

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-546701

(P2008-546701A)

(43) 公表日 平成20年12月25日(2008.12.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02 Z N A	2 G 0 4 5
<b>C 1 2 Q 1/37 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/37	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 P 25/28 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/28	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 K 38/43 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/48	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 35/76 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-517054 (P2008-517054)  
 (86) (22) 出願日 平成18年6月14日 (2006.6.14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年2月13日 (2008.2.13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/023135  
 (87) 国際公開番号 W02006/138355  
 (87) 国際公開日 平成18年12月28日 (2006.12.28)  
 (31) 優先権主張番号 60/690,841  
 (32) 優先日 平成17年6月14日 (2005.6.14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591054174  
 イェシバ・ユニバーシティ  
 YESHIVA UNIVERSITY  
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ブロンクス、モリス・パーク・アベニュー 1300  
 (74) 代理人 100110423  
 弁理士 曾我 道治  
 (74) 代理人 100084010  
 弁理士 古川 秀利  
 (74) 代理人 100094695  
 弁理士 鈴木 憲七  
 (74) 代理人 100111648  
 弁理士 梶並 順

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A $\beta$ 産生へのBRI蛋白の効果

## (57) 【要約】

A および/またはAID産生を、細胞により、抑制、阻害、または予防する方法、ならびに、アルツハイマー病を持っている被験体を処置する方法が、提供されている。化合物がBRI2またはBRI3の模倣体であるかどうか決定する方法も、提供されている。加えて、BRI2、BRI3、もしくはフリン、またはこれらの蛋白をコード化しているベクターの医薬組成物が、提供されている。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞により、A および/またはA I D 産生を、抑制、阻害、もしくは予防する方法であって、該細胞を、該細胞により、A および/またはA I D 産生を、抑制、阻害、もしくは予防するに有効な量のB R I 2もしくはB R I 3もしくはこれらの模倣体と接触させることを含む、方法。

**【請求項 2】**

前記細胞が、S E Q I D N O : 1の配列を持っているヒトB R I 2蛋白、もしくは、S E Q I D N O : 2の配列を持っているヒトB R I 3蛋白の、アミノ酸1 ~ 1 0 2に等価なアミノ酸および/またはペプチド模倣体を含むB R I 2もしくはB R I 3と接触され、ここで、該B R I 2蛋白および該B R I 3蛋白がそれぞれ、S E Q I D N O : 1およびS E Q I D N O : 2に少なくとも8 0 % 相同なアミノ酸配列を持つ、請求項1の方法。

10

**【請求項 3】**

前記B R I 2もしくはB R I 3が天然起源蛋白である、請求項2の方法。

**【請求項 4】**

前記B R I 2もしくはB R I 3がそれぞれ、S E Q I D N O : 1もしくはS E Q I D N O : 2の少なくともある部分に少なくとも9 0 % 相同なアミノ酸配列を持つ、請求項2の方法。

**【請求項 5】**

前記B R I 2もしくはB R I 3がそれぞれ、S E Q I D N O : 1もしくはS E Q I D N O : 2の少なくともある部分に少なくとも9 5 % 相同なアミノ酸配列を持つ、請求項2の方法。

20

**【請求項 6】**

前記B R I 2もしくはB R I 3がそれぞれ、S E Q I D N O : 1もしくはS E Q I D N O : 2の少なくともある部分に少なくとも9 8 % 相同なアミノ酸配列を持つ、請求項2の方法。

**【請求項 7】**

前記B R I 2もしくはB R I 3がそれぞれ、S E Q I D N O : 1もしくはS E Q I D N O : 2の少なくともある部分に1 0 0 % 相同である、請求項2の方法。

30

**【請求項 8】**

前記B R I 2もしくはB R I 3が、2 5 0 よりも少ないアミノ酸および/またはペプチド模倣体からなる、請求項2の方法。

**【請求項 9】**

前記B R I 2もしくはB R I 3が、2 0 0 よりも少ないアミノ酸および/またはペプチド模倣体からなる、請求項2の方法。

**【請求項 1 0】**

前記B R I 2もしくはB R I 3が、1 5 0 よりも少ないアミノ酸および/またはペプチド模倣体からなる、請求項2の方法。

**【請求項 1 1】**

前記B R I 2もしくはB R I 3が、1 2 5 よりも少ないアミノ酸および/またはペプチド模倣体からなる、請求項2の方法。

40

**【請求項 1 2】**

前記B R I 2もしくはB R I 3がそれぞれ、S E Q I D N O : 1もしくはS E Q I D N O : 2の配列を持っているヒトB R I 2もしくはB R I 3蛋白のアミノ酸1 ~ 1 0 2に等価なアミノ酸および/またはペプチド模倣体を含む、請求項2の方法。

**【請求項 1 3】**

前記細胞が、B R I 2と接触される、請求項1の方法。

**【請求項 1 4】**

前記細胞が、B R I 3と接触される、請求項1の方法。

50

- 【請求項 15】  
前記細胞が、BRI2もしくはBRI3模倣体と接触される、請求項1の方法。
- 【請求項 16】  
前記細胞が神経である、請求項1の方法。
- 【請求項 17】  
前記細胞が、神経様であるか、もしくは、神経へと分化していくことができる、請求項1の方法。
- 【請求項 18】  
前記細胞が、生存動物中にある、請求項1の方法。
- 【請求項 19】 10  
前記細胞が、生存動物中の神経である、請求項1の方法。
- 【請求項 20】  
前記細胞が、生存ヒト中にある、請求項1の方法。
- 【請求項 21】  
前記細胞が、BRI2もしくはBRI3蛋白の少なくともある前記部分をコード化している核酸配列を含んでいるベクターと接触される、請求項1の方法。
- 【請求項 22】  
前記ベクターが、前記細胞を感染させているウィルスベクターである、請求項21の方法。
- 【請求項 23】 20  
細胞により、A および/またはAID産生を、抑制、阻害、もしくは予防する方法であって、該細胞をフリント、該細胞におけるA および/またはAID産生を、抑制、阻害、もしくは予防するに有効な量で接触させることを含む、方法。
- 【請求項 24】  
前記フリングが、SEQ ID NO:3のアミノ酸配列108~794を持っているヒトフリンに少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む、請求項23の方法。
- 【請求項 25】  
前記フリングが、SEQ ID NO:3のアミノ酸配列108~794を持っているヒトフリンに少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、請求項23の方法。
- 【請求項 26】 30  
前記フリングがヒトフリンである、請求項23の方法。
- 【請求項 27】  
前記細胞が、フリン蛋白と接触される、請求項23の方法。
- 【請求項 28】  
前記フリン蛋白が、当該フリン蛋白をコード化している核酸配列を含んでいるベクターにより発現されている、請求項27の方法。
- 【請求項 29】  
前記ベクターがウィルスベクターである、請求項28の方法。
- 【請求項 30】  
前記細胞が神経である、請求項23の方法。
- 【請求項 31】 40  
前記細胞が、神経様であるか、もしくは、神経へと分化していくことができる、請求項23の方法。
- 【請求項 32】  
前記細胞が、生存動物中にある、請求項23の方法。
- 【請求項 33】  
前記細胞が、生存動物中における神経である、請求項23の方法。
- 【請求項 34】  
前記細胞が、生存ヒト中にある、請求項23の方法。
- 【請求項 35】 50

アルツハイマー病を持っている被験体を処置する方法であって、該被験体に、該被験体におけるアルツハイマー病を処置するに有効量のBRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体を投与することを含む、方法。

【請求項36】

前記被験体が、SEQ ID NO: 1のヒトBRI2蛋白配列、もしくは、SEQ ID NO: 2のヒトBRI3蛋白配列の、アミノ酸1~102に等価なアミノ酸および/またはペプチド模倣体を含むBRI2もしくはBRI3を投与され、ここで、該BRI2蛋白および該BRI3蛋白がそれぞれ、SEQ ID NO: 1およびSEQ ID NO: 2に少なくとも80%相同なアミノ酸配列を持つ、請求項35の方法。

【請求項37】

前記BRI2もしくはBRI3が天然起源蛋白である、請求項36の方法。

【請求項38】

前記被験体が、BRI2を投与される、請求項35の方法。

【請求項39】

前記被験体が、BRI3を投与される、請求項35の方法。

【請求項40】

前記被験体が、BRI2もしくはBRI3模倣体を投与される、請求項35の方法。

【請求項41】

前記BRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体が直接、前記被験体の脳に投与される、請求項35の方法。

【請求項42】

前記BRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体が、当該BRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体の、前記被験体の血液脳関門を横断できる能力を高める医薬組成物中において製剤されている、請求項35の方法。

【請求項43】

前記BRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体が、当該BRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体を、前記動物の血液脳関門を横断するようにさせるよう投与される、請求項35の方法。

【請求項44】

アルツハイマー病を持っている被験体を処置する方法であって、該被験体に、該被験体におけるアルツハイマー病を処置するに有効量のフリンを投与することを含む、方法。

【請求項45】

前記被験体が、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列108~794を持っているヒトフリンに等価なアミノ酸および/またはペプチド模倣体を含むフリンを投与され、ここで、該フリンが、SEQ ID NO: 3に少なくとも80%相同なアミノ酸配列を持つ、請求項44の方法。

【請求項46】

前記フリンが天然起源蛋白である、請求項44の方法。

【請求項47】

前記フリンが直接、前記被験体の脳に投与される、請求項44の方法。

【請求項48】

前記フリンが、当該フリンの、前記被験体の血液脳関門を横断できる能力を高める医薬組成物中において製剤されている、請求項44の方法。

【請求項49】

前記フリンが、前記化合物を、前記動物の血液脳関門を横断するようにさせるよう投与される、請求項44の方法。

【請求項50】

化合物が、BRI2もしくはBRI3の模倣体であるかどうか決定する方法であって：  
該化合物を、機能している - セクレターゼ、および、C99を含んでいる膜結合蛋白と組み合わせ、次いで、該化合物が、A および/またはAIDを放出するC99の開

10

20

30

40

50

裂を阻害するかどうか決定することを含み、ここで、該化合物が、もし - セクレターゼによる C 9 9 の開裂を阻害すれば、B R I 2 もしくは B R I 3 の模倣体である、方法。

【請求項 5 1】

A および / または A I D を放出する C 9 9 の開裂の阻害が、前記化合物が、A および / または A I D の放出を阻害するかどうか決定することにより決定される、請求項 5 0 の方法。

【請求項 5 2】

A および / または A I D を放出する C 9 9 の開裂の阻害が、前記化合物が、C 9 9 存在の増加を引き起こすかどうか決定することにより決定される、請求項 5 0 の方法。

【請求項 5 3】

A および / または A I D を放出する C 9 9 の開裂の阻害が、前記化合物が、C 8 3 存在の減少を引き起こすかどうか決定することにより決定される、請求項 5 0 の方法。

【請求項 5 4】

A および / または A I D を放出する C 9 9 の開裂の阻害が、前記化合物が、s A P P 存在の減少を引き起こすかどうか決定することにより決定される、請求項 5 0 の方法。

【請求項 5 5】

A および / または A I D を放出する C 9 9 の開裂の阻害が、前記化合物が、s A P P 存在の増加を引き起こすかどうか決定することにより決定される、請求項 5 0 の方法。

【請求項 5 6】

前記方法が E L I S A を利用し、ペプチドを定量する、請求項 5 0 の方法。

【請求項 5 7】

前記方法が質量分析を利用する、請求項 5 0 の方法。

【請求項 5 8】

前記方法がウェスタン・プロットを利用し、ペプチドを同定および / または定量する、請求項 5 0 の方法。

【請求項 5 9】

前記化合物が、配列 S E Q I D N O : 1 もしくは S E Q I D N O : 2 をそれぞれ持っているヒト B R I 2 もしくは B R I 3 蛋白のアミノ酸 1 ~ 1 0 2 に等価なアミノ酸を含んでいる B R I 2 もしくは B R I 3 蛋白のある部分を模倣するよう設計 ( デザイン ) されている、請求項 5 0 の方法。

【請求項 6 0】

前記化合物が、前記 B R I 2 もしくは B R I 3 蛋白の前記部分の 3 次元構造および / または電荷を模倣する、請求項 5 9 の方法。

【請求項 6 1】

前記 B R I 2 もしくは B R I 3 蛋白が、B R I 2 蛋白である、請求項 5 9 の方法。

【請求項 6 2】

前記 B R I 2 もしくは B R I 3 蛋白が、B R I 3 蛋白である、請求項 5 9 の方法。

【請求項 6 3】

C 9 9 を含んでいる前記膜結合蛋白が、アミロイド前駆体蛋白 ( A P P ) である、請求項 5 0 の方法。

【請求項 6 4】

機能している前記 - セクレターゼ、および、C 9 9 を含んでいる膜結合蛋白が、生存細胞中にある、請求項 5 0 の方法。

【請求項 6 5】

前記生存細胞が、- セクレターゼによる遺伝子導入 ( トランスジェニック ) A P P 開裂時、レポーター遺伝子の転写を活性化させる遺伝子構築体を含む、請求項 5 0 の方法。

【請求項 6 6】

前記レポーター遺伝子がルシフェラーゼである、請求項 6 5 の方法。

【請求項 6 7】

前記遺伝子導入 ( トランスジェニック ) A P P が更に、G a l 4 を、当該遺伝子導入 (

10

20

30

40

50

トランスジェニック) A P P の細胞質部位 (ドメイン) で含む、請求項 6 5 の方法。

【請求項 6 8】

前記生存哺乳類細胞が、神経細胞である、請求項 6 4 の方法。

【請求項 6 9】

前記生存哺乳類細胞が、遺伝子導入 (トランスジェニック) A P P を産生する、請求項 6 4 の方法。

【請求項 7 0】

前記生存哺乳類細胞が、H E K 2 9 3 細胞、H e L a 細胞、もしくは N 2 a 細胞由来である、請求項 6 9 の方法。

【請求項 7 1】

精製 B R I 2 もしくは B R I 3 を、医薬として許容可能な賦形剤中において含む組成物。

【請求項 7 2】

前記 B R I 2 もしくは B R I 3 が、S E Q I D N O : 1 の配列を持っているヒト B R I 2 蛋白、もしくは、S E Q I D N O : 2 の配列を持っているヒト B R I 3 蛋白の、アミノ酸 1 ~ 1 0 2 に等価なアミノ酸および/またはペプチド模倣体を含み、ここで、該 B R I 2 蛋白および該 B R I 3 蛋白がそれぞれ、S E Q I D N O : 1 および S E Q I D N O : 2 に少なくとも 8 0 % 相同なアミノ酸配列を持つ、請求項 7 1 の組成物。

【請求項 7 3】

前記 B R I 2 もしくは B R I 3 が B R I 2 である、請求項 7 1 の組成物。

【請求項 7 4】

前記 B R I 2 もしくは B R I 3 が B R I 3 である、請求項 7 1 の組成物。

【請求項 7 5】

前記 B I R 2 もしくは B R I 3 が、2 5 0 よりも少ないアミノ酸および/またはペプチド模倣体からなる、請求項 7 1 の組成物。

【請求項 7 6】

前記 B I R 2 もしくは B R I 3 が、2 0 0 よりも少ないアミノ酸および/またはペプチド模倣体からなる、請求項 7 1 の組成物。

【請求項 7 7】

前記 B I R 2 もしくは B R I 3 が、1 5 0 よりも少ないアミノ酸および/またはペプチド模倣体からなる、請求項 7 1 の組成物。

【請求項 7 8】

前記 B I R 2 もしくは B R I 3 が、1 2 5 よりも少ないアミノ酸および/またはペプチド模倣体からなる、請求項 7 1 の組成物。

【請求項 7 9】

医薬として許容可能な前記賦形剤が、前記 B R I 2 もしくは B R I 3 の、前記被験体の血液脳関門を横断できる能力を高める、請求項 7 1 の組成物。

【請求項 8 0】

前記組成物が、単位用量の形で、アルツハイマー病処置用に製剤されている、請求項 7 1 の組成物。

【請求項 8 1】

精製フリンを、医薬として許容可能な賦形剤中において含む組成物。

【請求項 8 2】

前記フリンが、S E Q I D N O : 3 のアミノ酸配列 1 0 8 ~ 7 9 4 を持っているヒトフリンに等価なアミノ酸および/またはペプチド模倣体を含み、ここで、該フリンが、S E Q I D N O : 3 に少なくとも 8 0 % 相同なアミノ酸配列を持つ、請求項 8 1 の組成物。

【請求項 8 3】

前記フリンが天然起源蛋白である、請求項 8 1 の組成物。

【請求項 8 4】

10

20

30

40

50

医薬として許容可能な前記賦形剤が、前記フリンの、前記被験体の血液脳関門を横断できる能力を高める、請求項 8 1 の組成物。

【請求項 8 5】

前記組成物が、単位用量の形で、アルツハイマー病処置用に製剤されている、請求項 8 1 の組成物。

【請求項 8 6】

B R I 2 もしくは B R I 3 をコード化しているベクターを、医薬として許容可能な賦形剤中において含む組成物。

【請求項 8 7】

前記 B R I 2 もしくは B R I 3 が、S E Q I D N O : 1 の配列を持っているヒト B R I 2 蛋白、もしくは、S E Q I D N O : 2 の配列を持っているヒト B R I 3 蛋白の、アミノ酸 1 ~ 1 0 2 に等価なアミノ酸を含み、ここで、該 B R I 2 蛋白および該 B R I 3 蛋白がそれぞれ、S E Q I D N O : 1 および S E Q I D N O : 2 に少なくとも 8 0 % 相同なアミノ酸配列を持つ、請求項 8 6 の組成物。

10

【請求項 8 8】

医薬として許容可能な前記賦形剤が、前記 B R I 2 もしくは B R I 3 の、前記被験体の血液脳関門を横断できる能力を高める、請求項 8 6 の組成物。

【請求項 8 9】

前記組成物が、単位用量の形で、アルツハイマー病処置用に製剤されている、請求項 8 6 の組成物。

20

【請求項 9 0】

前記ベクターがウイルスである、請求項 8 6 の組成物。

【請求項 9 1】

フリンをコード化しているベクターを、医薬として許容可能な賦形剤中において含む組成物。

【請求項 9 2】

前記フリンが、S E Q I D N O : 3 のアミノ酸配列 1 0 8 ~ 7 9 4 を持っているヒトフリンに等価なアミノ酸を含み、ここで、該フリンが、S E Q I D N O : 3 に少なくとも 8 0 % 相同なアミノ酸配列を持つ、請求項 9 1 の組成物。

30

【請求項 9 3】

前記フリンが天然起源蛋白である、請求項 9 1 の組成物。

【請求項 9 4】

医薬として許容可能な前記賦形剤が、前記フリンの、前記被験体の血液脳関門を横断できる能力を高める、請求項 9 1 の組成物。

【請求項 9 5】

前記組成物が、単位用量の形で、アルツハイマー病処置用に製剤されている、請求項 9 1 の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

40

連邦協賛研究開発に関わっている陳述

米国政府は、支払い済みのライセンスを本発明において持ち、その権利を限られた環境において持ち、本特許権者に他者を合理的な期間、ライセンスするよう要求し、G r a n t s A G 2 2 0 2 4 - 9 5 2 6 4 5 6 2 および A G 2 1 5 8 8 - 9 5 2 6 4 8 7 8 の期間により与えられたとおりであり、N I H により報奨された。

【0 0 0 2】

( 1 ) 本発明の分野

本発明は一般的に、アルツハイマー病における A 産生の制御(コントロール)に関する。より具体的には、本発明は、B R I 蛋白の使用に関し、C 9 9 の - セクレターゼ開裂ならびに A および / または A P P の細胞内(ドメイン、A I D ) の放出を阻害する。

50

## 【背景技術】

【0003】

## (2) 関連技術の記述

## 参考文献

- Cao, X., and Sudhof, T. C. (2001) *Science* 293, 115-120.
- Cupers, P., Orlans, L, Craessaerts, K., Annaert, W., and De Strooper, B. (2001) *J Neurochem* 78, 1168-1178.
- Deleersnijder, W., Hong, G., Cortvrindt, R., Poirier, C, Tylzanowski, P., Pittois, K., Van Marck, E., and Merregaert, J. (1996) *J Biol Chem* 271, 19475-19482.
- Gandy, S. (2005) *J Clin Invest* 115, 1121-1129.
- Gianni, D., Zambrano, N., Bimonte, M., Minopoli, G., Mercken, L., Talamo, F., Scaloni, A., and Russo, T. (2003) *J Biol Chem* 278, 9290-9297.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C, Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., and et al. (1991) *Nature* 349, 704-706.
- Holton, J. L., Lashley, T., Ghiso, J., Braendgaard, H., Vidal, R., Guerin, C. J., Gibb, G., Hanger, D. P., Rostagno, A., Anderton, B. H., Strand, C, Ayling, H., Plant, G., Frangione, B., Bojersen-Moller, M., and Revesz, T. (2002) *J Neuropathol Exp Neurol* 61, 254-267.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. (1987) *Nature* 325, 733-736.
- Kieber-Emmons et al. (1997) *Curr. Opin, Biotechnol.* 8, 435-441.
- Kim, S. H., Wang, R., Gordon, D. J., Bass, J., Steiner, D. F., Lynn, D. G., Thinakaran, G., Meredith, S. C, and Sisodia, S. S. (1999) *Nat Neurosci* 2, 984-988.
- Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 6382-6387.
- Kopan, R. (2002) *J Cell Sci* 115, 1095-1097.
- Levy-Lahad, E., Wijsman, E. M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K. A., Weber, J. L., Bird, T. D., and Schellenberg, G. D. (1995a) *Science* 269, 970-973.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingel, W. H., Yu, C.E., Jondro, P. D., Schmidt, S. D., Wang, K., and et al. (1995b) *Science* 269, 973-977.
- Maulik et al. (1997) *Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies*, Wiley-Liss, Inc.
- Matsuda, S., Yasukawa, T., Homma, Y., Ito, Y., Niikura, T., Hiraki, T., Hirai, S., Ohno, S., Kita, Y., Kawasumi, M., Kouyama, K., Yamamoto, T., Kyriakis, J. M., and Nishimoto, I. (2001) *J Neurosci* 21, 6597-6607.
- Passer, B., Pellegrini, L., Russo, C, Siegel, R. M., Lenardo, M. J., Schettini, G., Bachmann, M., Tabaton, M., and D'Adamio, L. (2000) *J Alzheimers Dis* 2, 289-301.
- Pickford, F., Onstead, L., Camacho-Prihar, C, Hardy, J., and McGowan, E. (2003) *Neurosci Lett* 338, 95-98.
- Pittois, K., Deleersnijder, W., and Merregaert, J. (1998) *Gene* 217, 141-149.
- Ripka et al. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 441-452.
- Rogaev, E. L, Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C, Holman, K., Tsuda, T., and et al. (1995) *Nature* 376, 775-778.

10

20

30

40

50

Sanchez-Pulido, L., Devos, D., and Valencia, A. (2002) Trends Biochem Sci 27, 329-332.

Sanderson (1999) Med. Res. Rev. 19, 179-197.

Selkoe, D., and Kopan, R. (2003) Annu Rev Neurosci 26, 565-597.

Scheinfeld, M. H., Roncarati, R., Vito, P., Lopez, P. A., Abdallah, M., and D'Adamio, L. (2002) J Biol Chem 277, 3767-3775.

Scheinfeld, M. H., Ghersi, E., Davies, P., and D'Adamio, L. (2003) J Biol Chem 278, 42058-42063.

Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., and et al. (1995) Nature 375, 754-760. 10

Sisodia, S. S., and St George-Hyslop, P. H. (2002) Nat Rev Neurosci 3, 281-290.

Stagljar, L., Korostensky, C, Johnsson, N., and te Heesen, S. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 5187-5192.

Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C, Bruns, G. A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M. L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D. M., and Neve, R. L. (1987) Science 235, 880-884.

Thomas, G. (2002) Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3, 753-766.

Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C, Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999) Science 286, 735-741. 20

Vidal, R., Frangione, B., Rostagno, A., Mead, S., Revesz, T., Plant, G., and Ghiso, J. (1999) Nature 399, 776-781.

Vidal, R., Revesz, T., Rostagno, A., Kim, E., Holton, J. L., Bek, T., Bojzen-Moller, M., Braendgaard, H., Plant, G., Ghiso, J., and Frangione, B. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97, 4920-4925.

Vidal, R., Calero, M., Revesz, T., Plant, G., Ghiso, J., and Frangione, B. (2001) Gene 266, 95-102. 30

Zambrano, N., Buxbaum, J. D., Minopoli, G., Fiore, F., De Candia, P., De Renzis, S., Faraonio, R., Sabo, S., Cheetham, J., Sudol, M., and Russo, T. (1997) J Biol Chem 272, 6399-6405.

#### 【 0 0 0 4 】

アミロイド前駆体蛋白 (APP) は、普遍的な I 型 (タイプ I) 膜貫通蛋白 (Kangら、1987年; Tanziら、1987年) であり、一連の内での蛋白溶解現象 (SelkoeおよびKopan、2003年; SisodiaおよびSt.George-Hyslop、2002年) を受ける。APP はまず、原形質膜または細胞内小器官において、 $\alpha$ -セクレターゼにより開裂される (Vassarら、1999年)。その外の部位 (ドメイン) が、細胞外で (sAPP)、もしくは細胞内コンパートメントの管腔 (ルーメン) 中に放出される一方、99アミノ酸 (C99) のCOOH-末断片が、膜に結合したままである。第2の、膜内蛋白溶解現象において、C99が開裂され、やや1a x 部位 (サイト) 特異的であり、 $\beta$ -セクレターゼによる。2種のペプチドが、1:1化学量論比で放出され、そのアミロイド原性Aペプチドは、40および42アミノ酸の2種の主要な種 (それぞれ、A40およびA42) からなっており、細胞内産物は、APP Intracellular Domain (AIDもしくはAICD) と名付けられ、非常に短命であり、最近でだけ (Passerら、2000年; CaoおよびSudhof、2001年; Cupersら、2001年) 同定されている。代替りの蛋白溶解経路において、APPはまず、 $\alpha$ -セクレターゼにより、A配列中においてプロセッシングされ、可溶性APP (sAPP) 外部位、および、83アミノ酸 (C 40

83) の膜結合 COOH - 未断片産生に至る。C83も、 $\beta$ -セクレターゼにより、P3 および AIDペプチドへと開裂される。A $\beta$  がアルツハイマー病の病理において含まれている一方、AIDが殆どのAPPシグナル伝達機能を媒介する。ADにおけるAPPプロセッシングに関する病理的な役割が、APPにおける突然変異を見出すことにより、確認されており (Goateら、1991)、 $\beta$ -セクレターゼの鍵(キー)の成分たる Presenilin類 (Sherringtonら、1995; Levy-Lahadら、1995a, b; Rogaevara、1995) が、常染色体優性家族形のADを引き起こす。これゆえ、この生物学的および病理学的重要さにより、如何にAPP開裂が規制されているのか理解していく必要がある。本発明は、この必要性を課題とする。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

従って、本発明者らは、BRI2およびBRI3が、APPからの、A $\beta$  およびAPP細胞内部位(ドメイン、AID)産生を阻害することを見出した。

【課題を解決するための手段】

【0006】

これゆえ、ある幾つかの実施形態において、本発明は、A $\beta$  および/またはAID産生を細胞により、抑制、阻害、または予防していく方法に関する。これら方法は、本細胞をBRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体と、A $\beta$  および/またはAID産生を本細胞により、抑制、阻害、または予防するに有効な量で接触させていくことを含む。

【0007】

他の実施形態において、本発明は、A $\beta$  および/またはAID産生を細胞により、抑制、阻害、または予防していく更なる方法に関する。これら方法は、本細胞をフリン(furin)と、本細胞におけるA $\beta$  および/またはAID産生を、抑制、阻害、または予防するに有効な量で接触させていくことを含む。

【0008】

加えて、本発明は、アルツハイマー病を持っている被験体を処置していく方法に関する。これら方法は、本被験体に、本被験体におけるアルツハイマー病を処置するに有効な量のBRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体を投与していくことを含む。

【0009】

更なる実施形態において、本発明は、アルツハイマー病を持っている被験体を処置していく他の方法に関する。これら方法は、本被験体に、本被験体におけるアルツハイマー病を処置するに有効な量のフリンを投与していくことを含む。

【0010】

本発明は、化合物が、BRI2もしくはBRI3の模倣体であるかどうか決定していく方法にも関する。これら方法は、本化合物を、機能している $\beta$ -セクレターゼ、および、C99を含んでいる膜結合蛋白と組み合わせ、次いで、本化合物が、A $\beta$  および/またはAIDを放出するC99の開裂を阻害するかどうか決定していくことを含む。これらの実施形態において、本化合物が、もし $\beta$ -セクレターゼによるC99の開裂を阻害すれば、BRI2もしくはBRI3の模倣体である。

【0011】

更なる実施形態において、本発明は、精製BRI2もしくはBRI3を、医薬として許容可能な賦形剤において含んでいる組成物に関する。

【0012】

更なる実施形態において、本発明は、精製フリンを、医薬として許容可能な賦形剤において含んでいる組成物に関する。

【0013】

本発明は、BRI2もしくはBRI3をコード化しているベクターを、医薬として許容可能な賦形剤において含んでいる組成物にも関する。

【0014】

10

20

30

40

50

他の実施形態において、本発明は、フリンをコード化しているベクターを、医薬として許容可能な賦形剤において含んでいる組成物にも関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明は一部、本発明者らの、BRI2およびBRI3が、APPからのA産生を阻害するとの発見に基づいている。APP細胞内部位(ドメイン)(AID)は混在して、Aと共に産生されるので、A産生を阻害すれば、AID産生をも阻害する。如何なる特定の機序(メカニズム)にも結び付けられることなく、このA産生阻害は、 $\beta$ -セクレターゼによるAPPおよび $\gamma$ -セクレターゼによるC99の開裂阻害により、BRI2およびBRI3により、C99産生およびC99からのA放出を阻害していると思われる。実施例参照。

10

【0016】

これゆえ、ある幾つかの実施形態において、本発明は、Aおよび/またはAID産生を細胞により、抑制、阻害、または予防していく方法に関する。これら方法は、本細胞をBRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体と、Aおよび/またはAID産生を本細胞により、抑制、阻害、または予防するに有効な量で、接触させていくことを含む。

【0017】

これらの実施形態において、BRI2およびBRI3は、脊椎動物の膜統合蛋白であり、 $\langle \langle$ 膜統合蛋白2B $\rangle \rangle$ および $\langle \langle$ 膜統合蛋白2C $\rangle \rangle$ としても、それぞれ知られている。ヒトの野生型の形のこれらの蛋白は、アミノ酸配列SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2をそれぞれ持ち、cDNA配列が、GenBank寄託NM021999(BRI2)、ならびに、NM030926、NM001012516、およびNM001012514(3種の転写変異体のBRI3)として提供された。加えて、マカク(Macaque)に関するBRI2アミノ酸配列およびマウスに関するBRI3アミノ酸配列が、GenBank寄託Q60HC1およびNP071862として、それぞれ知られている。このならびに他の既知のBRI2およびBRI3情報を用いれば、当業者であれば、日常の(ルーティーン)方法を使用して、如何なる脊椎動物に関しても、BRI2およびBRI3配列を決定できる。如何なる脊椎動物のBRI2およびBRI3蛋白も、少なくとも80%SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2にそれぞれ相同なアミノ酸配列を持つと予期される。

20

30

【0018】

本発明者らは、遺伝子的にBRI2蛋白の部分を合成して、アミノ酸1~102だけからなっているBRI2蛋白が、Aおよび/またはAID産生を、抑制、阻害、または予防するに充分であることも決定している。実施例1および2参照。

【0019】

BRI2またはBRI3が、本方法において使用されたが、ペプチド模倣体をも含む得る。本明細書において使用される場合、ペプチド模倣体とは、ある1種の蛋白における天然の親種のアミノ酸を模倣可能である化合物であり、当該ペプチド模倣体でのアミノ酸の置換が、当該蛋白の活性に有意に影響を及ぼさない。ペプチド模倣体を含んでいる蛋白は一般的に、プロテアーゼの良くない基質であり、その天然蛋白に比較されると、より長い期間の時間、*in vivo*において活性であることが多い。多くの加水分解不可能なペプチド結合類似体が当業界において知られており、このような結合を含有しているペプチド合成への手順を伴っている。加水分解不可能な結合は、 $-CH_2NH$ 、 $-COCH_2$ 、 $-CH(CN)NH$ 、 $-CH_2CH(OH)$ 、 $-CH_2O$ 、 $CH_2S$ を包含する。加えて、ペプチド模倣体含有ペプチドは、より低アレルギー性たり得、全体的により高いバイオアベイラビリティを示し得る。当業者であれば、ペプチド模倣体を含んでいる蛋白の設計(デザイン)および合成が、過度の実験を必要としないと理解する。例えば、Ripkara(1998年); Kieber-Emmonsら(1997年); Sanderson(1999年)参照。

40

【0020】

50

これゆえ、これらの方法の好ましい実施形態において、本細胞が、B R I 2もしくはB R I 3と接触されており、これは、アミノ酸および/またはペプチド模倣体を含み、これは、配列SEQ ID NO: 1を持っているヒトB R I 2蛋白または配列SEQ ID NO: 2を持っているヒトB R I 3蛋白のアミノ酸1~102に等価であり、B R I 2蛋白およびB R I 3蛋白は、SEQ ID NO: 1およびSEQ ID NO: 2に少なくとも80%相同なアミノ酸配列を、それぞれ持つ。

#### 【0021】

他の好ましい実施形態において、B R I 2もしくはB R I 3は、天然蛋白である。ある幾つかの好ましい実施形態において、B R I 2もしくはB R I 3は、ヒトB R I 2もしくはB R I 3に、80%相同的であるよりも、類似している。それらの実施形態において、B R I 2もしくはB R I 3は好ましくは、SEQ ID NO: 1もしくはSEQ ID NO: 2それぞれの少なくとも一部分に少なくとも90%相同的なアミノ酸配列を持ち、より好ましくは、SEQ ID NO: 1もしくはSEQ ID NO: 2それぞれの少なくとも一部分に少なくとも95%相同的であり、尚より好ましくは、B R I 2もしくはB R I 3が、SEQ ID NO: 1もしくはSEQ ID NO: 2それぞれの少なくとも一部分に少なくとも98%相同的なアミノ酸配列を持つ。最も好ましい実施形態において、B R I 2もしくはB R I 3が、SEQ ID NO: 1もしくはSEQ ID NO: 2それぞれの少なくとも一部分に100%相同的である。

10

#### 【0022】

B R I 2もしくはB R I 3はこれらの方法において、これらの蛋白の最初の102アミノ酸程度からなり得るので、本明細書において使用される場合、“B R I 2”もしくは“B R I 3”は、全長B R I 2もしくはB R I 3蛋白、例えばSEQ ID NO: 1およびSEQ ID NO: 2において与えられたようなものよりも小さい蛋白を包含する。これゆえ、これら蛋白は、250、200、150、もしくは125アミノ酸および/またはペプチド模倣体よりも少なくできる。他の好ましい実施形態において、B R I 2もしくはB R I 3は、配列SEQ ID NO: 1もしくはSEQ ID NO: 2をそれぞれ持っているヒトB R I 2もしくはB R I 3蛋白のアミノ酸1~102に等価なアミノ酸および/またはペプチド模倣体を含む。

20

#### 【0023】

B R I 2もしくはB R I 3は本明細書において、更なる有用な部分、例えば、当該蛋白のゆっくりとした放出もしくは抑制された分解を可能とする足場つまりPEGのような部分、または、ある特定の型の細胞に対する標的化を可能とする核酸配列のような部分をも更に含み得る。

30

#### 【0024】

これらの方法において、本細胞は、B R I 2、B R I 3、またはB R I 2もしくはB R I 3の模倣体と接触され得る。本明細書において使用された場合、模倣体とは、天然物ペプチド、ここではB R I 2もしくはB R I 3の生物学的作用を模倣できる如何なるペプチドもしくは非ペプチド化合物をも言い、しばしば、当該模倣体が、当該天然物ペプチドの基本構造を模倣する基本構造を持つか、および/または、当該天然物ペプチドの突出した生物学的特性を持つからである。模倣体は：側鎖のない当該天然物ペプチドとの類似性のような原型からの実質的な修飾を持つペプチド（このような修飾は例えば、分解に対する感受性を減少させることがある）；抗イデオタイプおよび/または触媒抗体もしくはこれらの断片；単離された蛋白の非蛋白部分（例えば、炭水化物の構造体）；あるいは、例えば、コンビナトリアルケミストリーを通じて同定された核酸および薬剤を包含して、合成もしくは天然有機分子を包含し得るが、これらに限られていない。このような模倣体が、当業界において既知の種々の方法を使用して、設計（デザイン）、選択、および/または、さもなくば同定され得る。薬剤設計（ドラッグデザイン）の種々の方法が、本発明において有用な模倣体もしくは他の治療化合物を設計（デザイン）するのに有用であり、M a u l i kら、1997年において開示されており、本明細書においてその全体が援用されている。

40

50

## 【0025】

これらの方法は、如何なる特定細胞を用いる使用にも限られておらず、但し、当該細胞が、A および/またはA I Dを産生できる。これらの方法と共に利用され得る細胞の非限定例は、神経、ならびに、A P Pを、天然に、もしくは、遺伝子操作を通して発現する本質的に如何なる他の哺乳類細胞でもある（実施例参照）。本細胞は、神経様でもあり得、もしくは、神経へと分化していくこともできる（例えば、幹細胞）。ある幾つかの好ましい実施形態において、本細胞は、生存哺乳類中にある。好ましくは、本哺乳類は、アルツハイマー病の実験モデル、もしくは、ヒトである。他の好ましい実施形態において、本細胞は、生存哺乳類、好ましくは、ヒトにおける神経である。最も好ましい実施形態において、本ヒトは、アルツハイマー病を持つか、または、アルツハイマー病を獲得してしまうリスクに晒されており、アルツハイマー病に対する遺伝素質を持つような誰かである。

10

## 【0026】

本細胞は、B R I 2もしくはB R I 3もしくは模倣体と、如何なる既知の方法によっても接触され得る。実施例は、B R I 2もしくはB R I 3もしくは模倣体を直接適用してみることを、または、B R I 2もしくはB R I 3もしくは模倣体を本細胞を停留させている哺乳類に投与してみることを包含し、こうして、B R I 2もしくはB R I 3もしくは模倣体が、例えば、循環系を通過して、もしくは、血液脳関門（B B B）を横断して、本細胞に辿り着く。B R I 2もしくはB R I 3もしくは模倣体が蛋白である場合（つまり、B R I 2もしくはB R I 3蛋白）、本細胞は、B R I 2もしくはB R I 3蛋白の少なくとも1部分をコード化している核酸配列を含んでいるウィルスベクターのようなベクターと接触され得、ここで、当該核酸によりコード化されたB R I 2もしくはB R I 3の翻訳が、この接触を有効化させる。後者の方法が好ましい方法であり、特に、当該ベクターが本細胞に入っていくことができる場合である（例えば、本細胞のウィルス感染）。

20

## 【0027】

B R I 2およびB R I 3はフリンによりプロセシングされ、その産物がC 9 9プロセシング阻害を引き起こす。これゆえ、本細胞におけるフリンの増加も、A および/またはA I D産生を、抑制、阻害、または予防する。

## 【0028】

これゆえ、本発明は、A および/またはA I D産生を、細胞により、抑制、阻害、または予防していく更なる方法にも関する。これら方法は、本細胞をフリンと、A および/またはA I D産生を、本細胞において、抑制、阻害、または予防するのに有効な量で接触させていくことを含む。

30

## 【0029】

フリン、つまり塩基性アミノ酸対開裂酵素は、細胞膜貫通型I蛋白原蛋白変換酵素（T h o m a s、2 0 0 2）である。ヒト野生型前原フリン（プレプロフリン）は、アミノ酸配列S E Q I D N O : 3を持ち、c D N A配列がG e n B a n k寄託N M 0 0 2 5 6 9として与えられている。その成熟蛋白は、配列S E Q I D N O : 3もしくはこれのアミノ酸1 0 8 ~ 7 9 4を持つ。加えて、マウスに関するフリンのアミノ酸配列が、G e n B a n k寄託N P 0 3 5 1 7 6として知られている。脊椎動物のフリン周辺のこのおよび他の既知の情報を用いれば、当業者であれば、フリン配列を、如何なる脊椎動物に関しても、通常の（ルーティーン）方法を使用して決定できる。如何なる脊椎動物フリン蛋白も、S E Q I D N O : 3のアミノ酸1 0 8 ~ 7 9 4に少なくとも8 0 % 相同なアミノ酸配列を持つと予期される。好ましい実施形態において、フリンが、S E Q I D N O : 3のアミノ酸配列1 0 8 ~ 7 9 4を持っているヒトフリンに少なくとも9 5 % 同一なアミノ酸配列を含み、最も好ましい実施形態において、フリンはヒトフリンである。

40

## 【0030】

本明細書におけるフリンは更に、更なる有用な部分も含み得、例えば、当該蛋白のゆっくりとした放出もしくは抑えられた分解を可能とする足場もしくはP E Gのような部分であるか、または、ある特定の型の細胞に対する標的化を可能とする核酸配列のような部分である。

50

## 【0031】

これらの方法において、本細胞が、天然フリンの活性を促進する化合物、例えばプロフリンをフリンに変換するペプチダーゼ、または、BRI蛋白が存在している部位(サイト)へのフリン輸送を促進する化合物と接触され得る。しかしながら、好ましい実施形態において、本細胞が、フリン蛋白と接触され、例えば、フリン蛋白を、本細胞を停留させている哺乳類に投与していくことにより、こうして、フリンが本細胞に辿り着き、例えば、循環系を通して、もしくは、BBBを横断していくことによる。より好ましい実施形態において、フリンが、フリン蛋白をコード化している核酸配列を含むベクターから発現されている。好ましくは、これらのベクターはウィルスベクターであり、本細胞に感染し、こうして、フリン蛋白を *in situ* において産生していく。

10

## 【0032】

これらの方法は、いずれの特定細胞を用いる使用にも限られておらず、但し、本細胞が、A および/またはAIDを産生していくことができる。これらの方法と共に利用され得る非限定例の細胞は、神経、および、天然もしくは遺伝子操作を通してAPPを発現する本質的に如何なる他の哺乳類細胞でもある(実施例参照)。本細胞は、神経様でもあり得、もしくは、神経へと分化していくこともできる(例えば、幹細胞)。ある幾つかの好ましい実施形態において、本細胞は、生存哺乳類中にある。好ましくは、本哺乳類は、アルツハイマー病実験モデル、もしくは、ヒトである。他の好ましい実施形態において、本細胞は、生存哺乳類、好ましくはヒト中の神経である。最も好ましい実施形態において、ヒトがアルツハイマー病を持つか、または、アルツハイマー病を獲得してしまうリスクに晒されており、アルツハイマー病に対する遺伝素因を持つような誰かである。

20

## 【0033】

他の実施形態において、本発明は、アルツハイマー病を持っている被験体を処置していく方法に関する。これら方法は、本被験体に、アルツハイマー病を本被験体において処置するに有効量のBRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体を投与していることを含む。

## 【0034】

これらの方法において、本被験体は好ましくは、ヒトBRI2蛋白配列SEQ ID NO:1アミノ酸1~102、または、ヒトBRI3蛋白配列SEQ ID NO:2に等価なアミノ酸および/またはペプチド模倣体を含むBRI2もしくはBRI3を投与されている。これらの実施形態において、BRI2蛋白およびBRI3蛋白は、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2に少なくとも80%相同なアミノ酸配列を、それぞれ持つ。他の好ましい実施形態において、BRI2もしくはBRI3が、天然起源蛋白である。

30

## 【0035】

これらの方法において、BRI2もしくはBRI3もしくは模倣体が直接本被験体の脳に、投与され得る。あるいは、BRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体が、当該BRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体を、本哺乳類のBBBを横断させるような様式で、投与されている。BRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体は、医薬組成物中においても製剤され得、当該BRI2もしくはBRI3もしくはこれらの模倣体が本被験体のBBBを横断できる能力を促進させる。

40

## 【0036】

他に限られなければ、医薬組成物は、本明細書において記載された如何なる実施形態においても、過度の実験なしに、哺乳類に対する投与用に製剤され得、ヒトを包含し、その特定の適用にとって適切なようである。加えて、適正な用量のこれら組成物は、過度の実験なしに、標準的な用量-応答プロトコールを使用して、求められ得る。

## 【0037】

従って、口、舌、舌下、口腔、および口腔内投与用に設計(デザイン)されたこれら組成物は、過度の実験なしに、当業界においてよく知られた手段により、例えば、不活性稀釈剤を用いてもしくは食べられる担体を用いて、調製され得る。本組成物は、ゼラチンカ

50

プセル中において閉じられるか、もしくは、錠剤（タブレット）へと圧縮されてよい。口腔治療投与目的に、本発明の医薬組成物が、賦形剤と共に取り込まれ、錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁、シロップ、ウェハウス、チュウイングガム等の形で使用されてよい。

【0038】

錠剤、ピル、カプセル、トローチ等が、バインダー、レシピエント、崩壊剤、潤滑剤、甘味料、および香料をも含有してよい。ある幾つかの例のバインダーは、微結晶セルロース、トラガカントゴム、もしくはゼラチンを包含する。賦形剤の例は、スターチもしくはラクトースを包含する。ある幾つかの例の崩壊剤は、アルギン酸、コーンスターチ等を包含する。潤滑剤の例は、ステアリン酸マグネシウムもしくはステアリン酸カリウムを包含する。ある1つの例の潤滑剤は、コロイド状二酸化珪素である。ある幾つかの例の甘味料は、スクロース、サッカリン等を包含する。香料の例は、ペパーミント、サリチル酸メチル、オレンジ香料等を包含する。これらの種々の組成物を調製していくのに使用される材料は、医薬として純粋であり、使用量において非毒性であるべきである。

10

【0039】

本発明の組成物は容易に、例えば、静脈内、筋内、蜘蛛膜内、もしくは皮下注射のように、非経口投与され得る。非経口投与は、本発明の組成物を溶液もしくは懸濁中に取り込んでいくことにより、達成され得る。このような溶液もしくは懸濁は、注射用水、食塩水、固定化油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、もしくは他の合成溶媒のような無菌稀釈剤をも包含してよい。非経口製剤は、例えばベンジルアルコールもしくはメチルパラベンのような抗菌剤、例えばアスコルビン酸もしくは重亜硫酸ナトリウムのような抗酸化剤、ならびに、EDTAのようなキレート剤をも包含してよい。酢酸塩（アセテート）、クエン酸塩（シトレート）、もしくは燐酸塩（ホスフェート）のような緩衝剤、ならびに、塩化ナトリウム（食塩）もしくはデキストロースのような浸透圧調整剤も、加えられてよい。本非経口調製品は、アンプル、使い捨てシリンジ、または、ガラスもしくはプラスチックでできた多数回用量バイアル中において閉じ込められ得る。

20

【0040】

直腸投与は、本医薬組成物を、直腸もしくは大腸中に投与していくことを包含する。これは、坐薬もしくは浣腸を使用して、達成され得る。坐薬製剤は容易に、当業界において既知の方法により、調製され得る。例えば、坐薬製剤が、グリセリンを約120に熱していき、本組成物を該グリセリンに溶解させていき、この熱せられたグリセリンを混合していき、この後精製水が加えられてよく、この熱い混合物を坐薬の型中に注いでいって調製され得る。

30

【0041】

経皮投与は、本組成物の、皮膚を通しての経皮吸収を包含する。経皮製剤は、パッチ（よく知られたニコチンパッチのような）、外用薬、クリーム、ゲル、軟膏等を包含する。

【0042】

本発明は、本哺乳類に、治療有効量の本組成物を経鼻投与していくことを包含する。本明細書において使用された場合、経鼻投与していくもしくは経鼻投与は、本組成物を、本患者の鼻道もしくは鼻腔の粘膜に投与していくことを包含する。本明細書において使用された場合、組成物の経鼻投与用医薬組成物は、例えば、鼻スプレー、鼻ドロップ、懸濁、ゲル、外用剤、クリーム、もしくは粉末として投与されるべく、よく知られた方法により調製された治療有効量の本組成物を包含する。本組成物の投与は、鼻栓もしくは鼻スポンジを使用しても、行われてよい。

40

【0043】

更なる実施形態において、本発明は、アルツハイマー病を持っている被験体を処置していく他の方法に関する。これら方法は、本被験体に、アルツハイマー病を本被験体において処置するに有効な量のフリンを投与していくことを含む。本被験体は、これらの実施形態において、好ましくはフリンを投与され、これは、アミノ酸配列108~794SEQ

50

I D N O : 3 を持っているヒトフリンに等価なアミノ酸および/またはペプチド模倣体を含み、ここで、フリンが、S E Q I D N O : 3 に少なくとも80%相同なアミノ酸配列を持つ。他の好ましい実施形態において、フリンが、天然起源蛋白であり、例えば、ヒトフリンである。

【0044】

フリンは、これらの実施形態において、直接、本被験体の脳に投与され得る。あるいは、フリンは、この化合物が、本哺乳類のB B Bを横断できるような様式で投与され得る。フリンは、フリンの、本被験体のB B Bを横断できる能力を高める医薬組成物中においても、製剤され得る。

【0045】

模倣体を同定していく確立された方法を使用して、当業者は、B R I 2もしくはB R I 3の模倣体を同定でき、A および/またはA I Dを放出するC 9 9の開裂を阻害する化合物を同定していくことによる。こうして、本発明は、ある化合物が、B R I 2もしくはB R I 3の模倣体であるかどうか決定していく方法にも関する。これら方法は、該化合物を、機能している - セクレターゼおよびC 9 9を含んでいる膜結合蛋白と組み合わせ、次いで、該化合物が、A および/またはA I Dを放出するC 9 9の開裂を阻害するかどうか決定していくことを含む。これらの実施形態において、 - セクレターゼによるC 9 9の開裂を阻害すれば、該化合物が、B R I 2もしくはB R I 3の模倣体である。

【0046】

A および/またはA I Dを放出するC 9 9の開裂の阻害が、如何なる既知の方法によっても、例えば、実施例において記載された方法により、決定され得る。このような方法は、A および/またはA I D放出を、例えばA および/またはA I D特異的抗体を使用して測定していくことを包含し、ここで、B R I 2もしくはB R I 3模倣体が、A および/またはA I Dの減少を引き起こす。C 9 9阻害は、C 9 9の変化を測定していくことによっても求められ得、ここで、模倣体が、C 9 9の増加を引き起こす(実施例参照)。

【0047】

実施例においても確立されたとおり、B R I 2もしくはB R I 3によるC 9 9開裂阻害は、C 8 3およびs A P P の存在の減少を引き起こし、s A P P の存在の増加を引き起こす。こうして、B R I 2もしくはB R I 3模倣体が、C 8 3およびs A P P の減少、ならびに、s A P P の増加を引き起こす。

【0048】

上の決定は、如何なる既知の方法によっても、なされ得る。好ましい方法は、E L I S A、質量分析、もしくはウェスタンブロットを包含する。当業界において知られているとおり、ウェスタンブロットしていくことが、E L I S Aよりも、不安定でない化合物の同定を可能とするが、より多くの時間を消費し、厄介な手順である。

【0049】

これら方法は、評価されるべきいずれの特定の化合物にも、限られていない。例えば、ランダムな化合物のライブラリーが、評価され得る。好ましくは、しかしながら、これら化合物が、配列S E Q I D N O : 1もしくはS E Q I D N O : 2をそれぞれ持っているヒトB R I 2もしくはB R I 3蛋白のアミノ酸1 ~ 102に等価なアミノ酸を含んでいるB R I 2もしくはB R I 3蛋白のある一部分を模倣して設計(デザイン)されている。このような化合物は、B R I 2もしくはB R I 3蛋白の該部分の3次元構造および/または電荷を例えば模倣して設計され得る。あるいは、該化合物はペプチド模倣体を含み得、こうして、該化合物がB R I 2もしくはB R I 3アミノ酸配列を模倣する。

【0050】

好ましい実施形態において、前記膜結合蛋白は、C 9 9を含んでおり、アミロイド前駆体蛋白(A P P)であり、A P Pを発現している細胞において生じるようなものである。

【0051】

これら方法は、i n v i t r o (例えば、試験管中において)において実施され得

10

20

30

40

50

る。好ましくは、しかしながら、機能している - セクレターゼおよびC99を含んでいる膜結合蛋白は、生存細胞中にある。このような生存細胞の非限定例は、レポーター遺伝子（レポーター遺伝子、例えば、ルシフェラーゼ）の転写を、 - セクレターゼによる遺伝子導入（トランスジェニック）APP開裂時に活性化させる遺伝子構築体を含むものであり、実施例1におけるとおりである。これらの実施形態において、該遺伝子導入APPは、好ましくは、更にGal4を、当該遺伝子導入APPの細胞質部位（ドメイン）上を含む（実施例参照）。

#### 【0052】

これら方法が生存細胞を利用する場合、機能している - セクレターゼおよびAPPを発現する如何なる細胞も、使用され得る。非限定例は、神経細胞、または、HEK293細胞、HeLa細胞、もしくはN2a細胞のような、遺伝子導入APPを産生する細胞を包含する。実施例参照。

10

#### 【0053】

更なる実施形態において、本発明は、精製BRI2もしくはBRI3を、医薬として許容可能な賦形剤中において含んでいる組成物に関する。好ましくは、BRI2もしくはBRI3は、配列SEQ ID NO:1を持っているヒトBRI2蛋白のアミノ酸1~102、または、配列SEQ ID NO:2を持っているヒトBRI3蛋白に等価なアミノ酸および/またはペプチド模倣体を含み、ここで、BRI2蛋白およびBRI3蛋白が、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2にそれぞれ少なくとも80%相同なアミノ酸配列を持つ。BRI2もしくはBRI3は、如何なる数のアミノ酸および/またはペプチド模倣体をも含み得、その全長の蛋白から、102アミノ酸のアミノ酸および/またはペプチド模倣体までであり、例えば、250よりも少ないアミノ酸および/またはペプチド模倣体、200よりも少ないアミノ酸および/またはペプチド模倣体、150よりも少ないアミノ酸および/またはペプチド模倣体、あるいは、125よりも少ないアミノ酸および/またはペプチド模倣体を包含している。

20

#### 【0054】

ある幾つかの実施形態において、医薬として許容可能な前記賦形剤は、BRI2もしくはBRI3の、本被験体のBBBを横断できる能力を高める。他の実施形態において、本組成物が、単位（ユニット）用量の形で、アルツハイマー病処置用に製剤されている。

#### 【0055】

本発明は加えて、精製フリンを、医薬として許容可能な賦形剤中において含んでいる組成物に関する。好ましくは、本フリンが、SEQ ID NO:3のアミノ酸配列108~794を持っているヒトフリンに等価なアミノ酸および/またはペプチド模倣体を含み、ここで、本フリンが、SEQ ID NO:3に少なくとも80%相同なアミノ酸配列を持つ。好ましくは、本フリンが、天然起源蛋白である。

30

#### 【0056】

ある幾つかの実施形態において、医薬として許容可能な前記賦形剤は、本フリンの、本被験体のBBBを横断できる能力を高める。他の実施形態において、本組成物が、単位（ユニット）用量の形で、アルツハイマー病処置用に製剤されている。

#### 【0057】

本発明は、BRI2もしくはBRI3をコード化しているベクターを、医薬として許容可能な賦形剤中において含んでいる組成物にも関する。好ましくは、BRI2もしくはBRI3が、配列SEQ ID NO:1を持っているヒトBRI2蛋白もしくは配列SEQ ID NO:2を持っているヒトBRI3蛋白のアミノ酸1~102に等価なアミノ酸を含み、ここで、BRI2蛋白およびBRI3蛋白が、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2にそれぞれ少なくとも80%相同なアミノ酸配列を持つ。ある幾つかの実施形態において、医薬として許容可能な本賦形剤が、BRI2もしくはBRI3の、被験体の血液脳関門（BBB）を横断できる能力を増強させる。他の実施形態において、本組成物が、単位用量の形で、アルツハイマー病処置用に製剤されている。これらの実施形態は、如何なる特定のベクターにも、限られていない。しかしながら、好ましい実

40

50

施形態において、該ベクターはウィルスである。

【0058】

本発明は、フリンをコード化しているベクターを、医薬として許容可能な賦形剤において含んでいる組成物にも関する。好ましくは、該フリンが、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列108~794を持っているヒトフリンに等価なアミノ酸を含み、ここで、該フリンが、SEQ ID NO: 3に少なくとも80%相同なアミノ酸配列を持つ。他の好ましい実施形態において、該フリンが、天然起源蛋白である。ある幾つかの実施形態において、医薬として許容可能な本賦形剤が、該フリンの、被験体の血液脳関門(BBB)を横断できる能力を増強させる。他の実施形態において、本組成物が、単位用量の形で、アルツハイマー病処置用に製剤されている。好ましくは、該ベクターはウィルスである。

10

【0059】

本発明の好ましい実施形態が、以降の実施例において、記載されている。本願請求項の範囲内の他の実施形態が、本明細書において開示されたとおりの本発明の特定もしくは実施の考慮から、当業者に明らかとされる。本明細書が、本実施例と共に、例示的なだけと考慮されるものと意図されており、本発明の範囲および精神が本願請求項により指し示されており、本実施例に続く。

【実施例】

【0060】

実施例1. 家族性痴呆BRI2遺伝子によりコード化された蛋白が、APPと結合し、A $\beta$ 産生を阻害する

20

実施例のまとめ

アルツハイマー病(AD)は、最もよくある老人性痴呆であり、アミロイド斑、血管性アミロイド、神経繊維の絡み合い、および、進行性神経変性により特徴付けられている。アミロイドは主に、A $\beta$ ペプチドにより構成されており、これは、セクレターゼによるA $\beta$ -アミロイド前駆体蛋白(APP)プロセシングに由来する。そのAPPの細胞内部分(ドメイン、AID)が、A $\beta$ と共に放出されるが、シグナル伝達機能を持ち、アポトーシスおよび転写を調節するからである。その生物学および病理学的重要性にもかかわらず、APPプロセシングを規制している機序(メカニズム)が、良く理解されていない。膜結合蛋白が、セクレターゼによるNotch開裂および転写活性細胞内断片の放出を、促進させる。APPとNotchシグナル伝達との間の顕著な類似度を考慮して、我々は、APPプロセシングが同様に規制されていると仮定した。ここで、我々は、BRI2たるII型膜蛋白が、APPと相互作用することを示す。おもしろいことに、A $\beta$ のNH<sub>2</sub>-末部分に対応している17アミノ酸が、この相互作用に必要である。更に、BRI2発現が、APPプロセシングを規制し、結果、A $\beta$ およびAID濃度(レベル)が抑えられた。すべからく、これらの知見が、BRI2-A $\beta$ 相互作用を、A $\beta$ 産生を阻害するAPPプロセシングの規制機序(メカニズム)として特徴付ける。特記すべきは、BRI2突然変異が、家族性英国痴呆(FBD)および家族性デンマーク痴呆(FDD)を引き起こし、これらは、臨床的および病理学的に、ADに似ている。BRI2病原突然変異が、APPプロセシングに関するBRI2の規制機能を代えたとの知見が、APP開裂の脱規制を、AD、FDD、およびFBDに共通な病原機序(メカニズム)として定義する。

30

40

【0061】

はじめに

他のA $\beta$ -セクレターゼ基質の開裂が膜結合リガンドにより規制されているので、我々は、APPと結合し、そのプロセシングを規制する膜結合蛋白の存在を仮定した。ここで、我々は、BRI2(Deleersnijderら、1996)たるII型膜蛋白を記載し、本記載を満たす。

【0062】

実験手順

30細胞が、Kimberlyら、2003年において記載されたとおりの抗生物質および10%牛胎児血清を用いて補完されたDMEMにおいて維持された。

50

## 【0063】

## スプリット - ユビキチンイースト 2 種ハイブリッドスクリーニング

該スプリット - ユビキチンのシステムが、魅力的な代替法を与え、膜統合蛋白間の相互作用を分析する (Stagljara, 1998)。該スプリット - ユビキチンのシステムおよびヒトの脳ライブラリーが、Dual systems Biotech (チューリッヒ、スイス) から購入された。これらスクリーニングが、製造元のプロトコルに従い、実施された。端的に、ヒトAPP (アミノ酸 1 ~ 695)、ヒトAPP (アミノ酸 1 ~ 664; APPNcas)、もしくはヒトAPLP2 がそれぞれ、pTMV4、pAMB V4、pAMB V4 餌ベクター中にクローン化され、ユビキチンのC末側半分 (Cub) に融合されたAPPファミリーの餌蛋白を得、報告 (レポーター) 断片を伴った (LexA、DNA 結合蛋白、VP16 に融合されたもの、転写活性化)。ヒトの脳ライブラリーが、変異したユビキチン (NubG) のN - 末側半分において融合された蛋白を発現する。各ライブラリーに関して、我々は、およそ  $5 \times 10^6$  種の形質転換体をスクリーニングした。APP/APLP2 - Cub と相互作用できる蛋白をコードしているクローンが、NubG : Cub 相互作用を促進させ、次いで、ユビキチン特異的プロテアーゼ (1 種もしくは複数種) の動員、APP/APLP2 - Cub 餌の開裂、LexA - VP16 転写因子の放出、および、これら 2 種のレポーター遺伝子 (LacZ および HIS3) の転写活性化を伴う。ライブラリーのプラスミドが、HIS3 および LacZ 陽性イースト形質転換体から回収され、N - 末FLAG タグを有する pcDNA3.1 中にクローン化され、直接、下記されたとおり、免疫沈降により、APP との相互作用できる能力をテストした。両レポーター遺伝子の共通の活性化因子を求めてのスクリーニングが、結果、Fe65 (Zambranoら、1997) のような、既知のAPP/APLP2 - 結合蛋白の同定に至った。

## 【0064】

## プラスミド

全長BRI2 およびBRI2<sup>1-131</sup> が、これら 2 種のハイブリッドクローンから、PCRにより増幅され、pcDNA3.1-FLAG (Matsudaら、2001) 中にクローン化された。哺乳類発現ベクターAPPたるAPPNcasが、記載されている (Scheinfieldら、2002)。myc - タグが、シグナル伝達配列ApoER2後挿入され、pEF-BOS中にクローン化された。BACEが、pcDNA3mycHisB (Invitrogen) 中にクローニングされていくことにより、マウスの脳cDNAからクローン化され、C - 末側でmycのタグをされた。

## 【0065】

## 抗体

以降の抗体が、使用されている：

FLAG (マウスモノクローナルM2、Sigma) ;  
 APPマウスモノクローナル22C11 (Chemicon) 6E10 (Signet labs) およびp2 - 1 (Biosource) ;  
 myc (マウスモノクローナル9E10、Santa Cruz Biotechnology) ;  
 ウサギポリクローナル抗体 APPct (ZMD.316、Zymed) (Scheinfieldら、2002) ;  
 ニワトリコントロール抗体 (IgY、Southern Biotechnology) ;  
 ニワトリ BRI2 (IgY、BMA Biomedicals) ;  
 ウサギポリクローナルコントロール抗体 (IgG、Southern Biotechnology) ;  
 EN3 (Pickfordら、2003) (ウサギポリクローナル抗体) ;  
 ウサギ BRI2 (Jorge Ghiso博士からの好意) ;  
 マウスポリクローナルが、ヒトBRI2の細胞質尾部を含んでいるペプチドに対して生じ

た。抗 A P L P 1 および抗 A P L P 2 C - 末側ウサギポリクローナル抗体が、C a l b i o c h e m から購入された。

#### 【0066】

##### 細胞培養および感染

HEK 293、APP 安定発現 HEK 293 (HEK 293 APP)、HeLa、N2a 細胞が、ペニシリン、ストレプトマイシン、および 10% 牛胎児血清を用いて補完された Dulbecco 修飾 Eagle 培地 (DMEM) において、5% CO<sub>2</sub> 中において、37 °C において維持された。FuGENE 6 (Roche Applied Science) もしくは Metafectene (Biontex) が、トランスフェクションに使用された。

10

#### 【0067】

##### 免疫沈降およびウェスタン・ブロット

他に記されなかったら、全免疫沈降手順が、4 °C において実施された。これらトランスフェクションされた細胞が、10% (v/v) グリセロールを含有している緩衝液 (Buffer A [20 mM の HEPES / NaOH pH 7.4、1 mM の EDTA、1 mM の DTT、150 mM の NaCl、0.5% (w/v) Triton X-100] 中において、30 分間溶解され、これら溶解物が、20,000 g において、10 分間清澄化された。FLAG の免疫沈降に関して、これら清澄化された溶解物が、20 μL の FLAG-M2 ビーズ (Sigma) と、2 時間混合され、3 回、Buffer A を用いて洗浄された。これら沈澱が、60 μL の 2 × SDS サンプル緩衝液中において煮沸され、ウェスタン・ブロットに付された。他の免疫沈降に関して、これら清澄化された溶解物が、抗体と共に、1 時間インキュベートされ、20 μL の蛋白 A/G ビーズ (Pierce) と混合され、洗浄され、上のとおり加工された。ヒトの脳 (Peter Davies 博士からの寛大な好意) が、10% (v/v) グリセロールを含有している Buffer A 中において、Dounce 均一化機を使用して、均一化された。これら蛋白が終夜、5 mg/mL における当該蛋白濃度を用いて、抽出された。抽出された蛋白が、20,000 g において、1 時間清澄化された。その上清が、指し示された抗体と共にインキュベートされ、蛋白 A/G ビーズが、1% (w/v) BSA を含有している PBS を用いてブロックされた。沈澱が、上記されたとおり、洗浄され、加工された。

20

#### 【0068】

##### 代謝標識

pcDNA3 もしくは BRI2 を用いてトランスフェクションされた HEK 293 APP 細胞が、メチオニンおよびシステインのない、ペニシリン、ストレプトマイシン、および 10% 牛胎児血清を用いて補われた DMEM (Invitrogen) 中において、2 時間インキュベートされた。細胞が次いで 30 分、[<sup>35</sup>S] 標識メチオニンおよびシステイン (ICN) をこの培養培地に加えていくことにより、標識された。これら標識された細胞が念入りに洗浄され、ペニシリン、ストレプトマイシン、および 10% 牛胎児血清を用いて補われた DMEM 中において、指し示された期間の時間、追跡された。この追跡後、細胞が溶解され、APP ct と共に、上記したとおり、免疫沈降された。標識された細胞が培地から、20,000 g 10 分間の遠心により清澄化され、次いで、指し示された抗体と共に、免疫沈降された。

30

40

#### 【0069】

##### ルシフェラーゼ・アッセイ

これらアッセイが、記載されたとおり (Scheinfieldら、2003)、実施されたが、APP-Gal4 融合 (Gianniら、2003) が Gal4 源として使用されたことを除く。ルシフェラーゼ活性が、同時トランスフェクションされた - ガラクトシダーゼ活性により規格化され、このトランスフェクション効率をモニターした。

#### 【0070】

##### 酵素連結免疫吸収アッセイ (ELISA)

HEK 293 APP 細胞が、pcDNA3 もしくは BRI2 を用いて、トランスフェク

50

ションされた。このトランスフェクションの24時間後、これら細胞が24時間、条件を整えられ、前記培地中のA 40およびA 42が、ヒトA ELISAキット(KMI Diagnostics)を使用しながら、その製造元のプロトコルに従いつつ、測定された。これらトランスフェクションされた細胞が溶解され、上のとおり清澄化され、抽出された蛋白量が使用されて、ELISAにより検出されたA量を規格化した。

#### 【0071】

##### 蛋白決定

蛋白濃度が、Bio-Rad蛋白アッセイにより(Bio-Rad)、BSAを標準として、求められた。

#### 【0072】

##### 結果および議論

膜連結蛋白がAPPプロセッシングを規制するかどうかテストするために、我々は、スプリットユビキチンシステムを使用して、膜蛋白間の相互作用を同定した。APPファミリー蛋白と相互作用する蛋白を求めてのヒト脳cDNAライブラリースクリーニングが、結果、BRI2(Deleersnijderら、1996)およびBRI3(Vidalら、2001)(示さなかった)の同定に至ったが、これらは、II型膜蛋白遺伝子ファミリーメンバーであり、Brichos部位(ドメイン)を含有している。BRI蛋白の機能は知られていないが、BRI2の突然変異が、FBD(Vidalら、1999)およびFDD(Vidalら、2000)を有する患者において見出されている。記すべきことに、FBDおよびFDDにおける神経病理学的知見が、実質における前兆のアミロイド沈着(FBDおよびFDD)および斑(FBD)、神経繊維の絡み合い、コンゴレッドに染まるアミロイド血管障害(CAA)、および神経変性を包含し、ADに似ている。これゆえ、BRI2における突然変異が、AD様の家族性痴呆を引き起こすので、我々は更に、このBRI2-APP相互作用の生理学的関連を研究した。

#### 【0073】

このBRI2-APP相互作用を哺乳類細胞において査定するために、HeLa細胞が、BRI2およびAPP構築体と共に、同時トランスフェクションされた(図1a)。FLAG抗体との細胞溶解物の免疫沈降が、BRI2が、全長APP(図1bおよびd)、C99(図1bおよびd)、およびAPPNcasと相互作用したことを示したが、このことは、C83でなく(図1bおよびd)、APP(図1c)の細胞内領域の殆どの欠損を表す。APPが、ダブレットとして、描かれている。より低い方のAPPのバンドが、グリコシル化されなかった未熟なAPPを表し;より上の方の形が代わりに、グリコシル化された成熟APPから構成されている。記すべきことに、このグリコシル化された成熟した形のAPPおよびAPPNcasだけが、BRI2と相互作用した(図1b、c、およびd)。BRI2過剰発現が劇的に、C99量を増加させることも、記されるべきである(図1bおよび1d)。この知見の意義が、後で展開される。

#### 【0074】

BRI2外側部位(ドメイン)の殆どの欠損が、APPに対する結合を廃しなかった(BRI2<sup>1-131</sup>、図1d)。APP抗体を用いるその逆免疫沈降が、APPがBRI2を免疫沈降させることを明らかにした(図1e)。加えて、トランスフェクションされたHeLa細胞において検出された蛋白溶解~17kDaのBRI2のNH<sub>2</sub>-末断片(BRI2<sup>nt</sup>、BRI2<sup>1-131</sup>にサイズが似ている)も、APPと共に沈澱された(図1e)。これらの相互作用の特異性が更に、BRI2が、もう1種別のI型膜統合蛋白たるApoER2に結合しなかった(図1c)との証拠により、裏付けられた。これらの知見が、APPの細胞質内尾部およびAPPの殆どおよびBRI2外側部位がBRI2/APP相互作用できる一方、APPの外側部位における17アミノ酸の領域が、その膜貫通領域に近く、そのNH<sub>2</sub>-末A配列を含有しており、この結合に必須であることを、証拠付ける。これらのデータが強く、BRI2およびAPPがin trans(つまり、区別される膜上で発現された受容体/リガンドとして)において相互作用しないが、むしろ、分子複合体を細胞膜において形成することを示唆する。

10

20

30

40

50

## 【0075】

A P PおよびB R I 2が両方、成熟神経組織において、発現されている。我々はこれゆえ、A P Pも、B R I 2と、成人ヒト脳において相互作用するかどうか、決定しようとした。まず、我々は、4種の抗B R I 2抗体をテストし、これらがヒトB R I 2を免疫沈降できるかどうか、決定した。これらのテストに関して、H e L a細胞が、F L A G - B R I 2を用いてトランスフェクションされ、これら4種のB R I 2抗体およびコントロールと共に免疫沈降された。図2 aにおいて示されたとおり、E N 3抗B R I 2抗体だけが、B R I 2を沈澱させることができた。次に、我々は、ヒトの脳のホモジェネートを調製し、A P P c t抗体もしくはE N 3を用いた免疫沈降を実施した。図2 bにおいて示されたとおり、C 9 9（およびより大きいC O O H - 末A P P断片）が、抗A P PおよびE N 3両方と共に沈澱された一方、C 9 9は、ウサギポリクローナルI g Gと共に沈澱されなかった。おもしろいことに、この場合においても、C 8 3が、B R I 2と共に沈澱しなかったが、A P P c tにより沈澱した。更に、全長A P Pも、E N 3により沈澱したが、低濃度（レベル）においてであった。すべからく、これらの実験が、内因性A P PおよびB R I 2が、成人ヒト脳において関連することを指し示す。加えて、これらが、B R I 2が好ましくは、C 8 3とでなく、C 9 9およびより大きいA P PのC - 末断片と相互作用することを示す。

10

## 【0076】

図1 bおよび1 dにおいて示されたとおり、B R I 2構築体の発現が変わっていくことなく、結果、C 9 9の濃度（レベル）の上昇に至る。このC 9 9濃度（レベル）の劇的な上昇が、A P PプロセシングへのB R I 2の効果に依存しているらしい。これに関して直接テストするために、我々は、F L A GのタグをされたB R I 2を、H e L a、H E K 2 9 3、およびN 2 a細胞において、A P P - G a l 4、G a l 4プロモーター制御下のルシフェラーゼレポーター、および - ガラクトシダーゼ構築体と共に、発現させた。A P P - G a l 4は、A P P細胞質部位（ドメイン）に対する、イースト転写因子G a l 4の融合体である。A P P - G a l 4の - 開裂が、A I D - G a l 4を、細胞膜から核に放出させ、引き続いてのルシフェラーゼ転写の活性化を伴う（G i a n n i ら、2 0 0 3）。図3 aにおいて示されたとおり、B R I 2がルシフェラーゼ活性を、3種全ての細胞株において抑えたが、A I D形成阻害を示唆している。代わりに、 - セクレターゼ（B A C E）トランスフェクションが、結果、A I D放出の増加に至ったが、予測されたとおりであった（図3 b）。B R I 2<sup>1-131</sup>変異体が、尚A P Pと相互作用し、上昇したC 9 9濃度（レベル）を産生させ（図1 d）、A I D放出も阻害する（図3 c）。最後に、混合実験が、B R I 2がA I D - G a l 4放出を抑制するには、A P P - G a l 4と共に、同一細胞において、同時発現されなくてはならないことを示す。事実、B R I 2を発現している細胞を、A P P - G a l 4を発現している細胞と混合していくと、A I D放出に影響を及ぼさない（図3 d）。このことが更に、B R I 2およびA P Pが、i n t r a n sよりもむしろi n c i sにおいて相互作用することを示唆する。

20

30

## 【0077】

この系（システム）を更に確認するために、我々は、B R I 2を用いてトランスフェクションされたH E K 2 9 3の条件を整えられた培地中におけるA を測定しており、B R I 2が有意に、A 4 0およびA 4 2濃度（レベル）を消失させた（図3 b）ことを見出している。再び、B A C Eトランスフェクションが、A 4 0およびA 4 2分泌を増加させた（図3 f）。

40

## 【0078】

B R I 2によるA I DおよびA 産生の阻害が、B R I 2発現が、 - セクレターゼによるA P Pの開裂を抑えることを示唆する。しかしながら、B R I 2が、A P Pの - および - 開裂を調節することも、可能である。上で議論されたとおり、 - もしくは - セクレターゼによるA P Pの開裂がそれぞれ、s A P P およびs A P P を、上清中において放出する。s A P P もしくはs A P P の量の増加が、 - もしくは - 開裂の増加を指し示す一方、s A P P もしくはs A P P の減少が、 - もしくは - 開裂の

50

減少に反映する。こうして、BRI2が - もしくは - セクレターゼに影響を及ぼすかどうか決定するために、我々は、sAPP および sAPP 量を測定した。これらの同一の実験において、我々は、C99 および C83 の細胞内濃度 (レベル) も測定した。HEK293-APP細胞が、FLAG-BRI2 もしくはベクターコントロールを用いて、トランスフェクションされた。トランスフェクションされた細胞が、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニン-システインを用いて30分間、パルス標識され、次いで、0、1、2、および4時間、37 °Cにおいて追跡された (図3c)。細胞溶解物が、APP-ct抗体と共に、各時点において免疫沈降された (図3c)。分泌されたAPP (sAPP および sAPP) を測定するために、上清が、4時間標識され、抗APP抗体P21 (sAPP および sAPP 両方を沈澱させる) もしくは6E10 (sAPP だけを沈澱させる) と共に沈澱された細胞から回収された (図3d)。BRI2トランスフェクションが、結果、C83 (図3c) および sAPP (図3d) の量の減少に至った。逆に、C99 (図3c) および sAPP (図3d) 濃度 (レベル) が、増加した。特記すべきことに、BRI2が、APP-ct抗体により、全時点において、同時免疫沈降された。こうして、BRI2発現が、 - セクレターゼによるAPP開裂を抑える一方、 - セクレターゼによるそのプロセッシングを上昇させる。 - セクレターゼの混入による阻害およびAPPの - 開裂の増加が、C99濃度 (レベル) の劇的な増加を説明する。

#### 【0079】

APPは、APLP1およびAPLP2を包含する蛋白ファミリーのある一員である。APLP1およびAPLP2も、 - セクレターゼの基質であり (Scheinfeldら、2002)、数多くの - セクレターゼの基質の中でも、APPに対するより多くの配列の類似性を保有するものである。こうして、BRI2が、一般的に - セクレターゼに影響を及ぼすのか、特異的にAPPの - 開裂を阻害するのかテストするために、我々は、BRI2を、APLP1もしくはAPLP2を用いてトランスフェクションした。抗APLP1もしくは抗APLP2C末抗体を使用するウエスタン・プロットが、BRI2発現が、APLP1 (示さなかった) およびAPLP2 (図3i) のC末断片の蓄積を促進させないことを指し示す。この結果が、BRI2が特異的に、他の - 基質ではなく、APPへの - 活性をブロックするとの観念を裏付ける。

#### 【0080】

すべからく、これらの研究が、BRI2およびAPPが、多重分子複合体を、細胞膜において形成することを示唆する。このような複合体におけるAPPおよびBRI2の化学量論量が、調査されなければならず、BRI2およびAPPが、他の蛋白を含んでいる構造において見出されるかどうか未知である一方、我々のデータが、BRI2が、APPプロセッシングの内因性制御因子 (レギュレーター) として機能することを示唆する。より具体的に、我々はここに、BRI2発現が、APPの - および - 両方の開裂を減らすことを見出した。これらの機能に相応しい詳細な分子機序 (分子レベルでのメカニズム) が直接述べられなければならないが、BRI2が、 - および - 開裂部位を含んでいるAPPの領域と相互作用するとの知見が、BRI2が物理的に、これら2種の標的配列を、これらセクレターゼからマスクすることをほのめかす。

#### 【0081】

最近、BRI2における突然変異が、FBD (Vidalら、1999) およびFDD (Vidalら、2000) 患者において見出されている。野生型および突然変異体BRI2両方が、フリンによりプロセッシングされており (Kimら、1999)、このプロセッシングが、結果、C末ペプチドの分泌に至っている。フリンによる野生型BRI2の開裂が、17アミノ酸 (aa) 長のペプチドを放出させる。FBD患者において、BRI2の停止 (ストップ) コドンでの点突然変異が、結果、3' - 非翻訳領域の解読、および、余分な11アミノ酸をC末において含有しているBRI2分子の合成に至る。フリンによるこの突然変異したBRI2の開裂が、より長いペプチドたるABriペプチドを生成させ、これがアミロイド繊維として沈着される。デンマークの家系において、正常停止コドンが、そのうちの最終のC末34アミノ酸をアミロイドサブユニットが含む、正常よりも大

10

20

30

40

50

きい前駆体蛋白を生成させるフレームシフトをBRI2配列において発生させる前、10 - n tの存在が1コドンを倍とする。A B r iおよびA D a nアミロイドの沈着が、これらの痴呆の病原と考えられている。しかしながら、BRI2が、APPプロセッシングを規制するとの知見が、魅惑的であり、代わったAPPプロセッシングも、F B DおよびF D Dにおける病原要因であるとの思索を促進させる。この仮定と一致して、F D D患者において、上昇した濃度(レベル)のA 4 2沈着が、C A A病巣において、A D a nと共に検出されている。

#### 【0082】

実施例2 . APPプロセッシングへのBRI2の効果に関する更なる研究

実施例1において記載された方法を使用しながら、最初の、80、93、96、99、102、105、117、および131アミノ酸からなるBRI2欠損構築体の効果が、測定された。図4(左パネル)において示されたとおり、99アミノ酸よりも大きい短縮だけが、総溶解物中におけるC99の蓄積を示したが、このことが、C99の更なるプロセッシングの阻害を指し示す。最初の96および99アミノ酸からなる欠損構築体が、遙かにより乏しい阻害効果を示し、80および93(アミノ酸)からなるものが、該阻害を示さなかった。C99プロセッシングへのBRI2のこの阻害効果が、これらのBRI2短縮体の、C99および全長APPに対する結合と平行したが、図4において示されたとおりであった(その右のパネル)。同一セットの欠損構築体が、AID産生へのそれらの効果を求めてみるのに使用された。APP - G a l 4がドライヴィング・フォースのルシフェラーゼ活性の結果(図5)が更に、最初の99アミノ酸よりも多くを含んでいるBRI2構築体が、AID産生の効率的な阻害に必要とされているとの結論を裏付ける。

#### 【0083】

実施例1が、sAPP がBRI2存在下に抑えられていることを確立させ、BRI2が - セクレターゼを阻害することを指し示している。更なる実験が実施され、sAPP 産生へのBRI2の効果を求めた。図6において示されたとおり、sAPP 産生も、BRI2存在下に抑えられており、BRI2が - セクレターゼを阻害することを指し示している。

#### 【0084】

上に鑑みると、本発明の幾つかの利点が達成されており、他の利点が達成されたことが分かる。

#### 【0085】

本発明範囲から逸脱してしまうことなく、上の方法および組成物において種々の変更がなされ得るので、上の記載において含有され、添付の図面において示された全事項が、例示として、限定している感覚ではなく解釈されると意図されている。

#### 【0086】

本明細書において引用された全文献が、本明細書において援用されている。本明細書におけるこれら文献に関する議論が単に、それらの著者によりなされた主張を要約すると意図されており、いずれの文献も、先行技術を構成するとは、全く認められていない。出願人は、これら引用された文献の精確さおよび適切さに挑む権利を確保する。

#### 【0087】

配列番号(SEQ ID NO)

SEQ ID NO : 1 - ヒトBRI2アミノ酸配列 GenBank Q9Y287  
 1 mvkvtfhsal aqkeakkdep ksgeealiip pdavavdckd pddwvpgqr rawcwcfcg  
 61 lafmlagvil ggaylykyfa lqpdvvyycg ikykddvil nepsadapaa lyqtieenik  
 121 ifeeeevefi svvppefads dpanivhdfh kkltayldln ldkcyvipln tsivmpprnl  
 181 lellinikag tylpqsylih ebmitdrie nidhlgffiy rlchdketyk lqrretikgi  
 241 qkreasncfa irhfenkfav etlics

SEQ ID NO : 2 - ヒトBRI3アミノ酸配列 GenBank Q9NOX7.  
 1 mvkisfqpav agikgdkadk asasapapas ateilltpar eeppqhrsk rggsvggvcy  
 61 lsmgmwlhn glvfasvyiy ryfflaqlar dnffrcgvly eds1ssqvrt qmeleedvki

10

20

30

40

50

121 yldenyerin vpvpqfgggd padiihdfqr gltayhdisl dkyvvielnt tivlpprnfw  
 181 ellmnvkrgrt ylpqtyiiqe emwtehvsd kealgsfiyh lcnngkdyrl rrratrrrin  
 241 krgakncnai rhfentfVve tlicgw

S E Q I D N O : 3 - ヒトフリン前原蛋白 GenBank NP002560

1 melrpwllwv vaatgtlvll aadaqqkvf tntwavripg gpavansvar khgfInlgqi  
 61 fgdyyhwhr gvtkrslsph rprhsrlqre pqvqwleqqv akrrtkrdvy qeptdpkfpq  
 121 qwylsgvtqr dlnvkaawaq gytghgiws ilddgieknh pdlagnydpq asfdvndqp  
 181 dpqprytqmn dnrhgtrcag evaavanngv cgvgvaynar iggvrmldge vtdavearsl  
 241 glnpnhihiy saswgpddg ktvdgparla eeaffrgvsq grgglsifv wasgnngreh  
 301 dscncdgytn siytlsissa tqfgnvpwys eacsstlatt yssgnqnekq ivttldlrqk  
 361 teshtgsas aplaagiial tleanknlw rdmqhlwqt skpahhiand watngvgrkv  
 421 shsygygld agamvalaqn wttvapqrkc iidiltepkd igkrlevrkt vtacIgepnh  
 481 itrlehaqar ltlsynrrgd laihlvspmg trstllaarp hdysadgfhd wafmtthswd  
 541 edpsgewvle ientseanny gtltkftlvi ygtapeglpv ppressgcktl tssqacwce  
 601 egfslhqksc vqhcppgfap qvldthyste ndvetirasv capchascacat cqgpaldcl  
 661 scpshasldp veqtcsrqsq ssresppqqq pprrlpevea gqrlragllp shlpewagl  
 721 scafivlvfv tvflvlqlrs gfsfrgvkvy tmdrglisyk glppeawqee cpsdseedeg  
 781 rgertafikd qsal

10

【図面の簡単な説明】

【0088】

20

【図1】ウェスタン・プロットのダイアグラムおよび写真であり、BRI2が、APPリガンドであることを確立している。パネルa：使用されたBRI2構築体の、スキーム表示である。これら構築体が、1（アミノ酸1～266、全長）および2（アミノ酸1～131）と付番されている。パネルb-d：抗FLAG免疫沈澱（IP FLAG）のウェスタン・プロット（WB）を示し、指し示された蛋白を発現しているHeLa細胞からの総溶解物（TL）が、BRI2 / APP会合の特異性を示し、これら相互作用部位を地図化（マッピング）する。pcが、空のベクター（pcDNA3.1）を指し示し；数字1および2が、aにおいて示されたBRI2構築体を指し示し；\*が、抑えられなかった抗FLAG抗体を指し示し；m.が、成熟したグリコシル化された形のAPPを指し；一方、i.が、対応する未熟なグリコシル化されなかったAPPを指し示す。ウェスタン・プロットに関して、APPが、モノクローナル抗体22C11を表す一方、APPctが、APPのC-末に対して惹起されたウサギポリクローナルである。

30

パネルe：実験のウェスタン・プロットであり、ここで、APPおよびBRI2両方を用いてトランスフェクションされたHeLa細胞の溶解物が、ウサギポリクローナルコントロール（RP）もしくはAPP-ctと共に沈澱された。免疫沈澱および総溶解物が、APPモノクローナル抗体22C11もしくはFLAGを用いてプロットされた。BRI2が、～17kDaのBRI2のN-末断片（BRI2nt）同様、APPctにより、APPと共に沈澱された。

【図2】ウェスタン・プロットの写真であり、内因性APPおよびBRI2が、成人脳において相互作用することを確立している。パネルa：FLAG-BRI2を用いてトランスフェクションされたHeLa細胞からの溶解物が、ニワトリのコントロールの抗体（レーン3）、市販のニワトリのBRI2抗体（レーン6）、蛋白A/Gビーズ単独（レーン9）、コントロールのウサギポリクローナル抗体（レーン12）、ウサギポリクローナルEN3 BRI2抗体（レーン15）、区別できるウサギBRI2血清（レーン18）、およびマウスBRI2ポリクローナル抗体（レーン21）と共に沈澱された。総溶解物（L）、上清（S）、および沈澱（P）が、ゲル濾過され、FLAGを用いて探された。EN3だけが、BRI2を沈澱させていくことができた。～17および14kDaのBRI2nt断片が沈澱しなかったが、これは、EN3により認識されるエピトープが、C-末～Brichos部位（ドメイン）であるからである。パネルb：総脳ホモジェネートが、コントロールのウサギポリクローナル（RP）、APPc

40

50

t、もしくはEN3と共に免疫沈降された。総脳溶解物(T.L.)および免疫沈澱が、APPモノクローナル抗体22C11(上のパネル)もしくはAPPct(下のパネル)を用いてプロットされた。

【図3】ウェスタン・プロットのグラフおよび写真であり、BRI2が、セクレターゼによるAPPプロセッシングを規制することを確立している。パネルa-c: BRI2

が、APP-Gal4がドライヴィング・フォースのルシフェラーゼ活性を、HeLa、N2a、およびHEK293細胞において抑える。細胞が、APP-Gal4を用いて、pcDNA3.1(pc)もしくはFLAG-BRI2、BRI2<sup>1-131</sup>もしくはBACEと共に、同時トランスフェクションされた。データが、空のベクターを用いてトランスフェクションされた細胞において測定されたルシフェラーゼ活性の%として、表現されている。BRI2、BACE、およびpcによりトランスフェクションされた細胞が、同様な濃度(レベル)のAPP-Gal4を発現する(示さなかった)。誤差のバーが、3回の独立した実験に関する±SDを表す。パネルd: 細胞が、APP-Gal4、pcDNA3.1(pc)、もしくはBRI2を用いてトランスフェクションされた。APP-Gal4を用いてトランスフェクションされた細胞が次いで、指し示された比において、BRI2もしくはpc.DNA3.1によりトランスフェクションされた細胞と混合された。サンプルが、ルシフェラーゼ活性に関して、上記したとおり、トランスフェクションおよび混合の24時間後、解析された。パネルe-f: BRI2が、A40/A42産生を阻害する。安定にAPPを発現しているHEK293細胞(HEK293APP)が、空のベクター(pc)、BACE、もしくはFLAG-BRI2を用いてトランスフェクションされ、培地中において分泌されたA40およびA42が、ELISAにより測定された。A量が、これらトランスフェクションされた細胞の溶解物の蛋白含量により、規格化された。誤差のバーが、3回の独立した実験に関する±SDを表す。パネルg: トランスフェクションされたHeLa細胞に関しての、4種の独立の実験の代表たるパルス追跡実験。HEK293APP細胞が、空のベクター(vector)もしくはFLAG-BRI2を用いてトランスフェクションされた。代謝標識された細胞の溶解物が、APPctと共に沈澱された。各レーン上の数字が、これら細胞が追跡された時間を指し示す(c)。BRI2発現が、C83産生を減らす一方、劇的に、C99生成を増やす。パネルh: 同様にトランスフェクションされたHEK293APP細胞の、条件を整えられた培地が4時間の標識後収集され、p21もしくは6E10と共に沈澱された。sAPP量が、BRI2により減った一方、総sAPP(sAPP + sAPP)が、sAPP産生の増加、および、からセクレターゼに至るAPPプロセッシングの変化(シフト)を指し示している有意な変化を示さなかった。パネルi: 細胞が、APLP2を用いて、pc.DNA3.1もしくはBRI2と共にトランスフェクションされた。トランスフェクション24時間後、細胞が、ウェスタン・プロットにより、BRI2およびAPLP2ペプチドに関して、解析された。

【図4】ウェスタン・プロットの写真であり、BRI2の最初の102アミノ酸が、C99の効率的な開裂を阻害するのに必要であることを、ならびに、同一領域が、BRI2の、APPのC99に対する結合に必要であることを確立している。左のパネルが、30細胞からの総溶解物(TL)のウェスタン・プロットを示し、30細胞は安定にAPPを発現し、空のベクター(vect)、mycのタグを付けた全長BRI2<sup>1-266</sup>(BRI2)、もしくは、種々のmycのタグを付けたBRI2C-未欠損体を用いてトランスフェクションされた(当該構築体によりコードされたアミノ酸により指し示した)。右のパネルが、対応している溶解物の、抗myc免疫沈澱(mycIP)を示す。HCが、この免疫沈降において使用されたmyc抗体の重鎖を指し示す。

【図5】APP-Gal4がドライヴィング・フォースのルシフェラーゼ活性のグラフであり、BRI2の最初の102アミノ酸が全て、AID産生を阻害するのに必要であることを確立している。HEK293細胞が、APP-Gal4を用いて、空のベクター、もしくは、mycのタグを付けた全長BRI2、もしくは、種々のBRI2C-未欠損構築

【図6】ウェスタン・プロットの写真であり、BRI2の最初の102アミノ酸が、C99の効率的な開裂を阻害するのに必要であることを、ならびに、同一領域が、BRI2の、APPのC99に対する結合に必要であることを確立している。左のパネルが、30細胞からの総溶解物(TL)のウェスタン・プロットを示し、30細胞は安定にAPPを発現し、空のベクター(vect)、mycのタグを付けた全長BRI2<sup>1-266</sup>(BRI2)、もしくは、種々のmycのタグを付けたBRI2C-未欠損体を用いてトランスフェクションされた(当該構築体によりコードされたアミノ酸により指し示した)。右のパネルが、対応している溶解物の、抗myc免疫沈澱(mycIP)を示す。HCが、この免疫沈降において使用されたmyc抗体の重鎖を指し示す。

【図7】APP-Gal4がドライヴィング・フォースのルシフェラーゼ活性のグラフであり、BRI2の最初の102アミノ酸が全て、AID産生を阻害するのに必要であることを確立している。HEK293細胞が、APP-Gal4を用いて、空のベクター、もしくは、mycのタグを付けた全長BRI2、もしくは、種々のBRI2C-未欠損構築

【図8】ウェスタン・プロットの写真であり、BRI2の最初の102アミノ酸が、C99の効率的な開裂を阻害するのに必要であることを、ならびに、同一領域が、BRI2の、APPのC99に対する結合に必要であることを確立している。左のパネルが、30細胞からの総溶解物(TL)のウェスタン・プロットを示し、30細胞は安定にAPPを発現し、空のベクター(vect)、mycのタグを付けた全長BRI2<sup>1-266</sup>(BRI2)、もしくは、種々のmycのタグを付けたBRI2C-未欠損体を用いてトランスフェクションされた(当該構築体によりコードされたアミノ酸により指し示した)。右のパネルが、対応している溶解物の、抗myc免疫沈澱(mycIP)を示す。HCが、この免疫沈降において使用されたmyc抗体の重鎖を指し示す。

【図9】APP-Gal4がドライヴィング・フォースのルシフェラーゼ活性のグラフであり、BRI2の最初の102アミノ酸が全て、AID産生を阻害するのに必要であることを確立している。HEK293細胞が、APP-Gal4を用いて、空のベクター、もしくは、mycのタグを付けた全長BRI2、もしくは、種々のBRI2C-未欠損構築

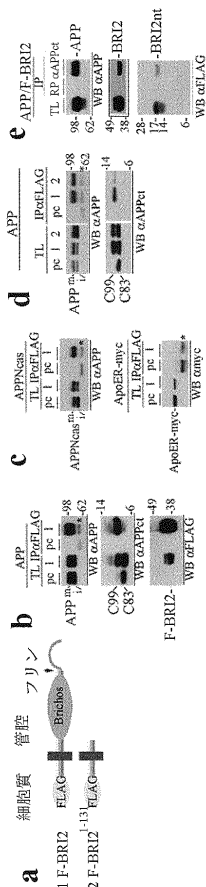
【図10】ウェスタン・プロットの写真であり、BRI2の最初の102アミノ酸が、C99の効率的な開裂を阻害するのに必要であることを、ならびに、同一領域が、BRI2の、APPのC99に対する結合に必要であることを確立している。左のパネルが、30細胞からの総溶解物(TL)のウェスタン・プロットを示し、30細胞は安定にAPPを発現し、空のベクター(vect)、mycのタグを付けた全長BRI2<sup>1-266</sup>(BRI2)、もしくは、種々のmycのタグを付けたBRI2C-未欠損体を用いてトランスフェクションされた(当該構築体によりコードされたアミノ酸により指し示した)。右のパネルが、対応している溶解物の、抗myc免疫沈澱(mycIP)を示す。HCが、この免疫沈降において使用されたmyc抗体の重鎖を指し示す。

【図11】APP-Gal4がドライヴィング・フォースのルシフェラーゼ活性のグラフであり、BRI2の最初の102アミノ酸が全て、AID産生を阻害するのに必要であることを確立している。HEK293細胞が、APP-Gal4を用いて、空のベクター、もしくは、mycのタグを付けた全長BRI2、もしくは、種々のBRI2C-未欠損構築

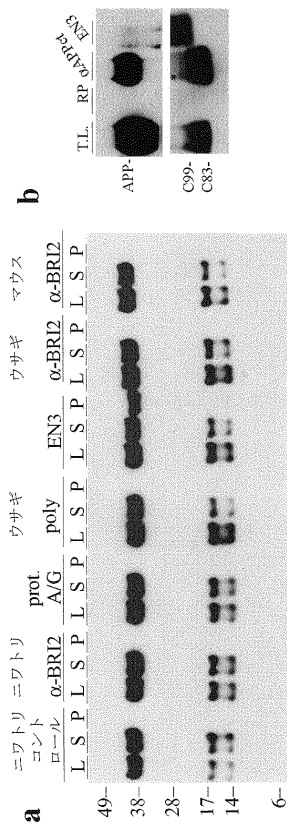
体と共にトランスフェクションされた（当該構築体によりカバーされたアミノ酸範囲により指し示した）。データが、空の該ベクターを用いてトランスフェクションされた細胞において測定されたルシフェラーゼ活性の%として、表現されている。誤差のバーが、3回の独立した実験に関する±SDを表す。

【図6】ウェスタン・プロットの写真であり、BRI2が、sAPPおよびsAPP分泌を阻害することを確立している。HEK293APP細胞が、空のベクター（-）もしくはFLAG-BRI2（+）を用いて、トランスフェクションされた。sAPPおよびsAPPが、Opti-MEM中において4時間条件を整えられたトランスフェクションされた細胞培養から、検出された。APPおよびBRI2発現が、これらトランスフェクションされた細胞の総溶解物のウェスタン・プロットにより、確認された。APP発現が、有意に変化しない。

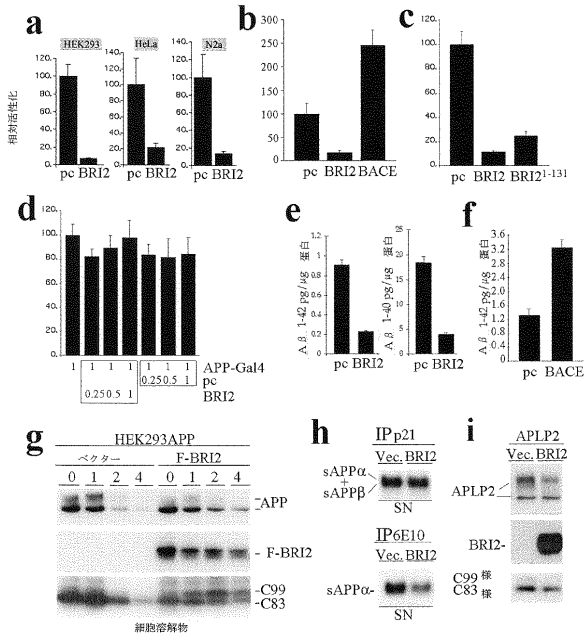
【 図 1 】



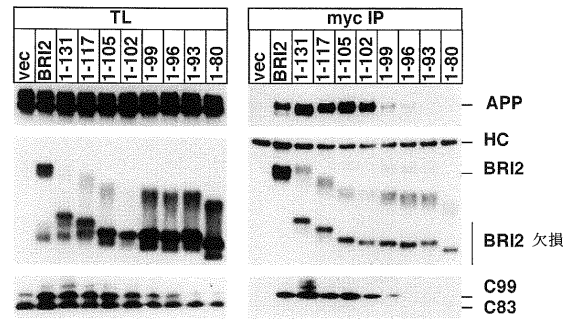
【 図 2 】



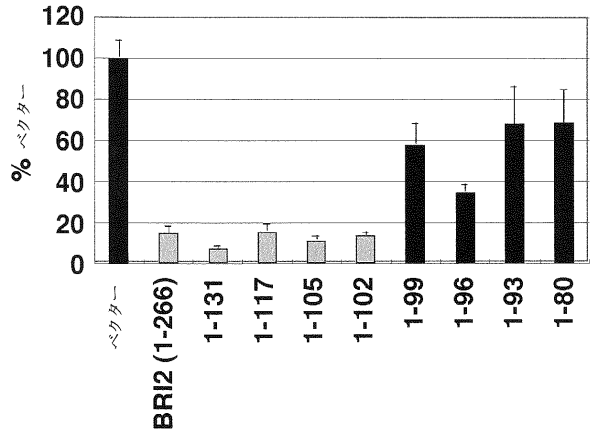
【 図 3 】



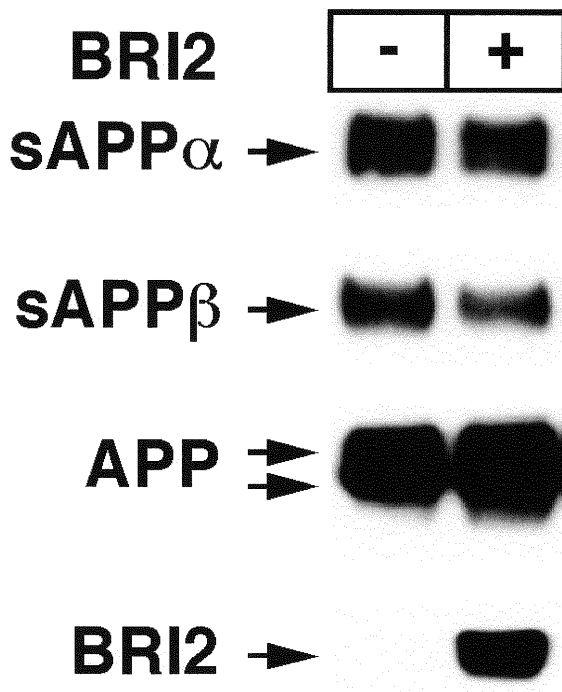
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/15</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/15	Z	4 H 0 4 5
<b>G 0 1 N 33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/50	Z	
<b>G 0 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D	
C 0 7 K 14/47	(2006.01)	C 0 7 K 14/47		
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A	

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

(74)代理人 100122437

弁理士 大宅 一宏

(72)発明者 ダダーミオ、ルチアーノ

アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ブロンクス、ヘイト・アヴェニュー 1 6 5 7

(72)発明者 松田 修二

アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ブロンクス、ホーン・アヴェニュー 1 6 2 5

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03 FB05

4B024 AA01 BA80 CA02 DA03 EA02 GA11 HA17

4B063 QA20 QQ79 QR80 QS38 QX01

4C084 AA02 BA01 BA08 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19 BA20

BA21 DC01 MA70 ZA16

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 CA20

4H045 BA09 CA40 DA56 EA21 FA74

专利名称(译)	BRI蛋白对Aβ产生的影响		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008546701A</a>	公开(公告)日	2008-12-25
申请号	JP2008517054	申请日	2006-06-14
申请(专利权)人(译)	Ieshiba大学		
[标]发明人	ダダーミオルチアーノ 松田修二		
发明人	ダダーミオ、ルチアーノ 松田 修二		
IPC分类号	A61K38/00 C12Q1/37 A61P25/28 A61K38/43 A61K35/76 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C07K14/47 C12N15/09		
CPC分类号	A61K38/1709 A61K38/482 A61P25/28		
FI分类号	A61K37/02.ZNA C12Q1/37 A61P25/28 A61K37/48 A61K35/76 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C07K14/47 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB05 4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA03 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA17 4B063/QA20 4B063/QQ79 4B063/QR80 4B063/QS38 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA14 4C084/BA15 4C084/BA16 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/DC01 4C084/MA70 4C084/ZA16 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/CA20 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA56 4H045/EA21 4H045/FA74		
代理人(译)	英年古河 Kajinami秩序		
优先权	60/690841 2005-06-14 US		
其他公开文献	JP2008546701A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了减少抑制或预防Aβ的方法。细胞和/或通过细胞产生AID和治疗患有阿尔茨海默氏病的受试者的方法。还提供了确定化合物是BRI2还是BRI3的模拟物的方法。另外提供了BRI2, BRI3或弗林蛋白酶的药物组合物, 或编码这些蛋白质的载体。

