

(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2019-505165

(P2019-505165A)

(43) 公表日 平成31年2月28日 (2019. 2. 28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C O 7 K 7/64 (2006.01)	C O 7 K 7/64	4 B 0 6 5
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 C O 7 6
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C O 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 102 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-523026 (P2018-523026)
 (86) (22) 出願日 平成28年11月9日 (2016. 11. 9)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年6月28日 (2018. 6. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2016/051301
 (87) 国際公開番号 W02017/079832
 (87) 国際公開日 平成29年5月18日 (2017. 5. 18)
 (31) 優先権主張番号 62/253, 044
 (32) 優先日 平成27年11月9日 (2015. 11. 9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/352, 346
 (32) 優先日 平成28年6月20日 (2016. 6. 20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/365, 634
 (32) 優先日 平成28年7月22日 (2016. 7. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 300066874
 ザ・ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュ
 ユ・コロンビア
 カナダ国 V 6 T 1 Z 3 ブリティッシ
 ユ コロンビア、バンクーバー、アグロノ
 ミー ロード 1 0 3-6 1 9 0、ユニバ
 ーシティー・インダストリー リエゾン オ
 フィス
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直
 (74) 代理人 100202751
 弁理士 岩堀 明代

最終頁に続く

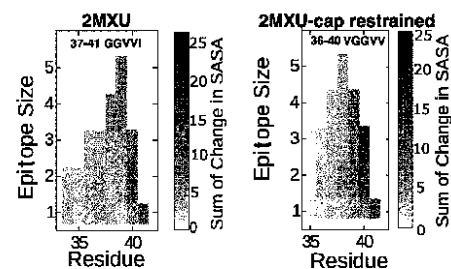
(54) 【発明の名称】 アミロイドベータのC末端エピトープおよびそれに対する立体配座選択的抗体

(57) 【要約】

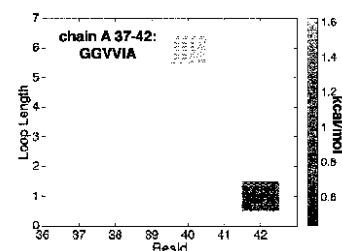
本開示は、Aベータで特定された立体配座エピトープを含めたC末端エピトープ、それに対する抗体ならびに免疫原およびそれに特異的な抗体を作製および使用方法に関する。

【選択図】 図1

Figure 1: Prediction using Collective Coordinate method and G6 method
 Panel A: Collective Coordinates prediction (left: disordered fibril; right: disordered fibril with end-cap restrained)



Panel B: G6 prediction



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

G V V と最大 6 個の A ベータの連続する残基とを含む A ベータペプチドと、リンカーとを含み、前記リンカーが、前記 A ベータペプチドの N 末端残基および前記 A ベータペプチドの C 末端残基と共有結合している、環状化合物。

【請求項 2】

前記ペプチドが、G G V V（配列番号 1）、G G V V I（配列番号 8）、V G G V V I（配列番号 7）、V G G V V（配列番号 6）、および V G G V（配列番号 5）から選択される、請求項 1 に記載の環状化合物。

【請求項 3】

環状ペプチドである、請求項 1 または 2 に記載の環状化合物。

【請求項 4】

i) 対応する直鎖状化合物および／または線維における G および／または V と比較して、少なくとも 10%、少なくとも 20% または少なくとも 30% 異なる、環状化合物中の G および／または V の曲率； i i) G および V から選択される少なくとも 1 つの残基であって、前記残基の少なくとも 1 つの二面角が、対応する直鎖状化合物および／または線維における対応する二面角と比較して少なくとも 30 度、少なくとも 40 度、少なくとも 50 度、少なくとも 60 度、少なくとも 70 度、少なくとも 80 度、少なくとも 90 度、少なくとも 100 度、少なくとも 110 度、少なくとも 120 度、少なくとも 130 度、少なくとも 140 度、または少なくとも 150 度異なる残基；；を含み、ならびに／あるいは i i i) 対応する直鎖状化合物と比較して少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40% 強く拘束された、エントロピーにより測定された V の立体配座を有する、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の環状化合物。

【請求項 5】

前記 A ベータペプチドが、G G V V I A（配列番号 15）である、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の環状化合物。

【請求項 6】

検出可能な標識をさらに含む、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の環状化合物。

【請求項 7】

前記リンカーが、任意に 1 つもしくは複数の官能化可能な部分を含む、1～8 個のアミノ酸および／またはこれと同等に機能的な分子を含む、あるいはこれよりなる、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の環状化合物。

【請求項 8】

前記リンカーのアミノ酸が A および G から選択され、任意に前記官能化可能な部分が C である、請求項 7 に記載の環状化合物。

【請求項 9】

前記リンカーが、アミノ酸 G C G を含む、またはこれよりなる、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の環状化合物。

【請求項 10】

前記リンカーが P E G 分子を含む、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の環状化合物。

【請求項 11】

以下の構造：

10

20

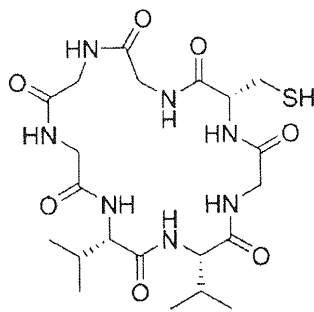
30

40

【化 1】

シクロ (CGGGVVG)

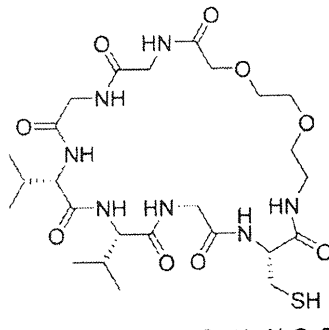
シクロ (C-PEG2-GGVVG)



化学式 : $C_{21}H_{35}N_7O_7S$
分子量 : 529.61

(I)

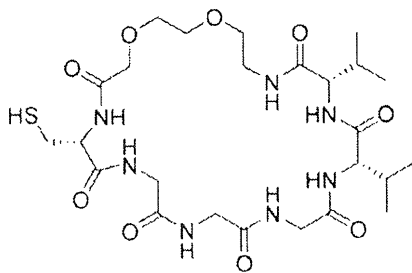
および



化学式 : $C_{25}H_{43}N_7O_9S$
分子量 : 617.72

(II)

シクロ (CGGGVV-PEG2)



化学式 : $C_{25}H_{43}N_7O_9S$
分子量 : 617.72

(III).

から選択される、請求項 1 に記載の環状化合物。

【請求項 1 2】

請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の環状化合物を含む、免疫原。

【請求項 1 3】

前記化合物が、担体タンパク質または免疫原性増強物質と結合している、請求項 1 2 に記載の免疫原。

【請求項 1 4】

前記担体タンパク質がウシ血清アルブミン (BSA) である、または前記免疫原性増強物質がキーホールリンペットヘモシアニン (Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH)) である、請求項 1 3 に記載の免疫原。

【請求項 1 5】

請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の化合物または請求項 1 2 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の免疫原を含む、組成物。

【請求項 1 6】

アジュバントをさらに含む、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

前記アジュバントがリン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウムである、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

10

20

30

40

50

任意選択で配列番号 1～15 のいずれか 1 つで示される配列 GGVV または関連エピトープ配列を有する A ベータペプチドと特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 19】

前記抗体が、対応する直鎖状化合物と比較して、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の環状化合物における A ベータ中のエピトープを特異的かつ／または選択的に結合する、請求項 18 に記載の抗体

【請求項 20】

前記エピトープが、前記抗体との結合に主として関与する GVV の少なくとも 2 個の連続するアミノ酸残基を含み、またはこれよりなり、前記少なくとも 2 個の連続するアミノ酸が、GVV、任意に GGVV (配列番号 1)、もしくは GGVVI (配列番号 8) 内に組み込まれた GV であるか、GGV、任意に GGVV (配列番号 1) GGVVI (配列番号 8) 内に組み込まれた GG であるか、または前記少なくとも 2 個の連続するアミノ酸が、GVV、任意に GGVV (配列番号 1) もしくは GGVVI (配列番号 8) 内に組み込まれた VV である、請求項 18 または 19 に記載の抗体。

【請求項 21】

前記 A ベータペプチドおよび／またはエピトープが、GGVV (配列番号 1)、GGVVI (配列番号 8)、VGGVVI (配列番号 7)、VGGVV (配列番号 6)、および VGGV (配列番号 5) を含む、またはこれよりなる、請求項 18、19、または 20 に記載の抗体。

【請求項 22】

前記抗体が、対応する直鎖状ペプチドよりも、GGVV (配列番号 1) を含む環状化合物に選択的に結合する、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 23】

前記抗体が、前記対応する直鎖状ペプチドよりも、前記環状化合物に関して、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 30 倍、少なくとも 40 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍、少なくとも 500 倍、少なくとも 1000 倍選択的である、請求項 18～22 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 24】

A ベータモノマーおよび／または A ベータ線維よりも A ベータオリゴマーと選択的に結合する、請求項 18～23 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 25】

前記抗体が、A ベータモノマーおよび／または A ベータ線維よりも、A ベータオリゴマーに少なくとも 2 倍、3 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 30 倍、少なくとも 40 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍、少なくとも 500 倍、少なくとも 1000 倍選択的である、請求項 24 に記載の抗体。

【請求項 26】

配列 GGVV または関連エピトープを含む直鎖状ペプチドと特異的かつ／または選択的に結合することがなく、任意選択で、前記直鎖状ペプチドの配列が、前記抗体を生じさせるのに使用する環状化合物の直鎖型、任意選択で配列番号 2、3、または 4 で示される配列を有する直鎖状ペプチドである、請求項 18～25 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 27】

in situ で A ベータモノマー斑および／または A ベータ線維斑と結合しない、またはほとんど結合しない、請求項 18～26 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 28】

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項 18～27 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 29】

ヒト化抗体である、請求項 18～28 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 30】

F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v、d s F v、d s - s c F v、二量体、ナノボディ、ミニボディ、ダイアボディおよびその多量体から選択される抗体結合フラグメントである、請求項 18～29 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 31】

任意選択で融合している軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含み、前記重鎖可変領域が、相補性決定領域 C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含み、前記軽鎖可変領域が、相補性決定領域 C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 を含み、前記 C D R のアミノ酸配列が、配列：

C D R - H 1 G F T F S N Y W (配列番号 17)

C D R - H 2 I R L K S Y N Y A T (配列番号 18)

C D R - H 3 L R W I D Y (配列番号 19)

C D R - L 1 Q D I N S Y (配列番号 20)

C D R - L 2 R A N (配列番号 21)

C D R - L 3 P Q Y D E F P Y T (配列番号 22)

を含む、請求項 18～30 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 32】

i) 配列番号 24 で示されるアミノ酸配列；i i) 配列番号 24 と少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 % の配列同一性を有し、前記 C D R の配列が、配列番号 17、18 および 19 で示される、アミノ酸配列、または i i i) 保存的に置換されたアミノ酸配列 i) を含む重鎖可変領域を含む、請求項 18～32 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 33】

i) 配列番号 26 で示されるアミノ酸配列、i i) 配列番号 26 と少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 % 70 % の配列同一性を有し、前記 C D R の配列が配列番号 20、21 および 22 で示される、アミノ酸配列、または i i i) 保存的に置換された i) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 18～30 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 34】

前記重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号 23 で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされ；かつ／あるいは、前記抗体が、配列番号 25 で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされる軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む、請求項 18～33 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 35】

前記重鎖可変領域が、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列を含む、もしくはこれよりなり、かつ／または、前記軽鎖可変領域が、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を含む、もしくはこれよりなる、請求項 18～34 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 36】

ヒト A ベータとの結合に関して、表 13 に記載される C D R 配列を含む抗体と競合する、請求項 18～30 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 37】

請求項 18～36 のいずれか 1 項に記載の抗体と、検出可能な標識または細胞毒性物質とを含む、イムノコンジュゲート。

【請求項 38】

前記検出可能な標識が、任意選択で P E T 撮像などの対象の撮像に使用する、陽電子放出放射性核種を含む、請求項に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 39】

任意選択で希釈剤とともに、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の化合物もしくは免疫原、請求項 18～36 のいずれか 1 項に記載の抗体、または請求項 37 もしくは 38 に記載のイムノコンジュゲートを含む、組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 40】

請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の化合物もしくは免疫原のタンパク質性部分、請求項 18～36 のいずれか 1 項に記載の抗体、または請求項 37 もしくは 38 に記載のタンパク質性イムノコンジュゲートをコードする、核酸分子。

【請求項 41】

請求項 40 に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 42】

請求項 18～36 のいずれか 1 項に記載の抗体を発現し、かつ／または請求項 41 に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 43】

請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の化合物、請求項 12～14 のいずれか 1 項に記載の免疫原、請求項 18～36 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 37 もしくは 38 に記載のイムノコンジュゲート、請求項 39 に記載の組成物、請求項 40 に記載の核酸分子、請求項 41 に記載のベクター、または請求項 42 に記載の細胞を含む、キット。

【請求項 44】

請求項 18～36 のいずれか 1 項に記載の抗体を作製する方法であって、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の化合物もしくは免疫原または前記化合物もしくは免疫原を含む組成物を対象に投与することと、前記投与した化合物もしくは免疫原および／または A ベータオリゴマーに特異的かつ／または選択的であり、任意選択で、前記 A ベータペプチドを含む直鎖状ペプチドと結合しない、もしくはほとんど結合せず、かつ／または斑と結合しない、もしくはほとんど結合しない、抗体および／または抗体を発現する細胞を単離することを含む、方法。

【請求項 45】

生体試料が A ベータを含むかどうかを判定する方法であって、

a. 抗体：A ベータオリゴマー複合体の形成が可能な条件下で、前記試料と、請求項 18～36 のいずれか 1 項に記載の抗体または請求項 37 もしくは 38 に記載のイムノコンジュゲートとを接触させることと、

b. 何らかの複合体の存在を検出することと

を含む、方法。

【請求項 46】

前記生体試料が A ベータオリゴマーを含有するかどうかを判定するための請求項 45 に記載の方法であって、

a. 抗体：A ベータオリゴマー複合体の形成が可能な条件下で、前記試料と、A ベータオリゴマーに特異的かつ／または選択的な請求項 18～36 のいずれか 1 項に記載の抗体または請求項 37 もしくは 38 に記載のイムノコンジュゲートとを接触させることと

b. 何らかの複合体の存在を検出することと

を含み、

検出可能な複合体の存在により、前記試料が A ベータオリゴマーを含有し得ることが示される、

請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

複合体の量を測定する、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記試料が、脳組織もしくはその抽出物、全血、血漿、血清および／または CSF を含む、請求項 45～47 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 49】

前記試料がヒト由来である、請求項 45～48 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 50】

前記試料を対照、任意選択で以前の試料と比較する、請求項 45～49 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

S P RによりAベータのレベルを検出する、請求項45～50のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5 2】

対象のAベータのレベルを測定する方法であって、

A Dを有するリスクもしくは疑いがある、またはA Dを有する対象に、請求項37または38に記載のイムノコンジュゲートであって、前記抗体が検出可能な標識とコンジュゲートされているイムノコンジュゲートを投与することと；前記標識を検出することと、任意選択で前記標識を定量的に検出することと

を含む、方法。

10

【請求項 5 3】

前記標識が陽電子放出放射性核種である、請求項52に記載の方法。

【請求項 5 4】

対象に免疫応答を誘導する方法であって、請求項1～11のいずれか1項に記載の化合物もしくは化合物の組合せ、任意選択で、G G V V（配列番号1）もしくは関連エピトープペプチド配列を含む環状化合物、免疫原および／または前記化合物もしくは前記免疫原を含む組成物を前記対象に投与することと；任意選択で、前記投与した化合物または免疫原中のAベータペプチドと特異的または選択的に結合する細胞および／または抗体を単離することとを含む、方法。

【請求項 5 5】

20

Aベータオリゴマーの伝播を阻害する方法であって、有効量の請求項19～38のいずれか1項に記載のAベータオリゴマーに特異的かつ／または選択的な抗体またはイムノコンジュゲートを、Aベータを発現する細胞もしくは組織と接触させる、または必要とする対象に投与して、Aベータ凝集および／またはAベータオリゴマー伝播を阻害することを含む、方法。

【請求項 5 6】

A Dおよび／またはその他のAベータアミロイド関連疾患を治療する方法であって、必要とする対象にi) 有効量の請求項19～38のいずれか1項に記載の抗体またはイムノコンジュゲート、任意選択で、Aベータオリゴマーに特異的かつ／もしくは選択的な抗体または前記抗体を含む医薬組成物を投与すること；2) G G V V（配列番号1）もしくは関連エピトープ配列を含む単離環状化合物または免疫原または前記環状化合物を含む医薬組成物あるいは3) 1の抗体または2の免疫原をコードする核酸または核酸を含むベクターを、必要とする対象に投与することを含む、方法。

30

【請求項 5 7】

本明細書に記載される抗体を用いて、前記治療する対象由来の生体試料をAベータの有無またはレベルに関して評価する、請求項56に記載の方法。

【請求項 5 8】

2つ以上の抗体または免疫原を投与する、請求項55～57のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5 9】

40

前記抗体、前記イムノコンジュゲート、前記免疫原、前記組成物または前記核酸もしくは前記ベクターを脳またはC N Sの他の部分に直接投与する、請求項55～58のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記組成物が、薬学的に許容される希釈剤または担体と混合した前記化合物または前記免疫原を含む、医薬組成物である、請求項55～59のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6 1】

配列番号で1～15に示される配列のいずれか1つの配列よりなるAベータペプチドを含む、単離ペプチド。

【請求項 6 2】

50

リンカーを含み、前記リンカーが前記 A ベータペプチドの N 末端残基および／または前記 A ベータの C 末端残基と共有結合している、環状ペプチドである、請求項 6 1 に記載の単離ペプチド。

【請求項 6 3】

検出可能な標識を含む、請求項 6 1 または 6 2 に記載の単離ペプチド。

【請求項 6 4】

請求項 6 1 ～ 6 3 のいずれか 1 項に記載の単離ペプチドをコードする、核酸配列。

【請求項 6 5】

請求項 1 ～ 3 6 のいずれか 1 項に記載の抗体を発現する、ハイブリドーマ細胞または細胞株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

これは 2015 年 11 月 9 日に出願された米国特許出願第 62 / 253044 号、2016 年 6 月 20 日に出願された米国特許出願第 62 / 352, 346 号、2016 年 7 月 22 日に出願された米国特許出願第 62 / 365, 634 号および 2016 年 9 月 12 日に出願された米国特許出願第 62 / 393, 615 号の優先権の利益を主張する PCT 出願であり、上記の出願はそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

(分野)

本開示は、C 末端アミロイドベータ (A ベータまたは A β) エピトープおよびそれに対する抗体、より具体的には、A ベータオリゴマー内で選択的に接触可能であると予測され、示されている立体配座 A ベータエピトープ、および関連する抗体組成物、ならびにそれらの用途に関する。

【背景技術】

【0003】

(背景)

36 ～ 43 アミノ酸のペプチドとして存在するアミロイドベータ (A ベータ) は、酵素である β セクレターゼおよび γ セクレターゼによってアミロイド前駆体タンパク質 (APP) から放出される産物である。AD 患者では、A ベータは可溶性モノマー、不溶性線維および可溶性オリゴマーの形で存在し得る。モノマー型の A ベータは、主として不定形のポリペプチド鎖として存在する。線維型の A ベータは、よく株と呼ばれる様々な形態に凝集することができる。これらの構造のうちのいくつかは固体 NMR により決定されている。

【0004】

例えば、原子分解三次元構造データの結晶学的データベースであるタンパク質データバンク (PDB) では、3 回対称性の A β 構造 (PDB エントリー 2M4J)、A β - 40 モノマーの 2 回対称性構造 (PDB エントリー 2LMN) および A β - 42 モノマーの一本鎖平行 in-register 構造 (PDB エントリー 2MXU) を含めたいくつかの線維の株の構造が入手可能である。

【0005】

2M4J の構造は Lu ら [8] に報告されており、2MXU の構造は Xiao ら [9] に報告されている。2LMN の構造は Petkova ら [10] に報告されている。

【0006】

A ベータオリゴマーは、培養した細胞系およびニューロンを死滅させ、スライス培養物および動物生体において記憶を促進し長期増強 (LTP) と呼ばれる極めて重要なシナプス活性を遮断することが示されている。

【0007】

これまでにオリゴマーの構造は決定されていない。さらに、NMR およびその他の証拠

10

20

30

40

50

から、オリゴマーが単一の明確に定められた構造ではなく、規則性に乏しく立体配座的に可塑性で順応性のある構造アンサンブルの形で存在することがわかっている。さらに、毒性オリゴマー種の濃度はモノマーまたは線維の濃度よりはるかに低い（推定値には幅があるが、約1000分の1またはそれ以下である）ため、この標的は捉えどころのないものとなっている。

【0008】

Aベータと結合する抗体が記載されている。

【0009】

表題BIOMARKERS AND METHODS FOR DIAGNOSING ALZHEIMER'S DISEASE AND/OR MILD COGNITIVE IMPAIRMENTの国際特許公開公報第2010128139号は、所定の対象の体液中のpGlu Aベータを結合できる抗体のレベルの評価を介したアルツハイマー病に関する診断方法を開示している。

10

【0010】

米国特許第9, 273, 126号（表題HUMANIZED ANTIBODIES AGAINST THE BETA-AMYLOID PEPTIDE）は、Aベータ配列AIIGLMVGGVV（配列番号13）に対する抗体および診断のための方法を記載している。

【0011】

表題NOVEL ASSAY FOR THE DETECTION OF AMYLOID BETA PEPTIDESの国際特許公開公報第2011033046号は、Aベータ（1～40）の検出のための方法を開示している。

20

【0012】

表題MONOCLONAL ANTIBODY AND USE THEREOFの欧州特許第1717250号は、抗体AベータのC末端配列35-40 MVGGVV（配列番号14）および38-42 GVVI A（配列番号15）、ならびにその用途を開示している。この抗体は、チログロブリンに結合したペプチドを使用して作製された。

【0013】

表題METHOD FOR DETECTING A β -SPECIFIC ANTIBODIES IN A BIOLOGICAL SAMPLEの国際特許公開公報第2014161875号は、アルツハイマー病の診断のため、Aベータ変異体を使用してAベータ特異的抗体を検出するための方法を開示している。

30

【0014】

表題BIOASSAY FOR POLYQ PROTEINの国際特許公開公報第2010015592号およびWei hofen et al. [12]は、GGVV（配列番号1）のC末端のタンパク質のタグを記載している。

【0015】

Paganetti et al. [11]はまた、Aベータ1～40のレベルの判定のため、Aベータ40の遊離C末端ペプチドGGVV（配列番号1）に対するAベータ1～40に特異的なモノクローナル抗体の使用を記載している。

40

【0016】

またGGVV（配列番号1）は、モノクローナル抗体のパネルを用いたスクリーニングを介して、Parietaria officinalisの主要なアレルゲンのN末端で同定されている[13]。

【0017】

Aベータのモノマーもしくは線維またはモノマーと線維の両方よりもAベータオリゴマーと優先的または選択的に結合する抗体が望ましい。

【発明の概要】

【0018】

本明細書には、残基GGVV（配列番号1）を含むおよび／またはこれよりなるAベータ

50

タのエピトープ、より具体的には立体配座エピトープまたは関連エピトープならびに前記エピトープに特異的かつ／または選択的と結合する抗体が記載される。エピトープは、オリゴマー種をモノマーおよび／または線維のものから区別する立体配座のAベータのオリゴマー種において選択的に露出され得る。

【0019】

一態様は、G V Vと最大6個のAベータの連続する残基と含むAベータペプチドと、リンカーを含む環状化合物であって、リンカーが、AベータペプチドのN末端残基およびAベータのC末端残基と共有結合している、環状化合物を含む。

【0020】

一実施形態では、ペプチドは、任意選択でG G V V（配列番号1）、G G V V I（配列番号8）、V G G V V I（配列番号7）、V G G V V（配列番号6）、およびV G G V（配列番号5）から選択される。

10

【0021】

別の実施形態では、環状化合物は環状ペプチドである。

【0022】

別の実施形態では、本明細書に記載される環状化合物は、i) 対応する直鎖状化合物および／または線維におけるGおよび／またはVと比較して、少なくとも10%、少なくとも20%または少なくとも30%異なる、環状化合物中のGおよび／またはVの曲率；ii) GおよびVから選択される少なくとも1つの残基であって、前記残基の少なくとも1つの二面角が、対応する直鎖状化合物および／または線維における対応する二面角と比較して少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度、少なくとも80度、少なくとも90度、少なくとも100度、少なくとも110度、少なくとも120度、少なくとも130度、少なくとも140度、または少なくとも150度異なる、残基；を含み、ならびに／あるいはiv) 対応する直鎖状化合物と比較して少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%強く拘束された、エントロピーによって測定されたVの立体配座を有する。

20

【0023】

別の実施形態では、Aベータペプチドは、G G V V I A（配列番号15）である。

【0024】

別の実施形態では、環状化合物は、検出可能な標識をさらに含む。

30

【0025】

別の実施形態では、リンカーは、任意選択で1つもしくは複数の官能化可能な部分を含む、1～8個のアミノ酸および／またはこれと同等に機能する分子を含む、あるいはこれよりなる。

【0026】

別の実施形態では、リンカーのアミノ酸がAおよびGから選択され、任意選択で官能化可能な部分がCである。

【0027】

別の実施形態では、リンカーは、アミノ酸G C Gを含む、またはこれよりなる。別の実施形態では、リンカーはP E G分子を含む。

40

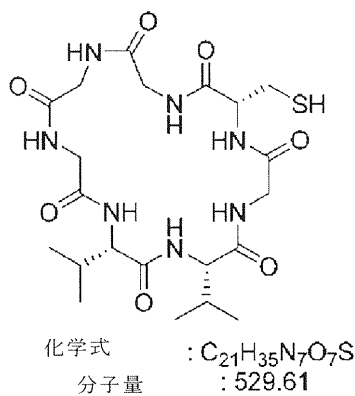
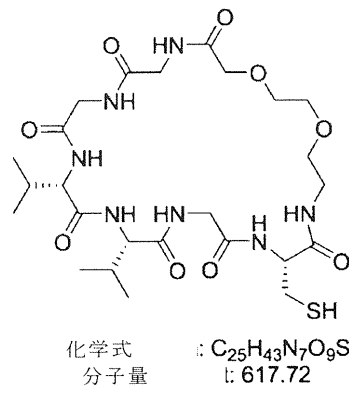
【0028】

別の実施形態では、環状化合物は、以下の構造から選択される。

【化 1】

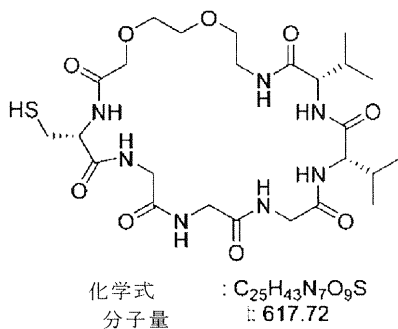
シクロ (CGGGVVG)

シクロ (C-PEG2-GGVVG)

(I)
および

(II)

シクロ (CGGGVV-PEG2)



(III).

【0029】

一態様は、本明細書に記載される環状化合物を含む、免疫原を含む。

【0030】

一実施形態では、化合物は、担体タンパク質または免疫原性増強物質と結合している。

【0031】

一実施形態では、担体タンパク質がウシ血清アルブミン (BSA) である、または免疫原性増強物質がキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) である。

【0032】

一態様は、本明細書に記載される化合物または本明細書に記載される免疫原を含む、組成物を含む。

【0033】

一実施形態では、本明細書に記載される組成物は、アジュバントをさらに含む。

【0034】

一実施形態では、アジュバントはリン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウムである。

【0035】

一態様は、任意選択で配列番号 1～15 のいずれか 1 つで示される配列 GGVV (配列番号 1) または関連エピトープ配列を有する A ベータペプチドに特異的と結合する、単離された抗体を含む。

10

20

30

40

50

【0036】

一実施形態では、抗体は、対応する直鎖状化合物と比較して、本明細書中記載される環状化合物中のAベータペプチドのエピトープを特異的かつ／または選択的に結合する。

【0037】

別の実施形態では、エピトープは、抗体との結合に主として関与するGVVの少なくとも2個の連続するアミノ酸残基を含み、またはこれよりなり、少なくとも2個の連続するアミノ酸は、GVV、任意にGGVV（配列番号1）もしくはGGVVI（配列番号8）内に組み込まれたGVであり、または少なくとも2個の連続するアミノ酸は、GGV、任意にGGVV（配列番号1）、GGVVI（配列番号8）内に組み込まれたGGであり、または少なくとも2つの連続するアミノ酸は、GVV、任意にGGVV（配列番号1）もしくはGGVVI（配列番号8）内に組み込まれたVVである。

10

【0038】

別の実施形態では、Aベータのペプチドおよび／またはエピトープは、GGVV（配列番号1）、GGVVI（配列番号8）、VGGVVI（配列番号7）、VGGVV（配列番号6）、およびVGGV（配列番号5を含む、またはこれよりなる。

【0039】

別の実施形態では、抗体は、対応する直鎖状ペプチドよりもGGVV（配列番号1）を含む環状化合物に選択的に結合する。

【0040】

別の実施形態では、抗体は、対応する直鎖状ペプチドよりも、環状化合物に関して少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍選択的である。

20

【0041】

別の実施形態では、抗体は、Aベータモノマーおよび／またはAベータ線維よりもAベータオリゴマーを選択的に結合する。

【0042】

別の実施形態では、抗体は、Aベータモノマーおよび／またはAベータ線維よりも、Aベータオリゴマーに関して少なくとも2倍、3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍選択的である。

30

【0043】

別の実施形態では、抗体は、配列GGVV（配列番号1）または関連エピトープを含む直鎖状ペプチドに特異的かつおよび／または選択的に結合することがなく、任意選択で、直鎖状ペプチドの配列は、抗体を生じさせるのに使用する環状化合物の直鎖型、任意選択で配列番号2、3、または4で示される配列を有する直鎖状ペプチドである。

【0044】

別の実施形態では、抗体は、*in situ*でAベータモノマー斑および／またはAベータ線維斑と結合しない、またはほとんど結合しない。

【0045】

別の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。

40

【0046】

別の実施形態では、抗体はヒト化抗体である。

【0047】

別の実施形態では、抗体は、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ナノボディ、ミニボディ、ダイアボディおよびその多量体から選択される抗体結合フラグメントである。

【0048】

別の実施形態は、本明細書中記載される抗体は、任意選択で融合している軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含み、重鎖可変領域は、相補性決定領域CDR-H1、CDR-H2

50

および C D R－H 3 を含み、軽鎖可変領域は、相補性決定領域 C D R－L 1、C D R－L 2 および C D R－L 3 を含み、前記 C D R のアミノ酸配列は以下の配列を含む：

【表 1】

CDR-H1	GFTFSNYW	(配列番号 1 7)
CDR-H2	IRLKSINYAT	(配列番号 1 8)
CDR-H3	LRWIDY	(配列番号 1 9)
CDR-L1	QDINSY	(配列番号 2 0)

10

【0 0 4 9】

別の実施形態では、抗体は、i) 配列番号 2 4 で示されるアミノ酸配列；i i) 配列番号 2 4 と少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 % もしくは少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、C D R の配列が配列番号 1 7、1 8 および 1 9 で示される、アミノ酸配列；または i i i) 保存的に置換されたアミノ酸配列 i) を含む重鎖可変領域を含む。

【0 0 5 0】

別の実施形態では、抗体は、i) 配列番号 2 6 で示されるアミノ酸配列；i i) 配列番号 2 6 と少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 % もしくは少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、C D R の配列が配列番号 2 0、2 1 および 2 2 で示される、アミノ酸配列；または i i i) 保存的に置換された i) のアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域を含む。

20

【0 0 5 1】

別の実施形態では、重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号 2 3 で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされ；かつ／あるいは、抗体が、配列番号 2 5 で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされる軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。

【0 0 5 2】

別の実施形態では、重鎖可変領域が、配列番号 2 4 で示されるアミノ酸配列を含む、もしくはこれよりなり、かつ／または、軽鎖可変領域が、配列番号 2 6 で示されるアミノ酸配列を含む、もしくはこれよりなる。

30

【0 0 5 3】

別の実施形態では、抗体は、ヒト A ベータとの結合に関して、表 1 3 に記載される C D R 配列を含む抗体と競合する。

【0 0 5 4】

一態様は、本明細書に記載される抗体と、検出可能な標識または細胞毒性物質とを含む、イムノコンジュゲートを含む。

【0 0 5 5】

一実施形態では、検出可能な標識は、任意選択で P E T 撮像などの対象の撮像に使用する、陽電子放出放射性核種を含む。

40

【0 0 5 6】

一態様は、任意選択で希釈剤とともに、本明細書に記載される抗体または本明細書に記載されるイムノコンジュゲートを含む組成物を含む。

【0 0 5 7】

一態様は、本明細書に記載される化合物もしくは免疫原のタンパク質性部分、本明細書に記載される抗体または本明細書に記載されるタンパク質性イムノコンジュゲートをコードする、核酸分子を含む。

【0 0 5 8】

一態様は、本明細書に記載される核酸を含むベクターを含む。

【0 0 5 9】

50

一態様は、本明細書に記載される抗体を発現し、かつ／または本明細書に記載されるベクターを含む細胞を含む。

【0060】

一態様は、本明細書に記載される化合物、本明細書に記載される免疫原、本明細書に記載される抗体、本明細書に記載されるイムノコンジュゲート、本明細書に記載される組成物、本明細書に記載される核酸分子、本明細書に記載されるベクターまたは本明細書に記載される細胞を含むキットを含む。

【0061】

一態様は、本明細書に記載される抗体を作製する方法であって、本明細書に記載される化合物もしくは免疫原または前記化合物もしくは免疫原を含む組成物を対象に投与することと、投与する化合物もしくは免疫原および／またはAベータオリゴマーに特異的かつ／または選択的であり、任意選択で、Aベータペプチドを含む直鎖状ペプチドと結合しない、もしくはほとんど結合せず、かつ／または斑と結合しない、もしくはほとんど結合しない、抗体および／または抗体を発現する細胞を単離することを含む、方法を含む。

【0062】

一態様は、生体試料がAベータを含むかどうかを判定する方法であって、

a. 抗体：Aベータオリゴマー複合体を形成可能な条件下で、試料と、本明細書に記載される抗体または本明細書に記載されるイムノコンジュゲートとを接触させること；および

b. 何らかの複合体の存在を検出すること
を含む、方法を含む。

【0063】

一実施形態では、生体試料がAベータオリゴマーを含み、上記方法が、

a. 抗体：Aベータオリゴマー複合体の形成が可能な条件下で、試料と、Aベータオリゴマーに特異的かつ／または選択的な本明細書に記載される抗体または本明細書に記載されるイムノコンジュゲートとを接触させること；および

b. 何らかの複合体の存在を検出すること
を含み、

検出可能な複合体の存在により、試料がAベータオリゴマーを含有し得ることが示される。

【0064】

別の実施形態では、複合体の量を測定する。

【0065】

別の実施形態では、試料は、脳組織もしくはその抽出物、全血、血漿、血清および／またはCSFを含む。

【0066】

別の実施形態では、試料はヒトから得られている。

【0067】

別の実施形態では、試料を対照、任意選択で以前の試料と比較する。

【0068】

別の実施形態では、SPRによりAベータのレベルを検出する。

【0069】

一態様は、対象のAベータのレベルを測定する方法であって、ADを有するリスクもしくは疑いがある、またはADを有する対象に、抗体が検出可能な標識とコンジュゲートされている本明細書中に記載のイムノコンジュゲートを投与すること；および標識を検出すること、任意選択で標識を定量的に検出することを含む、方法を含む。

【0070】

一実施形態では、標識は陽電子放出放射性核種である。

【0071】

一態様は、対象に免疫応答を誘導する方法であって、本明細書に記載される化合物もし

10

20

30

40

50

くは化合物の組合せ、任意選択で、GGVV（配列番号1）もしくは関連エピトープペプチド配列を含む環状化合物、免疫原および／または前記化合物もしくは前記免疫原を含む組成物を対象に投与すること；ならびに任意選択で、投与した化合物または免疫原中のAベータペプチドと特異的または選択的に結合する細胞および／または抗体を単離することを含む、方法を含む。

【0072】

一態様は、Aベータオリゴマー伝播を阻害する方法であって、有効量の本明細書に記載されるAベータオリゴマーに特異的または選択的な抗体またはイムノコンジュゲートを、Aベータを発現する細胞もしくは組織と接触させる、または必要とする対象に投与して、Aベータの凝集および／またはオリゴマー伝播を阻害することを含む、方法を含む。

10

【0073】

一態様は、ADおよび／またはその他のAベータアミロイド関連疾患を治療する方法であって、必要とする対象にi) 有効量の本明細書に記載される抗体またはイムノコンジュゲート、任意選択で、Aベータオリゴマーに特異的もしくは選択的な抗体または前記抗体を含む医薬組成物を投与すること；2) GGVV（配列番号1）もしくは関連エピトープ配列を含む単離環状化合物または免疫原または前記環状化合物を含む医薬組成物あるいは3) 1の抗体または2の免疫原をコードする核酸または核酸を含むベクターを、必要とする対象に投与することを含む、方法を含む。

【0074】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体を用いて、治療する対象由来の生体試料をAベータの有無またはレベルに関して評価する。

20

【0075】

別の実施形態では、2つ以上の抗体または免疫原を投与する。

【0076】

別の実施形態では、抗体、イムノコンジュゲート、免疫原、組成物または核酸もしくはベクターを脳またはCNSの他の部分に直接投与する。

【0077】

別の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される希釈剤または担体と混合した化合物または免疫原を含む、医薬組成物である。

【0078】

一態様は、配列番号1～15で示される配列のいずれか1つの配列よりなるAベータペプチドを含む、単離ペプチドを含む。

30

【0079】

一実施形態では、ペプチドは、リンカーを含み、リンカーがAベータペプチドのN末端残基および／またはAベータのC末端残基と共有結合している、環状ペプチドである。

【0080】

別の実施形態では、本明細書に記載される単離ペプチドは検出可能な標識を含む。

【0081】

一態様は、単離ペプチドをコードする核酸配列を含む。

【0082】

一態様は、抗体を発現するハイブリドーマを含む。

40

【0083】

以下の詳細な説明から本開示のその他の特徴と利点が明らかになるであろう。ただし、この詳細な説明から本開示の趣旨および範囲内に含まれる様々な変更および改変が当業者には明らかになることから、詳細な説明および具体例は、本開示の好ましい実施形態を示すと同時に、単に説明を目的として記載されるものであることが理解されるべきである。

【0084】

これより本開示の実施形態を図面と関連させて説明する。

【図面の簡単な説明】

【0085】

50

【図 1】集団座標法（パネル A）および Promis G - o 法（パネル B）により求めた配列の関数としての露出の可能性を示す図である。

【図 2】曲率を残基インデックスの関数として示す図である。環状ペプチド C G G G V V G（配列番号 2）の平衡アンサンブルの平均曲率（パネル B）が直鎖状ペプチドの曲率（パネル A）および線維での様々なモノマーの平均曲率（パネル C）とともに示されている。各ペプチドのすべての残基の曲率の値の平均値の収束の確認は、パネル D から F に示されている。

【図 3】残基 3 8 G の側鎖および主鎖の原子を含む角度 $O-C-C\alpha-H\alpha 1$ （パネル A）、 $O-C-C\alpha-H\alpha 2$ （パネル B）、および $O-C-C\alpha-N$ （パネル C）に関する、および 4 0 V の側鎖を含む角度 $O-C-C\alpha-C\beta$ （パネル D）に関する二面角分布が示されている。3 8 G および 4 0 V の概略が差し込み図に示されており、二面角が引き継がれている対応する結合は、他の結合よりも濃い色で示されている。重複のパーセンテージの値が表 2 に提供されている。分布のピークは表 3 に示されている。

【図 4】各残基 3 7 G（パネル A）、3 8 G（パネル B）、3 9 V（パネル C）および 4 0 V（パネル D）に関してプロットされた、線維のエントロピーと比較した、直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドにおける個々の二面角のエントロピー変化。パネル E：個々の残基の側鎖のエントロピー—主鎖のラムチャンドランエントロピーは含まれていない。パネル F：個々の残基の側鎖+主鎖（合計）の立体配座エントロピー。環状ペプチドは、残基 3 9 V および 4 0 V に関して直鎖状ペプチドよりも強固である。環状ペプチドにおける少ない側鎖の立体配座エントロピーは、選択性の付与に役立ち得る良好に定義された立体配座の状態を支援する。パネル G は、直鎖状ペプチドに対する各残基のエントロピーの損失をプロットし、環状アンサンブルに局在化したエントロピーの損失が有意であることを明らかに示すものである。これは、環状ペプチドと一致した立体配座を採用することは、直鎖状ペプチドではまれであることを示す。このような制限されたセットの立体配座にある確率は、おおよそ $\exp(-\Delta S) = 0.001$ である。線維の立体配座にある確率は、付随するエントロピーの損失に関するエンタルピーの補完により高められている。

【図 5】線維 2 M X U（右のパネル）における残基 3 8 G に関する主鎖のラムチャンドラン角に加えた、ペプチド C G G G V V G（配列番号 2）の環状（左のパネル）および直鎖状（中央のパネル）の形態における、残基 3 8 G に関する平衡主鎖のラムチャンドラン角。ラムチャンドラン角に関する各直鎖状、環状、および線維（2 M X U）の形態における残基 3 8 G 間の重複する確率が、表 4 に示されている。対応する分布のピーク角度が表 5 に示されている。

【図 6】残基 G G V V（配列番号 1）に関する溶媒接触表面積（S A S A）のプロット。環状ペプチドは破線で示されている。直鎖状ペプチドは、濃灰色の実線で示されている。線維の 2 M X U は、淡灰色の実線で示されている。

【図 7】パネル A：環状ペプチドおよび直鎖状ペプチドの残基 3 7 G、3 8 G、3 9 V、および 4 0 V のアライメントされた重量中心の構造が、2 つの異なる視点から重複する写真で示されている。環状ペプチドの残基は黒色で示されており、直鎖状ペプチドの残基は白色で示されている。パネル B：環状ペプチド構造 C G G G V V G（配列番号 2）および直鎖状ペプチド構造 C G G G V V G（配列番号 2）の 2 つの図面であり、両方がリコリス状態（l i c o r i c e r e p r e s e n t a t i o n）で表されており、よって側鎖の配向を観察することができる。パネル C：環状ペプチド結合を伴う環状ペプチド C G G G V V G（配列番号 2）、G 残基と C 残基との間に P E G 2 リンカーを伴う環状ペプチド C - P E G 2 - G G V V G（配列番号 3）、および C 残基と V 残基との間に P E G 2 リンカーを伴う環状ペプチド C G G G V V - P E G 2（配列番号 4）を含む、エピトープ残基 G G V V（配列番号 1）を含む環状ペプチドの概略図。

【図 8】エピトープ G G V V（配列番号 1）の溶媒接触表面積が、直鎖状ペプチドおよび環状ペプチド、ならびに A ベータポリペプチド 2 M 4 J の C 末端の一部に関して示されている。

【図 9】平均平方二乗誤差（R M S D）によるクラスタリングプロット；軸は、環状ペプ

10

20

30

40

50

チドアンサンプルの重量中心の構造における G G V V（配列番号 1）に対する G G V V（配列番号 1）の R M S D、直鎖状ペプチドアンサンプルの重量中心の構造における G G V V（配列番号 1）に対する G G V V（配列番号 1）の R M S D、および P D B I D 2 M X U の線維アンサンプルの重量中心の構造における G G V V（配列番号 1）に対する G G V V（配列番号 1）の R M S D に、対応する。各ポイントは、環状ペプチド平衡アンサンプル、直鎖状ペプチドの平衡アンサンプル、または P D B I D 2 M X U から開始した線維の平衡アンサンプルから得た所定の立体配座に対応する。3 つの異なる視点が、パネル A ~ C に提示されている。濃灰色の丸で示されている環状ペプチドのアンサンプルは、直鎖状アンサンプルまたは線維アンサンプルと立体配座的に異なっている。パネル D ~ G は、ペプチドの環状形態、直鎖状形態、および線維形態の分布間での重複の収束の確認を示す。数字での重複パーセンテージが、表 6 に示されている。特に、環状ペプチドおよび線維ペプチドの 2 M X U は、0 % の重複を有する。

【図 10】他の線維株の立体配座に関する R M S D によるクラスタリングプロット；軸は、環状ペプチドアンサンプルの重量中心の構造における G G V V（配列番号 1）に対する G G V V（配列番号 1）の R M S D、直鎖状ペプチドアンサンプルの重量中心の構造における G G V V（配列番号 1）に対する G G V V（配列番号 1）の R M S D、および A ベータ 40 のいくつかの線維モデルに関する平衡アンサンプルの重量中心の構造における G G V V（配列番号 1）に対する G G V V（配列番号 1）の R M S D に、対応する。各ポイントは、環状ペプチド、または P D B I D 2 M 4 J、2 L M N、および 2 L M P に由来する様々な「株」の線維平衡アンサンプルから得られる所定の立体配座に対応する。

【図 11】パネル A において環状ペプチドおよび直鎖状ペプチド、ならびにパネル B において A ベータオリゴマーおよび A ベータモノマーに対する組織培養上清の表面プラズモン共鳴（S P R）直接結合アッセイを使用した、組織培養上清由来のクローンの一次スクリーニング。I g G のクローンのみが示されている。

【図 12】S P R 直接結合アッセイ対 E L I S A における環状ペプチドと m A b の結合性を比較したプロット。I g G、I g M、および I g A のクローンが示されている。

【図 13】環状ペプチド、直鎖状ペプチド、A ベータ（A β ）モノマー、および A ベータオリゴマー（A β O）に対する選択クローンの S P R 直接結合アッセイ

【図 14】6 E 10 陽性対照抗体（A）およびシクロ（C G G G V V G）（配列番号 2）（B）に対して生じさせた抗体を用いた死体 A D 脳の斑の免疫組織化学染色を示す図である。

【図 15】選択し精製した抗体に関する S P R 間接（捕捉）結合アッセイを用いた二次スクリーニングを示す図である。A D 患者からプールした可溶性脳抽出物（B H）の捕捉抗体に対する S P R 結合応答から、非 A D 対照からプールした脳抽出物の捕捉抗体に対する結合応答を差し引いたもの。

【図 16】A ベータオリゴマーに対する抗体結合の検証を示す図である。様々な濃度の市販の調製済みの安定な A ベータオリゴマーと固定化抗体との結合に関する S P R センサグラムおよび結合応答プロット。パネル A は陽性対照 m A b 6 E 10 での結果を示し、パネル B は陰性アイソタイプ対照での結果を示し、パネル C はシクロ（C G G G V V G）（配列番号 2）に対して生じさせた抗体での結果を示している。パネル D は、環状ペプチドに対して生じさせた選択した抗体クローンと、濃度 1 マイクロモルの A ベータオリゴマーとの結合をプロットしたものである。

【図 17】G G V V（配列番号 1）を含む環状ペプチドを用いて生じさせた代表的な抗体の存在下（星）または不在下（四角）における i n v i v o での A ベータ凝集伝播のプロットである。

【図 18 - 1】異なるモル比のアイソタイプの陰性対照（A）またはシクロ（C G G G V V G）（配列番号 2）に対して生じさせた抗体（B）の存在下または非存在下における、A ベータオリゴマー（A β O）に曝露させたラットの初代の皮質ニューロンの生存率を示すプロットである。

【図 18 - 2】異なるモル比のアイソタイプの陰性対照（A）またはシクロ（C G G G V

V G) (配列番号 2) に対して生じさせた抗体 (B) の存在下または非存在下における、A ベータオリゴマー (A β O) に曝露させたラットの初代の皮質ニューロンの生存率を示すプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0086】

表 1 は、直鎖状、環状、および線維の 2 M X U の形態における、37 G、38 G、39 V、および 40 V の残基による曲率の値を示す。

【0087】

表 2 は、図 3 に提示されている二面角の分布の重複のパーセンテージを示す。

【0088】

表 3 に、環状ペプチドと他の種との間に分布の有意な差がみられる二面角の二面角分布のピーク値を示す。列 1 は、検討した具体的な二面角であり、列 2 は、直鎖状ペプチド C G G G V V G (配列番号 2) におけるその角の二面角分布のピーク値であり、列 3 は、環状ペプチド C G G G V V G (配列番号 2) におけるその角の二面角分布のピーク値であり、列 4 は、線維構造 2 M X U におけるペプチド G G V V (配列番号 1) の二面角分布のピーク値であり、列 5 は、直鎖状ペプチドと環状ペプチドの二面角分布のピーク値の差である。

【0089】

表 4 に、図 5 に提示されている残基 38 G のラマチャンドラン角の重複確率を示す。

【0090】

表 5 に、ラマチャンドラン主鎖ファイ／ブサイ角分布のピーク値を示す。第 1 の列は、検討した残基であり、丸括弧で示されている 2 つの角度ファイおよびブサイを提示している。第 2 の列は、直鎖状ペプチド C G G G V V G (配列番号 2) における残基 38 G のラマチャンドランファイ／ブサイ角のピーク値を示し、第 3 の列は、環状ペプチド C G G G V V G (配列番号 2) における残基 38 G のラマチャンドランファイ／ブサイ角のピーク値を示し、最後の列は、線維構造 2 M X U における 38 G のラマチャンドランファイ／ブサイ角のピーク値を示す。図 5 を参照されたい。

【0091】

表 6 に、図 9 に提示されている、直鎖状、環状、および線維 (2 M X U) のペプチド形態の間の RMSD クラスタリングの重複のパーセンテージを示す。

【0092】

表 7 に、環状、直鎖状、および線維のアンサンブルの重心立体配座における残基 G 37、G 38、V 39、および V 40 に関する主鎖および側鎖の二面角の値を提供する。同様に、環状および直鎖状の重量中心構造の間、ならびに環状および直鎖状の重量中心構造の間における、二面角の差異をも提供する。

【0093】

表 8 に、選択した抗体の結合特性を示す。

【0094】

表 9 に、選択した抗体の結合特性のまとめを示す。

【0095】

表 10 に、シクロ (C G G G V V G) (配列番号 2) に対して生じさせた抗体のオリゴマー結合ーモノマー結合を記載する。

【0096】

表 11 に、ホルマリン固定組織で試験した抗体の特性を記載する。

【0097】

表 12 は例示的毒性試験である。

【0098】

表 13 に C D R 配列を記載する。

【0099】

表 14 に重鎖および軽鎖の可変配列を記載する。

10

20

30

40

50

【0100】

表15は、Aベータ「エピトープ」配列およびリンカーを有する選択Aベータ配列の表である。

【0101】

表16にAベータ1～42のアミノ酸配列を記載する。

【0102】

(本開示の詳細な説明)

本明細書には、アルツハイマー病に関連するオリゴマー種を含めたAベータの毒性オリゴマー種内で優先的に接触可能なエピトープを標的とし得る抗体、免疫療法組成物および方法が提供される。Aベータのオリゴマー種内での抗体結合に特異的かつ／または選択的に接触可能であり得るAベータの領域が特定された。

10

【0103】

本明細書で示されるように、モノマーおよび／または線維上に存在しない、またはわずかに存在するAベータペプチド上の標的を特定することにより、オリゴマー特異的抗体の作製を達成した。オリゴマー特異的エピトープは、モノマーまたは線維の対応するセグメントと一次配列が異なっている必要はないが、オリゴマーにおいて立体配座的に際立ったものであり得る。つまり、これらは、オリゴマー内で、主鎖および／または側鎖の立体配座の点でモノマーおよび／または線維にはみられない（または好ましくない）と考えられる際立った立体配座を示す。

【0104】

直鎖状ペプチド領域に対して生じさせた抗体は、オリゴマーに選択的でないものであり得、したがって、モノマー斑またはAベータ斑にも結合し得る。

20

【0105】

本明細書に記載されるように、オリゴマー型のAベータに選択的になり得る抗体を開発するため、本発明者らは、線維において破壊されやすく、オリゴマーの表面に露出し得るAベータ配列の領域を特定することを目指した。

【0106】

実施例に記載されるように、本発明者らは、線維において破壊されやすいことが明らかになった領域を特定した。本発明者らは、その特定された標的を含む環状化合物が直鎖状アンサンブルまたは線維アンサンブルに対して別の立体配座の基準、例えば、より高い曲率、より大きい露出表面積、別の二面角分布および／または平均二乗偏差(RMSD)によるアライメントが容易ではないことなどを満たすようこれを設計した。

30

【0107】

標的領域を含む環状ペプチドを用いて、同じ配列の直鎖状ペプチド（例えば、対応する直鎖状配列）と比較して環状ペプチドと優先的に結合する抗体を生じさせることができた。実験結果が記載されており、合成モノマーと比較して合成オリゴマーと選択的に結合し、対照CSFよりもAD患者のCSFと優先的に結合し、かつ／または対照の可溶性脳抽出物よりもAD患者の可溶性脳抽出物と優先的に結合する、エピトープ特異的かつ立体配座選択的な抗体が特定される。さらに、AD脳組織の染色では、斑との結合を全くまたはほとんど示さない抗体が特定され、*in vitro*試験では、抗体がAβオリゴマーの伝播および凝集を阻害することがわかった。

40

【0108】

I. 定義

本明細書で使用される「Aベータ(A-beta)」という用語は、代替的に「アミロイドベータ」、「アミロイドβ」、Aベータ(Abeta)、Aベータ(A-beta)または「Aβ」と呼ばれ得る。本明細書中で使用されるアミロイドベータは、36～43個のアミノ酸よりなるペプチドであり、あらゆる種のあらゆる野生型および変異型、特にヒトAベータを包含する。Aベータ40は40アミノ酸型を指し、Aベータ42は42アミノ酸型を指すなど。ヒト野生型Aベータ42のアミノ酸配列は配列番号3で示されるものである。

50

【0109】

本明細書で使用される「Aベータモノマー」という用語は、Aベータ（例えば、1～40、1～41、1～42、1～43）ペプチドの個々のサブユニット型を指す。

【0110】

本明細書で使用される「Aベータオリゴマー」という用語は、本明細書では、複数（例えば、少なくとも2つ）のAベータモノマーが非共有結合によって、約100個未満またはより通常には約50個未満のモノマーからなり、立体配座に柔軟性があり、部分的に規則的である三次元の小球に凝集したAベータサブユニットのいずれか複数のものを指す。例えば、オリゴマーは、3個、4個、5個またはそれ以上のモノマーを含み得る。本明細書で使用される「Aベータオリゴマー」という用語は、合成Aベータオリゴマーおよび／または天然Aベータオリゴマーの両方を包含する。「天然Aベータオリゴマー」は、*in vivo*で、例えばADを有する対象の脳およびCSF内で形成されるAベータオリゴマーを指す。

【0111】

本明細書で使用される「Aベータ線維」という用語は、電子顕微鏡下で線維構造を示す個々のAベータペプチドが非共有結合により会合した集合体を含む分子構造を指す。線維構造は通常、「クロスベータ」構造であり、理論上、多量体の大きさに上限はなく、線維は数千個または何千個ものモノマーを含み得る。線維は数千個単位で凝集し、ADに特徴的な主な病理学的形態の1つである老人斑を形成し得る。

【0112】

「GGVV」という用語は、配列番号1で示されるグリシン、グリシン、バリン、およびバリンというアミノ酸配列を意味する。これと同様に、GVV、GGV、VGGV（配列番号5）、VGGVV（配列番号6）、VGGVVI（配列番号7）およびGGVVI（配列番号8）は、1文字アミノ酸コードによって識別されるアミノ酸配列を指す。文脈によっては、アミノ酸配列と記載される場合、それはAベータまたは単離ペプチド内の配列、例えば環状化合物のアミノ酸配列などを指すことがある。

【0113】

本明細書で使用される「モノマーおよび／または線維内でアミノ酸残基G37、G38、V39、および／またはV40によって占められるものとは別の立体配座」という用語は、例えばPDB 2MXUならびに図1～11および／または表に示される、Aベータモノマー構造および／またはAベータ線維構造の37G、38G、39V、および／または40Vの特性と比較して、溶媒露出度、電荷、エントロピー、曲率（例えば、実施例に記載される環状ペプチドで測定したペプチドGGVV（配列番号1）の場合の曲率）、RMSD構造アライメントおよび1つもしくは複数の主鎖二面角または側鎖二面角の二面角から選択される1つまたは複数の立体配座特性が異なることを意味する。さらに、本明細書で使用される「直鎖状ペプチド内でG37、G38、V39、および／またはV40によって占められるものとは別の立体配座」という用語は、対応する直鎖状AベータペプチドまたはGGVV（配列番号1）の37G、38G、39V、および／または40Vの特性と比較して、溶媒露出度、電荷、エントロピー、曲率（例えば、実施例に記載される環状ペプチドで測定したペプチドGGVV（配列番号1）の場合の曲率）、RMSD構造アライメントおよび1つもしくは複数の主鎖二面角または側鎖二面角の二面角から選択される1つまたは複数の立体配座特性が異なることを意味する。例えば、図2および表1は、環状ペプチドアンサンプルのGGVV（配列番号1）のV39およびV40の曲率が、線維立体配座のGGVV（配列番号1）の曲率より有意に大きいことを示している。同様に、直鎖状ペプチドアンサンプルの対応する残基の曲率は、線維アンサンプルの曲率よりも大きい。さらに、環状ペプチドアンサンプルにおける曲率は、残基39に関して、直鎖状ペプチドアンサンプルよりも大きく、直鎖状アンサンプルにおけるV40の曲率は、環状ペプチドアンサンプルの曲率よりも大きい。環状アンサンプルにおけるG37およびG38の曲率は、同様に直鎖状ペプチドの曲率よりも小さく、線維における曲率と比較可能である。直鎖状または線維のアンサンプルとは異なる環状ペプチドアンサンプルのエピトー

ブの曲率プロファイルは、立体配座の選択性が、特に直鎖状ペプチドまたは線維とは異なる環状ペプチドの曲率を呈する、V39およびV40により提供され得ることを暗示している。図3のパネルAは、環状ペプチドアンサンブルにおけるG38の角度（O-C-C-A-HA1）の二面角分布が、直鎖状ペプチドおよび線維の対応する分布と最小限に重複しており、環状ペプチドの分布と直鎖状ペプチドおよび線維の分布の重複が、それぞれ4.4%および2.6%であることを示している。他の二面角の分布はより重複しているが、個々の二面角分布のさらに小さな差異は、全体的に異なる抗原プロファイルを提供するように関連し得る。これは、後述されるアライメントされた立体配座のクラスター解析を使用してより明確に説明されている。図4Gは、環状ペプチドが直鎖状ペプチドよりも拘束されているが、線維よりは拘束されていないことを示している。図4Fは、V39およびV40が、環状ペプチドアンサンブルでより拘束されており、その後これらがモノマーにあり、このことにより直鎖状モノマーが、きわめてまれに環状ペプチドと一致する立体配座になることを示している。図5は、環状ペプチドの主鎖G38のラムチャンドラン二面角分布が、モノマーでの分布とは実質的に異なり、線維での分布とはより類似していることを例示している。図6は、残基GGVV（配列番号1）が、特にV39およびV40に関して、線維と比較して溶媒接触表面積SASAが増大したことを示している。図7は、環状ペプチドおよび直鎖状ペプチドの代表的な（重心）構造が、異なっていることを示している。図8は、環状ペプチドおよび直鎖状ペプチドの代表的な（重心）構造の表面積のプロファイルが異なっていることを示している。同様に、電荷を含むAベータ40の表面積のプロファイルが、環状のGGVV（配列番号1）の表面積プロファイルと異なっており：V40はAベータ40で正の電荷を有する。図9は、GGVV（配列番号1）の環状ペプチドでの平衡構造が、直鎖状ペプチドおよび線維2MXUにおける対応する配列の平衡構造とは明確に異なるようにクラスター化しており、直鎖状アンサンブルおよび線維アンサンブルには明確な区別がないことを示している。図10は、このことが他の線維株に関してでも真であることを示している。

10

20

【0114】

「アミノ酸」という用語は、天然のアミノ酸および修飾されたL-アミノ酸をすべて包含する。たとえば、アミノ酸の原子は様々な同位体を含み得る。例えば、アミノ酸は、水素に代わるジウテリウム、窒素14に代わる窒素15および炭素12に代わる炭素13ならびにその他の同様の变化を含み得る。

30

【0115】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、ベニヤ化（veneerred）抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体ならびに例えば一本鎖Fabフラグメント、Fab'2フラグメントまたは一本鎖Fvフラグメントを含めた上記の抗体のフラグメントを包含するものとする。抗体は、組換え供給源由来のものおよび／またはウサギ、ラマ、サメなどの動物で産生されたものであり得る。また、トランスジェニック動物で産生され得る、もしくは生化学技術を用いて作製され得る、またはファージライブラリーなどのライブラリーから単離され得るヒト抗体も包含される。ヒト化抗体またはその他のキメラ抗体は、1種類または2種類以上のアイソタイプもしくはクラスまたは種由来の配列を含み得る。

40

【0116】

「単離された抗体」という語句は、in vivoまたはin vitroで産生され、抗体を産生した供給源、例えば、動物、ハイブリドーマまたはその他の細胞系（抗体を産生する組換え昆虫、酵母または細菌細胞など）から取り出された抗体を指す。単離された抗体は任意選択で「精製」されており、これは少なくとも80%、85%、90%、95%、98%または99%の純度であることを意味する。

【0117】

本明細書で使用される「結合フラグメント」という用語は、抗体または抗体鎖の一部または一部分であって、インタクトの抗体もしくは抗体鎖または完全な抗体もしくは抗体鎖より少ないアミノ酸残基を含み、抗原と結合する、またはインタクトの抗体と競合するも

50

のを指す。例示的結合フラグメントとしては、特に限定されないが、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 $scFv$ 、 $dsFv$ 、 $ds-scFv$ 、二量体、ナノボディ、ミニボディ、ダイアボディおよびその多量体が挙げられる。フラグメントは、インタクトの抗体もしくは抗体鎖または完全な抗体もしくは抗体鎖の化学処理または酵素処理によって得ることができる。フラグメントは、組換え手段によっても得ることができる。例えば、抗体をペプシンで処理することにより $F(ab')_2$ フラグメントを作製することができる。得られた $F(ab')_2$ フラグメントにジスルフィド架橋を還元する処理を実施して、 Fab' フラグメントを作製することができる。パパイン消化により Fab フラグメントの形成を引き起こすことができる。また、組換え発現技術により Fab 、 Fab' および $F(ab')_2$ 、 $scFv$ 、 $dsFv$ 、 $ds-scFv$ 、二量体、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体フラグメントならびにその他のフラグメントを構築することもできる。

10

【0118】

当該技術分野で認識されている「IMGT番号付け」または「Immunogeneticデータベース番号付け」という用語は、抗体またはその抗原結合部分の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の他のアミノ酸残基より可変性のある（すなわち、超可変性の）アミノ酸残基を番号付けするシステムを指す。

【0119】

ある抗体がGGVV（配列番号1）などのエピトープに特異的と結合すると記載される場合、それは、その抗体が特定の残基またはその一部、例えばHDSGの少なくとも2つの残基を含むペプチドに最小限の親和性で特異的と結合し、例えばアイソタイプ対照抗体より大きい無関係な配列にも無関係な配列の空間定位にも結合しないことを意味する。このような抗体は必ずしもGGVV（配列番号1）の各残基と接触するわけではなく、前記エピトープ内のあらゆるアミノ酸置換またはアミノ酸欠失が、必ずしも結合親和性に大きな影響を及ぼし、かつ／または同程度の影響を及ぼすというわけではない。

20

【0120】

ある抗体がエピトープ、例えばGGVV（配列番号1）などの立体配座エピトープなどを選択的と結合すると記載される場合、それは、その抗体が特定の残基またはその一部を含む1つまたは複数の特定の立体配座に、別の立体配座の前記残基と結合する場合より大きい親和性で優先的と結合することを意味する。例えば、ある抗体が対応する直鎖状ペプチドよりもGGVVまたは関連エピトープを含むシクロペプチドを選択的と結合すると記載される場合、その抗体は、直鎖状ペプチドと結合する場合の少なくとも2倍の親和性でそのシクロペプチドと結合する。

30

【0121】

本明細書で使用される「立体配座エピトープ」という用語は、アミノ酸配列が特定の三次元構造を有し、対応する直鎖状ペプチド中に存在しない、または存在する可能性が低い三次元構造の少なくとも一面がコグネイト抗体によって特異的かつ／または選択的に認識される、エピトープを指す。立体配座特異的エピトープと特異的かつ／または選択的に結合する抗体は、その立体配座特異的／選択的エピトープの1つまたは複数のアミノ酸の空間的配置を認識する。例えば、GGVV（配列番号1）立体配座エピトープは、抗体によって特異的かつ／または選択的に、例えば直鎖状GGVV（配列番号1）と比較して少なくとも2倍、3倍、5倍、10倍、50倍、100倍、250倍、500倍もしくは1000倍またはそれ以上選択的に認識される、GGVV（配列番号1）のエピトープを指す。

40

【0122】

本明細書で使用される「関連エピトープ」という用語は、抗原性であるGGVV（配列番号1）の少なくとも2つの残基および／またはAベータのGGVV（配列番号1）の少なくとも2つの残基のN末端側もしくはC末端側のいずれかに1つもしくは2つのアミノ酸残基を含む配列を意味する。例えば、本明細書では、GGVV（配列番号1）、VGGVV（配列番号6）およびGGVVI（配列番号8）がAベータ線維において不規則になりやすい領域として特定されたことが示される。したがって、GGVV（配列番号1）、

50

V G G V V（配列番号6）およびG G V V I（配列番号8）は関連エピトープである。例示的関連エピトープとしては、配列が表15に示されているエピトープが挙げられる。関連エピトープの配列は、「関連エピトープ配列」を意味する。

【0123】

本明細書でアミノ酸配列内のアミノ酸もしくはその側鎖（例えば、G G V V（配列番号1）のG37またはG38またはV39またはV40）またはより大きいポリペプチド内のアミノ酸配列に関して使用される「拘束された立体配座」という用語は、アミノ酸二面角の回転運動性が（たとえば直鎖状化合物である）対応する直鎖状ペプチド配列またはより大きいポリペプチドの配列よりも低下し、それにより、許容される立体配座の数が少なくなっていることを意味する。このことは、例えば、主鎖および側鎖の二面角自由度のアンサンブルのエントロピー減少を見出すことによって定量化することが可能であり、直鎖状アンサンブルと比較した、環状アンサンブルおよび線維アンサンブルにおけるエントロピーの減少に関して、各アミノ酸については図4Gにプロットされている。直鎖状および環状のペプチドアンサンブルの、線維アンサンブルからのエントロピーの増加は、各アミノ酸の個々の二面角に関して、図4～Dにプロットされている。例えば、配列内の側鎖の立体配座自由度が直鎖状ペプチドより低ければ、エントロピーが減少することになる。このような立体配座の制約があれば、この抗原に対して特異的に生じた抗体の立体配座選択性が増大するものと思われる。

【0124】

本明細書で使用される「より拘束された立体配座」という用語は、1つまたは複数の二面角の二面角分布（許容される二面角のアンサンブル）が、例えば、アミノ酸、例えばGおよび／またはVのエントロピーによる判定（例えば、立体配座の拘束が強いほどエントロピーが低くなる）で、比較立体配座より少なくとも10%強く拘束されていることを意味する。具体的には、全体的により拘束された環状立体配座アンサンブルにおけるG G V V（配列番号1）の、直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドの平均エントロピーに対する平均エントロピー変化により測定されるエントロピーのパーセント減少、 $[(\Delta S(\text{cyclic}) - \Delta S(\text{linear})) / (0.5 * (\Delta S(\text{cyclic}) + \Delta S(\text{linear})))]$ 、は、拘束されていない立体配座のアンサンブルよりも、平均で、10%超減少し、または20%超減少し、または30%超減少し、または40%超減少している。上記の式のエントロピー ΔS は、線維と比較したエントロピーとして得られている。たとえば $\Delta S(\text{cyclic}) = S(\text{cyclic}) - S(\text{fibril})$ 。例として、図4Fにプロットされたデータによる、エントロピーのパーセント減少は、V39では67%であり、V40では31%である。またG38は、13%のエントロピーの損失を示す。しかしながらG37は、実際に、環状立体配座において61%のエントロピー増加を示す。（線維エントロピーと比較した）環状ペプチドに対する直鎖状の総エントロピー減少は、 $(\Delta S(\text{cyclic}) - \Delta S(\text{linear})) / (0.5 * (\Delta S(\text{cyclic}) + \Delta S(\text{linear}))) = -27\%$ 、すなわち27%のエントロピー減少である。

【0125】

本明細書で抗体に関して使用される「斑との結合が全くまたはほとんどみられない」または「斑と結合しない、またはほとんど結合しない」という用語は、抗体が（例えば、in situの）免疫組織化学法で典型的な斑の染色形態を示さず、染色のレベルが、IgG陰性の（例えば、無関係な）アイソタイプ対照でみられるレベルと同等である、またはその2倍以下であることを意味する。

【0126】

「単離ペプチド」という用語は、例えば組換え技術または合成技術によって作製され、ペプチドを作製した組換え細胞または残存ペプチド合成反応物などの供給源から取り出されたペプチドを指す。単離ペプチドは、任意選択で「精製」されており、これは少なくとも80%、85%、90%、95%、98%または99%の純度および任意選択で医薬品等級の純度であることを意味する。

【0127】

本明細書で使用される「検出可能な標識」という用語は、本明細書に記載されるペプチドまたは化合物内に付加または導入することができるペプチド配列（myc タグ、HA タグ、V5 タグまたはNE タグなど）、蛍光タンパク質などの部分であって、直接的または間接的に検出可能なシグナルを発生することが可能な部分を指す。例えば、標識は、（例えば、PET 撮像に使用する）放射線不透過性の陽電子放出放射性核種もしくは放射性同位元素、例えば ^3H 、 ^{13}N 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{31}I など；蛍光化合物（フルオロフォア）もしくは化学発光化合物（発色団）、例えばフルオレセインイソチオシアナート、ローダミンもしくはルシフェリンなど；酵素、例えばアルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼもしくは西洋ワサビペルオキシダーゼなど；造影剤；または金属イオンであり得る。検出可能な標識はまた、例えば二次抗体を用いて間接的に検出可能なものであり得る。

10

【0128】

通常使用される「エピトープ」という用語は、抗体によって特異的に認識される抗原の抗体結合部位、通常、ポリペプチドセグメントを意味する。本明細書で使用される「エピトープ」はまた、エピトープ配列を含むペプチドを使用して抗体を生じさせることができる、記載される集団座標法を用いてAベータ上で特定され得るアミノ酸配列またはその一部を指すこともある。例えば、特定された標的領域GGVV（配列番号1）を含む環状化合物に対応する単離ペプチドに対して作製した抗体は、前記「エピトープ」配列の一部または全部を認識する。エピトープが抗体による結合に接触可能な場合、それは本明細書において「接触可能な」ものである。

20

【0129】

本明細書で使用される「より高い親和性」という用語は、抗体Xが標的Zより強く（ K_{on} ）かつ／または小さい解離定数（ K_{off} ）で標的Yと結合する場合の相対的抗体結合度を指し、この文脈では、抗体Xは標的Yに対して標的Zより高い親和性を有する。これと同様に、本明細書の「より低い親和性」は、抗体Xが標的Zより弱くかつ／または大きい解離定数で標的Yと結合する場合の相対的抗体結合度を指し、この文脈では、抗体Xは標的Yに対して標的Zより低い親和性を有する。抗体とその標的抗原との間の結合の親和性は $K_A = 1/K_D$ で表すことができ、式中、 $K_D = k_{on}/k_{off}$ である。 k_{on} および k_{off} の値は、表面プラズモン共鳴技術を用いて、例えばMolecular Affinity Screening System (MASS-1) (Sierra Sensors社、ハンブルク、ドイツ)を用いて測定することができる。環状化合物、例えば任意選択の環状ペプチド中に提示される立体配座に選択的な抗体は、環状化合物（例えば、環状ペプチド）に対する親和性が直鎖状形態の対応する配列（例えば、非環化配列）より大きい。

30

【0130】

同じく本明細書で使用される「免疫原性」という用語は、抗体の産生を誘発し、免疫原の免疫原性部分に対するT細胞およびその他の反応性免疫細胞を活性化する物質を指す。

【0131】

環状化合物に関する「対応する直鎖状化合物」という用語は、環状化合物と同じ配列もしくは化学的部分を含む、またはこれよりなるが、直鎖状（すなわち、非環状）形態であり、例えば溶液中でみられ得る直鎖状ペプチドの特性を有する、化合物、任意選択でペプチドを指す。例えば、対応する直鎖状化合物は、環化されていない合成ペプチドであり得る。

40

【0132】

ある抗体に関して本明細書で使用される「特異的に結合する」は、その抗体がエピトープ配列を認識し、最小限の親和性でその標的抗原と結合することを意味する。例えば、多価抗体は、その標的と少なくとも $1e-6$ 、少なくとも $1e-7$ 、少なくとも $1e-8$ 、少なくとも $1e-9$ または少なくとも $1e-10$ の K_D で結合する。少なくとも $1e-8$ より高い親和性が好ましいものであり得る。可変ドメインを1つ含むFabフラグメントなどの抗原結合フラグメントは、非フラグメント化抗体との多価相互作用の10倍または

50

100倍低い親和性でその標的と結合する。

【0133】

ある形態のAベータ（例えば、線維、モノマーまたはオリゴマー）または環状化合物と選択的に結合する抗体に関して本明細書で使用される「選択的に結合する」という用語は、その抗体が上記の形態と少なくとも2倍、少なくとも3倍または少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも250倍、少なくとも500倍もしくは少なくとも1000倍またはそれ以上の親和性で結合することを意味する。したがって、特定の立体配座（例えば、オリゴマー）に対してより選択的な抗体は、別の形態のペプチドおよび／または直鎖状ペプチドの少なくとも2倍などの親和性で特定の形態のAベータと優先的に結合する。

10

【0134】

本明細書で使用される「リンカー」という用語は、GGVV（配列番号1）エピトープペプチドを含むペプチドと共有結合して、任意選択でGGVV（配列番号1）ペプチドのN末端およびC末端と結合して、環状化合物を生じさせることができる化学的部分を指す。リンカーは、スペーサーおよび／または1つもしくは複数の官能化可能な部分を含み得る。リンカーは、官能化可能な部分を介して担体タンパク質またはキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）などの免疫原強化物質と結合することができる。

【0135】

本明細書で使用される「スペーサー」という用語は、ペプチドのN末端およびC末端と直接的または間接的に共有結合して、長さがペプチド自体より長い環状化合物を生じさせることができる、好ましくは非免疫原性または低免疫原性の任意の化学的部分を意味し、例えば、スペーサーは、GGVV（配列番号1）よりなるペプチドのN末端およびC末端と結合して、主鎖の長さがGGVV（配列番号1）配列自体より長い環状化合物を生じさせることができる。つまり、（例えば、3アミノ酸残基の）スペーサーを有するペプチドが環化されると、スペーサーのないペプチドより大きい閉環が生じる。スペーサーとしては、特に限定されないが、グリビート、アリビートまたはPEGリビートなどの部分、例えばAベータ（A-beat）ペプチドと組み合わせる場合、配列は、GGGVVG（配列番号9）GGVVVG（配列番号10）、GGGVVG（配列番号11）などが挙げられる。スペーサーは、1つもしくは複数のシステイン（C）残基などの1つもしくは複数の官能化部分を含む、またはこれと結合しているものであり得、官能化部分はスペーサー内に散在している、またはスペーサーの一端または両端と共有結合しているものであり得る。C残基などの官能化可能な部分がスペーサーの1つまたは複数の末端と共有結合している場合、スペーサーはペプチドと間接的に共有結合している。スペーサーはまた、ビオチン分子がアミノ酸残基内に導入されている場合のように、スペーサー残基内に官能化可能な部分を含み得る。

20

30

【0136】

本明細書で使用される「官能化可能な部分」という用語は、「官能基」を有する化学物質を指し、本明細書で使用される「官能基」は、別の原子団または単一原子（いわゆる「相補性官能基」）と反応して、2つの原子団または原子の間で化学的相互作用を形成する、原子団または単一原子を指す。システインの場合、官能基は、反応してジスルフィド結合を形成することができる-SHであり得る。したがって、リンカーは、例えばCCCであり得る。別の原子団との反応は、共有結合または例えば、Kdが約 $1e-14$ になり得るビオチン-ストレプトアビジン結合としての場合のような強い非共有結合であり得る。本明細書で使用される強い非共有結合は、K_dが少なくとも $1e-9$ 、少なくとも $1e-10$ 、少なくとも $1e-11$ 、少なくとも $1e-12$ 、少なくとも $1e-13$ または少なくとも $1e-14$ の相互作用を意味する。

40

【0137】

タンパク質および／またはその他の物質を免疫原性に役立つ、または*in vitro*研究のプロブとして作用するよう環状化合物に機能化（例えば、結合）させ得る。この目的には、反応すること（例えば、共有結合または共有結合ではない強い結合を形成する

50

こと) が可能な任意の官能化可能な部分を使用し得る。ある特定の実施形態では、官能化可能な部分は、目的のタンパク質上にある対形成していないシステインと反応してジスルフィド結合を形成するシステイン残基であり、目的のタンパク質は、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H) などの免疫原性増強物質または *in vitro* 免疫ブロットもしくは免疫組織化学アッセイに使用するウシ血清アルブミン (B S A) などの担体タンパク質であり得る。

【0138】

本明細書で使用される「～と反応する」という用語は一般に、電子の流れまたは静電荷の移動が起こることにより化学的相互作用が形成されることを意味する。

【0139】

本明細書で使用される「動物」または「対象」という用語は、任意選択でヒトを含む、または含まない哺乳動物を含めた動物界のあらゆるメンバーを包含する。

【0140】

本明細書で使用される「保存的アミノ酸置換」とは、タンパク質の所望の特性を打ち消すことなく、あるアミノ酸残基が別のアミノ酸残基に置き換わるアミノ酸置換のことである。適切な保存的アミノ酸置換は、疎水性、極性および R 鎖長が互いに類似したアミノ酸同士を置き換えることにより実施することができる。保存的アミノ酸置換の例としては以下のものが挙げられる。

【0141】

【表 2】

保存的置換	
アミノ酸のタイプ	置換可能なアミノ酸
親水性	Ala、Pro、Gly、Glu、Asp、Gln、Asn、Ser、Thr
スルフィドリル	Cys
脂肪族	Val、Ile、Leu、Met
塩基性	Lys、Arg、His
芳香族	Phe、Tyr、Trp

【0142】

本明細書で使用される「配列同一性」という用語は、2つのポリペプチド配列または2つの核酸配列の間の配列同一性のパーセンテージを指す。2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列のパーセント同一性を決定するには、配列を最適な比較目的で整列させる（例えば、第二のアミノ酸配列または核酸配列との最適アライメントのために第一のアミノ酸配列または核酸配列の配列内にギャップを導入することができる）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第一の配列内のある位置が第二の配列内の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合、その分子は上記の位置において同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、その配列が共有する同一位置の数の関数である（すなわち、%同一性 = 同一の重複位置の数 / 一の総数 × 100%）。一実施形態では、2つの配列は同じ長さである。2つの配列間のパーセント同一性の決定はまた、数学的アルゴリズムを用いて実施することができる。2つの配列の比較に用いられる数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例には、KarlinおよびAltschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:5873-5877で改変されたKarlinおよびAltschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:2264-2268のアルゴリズムがある。Altschulら, 1990, J. Mol. Biol. 215:403のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラムにはそのようなアルゴリズムが組み込まれている。NBLASTヌクレオチドプログラムパラメータを例えばスコア=100、ワード長=12に設定してBLASTヌクレオチド検索を実施し、本願の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。XBLASTプログラムパラメータを例えばスコア=50、ワード長=3に設定してBLA

10

20

30

40

50

S Tタンパク質検索を実施し、本明細書に記載されるタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的でギャップ付きアライメントを得るには、A l t s c h u l ら, 1997, N u c l e i c A c i d s R e s . 25:3389-3402に記載されているG a p p e d B L A S Tを用いることができる。あるいは、P S I - B L A S Tを用いて、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施することができる（同文献）。B L A S Tプログラム、G a p p e d B L A S TプログラムおよびP S I - B l a s tプログラムを用いる場合、それぞれのプログラム（例えば、X B L A S TおよびN B L A S T）の初期パラメータを用いることができる（例えば、N C B I のウェブサイトを参照されたい）。配列の比較に用いられる数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例には、M y e r s およびM i l l e r , 1988, C A B I O S 4:11-17のアルゴリズムがある。G C G 配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるA L I G N プログラム（バージョン2.0）には、そのようなアルゴリズムが組み込まれている。アミノ酸配列の比較にA L I G N プログラムを用いる場合、P A M 120加重残基表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を用いることができる。ギャップを許容するかしないかを問わず、上記のものと類似した技術を用いて2つの配列間のパーセント同一性を決定することができる。パーセント同一性を算出する際には通常、完全一致のみをカウントする。

【0143】

抗体に関しては、抗体配列をI M G T またはその他のもの（例えば、K a b a t 番号付けの慣例）により最大限に整列させたとき、パーセンテージ配列同一性を決定することができる。アライメント後、対象抗体領域（例えば、重鎖または軽鎖の全成熟可変領域）を参照抗体の同じ領域と比較している場合、対象抗体領域と参照抗体領域の間のパーセンテージ配列同一性は、ギャップをカウントせず、対象抗体領域および参照抗体領域の両方で同じアミノ酸によって占められている位置の数を、整列させた2つの領域の位置の総数で除したものに100を乗じてパーセンテージに変換したものとする。

【0144】

本明細書で使用される「核酸配列」は、天然の塩基、糖および糖間（主鎖）結合よりなるヌクレオシドモノマーまたはヌクレオチドモノマーの配列を指す。この用語はまた、非天然のモノマーまたはその一部分を含む修飾または置換された配列を包含する。本願の核酸配列は、デオキシリボ核酸配列（D N A）またはリボ核酸配列（R N A）であり得、アデニン、グアニン、シトシン、チミジンおよびウラシルを含めた天然の塩基を包含し得る。配列はまた、修飾塩基を含み得る。このような修飾塩基の例としては、アザおよびデアザアデニン、グアニン、シトシン、ミジンおよびウラシル；ならびにキサンチンおよびヒポキサンチンが挙げられる。核酸は二本鎖または一本鎖であり得、センス鎖またはアンチセンス鎖を表す。さらに、「核酸」という用語は、相補的核酸配列およびコドン最適化等価物または同義コドン等価物を包含する。本明細書で使用される「単離核酸配列」という用語は、組換えD N A 技術により作製された場合は実質的に細胞物質も培地も含まない核酸、あるいは化学的に合成された場合は化学的前駆体またはその他の化学物質を指す。単離核酸はまた、その核酸が由来する核酸に天然の状態で隣接する配列（すなわち、核酸の5'側および3'側に位置する配列）を実質的に含まない。

【0145】

「作動可能に連結されている」は、核酸の発現が可能ないようにその核酸が制御配列を連結されていることを意味するものとする。適切な制御配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳動物または昆虫の遺伝子を含めた様々な供給源に由来するものであり得る。適切な制御配列の選択は、選択する宿主細胞によって決まり、当業者により容易に達成され得る。このような制御配列の例としては、転写プロモーターおよび転写エンハンサーまたはR N A ポリメラーゼ結合配列、翻訳開始シグナルを含めたりボソーム結合配列が挙げられる。さらに、選択する宿主細胞および用いるベクターに応じてその他の配列、例えば複製起点、追加のD N A 制限部位、エンハンサーおよび転写の誘導性を付与する配列などを発現ベクター内に組み込み得る。

【0146】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、核酸分子を例えば、原核細胞および／または真核細胞内に導入し、かつ／あるいはゲノム内に組み込むことを可能にする前記核酸分子の任意の中間運搬体を含み、プラスミド、ファージミド、バクテリオファージまたはウイルスベクター、例えばレトロウイルス系ベクター、アデノ関連ウイルスベクターなどがこれに包含される。本明細書で使用される「プラスミド」という用語は一般に、通常は環状DNA二本鎖であり、染色体DNAとは独立して複製することができる、染色体外遺伝物質の構築物を指す。

【0147】

「少なくとも中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、溶液中の2つの相補的核酸分子の間の選択的ハイブリダイゼーションを促進する条件を選択することを意味する。ハイブリダイゼーションは核酸配列分子の全部または一部に起こり得る。ハイブリダイズする部分は通常、少なくとも15（例えば、20、25、30、40または50）ヌクレオチドの長さである。当業者には、核酸の二本鎖またはハイブリッドの安定性が、ナトリウム含有緩衝液中でのナトリウムイオン濃度と温度の関数である T_m ($T_m = 81.5^\circ\text{C} - 16.6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% (\text{G} + \text{C}) - 600 / l)$) またはこれと類似した方程式) によって決まることが認識されよう。したがって、ハイブリッドの安定性を決定する洗浄条件のパラメータはナトリウムイオン濃度および温度である。既知の核酸分子に類似しているが同一ではない分子を特定するには、1%のミスマッチにより T_m が約 1°C 低下するものと考えられ、例えば、同一性が95%を上回る核酸分子を探索するのであれば、最終洗浄温度は約 5°C 低下することになる。当業者は、これらの考慮事項に基づき、適切なハイブリダイゼーション条件を容易に選択することが可能であろう。好ましい実施形態では、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を選択する。例として、以下の条件を用いてストリンジェントなハイブリダイゼーションを実施し得る：上の方程式に基づき、 T_m を -5°C とし、 $5\times$ 塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム (SSC)／ $5\times$ デンハルト溶液／1.0% SDSで、ハイブリダイゼーションを実施し、次いで、 60°C にて $0.2\times$ SSC／0.1% SDSで洗浄する。中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、 42°C 、 $3\times$ SSCでの洗浄段階が含まれる。ただし、上のものに代わる緩衝液、塩および温度を用いても同等のストリンジェンシーが達成され得ることが理解される。ハイブリダイゼーション条件に関するさらなる指針については、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y., 2002および Sambrookら, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001にみることができる。

【0148】

本明細書で使用され、当該技術分野でも十分に理解されている「治療すること」または「治療」という用語は、臨床結果を含めた有益な結果または所望の結果を得る方法意味する。有益な臨床結果または所望の臨床結果としては、特に限定されないが、検出可能なものであるか検出不可能なものであるかを問わず、1つまたは複数の症状または病態の軽減または改善、疾患の程度の減少、疾患の状態の安定化（すなわち、悪化しないこと）、疾患の拡散の予防、疾患進行の遅延または緩徐化、病状の改善または緩和、疾患再発の減少および寛解（部分寛解または完全寛解を問わない）が挙げられる。「治療すること」および「治療」はまた、治療を受けない場合に予想される生存期間と比較して生存期間が長くなることを意味し得る。本明細書で使用される「治療すること」および「治療」はまた、予防的治療を包含する。例えば、初期段階のADを有する対象を本明細書に記載される化合物、抗体、免疫原、核酸または組成物で治療して進行を予防することができる。

【0149】

本明細書で使用される「投与される」という用語は、細胞または対象への治療有効量の開示の化合物または組成物の投与を意味する。

10

20

30

40

50

【0150】

本明細書で使用される「有効量」という語句は、所望の結果を得るのに必要な投与回数および期間で効果が得られる量を意味する。対象に投与する場合、有効量は対象の病状、年齢、性別、体重などの因子に応じて異なり得る。最適な治療反応を得るために投与レジメンを調整し得る。

【0151】

「薬学的に許容される」という用語は、担体、希釈剤または補形剤が、製剤の他の成分と適合性があり、その被投与者に対して実質的に有害でないことを意味する。

【0152】

1つまたは複数の記載される要素を「含む (comprising または including)」組成物または方法は、具体的に記載されていない他の要素を含み得る。例えば、抗体を「含む (comprise または include)」組成物は、抗体を単独で、または他の成分とともに含有し得る。

【0153】

本開示の範囲を理解するにあたっては、本明細書で使用される「～よりなる」という用語またはその派生語は、記載される特徴、要素、成分、グループ、整数および／または段階の存在を明記し、また他の記載されていない特徴、要素、成分、グループ、整数および／または段階の存在を排除する、オープンエンドな用語であるものとする。

【0154】

本明細書で端点により数値範囲が記載されている場合、その範囲内に含まれる数および端数がいずれも含まれる (例えば、1～5 には、1、1.5、2、2.75、3、3.90、4 および 5 が含まれる)。また、数およびその端数はすべて「約」という用語によって修飾されるものと考えられることを理解するべきである。さらに、「a」、「an」および「the」は、内容からそうでないことが明らかでない限り、複数形の指示対象を包含することを理解するべきである。「約」という用語は、言及されている数のプラスまたはマイナス 0.1～50%、5～50% または 10～40%、好ましくは 10～20%、より好ましくは 10% または 15% を意味する。

【0155】

さらに、当業者であれば理解するように、特定のセクションに記載される定義および実施形態は、本明細書に記載される他の実施形態のうちそれらが適しているものに適用可能であるものとする。例えば、以下の節では、本発明の様々な態様がさらに詳細に定義される。そのように定義された各態様は、そうでないことが明記されない限り、1つまたは複数の他の任意の態様と組み合わせ得る。特に、好ましいまたは有利であると示されている任意の特徴と、好ましいまたは有利であると示されている他の任意の特徴とを組み合わせ得る。

【0156】

冠詞の単数形である「a」、「an」および「the」は、文脈上そうでないことが明らかでない限り、複数の指示物を包含する。例えば、「化合物 (a compound)」または「少なくとも 1 つの化合物」という用語は、複数の化合物をその混合物も含め包含し得る。

【0157】

II. エピトープおよび結合タンパク質

本発明者らは、A ベータのアミノ酸 37～40 に GGVV (配列番号 1) を含む A ベータのエピトープを特定した。本発明者らはさらに、そのエピトープまたはその一部が立体配座エピトープであり得ることおよび GGVV (配列番号 1) が A ベータのオリゴマー種での抗体結合に選択的に接触可能であり得ることを明らかにした。

【0158】

理論に束縛されることを望むものではないが、線維は、オリゴマー化を触媒する傾向のある相互作用部位を示し得る。このことは、株に特異的であり得、正常な個体には存在しない選択的な線維表面が露出され、よってモノマーとの異常な相互作用を起こす (すなわ

10

20

30

40

50

ちモノマーに提示される)ことが可能である場合にのみ起こり得る。低pH、炎症時に存在するオスモライトまたは酸化的損傷などの環境変化が線維の破壊を誘発し、より安定性の低い領域の露出を引き起こし得ると考えられる。その結果、これらの低安定性領域を予測し、そのような予測を用いて、上記の領域を標的とする抗体を合理的に設計することに関心が持たれている。さらに、線維内で破壊される可能性のある領域はまた、オリゴマー種内で露出する領域の有力な候補となり得る。

【0159】

不規則になりやすい隣接するタンパク質領域を予測するためのコンピュータに基づくシステムおよび方法が、2015年11月9日に出願され全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第62/253044号「Systems and methods for predicting misfolded protein epitopes by collective coordinate biasing」および2009年10月6日に出願された米国特許出願第12/574,637号「METHODS AND SYSTEMS FOR PREDICTING MISFOLDED PROTEIN EPITOPES」に記載されている。実施例に記載されるように、この方法をAベータに適用し、本明細書で示されるように、Aベータオリゴマーにおいて特異的または選択的に接触可能なエピトープを特定した。

【0160】

実施例に記載されるように、環状ペプチドであるシクロ(CGGGVVG)(配列番号2)は、モノマー種および/または線維種と比較したオリゴマーのGGVV(配列番号1)エピトープの立体配座の差を1つまたは複数捕捉し得る。例えば、環状7量体シクロ(CGGGVVG)(配列番号2)の溶媒接触表面、曲率、RMSD構造アライメントならびにアミノ酸および二面角の二面角分布の差は、モノマーおよび/または線維と実質的に異なっていることが明らかになり、環状ペプチドが直鎖状ペプチドとは異なる立体配座エピトープをもたらすことが示唆された。シクロ(CGGGVVG)(配列番号2)を含む免疫原に対して生じさせた抗体は、直鎖状CGGGVVG(配列番号2)よりも選択的にシクロ(CGGGVVG)(配列番号2)と結合し、単量体のAベータ斑およびAベータ線維斑と比較して合成および/または天然のオリゴマーAベータ種と選択的に結合した。さらに、シクロ(CGGGVVG)(配列番号2)に対して生じさせた抗体によりAベータ凝集の*in vitro*での伝播を阻害することができた。さらに、毒性アッセイで例示されているように、(CGGGVVG)(配列番号2)に対して生じさせた抗体は、Aベータオリゴマーの神経細胞への毒性を阻害した。

【0161】

a) GGVV(配列番号1)「エピトープ」化合物

したがって、本開示は、GVVなどのアミノ酸GGVV(配列番号1)またはその一部よりなるAベータのエピトープを特定するものであり、GGVV(配列番号1)はAベータのアミノ酸残基37~40に対応する。実施例で示されるように、エピトープGGVV(配列番号1)、GGVVI(配列番号8)およびVGGVV(配列番号6)(本明細書でまとめて「GGVV(配列番号1)および関連エピトープ」と呼ばれるエピトープに包含される)がAベータ線維で不規則になりやすい領域として特定された。残基GGVV(配列番号1)は集団座標法を用いた2つの予測に現れたものであり、このエピトープの隣接残基である36Vおよび41Iはそれぞれ、1つの予測にみられたものである。また残基GGVV(配列番号1)は、Promis G⁻o方法を使用して、明らかになった。

【0162】

一態様は、GGVV(配列番号1)、上記のいずれかの一部を含む関連エピトープの配列を含むまたはこれよりなるAベータペプチドを含む化合物であって、ペプチドがGGVV(配列番号1)である場合、ペプチドは、直鎖状GGVV(配列番号1)とは少なくとも1つの特徴で異なり、たとえば末端のバリンが、このカルボキシル末端を介してアミノ酸または他の部分と結合し、よって荷電していない、化合物を含む。たとえば、環状立体配座において、C末端のバリンは、環化によりカルボキシレート陰性電荷を含まない。

【0163】

一実施形態では、Aベータペプチドは、GGVV（配列番号1）、VGGVV（配列番号6）またはGGVVI（配列番号8）を含む、またはこれよりなるアミノ酸配列から選択される。一実施形態では、Aベータペプチドは、表14に記載のAベータペプチドの配列のいずれか1つに記載された配列を有する。

【0164】

一実施形態では、化合物はシクロペプチドなどの環状化合物である。シクロペプチドおよび環状ペプチドという用語は、本明細書では互換的に使用される。

【0165】

いくつかの実施形態では、GGVV（配列番号1）（またはその一部）、または関連エピトープの配列を含むAベータペプチド、任意選択で立体配座ペプチドは、GGVV（配列番号1）（またはその一部）のN末端および／またはC末端に、Aベータに追加の残基を1個または2個含んでよく、例えば、Aベータペプチドは、C末端側に残基を1個含み、VGGVV（配列番号6）となり得る。例えば配列番号16のAベータ配列に示されるように、AベータのGGVV（配列番号1）のN末端側の3個のアミノ酸はLMVであり、Aベータ1～42および1～43の形態におけるGGVV（配列番号1）のC末端側の2個のアミノ酸はIAである。Aベータペプチドを含む化合物が環化されている実施形態では、Aベータペプチドは、6個のAベータ残基である、またはこれを最長とする残基である。一実施形態では、Aベータペプチドは、5個のAベータ残基である、またはこれを最長とする残基である。さらなる別の実施形態では、Aベータペプチド（たとえば環状化合物などの化合物におけるAベータペプチド）は4個のAベータ残基であり、任意にGGVV（配列番号1）である。

【0166】

一実施形態では、化合物はリンカーをさらに含む。リンカーは、スペーサーおよび／または1つもしくは複数の官能化可能な部分を含む。リンカーは、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個もしくは8個のアミノ酸および／またはポリエチレングリコール（PEG）部分などの同等に機能する分子ならびに／あるいはその組合せを含み得る。一実施形態では、スペーサーアミノ酸は、非免疫原性または低免疫原性のアミノ酸残基、例えばGおよびAなどから選択され、例えば、スペーサーは、GGG、GAG、G（PEG）G、PEG-PEG（PEG2とも呼ばれる）-GGなどであり得る。1つまたは複数の官能化可能な部分、例えば官能基を有するアミノ酸は、例えば、化合物と、作用物質もしくは検出可能な標識、BSAなどの担体またはKLHなどの免疫原性増強物質とを結合させるために含まれ得る。

【0167】

一実施形態では、リンカーは、GC-PEG、PEG-GC、GCGまたはPEG2-CGを含む。

【0168】

一実施形態では、リンカーは、1、2、3、4、5、6、7個または8個のアミノ酸を含む。

【0169】

特定の実施形態では、環状化合物は、最大12、11、10、9、8、または7個の残基、任意に、PEG単位または他の類似する大きさの化学的部分などのアミノ酸残基および／または同等の単位を有する。

【0170】

GGVV（配列番号1）またはその一部または関連エピトープの配列を含むAベータペプチドが、AベータにみられGGVV（配列番号1）のN末端側および／またはC末端側にある追加の残基を1個、2個または3個含む実施形態では、リンカーは、Aベータ残基のN末端および／またはC末端と共有結合している（例えば、ペプチドがVGGVV（配列番号6）である場合、リンカーはR残基およびG残基と共有結合している）。これと同様に、AベータペプチドがGGVV（配列番号1）である場合、リンカーは残基Gおよび

G Vと共有結合し、A ベータペプチドがG G V V I（配列番号8）である場合、リンカーは残基GおよびIと共有結合している。

【0171】

化合物（またはリンカーもタンパク質性である化合物）のタンパク質性部分は、タンパク質化学でよく知られている固相合成または均質溶液中での合成などの技術を用いる化学合成により調製し得る。

【0172】

上記のように、化合物は環状化合物であり得る。本明細書で「環状ペプチド」と記載される場合、それは（例えば、リンカーが1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個または8個のアミノ酸である）完全にタンパク質性の化合物を指す。実施例で決定され環状ペプチドについて記載される特性を、非アミノ酸リンカー分子を含む他の化合物（例えば、環状化合物）に組み込み得ることが理解される。

10

【0173】

したがって、一態様では、ペプチドG G V V（配列番号1）（またはG G Vなどの上記ペプチドの一部）または関連エピトープの配列とリンカーとを含み、リンカーが、G G V V（配列番号1）を含むペプチド（例えば、ペプチドがG G V V（配列番号1）よりなる場合、G残基およびV残基）と直接的または間接的に共有結合している、環状化合物が提供される。環状化合物内では、例えば、Gおよび／またはVの残基のうちの少なくとも1つが、直鎖状化合物、任意に対応する直鎖状ペプチド、任意選択でより拘束された立体配座でのGおよび／またはVの残基とは別の立体配座にある。

20

【0174】

一実施形態では、環状化合物は、G G V V（配列番号1）または関連エピトープの配列と最大6個のA ベータ残基（例えば、G G V V（配列番号1）のN末端および／またはC末端の1個または2個のアミノ酸）とを含むA ベータペプチドと、リンカーとを含み、リンカーが、A ベータペプチドのペプチドN末端残基およびC末端残基と直接的または間接的に共有結合している。環状化合物内では、例えば、少なくともVが対応する直鎖状ペプチド内でのVとは別の立体配座にある、または少なくともGが対応する直鎖状ペプチド内でのGとは別の立体配座にあり、任意選択で、少なくともGまたは少なくともVが、直鎖状化合物、任意にG G V V（配列番号1）を含む対応する直鎖状ペプチド内で占められる立体配座より拘束された立体配座にある。

30

【0175】

A ベータ配列を含む直鎖状ペプチドは、直鎖状化合物に含まれ得る。G G V V（配列番号1）を含む直鎖状化合物または直鎖状ペプチドは、一実施形態において、対応する直鎖状ペプチドである。別の実施形態では、直鎖状ペプチドは、G G V V（配列番号1）を含む任意の長さのA ベータペプチドであって、たとえばA ベータの残基10～42、またはA ベータの残基20～42、20～40、30～42などのより小さなその一部などを含み、任意にリンカー配列を含む直鎖状ペプチドが挙げられる。また、直鎖状ペプチドは、一部の実施形態では、完全長のA ベータペプチドとすることもできる。

【0176】

一実施形態では、環状化合物は、配列番号2～4のいずれか1つの配列を含む。

40

【0177】

環状化合物を環化前に、A ベータペプチド、任意選択でG G V V（配列番号1）または関連エピトープを含むペプチドのN末端またはC末端と共有結合したリンカーを有する、直鎖状分子として合成することができる。あるいは、環化前に、リンカーの一部をN末端と共有結合させ、一部をC末端と共有結合させる。いずれの場合も、直鎖状化合物を例えば頭－尾環化（例えば、アミド結合環化）で環化する。

【0178】

一実施形態では、環状化合物は、G G V V（配列番号1）を含む、またはこれよりなるA ベータペプチドと、リンカーとを含み、リンカーが、ペプチドのN末端およびC末端（例えば、ペプチドがG G V V（配列番号1）よりなる場合、G残基およびV残基）と結合

50

している。一実施形態では、Gおよび／またはVの残基のうちの少なくとも1つが環状化合物内で、GGVV（配列番号1）を含む直鎖状ペプチド内でGおよび／またはVの残基のうちの少なくとも1つによって占められるものとは別の立体配座にある。

【0179】

一実施形態では、環状化合物におけるGおよび／またはVの残基のうちの少なくとも1つは、モノマーおよび／または線維のある残基、任意にGおよび／またはVの残基により占められるものとは別の立体配座にある。

【0180】

一実施形態では、Gおよび／またはVの残基のうちの少なくとも1つは、が環状化合物内で、モノマーおよび／または線維内の残基によって占められるものとは別の立体配座にある。

10

【0181】

一実施形態では、別の立体配座は拘束された立体配座である。

【0182】

一実施形態では、少なくともVは任意選択で、単独で、または少なくとも第2のVと組み合わせさせて、GGVV（配列番号1）を含む直鎖状ペプチドにおいて占められる立体配座より拘束された立体配座にある。

【0183】

一実施形態では、G、および／またはGと組み合わせさせたV、および／またはVの立体配座は、別の立体配座、任意選択でより拘束された立体配座の化合物に含まれる。

20

【0184】

例えば、別の立体配座は、直鎖状ペプチドおよび／または線維におけるペプチドの二面角と異なる、残基G38における1つあるいは複数の異なる二面角を含み得る。

【0185】

一実施形態では、環状化合物は、環状化合物と直鎖状ペプチドとの間で差異の平均値が最小の側鎖／主鎖二面角を含む。

【0186】

一実施形態では、環状化合物は、GおよびVから選択される残基を含み、環状化合物の少なくとも1つの二面角が、直鎖状化合物および／または線維化合物において対応する二面角と少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度、少なくとも80度、少なくとも90度、少なくとも100度、少なくとも110度、少なくとも120度、少なくとも130度、少なくとも140度、または少なくとも150度異なる。

30

【0187】

一実施形態では、GはG38であり、VはV40である。

【0188】

203

図3に示されるように、G38および同様にV40の二面角分布は、環状ペプチドにおいて、直鎖状ペプチド、または線維2MXUにおける残基と実質的に異なっている。たとえば表3から、シミュレートした直鎖状ペプチド、環状ペプチドおよび線維では、G38の二面角O-C-Cα-Nの差は、環状と直鎖状との間では約-172.5度、環状と線維との間では約40.0度である可能性が最も高いことが示されている。一実施形態では、環状化合物は、直鎖状ペプチドおよび／または線維における対応する二面角と、少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度、少なくとも80度、少なくとも90度、少なくとも100度、少なくとも110度、少なくとも120度、少なくとも130度、少なくとも140度、または少なくとも150度異なるO-C-Cα-N（O-C-Cα-Nとも呼ばれる）を含むG残基を含む。同様に、G38残基の二面角O-C-Cα-H1、O-C-Cα-H2に関する環状ペプチドと直鎖状ペプチドとの間の二面角の差異は、それぞれ約60度および55度である可能性が最も高い。よって一実施形態では、環状化合物は、直鎖状化合物における対応する二

40

50

面角と少なくとも20度異なる、少なくとも30度異なる、または少なくとも40度異なる二面角 $O-C-C\alpha-H1$ および／または $O-C-C\alpha-H2$ を含むGを含む。G38の二面角 $O-C-C\alpha-H1$ 、 $O-C-C\alpha-H2$ での、環状ペプチドと線維ペプチドとの間での最も可能性のある二面角の対応する差異は、それぞれ91度および160度である。よって、一実施形態では、環状化合物は、線維における対応する二面角と、少なくとも20度、少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度、少なくとも80度、少なくとも90度、少なくとも100度、少なくとも110度、少なくとも120度、少なくとも130度、少なくとも140度、または少なくとも150度異なる $O-C-C\alpha-H1$ および／または $O-C-C\alpha-H2$ の二面角を含むGを含む。

10

【0189】

表3からまた、例えば残基38Gおよび40Vのものを含めた他の角の二面角分布に差があることが確認される。

【0190】

表5に提供されているラムチャンドラン角のピーク値により、最も可能性のあるラムチャンドランの ψ の値は、環状ペプチドと直鎖ペプチドとの間で異なっている。直鎖状ペプチドは、4つのピーク値を提示し；環状ペプチドは2つのピーク値を提示している。直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドのピーク値の間に8つの対応する差異 $\Delta\psi$ ：175度、170度、175度、175度、170度、175度、160度、および170度が存在する。 $\Delta\psi$ 値は、直鎖状ペプチドと環状ペプチドとの間で実質的に異なっている。

20

【0191】

また表3は、V40に関する二面角の差異を記載している。V40 $O-C-C\alpha-CB$ の二面角分布は、環状および直鎖状で2つのピークを有し；環状ペプチドと直鎖状ペプチドとの間でのV40 $O-C-C\alpha-CB$ の差異は、約15度および30度の可能性が最も高い。線維の分布は1つのピークを有する。環状ペプチドと線維との間を比較する場合、V40 $O-C-C\alpha-CB$ の差異は、約10度および170度の可能性が最も高い。

【0192】

一実施形態では、環状化合物は、直鎖状化合物および／または線維化合物における対応する二面角と、少なくとも10度、少なくとも20度、少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度、少なくとも80度、少なくとも90度、少なくとも100度、少なくとも110度、少なくとも120度、少なくとも130度、少なくとも140度、または少なくとも150度異なる二面角 $O-C-C\alpha-CB$ を含むVを含む。。

30

【0193】

角の差は、例えば正または負、(+)または(-)であり得る。

【0194】

別の立体配座は別の主鎖配向を含み得る。例えば、環状エピトープが抗体に対して露出する主鎖配向は、直鎖型または線維型と比較して異なるものである。

【0195】

図5は、配列CGGGVVG（配列番号2）よりなる直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドの両方ならびにPDB 2MXUの初期条件を用いた平衡化線維構造におけるGGVV（配列番号1）の残基38Gについて、平衡シミュレーションでサンプリングした主鎖のファイ角およびプサイ角をプロットしたものである。図5から、環状ペプチドの主鎖二面角（ラムチャンドランファイ／プサイ角）の分布が、残基G38に関して、直鎖状ペプチドについてサンプリングしたラムチャンドラン角の分布とは異なり、線維構造2MXUにおけるペプチドGGVV（配列番号1）とは類似していることがわかる。表5は、主鎖のファイ／プサイ角の分布のピーク値を列挙しており、表4は、主鎖のファイ／プサイ角の分布の間の重複を列挙している。環状の分布と直鎖状の分布との間の重複は少なく、直鎖状の分布は、環状分布と約16%重複している。さらに、最も大きい環状クラスター、最

40

50

も大きい直鎖状のクラスターおよび最も大きい線維のクラスターの重量中心立体配座（重量中心の構造は図7および図8に示されている）では、G38のラマチャンドラン角は、それぞれ、 $(\phi, \psi) = (-75.4, -174.3)$ 、 $(\phi, \psi) = (71.6, 9.9)$ 、および $(\phi, \psi) = (98.0, 116.9)$ である。よって、主鎖のラマチャンドラン角の差異は、GGVV（配列番号1）のG38では環状ペプチドと直鎖状ペプチドとの間で $(\Delta\phi, \Delta\psi) = (-147, 175.8)$ であり、GGVV（配列番号1）のG38では環状ペプチドと線維ペプチドとの間の主鎖のラマチャンドラン角の差異は $(\Delta\phi, \Delta\psi) = (-173.4, 68.8)$ である。このことは、それぞれの構造が、異なる主鎖の二面角を有することを示唆している。

【0196】

したがって、一実施形態では、環状化合物は、主鎖ファイ／ブサイ角が、直鎖状化合物、任意に対応する直鎖状ペプチドまたは線維PDB構造におけるものと比較して少なくとも20度、少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度、少なくとも80度異なる、少なくとも90度、少なくとも100度、少なくとも110度、少なくとも120度、少なくとも130度、少なくとも140度、または少なくとも150度である少なくとも1個の残基を有する、Aベータペプチドを含む。

【0197】

別の立体配座はまた、直鎖状化合物、任意に対応する直鎖状ペプチドおよび／またはAベータ線維と比較して、アミノ酸を中心とする曲率またはGGVV（配列番号1）もしくは関連エピトープを含む環状化合物の曲率の増大または減少を含み得る。

【0198】

一実施形態では、別の立体配座GGVV（配列番号1）は、直鎖状GGVV（配列番号1）または線維構造2MXUにおけるGGVV（配列番号1）と比較して変化した曲率プロファイルを有する。数が表1に提供されている図2Gに示されているように、環状ペプチドにおけるV39の曲率は、直鎖状ペプチドまたは線維の値よりも実質的に大きい。環状のV40の曲率は、線維とモノマーとの間の中間にある。

【0199】

曲率の値は、線維におけるシクロ（CGGGVVG）（配列番号2）、直鎖状（CGGGVVG）（配列番号2）のN末端からC末端のG、G、V、およびVに関して決定されており、これを実施例2に記載する。

【0200】

したがって、化合物は、別の立体配座のV39の曲率が、対応する線維における直鎖状ペプチドと比較して少なくとも0.1ラジアン、0.2ラジアン、0.3ラジアンまたはそれ以上増大している、Aベータペプチドを含む。

【0201】

一実施形態では、末端のV、GG、GV、VV、VVG、および／またはGGVV（配列番号1）は、例えば直鎖状ペプチドおよび／または線維などの非オリゴマー立体配座でこれら残基によって占められるものと比較して、別の立体配座にある。

【0202】

図2Aは、異なる平衡シミュレーションの時間から得た直鎖状CGGGVVG（配列番号2）の曲率をプロットしている。説明文は、10nsから開始し、30ns、50ns、70ns、または90nsまで続行するいくつかの曲線を示す。シミュレーション時間が増大すると、曲率の値は、上記および表1に記録されている値に集束する。同様に、環状ペプチドに関する試験が図2Bに示されており、線維に関する試験が図2Cに示されている。パネルD、E、およびFは、それぞれ直鎖状、環状、および線維の立体配座に対する、シミュレーション時間の関数としての曲率の値の合計の収束を示している。収束の度合いは、エラーバーが、環状ペプチドでは約0.016ラジアン、直鎖状ペプチドでは0.05ラジアン、および線維では0.01ラジアンであることを示す。

【0203】

同様の変化を示す環状化合物も包含される。

【0204】

G G V V（配列番号1）を含むペプチドを含む、いくつかの実施形態の環状化合物は、A ベータの G G V V（配列番号1）の上流および／または下流に1個または2個またはそれ以上の残基を含み得る。このような場合、A ベータ配列の対応する残基の末端のN末端およびC末端にスペーサーが共有結合している。

【0205】

いくつかの実施形態では、リンカーまたはスペーサーは、A ベータペプチドのN末端残基およびC末端残基と間接的に結合している。

【0206】

一実施形態では、環状化合物は図17Cに示される化合物である。

【0207】

環化ペプチドを作製する方法は当該技術分野で公知であり、S S環化またはアミド環化（頭一尾環化または主鎖環化）がこれに含まれる。実施例3に方法をさらに記載する。例えば、N末端およびC末端に「C」残基を有するペプチド、例えばC G G G V V G C（配列番号12）をS S環化により反応させて、環状ペプチドを得ることができる。実施例2に記載されるように、図7Cの環状化合物について、特定された立体配座エピトープとの関連性を評価した。G G V V（配列番号1）ペプチドを含む環状化合物は、例えば、1つまたは複数の立体配座の特徴に選択的な抗体を生じさせるのに使用することができる。

【0208】

本明細書に記載されるエピトープ G G V V（配列番号1）および／またはその一部は、A ベータに含まれるA ベータのミスフォールドされた伝播性の株における潜在的な標的となり得、その立体配座エピトープを認識する抗体は、例えば、そのような伝播性の株の検出に有用であり得る。

【0209】

別の態様では、直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドを含めた本明細書に記載されるA ベータペプチド配列を含む、単離ペプチドも提供される。直鎖状ペプチドは、例えば、それと結合しない抗体の選択に使用することができる。単離ペプチドは、本明細書に記載されるリンカー配列を含み得る。リンカーは、C G G G V V G（配列番号2）直鎖状ペプチドでは、N末端またはC末端と共有結合していても、あるいは一部がN末端と結合し、一部がC末端と結合していてもよい。環状ペプチドでは、リンカーはC末端およびN末端と直接的または間接的に結合している。

【0210】

別の態様は、本明細書に記載される化合物、任意選択で環状化合物を含む、免疫原を含む。免疫原はまた、ほかのA ベータ配列を含み得る。G G V V（配列番号1）および関連エピトープ配列のすぐ上流および／または下流（すなわち、N末端側および／またはC末端側）にはアミノ酸が存在し得る。このような免疫原に対して生じさせた抗体を、例えば、G G V V（配列番号1）または関連エピトープを含むシクロペプチドとの結合に関して選択することができる。

【0211】

免疫原は、対象への投与のために適切に調製または製剤化され、例えば、免疫原は無菌のものまたは精製されたものであり得る。一実施形態では、免疫原は、G G V V（配列番号1）または関連エピトープの配列を含む環状ペプチドである。

【0212】

一実施形態では、免疫原は、キーホールリンペットヘモシアニン（K L H）またはM A P抗原などの免疫原性増強物質を含む。免疫原性増強物質は、アミド結合などを介して直接、またはリンカーの官能化可能な部分を介して間接的に、化合物と結合してよい。（例えば、環状化合物内のA ベータペプチドが6アミノ酸残基であり）リンカーが単一のアミノ酸残基である場合、リンカーは官能化可能な部分（例えば、システイン残基）であり得る。

10

20

30

40

50

【0213】

免疫原は、例えば、参照により本明細書に組み込まれるLateefら(2007)に記載されている方法を用いて、拘束されたエピトープペプチドを含む環状化合物と、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)などの免疫原性増強物質またはウシ血清アルブミン(BSA)などの担体とをコンジュゲートすることにより作製することができる。一実施形態では、実施例3または4に記載される方法を用いる。

【0214】

さらなる態様は、本明細書に記載される化合物または免疫原のタンパク質性部分をコードする単離核酸分子である。

【0215】

実施形態では、核酸分子は、配列番号1~15で示されるアミノ酸配列のいずれか1つをコードする。

【0216】

一実施形態では、核酸分子は、GGVV(配列番号1)または関連エピトープおよび任意選択で、本明細書に記載されるリンカーをコードする。

【0217】

さらなる態様は、前記核酸を含むベクターである。適切なベクターについては本明細書の他の箇所に記載する。

【0218】

b) 抗体、細胞および核酸

実施例6および7に示されているように、環状化合物CGGGVVG(配列番号2)は免疫原性であり、直鎖状化合物、任意に対応する直鎖状ペプチドと比較して環状化合物を選択的に結合する複数の抗体を産生させた。本明細書に記載されるように、シクロ(CGGGVVG)(配列番号2)を使用して生じさせた抗体は、環状化合物に選択的であり、モノマーよりもAベータオリゴマーに選択的に結合し、AD組織において認識可能なプラーク染色を含まない抗体を含むものであった。本明細書に記載されるエピトープGGVV(配列番号1)および/またはその一部は、Aベータに関与するAベータのミスフォールドされた伝搬株の潜在的な標的であってもよく、立体配座エピトープを認識する抗体は、たとえばこのような伝搬株の検出に有益であり得る。さらに、環状化合物に対して生じさせた抗体は、Aベータの凝集を阻害し、またAベータオリゴマーにより誘導される神経細胞への毒性を阻害した。このことにより、これらの治療上の有用性が示唆されている。

【0219】

よって、上記の化合物および特に環状化合物を用いて、Aベータ内のVV、GVV、および/またはGGVV(配列番号1)と特異的に結合する抗体および/または本明細書に記載される1つもしくは複数の差次的な特徴を含むAベータにおけるこれら残基の特定の立体配座を認識する抗体を生じさせることができる。これと同様に、例えばVGGVV(配列番号6)、GGVVI(配列番号8)、VGGVVI(配列番号7)および/または本明細書に記載されるその他の関連エピトープ配列を含む環状化合物を用いて、GGVV(配列番号1)などおよび/またはその特定の立体配座エピトープと特異的に結合する抗体を生じさせることができる。

【0220】

したがって、一態様は、例えば配列番号1~15のいずれか1つで示される配列GGVV(配列番号1)または関連エピトープ配列の配列、たとえばAベータの配列を有するAベータペプチドと特異的に結合する、抗体(その結合フラグメントを含む)を含む。

【0221】

一実施形態では、Aベータペプチドは環状ペプチド内に含まれており、抗体は、環状化合物内で提示されるAベータに対して特異的かつ/または選択的なものである。

【0222】

一実施形態では、抗体は本明細書に記載される環状化合物のAベータペプチドと特別かつ/または選択的に結合し、Aベータは、配列番号1~15のいずれか1つ、たとえば配

10

20

30

40

50

列番号 1、および 5～15 のうちの 1 つに示されている A ベータ配列を有する。一実施形態では、環状化合物は、配列番号 2～4 のいずれか 1 つで示される配列を含む

【0223】

一実施形態では、環状化合物は環状ペプチドである。一実施形態では、環状ペプチド内の A ベータペプチドは、配列番号 1～15 のいずれか、たとえば配列番号 1、および 5～15 のうちの 1 つの A ベータペプチドである。

【0224】

一実施形態では、抗体は、配列番号 2～4 のいずれか 1 つの環状化合物または上記化合物を含む免疫原を使用して、産生されている。

【0225】

実施例に記載されるように、実施例に記載されるアッセイを用いて、1 つまたは複数の特性を有する抗体を選択することができる。

【0226】

一実施形態では、抗体は、配列 G G V V（配列番号 1）を含む直鎖状ペプチドとは結合せず、任意選択で、直鎖状ペプチドの配列は、抗体を生じさせるために使用され任意選択で配列番号 2 に示される環状配列の直鎖型である。

【0227】

一実施形態では、抗体は、A ベータペプチドを含む対応する直鎖状化合物よりも環状化合物内で提示される A ベータペプチドに対して選択的である。

【0228】

一実施形態では、抗体は A ベータ上のエピトープと特異的に結合し、エピトープは、G G V V（配列番号 1）またはその関連エピトープ含む、またはこれよりなる。

【0229】

一実施形態では、A ベータ上で抗体により特異的または選択的に認識されるエピトープは、立体配座エピトープである。

【0230】

一実施形態では、抗体は単離されている。

【0231】

一実施形態では、抗体は外来抗体である。

【0232】

一実施形態では、抗体は、G G V V（配列番号 1）からなるペプチドを含む環状化合物と比較して、直鎖状 A I I G L M V G G V V（配列番号 13）、直鎖状 M V G G V V（配列番号 14）、または直鎖状 G V V I A（配列番号 15）に特異的に結合しない、かつ／または選択的ではない。選択性は、本明細書中に記載される E L I S A を使用して測定することができる。

【0233】

したがって、さらなる態様は、A ベータに存在するエピトープと特異的に結合する抗体であり、ここでは、エピトープは、抗体との結合に主として関与する少なくとも 1 個のアミノ酸残基を含む、またはこれよりなるものであり、その少なくとも 1 個のアミノ酸は、配列 G G V V（配列番号 1）内に組み込まれた G または V であり、G G V V（配列番号 1）からなる場合、エピトープは、立体配座エピトープである（たとえば、直鎖状化合物、任意に、たとえばエピトープの少なくとも 1 つのアミノ酸がより拘束されている対応する直鎖状化合物と比較して、任意に拘束された別の立体配座にあるペプチドを選択的に結合する）。一実施形態では、エピトープは、抗体との結合に主として関与する少なくとも 2 個の連続するアミノ酸残基を含む、またはこれよりなるものであり、その少なくとも 2 個の連続するアミノ酸は、G G V V（配列番号 1）内に組み込まれた G G または G V または V V である。

【0234】

別の実施形態では、エピトープは G G V V（配列番号 1）または関連エピトープよりなる。

10

20

30

40

50

【0235】

別の実施形態では、エピトープは、立体配座エピトープであり、GGVV（配列番号1）からなる。一実施形態では、抗体は、環状ペプチドにおいて、対応する直鎖状ペプチドと比較して、GGVV（配列番号1）、任意にシクロ（CGGGVVG）（配列番号2）と選択的に結合する。

【0236】

一実施形態では、抗体は、本明細書に記載される少なくとも1つの別の立体配座の特徴を含む本明細書に記載のエピトープ（たとえば直鎖状化合物と比較した、環状化合物におけるエピトープ）のペプチド配列を含む環状化合物を特異的かつ／または選択的に結合する。例えば、特定のエピトープ立体配座と結合する抗体は、立体配座特異的抗体と呼ぶことができる。このような抗体は、本明細書に記載される方法を用いて選択することができる。立体配座特異的抗体は、特定のAベータ種または関連種（例えば、二量体、三量体およびその他のオリゴマー種）のグループを区別して認識することが可能であり、ある種または種のグループに対して別の種（例えば、モノマー種または線維種）より高い親和性を有し得る。

10

【0237】

一実施形態では、抗体は単量体Aベータと特異的に結合しない。一実施形態では、抗体は、例えばADの脳組織においてin situで、Aベータ老人斑と特異的に結合しない。

【0238】

別の実施形態では、抗体は、天然または合成のオリゴマーAベータより単量体Aベータと選択的に結合することはない。

20

【0239】

例えば、抗体は、GおよびVから選択され、環状化合物における少なくとも1つの二面角が、直鎖状化合物において対応する二面角と少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度、少なくとも80度、少なくとも90度、少なくとも100度、少なくとも110度、少なくとも120度、少なくとも130度、少なくとも140度、少なくとも150度異なる残基を含む、環状化合物と特異的に結合し得る。

【0240】

一実施形態では、抗体は、対応する配列などの任意に直鎖状CGGGVVG（配列番号2）におけるGGVV（配列番号1）を含む直鎖状ペプチドよりも、環状化合物内にあり任意にシクロ（CGGGVVG）（配列番号2）におけるGGVV（配列番号1）またはその一部を含むAベータペプチドと選択的に結合する。例えば、一実施形態では、抗体は、環状立体配座のGGVV（配列番号1）と選択的に結合し、例えばELISAもしくは表面プラズモン共鳴、または任意選択で本明細書に記載される方法を使用することにより測定された、環状立体配座のGGVV（配列番号1）に対する選択性（例えば、結合親和性）が、直鎖状ペプチド内のGGVV（配列番号1）の少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍である。

30

40

【0241】

一実施形態では、環状化合物は、シクロ（CGGGVVG）（配列番号2）である。

【0242】

一実施形態では、抗体は、環状化合物内のAベータペプチドおよび／またはAベータと選択的に結合する。一実施形態では、選択性は、環状化合物内のAベータペプチドおよび／またはAベータオリゴマーに対して、Aベータモノマーおよび／またはAベータ線維から選択されるAベータ種ならびに／あるいは直鎖状GGVV（配列番号1）、任意に直鎖状CGGGVVG（配列番号2）の少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくと

50

も50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍選択的である。

【0243】

一実施形態では、Aベータオリゴマーは、Aベータ1～42のサブユニットを含む。

【0244】

一実施形態では、抗体はAベータ線維斑（老人斑とも呼ばれる）染色を示さない。斑染色がみられないことは、Aベータ特異的抗体である6E10および4G8（Biolegend社、サンディエゴ、カリフォルニア州）または2C8（Enzo Life Sciences社、ファーマーグデール、ニューヨーク州）、またはAベータの線維形態に反応性のある他のいずれかの抗体などの陽性対照ならびにアイソタイプ対照と比較することにより評価することができる。本明細書に記載される抗体は、その抗体が典型的な斑形態染色を示さず、染色のレベルがIgG陰性アイソタイプ対照でみられるレベルの2倍と同等またはそれ以下である場合、Aベータ線維斑染色を示さない、またはほとんど示さないことになる。尺度は、例えば、アイソタイプ対照での染色レベルを1に設定し、6E10での染色レベルを10に設定することができる。抗体は、そのような尺度で染色レベルが2以下である場合、Aベータ線維斑染色を示さないことになる。実施形態では、抗体は、例えば上記の尺度で、最小限のAベータ線維斑染色を示し、そのレベルのスコアは少なくとも3程度または3未満である。

【0245】

一実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。

【0246】

モノクローナル抗体を作製するには、本明細書に記載される免疫原で免疫感作した対象から抗体産生細胞（リンパ球）を回収し、標準的な体細胞融合法によりミエローマ細胞と融合し、それにより上記の細胞を不死化してハイブリドーマ細胞を得ることができる。このような技術は当該技術分野で周知である（例えば、KohlerおよびMilsteinにより最初に開発されたハイブリドーマ技術（Nature 256:495-497（1975））ならびにその他の技術、例えばヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozborら, Immunol. Today 4:72（1983））、ヒトモノクローナル抗体を作製するEBVハイブリドーマ技術（Coleら, Methods Enzymol, 121:140-67（1986））およびコンビナトリアル抗体ライブラリーのスクリーニング（Huseら, Science 246:1275-1281（1989）など）。望ましいエピトープと特異的に反応する抗体の産生に関してハイブリドーマ細胞を免疫学的にスクリーニングし、モノクローナル抗体を単離することができる。

【0247】

特定の抗原または分子に対して反応性の特異的抗体または抗体フラグメントはまた、細胞表面成分とともに細菌内で発現する免疫グロブリン遺伝子またはその一部をコードする発現ライブラリーをスクリーニングすることにより作製し得る。例えば、ファージ発現ライブラリーを用いて、完全Fabフラグメント、VH領域およびFV領域を細菌内で発現させることができる（例えば、Wardら, Nature 41:544-546（1989）；Huseら, Science 246:1275-1281（1989）；およびMcCaffertyら, Nature 348:552-554（1990）を参照されたい）。

【0248】

一実施形態では、抗体はヒト化抗体である。

【0249】

非ヒト種からの抗体のヒト化については文献に十分に記載されている。例えば、欧州特許第号第0239400号（B1）ならびにCarterおよびMerchant 1997（全体が参照により本明細書に組み込まれるCurr Opin Biotechnol 8, 449-454, 1997）を参照されたい。ヒト化抗体はまた、商業的に容易に入手できる（例えば、イギリス、ミドルセックス、トゥイッケナム、ホーリーロード

10

20

30

40

50

2 番の S c o t g e n L i m i t e d 社)。

【0250】

ヒト化型のげっ歯類抗体は、CDR移植 (R i e c h m a n n ら, N a t u r e, 332:323-327, 1988) によって容易に作製される。この方法では、げっ歯類モノクローナル抗体の抗原結合部位を含む6つのCDRループと、対応するヒトフレームワーク領域とを結合させる。CDR移植では、フレームワーク領域のアミノ酸が抗原認識に影響を及ぼし得ることから、親和性が低下した抗体が得られることが多い (F o o t e および W i n t e r, J M o l B i o l, 224:487-499, 1992)。抗体の親和性を維持するには多くの場合、部位特異的変異誘発またはその他の組換え技術により特定のフレームワーク残基を置き換える必要があり、コンピュータによる抗原結合部位のモデル化を援用することもある (C o ら, J I m m u n o l, 152:2968-2976, 1994)。

10

【0251】

ヒト化型の抗体は任意選択で、リサーフィニング (r e s u r f a c i n g) (P e d e r s e n ら, J M o l B i o l, 235:959-973, 1994) によって得られる。この方法ではげっ歯類抗体の表面残基のみをヒト化する。

【0252】

特定の抗原に特異的なヒト抗体は、ファージディスプレイ戦略 (J e s p e r s ら, B i o / T e c h n o l o g y, 12:899-903, 1994) によって特定され得る。1つの方法では、特異的抗原に対するげっ歯類抗体の重鎖をクローン化し、ヒト軽鎖のレパートリーと対にして、繊維状ファージ上にF a b フラグメントとして提示させる。抗原との結合によりファージを選択する。次いで、選択されたヒト軽鎖をヒト重鎖のレパートリーと対にしてファージ上に提示させ、再び抗原との結合によりファージを選択する。その結果は、特定の抗原に特異的なヒト抗体F a b フラグメントとなる。別の方法では、メンバーがその外表面に様々なヒト抗体フラグメント (F a b またはF v) を提示するファージのライブラリーを作製する (D o w e r ら, 国際公開第91/17271号およびM c C a f f e r t y ら, 国際公開第92/01047号)。特異的抗原に対するアフィニティー濃縮により所望の特異性を有する抗体を提示するファージを選択する。いずれかの方法で特定されたヒトF a b フラグメントまたはヒトF v フラグメントをクローン化して、哺乳動物細胞でヒト抗体として発現させ得る。

20

30

【0253】

ヒト抗体は任意選択で、トランスジェニック動物から得られる (米国特許第6, 150, 584号; 同第6, 114, 598号; および同第5, 770, 429号)。この方法では、キメラマウスまたは生殖系列変異体マウスの重鎖連結領域 (J H) 遺伝子を欠失させる。次いで、そのような変異体マウスにヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイを導入する。次いで、得られたトランスジェニックマウスは抗原曝露時にヒト抗体の全レパートリーを作製することが可能になる。

【0254】

ヒト化抗体は通常、F a b、F a b' F (a b')₂、F d、F v および単一ドメイン抗体フラグメントなどの抗原結合フラグメントまたは重鎖と軽鎖がスパーサーにより連結された一本鎖抗体として作製される。また、ヒト抗体またはヒト化抗体はモノマー型またはポリマー型で存在し得る。ヒト化抗体は任意選択で、1本の非ヒト鎖と1本のヒト化鎖 (すなわち、1本のヒト化重鎖または軽鎖) とを含む。

40

【0255】

ヒト化抗体またはヒト抗体を含めた抗体は、I g M、I g G、I g D、I g A または I g E を含めた任意のクラスの免疫グロブリン; ならびに I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 を含めた任意のアイソタイプから選択される。キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体は、1つまたは2つ以上のアイソタイプまたはクラスに由来する配列を含み得る。

【0256】

50

さらに、本明細書に記載されるエピトープに特異的な抗体は、抗体ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることにより容易に単離される。例えば、任意選択で本発明の疾患特異的なエピトープを使用することにより、抗体ファージライブラリーをスクリーニングして、疾患特異的なエピトープに特異的な抗体フラグメントを同定する。任意選択で、特定された抗体フラグメントを用いて、本明細書に記載される様々な実施形態に有用な様々な組換え抗体を作製する。抗体ファージディスプレイライブラリーは、例えば X o m a 社（パークレー、カリフォルニア州）から市販されている。ファージライブラリーをスクリーニングする方法は当該技術分野で周知である。

【0257】

さらなる態様は、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含み、重鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含み、軽鎖可変領域が相補性決定領域 C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 を含み、前記 C D R のアミノ酸配列が、以下に記載する配列を含む、抗体および／またはその結合フラグメントである。

【0258】

【表 3】

CDR-H1	GFTFSNYW	配列番号 17
CDR-H2	IRLKSINYAT	配列番号 18
CDR-H3	LRWIDY	配列番号 19
CDR-L1	QDINSY	配列番号 20
CDR-L2	RAN	配列番号 21
CDR-L3	PQYDEFPYT	配列番号 22

【0259】

一実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。一実施形態では、抗体はキメラ抗体、例えば表 12 に記載される C D R 配列を含むヒト化抗体などである。

【0260】

別の態様は、表 12 に記載されている C D R を含む抗体と、ヒトの A ベータに対する結合性に関して競合する抗体を含む。

【0261】

別の実施形態では、任意選択で一本鎖抗体において、表 12 の C D R と軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含む、抗体も提供される。

【0262】

さらに別の態様では、抗体は、i) 配列番号 24 で示されるアミノ酸配列；i i) 配列番号 24 と少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、または少なくとも 90 % の配列同一性を有し、C D R 配列が配列番号 17、18 および 19 で示される、アミノ酸配列または i i i) 保存的に置換されたアミノ酸配列 i) を含む、重鎖可変領域を含む。別の態様では、抗体は、i) 配列番号 26 で示されるアミノ酸配列、i i) 配列番号 26 と少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 % もしくは少なくとも 90 % の配列同一性を有し、C D R 配列が配列番号 20、21 および 22 で示される、アミノ酸配列または i i i) 保存的に置換された i) のアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域を含む。別の実施形態では、重鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号 23 で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重最適化型によってコードされている。別の実施形態では、抗体は、配列番号 25 で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされる軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、重鎖可変領域は配列番号 24 で示されるアミノ酸配列を含む。

【0263】

別の態様は、表 12 に記載される C D R 配列を有する抗体と同じエピトープと特異的に結合する抗体である。

【0264】

抗体間の競合は、例えば、被験抗体が参照抗体と共通の抗原との特異的結合を阻害する能力を評価するアッセイを用いて判定することができる。競合結合アッセイで測定したとき、過剰の被験抗体（例えば、少なくとも2倍、5倍、10倍または20倍）が参照抗体の結合を少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%阻害する場合、被験抗体は参照抗体と競合することになる。

【0265】

さらなる態様は、治療剤、検出可能な標識または細胞毒性物質とコンジュゲートした抗体である。一実施形態では、検出可能な標識は陽電子放出放射性核種である。陽電子放出放射性核種は、例えばPET撮像で使用され得る。

【0266】

さらなる態様は、本明細書に記載される抗体および／またはその結合フラグメントとオリゴマーAベータとを含む、抗体複合体に関する。

【0267】

さらなる態様は、本明細書に記載される抗体またはその一部をコードする、単離核酸である。

【0268】

また、重鎖または軽鎖をコードする、例えば、本明細書に記載されるCDR-H1領域、CDR-H2領域および／またはCDR-H3領域を含む重鎖をコードする、あるいは本明細書に記載されるCDR-L1領域、CDR-L2領域および／またはCDR-L3領域を含む軽鎖をコードする、核酸も提供される。

【0269】

本開示はまた、本明細書に開示される抗体および／またはその結合フラグメントをコードする核酸配列のバリエーションを提供する。例えば、バリエーションとしては、本明細書に開示される抗体および／またはその結合フラグメントをコードする核酸配列と少なくとも中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列またはコドン縮重配列もしくはコドン最適化配列が挙げられる。別の実施形態では、バリエーション核酸配列は、配列番号24および26をコードする核酸配列と少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、最も好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%、さらに最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0270】

一実施形態では、核酸は単離核酸である。

【0271】

別の態様は、本明細書に開示される核酸を含む発現カセットまたはベクターである。一実施形態では、ベクターは単離ベクターである。

【0272】

ベクターは、抗体および／またはその結合フラグメントの作製あるいは本明細書に記載されるエピトープのペプチド配列の発現に適したベクターを含めた任意のベクターであり得る。

【0273】

既知の方法で、タンパク質を確実に発現させる適切な発現ベクター内に核酸分子を組み込み得る。考え得る発現ベクターとしては、特に限定されないが、コスミド、プラスミドまたは改変ウイルス（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）が挙げられる。ベクターは使用する宿主細胞と適合性のあるものであるべきである。発現ベクターは「宿主細胞の形質転換に適した」ものであり、これは、その発現ベクターが、本明細書に記載されるエピトープまたは抗体に対応するペプチドをコードする核酸分子を含んでいることを意味する。

【0274】

一実施形態では、ベクターは、遺伝子治療により例えば一本鎖抗体を発現させるのに適したものである。ベクターは、例えば神経特異的プロモーターなどを用いて、神経組織で

10

20

30

40

50

の特異的発現に適合させることができる。一実施形態では、ベクターは、I R E Sを含み、軽鎖可変領域および重鎖可変領域の発現を可能にする。このようなベクターは、i n v i v oで抗体を送達するのに用いることができる。

【0275】

適切な制御配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳動物または昆虫の遺伝子を含めた様々な供給源に由来するものであり得る。

【0276】

このような制御配列の例としては、転写プロモーターおよび転写エンハンサーまたはR N Aポリメラーゼ結合配列、翻訳開始シグナルを含めたりボソーム結合配列が挙げられる。さらに、選択する宿主細胞および用いるベクターに応じてその他の配列、例えば複製起10
点、追加のD N A制限部位、エンハンサーおよび転写の誘導性を付与する配列などを発現ベクター内に組み込み得る。

【0277】

一実施形態では、制御配列は、神経組織および／または細胞での発現を指令する、または増大させる。

【0278】

一実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。

【0279】

組換え発現ベクターはまた、本明細書に記載される抗体またはエピトープペプチドを発現させるためにベクターにより形質転換、感染または形質移入した宿主細胞の選択を容易にするマーカー遺伝子を含み得る。20

【0280】

組換え発現ベクターはまた、組換えペプチドを発現または安定性を増大させる；組換えペプチドの溶解度を増大させる；ならびに例えば本明細書に記載されるタグおよび標識を含めたアフィニティー精製のリガンドとして作用することにより標的組換えペプチドの精製を補助する融合部分（すなわち、「融合タンパク質」）をコードする、遺伝子を含み得る。さらに、標的組換えタンパク質にタンパク質分解切断部位を付加して、融合タンパク質精製後に融合部分から組換えタンパク質を分離させ得る。典型的な融合発現ベクターとしては、p G E X（A m r a d社、メルボルン、オーストラリア）、p M A L（N e w E n g l a n d B i o l a b s社、ビバリー、マサチューセッツ州）およびp R I T 530
（P h a r m a c i a社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）が挙げられ、これらは組換えタンパク質にそれぞれグルタチオンS-トランスフェラーゼ（G S T）、マルトースE結合タンパク質またはプロテインAを融合させるものである。

【0281】

例えばニューロンおよび神経組織内にi n v i t r oおよびi n v i v oの両方で遺伝子を導入するシステムとしては、ウイルス、中でもとりわけ単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（A A V）およびレンチウイルスを含めたレトロウイルスに基づくベクターが挙げられる。これに代わる遺伝子送達の方法としては、裸のプラスミドD N Aおよびリボソーム-D N A複合体の使用が挙げられる。別の方法には、D N Aをポリカチオン濃縮して脂質に封入し、脳内遺伝子送達により脳内に導入する、A A Vプラスミドの使用（L e o n eら、米国特許出願公開第2002076394号）がある。40

【0282】

したがって、別の態様では、本明細書に記載される化合物、免疫原、核酸、ベクターおよび抗体をリボソーム、ナノ粒子およびウイルスタンパク質粒子などの小胞で製剤化し、例えば、本明細書に記載される抗体、化合物、免疫原および核酸を送達し得る。特に、ポリマーソームを含めた合成ポリマー小胞を用いて抗体を投与することができる。

【0283】

別の態様では、本明細書に記載される抗体を発現する、または本明細書に開示される発現カセットまたはベクターを含む細胞、任意選択で単離細胞および／または組換え細胞も50

提供される。

【0284】

組換え細胞は、ポリペプチドの産生に適した、例えば抗体および／またはその結合フラグメントの産生に適した任意の細胞を用いて作製することができる。例えば、核酸（例えば、ベクター）を細胞内に導入するには、用いるベクターに応じて、細胞に形質移入し得る、細胞を形質転換し得る、または細胞に感染させ得る。

【0285】

適切な宿主細胞としては、多種多様な原核宿主細胞および真核宿主細胞が挙げられる。例えば、本明細書に記載されるペプチドおよび抗体を大腸菌（*E. coli*）などの細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルスを用いる）、酵母細胞または哺乳動物細胞で発現させ得る。

10

【0286】

一実施形態では、細胞は、酵母細胞、植物細胞、蠕虫細胞、昆虫細胞、鳥類細胞、魚類細胞、爬虫類細胞および哺乳動物細胞から選択される真核細胞である。

【0287】

別の実施形態では、哺乳動物細胞は、ミエローマ細胞、脾臓細胞またはハイブリドーマ細胞である。

【0288】

一実施形態では、細胞は神経細胞である。

【0289】

抗体またはペプチドを発現させるのに適した酵母宿主細胞および真菌宿主細胞としては、特に限定されないが、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）、ピキア（*Pichia*）属またはクリベロミセス（*Kluyveromyces*）属およびアスペルギルス（*Aspergillus*）属の様々な種が挙げられる。酵母（*S. cerevisiae*）で発現させるためのベクターの例としては、pYepSec1、pMFa、pJRY88およびpYES2（Invitrogen社、サンディエゴ、カリフォルニア州）が挙げられる。酵母および真菌を形質転換させるプロトコルは当業者に周知である。

20

【0290】

適切であり得る哺乳動物細胞としては、特にCOS（例えば、ATCC番号CRL1650または1651）、BHK（例えば、ATCC番号CRL6281）、CHO（ATCC番号CCL61）、HeLa（例えば、ATCC番号CCL2）、293（ATCC番号1573）およびNS-1細胞が挙げられる。哺乳動物細胞での発現を指令するのに適した発現ベクターは一般に、プロモーター（例えば、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびサルウイルス40などのウイルス材料由来のもの）ならびにその他の転写制御配列および翻訳制御配列を含む。哺乳動物発現ベクターの例としては、pCDM8およびpMT2PCが挙げられる。

30

【0291】

さらなる態様は、本明細書に記載されるエピトープに特異的な抗体を産生するハイブリドーマである。

40

【0292】

I V. 組成物

さらなる態様は、本明細書に記載される化合物、免疫原、核酸、ベクターまたは抗体を含む組成物である。

【0293】

一実施形態では、組成物は希釈剤を含む。

【0294】

核酸に適した希釈剤としては、特に限定されないが、水、生理食塩水およびエタノールが挙げられる。

【0295】

50

抗体もしくはそのフラグメントを含めたポリペプチドおよび／または細胞に適した希釈剤としては、特に限定されないが、生理食塩水、pH緩衝溶液およびグリセロール溶液あるいはポリペプチドおよび／または細胞を凍結させるのに適した他の溶液が挙げられる。

【0296】

一実施形態では、組成物は、本明細書に開示されるペプチド、免疫原、抗体、核酸またはベクターのいずれかを含み、任意選択で薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物である。

【0297】

本明細書に記載される組成物は、対象に投与することができる薬学的に許容される組成物を調製する既知の方法それ自体により、任意選択でワクチンとして、有効量の活性物質が薬学的に許容される溶媒との混合物の形で組み合わせるように調製することができる。

【0298】

医薬組成物としては、特に限定されないが、凍結乾燥粉末剤または水性もしくは非水性の無菌注射用液剤もしくは無菌注射用懸濁剤が挙げられ、これらは、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および組成物を目的とする被投与者の組織または血液に実質的に適合させる溶質をさらに含有し得る。このような組成物中に記載の存在し得るその他の成分としては、例えば水、界面活性剤（Tweenなど）、アルコール、ポリオール、グリセリンおよび植物油が挙げられる。無菌粉末剤、顆粒剤、錠剤または濃縮した液剤もしくは懸濁剤から即時注射液剤および即時注射懸濁剤を調製し得る。組成物は、例えば、特に限定されないが、患者に投与する前に滅菌水または生理食塩水で再構築する凍結乾燥粉末として供給され得る。

【0299】

医薬組成物は薬学的に許容される担体を含み得る。適切な薬学的に許容される担体としては、実質的に化学的に不活性で無毒性であり医薬組成物の生物活性の効果に干渉しない組成物を含む。適切な医薬担体の例としては、特に限定されないが、水、生理食塩水、グリセロール溶液、エタノール、N-（1（2，3-ジオレイルオキシ）プロピル）N，N，N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）、ジオレシルホスファチジルエタノールアミン（diolesylphosphotidylethanolamine）（DOPE）およびリポソームが挙げられる。このような組成物は、患者に直接投与する形態になるように、治療有効量の化合物を適量の担体とともに含有すべきである。

【0300】

組成物は薬学的に許容される塩の形態であり得、このような塩としては、特に限定されないが、遊離アミノ基を用いて形成される塩、例えば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するなどおよび遊離カルボキシル基を用いて形成される塩、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアルニノエタノール（2-ethylarnino ethanol）、ヒスチジン、プロカインなどに由来するなどが挙げられる。

【0301】

本明細書に記載される化合物または免疫原を含む実施形態では、組成物はアジュバントを含む。

【0302】

使用し得るアジュバントとしては例えば、通常、ワクチンとして使用される死菌または弱毒菌の成分である、内因性アジュバント（リボ多糖など）が挙げられる。外因性アジュバントには、通常、抗原と非共有結合し、宿主免疫応答を増強するよう製剤化される、免疫調節物質がある。水酸化アルミニウム、硫酸アルミニウムおよびリン酸アルミニウム（一般にミョウバンと総称される）はアジュバントとして日常的に使用される。様々なアジュバントが免疫原に対する強力な免疫応答を引き起こし得る。このようなものとしては、サポニン、例えばStimulon（QS21、Aquila社、ウスター、マサチューセッツ州）またはそれから生成されるISCOMおよび（免疫刺激複合体）および膜タン

パク質抗原と複合体を形成した I S C O M A T R I X（免疫刺激複合体）などの粒子など、プルロニックポリマーと鉱油、死滅マイコバクテリアと鉱油、フロイント完全アジュバント、ムラミルジペプチド（MDP）およびリポ多糖などの細菌生成物ならびにリピド A およびリポソームが挙げられる。

【0303】

一実施形態では、アジュバントは水酸化アルミニウムである。別の実施形態では、アジュバントはリン酸アルミニウムである。水中油型乳剤としては、スクアレレン；ラッカセイ油；MF59（国際公開第90/14387号）；SAF（Syntex Laboratories社、パロアルト、カリフォルニア州）；およびRibi（商標）（Ribi Immunochem社、ハミルトン、モンタナ州）が挙げられる。水中油型乳剤は、免疫刺激物質、例えばムラミルジペプチド（例えば、N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン（thr-MDP）、-アセチル-L-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン（nor-MDP）、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-（1'-2'ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ）-エチルアミン（MTP-PE）、N-アセチルグルクサミニル-N-アセチルムラミル-L-Al-D-イソグル-L-Ala-ジバルミトキシプロピルアミド（N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxypropylamide）（DTP-DPP）、theramide（商標））またはその他の細菌細胞壁成分とともに使用し得る。

【0304】

アジュバントを単一組成物として免疫原とともに投与し得る。あるいは、アジュバントを免疫原投与の前に、免疫原投与と同時に、かつ／または免疫原投与の後に投与し得る。

【0305】

アジュバントは一般に、リン酸緩衝生理食塩水に溶かした0.05～1.0パーセント溶液として使用される。アジュバントは免疫原の免疫原性を増強するが、アジュバント自体は必ずしも免疫原性であるわけではない。アジュバントは、投与部位付近に免疫原を局所的に保持することによって作用し、免疫系細胞への免疫原の緩徐で持続的な放出を促進するデポとしての効果をもたらし得る。アジュバントはまた、免疫原デポに免疫系細胞を誘引し、そのような細胞を刺激して免疫応答を誘発し得る。したがって、諸実施形態は、アジュバントをさらに含む組成物を包含する。

【0306】

非経口免疫感作のためのアジュバントとしては、アルミニウム化合物（水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムおよびヒドロキシリン酸アルミニウム）が挙げられる。標準的プロトコルに従って、抗原をアルミニウム化合物とともに沈殿させる、またはアルミニウム化合物上に吸着させることができる。RIBI（Immunochem社、ハミルトン、モンタナ州）などのその他のアジュバントも非経口投与に使用することができる。

【0307】

粘膜免疫感作のためのアジュバントとしては、細菌毒素（例えば、コレラ毒素（CT）、大腸菌（E. coli）易熱性毒素（LT）、ディフィシル菌（Clostridium difficile）毒素Aおよび百日咳毒素（PT）またはその組合せ、サブユニット、トキシドもしくは変異体）が挙げられる。例えば、天然のコレラ毒素サブユニットB（CTB）の精製調製物が有用であり得る。上記のいずれかの毒素のフラグメント、ホモログ、誘導体および融合物も、アジュバント活性を保持している限り適切なものである。好ましくは、毒性が低下した変異体を使用する。適切な変異体については、（例えば、国際公開第95/17211号（Arg-7-Lys CT変異体）、国際公開第96/6627号（Arg-192-Gly LT変異体）および国際公開第95/34323号（Arg-9-LysおよびGlu-129-Gly PT変異体）に）既に記載されている。方法および組成物に使用し得る追加のLT変異体としては、例えば、Ser-63-Lys変異体、Ala-69-Gly変異体、Glu-110-Asp変異体およ

びG l u - 1 1 2 - A s p 変異体が挙げられる。その他のアジュバント（様々な供給源（例えば、大腸菌（E. c o l i）、サルモネラ・ミネソタ（S a l m o n e l l a m i n n e s o t a）、サルモネラ・チフィムリウム（S a l m o n e l l a t y p h i m u r i u m）もしくはシゲラ・フレックスネリ（S h i g e l l a f l e x n e r i））の細菌モノホスホリルリピドA（M P L A）、サポニンまたはポリラクチドグリコリド（P L G A）マイクロスフェアなど）も粘膜投与に使用することができる。

【0308】

その他のアジュバントとしては、インターロイキンなどのサイトカイン、例えばI L - 1、I L - 2およびI L - 1 2、ケモカイン、例えばC X C L 1 0およびC C L 5、マクロファージ刺激因子ならびに／あるいは腫瘍壊死因子が挙げられる。使用し得るその他のアジュバントとしては、C p Gオリゴヌクレオチド（D a v i s . C u r r T o p M i c r o b i o l I m m u n o l . , 2 4 7 : 1 7 1 - 1 8 3 , 2 0 0 0）が挙げられる。

10

【0309】

水中油型乳剤としては、スクアレン；ラッカセイ油；M F 5 9（国際公開第90／14387号）；S A F（S y n t e x L a b o r a t o r i e s社、パロアルト、カリフォルニア州）；およびR i b i（商標）（R i b i I m m u n o c h e m社、ハミルトン、モンタナ州）が挙げられる。水中油型乳剤は、免疫刺激物質、例えばムラミルペプチド（例えば、N - アセチルムラミル - L - スレオニル - D - イソグルタミン（t h r - M D P）、 - アセチル - ノルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン（n o r - M D P）、N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン - L - アラニン - 2 - （1' - 2' ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ヒドロキシホスホリルオキシ） - エチルアミン（M T P - P E）、N - アセチルグルクサミニル - N - アセチルムラミル - L - A l - D - イソグル - L - A l a - ジパルミトキシプロピルアミド（N - a c e t y l g l u c s a m i n y l - N - a c e t y l m u r a m y l - L - A l - D - i s o g l u - L - A l a - d i p a l m i t o x y p r o p y l a m i d e）（D T P - D P P）、t h e r a m i d e（商標））またはその他の細菌細胞壁成分とともに使用され得る。

20

【0310】

粘膜免疫感作および非経口免疫感作の両方に有用なアジュバントとしては、ポリホスファゼン（例えば、国際公開第95／2415号）、D C - c h o l（3b - （N - （N' , N' - ジメチルアミノメタン） - カルバモイル）コレステロール（例えば、米国特許第5, 283, 185号および国際公開第96／14831）号およびQ S - 2 1（例えば、国際公開第88／9336号）が挙げられる。

30

【0311】

アジュバントを免疫原と結合させて投与し得る。例えば、免疫原を含むペプチドの立体配座の変化が免疫原に対する免疫応答の性質に影響を及ぼさないように、パルミチン酸などの脂質を1つまたは複数のペプチドと直接結合させ得る。

【0312】

アジュバントは、単一組成物として免疫原と共に投与されてもよい。さらに、アジュバントは、免疫原の投与の前、投与中、または投与後に投与されてもよい。

40

【0313】

一実施形態では、組成物は本明細書に記載される抗体を含む。別の実施形態では、組成物は、本明細書に記載される抗体と希釈剤とを含む。一実施形態では、組成物は無菌組成物である。

【0314】

さらなる態様は、本明細書中記載される抗体およびA ベータ、任意にA ベータオリゴマーを含む抗体の複合体を含む。この複合体は、溶液中であってもよく、組織に含まれていてもよく、または任意にi n v i t r oにあってもよい。

【0315】

50

I V. キット

さらなる態様は、無菌バイアルなどのバイアルあるいはその他の筐体に入った本明細書に記載される i) 抗体および／またはその結合フラグメント、i i) 核酸、i i i) ペプチドまたは免疫原、i v) 組成物あるいは v) 組換え細胞と、任意選択で参照物質および／またはキットの使用のための説明書とを含む、キットに関する。

【0316】

一実施形態では、キットは、収集バイアル、標準緩衝液および検出試薬のうちの1つまたは複数のものをさらに含む。

【0317】

V. 方法

本明細書に記載される化合物、免疫原および抗体を作製および使用方法が含まれる。

【0318】

特に、GGVV（配列番号1）または関連エピトープの立体配座エピトープに特異的かつ／または選択的な抗体を作製する方法であって、対象、任意選択で非ヒト対象に本明細書に記載されるエピトープ配列を含み立体配座的に制約のある化合物、任意選択でGGVV（配列番号1）または関連エピトープを含む環状化合物を投与すること、環状化合物と特異的または選択的に結合し、任意選択で、i) 合成および／または天然のオリゴマーと特異的または選択的に結合し、かつ／あるいはin situ組織試料で老人斑との結合が全くもしくはほとんどみられない、または直鎖状化合物、任意に対応する直鎖状ペプチドとの結合が全くもしくはほとんどない、抗体産生細胞あるいは抗体を単離することを含む、方法が提供される。環状化合物は、例えば、本明細書に記載される環状化合物を含む、本明細書に記載されるいずれかの「エピトープ」を含み得る。

【0319】

一実施形態では、この方法は、例えば本明細書に記載される方法を用いて、モノクローナル抗体を作製するためのものである。

【0320】

一実施形態では、この方法は、例えば本明細書に記載される方法を用いて、ヒト化抗体を作製するためのものである。

【0321】

環状化合物を用いて作製する抗体は、本明細書および実施例に記載される通りに選択される。一実施形態では、この方法は、任意選択で本明細書に記載される方法を用いて、直鎖状ペプチドよりも環状ペプチドと特異的または選択的に結合し、エピトープ配列に特異的であり、オリゴマーと特異的に結合し、かつ／あるいはin situの斑および／または対応する直鎖状ペプチドと結合しない、またはほとんど結合しない抗体を単離することを含む。

【0322】

さらなる態様では、生体試料がAベータを含むかどうかを検出する方法であって、生体試料と本明細書に記載される抗体とを接触させることと、何らかの抗体複合体の存在を検出することとを含む、方法が提供される。一実施形態では、この方法は、生体試料が、残基GまたはVのうちの少なくとも1つが非オリゴマー立体配座のGおよび／またはVによって占められるものとは別の立体配座にある、Aベータを含むかどうかを検出するためのものである。一実施形態では、この方法は、生体試料がオリゴマーAベータを含むかどうかを検出するためのものである。

【0323】

一実施形態では、この方法は、

a. 抗体：Aベータオリゴマー複合体の形成が可能な条件下で、生体試料と、本明細書のAベータオリゴマーに特異的かつ／または選択的な本明細書に記載される抗体とを接触させること；および

b. 何らかの複合体の存在を検出すること

10

20

30

40

50

を含み、

検出可能な複合体の存在により、試料がAベータオリゴマーを含有し得ることが示される。

【0324】

一実施形態では、形成された複合体のレベルを、適切なIg対照または無関係な抗体などの被験抗体と比較する。

【0325】

一実施形態では、検出を定量化し、生成した複合体の量を測定する。測定は、例えば標準物質に対して相対的なものであり得る。

【0326】

一実施形態では、測定された量を対照と比較する。

【0327】

別の実施形態では、この方法は、

(a) 抗体-抗原複合体の生成が可能な条件下で、前記対象の生体試料と本明細書に記載される抗体とを接触させること；

(b) 被験試料中の抗体-抗原複合体の量を測定すること；および

(c) 被験試料中の抗体-抗原複合体の量と対照とを比較すること

を含み、

対照と比較して生体試料中に抗体-抗原複合体が検出されることにより、試料がAベータを含むことが示される。

【0328】

対照は、試料対照（例えば、ADを有さない対象または軽度、中等度もしくは進行型といった特定の型のADを有する対象に由来するもの）または対象のAベータオリゴマーレベルの変化をモニターするための同じ対象由来の以前の試料であり得る。

【0329】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体を使用する。

【0330】

一実施形態では、抗体は、GGVV（配列番号1）または関連立体配座エピトープを含むAベータの立体配座を特異的かつ／または選択的に認識し、生体試料中に抗体抗原複合体が検出されることにより、試料がAベータオリゴマーを含むことが示される。

【0331】

一実施形態では、試料は生体試料である。一実施形態では、試料は、脳組織もしくはその抽出物および／またはCSFを含む。一実施形態では、試料は、全血、血漿または血清を含む。一実施形態では、試料はヒト対象から採取されるものである。一実施形態では、対象は、ADが疑われる、ADのリスクがある、またはADを有する。

【0332】

本明細書に記載される抗体を用いてAベータ：抗体複合体を検出し、それにより生体試料中にGGVV（配列番号1）もしくは関連立体配座エピトープを含むAベータおよび／またはAベータオリゴマーが存在するかどうかを判定するには、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、ELISAおよび免疫沈降とそれに続くSDS-PAGEなどのイムノアッセイならびに免疫細胞化学を含めたいくつかの方法を用いることができる。

【0333】

実施例に記載されるように、表面プラズモン共鳴技術を用いて立体配座特異的結合を評価することができる。抗体を標識する、または複合体の抗体に特異的な検出可能に標識した二次抗体を用いる場合、その標識を検出することができる。一般に用いられる試薬としては、蛍光発光抗体およびHRP標識抗体が挙げられる。定量的方法では、発生したシグナルの量を標準物質または対照との比較により測定することができる。測定はまた、相対的なものであり得る。

【0334】

さらなる態様は、対象または組織中のAベータのレベルを測定する、またはそのような

10

20

30

40

50

A ベータを撮像する方法であって、任意選択で、測定または撮像する A ベータがオリゴマー A ベータである、方法を含む。一実施形態では、この方法は、A D を有するリスクがある、A D を有することが疑われる、または A D を有する対象に検出可能な標識とコンジュゲートした抗体を投与すること；および標識を検出すること、任意選択で標識を定量的に検出することを含む。標識は、一実施形態では、例えば P E T 撮像に使用することができる陽電子放出放射性核種である。

【0335】

さらなる態様は、対象に免疫応答を誘導する方法であって、対象に本明細書に記載される化合物、任意選択で、G G V V（配列番号 1）もしくは関連エピトープペプチド配列を含む環状化合物、免疫原および／または前記化合物もしくは前記免疫原を含む組成物を投与すること；ならびに任意選択で、投与した化合物または免疫原中の A ベータペプチドと特異的かつ／または選択的に結合する細胞および／または抗体を単離することを含む、方法を含む。一実施形態では、組成物は、薬学的に許容される希釈剤または担体と混合した化合物または免疫原を含む、医薬組成物である。

10

【0336】

一実施形態では、対象はげっ歯類などの非ヒト対象である。作製された抗体産生細胞は、一実施形態ではハイブリドーマ細胞系を作製するために使用する。

【0337】

一実施形態では、投与する免疫原は、図 7 C の化合物を含む。

【0338】

本明細書では、シクロ（C G G G V V G）（配列番号 2）に対して生じさせた抗体が、A ベータオリゴマーと特異的かつ／または選択的に結合し、A ベータ斑染色を示さないことが示される。リゴマー A ベータ種は、A D において毒性のある伝播性の種であると考えられる。さらに、図 1 9 に示されるように、シクロ（C G G G V V G）（配列番号 2）を用いて生じさせ、オリゴマーに特異的な抗体は、A ベータの凝集および A ベータオリゴマーの伝播を阻害した。したがって、A ベータオリゴマーの伝播を阻害する方法であって、有効量の本明細書に記載される A ベータオリゴマーに特異的かつ／または選択的な抗体を、A ベータを発現する細胞もしくは組織と接触させる、または必要とする対象に投与して、A ベータの凝集および／またはオリゴマーの伝播を阻害することを含む、方法も提供される。実施例 1 0 に記載されるように、i n v i t r o でアッセイをモニターすることができる。

20

30

【0339】

抗体はまた、A D および／またはその他の A ベータアミロイド関連疾患の治療に有用であり得る。例えば、レビー小体型認知症のバリエーションおよび封入体筋炎（筋肉疾患の 1 つ）では、A D と類似した斑がみられ、脳アミロイド血管症に關与する凝集体を A ベータが形成し得る。上記のように、シクロ（C G G G V V G）（配列番号 2）に対して生じさせた抗体は、A D の毒素原性の A ベータ種であると考えられるオリゴマー A ベータと結合し、毒素原性 A ベータオリゴマーの形成を阻害する。

【0340】

したがって、さらなる態様は、A D および／またはその他の A ベータアミロイド関連疾患を治療する方法であって、必要とする対象に i）有効量の本明細書に記載される抗体、任意選択で、前記抗体を含む A ベータオリゴマーに特異的かつ／もしくは選択的な抗体もしくは医薬組成物を投与すること；あるいは 2）必要とする対象に G G V V（配列番号 1）もしくは関連エピトープ配列を含む単離環状化合物、免疫原または前記環状化合物を含む医薬組成物を投与することを含む、方法である。

40

【0341】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体を用いて、治療する対象由来の生体試料を A ベータの有無またはレベルに関して評価する。一実施形態では、検出可能な A ベータレベル（例えば、i n v i t r o で測定される、または撮像により測定される A ベータ抗体複合体）を有する対象を抗体で治療する。

50

【0342】

抗体および免疫原を例えば、本明細書に記載される医薬組成物に含ませ、例えば小胞に製剤化して送達を改善することができる。

【0343】

1つまたは複数の、本明細書中に記載される標的化する抗体、たとえば環状化合物中に提示されているGGVV（配列番号1）を標的とする1つまたは複数の抗体および／または関連抗体を組み合わせて投与することができる。さらに、本明細書に開示される抗体をベータセクレターゼ阻害剤またはコリンエステラーゼ阻害剤などの1つまたは複数の他の治療剤とともに投与することができる。

【0344】

一実施形態では、抗体は、任意選択でAベータオリゴマーと特異的または選択的に結合する、立体配座特異的／選択的抗体である。

【0345】

また、ADを標的とする組成物、抗体、単離ペプチド、免疫原および核酸の使用が提供される。

【0346】

本明細書に記載される組成物、化合物、抗体、単離ペプチド、免疫原および核酸、ベクターなどを、例えば、非経口投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、頭蓋内投与、脳室内投与、髄腔内投与、眼窩内、点眼、脊髄内投与、槽内投与、腹腔内投与、鼻腔内投与、エアゾール投与または経口投与により投与することができる。

【0347】

ある特定の実施形態では、医薬組成物を全身投与する。

【0348】

他の実施形態では、医薬組成物を脳またはCNSの他の部分に直接投与する。例えば、このような方法は、埋込み型カテーテルおよびポンプの使用を含み、これらはカテーテルを通して注入部位に所定用量を放出するものである。当業者であればさらに、理解されよう。カテーテルは、それを可視化して脳内の所望の投与部位または注入部位に隣接する位置に配置することが可能な外科技術により埋め込まれ得る。このような技術は、参照により本明細書に組み込まれるElsberryらの米国特許第5,814,014号「Techniques of Treating Neurodegenerative Disorders by Brain Infusion」に記載されている。また、米国特許出願公開第20060129126号（KaplitおよびDuring, 「Infusion device and method for infusing material into the brain of a patient」）に記載されているもの方法などの方法が企図される。脳およびCNSの他の部分に薬物を送達する装置が市販されている（例えば、SynchroMed（登録商標）EL Infusion System; Medtronic社、ミネアポリス、ミネソタ州）。

【0349】

別の実施形態では、血液脳関門を通過する受容体介在型輸送が可能になるよう投与する化合物を修飾するなどの方法を用いて、医薬組成物を脳に投与する。

【0350】

他の実施形態では、本明細書に記載される組成物、化合物、抗体、単離ペプチド、免疫原および核酸と、血液脳関門を通過する輸送を促進することが知られている生物学的に活性な分子との共投与が企図される。

【0351】

また、ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物、化合物、抗体、単離ペプチド、免疫原および核酸を血液脳関門を通過させて投与する方法、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7012061号「Method for increasing the permeability of the blood brain barrier」に記載されている、血液脳関門の透過性を一時的に増大させるこ

10

20

30

40

50

とを目的とする方法などが企図される。

【0352】

当業者には、本明細書に記載される組成物、化合物、抗体、単離ペプチド、免疫原および核酸を脳に直接投与する、または血液脳関門を通過させて投与するのに適切な様々な方法が理解され、本明細書に記載される製品を安全に投与するためにこれらの方法を修正することが可能であろう。

【0353】

上の開示は本願を全体的に説明するものである。以下の具体例を参照することにより、さらに十全な理解することができる。これらの例は単に説明を目的として記載されるものであって、本願の範囲を限定することを意図するものではない。状況によって好都合であることが示唆される、または好都合である場合、形態の変更および均等物による置換が企図される。本明細書では特定の用語が使用されているが、このような用語は説明的な意味を意図するものであって、限定を目的とするものではない。

【0354】

以下の非限定的な例は本開示を例示するものである。

【0355】

(実施例)

実施例 1

集団座標予測

ミスフォールドされたエピトープを予測する方法は、2015年11月9日に出願され参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第62/253044号、「Systems and methods for predicting misfolded protein epitopes by collective coordinate biasing」に記載されている「集団座標バイアス」によって得られる。そこに記載されているように、この方法は、あるタンパク質（またはペプチド凝集体）にグローバル座標のバイアスをかけて、そのタンパク質（またはペプチド凝集体）をミスフォールドさせた後、部分的に構造化されていないタンパク質（またはペプチド凝集体）のフォールドされない可能性が最も高いアンフォールド領域を予測する、分子動力学に基づくシミュレーションを用いるものである。バイアスシミュレーションを実施し、各残基インデックスに対応する（検討するタンパク質の初期構造のものと比較した）溶媒接触表面積（SASA）。SASAはH₂Oが接触可能な表面積を表す。SASAの（検討するタンパク質の初期構造のものと比較した）正の変化は、関連する残基インデックスの領域におけるアンフォールドを示すと考え得る。この方法を、単鎖、ならびにそれぞれが独自の形態を有する3種類のAベータ株、すなわち、3回対称性構造（またはモノマー）（PDBエントリー2M4J）のAβ-40ペプチド、2回対称性構造（PDBエントリー2LMN）のAβ-40モノマーおよび一本鎖平行in-register（例えば、一本の鎖の残基が近接する鎖の同じ残基と相互作用するベータシートが反復したもの）構造（PDBエントリー2MXU）のAβ-42モノマーに適用した。

【0356】

米国特許出願第62/253044号に記載されている集団座標法ならびにK. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. VorobyovおよびA. D. Mackerell. Charmm general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the charmm all-atom additive biological force fields. Journal of Computational Chemistry, 31(4): 671-690, 2010; ならびにP. Bjelkmar, P. Larsson, M. A. Cuendet, B. HessおよびE. Lindahl. Implementation of the CHARMM force field in GRO

MACS: analysis of protein stability effects from correlation maps, virtual interaction sites, and water models. J. Chem. Theo. Comp., 6:459-466, 2010に記載されているCHARMM力場パラメータ（ともに参照により本明細書に組み込まれる）をTIP3P水とともに用いて、各初期構造に対するシミュレーションを実施した。

【0357】

この方法を用いて予測されたエピトープを実施例2に記載する。

【0358】

Aベータオリゴマー特異的エピトープを予測するためのG⁻oモデルの方法

10

第2のエピトープ予測モデルは、天然の状態からの部分的なタンパク質のアンフォールディングの自由エネルギー地形に基づくものである。この天然の状態は、実験に由来する線維構造に引き継がれている。タンパク質が、所定の量の一次配列だけ、天然の状態から部分的にアンフォールディングされている場合、エピトープ候補は、不規則に対する最小の自由エネルギーを消費する連続した配列のセグメントである。所定のタンパク質の立体配座の自由エネルギーは、折りたたまれていない状態を好む立体配座のエントロピーおよび極性官能基の溶媒和、ならびに天然の状態をエンタルピー的に安定させる静電作用およびファンデルワールス相互作用-タンパク質相互作用の損失を含む、いくつかの寄与から生じる。

【0359】

20

A. 部分的アンフォールドタンパク質の地形のG⁻o様モデル

アンフォールディング中に行われる自由エネルギーの変化を考慮する近似モデルは、固定したエネルギーを天然の状態におけるすべての接触に割り当て、ここでの接触は、固定したカットオフ距離 $r_{cut\ off}$ の中の1対の重（非水素）原子として定義されている。G⁻o様モデルは、以前のタンパク質のフォールディングの試験でうまく行われた。G⁻o様モデルは、天然のタンパク質の相互作用のトポロジーから生じる効果を分離しており、実際にアンフォールディングされている自由エネルギー地形は、単一の天然の状態の構造から容易に計算することができる。

【0360】

あるセグメントをアンフォールディングする総自由エネルギー消費は、アンフォールディングされた領域の立体配座のエントロピーの観点と合わせて、妨害される相互作用の数に依拠している。

30

【0361】

以下の式では、小文字の変数は原子を表し、大文字の変数は残基を表す。Tは、タンパク質中のすべての残基のセットとし、Uは、タンパク質中のアンフォールディングされている残基のセットとし、Fを、タンパク質中でフォールディングされている残基のサブセットとする（よって（ $T=U \cup F$ ））。本来度合が高いアンフォールディングの機構は、複数の不規則な残基の連続した鎖からなる。ここで単一の連続したアンフォールディングされた鎖の近似値を採用し、この連続した鎖を不規則化するための自由エネルギー消費を計算した。

40

【0362】

残基Uのセットをアンフォールディングするための総自由エネルギーの変化

【数1】

$$\Delta F_{G^o}(U)$$

は、

【数 2】

$$\Delta F_{G\bar{0}}(U) = \Delta E_{G\bar{0}}(U) - T\Delta S_{G\bar{0}}(U) \quad (1)$$

である。

【0 3 6 3】

アンフォールディングのエンタルピーの関数

【数 3】

$$\Delta E_{G\bar{0}}(U)$$

10

は、U 残基のセットのアンフォールディングにより妨害される相互作用の数により得られる。

【数 4】

$$\Delta E_{G\bar{0}}(\mathcal{U}) = \alpha \sum_{\substack{i>j \\ \text{Atoms } i \in \mathcal{T}, j \in \mathcal{U}}} \Theta(r_{\text{cutoff}} - |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|) \quad (2)$$

【0 3 6 4】

20

式 2 では、i, j の合計は、アンフォールディングされた領域中の 1 つまたは両方の原子のいずれかを有するすべての固有の重原子対に関するものであり、 $\mathbf{r}_i$ および $\mathbf{r}_j$ は、原子 i および j の座標である。 r_{cutoff} (4.8 Å とされる) は、相互作用の距離のカットオフである。

【数 5】

$$\Theta(x)$$

は、x が正である場合、

30

【数 6】

$$\Theta(x) = 1$$

、その他の場合は 0 により定義されているヘヴィサイド関数である。接触あたりのエネルギーは、室温でタンパク質を完全にアンフォールディングする際の、全体の実験的な安定性

【数 7】

$$\Delta F_{Exp}(U)|_{U=T}$$

40

をまとめるために選択されてもよい。

【数 8】

$$\alpha = \frac{\Delta F_{Exp}(\mathcal{U})|_{\mathcal{U}=\mathcal{T}} + T\Delta S_{G\bar{0}}(\mathcal{U})|_{\mathcal{U}=\mathcal{T}}}{\sum_{i,j \in \mathcal{N}}^{i>j} \Theta(r_{\text{cutoff}} - |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|)} \quad (3)$$

50

【0365】

結果はこの値に依存するものではなく；単にこの問題の一般的なエネルギー尺度全体を設定している。このモデルでは、この自由エネルギーを、 4.6 kcal/mol に相当する定数とした。この値は、エピソード予測の方法で不規則であると考えられている同一のタンパク質の異なる領域に関する相対的な自由エネルギーの消費であるため、一番の関心ごとではない。

【0366】

アンフォールディングのエントロピー用語

【数9】

10

$$\Delta S_{G0}(U)$$

の計算が、以下のBに論述されている。

【0367】

B. エントロピーの計算

アンフォールディングされた状態のタンパク質と接触可能なマイクロ状態の数は、天然の状態と接触可能な数よりもかなり多いため、アンフォールディングに関する立体配座のエントロピーの好都合な増分が存在する。アンフォールディングされた領域の残基Kすべてを合計することによりアンフォールディングセグメントUの総エントロピーが計算される。

20

【数10】

$$\Delta S_{G0}(\mathcal{U}) = \sum_{K \in \mathcal{U}} (\Delta S_{bb,K} - (1 - \frac{A_{\mathcal{U},K}}{A_{\mathcal{U},K}}) \Delta S_{bu \rightarrow ex,K} + \Delta S_{ex \rightarrow sol,K}) \quad (4)$$

式中、

【数11】

$$\Delta S_{bb,K}, \Delta S_{bu \rightarrow ex,K}, \Delta S_{ex \rightarrow sol,K}$$

30

は、参考文献[3]に列挙されている残基Kの3つの立体配座のエントロピー構成要素であり、

【数12】

$$\Delta S_{bb,K}$$

は、天然の状態からアンフォールディングされた状態までの主鎖のエントロピーの変化であり、

40

【数13】

$$\Delta S_{bu \rightarrow ex,K}$$

は、タンパク質中に埋もれた側鎖からタンパク質の表面までのエントロピーの変化であり、

【数 1 4】

$$\Delta S_{ex \rightarrow sol, K}$$

は、表面から溶液までの側鎖に関して得られたエントロピーである。

【0 3 6 8】

単一の配列の近似では、部分的にアンフォールディングされた鎖のエンドポイントは、天然の構造ではこれら位置で固定されているため、補正をアンフォールディングされた状態の立体配座のエントロピーに適用する。これは、完全にアンフォールディングされた状態には存在しない、部分的にアンフォールディングされた構造における末端を拘束するために対となっているループエントロピーのペナルティが存在することを意味する。 10

【数 1 5】

$$\Delta S_{return} = -k_B \ln(f_w(R|N)\Delta\tau). \quad (5)$$

【0 3 6 9】

ここで、

【数 1 6】

20

$$f_w(R|N)\Delta\tau$$

は、確率を計算することにより、理想的なランダムウォークが、ランダムウォークの間にタンパク質に浸透が戻ることなく、Nステップの後に位置Rを中心とした体積 ΔT のボックスに戻ることが見いだされる。約 $n = 20$ の残基より短い長さの鎖では、溶けた鎖の大きさは、タンパク質の直径よりもずっと小さく、タンパク質の立体上の排除された体積が、入り込めない面として良好に処理されている。溶けた鎖の重合状態の数は、タンパク質の表面上の起点から、溶けたポリマーが入り込めない面に接触または当該面を通ることなくタンパク質に再度戻る場所まで移動するランダムウォークの割合により乗算されなければならない。上記の状態の割合は、以下の形態 30

【数 1 7】

$$f_w(R|N) = \frac{a}{N^{5/2}} \exp\left(-\frac{3R^2}{2Nl^2} - \frac{N^2 V_c}{2R^3}\right) \quad (6)$$

によって書くことができる。式中、Rは、出口と入口の場所の間の末端から末端の距離であり、Nは溶けた領域の残基の数であり、a、I、 V_c は、アンフォールディングされたポリペプチドのシミュレーションに適合することにより決定されたパラメータである。パラメータIは、2つの $C\alpha$ 原子の間の有効なアーク長であり、 V_c は、各残基に関する平均排除体積である。シミュレーションの結果に式6を適合することにより、パラメータの値、 $a = 0.0217$ 、 $I = 4.867$ 、 $V_c = 3.291$ を得る。エントロピーのペナルティは一般的なものであり、配列とは無関係である。 40

【0 3 7 0】

ジスルフィド結合は、アンフォールディングされたセグメントの動きをさらに制限するため、ループエントロピーの観点でさらに考慮することが必要である。存在する場合、ジスルフィドは、ループが通過しなければならない追加的なノードとして処理され、実際には、完全なループを2つの小さなループに分割し、両方に上述の境界条件を課す。

【0 3 7 1】

C. 自由エネルギー地形からのエピトープの予測

50

タンパク質を部分的にアンフォールディングする自由エネルギー地形を得た後、可変エネルギーの閾値 E_{th} を適用し、閾値より小さな自由エネルギーの消費を伴い、3つ未満のアミノ酸を含むセグメントを、エピトープの候補として予測する。この予測は、閾値 E_{th} の変動に関して安定している。

【0372】

この方法を使用して予測したエピトープは実施例2に記載されている。

【0373】

実施例2

【0374】

I. 立体配座特異的エピトープ

本開示は、プリオン様の伝搬およびシナプス小胞との干渉がアルツハイマー病 (AD) で起こるシナプスの機能不全および認知低下の原因であると考えられているミスフォールドされたタンパク質種である、オリゴマーの $A\beta$ ペプチド、特に是有毒のある $A\beta$ ペプチドのオリゴマーに選択性があり得る抗体に関するものである。 $A\beta$ は、ガンマセクレターゼによるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の切断により生じる長さ36~43アミノ酸のペプチドである。AD患者では、モノマー、線維および不溶性オリゴマーで存在する。 $A\beta$ 線維はAD患者の脳にみられるアミロイド斑の主成分である。

【0375】

モノマー型では、 $A\beta$ は非構造化ポリペプチド鎖として存在する。線維型では、 $A\beta$ は異なる形態に凝集することができ、これらは多くの場合、株と呼ばれる。上記の構造のうちいくつかのものは固体NMRにより決定されたものであり、一部の線維構造は *in vitro* 試験で得られたものであり、それ以外は、AD患者から採取したアミロイド斑を用いて線維を播種することにより得られたものである。

【0376】

オリゴマーは、毒性のある伝播性のペプチド種であり、モノマーの $A\beta$ をオリゴマー、最終的には線維へと動員し変換することが示唆されている。

【0377】

オリゴマー特異的抗体を作製するための必要条件の1つが、モノマーまたは線維には存在しない $A\beta$ ペプチド上の標的の特定である。これらのオリゴマー特異的エピトープは、モノマーまたは線維の対応するセグメントと一次配列が異なるわけではないが、オリゴマーにおいて立体配座が異なるものとなる。つまり、これらは、モノマーにも線維にも存在しない独特の立体配座でオリゴマー中に存在することになる。

【0378】

これまでにオリゴマーの構造は決定されておらず、さらに、NMRの証拠から、オリゴマーが単一の明確に定められた構造ではなく、規則性に乏しく立体配座的に可塑性で順応性のある構造アンサンブルの形で存在することが示されている。さらに、オリゴマー種の濃度はモノマーまたは線維のものよりもはるかに低い (推定値には幅があるが、約100分の1またはそれ以下である) ため、この標的は捉えどころのないものとなっている。

【0379】

一次配列 (例えば、直鎖状配列) の連続する鎖または線維構造に対する抗体は、その効果を制限する問題点をいくつか抱え得る。直鎖状ペプチド領域に対して生じさせた抗体は、オリゴマーに対して選択的ではない傾向があり、このため、モノマーとも結合する。モノマーの濃度は実質的にオリゴマーの濃度より高いため、そのような抗体治療剤は「標的に対する注意散漫」という問題を抱えることがあり、オリゴマー種を選択的に標的とし除去するのではなく、むしろ主としてモノマーと結合し、機能的 $A\beta$ の除去を促進する。アミロイド封入体に対して生じさせた抗体は主として線維と結合し、その結果、血管原性浮腫および/または微小出血を表すと考えられるシグナル変化を含めたアミロイド関連画像異常 (ARIA) が生じた。

【0380】

オリゴマー型の $A\beta$ に選択的な抗体を開発するため、線維内で破壊され得る領域を特定

10

20

30

40

50

した。理論に拘束されるのを望むわけではないが、線維における破壊がオリゴマーの表面にも露出するのではないかという仮説を立てた。しかし、オリゴマー上では、これらの配列領域は、モノマーおよび／または線維のものとは異なる立体配座で露出し得る。例えば、表面にあるとき、それらは線維またはモノマー（たとえば直鎖状ペプチド）にみられる対応する量より曲率が高く、露出表面積が大きく、それとは異なる二面角分布を示し、かつ／または、異なる、構造上のアライメントにより決定される全体的な立体配座の幾何学を有するターン領域の形で露出し得る。

【0381】

G G V V（配列番号1）を含む環状化合物を本明細書に記載し、図7のパネルCに示す。この環状化合物は、上記の基準を1つまたは複数満たすよう設計したものである。

10

【0382】

線維内の破壊されやすい領域を特定することの潜在的有益性の1つは、それにより線維がモノマーからオリゴマーの核を形成する触媒基質としての役割を果たし得る二次的な核形成過程に関与する領域が特定され得ることである[3]。側鎖が露出した線維の領域の方が付近のモノマーとの異常な相互作用に関与してモノマーの付着を促進する可能性が高いと思われ、次いで、このように付着したモノマーは、線維の表面またはその付近で効率的に増大する濃度という環境に曝され、それによりオリゴマーを含めた多量体凝集体を形成する可能性が高くなるものと思われる。Aβの露出領域を有する加齢線維または損傷線維は毒性オリゴマーの産生を増大させ得るものであり、線維上のこれらの不規則な領域に対する抗体は、このような伝播機序を阻止するのに効果的であるものと思われる。

20

【0383】

I I . 集団座標予測および P r o m i s G - o の予測

エピトープ G G V V（配列番号1）は実施例1に記載した集団座標および P r o m i s G - o の手法から予測される 2 M X U 株由来のエピトープとして現れる。この予測されたエピトープを示す対応する図面は図1にある。パネルAでは、グラフは左で、部分的に不規則な線維から生じたエピトープ予測を表し、右でグラフは、2つのエンドキャッピングモノマーが位置的に制限されている場合に部分的に不規則な線維から生じさせたエピトープ予測を表す。G G V V（配列番号1）エピトープは、P D B 構造 2 M X U の予測として現れる。線維構造 2 M X U では、左および右から G G V V（配列番号1）を挟んでいる2つの配列 3 7 - 4 1 G G V V I（配列番号8）および 3 6 - 4 0 V G G V V（配列番号6）が、集団座標を使用して予測されている（それぞれで、エンドキャップは制限されておらず、かつ制限されている）。

30

【0384】

G G V V（配列番号1）の残基 3 7 ~ 4 0 が、2つの予測から現れ、よって、これら2つの予測の間をコンセンサス配列として処理する。P r o m i s G - o 法は、P D B の 2 M X U の鎖 A および L（エンドキャップ鎖）に特異的な配列 G G V V I A（配列番号15）を含む Aβ のアミノ酸 3 7 ~ 4 2 からなるエピトープを予測する。鎖 B、C、D、E、F、G、H、I、J、および K では、エピトープ G G V V（配列番号1）は、2 M X U 構造を制限していないエンドキャップを使用して予測されている。

40

【0385】

I I I . 環状ペプチドの曲率

繊維 2 X M U の曲率のプロファイルに加えて、環状ペプチドおよび直鎖状ペプチド C G G G V V G（配列番号2）の曲率プロファイルが、図2に示されている。グリシン残基 G 3 7 および G 3 8 は、直鎖状ペプチドとは異なる曲率を有するが、線維と類似の曲率を有する。環状ペプチドにおいて、バリン残基 V 3 9 は、直鎖状ペプチドまたは線維の V 3 9 と比較して有意に大きな曲率を有する。環状ペプチドにおけるバリン残基 V 4 0 は、直鎖状ペプチドまたは線維とは異なる曲率を有し、ここでの曲率は、直鎖状ペプチドと線維との間の中間である。

【0386】

図2Aは、異なる平衡シミュレーション時間から得た直鎖状 C G G G V V G（配列番号

50

2) の曲率をプロットしている。説明文は、10 ns から開始し、30 ns、50 ns、70 ns、または90 ns まで続行する。シミュレーション時間が増加すると、曲率の値は、上記および表 1 に報告された値に収束する。環状ペプチドに関する同様の試験が図 2 B に示されており、線維に関しては図 2 C に示されている。パネル D、E、および F は、それぞれ、直鎖状、環状、および線維の立体配座に関するシミュレーション時間の関数としての曲率の合計の収束を示している。収束の度合いは、エラーバーが、環状ペプチドで 0.016 ラジアン、直鎖状ペプチドで 0.05 ラジアン、および線維で 0.01 ラジアンであることを示している。曲率の値が、直鎖状アンサンブルおよび環状アンサンブルの両方で、70 ns 後に収束したことが観察された。CGGGVV G (配列番号 2) の残基インデックスの関数としての平均曲率が、パネル G に示されており、ここで直鎖状ペプチドが実線の濃灰色で、環状ペプチドが実線の淡灰色で、線維が破線で示されている。残基 37 G、38 G、39 V、および 40 V の曲率の数値が表 1 に提供されている。直鎖状配列および環状配列の曲率の値は線維の曲率の値の範囲内ではあるが、直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドの両方の曲率は、GGVV (配列番号 1) に関して全体的に、線維のこれら残基の曲率よりも大きい。

10

【0387】

ペプチドのすべての残基の曲率の値が、個々の平衡アンサンブルにわたる平均化の後に得られる。パネル A、B、または C の直鎖状、環状、または線維の 2MXU のプロットのポイント (x, y) は、GGVV (配列番号 1) の天然の残基 37~40 の曲率に対応する；パネル A および B におけるこの範囲外の残基、すなわち、パネル A の 36、およびパネル B の 35、36、および 41 は、それぞれ、直鎖状構築物および環状構築物に存在する天然ではない残基に対応する。10 ns から、増加していく時間 35 ns、50 ns、70 ns、および 90 ns まで、アンサンブルを平均化することにより、収束が示される。

20

【0388】

図 1~10 のプロットに関しては、Charmm27 force field を用いる陽溶媒 (TIP3P) での平衡シミュレーションからデータを得る。各アンサンブルのシミュレーション時間および立体配置数は以下の通りである。環状ペプチドアンサンブル：シミュレーション時間 100 ナノ秒、20000 のフレームを含む；直鎖状ペプチドアンサンブル：シミュレーション時間 100 ナノ秒、20000 のフレームを含む；2M4J アンサンブル：20 ナノ秒、12000 のフレームを含む。

30

【0389】

環状エピトープの曲率は直鎖状ペプチドまたは線維とプロファイルが異なるため、これらの残基を含むオリゴマー上のアミノ酸の対応する伸縮振動は線維またはモノマーのものとは異なる主鎖配向を有するのではなないかと予想される。しかし、曲率の大きさは非物理学的なものであると思われ、環状ペプチドを特徴付ける曲率の数値は線維のいくつかの位置で得られる。

【0390】

図 2 に基づき、残基 37 G、38 G、39 V、および 40 V の曲率の値を、直鎖状ペプチド、環状ペプチド、および線維 (2MXU) ペプチドに関して表 1 に示す。

40

【表 4】

表 1. 残基による曲率の値

	直鎖状	環状	2MXU
37G	1.33	1.21	1.15
38G	1.37	0.88	0.88
39V	1.34	1.53	0.94
40V	1.36	1.26	1.05

10

【0391】

I V. 二面角分布

オリゴマー選択的エピトープを特定するためのさらなるコンピュータ支援が、オリゴマー内の露出エピトープの代わりである環状ペプチドの側鎖二面角分布ならびに主鎖二面角のラムチャンドラン ϕ および ψ 分布の両方によって得られ、これらの分布は、いくつかの角について線維またはモノマーの対応する分布とは実質的に異なる。

【0392】

残基 38G および 40V の側鎖二面分布および主鎖二面分布を検討した。38G で示される二面角は環状形態と他の形態との間で区別があるが、大部分の二面角は、環状形態と他の形態との間で重複を示した。分布のパーセント重複、たとえば分布「環状」における「直鎖状」は、5 度のエレメントに角度を分割し、次いで環状分布の 90% がカットオフを超え、10% がカットオフ未満を維持するまで、無限の数量から確率振幅のカットオフを減少させることにより、得られる。これは、許容可能な角度における 1 つまたは複数の領域を定義する。次に、この領域の中の直鎖状の分布のパーセントを見出した。この手法は逆数ではなく、一般的に、分布対の間では異なる数を提供する（たとえば直鎖状／環状の 40V: $O-C-C_{\alpha}-C_{\beta}$ では 50.9% および 76.7%）。

20

【0393】

環状ペプチドの 38G に関する $O-C-C_{\alpha}-H A 1$ および $O-C-C_{\alpha}-H A 2$ の二面角の分布は、直鎖状または線維とは異なっている。環状ペプチドの $O-C-C_{\alpha}-N$ の二面角の分布は、直鎖状ペプチドと類似しているが、線維のものとは異なっている。3 つすべての形態での $O-C-C_{\alpha}-C_{\beta}$ の二面角の分布は類似している（図 3）。以下の説明および図面では、 $C A$ 、 $C a$ 、または C_{α} は、 C アルファ原子を説明するために互換可能に使用されており、このことは $C B$ 、 $C b$ 、および C_{β} などに関しても同様である。

30

【0394】

38G および 40V に関する二面角分布を図 3 に示す。38G の二面角に関して、直鎖状ペプチドが、環状ペプチドの二面角のほぼ全体（90%）の範囲内にある二面角を占める確率は以下の通りである：

$C-C A-C B-H A 1$: 4.4%

$N-C A-C B-H A 2$: 35.8%

$O-C-C A-N$: 17.4%。

40

【0395】

40V の二面角に関して、直鎖状ペプチドが、環状ペプチドの二面角のほぼ全体（90%）の範囲内にある二面角を占める確率は以下の通りである：

$O-C-C A-C B$: 50.9%。

【0396】

個々の二面角における比較的小さな差異の集積が、以下の実施例 V I I I でさらに説明されているように、ペプチドの全体的な立体配座に大きく有意な差異をもたらし得ることに留意されたい。

50

【0397】

38Gの二面角に関して、線維におけるペプチドが、環状ペプチドの二面角のほぼ全体（90％）の範囲内にある二面角を占める確率は以下の通りである：

C-C A-C B-H A 1：2.6％

N-C A-C B-H A 2：1.1％

O-C-C A-N：52.0％。

【0398】

40Vの二面角に関して、線維におけるペプチドが、環状ペプチドの二面角のほぼ全体（90％）の範囲内にある二面角を占める確率は以下の通りである：

O-C-C A-C B：98.6％。

【0399】

図3に基づき、表2は、直鎖状、環状、および線維（2MXU）の形態における残基38Gおよび40Vの主鎖および側鎖の角度の、互いと比較した二面角分布のパーセント重複を示している。

【表5】

表2. 二面角分布のパーセント重複

	環状における 直鎖状	環状における 2MXU	直鎖状におけ る環状	直鎖状におけ る2MXU	2MXUにお ける直鎖状	2MXUにお ける環状
38G:O-C- CA-HA1	4.4%	2.6%	8.5%	45.3%	13.5%	5.1%
38G:O-C- CA-HA2	35.8%	1.1%	38.2%	44.6%	12.3%	0.1%
38G:O-C- CA-N	17.4%	52%	74.8%	37.3%	12.5%	53%
40V: O-C- CA-CB	50.9%	98.6%	76.7%	85.5%	16.4%	58.3%

【0400】

上の側鎖二面角分布および主鎖二面角分布の解析によれば、残基38Gが直鎖状ペプチドおよび線維のアンサンブルとの相違が最も大きい残基である。これらの方法により、38Gは、立体配座選択性を付与するエピトープ上の重要な残基であり得る。残基40Vはこれよりも小さな差異を示しているが、立体配座選択性の付与を支援し得る。

【0401】

図3に示されるデータに基づき、環状ペプチド種とそれ以外の種との間に分布の有意差がみられる二面角について二面角分布のピーク値を表3に挙げる。表3の列1は、検討した具体的な二面角であり、列2は、直鎖状ペプチドCGGGVVG（配列番号2）におけるその角の二面角分布のピーク値であり、列3は、環状ペプチドCGGGVVG（配列番号2）におけるその角の二面角分布のピーク値であり、列4は、直鎖状ペプチドと環状ペプチドの二面角分布のピーク値の差であり、列5は、線維構造2MXUにおけるペプチドGGVV（配列番号1）の二面角分布のピーク値である。

【0402】

【表6】

表3：二面角分布のピーク値

二面角	直鎖状	環状	2MXU	環状-直鎖状
38G:O-C-CA-HA1	62.5	122.5	-147.5	60
38G:O-C-CA-HA2	-57.5	-112.5	87.5	-55
38G:O-C-CA-N	180	7.5	-32.5	-172.5
40V: O-C-CA-CB	72.5, -72.5	57.5, -102.5	67.5	-15,-30

【0403】

V. 側鎖のエントロピー

残基の側鎖のエントロピーは、
【数 18】

$$S/k_B = - \sum_i \int d\phi_i p(\phi_i) \ln p(\phi_i)$$

から概算され得る。

式中、総和は特定の残基の側鎖の全二面角であり、 $p(\phi_i)$ は上で解析した二面角分布である。

【0404】

側鎖の残基部分のエントロピーの詳細な分析

37G、38G、39V、および40Vのそれぞれの二面角のエントロピーを検討した。各残基の二面角のエントロピーを図4のパネルA～Dにプロットする。39Vおよび40Vのいくつかの二面角のエントロピーが直鎖状の形態と比較して減少しており、このことは、直鎖状の形態、おそらくはモノマーとは異なる傾向がある立体配座においてそれらの角のポーズが制約されることを示している。パネルEは、線維のエントロピーと比較した、残基G37、G38、V39、およびV40に関する総側鎖エントロピー（主鎖のラマチャンドラン角を含まない）をプロットしており、たとえば環状ペプチドの ΔS は $S(\text{cyclic}) - S(\text{fibril})$ である。このことは、エントロピーが、環状ペプチドおよび直鎖状ペプチドに関しては、線維と比較して増大しているが、環状ペプチドは直鎖状ペプチドよりも少ないエントロピーを有することを示している。パネルFは、線維のエントロピーと比較した、残基G37、G38、V39、およびV40に関する側鎖＋主鎖の総エントロピーをプロットしている。これは、先と同様にエントロピーが線維と比較して増大しているが、環状ペプチドが直鎖状ペプチドよりも少ないエントロピーを有し、よってより強力に拘束されていることを示している。また、パネルGは、直鎖状モノマーのエントロピーと比較した、残基G37、G38、V39、およびV40に関する立体配座の総エントロピーを再度プロットしている。このことは、環状ペプチドに存在する立体配座が、直鎖状ペプチドにおいて相対的に希少であり、よって、偶然にサンプリングされる可能性が低いであろうことを示している。このような拘束された一連の立体配座である確率は、およそ $\exp(-AS) \approx 0.001$ である。線維の立体配座である確率は、同時に起こるエントロピーの損失をエンタルピー的に補完することにより、高められる。

【0405】

VI. ラマチャンドラン角

エピトープが抗体に対して露出する主鎖配向は、ペプチドが直鎖状型であるか、環状型であるか、または繊維型であるかによって異なる。この相違は、直鎖ペプチドおよび環状ペプチドの両方の残基38Gについて、主鎖に沿ってラマチャンドラン角 ϕ および ψ （または Φ および Ψ ）をプロットすることにより定量化することができる。配列CGGVG（配列番号2）よりなる直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドの両方ならびに線維構造2MXUにおけるGGVV（配列番号1）の残基38Gについて平衡シミュレーションでサンプリングした ϕ 角および ψ 角を図5にプロットする。図5から、環状ペプチドの主鎖二面角分布は、直鎖状ペプチドについてサンプリングした二面角の分布と異なり、線維構造2MXUにおける残基GGVV（配列番号1）の主鎖の角度とはより類似していることが、観察できる。

【0406】

環状の形態のラマチャンドラン角と90%重複する直鎖状の形態の残基38Gのラマチャンドラン角の確率は16%である。環状の形態のラマチャンドラン角と90%重複する線維形態の残基38Gのラマチャンドラン角の確率は43%である。環状ペプチドのラマチャンドラン角分布が繊維状形態のものと類似している可能性がより大きい。表4を参照されたい。

【表 7】

表 4. 38G のラマチャンドラン角に関する重複の確率

	環状における直鎖状	環状における 2MXU	直鎖状における環状	直鎖状における 2MXU	2MXU における直鎖状	2MXU における環状
38G	16%	43%	39%	41%	13%	42%

【0407】

具体例として、残基 38G に関して、表 5 は、図 5 にプロットされているラマチャンドラン Φ 、 Ψ 角のピーク（最も可能性のある）値を提供する。環状ペプチドの分布は、 $(\phi, \psi) = ((70^\circ, 180^\circ), (-80^\circ, 175^\circ), (-85^\circ, -170^\circ))$ および $(75^\circ, -180^\circ)$ でピーク値（最も可能性のある値）を有する（4 つのピークが存在する）。直鎖状ペプチドでは、最も可能性のある値は $(\phi, \psi) = (85^\circ, 5^\circ)$ 、および $(-85^\circ, -10^\circ)$ であり（2 つのピークが存在する）、線維構造 2MXU では、これらの最も可能性のある値は $(\phi, \psi) = (-60^\circ, 145^\circ), (80^\circ, 170^\circ)$ および $(70^\circ, -180^\circ)$ である。これら二面角のピーク値の多くの差異は、環状エピトープ立体配座に対して選択した抗体が直鎖状エピトープおよび線維エピトープに対して低い親和性を有する可能性があることを示している。

【0408】

38G に関するラマチャンドラン主鎖 Φ 、 Ψ 分布のピーク値（最も可能性が高い値）を表 5 に示す。表 5 の第 1 列には、検討した残基が記載されており、この残基は括弧内に示される 2 つの角ファイおよびプサイを示す。第 2 列には、直鎖状ペプチド CGGGVVG（配列番号 2）における 38G のラマチャンドランファイ／プサイ角のピーク値が示されており、第 3 列には、環状ペプチド CGGGVVG（配列番号 2）における 38G のラマチャンドランファイ／プサイ角のピーク値が示されており、最終列には、線維構造 2MXU における 38G のラマチャンドランファイ／プサイ角のピーク値が示されている。

【0409】

【表 8】

表 5. 主鎖ファイ／プサイ角の分布のピーク値

G 38 の主鎖ファイ／プサイ角の分布のピーク値	直鎖状	環状	線維
G38	(85,5) (-85,-10)	(70,180) (-80,175) (-85,-170) (75,-180)	(-60,145) (80,170) (70,-180)

【0410】

V I I . エピトープの溶解度および抗原性

図 6 は、溶媒接触表面積（SASA）をプロットしている。これは、環状ペプチドにおける残基 GG V V（配列番号 1）の SASA が線維よりも大きいことを示しており、溶媒へより露出することにより抗体結合に接触できるであろうことを示唆している。この露出の増大は、残基 V 39 および V 40 にとって最も重要である。V 39 は、線維に完全に埋め込まれており、環状ペプチドで最も露出されている。

【0411】

線維構造での GG V V（配列番号 1）の立体配座の残基と比較して露出および抗体結合への接触可能性が異なる可能性が最も高い残基 V 39、およびより低い度合で V 40 が得

10

20

30

40

50

られる。

【0412】

V I I I . 環状ペプチド立体配座のアンサンブルは直鎖状立体配座または線維立体配座のアンサンブルとは異なる方法でクラスター化する

立体配座間に標準的な構造アライメントの測定基準を用い、次いでクラスタリング解析を実施することにより、配列 G G V V (配列番号 1) が環状ペプチドにおいて直鎖状ペプチドとは異なる立体配座を提示するという決定的証拠を確認することができる。直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドの C G G G V V G (配列番号 2) ならびに P D B I D 2 M X U に対応する構造の完全長線維について立体配座の平衡アンサンブルを得る。これらのアンサンブルから残基 G G V V (配列番号 1) に関する立体配座のスナップショットを収集し、次いで、環状ペプチドアンサンブルの最も大きいクラスター、直鎖状ペプチドアンサンブルの最も大きいクラスター、および線維アンサンブルの G G V V (配列番号 1) の最も大きいクラスターの重心を構造的に整列させ、次にこの 3 つの値の平均二乗偏差 (R M S D) を記録し、プロットする。ここでは、最大クラスターアルゴリズム (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/maxcluster>) によりクラスタリングを実施する。図 9 に、直鎖状アンサンブル、環状アンサンブルおよび線維アンサンブルの 3 つの対応する R M S D 値を三次元散布図としてプロットする。

【0413】

表 6 は、直鎖状、環状、および線維 (2 M X U) のペプチドの立体配座の R M S D の散布図のパーセント重複を示す。列 1 は、直鎖状の形態と環状の形態との間のパーセント重複がたったの 3 % ときわめて小さいことを示している。

【表 9】

表 6. R M S A クラスタリングのパーセント重複

環状における直鎖状	環状における 2 M X U	直鎖状における環状	直鎖状における 2 M X U	2 M X U における直鎖状	2 M X U における環状	2 L M P における直鎖状	2 M 4 J における直鎖状	2 L M N における直鎖状
3%	0	10%	0.7%	0.04%	0	2%	10%	8.5%

【0414】

図 9 から、3 つのアンサンブルが互いに異なる方法でクラスター化することは明らかである。特に、環状ペプチド構造のアンサンブルは直鎖状アンサンブルまたは線維アンサンブルとは異なり、このことは、環状ペプチドエピトープに特異的な抗体が直鎖状アンサンブルまたは線維アンサンブル内で提示される立体配座に対して低い親和性を有する可能性があることを示している。環状ペプチドに対して生じさせた抗体は、A ベータの直鎖状または線維の立体配座よりもオリゴマー形態を立体配座的に選択的かつ優先的に結合することができる。このような抗体はまた、これらの株で存在する荷電した末端のため、A ベータ 40 の様々な株を優先的に結合する可能性が低い。アンサンブル間の差異は、いくつかの側鎖および主鎖の二面角分布間に重複があるにも関わらず、起こる；上述の多くの大抵の場合は小さな差次的な特徴が、全体的に異なる立体配座の分布をもたらす。

【0415】

アンサンブル間の重複を以下のように計算した。環状アンサンブルと重複する直鎖状アンサンブルの割合 (%) は、まず、長さ 0.1 オングストロームの立方体 (c u b i c) のエレメントに、この 3 次元の R M S D のスペースアップの体積を分割することにより、得られる。次に、環状分布の複数のポイントの「カットオフ密度」を、カットオフ密度以上の環状分布密度を有する立方体が、環状分布の 90 % を含むように見出す。このことは、環状分布を含む特徴的な体積を提供する体積 (連続ではない場合がある) を定義し、異常値による不自然な結果を除去する。次に、この領域内にある直鎖状の分布から複数のポイントの割合を見出す。この方法を用いて、直鎖状における線維、直鎖状における環状などの重複パーセンテージを見出すことが可能である。一般的に、非常に低い重複が観察される。

【0416】

表6に、上記の方法により得た重複パーセンテージの数値を提供する。特に、環状ペプチドおよび線維ペプチド2MXUは0%の重複を有する。上記の方法により、環状分布と直鎖状分布の重複は3%であり、直鎖状ペプチドの分布と環状の分布の重複は10%である。

【0417】

図9はのパネルD～Gは、アンサンプルの重複値の収束を例示している。図9Dは、直鎖状および線維のアンサンプルが、1%未満に収束した重複を有することを示している。図9Eは、直鎖状アンサンプルが、約3%の収束値で環状アンサンプルと重複することを示している。図9Fは、直鎖状アンサンプルが、0.04%未満の収束値で線維アンサンプルと重複することを示している。図9Gは、環状アンサンプルが、約10%の収束値で直鎖状アンサンプルと重複することを示している。

【0418】

環状ペプチドアンサンプルの構造から最も大きなクラスターの重心を構成する、環状ペプチドアンサンプル由来のGGVV（配列番号1）の代表的な立体配座の2つの図を、図7のパネル7に黒色で示す。同様に、最も大きなクラスターの重心を構成する、直鎖状ペプチドのアンサンプルの最も代表的な立体配座を図7に白色で示しており、これは、異なる配向を明示させるために、RMSDを使用して最適に調節することにより、黒色で示されている環状ペプチドと重ね合わされている。図7のパネルBは、先と同様にRMSDに関して調節することにより最適に重ね合わされた、配列CGGGVVG（配列番号2）の環状ペプチドおよび直鎖状ペプチドの対応する重心の立体配座を示す。黒色の立体配座は環状ペプチドの最も大きなクラスターの重心であり、よって環状ペプチドの典型的な立体配座を最良に表している。白色の立体配座は、直鎖状ペプチドの最大のクラスターの重心であり、環状の立体配座と調節して並べられている。重ね合わせられ、並べられた構造は、異なる二面角および全体的なエピソードの立体配座が、直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドにとって好ましい傾向があることを示している。

【0419】

表7は、環状ペプチドアンサンプル、直鎖状ペプチドアンサンプル、および線維アンサンプルの重量中心の構造のG37、G38、V39、およびV40により占められている主鎖および側鎖のラマチャンドラン二面角の値を列挙している；環状および直鎖状の重量中心の立体配座は図7にプロットされている。これら重量中心の構造は、環状の立体配座と直鎖状または線維の立体配座との間で実質的に異なるいくつかの二面角を呈する。表7の列1は、対象の残基を提供し、列2は、対象の二面角を列挙し、列3は、環状アンサンプルの重量中心の構造の二面角の値を提供し、列4は、直鎖状アンサンプルの重量中心の二面角の値を提供し、列5は、線維アンサンプルの重量中心の二面角の値を提供し、列6は、環状の重量中心と直鎖状の重量中心との間の二面角の差異を提供し、列7は、環状の重量中心と線維の重量中心との間の二面角の差異を提供する。表7における二面角の多くは、大きくは拘束されておらず、たとえば1HG1、2HG1、3HG1、1HG2、2HG2、および3HG2で終結する二面角は120度未満である。しかしながら、環状の二面角の多くは、直鎖状または線維の重量中心の対応する二面角とは有意に異なることが明らかである。

【表 10】

表 7. 直鎖状、環状、および線維のアンサンブルの重量中心の構造の二面角、ならびにそれらの差異

残基	二面角	環状	直鎖状	線維 (2MXU)	環状－直鎖状	環状－線維
G37	C-N-CA-C(phi)	109.06	67.42	130.02	41.64	-20.96
	N-CA-C-N(psi)	-113.89	24.79	0.39	-138.67	-114.28
	HA1-CA-N-HN	52.08	14.20	71.49	37.88	-19.41
	HA2-CA-N-HN	173.42	131.97	-169.73	41.45	-16.85
	C-CA-N-HN	-60.90	-104.01	-56.48	43.11	-4.42
	O-C-CA-HA1	-49.10	93.49	49.22	-142.59	-98.32
	O-C-CA-HA2	-168.92	-23.86	-71.17	-145.06	-97.75
	O-C-CA-N	66.84	-149.48	176.39	-143.68	-109.55
G38	C-N-CA-C(phi)	-75.42	71.58	98.04	-147.00	-173.46
	N-CA-C-N(psi)	-174.30	9.91	116.88	175.78	68.81
	HA1-CA-N-HN	-20.86	7.89	32.36	-28.75	-53.22
	HA2-CA-N-HN	-138.75	134.36	153.69	86.88	67.55
	C-CA-N-HN	91.73	-107.85	-85.21	-160.42	176.95

	O-C-CA-N	6.47	-171.54	-75.53	178.01	82.00
	O-C-CA-HA1	118.97	70.69	164.18	48.28	-45.21
	O-C-CA-HA2	-127.46	-56.68	42.99	-70.78	-170.45
V39	C-N-CA-C(phi)	-63.81	-68.62	-88.92	4.81	25.11
	N-CA-C-N(psi)	-52.30	-44.80	134.12	-7.50	173.58
	HA-CA-N-HN	-116.20	-141.02	-162.82	24.82	46.62
	C-CA-N-HN	120.23	104.11	77.88	16.12	42.35
	CB-CA-N-HN	3.08	-19.64	-54.49	22.72	57.57
	O-C-CA-N	129.72	143.36	-49.90	-13.64	179.62
	O-C-CA-HA	4.96	25.26	-168.83	-20.31	173.79
	O-C-CA-CB	-110.62	-88.75	80.38	-21.87	168.99
	N-CA-CB-HB	57.27	76.60	62.11	-19.34	-4.85
	N-CA-CB-CG2	-62.02	-42.04	-62.16	-19.98	0.14
	N-CA-CB-CG1	-178.13	-164.35	-173.85	-13.78	-4.29
	HA-CA-CB-HB	-178.04	-162.19	174.46	-15.84	7.50
	HA-CA-CB-CG2	62.67	79.16	50.19	-16.49	12.48
	HA-CA-CB-CG1	-53.44	-43.15	-61.50	-10.29	8.06
	C-CA-CB-HB	-57.61	-52.44	-70.71	-5.16	13.11
	C-CA-CB-CG2	-176.90	-171.09	165.02	-5.81	18.09
	C-CA-CB-CG1	66.99	66.60	53.33	0.39	13.66
	HB-CB-CG2-1HG2	176.19	-170.47	-162.57	-13.34	-21.24
	HB-CB-CG2-3HG2	57.97	74.59	86.50	-16.62	-28.52
	HB-CB-CG2-2HG2	-63.47	-38.11	-45.22	-25.36	-18.25
	CA-CB-CG2-1HG2	-63.95	-53.07	-42.83	-10.88	-21.12
	CA-CB-CG2-3HG2	177.84	-168.01	-153.77	-14.16	-28.39
	CA-CB-CG2-2HG2	56.39	79.29	74.51	-22.90	-18.12
	CG1-CB-CG2-1HG2	55.90	70.75	73.59	-14.85	-17.69
	CG1-CB-CG2-3HG2	-62.31	-44.18	-37.35	-18.13	-24.96
	CG1-CB-CG2-2HG2	176.24	-156.89	-169.07	-26.87	-14.69
	HB-CB-CG1-1HG1	177.16	163.64	158.98	13.52	18.18
	HB-CB-CG1-2HG1	-61.94	-76.02	-73.72	14.08	11.79
	HB-CB-CG1-3HG1	60.25	52.24	38.49	8.00	21.76
	CA-CB-CG1-1HG1	-62.47	-64.03	-82.41	1.56	19.94
	CA-CB-CG1-2HG1	54.44	47.36	38.07	7.08	16.37
	CA-CB-CG1-	175.34	167.70	165.37	7.64	9.97

10

20

30

40

	3HG1					
	CG2-CB-CG1-1HG1	177.67	169.53	163.55	8.14	14.12
	CG2-CB-CG1-2HG1	-65.42	-79.07	-75.96	13.66	10.54
	CG2-CB-CG1-3HG1	55.48	41.27	51.34	14.22	4.14
V40	C-N-CA-C(phi)	-112.14	-82.13	-136.24	-30.01	24.10
	N-CA-C-N(psi)	113.58	-41.00	117.93	154.58	-4.35
	CB-CA-N-HN	-57.38	-16.74	-77.95	-40.64	20.57
	C-CA-N-HN	64.57	102.44	47.57	-37.87	17.00
	HA-CA-N-HN	-169.89	-133.28	156.66	-36.61	33.44
	N-CA-CB-HB	69.06	76.98	57.77	-7.92	11.29
	N-CA-CB-CG1	-165.89	-162.61	176.14	-3.29	17.96
	N-CA-CB-CG2	-48.00	-42.56	-66.59	-5.44	18.59
	C-CA-CB-HB	-52.96	-43.72	-63.28	-9.24	10.32
	C-CA-CB-CG1	72.09	76.69	55.10	-4.60	16.99
	C-CA-CB-CG2	-170.01	-163.26	172.37	-6.75	17.62
	HA-CA-CB-HB	-173.18	-164.47	-177.97	-8.71	4.79
	HA-CA-CB-CG1	-48.13	-44.06	-59.60	-4.07	11.47
	HA-CA-CB-CG2	69.77	75.99	57.68	-6.22	12.09
	O-C-CA-CB	54.24	-108.00	68.53	162.23	-14.29
	O-C-CA-N	-71.93	132.45	-57.00	155.62	-14.93
	O-C-CA-HA	165.36	9.40	-171.29	155.97	-23.35
	HB-CB-CG1-2HG1	-153.06	-159.72	179.67	6.65	27.27
	HB-CB-CG1-3HG1	-33.99	-41.87	-57.48	7.87	23.48
	HB-CB-CG1-1HG1	79.81	81.48	60.91	-1.67	18.90
	CG2-CB-CG1-2HG1	-38.95	-47.76	-66.86	8.82	27.91
	CG2-CB-CG1-3HG1	80.12	70.08	56.00	10.04	24.12
	CG2-CB-CG1-1HG1	-166.07	-166.57	174.38	0.50	19.54
	CA-CB-CG1-2HG1	79.09	73.72	52.30	5.37	26.79
	CA-CB-CG1-3HG1	-161.84	-168.43	175.16	6.59	23.00
	CA-CB-CG1-1HG1	-48.03	-45.08	-66.45	-2.95	18.42
	HB-CB-CG2-3HG2	-177.08	171.03	-155.36	11.89	-21.73
	HB-CB-CG2-2HG2	63.11	54.85	83.11	8.27	-20.00
	HB-CB-CG2-1HG2	-51.70	-62.09	-35.11	10.39	-16.59
	CG1-CB-CG2-3HG2	-54.58	-59.12	-27.99	4.54	-26.59

V40

V40 (続き)

10

20

30

40

	CG1-CB-CG2-2HG2	-169.39	-176.06	-146.21	6.67	-23.18
	CG1-CB-CG2-1HG2	65.23	57.06	93.54	8.17	-28.32
	CA-CB-CG2-3HG2	-173.34	-178.12	-146.23	4.79	-27.11
	CA-CB-CG2-2HG2	71.85	64.94	95.56	6.91	-23.70
	CA-CB-CG2-1HG2	-53.53	-61.94	-24.69	8.41	-28.84

【0420】

10

図8は、再度、環状、直鎖状、および2M4J線維のアンサンブルに関する重量中心の構造を示している。表面積のプロファイルは抗体に対して提示することができ、重量中心の立体配座間で異なっている。具体的には、2M4Jは、残基V40で終結し、よって荷電したカルボキシル末端を有する。よって、Aベータ40においてこの領域に対して生じさせた抗体は、環状GGVV（配列番号1）と結合する可能性が低く、逆に、環状GGVV（配列番号1）に対して生じさせた抗体は、Aベータ40においてこの領域と結合する可能性が少ない。

【0421】

20

図10は、環状アンサンブルがAベータ線維の他の株のいずれかと重複しないことを示している。具体的には、環状ペプチドアンサンブルと線維分布との間の重複は0である。図10Aは、PDB 2M4Jに関する結果を示し、図10BはPDB 2LMNに関する結果を示し、図10CはPDB 2LMPに関する結果を示している。

【0422】

実施例3

立体配座拘束エピトープを含む環状化合物構築

シクロ（CGGGVVG）（配列番号2）などのGGVV（配列番号1）を含むペプチドは頭一尾環化することができる。

【0423】

30

Fmocベースの固相ペプチド合成などの既知の方法を単独で、または他の方法と組み合わせ用い、GGVV（配列番号1）と、好ましくは2個、3個もしくは4個のアミノ酸および／またはPEG単位を含むリンカーとを含む、直鎖状ペプチドを合成することができる。例えばHamley（2014）[6]およびRobertsら（2012）[7]（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているカップリング化学を用いて、PEG分子をN末端のアミン基に結合させることができる。直鎖状ペプチド化合物は、1）ペプチド+リンカーのアミノ末端とカルボキシル末端を共有結合させてペプチド結合を形成させること（例えば、主鎖の環化）、2）ペプチド+リンカー内のアミノ末端もしくはカルボキシル末端と側鎖を共有結合させること、または3）ペプチド+リンカー内の2つの側鎖を共有結合させることにより環化され得る。

【0424】

40

環状化合物内の結合は、すべて通常のペプチド結合であっても（ホモデティック環状ペプチド）、あるいはエステル結合、エーテル結合、アミド結合もしくはジスルフィド結合などの他のタイプの結合を含んでも（ヘテロデティック環状ペプチド）よい。

【0425】

ペプチドをN末端もしくはC末端またはペプチドの内側にある、例えばシステインおよびホモシステインを含めたチオール含有残基またはメルカプトタン含有残基の酸化により環化させ得る。例えば、ペプチドに隣接する2つのシステイン残基を酸化させてジスルフィド結合を形成させ得る。用い得る酸化試薬としては、例えば、酸素（空気）、ジメチルスルホキシド、酸化グルタチオン、シスチン、塩化銅（II）、フェリシアン化カリウム、トリフルオロ酢酸タリウム（III）またはその他の酸化試薬、例えば当業者に公知であり当業者に公知の方法とともに使用し得る酸化試薬などが挙げられる。

50

【0426】

米国特許出願公開第2009/0215172号、米国特許出願公開第2010/0240865号、米国特許出願公開第2010/0137559号には環状ペプチド合成に関連する方法および組成物が記載されており、米国特許第7,569,541には環化の様々な方法が記載されている。国際公開第01/92466号およびAndreuら, 1994. *Methods in Molecular Biology* 35:91-169にはその他の例が記載されている。

【0427】

より具体的には、システイン残基が隣接し、かつ／または挿入されているスペーサーを含むリンカーを付加することにより、GGVV（配列番号1）エピトープを含む環状ペプチドを構築することができる。ペプチドのN末端およびC末端に付加した非天然システイン残基の間でジスルフィド結合を形成させることにより、ペプチドを環状立体配座に構築することができる。また、N末端とC末端のアミノ酸の間でペプチド結合を形成させること（例えば、頭-尾環化）により、それを環状化合物に合成することができる。

【0428】

ペプチド合成を標準的な製造方法に従いCPC Scientific社（サニーベール、カリフォルニア州、米国）で実施する。

【0429】

例えば、GGVV（配列番号1）を含むペプチドのN末端およびC末端に付加したシステイン残基間のジスルフィド結合を用いて、拘束された環状立体配座の立体配座エピトープGGVV（配列番号1）を含むシクロ（CGGGVVVG）（配列番号12）環状ペプチドを構築することができる。2つの非天然システイン残基のうち1つをGGVV（配列番号11）のC末端に、1つをN末端に付加した。この2つのシステインを制御された条件下で酸化してジスルフィド架橋を形成させる、または頭部と尾部を反応させてペプチド結合を生じさせる。

【0430】

上記の通り、AベータオリゴマーのGGVV（配列番号1）のアミノ酸の主鎖および側鎖の立体配座および配向を模倣するように環状ペプチドの構造を設計した。

【0431】

シクロ（CGGGVVVG）（配列番号2）

以下の方法（CPC Scientific社、サニーベール、カリフォルニア州）を用いてシクロ（CGGGVVVG）（配列番号2）を合成した。標準的な従来のFmocベースの固相ペプチド合成により、保護された直鎖状ペプチドを2-クロロトリチルクロリド樹脂上で合成し、次いで、30%HFIP/DCMを用いて樹脂から切断した。低濃度のEDC・HCl/HOBt/DIEAのDMF溶液を用いることにより、保護された直鎖状ペプチドを対応する保護された環状ペプチドに環化した。保護された環状ペプチドをTFAにより脱保護して粗環状ペプチドを得、粗ペプチドをRP HPLCにより精製し、凍結乾燥後、純粋な環状ペプチドを得た。

【0432】

直鎖状ペプチドCGGGVVVG（配列番号2）のアミド縮合によりシクロ（CGGGVVVG）（配列番号2）を調製することができる。

【0433】

直鎖状化合物C-PEG2-GGGVVVG（配列番号3）のアミド縮合によりシクロ（C-PEG2-GGGVVVG）（配列番号3）を調製することができる。

【0434】

直鎖状化合物CGGGVV-PEG2（配列番号4）のアミド縮合により、シクロ（CGGGVV-PEG2）（配列番号4）を調製することができる。

【0435】

直鎖状（CGGGVVVG）（配列番号2）を調製した（CPC Scientific社、サニーベール、カリフォルニア州）。標準的な従来のFmocベースの固相ペプチド

10

20

30

40

50

合成により、保護された直鎖状ペプチドを Fmoc-Gly-Wang 樹脂上で合成し、次いで、保護されたペプチドを TFA により切断して粗ペプチドを得、粗ペプチドを RP HPLC により精製し、凍結乾燥後、純粋なペプチドを得、これを用いて BSA をコンジュゲートした。

【0436】

免疫原構築

環状化合物シクロ (CGGGVVG) (配列番号 2) を上記の通りに合成し、次いで BSA および／または KLH とコンジュゲートした (CPC Scientific 社、サニーバール、カリフォルニア州)。PBS 緩衝液に溶かした SMCC により BSA または KLH を再活性化し、次いで、純粋なペプチドを PBS 緩衝液に溶かした溶液をコンジュゲーション混合物に加え、コンジュゲーション混合物を室温で 2 時間攪拌した。次いで、コンジュゲーション混合物を透析後に凍結乾燥させて、コンジュゲーション産物を得た。

【0437】

実施例 4

抗体の作製および選択

立体配座拘束化合物、任意選択で環状化合物、例えばシクロ (CGGGVVG) (配列番号 2) ペプチドなどの GGVV (配列番号 1) を含む環状ペプチドなどとキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) とを結合させる。カナダ動物管理協会により承認されたプロトコルに従ったマウスモノクローナル抗体作製 (Immunoprecise Antibodies 社 (ビクトリア、ブリティッシュコロンビア州、カナダ)) のためにシクロペプチドを送る。BSA と結合した、抗体の作製に使用する立体配座ペプチドまたは関連ペプチド、例えばシクロ (CGGGVVG) (配列番号 2) を用いて、マウス血清をスクリーニングする。

【0438】

実施例 6 にさらに記載するように、シクロ (CGGGVVG) (配列番号 2) を含む免疫原を用いてハイブリドーマを作製した。ELISA および SPR により、本明細書に記載される直鎖状ペプチドよりもシクロ (CGGGVVG) (配列番号 2) ペプチドと優先的に結合するハイブリドーマ上清をスクリーニングした。陽性 IgG 分泌クローンを大規模生産およびプロテイン G を用いるさらなる精製に供する。

【0439】

実施例 5

斑／線維との結合の有無の評価

新鮮な凍結ヒト脳切片または 10%ホルマリンで固定した後の凍結ヒト脳切片で免疫組織化学を実施することができる。過酸化水素の 0.5%メタノール溶液を 20 分間用いて、内因性ペルオキシダーゼ活性を失活させることができる。pH 6.0 のクエン酸ナトリウムおよび 25 分間の蒸気加熱を用いて抗原回復を達成することができ、次いで室温 (RT) で 30 分間冷却する。TBS 中で 5~7 分間安定化させた後、切片を 70%ギ酸により RT で 15 分間処理し、次いで TBS で 3×15 分間洗浄する。加湿チャンバ内で無血清タンパク質ブロッキング試薬 (Dako Canada 社、ミシサガ、オンタリオ州、カナダ) と 1 時間インキュベートすることにより非特異的染色をブロックする。

【0440】

免疫染色には、本明細書に記載される抗体、陽性対照の 6E10 (1 μg/ml) およびアイソタイプ対照の IgG1、IgG2a、IgG2b、および IgG3 (1 μg/ml、Abcam 社) を一次抗体として用いる。切片を 4℃で一晩インキュベートし、TBS-T で 3×5 分間洗浄する。西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートした抗マウス IgG (1:1000、ECL 社) を切片に添加し、45 分間インキュベートし、次いで TBS-T で 3×5 分間洗浄する。DAB 発色試薬 (Vector Laboratories 社、バーリントン、オンタリオ州、カナダ) を加え、バックグラウンド染色に対して所望の標的レベルに達したとき、切片を蒸留水でリンスする。切片をマイヤーのヘマトキシリンで対比染色し、脱水し、カバーガラスをかけた。スライドを光学顕微鏡 (Zeiss

10

20

30

40

50

ss Axiovert 200M、Carl Zeiss Canada社、トロント、オンタリオ州、カナダ) 下で検査し、Leica社のDC300デジタルカメラおよびソフトウェア (Leica Microsystems Canada社、リッチモンドヒル、オンタリオ州) を用いて代表的な画像を50倍、200倍および400倍の倍率で記録する。

【0441】

実施例6

方法および材料

免疫原

米国カリフォルニア州サニーベールのCPC Scientific社で環状ペプチドおよび直鎖状ペプチドを作製した。トリフルオロ酢酸対イオンプロトコルを用いてペプチドをKLH (免疫感作用) およびBSA (スクリーニング用) とコンジュゲートした。ペプチドを脱塩し、MSおよびHPLCにより確認し、純度95%であると判断された。ペプチドをIPA社に発送し、マウスを用いたモノクローナル抗体の作製に使用した。

【0442】

抗体

キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と結合したシクロ (CGGGVVG) (配列番号2) に対するハイブリドーマおよびモノクローナル抗体をいくつか作製した。

【0443】

50日齢の雌BALB/cマウス (Charles River Laboratories社、ケベック州) を免疫感作した。抗原を含有するアジュバントは含有しない一連の皮下水性注射剤を19日間にわたって投与した。環状ペプチド-KLHの0.5mg/mL無菌生理食塩水溶液の注射によりマウスを1匹当たり100μgで免疫感作した。マウスをLab Products社の換気ラックシステムで飼育した。第19日、マウス全4匹を安楽死させ、ハイブリドーマ細胞系の作製用にリンパ球を回収した。

【0444】

融合/ハイブリドーマの発育

リンパ球を単離し、ポリエチレングリコール (PEG1500) の存在下でマウスSP2/0ミエローマ細胞と融合させた。融合した細胞をHAT選択を用いて培養した。この方法では、半固形メチルセルロース系HAT選択培地を用いてハイブリドーマ選択とクローン化とを1つの段階に組み合わせる。半固形培地上で単一細胞由来のハイブリドーマが増殖してモノクローナルコロニーを形成した。融合事象から10日後、得られたハイブリドーマクローンを96ウェル組織培養プレートに移し、中期対数増殖期に達するまで (5日) HT含有培地で増殖させた。

【0445】

ハイブリドーマの解析 (スクリーニング)

ハイブリドーマの組織培養上清を間接ELISAによりスクリーニング抗原 (環状ペプチド-BSA) (一次スクリーニング) で試験し、ヤギ抗IgG/IgM (H&L) -HRP二次抗体を用いてIgG抗体およびIgM抗体の両方について探索し、TMB基質で発色させた。このアッセイで0.2OD超であったクローンを次の試験ラウンドに進めた。陽性培養物をスクリーニング抗原で再試験して分泌を確認し、無関係の抗原 (ヒトトランスフェリン) で再試験して非特異的mAbを除去し、偽陽性を除外した。抗体捕捉ELISAにより目的とする全クローンにアイソタイピングを実施して、それらがIgGアイソタイプであるのか、またはIgMアイソタイプであるのかを判定した。また、目的とする全クローンを間接ELISAにより他の環状ペプチド-BSAコンジュゲートおよび直鎖状ペプチド-BSAコンジュゲートで試験して、交差反応性を評価した。

【0446】

BSAとコンジュゲートしたシクロ (CGGGVVG) (配列番号2) を用いた間接ELISAにより、マウスハイブリドーマ抗体をスクリーニングした。

【0447】

10

20

30

40

50

E L I S A 抗体スクリーニング

簡潔に述べれば、E L I S A プレートに 4℃ の炭酸塩コーティング緩衝液 (pH 9.6) O/N 中 0.1 μg/ウェルのシクロ (C G G G V V G) (配列番号 2) コンジュゲート B S A 100 μL/ウェルでコートし、脱脂粉乳の 3% P B S 溶液を用いて室温で 1 時間ブロックした。一次抗体: 37℃ で振盪しながら 1 時間インキュベートした 100 μL/ウェルのハイブリドーマ上清。二次抗体: 37℃ で 1 時間振盪した P B S-T w e e n 中 1:10,000 の 100 μL/ウェルのヤギ抗マウス I g G/I g M (H+L)-H R P。全洗浄段階を P B S-T w e e n で 30 分間実施した。基質 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (T M B) を 50 μL/ウェルに加え、暗所で発色させ、等体積の 1 M H C l で停止させた。

10

【0448】

さらなる試験のため陽性クローンを選択した。マウスの G G V V (配列番号 1) のハイブリドーマの陽性クローンを間接 E L I S A により、シクロ (C G G G V V G) (配列番号 2) コンジュゲート B S A およびヒトトランスフェリン (H T) に対する反応性について試験した。プレートを 1) 4℃ の炭酸塩コーティング緩衝液 (pH 9.6) O/N 中 0.1 μg/ウェルのシクロ (C G G G V V G) コンジュゲート B S A (配列番号 2) 100 μL/ウェル; または 2) 37℃ の d H 2 O O/N 中 0.25 μg/ウェルの H T 抗原 50 μL/ウェルでコートした。一次抗体: 37℃ で振盪しながら 1 時間インキュベートした 100 μL/ウェルのハイブリドーマ上清。二次抗体: 37℃ で 1 時間振盪した P B S-T w e e n 中 100 μL/ウェルの 1:10,000 ヤギ抗マウス I g G/I g M (H+L)-H R P。全洗浄段階を P B S-T w e e n で 30 分間実施した。基質 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (T M B) を 50 μL/ウェルに加え、暗所で発色させ、等体積の 1 M H C l で停止させた。

20

【0449】

E L I S A によるシクロ C G G G V V G (配列番号 2) 化合物と直鎖状 C G G G V V G (配列番号 2) 化合物の選択性

E L I S A プレートを 1) 4℃ の炭酸塩コーティング緩衝液 (pH 9.6) O/N 中 0.1 μg/ウェルのシクロ (C G G G V V G) コンジュゲート B S A (配列番号 2) 100 μL/ウェル; 2) 4℃ の炭酸塩コーティング緩衝液 (pH 9.6) O/N 中 0.1 μg/ウェルの直鎖状 C G H D S G G コンジュゲート B S A (配列番号 2) 100 μL/ウェル; または 3) 4℃ の炭酸塩コーティング緩衝液 (pH 9.6) O/N 中 0.1 μg/ウェルの陰性ペプチド 100 μL/ウェルでコートした。一次抗体: 37℃ で振盪しながら 1 時間インキュベートした 100 μL/ウェルのハイブリドーマ上清。二次抗体: 37℃ で 1 時間振盪した P B S-T w e e n 中 100 μL/ウェルの 1:10,000 ヤギ抗マウス I g G/I g M (H+L)-H R P。全洗浄段階を P B S-T w e e n で 30 分間実施した。基質 T M B を 50 μL/ウェルに加え、暗所で発色させ、等体積の 1 M H C l で停止させた。

30

【0450】アイソタイピング

抗体捕捉実験を用いてハイブリドーマ抗体にアイソタイピングを実施した。捕捉プレートを pH 9.6 の炭酸塩コーティング緩衝液中、4℃ で一晩、100 μL/ウェルの 1:10,000 ヤギ抗マウス I g G/I g M (H&L) 抗体でコートした。ブロッキング段階は用いなかった。一次抗体 (ハイブリドーマ上清) を加えた (100 μg/mL)。二次抗体: 37℃ で 1 時間振盪した P B S-T w e e n 中 100 μL/ウェルの 1:5,000 ヤギ抗マウス I g G γ-H R P または 1:10,000 ヤギ抗マウス I g M μ-H R P。全洗浄段階を P B S-T w e e n で 30 分間実施した。基質 T M B を 50 μL/ウェルに加え、暗所で発色させ、等体積の 1 M H C l で停止させた。

40

【0451】S P R 結合アッセイ—一次および二次スクリーニング

抗体と A ベータモノマーおよび A ベータオリゴマーとの結合に関する S P R 解析

50

氷冷ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) にAベータモノマーおよびAベータオリゴマーの調製組換えAベータ40およびAベータ42ペプチド (California Peptide社、ソルトレイクシティ、ユタ州、米国) を溶かした。一晚蒸発させることによりHFIPを除去し、Speed Vac遠心機で乾燥させた。モノマーの調製には、ペプチド薄膜をDMSOで戻して5mMとし、dH₂Oでさらに100μMに希釈し、直ちに使用した。5mMのDMSOペプチド溶液を無フェノールレッドF12培地 (Life Technologies社、バーリントン、オンタリオ州、カナダ) で希釈して最終濃度100μMとすることによりオリゴマーを調製し、4℃で24時間～7日間インキュベートした。

【0452】

SPR解析 高強度レーザー光および高速光学式走査を用いて結合相互作用をリアルタイムでモニターする分析用バイオセンサーであるMolecular Affinity Screening System (MASS-1) (Sierra Sensors社、ハンブルク、ドイツ) を用いて、全SPR測定を実施した。SPR直接結合アッセイを用いて組織培養上清の一次スクリーニングを実施し、このアッセイでは、High Amine Capacity (HAC) センサーチップ (Sierra Sensors社、ハンブルク、ドイツ) の個々のフローセル上にBSAコンジュゲートペプチド、Aベータ42モノマーおよびAベータ42オリゴマーを共有結合で固定化し、表面に抗体を流した。二次スクリーニングでは、プロテインGで精製したmAbをSPR間接 (捕捉) 結合アッセイを用いて解析し、このアッセイでは、プロテインA誘導体化センサーチップ (XanTec Bioanalytics社、デュッセルドルフ、ドイツ) 上に抗体を捕捉し、表面にAベータ40モノマー、Aベータ42オリゴマー、可溶性脳抽出物および脳脊髄液を流した。SPR直接結合アッセイで、HACセンサーチップの個々のフローセル上にAベータ42モノマーおよびAベータ42オリゴマーを共有結合で固定化し、精製mAbを流すことにより抗体の特異性を検証した。

【0453】

可溶性脳抽出物およびCSF試料のSPR解析

可溶性脳抽出物およびCSFの調製 UBC Alzheimer's and Related Disorders Clinicで評価した患者からヒトの脳組織およびCSFを採取した。推定ADの臨床診断はNINCDS-ADRDA基準 [5] に基づくものである。腰椎穿刺後1時間以内にCSFをポリプロピレンチューブに収集し、処理し、100μLポリプロピレンバイアルに等分し、-80℃で保管する。

【0454】

ホモジナイゼーション：ヒト脳組織試料の重量を測定し、次いで、脳組織の最終濃度が20% (w/v) になるよう一定量の新鮮な氷冷TBS (カナダケベック州ラヴァルのRoche Diagnostics社の無EDTAプロテアーゼインヒビターカクテルを添加したもの) に浸漬した。この緩衝液中で機械的プローブホモジナイザーを用いて組織をホモジナイズ (間に30秒の停止を挟んで3×30秒のパルス、いずれも氷上で実施) する。次いで、TBS中でホモジナイズした試料を超遠心分離にかける (70,000×gで90分)。上清を収集し、等分し、-80℃で保管する。BCAタンパク質アッセイ (Pierce Biotechnology社、ロックフォード、イリノイ州、米国) を用いてTBSホモジネートのタンパク質濃度を求める。

【0455】

SPR解析 AD患者4例および同年齢の対照4例の脳抽出物ならびにAD患者9例および同年齢の対照9例のCSF試料をプールし解析した。プロテインA誘導体化センサーチップの別個のフローセル上に精製mAbを捕捉し、表面に希釈試料を180秒間注入し、次いで、緩衝液で120秒間解離を実施し、表面を再生した。マウス対照IgG参照の表面結合およびアッセイ緩衝液の減算により結合応答を二重参照し、異なる試料のグループを比較した。

【0456】

A ベータモノマーとの結合の有無の評価

組織培養上清の一次スクリーニングでは、A ベータ 4 2 モノマーおよび A ベータ 4 2 オリゴマーを直接結合アッセイに用いた。二次スクリーニングでは、A ベータ 4 0 モノマーおよび A ベータ 4 2 オリゴマー、可溶性脳抽出物および C S F 試料を間接（捕捉）結合アッセイに用いた。

【0457】

一次スクリーニング

コグネイト環状ペプチドに対する抗体の結合の有無について組織培養上清をスクリーニングした。各試料を希釈し、固定化したペプチドおよび B S A 参照の表面に 1 2 0 秒間、二重反復で注入し、次いで、3 0 0 秒間の解離相にのみランニング緩衝液を注入した。解析サイクル毎に、センサーチップ表面を再生した。B S A 参照表面およびブランクランニング緩衝液注入から結合を減算することによりセンサグラムを二重参照し、解離相の結合応答報告点を収集した。

10

【0458】

オリゴマー結合アッセイ

次の合成 A ベータ 4 2 オリゴマーを上記の通りに作製および固定化し、抗体結合応答を解析した。A ベータ 4 2 オリゴマーに対する抗体結合応答を環状に対する結合応答と比較した。

【0459】

A ベータオリゴマーとの結合の検証。

A ベータ 4 2 オリゴマー結合をさらに検証および確認するため、抗体を共有結合で固定化し、次いで、市販の調製済みの安定な A ベータ 4 2 オリゴマー（S y n A g i n g 社、ヴァンドゥーヴル＝レ＝ナンシー、フランス）を表面に注入した。

20

【0460】

結果

E L I S A 試験では、ハイブリドーマクローンの大部分がシクロペプチドと結合することがわかった。

【0461】

次のクローンをシクロ C G G G V V G（配列番号 2）化合物および直鎖状 C G G G V V G（配列番号 2）化合物に対する選択性について E L I S A により試験した。複数のクローンが直鎖状 C G G G V V G コンジュゲート B S A（配列番号 2）よりも優先的にシクロ（C G G G V V G）コンジュゲート B S A（配列番号 2）と結合した。

30

【0462】

アイソタイピングでは、クローンの大部分が I g G 1 クローン、I g G 2 a クローンおよび I g G 3 クローンを含めた I g G であることがわかった。I g M クローンおよび I g A クローンも複数同定されたが、それ以上追究しなかった。

【0463】

表面プラズモン共鳴技術を用いた直接結合解析を実施して、配列番号 2 の環状ペプチドと結合する組織培養上清中の抗体についてスクリーニングした。

【0464】

図 1 2 は、S P R 直接結合アッセイの結果および E L I S A の結果の間の相関をプロットしたものであり、直接結合の結果と E L I S A の結果との間に相関があることを示している。

40

【0465】

上記の通りに調製した環状ペプチド、直鎖状ペプチド、A ベータ 1 ～ 4 2 モノマーおよび A ベータ 1 ～ 4 2 オリゴマーとの結合能についてクローンを再試験した。上記の S P R を用いて結合アッセイを実施した（直接結合アッセイ）。表 5 に示すように、実施した結合アッセイに基づきクローンをいくつか選択した。

【0466】

選択したクローンは I g G m A b であった。負の数は結合がみられなかったことを示

50

している。

【0467】

【表11】

表8

304

	環状ペプチド (RU)	直鎖状ペプチド (RU)	Aβ42モノマー (RU)	Aβ42オリゴマー (RU)
1B5	140.1	-1.6	-70.2	30.8
1F12	430.6	-19.2	-37.3	31.9
2G8	502	97.3	-18.6	57.6
3B8	23.4	-25.4	-19.6	49.9
4A8	370.8	-19.6	-31.9	33.2
4B4	422.4	-14.7	26.8	55.4
5F5	202	-18.5	-51.1	51.6
6E12	120.9	-11.8	-11.2	44.9
7C5	139	-16.5	-41.3	32.2
7D7	249.6	-14.8	-4.7	45.9
7G5	13.8	-18.6	-7.2	61.3
7H11	443.5	174.5	-39.6	42
8E10	368.7	116.1	-9.4	36.8
12A11	590.8	831.4	2.8	46.3
12D7	367	-12.3	-27.7	44.5
12F10	1006.5	155.4	21.2	41.8

10

【0468】

E L I S A プレスクリーニング

ハイブリドーマ上清の E L I S A プレスクリーニングにより、直鎖状ペプチドと比較して環状ペプチドとの結合の増大を示すクローンを特定した。そのクローンの一部は K L H -エピトープリンカーペプチドに対して反応性であった。これらはさらなる検討から除外した。本明細書に記載されるアイソタイピング法を用いて、クローンの大部分が I g G アイソタイプであることが明らかになった。

20

【0469】

表面プラズモン共鳴により測定する直接結合—一次スクリーニング

表面プラズモン共鳴を用いて、抗体クローンを含有する組織培養上清を環状ペプチド、直鎖状ペプチド（図11Aに示されている）、AベータオリゴマーおよびAベータモノマー（図11Bに示されている）との直接結合について試験した。エピトープ／リンカーとの公差反応性のない I g G クローンのみが示されている。大部分のクローンでは、直鎖状ペプチドに対する結合は0以下であり、対照的に、環状ペプチドに対する結合は、大部分のクローンで正である（図11A）。同様のパターンが、AベータモノマーおよびAベータオリゴマー（AβO）の結合性で観察される。ここでは6つのクローンを、参照表面よりもモノマーに対して反応性が低い、これらを除くすべてのクローンをAβOに強力に結合する（図11B）。

30

【0470】

図13に、選択したクローンの結合プロファイルを比較して示す。表面プラズモン共鳴を用いて、環状ペプチド、直鎖状ペプチド、Aベータ（Aβ）モノマーおよびAベータオリゴマー（AβO）における特定のエピトープに対する直接結合について各クローンを評価する。

【0471】

実施例7

二次スクリーニング

免疫組織化学

固定も抗原回復も実施していない凍結ヒト脳切片に免疫組織化学を実施した。加湿チャンバ内で無血清タンパク質ブロッキング試薬（D a k o C a n a d a 社、ミシサガ、オンタリオ州、カナダ）と1時間インキュベートすることにより非特異的結合をブロックした。免疫染色には以下の一次抗体を使用した：マウスモノクローナルアイソタイプ対照 I g G 1、I g G 2 a および I g G 2 b ならびに抗アミロイドβ6E10（以上、B i o l e g e n d 社から購入）ならびにシクロペプチドに対して反応性を示す選択した精製クローン。いずれの抗体も 1 μ g / m L で使用した。切片を室温で1時間インキュベートし、

40

50

TBS-Tで3×5分間洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートした抗マウスIgG(1:1000、ECL社)を切片に添加し、45分間インキュベートし、次いでTBS-Tで3×5分間洗浄した。DAB発色試薬(Vector Laboratories社、バーリントン、オンタリオ州、カナダ)を加え、バックグラウンド染色に対して所望の標的レベルに達したとき、切片を蒸留水でリンスした。切片をマイヤーのヘマトキシリンで対比染色し、脱水し、カバーガラスをかけた。スライドを光学顕微鏡(Zeiss Axiovert 200M、Carl Zeiss Canada社、トロント、オンタリオ州、カナダ)下で検査し、Leica社のDC300デジタルカメラおよびソフトウェア(Leica Microsystems Canada社、リッチモンドヒル、オンタリオ州)を用いて代表的な画像を20倍および40倍の倍率で記録した。Adobe PhotoshopでLevels Auto Correctionを用いて画像を最適化した。

10

【0472】

C S Fおよび脳抽出物

UBCのClinical Research Ethics Board(C04-0595)から承認を受け、メリーランド大学のBrain and Tissue Bankからヒト脳組織を入手した。UBC Hospital Clinic for Alzheimer's and Related Disordersで評価した患者からCSFを採取した。この試験はUBCのClinical Research Ethics Boardにより承認を受けたものであり、CSF試料を収集する前に参加者または法律上の近親者から書面による同意を得た。推定ADの臨床診断はNINCDS-ADRDA基準に基づくものとした。腰椎穿刺後1時間以内にCSFをポリプロピレンチューブに収集し、処理し、100μLポリプロピレンバイアルに等分し、-80で保管した。

20

【0473】

ホモジナイゼーション：ヒト脳組織試料の重量を測定し、次いで、脳組織の最終濃度が20%(w/v)になるよう一定量の新鮮な氷冷TBSおよびRoche Diagnostics社(ラヴェル、ケベック州、カナダ)の無EDTAプロテアーゼインヒビターカクテルに浸漬した。この緩衝液中で機械的プローブホモジナイザーを用いて組織をホモジナイズ(間に30秒の停止を挟んで3×30秒のパルス、いずれも氷上で実施)した。次いで、TBS中でホモジナイズした試料を超遠心分離にかけた(70,000×gで90分)。上清を収集し、等分し、-80℃で保管した。BCAタンパク質アッセイ(Pierce Biotechnology社、ロックフォード、イリノイ州、米国)を用いてTBSホモジネートのタンパク質濃度を求めた。

30

【0474】

CSF：ADを有するドナー9例およびADを有さないドナー9例からCSFをプールした。精製IgGを全抗体とも30マイクログラム/mlの濃度で用いて、試料をSPRにより解析した。マウスIgGを抗体対照として使用し、いずれの実験も少なくとも2回反復した。

40

【0475】

抗体6E10を用いてCSFおよび脳抽出物での陽性結合を確認した。

【0476】

SPR解析：AD患者の脳抽出物4例および同年齢の対照の脳抽出物4例をプールし解析した。TBS中でホモジナイズした脳試料には前頭皮質のブロードマン第9野が含まれていた。いずれの実験も、高強度レーザー光および高速光学式走査を用いて結合相互作用をリアルタイムでモニターする分析用バイオセンサーである、実施例6に記載のMolecular Affinity Screening System(MASS-1)(Sierra Sensors社、ハンブルク、ドイツ)を用いて実施した。本明細書に記載されるシクロペプチドに対して作製した精製抗体をプロテインA誘導体化センサーチップの別個のフローセル上に捕捉し、表面に希釈試料を180秒間注入し、次いで、緩衝

50

液で120秒間解離を実施し、表面を再生した。マウス対照 I g G 参照の表面結合およびアッセイ緩衝液の減算により結合応答を二重参照し、異なる試料のグループを比較した。

【0477】

結果

C S F 脳抽出物および免疫組織化学

いくつかのクローンを C S F、可溶性脳抽出物中での A ベータとの結合能について試験し、死体 A D 脳の組織試料を表 9 に示す。表 9 では陽性度がプラス印の数により示されている。

【0478】

表 9 および表 10 は、選択したクローンが本明細書に記載される S P R による測定でモノマーよりもオリゴマーに対して結合選択性を有することのデータとなる。

【0479】

表 9 には I H C の結果もまとめてあり、ここでは、「+ / -」は、アイソタイプ対照と類似した染色またはアイソタイプ対照と異なる染色であるが明確な斑形態はみられないことを表す。

【0480】

6 E 10 抗体 (A) でみられる陽性斑染色と比較して、クローン 304-47 (7 D 7) (B) では新鮮な凍結切片上に斑染色がみられない例を図 14 に示す。

【0481】

G G V V (配列番号 1) を含むシクロペプチドに対して生じさせた抗体が、対照の患者のものよりも高い度合で A D 患者の脳抽出物中の A ベータを結合する抗体を含むものであったことを図 15 に示す。

【0482】

表 9、10 および図 14 に示されるように、免疫原として G G V V (配列番号 1) を含むシクロペプチドを使用して、脳抽出物および / または C S F 中の A ベータに結合する産生させた抗体は、しかしながら、S P R ではモノマーとあまり結合せず、I H C による斑線維とあまり結合しなかった。

【0483】

【表 12】

表 9 : 結合特性のまとめ

表 9					
-----	--	--	--	--	--

	クローン番号	オリゴマー / モノマー	C S F A D / 非 A D	脳抽出物 A D / 非 A D	I H C 斑染色
シクロ (C G G G V V G) 配列番号 2)	38 (1B5)	++	-	+	-
	41 (3B8)	++	++	+	+/-
	47 (7D7)	+	+	+	-

* スコアリングは同じ試料カテゴリーで他のクローンに対して相対的なものである。

【0484】

【表 1 3】

表 1 0. モノマー結合を減算した A ベータオリゴマー結合 R U 値

被験クローン	304-41
RU	6.4

【0 4 8 5】

実施例 8

合成オリゴマー結合

共有結合で固定化した抗体との結合について市販の調製済み合成アミロイドベータオリゴマー（SynAging 社、ヴァンドゥーヴル＝レ＝ナンシー）の連続 2 倍希釈物（7.8 nM～2000 nM）を試験した。対照抗体 mAb 6 E 1 0 の結果を図 1 6 A に示し、マウス対照 I g G の結果を図 1 6 B に示す。シクロ（C G G G V V G）（配列番号 2）に対して生じさせた抗体を用いた結果を図 1 6 C に示す。

10

【0 4 8 6】

実施例 9

ホルマリン固定組織での免疫組織化学

シクロ（C G G G V V G）（配列番号 2）に対して生じさせた抗体を用いてヒト脳組織を評価した。患者はそれまでに、（i）老人斑および神経原線維濃縮体を示すビルショウスキー銀法、（i i）アミロイドを示すコンゴレッドならびに（i i i）濃縮体を示し老人斑が「神経突起性」であることを確認するタウ免疫組織化学法の 3 部よりなる方法でアルツハイマー病であることが特徴付けられ診断されていた。この組織を用いて、選択したモノクローナル抗体クローンの斑反応性を試験した。脳組織を 1 0 % 緩衝ホルマリンで数日間固定し、Sakura VIP 組織処理装置でパラフィン処理した。組織切片にマイクロ波による抗原回復（AR）を実施するか、または実施せずに、1 μg / ml の抗体で探索した。陽性対照として、汎アミロイドベータ反応性抗体 6 E 1 0 を選択した抗体クローンと同時にインキュベートした。抗体を抗体希釈剤（Ventana 社）で希釈し、OptiView DAB（Ventana 社）で発色させた。Ventana Benchmark XT IHC 染色装置で染色を実施した。Olympus BX 4 5 顕微鏡で画像を取得した。画像は神経病理学の専門知識を有する専門の病理学者が盲検的に解析した。

20

30

【0 4 8 7】

下の表 1 1 に示されるように、固定組織を用いると、被験抗体は抗原回復の有無を問わず、老人斑アミロイドの特異的染色が陰性であった。陽性対照には 6 E 1 0 を用いた。

【0 4 8 8】

【表 1 4】

表 1 1

老人斑アミロイドの特異的染色による有力な証拠

エピトープ	被験抗体	老人斑アミロイドの特異的染色による有力な証拠	
		AR 無し	AR 有り
304	41	陰性	陰性
	45	陰性	陰性
	47	陰性	陰性
	52 (12D7)	陰性	陰性
陽性対照	6E10	強い陽性	強い陽性

40

【0 4 8 9】

実施例 1 0

オリゴマー伝播の阻害

50

チオフラビンT (ThT) 結合アッセイを用いてアミロイドベータ ($A\beta$) 凝集に対する抗体の効果を検討することにより、その生物学的機能を *in vitro* で試験した。 $A\beta$ 凝集は、予め形成された小さい $A\beta$ オリゴマーの核によって誘導され、この核を介して伝播し、単量体 $A\beta$ から可溶性オリゴマー、次いで不溶性線維への全過程には同時に、ベータシート形成の増大が伴う。このことはベンゾチアゾール塩のThTによってモニターすることができ、ThTがベータシートに富む構造に結合すると、その励起および発光の最大値がそれぞれ385 nmから450 nmおよび445 nmから482 nmに遷移し、それにより蛍光が増大する。簡潔に述べれば、 $A\beta$ 1~42 (Bachem America社、トーランス、カリフォルニア州) を可溶化し、超音波処理し、トリス-EDTA緩衝液 (pH 7.4) で希釈し、黒色の96ウェルマイクロタイタープレート (Greiner Bio-One社、モンロー、ノースカロライナ州) のウェルに加え、これに等体積のシクロペプチドに対する抗体または無関係のマウスIgG抗体アイソタイプ対照を加え、 $A\beta$ 1~42 ペプチドと抗体のモル比を1:5とした。ThTを加え、プレートを室温で24時間インキュベートし、1時間毎にWallac Victor 3 v 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer社、ウォルサム、マサチューセッツ州) を用いてThT蛍光を測定し記録した。全ウェルからバックグラウンド緩衝液の蛍光読取り値を減算し、さらに、対応するウェルから抗体単独のウェルの読取り値を減算した。

10

【0490】

図17に示されるように、ThT蛍光によりモニターした $A\beta$ 42凝集は、蛍光が最小である最初の遅滞期、蛍光が急激に増大する対数期および最後に $A\beta$ 分子種が平衡状態にあり蛍光の増大がみられないプラトー期を特徴とするS字形を示した。 $A\beta$ 42と無関係のマウス抗体との共インキュベーションでは、凝集過程に対する有意な効果が全くみられなかった。これに対し、 $A\beta$ 42と被験抗体との共インキュベーションでは、凝集過程のいずれの期も阻害された。図17には抗体クローン47 (7D7; IgG1アイソタイプ) で得られた結果が示されている。ThT凝集アッセイは、ADの病理発生に極めて重要な $A\beta$ 伝播およびモノマー、オリゴマー、前原線維および線維からの $A\beta$ 凝集の *in vivo* の生物物理学的/生化学的段階を模倣するものであることから、シクロCGGVVG (配列番号2) に対して生じさせた抗体はこの過程を完全に打ち消す可能性を秘めている。マウスIgG対照を用いて実施したアイソタイプ対照では阻害はみられなかった。

20

30

【0491】

実施例11

アルツハイマー病の免疫療法に最適なプロファイルの達成：毒性 A ベータオリゴマーに特異的な抗体の合理的作製

目的：毒性アミロイド β オリゴマー ($A\beta$ O) に特異的な抗体を作製すること

背景：現時点での証拠から、 $A\beta$ Oの伝播性プリオン様株は、モノマーおよび線維とは対照的に、ニューロンに対して優先的に毒性を示し、アルツハイマー病 (AD) のタウ病態を誘発することが示唆される。さらに、臨床試験では、用量制限有害作用が $A\beta$ 線維認識と関係があることがわかっている。これらの観察結果から、安全性および有効性のためには毒性 $A\beta$ Oの特異的中和が望ましいものであり得ることが示唆される。

40

【0492】

設計/方法：本明細書に記載されるように、標準力場による分子動力学を用いてProtein Data Baseに蓄積されている $A\beta$ 線維の原子レベルの構造を攪乱するコンピュータシミュレーションを用いた。新生前原線維またはオリゴマーではわずかに安定な領域が露出する可能性が高いという仮説を立てた。オリゴマーにおいて提示される場合とモノマーまたは線維において提示される場合の抗原性プロファイルの差を定量化するクラスターリング解析、曲率、溶媒への露出、溶解度、二面角分布およびラマチャンドラン角分布をすべて用いて予測エピトープの立体配座特性を特徴付けた。局所的な $A\beta$ O立体配座を模倣し得る環状フォーマットで候補ペプチドエピトープを合成し、担体タンパク質とコンジュゲートし、マウスでのモノクローナル抗体作製に用いた。精製した抗体をSP

50

Rおよび免疫組織化学によりスクリーニングした。

【0493】

結果：

コグネイト構造化ペプチドおよび合成AβOを認識することが可能であり、非構造化ペプチド、リンカーペプチドまたはAβモノマーとはほとんどまたは全く結合しないことに基づき、5種類の予測エピトープに対するIgGクローンを66種類選択し精製した。さらなるスクリーニングにより、対照と比較してAD患者のCSFおよび脳抽出物中の天然の可溶性AβOと優先的に結合する抗体を特定した。AD脳の免疫組織化学的解析により、斑と反応しない抗体クローンを選択することができた。

【0494】

結論：コンピュータにより特定したAβOエピトープにより、天然のAD AβOと選択的に結合しモノマーにも線維にも有意な交差反応性を示さないという所望の標的プロファイルを有する抗体を作製することができた。

【0495】

実施例12

毒性阻害アッセイ

シクロペプチドに対して生じさせた抗体によるAベータ42オリゴマーの毒性の阻害をラット一次皮質ニューロンアッセイで試験することができる。

【0496】

抗体および対照IgGをそれぞれ2mg/mLなどの濃度に調節する。様々なモル比のAベータオリゴマーと抗体を溶媒対照、Aベータオリゴマー単独および神経保護ペプチドのヒューマニン（HNG）などの陽性対照とともに試験する。

【0497】

例示的設定を表12に示す。

【0498】

室温で10分間プレインキュベートした後、体積を培地で840マイクロリットルに調節する。この溶液を37℃で5分間インキュベートする。次いで、溶液を一次皮質ニューロンに直接添加し、細胞を24時間インキュベートする。MTT試験を用いて細胞生存率を求めることができる。

【0499】

【表15】

表12

AβO/ABモル比	AβO (μL)	AβO (μM)	AB (μM)	AB (μL)	培地 (μL)	最終体積 (μL)
5/1	1.68	4.2	0.84	12.73	185.6	200
1/1	1.68	4.2	4.20	63.64	134.7	200
1/2	1.68	4.2	8.4	127.27	71.1	200

AβO希釈標準溶液：2.2mg/mL-500μM

対照溶媒：オリゴマー緩衝液1.68μL+PBS 127.3μL+培地711μL

対照AβO：AβO 1.68μL+PBS 127.3μL+培地711μL

対照HNG：AβO 1.68μL+HNG 8.4μL（最終100nM）+PBS 127.3μL+培地702.6μL

【0500】

この試験は、Aベータオリゴマーの毒性の阻害を例証した304抗体クローン47を使用して行った。

【0501】

実施例13

in vivo 毒性阻害アッセイ

シクロペプチドに対して生じさせた抗体によるAベータ42オリゴマーの毒性の阻害をマウス行動試験でin vivoで試験することができる。

【0502】

マウスの脳室内（ICV）に注射する前に、抗体およびアイソタイプ対照をそれぞれAベータ42オリゴマーと2以上の様々なモル比で予め混合する。対照群には、溶媒単独を注射するマウス、オリゴマー単独を注射するマウス、抗体単独を注射するマウスおよび神経保護ペプチドのヒューマニンなどの陽性対照を注射するマウスを含める。あるいは、抗体をオリゴマーのICV注射前、注射時および／または注射後に全身投与してもよい。オリゴマーのICV注射から約4～7日後に開始して、マウス空間認識試験（SRT）、Y迷路試験、モーリス水迷路モデルおよび新奇物体認識モデル（NOR）などの学習および記憶に関する行動試験で認知を評価する。

【0503】

マウス空間認識試験（SRT）は、海馬機能の尺度である地理的記憶を評価するものである（SynAging社）。このモデルでは2チャンバの装置を使用し、この装置のチャンバは形状、模様および色が異なっている（すなわち、地理的差）。チャンバは透明なPlexiglass製の廊下で繋がっている。最初に個々のマウスを探索期の5分間、一方のチャンバにのみアクセスできる装置の中に入れておく。次いで、マウスをホームケージに30分間戻し、「選択」期の5分間、再び装置の中に入れ、その間、マウスは両方のチャンバにアクセスできる。正常な認知機能を有するマウスは前回探索したチャンバを記憶しており、新規なチャンバで費やす時間の方が長い。 $DI = (TN - TF) / (TN + TF)$ で識別指数（DI）を算出し、式中、TNは新規なチャンバで費やした時間の量であり、TFは馴染みのあるチャンバで費やす時間の量である。毒性AベータオリゴマーによりDIの低下が起こるが、ヒューマニン陽性対照により一部レスキューされ得る。ICV注射後の様々な時間におけるこの試験の成績を用いて、シクロペプチドに対して生じさせた抗体がAベータオリゴマー毒性をin vivoで阻害する可能性を評価することができる。

【0504】

Y迷路試験（SynAging社）は、主として前頭前皮質（作業記憶）および海馬（空間構成要素）が仲介する空間作業記憶の試験である。マウスが2本の腕を探索することができるY字形の迷路の中にマウスを置く。短期記憶が無傷なマウスは連続試行で交互に2本の腕に行く。毒性AベータオリゴマーをICV注射したマウスは認知に障害がみられ、ランダム値50%（これに対し正常個体は約70%）付近の交互のランダム行動を示す。この障害は、コリンエステラーゼ阻害剤ドネペジル（Aricept）またはヒューマニンによりそれぞれ部分的または全面的に正常に戻る。この試験により、被験抗体のAベータオリゴマー毒性に対する防御活性に関してまた別のin vivo評価ができる。

【0505】

モーリス水迷路はまた別の広く認められている認知モデルであり、主として海馬機能に依存する空間学習および長期地理的記憶を検討するものである（SynAging社）。マウスを複数回の試行で、不透明な水面の下に隠したプラットフォームを見つけるよう訓練する。プラットフォームの位置の想起に関するマウスの学習成績は、視覚的な手掛かりおよび記録したビデオに基づく。マウスを水に放ってからプラットフォームを見つけるまでの時間は着実に短縮され、これをマウスの学習速度とし、複数日にわたって測定する。認知が正常なマウスでは、プラットフォームを見つけるのに必要な時間が連日短縮される（学習）。長期記憶の解析には、訓練後に試験を複数日反復する。つまり、プラットフォームを取り去り、以前のプラットフォームの位置の上を横切る回数または最初に横切るまでの時間を長期記憶を評価する尺度として用いる。毒性AベータオリゴマーをICV注射したマウスは、学習および長期記憶の両方に欠陥がみられ、被験抗体の防御活性を評価す

るためのモデルとなる。

【0506】

新奇物体認識（NOR）モデルは、新奇な物体を既知の物体より有意に長い時間をかけて調べるといってげっ歯類の正常な行動を利用するものであり、この行動は主として嗅周皮質機能に依存する（SynAgging社）。習得試行でマウスまたはラットに2つの同一の物体を探索させる。短時間の試行間隔の後、一方の物体を新奇な物体に置き換える。動物を活動領域に戻し、各物体を能動的に探索して費やした時間を記録する。正常なげっ歯類は馴染みのある物体を思い出し、新奇な物体の方の探索に有意に長い時間を費やす。これに対し、Aベータオリゴマー処置したげっ歯類は明確な認知障害を示し、「馴染みのある」物体と「新奇な」物体の両方の探索に同程度の時間を費やす。これは、既知の臨床認知機能改善薬（例えば、ドネペジル）により一時的に正常に戻ることができる。NOR試験を縦断研究で複数回実施して、験抗体の認知に対する潜在的な有益性を評価することができる。

10

【0507】

行動試験に加え、脳組織を収集し、シナプスマーカー（PSD95、SNAP25、シナプトフィジン）および炎症マーカー（IL-1ベータ）のレベルを解析することができる。オリゴマーのICV注射から約14日後にマウスを屠殺し、生理食塩水を灌流する。海馬を収集し、急速凍結し、解析まで-80℃で保管する。ホモジナイズした試料のタンパク質濃度をBCAにより求める。ELISAキット（Cloud-Clone社、米国）を用いてシナプスマーカーの濃度を求める。シナプスマーカーは通常、Aベータオリゴマーを注射したマウスで25～30%減少し、ヒューマニン陽性対照により90～100%に回復する。IL-1ベータ炎症性マーカーの濃度は、Aベータオリゴマーを注射したマウスで約3倍になり、この増大はヒューマニンによって大幅に抑えられる。これらのアッセイは、被験抗体の防御活性に関する分子レベルでのまた別の尺度となる。

20

【0508】

実施例14

in vivo 伝播阻害アッセイ

Aベータ毒性オリゴマーのin vivoの伝播およびそれに関連する病態を様々なアルツハイマー病（AD）げっ歯類モデルで研究することができる。例えば、ヒトAPPのトランスジェニックマウス（例えば、APP23マウス）またはヒトAPPとPSEN1のトランスジェニックマウス（APP/PS1マウス）は高レベルのAベータを発現し、加齢とともに炎症および神経損傷を伴うアミロイド沈着が徐々にみられるようになる。オリゴマー含有脳抽出物の脳内接種によりこの過程（13、14）を大幅に加速させることができる。これらのモデルは、脳内または全身に投与した抗体によるAベータオリゴマー伝播の阻害を研究するためのシステムとなる。

30

【0509】

実施例15

CDRシーケンシング

IgG1重鎖とカッパ軽鎖とを有することが明らかになった304-7D7.1を重鎖および軽鎖のCDRおよび可変領域に選択した。

40

【0510】

5'RACEならびに適切なマウス免疫グロブリンの重鎖（IgG1/IgG3/IgG2A）および軽鎖（カッパ）の可変領域配列を増幅する遺伝子特異的逆方向プライマーを用いてRT-PCRを実施した。

【0511】

シーケンシング用に特異的バンドを切り取ってpCR-Blunt II-TOPOベクターにクローン化し、構築物を大腸菌（E. coli）に形質転換した。

【0512】

各鎖について少なくとも8種類のクローンを選定し、シーケンシングの前に増幅領域の有無についてPCRでスクリーニングした。選択したPCR陽性クローンにシーケンシ

50

グを実施した。

【0513】

CDR配列を表13に記載する。重鎖および軽鎖の可変部分のコンセンサスDNA配列およびタンパク質配列を表14に記載する。

【0514】

【表16】

表13

鎖	CDR	配列	配列番号
重鎖	CDR-H1	GFTFSNYW	17
	CDR-H2	IRLKSINYAT	18
	CDR-H3	LRWIDY	19
軽鎖	CDR-L1	QDINSY	20
	CDR-L2	RAN	21
	CDR-L3	PQYDEFPYT	22

【0515】

【表17】

表14

可変領域のコンセンサスDNA配列および翻訳タンパク質配列。相補性決定領域（CDR）にはIMTG/LIGM-DBに従って下線が施されている。

アイソタイプ	コンセンサスDNA配列	タンパク質配列
I g G 1 配列番号23、 24	ATGTATTTGGGACTGAACTGTGTATTCATAGTTTTCTCTTAAAA GGTGTCCAGAGTGAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTG GTGCAACCTGGAGGATCCATGAACTCTCCTGTGTTCCTCTGGA <u>TTCACTTTCACTAACTACTGG</u> ATGAACTGGGTCCGCCAGTCTCCA GAGAAGGGGCTTGAGTGGGTGCTGAAATTAGATTGAAATCTTAT <u>AATTATGCAACA</u> CATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTCAAC ATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAGTGTCTACCTGCAAATGAAC AACTTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTTTACGGTGG <u>ATCGACTACT</u> TGGGGCCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCAGCC AAAACGACA	MYLGLNCVFIVFLKLG VQSEVKLEESGGGLVQ PGGSMKLSCVAS <u>GFTF</u> <u>SNYWM</u> NWVRQSPKGL EWVAE <u>IRLKS</u> YNYATH YAESVKGRFTISRDDS KSSVYLQMNLRADDT GIYYC <u>LRWIDY</u> WGQGT TLTVSSAKTT
カッパ 配列番号 25、26	ATGGACATGAGGACCCCTGCTCAGTTTCTTGAATCTTGTGCTC TGGTTTCCAGGTATCAATGTGACATCAAGATGACCCAGTCTCCA TCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTATCACTTGC AAGGCGAGT <u>CAGGACATTAATAGCTAT</u> TTAAGCTGGTTCAGCAG AAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTGCAAACAGA TTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGG CAAGATTATTTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTATGAAGATATG GGAATTTATTAT <u>TGTCCACAGTATGATGAGTTTCCGTACACG</u> TTC GGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCTGATGCT	MDMRTPAQFLGILLW FPGIKCDIKMTQSPSS MYASLGERVTITCKAS <u>QDINSY</u> LSWFQKPGK SPKTLIY <u>RAN</u> RLVDGV PSRFSGSGSGQDYSLT ISSLEYEDMGIYY <u>CPQ</u> <u>YDEFPYT</u> FGGGTKLEI KRADA

【0516】

表15. Aベータエピトープ配列およびリンカーを有するAベータ配列

GGVV（配列番号1）

CGGGVVG、シクロ（CGGGVVG）（配列番号2）

CGGGVVG、C-PEG2-GGGVVG（配列番号3）

CGGGVVG、CGGGVVG-PEG2（配列番号4）

VGGV（配列番号5）

VGGVV（配列番号6）

VGGVVI（配列番号7）

GGVVI（配列番号8）

GGGVVG（配列番号9）

GGVVG（配列番号10）

GGGVV（配列番号11）

CGGGVVG（配列番号12）

A I I G L M V G G V V (配列番号 13)

M V G G V V (配列番号 14)

G G V V I A (配列番号 15)

【0517】

表 16

D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V
I A (配列番号 16)

【0518】

ここまで、現時点で好ましい例であると考えるものに関して本願を記載してきたが、本願は本開示の例に限定されないことを理解するべきである。これとは逆に、本願は、添付の請求項の趣旨および範囲に含まれる様々な改変および同等の構成を包含するものとする。

10

【0519】

刊行物、特許および特許出願はいずれも、個々の刊行物、特許または特許出願が具体的かつ個別にその全体が参照により組み込まれることが明記された場合と同じように、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。特に、例えば表またはその他の箇所に記載されるアクセッション番号および／またはバイオマーカー配列（例えば、タンパク質および／または核酸）を含めた本明細書に記載される各アクセッション番号に関連する配列は、その全体が参照により組み込まれる。

【0520】

請求項の範囲は、好ましい実施形態および実施例によって限定されるべきではなく、記載全体と一致する最も広い解釈がなされるべきである。

20

【0521】

(本明細書で参照される参考文献の引用)

[1] Gabriela A. N. Crespi, Stefan J. Hermans, Michael W. Parker, and Luke A. Miles. Molecular basis for mid-region amyloid- β capture by leading Alzheimer's disease immunotherapies SCIENTIFIC REPORTS | 5:9649, 2015 | DOI:10.1038/srep09649

30

[2] Vincent J. Hilser and Ernesto Freire. Structure-based calculation of the equilibrium folding pathway of proteins. correlation with hydrogen exchange protection factors. J. Mol. Biol., 262:756-772, 1996. The COREX approach.

[3] Samuel I. A. Cohen, Sara Linse, Leila M. Luheshi, Erik Hellstrand, Duncan A. White, Luke Rajah, Daniel E. Otzen, Michele Vendruscolo, Christopher M. Dobson, and Tuomas P. J. Knowles. Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110(24):9758-9763, 2013.

40

[4] Pietro Sormanni, Francesco A. Aprile, and Michele Vendruscolo. The camsol method of rational design of protein mutants with enhanced solubility. Journal of Molecular Biology, 427(2):478-490, 2015.

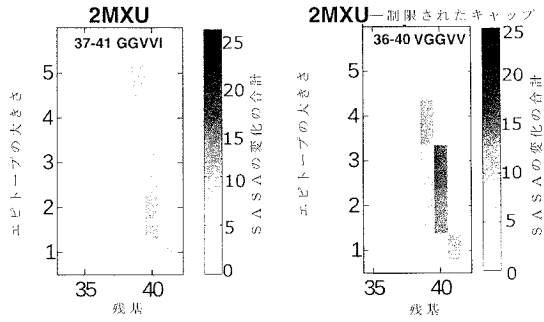
[5] Deborah Blacker, MD, ScD; Marilyn S. Albe

50

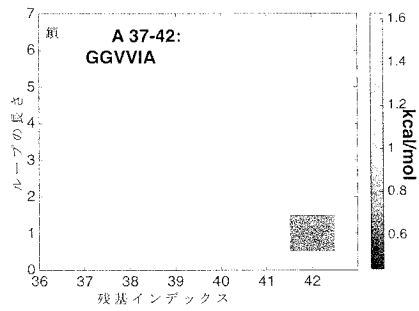
- rt, PhD; Susan S. Bassett, PhD; Rodney C. P. Go, PhD; Lindy E. Harrell, MD, PhD; Marshai F. Folstein, MD Reliability and Validity of NINCDS-ADRDA Criteria for Alzheimer's Disease The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. Arch Neurol. 1994; 51 (12) : 1198-1204. doi:10.1001/archneur.1994.00540240042014.
- [6] Hamley, I. W. PEG-Peptide Conjugates 2014; 15, 1543-1559; dx.doi.org/10.1021/bm500246w 10
- [7] Roberts, MJ et al Chemistry for peptide and protein PEGylation 64:116-127.
- [8] J. X. Lu, W. Qiang, W. M. Yau, C. D. Schwieters, S. C. Meredith, R. Tycko, MOLECULAR STRUCTURE OF BETA-AMYLOID FIBRILS IN ALZHEIMER'S DISEASE BRAIN TISSUE. CELL Vol. 154 p. 1257 (2013)
- [9] Y. Xiao, B. MA, D. McElheny, S. Parthasarathy, F. Long, M. Hoshi, R. Nussinov, Y. Ishii, A BETA (1-42) FIBRIL STRUCTURE ILLUMINATES SELF-RECOGNITION AND REPLICATION OF AMYLOID IN ALZHEIMER'S DISEASE. NAT. STRUCT. MOL. BIOL. Vol. 22 p. 499 (2015). 20
- [10] A. Petkova, W. Yau, R. Tycko EXPERIMENTAL CONSTRAINTS ON QUATERNARY STRUCTURE IN ALZHEIMER'S BETA-AMYLOID FIBRILS BIOCHEMISTRY V. 45 498 2006.
- [11] Paganetti PA, Lis M, Klafi HW, Staufenbiel M. Amyloid precursor protein truncated at any of the γ -secretase sites is not cleaved to β -amyloid, J. Neurosci. Res. 46 (1996) 283-293. 30
- [12] Weihofen A, Lemberg MK, Friedmann E, Rueeger H, Schmitz A, Pagnetti P, Rovelli G, Martoglio B. Targeting presenilin-type aspartic protease signal peptide peptidase with γ -secretase inhibitors. J Biol Chem. 2003; 278 (19), 16528-33.
- [13] Kahlert H, Weber B, Teppke M, Wahl R, Cromwell O, Fiebig H. Characterization of major allergens of Parietaria officinalis. Int Arch Allergy Immunol 1996 Feb; 109 (2) : 141 -9. 40

【図 1 - 1】

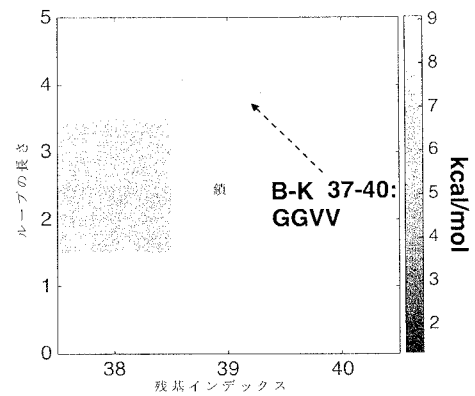
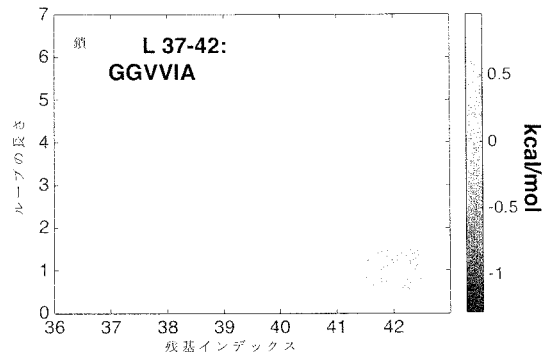
集団座標法および G_o 法を使用した予測
 パネル A: 集団座標の予測 (左: 不規則な線維;
 右: 制限されたエンドキャップを作る不規則な線維)



パネル B: G_o 予測



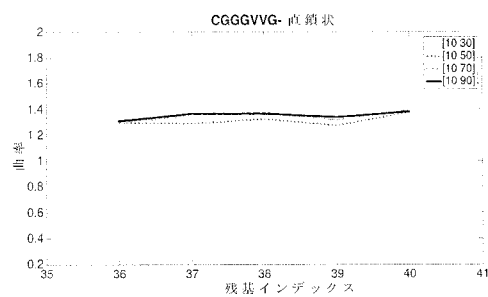
【図 1 - 2】



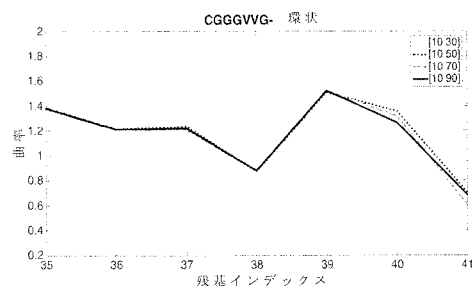
【図 2 - 1】

残基インデックスの間数としての曲率

パネル A

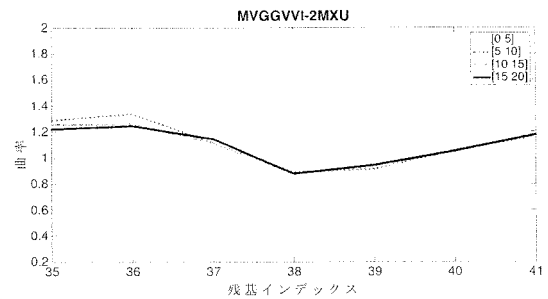


パネル B

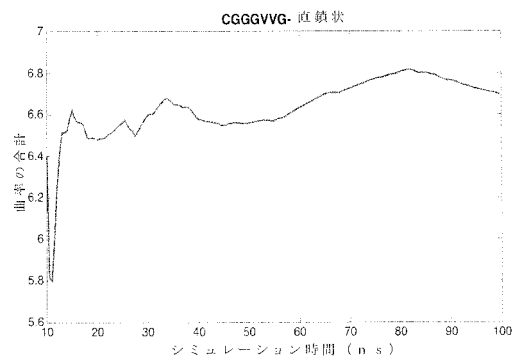


【図 2 - 2】

パネル C

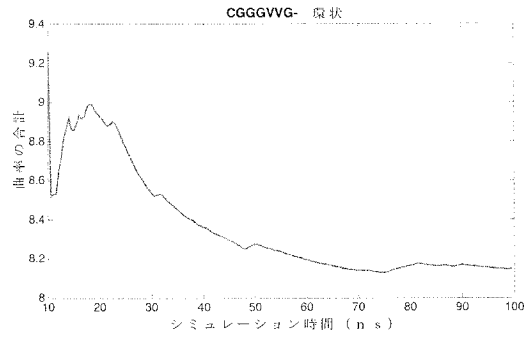


パネル D

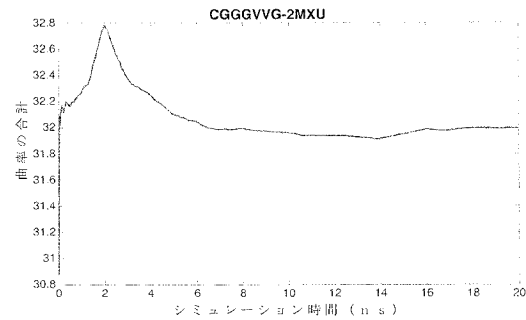


【図 2-3】

パネル E

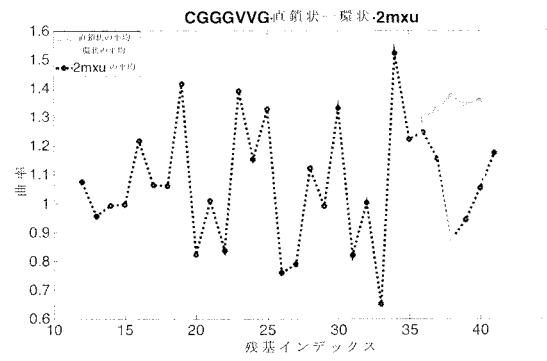


パネル D

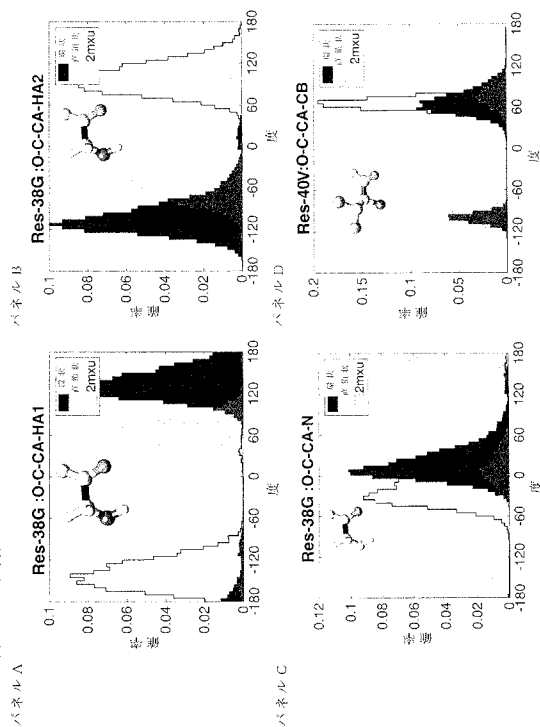


【図 2-4】

パネル G



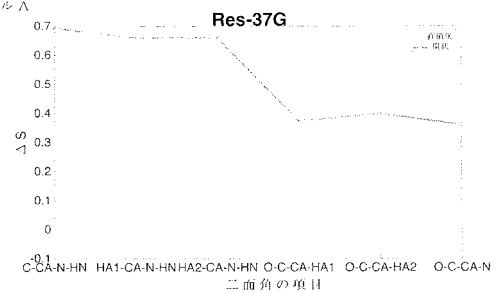
【図 3】



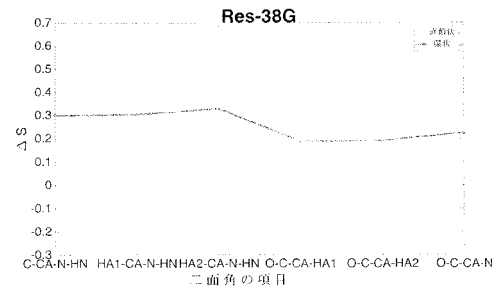
【図 4-1】

各残基のエントロピーの構成要素

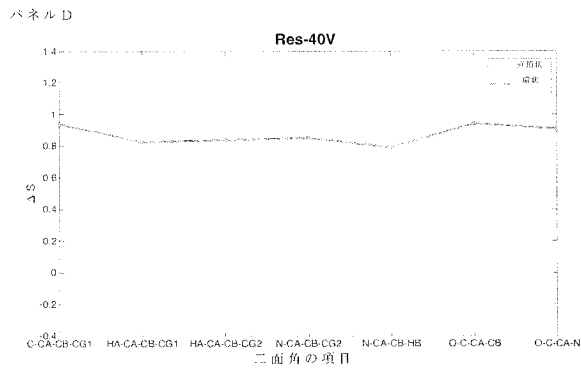
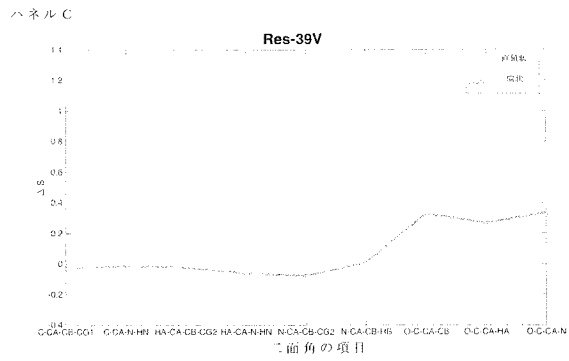
パネル A



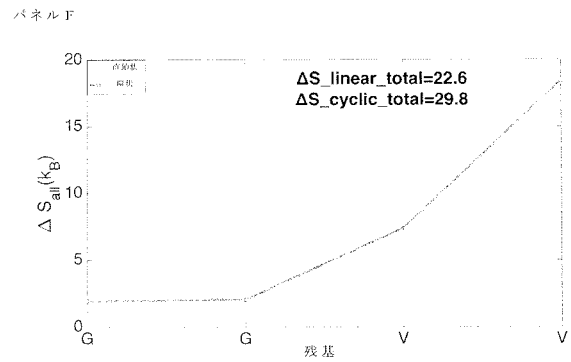
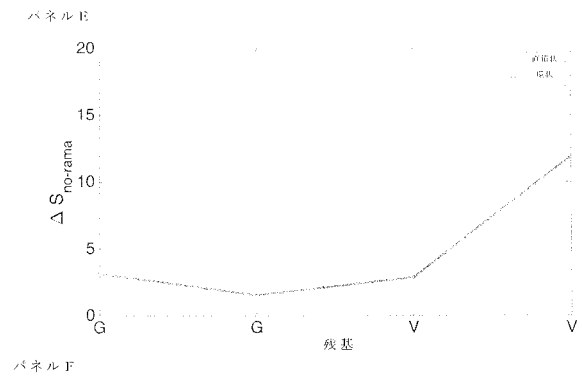
パネル B



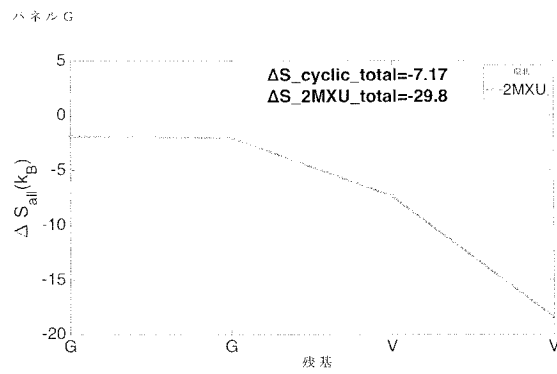
【図 4 - 2】



【図 4 - 3】



【図 4 - 4】



【図 5】

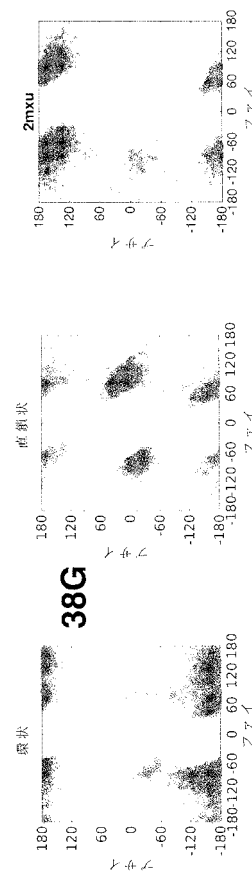
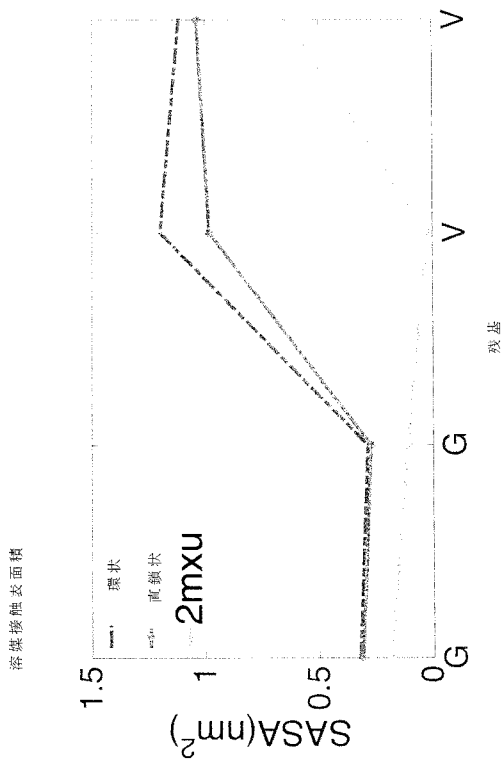


図 5 : 38G に関する正鎖のラマチャンドラン角

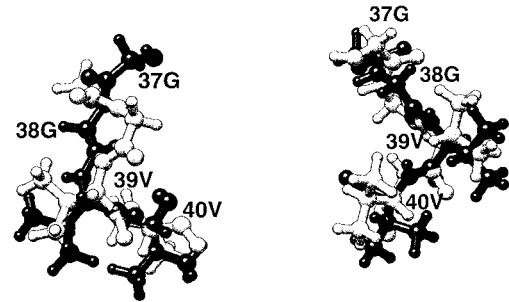
【図 6】



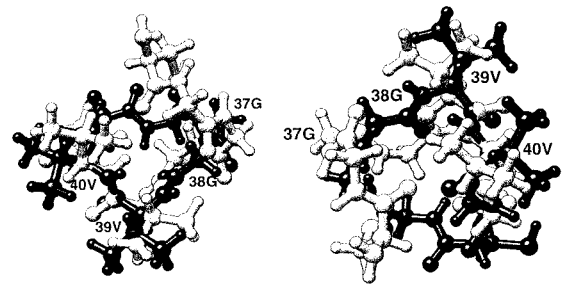
【図 7 - 1】

環状ペプチド（黒色）および直鎖状ペプチド（白色）の重畳中心

パネル A



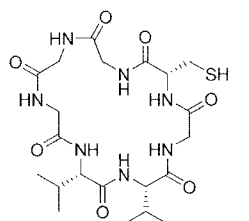
パネル B



【図 7 - 2】

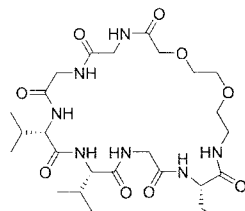
パネル C

シクロ (CGGGVVG)



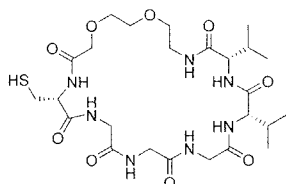
化学式 : $C_{21}H_{35}N_7O_7S$
分子量 : 529.61

シクロ (C-PEG2-GGVVG)



化学式 : $C_{25}H_{43}N_7O_9S$
分子量 : 617.72

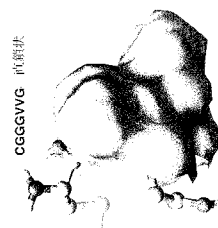
シクロ (CGGGVV-PEG2)



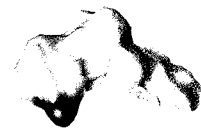
化学式 : $C_{25}H_{43}N_7O_9S$
分子量 : 617.72

【図 8】

エビトープGGVVの溶解後接触面積

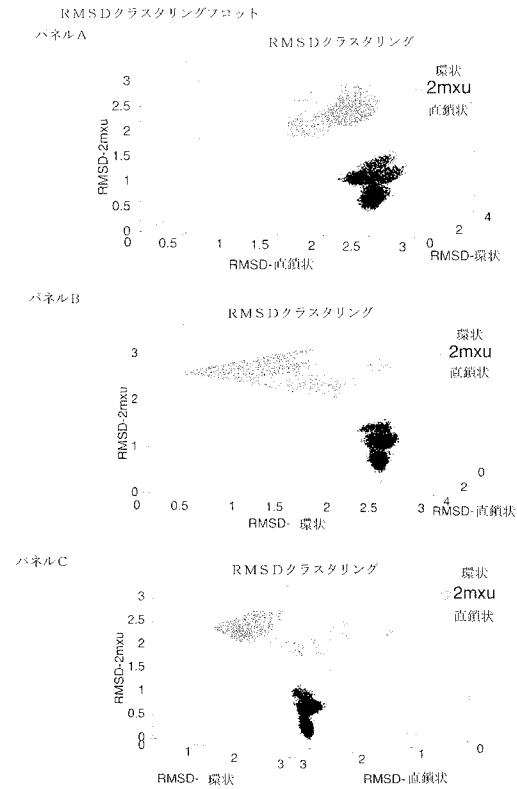


CGGGVVG-環状

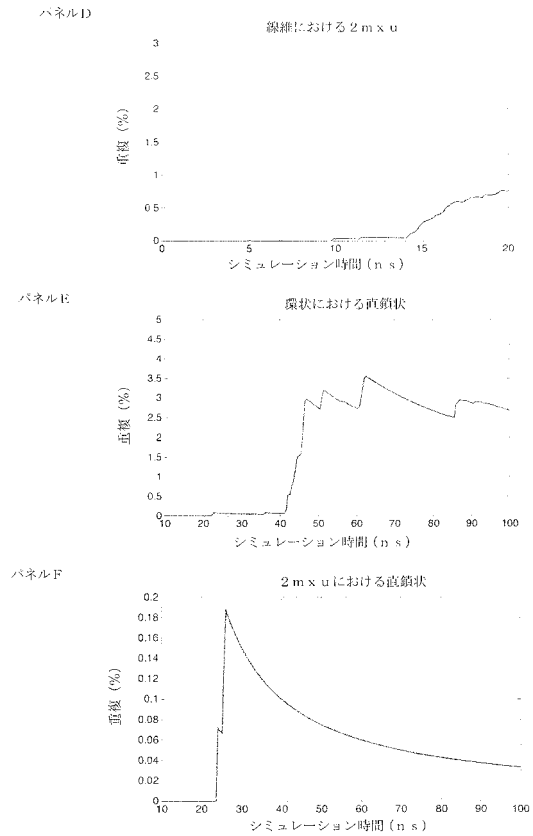


△ペプター4.0ポリペプチドのみに由来のGGVV, PDB 2M41からとられた構成

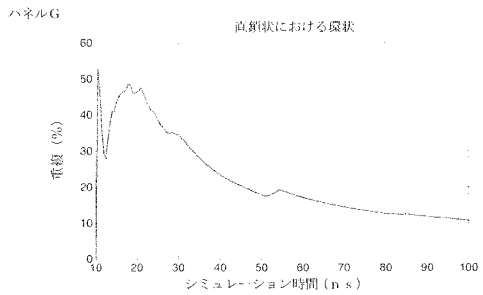
【図 9-1】



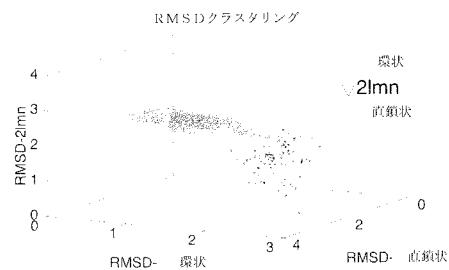
【図 9-2】



【図 9-3】

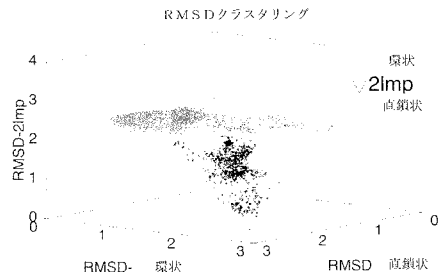
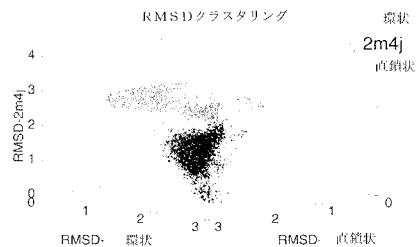


【図 10-2】

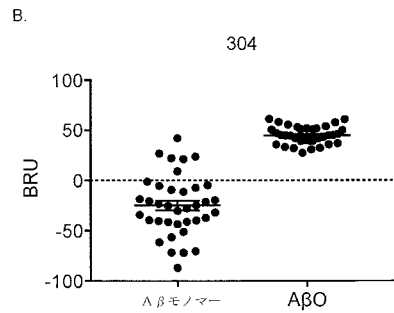
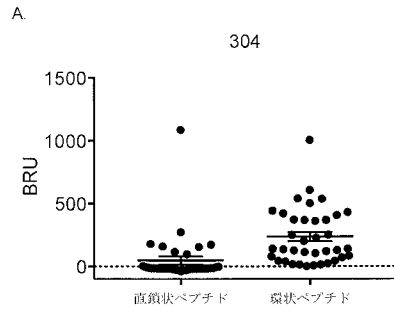


【図 10-1】

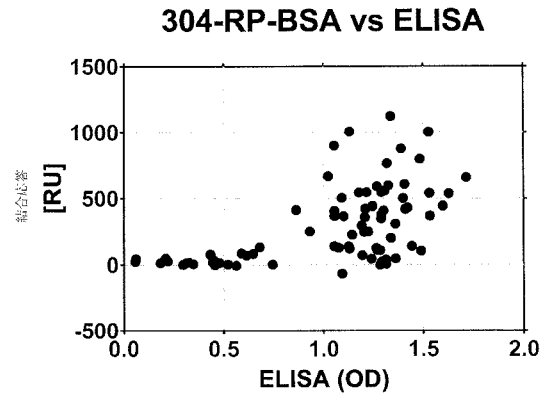
線維 2M4J、2LMN、および2LMPに関するRMSDクラスタリング



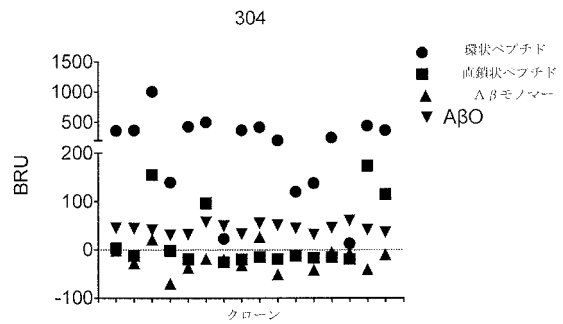
【図 1 1】



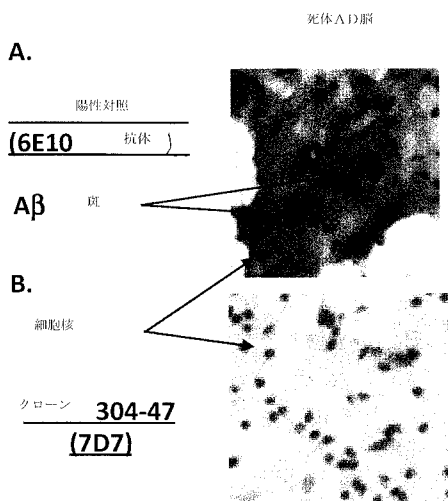
【図 1 2】



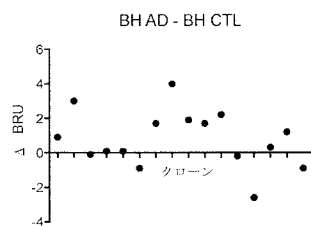
【図 1 3】



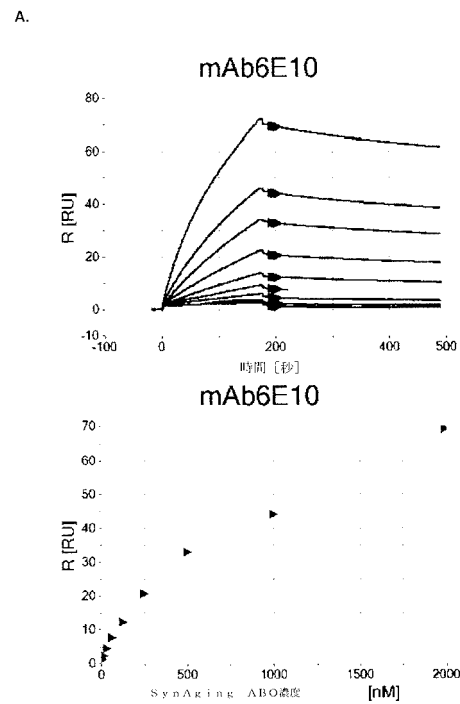
【図 1 4】



【図 1 5】

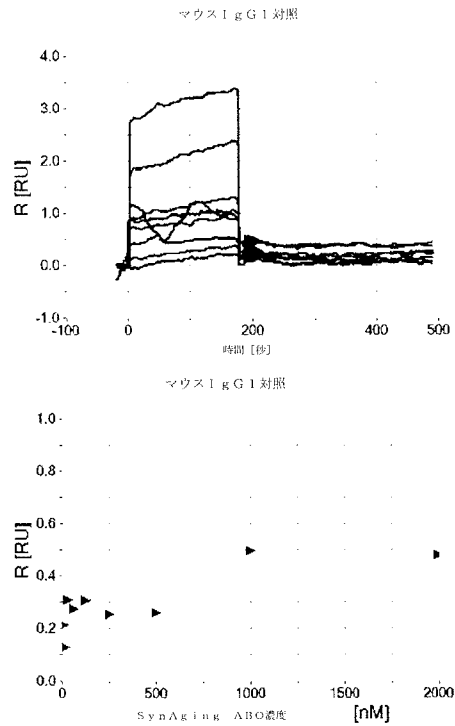


【図 1 6 - 1】



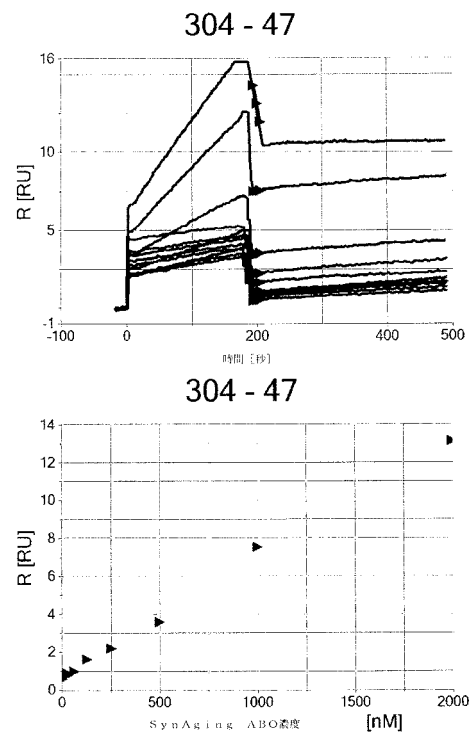
【図 16-2】

B.



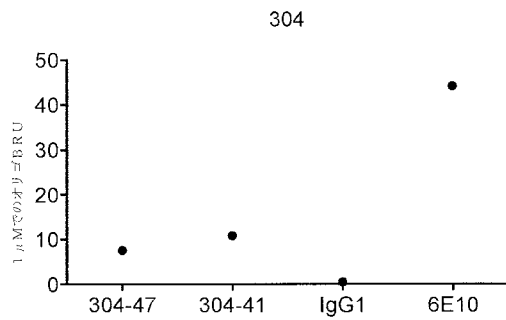
【図 16-3】

C.



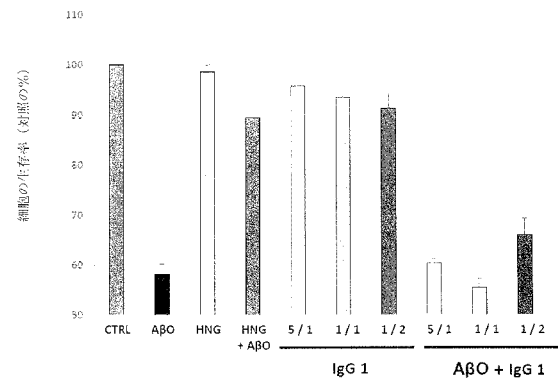
【図 16-4】

D.

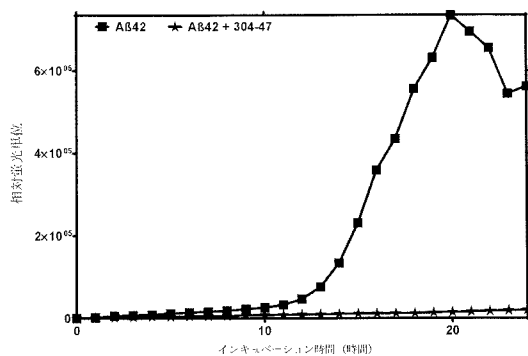


【図 18-1】

A.

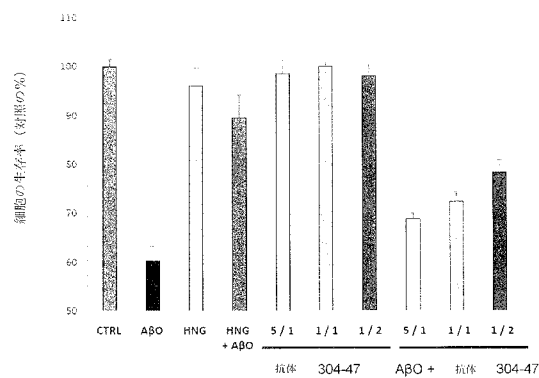


【図 17】



【図 1 8 - 2】

B.



【配列表】

2019505165000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年7月4日(2018.7.4)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2019505165000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2016/051301
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C07K 14/47</i> (2006.01), <i>A61K 39/00</i> (2006.01), <i>A61K 39/385</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61K 47/60</i> (2017.01), <i>A61K 47/68</i> (2017.01) (more IPCs on the last page) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(2006.01): <i>C07K 14/47</i> , <i>A61K 39/00</i> , <i>A61K 39/385</i> , <i>A61K 39/395</i> , <i>A61K 49/00</i> , <i>A61K 51/10</i> , <i>A61P 25/28</i> , <i>A61P 37/04</i> , <i>C07K 16/18</i> , <i>C07K 16/46</i> , <i>C07K 5/00</i> , <i>C07K 5/10</i> , <i>C07K 7/06</i> , <i>C07K 7/64</i> , <i>C12N 15/12</i> , <i>C12N 15/13</i> , <i>C12N 5/10</i> , <i>G01N 33/53</i> , <i>G01N 33/577</i>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases: Google, Google Patent, Google Scholar, NCBI, Questel Orbit, Canadian Patent Database, GenomeQuest Keywords: GVV, conformational, epitope, Alzheimer, cyclic, peptide, immune, improved, antibody		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/017900 (MILES, L.A. et al.) 12 February 2015 (12-02-2015) (Please see whole document particularly at pages 5, 16, 34, 45 and 48)	61, 63 and 64
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 23 January 2017 (23-01-2017)		Date of mailing of the international search report 25 January 2017 (25-01-2017)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Brad Temple (819) 576-2089

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2016/051301

A61K 49/00 (2006.01), *A61K 51/10* (2006.01), *A61P 25/28* (2006.01), *A61P 37/04* (2006.01),
C07K 16/18 (2006.01), *C07K 16/46* (2006.01), *C07K 5/00* (2006.01), *C07K 5/10* (2006.01),
C07K 7/06 (2006.01), *C07K 7/64* (2006.01), *C12N 15/12* (2006.01), *C12N 15/13* (2006.01),
C12N 5/10 (2006.01), *G01N 33/53* (2006.01), *G01N 33/577* (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2016/051301

Box No. 1	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13<i>ter</i>.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13<i>ter</i>.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13<i>ter</i>.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2016/051301

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. ☒ Claim Nos.: 52-60 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claims 52-60 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, which the International Searching Authority is not required to search under PCT Rule 39.1(iv). However, this Authority has carried out a search based on the alleged effect or purpose/use of the product as determined from the methods of claims 52-60. 2. ☐ Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. ☐ Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.: 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.: Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CA2016/051301

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2015017900A1	12 February 2015 (12-02-2015)	WO2015017900A1 AU2014305658A1 EP3030580A1 US2016194385A1	12 February 2015 (12-02-2015) 11 February 2016 (11-02-2016) 15 June 2016 (15-06-2016) 07 July 2016 (07-07-2016)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	4 C 0 8 6	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	4 C 0 8 7	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12		
A 6 1 K	38/12	(2006.01)	A 6 1 K	38/12		
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H	
A 6 1 K	47/62	(2017.01)	A 6 1 K	47/62		
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16		
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K	39/39		
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04		
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
A 6 1 K	51/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	
A 6 1 K	51/10	(2006.01)	A 6 1 K	51/00	2 0 0	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	51/10		
A 6 1 K	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	C	
A 6 1 K	31/711	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	L	
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	35/761	(2015.01)	A 6 1 K	31/7105		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/711		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/76		
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	35/761		
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	48/00		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
C 1 2 N	5/20	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
C 1 2 N	15/06	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y	
C 0 7 K	5/10	(2006.01)	A 6 1 K	47/68		
C 0 7 K	7/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/12		
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D	
			C 1 2 N	5/20		
			C 1 2 N	15/06	1 0 0	
			C 0 7 K	5/10		
			C 0 7 K	7/00		
			C 1 2 P	21/08		

(31)優先権主張番号 62/393,615

(32)優先日 平成28年9月12日(2016.9.12)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TWEEN

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 キャッシュマン, ニール アール.

カナダ国, ブリティッシュ コロンビア州 ブイ6エス 1エム8, バンクーバー, 3793 ウ
エスト キング エドワード アベニュー

(72)発明者 プロトキン, スティーブン エス.

カナダ国, ブリティッシュ コロンビア州 ブイ5ゼット 1シー3, バンクーバー, #408-
908 ダブリュー. 7番 アベニュー

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CA20 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA93Y AB01 AB02 BA02 BA08 CA24
CA25 CA44 CA45 CA46

4C076 AA95 BB11 BB40 CC01 CC06 CC07 EE41 EE59 FF68 FF70

4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA17 BA24 BA25 BA44 CA53 MA02

MA05 MA13 MA52 MA55 MA56 MA58 MA59 MA65 MA66 MA70

NA05 NA13 NA14 ZA161 ZB092 ZC412 ZC751

4C085 AA03 AA13 AA14 AA21 AA25 AA27 AA38 BB41 BB43 BB50

DD62 EE01 EE03 EE06 FF01 FF02 GG01 GG02 GG03 GG04

GG06 GG08 GG10 HH03 KA29 LL13 LL20

4C086 AA01 AA02 AA03 EA18 MA01 MA02 MA03 MA04 MA65 MA70

NA05 NA13 NA14 ZA16 ZB09 ZC41 ZC75

4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 BC83 CA05 CA12 MA02 MA05 MA65

MA70 NA05 NA13 NA14 ZA16 ZB09 ZC41 ZC75

4H045 AA11 AA20 AA30 BA30 BA31 BA57 CA40 EA20 EA50

专利名称(译)	淀粉样蛋白β的C末端表位及其构象选择性抗体		
公开(公告)号	JP2019505165A	公开(公告)日	2019-02-28
申请号	JP2018523026	申请日	2016-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	英属哥伦比亚大学		
申请(专利权)人(译)	不列颠哥伦比亚大学		
[标]发明人	キャッシュマンニールアール プロトキンスティーブンエス		
发明人	キャッシュマン,ニール アール. プロトキン,スティーブン エス.		
IPC分类号	C12N15/13 C07K7/64 C07K16/18 C07K16/46 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/12 A61K38/12 A61K39/00 A61K47/62 A61K38/16 A61K39/39 A61P37/04 A61P25/28 A61K39/395 A61K51/00 A61K51/10 A61K45/00 A61K31/7105 A61K31/711 A61K35/76 A61K35/761 A61K48/00 A61P43/00 A61K47/68 A61K35/12 G01N33/53 C12N5/20 C12N15/06 C07K5/10 C07K7/00 C12P21/08		
CPC分类号	A61K39/0007 A61K39/0008 A61K47/643 A61K47/646 A61K2039/6081 A61P25/28 A61P37/06 A61K39/00 A61K39/385 C07K1/36 C07K5/1008 C07K5/101 C07K7/06 C07K7/64 C07K14/4711 C07K16/18 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K5/00 C07K5/10 C07K14/47 G01N33/6896 G01N2333/4709 A61K51/1018 A61K2039/55505 A61K2039/6031		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K7/64 C07K16/18 C07K16/46 C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/12 A61K38/12 A61K39/00.H A61K47/62 A61K38/16 A61K39/39 A61P37/04 A61P25/28 A61K39/395.N A61K39/395.D A61K51/00.200 A61K51/10 A61K39/395.C A61K39/395.L A61K45/00 A61K31/7105 A61K31/711 A61K35/76 A61K35/761 A61K48/00 A61P43/00.121 A61P43/00.111 A61K39/395.Y A61K47/68 A61K35/12 G01N33/53.D C12N5/20 C12N15/06.100 C07K5/10 C07K7/00 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA45 4B065/CA46 4C076/AA95 4C076/BB11 4C076/BB40 4C076/CC01 4C076/CC06 4C076/CC07 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF68 4C076/FF70 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA24 4C084/BA25 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/MA02 4C084/MA05 4C084/MA13 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/MA70 4C084/NA05 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA161 4C084/ZB092 4C084/ZC412 4C084/ZC751 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA25 4C085/AA27 4C085/AA38 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF01 4C085/FF02 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4C085/HH03 4C085/KA29 4C085/LL13 4C085/LL20 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA18 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA03 4C086/MA04 4C086/MA65 4C086/MA70 4C086/NA05 4C086/NA13 4C086/NA14 4C086/ZA16 4C086/ZB09 4C086/ZC41 4C086/ZC75 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB65 4C087/BC83 4C087/CA05 4C087/CA12 4C087/MA02 4C087/MA05 4C087/MA65 4C087/MA70 4C087/NA05 4C087/NA13 4C087/NA14 4C087/ZA16 4C087/ZB09 4C087/ZC41 4C087/ZC75 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA30 4H045/BA31 4H045/BA57 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	62/253044 2015-11-09 US 62/352346 2016-06-20 US		

外部链接

Espacenet

摘要(译)

本公开涉及C末端表位，包括A β -特异性构象表位，其抗体以及制备和使用免疫原和其特异性抗体的方法。 [选型图]图1

