

(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2006-516535

(P2006-516535A)

(43) 公表日 平成18年7月6日(2006.7.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47 ZNA	4C084
A61K 39/00 (2006.01)	A61K 39/00 H	4C085
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	4H045
A61P 3/02 (2006.01)	A61K 39/395 N	
A61P 3/10 (2006.01)	A61P 3/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2004-536278 (P2004-536278)
 (86) (22) 出願日 平成15年9月12日 (2003. 9. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年4月27日 (2005. 4. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/028829
 (87) 国際公開番号 W02004/024090
 (87) 国際公開日 平成16年3月25日 (2004. 3. 25)
 (31) 優先権主張番号 60/410, 069
 (32) 優先日 平成14年9月12日 (2002. 9. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

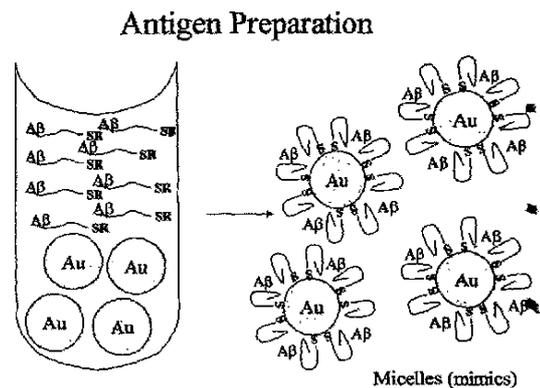
(71) 出願人 500210903
 ザ、リージェンツ、オブ、ザ、ユニバーシ
 ティ、オブ、カリフォルニア
 THE REGENTS OF THE
 UNIVERSITY OF CALIF
 ORNIA
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 946
 07、オークランド、フランクリン・スト
 リート 1111、トゥエルフス・フロア
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異なる配列のタンパク質から形成されたアミロイドに共通する高分子量凝集中間体に対して特異的な免疫原および対応する抗体

(57) 【要約】

アミロイドペプチド凝集体上に見出される一個以上の立体配座エピトープを含む問題の組成物、このようなエピトープに対する抗体、ならびにこれらの組成物、エピトープおよび/または抗体を作製および使用するための方法。本発明は、アミロイド疾患（例えばアルツハイマー病）に罹患しているか、またはそれを発症する可能性があるヒト患者または獣医学的患畜中に存在するペプチド凝集体（例えば毒性ペプチド凝集体）上に見出される特定の立体配座エピトープを含むか、またはそのようなエピトープからなる合成組成物または単離された組成物を含む。本発明は、このような組成物を使用したヒトまたは動物における疾患の検出、治療および予防のための方法を含む。本発明はさらに、この立体配座エピトープに結合する抗体だけでなく、このような抗体を作製するための方法、そしてこのような抗体を使用した疾患の検出、治療および予防のための方法ならびに/または潜在的治療剤の同定のための方法（例えば薬物スクリーニング）を含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

始原原線維凝集体の立体配座エピトープを含む単離された組成物であって、該始原原線維凝集体は a) ヒトまたは動物において形成し、かつ b) アミロイド原線維形成に寄与する組成物。

【請求項 2】

前記組成物は合成品である請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記組成物はペプチドを含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記ペプチドが立体配座的に拘束されている請求項 3 に記載の組成物。

10

【請求項 5】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 およびこれらの混合物からなる群から選択される請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記ペプチドが配列番号 1 である請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記組成物が表面によって支持されている請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記表面が湾曲または平坦である請求項 7 に記載の組成物。

20

【請求項 9】

前記表面が固体を含む請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記表面がフィルム、粒子またはシートの表面を含む請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記表面がタンパク質を含む請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記タンパク質が - プリーツシートを含む請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記組成物が前記支持体表面に結合している請求項 7 に記載の組成物。

30

【請求項 14】

前記組成物が前記支持体表面に化学的に結合している請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記化学的な結合が共有結合である請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記支持体が、金、亜鉛、カドミウム、錫、チタン、銀、セレン、ガリウム、インジウム、砒素、ケイ素、これらの混合物およびこれらの組合せからなる群から選択される材料を含む請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記始原原線維凝集体が約 1 k D a から約 1 0 0 , 0 0 0 , 0 0 0 k D a の範囲内の分子量を有する請求項 1 に記載の組成物。

40

【請求項 18】

前記始原原線維凝集体が 5 個以上のモノマーを含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記始原原線維凝集体が 8 個のモノマーを含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 20】

アミロイドペプチドモノマーが前記エピトープを実質的に含まない請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 21】

50

アミロイド原線維が前記エピトープを実質的に含まない請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記始原原線維凝集体が毒性種を含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記始原原線維凝集体が、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物中に存在する請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記疾患が、アルツハイマー病、ダウン症候群に関連する早期発症型アルツハイマー病、S A A アミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、多発性骨髄腫、ならびに狂牛病、ヒツジ・スクレイピーおよびミンク海綿状脳症を含む海綿状脳症、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、クールー病、致死性家族性不眠症、慢性消耗症候群、家族性アミロイド多発性神経症、前頭側頭型痴呆、I I 型糖尿病、全身性アミロイドーシス、血清アミロイドーシス、イギリス家族性痴呆、デンマーク家族性痴呆、黄斑変性および脳血管アミロイドーシスからなる群から選択される請求項 2 3 に記載の組成物。

10

【請求項 2 5】

前記疾患がアルツハイマー病である請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記組成物が医薬組成物である請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記組成物がワクチンである請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 2 8】

始原原線維凝集体のエピトープを含む単離された組成物であって、該始原原線維凝集体は、ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与し、前記アミロイド原線維は前記エピトープを実質的に含まない組成物。

【請求項 2 9】

前記組成物は合成品である請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

アミロイドペプチドモノマーが前記エピトープを実質的に含まない請求項 2 8 に記載の組成物。

30

【請求項 3 1】

前記組成物がペプチドを含む請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

前記ペプチドが立体配座的に拘束されている請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 およびこれらの混合物からなる群から選択される請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記ペプチドが配列番号 1 である請求項 3 1 に記載の組成物。

40

【請求項 3 5】

前記組成物が表面によって支持されている請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記表面が湾曲または平坦である請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記表面が固体を含む請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

前記表面がフィルム、粒子またはシートである請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記表面がタンパク質を含む請求項 3 5 に記載の組成物。

50

【請求項 40】

前記タンパク質が - プリーツシートを含む請求項 39 に記載の組成物。

【請求項 41】

前記組成物が前記支持体表面に結合している請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 42】

前記組成物が前記支持体表面に化学的に結合している請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 43】

前記化学的な結合が共有結合である請求項 42 に記載の組成物。

【請求項 44】

前記支持体が、金、亜鉛、カドミウム、錫、チタン、銀、セレン、ガリウム、インジウム、砒素、ケイ素、これらの混合物およびこれらの組合せからなる群から選択される材料を含む請求項 35 に記載の組成物。 10

【請求項 45】

前記始原原線維凝集体が約 1 kDa から約 100,000,000 kDa の範囲内の分子量を有する請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 46】

前記始原原線維凝集体が 5 個のモノマーを含む請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 47】

前記始原原線維凝集体が 8 個のモノマーを含む請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 48】

前記始原原線維凝集体が毒性種を含む請求項 28 に記載の組成物。 20

【請求項 49】

前記始原原線維凝集体が、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物中に存在する請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 50】

前記疾患が、アルツハイマー病、ダウン症候群に関連する早期発症型アルツハイマー病、SAA アミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、多発性骨髄腫、ならびに狂牛病、ヒツジ・スクレイピーおよびミンク海綿状脳症を含む海綿状脳症、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、クールー病、致死性家族性不眠症、慢性消耗症候群、家族性アミロイド多発性神経症、前頭側頭型痴呆、II 型糖尿病、全身性アミロイドーシス、血清アミロイドーシス、イギリス家族性痴呆、デンマーク家族性痴呆、黄斑変性および脳血管アミロイドーシスからなる群から選択される請求項 49 に記載の組成物。 30

【請求項 51】

前記疾患がアルツハイマー病である請求項 49 に記載の組成物。

【請求項 52】

前記組成物が医薬組成物である請求項 28 に記載の合成組成物。

【請求項 53】

前記組成物がワクチンである請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 54】

単離された抗体を含む組成物であって、該抗体は、ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集体の立体配座エピトープに結合する組成物。 40

【請求項 55】

前記抗体が前記始原原線維凝集体の毒性を低減させるのに有効である請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 56】

前記始原原線維凝集体が約 1 kDa から約 100,000,000 kDa の範囲内の分子量を有する請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 57】

前記始原原線維凝集体が 5 個のモノマーを含む請求項 54 に記載の組成物。 50

【請求項 58】

前記始原原線維凝集体が 8 個のモノマーを含む請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 59】

アミロイドペプチドモノマーが前記立体配座エピトープを実質的に含まない請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 60】

アミロイド原線維が前記エピトープを実質的に含まない請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 61】

前記始原原線維凝集体が毒性種を含む請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 62】

前記始原原線維凝集体が、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物中に存在する請求項 54 に記載の組成物。

10

【請求項 63】

前記疾患が、アルツハイマー病、ダウン症候群に関連する早期発症型アルツハイマー病、SAA アミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、多発性骨髄腫、ならびに狂牛病、ヒツジ・スクレイピーおよびミンク海綿状脳症を含む海綿状脳症、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、クールー病、致死性家族性不眠症、慢性消耗症候群、家族性アミロイド多発性神経症、前頭側頭型痴呆、II 型糖尿病、全身性アミロイドーシス、血清アミロイドーシス、イギリス家族性痴呆、デンマーク家族性痴呆、黄斑変性および脳血管アミロイドーシスからなる群から選択される請求項 62 に記載の組成物。

20

【請求項 64】

前記疾患がアルツハイマー病である請求項 62 に記載の組成物。

【請求項 65】

前記組成物が医薬組成物である請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 66】

単離された抗体を含む組成物であって、該抗体は、ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集体のエピトープに結合し、該アミロイド原線維は該エピトープを実質的に含まない組成物。

【請求項 67】

前記始原原線維凝集体が毒性種を含む請求項 66 に記載の組成物。

30

【請求項 68】

アミロイドペプチドモノマーが前記エピトープを実質的に含まない請求項 66 に記載の組成物。

【請求項 69】

前記抗体が前記始原原線維凝集体の毒性を低減させるのに有効である請求項 66 に記載の組成物。

【請求項 70】

前記始原原線維凝集体が約 1 kDa から約 100,000,000 kDa の範囲内の分子量を有する請求項 66 に記載の組成物。

40

【請求項 71】

前記始原原線維凝集体が 5 個のモノマーを含む請求項 66 に記載の組成物。

【請求項 72】

前記始原原線維凝集体が 8 個のモノマーを含む請求項 66 に記載の組成物。

【請求項 73】

前記始原原線維凝集体が、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物中に存在する請求項 66 に記載の組成物。

【請求項 74】

前記疾患が、アルツハイマー病、ダウン症候群に関連する早期発症型アルツハイマー病、SAA アミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、多発性骨髄腫、ならびに狂牛病、

50

ヒツジ・スクレイピーおよびミンク海綿状脳症を含む海綿状脳症、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、クーラー病、致死性家族性不眠症、慢性消耗症候群、家族性アミロイド多発性神経症、前頭側頭型痴呆、II型糖尿病、全身性アミロイドーシス、血清アミロイドーシス、イギリス家族性痴呆、デンマーク家族性痴呆、黄斑変性および脳血管アミロイドーシスからなる群から選択される請求項73に記載の組成物。

【請求項75】

前記疾患がアルツハイマー病である請求項73に記載の組成物。

【請求項76】

前記組成物が医薬組成物である請求項66に記載の組成物。

10

【請求項77】

ヒトまたは動物の被験体において疾患または症状を予防または治療する方法であって、該疾患または症状はアミロイド沈着の存在によって特徴付けられ、該方法は、

A. ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集体の立体配座エピトープを含む組成物の治療有効量または予防量を該被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項78】

工程Aが前記立体配座エピトープに対する免疫応答を誘導する工程を含む請求項77に記載の方法。

【請求項79】

前記組成物がペプチド成分を含む請求項77に記載の方法。

20

【請求項80】

前記ペプチドが立体配座的に拘束されている請求項79に記載の方法。

【請求項81】

前記ペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9およびこれらの混合物からなる群から選択される請求項79に記載の方法。

【請求項82】

前記ペプチドが配列番号1である請求項79に記載の方法。

【請求項83】

前記組成物が表面によって支持されている請求項77に記載の方法。

30

【請求項84】

前記表面が湾曲または平坦である請求項83に記載の方法。

【請求項85】

前記表面が固体を含む請求項83に記載の方法。

【請求項86】

前記表面がフィルム、粒子またはシートである請求項83に記載の方法。

【請求項87】

前記表面がタンパク質を含む請求項83に記載の方法。

【請求項88】

前記タンパク質が - プリーツシートを含む請求項86に記載の方法。

40

【請求項89】

前記組成物が前記支持体表面に結合している請求項83に記載の方法。

【請求項90】

前記組成物が前記支持体表面に化学的に結合している請求項83に記載の方法。

【請求項91】

前記化学的な結合が共有結合である請求項90に記載の方法。

【請求項92】

前記支持体が、金、亜鉛、カドミウム、錫、チタン、銀、セレン、ガリウム、インジウム、砒素、ケイ素、これらの混合物およびこれらの組合せからなる群から選択される材料を

50

含む請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記始原原線維凝集体が約 1 k D a から約 1 0 0 , 0 0 0 , 0 0 0 k D a の範囲内の分子量を有する請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記始原原線維凝集体が 5 個のモノマーを含む請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記始原原線維凝集体が 8 個のモノマーを含む請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 9 6】

アミロイドペプチドモノマーが前記エピトープを実質的に含まない請求項 7 7 に記載の方法。 10

【請求項 9 7】

アミロイド原線維が前記エピトープを実質的に含まない請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記始原原線維凝集体が毒性種を含む請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記始原原線維凝集体が、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物中に存在する請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記疾患が、アルツハイマー病、ダウン症候群に関連する早期発症型アルツハイマー病、 20
S A A アミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、多発性骨髄腫、ならびに狂牛病、ヒツジ・スクレイピーおよびミンク海綿状脳症を含む海綿状脳症、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、クールー病、致死性家族性不眠症、慢性消耗症候群、家族性アミロイド多発性神経症、前頭側頭型痴呆、I I 型糖尿病、全身性アミロイドーシス、血清アミロイドーシス、イギリス家族性痴呆、デンマーク家族性痴呆、黄斑変性および脳血管アミロイドーシスからなる群から選択される請求項 9 9 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記疾患がアルツハイマー病である請求項 9 9 に記載の組成物。

【請求項 1 0 2】 30

前記組成物がワクチンである請求項 7 7 に記載の組成物。

【請求項 1 0 3】

ヒトまたは動物において、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患または症状を予防または治療する方法であって、該方法は、

A . ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集体のエピトープを含む組成物の治療有効量または予防量を該被験体に投与する工程を含み、

該アミロイド原線維は該エピトープを実質的に含まない方法。

【請求項 1 0 4】

工程 A が前記立体配座エピトープに対する免疫応答を誘導する工程を含む請求項 1 0 3 に 40
記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記アミロイドペプチドモノマーが前記エピトープを実質的に含まない請求項 1 0 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

前記組成物がペプチド成分を含む請求項 1 0 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記ペプチドが立体配座的に拘束されている請求項 1 0 6 に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

前記ペプチドが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列 50

番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9 およびこれらの混合物からなる群から選択される請求項 106 に記載の方法。

【請求項 109】

前記ペプチドが配列番号 1 である請求項 106 に記載の方法。

【請求項 110】

前記組成物が表面によって支持されている請求項 103 に記載の方法。

【請求項 111】

前記表面が湾曲または平坦である請求項 110 に記載の方法。

【請求項 112】

前記表面が固体を含む請求項 110 に記載の方法。

10

【請求項 113】

前記表面がフィルム、粒子またはシートである請求項 110 に記載の方法。

【請求項 114】

前記表面がタンパク質を含む請求項 110 に記載の方法。

【請求項 115】

前記タンパク質が - プリーツシートを含む請求項 114 に記載の方法。

【請求項 116】

前記組成物が前記支持体に結合している請求項 110 に記載の方法。

【請求項 117】

前記組成物が前記支持体に化学的に結合している請求項 110 に記載の方法。

20

【請求項 118】

前記化学的な結合が共有結合である請求項 117 に記載の方法。

【請求項 119】

前記支持体が、金、亜鉛、カドミウム、錫、チタン、銀、セレン、ガリウム、インジウム、砒素、ケイ素、これらの混合物およびこれらの組合せからなる群から選択される材料を含む請求項 110 に記載の方法。

【請求項 120】

アミロイド原線維が前記エピトープを実質的に含まない請求項 103 に記載の方法。

【請求項 121】

前記始原原線維凝集体が約 1 k D a から約 100,000,000 k D a の範囲内の分子量を有する請求項 103 に記載の方法。

30

【請求項 122】

前記始原原線維凝集体が 5 個のモノマーを含む請求項 103 に記載の方法。

【請求項 123】

前記始原原線維凝集体が 8 個のモノマーを含む請求項 103 に記載の方法。

【請求項 124】

前記始原原線維凝集体が毒性種を含む請求項 103 に記載の方法。

【請求項 125】

前記始原原線維凝集体が、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物中に存在する請求項 103 に記載の方法。

40

【請求項 126】

前記疾患が、アルツハイマー病、ダウン症候群に関連する早期発症型アルツハイマー病、S A A アミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、多発性骨髄腫、ならびに狂牛病、ヒツジ・スクレイピーおよびミンク海綿状脳症を含む海綿状脳症、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、クーラー病、致死性家族性不眠症、慢性消耗症候群、家族性アミロイド多発性神経症、前頭側頭型痴呆、I I 型糖尿病、全身性アミロイドーシス、血清アミロイドーシス、イギリス家族性痴呆、デンマーク家族性痴呆、黄斑変性および脳血管アミロイドーシスからなる群から選択される請求項 125 に記載の方法。

【請求項 127】

50

前記疾患がアルツハイマー病である請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記組成物がワクチンである請求項 1 0 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

ヒトまたは動物の被験体において、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患または症状を予防または治療する方法であって、該方法は、

A . ヒトまたは動物において形成して原線維形成に寄与する始原原線維凝集体の立体配座エピトープに抗体を結合させる工程を含む方法。

【請求項 1 3 0】

工程 A が治療有効量または予防量の抗体を前記被験体に投与する工程を含む請求項 1 2 9 に記載の方法。 10

【請求項 1 3 1】

前記始原原線維凝集体が毒性種を含む請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記抗体が前記始原原線維凝集体の毒性を低減させるのに有効である請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記始原原線維凝集体が約 1 k D a から約 1 0 0 , 0 0 0 , 0 0 0 k D a の範囲内の分子量を有する請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記始原原線維凝集体が 5 個のモノマーを含む請求項 1 2 9 に記載の方法。 20

【請求項 1 3 5】

前記始原原線維凝集体が 8 個のモノマーを含む請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

アミロイドペプチドモノマーが前記エピトープを実質的に含まない請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

アミロイド原線維が前記エピトープを実質的に含まない請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記始原原線維凝集体が、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物中に存在する請求項 1 2 9 に記載の方法。 30

【請求項 1 3 9】

前記疾患が、アルツハイマー病、ダウン症候群に関連する早期発症型アルツハイマー病、S A A アミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、多発性骨髄腫、ならびに狂牛病、ヒツジ・スクレイピーおよびミンク海綿状脳症を含む海綿状脳症、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、クールー病、致死性家族性不眠症、慢性消耗症候群、家族性アミロイド多発性神経症、前頭側頭型痴呆、I I 型糖尿病、全身性アミロイドーシス、血清アミロイドーシス、イギリス家族性痴呆、デンマーク家族性痴呆、黄斑変性および脳血管アミロイドーシスからなる群から選択される請求項 1 3 8 に記載の方法。 40

【請求項 1 4 0】

前記疾患がアルツハイマー病である請求項 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記組成物が、脊髄内投与、髄腔内投与、経口投与、経皮投与、肺投与、静脈内投与、皮下投与、経鼻投与、動脈内投与、頭蓋内投与、皮内投与、腹腔内投与、筋内投与、直腸投与および口腔投与からなる群から選択される方法によって投与される請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

ヒトまたは動物の被験体において、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患または症状を予防または治療する方法であって、該方法は、 50

A．単離された抗体をヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集体のエピトープに結合させる工程を含み、

該アミロイド原線維は該エピトープを実質的に含まない方法。

【請求項 1 4 3】

工程 A が治療有効量または予防量の抗体を前記被験体に投与する工程を含む請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記始原原線維凝集体が約 1 k D a から約 1 0 0 , 0 0 0 , 0 0 0 k D a の範囲内の分子量を有する請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記始原原線維凝集体が 5 個のモノマーを含む請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

前記始原原線維凝集体が 8 個のモノマーを含む請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記始原原線維凝集体が毒性種を含む請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

前記抗体が前記始原原線維凝集体の毒性を低減させるのに有効である請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

アミロイド原線維が前記エピトープを実質的に含まない請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

前記始原原線維凝集体が毒性種を含む請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

前記始原原線維凝集体が、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物中に存在する請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

前記疾患が、アルツハイマー病、ダウン症候群に関連する早期発症型アルツハイマー病、S A A アミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、多発性骨髄腫、ならびに狂牛病、ヒツジ・スクレイピーおよびミンク海綿状脳症を含む海綿状脳症、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、クールー病、致死性家族性不眠症、慢性消耗症候群、家族性アミロイド多発性神経症、前頭側頭型痴呆、I I 型糖尿病、全身性アミロイドーシス、血清アミロイドーシス、イギリス家族性痴呆、デンマーク家族性痴呆、黄斑変性および脳血管アミロイドーシスからなる群から選択される請求項 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

前記疾患がアルツハイマー病である請求項 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

前記組成物が、脊髄内投与、髄腔内投与、経口投与、経皮投与、肺投与、静脈内投与、皮下投与、経鼻投与、動脈内投与、頭蓋内投与、皮内投与、腹腔内投与、筋内投与、直腸投与および口腔投与からなる群から選択される方法によって投与される請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

抗体を作製する方法であって、該方法は、

A．ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集体の立体配座エピトープを得る工程を含む方法。

【請求項 1 5 6】

工程 A がヒトまたは動物から前記抗体を回収する工程を含む請求項 1 5 5 に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

抗体を作製する方法であって、該方法は、

A．ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集

10

20

30

40

50

体のエピトープを含む組成物をヒトまたは動物に投与する工程を含み、
該アミロイド原線維は該エピトープを実質的に含まない方法。

【請求項 1 5 8】

工程 A が前記ヒトまたは動物から前記抗体を回収する工程を含む請求項 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を診断する方法であって、該方法は、

A . ヒトまたは動物の患者由来の組織または流体と、ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集体の立体配座エピトープに結合する抗体を含む組成物とを混合する工程を含む方法。

10

【請求項 1 6 0】

前記疾患がアルツハイマー病である請求項 1 5 9 に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

前記組織または流体が脳脊髄液である請求項 1 5 9 に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を診断する方法であって、該方法は、

A . ヒトまたは動物の患者由来の組織または流体と、ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集体のエピトープに結合する抗体を含む組成物とを混合する工程を含み、

該アミロイド原線維は該エピトープを実質的に含まない方法。

20

【請求項 1 6 3】

前記疾患がアルツハイマー病である請求項 1 6 2 に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

前記組織または流体が脳脊髄液である請求項 1 6 2 に記載の方法。

【請求項 1 6 5】

アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物の治療方法の有効性を評価する方法であって、該方法は、

A . 薬剤での治療の前に、ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集体の立体配座エピトープに特異的な抗体の、患者由来の組織サンプル中におけるベースライン量を決定する工程、および

30

B . 前記薬剤での治療後の該被験体由来の該組織サンプル中の該抗体の量を、該抗体のベースライン量と比較する工程を含む方法。

【請求項 1 6 6】

前記治療後に測定されて前記抗体のベースライン量と比較された前記抗体の量の低下またはそれらの間の有意な差異の欠如がネガティブな治療結果を示す請求項 1 6 5 に記載の方法。

【請求項 1 6 7】

前記治療後に測定されて前記抗体のベースライン量と比較された前記抗体の有意に大きい量がポジティブな治療結果を示す請求項 1 6 5 に記載の方法。

【請求項 1 6 8】

前記抗体の量が抗体力価として測定される請求項 1 6 5 に記載の方法。

40

【請求項 1 6 9】

前記抗体の量が E L I S A アッセイによって測定される請求項 1 6 5 に記載の方法。

【請求項 1 7 0】

アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物の治療方法の効力を評価する方法であって、該方法は、

A . 薬剤での治療の前に、ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集体のエピトープに特異的な抗体の、患者由来の組織サンプル中におけるベースライン量を決定する工程であって、該アミロイド原線維は該エピトープを実質的に含まない工程、

50

B．前記薬剤での治療後の該被験体由来の該組織サンプル中の該抗体の量を、該抗体のベースライン量と比較する工程を含む方法。

【請求項 171】

前記治療後に測定されて前記抗体のベースライン量と比較された前記抗体の量の低下またはそれらの間の有意な差異の欠如がネガティブな治療結果を示す請求項 170 に記載の方法。

【請求項 172】

前記治療後に測定されて前記抗体のベースライン量と比較された前記抗体の有意に大きい量がポジティブな治療結果を示す請求項 170 に記載の方法。

【請求項 173】

前記抗体の量が抗体力価として測定される請求項 170 に記載の方法。

【請求項 174】

前記抗体の量が E L I S A アッセイによって測定される、請求項 170 に記載の方法。

【請求項 175】

アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を検出するのに有用な診断キットであって、該キットは、ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集体の立体配座エピトープに結合する抗体を含有する組成物を含むキット。

【請求項 176】

アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を検出するのに有用な診断キットであって、該キットは、ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集体のエピトープに結合する抗体を含む単離された組成物を含み、該アミロイド原線維は該エピトープを実質的に含まないキット。

【請求項 177】

試験物質のアミロイドオリゴマー中間体の形成を阻害する能力を評価するための方法であって、該方法は、

A．該試験物質およびアミロイドペプチドを含む第 1 の混合物を調製する工程；

B．任意の阻害効果の非存在下、且つアミロイドオリゴマー中間体が該アミロイドペプチドから形成される条件下で、該第 1 の混合物を定温放置する工程；

C．工程 B からの該定温放置された混合物と、該オリゴマー中間体の立体配座エピトープを認識する抗体とを混合することによって、第 2 の混合物を調製する工程；及び

D．該オリゴマー中間体の立体配座エピトープに対する該抗体の結合に基づいて、形成されたオリゴマー中間体の量を決定する工程を含む方法。

【請求項 178】

工程 D が E L I S A によって実施される請求項 177 に記載の方法。

【請求項 179】

試験物質のアミロイドオリゴマー中間体の分解、解離または実質的な破壊を引き起こす能力を評価するための方法であって、該方法は、

A．アミロイドオリゴマー中間体および該試験物質を含む第 1 の混合物を調製する工程；

B．工程 A からの該混合物と、該オリゴマー中間体の立体配座エピトープを認識する抗体とを混合することによって、第 2 の混合物を調製する工程；及び

C．該第 2 の混合物中に残留する該オリゴマー中間体の立体配座エピトープに対する該抗体の結合に基づいて、分解、解離または実質的な破壊を受けていないアミロイドオリゴマー中間体の量を決定する工程を含む方法。

【請求項 180】

工程 C が E L I S A によって実施される請求項 178 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般に、医学、免疫学およびタンパク質生化学の分野に関し、より詳しくは、

10

20

30

40

50

アミロイド疾患の診断、治療および/またはモデリングにおいて有用な特定の抗原性組成物および抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

多くの生物学的機能の少なくとも一部は、タンパク質の種々の配列依存的な構造をとる能力に起因して生じている。しかし、特定のタンパク質配列は、アミロイド原線維として知られている異常な折り畳み構造の不溶性凝集体をしばしば形成し得る。これらのアミロイド原線維は、遺伝起源、感染起源および/または自発起源の種々のアミロイド疾患の病原に關与すると考えられ、アミロイド疾患は、海綿状脳症、アルツハイマー病、パーキンソン病、I I型糖尿病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン病、おそらく黄斑变性、種々のプリオン病および多数の他の疾患を含む。これらのアミロイド疾患の内の少なくともいくつかにおいて、アミロイド原線維はアミロイド斑の発生を引き起こす。

10

【0003】

アミロイドペプチドは、アミロイド斑の主な構成成分である。アルツハイマー病の場合、これらのペプチドは、A ペプチドまたは - アミロイドペプチドと称される。A ペプチドは、アミロイド前駆タンパク質 (APP) の39~43アミノ酸の内部フラグメントである。APPタンパク質内のいくつかの変異がADの存在と相関している。例えば、ゴータら (Goate et al.)、Nature (1991) 第349巻、704頁 (パリソからイソロイシンへ) ; シャルティエ ハーランら (Chartier Harlan et al.)、Nature (1991) 第353巻、844頁 (パリソからグリシンへ) ; ミュレルら (Murrell et al.)、Science (1991) 第254巻、97頁 (パリソからフェニルアラニンへ) ; ミュランら (Mullan et al.)、Nature Genet. (1992) 第1巻、345頁 (リジン595 - メチオニン596 からアスパラギン595 - ロイシン596 に変化する二重変異) を参照のこと。このような変異は、APPからAへの増大または変更されたプロセシングを生じることによって、ADを引き起こすと考えられている。特に、より長い形態のA、例えばA1-42およびA1-43の蓄積を生じるAPPのプロセシングは、ADの原因において重要であると考えられている。他の遺伝子 (例えば、プレセニリン遺伝子PS1およびPS2) における変異は、APPのプロセシングに間接的に影響を与えて、長い形態のAの産生を生じると考えられている。例えば、ハーディ (Hardy)、TIN S (1997) 第20巻、154頁を参照のこと。

20

30

【0004】

欧州特許公報第EP526,511号 (マクマイケル (McMichael)) およびPCT国際特許公開第WO/9927944号 (シェンク (Schenk)) は、アルツハイマー病の治療または予防のための患者へのA の投与を記載している。しかし、トランスジェニックマウスへのA の能動免疫は見かけの利益を生じるものの、このアプローチをAD患者へと拡大したところ、何人かの被験者において中枢神経系の望ましくない炎症が生じた。ハーディ (Hardy)、ディー、ジェイ セルコー (D. J. Selkoe) (2002) Science 第297巻、353~356頁を参照のこと。

【0005】

可溶性A には、A モノマー、並びに始原原線維凝集体 (protofibrillar aggregates) と称されるこのようなモノマーの凝集体が含まれる。これらの始原原線維凝集体は、アミロイド原線維の発生を生じる。ヒト脳の可溶性A 含量は、アミロイド斑の蓄積に比べてADの重症度により相関する。例えば、ワイ・エム・クオラ (Y. M. Kuo et al.) (1996) J. Biol. Chem. 第271巻、4077~4081頁 ; シー・エイ・マクレーンら (C. A. McLean et al.) (1999) Annals of Neurology 第46巻、860~6頁 ; エル・エフ・リュウら (L. F. Lue et al.) (1999) American Journal of Pathology 第155巻、853~862頁を参照のこと。さらに、最近の報告は、A および他のアミロイド原性タンパク質の毒性は、可

40

50

溶性モノマーまたは蓄積する不溶性原線維には存在しないが、始原原線維凝集体においてかなり存在することを示唆している。例えば、ハートリーら (Hartley et al.) (1999)、Journal of Neuroscience 第19巻、8876~8884頁;ランバートら (Lambert et al.)、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1998) 第95巻、6448~53頁;およびブチャンティーニら (Bucciantini et al.)、Nature (2002) 第416巻、507~511頁;およびハートリーら (Hartley et al.) Nature (2002) 第418巻、291頁を参照のこと。併せて考えると、これらの結果は、始原原線維凝集体が、アミロイドペプチドの他の形態よりもより病理学的に重要である可能性があり、したがって、ADのようなアミロイド疾患の予防または治療において、より所望される標的であり得ることを示している。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

高い特異性でアミロイドの毒性形態に結合し、それによってアミロイド疾患の病原性を阻害する抗体を産生し得る抗原の開発が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、A ペプチド凝集体に特異的に結合し、かつ可溶性の低分子量A またはA 原線維に結合しない抗体を産生するために有用な抗原を提供する。また、これらの抗体は、本明細書中で試験した他の全ての型のアミロイド原性ペプチドおよびタンパク質から産生されたアミロイドペプチド凝集体を特異的に認識するが、対応する低分子量アミロイドペプチドまたは原線維には結合しない。

20

【0008】

本発明によれば、ヒトまたは動物において形成してアミロイド原線維形成に寄与する始原原線維凝集体のエピトープ、例えば立体配座エピトープを含む単離された組成物、例えば抗原性組成物が提供される。アミロイド原線維は、この組成物のエピトープを含まなくてもよいし、またはこの組成物のエピトープを実質的に含まなくてもよい。さらに、アミロイドペプチドモノマーは、この組成物のエピトープを含まなくてもよいし、またはこの組成物のエピトープを実質的に含まなくてもよい。これらのエピトープに結合する抗体を含む組成物もまた提供される。一実施形態において、これらの組成物は、天然供給源から単離されている。他の実施形態において、これらの組成物は合成品である。一つの有用な実施形態において、これらの組成物は医薬組成物、例えばワクチンである。さらに本発明によれば、これらの組成物は、立体配座的に拘束され得るペプチドまたはタンパク質を含む。これらのペプチドは、天然から単離され得るか、または合成品であり得る。一実施形態において、このペプチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9およびこれらの混合物からなる群から選択される。

30

40

【0009】

さらに本発明によれば、これらの組成物は、湾曲または平坦を含む任意の形状であり得る表面によって支持される。一つの有用な実施形態において、この表面は固体を含む。この表面は、フィルム、粒子またはシートであり得る。一実施形態において、この表面は機能的に改変され、例えば自己集合したペプチド単層の形成を可能にするように機能的に改変される。さらに、この表面は、タンパク質、例えば - プリーツシートからなり得る。一実施形態において、ペプチドは、この支持体表面に結合している。例えば、これらのペプチドは、この支持体表面に化学的に結合され得る。化学的結合には、イオン結合、水素結合、共有結合およびファンデルワールス引力が含まれる。一つの特に有用な実施形態において、この化学的結合は共有結合である。これらの組成物は、これらのペプチドを表面に

50

結合させるのに有効なリンカーからなり得る。これらのリンカーには、限定するものではないが、ストレプトアビジン、炭化水素分子、例えばクエン酸塩、 $HS-(CH_2)_n-COOH$ 、 $HS-(CH_2)_n-NH_2$ 、 $HS-(CH_2)_n-OH$ 、 $HS-(CH_2)_n-COOR$ 、ホスホルアミド- NH_2 、環状または酸性のジスルフィド- $R-COOH$ が含まれるがこれらに限定されない炭化水素鎖、環状または酸性のジスルフィド- $R-NH_2$ 、 $Si(OCH_3)_3-R-NH_2$ 、 $Si(OCH_3)_3-R-COOH$ およびマレイミドが含まれ得る。この支持体は、金、亜鉛、カドミウム、錫、チタン、銀、セレン、ガリウム、インジウム、砒素、ケイ素、これらの混合物またはこれらの組合せが含まれるがこれらに限定されない任意の適切な材料からなり得る。

【0010】

さらに本発明によれば、本明細書中に記載されるような始原原線維凝集体は、約10kDa~約100,000,000kDaの範囲内の分子量を有し得る。一実施形態において、この始原原線維凝集体は5つのモノマーを含む。他の実施形態において、この始原原線維凝集体は8つのモノマーを含む。この始原原線維凝集体は、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物中に存在し、かつ毒性種を含み得る。本発明は、始原原線維凝集体の毒性を低減させるのに有効であり得る抗体を提供する。

10

【0011】

さらに本発明によれば、この始原原線維凝集体は、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物中に存在する。例えば、この疾患は、アルツハイマー病、ダウン症候群に関連する早期発症型アルツハイマー病、SAAアミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、多発性骨髄腫および海綿状脳症（例えば、ウシ海綿状脳症(BSE)、狂牛病、ヒツジ・スクレイピーおよびミンク海綿状脳症)、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、クールー病、致死性家族性不眠症、慢性消耗症候群、家族性アミロイド多発性神経症、前頭側頭型痴呆、II型糖尿病、全身性アミロイドーシス、血清アミロイドーシス、イギリス家族性痴呆、デンマーク家族性痴呆、黄斑変性、脳血管アミロイドーシス、プリオン病または別のアミロイド疾患であり得る。

20

【0012】

さらに本発明によれば、ヒトまたは動物の被験体において疾患または症状を予防または治療する方法が提供され、この疾患または症状は、アミロイド沈着の存在によって特徴付けられる。これらの方法は、治療有効量または予防量の組成物をこの被験体に投与する工程を含み得る。一実施形態において、この方法は、立体配座エピトープに対する免疫応答を誘導する工程を含む。

30

【0013】

さらに本発明によれば、ヒトまたは動物においてアミロイド沈着によって特徴付けられる疾患または症状を予防または治療する方法が提供され、この方法は、抗体を、ヒトまたは動物において形成して原線維形成に寄与する始原原線維凝集体の立体配座エピトープに結合させる工程を含む。一実施形態において、これらの方法は、抗体を投与する工程を含む。この組成物は、脊髄内投与、髄腔内投与、経口投与、経皮投与、肺投与、静脈内投与、皮下投与、筋内投与、経鼻投与、直腸投与、舌下投与または口腔投与によって投与され得る。

40

【0014】

さらに本発明によれば、本発明の組成物をヒトまたは動物に投与する工程を含み得る抗体を作製する方法が提供される。この方法はまた、ヒトまたは動物から抗体を回収する工程を含み得る。

【0015】

さらに本発明によれば、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を診断する方法が提供され、この方法は、ヒトまたは動物の患者由来の組織または流体と、本発明の抗原性組成物または本発明の抗体とを混合する工程を含む。一実施形態において、この組織または流体は脳脊髄液である。この疾患には、限定するものではないが、アルツハイマー病、

50

ダウン症候群に関連する早期発症型アルツハイマー病、SAAアミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、多発性骨髄腫、および狂牛病、ヒツジ・スクレイピーおよびミンク海綿状脳症を含む海綿状脳症、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、クールー病、致死性家族性不眠症、慢性消耗症候群、トランスサイレチン (trans-thyretin) 関連のアミロイドーシス、例えば家族性アミロイド多発性神経症および血清アミロイドーシス、前頭側頭型痴呆、II型糖尿病、全身性アミロイドーシス、イギリス家族性痴呆、デンマーク家族性痴呆、黄斑変性および脳血管アミロイドーシスが含まれる。抗体の量は抗体力価として測定され得る。一実施形態において、抗体の量はELISAアッセイを使用して測定される。

10

【0016】

さらに本発明によれば、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物の治療方法の効力を評価する方法が提供され、この方法は、薬剤での治療の前に、患者由来の組織サンプル中において本発明の組成物を構成する抗原に特異的な抗体のベースライン量を決定する工程、およびこの薬剤での治療の後に、この被験体由来の組織サンプル中の抗体の量を抗体のベースライン量と比較する工程を含み得る。一実施形態において、治療後に測定されて抗体のベースライン量と比較された抗体の量の低下またはそれらの間の有意な差異の欠如は、ネガティブな治療結果を示す。他の実施形態において、治療後に測定されて抗体のベースライン量と比較された抗体の有意に大きい量は、ポジティブな治療結果を示す。

20

【0017】

さらに本発明によれば、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物の治療方法の効力を評価する方法が提供され、この方法は、薬剤での治療の前に、患者由来の組織サンプル中において本発明の抗体に特異的な始原原線維凝集体のベースライン量を決定する工程、およびこの被験体由来の組織サンプル中の本発明の抗体に特異的な始原原線維凝集体の量を始原原線維凝集体のベースライン量と比較する工程を含み得る。一実施形態において、治療後に測定されて始原原線維凝集体のベースライン量と比較された始原原線維凝集体の量の低減またはそれらの間の有意な差異の欠如は、ネガティブな治療結果を示す。他の実施形態において、治療後に測定されて始原原線維凝集体のベースライン量と比較された始原原線維凝集体の有意に大きい量は、ポジティブな治療結果を示す。

30

【0018】

さらに本発明によれば、ヒトまたは動物においてアミロイド疾患またはアミロイド疾患に対する感受性をモニタリングする方法が提供され、この方法は、患者由来のサンプル中において本発明の組成物に対する免疫応答を検出する工程を含み得る。

【0019】

さらに本発明によれば、抗体の量は抗体力価として測定され、抗原の量は抗原力価として測定され得る。一実施形態において、抗体の量はELISAアッセイによって測定される。一実施形態において、抗原の量はELISAアッセイによって測定される。

【0020】

さらに本発明によれば、免疫応答の検出は、本発明の組成物に特異的に結合する抗体を検出する工程および/または本発明の組成物と特異的に反応するT細胞を検出する工程を含み得る。

40

【0021】

さらに本発明によれば、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を検出するのに有用な診断キットが提供され、このキットは、本発明の抗原または本発明の抗体を含む本発明の単離された組成物を含み得る。

【0022】

本明細書中に記載される各々および全ての特徴、ならびに2つ以上のこのような特徴の各々および全ての組合せは、このような組合せ中に含まれる特徴が互いに矛盾しない限り

50

、本発明の範囲内に含まれる。

【0023】

本発明のこれらおよび他の態様および利点は、以下の図面、詳細な説明、実施例および特許請求の範囲に示される。

定義

用語「アジュバント」とは、抗原と組み合わせて投与された場合にこの抗原に対する免疫応答を増強するが、単独で投与された場合にはその抗原に対する免疫応答を生じない化合物のことである。アジュバントは、リンパ球の遊走、B細胞および/またはT細胞の刺激、ならびにマクロファージの刺激を含むいくつかの機構によって、免疫応答を増強し得る。

10

【0024】

用語「A」または「A ペプチド」とは、低分子量の可溶性オリゴマー、始原原線維凝集体、原線維およびアミロイド沈着を構成するペプチドのことであり、各々がADに関連する。アミロイドA ペプチドには、限定するものではないが、A₃₉、A₄₀、A₄₁、A₄₂およびA₄₃が含まれ、これらはそれぞれ、39アミノ酸長、40アミノ酸長、41アミノ酸長、42アミノ酸長および43アミノ酸長である。

【0025】

「アミロイドペプチド」は、アミロイドペプチド中間体、低分子量の可溶性オリゴマー、アミロイド原繊維およびアミロイド斑を含むアミロイド形態中に存在するペプチドである。

20

【0026】

用語「抗体」は、無傷の抗体およびその結合フラグメントを含むように使用され、これには、例えば、全長抗体（例えばIgG抗体）または抗原結合部分のみ（例えばFab、F(ab')₂またはscFvフラグメント）が含まれるが、これらに限定されない。一般に、フラグメントは、それが抗原への特異的な結合のために誘導された無傷な抗体と同等である。必要に応じて、抗体またはその結合フラグメントは、他のタンパク質に化学的に結合され得るか、または他のタンパク質との融合タンパク質として発現され得る。

【0027】

「抗オリゴマー抗体」または「抗オリゴマー」とは、アミロイドペプチド凝集中間体に結合するが、アミロイドペプチドのモノマー、ダイマー、トリマーまたはテトラマーに結合することも、これらに特異的に結合することもない抗体のことである。

30

【0028】

一種以上の列挙された要素を「含む」組成物または方法は、具体的に列挙されていない他の要素を含み得る。例えば、アミロイドA ペプチドを含む組成物は、より大きいポリペプチド配列の成分、または多数の要素を含む組成物の一部の両方として、単離されたアミロイドA ペプチドを包含し得る。

【0029】

用語「エピトープ」または「抗原決定基」とは、B細胞および/もしくはT細胞が応答する抗原上の部位、または抗体が産生される分子上の部位および/もしくは抗体が結合する分子上の部位のことである。例えば、エピトープは、それを規定する抗体によって認識され得る。

40

【0030】

「線状エピトープ」は、認識されるエピトープをアミノ酸の一次配列が構成するエピトープである。線状エピトープは一般に、独自の配列中に、少なくとも3アミノ酸、より通常は少なくとも5アミノ酸、例えば、約8～約10アミノ酸を含む。

【0031】

「立体配座エピトープ」は、線状エピトープとは対称的に、エピトープを構成するアミノ酸の一次配列が、認識されるエピトープを規定する単独の成分ではないエピトープ（例えば、アミノ酸の一次配列が、そのエピトープを規定する抗体によって必ずしも認識されないエピトープ）である。一般に、立体配座エピトープは、線状エピトープに比べて増大

50

した数のアミノ酸からなる。立体配座エピトープの認識に関して、この抗体は、ペプチドまたはタンパク質の3次元構造を認識する。例えば、タンパク質分子が折り畳まれて3次元構造を形成する場合、立体配座エピトープを形成する特定のアミノ酸および/またはポリペプチド骨格は並置されて、抗体がエピトープを認識するのを可能にする。エピトープの立体配座を決定する方法には、例えば、x線結晶学、2次元核磁気共鳴分光学および部位特異的スピンラベリングおよび電子常磁性共鳴分光法が含まれるが、これらに限定されない。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology、第66巻、グレン・モリス (Glenn E. Morris) 編 (1996) (この開示は、本明細書中でその全体が参考により援用される) を参照のこと。

10

【0032】

用語「免疫学的応答」または「免疫応答」は、受容患者 (recipient patient) におけるアミロイドペプチドに対する有益な体液性 (抗体媒介性) 応答および/または細胞性 (抗原特異的T細胞またはそれらの分泌産物によって媒介される) 応答の発生に関する。このような応答は、免疫原の投与によって誘導される能動的応答、または抗体もしくは初回抗原刺激を受けたT細胞の投与によって誘導される受動的応答であり得る。細胞性免疫応答は、クラスIまたはクラスIIのMHC分子に関連したポリペプチドエピトープの提示によって導かれ、抗原特異的なCD4⁺Tヘルパー細胞および/またはCD8⁺細胞傷害性T細胞を活性化する。この応答はまた、単球、マクロファージ、NK細胞、好塩基球、樹枝状細胞、星状細胞、ミクログリア細胞、好酸球または先天性免疫の他の成分を含み得る。

20

【0033】

「免疫原性因子」、「免疫原」または「抗原」は、必要に応じてアジュバントと組み合わせて、被験体への投与の際にそれ自体に対する免疫学的応答を誘導し得る。

「単離された」とは、精製されたこと、実質的に精製されたこと、または部分的に精製されたことを意味する。単離されたとはまた、天然の環境以外の環境中に存在することを意味し得る。例えば、天然に存在する場合に抗体が本来見出される全血清中に存在しない抗体は、単離された抗体である。

【0034】

「低分子量凝集体」、「低分子量アミロイド凝集体」、「低分子量オリゴマー」および「低分子量可溶性オリゴマー」とは、ペプチドが4つまたは5つより少ない凝集体中に存在するアミロイドペプチドのことである。一つの特定の例において、低分子量Aとは、ADに関連して見出される低分子量可溶性オリゴマーのことである。

30

【0035】

用語「患者」には、治療的処置、予防的処置もしくは診断的処置を受けるヒトおよび他の動物の被験体、または疾患を有するか若しくは疾患に罹りやすいヒトもしくは動物が含まれる。

【0036】

「始原原線維凝集体」、「ミセル凝集体」、「高分子量凝集中間体」、「高分子量アミロイドペプチド凝集体」、「高分子量可溶性アミロイドペプチド凝集体」、「アミロイドペプチド凝集体」、「可溶性凝集中間体」、「アミロイドオリゴマー中間体」、「オリゴマー中間体」および「オリゴマー凝集体」、または単に「中間体」とは、3個より多い個々のペプチドモノマーまたはタンパク質モノマー、例えば4個より多いペプチドモノマーまたはタンパク質モノマーを含む凝集体をいう。上位のサイズ (upper size) の始原原線維凝集体はオリゴマーの凝集体を含み、該オリゴマーの凝集体は、原線維形成を導く球状構造体またはミセルおよびミセルの棘を形成する。

40

【0037】

「環状始原原線維」は、3~10個の球状オリゴマーサブユニットが、電子顕微鏡写真または原子間力顕微鏡写真中の孔として現れる中空を有して環状様式または円状様式で配列される始原原線維凝集体の特定のサブユニットである。

50

【0038】

始原原線維凝集体の分子量は、約10kDa～約100,000,000kDaの範囲内、例えば約10kDa～約10,000,000kDaまたは1,000,000kDaであり得る。しかし、このサイズ範囲は限定されるものではなく、かつ始原原線維凝集体は分子量範囲によって規定されない。

【0039】

「始原原線維」は、曲線構造を形成する球状構造体の棘を示すように見えるアミロイドAペプチドを含有する球状構造体を含む始原原線維凝集体である。

2つの実体間の「特異的結合」は、少なくとも $10^6 M^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 、または $10^{10} M^{-1}$ の親和性を意味する。 $10^8 M^{-1}$ より高い親和性が、特異的結合に好ましい。

【0040】

用語「実質的に同一」とは、例えば、2つのペプチド配列が初期ギャップ重量(default gap weights)を用いたプログラムGAPまたはBESTFITによって必要に応じて整列される場合、2つのペプチド配列が少なくとも65%の配列同一性、例えば少なくとも80%もしくは90%の配列同一性、または少なくとも95%以上の配列同一性、例えば99%以上の配列同一性を共有することである。

【0041】

好ましくは、同一でないアラインメント中の残基位置は、保存的アミノ酸置換、即ち、あるアミノ酸の同じクラスまたは同じ群の他のアミノ酸での置換が異なる。いくつかのアミノ酸は、以下のように分類され得る：群I（疎水性側鎖）：leu、met、ala、val、leu、ile；群II（中性親水性側鎖）：cys、ser、thr；群III（酸性側鎖）：asp、glu；群IV（塩基性側鎖）：asn、gln、his、lys、arg；群V（鎖の配向に影響を与える残基）：gly、pro；および群VI（芳香族側鎖）：trp、tyr、phe。非保存的置換は、これらクラスの1つのメンバーを、他のクラスのメンバーと交換することを含み得る。

【0042】

配列比較のために、代表的には1つの配列が、試験配列が比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および参照配列がコンピュータに入力され、配列座標が指定され、そして必要な場合、配列アルゴリズムプログラムのパラメータが指定される。次いで、この配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列についての%配列同一性を計算するために使用され得る。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、スミス(Smith)およびウォーターマン(Waterman)、Adv. Appl. Math. 第2巻：482頁(1981)の局所的相同性アルゴリズム、ニードルマン(Needleman)およびヴンシュ(Wunsch)、J. Mol. Biol. 第48巻：443頁(1970)の相同性アラインメントアルゴリズム、ピアソン(Pearson)およびリップマン(Lipman)、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 第85巻：2444頁(1988)の類似性についての検索方法、これらのアルゴリズム(Wisconsin Genetics Software Package中のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA、ジェネティクスコンピュータグループ(Genetics Computer Group)、ウイコンシン州マディソン、サイエンスドライブ575(575 Science Dr., Madison)所在のコンピュータ実施、または視覚的検査によって実施され得る。

【0043】

%配列同一性および配列類似性を決定するのに適切なアルゴリズムの一例はBLASTアルゴリズムであり、これは、アルトシュルら(Altschul et al.)、J. Mol. Biol. 第215巻：403～410頁(1990)に記載されている。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information) 40

) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を介して、公に入手可能である。一般に、デフォルトプログラムパラメータが配列比較を実施するために使用され得るが、カスタム化されたパラメータもまた使用され得る。アミノ酸配列について、BLASTPプログラムは、デフォルトとして3のワード長(W)、10の期待値(E)およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用する。例えば、ヘニコフ(Henikoff)およびヘニコフ(Henikoff)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第89巻、10915頁(1989)を参照のこと。保存的置換は、同じクラス中のアミノ酸間での置換を含む。

【0044】

「合成」とは、天然に存在しないことである。例えば、合成組成物は、全体または一部が天然には見出されない組成物である。 10

「治療的薬剤」または「治療剤」は、患者における疾患の治療または予防に有用な物質である。本発明の治療的薬剤は一般に、実質的に純粋である。これは、薬剤が、概して少なくとも約50w/w(重量/重量)純粋であり、かつこの治療剤の効力を妨害するタンパク質および混入物を実質的に含まない。これらの薬剤は、少なくとも約80%w/w、より好ましくは少なくとも90%w/wまたは約95%w/wの純度であり得る。しかし、従来 of タンパク質精製技術を使用すると、99%w/w以上の同種のペプチドが産生され得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0045】

本発明は、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物中に存在するアミロイドペプチド凝集体上に見出される1個以上のエピトープを有する組成物、このようなエピトープに対する抗体、ならびにこれらの組成物および抗体を作製および使用するための方法を提供する。 20

【0046】

より詳しくは、本発明は、限定するものではないが、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物中のペプチド凝集体(例えばアミロイドペプチド凝集体)上に見出されるエピトープ(例えば立体配座エピトープ)を含む組成物、これらの組成物を作製する方法、これらの組成物を使用する方法(限定するものではないが、疾患の検出、治療および予防のためのものが含まれる)、これらの組成物上に存在する立体配座エピトープに対する抗体、これらの抗体を作製する方法およびこれらの抗体を使用する方法(限定するものではないが、疾患の検出、治療および予防のためのものが含まれる)を包含する。 30

【0047】

アミロイド疾患は、患者におけるアミロイド斑もしくはアミロイド斑への前駆体の蓄積、または患者におけるアミロイド斑もしくはアミロイド斑への前駆体の蓄積への素因によって特徴付けられる。アミロイド斑の主な構成要素の1つは、アミロイドペプチドである。アミロイドペプチドの一般的な立体構造は疾患によって変動し得るが、このペプチドはしばしば、特徴的なβ-シート構造を有する。アミロイドペプチドは、約10アミノ酸長または約20アミノ酸長~約200アミノ酸長のペプチドおよびタンパク質を含む。このサイズ範囲は限定されるものではなく、本発明では、より少ないアミノ酸またはより多いアミノ酸を有するアミロイドペプチドまたはタンパク質が意図される。 40

【0048】

始原原線維凝集体は、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患(例えばアルツハイマー病)を有するヒトまたは動物のアミロイド斑中に蓄積する不溶性原線維の産生における中間体である。始原原線維凝集体は、4個のアミロイドペプチドほどの小ささ、5個のアミロイドペプチドほどの小ささ、6個のアミロイドペプチドほどの小ささ、7個のアミロイドペプチドほどの小ささ、または8個のアミロイドペプチドほどの小ささであり得る凝集体を含む。一実施形態において、始原原線維凝集体は、ミセル状凝集体またはミセルまたはミセルの棘である。始原原線維凝集体は、本発明の抗体によって認識される立体配 50

座エピトープを形成するのに有効である。

【0049】

始原原線維凝集体上に見出される本発明の立体配座エピトープは、アミロイドペプチド（例えばアミロイドペプチドのモノマー、ダイマー、トリマーまたはテトラマー）の固有の前駆タンパク質中にも、それらの特徴的なクロス x 線線維回折パターンによって規定される成熟アミロイド線維中にも、アミロイド斑中にも実質的に見られない。本発明の抗体によって認識される立体配座エピトープを生じる特定のポリペプチド構造を含む始原原線維凝集体は、ほぼ五量体、六量体、七量体または八量体 ~ 1,000,000 ダルトンを超える分子量を有するミセル形態または始原原線維のサイズ範囲を有する。本発明の免疫原には、これらのエピトープを含む組成物が含まれる。本発明の抗体は、これらのエピトープに結合するのに有効である。

10

【0050】

本発明の免疫原は、任意の適切な供給源から得られることができる。例えば、これらの免疫原は、天然に存在する供給源から精製され得る。一つの特に有用な実施形態において、これらの免疫原は合成品である。

【0051】

本発明の抗体を産生するために必要なエピトープを提示する免疫原は、アミロイドペプチドまたはタンパク質を含むオリゴマー中間体模倣物として調製され得る。例えば、Aペプチド（例えばA40およびA41）、-シヌクレイン、IAPP（C2AおよびC7A、ここでは、アラニンがIAPP中の天然に存在するシステインに置換されている）、ポリグルタミンKKQ40KKまたはポリグルタミン（ここで、Q残基の数は32より大きい）、カルシトニン、TTRおよびその変異体TTR^{Pro55}、TTR^{Phe78}、ビトロネクチン（vitronectin）、ポリリジン、ポリアルギニン、血清アミロイドA、シスタンチンC（cystantinc）、IgG 軽鎖、本明細書中に開示される他のアミロイドペプチドおよび本明細書中に開示される各々のアミロイド疾患に関連するアミロイドペプチドが使用され得る。

20

【0052】

本発明において有用なペプチドは天然の供給源から得られることができ、例えば天然に存在する供給源から精製され得るか、または製造され得る。製造方法には、固相合成および異種遺伝子発現が含まれるがこれらに限定されない任意の適切な方法が含まれる。

30

【0053】

本発明の抗原が広く変動する一次配列のアミロイドに共通するという事実は、このエピトープが、立体配座エピトープと称される特定の3次元立体配座のポリペプチド骨格から形成されることを示す。

【0054】

ペプチドの固相合成および精製は、ディー・バーディックら（D. Burdick et al.）（1992）J Biol Chem 第267巻、546~54頁（その開示は、本明細書中で参考により援用される）に記載されるような連続流動半自動機器を使用して、フルオレン-9-イルメトキシカルボニル化学によって実施され得る。

【0055】

簡潔に述べると、第1のFmoc-アミノ酸は、ジクロロメタン（DCM）中のsulfonylbutyryl-AM-PEG樹脂（ノババイオケム社（Novabiochem）、カリフォルニア州サンディエゴ（San Diego）所在）に手動でカップリングされる。ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）が添加され、この混合物は、室温で20分間攪拌され、-10~-20に冷却され、そしてByBop（ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス（ピロリジノ（pyrrolidino））-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート）が添加される。この混合物は、-10~-20で8~9時間攪拌される。カップリング効率は、カイザー（Kaiser）試験（これは、ペプチド合成の分野で周知である）を使用してチェックされ得る。

40

【0056】

50

アセチル化は、無水酢酸を使用して実施され得る。アミノ酸の鎖伸長は、連続流動半自動機器を使用したフルオレン-9-イルメトキシカルボニル化学による。このペプチドは、合成容器中で、N-メチル-2-ピロリドン5×(NMP)5.0mLのNMP、185μLの*i*-Pr₂EtN(1.1mmol)および400μLのヨードアセトニトリル(予め暗中でアルミナ塩基性フィルタ床で濾過した)で洗浄される。次いで、この反応混合物は、ロータリープレート上および暗中で24時間攪拌される。この樹脂は、5×NMPおよび5×DMFで洗浄され、その後5×CH₂Cl₂を使用して洗浄され、次いで乾燥される。樹脂は5×THFで洗浄され、その後、THFおよびTMS-CH₂N₂(50:50、v/v、ヘキサン)が添加される。2時間攪拌された後、この樹脂はTHFおよびDMFで洗浄される。

10

【0057】

この樹脂は120μLのエチル-3-メルカプトプロピオネートに添加され、この混合物はロータリープレート上で24時間攪拌される。この樹脂は濾過され、次いで3×3mL DMFで洗浄される。この濾液および洗浄液が回収され、34でロータリーエバポレートされる。

【0058】

得られたペプチドは、標準的な方法(TFAおよびスカベンジャー)を使用して脱保護され、RP-HPLCによって精製される。その純度は、分析用RP-HPLCおよび電子スプレー質量分析法によってチェックされ得る。

【0059】

これらのペプチドは、標準的な異種遺伝子発現方法によっても産生され得る。例えば、組換え発現は、細菌(例えば*E. coli*)または酵母、昆虫細胞もしくは哺乳動物細胞中であり得る。組換え発現のための手順は、サンプルックら(Sambrook et al.)、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(シー・エス・エイチ・ピー・プレス社(C.S.H.P.Press)、ニューヨーク州所在、第2版、1989)に記載されている。さらに、ヒトインスリンまたはリゾチームを含む多数のアミロイドペプチドは、商業的供給元から入手し得る。

20

【0060】

本発明において有用なペプチドは、本明細書中で記載されるような有用なエピトープを形成するために、有利に凝集され得るか、または立体配座的に拘束され得る。一つの有用な実施形態において、これらのペプチドは表面に結合され、例えば、本発明の抗体によって認識されるエピトープの産生を可能にするような様式で、表面に物理的に付着されるか、または化学的に結合される。

30

【0061】

例えば、C末端チオエステルは、当業者に公知であるような従来の様式で、これらのペプチドに付着され得る。例えば、Fmoc化学によるこれらのペプチドのC末端チオエステル化は、実質的に、インジニト、アールら(Ingnito, Ret al.)、(1999) *Journal of the American Chemical Society* 第121巻、11369~11374頁に記載されるように実施され得る。C末端チオエステル化ペプチドは、金属表面のような表面に容易に付着される。

40

【0062】

これらのペプチドが結合または付着する表面は、任意の適切な表面であり得る。例えば、この表面は固体であり得る。この表面は、炭化水素、ポリマー(単数または複数)、プラスチック、ガラス、金属、セラミックまたは一種以上の生体分子(例えば、タンパク質、脂肪、核酸および炭水化物)の一種以上を含み得る。これらの成分の一種以上が、この表面を構成し得る。例えば、粒子は、金属でコーティングされたポリマーからなり得る。この表面は、平坦であり得るか、または湾曲表面のような3次元形状を有し得る。さらに、この表面は粒子であり得る。一実施形態において、オリゴマー凝集体分子模倣物は、ナノスフィア(nanospheres)を使用して産生される。これらのナノスフィアは、任意の適切なサイズのものであり得る。例えば、これらのナノスフィアの直径は、約0

50

． 0 1 n m ~ 約 1 c m の範囲内であり得る。一つの有用な実施形態において、これらのナノスフィアの直径は約 5 n m である。

【 0 0 6 3 】

一つの特に有用な実施形態において、分子模倣物を産生するために金ナノスフィアが使用される。簡潔に述べると、これらのナノスフィアは、0 . 2 m g / m l の C 末端チオエステルペプチド (p H 5 . 0 ~ 5 . 5) 溶液中で 3 時間定温放置され得、その後、1 0 0 m M T r i s p H 8 . 0 (0 . 2 % のアジ化ナトリウム) を用いて p H が 7 . 4 に調整される。室温での 6 時間のインキュベーションの後、これらの分子模倣物は遠心分離によって回収され、取り込まれていないペプチドを除去するために P B S p H 7 . 6 で 3 回洗浄され、次いで 0 . 0 2 % のアジ化ナトリウム中に 4 で保存される。このような分子模倣物の集合を図 1 に示す。しかし、これは、本発明の分子模倣物を産生するための方法の一例である。これらの模倣物を産生する他の方法は、当業者に容易に明らかである。

10

【 0 0 6 4 】

本発明は、アミロイド中間体上に存在するエピトープを認識するが、アミロイドのモノマー、ダイマー、トリマーもしくはテトラマー上に存在するエピトープも、成熟アミロイド原線維のエピトープも、不溶性の塊に凝集したアミロイドペプチドを含むアミロイド沈着のエピトープも認識しない抗体を包含する。

【 0 0 6 5 】

本発明の抗体は、任意の適切な手段によって作製され得る。例えば、これらの抗体は実験動物中で産生され得る。一つのこのような場合、ニュージーランド白ウサギ、B a l b / C、C 5 7 / B l a c k 6 マウスまたは飼いイヌに、上記のように産生された多量の分子模倣物を注射する。抗原は、注射の前にフロイント不完全アジュバントであるミョウバンアジュバントと混合されるか、またはアジュバントなし (P B S のみ) である。第 1 の注射について、同量部の抗原とアジュバントとが使用される。引き続く注射では、この抗原をアジュバントと混合し、例えば 2 週間間隔で各々を注射する。動物は、肩甲部上のチェッカー盤様式の 1 部位当たり 0 . 1 m L の小さい増分で皮下注射され得る。

20

【 0 0 6 6 】

この抗原は、立体配座において拘束されて、抗体によって認識される立体配座依存的なエピトープの抗原の産生およびこの抗原の溶媒アクセス可能な表面上での提示を生じる。詳しくは、表面基材へのカルボキシル末端の付着は、この領域をこの表面に密接に並置して維持し、これは、可溶性オリゴマー中の A ペプチドの配列を模倣する [ガルソン - ロドリゲス (G a r z o n - R o d r i g u e z)、2 0 0 0 # 6 8 9 0]。固体支持体に対するカルボキシル末端の付着は、可溶性オリゴマーからアミロイド原線維への構造的遷移の間に生じるペプチドのこの領域の再配列を防止する。アミロイド原線維において、このカルボキシル末端は自由に可動であり、かつアミロイド原線維の溶媒アクセス可能な表面で見出される [ガルソン - ロドリゲス (G a r z o n - R o d r i g u e z)、2 0 0 0 # 6 8 9 0] [トロク (T o r o k)、2 0 0 2 # 8 9 2 7] [アントズトキン (A n t z u t k i n)、2 0 0 3 # 1 0 5 5 5]。固体支持体へのカルボキシル末端の付着はまた、ポリペプチド鎖の平行配列を維持し、かつこのポリペプチドの、そのモノマー形態、または低分子量のモノマー形態、ダイマー形態、トリマー形態およびテトラマー形態への解離を防止する。

30

40

【 0 0 6 7 】

本発明の好ましい抗体は、1 時間を超える洗浄時間の間に結合を保持し、従って、比較的高い結合親和性を示すように思われる。本発明の抗体の少なくともいくつかにおいて、解離についての半減期は 1 時間より長い。

【 0 0 6 8 】

この抗体は配列に関わらずエピトープを認識し、このエピトープは、広範なアミロイド原性ペプチドおよびタンパク質由来の可溶性オリゴマーに共有されるか、またはそれらに共通する。このエピトープは、これらのペプチドの低分子量形態およびアミロイド原線維

50

中において、存在しないか、またはその構造もしくはアクセス可能性が実質的に低減されている。このエピトープは、このペプチドの共通の構造的特徴および立体配座特徴（この特徴には、多数の異なるタンパク質配列およびペプチド配列によって形成されるポリペプチド骨格の特定の立体配座が含まれるが、これに限定されない）からなる。このエピトープはこの抗体によって認識され、その結果、このエピトープへの抗体の結合は、このエピトープを提示するタンパク質配列またはペプチド配列に関わらず、可溶性オリゴマーの毒性を実質的に低減または排除する。しかし、本発明のこの記載は異なる配列のために特異的な抗体、即ち、このような抗体が可能であり、かつこれらの抗体が1つのペプチド上の同じエピトープに結合するがこれらの抗体は配列特異的であり得、かつ他の全てのアミロイドを認識しない抗体を必ずしも除外しないことが理解されるべきである。

10

【0069】

血清回収について、IgG画分が、例えばプロテインG-Sepharoseビーズ上で親和性精製されて溶出され、次いでPBSに対して透析され得る。中間凝集体特異的な抗体は、上記のように産生されたアミロイドオリゴマー中間体分子模倣物をIgG画分と混合し、約2時間定温放置し、その後洗浄することによって、この分子模倣物上での吸着によって精製され得る。溶出後、この抗体はPBSに対して透析され、0.02%のアジ化ナトリウムを含むPBS中に4 または -70 で保存され得る。

【0070】

ウサギ、イヌまたは他の動物の、本明細書中に開示された分子模倣物でのワクチン接種により産生されたポリクローナル血清は、アミロイドペプチド凝集中間体に特異的であり、かつ可溶性の低分子量のアミロイド種または原線維アミロイド種とは検出可能に反応性ではない。実施例4を参照のこと。驚くべきことに、低分子量の凝集体または原線維に対する抗オリゴマー免疫反応性は未分画血清については観察されず、このことは、この分子模倣物に対する免疫応答が非常に特異的であることを示している。例えば、A 分子模倣物に対して産生された抗体は、A 分子模倣物でウサギを12時間ブーストした後であっても、A 低分子量凝集体またはA 原線維に結合しない。

20

【0071】

A ペプチド凝集体模倣物に対して産生された抗体は、試験した全ての他のアミロイド型のアミロイド凝集中間体に結合することが示されている。図6を参照のこと。さらに、これらの抗体は、試験した全ての毒性アミロイド（すなわち、アミロイド中間体）のオリゴマー形態の毒性を中和することが示されている。図7、8および9を参照のこと。アミロイド中間体が共通の構造を共有することが示唆される。従って、本発明は、1つの型のアミロイドペプチドを含む分子模倣物を使用して産生された抗体が、他のアミロイドペプチド中間体型（例えば全てのアミロイドペプチド中間体型）に特異的な抗体（例えば立体配座依存的抗体）を産生することを意図する。例えば、-シヌクレインペプチドを含む分子模倣物から調製された抗体は、-シヌクレイン始原原線維凝集体と特異的に反応するだけでなく、他のアミロイドオリゴマー中間体形態（例えば全ての他のアミロイドオリゴマー中間体形態）のオリゴマー中間体とも特異的に反応する。

30

【0072】

以下のアミロイドペプチドの各々は、本発明の抗体（例えば、A ペプチドオリゴマー中間体に対して産生された抗体）によって認識される立体配座エピトープを産生するアミロイドペプチド凝集体を形成することが示されている。これらのペプチドのうちいくつかは、アミロイド沈着によって特徴付けられる疾患を有するヒトまたは動物のアミロイド沈着中に存在する。本発明は、列挙されたペプチド配列またはタンパク質配列にも、これらの配列のうちいくつかに関連する特定の疾患にも限定されない。本発明は、他のアミロイドペプチド凝集体または他の全てのアミロイドペプチド凝集体に結合するとともに、本明細書中に記載されるような抗体を意図する。特に本発明は、他の疾患に関連するアミロイド前駆体凝集体を形成する他のペプチド配列またはタンパク質配列に対する本発明の方法および組成物の適用を意図する。

40

A 40（配列番号1）

50

DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV

A42 (配列番号2)

DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV IA

ヒトIAPP (配列番号3)

KCNTATCATQ RLANFLVHSS NNFGA ILSST NVGSNTY

ヒトプリオン106-126 (配列番号4)

KTNMKHMAGA AAGAVVGG LG

ステファニ (Stefani) および共同研究者ら (ブチャンティーニら (Bucciantini et al) (2002) Nature 第416巻、507~511頁) は最近、非疾患関連のタンパク質から形成されたアミロイドペプチド凝集体が生得的に細胞傷害性であることを報告しており、これは、これらのアミロイドペプチド凝集体が、疾患関連のアミロイドペプチドと共通する構造を有し得ることを示唆する。以下の非疾患関連のアミロイドペプチドを含む非疾患関連のアミロイドペプチド凝集体もまた、本発明の抗体に結合することが示されている。

ポリグルタミン合成ペプチドKK(Q40)KK (配列番号5)

KKQQQQQQQQ QQQQQQQQQQ QQQQQQQQQQ QQQQQQQQ

ヒトリゾチーム (配列番号6)

MKALIVLGLV LLSVTVQGKV FERCELARTL KRLGMDG
YRG SLANWMCLAK WESGYNTRAT NYNAGDRSTD YGI
FQINSRY WCNDGKTPGA VNACHLSCSA LLQDNIADAV
ACAKRVVRDP QGIRAWVAWR NRCQNRDVRQ YVQGC GV

ヒトインスリン (配列番号7)

MALWMRLLPL LALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVE
ALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGGQVELGGGPG
AGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSLISLYQLENYCN

ヒトトランスサイレチン (配列番号8)

MASHRLLLLC LAGLVFVSEA GPTGTGESKCLPMVKVL
DAV RGS PAINVAV HVFRKAADDT WEPFASGKTS ESG
ELHGLTT EEEFVEGIYK VEIDTKSYWK ALGISPFHEH
AEVVFTANDS GPRRYTIAAL LSPYSYSTTA VVTNPK
E

ヒト シヌクレイン (配列番号9)

MDVFMKGLSK AKEGVVA AAE KTKQGVAAEA GKTKEGV
LYV GSKTKEGVVH GVATVAEKTKEQVTNVGGAV VTG
VTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL GKNEEGAPQE
GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

さらに、野生型A42、A40の改変体およびフラグメント(限定するものではないが、A42(A21G)フランドル型変異、A42(E22Q)オランダ型変異、A42(E22G)北極型変異、A42(D23N)ロワ(lowa)型変異、A40(A21G)フランドル型変異、A40(E22Q)オランダ型変異、A40(E22G)北極型変異、A40(D23N)ロワ型変異、A40(E22Q&D23N)オランダ型&ロワ型変異、A3-42(pGlu3)、A3-40(pGlu3)、A8-42、A17-42、A1-16、A3-11、A25-35、A4-16(3種の類似体:Cys¹⁶A4-16、Ala⁴A4-16およびAla¹⁰A4-16)、His6 A40C40(A C40のアミノ末端に付加された6個のヒスチジン)が含まれる)から形成されたオリゴマー中間体が、本発明の抗体によって認識される。本発明の抗体によって認識

10

20

30

40

50

される他のオリゴマー中間体には、限定するものではないが、I A P P (C 2 A および C 7 A) (ここではアラニンが、I A P P 中の天然に存在するシステインに置換されている)、ポリグルタミン K K Q 4 0 K K またはポリグルタミン (ここで、Q 残基の数は 3 2 より大きい)、カルシトニン、T T R およびその変異体 T T R P r o ^{5 5}、T T R P h e ^{7 8}、ピトロネクチン、ポリリジン、ポリアルギニン、血清アミロイド A、シスタンチン C、I g G 軽鎖から形成されたオリゴマー中間体、本明細書中に開示される他のアミロイドペプチドから産生されたオリゴマー中間体、および本明細書中に開示される各々のアミロイド疾患に関連するアミロイド中間体が含まれる。

【0073】

本発明は、アミロイドオリゴマー中間体に対する特異的免疫応答を誘導するアミロイド疾患の治療剤を提供する。これらの治療剤には、アミロイドペプチドの凝集体の立体配座エピトープと、このアミロイドペプチドの改変体の凝集体の立体配座エピトープと、本発明の抗体を誘導し、かつ/または本発明の抗体と交差反応するアミロイドペプチドの類似体および模倣物の凝集体の立体配座エピトープと、抗体またはこのような抗体と反応性の T 細胞とを含有する分子模倣物が含まれる。免疫応答の誘導は、免疫原が患者においてアミロイドペプチド中間体と特異的に反応性の抗体または T 細胞を誘導するために投与される場合に能動的であり、または患者においてアミロイドペプチド中間体にそれ自体特異的に結合する抗体が投与される場合に受動的であり得る。

10

【0074】

類似体には、対立遺伝子改変体、種改変体および誘導された改変体が含まれる。類似体は一般に、しばしば保存的置換の長所によって、1つまたはいくつかの位置で天然に存在するペプチドとは異なる。類似体は一般に、天然のペプチドと少なくとも 80% または 90% の配列同一性を示す。いくつかの類似体はまた、非天然のアミノ酸または N 末端もしくは C 末端のアミノ酸の改変を含む。非天然のアミノ酸の例は、A - 2 置換アミノ酸、- アルキルアミノ酸、乳酸、4 - ヒドロキシプロリン、カルボキシグルタミン酸、e - N , N , N - トリメチルリジン、e - N - アセチルリジン、O - ホスホセリン (O - p h o s p g o s e r i n e)、N - アセチルセリン、N - ホルミルメチオニン、3 - メチルヒスチジン、5 - ヒドロキシリジン、w - N - メチルアルギニンである。

20

【0075】

治療剤にはまた、より長いペプチドまたはタンパク質の凝集体 (これは、例えば、他のアミノ酸と共に、アミロイドペプチド、活性なフラグメントまたは類似体を含む) が含まれる。例えば、A ペプチドは、無傷の A P P タンパク質またはそのセグメント (例えば、A の N 末端で開始し、かつ A P P の末端まで続く C - 1 0 0 フラグメント) として存在し得る。このようなポリペプチドは、以下に記載されるように、動物モデルにおいて予防効力または治療効力についてスクリーニングされ得る。A ペプチド、類似体、活性フラグメントまたは他のポリペプチドは、低分子量のオリゴマーまたは原線維上に実質的に存在しない 3 次元エピトープまたは立体配座エピトープに対する免疫応答を提供する形態で投与され得る。

30

【0076】

治療剤はまた、ペプチドおよび他の化合物を含み、これらは、アミロイドタンパク質との有意なアミノ酸配列の類似性を必ずしも有さないが、それにも拘ら、アミロイドオリゴマー中間体の立体配座エピトープに対する免疫応答を提供する本発明の抗原として機能する。例えば、- プリーツシートを形成する任意のペプチドおよびタンパク質は、適切性についてスクリーニングされ得る。アミロイド中間体またはアミロイド中間体の合成模倣物に対するモノクローナル抗体に対する抗イディオタイプ抗体もまた、使用され得る。このような抗 I d 抗体は、抗原を模倣し、かつこの抗体に対する免疫応答を生じる (E s s e n t i a l I m m u n o l o g y (ロイ (R o i t) 編、ブラックウェルサイエンティフィックパブリケーションズ社 (B l a c k w e l l S c i e n t i f i c P u b l i c a t i o n s)、パロアルト (P a l o A l t o) 所在、第 6 版)、181 頁を参照のこと)。

40

50

【0077】

ペプチドまたは他の化合物のランダムライブラリーもまた、本明細書中での使用のために適切性についてスクリーニングされ得る。コンビナトリアルライブラリーは、段階的様式で合成され得る多数の型の化合物について生成され得る。このような化合物には、ポリペプチド、 ターン模倣物、多糖、リン脂質、ホルモン、プロスタグランジン、ステロイド、芳香族化合物、複素環式化合物、ベンゾジアゼピン、オリゴマー置換グリシンおよびオリゴカーバメート (oligocarbamate) が含まれる。これらの化合物の大きなコンビナトリアルライブラリーは、アフィマックス (Affymax) の WO 95 / 12608号、アフィマックスの WO 93 / 06121号、コロンビア大学の WO 94 / 08051号、ファルマコピア (Pharmacopeia) の WO 95 / 35503号およびスクリプス (Scripps) の WO 95 / 30642号 (これらは各々、全ての目的のために参考により援用される) に記載されるコードされた合成ライブラリー (encoded synthetic libraries (ESL)) 法によって実施され得る。ペプチドライブラリーはまた、ファージディスプレイ法によって生成され得る。例えば、デブリン (Devlin) の WO 91 / 18980号を参照のこと。

10

【0078】

任意のペプチド凝集体、天然もしくは合成の、または目的の他の化合物が、オリゴマー中間体に対して特異的であることが公知の抗体またはリンパ球 (BまたはT) にこの凝集体または化合物が結合する能力を決定することによって、本明細書中での使用のための免疫原または抗原としての適切性について最初にスクリーニングされ得る。例えば、最初のスクリーニングは、オリゴマー中間体に対する任意のポリクローナル血清またはモノクローナル抗体で実施され得る。

20

【0079】

このようなスクリーニングによって同定された化合物は、オリゴマー中間体に対する抗体または反応性リンパ球を誘導する能力について、さらに分析され得る。例えば、血清の多数の希釈物が、本発明のオリゴマー中間体模倣物または精製されたオリゴマー中間体で予めコーティングされたマイクロタイタープレート上で試験され、標準的な ELISA が、反応性抗体について試験するために実施され得る。次いで、化合物は、予防および治療の有効性について、当該分野で理解されるように、例えば、アミロイド原性疾患に罹りやすいトランスジェニック動物において試験され得る。このような動物には、例えば、ゲームスら (Games et al.) (前出) によって記載される APP の 717 変異を保有するマウス、ならびにマクコンログラ (McConlogue et al.) の米国特許第 5,612,486号およびシャオら (Hsiao et al.)、(1996) Science 第 274 巻、99頁; ストーフエンビールら (Staufenbiel et al.)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 第 94 巻、13287~13292頁; スターチュラー - ピエラら (Sturchler - Pierat et al.)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第 94 巻、13287~13292頁; ボルチェルトら (Borchelt et al.)、Neuron (1997) 第 19 巻、939~945頁によって記載されるような APP のスイス型変異を保有するマウスが含まれる。同じスクリーニングアプローチが、上記の治療剤を含む他の可能性のある治療剤に対して使用され得る。

30

40

【0080】

本発明の治療剤はまた、オリゴマー中間体に特異的に結合する抗体を含む。このような抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。一つの有用な実施形態において、これらの抗体は、立体配座エピトープに結合する。非ヒト (例えば、マウスまたはラット) のモノクローナル抗体の産生は、例えば、本発明のオリゴマー中間体模倣物でこの動物を免疫することによって達成され得る。精製されたアミロイド中間体で動物を免疫することもまた意図される。

【0081】

本発明のマウス抗体のヒト化形態は、非ヒト抗体の CDR 領域を組換え DNA 技術によ

50

ってヒト定常領域に連結させることによって生成され得る。クイーンら (Queen et al.)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第86巻、10029~10033頁(1989)およびWO90/07861号(全ての目的のために参考により援用される)を参照のこと。

【0082】

ヒト抗体は、ファージディスプレイ法を使用して得られ得る。例えば、ダワーら (Dower et al.) のWO91/17271号およびマクカフェルティら (McCafferty et al.) のWO92/01047号を参照のこと。これらの方法において、メンバーがそれらの外面上に異なる抗体を提示するファージのライブラリーが生成される。所望の特異性を有する抗体を提示するファージが、親和性富化によって選択される。オリゴマー中間体に対するヒト抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子座および不活化された内因性免疫グロブリン遺伝子座の少なくともセグメントをコードする導入遺伝子を有する非ヒトトランスジェニック哺乳動物から産生され得る。例えば、ロンバーグら (Lonberg et al.) のWO93/12227号(1993); クチエルラパティ (Kucherlapati) のWO91/10741号(1991)(これらは各々、全ての目的のためにその全体が参考により援用される)を参照のこと。特定のマウス抗体と同じエピトープ特異性を有するヒト抗体が、競合的結合実験または他の方法によって選択され得る。このような抗体は、マウス抗体の有用な機能的特性が共通している可能性が特に高い。

【0083】

ヒトポリクローナル抗体もまた、本発明の免疫原で免疫したヒトから血清の形態で提供され得る。必要に応じて、このようなポリクローナル抗体は、例えば親和性試薬として本発明の免疫原を使用して、親和性精製によって濃縮され得る。

【0084】

ヒト抗体またはヒト化抗体は、IgG、IgD、IgAおよびIgEの定常領域、ならびに任意のアイソタイプ(IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含む)を有するように設計され得る。抗体は、2つの軽鎖および2つの重鎖を含むテトラマーとして、別個の重鎖、軽鎖として、Fab、Fab'F(ab')₂およびFvとして、または重鎖および軽鎖の可変ドメインがスパーサーを介して連結された単鎖抗体として発現され得る。

【0085】

本発明の方法において使用するための治療剤はまた、アミロイドオリゴマー中間体に結合するT細胞を含み得る。例えば、T細胞は、昆虫細胞系統からヒトMHCクラスI遺伝子およびヒト-2-ミクログロブリン遺伝子を発現させることによって、中間体に対して活性化され、それによって空の複合体がこれらの細胞の表面上に形成され、かつオリゴマー中間体抗原に結合し得る。この細胞系統と接触したT細胞は、この抗原に対して特異的に活性化され得る。ピーターソンら (Peterson et al.) の米国特許第5,314,813号を参照のこと。MHCクラスII抗原を発現する昆虫細胞系統が同様に、CD4T細胞を活性化するために使用され得る。

【0086】

特定の例において、本発明の免疫原を適切な担体に連結させることが所望され得る。適切な担体には、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、オボアルブミン、破傷風毒素もしくは他の病原性細菌(例えば、ジフテリア、E. coli、コレラまたはH. pylori)由来のトキシイド、または弱毒化毒素誘導体が含まれる。免疫応答を刺激または増強するための他の担体には、サイトカイン(例えば、IL-1、IL-1ペプチドおよびIL-1ペプチド、IL-2、INF、IL-10、GM-CSFならびにケモカイン(例えば、MIP1およびMIP1、ならびにRANTES))が含まれる。免疫原はまた、オマホニー (O'Mahony) のWO97/17613号およびWO97/17614号に記載されるように、組織を横断する輸送を増強するペプチドに連結され得る。

【0087】

本発明の免疫原は、化学的架橋によって担体に連結され得る。免疫原を担体に連結するための技術には、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジル-チオ)プロピオネート(SPD P)およびスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)を使用したジスルフィド結合の形成(このペプチドがスルフヒドリル基を欠く場合、これは、システイン残基の付加によって提供され得る)が含まれる。これらの試薬は、それら自体とペプチドのシステイン残基との間のジスルフィド結合を1個のタンパク質上に生成し、リジン上のε-アミノまたは他のアミノ酸中の他の遊離アミノ基を介してアミド結合を生成する。種々のこのようなジスルフィド/アミド形成薬剤が、Immun. Rev. 第62巻、185頁(1982)に記載されている。他の2官能性カップリング剤は、ジスルフィド結合ではなくチオエーテルを形成する。これらのチオエーテル形成剤の多くは市販されており、これには、6-マレイミドカプロン酸、2-プロモ酢酸および2-ヨード酢酸、4-(N-マレイミド-メチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の反応性エステルが含まれる。これらのカルボキシル基は、これらのカルボキシル基をスクシンイミドまたは1-ヒドロキシ-2-ニトロ-4-スルホン酸のナトリウム塩と合わせることによって活性化され得る。

【0088】

本発明の免疫原に含まれるペプチドはまた、融合タンパク質として発現され得る。このペプチドは、アミノ末端、カルボキシル末端または内部で、担体に連結され得る。例えば、これらのペプチドは、担体または任意の有用なペプチド配列もしくはタンパク質配列と融合され得る。

【0089】

治療を受け入れる患者には、疾患の危険性があるが症状を示さない個体、ならびに現在症状を示している患者が含まれる。ADを含む特定のアミロイド疾患の場合、事実上誰もがこの疾患に罹患する危険性がある。

【0090】

従って、本発明の組成物は、対象患者の危険性を評価することなしに、例えば、ワクチンによって一般的な集団に予防的に投与され得る。本発明の方法は、アミロイド疾患(例えばAD)の既知の遺伝的な危険性を有する個体に対して特に有用である。このような個体には、アミロイド疾患を経験した親族を有する個体、および遺伝的マーカーもしくは生化学的マーカーの分析によって危険性が決定された個体、またはこのような疾患の発症もしくは実際の存在についての可能性を示す症状もしくは前駆症状を示す個体が含まれ得る。例えば、ADに対する危険性の遺伝的マーカーには、APP遺伝子における変異、特に位置717ならびに位置670および位置671における変異(それぞれ、ハーディ(Hardy)変異およびスイス型変異と称される)(ハーディ(Hardy)、TINS(前出)を参照のこと)が含まれる。ADについての危険性の他のマーカーは、プレセニリン遺伝子(PS1およびPS2)およびApoE4における変異、ADの家族歴、高コレステロール血症またはアテローム性動脈硬化症である。

【0091】

アミロイド疾患の症状は当業者の医師に明らかである。例えば、アルツハイマー病に現在罹患している個体は、特徴的な痴呆症、ならびに上記の危険因子の存在から認識され得る。さらに、多数の診断試験が、アミロイド疾患を有する個体を同定するために利用可能である。例えば、ADの場合、これらにはCSFレベルおよびA42レベルの測定値が含まれる。上昇したレベルおよび減少したA42レベルは、ADの存在を意味する。

【0092】

無症候性の患者において、治療は、任意の年齢(例えば、10歳、20歳、30歳、40歳、50歳、60歳または70歳)で開始し得る。治療は、一回以上の投薬(例えば、ある期間にわたる多数の投薬量)をもたらす。治療は、この治療剤(例えば、オリゴマー中間体模倣物)に対する抗体または活性化されたT細胞もしくはB細胞の応答を経時的に分析することによって、あるいは存在する始原原線維凝集体のレベルを経時的に分析

することによって、モニタリングされ得る。一実施形態において、本発明の単一の治療剤（例えば、本発明の単一の免疫原）の投与による治療は、2種以上のアミロイド疾患（例えば、全てのアミロイド疾患）のための治療として、またはこれらのアミロイド疾患に対する予防的測定として働き得る。

【0093】

予防的適用において、本発明の組成物または医薬は、特定の疾患に対して感受性の患者またはこの特定の疾患の危険性がある患者に、この疾患の危険性を排除もしくは低減するか、またはこの疾患の発症を遅延させるのに十分な量で投与される。治療的適用において、組成物またはメジアン (medians) は、このような疾患の疑いがある患者またはこのような疾患にすでに罹患している患者に、この疾患の症状およびその合併症を治癒または少なくとも部分的に停止させるのに十分な量で投与される。これを達成するために適切な量は、治療的有効量または薬学的有効量として規定される。予防レジメン (regime) および治療レジメンの両方において、治療剤は通常、十分な免疫応答が達成されるまで、いくつかの投薬形態で投与される。一般に、この免疫応答はモニタリングされ、免疫応答が減衰し始める場合に、反復された投薬量が与えられる。

10

【0094】

本発明の組成物の有効量は、上記の状態の治療について、多数の異なる因子（投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトであるか動物であるか、投与される他の投薬、および治療が予防目的であるか治療目的であるかが含まれる）に応じて異なる。通常、この患者はヒトであるが、いくつかの疾患（例えば、狂牛病）において、この患者は非ヒト哺乳動物（例えば、ウシ亜科の動物）であり、またはアルツハイマー病の場合には、この患者はイヌであり得る。治療投薬量は、安全性および効力を最適化するために滴定される必要がある。免疫原の量はアジュバントもまた投与されるか否かに依存し、より高い投薬量がアジュバントの非存在下で必要とされる。投与のための免疫原の量はしばしば、患者1人当たり約 $1 \mu\text{g}$ ~ 約 $500 \mu\text{g}$ で変動し、より通常は、ヒト投与のための注射1回当たり約 $5 \mu\text{g}$ ~ $500 \mu\text{g}$ で変動する。時々、注射1回当たり約 1mg ~ 約 2mg のより高い用量が使用される。典型的には、約 $10 \mu\text{g}$ 、約 $20 \mu\text{g}$ 、約 $50 \mu\text{g}$ または約 $100 \mu\text{g}$ が、各々のヒト注射のために使用される。注射のタイミングは、1日1回 ~ 1年に1回 ~ 10年に1回で有意に変動し得る。免疫原の投薬が与えられる任意の所定の日に、この投薬量は、アジュバントもまた投与される場合、患者1人当たり $1 \mu\text{g}$ より高く、通常は患者1人当たり $10 \mu\text{g}$ より高く、そしてアジュバントの非存在下では、患者1人当たり $10 \mu\text{g}$ より高く、通常は患者1人当たり 100 より高い。この投薬量中に存在するペプチドの質量は、使用される治療剤の量を計算するために使用され得る。

20

30

【0095】

1つの代表的なレジメンは、6週間間隔でのブースター注射に従う免疫付与からなる。他のレジメンは、1カ月後、2カ月後および12カ月後のブースター注射に従う免疫付与からなる。他のレジメンは、生涯にわたる2カ月毎の注射をもたらす。あるいは、ブースター注射は、免疫応答のモニタリングによって示されるような不規則な基準に基づき得る。

【0096】

抗体での受動免疫について、この投薬量は、宿主の体重 1kg 当たり約 0.0001mg ~ 体重 1kg 当たり約 100mg の範囲であり、より通常は、宿主の体重 1kg 当たり約 0.01mg ~ 体重 1kg 当たり約 5mg の範囲である。

40

【0097】

免疫応答を誘導するための治療剤は、予防的治療および/または治療的治療に適切な任意の手段（例えば、非経口手段、局所手段、静脈内手段、経口手段、皮下手段、腹腔内手段、経鼻手段または筋内手段）によって投与され得る。最も代表的な投与経路は皮下であるが、他の経路が等しく有効であり得る。次に最も一般的なものは筋内注射である。このタイプの注射は、最も典型的には、腕または脚の筋肉において実施される。静脈内注射ならびに腹腔内注射、動脈内注射、頭蓋内注射または皮内注射もまた、免疫応答を生じさせる

50

のに有効であり得る。いくつかの方法において、これらの治療剤は、沈着が蓄積しているかまたは蓄積し得る特定の組織中に直接注射される。

【0098】

本発明の組成物は、必要に応じて、アミロイド原性疾患の治療において少なくとも部分的に有効な他の薬剤と組み合わせて投与され得る。アミロイド沈着が脳において生じるアルツハイマー病およびダウン症候群の場合、本発明の治療剤はまた、血液脳関門を横切る本発明の組成物の通過を増大させる他の薬剤と共に投与されてもよい。

【0099】

本発明の免疫原性薬剤（例えば、ペプチド）はしばしば、アジュバントと組み合わせて投与される。種々のアジュバントが、免疫応答を惹起するために、本発明の免疫原と組み合わせて使用され得る。好ましいアジュバントは、応答の質的な形態に影響を与える免疫原における立体配座変化を引き起こすことなしに、この免疫原に対する内在性の応答を増強する。好ましいアジュバントには、ミョウバン、3-デオキシ-O-アシル化モノホスホリルリピドA (MPL) (GB 2220211を参照のこと)が含まれる。QS21は、南アフリカにおいて見出された *Quillaja Saponaria Molina* の木の樹皮から単離されたトリテルペングリコシドまたはサポニンである (ケンシルら (Kensil et al.), *Vaccine Design: The subunit and Adjuvant Approach* (ポウエル (Powell) およびニューマン (Newman) 編、プレナム プレス社 (Plenum Press)、ニューヨーク州所在、1995); および米国特許第5,057,540号を参照のこと)。他のアジュバントは、必要に応じて免疫刺激剤（例えば、モノホスホリルリピドA）と組み合わせた水中油エマルジョン（例えば、スクアレンまたはピーナツ油）である。例えば、ストウトら (Stoute et al.), *N. Engl. J. Med.* (1997) 第336巻、86~91頁を参照のこと。他の有用なアジュバントは、1998年11月15日の *Bio World Today* に記載された CpG である。あるいは、免疫原はアジュバントにカップリングされ得る。例えば、この免疫原のリポペプチドバージョンは、B型肝炎抗原ワクチン接種についてリビングストン (Livingston), *J. Immunol.* (1997) 第159巻、1383~1392頁に記載されるように、本発明の免疫原を構成する一種以上のペプチドのN末端に、パルミチン酸または他の脂質を直接カップリングすることによって調製され得る。しかし、このようなカップリングは、この免疫原に対する免疫応答の性質に影響を与えるように、この免疫原を構成するペプチドの立体配座を実質的に変化させるべきではない。アジュバントは、活性薬剤と共に治療組成物の成分として投与され得るか、または治療剤の投与とは別個に、治療剤の投与の前に、治療剤の投与と同時に、または治療剤の投与の後に投与され得る。

【0100】

好ましいクラスのアジュバントは、アルミニウム塩（ミョウバン、例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム）である。このようなアジュバントは、他の特定の免疫刺激剤（例えば、MPLまたは3-DMP）、QS21、ポリマーアミノ酸またはモノマーアミノ酸（例えば、ポリグルタミン酸またはポリリジン）とともに、またはこの免疫刺激剤なしに使用され得る。

【0101】

別のクラスのアジュバントは、水中油エマルジョン製剤である。このようなアジュバントは、他の特定の免疫刺激剤（例えば、ムラミルペプチド（例えば、N-アセチルムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン (thr-MDP)、-アセチル-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-イソグルタミル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-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-アセチルグルコサミニル-N-アセチルムラミル-L-Al-D-イソグル-L-Ala-ジパルミトキシ プロピルアミド (N-acetylglucosaminy l-N-acetylmuramyl-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalm

10

20

30

40

50

itoxyl propylamide、DTP-DPP、theramide(商標))、または他の細菌細胞壁成分とともに、またはこの免疫刺激剤なしに使用され得る。水中油エマルジョンには、(a) Model 110Yマイクロフルイダイザー(マイクロフルイデクス社(Microfluidics)、マサチューセッツ州ニュートン(Newton)所在)のようなマイクロフルイダイザーを使用してサブミクロンの粒子へと処方された5%スクアレン、0.5%Tween 80および0.5%Span 85を含む(種々の量のMTP-PEを必要に応じて含む)MF59(WO90/14837号)、(b)サブミクロンのエマルジョンへと微小流動化された、またはより大きい粒子サイズのエマルジョンを生じるためにボルテックスされた10%スクアレン、0.4%Tween 80、5%プルロニック-ブロックポリマーL121およびthr-MDPを含むSAF 10、ならびに(c)2%スクアレン、0.2%Tween 80、ならびにモノホスホリルリピドA(MPL)、ジミコール酸トレハロース(trehalose dimycolate)(TDM)および細胞壁骨格(CWS)、好ましくはMPL+CWS(Detox(商標))からなる群由来の1種以上の細菌細胞壁成分を含むRibi(商標)アジュバントシステム(RAS)、(リビウムノケム社(Ribi Immunochem)、モンタナ州ハミルトン(Hamilton)所在)が含まれる。

【0102】

他のクラスの好ましいアジュバントは、サポニンアジュバント(例えば、Stimulons(QS21、アキラ社(Aquila)、マサチューセッツ州ウースター(Worcester)所在))またはこれから生成された粒子(例えば、ISCOM(免疫刺激複合体)およびISCOMATRIX)である。他のアジュバントには、フロイント完全アジュバント(CFA)および不完全フロイントアジュバント(IFA)が含まれる。他のアジュバントには、サイトカイン(例えば、インターロイキン(例えばIL-1、IL-2およびIL-12)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF))および/またはケモカイン(例えばCXCL10およびCCL5)が含まれる。

【0103】

アジュバントは単一の組成物として免疫原と共に投与され得るか、またはこの免疫原の投与の前、この免疫原の投与と同時に、もしくはこの免疫原の投与の後に投与され得る。免疫原およびアジュバントは、同じバイアル中に包装されて供給され得るか、または別個のバイアル中に包装されて使用前に混合され得る。免疫原およびアジュバントは概して、意図された治療適用を示すラベルと共に包装される。免疫原およびアジュバントが別個に包装される場合、この包装は概して、使用前に混合するための指示書を含む。アジュバントおよび/または担体の選択は、アジュバントを含むワクチンの安定性、投与経路、投与スケジュール、ワクチン接種される種についてのアジュバントの効力に依存し、そしてヒトにおいては、薬学的に許容されるアジュバントは、適切な規制機関によってヒトへの投与について承認されているか、または承認され得るアジュバントである。例えば、フロイント完全アジュバントはヒトへの投与に適切ではない。必要に応じて、2種以上の異なるアジュバントが同時に使用され得る。好ましい組合せには、ミョウバンおよびMPLと、ミョウバンおよびQS21と、MPLおよびQS21と、ミョウバン、QS21およびMPLとが含まれる。また、フロイント不完全アジュバントは、必要に応じてミョウバン、QS21およびMPLならびにこれらの全ての組合せのいずれかと組み合わせて使用され得る(チャンら(Chang et al.)、Advanced Drug Delivery Reviews 第32巻、173~186頁(1998))。

【0104】

本発明の組成物は、種々の他の薬学的に許容される成分からなる医薬組成物としてしばしば投与される。Remington's Pharmaceutical Science(第15版、マックパブリッシングカンパニー社(Mack Publishing Company)、ペンシルバニア州イーストン(Easton)所在、1980)を参照のこと。好ましい形態は、意図された投与様式および治療適用に依存する。これらの

組成物はまた、所望される製剤に依存して、動物またはヒトへの投与のための医薬組成物を処方するために一般に使用される賦形剤として規定され、且つ薬学的に許容される非毒性の担体または希釈剤を含み得る。この希釈剤は、この組合せの生物学的活性に影響を与えないように選択される。このような希釈剤の例は、蒸留水、生理学的リン酸緩衝化生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液およびハックス溶液である。さらに、この医薬組成物または製剤はまた、他の担体、アジュバントまたは非毒性で非治療的な非免疫原性安定剤などを含み得る。しかし、フロイント完全アジュバントのような動物への投与に適切なくつかの試薬は概して、ヒトへの使用のための組成物中には含まれない。

【0105】

医薬組成物はまた、大きくてゆっくりと代謝される高分子（例えばタンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびコポリマー（例えばラテックス官能化セファロース（*latex functionalized sepharose*））、アガロース、セルロースなど）、高分子アミノ酸、アミノ酸コポリマー、ならびに脂質凝集体（例えば油滴またはリポソーム）を含み得る。さらに、これらの担体は免疫刺激剤（即ちアジュバント）として機能し得る。

10

【0106】

非経口投与について、本発明の組成物は、生理学的に許容される希釈剤中の物質の溶液または懸濁物の注射可能な投薬として、滅菌液体（例えば水、油、生理食塩水、グリセロールまたはエタノール）であり得る薬学的担体と共に投与され得る。

【0107】

補助物質（例えば湿潤剤または乳化剤、界面活性剤、pH緩衝化物質など）が組成物中に存在し得る。医薬組成物の他の成分は、石油、動物、植物または合成起源の成分（例えばピーナツ油、ダイズ油および鉱油）である。一般に、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールのようなグリコールは、特に注射可能な溶液のために好ましい液体担体である。

20

【0108】

組成物は、液体溶液または懸濁物のいずれかとして注射可能物として調製され、注射前に液体溶媒中の溶液または懸濁物にするのに適切な固体形態もまた調製され得る。この調製物はまた、リポソームまたは微小粒子（例えばポリラクチド、ポリグリコリドまたは上記で考察されたような増強されたアジュバント効果のためのコポリマー）中に乳化またはカプセル化され得る。ランガー（*Langer*）、*Science*（1990）第249巻、1527頁およびヘインズ（*Hanes*）、*Advanced Drug Delivery Reviews*（1997）第28巻、97～119頁を参照のこと。本発明の組成物は、活性成分の徐放または拍動性放出を許容するような様式で処方され得るデポ注射またはインプラント調製物の形態で投与され得る。

30

【0109】

他の投与様式に適切なさらなる製剤には、経口製剤、経鼻製剤および肺製剤、坐剤、ならびに経皮投与が含まれる。

坐剤について、結合剤および担体には、例えばポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドが含まれ、このような坐剤は、0.5%～約10%の範囲内、例えば約1%～約2%の範囲内の活性成分を含む混合物から形成され得る。経口製剤は、賦形剤（例えば、薬学的等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロースおよび炭酸マグネシウム）を含む。これらの組成物は、溶液、懸濁物、錠剤、丸薬、カプセル剤、徐放製剤または粉末の形態をとり、約10%～95%の活性成分、例えば約25%～約70%の活性成分を含み得る。

40

【0110】

局所適用は、経皮送達または皮内送達を生じ得る。局所投与は、この組成物と、コレラ毒素もしくは無毒化誘導體またはそれらのサブユニット、あるいは他の類似の細菌毒素との同時投与によって促進され得る。グレンら（*Glenn et al.*）、*Nature*（1998）第391巻、851頁を参照のこと。同時投与は、混合物として、または

50

化学的架橋もしくは融合タンパク質としての発現によって得られる連結された分子として、これらの成分を使用することによって達成され得る。

【0111】

あるいは、経皮送達は、皮膚通路を使用して、またはトランスフェロソーム (transfersome) を使用して達成され得る。例えば、ポールら (Paul et al.)、Eur. J. Immunol. (1995) 第25巻、3521~24頁; セベクら (Cevc et al.)、Biochem. Biophys. Acta (1998) 第1368巻、201~15頁を参照のこと。

【0112】

本発明は、ADのようなアミロイド疾患に罹患しているか、またはこれに対して感受性である患者において、アミロイドオリゴマー中間体に対する免疫応答を検出する方法を提供する。これらの方法は、患者に投与される治療過程をモニタリングするために特に有用である。これらの方法は、症状のある患者に対する治療的治療および無症状の患者に対する予防的治療の両方をモニタリングするために使用され得る。

【0113】

いくつかの方法は、組成物の調剤を投与する前に、患者において免疫応答のベースライン値を決定する工程と、およびこの値を治療後の免疫応答についての値と比較する工程とを内含する。免疫応答の値の有意な増大 (すなわち、このような測定値の平均からの1標準偏差として表され、同じサンプルの反復測定値における実験誤差の標準的な限界よりも高い増大) は、ポジティブな治療結果 (すなわち、この組成物の投与が免疫応答を達成または増強したこと) を示す。免疫応答についての値が有意に変化しないかまたは減少する場合、ネガティブな治療結果が示される。一般に、組成物での治療の最初の過程を受ける患者は、最終的に停滞期に達する連続的な投薬での免疫応答における増大を示すことが予測される。組成物の投与は一般に、免疫応答が増大しながら継続される。

【0114】

停滞期の到達は、この治療が中断され得るか、または投薬量もしくは頻度において低減され得ることの指標である。

他の方法において、免疫応答のコントロール値 (すなわち、平均および標準偏差) が、コントロール集団について決定される。典型的には、コントロール集団中の個体は、以前に治療を受けていないものである。次いで、治療組成物を投与した後に患者において測定された免疫応答の値は、コントロール値と比較される。コントロール値と比較した有意な増大 (例えば、平均から1標準偏差より大きい) は、ポジティブな治療結果を示す。有意な増大の欠如または減少は、ネガティブな治療結果を示す。

【0115】

組成物の投与は一般に、免疫応答がコントロール値に対して増大する間、継続される。

前述と同様に、コントロール値に対する停滞期の到達は、治療の投与が中断され得るか、または投薬量もしくは頻度において低減され得ることの指標である。

【0116】

他の方法において、免疫応答のコントロール値 (例えば、平均および標準偏差) は、治療組成物での治療を受け、かつその免疫応答が治療に反応して停滞期に達した個体のコントロール集団から決定される。患者における免疫応答の測定値はコントロール値と比較される。患者における測定されたレベルがコントロール値から有意に異なる場合 (例えば、一標準偏差より大きくない場合)、治療は中断され得る。患者におけるレベルがコントロール値より有意に低い場合、組成物の継続された投与が保証される。患者におけるレベルがコントロール値よりも低いままである場合、治療レジメンにおける変更 (例えば、異なるアジュバントの使用) が示され得る。

【0117】

他の方法において、現在治療を受けていないが以前に治療過程を受けた患者は、治療の再開が必要であるか否かを決定するために、免疫応答について観察される。この患者における免疫応答の測定値は、以前の治療過程の後にこの患者において以前に達成された免疫

10

20

30

40

50

応答の値と比較され得る。以前の測定値に対する有意な減少（例えば、同じサンプルの反復測定値における誤差の代表的な限界より大きいこと）は、治療が再開され得ることの指標である。あるいは、患者において測定された値は、治療過程を受けた後に患者集団において決定されたコントロール値（平均 + 標準偏差）と比較され得る。

【0118】

あるいは、患者において測定された値は、予防的に治療されて疾病の症状を依然として有さない患者の集団におけるコントロール値、または治療的に治療されて疾病の特徴の改善を示す患者の集団におけるコントロール値と比較され得る。これらの場合の全てにおいて、コントロール値に対する有意な減少（例えば、一標準偏差より大きい減少）は、治療が患者において再開されるべきであることの指標である。

10

【0119】

分析のための組織サンプルは一般に、患者由来の血液、血漿、血清、粘液または脳脊髄液である。このサンプルは、アミロイドペプチド凝集体またはアミロイドペプチド凝集体模倣物に対する免疫応答の指標について分析され得る。この免疫応答は、例えば、アミロイドペプチド凝集体またはアミロイドペプチド凝集体模倣物に特異的に結合する抗体またはT細胞の存在から決定され得る。組成物に特異的な抗体を検出するELISA法は、実施例の項に記載される。

【0120】

本発明はさらに、上記の診断方法を実施するための診断キットを提供する。一般的に、このようなキットは、オリゴマー中間体に対する抗体に特異的に結合する組成物、またはオリゴマー中間体に特異的なT細胞と反応する組成物を含む。このキットはまた、標識を含み得る。アミロイドペプチド凝集体に対する抗体の検出について、この標識は一般に、標識された抗イディオタイプ抗体の形態である。抗体の検出について、この組成物は、マイクロタイターディッシュ（microtiter dish）のウェルのような固相に予め結合されて供給され得る。反応性T細胞の検出の場合、この標識は、増殖応答を測定するために、³H-チミジンを含んで供給され得る。キットはまた、一般的に、このキットの使用のための指示書を含む。この指示書は、測定された標識のレベルを、オリゴマー中間体に対する抗体のレベルまたはオリゴマー中間体と反応性のT細胞のレベルと相関させるチャートまたは他の対応するレジメンを含み得る。

20

【0121】

実施例

実施例 1

アミロイドペプチド凝集体の分子模倣物を、以下のように合成した。

30

【0122】

ペプチド合成：

A40（配列番号1）、A42（配列番号2）、IAPP（配列番号3）およびヒトブリオン106~126（配列番号4）の固相合成および精製を、ディー、バーディックら（D. Burdick et al.）（1992）J Biol Chem 第267巻、546~54頁に既に記載されたように、連続流動半自動機器を使用して、フルオレン-9-イルメトキシカルボニル化学によって実施した。Fmoc化学によるC末端チオエステルを、インギニト、アールら（Inginito, R. et al.）、（1999）Journal of the American Chemical Society 第121巻、11369~11374頁に実質的に記載されるように実施した。

40

【0123】

各ペプチドについて、10mLのジクロロメタン（DCM）中のsulfonylbutyryl-AM-PEGA樹脂（ノババイオケム社（Novabiochem）、カリフォルニア州サンディエゴ（San Diego）所在）1gに5当量の第1のアミノ酸（（A42についてFmoc-Ala-OH）、（A40についてFmoc-Val-OH）および（IAPPについてFmoc-Tyr(t-But)-OH））を添加して第1のアミノ酸をsulfonylbutyryl-AM-PEGA樹脂に手動でカップリング

50

し、続いて10当量のジイソプロピルエチルアミン(DIEA)を添加した。この混合物を室温で20分間攪拌し、次いで-10~-20に冷却した。4.7当量のByBop(ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス(ピロリジノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート)を添加し、この混合物を-10~-20で8~9時間攪拌した。ペプチド合成の分野で周知であるカイザー(Kaiser)試験を使用してカップリング効率を確認してFmoc切断方法を使用して決定したところ、置換レベルは約0.18~0.20mmole/gであることが見出された。無水酢酸を使用してアセチル化を実施した。アミノ酸鎖を、連続流動半自動機器を使用して、フルオレン-9-イルメトキシカルボニル化学によって伸長させた。100mgのペプチドを、合成容器中でN-メチル-2-ピロリドン5x(NMP)5.0mLのNMP、185μLのi-Pr2EtN(1.1mmol)および400μLのヨードアセトニトリル(予め暗中でアルミナ塩基性フィルタ床で濾過した)で洗浄した。この反応混合物を、ロータリープレート上および暗中で24時間攪拌した。この樹脂を5xNMPおよび5xDMFで洗浄し、続いて5xCH2Cl2を使用して洗浄し、次いで乾燥した。100mgの樹脂を5xTHFで洗浄し、続いて2.7mLのTHFを添加した。次いで、2.7mLのTMS-CH2N2(50:50、v/v、ヘキサン)を添加した。2時間攪拌した後、この樹脂を5x5mL THFおよび5x5mL DMFで洗浄した。

【0124】

この樹脂を120μLのエチル-3-メルカプトプロピオネートに添加し、この混合物をロータリープレート上で24時間攪拌した。次いで、この樹脂を濾過した後に3x3mL DMFで洗浄した。その濾液および洗浄液を回収し、34でロータリーエバポレートした。収率は約60%であった。

【0125】

得られたペプチドを、標準的な方法(TFAおよびスカベンジャー)を使用して脱保護し、RP-HPLCによって精製した。その純度を分析用RP-HPLCおよび電子スプレー質量分析法によって確認した。

【0126】

ヒトインスリン、リゾチーム、ポリグルタミンKKQ40KKおよび-シヌクレインは、商業的供給元または他の供給元から入手した。

C末端チオエステルを、これらの合成ペプチドおよび市販のペプチドの各々に従来の様式で加えた。

【0127】

コロイド金アミロイドオリゴマー分子模倣物集合:

コロイド金ナノスフィア(平均直径5.3nm)をテッドペラインコーポレイテッド社(Ted Pella, Inc.)から購入し、1MのHCLで洗浄し後に蒸留水で3回洗浄した。これらの金ナノスフィアを、0.2mg/mLのC末端チオエステルペプチド(pH5.0~5.5)の溶液中で3時間定温放置した。次いで、このpHを100mM Tris(pH8.0)(0.2% アジ化ナトリウム)で7.4に調整した。

【0128】

室温で6時間定温放置した後、30,000xG、4、及び30分間の遠心分離によって抗原を回収し、PBS(pH7.6)で3回洗浄して取り込まれていないペプチドを除去し、次いで0.02%のアジ化ナトリウム中に分散させた。得られたミセル分子模倣物を原子間力顕微鏡(AFM)、円偏光二色性分光法、チオフラビンT蛍光、ビス-ANS蛍光およびUV/可視分光法によって分析し、この金上のペプチド単層が、溶液中のオリゴマーアミロイド中間体表示と同じ二次構造および立体配座を有することを確認した。この溶液を4で保存した。

【0129】

分子模倣物の集合を図1に示す。

実施例2

コロイド金アミロイドオリゴマー分子模倣物に対する抗体の産生を、以下のように実施

した。

【0130】

ニュージーランド白ウサギ、Balb/C、C57/Black6マウスおよび飼いや
 又、約0.8～1.0mgのAペプチドに対応するとともに、実施例1に記載され
 るように産生された多量の分子模倣物を注射した。金結合抗原は、注射前にフロイント不
 完全アジュバントであるミョウバンアジュバントと混合したか、またはアジュバントなし
 (PBSのみ)とした。ウサギを1mLの抗原(4で一晩PBSに対して透析したウサ
 ギ1匹当たり0.08～0.1mgのペプチド)で免疫した。第1の注射について、同量
 部の抗原とフロイント完全アジュバントとを使用した。引き続き11回の注射について、
 この抗原をフロイント不完全アジュバントと混合し、各々を2週間間隔で注射した。動物
 に肩甲部上のチェッカー盤様式の1部位当たり0.1mLの小さい増分で皮下注射した。

10

【0131】

血清を静脈穿刺によって回収した。IgG画分をプロテインG-Sepharoseビ
 ーズ上で親和性精製し、0.2Mグリシン(pH2.2)中で溶出し、Tris緩衝液で
 pH7.4に中和し、次いでPBS(pH7.4)に対して透析した。アミロイドオリゴ
 マー中間体分子模倣物をIgG画分と混合し、約2時間定温放置し、その後洗浄すること
 により、この分子模倣物上での吸着によって中間凝集体特異的な抗体(オリゴマー抗体と
 称する)を精製した。このオリゴマー中間体特異的な抗体を0.2Mグリシン(pH2.2
)中で溶出し、その後中和し、PBSに対して透析した。防腐剤として0.02%のアジ
 化ナトリウムを含むPBS中において、この抗体を4または-70で保存した。

20

【0132】

この分子模倣物によるウサギのワクチン接種によって産生されたポリクローナル血清は
 、アミロイドペプチド凝集中間体に特異的であり、かつ可溶性の低分子量のA種または
 原線維A種とは検出可能に反応性ではない(実施例4を参照のこと)。驚くべきことに
 、低分子量AまたはA原線維に対する抗オリゴマー免疫反応性は、ウサギを12回ブ
 ーストした(boosting)後でさえ、未分画血清について観察されず、このことは
 、これらの分子模倣物に対する免疫応答が非常に特異的であることを示している。

【0133】

実施例3

モノマーまたは低分子量の凝集体、オリゴマー中間体および成熟アミロイド原線維の産
 生を説明する。

30

【0134】

Aのモノマーおよび低分子量の凝集体の調製:

モノマーペプチドおよび低分子量凝集体を、室温で400μLのHFIP中に1.0m
 gのAを溶解させることによって調製した。100μLの得られたA溶液をシリコン
 処理エッペンドルフチューブ中の900μLのDDH₂Oに添加した。室温で10～2
 0分間定温放置した後、これらのサンプルを14,000×Gで15分間遠心分離し、上
 清画分(pH2.8～3.5)を新たなシリコン処理チューブに移し、N₂の穏やかな流
 れに5～10分間供してHFIPを蒸発させた。次いで、これらのサンプルを直ぐに使用
 したか、または任意の原線維もしくはオリゴマー中間体をも除去するためにゲル透過によ
 って分画した。

40

【0135】

Aオリゴマー中間体の調製:

アミロイドペプチド凝集体を、室温で10～20分間にわたり400μLのHFIP中
 に1.0mgのAを溶解させることによって調製した。100μLの得られたA溶液
 を、シリコン処理エッペンドルフチューブ中の900μLのDDH₂Oに添加した。室
 温で10～20分間定温放置した後、これらのサンプルを14,000×Gで15分間遠
 心分離し、上清画分を新たなシリコン処理チューブに移し、N₂の穏やかな流れに5～1
 0分間供してHFIPを蒸発させた。これらのサンプルを、テフロンコーティングしたミ
 クロスターラーバーを使用して、24～48時間、22、および500RPMで攪拌し

50

た。AFMまたはEMによる観察のために、10 μ lのアリコートに6～12時間間隔で採取した。中間体の高純度サンプルを調製するために、残留トリフルオロ酢酸イオンを、1 mM HCl中での凍結乾燥と、続く50%アセトニトリル中での凍結乾燥とによって除去した。

【0136】

最適レベルの中間体を得るために必要な攪拌時間は、攪拌速度およびペプチド濃度を含む当業者に明らかで微妙な因子に依存する。A についての最も高いレベルの中間体を、6時間と3日間との間の攪拌の後に回収した。

【0137】

オリゴマー中間体およびモノマーまたは低分子量の凝集体の量を、Toso Haas TSK 300ゲル透過カラムまたはSuparose HR75 FPLCカラムを使用して注意深く観察した。この中間体を、カラムの含有容積またはその近傍で溶出するモノマーA または低分子量A から、カラムの空隙容積またはその近傍で回収した。

【0138】

原線維からの中間体の精製は、100,000 \times G、及び1時間の遠心分離によって行う。モノマーまたは低分子量の凝集体は、ゲル透過クロマトグラフィーカラムへの上清の適用によって除去する。中間体はカラムの空隙容積の近傍で溶出され、モノマーおよび低分子量の凝集体は、含有容積の近傍で溶出して廃棄される。

【0139】

始原原線維の調製：

球状オリゴマーを上記のように調製し、次いで同容量のPBS (pH 7.4) を添加して24時間攪拌し、球状オリゴマーの湾曲した繊維を生成した。

【0140】

環状始原原線維の調製：

環状始原原線維の調製のために、オリゴマー中間体を上記のように調製した。このサンプルを、緩徐なエバポレーションによって乾燥しながら、激しい攪拌に供する。実質的に同じ結果を得るために、サンプルを攪拌しながら、数滴（総体積の5%未満）のヘキサンを添加する。これを、各添加について5分間の攪拌期間で10回行う。

【0141】

原線維の調製：

原線維を、3つの異なる条件（各々0.02%のアジ化ナトリウムを含む水 (pH 3.8～4.2)、10 mM Tris (pH 7.4)、および50 mM Tris 100 mM NaCl (pH 7.4)) 下で調製した。A の最終ペプチド濃度は0.3～0.5 mg/ml (80～125 μ M) であった。これらのサンプルを、テフロンコーティングしたマイクロスターパーにより、室温、及び500 rpmで6～9日間攪拌した。原線維形成を、チオフラビンT蛍光およびUV光散乱によって観察した。原線維形成が完了したら、これらの溶液を14,000 \times G、及び20分間で遠心分離し、原線維ペレットを2回蒸留した水で3 \times 洗浄し、次いで所望の緩衝液中に再懸濁した。成熟原線維形態の存在、ならびに球状オリゴマー中間体および始原原線維の欠如を、AFMまたはネガティブ染色EMによって確認した。

【0142】

実施例 4

抗オリゴマー凝集抗体の特異性を、ドットプロット分析およびELISAアッセイを使用して、抗オリゴマー抗体と反応する細胞性タンパク質についてSHSY5Y細胞の溶解物をスクリーニングすることによって試験した。

【0143】

ドットプロットアッセイ

モノマーまたは低分子量の凝集体、オリゴマー中間体およびアミロイド原線維を実施例3に記載されるように調製し、使用の直前に、各々を0.5 mg/mlの濃度でDDH₂O中に溶解させた。2 μ lの各サンプルをニトロセルロースメンブレンに注いだ。0.

10

20

30

40

50

0.1%のTween 20を含むTris緩衝化生理食塩水(TBS)(TBT-T)中の10%の脱脂粉乳により、このメンブレンを室温で1時間ブロック(block)した。このメンブレンを、TBS-Tで3回(各々5分間)洗浄し、次いで室温で1時間にわたって、親和性精製した抗オリゴマー抗体(TBS-T中の3%BSA中0.1 μ g/ml)または血清(3%BSA TBS-T中に1:1,000希釈)と共に定温放置した。より高い濃度の洗剤は、抗オリゴマーによるアミロイドペプチド凝集体の検出を妨げることが示されていることから、Tween 20の濃度は、通常使用される濃度の10分の1よりも低い。これらのメンブレンをTBS-Tで3回(各々5分間)洗浄し、3%BSA/TBS-T中に1:10,000希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ-コンジュゲート抗ウサギIgG(プロメガ社(Promega))と共に定温放置し、そして室温で1時間定温放置した。これらのプロットをTBS-Tで3回洗浄し、アマシャム-ファルマシア社(Amersham-Pharmacia)、ニュージャージー州ピスカタウェイ(Piscataway)所在製のECL化学ルミネセンスキットで発色させた。抗オリゴマーについて、上記したように同じメンブレンをストリッピング緩衝液(100mM 2-メルカプトエタノール、2%SDS、62.5mM Tris-HCl、pH6.7)中、65、及び45分間定温放置することによって揮散(strip)し、TBS-Tで5分間にわたって5回洗浄し、10%脱脂粉乳でブロックし、そして6E10で免疫検出した。6E10は、ヒトアミロイドペプチドのアミノ酸残基1~17を検出する公知のモノクローナル抗体である。

10

【0144】

20

図2に示すように、以下をニトロセルロースメンブレンに塗布し、抗オリゴマー凝集体(抗オリゴ)でプローブした:

- 1 - 可溶性A40オリゴマー凝集体中間体;
- 2 - 可溶性低分子量A40; および
- 3 - A40原線維。

【0145】

抗オリゴマーのみが可溶性凝集中間体を認識し、6E10は全てのA種を認識することが図2において理解され得る。

ELISAアッセイ

サンプルを96ウェルのプレートに塗布し、実施例2に記載されるように産生された抗オリゴマー凝集体抗血清を使用するELISAによって分析した。可溶性低分子量A40()、可溶性A40オリゴマー()、A40原線維()についての分析結果を図3に示す。

30

【0146】

サンプルをコーティング緩衝液(0.1M重炭酸ナトリウム、pH9.6)中に希釈し、100 μ lの緩衝液中の0ngと100ngとの間の各アミロイド型を96ウェルのマイクロプレートの別個のウェルに添加した。これらのプレートを37で2時間定温放置し、0.01% Tween 20を含むPBS(PBS-T)で3回洗浄し、次いで3%BSA TBS-Tにより、37で2時間ブロックした。使用したBSAは、IgGフリー(シグマ社(Sigma))であった。次いで、これらのプレートをPBS-Tで3回洗浄し、100 μ lの抗オリゴマー(3%BSA/TBS-T中に1:10,000希釈)を添加し、37で1時間定温放置した。これらのプレートをPBS-Tで3回洗浄し、100 μ lのホースラディッシュペルオキシダーゼ-コンジュゲート抗ウサギIgG(プロメガ社(Promega)、3%BSA TBS-T中に1:10,000希釈)を添加し、続いて37で1時間定温放置した。これらのプレートをPBS-Tで3回洗浄し、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB、ケーピーエル社(KPL))、メリーランド州ゲイザースバーグ(Gaithersburg)所在)を使用して発色させた。この反応を、100 μ Lの1M HClで停止させ、これらのプレートを450nmで読み取った。

40

【0147】

50

図3から、アミロイドペプチド凝集A40中間体のみが抗オリゴマー血清によって認識され、可溶性低分子量A40およびA40原線維は、バックグラウンド値しか示さなかったことが判る。

【0148】

実施例5

原線維形成中の抗オリゴマー免疫反応性の反応速度論を、タイムポイントドットプロットアッセイによって分析した(図4)。

【0149】

球状凝集体は、変性Aペプチドの新たに可溶化した溶液中に最初は存在せず、経時的に発生する。さらに、球状オリゴマーの形成は、曲線をなす繊維または始原原線維の形成に先行することが公知である。例えば、ハーパーら(Harper et al)(1999) Biochemistry 第38巻、8972頁を参照のこと。

【0150】

図4は、A40溶液およびA42溶液がHFIP中に溶解され、56μMのAに希釈され、そして100mM NaCl、50mM Tris(pH7.4)中、25で攪拌しながら定温放置されたタイムポイントドットプロットアッセイを示す。示された時間において、アリコートにニトロセルロースメンブレンに塗布し、抗オリゴマー抗体(上のパネル)でプローブし、次いで揮散して6E10で再プローブした(下のパネル)。

【0151】

A42について、免疫反応性は6時間目に観察され、24時間と168時間との間で最大である。332時間目に免疫反応性は失われる。A40についての反応速度論は、中間体の形成が約18~24時間遅延される(これは、A42がA40より速くオリゴマーを形成するという以前の観察と一致する)こと以外は、A42の反応速度論とほぼ同じである。これらのサンプルを電子顕微鏡によって調べて、この経時実験中の形態を決定した。免疫反応性の初期において、これらのサンプルは球状オリゴマーを主に含むが、後期においては、伸長された「始原原線維」を主に含むことが確認された。この観察は、始原原線維およびあまり発達していない中間体アミロイド形態が、抗オリゴマーによって認識される同じ立体配座エピトープを提示することを示す。

【0152】

実施例6

抗オリゴマー凝集体エピトープの見かけに対するペプチド凝集体サイズの依存を、ソレハムら(Soreghan et al)(1994) J Biol Chem 第269巻、28551頁に記載されるようなサイズ排除クロマトグラフィーによるアミロイドペプチド凝集体を分画することによって試験した。

【0153】

各種サイズのオリゴマーの集団に有利な異なる条件下で、A40オリゴマーの溶液を定温放置した。() DD H₂O(pH2.5~4)中で3日間定温放置したA40、(. . . .) 50mM Tris(pH7.4) 100mM NaCl中で2日間定温放置したA40、(- - - -) 50mM Tris(pH7.4)中に新たに溶解したA40、(. . . .) 50mM Tris(pH7.4)中で2日間定温放置したA40。ピークを回収し、各々からのアリコートにニトロセルロースメンブレン上にドットし、抗オリゴマー抗体またはおよび6E10抗体でプローブした。結果を図5に示す。

【0154】

約40kDaの位置(これはオクタマーのおよそのサイズに対応する)で溶出する40kDaのペプチド凝集体は、抗オリゴマーによって認識される。テトラマー、ダイマーおよびモノマーに対応する位置で溶出するピークは、抗オリゴマーとの反応性を示さない。

【0155】

実施例7

実施例2で産生された抗オリゴマー血清の特異性を、ELISAによる他のアミロイド原性のタンパク質およびペプチドとの反応性によって分析した。これには、-シヌクレイ

10

20

30

40

50

ン、島アミロイド I A P P、ポリグルタミン、リゾチーム、ヒトインスリンおよびヒトプリオンペプチド 106 ~ 126 由来の始原原線維凝集体、低分子量オリゴマーおよびアミロイド原線維の分析が含まれる。

【0156】

サンプルを 96 ウェルのプレートに塗布し、抗オリゴマー抗血清を使用して E L I S A (これは、実質的に実施例 4 に記載されるように実施した) によって分析した (図 6)。可溶性低分子量オリゴマー ()、アミロイドペプチド凝集体 () および A 40 ペプチド () を、各アミロイド型について分析した。アミロイドペプチド凝集体のみが抗オリゴマーによって認識され、可溶性低分子量オリゴマーおよび原線維はバックグラウンド値のみを与える。アミロイドの型を図 6 中の各パネルの上部に示す。

10

【0157】

これらの結果は、抗オリゴマーは、アミロイドペプチド凝集体中のポリペプチド骨格独自の共通な立体配座的構造特徴を認識し、かつ独自のアミノ酸一次配列によって規定されないことを示す。

【0158】

実施例 8

細胞培養物における抗オリゴマー抗体の神経毒性を阻害する能力を試験した。

抗オリゴマー抗体によるアミロイドペプチド凝集体の細胞傷害性の阻害を、ヒト神経芽細胞腫 S H - S Y 5 Y 細胞における M T T 低減および L D H 放出毒性アッセイを用いて測定する。

20

【0159】

M T T 低減アッセイについて、S H - S Y 5 Y ヒト神経芽細胞腫細胞を、10 mM H E P E S、10% ウシ胎仔血清、4 mM グルタミン、ペニシリン (200 単位 / m l) およびストレプトマイシン (200 μ g / m l) を含む D M E M 中において、5% C O₂ 中、及び 37 °C で保存した。培地を 2 日毎に交換した。使用前に N 2 供給および 1×10^{-5} M の全トランス型レチノイン酸を含む無血清 D M E M 培地中で細胞を分化させた。細胞を 96 ウェルのプレート中に 10,000 細胞 / ウェルでプレートし、一晚増殖させた。培地を除去し、試験されるアミロイド形態を、フェノールレッドを含まない 80 μ l の新たな培地に添加した。37 °C で 4 時間の定温放置後、M T T 毒物学キット (T o x - 1、シグマ社 (S i g m a)) を製造業者の指示に従って使用することにより、これらの細胞を分析した。

30

【0160】

L D H 放出アッセイについて、上記のように S H - S Y 5 Y 細胞を調製してアミロイド形態で処理した。37 °C で 8 時間の後、L D H 毒物学キット (T o x - 7、シグマ社 (S i g m a)) を製造業者の指示に従って使用して L D H アッセイを実施した。

【0161】

図 7 は、A 40 および A 42 オリゴマー中間体の毒性、ならびに A 40 および A 42 原線維について、M T T 低減を利用した抗オリゴマーによる毒性の阻害を示す。サンプルを、過剰量の親和性精製された抗オリゴマー抗体の存在下 (白棒)、非存在下 (黒棒)、または同量の非免疫ウサギ I g G の存在下 (斜線の棒) で 30 分間にわたり予め定温放置し、次いで 2.5 mM の最終濃度で細胞傷害性について分析した。抗オリゴマーは、オリゴマー中間体 (オリゴ) の毒性を実質的に低減するのに有効である。原線維形態は、最初は実質的に非毒性であり、かつ抗オリゴマーによって実質的に影響を受けない。

40

【0162】

- シヌクレイン、島アミロイドポリペプチド (I A P P)、ポリグルタミン、リゾチーム、ヒトインスリンおよびヒトプリオンペプチド 106 ~ 126 由来のアミロイドペプチド凝集体を含む他のアミロイドペプチド凝集体の毒性の M T T 低減を利用した抗オリゴマーによる阻害を図 8 に示す。図 8 はまた、試験した全てのアミロイド型についての総平均測定値において、可溶性低分子量オリゴマーおよび原線維 (A 11 S o l . および A 11 F i b .) についての細胞毒性の測定値および抗オリゴマーによるその低減を示す。

50

【0163】

A40、A42、-シヌクレイン、島アミロイドポリペプチド(IAPP)、ポリグルタミン、リゾチーム、ヒトインスリンおよびヒトプリオンペプチド106~126のアミロイドペプチド凝集体について、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞におけるLDH放出アッセイを使用して測定した場合の抗オリゴマー抗体による毒性の阻害を図9aおよび9bに示す。可溶性オリゴマーサンプルを、過剰量の親和性精製された抗オリゴマー抗体の存在下(白棒)、非存在下(黒棒)、または同量の非免疫ウサギIgGの存在下(斜線の棒)で30分間にわたり予め定温放置し、次いで2.5mMの最終濃度で細胞傷害性について分析した。図9aおよび9bはまた、試験した全てのアミロイド型についての総平均測定値において、可溶性低分子量オリゴマーおよび原線維(All Sol.およびAll Fib.)についての細胞毒性の測定値および抗オリゴマーによるその低減を示す。図9bは明確な目的を含み、図9b中に示された白棒および黒棒を示す。

10

【0164】

このデータから、試験した各アミロイドペプチド凝集体型で抗オリゴマー抗体による毒性の阻害が生じることが明らかである。

試験した全てのアミロイドのアミロイドペプチド凝集体が有意な毒性を示し、かつこの毒性が抗オリゴマーによって除去されるということは、アミロイドペプチド凝集体が、共通の機構によって毒性を媒介し得る共通の構造を共有することを示す。また、抗オリゴマーは一般的なクラスのアミロイドオリゴマー中間体に結合し、かつその毒性を低減させるために有効な抗体であることが示される。

20

【0165】

実施例9

抗オリゴマーの特異性をドットプロット分析およびELISAアッセイによって試験した。

【0166】

ドットプロット分析:

可溶性SH-SY5Y細胞溶解物(2.8μg)を、0ng、6ng、12ng、25ng、50ngまたは100ngのA42アミロイドペプチド凝集体と混合した。これらのサンプルを、実質的に実施例4に記載されるように実施したドットプロットアッセイによって試験した(図10)。

30

【0167】

添加したアミロイドペプチド凝集体の非存在下において、抗オリゴマーの免疫反応性は細胞溶解物で観察されない。上列:プロテアーゼインヒビターカクテルの非存在下で細胞溶解物と共に定温放置されたアミロイドペプチド凝集体。下列:プロテアーゼインヒビターカクテルの存在下で細胞溶解物と共に定温放置されたアミロイドペプチド凝集体。プロテアーゼインヒビターの存在下で、検出可能なアミロイドペプチド凝集体における顕著な増大が存在する。

【0168】

ELISAアッセイ:

可溶性SH-SY5Y細胞溶解物(20μg)を、量が増大するA42、A40および-シヌクレインのアミロイドペプチド凝集体と混合し、実質的に実施例4に記載されるように実施したELISAアッセイに供した(図11)。アミロイドペプチド凝集体の非存在下での細胞溶解物のバックグラウンドを上回る0.75ngほどの少なさのアミロイドペプチド凝集体が検出される。

40

【0169】

このドットプロット分析におけるように、細胞溶解物と混合された場合の添加された可溶性オリゴマーの検出は、プロテアーゼインヒビターの存在に依存する。これは、可溶性アミロイドペプチド凝集体が、既に報告されているように(ウォルシュら(Walsh et al.)(2002)Nature 第416巻、535~539頁)タンパク質分解に感受性であることを示している。

50

【0170】

この分子模倣物での反復免疫に应答して産生された未画分の血清は、アミロイド形成ペプチドの病理学的ミセル立体配座に顕著に特異的である。これは、Aを使用したワクチン接種について観察された所望されない炎症性副作用を回避するワクチンの開発のための手段を提供し得ることを示唆する。なぜなら、このワクチンは、モノマーA または原線維沈着に対する反応性を有さずに中間体を特異的に狙うからである（ハーディ（Hardy）、ディー、ジェイ セルコー（D. J. Selkoe）（2002）Science 第297巻、353～356頁）。試験した全てのアミロイドの可溶性オリゴマーがこの抗体によって全て認識されるという結果は、このエピトープに対するワクチンが、広範囲のアミロイド疾患のための有効な治療的アプローチであり得ることを示唆する。

10

【0171】

実施例10

ELISAアッセイを使用した診断方法：

脳脊髄液サンプルを、コーティング緩衝液（0.1M重炭酸ナトリウム、pH9.6）中に、2倍希釈で連続的に希釈する。100 μ lのサンプルを96ウェルのマイクロプレートのウェルに添加し、37 $^{\circ}$ Cで2時間定温放置し、0.01% Tween 20を含むPBS（PBS-T）で3回洗浄し、次いで3% BSA TBS-Tを用いて37 $^{\circ}$ Cで2時間ブロックする。使用されるBSAはIgGフリー（シグマ社（Sigma））である。次いで、これらのプレートをPBS-Tで3回洗浄し、100 μ lの抗オリゴマー（3% BSA/TBS-T中に1:10,000希釈）を添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間定温放置する。これらのプレートをPBS-Tで3回洗浄し、100 μ lのホースラディッシュペロキシダーゼ-コンジュゲート抗ウサギIgG（プロメガ社（Promega）3% BSA TBS-T中に1:10,000希釈）を添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間定温放置する。これらのプレートをPBS-Tで3回洗浄し、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB、ケーピーエル社（KPL）、メリーランド州ゲイザーズバーグ（Gaithersburg）所在）を使用して発色させる。この反応を100 μ lの1M HClで停止させ、これらのプレートを450nmで読み取る。ELISAプレートのウェルに対する抗オリゴマーの結合は、アミロイドオリゴマー中間体の存在を示す。

20

【0172】

実施例11

治療方法の効力を評価するための方法：

オリゴマー特異的抗体は、アミロイドオリゴマー中間体の形成を阻害するか、またはこのようなオリゴマー中間体の分解もしくは解離を引き起こす薬物および治療的薬剤についてのスクリーニングにおいて利用され得る。アミロイドオリゴマー中間体形成を阻害する薬物についてスクリーニングするために、試験化合物または薬物を、アミロイドオリゴマー中間体が任意の阻害効果の非存在下で形成する条件下で、アミロイドペプチドと共に定温放置する。この混合物を、実質的に実施例4に記載されるように、形成されたアミロイドオリゴマー中間体の量を決定するELISAプレートによって分析する。オリゴマー中間体を分解または解離させる化合物について試験するために、予め形成されたオリゴマー中間体を試験薬物または化合物と混合し、この混合物を存在するオリゴマー中間体の量を決定するELISAによって分析する。阻害化合物は、より低い量のアミロイドオリゴマーを生じ、アミロイドオリゴマーは、この分析において抗オリゴマー抗体によって検出される。

30

40

【0173】

上記の発明は、理解を明確にする目的のために詳細に記載されているが、特定の変更が添付の特許請求の範囲内で実施され得ることが明らかである。本明細書中に引用される全ての刊行物および特許文献は、各々が個々に示されるのと同程度に、全ての目的についてその全体が本明細書中で参考により援用される。

【図面の簡単な説明】

【0174】

50

【図1】本発明の合成抗原の集合を示す図。

【図2】A 低分子量オリゴマー、A 高分子量オリゴマーおよびA 原線維をニトロセルロースメンブレンにスポットし、抗オリゴマー抗体および6E10でプローブしたドットプロットアッセイの結果を示す図。

【図3】A 低分子量オリゴマー、A 高分子量オリゴマーおよびA 原線維を抗オリゴマー特異性について分析したELISAアッセイの結果を示す図。

【図4】各々経時的に、A 低分子量オリゴマーからのA 高分子量オリゴマーの形成と、それに続くA 高分子量オリゴマーからのA 原線維の形成とを実証するドットプロットアッセイの結果を示す図。

【図5】ゲル濾過カラムから溶出した画分のドットプロット分析によって経時的に決定した場合の異なる溶液において産生されたA 集合の分子サイジングを示す図。 10

【図6】種々の低分子量アミロイド凝集体、高分子量アミロイド凝集体およびアミロイド原線維を抗オリゴマー特異性について分析したELISAアッセイの結果を示す図。

【図7】MTT低減アッセイを使用した抗オリゴマー抗体によるA40およびA42原線維(Fib.)ならびにA40およびA42高分子量凝集体(オリゴ)の細胞毒性における低減を示す図。

【図8】MTT低減アッセイを使用した抗オリゴマー抗体によるA40、A2、-シヌクレイン、鳥アミロイドポリペプチド(IAPP)、ポリグルタミン、リゾチーム、ヒトインスリンおよびヒトプリオンペプチド106~126の低分子量凝集体(Sol.)、高分子量凝集体および原線維(Fib.)の細胞毒性における低減を示す図。 20

【図9a】LDH放出アッセイを使用した抗オリゴマー抗体によるA40、A42、-シヌクレイン、鳥アミロイドポリペプチド(IAPP)、ポリグルタミン、リゾチーム、ヒトインスリンおよびヒトプリオンペプチド106~126の低分子量凝集体(Sol.)、高分子量凝集体および原線維(Fib.)の細胞毒性における低減を示す図。

【図9b】LDH放出アッセイを使用した抗オリゴマー抗体によるA40、A42、-シヌクレイン、鳥アミロイドポリペプチド(IAPP)、ポリグルタミン、リゾチーム、ヒトインスリンおよびヒトプリオンペプチド106~126の低分子量凝集体(Sol.)、高分子量凝集体および原線維(Fib.)の細胞毒性における低減を示す図。

【図10】細胞抽出物における抗オリゴマー抗体の特異性を実証するドットプロット分析を示す図。 30

【図11】細胞抽出物における抗オリゴマー抗体の特異性を実証するELISAアッセイを示す図。

【 図 1 】

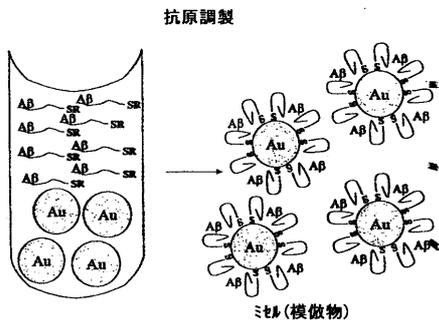


Figure 1

【 図 2 】

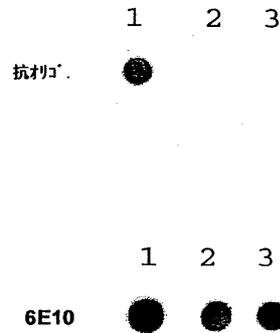


Figure 2

【 図 3 】

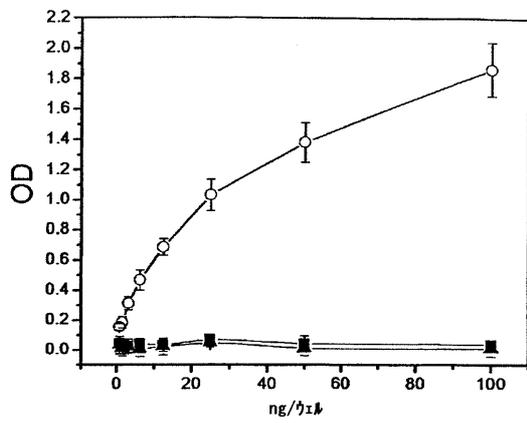


Figure 3

【 図 4 】

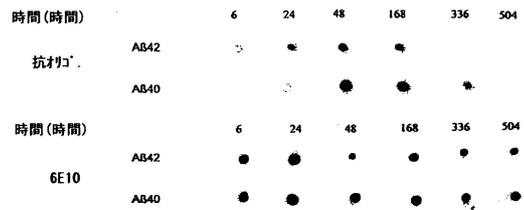


Figure 4

【 図 5 】

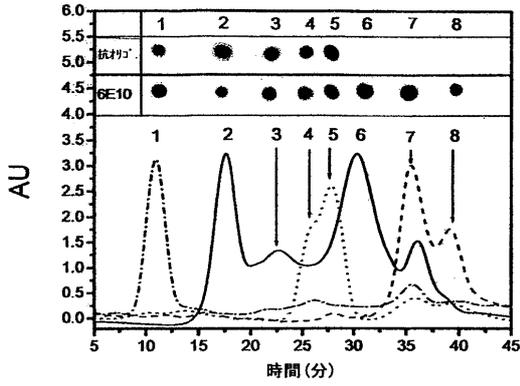


Figure 5

【 図 6 】

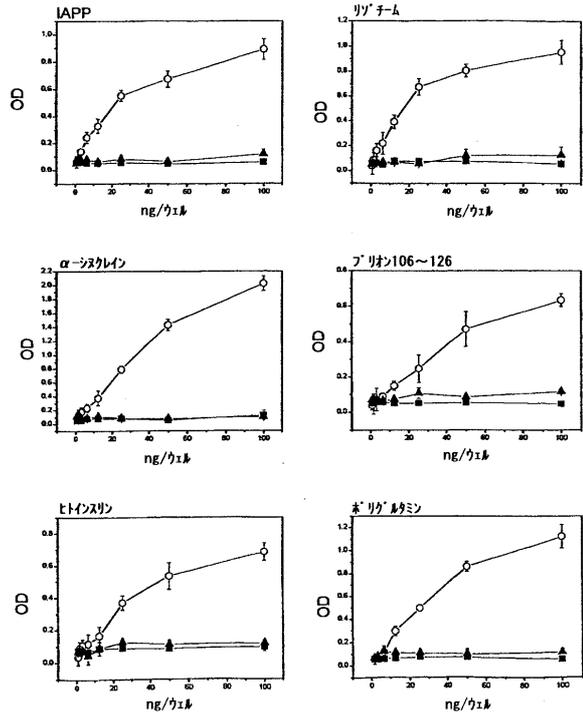


Figure 6

【 図 7 】

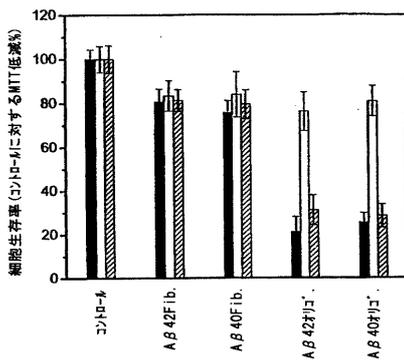


Figure 7

【 図 8 】

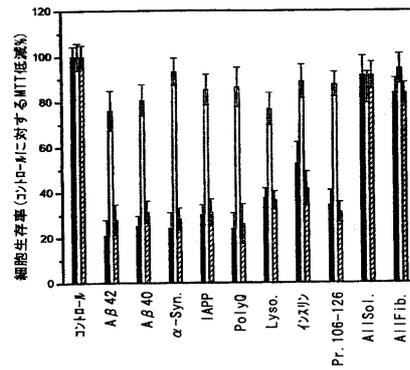


Figure 8

【 図 9 a 】

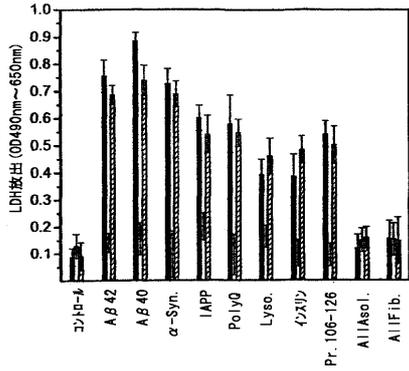


Figure 9a

【 図 10 】

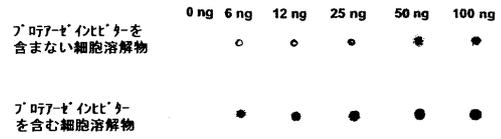


Figure 10

【 図 9 b 】

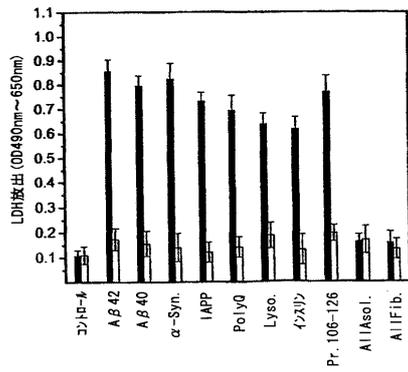


Figure 9b

【 図 11 】

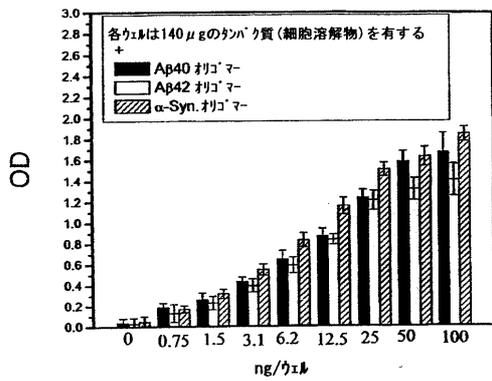


Figure 11

【配列表】

2006516535000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成17年7月20日(2005.7.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

始原原線維凝集体の立体配座エピトープを含む単離された組成物であって、該始原原線維凝集体は a) ヒトまたは動物において形成し、かつ b) アミロイド原線維形成に寄与する組成物。

【請求項2】

前記組成物はペプチドを含む請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記組成物が立体配座的に拘束されている請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記ペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9およびこれらの混合からなる群から選択される請求項2または3に記載の組成物。

【請求項5】

前記エピトープが、湾曲した、または平坦な表面上で拘束されている請求項3に記載の組成物。

【請求項6】

前記表面が a) タンパク質、b) プリーツシートを含むタンパク質、c) 粒子およびシートから選択される請求項5に記載の組成物。

【請求項7】

前記組成物が支持体表面に結合している請求項1から6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

前記組成物が、金、亜鉛、カドミウム、錫、チタン、銀、セレン、ガリウム、インジウム、砒素、ケイ素、これらの混合物およびこれらの組合せから選択される材料を含む支持体上で拘束されている請求項1から7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項9】

前記始原原線維凝集体が約1kDaから約100,000,000kDaの範囲内の分子量を有する請求項1から8のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項10】

前記組成物が、5個以上のモノマーを含む始原原線維凝集体の立体配座エピトープを含む請求項1から9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項11】

前記組成物が始原原線維凝集体の毒性種の立体配座エピトープを含む請求項1から10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項12】

アミロイド疾病もしくはアミロイド疾患の予防、治療または診断のための製剤、またはヒトもしくは動物の患者において、アミロイド疾患のために前もって施された治療の有効性または非有効性を決定するための製剤の製造時に請求項1から11のいずれか一項に記載の有効量の組成物を使用する方法。

【請求項13】

前記製剤は、アルツハイマー病、ダウン症候群に関連する早期発症型アルツハイマー病、

S A A アミロイドーシス、遺伝性アイスランド症候群、多発性骨髄腫、ならびに狂牛病、ヒツジ・スクレイピーおよびミンク海綿状脳症を含む海綿状脳症、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、クールー病、致死性家族性不眠症、慢性消耗症候群、家族性アミロイド多発性神経症、前頭側頭型痴呆、I I 型糖尿病、全身性アミロイドーシス、血清アミロイドーシス、イギリス家族性痴呆、デンマーク家族性痴呆、黄斑変性および脳血管アミロイドーシスの群から選択されるアミロイド疾病の治療のためのものである請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記製剤がワクチンを含む請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記方法は、診断目的のための製剤の製造で行われ、

前記立体配座エピトープに結合する抗体を形成するために前記組成物を使用する工程を含む請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記製剤は、前記立体配座エピトープが患者由来の組織または流体中に存在する場合、アミロイド疾病の原因となる始原原線維凝集体の立体配座エピトープに前記抗体が結合するように前記組織または流体に混合されるものであり、前記抗体の結合または非結合によって、前記患者におけるアミロイド疾病またはアミロイド疾患の存在もしくはそれらの進行の可能性を診断するのに有効な請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記方法は、前記患者に前もって施されているアミロイド疾患のための治療の有効性または非有効性を決定するための製剤の製造で行われ、前記立体配座エピトープに結合する抗体を形成するために前記組成物を使用する工程を含む請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記製剤は、

A . 前記患者の組織または流体中に存在する前記立体配座エピトープに特異的な抗体の治療前のベースライン量を決定する工程；

B . 前記患者に前記治療を施す工程；

C . 前記患者の組織または流体中に存在する前記立体配座エピトープに特異的な抗体の治療後の量を決定する工程；及び

D . 前記抗体の治療前のベースライン量を前記抗体の治療後の量と比較する工程によって使用される請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

アミロイド沈着によって特徴付けられる疾病を検出するのに有用な診断キットであって、該キットは、請求項 1 に記載の立体配座エピトープに結合する抗体を含むキット。

【請求項 2 0】

前記立体配座エピトープが寄与する前記アミロイド原繊維が前記エピトープを実質的に含まない請求項 1 9 に記載の診断キット。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 21/04	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/14	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/20	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/20	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00	
C 0 7 K 17/14	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	C 0 7 K 17/14	
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
		G 0 1 N 33/53	N
		A 6 1 K 37/02	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

テフロン

(72) 発明者 カイエデ、ラケッツ

アメリカ合衆国 9 2 6 1 2 カリフォルニア州 アーバイン ロス トランコス 2 0 1 6

(72) 発明者 グラブ、チャールズ ジー .

アメリカ合衆国 9 2 6 1 2 カリフォルニア州 アーバイン クーリエ コート 2 0

F ターム(参考) 4C084 CA18 CA25 DC50 NA14 ZA01 ZA02 ZA05 ZA15 ZA16 ZA89

ZA94 ZB11 ZB26 ZC22 ZC35

4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 CC03 CC04 CC05 DD62

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA86 EA20 EA50 FA34

FA58 FA81

专利名称(译)	对由不同序列的蛋白质和相应抗体形成的淀粉样蛋白共有的高分子量聚集中间体特异的免疫原		
公开(公告)号	JP2006516535A	公开(公告)日	2006-07-06
申请号	JP2004536278	申请日	2003-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	的, 摄政日, 本, 加州大学,		
[标]发明人	カイエデラケッツ クラブチャールズジー		
发明人	カイエデ、ラケッツ クラブ、チャールズジー。		
IPC分类号	C07K14/47 A61K39/00 A61K39/395 A61P3/02 A61P3/10 A61P17/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/20 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K17/14 G01N33/53 A61K38/00 C07K16/00 C07K16/18		
CPC分类号	A61K39/0007 A61P3/02 A61P17/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/20 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 C07K16/00 C07K16/18		
FI分类号	C07K14/47.ZNA A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61P3/02 A61P3/10 A61P17/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/20 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K17/14 G01N33/53.D G01N33/53.N A61K37/02		
F-TERM分类号	4C084/CA18 4C084/CA25 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA02 4C084/ZA05 4C084/ZA15 4C084/ZA16 4C084/ZA89 4C084/ZA94 4C084/ZB11 4C084/ZB26 4C084/ZC22 4C084/ZC35 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA34 4H045/FA58 4H045/FA81		
代理人(译)	昂达诚		
优先权	60/410069 2002-09-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

感兴趣的组合物包含在淀粉样肽聚集体上发现的一个或多个构象表位，针对这些表位的抗体，以及制备和使用这些组合物，表位和/或抗体的方法。另外，本发明存在于人类患者或兽医动物的影响是可能发展或从淀粉样疾病的患者（例如阿尔茨海默氏病）肽聚集发现，或它（例如毒性肽聚集体）一种合成组合物，其包含这种表位的特定构象表位或由其组成或由其组成含有成分。本发明包括使用这种组合物检测，治疗和预防人或动物疾病的方法。本发明不仅包括与该构象表位结合的抗体，还包括制备此类抗体的方法和使用此类抗体检测，治疗和预防疾病的方法和/或用于鉴定潜在的治疗剂（例如药物筛选）。

