

(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2010-502938

(P2010-502938A)

(43) 公表日 平成22年1月28日(2010.1.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4 C O 7 6
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 H O 4 5
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-521822 (P2009-521822)
 (86) (22) 出願日 平成19年7月26日 (2007. 7. 26)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年3月5日 (2009. 3. 5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/016738
 (87) 国際公開番号 W02008/013859
 (87) 国際公開日 平成20年1月31日 (2008. 1. 31)
 (31) 優先権主張番号 60/833, 854
 (32) 優先日 平成18年7月28日 (2006. 7. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/848, 358
 (32) 優先日 平成18年10月2日 (2006. 10. 2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507077558
 エイディーライフ インコーポレイティッド
 アメリカ合衆国 メリーランド州 ロック
 ビル キー ウェスト アヴェニュー 9
 430 スート 210
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74) 代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

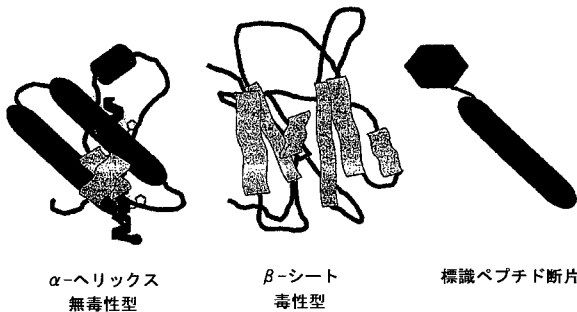
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断および治療のためのペプチドプローブ

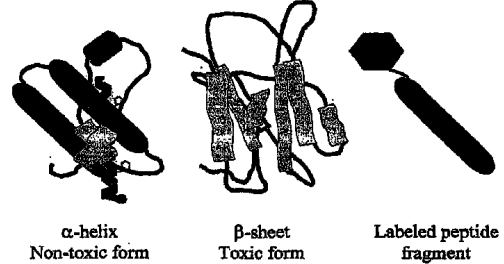
(57) 【要約】

立体構造的に変化したタンパク質に関連するさまざまな疾患を診断および処置するために使用できる作用物質および方法が開示される。この作用物質および方法は、立体構造的に変化したタンパク質に関連する疾患を処置するのに有用な薬物を特定および送達するために使用することができる。

伝達性海綿状脳症: TSE配座異性体



Transmissible spongiform encephalopathies: TSE Conformers



【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、試料を接触させる段階; および

(b) ペプチドプローブと特定の自己凝集状態で存在する任意の標的タンパク質との間の任意の結合を検出し、それによって特定の自己凝集状態で存在する任意の標的タンパク質を特定する段階

を含む、特定の自己凝集状態で試料に存在する標的タンパク質を特定するための方法。

【請求項2】

ペプチドプローブが、モノマー、可溶性オリゴマーおよび不溶性自己凝集体からなる群より選択される特定の自己凝集状態の標的タンパク質に、選択的に結合する、請求項1記載の方法。

10

【請求項3】

ペプチドプローブが、不溶性の無定形自己凝集体、原線維前駆体(protofibril)および原線維からなる群より選択される標的タンパク質の不溶性自己凝集体に、選択的に結合する、請求項2記載の方法。

【請求項4】

標的タンパク質が、膵島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質、アミロイドタンパク質またはAβペプチド、血清アミロイドA、インスリン、アミリン、非アミロイド成分、プリオン、ヘモグロビン、免疫グロブリンまたはその断片、 α_2 -ミクログロブリン、 α_1 -シヌクレイン、ロドプシン、 α -1-アンチキモトリプシン、シスタリン(cystallin)、タウ、p53、プレセニリン、低密度リポタンパク質受容体、アポリポタンパク質、スーパーオキシドジスムターゼ、神経フィラメントタンパク質、トランスサイレチン、プロカルシトニンまたはカルシトニン、心房性ナトリウム利尿因子、ゲルゾリン、嚢胞性線維症膜貫通制御因子、ハンチントン病タンパク質、フィブリノゲン鎖、フェニルアラニン水酸化酵素、コラーゲン、 α -ヘキソサミニダーゼ、ならびにシスタチンCタンパク質からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

20

【請求項5】

ペプチドプローブが検出可能な標識をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項6】

ペプチドプローブが、SEQ ID NO:36およびSEQ ID NO:45より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1記載の方法。

30

【請求項7】

ペプチドプローブが固体支持体に固定化される、請求項1記載の方法。

【請求項8】

(a) 特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合し、かつ検出可能な標識で標識されている、標的タンパク質に対するペプチドプローブを、患者に投与する段階; および

(b) 患者に存在する標的タンパク質の位置に局在化された標識ペプチドプローブについて被験者を走査し、それによって特定の自己凝集状態で、患者に存在する標的タンパク質を特定する段階

40

を含む、特定の自己凝集状態で、患者に存在する標的タンパク質を特定するためのインビボの方法。

【請求項9】

ペプチドプローブが、モノマー、可溶性オリゴマーおよび不溶性自己凝集体からなる群より選択される特定の自己凝集状態の標的タンパク質に、選択的に結合する、請求項8記載の方法。

【請求項10】

標的タンパク質が、膵島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質、アミロイドタンパク質またはAβペプチド、血清アミロイドA、インスリン、アミリン、非アミロイド成

50

分、プリオン、ヘモグロビン、免疫グロブリンまたはその断片、 β_2 -ミクログロブリン、 β -シヌクレイン、ロドプシン、 β 1-アンチキモトリプシン、シスタリン、タウ、p53、プレセニリン、低密度リポタンパク質受容体、アポリポタンパク質、スーパーオキシドジスムターゼ、神経フィラメントタンパク質、トランスサイレチン、プロカルシトニンまたはカルシトニン、心房性ナトリウム利尿因子、ゲルゾリン、嚢胞性線維症膜貫通制御因子、ハンチントン病タンパク質、フィブリノゲン鎖、フェニルアラニン水酸化酵素、コラーゲン、 β -ヘキササミニダーゼ、ならびにシスタチンCタンパク質からなる群より選択される、請求項8記載の方法。

【請求項11】

特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、標的タンパク質を接触させ、それによって標的タンパク質の高次タンパク質凝集体の形成を阻止する段階を含む、標的タンパク質のタンパク質凝集体の形成を阻止するための方法。

10

【請求項12】

ペプチドプローブが、モノマー、可溶性オリゴマーおよび不溶性自己凝集体からなる群より選択される特定の自己凝集状態の標的タンパク質に、選択的に結合する、請求項11記載の方法。

【請求項13】

標的タンパク質が、膵島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質、アミロイドタンパク質またはA β ペプチド、血清アミロイドA、インスリン、アミリン、非アミロイド成分、プリオン、ヘモグロビン、免疫グロブリンまたはその断片、 β_2 -ミクログロブリン、 β -シヌクレイン、ロドプシン、 β 1-アンチキモトリプシン、シスタリン、タウ、p53、プレセニリン、低密度リポタンパク質受容体、アポリポタンパク質、スーパーオキシドジスムターゼ、神経フィラメントタンパク質、トランスサイレチン、プロカルシトニンまたはカルシトニン、心房性ナトリウム利尿因子、ゲルゾリン、嚢胞性線維症膜貫通制御因子、ハンチントン病タンパク質、フィブリノゲン鎖、フェニルアラニン水酸化酵素、コラーゲン、 β -ヘキササミニダーゼ、ならびにシスタチンCタンパク質からなる群より選択される、請求項11記載の方法。

20

【請求項14】

α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、 α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ標的タンパク質の完全長の配列を含まない、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、治療用作用物質を組み合わせる段階、および

30

ペプチドプローブ-治療用作用物質の組み合わせをその必要性がある患者に投与する段階

を含む、治療用作用物質を標的タンパク質に送達する方法。

【請求項15】

治療用作用物質が抗アミロイド活性を有する、請求項14記載の方法。

【請求項16】

ペプチドプローブが、特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する、請求項14記載の方法。

40

【請求項17】

ペプチドプローブが、モノマー、可溶性オリゴマーおよび不溶性自己凝集体からなる群より選択される特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する、請求項16記載の方法。

【請求項18】

(A) 融合タンパク質が、

(i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、

50

(b) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起
こし、かつ

(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、
標的タンパク質に対するペプチドプローブと、

(ii) 融合タンパク質の凝集状態に依存してシグナルを生ずる標識と
を含む、融合タンパク質および試験作用物質を接触させる段階；

(B) 標識によって生じたシグナルを検出する段階；ならびに

(C) シグナルを、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力と相関させる段階
を含む、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力を評価する方法。

【請求項 19】

10

(A) 融合タンパク質が、

(i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起
こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、

(b) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起
こし、かつ

(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、
標的タンパク質に対するペプチドプローブと、

(ii) 融合タンパク質の凝集状態に依存してシグナルを生ずる標識と
を含む、標的タンパク質、融合タンパク質、および試験作用物質を接触させる段階

20

(B) 標識によって生じたシグナルを検出する段階；ならびに

(C) シグナルを、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力と相関させる段階
を含む、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力を評価する方法。

【請求項 20】

(A) 融合タンパク質が、

(i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起
こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、

(b) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起
こし、かつ

(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、
標的タンパク質に対するペプチドプローブと、

(ii) 融合タンパク質の凝集状態に依存してシグナルを生ずる標識と
を含む、凝集を促進する条件に融合タンパク質を供する段階；

(B) 標識によって生じた第一のシグナルを検出する段階；

(C) 試験作用物質の存在下で、凝集を促進する条件に融合タンパク質を供し、かつ標識
によって生じた第二のシグナルを検出する段階；ならびに

(D) 第一および第二のシグナルの相対強度を評価し、それによって標的タンパク質の凝
集を阻害する作用物質を特定する段階
を含む、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力を評価する方法。

30

【請求項 21】

40

(A) 融合タンパク質が、

(i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起
こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、

(b) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起
こし、かつ

(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、
標的タンパク質に対するペプチドプローブと、

(ii) 融合タンパク質の凝集状態に依存してシグナルを生ずる標識と
を含む、融合タンパク質および標的タンパク質を接触させる段階；

(B) 標識によって生じた第一のシグナルを検出する段階；

50

(C) 融合タンパク質、標的タンパク質および試験作用物質を接触させ、かつ標識によって生じた第二のシグナルを検出する段階；ならびに

(D) 第一および第二のシグナルの相対強度を評価し、それによって標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質を特定する段階を含む、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力を評価する方法。

【請求項 2 2】

(A) (i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、

(b) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ

(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、参照ペプチドプローブと、

(ii) 緑色蛍光タンパク質と

を含む参照融合タンパク質によって生じた第一のシグナルを、検出する段階；

(B) 試験ペプチドプローブが、参照ペプチドプローブのアミノ酸配列と比べてアミノ酸の挿入、欠失または置換を含む参照ペプチドプローブの変異体である、試験ペプチドプローブおよび緑色蛍光タンパク質を含む試験融合タンパク質によって生じた第二のシグナルを検出する段階；ならびに

(C) 第一のシグナルと比べて第二のシグナルの強度を関連付け、それにより参照ペプチドプローブと比べて凝集体を形成する傾向の増大または低下を示す標的タンパク質に対するペプチドプローブを特定する段階

を含む、参照ペプチドプローブと比べて凝集体を形成する傾向の増大または低下を示す標的タンパク質に対するペプチドプローブを特定する方法。

【請求項 2 3】

(A) 融合タンパク質が、

(i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、

(b) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ

(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、

(ii) 緑色蛍光タンパク質と

を含む、自己凝集を促進する条件に融合タンパク質を供する段階；

(B) 融合タンパク質によって生じたシグナルを検出する段階；ならびに

(C) シグナルの強度を、特定の構造状態の標的タンパク質に対するペプチドプローブの特異性と相関させ、それにより特定の構造状態の標的タンパク質に特異的なペプチドプローブを特定する段階

を含む、低級の可溶性モノマーから高級の不溶性自己凝集体に及ぶ構造状態の範囲に入る特定の構造状態の標的タンパク質に特異的なペプチドプローブを特定する方法。

【請求項 2 4】

(i) 標的タンパク質に選択的に結合する、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、

(ii) 治療用作用物質と

を含む融合タンパク質と、標的タンパク質を接触させる段階

を含む、標的タンパク質に関連する疾患を処置するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2006年7月28日付で出願した米国特許仮出願第60/833,854号、および2006年1

10

20

30

40

50

0月2日付で出願した米国特許仮出願第60/848,358号に対し米国特許法第119条(e)項の下で優先権の恩典を主張し、これらの全内容はその全体が参照により本明細書において組み入れられる。

【0002】

1. 発明の分野

本発明は、疾患状態に関連するものなどの、誤って折り畳まれたタンパク質を含む、特定の構造型のタンパク質の検出の分野に関し、およびそれらの疾患状態の処置に関する。さらに詳しくは、本発明は、生物学的および臨床的試料などの、試料においてまたはインビボにおいて特定の構造型のタンパク質を検出するための方法、プローブおよびキットに関する。いくつかの態様において、タンパク質はアミロイド形成性疾患に関連する。本発明は同様に、そのようなタンパク質に関連する疾患を処置するための方法、作用物質およびキット、ならびにそのような疾患を処置するのに有用な他の作用物質を特定するための方法、作用物質およびキットに関する。

【背景技術】

【0003】

2. 背景

さまざまな疾患がタンパク質の特定の構造型(例えば、「誤って折り畳まれたタンパク質」または自己凝集したタンパク質)に関連している一方で、異なる構造型のタンパク質(例えば、「正常なタンパク質」)は有害ではない。多くの場合に、正常なタンパク質が可溶性であるのに対し、誤って折り畳まれたタンパク質は不溶性凝集体を形成する。そのような不溶性タンパク質の例としては、伝達性海綿状脳症(TSE)におけるプリオン; アルツハイマー病(AD)、脳アミロイド血管症(CAA)および脳血管疾患(CVD)のアミロイドブラークにおけるA β ペプチド; パーキンソン病のレヴィー小体における α -シヌクレイン沈着、前頭側頭認知症およびピック病における神経原線維濃縮体中のタウ; 筋萎縮性側索硬化症におけるスーパーオキシドジスムターゼ; ならびにハンチントン病におけるハンチンチンが挙げられる。例えば、Glenner et al., J. Neurol. Sci. 94:1-28, 1989; Haan et al., Clin. Neurol. Neurosurg. 92(4):305-310, 1990を参照されたい。

【0004】

多くの場合、これらの不溶性タンパク質は、 β -ブリーツシート立体構造に共通の特徴を有する非分枝性の原線維で構成される凝集体を形成する。CNSにおいて、アミロイドは脳髄膜血管(脳血管沈着物)に、および脳実質(ブラーク)に存在しうる。ヒトおよび動物モデルにおける神経病理学的研究によって、アミロイド沈着物の近位にある細胞ではその正常な機能が妨げられることが示されている。例えば、Mandybur, Acta Neuropathol. 78:329-331, 1989; Kawai et al., Brain Res. 623:142-146, 1993; Martin et al., Am. J. Pathol. 145:1348-1381, 1994; Kalaria et al., Neuroreport 6:477-80, 1995; Masliah et al., J. Neurosci. 16:5795-5811, 1996を参照されたい。他の研究によってさらに、アミロイド原線維が神経変性を実際に惹起しうることが示されている。例えば、Lendon et al., J. Am. Med. Assoc. 277:825-831, 1997; Yankner, Nat. Med. 2:850-852, 1996; Selkoe, J. Biol. Chem. 271:18295-18298, 1996; Hardy, Trends Neurosci. 20:154-159, 1997を参照されたい。

【0005】

A. プリオンおよびプリオン関連疾患

プリオンは、ヒトおよび動物において中枢神経系の海綿状脳症を引き起こす感染性病原体である。プリオンは細菌、ウイルスおよびウイロイドとは異なる。潜在的なプリオン前駆体はPrP^{Sc} 27-30といわれるタンパク質であり、これは、感染脳内でブラークとして見出される棒状フィラメントに重合する(凝集する)28キロダルトンの疎水性糖タンパク質である。正常なタンパク質相同体は、これが容易に分解可能であるという点でプリオンとは異なるのに対し、プリオンはプロテアーゼに強い抵抗性を示す。プリオンは、従来のアッセイ法によって検出不可能な、ごく微量の非常に感染性の高い核酸を含有しうることが示唆されている。例えば、Benjamin Lewin, 「Genes IV」, Oxford Univ. Press, New York

10

20

30

40

50

、1990、1080頁を参照されたい。しかしながら、目下の有力な仮説は、プリオンタンパク質の感染性に核酸成分は必要ないというものである。

【0006】

完全なプリオンタンパク質をコードする遺伝子は、クローニングされ、配列決定され、およびトランスジェニック動物において発現されている。正常な細胞性プリオンタンパク質であるPrP^Cは、単一コピーの宿主遺伝子によってコードされ、通常はニューロンの外表面に見出される。翻訳後の過程の間に、PrP^{Sc}といわれるタンパク質が、正常な細胞性PrPアイソフォーム(PrP^C)から形成されて、プリオン病が起こる。PrP^{Sc}は、動物およびヒトの伝染性神経変性疾患の伝播にも発病にもともに必要である。

【0007】

正常なプリオンタンパク質(PrP^C)は、主に β -ヘリックスおよびコイルドループの構造を有する細胞表面メタロ-糖タンパク質である。これは、抗酸化物質として作用すると考えられており、細胞恒常性に関連すると考えられている。異常型(PrP^{Sc})は、プロテアーゼに抵抗性を示す配座異性体であり、主として β -シートを含有する二次構造を有する。二次構造におけるこの立体構造変化が、プリオン病の過程での凝集および結果として生じる神経毒性のプラーク沈着につながると考えられている。

【0008】

プリオン関連疾患は、ヒツジおよびヤギのスクレイピー、シカおよびエルクの慢性消耗病、ならびにウシの牛海綿状脳症(BSE)を含む。例えば、Wilesmith and Wells, *Microbio l. Immunol.* 172:21-38, 1991を参照されたい。4つのヒトプリオン病、つまり(1)クールー、(2)クロイツフェルトヤコブ病(CJD)、(3)ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病(GSS)および(4)致死性家族性不眠症(FFI)が特定されている。例えば、Gajdusek, D.C., *Science* 197:943-969, 1977; Medori et al. *N. Engl. J. Med.* 326:444-449, 1992を参照されたい。

【0009】

プリオン病は伝染性かつ潜行性である。例えば、プリオン病に伴う長い潜伏時間のため、医原性CJDの全貌は、死体を供給源とするヒト成長ホルモン(HGH)により全世界で処置を受けた数千人もの人々において数十年にわたって明らかにならなかったと考えられる。生物学的製剤中のプリオンを検出することの重要性は、新変異型クロイツフェルト-ヤコブ病(nvCJD)を発症したヒトにウシプリオンが伝染していたという可能性によって高まっている。例えば、Chazot et al., *Lancet* 347:1181, 1996; Will et al., *Lancet* 347:921-925, 1996を参照されたい。

【0010】

プリオンによって引き起こされる疾患は診断するのが困難である。この疾患は潜伏性または無症状でありうる(異常なプリオンは検出できるが、しかし、症状は検出できない)。さらに、プリオン関連タンパク質の正常な相同体は、非感染生物の脳に存在しており、検出をさらに困難にしている。例えば、Ivan Roitt et al., 「*Immunology*」, Mosby-Year Book Europe Limited, 1993, 15.1頁を参照されたい。

【0011】

プリオンに関係する感染症の存在を検出するために用いられる現行の技術は、脳内の肉眼的な形態学的変化に依っており、および一般的には症状が顕在化した後になってはじめて適用される免疫化学的技術に依っている。現行の検出方法の多くは、抗体に基づくアッセイ法であり、またはアフィニティークロマトグラフィーに依っている。それらでは死んだ動物からの脳組織を用いるか、または場合によっては、血液試料のキャピラリー免疫電気泳動を用いる。

【0012】

脳組織に基づくアッセイ法は検出の遅れにつながることもあり、試験する動物を屠殺する必要がある。牛海綿状脳症の診断試験Prionic-Check (Prionics AG)も、ウエスタンブロット法を用いて抗体に供される、液化した脳組織試料を得るために動物を屠殺することを必要とする。結果は6~7時間で得られるが、この試験は、脳内のPrP^{Sc}の蓄積と臨床症

10

20

30

40

50

状の発生の間の6ヶ月の時間のずれの説明とはならない。扁桃生検試料採取、ならびに血液および脳脊髄の試料採取は、正確であるとはいえ、外科的介入を必要とし、結果を得るには数週間かかることもある。エレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)、核磁気共鳴法(NMR)、円偏光二色性法(CD)、および他の非増幅的構造手法は大量の試料、および典型的には試料の供給源からかなり距離を隔てて位置する高額な装置を必要とする。立体構造的に変化したタンパク質に関連する他の疾患は、同様に困難のように見える。

【0013】

B. 伝達性海綿状脳症(TSE)

伝達性海綿状脳症または「TSE」は、CJDおよびクールーのようなヒト障害を含む致死性神経変性疾患である。TSEの動物型はヒツジにおけるスクレイピー、シカおよびエルクにおけるCWD、ならびにウシにおけるBSEを含む。これらの疾患は、宿主によりコードされるプロテアーゼ感受性の正常プリオンタンパク質(PrP-sen)のプロテイナーゼK抵抗性の異常アイソフォーム(PrP-res)の脳内での形成および蓄積によって特徴付けられる。PrP-resは、PrP-senをβ-シート含有量のより多いPrP-res分子凝集体に変換する立体構造変化を伴う翻訳後過程によりPrP-senから形成される。PrP-resのこれらの高分子凝集体の形成は、PrP-resのアミロイド沈着が脳内に形成され、最終的には「海綿状」となる(孔で満たされる)、TSEによって媒介される脳病態と密接に関連している。

10

【0014】

細胞タンパク質PrP-senは、ヒトでは、第20番染色体上に位置する遺伝子によってコードされるシアロ糖タンパク質である。PrP遺伝子は神経組織においても非神経組織においてもともに発現されており、そのmRNAの最大濃度はニューロンで認められる。PrP遺伝子の翻訳産物は、ヒトでは253アミノ酸、ハムスターおよびマウスでは254アミノ酸、ウシでは264アミノ酸、ならびにヒツジでは256アミノ酸からなる(これらの配列は全て、種特異的PrPを発現するトランスジェニックマウスを作出する方法について記述している米国特許第5,565,186号に開示されており、その特許は参照により本明細書に組み入れられる)。プリオンタンパク質に関連する脳症において、細胞性PrP-senは改変型PrP-resに変換される。PrP-resは、PrP-resが、凝集する(例えば、Caughey and Chesebro, Trends Cell Biol. 7:56-62, 1997参照); プロテイナーゼK消化に対し少なくとも部分的に抵抗性を示す(PrP-senが完全に分解される条件の下でプロテイナーゼK消化によってN末端のほぼ67アミノ酸のみが除去される)(例えば、Prusiner et al., Sem. Virol. 7:159-173, 1996参照); およびPrP-senと比べて、α-ヘリックス構造がより少なくβ-シート構造がより多い(例えば、Pan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10962-10966, 1993参照)という点でPrP-senと区別できる。

20

30

【0015】

PrP-senがスクレイピーに感染した神経移植片のレシピエント動物の脳組織で発現されない場合には、移植片の外側で病態が生じることはなく、このことはPrP-resおよびPrP-senが両方とも病態に必要とされることを実証している。例えば、Brander et al., Nature 379:339-343, 1996を参照されたい。感染から疾患の出現までの潜伏期の長さ(種に依って、数カ月から数十年)により、PrP-senのPrP-resへの変換をPrP-resが誘導する無細胞インビトロ試験の開発が促された。例えば、Kockisko et al., Nature 370:471-474, 1994; Prusiner et al., 国際公開公報第97/16728号を参照されたい。これらのインビボおよびインビトロの観察所見から、PrP-resおよびPrP-senが相互作用してPrP-resを形成し、TSEの発病を促進することが示された。本明細書において用いられる「相互作用する」という用語は、タンパク質-タンパク質、タンパク質-核酸、核酸-核酸、タンパク質-小分子または核酸-小分子相互作用などの、分子間の検出可能な相互作用(例えば、生化学的相互作用)を含むよう意図される。

40

【0016】

ある種のPrP配列を含有する合成小ペプチドは、自発的に凝集して、TSE罹患脳における不溶性沈着物中に見られる型のβ-シート二次構造を高度に有する原線維を形成することがこれまでに明らかにされている。例えば、Gasset et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US

50

A 89:10940-10944, 1992; Come et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5959-5963, 1993; Forloni et al., Nature 362:543-546, 1993; Hope et al., Neurodegeneration 5:1-11, 1996を参照されたい。さらに、他の合成PrPペプチドが、PrP-sen分子と相互作用して、プロテアーゼ抵抗性が高くなった凝集複合体を形成することが明らかにされている。例えば、Kaneko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11160-11164, 1995; Kaneko et al., J. Mol. Biol. 270:574-586, 1997を参照されたい。

【 0 0 1 7 】

C. アミロイドタンパク質および関連疾患

AD、CAAおよびCVDにおいて、主なアミロイド成分はアミロイドタンパク質(A_β)である。A_βタンパク質は、推定上の二つのセクレターゼの作用によってアミロイド前駆体タンパク質(APP)から生成され、正常なCNSおよび血液の中に低レベルで存在する。APPはいくつかの部位で切断されうるので、天然に存在するA_βタンパク質は、均一な生成物ではない。アミロイドプラーク中に見られる二つの豊富な型は、A_β₁₋₄₀(A_β40ともいわれる)およびA_β₁₋₄₂(A_β42ともいわれる)であり、これらはAPPの選択的カルボキシ末端切断によって生成される。例えば、Selkoe et al., PNAS USA 85:7341-7345, 1988; Selkoe, Trends Neurosci. 16:403-409, 1993を参照されたい。A_β40およびA_β42は同一のアミノ酸配列を有しているが、A_β42はそのC末端にさらに2残基(IleおよびAla)を有している。A_β40の方が豊富にあるが、A_β42はより線維形成性であり、ADおよびCAAの両方のアミロイド沈着においてその二つのうち主要な成分である。例えば、Wurth et al., J. Mol. Biol. 319:1279-90 (2002)を参照されたい。

【 0 0 1 8 】

A_β42の血漿レベルの上昇は、ADに関連しており、およびADの危険性の増大に関連している。同様に、A_β42/A_β40レベルの比率の大きさは、AD、CAAおよび他の状態、例えば高齢期うつ病(LLMD)などに対する臨床的有意性を有することが明らかにされている。例えば、Pomara et al. Neurochem. Res. (2006)を参照されたい。A_β42およびA_β40の血漿レベルは、典型的には、モノクローナル抗体を用いて測定される。

【 0 0 1 9 】

上述したAD症例におけるアミロイド沈着に加えて、ほとんどのAD症例も血管壁におけるアミロイド沈着に関連している。例えば、Hardy, 1997, 前記; Haan et al., 1990, 前記; Terry et al., 前記; Vinters H. V., Cerebral amyloid angiopathy, Stroke Mar-Apr; 18(2):311-324, 1987; Itoh Y., et al. Subpial beta/A4 peptide deposits are closely associated with amyloid angiopathy in the elderly, Neurosci. Lett. 155(2):144-147, Jun. 11, 1993; Yamada M., et al., Subarachnoid haemorrhage in the elderly: a necropsy study of the association with cerebral amyloid angiopathy, J Neurol. Neurosurg. Psychiatry 56(5):543-547, May, 1993; Greenberg S.M., et al., The clinical spectrum of cerebral amyloid angiopathy: presentations without lobar hemorrhage, Neurology 43(10):2073-2079, October 1993を参照されたい。これらの血管病変は、CAAの顕著な特徴であり、ADが存在しなくても存在しうる。

【 0 0 2 0 】

ADの分子的基礎は確立されていないが、この疾患はA_β42の神経毒性集合体に関連する。普通の人では可溶性A_βタンパク質がその血漿および脳脊髄液(CSF)中を循環している。インビトロ試験のなかには、神経毒性がA_β42の原線維集合体の存在と相関し、A_β42のβシート立体構造と相関していることを示すものもある。アポリポタンパク質E (アポE)、アポリポタンパク質J (アポJ)、血清アミロイドP成分(SAP)、トランスサイレチン(TTR)、アンチキモトリプシン(ACT)およびβ₂-マクログロブリン(β₂M)などの、CSF中に存在する分子のなかには、A_β42原線維形成を阻害することが報告されているものもあるが、アポEおよびACTはインビトロにおいて原線維へのA_β42の集合を促進することも報告されている。ヒト抗A_β抗体もA_β42原線維形成を遮断し、A_β42誘導性の神経毒性をインビトロにおいて阻止することが明らかにされている。例えば、Ono et al., Neurobiol. Disease 20:233-40 (2005)を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0021】

インビトロにおけるA β 原線維形成の機序は、核生成依存的なモデルにより、2段階で説明されている。最初の段階である核形成、はモノマーの会合を伴い、原線維形成において熱力学的に不利な、律速段階であると考えられる。次の段階である拡大は、既存の原線維の末端へのモノマーの付加を伴い、熱力学的にずっと有利である。例えば、Ono et al., 前記を参照されたい。

【0022】

A β タンパク質の別の病原型は可溶性A β オリゴマー(A β オリゴマーリガンド、またはADLとしても公知)である。ADDLの神経毒性活性はいくつかのインビトロモデルにおいて立証されており、ADDLのヒト脳レベルはAD患者において著しく上昇していることが分かっている。例えば、Gong et al., PNAS 100: 10417-22 (2003)を参照されたい。

10

【0023】

ヒトのトランスサイレチン(TTR)は、四つの同一の主に β -シート構造を持つ単位で構成される、正常な血漿タンパク質であり、ホルモンであるチロキシンの輸送体として働く。アミロイド原線維へのTTRの異常な自己集合は、二形態のヒト疾患、すなわち、老人性全身性アミロイドーシス(SSA)および家族性アミロイドポリニューロパシー(FAP)の原因になる。例えば、Kelly, Curr. Opin. Struct. Biol. 6(1): 11-17, 1996を参照されたい。FAPにおけるアミロイド形成の原因はTTR遺伝子における点突然変異であり; SSAの原因は不明である。臨床診断は、生検材料においてインサイチューでアミロイドの沈着を検出することにより組織学的に確定される。

20

【0024】

今日まで、インビボでのアミロイドへのTTRの変換の機序についてほとんど知られていない。しかしながら、いくつかの研究施設では、正常ヒトTTRの部分的変性によって、アミロイド変換をインビトロで模擬できることを実証している。例えば、McCutchen et al., Biochemistry 32(45):12119-12127, 1993; McCutchen and Kelly, Biochem. Biophys. Res. Comm. 197(2):415-421, 1993を参照されたい。立体構造転移の機序には、線状の β -シート構造を持つアミロイド原線維に重合体化する、モノマーの立体構造中間体が含まれる。Lai et al., Biochemistry 35(20):6470-6482, 1996。この過程はチロキシンまたはトリヨードフェノールなどの、安定化分子との結合によって減じることができる。Mirov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(26):15051-15056, 1996。

30

【0025】

神経炎性プラークが形成される正確な機序、およびプラーク形成と疾患に関連する神経変性過程との関係は明確にされていない。アルツハイマー病およびプリオン病患者の脳におけるアミロイド原線維は、ある種の細胞の炎症活性化をもたらすことが知られている。例えば、初代ミクログリア培養物およびTHP-1単球細胞株は、原線維の β -アミロイドおよびプリオンペプチドにより刺激されて、同一のチロシンキナーゼ依存性炎症シグナル伝達カスケードを活性化する。 β -アミロイドおよびプリオン原線維によって誘発されたシグナル伝達応答は神経毒性産物の産生をもたらす、これは神経変性の一因となる。例えば、Combs et al., J. Neurosci. 19:928-939, 1999を参照されたい。

【0026】

AD、CAAおよびCVDのような、前述の障害に関連する立体構造的に変化したタンパク質の検出方法も、既述のプリオン検出技術と同様に、それらが死後組織の試料採取を必要とするという点で不十分である。同様に、抗体に基づくアッセイ法は、抗体がタンパク質の病原型と正常タンパク質を識別できないので、有効ではない可能性がある。

40

【発明の概要】

【0027】

概要

本発明は、特定の構造状態のタンパク質に関連する種々の疾患を診断および処置するために使用できる方法、プローブ、作用物質およびキットを提供する。この作用物質および方法は同様に、そのような疾患を処置または予防するのに有用な他の作用物質を特定する

50

ために使用することができる。

【0028】

一つの態様によれば、(a) 特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、試料を接触させる段階；および(b) ペプチドプローブと特定の自己凝集状態で存在する任意の標的タンパク質との間の任意の結合を検出し、それによって特定の自己凝集状態で存在する任意の標的タンパク質を特定する段階を含む、特定の自己凝集状態で試料に存在する標的タンパク質を特定するための方法が提供される。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、モノマー、可溶性オリゴマーおよび不溶性自己凝集体からなる群より選択される特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、不溶性の無定形自己凝集体、原線維前駆体(protofibril)および原線維からなる群より選択される特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する。

10

【0029】

いくつかの態様において、標的タンパク質は、豚島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質、アミロイドタンパク質またはAペプチド、血清アミロイドA、インスリン、アミリン、非アミロイド成分、プリオン、ヘモグロビン、免疫グロブリンまたはその断片、 α_2 -ミクログロブリン、 β -シヌクレイン、ロドプシン、 β 1-アンチキモトリプシン、シスタリン(cystallin)、タウ、p53、プレセニン、低密度リポタンパク質受容体、アポリポタンパク質、スーパーオキシドジスムターゼ、神経フィラメントタンパク質、トランスサイレチン、プロカルシトニンまたはカルシトニン、心房性ナトリウム利尿因子、ゲルゾリン、嚢胞性線維症膜貫通制御因子、ハンチントン病タンパク質、フィブリノゲン鎖、フェニルアラニン水酸化酵素、コラーゲン、 β -ヘキササミニダーゼ、ならびにシスタチンCタンパク質からなる群より選択される。

20

【0030】

いくつかの態様において、ペプチドプローブは検出可能な標識をさらに含む。いくつかの態様において、ペプチドプローブは固体支持体に固定化される。

【0031】

特定の態様において、ペプチドプローブは、SEQ ID NO:36およびSEQ ID NO:45より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0032】

別の態様によれば、(a) 特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合し、かつ検出可能な標識で標識されている、標的タンパク質に対するペプチドプローブを、患者に投与する段階；および(b) 患者に存在する標的タンパク質の位置に局在化された標識ペプチドプローブについて被験者を走査し、それによって特定の自己凝集状態で、患者に存在する標的タンパク質を特定する段階を含む、特定の自己凝集状態で、患者に存在する標的タンパク質を特定するためのインビボの方法が提供される。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、モノマー、可溶性オリゴマーおよび不溶性自己凝集体からなる群より選択される特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する。

30

【0033】

いくつかの態様において、標的タンパク質は、豚島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質、アミロイドタンパク質またはAペプチド、血清アミロイドA、インスリン、アミリン、非アミロイド成分、プリオン、ヘモグロビン、免疫グロブリンまたはその断片、 α_2 -ミクログロブリン、 β -シヌクレイン、ロドプシン、 β 1-アンチキモトリプシン、シスタリン、タウ、p53、プレセニン、低密度リポタンパク質受容体、アポリポタンパク質、スーパーオキシドジスムターゼ、神経フィラメントタンパク質、トランスサイレチン、プロカルシトニンまたはカルシトニン、心房性ナトリウム利尿因子、ゲルゾリン、嚢胞性線維症膜貫通制御因子、ハンチントン病タンパク質、フィブリノゲン鎖、フェニルアラニン水酸化酵素、コラーゲン、 β -ヘキササミニダーゼ、ならびにシスタチンCタンパク質からなる群より選択される。

40

【0034】

50

別の態様によれば、特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、標的タンパク質を接触させ、それによって標的タンパク質の高次タンパク質凝集体の形成を阻止する段階を含む、標的タンパク質のタンパク質凝集体の形成を阻止するための方法が提供される。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、モノマー、可溶性オリゴマーおよび不溶性自己凝集体からなる群より選択される特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する。

【0035】

いくつかの態様において、標的タンパク質は、膵島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質、アミロイドタンパク質またはAペプチド、血清アミロイドA、インスリン、アミリン、非アミロイド成分、プリオン、ヘモグロビン、免疫グロブリンまたはその断片、 α_2 -ミクログロブリン、 α_1 -シヌクレイン、ロドプシン、 α -1-アンチキモトリプシン、シスタリン、タウ、p53、プレセニリン、低密度リポタンパク質受容体、アポリポタンパク質、スーパーオキシドジスムターゼ、神経フィラメントタンパク質、トランスサイレチン、プロカルシトニンまたはカルシトニン、心房性ナトリウム利尿因子、ゲルゾリン、囊胞性線維症膜貫通制御因子、ハンチントン病タンパク質、フィブリノゲン鎖、フェニルアラニン水酸化酵素、コラーゲン、 α -ヘキササミニダーゼ、ならびにシスタチンCタンパク質からなる群より選択される。

【0036】

別の態様によれば、標的タンパク質に対するペプチドプローブと治療用作用物質を組み合わせる段階およびペプチドプローブ-治療用作用物質の組み合わせをその必要性がある患者に投与する段階を含む、治療用作用物質を標的タンパク質に送達する方法が提供される。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、 α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、ペプチドプローブは β -ヘリックス立体構造から α -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、ペプチドプローブは標的タンパク質の完全長の配列を含まない。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、モノマー、可溶性オリゴマーおよび不溶性凝集体などの、特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する。いくつかの態様において、治療用作用物質は抗アミロイド活性を有する。

【0037】

別の態様によれば、(A) 融合タンパク質が(i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、(b) β -ヘリックス立体構造から α -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、標的タンパク質に対するペプチドプローブと；(ii) 融合タンパク質の凝集状態に依存してシグナルを生ずる標識とを含む、融合タンパク質および試験作用物質を接触させる段階；(B) 標識によって生じたシグナルを検出する段階；ならびに(C) シグナルを、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力と関連させる段階を含む、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力を評価する方法が提供される。

【0038】

別の態様によれば、(A) 融合タンパク質が(i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、(b) β -ヘリックス立体構造から α -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、標的タンパク質に対するペプチドプローブと；(ii) 融合タンパク質の凝集状態に依存してシグナルを生ずる標識とを含む、標的タンパク質、融合タンパク質、および試験作用物質を接触させる段階；(B) 標識によって生じたシグナルを検出する段階；ならびに(C) シグナルを、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力と関連させる段階を含む、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力を評価する方法が提供される。

【0039】

別の態様によれば、(A) 融合タンパク質が(i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリ

10

20

30

40

50

ックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、(b) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、(ii) 融合タンパク質の凝集状態に依存してシグナルを生ずる標識とを含む、凝集を促進する条件に融合タンパク質を供する段階；(B) 標識によって生じた第一のシグナルを検出する段階；(C) 試験作用物質の存在下で、凝集を促進する条件に融合タンパク質を供し、かつ標識によって生じた第二のシグナルを検出する段階；ならびに(D) 第一および第二のシグナルの相対強度を評価し、それによって標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質を特定する段階を含む、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力を評価する方法が提供される。

10

【0040】

別の態様によれば、(A) 融合タンパク質が(i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、(b) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、(ii) 融合タンパク質の凝集状態に依存してシグナルを生ずる標識とを含む、融合タンパク質および標的タンパク質を接触させる段階；(B) 標識によって生じた第一のシグナルを検出する段階；(C) 融合タンパク質、標的タンパク質および試験作用物質を接触させ、かつ標識によって生じた第二のシグナルを検出する段階；ならびに(D) 第一および第二のシグナルの相対強度を評価し、それによって標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質を特定する段階を含む、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力を評価する方法が提供される。

20

【0041】

別の態様によれば、(A) (i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、(b) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、参照ペプチドプローブと、(ii) 緑色蛍光タンパク質とを含む、参照融合タンパク質によって生じた第一のシグナルを検出する段階；(B) 試験ペプチドプローブが、参照ペプチドプローブのアミノ酸配列と比べてアミノ酸の挿入、欠失または置換を含む参照ペプチドプローブの変異体である、試験ペプチドプローブおよび緑色蛍光タンパク質を含む試験融合タンパク質によって生じた第二のシグナルを検出する段階；ならびに(C) 第一のシグナルと比べて第二のシグナルの強度を関連付け、それにより参照ペプチドプローブと比べて凝集体を形成する傾向の増大または低下を示す標的タンパク質に対するペプチドプローブを特定する段階を含む、参照ペプチドプローブと比べて凝集体を形成する傾向の増大または低下を示す標的タンパク質に対するペプチドプローブを特定する方法が提供される。

30

【0042】

別の態様によれば、(A) 融合タンパク質が(i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、(b) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、(ii) 緑色蛍光タンパク質とを含む、自己凝集を促進する条件に融合タンパク質を供する段階；(B) 融合タンパク質によって生じたシグナルを検出する段階；ならびに(C) シグナルの強度を、特定の構造状態の標的タンパク質に対するペプチドプローブの特異性と相関させ、それにより特定の構造状態の標的タンパク質に特異的なペプチドプローブを特定する段階を含む、低級の可溶性モノマーから高級の不溶性自己凝集体に及ぶ構造状態の範囲に入る特定の構造状態の標的タンパク質に特異的なペプチドプローブを特定する方法が、提供される。

40

【0043】

別の態様によれば、(i) 標的タンパク質に選択的に結合する、標的タンパク質に対する

50

ペプチドプローブと、(ii) 治療用作用物質とを含む融合タンパク質と、標的タンパク質を接触させる段階を含む、標的タンパク質に関連する疾患を処置するための方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】開示するプローブの各種の態様とともに、TSE配座異性体の α -ヘリックスモノマーおよび β -シートダイマーを図示する。正常な野生型(wt)のプリオンタンパク質(PrP^C)はモノマー状態の方を選ぶのに対し、異常な病原型(PrP^{Sc})は多量体(ダイマーまたはそれ以上の)状態の方を選ぶ。

【図2】 β -シートで構成されたTSEタンパク質を含有する試料の診断分析を図示する。上の反応は試料中に誤って折り置まれたタンパク質が存在する場合の過程を示し、その一方で、下の反応は試料中に誤って折り置まれたタンパク質が存在しない場合の過程を示す。

【図3】プリオンタンパク質に対するパンドロームプローブを図示する。

【図4】アルツハイマープローブペプチド-GFP融合体(AIz)およびプリオンプローブペプチド-GFP融合体(Pri)のGFP蛍光測定を図示する。発現を誘導し、細胞を37℃で3時間(左グラフ)または30℃で5時間(右グラフ)インキュベートした後に、測定値を得た。

【図5】ピレン標識ペプチドプローブのモノマー(378 nmで測定)およびダイマー(495 nmで測定)に特有の蛍光を図示する。

【図6】スクレイピーに感染したハムスターの脳由来の試料から得られた30画分に存在するPrP^{Sc}との、PrP^{Sc}タンパク質に特異的なペプチドプローブの反応性を図示する。y軸は各画分の相対的I_D/I_M比を示す。各画分中に存在するPrP^{Sc}凝集体のサイズはx軸に沿って増大する。

【図7】感染ヒツジ由来の血清中PrP^{Sc}との、PrP^{Sc}に特異的なペプチドプローブの反応性、および正常ヒツジ由来の血清とのその反応性の欠如を図示する。図中、「HP1」は3ヶ月齢の健常ヒツジのプール血清由来試料を指し; 「HP2」は2歳齢の健常ヒツジのプール血清由来試料を指し; 「In1」から「In4」は18~24ヶ月齢のスクレイピーのヒツジ由来血清を指し、および「In5」は末期のヒツジ由来の血清を指す。

【図8】感染ヒツジおよび正常ヒツジ由来の血清中PrP^{Sc}との、PrP^{Sc}に特異的なペプチドプローブの反応性の分析前に、試料を超音波処理することによって達成されたシグナル対ノイズ比の改善を図示する。図中、「HP1」は3ヶ月齢の健常ヒツジのプール血清由来試料を指し; 「HP2」は2歳齢の健常ヒツジのプール血清由来試料を指し; 「In1」から「In4」は18~24ヶ月齢のスクレイピーのヒツジ由来血清を指し、および「In5」は末期のヒツジ由来の血清を指す。

【図9】ヒツジ血液成分(白血球層、血清および血漿)中に存在するPrP^{Sc}との、PrP^{Sc}に特異的なペプチドプローブの反応性を図示する。

【図10】GFPおよびA₄₀に特異的なペプチドプローブ(SEQ ID NO:36)、A₄₂(SEQ ID NO:42)またはA₄₂変異体クローンGM6(SEQ ID NO:44)を含む融合タンパク質の、細胞に基づくGFPアッセイ法における蛍光を図示する。

【図11】異なる構造型のA₄₀およびA₄₂との、A₄₀に特異的なペプチドプローブ(SEQ ID NO:36)の反応性を図示する。図11AはA₄₀およびA₄₂線維との反応性ならびにA₄₀モノマーとの非反応性を示す。図11BはA₄₀およびA₄₂オリゴマーとの反応性を示す。

【図12】アルツハイマーの患者から得たヒト脳脊髄液(CSF)試料中のA₄₀およびA₄₂を検出する、A₄₀に特異的なペプチドプローブ(SEQ ID NO:36)の能力を図示する。ペプチドプローブは、アルツハイマーの患者(黒)を、年齢を適合させた健常患者(白)からp値 = 0.0005で層別化することができる。図12Aは各患者に対するデータを示し、その一方で図12Bは各患者群に対する平均データを示す。

【図13】アルツハイマーの患者由来のヒト血清試料中のA₄₀およびA₄₂を検出する、A₄₀に特異的な固定化ペプチドプローブ(SEQ ID NO:36)の能力を図示する。ペプチドプローブは、アルツハイマーの患者(黒)を、年齢を適合させた健常患者(白)からp値 = 0.045で層別化することができる。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0045】

詳細な説明

本発明は、疾患状態に関連するものなどの、誤って折り置まれたタンパク質および自己凝集したタンパク質を含む、特定の構造状態のタンパク質の検出のためのプローブおよび方法、ならびにそれらの疾患状態の処置のためのプローブおよび方法を提供する。さらに詳しくは、本発明は、試料においてまたはインビボにおいて特定の構造型のタンパク質を検出するための方法、プローブおよびキットを提供する。いくつかの態様において、タンパク質はアミロイド形成性疾患に関連する。本発明は同様に、そのようなタンパク質に関連する疾患を処置するための方法、作用物質およびキット、ならびにそのような疾患を処置するのに有用な他の作用物質を特定するための方法、作用物質およびキットを提供する。

10

【0046】

本発明のいくつかの局面は、タンパク質の特定の立体構造または自己凝集状態などのタンパク質の特定の構造状態に関連する疾患および状態の診断および処置に関する。特定の立体構造状態または自己凝集状態をとる場合にヒト疾患に関連するタンパク質は、当技術分野において公知である。そのような疾患の例としては、アミロイド形成性疾患が挙げられる。

【0047】

特許および特許出願を含む本明細書において引用する参考文献は、その全体が参照により組み入れられる。

20

【0048】

本明細書において用いられる技術的および科学的用語は、特に規定のない限り、本発明が関係する技術分野の当業者によって一般に理解されている意味を有する。当業者に公知の種々の方法論が本明細書において参照される。参照されるそのような公知の方法論を明記している刊行物および他の資料は、全文が記載されているかのように、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。組換えDNA技術の一般的原理を明記している標準的な参考資料は、Sambrook, J., et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.; McPherson, M.J. Ed. (1991) *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford; Jones, J. (1992) *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford Science Publications, Oxford; Austen, B.M. and Westwood, O.M.R. (1991) *Protein Targeting and Secretion*, IRL Press, Oxfordを含む。当業者に公知の任意の適当な材料および/または方法を、本発明を実施する際に用いることができる。しかしながら、好ましい材料および方法について記述する。以下の記述および実施例のなかで参照される材料、試薬などは、特に断りのない限り、商業的供給源から入手可能である。

30

【0049】

A. 定義

本明細書において用いられる場合、「一つの(a)」、「一つの(an)」および「その(the)」という単数形は、単数形だけを指すよう明示的に記述されていない限り、単数形も複数形もともに指す。

40

【0050】

本明細書において用いられる場合、「約」は、当業者によって理解されるものであり、これが使用される状況に応じてある程度変動する。この用語が使用される状況が当業者に明確に示されずに、この用語が使用される場合、「約」は特定の用語の±10%までを意味する。

【0051】

本明細書において用いられる場合、「治療上有効量」という語句は、このような処置を必要とする有意な数の被験体において薬物を投与する場合に特異的な薬理学的反応をもたらす薬物投与量を意味するものとする。特定の事例において特定の被験体に投与される薬

50

物の治療上有効量は、このような投与量が当業者によって治療上有効量であると見なされても、本明細書において記述する状態/疾患を処置するのに必ずしも有効ではないことを強調しておく。

【0052】

本明細書において記述される場合、「アミロイド形成性疾患」とは、アミロイドブラークまたはアミロイド沈着が体内に形成される疾患である。アミロイド形成は糖尿病、AD、スクレイピー、BSE、CJD、慢性消耗病(CWD)、関連する伝達性海綿状脳症(TSE)、および本明細書において開示する他の疾患のような、いくつかの障害に見られる。しかしながら、本発明はアミロイド形成性疾患に限定されることはなく、タンパク質の特定の立体構造または凝集状態に関連する任意の疾患または状態の診断および処置において有用である。

10

【0053】

本明細書において用いられる場合、「タンパク質」とは、一つのアミノ酸(またはアミノ酸残基)の -炭素に結合したカルボン酸基のカルボキシル炭素原子が隣接アミノ酸の -炭素に結合したアミノ基のアミノ窒素原子に共有結合的に結合されるようになる場合に生じる、ペプチド結合を介して連結された、二つまたはそれ以上の個々のアミノ酸(天然に存在するか否かにかかわらず)の任意のポリマーをいう。これらのペプチド結合、およびそれらを含む原子(すなわち、 -炭素原子、カルボキシル炭素原子およびその置換基酸素原子、ならびにアミノ窒素原子およびその置換基水素原子)は、タンパク質の「ポリペプチド骨格」を形成する。簡単に言うと、ポリペプチド骨格は、タンパク質のアミノ窒素原子、 -炭素原子およびカルボキシル炭素原子をいうよう理解されるものだが、これらの原子(その置換基原子の有無を問わず)のうち二つまたはそれ以上が偽原子として表されることもできる。本明細書において記述されているように機能部位の記述子において使用されうるポリペプチド骨格のいかなる表現も「ポリペプチド骨格」という用語の意味の範囲内に含まれることが理解されよう。

20

【0054】

「タンパク質」という用語は、その意味の範囲内に「ポリペプチド」および「ペプチド」(これらは、時に、本明細書において互換的に使用されうる)という用語を含むよう理解される。タンパク質は本明細書において開示の感染性タンパク質または「プリオン」を含む。さらに、複数のポリペプチドサブユニット(例えば、DNAポリメラーゼIII、RNAポリメラーゼII)または他の成分(例えば、テロメラーゼに存在するようなRNA分子)を含むタンパク質も、本明細書において用いられる「タンパク質」の意味の範囲内に含まれるよう理解される。同様に、タンパク質およびポリペプチドの断片も企図され、本明細書において「タンパク質」ということができる。断片は、完全長タンパク質の少なくとも5個の隣接アミノ酸、少なくとも10個の隣接アミノ酸、少なくとも15個の隣接アミノ酸、少なくとも20個の隣接アミノ酸、または少なくとも25個の隣接アミノ酸を含むことができる。

30

【0055】

本明細書において用いられる場合、「立体構造」または「立体構造の制約」とは、特定のタンパク質立体構造、例えば、 α -ヘリックス、平行および逆平行 β 鎖、ロイシンジッパー、ジンクフィンガーなどの存在をいう。さらに、立体構造の制約はさらなる構造情報を伴わないアミノ酸配列情報を含むことができる。一例として、「-C-X-X-C-」は、二つのシステイン残基が、この特定の制約との関連においてはそれぞれの実体が無関係であるような他の二つのアミノ酸残基によって隔てられていなければならないことを示す立体構造の制約である。「立体構造の変化」は一つの立体構造から別の立体構造への変化である。

40

【0056】

「プリオン(prion)」は「タンパク質(protein)」および「感染(infection)」という単語の縮約形である。「PrPタンパク質」、「PrP」などは本明細書で互換的に用いられて、ヒトおよび動物において疾患(海綿状脳症のような)を引き起こすことが公知の感染性粒子形態(「PrP^{S^c}」)も、該当する条件の下で、感染性PrP^{S^c}形態に変換される非感染性形態(「PrP^C」)もともに意味する。「プリオン」、「プリオンタンパク質」、「PrP^{S^c}タンパク

50

質」などの用語は、PrPタンパク質の感染性PrP^{S^c}形態をいうよう本明細書において互換的に用いられる。プリオン粒子は、PrP遺伝子によってコードされるPrP^{S^c}分子で、排他的にはないにせよ、大部分が構成される。プリオンは細菌、ウイルスおよびウイロイドとは異なる。公知のプリオンは動物に感染し、ヒツジおよびヤギの神経系の伝達性変性疾患であるスクレイピー、ならびにBSE(または狂牛病)およびネコのネコ海綿状脳症を引き起こす。ヒトに罹患することが知られている4つのプリオン病は、(1) クールー、(2) CJD、(3) GSSおよび(4) FFIである。本明細書において用いられる場合、「プリオン」は、これらの疾患の全てもしくはいずれか、または任意の動物、特に、ヒトおよび家畜において他の疾患を引き起こす全形態のプリオンを含む。

【0057】

「PrP遺伝子」という用語は、公知の多型および病理性突然変異を含むタンパク質を発現する遺伝物質を記述するよう本明細書において用いられる。「PrP遺伝子」という用語は一般に、任意の形態のプリオンタンパク質をコードする任意の種の任意の遺伝子をいう。PrP遺伝子は、任意の動物由来であってよく、その全ての多型および突然変異を含み、この用語は未だ発見されていない他のこのようなPrP遺伝子を含むことを認識されたい。そのような遺伝子により発現されるタンパク質は、PrP^C (非疾患)またはPrP^{S^c} (疾患)形態のいずれかをとりうる。

【0058】

「A タンパク質」という用語は、AB40およびAB42を含むA タンパク質の全ての形態をいうよう本明細書において用いられる。

【0059】

「組換えタンパク質またはポリペプチド」とは、組換えDNA技術により産生される、すなわち、所望のタンパク質またはポリペプチドをコードする外来性の組換えDNA発現構築体によって形質転換された細胞、微生物または哺乳類から産生されるタンパク質またはポリペプチドをいう。大部分の細菌培養物において発現されたタンパク質またはポリペプチドには、通常、グリカンがない。酵母において発現されたタンパク質またはポリペプチドは、哺乳類細胞において発現されたものとは異なるグリコシル化パターンを持ちうる。

【0060】

「天然の」または「天然に存在する」タンパク質またはポリペプチドとは、自然界に存在する供給源から回収されたタンパク質またはポリペプチドをいう。天然のタンパク質またはポリペプチドは、限定されるものではないが、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、アシル化および切断を含む翻訳後修飾を含む。

【0061】

DNAまたはポリヌクレオチド「コード配列」とは、適切な調節配列の制御下に配置される場合に宿主細胞においてmRNAに転写され、ポリペプチドに翻訳されるDNAまたはポリヌクレオチド配列である。コード配列の境界は5'側N末端の開始コドンおよび3'側C末端の翻訳停止コドンである。コード配列は原核生物配列、真核生物mRNA由来のcDNA、真核生物DNA由来のゲノムDNA配列および合成DNA配列を含むことができる。転写終結配列は、通常、コード配列の3'側に位置する。

【0062】

「DNAまたはポリヌクレオチド配列」とは、デオキシリボヌクレオチド(塩基アデニン、グアニン、チミン、シトシン)のヘテロポリマーである。本発明のタンパク質またはポリペプチドをコードするDNAまたはポリヌクレオチド配列が、合成cDNA由来のDNA断片および短いオリゴヌクレオチドリンカーから集合し、組換えDNA発現ベクターにおいて発現される合成遺伝子を供与することができる。特定の二本鎖DNA分子の構造を論じる場合、配列は、cDNAの非転写鎖に沿って5'から3'方向の配列だけをもたらず通常の慣例にしたがい本明細書において記述されうる。

【0063】

「組換え発現ベクターまたはプラスミド」は、本発明のタンパク質またはポリペプチドをコードするDNAを増幅するためにまたは発現するために使用される複製可能なDNAベクタ

10

20

30

40

50

ーまたはプラスミド構築体である。発現ベクターまたはプラスミドはDNA制御配列およびコード配列を含有する。DNA制御配列はプロモーター配列、リボソーム結合部位、ポリアダニル化シグナル、転写終結配列、上流の調節ドメインおよびエンハンサーを含む。本明細書において定義される組換え発現系は、調節要素の誘導によって本発明のタンパク質またはポリペプチドを発現する。

【0064】

「形質転換された宿主細胞」とは、外来性DNAにより形質転換されトランスフェクトされている細胞をいう。外来性DNAは、宿主細胞のゲノムを構成する染色体DNAに組み込まれ(すなわち、共有結合的に連結され)てもまたは組み込まれなくてもよい。例えば、原核生物および酵母では、外来性DNAはプラスミドのような、エピソーム要素上で維持されるか、または染色体DNAに安定的に組み込まれるかされうる。真核細胞に関しては、安定的に形質転換された細胞は、外来性DNAが染色体に組み込まれているようになったものである。この安定性は、外来性DNAを含んだ娘細胞の集団を、複製を介して生み出す真核細胞株またはクローンの能力によって示される。

10

【0065】

「類似体」、「断片」、「誘導体」および「変異体」という用語は、本発明のポリペプチドをいう場合、本明細書において記述するように、参照ポリペプチドと実質的に類似の機能活性または実質的に同じ生物学的機能もしくは活性を保持する、そのようなポリペプチドの類似体、断片、誘導体および変種を意味する。

20

【0066】

「類似体」とはその内部に、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列を含んだプロ-ポリペプチドを含む。

【0067】

「断片」とは本明細書に開示するインビトロのアッセイ法において示されるように、ポリペプチドと実質的に類似の機能活性または実質的に同じ生物学的機能もしくは活性を保持する、本発明のポリペプチドの一部である。

【0068】

「誘導体」とは、本明細書において開示する機能を実質的に保存し、かつさらなる構造および付帯機能を含んだ本発明のポリペプチドへの全ての修飾、例えば、いっそう大きな半減期を有するPEG化ポリペプチドまたはアルブミン融合ポリペプチドを含む。

30

【0069】

「変種」とは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列に実質的に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。「実質的に類似の」という用語は、第一および第二のアミノ酸配列が共通の構造ドメインおよび/または共通の機能活性を有するように、第二のアミノ酸配列に対して十分なまたは最小の数の同一または同等のアミノ酸残基を含有する第一のアミノ酸配列を意味する。例えば、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または少なくとも約100%同一である共通の構造ドメインを含むアミノ酸配列は、十分に類似していると本明細書において定義される。好ましくは、変種は本発明の好ましいポリペプチドのアミノ酸配列に十分に類似しているであろう。変種はストリンジェントな条件の下で、本発明のポリヌクレオチドまたはその相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの変種を含む。そのような変種は概して、本発明のポリヌクレオチドの機能活性を保持する。変種は突然変異誘発のため、アミノ酸配列が異なるポリペプチドを含む。

40

【0070】

「実質的に類似の機能活性」および「実質的に同じ生物学的機能または活性」とはそれぞれ、各ポリペプチドの生物学的活性が同じ手順またはアッセイ法により測定される場合に、生物学的活性の程度が比較対象のポリペプチドによって示されるその生物学的活性の

50

約50%~100%もしくはそれ以上の範囲内、80%~100%もしくはそれ以上の範囲内、または約90%~100%もしくはそれ以上の範囲内であることを意味する。

【0071】

二つのポリペプチド間の「類似性」は、一つのポリペプチドのアミノ酸配列をもう一つのポリペプチドの配列と比較することによって判定される。一つのポリペプチドのアミノ酸はもう一つのポリペプチドの対応アミノ酸に対し、同一であるまたは保存的アミノ酸置換であるなら類似している。保存的置換はDayhoff, M.O.(編), The Atlas of Protein Sequence and Structure 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. (1978)に、およびArgos, P. (1989) EMBO J. 8:779-785に記述されているものを含む。例えば、以下の群の一つに属するアミノ酸は保存的変化または置換を示す。

【0072】

-Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr;
 -Cys, Ser, Tyr, Thr;
 -Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe;
 -Lys, Arg, His;
 -Phe, Tyr, Trp, His; および
 -Asp, Glu。

【0073】

本明細書において用いられる「患者」とは、ヒトおよび家畜、例えばネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ウサギなどを含む、任意の哺乳類を意味する。典型的な患者は、誤って折り畳まれたタンパク質に関連する疾患の危険性があるか、そのような疾患に苦しむのではないかと疑われるか、または誤って折り畳まれたタンパク質に関連する疾患に対する危険性もしくは状態を判定することを望むかでありうる。

【0074】

B. 標的の構造状態

タンパク質の配列が特定の三次元立体構造の形成を指令する正確な機構は不明である。天然の立体構造状態を達成するには、タンパク質分子は多くの選択枝から固有の立体構造をとらなければならない。機能的タンパク質は、典型的には可溶性であり、コイルおよび秩序ある要素を含む種々の構造をとりうる。秩序ある要素にはミオグロビンおよびヘモグロビンなどの、タンパク質において主要な α -ヘリックスが含まれる。

【0075】

ヒトの老化の過程で、タンパク質のなかには、その可溶性の構造(例えば、主に α -ヘリックスまたはランダムコイル立体構造を含む)から、機能の喪失を伴う自己凝集体を形成する、より不溶性の構造(例えば、 β -シート立体構造を含む)への構造的変化を示すものがある。さらに、疾患のなかには、可溶性形態が有害ではないタンパク質の不溶性形態に関連するものがある。

【0076】

したがって、本発明の一つの局面では、特定の立体構造または自己凝集状態のような、特定の構造状態(「標的の構造状態」)のタンパク質の検出のための方法およびプローブを提供する。標的の構造状態は、タンパク質の任意の三次元構造を含む、タンパク質の立体構造および/またはタンパク質の自己凝集状態を含む。多くの場合、標的の構造状態は疾患に関連しているのに対し、異なる構造状態は疾患に関連していない。標的の構造状態は、疾患を引き起こす可能性があり、疾患の症状の要因である可能性があり、他の要因の結果として試料においてもしくはインビボにおいて見られる可能性があり、またはそうでなければ疾患に関連している可能性がある。一つの態様において、タンパク質はその構造状態にかかわらず同じアミノ酸配列を有し、疾患関連の状態および非疾患関連の状態のような、少なくとも二つの異なる構造状態をとりうる。

【0077】

多くの疾患が β -シート立体構造のタンパク質に関連している。これらの疾患の多くの場合、 α -ヘリックスおよび/またはランダムコイル立体構造のそのタンパク質は疾患に関

10

20

30

40

50

連していない。したがって、これらの状態の場合、 β -シート立体構造は疾患の検出のための標的の構造状態になりうるのに対し、 α -ヘリックスおよび/またはランダムコイル立体構造は疾患がないことを確認するための、または進行した疾患状態がないことを確認するための標的の構造状態になりうる。例えば、図1はTSE配座異性体の α -ヘリックスモノマー型および β -シートダイマー型の両方を図示している。正常な野生型(wt)のプリオンタンパク質(PrP^C)はモノマー状態の方を選ぶのに対し、異常な病原型(PrP^{Sc})は多量体状態をより容易にとる。

【0078】

以下は、特定の構造タンパク質状態に関連する疾患の非限定的な一覧であり、その後には関連タンパク質が括弧内に続く：アルツハイマー病(APP、A β ペプチド、 τ -1-アンチキモトリプシン、タウ、非A β 成分、プレセニリン1、プレセニリン2、アポE)；プリオン病、クロイツフェルトヤコブ病、スクレイピーおよびBSE (PrP^{Sc})；ALS (SODおよび神経フィラメント)；ピック病(ピック小体)；パーキンソン病(レヴィー小体における α -シヌクレイン)；前頭側頭認知症(原線維中のタウ)；II型糖尿病(アミリン)；多発性骨髄腫-形質細胞疾患(IgG鎖)；家族性アミロイド神経障害(トランスサイレチン)；甲状腺髄様がん(プロカルシトニン)；慢性腎不全(β_2 -ミクログロブリン)；うっ血性心不全(心房性ナトリウム利尿因子)；老人性心および全身性アミロイドーシス(トランスサイレチン)；慢性炎症(血清アミロイドA)；アテローム性動脈硬化症(アポA1)；家族性アミロイドーシス(ゲルゾリン)；ならびにハンチントン病(ハンチンチン)。

【0079】

上記のように、いくつかの疾患が不溶性のタンパク質凝集体またはタンパク質線維のような、自己凝集タンパク質に関連する。これらの状態の場合、自己凝集タンパク質および/またはタンパク質線維は疾患の検出のための標的の構造状態になりうるのに対し、可溶性および/または非凝集タンパク質は疾患がないこと、または進行した疾患段階がないことを確認するための標的の構造状態になりうる。前節において特定されたタンパク質の多くは、疾患状態に関連する自己凝集体および/またはタンパク質線維を形成する。そのような他のタンパク質は膵島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質、アミロイド β タンパク質またはA β ペプチド(例えば、A β 42およびA β 40)、血清アミロイドA、インスリン(例えば、インスリン関連アミロイドを形成するもの)、アミリン、非アミロイド β 成分、プリオン、ヘモグロビン(例えば、鎌状赤血球貧血の異型)、免疫グロブリンまたはその断片(例えば、IgG鎖)、 β_2 -ミクログロブリン、 α -シヌクレイン、ロドプシン、 τ -1-アンチキモトリプシン、シスタリン、タウ、p53、プレセニリン(例えば、プレセニリン1およびプレセニリン2)、低密度リポタンパク質受容体、アポリポタンパク質(例えば、アポAおよびアポE)、スーパーオキシドジスムターゼ、神経フィラメントタンパク質、トランスサイレチン、プロカルシトニンまたはカルシトニン、心房性ナトリウム利尿因子、ゲルゾリン、嚢胞性線維症膜貫通制御因子、ハンチントン病タンパク質(すなわち、ハンチンチン)、フィブリノゲン鎖、フェニルアラニン水酸化酵素、コラーゲン、 α -ヘキササミニダーゼ、ならびにシスタチンCタンパク質を含む。不溶性タンパク質は一般に、凝集体の中に β -シートの形成を示す。

【0080】

ADの場合、A β 40またはA β 42タンパク質は標的タンパク質になり、それらの状態のいずれも可溶性モノマー、可溶性オリゴマー、凝集体/ADDL、不溶性無定形凝集体、原線維および線維などの自己凝集状態のような、標的の構造状態になりうる。疾患の危険性、疾患の診断および疾患の進行および病気の原因を伴うこれらの異なる構造状態の重要性に関する現在の考えは、前述の背景の項に掲載されている。

【0081】

プリオンタンパク質の場合、PrP^{Sc}型のPrPタンパク質は疾患の検出のための標的の構造状態になりうるのに対し、PrP^C型のPrPタンパク質は疾患がないこと、または進行した疾患段階がないことを確認するための標的の構造状態になりうる。さらに、PrP^{Sc}型の自己凝集体は疾患の検出のための標的の構造状態になりうる。例えば、最も感染性の高いPrP^{Sc}

10

20

30

40

50

°型は、疾患の後期に脳内で形成される成熟線維ではなく、小さな可溶性凝集体でありうる。例えば、Silveira et al., Nature 437: 257-61 (1005) (近似分子量300~600 kDaおよび直径17~27 nmのほぼ球状から楕円形状を有するPrP^S°粒子を、最も高い感染性および変換活性を有すると特定している)を参照されたい。このように、PrP^S°のこの可溶性凝集体型は標的の構造状態になりうる。

【0082】

C. ペプチドプローブ

本発明の一つの局面は、試料においてまたはインビボにおいて標的タンパク質の特定の構造状態を検出するのに有用な、すなわち、標的の構造状態のタンパク質を検出するのに有用なペプチドプローブに関する。典型的には、ペプチドプローブは、 α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、ペプチドプローブそれ自体が α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす。例えば、ペプチドプローブは、 α -ヘリックスの立体構造にある標的タンパク質と接触された場合に立体構造の転換を起こしうる。以下にさらに詳しく論じるように、いくつかの態様において、ペプチドプローブは同様に、治療剤を特定するのにおよび治療剤それ自体として有用である。

【0083】

1. 相同性

一つの態様において、プローブは、標的タンパク質と、または標的タンパク質の一部と相同または同一であるアミノ酸配列を含む。「相同性」、「の相同体」、「相同の」、「同一性」または「類似性」とは二つのポリペプチド間の配列類似性をいい、同一性がいっそう厳密な比較である。相同性および同一性はそれぞれ、比較の目的で整列されうる各配列中の位置を比較することにより判定することができる。比較される配列中の位置が同じアミノ酸によって占有されている場合には、その位置で分子は同一である。アミノ酸配列の同一性の程度は、アミノ酸配列によって共有される位置の同一アミノ酸の数の関数である。アミノ酸配列の相同性または類似性の程度は、アミノ酸配列によって共有される位置の、アミノ酸の、すなわち構造的に関連するアミノ酸の数の関数である。「関連のない」または「非相同の」配列は、本明細書において記述する配列の一つと10%またはそれ以下の同一性を共有する。関連する配列は少なくとも約15%の配列同一性、少なくとも約20%の配列同一性、少なくとも約30%の配列同一性、少なくとも約40%の配列同一性、少なくとも約50%の配列同一性、少なくとも約60%の配列同一性、少なくとも約70%の配列同一性、少なくとも約80%の配列同一性、少なくとも約90%の配列同一性、少なくとも約95%の配列同一性または少なくとも約99%の配列同一性のような、10%を超える配列同一性を共有する。

【0084】

「同一性の割合」という用語は、二つのアミノ酸配列間の配列同一性をいう。比較の目的で整列される各配列中の位置を比較することにより、同一性を判定することができる。一方の比較配列中の等価の位置がもう一方においてこの同じ位置で同じアミノ酸によって占有されている場合には、その位置で分子は同一であり；等価の部位が同じまたは類似のアミノ酸残基(例えば、立体的および/または電気的性質が類似)によって占有されている場合には、その位置で分子は相同(類似)ということができる。相同性、類似性または同一性の割合と表現することは、比較される配列によって共有される位置での同一または類似のアミノ酸の数の関数をいう。FASTA、BLASTまたはENTREZを含む、さまざまなアライメント・アルゴリズムおよび/またはプログラムを使用することができる。FASTAおよびBLASTは、GCG配列解析パッケージ(ウイスコンシン大学、Madison, Wis.)の一部として利用可能であり、例えば、デフォルト設定で使用することができる。ENTREZは、National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, NIH, Bethesda, Mdを通じて利用可能である。一つの態様において、二つの配列の同一性の割合は、1のギャップ重み付けを用いてGCGプログラムにより判定することができ、例えば、各アミノ酸のギャップは、それが二つの配列間の単一のアミノ酸のミスマッチであるかのように重み付けされる。配列同一性を判定するための他の技術は、周知であり、当技術分野において記述

されている。

【0085】

「不溶性タンパク質の相同体」という用語は、不溶性タンパク質遺伝子の相同体によってコードされる全てのアミノ酸配列、および、このような配列と等価または相同である全てのアミノ酸配列を含む。それゆえに、「不溶性タンパク質の相同体」は、Pfamファミリーにおいてヒットとしてスコア化されるタンパク質を含む。タンパク質配列中の「不溶性タンパク質」ドメインの存在を特定するため、および関心対象のポリペプチドまたはタンパク質が特定のプロファイルを有するという判定を下すため、タンパク質のアミノ酸配列を種々のデフォルトパラメータによりいくつかのデータベース(例えば、SwissProt、PIR)の一つに対して検索することができる。例えば、検索プログラムのHM_MERパッケージの一部として利用可能なhmmsfプログラムはMILPAT0063に関するファミリー特異的なデフォルトプログラムであり、スコア15がヒットを判定するためのデフォルトの閾値スコアである。または、ヒットを判定するための閾値スコアを(例えば、8ビットに)下げてもよい。Pfamデータベースの記述は、Sonham et al., *Proteins* 28(3):405-420, 1997のなかで見出すことができ、HMMの詳細な記述は、例えば、Gribskov et al., *Meth. Enzymol.* 183:146-159, 1990; Gribskov et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4355-4358, 1987; Krogh et al., *J. Mol. Biol.* 234:1501-1531, 1994; およびStultz et al., *Protein Sci.* 2:305-314, 1993のなかで見出すことができ、これらの内容は参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0086】

2. プロープデザイン

本明細書において開示するプロープは、またはインピボにおいて特定の構造状態、例えば、標的の構造状態で試料に存在するタンパク質を検出するために使用することができる。一つの態様において、プロープは、標的タンパク質のアミノ酸配列の少なくとも一部に基づく(例えば、その一部と相同または同一の)アミノ酸配列を含む。そのようなプロープは同様に、標的タンパク質のアミノ酸配列の一部に「対応する」といわれる。したがって、プロープのアミノ酸配列は、配列データベース中の既存の情報に基づき標的タンパク質からデザインされてもよく、あるいは、実験的に容易に決定されてもよい。プロープは標的タンパク質の任意の領域に基づく配列を含んでもよいが、一つの態様において、配列は、標的の構造状態に關与する標的タンパク質の一部に基づく。例えば、一つの態様において、プロープは、 α -ヘリックス/ランダムコイル立体構造から β -シート立体構造への転換のような、構造の転換を起こす標的タンパク質のアミノ酸配列の一部と類似の(例えば、相同の)、または同一のアミノ酸配列を含む。

20

30

【0087】

プロープは、標的タンパク質由来の最小数の隣接アミノ酸、例えば標的タンパク質配列由来の少なくとも約5個の、少なくとも約6個の、少なくとも約7個の、少なくとも約8個の、少なくとも約9個の、少なくとも約10個の、少なくとも約11個の、少なくとも約12個の、少なくとも約13個の、少なくとも約14個の、少なくとも約15個の、少なくとも約16個の、少なくとも約17個の、少なくとも約18個の、少なくとも約19個の、少なくとも約20個の、少なくとも約21個の、少なくとも約22個の、少なくとも約23個の、少なくとも約24個の、もしくは少なくとも約25個の隣接アミノ酸、またはこれらの数の間の任意の範囲の、例えば標的タンパク質配列由来の約10~約25個の隣接アミノ酸を含むことができる。

40

【0088】

プロープそれ自体は長さが少なくとも約5アミノ酸単位であってよく、長さ(-mer)が最大で約300~約400までのアミノ酸単位もしくはそれ以上、または長さが約10アミノ酸~約50アミノ酸のような、約400アミノ酸に至るまでの約5アミノ酸の範囲の間の任意のサイズであってよい。いくつかの態様において、プロープは、長さが約15アミノ酸から長さが約100アミノ酸である。他の態様において、プロープは、長さが約20アミノ酸から長さが約40アミノ酸に及ぶ。さらなる態様において、プロープは長さが約17アミノ酸から長さが約34アミノ酸に及ぶ。所与のプロープの長さは、標的タンパク質と複合体を形成し、 β -シー

50

トの形成をもたらすプローブの能力に影響を及ぼすことができ、本明細書における教示に導かれて当業者はこれを選択することができる。

【0089】

本発明は同様に、標的タンパク質のアミノ酸配列の約5個またはそれ以上の隣接残基に基づくアミノ酸配列を、当技術分野において公知の方法により一つまたは複数の残基が付加され、欠失されまたは置換された状態で含んだプローブを含む。

【0090】

一つの態様において、プローブは、標的タンパク質の構造的変化と類似の構造的変化を起こし、例えば、 α -ヘリックス/ランダムコイル立体構造または β -シート立体構造のいずれかで存在することができる。一つの特定の態様において、プローブは、溶液中にて α -ヘリックス/ランダムコイル立体構造で存在し、 β -シート立体構造の標的タンパク質との接触時に β -シート立体構造への立体構造の変化を起こす。例えば、一つの態様において、プローブは、溶液中にてランダムコイルまたは α -ヘリックス立体構造を示す少なくとも5個、もしくは10個、またはそれ以上のアミノ酸残基のペプチドまたはペプチド模倣体を含む。ペプチドまたはペプチド模倣体プローブの溶媒は、水性で、pHが約4~約10、例えば約5~約8であってよく、イオン強度が約0.05~約0.5であってよい(塩化ナトリウムまたは塩化カリウムのような、塩化物塩で、通常、調製される場合)。溶媒は同様に、トリフルオロエタノールのような、水混和性有機材料の割合を約30容量%~約70容量%、例えば約45容量%~約60容量%の量で含んでもよい。溶媒は、酢酸塩/酢酸、トリスまたはリン酸塩のような、適当な緩衝系で調製されてもよい。

10

20

【0091】

プローブは、以下の制約の下でデザインすることができる。初期の立体構造状態(例えば、 α -ヘリックス)にあるプローブの集団を、主に転換された立体構造状態(例えば、 β -ヘリックス)にあるプローブの集団と分ける違いは数kcalに過ぎない。一方の立体構造状態からもう一方のものへの転換は、 β -シート複合体を形成するプローブ分子とその天然の会合体との会合のKd、または分子間の静電相互作用の変化(例えば、溶液のイオン強度を低下させることにより引き起こされる変化)のいずれかに起因する駆動力によってもたらされる。Alのような金属イオン、または別のリガンドの結合が関与する場合、その他の静電的または立体的な(steric)影響が寄与する可能性がある。プローブペプチドのサイズは変わることがあるが、しかし検出条件の下で「合理的に」明確な二次構造を有するのに、およびプリオンタンパク質のような、選択された標的に対する十分な認識特異性を有するのに十分な長さのものとすべきである。プローブペプチドは同様に、突然変異したタンパク質または系統に一般的に適用可能であるよう単一部分の突然変異を収容し、これらの変化および/または異質性が分子の熱力学的安定性に影響を及ぼすことを認識すべきである。さらに、プローブは患者集団に対し、その集団がヒト患者集団、家畜集団またはその他の哺乳類集団のいずれであるかを問わず、非伝染性でなければならない。

30

【0092】

一つの態様において、プローブは、標的配列のアミノ酸配列に対応する二つのアミノ酸配列を有するパリンドローム構造を持つ。「パリンドローム(の)」という用語は、構造の転換に関与する標的タンパク質の一部に対応する第一および第二のペプチド配列を含み、これらのペプチド配列がパリンドロームの形で、すなわち、第一のペプチド配列ではカルボキシ末端からアミノ末端へ(またはアミノ末端からカルボキシ末端へ)、かつ第二のペプチド配列ではアミノ末端からカルボキシ末端へ(またはカルボキシ末端からアミノ末端へ)提示されるような、所与のプローブ配列の構成をいう。パリンドロームプローブ中の第一および第二のペプチド配列は、長さが同一である必要はない。いくつかの態様において、第一および第二のペプチド配列は、長さが少なくともほぼ等価である。いくつかの態様において、第一および第二のペプチド配列は、同じアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、二つのペプチド配列(パリンドロームプローブの「アーム」)は、長さがせいぜい15アミノ酸、せいぜい10アミノ酸またはせいぜい5アミノ酸である。他の態様において、各アームは約10~約25アミノ酸、例えば約14~約20アミノ酸を含む。いくつかの態様

40

50

において、パリンドロームプローブ内の第一および第二のペプチド配列は、約1～約5アミノ酸、または約1～約3アミノ酸を含み、かつ少なくとも一つのプロリンアミノ酸を含んでよい、または主にプロリンアミノ酸を含んでもよいペプチドリinkerのような、リンカーにより隔てられている。適当なペプチドプローブは米国特許第2006-057671号に記述されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。図3は例示的な33-merのパリンドロームプローブを示す。パリンドロームプローブは、プリオンタンパク質を検出するのに特に有用でありうる。

【0093】

いくつかの態様において、プローブは疎水性アミノ酸配列を含むことができ、この配列は標的タンパク質のアミノ酸配列の一部分(構造の転換を起こす標的アミノ酸配列の一部分のような)に基づき、この配列は長さが約1アミノ酸から約20アミノ酸またはそれ以上、例えば、長さが約2～約10アミノ酸まで変わることがあり、かつこの配列はプローブの両端のうちの一端にまたはそく近くに存在する。パリンドロームプローブの場合、疎水性アミノ酸配列はプローブの各二つのペプチドアームの末端に存在しうる。任意で、プローブは同様に、プローブの少なくとも一端におよび、パリンドロームプローブの場合、プローブの一端または両端にまたはその近くに合成疎水性アミノ酸配列(すなわち、標的タンパク質のペプチド配列にとって天然のものではない)を含んでもよく、これは長さがわずかに約1アミノ酸から約20アミノ酸またはそれ以上、例えば長さが約2～約10アミノ酸まで変化してもよい。プローブは、標識のプローブへの連結で用いるのに適したN末端アミノ酸残基、C末端アミノ酸残基、またはその両方(例えば、遊離アミノ基を含む、Lys)を含むことができる。

10

20

【0094】

例証としてかつ非限定的に、標的タンパク質中の所望のペプチド配列が、アミノ末端からカルボキシ末端へ読んで、配列

QRSTVVARLKAAAV (SEQ ID NO:15)

(ここで、AAAV (SEQ ID NO:30)は疎水性アミノ酸配列である)を含む場合には、このパリンドロームは

VAAAKLRAVVTSRQ (SEQ ID NO:31)

30

である第一のペプチド配列および

QRSTVVARLKAAAV (SEQ ID NO:15)

である第二のペプチド配列(またはその配列に近い異形)を含んでよく、この二つの配列は、約1から約5アミノ酸を、これらのアミノ酸の少なくとも一つが、および好ましくは、これらのアミノ酸の全てではないにせよ大部分が、プロリンアミノ酸であるように含んだリンカーにより隔てられてもよい。したがって、この標的タンパク質に適したプローブは、以下であることができると考えられる。

VAAAKLRAVVTSRQPPPPQRSTVVARLKAAAV (SEQ ID NO:28)

40

(仮想的なパリンドロームプローブ)。

【0095】

プローブは任意の標的タンパク質に特異的であってよい。例えば、標的タンパク質はPrP^C、PrP^Sまたはその混合物のような、プリオンタンパク質であってよい。したがって、標的タンパク質はSEQ ID NO:13のタンパク質(ヒトプリオンタンパク質、アクセッション番号P04156)またはその断片を含むことができる。いくつかの態様において、「その断片」とは、ポリペプチド配列の完全長に至るまでの少なくとも約5個の隣接アミノ酸、または約5個から最大で完全長までのタンパク質の範囲の間の、任意の数の隣接アミノ酸を含むことができる。いくつかの態様において、プローブは完全長のタンパク質を含み; 他の態様において、プローブは完全長のタンパク質を含まない。いくつかの態様において、プ

50

ローブは完全長の配列の少なくとも約10個の隣接アミノ酸、もしくは少なくとも約15個のアミノ酸であってよく、またはそれらの隣接残基に対し少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する配列を含むことができる。

【0096】

標的タンパク質は同様に、A 42 (SEQ ID NO:32)またはA 40 (SEQ ID NO:4)のような、アミロイドタンパク質であってもよい。融合タンパク質のペプチドプローブは、SEQ ID NO:32もしくはSEQ ID NO:4、またはその断片に対し少なくとも約15%の配列同一性を有する配列を含むことができる。例えば、ペプチドプローブは、タンパク質 (SEQ ID NO:32もしくはSEQ ID NO:4)の完全長に至るまでの少なくとも約5個の隣接アミノ酸、またはこれらのサイズ範囲の間の、SEQ ID NO:32もしくはSEQ ID NO:4由来の任意の数の隣接アミノ酸を含むことができる。本発明の他の態様において、プローブはSEQ ID NO:32もしくはSEQ ID NO:4の少なくとも約10個もしくは少なくとも約15個の隣接アミノ酸残基であってよく、またはそれらの隣接残基に対し少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する配列を含むことができる。

【0097】

いくつかの態様において、ペプチドプローブは、当技術分野 (Wurth et al., J. Molec. Biol. 319:1279-1290 (2002); Kim et al., J. Biol. Chem. 41:35069-35076 (2005)、これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられる)において開示の、A 42 (SEQ ID NO:32)またはA 40 (SEQ ID NO:4)中の突然変異を含むことができる。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、A 42またはA 40の一方に特異的である。すなわち、プローブはA 42またはA 40の一方に選択的に結合し、したがってA 42を含む試料を、A 40を含むものと識別するのに、または試料中のA 42およびA 40の相対量を定性的に評価するのに、または試料中のA 42および/もしくはA 40の量を定量化するのに有用である。そのようなペプチドプローブは、インピボにおいてA 42およびA 40を検出および/または識別するため、インピボの方法において同様に使用することができる。

【0098】

標的タンパク質は同様に、膵島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質であってもよい。そのような標的タンパク質に対するペプチドプローブは、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:11に対し少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する配列、またはその断片を含むことができる。例えば、融合タンパク質のペプチドプローブは、SEQ ID NO:11の完全長に至るまでの少なくとも約5個の隣接アミノ酸残基、またはこれらの二つの範囲の間の、任意の数の隣接アミノ酸を含むことができる。本発明の他の態様において、融合タンパク質のペプチドプローブは、SEQ ID NO:11の少なくとも約10個もしくは少なくとも約15個の隣接アミノ酸残基を含むことができ、またはそれらの隣接残基に対し少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくと

も約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する配列を含むことができる。

【0099】

標的タンパク質は同様に、トランスサイレチンタンパク質であってもよい。そのような標的タンパク質に対するペプチドプローブは、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:26に対し少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する配列、またはその断片を含むことができる。例えば、融合タンパク質のペプチドプローブは、SEQ ID NO:26の完全長に至るまでの少なくとも約5個の隣接アミノ酸残基、またはこれらの二つの範囲の間の、任意の数の隣接アミノ酸を含むことができる。本発明の他の態様において、ペプチドプローブは、SEQ ID NO:26の少なくとも約10個もしくは少なくとも約15個の隣接アミノ酸残基またはSEQ ID NO:26のアミノ酸残基番号11-19の少なくとも約5個もしくは少なくとも約10個のアミノ酸を含むことができ、あるいはそれらの隣接残基に対し少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する配列を含むことができる。

【0100】

標的タンパク質は同様に、シスタチンCタンパク質であってもよい。そのような標的タンパク質に対するペプチドプローブは、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:17に対し少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する配列、またはその断片を含むことができる。例えば、融合タンパク質のペプチドプローブは、SEQ ID NO:17の完全長に至るまでの少なくとも約5個の隣接アミノ酸残基、またはこれらの二つの範囲の間の、任意の数の隣接アミノ酸を含むことができる。本発明の他の態様において、ペプチドプローブは、SEQ ID NO:17の少なくとも約10個もしくは少なくとも約15個の隣接アミノ酸残基を含み、またはペプチドプローブはそれらの隣接残基に対し少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する配列を含むことができる。

【0101】

標的タンパク質はハンチントン病タンパク質または「ハンチンチン」であってもよい。そのような標的タンパク質に対するペプチドプローブは、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:19に対し少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも

約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する配列、またはその断片を含むことができる。例えば、融合タンパク質のペプチドプローブは、SEQ ID NO:19の完全長に至るまでの少なくとも約5個の隣接アミノ酸残基、またはこれらの二つの範囲の間の、任意の数の隣接アミノ酸を含むことができる。本発明の他の態様において、ペプチドプローブは、SEQ ID NO:19の少なくとも約10個もしくは少なくとも約15個の隣接アミノ酸残基を含み、またはそれらの隣接残基に対し少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する配列を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0102】

ペプチドプローブは、標的タンパク質のアミノ酸配列に等価なアミノ酸配列、またはその断片を有することができる。「等価な」とは、分析されるタンパク質のアミノ酸配列に類似するアミノ酸配列を持ったタンパク質をいう。いくつかの態様において、「等価な」とは、例えば置換、付加または欠失により、アミノ酸配列の中に少なくとも1つ、しかし約5つ未満(例えば、3つまたはそれ以下)の相違を有する。他の態様において、「等価な」とは、標的タンパク質配列またはその断片に対し少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%の配列同一性を有する。プローブの基本機能を実質的に変化させない、所与の配列中の一つまたは複数のアミノ酸の置換。いくつかの態様において、「等価な」とは、アミノ酸残基が、類似の側鎖を持つアミノ酸残基と置き換えられた置換である一つまたは複数の「保存的アミノ酸置換」を含むことができる。類似の側鎖を持つアミノ酸残基のファミリーは、塩基性側鎖を有するもの(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するもの(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を有するもの(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖を有するもの(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 β -分岐側鎖を有するもの(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖を有するもの(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を含む。

【0103】

3. 合成

ペプチドプローブは化学的にまたは組換えDNA法を用いることにより合成することができる。

【0104】

例えば、ペプチドプローブは種々の固相技術を行うことによって化学的に合成することができ(Roberge et al., Science 269:202-204 (1995))、自動合成は、例えば、当技術分野において公知のペプチド合成機(例えば、ABI 431A Peptide Synthesizer, Perkin Elmer, Palo Alto, Calif.)を用いて達成することができる。新たに合成されたペプチドは、分取高速液体クロマトグラフィー(例えば、Creighton, Proteins, Structures and Molecular Principles (1983))または当技術分野において用いることができる他の同等の技術によって実質的に精製することができる。合成ペプチドの組成はアミノ酸分析または配列決定法(例えば、エドマン分解法)によって確認することができる。以下にさらに詳しく論

じるように、合成したペプチドプローブに標識またはレポーターを化学的にカップリングさせることができる。

【0105】

所望のポリペプチドを宿主細胞中で発現するため、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、または機能的等価体を適切な発現ベクター、すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要な要素を含有するベクターに挿入することができる。当業者に周知である方法を用いて、関心対象のポリペプチドをコードする配列ならびに適切な転写および翻訳制御要素を含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法にはインピトロでの組換えDNA技術、合成技術およびインピボでの遺伝子組換えが含まれる。そのような技術は、Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989)、およびAusubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1989)に記述されている。

10

【0106】

種々の発現ベクター/宿主系を用いて、ポリヌクレオチド配列を含有させ、発現させることができる。これらには、以下に限定されるものではないが、組換えバクテリオファージ、プラスミドもしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌のような微生物；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV)でもしくは細菌発現ベクター(例えば、TiもしくはpBR322プラスミド)で形質転換した植物細胞系；または動物細胞系が含まれる。

20

【0107】

ペプチドプローブを宿主細胞中で発現するため、以下のような手順を使用することができる。ペプチドプローブをコードするDNA配列を含有する制限断片を、宿主細胞で機能する複製起点および適した選択可能なマーカーを含有する適切な組換えプラスミドにクローニングすることができる。プラスミドはペプチドプローブの誘導発現用のプロモーター(例えば、pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315)およびpET11d (Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89))を含むことができる。組換えプラスミドを、例えば、エレクトロポレーションによって宿主細胞に導入することができ、組換えプラスミドを含有する細胞を、プラスミド上のマーカーに対する選択によって特定することができる。ペプチドプローブに特異的なアッセイ法を用いて、ペプチドプローブの発現を宿主細胞中で誘導および検出することができる。

30

【0108】

ペプチドプローブの発現に適した宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞(例えば、大腸菌(*E. coli*)もしくは枯草菌(*B. subtilis*)のような細菌細胞、昆虫細胞(バキュロウイルス)、酵母、またはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞のような哺乳類細胞)でありうる。いくつかの態様において、ペプチドをコードするDNAを宿主細胞中での発現のために最適化することができる。例えば、DNAは、一つまたは複数のアミノ酸に対するコドンであって、この同じアミノ酸に対する他のコドンと比べ宿主細胞において優勢なコドンを含むことができる。

40

【0109】

4. 例示的なプローブ

開示する方法において有用な α -ヘリックスまたはランダムコイルプローブ(すなわち、溶液中で α -ヘリックスまたはランダムコイル立体構造を示すプローブ)は、以下を含むことができる。

【0110】

a. PrP^{Sc}プローブ

PrP^{Sc}タンパク質のアミノ酸番号122-104および109-122 (SEQ ID NO:13および14) (SwissProt P04156; Pfam ID Prion Pf00377および03991)と同一であるアミノ酸配列を含むパリンドロームの33-mer:

50

VVAGAAAAGAVHKLNTKPKLKHVAGAAAAGAVV (SEQ ID NO:29)

(マウス);

VVAGAAAAGAMHKMNTKPKMKHMAGAAAAGAVV (SEQ ID NO:1)

(ヒト)。いくつかの態様において、C末端リジンをパリンドロームの33-merに付加して34-mer (例えば、

VVAGAAAAGAMHKMNTKPKMKHMAGAAAAGAVVK (SEQ ID NO:33) および

VVAGAAAAGAVHKLNTKPKLKHVAGAAAAGAVVK (SEQ ID NO:34)

10

を形成させることができる。C末端リジンは適当な標識(例えば、ピレン)へのプローブの連結で用いるのに適当でありうる。

【0111】

PrP^{Sc}タンパク質のアミノ酸番号122-104および109-122 (SEQ ID NO:13および14) (SwissProt P04156; Pfam ID Prion Pf00377および03991)と等価であるアミノ酸配列を含むパリンドロームの33-mer。

【0112】

PrP^{Sc}タンパク質のアミノ酸番号122-104および109-122 (SEQ ID NO:13および14) (SwissProt P04156; Pfam ID Prion Pf00377および03991)と約70%~約90%同一であるアミノ酸配列を含むパリンドロームの33-mer。

20

【0113】

ヒトPrP^{Sc}のアミノ酸番号104-122またはマウスPrP^{Sc}タンパク質のアミノ酸番号103-121 (SEQ ID NO:13および14) (SwissProt P04156; Pfam ID prion PF00377および03991)の少なくとも10個の隣接アミノ酸残基を含んだアミノ酸配列を含むプローブ; ヒトプリオンタンパク質(アクセッションP04156)。

【0114】

アミノ酸配列

KPKTNMKHMAGAAAAGAVV (SEQ ID NO:39)

を含むプローブ。

30

【0115】

アミノ酸配列

VVAGAAAAGAMHKMNTKPKMKHMAGAAAAGAVV (SEQ ID NO:40)

(下線はパリンドロームの二つのアームに対するリンカー配列)を含むパリンドロームの33-mer。

【0116】

アミノ酸配列

VVAGAAAAGAMHKMKPKTNMKHMAGAAAAGAVV (SEQ ID NO:41)

40

(下線はパリンドロームの二つのアームに対するリンカー配列)を含むパリンドロームの33-mer。

【0117】

アミノ酸配列

VVAGAAAAGAVHKMKPKTNMKHVAGAAAAGAVV (SEQ ID NO:42)

(下線はパリンドロームの二つのアームに対するリンカー配列)を含むパリンドロームの33-mer。

【0118】

b. A プローブ

50

A ペプチド(Nref00111747; ヒト)のアミノ酸番号1-40と同一であるアミノ酸配列を含むプローブ:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO:4)

【 0 1 1 9 】

A ペプチド(Nref00111747; ヒト)のアミノ酸番号1-40 (SEQ ID NO:4)と等価であるアミノ酸配列を含むプローブ。

【 0 1 2 0 】

A ペプチド(Nref00111747; ヒト)のアミノ酸番号1-40 (SEQ ID NO:4)と約70%~約90%同一であるアミノ酸配列を含むプローブ。

10

【 0 1 2 1 】

A ペプチド(Nref00111747; ヒト)のアミノ酸番号11-34と同一であるアミノ酸配列を含むプローブ:

EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL (SEQ ID NO:5)

【 0 1 2 2 】

A ペプチド(Nref00111747; ヒト)のアミノ酸番号11-34と同一であるが、金属イオン相互作用を低下させ、かつペプチドの溶解度を増加させるようRで置換された残基H13を有する、アミノ酸配列を含むプローブ:

EVRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL (SEQ ID NO:6)

20

【 0 1 2 3 】

A ペプチド(Nref00111747; ヒト)のアミノ酸番号25-35と同一であるアミノ酸配列を含むプローブ:

GSNKGAIIGLM (SEQ ID NO:7)

【 0 1 2 4 】

A ペプチド(Nref00111747; ヒト)のアミノ酸番号17-35と同一であるアミノ酸配列を含むプローブ:

LVFFAEDVGSNKGAIIGLM (SEQ ID NO:35)

30

任意で、プローブはさらなるN末端リジン(K)を含んでもよく

KLVFFAEDVGSNKGAIIGLM (SEQ ID NO:36)

、C末端リジン(K)を含んでもよく

LVFFAEDVGSNKGAIIGLMK (SEQ ID NO:37)

、またはその両方を含んでもよい。

KLVFFAEDVGSNKGAIIGLMK (SEQ ID NO:38)

40

【 0 1 2 5 】

c. TSEプローブ

野生型(wt) TSE (ヒトNref00130350)のアミノ酸番号104-122と相同であるアミノ酸配列を含むプローブ:

KPKTNLKHVAGAAAAGAVV (SEQ ID NO:10)

【 0 1 2 6 】

野生型(wt) TSE (ヒトNref00130350)のアミノ酸番号104-122 (SEQ ID NO:10)と等価であるアミノ酸配列を含むプローブ。

50

【 0 1 2 7 】

野生型(wt) TSE (ヒトNref00130350)のアミノ酸配列番号104-122 (SEQ ID NO:10)と約70%~約90%同一であるアミノ酸配列を含むプローブ。

【 0 1 2 8 】

(a) 選択的に突然変異したTSE配列である;

(b) 不安定化され、かつ非感染性である; および

(c) 野生型(wt) TSE (ヒトNref00130350)のアミノ酸配列番号104-122 (SEQ ID NO:10)と相同であるアミノ酸配列を有する、アミノ酸配列を含むプローブ。

【 0 1 2 9 】

(a) 選択的に突然変異したTSE配列である;

(b) 不安定化され、かつ非感染性である; および

(c) 野生型(wt) TSE (ヒトNref00130350)のアミノ酸配列番号104-122 (SEQ ID NO:10)と等価であるアミノ酸配列を有する、アミノ酸配列を含むプローブ。

【 0 1 3 0 】

(a) 選択的に突然変異したTSE配列である;

(b) 不安定化され、かつ非感染性である; および

(c) 野生型(wt) TSE (ヒトNref00130350)のアミノ酸配列番号104-122 (SEQ ID NO:10)と約70%~約90%同一であるアミノ酸配列を有する、アミノ酸配列を含むプローブ。

【 0 1 3 1 】

d. アミリンプローブ

ヒト糖尿病に關与するヒト膵島アミロイドポリペプチド前駆体(アミリン)タンパク質(アクセッション番号NP_000406; ヒト)のアミノ酸番号1-38と同一であるアミノ酸配列を含むプローブ:

MGILKLVQVFLIVLSVALNHLKATPIESHQVEKRKCNATA (SEQ ID NO:11)

【 0 1 3 2 】

ヒト膵島アミロイドポリペプチド前駆体(アミリン)タンパク質(アクセッション番号NP_000406; ヒト)のアミノ酸番号1-38 (SEQ ID NO:11)に対応する配列内の少なくとも10個の隣接アミノ酸残基と同一であるアミノ酸配列を含むプローブ。

【 0 1 3 3 】

e. 他のプローブ

ポリリジンに見出されるヘリックス-ループ-ヘリックス立体構造、および長さが少なくとも10アミノ酸残基であり、かつ

KKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKK (27-mer) (SEQ ID NO:8)

と等価または相同であるアミノ酸配列を有するプローブ。

【 0 1 3 4 】

ポリグルタミンに見出される立体構造、および

QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ (23-mer) (SEQ ID NO:9)

と等価または相同であるアミノ酸配列を有するプローブ。

【 0 1 3 5 】

ヒト乳児SIDSにかかわるヒト肺界面活性剤タンパク質(NCBIアクセッション番号AAH3278 5; ヒト)のアミノ酸番号1-25と同一であるアミノ酸配列を含むプローブ:

MAESHLLQWLLLLLPTLCGPGTAAW (SEQ ID NO:12)

10

20

30

40

50

【 0 1 3 6 】

ヒト血漿ゲルゾリン(P06396; Muary et al., FEBS Lett. 260(1):85-87, 1990)のアミノ酸番号235-269 (二重下線によって以下に強調されている)の少なくとも10個の隣接アミノ酸残基を含んだアミノ酸配列を含むプローブ:

MAPHRPAPALLCALSLALCALSLPVRAATASRGASQAGAPQGRVPEARPNM
 VVEHPEFLKAGKEPGLQIWRVEKFDLVPVPTNLYGDFFTGDAYVILKTVQLR
 NGNLQYDLHYWLGNECSQDESGAAAIFTVQLDDYLNGRAVQHREVQGFESA
 TFLGYFKSGLKYKKGGSVASGFKHVVPNEVVVQRLFQVKGRRVVRATEVPVS
 WESFNNGDCFILDLGNNIHQWCGSNSNRYERLKATOVSKGIRDNERSGRARV
HVSEEGTEPEAMLQVLGPKPALPAGTEDTAKEDAANRKLAKLYKVSNGAGT
 MSVSLVADENPFAQGALKSEDCFILDHGKDGKIFVWKGKQANTEERKAALK
 TASDFITKMDYPKQTQVSVLPEGGETPLFKQFFKNWRDPDQTDGLGLSYLSS
 HIANVERVPFDAATLHTSTAMAAQHGMDDDGTTGQKQIWRIEGSNKVPVDP
 TYGQFYGGDSYIILYNYRHGGRQGGQIYNWQGAQSTQDEVAASAILTAQLDE
 ELGGTPVQSRVVQGKEPAHLMSLFGGKPMIYKGGTSREGGQTAPASTRLFQ
 VRANSAGATRAVEVLPKAGALNSNDAFVLKTPSAAYLWVGTGASEAEKTGA
 QELLRVLRAQPVQVAEGSEPDGFWEALGGKAAAYRTSPRLKDKKMDAHPRL
 FACSNKIGRFVIEEVPGELMQEDLATDDVMLLDTWDQVFVWVGKDSQEEEK
 TEALTSAKRYIETDPANRDRRTPTVVKQGFEPSPFVWFLGWDDDDYWSVDP
 LDRAMAELAAAYERLKATQVSKGIRDNERSGRARVHVSEEGTEPEAM (SEQ ID
 NO:16)

10

20

【 0 1 3 7 】

以下に描くようにおよびLevy et al., J. Exp. Med. 169(5):1771-1778, 1989 (P01034)に報告されているように、シスタチンCタンパク質配列のアミロイド形成領域(アミノ酸番号26-147; 以下に二重下線によって強調されている)の少なくとも10個の隣接アミノ酸残基を含んだアミノ酸配列を含むプローブ。適切なプローブは少なくとも10アミノ酸のその任意の部分である。数多くのプローブをそれに応じて配置することができる。

30

MAGPLRAPLLLLAILAVALAVSPAAGSSPGKPPRLVGGPMDASVEEEGVR
RALDFAVGEYNKASNDMYHSRALQVVRARQIVAGVNYFLDVELGRITCTK
TOPNLDCPFHDOPHLKRKAFCSEFOIYAVPWOGTMTLSKSTCODA (SEQ ID
 NO:17)

40

【 0 1 3 8 】

4単位のプロリンリンカーを有する、上記の配列のアミノ酸番号39-47から取ったシスタチンCタンパク質のパリンドロームプローブ; 例えば

EEEVSADMPPPPMDASVEEE (SEQ ID NO:18)

【 0 1 3 9 】

以下に描いたハンチンチンタンパク質(ハンチントン病タンパク質)のタンパク質配列の残基番号18-40 (以下に二重下線によって強調されている)由来オリゴグルタミンまたはポリグルタミンの、10個から23個までの(10個と23個を含む)隣接グルタミン残基を含んだアミノ酸配列を含むプローブ:

MATLEKLMKAFESLKSFOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOPPPPPPPPPP
 PQLPQPPPPQAQPLLPQPQPPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKKELSATKKD
 RVNHCLTICENIVAQSVRNSPEFQKLLGIMELFLLCSDDAESDVRMVADE
 CLNKVIKALMDSNLPRLQLELYKEIKKNGAPRSLRAALWRF~~AEL~~AHLVVP
 QKCRPYLVNLLPCLTRTSKRPEESVQETLAAAVPKIMASFGNFANDNEIK
 VLLKAFIANLKSSSPTIRRRTAAGSAVSICQHRRRTQYFYSWLLNVLLGLL
 VPVEDEHSTLLILG (SEQ ID NO:19) (P42858; gi:1170192)

10

【 0 1 4 0 】

例示的なプローブ:

QQQQQQQQQQQQQQQQQQ (SEQ ID NO:20)

【 0 1 4 1 】

配列を以下に示した原線維形成に關与するヒト臍島アミロイドポリペプチド、NP_000406 [gi:4557655] Scrocchi et al., J Struct. Biol. 141(3):218-227, 2003のアミノ酸残基番号45-50および48-53 (以下に強調されている)の少なくとも6個の隣接アミノ酸残基を含んだアミノ酸配列を含むプローブ:

MGILKLQVFLIVLSVALNHLKATPIESHQVEKRKCNTATCATQRLANFLV

20

HSSNNFGAILSSTNVGSNTYGKRNAVEVLKREPLNYLPL (SEQ ID NO:21)

【 0 1 4 2 】

そのまま使われてもよく、または本明細書において記述するパリンδροームプローブを形成させるために使われてもよい、SEQ ID NO:21の上記ペプチド配列の配列番号45-53内の配列である、以下の配列を含有しうる例示的なプローブ:

LANFV (SEQ ID NO:22)

VFNALPPPPLAKFV (SEQ ID NO:23) (パリンδροームプローブ)

FLVHSS (SEQ ID NO:24)

30

SSHVLFPPPPFLVHSS (SEQ ID NO:25) (パリンδροームプローブ)

【 0 1 4 3 】

トランスサイレチン(AAH20791 [gi: 18089145]; MacPhee and Dobson, J. Mol. Biol., 279(5):1203-1215, 2000)のペプチド断片のアミノ酸残基番号11-19 (二重下線によって以下に強調されている)の少なくとも5個の隣接アミノ酸残基を含んだアミノ酸配列を含むプローブ

MASHRLLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPMLVKVLDAVRGSPAINVAV

HVFRKAADDTWEPFASGKTSESSELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWK

40

ALGISPFHEHA~~EV~~VFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE (SEQ ID NO:26)

【 0 1 4 4 】

SEQ ID NO:26の上記の強調配列(アミノ酸残基番号11-19)に基づくパリンδροームプローブ; 例えば

ESVFLVGLALPPPPLAGLVFVSE. (SEQ ID NO:27)

【 0 1 4 5 】

上記に例示したものに対して少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なく

50

とも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも99%を有するプローブ、および等価な配列を有するプローブも本発明に含まれる。同様に含まれるのは、上記プローブのアミノ酸配列を含んだ、かつ標識のプローブへの連結で用いるのに適したさらなるN末端アミノ酸残基、C末端アミノ酸残基、またはその両方(例えば、標識をプローブに連結するための遊離アミノ基を供与する、Lys)を持ったプローブである。

【0146】

標準的な実験室技術およびペプチドに関連した化学合成を用いて、過度の実験なしに、さまざまなその他のプローブを容易に作出することができる。その他のプローブおよび本開示の方法で使用できるまたは本開示の方法で用いるのに改変できるプローブをデザインする方法は、容易に得ることが可能であり、米国特許第2006-0057671号; Wurth et al., J. Mol. Biol. 319:1279-1290 (2002); およびKim et al., J. Biol. Chem. 280:35059-35076 (2005)に記述されており、これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0147】

5. 標識

本明細書において開示するプローブは標識を含むことができる。例えば、プローブは、標識に、共有結合的にまたは非共有結合的にカップリングまたは融合されているペプチドプローブを含むことができる。一つの態様において、ペプチドプローブは、プローブそれ自体の検出およびプローブの構造状態の検出を含むペプチドプローブの分析を促進しうる部分または化学的実体により(ペプチドの一端または両端で)末端キャッピングされる。

【0148】

選択される特定の標識は、分析に使用される分析技術に応じて、大きく変わることがある。標識はペプチドのアミノまたはカルボキシ末端にまたはその近くに複合体形成または共有結合することができ、このペプチドは短い疎水性ペプチド配列により末端キャッピングされたものでもよい。本発明のいくつかの局面においては、プローブペプチドのアミノ末端もカルボキシ末端もともに、サイズが約1から約5アミノ酸に及ぶ小さな疎水性ペプチドにより末端キャッピングされる。これらのペプチドは天然のものまたは合成のものであってよいが、好ましくは天然のものである(すなわち、標的タンパク質に由来する)。プローブのアミノおよび/またはカルボキシ末端にまたはその近くに標識を付着することができる。

【0149】

本明細書において用いられる場合、「標識」とは、プローブを標識するのに有用な化学的または生化学的部分であり、これは任意で、プローブの特定の構造状態を評価するために用いられてもよい。例えば、標識は、第一の構造状態に基づく第一のシグナルおよび第二の構造状態に基づく第二のシグナルを放出することができる。第一のシグナルおよび第二のシグナルは、強度が異なることができる。シグナルが光の放出を含むいくつかの態様において、第一のシグナルおよび第二のシグナルは、励起波長および/または放出波長が異なることができる。

【0150】

「標識」は、蛍光剤(例えば、フルオロフォア、蛍光タンパク質、蛍光性半導体ナノ結晶)、リン光剤、化学発光剤、発色剤、消光剤、色素、放射性核種、金属イオン、金属ゾル、リガンド(例えば、ピオチン、ストレプトアビジン、ハプテンなど)、酵素(例えば、
-ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど)、酵素基質、酵素補因子(例えば、NADPH)、酵素阻害剤、シンチレーション剤、阻害剤、磁性粒子、オリゴヌクレオチド、および当技術分野において公知の他の部分を含むことができる。標識がフルオロフォアである場合、フルオロフォアの一つまたは複数の特徴を用いて、標識プローブの構造状態を評価することができる。例えば、フルオロフォアの励起波長は標識プローブの構造状態に基づいて異なることができる。いくつかの態様において、フルオロフォアの放出波長、強度または極性は、標識プローブ

の構造状態に基づいて変わることができる。

【0151】

本明細書において用いられる場合「フルオロフォア」とは、光により励起されて蛍光またはリン光を放出しうる化学基である。「クエンチャ」とは、蛍光供与体からの蛍光シグナルを消光できる作用物質である。第一のフルオロフォアは、第二のフルオロフォアを励起する蛍光シグナルを放出しうる。第一のフルオロフォアは、第二のフルオロフォアにより消光されるシグナルを放出しうる。本明細書において開示するプローブは、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を起こすことができる。

【0152】

フルオロフォアおよびクエンチャは、以下の作用物質(または以下の商品名で販売されているフルオロフォアおよびクエンチャ)を含むことができる: 1,5 IAEDANS; 1,8-ANS; ウンベリフェロン(例えば、4-メチルウンベリフェロン); アクラジマム(acradimum)エステル、5-カルボキシ-2,7-ジクロロフルオレセイン; 5-カルボキシフルオレセイン(5-FAM); 5-カルボキシテトラメチルローダミン(5-TAMRA); 5-FAM (5-カルボキシフルオレセイン); 5-HAT (ヒドロキシトリプタミン); 5-ヒドロキシトリプタミン(HAT); 5-ROX (カルボキシ-X-ローダミン); 5-TAMRA (5-カルボキシテトラメチルローダミン); 6-カルボキシローダミン6G; 6-CR 6G; 6-JOE; 7-アミノ-4-メチルクマリン; 7-アミノアクチノマイシンD (7-AAD); 7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン; 9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン; ABQ; 酸性フクシン(Acid Fuchsin); ACMA (9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン); アクリジンオレンジ(Acridine Orange); アクリジンレッド(Acridine Red); アクリジンイエロー(Acridine Yellow); アクリフラビン(Acriflavin); アクリフラビフェルゲン(Acriflavin Feulgen) SITSa; アレキサフルオル(Alexa Fluor) 350(商標); アレキサフルオル430(商標); アレキサフルオル488(商標); アレキサフルオル532(商標); アレキサフルオル546(商標); アレキサフルオル568(商標); アレキサフルオル594(商標); アレキサフルオル633(商標); アレキサフルオル647(商標); アレキサフルオル660(商標); アレキサフルオル680(商標); アリザリンコンプレキソン(Alizarin Complexon); アリザリンレッド(Alizarin Red); アロフィコシアニン(Allophycocyanin) (APC); AMC; AMCA-S; AMCA (アミノメチルクマリン(Aminomethylcoumarin)); AMCA-X; アミノアクチノマイシン(Aminoactinomycin) D; アミノクマリン(Aminocoumarin); アミノメチルクマリン(Aminomethylcoumarin) (AMCA); アニリンブルー(Anilin Blue); ステアリン酸アントロシル; APC (アロフィコシアニン(Allophycocyanin)); APC-Cy7; APTS; アストラゾンブリリアントレッド(Astrazon Brilliant Red) 4G; アストラゾンオレンジ(Astrazon Orange) R; アストラゾンレッド(Astrazon Red) 6B; アストラゾンイエロー(Astrazon Yellow) 7GLL; アタブリン(Atabrine); ATTO-TAG(商標) CBQCA; ATTO-TAG(商標) FQ; オーラミン(Auramine); オーロホスフィン(Aurophosphine) G; オーロホスフィン; BAO 9 (ビスアミノフェニルオキサジアゾール(Bisaminophenyloxadiazole)); 硫酸ベルベリン(Berberine Sulphate); ラクタマーゼ(Beta Lactamase); BFP青色偏移GFP (BFP blue shifted GFP) (Y66H); 青色蛍光たんぱく質(Blue Fluorescent Protein); BFP/GFP FRET; ビマン(Bimane); ビスベンズアミド(Bisbenzamide); ビスベンズイミド(Bisbenzimidazole) (ヘキスト(Hoechst)); ブランコファー(Blancophor) FFG; ブランコファーSV; BOBO(商標)-1; BOBO(商標)-3; ボディピ(Bodipy) 492/515; ボディピ493/503; ボディピ500/510; ボディピ505/515; ボディピ530/550; ボディピ542/563; ボディピ558/568; ボディピ564/570; ボディピ576/589; ボディピ581/591; ボディピ630/650-X; ボディピ650/665-X; ボディピ665/676; ボディピFL; ボディピFL ATP; ボディピF1-セラミド(Ceramide); ボディピR6G SE; ボディピTMR; ボディピTMR-X結合体; ボディピTMR-X, SE; ボディピTR; ボディピTR ATP; ボディピTR-X SE; BO-PRO(商標)-1; BO-PRO(商標)-3; ブリリアントスルホフラビン(Brilliant Sulphoflavin) FF; カルセイン(Calcein); カルセインブルー(Calcein Blue); カルシウムクリムソン(Calcium Crimson) (商標); カルシウムグリーン(Calcium Green); カルシウムオレンジ(Calcium Orange); カルコフルオアホワイト(Calcofluor White); カルボキシ-X-ローダミン(5-ROX); カスケードブルー(Cascade Blue) (商標); カスケードイエ

10

20

30

40

50

ロー (Cascade Yellow); カテコールアミン (Catecholamine); CCF2 (GeneBlazer); CFDA; CFP-シアン蛍光たんぱく質 (Cyan Fluorescent Protein); CFP/YFP FRET; クロロフィル (Chlorophyll); クロモマイシン (Chromomycin) A; CL-NERF (レシオ色素、pH) (Ratio Dye, pH); CMFDA; セレンテラジン (Coelenterazine) f; セレンテラジン fcp; セレンテラジン h; セレンテラジン hcp; セレンテラジン ip; セレンテラジン n; セレンテラジン 0; クマリンファロイジン (Coumarin Phalloidin); C-フィコシアニン (phycocyanine); CPMメチルクマリン; CTC; CTCホルマザン (Formazan); Cy2 (商標); Cy3.1 8; Cy3.5 (商標); Cy3 (商標); Cy5.1 8; Cy5.5 (商標); Cy5 (商標); Cy7 (商標); シアン (Cyan) GFP; 環状AMPフルオロセンサー (cyclic AMP Fluorosensor) (FiCRhR); ダブシル (Dabcyl); ダンシル (Dansyl); ダンシルアミン (Dansyl Amine); ダンシルカダベリン (Dansyl Cadaverine); ダンシルクロリド (Dansyl Chloride); ダンシル (Dansyl) DHPE; ダンシルフルオリド (Dansyl fluoride); DAPI; ダポキシル (Dapoxyl); ダポキシル2; ダポキシル3; DCFDA; DCFH (ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート (Dichlorodihydrofluorescein Diacetate)); DDAO; DHR (ジヒドロローダミン (Dihydrohodamine) 123); Di-4-ANEPPS; Di-8-ANEPPS (ノンレシオ) (non-ratio); DiA (4-Di-16-ASP); ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート (Dichlorodihydrofluorescein Diacetate) (DCFH); DiD-脂溶性トレーサー (Lipophilic Tracer); DiD (DiIC18(5)); DIDS; ジヒドロローダミン (Dihydrohodamine) 123 (DHR); DiI (DiIC18(3)); ジニトロフェノール (Dinitrophenol); DiO (DiOC18(3)); DiR; DiR (DiIC18(7)); DNP; ドーパミン (Dopamine); DsRed; DTAF; DY-630-NHS; DY-635-NHS; EBFP; ECFP; EGFP; ELF 97; エオシン (Eosin); エリスロシン (Erythrosin); エリスロシン ITC; エチジウムブロミド (Ethidium Bromide); エチジウムホモダイマー (Ethidium homodimer)-1 (EthD-1); オイクリシン (Euchrysin); ユーコライト (EukoLight); 塩化ユウロピウム (III) (Europium (III) chloride); EYFP; ファストブルー (Fast Blue); FDA; フォイルゲン (Feulgen) (パラローザニリン (Pararosaniline)); FITC; フラゾオレンジ (Flazo Orange); フルオ (Fluo)-3; フルオ-4; フルオレセイン (Fluorescein) (FITC); フルオレセインジアセテート (Fluorescein Diacetate); フルオロ-エメラルド (Fluoro-Emerald); フルオロ-ゴールド (Fluoro-Gold) (ヒドロキシスチルブアミジン (Hydroxystilbamidine)); フルオル・ルビー (Fluor-Ruby); フルオルX (FluorX); FM 1-43 (商標); FM 4-46; フラレット (Fura Red) (商標); フラレット (商標)/フルオ-3; フラ-2 (Fura-2); フラ-2/BCECF; ゲナクリルブリリアントレッド (Genacryl Brilliant Red) B; ゲナクリルブリリアントイエロー (Genacryl Brilliant Yellow) 10GF; ゲナクリルピンク (Genacryl Pink) 3G; ゲナクリルイエロー (Genacryl Yellow) 5GF; GeneBlazer (CCF2); 蛍光たんぱく質 (例えば、GFP (S65T)); 赤色偏移GFP (GFP red shifted) (rsGFP); GFP野生型 (GFP wild type)、非UV励起 (non-UV excitation) (wtGFP); GFP野生型、UV励起 (UV excitation) (wtGFP); およびGFPuv); グロキサ酸 (Gloxalic Acid); グラニューブルー (Granular Blue); ヘマトポルフィリン (Haematoporphyrin); ヘキスト33258; ヘキスト33342; ヘキスト34580; HPTS; ヒドロキシクマリン (Hydroxycoumarin); ヒドロキシスチルブアミジン (Hydroxystilbamidine) (フルオロゴールド (FluoroGold)); ヒドロキシトリプタミン (Hydroxytryptamine); インド (Indo)-1; インドジカルボシアニン (Indodicarbocyanine) (DiD); インドトリカルボシアニン (Indotricarbocyanine) (DiR); イントラホワイト (Intrawhite) Cf; JC-1; JO-JO-1; JO-PRO-1; ラウロダン (Laurodan); LDS 751 (DNA); LDS 751 (RNA); リューコファー (Leucophor) PAF; リューコファー-SF; リューコファー-WS; リサミンローダミン (Lissamine Rhodamine); リサミンローダミンB; カルセイン (Calcein)/エチジウムホモダイマー (Ethidium homodimer); LOLO-1; LO-PRO-1; ルシファーイエロー (Lucifer Yellow); ルミノール (luminal)、ライソトラッカーブルー (Lyso Tracker Blue); ライソトラッカーブルー・ホワイト (Lyso Tracker Blue-White); ライソトラッカーグリーン (Lyso Tracker Green); ライソトラッカーレッド (Lyso Tracker Red); ライソトラッカーイエロー (Lyso Tracker Yellow); ライソセンサーブルー (LysoSensor Blue); ライソセンサーグリーン (LysoSensor Green); ライソセンサーイエロー/ブルー (LysoSensor Yellow/Blue); Magグリーン (Mag Green); マグダラレッド (Magdala Red) (フロキシシン (Phloxin) B); Mag-フラ

レッド(Mag-Fura Red); Mag-フラ-2 (Mag-Fura-2); Mag-フラ-5 (Mag-Fura-5); Mag-インド-1 (Mag-Indo-1); マグネシウムグリーン(Magnesium Green); マグネシウムオレンジ(Magnesium Orange); マラカイトグリーン(Malachite Green); マリーナブルー(Marina Blue); マキシロンブリリアントフラビン(Maxilon Brilliant Flavin) 10 GFF; マキシロンブリリアントフラビン8 GFF; メロシアニン(Merocyanin); メトキシクマリン(Methoxycoumarin); ミトトラッカーグリーン(Mitotracker Green) FM; ミトトラッカーオレンジ(Mitotracker Orange); ミトトラッカーレッド(Mitotracker Red); ミトラマイシン(Mitramycin); モノプロモビマン(Monobromobimane); モノプロモビマン(mBBr-GSH); モノクロロビマン(Monochlorobimane); MPS (ルグリーンピロニンスチルベン(Methyl Green Pyronine Stilbene)); NBD; NBDアミン(Amine); ナイルレッド(Nile Red); NED(商標); ニトロベンゾキシアジドール(Nitrobenzoxadidole); ノルアドレナリン(Noradrenaline); スクレアファストレッド(Nuclear Fast Red); スクレアイエロー(Nuclear Yellow); ニロサンブリリアントフラビン(Nylosan Brilliant Flavin) E8G; オレゴングリーン(Oregon Green); オレゴングリーン488-X; Oregon Green(商標); オレゴングリーン(商標) 488; オレゴングリーン(商標) 500; オレゴングリーン(商標) 514; パシフィックブルー(Pacific Blue); パラローザニン(Pararosaniline) (フォイルゲン(Feulgen)); PBF1; PE-Cy5; PE-Cy7; PerCP; PerCP-Cy5.5; PE-テキサスレッド(PE-TexasRed) [レッド613]; フロキシシン(Phloxin) B (マグダラレッド(Magdala Red)); ホルワイト(Phorwite) AR; ホルワイトBK L; ホルワイトRev; ホルワイトRPA; ホスフィン(Phosphine) 3R; フィコエリスリン(Phycocerythrin) B [PE]; フィコエリスリン(Phycocerythrin) R [PE]; PKH26 (Sigma); PKH67; PMIA; ポントクロームブルーブラック(Pontochrome Blue Black); POPO-1; POPO-3; PO-PRO-1; PO-PRO-3; プリムリン(Primuline); プロシオンイエロー(Procion Yellow); ヨウ化プロピジウム(Propidium Iodid) (PI); PyMPO; ピレン(Pyrene); ピロニン(Pyronine); ピロニンB; ピロザールブリリアントフラビン(Pyrozal Brilliant Flavin) 7GF; QSY 7; キナクリンマスタード(Quinacrine Mustard); レッド613 [PE-テキサスレッド]; レゾルフィン(Resorufin); RH 414; Rhod-2; ローダミン(Rhodamine); ローダミン110; ローダミン123; ローダミン5 GLD; ローダミン6G; ローダミンB; ローダミンB 200; ローダミンB エキストラ; ローダミンBB; ローダミンBG; ローダミングリーン; ローダミンファリジジン(Rhodamine Phalloidicidine); ローダミンファロイジン(Rhodamine Phalloididine); ローダミンRed; ローダミンWT; ローズベンガル(Rose Bengal); R-フィコシアニン(phycoerythrin); R-フィコエリスリン(phycoerythrin) (PE); RsGFP; S65A; S65C; S65L; S65T; サファイア(Sapphire) GFP; SBF1; セロトニン(Serotonin); セブロンブリリアントレッド(Sevron Brilliant Red) 2B; セブロンブリリアントレッド4G; セブロンブリリアントレッドB; セブロンオレンジ(Sevron Orange); セブロンイエロー(Sevron Yellow) L; sgBFP(商標); sgBFP(商標) (スーパーグロウ(super glow) BFP); sgGFP(商標); sgGFP(商標) (スーパーグロウGFP); SITS; SITS (プリムリン(Primuline)); SITS (スチルベンイソチオスルホン酸(Stilbene Isothiosulphonic Acid)); SNAFLカルセイン; SNAFL-1; SNAFL-2; SNARFカルセイン; SNARF1; ナトリウムグリーン(Sodium Green); スペクトラムアクア(SpectrumAqua); スペクトラムグリーン(SpectrumGreen); スペクトラムオレンジ(SpectrumOrange); スペクトラムレッド(SpectrumRed); SPQ (6-メトキシ-N-(3-スルホプロピル)キノリニウム); スチルベン(Stilbene); スルホローダミン(Sulphorhodamine) B can C; スルホローダミン(Sulphorhodamine) G エキストラ; SYTO 11; SYTO 12; SYTO 13; SYTO 14; SYTO 15; SYTO 16; SYTO 17; SYTO 18; SYTO 20; SYTO 21; SYTO 22; SYTO 23; SYTO 24; SYTO 25; SYTO 40; SYTO 41; SYTO 42; SYTO 43; SYTO 44; SYTO 45; SYTO 59; SYTO 60; SYTO 61; SYTO 62; SYTO 63; SYTO 64; SYTO 80; SYTO 81; SYTO 82; SYTO 83; SYTO 84; SYTO 85; SYTOXブルー(Blue); SYTOXグリーン(Green); SYTOXオレンジ(Orange); TET(商標); テトラシクリン(Tetracycline); テトラメチルローダミン(Tetramethylrhodamine) (TRITC); テキサスレッド(Texas Red) (商標); テキサスレッド-X (Texas Red-X) (商標) 結合体; チアジカルボシアニン(Thiadicyanocyanine) (DiSC3); チアジンレッド(Thiazine Red) R; チアゾールオレンジ

10

20

30

40

50

(Thiazole Orange); チオフラビン(Thioflavin) 5; チオフラビンS; チオフラビンTCN; チオライト(Thiolite); チオゾールオレンジ(Thiozole Orange); チノポール(Tinopol) C BS (カルコフロールホワイト(Calcofluor White)); TMR; TO-PRO-1; TO-PRO-3; TO-PRO-5; TOTO-1; TOTO-3; トリコロール(TriColor) (PE-Cy5); TRITC テトラメチルローダミンイソチオシアネート(TetramethylRodamineIsoThioCyanate); トゥルーブルー(True Blue); トゥルーレッド(TruRed); ウルトラライト(Ultralite); ウラニン(Uranine) B; ウビテックス(Uvitex) SFC; VIC(登録商標); wt GFP; WW 781 ; X-ローダミン; XRITC; キシレンオレンジ(Xylene Orange); Y66F; Y66H; Y66W; イエロー(Yellow) GFP; YFP; YO-PRO-1; YO-PRO-3; YOYO-1; YOYO-3; およびそれらの塩。フルオロフォアは蛍光タンパク質を含むことができる。

10

【0153】

標識は、別の反応分子への結合を促進するように改変されているフルオロフォアの誘導体を含むことができる。したがって、標識は、イソチオシアネート誘導体のようなアミン反応性誘導体および/または標識のスクシンイミジルエステル誘導体を含むことができる。

【0154】

標識は、融合タンパク質の一部としてプローブに組み入れられる蛍光タンパク質を含むことができる。蛍光タンパク質は、緑色蛍光タンパク質(例えば、GFP、eGFP、AcGFP3、TurboGFP、エメラルド(Emerald)、アザミグリーン(Azami Green)およびZsGreen)、青色蛍光タンパク質(例えば、EBFP、サファイア(Sapphire)およびT-サファイア(T-Sapphire))、シアン蛍光タンパク質(例えば、ECFP、mCFP、セルリアン(Cerulean)、CyPet、AmCyan1およびミドリイシシアン(Midoriishi Cyan))、黄色蛍光タンパク質(例えば、EYFP、トパーズ(Topaz)、ビーナス(Venus)、mCitrine、YPet、PhiYFP、ZsYellow1およびmBanana)ならびに橙色および赤色蛍光タンパク質(例えば、クサビラオレンジ(Kusabira Orange)、mOrange、dTomato、dTomato-Tandem、DsRed、DsRed2、DsRed-Express (T1)、DsRed-Monomer、mTangerine、mStrawberry、AsRed2、mRFP1、JRed、mCherry、HcRed1、mRaspberry、HcRed-Tandem、mPlumおよびAQ143)を含むことができる。他の蛍光タンパク質は当技術分野において記述されている(Tsien, R. Y., Annual. Rev. Biochem. 67:509-544 (1998); および Lippincott-Schwartz et al., Science 300:87-91 (2003))。

20

【0155】

上記のように、プローブは、プローブのN末端またはC末端にカップリングされた蛍光タンパク質を同様に含んだ融合タンパク質の中にも含まれてもよい。蛍光タンパク質は当技術分野において記述のペプチドリンカーを介してカップリングされてもよい(米国特許第6,448,087号; Wurth et al., J. Mol. Biol. 319:1279-1290 (2002); およびKim et al., J. Biol. Chem. 280:35059-35076 (2005)、これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられる)。いくつかの態様において、適当なリンカーは長さが約8~12アミノ酸であってよい。さらなる態様において、リンカーのアミノ酸残基の約75%を超えるものがセリン、グリシンおよびアラニン残基から選択される。

30

【0156】

インビボ撮像法を含む態様において、インビボ撮像法に有用な標識を使用することができる。例えば、フッ素-18のような、磁気共鳴撮像法に有用な標識を化学発光標識のように、使用することができる。別の態様において、標識は放射性標識で標識される。例えば、標識はこのために一般に用いられる機械によって検出されるのに十分なエネルギーの陽電子放出をもたらすことができる。そのような実体の一例には、酸素-15(陽電子放出により壊変する酸素の同位体)または他の放射性核種が含まれる。別の例は炭素-11である。そのような標識で標識されたプローブを患者に投与し、標的タンパク質の位置に局在化させることができ、患者を撮像して(走査して)局在化したプローブを検出し、このようにして、局在化した標的タンパク質の部位を特定することができる。標識プローブは直接注射、鼻腔内にまたは経口によるような、標的タンパク質の部位での局在化を可能にする任意の適当な手段により投与することができる。いくつかの態様において、放射性標識プロ

40

50

ープを患者に注射し、標的タンパク質とのプローブの結合を外部からモニターしてもよい。

【0157】

標識はオリゴヌクレオチドを含むことができる。例えば、当技術分野において公知の方法(例えば、PCR、TMA、b-DNA、NASBAなどのような増幅アッセイ法)により検出できるオリゴヌクレオチドタグにペプチドプローブをカップリングさせることができる。

【0158】

6. 固定化プローブおよびその使用

いくつかの態様において、ペプチドプローブは固体支持体に固定化される。これは、固体支持体へのプローブの固定化を可能とするのに十分な量の時間にわたって固体支持体にプローブを曝露する段階を含む方法のような、当技術分野において公知の方法により達成することができる。この方法はさらに、未結合のプローブを除去する段階、プローブを固体支持体に(例えば、化学的におよび/またはUV照射への曝露により)架橋する段階、ならびに固体支持体およびプローブを乾燥する段階を含むことができる。ペプチドを固体支持体に固定化する方法は、当技術分野において公知である。一つの態様において、全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第2006-0057671号に記述されているように、プローブは特定の立体構造(例えば、主に α -ヘリックス/ランダム(radon)コイルまたは主に β -シート)などの、特定の構造状態で固定化される。

【0159】

固体支持体に固定化されたプローブは、試料中の標的タンパク質の存在を迅速にかつ効率的に検出するために使用することができる。固定化されたプローブは同様に、試料中に存在する標的タンパク質の一部、本質的には全て、または全てを結合させるのに有用であり、その後、標的タンパク質を試料の残りの部分から分離して、例えば、標的タンパク質の含有量が減っているか、標的タンパク質を本質的に含んでいないか、または標的タンパク質を全く含んでいない精製試料を供与することができる。このように例えば、標的タンパク質の含有量が減っている生物学的な、医学的なまたは消費可能な組成物を調製することができる。

【0160】

固体支持体は、ペプチドを結合させるのに適したおよび生物学的材料とともに用いるのに適した任意の公知の固形物質であってよい。そのような多くの固体支持体が当業者に公知である。固体支持体として有用な材料の例としては、以下に限定されるものではないが、ポリスチレンを含むプラスチック、ガラス、多糖類、金属、ならびにラテックス、アクリル樹脂およびナイロンを含む種々のポリマーが挙げられる。固体支持体の形態の例としては、以下に限定されるものではないが、プレート、ビーズおよび膜が挙げられる。

【0161】

一般に、固定化プローブを用いて標的タンパク質を検出する方法は、固定化プローブを提供する段階、標的タンパク質を含有するまたは含有するのではないかと疑われる試料を提供する段階、固定化プローブが試料中の標的タンパク質に(存在するなら)結合するのに十分な量の時間および条件の下で試料を固定化プローブに曝露する段階、ならびに固定化プローブに結合した標的タンパク質の存在を検出する段階を含む。検出は、先に記述および詳述したように、任意の公知の技術によってもよい。いくつかの態様において、検出は蛍光または発光によるような、標識からの光の放出をアッセイする段階を含む。他の態様において、検出は、PAGEおよびゲル中に存在するタンパク質の染色によるものである。他の態様において、検出は、関心対象の標的タンパク質に特異的な抗体との反応によるものである。検出技術の他の非限定的な例は、標識に関連して上記に示されている。

【0162】

当業者は日常的な検討事項によって反応条件を選択することができる。適当な条件には水性の環境、中性のpH(例えば、約6.0~約8.0のpH)、中程度の塩(例えば、約100 mM~約400 mMの塩)、および有るか無しかの、界面活性剤、乳化剤またはタンパク質-タンパク質相互作用を阻害しうる他の補助的物質が含まれる。使用される固定化プローブおよび試料

10

20

30

40

50

の量は、得られる試料の量、試料中に存在するのではないかと疑われる標的タンパク質の量、使用者が試料を固定化プローブに曝露することを望む時間の量、および他の検討事項に応じて変わるであろう。

【0163】

一般に、試料の標的タンパク質の含有量を減らす方法は、固定化プローブを提供する段階、標的タンパク質を含有するまたは含有するのではないかと疑われる試料を提供する段階、固定化プローブが試料中の標的タンパク質の少なくとも一部に(存在するなら)結合するのに十分な量の時間および条件の下で試料を固定化プローブに曝露する段階、ならびに固定化プローブおよび固定化プローブ-標的タンパク質複合体を試料から分離する段階を含む。いくつかの態様において、この方法は試料中の標的タンパク質の量を、検出可能である量だけ減らす。他の態様において、この方法は試料中の標的タンパク質の量を、検出限界未満の量に減らす。他の態様において、この方法は試料から標的タンパク質を完全に排除する。

10

【0164】

試料の標的タンパク質の含有量を減らす方法は、標的タンパク質を検出するための上記の方法に類似の条件の下で達成することができる。固定化プローブおよび固定化プローブ-標的タンパク質複合体を試料から分離する段階は試料の注ぎ出しによる、試料からの固定化プローブおよび複合体の物理的除去によるなどのような、任意の適当な技術によるものであってよい。当業者はビーズ、膜および他の固体支持体を水溶液から除去する多くの方法を承知しており、そのような方法のいずれかを、固定化プローブおよび固定化された複合体を試料から分離するために用いることができる。いくつかの態様において、固定化プローブは、血液または血液製剤、例えば血漿のような、試料に対して透過性のある膜に結合したプローブである。これらの態様において、プローブを結合させた膜を通し試料をろ過して、標的タンパク質の一部または全部を試料から、例えば、血液または血液製剤から除去する。試料の残りを膜に通すことで、プローブを結合させた膜および試料の分離が起こる。試料をろ過した後に、プローブを結合させた膜を、標的タンパク質の存在についてアッセイすることができる。

20

【0165】

上記の開示から明らかであるように、本方法は同様に、固定化プローブに結合した標的タンパク質の存在を検出する段階を含む。検出は、先に記述および詳述したように、任意の公知の技術によってもよい。同様に、種々のさらなる段階は、これらの段階が、試料中に存在するプリオンタンパク質の一部または全部を本方法によって除去不能としない限り、本方法に含まれてもよい。

30

【0166】

D. タンパク質およびタンパク質構造の検出

上記のように、本発明の一つの局面では、試料においてまたはインビボにおいてタンパク質を検出するための、および特定の構造状態(例えば、標的の構造状態)のタンパク質を検出するためのプローブを提供する。例えば、ペプチドプローブが α -ヘリックスもしくはランダムコイル立体構造(または溶解状態)である場合には蛍光を発生し、ペプチドプローブが β -ヘリックス立体構造(または不溶性の凝集状態)にある場合には蛍光を発生しないように、ペプチドプローブを標識することができる。同様に、ペプチドプローブが α -ヘリックスもしくはランダムコイル立体構造(または溶解状態)である場合にはエキシマーを形成しないが、しかしペプチドプローブが β -ヘリックス立体構造(または不溶性の凝集状態)にある場合にはエキシマーを形成するように、ペプチドプローブを標識することができる。例示的な標識としてはフルオロフォアまたは蛍光タンパク質、例えばビレン、トリプトファン、フルオレセイン、ローダミン、GFP、および本明細書において記述のその他多くのものが挙げられる。

40

【0167】

伝統的に、タンパク質構造は、当技術分野において記述されている種々の実験的または計算的方法により測定されてきた。例えば、米国特許第2006-0057671号；米国特許第6,44

50

8,087号; Waldo et al., Nat. Biotech. 17:691-695 (1999); Wurth et al., J. Mol. Biol. 319:1279-1290 (2002); Kim et al., J. Biol. Chem. 280:35069-35076 (2005)を参照されたく、これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。例えば、タンパク質構造は、少なくとも低分解能の構造を作出できる任意の方法によって実験的に評価することができる。そのような方法は、現在、X線結晶構造解析および核磁気共鳴(NMR)分光法を含む。X線結晶構造解析はタンパク質構造の評価のための一つの方法であり、結晶中の原子核を取り囲む電子雲による特徴的波長のX線照射の回折に基づく。X線結晶構造解析では、特定の生体分子を構成する原子の原子分解をほとんど測定するために、精製された生体分子(しかし、これらは溶媒成分、補因子、基質または他のリガンドを含む)の結晶を用いる。結晶成長のための技術は当技術分野において公知であり、典型的には生体分子ごと異なる。自動化された結晶成長技術も公知である。

10

【0168】

核磁気共鳴(NMR)は、現在、生体分子の溶液立体構造(結晶構造ではなく)の測定を可能にしている。典型的には、小分子、例えばアミノ酸約100~150個未満のタンパク質しかこの技術に適していない。しかしながら、最近の進歩は、同位体標識のような技術を用いて、大きなタンパク質の溶液構造の実験的解明へと導いた。X線結晶構造解析に比したNMR分光法の利点は、構造が結晶格子中ではなく、格子近傍での相互作用がタンパク質の構造を変化させる可能性のある溶液中で測定されることである。NMR分光法の欠点は、NMR構造が結晶構造ほど詳細または正確ではないことである。一般的に、NMR分光法により測定された生体分子構造は、結晶構造解析により測定されたものに比べて中程度の分解能のものである。

20

【0169】

本発明との関連で、ペプチドプローブの未変性の(native)または(例えば、標的タンパク質との接触後に)変性した立体構造は、CD分光法、フーリエ変換赤外分光法、紫外分光法、NMR分光法または蛍光分光法、光散乱、1-アニリノ-8-ナフタレンスルホネート(ANS)またはコンゴレッド染色などの外来性蛍光体を用いた疎水性の検出、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)、立体構造の変化またはモノマーまたはヘテロダイマーにおける境界面での結合のいずれかによる内在性トリプトファン蛍光の消光、平衡超遠心分離法およびサイズ排除クロマトグラフィーのような、一つまたは複数の方法によって測定することができる。例えば、これらの技術の記述については、PHYSICAL BIOCHEMISTRY: APPLICATIONS TO BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2nd ed., W. H. Freeman & Co., New York, N.Y., 1982を参照されたい。

30

【0170】

上記のように、いくつかの態様において、プローブは、光学的手段によって検出可能である標識を含むように改変される。そのような標識は、ペプチドプローブの末端位置にまたはその近くに付着された、トリプトファン(アミノ酸)、ピレンもしくは類似のフルオロフォア、または蛍光タンパク質を含むことができる。フルオロフォアのような標識の付着は、当技術分野において周知である従来の方法により達成される。

【0171】

1. エキシマー

一つの態様において、標識は、エキシマーとして公知の種を生成するような方式で相互作用する能力を有する。エキシマーとは、必ずしも共有結合性ではない、かつ光子によって励起された分子の実体と励起されていない同一の分子の実体との間で形成される付加物である。この付加物は天然では一過性であり、光子の放出によって蛍光を発するまで存在する。エキシマーは、特定波長の光での励起によって、異なる波長で光を放出する二つのフルオロフォアの相互作用を示し、これはどちらかのフルオロフォアが単独で作用することによって放出されるものとは光度も異なる。通常の高発光スペクトルの波長よりも長い波長の新たな蛍光バンドの生成によって、エキシマー(またはエキシマーの形成)を認識することが可能である。エキシマーは、励起スペクトルがモノマーのそれと同一であるので、蛍光共鳴エネルギー転移と区別することができる。

40

50

【0172】

エキシマーの形成は、フルオロフォアの幾何学的配置に依存し、それらの間の距離によって大きく影響される。一つの態様において、フルオロフォアは各プローブ末端に存在し、フルオロフォア間のエキシマーの形成は、全体的なプローブ立体構造が α -ヘリックスまたはランダムコイルである限り無視できる。これは、標的タンパク質の非存在下での分析に用いられる溶媒中でのプローブの蛍光的挙動の測定によって容易に判定される。いくつかの態様において、標的タンパク質とのプローブの相互作用は、エキシマーの形成が起こるような、プローブの構造的変化(立体構造の変化のような)を引き起こす。これは本明細書において記述する手順によって容易に測定される。例えば、被分析物の非存在下で示される構造(α -ヘリックスまたはランダムコイル)から β -シート構造へのプローブ構造の変換によって、プローブに付着されたフルオロフォアは、容易に特定できるエキシマーを形成することが可能になりうる。さらに、エキシマーの形成の度合いは、存在するタンパク質被分析物の量に直接関連する。

10

【0173】

したがって、本発明の一つの局面によれば、標識プローブは、プローブが標的の構造状態の標的タンパク質と相互作用する場合に生じうるような、標的の構造状態などの、特定の構造状態をとる場合にエキシマーを形成する。エキシマーの形成は光学的特性の変化によって検出することができる。そのような変化はプローブに付着したフルオロフォアに応じて、数多く他にある中でも、UV、IR、CD、NMRまたは蛍光を含む公知の蛍光分析技術により測定することができる。光学的特性のこれらの変化の度合いは、この変化に伴う構造状態をとったプローブの量に直接関連し、そうするとこれは、存在する標的タンパク質の量に直接関連している。

20

【0174】

2. 円偏光二色性

「円偏光二色性」(「CD」)は、CD分光偏光計により測定した場合、光学的に活性な物質がLおよびR円偏光をわずかに異なるように吸収する際に観察される。差異は非常に小さく、楕円率の程度の分数に相当する。ペプチドおよびタンパク質に存在する、異なる型の二次構造に対するCDスペクトルは異なる。複合体化タンパク質 対 非複合体化タンパク質のCD曲線の測定および比較は、本明細書において開示する方法のための正確な測定手段になる。

30

【0175】

3. GFP系

一つの態様において、プローブまたは試験タンパク質の特定の構造状態を測定するために、GFP融合タンパク質系が用いられる。試験タンパク質の溶解度を測定するために、試験タンパク質および緑色蛍光タンパク質(GFP)を含む融合タンパク質が記述されている。例えば、Waldo et al., Nat. Biotech. 17:691-695 (1999); 米国特許第6,448,087号, Wirth et al., J. Mol. Biol. 319:1279-1290 (2002); Kim et al., J. Biol. Chem. 280:35059-35076 (2005)を参照されたく、これらの各々はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。GFPのその天然の蛍光構造への折り畳みはゆっくり起こると考えられるので(Cubitt et al., Trends Biochem. Sci. 20:448-455 (1995))、GFP融合タンパク質の蛍光は試験タンパク質の溶解度に依存しうる。試験タンパク質が不溶性である場合には、融合タンパク質のGFP部分は試験タンパク質とともに溶液の中から引き出され、それにより、その蛍光構造に折り畳むことを妨げられうる。

40

【0176】

本発明との関連で、GFP融合タンパク質は、特定の構造状態のプローブまたは試験タンパク質を特定するのに有用であり、特定の構造状態の試験タンパク質に特異的なプローブを特定するのに有用であり、および標的タンパク質の構造状態に影響を及ぼす作用物質を特定するのに有用である。例えば、GFPとプローブとの間の融合またはGFPと試験タンパク質との間の融合の蛍光は、自己凝集体を形成する傾向が低い可溶性のプローブまたは試験タンパク質を示している。対照的に、蛍光の欠如は不溶性または自己凝集性のプローブま

50

たは試験タンパク質の存在を示している。

【0177】

このように、本発明の一つの局面では、(a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ、標的タンパク質の完全長の配列を含まない、 α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含んだペプチドプローブのような、標的タンパク質に対するペプチドプローブ; および(b) 蛍光タンパク質(例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP))を含む、融合タンパク質を提供する。任意で、融合タンパク質はさらに、ペプチドプローブおよび蛍光ポリペプチドを連結するポリペプチドリンカーを含んでもよい。本発明のこの局面との関連で、「GFP」とは、完全長GFPタンパク質に対し少なくとも約60%の配列同一性を有する完全長GFPタンパク質の誘導体または断片のような、完全長GFPタンパク質の等価な折り畳みおよび蛍光特性を示すタンパク質を含む。

10

【0178】

適当な標的タンパク質は膵島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質、アミロイドタンパク質またはA β ペプチド、血清アミロイドA、インスリン、アミリン、非アミロイド成分、プリオン、ヘモグロビン、免疫グロブリンまたはその断片、 α_2 -ミクログロブリン、 α -シヌクレイン、ロドプシン、 α 1-アンチキモトリプシン、シスタリン、タウ、p53、プレセニン、低密度リポタンパク質受容体、アポリポタンパク質、スーパーオキシドジスムターゼ、神経フィラメントタンパク質、トランスサイレチン、プロカルシトニンまたはカルシトニン、心房性ナトリウム利尿因子、ゲルゾリン、嚢胞性線維症膜貫通制御因子、ハンチントン病タンパク質、フィブリノゲン鎖、フェニルアラニン水酸化酵素、コラーゲン、 α -ヘキササミニダーゼ、ならびにシスタチンCタンパク質を含む。

20

【0179】

いくつかの態様において、標的タンパク質はプリオンタンパク質(例えば、PrP^C、PrP^{Sc}またはその混合物)であり、ペプチドプローブはSEQ ID NO:13または関連配列を含むことができる。別の態様において、標的タンパク質は、アミロイドタンパク質(例えば、A β 42、A β 40またはその混合物)であり、ペプチドプローブはSEQ ID NO:32、SEQ ID NO:4または関連配列を含むことができる。さらなる態様において、標的タンパク質は、膵島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質であり、ペプチドプローブはSEQ ID NO:11または関連配列を含むことができる。さらなる態様において、標的タンパク質は、トランスサイレチンタンパク質であり、ペプチドプローブはSEQ ID NO:26または関連配列を含むことができる。さらなる態様において、標的タンパク質はシスタチンCタンパク質であり、ペプチドプローブはSEQ ID NO:17または関連配列を含むことができる。さらなる態様において、標的タンパク質はハンチントン病タンパク質(すなわち、ハンチンチン)であり、ペプチドプローブはSEQ ID NO:19または関連配列を含む。

30

【0180】

上記のように、融合タンパク質は、その溶解度に関連している蛍光シグナルを放出することができる。すなわち、例えば、可溶性の融合タンパク質は強力な蛍光シグナルを示すことができるのに対し、不溶性のタンパク質は蛍光を発しないであろう。いかなる理論によっても束縛されることを欲しないが、少なくともアミロイドタンパク質との関連で、融合タンパク質の蛍光は同様に、ペプチドプローブの立体構造状態と関連付けられるものと考えられる。すなわち、例えば、融合タンパク質は、ペプチドプローブが α -ヘリックス立体構造にある場合に蛍光シグナルを放出することができるのに対し、融合タンパク質は、ペプチドプローブが β -ヘリックス立体構造にある場合には蛍光シグナルを放出することができない。

40

【0181】

いくつかの態様において、ペプチドプローブは、約7のpHを有する1.0% SDSの溶液中に存在する場合に α -ヘリックス立体構造にある。さらなる態様において、ペプチドプローブは、約4.5のpHを有する溶液中に存在する場合に β -ヘリックス立体構造にある。任意で、融合タンパク質は固体支持体に固定化されてもよい(例えば、融合タンパク質がアビジ

50

ン部分さらにを含み、ビオチン部分を介して固体支持体にカップリングされる場合)。

【0182】

融合タンパク質は、ペプチドプローブをコードするDNA配列を、GFP発現ベクターにクローニングすることによって調製することができる(例えば、Waldo et al., Nature Biotechnol. 17, 691-695 (1999)を参照のこと)。例えば、ペプチドプローブをコードするDNA配列は、ペプチドプローブをコードする標的配列のPCR増幅により、またあるいは、アニール時に、ペプチドプローブをコードする重複オリゴヌクレオチドを調製することにより得ることができる(例えば、Kim et al., J. Mol. Biol. 319:1279-1290 (2002)を参照のこと)。その後、ペプチドプローブをコードするDNA配列を、制限酵素で処理することができ、GFP発現ベクターにクローニングすることができる。

10

【0183】

4. 表面プラズモン共鳴

生体分子構造は同様に、「表面プラズモン共鳴」または「SPR」を評価することによって試験することができる。SPRの現象は、光学的に透明な材料(例えば、ガラス)と不透明な材料との間の界面から特定の角度で反射された光の強度の低下として観察され、他の要因のなかでも特に、不透明な材料の表面に近い媒体(例えば、試料溶液)の屈折率に依存する(国際公開公報第90/05295号参照)。不透明な材料への材料の吸着または結合によるような、不透明な材料の表面での屈折率の変化は、SPRが起こる角度において、対応するシフトを生じるであろう。SPRに基づくタンパク質結合アッセイ法において、ペプチドプローブを、不透明な支持体の表面に固定化されている標的タンパク質と接触させることができる。その後の標的タンパク質とのペプチドプローブの相互作用を、不透明な支持体および透明な材料の表面の界面間のSPRをモニターすることによって評価することができる。

20

【0184】

E. 標的タンパク質の検出方法

開示する方法のいくつかの態様において、ペプチドプローブは、特定の構造状態で存在する標的タンパク質を含む、試料にまたはインピボに存在する標的タンパク質を検出するよう未知試料もしくは試験試料への添加のためにまたはインピボでの使用のために選択される。検出方法は、米国特許第7,166,471号；米国特許出願第10/728,246号；PCT出願PCT/US2006/005095および/または米国特許出願第11/030,300号に記載の一般方針に沿って行うことができ、これらの全内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

30

【0185】

インピトロでの態様の場合、ペプチドプローブが選択された場合に、これを試験試料に添加する。プリオンタンパク質の検出によるような、いくつかの態様において、プローブの添加の前に、試料を超音波処理のような、当技術分野において一般的に公知の解離技術に供することが好都合でありうる。解離段階は潜在的に凝集した任意の試料材料をバラバラにすることを可能にし、その結果、解離されたこれらの試料材料は、新たに導入されたペプチドプローブと自由に結び付き、それによってプローブと標的タンパク質との間の相互作用、および標的タンパク質の検出が促進される。

【0186】

試験試料または解離された試験試料をペプチドプローブと相互作用させた後に、生じた混合物を次いで、プローブと標的タンパク質との間の相互作用の検出で当技術分野において一般的に公知の分析方法に供する。いくつかの態様において、標的タンパク質を固体支持体に固定化する。ペプチドプローブを標的タンパク質と接触させ、相互作用させる。その後、未結合のペプチドプローブを除去し、結合したペプチドプローブをプローブ上の検出可能な標識からのシグナルの検出によって観察する。例えば、検出可能な標識がフルオロフォアである場合、結合したペプチドプローブに光を当てて、フルオロフォアからの発光を刺激することができる。検出可能な標識が放射性同位体である場合、結合したペプチドプローブをシンチラント(scintillant)と接触させて、シンチラントからの発光を刺激することができる。あるいは、検出は、プローブが結合した任意の標的タンパク質に結合しうる、標的タンパク質に対する抗体のような、抗体を用いて達成することもできる。

40

50

【0187】

いくつかの態様において、ペプチドプローブおよび標的タンパク質を試験作用物質の存在下で接触させて、ペプチドプローブと標的タンパク質との間の相互作用を阻害する試験作用物質の能力を評価することができる。

【0188】

一つの態様において、プローブは、標的タンパク質と接触される前には主としてβ-ヘリックスまたはランダムコイル立体構造を有し、α-シート立体構造の標的タンパク質と接触される場合にα-シート立体構造への転換を起こす。この態様の特定の局面によれば、プローブの立体構造の変化は、立体構造の変化を起こしているプローブと接触したその他のプローブにおいてさらに立体構造の変化を伝播し、それによって検出反応シグナルを増幅する。このように、異常に折り置まれたタンパク質または疾患を引き起こすタンパク質に特有のα-シート立体構造を含有する未知試料または試験試料は、α-シート形成の増大および、多くの場合、試験試料もペプチドプローブもともに含有するテキスト混合物中での不溶性凝集体の形成をもたらす。逆に、主としてβ-シート二次構造がない未知試料または試験試料は、α-シート構造への転移を触媒することも、凝集体の形成を誘導することもないであろう。本発明のこの局面は、標的タンパク質がプリオンタンパク質である場合にとりわけ有利でありうる。

10

【0189】

例えば、TSEを含む試料は、以下のように分析することができる。図2を参照して、概略図の上列は、α-シートを含有するものとして表されているTSEタンパク質の未知試料を図示している。α-シートを超音波処理によって解離させる。標識ペプチドプローブを添加し、試料に結合させる。試料中のα-シート立体構造は、ペプチドプローブがα-シート立体構造をとるように誘導する。ペプチドプローブ間でのα-シートの伝播によって凝集体が形成される。その結果として生じる、主としてβ-シート型への転移および凝集体形成の増幅を、光散乱およびCDのような技術によって検出する。いくつかの態様において、ペプチドプローブを蛍光的に標識し、蛍光検出を用いる。

20

【0190】

一つのさらなる態様において、伝播した立体構造の変化はどれも、疾患の進行状態(または伝染性)を伴う疾患関連タンパク質(プリオンのような)のレベルと直接相関する。

【0191】

プリオンタンパク質に関する態様のような、いくつかの態様において、伝播の結果として感染性産物の増加が認められない形で本開示の方法を用いることが好ましい場合もある。これは、異常型の感染、伝染および伝播という連鎖間のつながりに「途切れ」を入れることによって達成することができる。そのような途切れは、凝集体のダイマー型および多量体型との間の転移段階で行われることができる。多量体型の物理的形成は、その形成につながる段階を単に妨げることによって遮断することができる。これは、関心対象の配列が関連性のないペプチドに付着されているプローブを用いることにより、またはリンカーもしくは「テザー」上のプローブが互いに遭遇し、結果的にシグナルの増幅をもたらす可能性が高いことを了解の上、中性の「ブロッカー」セグメントにより達成することができる。

30

40

【0192】

いくつかの態様において、構造の転換、例えば、凝集をもたらす可能性があるβ-ヘリックス立体構造へのβ-ヘリックス立体構造からの立体構造の転換を促進する条件に試験試料を供する。そのような条件は当技術分野において公知である。例えば、金属リガンドの結合はタンパク質立体構造の変化を導き、凝集に有利に働く可能性があり;異なるペプチド配列の発現または切断は、原線維およびブラーク形成に至る進行した凝集を促進することがあり;遺伝子点突然変異も二つの異なる立体構造に要求される相対的なエネルギーレベルを変えて、構造転移の中間転換をもたらすことがあり;濃度レベルの増大は立体構造の転移に有利に働くのに十分な可能性がある。他の態様において、試験試料を短いペプチド配列の凝集体とともに「まく(seed)」。例えば、合成および/または組換えプリオ

50

ンタンパク質および原線維は、生物学的に誘導されたプリオンタンパク質よりもペプチドプローブとの反応性が低い可能性がある。しかしながら、この反応性の低下は、例えば残基番号106-126を含むプリオンタンパク質(PrP₁₀₆₋₁₂₆)のような、小さなプリオンに由来する配列の凝集体とともに反応混合物をまくことによって克服することができる。初期の引き金機構にかかわらず、最終結果は異常な立体構造の触媒的伝播であり、本来正常なタンパク質の構造変換をもたらさう。

【0193】

インビボでの態様において、標識ペプチドプローブを、例えば局所注入によって、患者に投与し、患者の体内に存在する標的タンパク質または高次標的タンパク質構造の任意の部位に局在化させ、その後患者を走査して、標的タンパク質または高次標的タンパク質構造の部位に局在化する標識プローブの部位を検出することができる。鼻腔内経路および経口経路を含むその他の投与経路も企図される。上記のように、プローブをインビボ撮像法に適した任意の標識により標識することができる。患者を全身走査に供して、標的タンパク質の任意の部位を特定することができる。あるいは、患者の特定領域を走査して、標的タンパク質が特定領域に局在化しているかどうかを判定することもできる。関心対象の特定領域は血管組織、リンパ組織もしくは脳(海馬もしくは前頭葉を含む)、または心臓、腎臓、肝臓もしくは肺のような他の臓器を含むことができる。

10

【0194】

上記のように、いくつかの態様において、ペプチドプローブは特定の構造状態の標的タンパク質に特異的である。例えば、ペプチドプローブは、 α -ヘリックスまたはランダムコイル立体構造の標的タンパク質に選択的に結合し、 β -ヘリックス立体構造の標的タンパク質に対する親和性が低く(またはなく)てもよい。逆に、ペプチドプローブは、 β -ヘリックス立体構造の標的タンパク質に選択的に結合し、 α -ヘリックスまたはランダムコイル立体構造の標的タンパク質に対する親和性が低く(またはなく)てもよい。同様に、ペプチドプローブは、特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合してもよい。例えば、ペプチドプローブは標的タンパク質の可溶性モノマーに、標的タンパク質の可溶性オリゴマーに、不溶性自己凝集体(無定形単位(amorphone)自己凝集体を含む)に、原線維前駆体(protofibril)にまたは原線維に選択的に結合し、異なる状態の標的タンパク質に対する親和性が低く(またはなく)てもよい。そのようなプローブは、ペプチドプローブにより選択的に認識される特定の構造状態の標的タンパク質を特定するのに有用である。

20

30

【0195】

本明細書において用いられる場合、「特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する」ペプチドプローブとは、ペプチドプローブが特定の自己凝集状態の標的タンパク質に用量依存的に結合し、異なる自己凝集状態の標的タンパク質には用量依存的に結合しないことを意味する。例えば、ペプチドプローブは高次の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合してもよく、その結果、ペプチドプローブは、オリゴマーおよび繊維に用量依存的に結合し、モノマーには用量依存的に結合しない。

【0196】

例えば、SEQ ID NO:36またはSEQ ID NO:45のアミノ酸配列からなるまたはその配列を含むペプチドプローブは、A₄₀およびA₄₂オリゴマーと特異的に反応し、A₄₀およびA₄₂モノマーと特異的に反応しない。すなわち、これらのペプチドプローブはA₄₀およびA₄₂の高次構造を特定するのに有用である。

40

【0197】

このように、本発明の一つの局面では、(a) 標的タンパク質の特定の構造型に選択的に結合する、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、試料を接触させる段階、および(b) ペプチドプローブと特定の構造型で存在する任意の標的タンパク質との間の任意の結合を検出する段階を含む、特定の構造型で試料に存在する標的タンパク質を特定するための方法を提供する。

【0198】

上記のように、ペプチドプローブは、標識(例えば、ピレン、トリプトファン、緑色蛍

50

光タンパク質(GFP)のような蛍光ポリペプチド標識、および放射性核種標識)をさらに含むことができ、任意で固体支持体に固定化されてもよい。

【0199】

あるいは、特定の構造型で患者に存在する標的タンパク質を特定するためのインビボの方法は、(a) 標的タンパク質の特定の構造型に選択的に結合する、標的タンパク質に対するペプチドプローブを、患者に投与する段階、および(b) 患者を走査して局在化した任意のペプチドプローブを検出し、それにより患者に存在する特定の構造型の任意の標的タンパク質を検出する段階を含むことができる。上記のように、ペプチドプローブをインビボ撮像法による検出に適した任意の標識で標識してもよく、このプローブを任意の適当な投与経路により投与することができる。上記のように、患者を全身走査に供してもよく、あるいは血管組織、リンパ組織もしくは脳(海馬もしくは前頭葉を含む)、または心臓、腎臓、肝臓もしくは肺のような他の臓器などの、特定領域を走査し、または撮像してもよい。

10

【0200】

標的タンパク質の構造型は α -ヘリックス立体構造または β -ヘリックス立体構造を含むことができる。いくつかの態様において、標的タンパク質の構造型はタンパク質のモノマーである。他の態様において、標的タンパク質の構造型はタンパク質の可溶性オリゴマーである。構造型は同様に、タンパク質の不溶性自己凝集体(例えば、不溶性の無定形自己凝集体、原線維前駆体および原線維)を含むことができる。

【0201】

例えば、ADとの関連で、試料中に存在する可溶性A β タンパク質、ADDL、A β タンパク質の不溶性凝集体、原線維前駆体および原線維を特定するためにペプチドプローブを用いることができる。A β タンパク質の特定の構造型を特定する能力によって、かなりの臨床的利点が得られる。例えば、A β 42タンパク質および高次A β 構造(例えば、ADDL、原線維前駆体および原線維)の存在および負荷量を、ADの危険性がある患者もしくはADに苦しんでいる患者、および/または疾患が進行した程度を特定するために用いることができる。その同じ情報を同様に、治療計画の必要性または現在用いられているよりも多かれ少なかれ積極的な治療計画の必要性を判定するために、および所与の治療計画の有効性をモニターするために用いることができる。

20

【0202】

一つの態様において、患者の体内でのA β 42タンパク質または高次A β 構造の位置を測定するためにペプチドプローブを用いる。例えば、脳の特定のセグメント由来の生物学的試料を採取し、A β 42タンパク質または高次A β 構造の存在について分析してもよい。あるいは、標識プローブを、例えば局所注入によって、患者に投与し、患者の体内に存在するA β 42タンパク質または高次A β 構造の任意の部位に局在化させてもよく、その後患者を走査して、A β 42タンパク質または高次A β 構造の部位に局在化する標識プローブの部位を検出してもよい。関心対象の特定部位は脳の海馬または前頭葉を含むことができる。関心対象の他の部位は血管組織、リンパ組織、および心臓、腎臓、肝臓または肺のような他の臓器を含むことができる。

30

【0203】

本発明の別の局面では、試料中のA β 42および/またはA β 40の量、ならびに試料中のA β 42のA β 40に対する比を測定するための方法を提供する。上記のように、患者血漿またはCSF中を循環しているA β 42の量(または「負荷量」)は、ADおよびLLMDのような疾患と相関性がある。同様に、A β 42のA β 40に対する高い比は疾患状態を示している。本発明は、A β 42またはA β 40のいずれかに選択的に結合するペプチドプローブを用いてこれらの値を測定する方法を提供し、したがって試料中に存在するA β 42またはA β 40の量を定量化するために使用することができる。試料を各種のプローブで(同時にまたは連続的に)試験することにより、絶対および相対負荷量を測定することができる。その情報を、例えば、ADの危険性がある患者もしくはADに苦しんでいる患者、および/または疾患が進行した程度を特定するために用いることができる。その同じ情報を同様に、治療計画の必要性または現

40

50

在用いられているよりも多かれ少なかれ積極的な治療計画の必要性を判定するために、および所与の治療計画の有効性をモニターするために用いることができる。同様の情報を上記に沿って、インビボの方法により得ることができる。

【0204】

同様に、プリオンタンパク質との関連で、試料中にまたはインビボに存在するPrP^{Sc}の可溶性モノマー、PrP^{Sc}の可溶性凝集体、PrP^{Sc}の不溶性凝集体、原線維前駆体および/または原線維を特定するためにペプチドプローブを用いることができる。PrP^{Sc}の特定の構造型を特定する能力によって、かなりの臨床的利点を得られる。例えば、PrP^{Sc}の可溶性凝集体型は最も感染性の高い型であると考えられており；したがって、PrP^{Sc}のその型の特定を、感染被験者を特定するために用いることができる。その同じ情報を同様に、治療計画の必要性または現在用いられているよりも多かれ少なかれ積極的な治療計画の必要性を判定するために、および所与の治療計画の有効性をモニターするために用いることができる。

10

【0205】

一つの態様において、患者の体内でのPrP^{Sc}タンパク質または高次PrP^{Sc}構造(可溶性凝集体のような)の位置を測定するためにペプチドプローブを用いる。例えば、脳の特定のセグメント由来の生物学的試料を採取し、PrP^{Sc}タンパク質または高次PrP^{Sc}構造の存在について分析してもよい。あるいは、標識プローブを、例えば局所注入によって、患者に投与し、患者の体内に存在するPrP^{Sc}タンパク質または高次PrP^{Sc}構造の任意の部位に局在化させてもよく、その後患者を走査して、PrP^{Sc}タンパク質または高次PrP^{Sc}構造の部位に局在化する標識プローブの部位を検出してもよい。

20

【0206】

本発明の別の局面では、試料中のPrP^{Sc}の量、または試料中のPrP^{Sc}の特定型の量を測定するための方法を提供する。上記のように、PrP^{Sc}の可溶性凝集体型は極めて感染性である。本発明は、PrP^{Sc}の可溶性凝集体型に選択的に結合するペプチドプローブを用いて、試料中に存在するPrP^{Sc}のその型の量を測定する方法を提供する。その情報は、例えば、患者の感染負荷(infective burden)および/または疾患が進行した程度を評価するために用いることができる。その同じ情報を同様に、治療計画の必要性または現在用いられているよりも多かれ少なかれ積極的な治療計画の必要性を判定するために、および所与の治療計画の有効性をモニターするために用いることができる。同様の情報を上記に沿って、インビボの方法により得ることができる。

30

【0207】

本発明は同様に、特定の構造状態の標的タンパク質に特異的であるプローブを特定する方法を提供する。いくつかの態様において、プローブが特定の構造状態をとる傾向は、その特定の構造状態の標的タンパク質に対するプローブの特異性と一致する。すなわち、不溶性自己凝集体を形成する傾向が高いプローブは不溶性の自己凝集体状態の標的タンパク質に特異的であり、可溶性自己凝集体を形成する傾向が有るプローブは可溶性の自己凝集体状態の標的タンパク質に特異的であり、凝集体を形成する傾向がないプローブは非凝集体状態(例えばモノマー状態)の標的タンパク質に特異的である。いくつかの態様において、プローブは、自己凝集体を形成する傾向の低さを示しうる。例えば、プローブは、アミノ酸置換I41DおよびA42Qを有するA₄₂の変種(すなわち「DQ変異体」)のアミノ酸配列を含むことができる。

40

【0208】

低級(low end)の可溶性モノマーから高級(high end)の不溶性自己凝集体に及ぶ構造状態の範囲に入る特定の構造状態の標的タンパク質に特異的なプローブは、本発明によって、例えばGFP系を用いることによって特定することができる。例えば、(i) 標的タンパク質に対するペプチドプローブおよび(ii) GFPを含む融合タンパク質を、自己凝集を促進する条件に供することができる、任意の蛍光シグナルを検出することができる。シグナルの強度は特定の構造状態の標的タンパク質に対するプローブの特異性と相関することができる。例えば、いくつかの態様において、より高い強度のシグナルから、プローブは凝集体を

50

形成する傾向が低く、したがって可溶性モノマーのような、構造状態の範囲のうち低級の標的タンパク質に特異的であることが示唆される。逆に、いくつかの態様において、より低い強度のシグナルから、プローブは凝集体を形成する傾向がより高く、不溶性凝集体のような、構造状態の範囲のうち高級の標的タンパク質に特異的であることが示唆される。中間のシグナルから、プローブは凝集体を形成する傾向が中くらいであり、可溶性オリゴマーのような、構造状態の範囲のうち中級(intermediate end)の標的タンパク質に特異的であることが示唆される。

【0209】

特定の構造状態の標的タンパク質に特異的なプローブは同様に、異なる特定の構造状態のタンパク質試料を調製し、その後、異なる特定の構造状態の一つまたは複数のタンパク質に選択的に結合するペプチドプローブの能力を評価することにより特定することができる。例えば、ペプチドプローブを特定の構造状態のタンパク質試料と接触させることができ、タンパク質とのその相互作用を、例えば、上記の方法論のいずれかを用いて評価することができる。この過程を異なる特定の構造状態のタンパク質試料で繰り返すことができ、この結果を比較して、ペプチドプローブが、異なる特定の構造状態の一つまたは複数のタンパク質に選択的に結合するかどうかを判定することができる。

10

【0210】

F. 凝集を調節する作用物質を特定するためのスクリーニング方法

本明細書において開示するプローブは、標的タンパク質の自己凝集を調節する作用物質を特定するためのスクリーニング方法において使用することができる。

20

【0211】

例えば、標的タンパク質の自己凝集を調節する作用物質をスクリーニングするために、標的タンパク質に対するペプチドプローブおよびGFPのような、タンパク質の集合状態に依ってシグナルを生ずる標識を含む、融合タンパク質を調製する。(いくつかの態様において、標識は直接的にまたはリンカーを通じて、ペプチドプローブのC末端に連結される)。上記のように、GFP系において、融合タンパク質の蛍光は、不溶性自己凝集体を形成するペプチドプローブの傾向と逆相関する。したがって、例えば、融合タンパク質が蛍光シグナルを放出すると認められる場合には、ペプチドプローブは不溶性自己凝集体を形成する傾向が低い。逆に、融合タンパク質が蛍光シグナルを放出しないと認められる場合には、ペプチドプローブは不溶性自己凝集体を形成する傾向がいっそう高い。前述の他の標識をGFPの代わりに用いることができる。凝集と逆相関するシグナルを放出するような標識もあれば、一方では、凝集と直接相関するシグナルを放出するようなものもあることを当業者は認識している。便宜上、本発明をGFP系に関連して記述する。

30

【0212】

状況によっては、凝集体を形成するペプチドプローブの相対的傾向を判定することが望ましい場合がある。そのために、参照融合タンパク質(例えば、GFPおよび参照ペプチドプローブを含む)によって生ずるシグナルを試験融合タンパク質(例えば、GFPおよび試験ペプチドプローブを含む)によって生ずるシグナルと比較する。GFP系において、増加性の蛍光シグナルは、凝集体を形成する傾向のいっそうの低さと相関する。

【0213】

いくつかの態様において、不溶性自己凝集体を形成する傾向が高いペプチドプローブを、標的タンパク質の自己凝集を調節する作用物質を特定するためのスクリーニング方法において使用する。この態様の一つの局面において、GFP融合タンパク質(例えば、ペプチドプローブ-GFP)を宿主細胞(例えば、大腸菌)での誘導性発現用のベクターにクローニングする。標的タンパク質の自己凝集を阻害するために試験作用物質の存在下で、大腸菌において発現を誘導する。融合タンパク質の蛍光(GFP部分による)を測定し、試験作用物質の存在下での蛍光から、試験作用物質が標的タンパク質の自己凝集の潜在的な阻害剤と特定される。

40

【0214】

別の局面において、スクリーニング方法はインビトロアッセイ法を含む。例えば、当技

50

術分野において公知のように「無細胞」発現用のベクターにGFP融合タンパク質をクローニングする。この融合タンパク質を次に、試験作用物質の存在下で発現し、蛍光を測定する。この場合もやはり、試験作用物質の存在下での蛍光から、試験作用物質が標的タンパク質の自己凝集の潜在的な阻害剤と特定される。

【0215】

これらの態様の変化形において、GFP融合タンパク質を試験作用物質の非存在下でおよび試験作用物質の存在下で発現し、蛍光の増大から、凝集を阻害する試験作用物質が特定される。

【0216】

これらの態様の他の変化形において、融合タンパク質を試験タンパク質(および試験作用物質)の存在下で発現する。

10

【0217】

スクリーニング方法に適した試験作用物質は、抗体、キレート剤、三座鉄キレート剤、ジケトン、2-ピリドキサルイソニコチニルヒドラゾン類似体、タキピリジン(tachypyridine)クリオキノール、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤キレート剤、2,3-ジヒドロキシ安息香酸、ピコリンアルデヒド、ニコチンアルデヒド、2-アミノピリジン、3-アミノピリジン、局所2-フリルジオキシム、n-酪酸、フェニルブチレート、トリブチリン、スベロイラニリドヒドロザミック酸、6-シクロヘキシル-1-ヒドロキシ-4-メチル-2(1H)-ピリジノン、リロピロックス、ピロクトン、安息香酸系のキレート剤、サリチル酸、ニコチンアミド、クリオキノール(Clioquinol)、ヘパリン硫酸、トリメチルアミンN-オキシド、

20

ポリエチレングリコール(PEG)、銅カチオン、ジメチルスルホキシド、デクスラゾキサ

【0218】

スクリーニング方法に適した標的タンパク質は、上記のものいずれかであってよい。スクリーニング方法は、プリオンタンパク質およびA_β42を含む自己凝集に感受性の高い任意の標的タンパク質の凝集を調節する作用物質を特定するために、用いることができる。これらの方法は同様に、標的タンパク質に結合する作用物質を特定することができる。標的タンパク質のモノマーとの作用物質の結合によって、標的タンパク質の自己凝集が阻止されるであろう。同様に、可溶性オリゴマーまたは不溶性凝集体との作用物質の結合によって、さらなる凝集ならびに原線維前駆体および原線維の形成が阻止され、その一方で、原線維前駆体または原線維との作用物質の結合によって、その構造のさらなる拡大が阻止されるであろう。さらなる凝集を遮断することに加えて、この結合は同様に、平衡を再び可溶性モノマーの方に有利な状態に戻し、さらに疾患の進行を阻止し、疾患症状を軽減しうる。

30

【0219】

作用物質による標的タンパク質の結合は同様に、標的タンパク質が示す任意の有害な活性を直接的に妨げることができる。

40

【0220】

一つの特定の態様において、上記のように特定された試験作用物質の活性をさらなるアッセイ法において確認する。例えば、標的タンパク質の可溶型または標的タンパク質に対するペプチドプローブを有機溶媒、超音波処理およびろ過によって調製する(Bitan et al., *Methods in Molec. Biol.*, pp. 3-9 (2005, Humana Press)。調製後、標的タンパク質の可溶型またはプローブを、上記のように特定した試験作用物質を含む水性緩衝液中で希釈し、標的タンパク質またはプローブを攪拌下でまたは静止下で凝集させる。次いで凝集を前述の方法のいずれかにより、例えば、標識プローブの使用およびエキシマー形成もしくはCDの検出により、またはチオフラビンT (Levine-III, H., *Protein Sci.* 2:404-410

50

(1993))もしくはコンゴレッド結合の蛍光測定などの、当技術分野において公知の他の方法により測定して、試験作用物質が凝集を阻害することを確認する。

【0221】

一つの態様において、GFP-ペプチドプローブの融合タンパク質を用いて上記のように特定した試験作用物質の活性を、試験作用物質の存在下でGFP-標的タンパク質の融合タンパク質の蛍光を評価することによって確認する。

【0222】

凝集を阻害する試験作用物質の能力を同様に、試験作用物質の存在下での標的タンパク質(またはプローブ)の凝集を電子顕微鏡検査の下で観察することによって評価することができる。凝集の用量依存的な減少から、試験作用物質が凝集を阻害することが確認される。

10

【0223】

本発明は同様に、より目的に合わせた薬物スクリーニングを、すなわち、標的タンパク質の特定の構造状態と相互作用する活性作用物質を特定することにより提供する。この態様において、特定の構造状態を形成する傾向が有るプローブと相互作用する試験作用物質の能力を用いて、その特定の構造状態の標的タンパク質と相互作用する作用物質を特定する。例えば、自己凝集体を形成する傾向が低いプローブを用いて、標的タンパク質のモノマーに結合する活性作用物質を特定することができ；可溶性オリゴマーを形成する傾向が有るプローブ(A ADDLの構造を模倣するものなどの)を用いて、可溶性オリゴマーに結合する活性作用物質を特定することができ；不溶性凝集体を形成する傾向が有るプローブを用いて、標的タンパク質の不溶性モノマーに結合する活性作用物質を特定することができる。いくつかの態様において、自己凝集体を形成する傾向が低いプローブを用いて、標的タンパク質に結合する活性作用物質を競合アッセイ法において特定することができる。例えば、プローブおよび活性作用物質が複合体を形成する場合、任意で誘導体化されてもよい、さらなるプローブを用いて、複合体からプローブを競合分離することができる。

20

【0224】

別の変化形において、標的タンパク質の特定の構造状態と相互作用する活性作用物質は、本明細書において記述するように、活性作用物質を標的タンパク質の試料と接触し、複合体化した活性作用物質-標的タンパク質部分を、非複合体化標的タンパク質から分離し、特定の構造状態に対するプローブを用いて複合体化標的タンパク質の特定の構造状態を判定することにより特定される。

30

【0225】

G. 治療用試験作用物質

疾患状態に関連する特定の構造状態を阻害することが知られるまたは考えられる任意の作用物質をスクリーニング方法で用いて、凝集を調節するその能力、すなわち治療用作用物質としてのその資格を評価することができる。例えば、標的タンパク質のシート立体構造の形成を阻害することが、標的タンパク質のオリゴマーもしくは不溶性の無定形自己凝集体の形成を阻害することが、または原線維の形成を阻害することが知られるまたは考えられる作用物質を本発明の方法によりスクリーニングして、治療用作用物質を特定することができる。前述のようにデザインしたペプチドプローブ(標識の有無にかかわらず)は同様に、治療用作用物質としてのその可能性の高い有用性を評価するための試験作用物質として適している。

40

【0226】

治療用試験作用物質の例としては、抗アミロイド活性または抗アミロイド形成性活性を有することが知られるまたは考えられる作用物質が挙げられる。「抗アミロイド剤」または「抗アミロイド形成性剤」とは、タンパク質がアミロイドブラークもしくは沈着を凝集するおよび/もしくは形成する、ならびに/またはアミロイドブラークもしくは沈着の脱凝集もしくは減少を促進することを、直接的にまたは間接的に阻害する作用物質である。例えば、抗アミロイド剤は、オリゴマー、原線維、アミロイドブラークなどの凝集および/または形成に関与する立体構造をタンパク質がとることを阻害することができる。したが

50

って、例えば、抗アミロイド剤は、タンパク質が α -ヘリックス立体構造をとることを阻害することができる。抗アミロイド剤は、タンパク質、例えば抗アミロイド抗体およびペプチドプローブを含み、同様に小化学分子、例えば小分子薬物を含む。

【0227】

1. 従来の抗アミロイド剤

抗アミロイド剤は、キレート剤(例えば、銅および鉄などの、遷移金属に対するキレート剤、例えば三座鉄キレート剤)、ジケトン(例えば、 α -ジケトン)、2-ピリドキサルイソニコチニルヒドラゾン類似体、タキピリジン(tachypyridine)、クリオキノール、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤キレート剤、2,3-ジヒドロキシ安息香酸、ピコリンアルデヒド、ニコチンアルデヒド、2-アミノピリジン、3-アミノピリジン、局所2-フリルジオキシム、*n*-酪酸、フェニルブチレート、トリブチリン、スベロイラニリドヒドロザミック酸、6-シクロヘキシル-1-ヒドロキシ-4-メチル-2(1H)-ピリジノン、リロピロックス、ピロクトン、安息香酸系のキレート剤、サリチル酸、ニコチンアミド、クリオキノール(Clioquinol)、ヘパリン硫酸、トリメチルアミンN-オキシド(TMNO)、ポリエチレングリコール(PEG)、銅カチオン(例えば、 Cu^{++})、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびデクスラゾキサンを含む。

【0228】

抗アミロイド剤は、当技術分野において「アミロイドバスター」または「ブランクバスター」と総称される作用物質を含む。これらは、ペプチド模倣的な薬物を含み、アミロイド原線維と相互作用してそれらを徐々に溶解する。「ペプチド模倣」とは、生体分子が生物学的に活性な他のペプチド分子の活性を模倣することを意味する。「アミロイドバスター」または「ブランクバスター」は同様に、アミロイド原線維が安定性を保つのに必要な補因子を吸収する作用物質を含む。

【0229】

抗アミロイド剤は同様に、ドーパミン、タンニン酸、トリアジン、レボドパ、ペルゴリド、プロモクリプチン、セレギリン、グルコサミンもしくはその類似体(例えば、4-デオキシ-D-グルコサミンもしくは4-デオキシ-アセチルグルコサミン)、テトラピロール、ノルジヒドログアヤレト酸(NDGA)、ポリフェノール(例えば、ミリセチン(Myr)、モリン(Mor)、ケルセチン(Qur)、ケンペロール(Kmp)、(+)-カテキン(Cat)、(-)-エピカテキン(epi-Cat))、リファンピシン(RIF)、テトラサイクリン(TC)、小分子スルホン酸(例えば、ポリビニルスルホン酸および1,3-プロパンジスルホン酸)、小分子スルホネートおよびサルフェート(例えば、エタンスルホネート、1-プロパンスルホネート、1,2-エタンジスルホネート、1,3-プロパンジスルホネート、1,4-ブタンジスルホネート、1,5-プロパンジスルホネート、1,6-ヘキサジスルホネート、ポリ(ビニルスルホネート)、1,2-エタンジオールジサルフェート、1,3-プロパンジオールジサルフェートおよび1,4-ブタンジオールジサルフェート)、シクロヘキサンヘキソール(例えば、エピ-シクロヘキサンヘキソール、シロ-シクロヘキサンヘキソールおよびミオ-シクロヘキサンヘキソール)、 α -シートプレイカーペプチド(iA 5)、ニコチン、またはその塩、酸もしくは誘導体を含む。

【0230】

抗アミロイド剤は同様に、抗体、例えば標的タンパク質に特異的な抗体、または標的タンパク質の特定の構造状態に特異的な抗体を含むことができる。

【0231】

2. 抗アミロイド剤としてのペプチドプローブ

上記のように、本発明のペプチドプローブは、ADのようなアミロイド形成性疾患の予防および処置において、ならびにアミロイド形成性疾患の進行した段階の予防において抗アミロイド剤として有用である。前述のように、所与の標的タンパク質に対するペプチドプローブは、そのタンパク質に特異的に結合し、標的タンパク質の特定の構造型に選択的に結合することができる。

【0232】

いかなる理論によっても束縛されることを欲しないが、ペプチドプローブによる標的タ

10

20

30

40

50

ンパク質の結合は標的タンパク質の高次集合体の形成を阻止し、それによって、標的タンパク質に関連する疾患を予防しもしくは処置し、および/または疾患のさらなる進行を予防しうると考えられる。例えば、標的タンパク質のモノマーとのペプチドプローブの結合によって、標的タンパク質の自己凝集が阻止されるであろう。同様に、可溶性オリゴマーまたは不溶性凝集体とのペプチドプローブの結合によって、さらなる凝集ならびに原線維前駆体および原線維の形成が阻止され、その一方で、原線維前駆体または原線維とのペプチドプローブの結合によって、その構造のさらなる拡大が阻止されるであろう。さらなる凝集を遮断することに加えて、この結合は同様に、平衡を再び可溶性モノマーの方に有利な状態に戻し、さらに疾患の進行を阻止し、疾患症状を軽減しうる。

【0233】

ペプチドプローブによる標的タンパク質の結合は同様に、標的タンパク質が示す任意の有害な活性を直接的に妨げることができる。すなわち、例えば、ADDLの神経毒性作用は、ADDLに特異的なペプチドプローブの結合作用による阻害でありうる。すなわち、一つの態様において、ペプチドプローブによる結合は、シナプスおよびニューロン膜とのADDLおよび原線維前駆体の相互作用を遮断する。いくつかの態様において、標的タンパク質が他のタンパク質(例えば、受容体)に結合する場合、他のタンパク質に結合するために標的タンパク質と競合するようペプチドプローブをデザインすることができる。例えば、標的タンパク質に対する受容体であって、ニューロン膜または基底細胞膜中に存在するその受容体に結合するために、競合するようペプチドプローブをデザインすることができる。

【0234】

いくつかの態様において、ペプチドプローブは、ラミニン、エフェクター細胞接着分子(ECAMS)(例えばセレクチン)およびグリコサミノグリカン(GAGS)のようなタンパク質に結合するようデザインすることができる。(米国特許第2006-0135529号参照)。例えば、ペプチドプローブは、グリコサミノグリカン(GAG)に結合するようおよびセレクチンのようなエフェクター細胞接着分子(ECAM)とのGAGの相互作用を阻害するようデザインすることができる。

【0235】

したがって、一つの態様において、標的タンパク質に選択的に結合する、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、標的タンパク質を接触させ、それによって標的タンパク質の高次タンパク質凝集体の形成を阻止する段階を含む、標的タンパク質のタンパク質凝集体の形成を阻止するための方法が提供される。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、特定の構造状態の標的タンパク質に選択的に結合する。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、標的タンパク質のモノマーに選択的に結合し、それによってタンパク質凝集体の形成を阻止する。他の態様において、ペプチドプローブは、標的タンパク質の可溶性オリゴマーに選択的に結合し、それによって不溶性タンパク質凝集体の形成を阻止する。他の態様において、ペプチドプローブは、標的タンパク質の不溶性凝集体に選択的に結合し、それによって標的タンパク質の原線維の形成を阻止する。特定の態様において、ペプチドプローブは、無定形自己凝集体、原線維前駆体および原線維のような不溶性凝集体に選択的に結合する。

【0236】

接触は、ペプチドプローブを標的タンパク質と接触させる任意の手段によって達成することができる。インビボの方法の場合、患者における標的タンパク質のタンパク質凝集体の形成を阻止するため、ペプチドプローブを、例えば、前述の部位のような、局在化した標的タンパク質の部位へもしくは関心対象の部位への直接注射によって、または鼻腔内投与もしくは経口投与によってなど、任意の適当な手段によって患者に投与することができる。

【0237】

H. 標的化薬

本発明のペプチドプローブは同様に、他の活性作用物質(上記の作用物質のような)をAタンパク質のような、標的タンパク質に、またはA₄₂、A₄₂モノマー、A₄₂ ADDL、

10

20

30

40

50

A 42の不溶性凝集体、原線維などのような、特定型のA に送達するための標的化薬として有用である。本発明のこの態様において、ペプチドプローブを一つまたは複数の活性作用物質と、当技術分野において公知の方法により、例えば直接的にまたはリンカーを通じて結合することにより組み合わせる。活性作用物質は、当技術分野において公知のものおよび上記のものいずれかのような、治療用活性作用物質であってよく、またはこれは当技術分野において公知のものおよびペプチドプローブ標識に関して上記のものいずれかのような、検出作用物質であってもよい。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、血管組織、リンパ組織、脳、または腎臓、肝臓、心臓もしくは肺などの他の臓器の一つまたは複数のような、患者での特定部位に存在する標的タンパク質の位置に局在化し、それによって治療用作用物質をそのような特定部位に送達する。

10

【0238】

したがって、一つの態様において、(i) 標的タンパク質に選択的に結合する、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、(ii) 治療用作用物質とを含む融合タンパク質と標的タンパク質を接触させる段階を含む、標的タンパク質に関連する疾患を処置するための方法が提供される。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、特定の構造状態の標的タンパク質に選択的に結合する。接触は、注射によって、鼻腔内にまたは経口になど、上記のように、ペプチドプローブを標的タンパク質と接触させる任意の手段によって達成することができる。

【0239】

いくつかの態様において、疾患は、アルツハイマー病であり、標的タンパク質はA 42、A 40、またはその両方であり、治療用作用物質は、抗体、重金属キレート剤および帯電部分からなる群より選択される。他の態様において、疾患はTSEであり、標的タンパク質はプリオンタンパク質であり、治療用作用物質は抗体、重金属キレート剤および帯電部分からなる群より選択される。他の態様において、疾患は老人性全身性アミロイドーシスまたは家族性アミロイドポリニューロパシーであり、標的タンパク質はトランスサイレチンであり、治療用作用物質は抗体、重金属キレート剤および帯電部分からなる群より選択される。いくつかの態様において、疾患はハンチントン病であり、標的タンパク質はハンチンチンであり、治療用作用物質は重金属キレート剤および帯電部分からなる群より選択される。他の態様において、疾患はパーキンソン病であり、標的タンパク質は α -シヌクレインであり、治療用作用物質は重金属キレート剤および帯電部分からなる群より選択される。

20

30

【0240】

同様に提供されるのは、標的タンパク質に対するペプチドプローブと治療用作用物質を組み合わせる段階およびペプチドプローブ-治療用作用物質の組み合わせをその必要性がある患者に投与する段階を含む、治療用作用物質を送達する方法である。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、 α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、ペプチドプローブは、 β -ヘリックス立体構造から α -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こすが、しかし標的タンパク質の完全長の配列を含まない。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する。いくつかの態様において、ペプチドプローブは、モノマー、可溶性オリゴマーおよび不溶性凝集体からなる群より選択される特定の自己凝集状態の標的タンパク質に選択的に結合する。いくつかの態様において、治療用作用物質は抗アミロイド活性を有する。いくつかの態様において、ペプチドプローブを直接的にまたはリンカーを通じて結合させることにより治療用作用物質と組み合わせる。

40

【0241】

当業者は予防または処置に適した患者を特定することができる。例えば、患者から採取した生物学的試料中の標的タンパク質を検出することによりもしくは上記のインビボの方法により、他の危険因子(遺伝子突然変異、アポE、またはアミロイド沈着もしくはプラークを示すPET走査などの)を特定することにより、またはアミロイド形成性疾患(ADおよびL

50

LMDを含む)の家族歴により、患者を特定することができる。本発明の一つの態様において、血液試料をA₄₂のような、一つまたは複数のアミロイドタンパク質の存在についてスクリーニングし、高レベルのそのタンパク質を有する、または高いA₄₂/A₄₀比を有する患者を処置について選択する。

【0242】

I. 対照

本明細書において開示する方法のいずれにおいても、アッセイ法の有効性を確認するために対照(陽性、陰性またはその両方)を立てることができる。陽性対照は一般に、少なくとも一つの標的タンパク質(典型的には特定の、公知のタイプの)を含むことが分かっている試料により本方法を行うことを含み、本方法がそのタンパク質を検出できること、および/またはその特定のタンパク質に特異的であることを確認するために用いることができる。一般に、陽性対照は、公知の標的タンパク質が、典型的には既知量で意図的に(手順の任意の段階で)添加されている試料を含む。陰性対照は一般に、いかなる標的タンパク質も含まないことが分かっている試料により本方法を行うことを含み、本方法がシステム上の偽陽性結果を与えないことを確認するために用いることができる。その他の対照を本方法における一つまたは複数の特定の段階に立てて、その段階が予想通りに機能していることを検証することができる。当業者は適当な対照を十分に承知しており、過度の実験なしにそれらをデザインし、実行に移すことができる。

【0243】

J. 試料および標本

「試験標本」とは、試験しようとする材料の試料のことであり、「試料」と意味の点で等価であり、それ故に互換的に用いられる。試料は、組織(例えば、挽肉の一部分、生検処置によって得られたある量の組織、血液または血液画分、例えば血漿など)から、ガラス製ホモジナイザー中でのホモジナイゼーションによって調製してもよく、得られたものを直接用いてもよい。試料の量は、試料が用いられる用途に適した任意の量でありうる。例えば、血液または血液画分を用いる場合には、それは約1 μ l、約100 μ l、約1 ml、約10 ml、約100 ml、約1リットル(もしくは1ポイント)またはそれ以上でありうる。いくつかの用途においては、1リットル(または1ポイント)を上回る量を含む、大量の血液または血液製剤を試料として用いることができる。固形組織が試料の供給源である場合、試料は約1 mg~1 gmの間、好ましくは10 mg~250 mgの間、理想的には20 mg~100 mgの間であるべきである。

【0244】

試料または標本中のタンパク質は、凝集した形態で、または他の細胞構成要素、例えば脂質、他のタンパク質もしくは糖質の存在下で検出されてもよい。分析用の試料調製物はホモジナイズされても、または組織もしくは凝集体構造の同様の破壊に供されてもよく、細胞残屑を遠心分離によって除去してもよい。この工程は、緩衝塩溶液の存在下で行われてもよく、SDS、Triton X-100またはサルコシルなどのいくつかの界面活性剤の一つを用いてもよい。試料のさらなる濃縮をいくつかの作用物質のうちのいずれかでの処理によって達成してもよく;(例えば、ホスホテングステート(phosphotungstate))、これはSafar et al., Nature Medicine 4: 1157-1165, 1998の方法にしたがって用いられる。

【0245】

試料は次のように、試験および診断のために得ることができる。試料は組織(例えば、挽肉の一部分、または生検処置によって得られたある量の組織)から、ガラス製ホモジナイザー中でのホモジナイゼーションによって、または液体窒素の存在下で乳鉢および乳棒によって調製してもよい。材料の量は、約1 mg~1 gmの間、好ましくは10 mg~250 mgの間、例えば20 mg~100 mgの間などであるべきである。試料採取しようとする材料を適当な溶媒中に、好ましくはpH 7.0~7.8のリン酸緩衝食塩水中に懸濁させてもよい。RNase阻害剤の添加は任意である。溶媒は界面活性剤(例えば、Triton X-100、SDS、サルコシル、ジオキシコレート、IgePal (NP40))を含有してもよい。ホモジナイゼーションはホモジナイザーのいくつかの可動域、好ましくは10~25ストローク; 例えば15~20ストロークにわ

10

20

30

40

50

その他の紙製品および金属を含むが、これらに限定されることはない。容器は、固定化プローブを完全に包み込んでよく、または粉塵、油などによる汚染を最小限に抑えるためにプローブを単に覆うのみであってもよい。キットは単一の容器または複数の容器を含んでもよく、複数の容器が存在する場合、それぞれの容器は他の全ての容器と同じであってもよく、他のものとは異なってもよく、または他の全てではないが一部の容器とは異なってもよい。

【0252】

キットはそれ自体が任意の適当な材料で作られていてもよい。キット材料の非限定的な例としては、厚紙またはその他の紙製品、プラスチック、ガラスおよび金属が挙げられる。

10

【0253】

キットは、一つまたは複数のプローブを固体支持体に固定化するために必要な試薬および供給品の一部もしくは全部、または試料中のプリオンタンパク質との固定化プローブの結合のために必要な試薬および供給品の一部もしくは全部を含んでもよい。

【0254】

本明細書において開示するキットは、一つまたは複数の非固定化プローブ、および固定化プローブを含むまたは含まない一つまたは複数の固体支持体を含んでもよい。このようなキットは、一つまたは複数のプローブを固体支持体に固定化するために必要な試薬および供給品の一部もしくは全部、または試料中のプリオンタンパク質との固定化プローブの結合のために必要な試薬および供給品の一部もしくは全部を含んでもよい。

20

【0255】

例示的な態様

以下は、例示的な態様の羅列である。

【0256】

1. 以下を含む、融合タンパク質:

(a) (i) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、

(ii) β -ヘリックス立体構造から α -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ

(iii) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、
標的タンパク質に対するペプチドプローブ; および

(b) 緑色蛍光タンパク質(GFP)。

30

【0257】

2. ペプチドプローブおよびGFPポリペプチドを連結するポリペプチドリッカーをさらに含む、態様1記載の融合タンパク質。

【0258】

3. 標的タンパク質が、膵島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質、アミロイドタンパク質またはA β ペプチド、血清アミロイドA、インスリン、アミリン、非アミロイド成分、プリオン、ヘモグロビン、免疫グロブリンまたはその断片、 α_2 -ミクログロブリン、 α -シヌクレイン、ロドプシン、 α -1-アンチキモトリプシン、シスタリン、タウ、p53、プレセニン、低密度リポタンパク質受容体、アポリポタンパク質、スーパーオキシドジスムターゼ、神経フィラメントタンパク質、トランスサイレチン、プロカルシトニンまたはカルシトニン、心房性ナトリウム利尿因子、ゲルゾリン、嚢胞性線維症膜貫通制御因子、ハンチントン病タンパク質、フィブリノゲン鎖、フェニルアラニン水酸化酵素、コラーゲン、 α -ヘキソサミニダーゼ、ならびにシスタチンCタンパク質からなる群より選択される、態様1記載の融合タンパク質。

40

【0259】

4. 標的タンパク質がプリオンタンパク質である、態様3記載の融合タンパク質。

【0260】

5. プリオンタンパク質がPrP^C、PrP^{Sc}またはその混合物である、態様4記載の融合タン

50

パク質。

【0261】

6. ペプチドプローブがSEQ ID NO:13またはSEQ ID NO:13に対し少なくとも約90%の配列同一性を有する配列を含む、態様4記載の融合タンパク質。

【0262】

7. 標的タンパク質がアミロイド タンパク質である、態様3記載の融合タンパク質。

【0263】

8. アミロイド タンパク質がA_β42、A_β40またはその混合物である、態様7記載の融合タンパク質。

【0264】

9. ペプチドプローブがSEQ ID NO:32の配列、SEQ ID NO:4の配列、またはSEQ ID NO:32もしくはSEQ ID NO:4に対し少なくとも約90%の配列同一性を有する配列を含む、態様7記載の融合タンパク質。

【0265】

10. 標的タンパク質が腓島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質である、態様3記載の融合タンパク質。

【0266】

11. ペプチドプローブがSEQ ID NO:11の配列またはSEQ ID NO:11に対し少なくとも約90%の配列同一性を有する配列を含む、態様10記載の融合タンパク質。

【0267】

12. 標的タンパク質がトランスサイレチンタンパク質である、態様3記載の融合タンパク質。

【0268】

13. ペプチドプローブがSEQ ID NO:26の配列またはSEQ ID NO:26に対し少なくとも約90%の配列同一性を有する配列を含む、態様12記載の融合タンパク質。

【0269】

14. 標的タンパク質がシスタチンCタンパク質である、態様3記載の融合タンパク質。

【0270】

15. ペプチドプローブがSEQ ID NO:17の配列またはSEQ ID NO:17に対し少なくとも約90%の配列同一性を有する配列を含む、態様14記載の融合タンパク質。

【0271】

16. 標的タンパク質がハンチントン病タンパク質である、態様3記載の融合タンパク質。

【0272】

17. ペプチドプローブがSEQ ID NO:19の配列またはSEQ ID NO:19に対し少なくとも約90%の配列同一性を有する配列を含む、態様15記載の融合タンパク質。

【0273】

18. ペプチドプローブが α -ヘリックス立体構造にある場合に蛍光シグナルを放出する、態様1記載の融合タンパク質。

【0274】

19. ペプチドプローブが α -ヘリックス立体構造にある場合に蛍光シグナルを放出しない、態様1記載の融合タンパク質。

【0275】

20. ペプチドプローブが、約7のpHを有する1.0% SDSの溶液中に存在する場合に α -ヘリックス立体構造にある、態様1記載の融合タンパク質。

【0276】

21. ペプチドプローブが、約4.5のpHを有する溶液中に存在する場合に α -ヘリックス立体構造にある、態様1記載の融合タンパク質。

【0277】

22. 固体支持体に固定化される、態様1記載の融合タンパク質。

10

20

30

40

50

【0278】

23. アビジン部分をさらに含み、ビオチン部分を介して固体支持体にカップリングされる、態様22記載の融合タンパク質。

【0279】

24. (A) 融合タンパク質が、

(i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、

(b) β -ヘリックス立体構造から α -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ

(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、

標的タンパク質に対するペプチドプローブと、

(ii) 融合タンパク質の凝集状態に依存してシグナルを生ずる標識とを含む、融合タンパク質および試験作用物質を接触させる段階；

(B) 標識によって生じたシグナルを検出する段階；ならびに

(C) シグナルを、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力と関連させる段階

を含む、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力を評価する方法。

【0280】

25. シグナルの減少が標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力と関連する、態様24記載の方法。

【0281】

26. シグナルの増加が標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力と関連する、態様24記載の方法。

【0282】

27. 標的タンパク質が、豚島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質、アミロイドタンパク質またはA β ペプチド、血清アミロイドA、インスリン、アミリン、非アミロイド成分、プリオン、ヘモグロビン、免疫グロブリンまたはその断片、 α_2 -ミクログロブリン、 α -シヌクレイン、ロドプシン、 α -1-アンチキモトリプシン、シスタリン、タウ、p53、プレセニリン、低密度リポタンパク質受容体、アポリポタンパク質、スーパーオキシドジスムターゼ、神経フィラメントタンパク質、トランスサイレチン、プロカルシトニンまたはカルシトニン、心房性ナトリウム利尿因子、ゲルゾリン、嚢胞性線維症膜貫通制御因子、ハンチントン病タンパク質、フィブリノゲン鎖、フェニルアラニン水酸化酵素、コラーゲン、 α -ヘキササミニダーゼ、ならびにシスタチンCタンパク質からなる群より選択される、態様24記載の方法。

【0283】

28. 試験作用物質がキレート剤である、態様24記載の方法。

【0284】

29. 試験作用物質が、三座鉄キレート剤、ジケトン、2-ピリドキサルイソニコチニルヒドラゾン類似体、タキピリジン、クリオキノール、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤キレート剤、2,3-ジヒドロキシ安息香酸、ピコリンアルデヒド、ニコチンアルデヒド、2-アミノピリジン、3-アミノピリジン、局所2-フリルジオキシム、n-酪酸、フェニルブチレート、トリブチリン、スベロイラニリドヒドロザミック酸、6-シクロヘキシル-1-ヒドロキシ-4-メチル-2(1H)-ピリジノン、リロピロックス、ピロクトン、安息香酸系のキレート剤、サリチル酸、ニコチンアミド、ヘパリン硫酸、トリメチルアミンN-オキシド、ポリエチレングリコール(PEG)、銅カチオン、ジメチルスルホキシド、デクスラゾキサソ、ドーパミン、タンニン酸、トリアジン、レボドパ、ペルゴリド、プロモクリプチン、セレギリン、グルコサミンもしくはその類似体、テトラピロール、ノルジヒドログアヤレット酸、ポリフェノール、テトラサイクリン、ポリビニルスルホン酸、1,3,5-プロパンジルスルホン酸、 α -シートプレイカーペプチド(iA 5)、ニコチン、またはその塩もしくは誘導体の群より選択される、態様24記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【 0 2 8 5 】
30. 標識がフルオロフォアを含む、態様24記載の方法。
- 【 0 2 8 6 】
31. フルオロフォアがピレンまたはトリプトファンを含む、態様24記載の方法。
- 【 0 2 8 7 】
32. 標識が蛍光ポリペプチドを含む、態様24記載の方法。
- 【 0 2 8 8 】
33. 蛍光ポリペプチドが緑色蛍光タンパク質(GFP)を含む、態様32記載の方法。
- 【 0 2 8 9 】
34. 標識が放射性核種を含む、態様24記載の方法。 10
- 【 0 2 9 0 】
35. 融合タンパク質が固体支持体に固定化される、態様24記載の方法。
- 【 0 2 9 1 】
36. 融合タンパク質が、アビジン部分をさらに含み、ビオチン部分を介して固体支持体にカップリングされる、態様24記載の方法。
- 【 0 2 9 2 】
37. 検出する段階(b)の前に、凝集を促進する条件にペプチドプローブを供する段階をさらに含み、シグナルの強度が、凝集を阻害する作用物質の能力と直接関連する、態様24記載の方法。
- 【 0 2 9 3 】
38. (A) 融合タンパク質が、 20
 (i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、
 (b) β -ヘリックス立体構造から α -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ
 (c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、
 標的タンパク質に対するペプチドプローブと、
 (ii) 融合タンパク質の凝集状態に依存してシグナルを生ずる標識と
 を含む、標的タンパク質、融合タンパク質、および試験作用物質を接触させる
段階； 30
 (B) 標識によって生じたシグナルを検出する段階；ならびに
 (C) シグナルを、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力と関連させる段階
を含む、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力を評価する方法。
- 【 0 2 9 4 】
39. シグナルが凝集を阻害する作用物質の能力と直接関連する、態様38記載の方法。
- 【 0 2 9 5 】
40. シグナルが凝集を阻害する作用物質の能力と逆関連する、態様38記載の方法。
- 【 0 2 9 6 】
41. (A) 融合タンパク質が、 40
 (i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の
転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、
 (b) β -ヘリックス立体構造から α -ヘリックス立体構造への立体構造の
転換を起こし、かつ
 (c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、
 標的タンパク質に対するペプチドプローブと、
 (ii) 融合タンパク質の凝集状態に依存してシグナルを生ずる標識と
 を含む、凝集を促進する条件に融合タンパク質を供する段階；
 (B) 標識によって生じた第一のシグナルを検出する段階；
 (C) 試験作用物質の存在下で、凝集を促進する条件に融合タンパク質を供し、かつ 50

標識によって生じた第二のシグナルを検出する段階；ならびに

(D) 第一および第二のシグナルの相対強度を評価し、それによって標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質を特定する段階を含む、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力を評価する方法。

【0297】

42. 第一のシグナルと比べて高い、第二のシグナルの強度によって、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質が特定される、態様41記載の方法。

【0298】

43. 第二のシグナルと比べて高い、第一のシグナルの強度によって、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質が特定される、態様41記載の方法。

10

【0299】

44. (A) 融合タンパク質が、

(i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、

(b) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ

(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、

標的タンパク質に対するペプチドプローブと、

(ii) 融合タンパク質の凝集状態に依存してシグナルを生ずる標識とを含む、融合タンパク質および標的タンパク質を接触させる段階；

20

(B) 標識によって生じた第一のシグナルを検出する段階；

(C) 融合タンパク質、標的タンパク質および試験作用物質を接触させ、かつ標識によって生じた第二のシグナルを検出する段階；ならびに

(D) 第一および第二のシグナルの相対強度を評価し、それによって標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質を特定する段階を含む、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質の能力を評価する方法。

【0300】

45. 第一のシグナルと比べて高い、第二のシグナルの強度によって、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質が特定される、態様44記載の方法。

【0301】

46. 第二のシグナルと比べて高い、第一のシグナルの強度によって、標的タンパク質の凝集を阻害する作用物質が特定される、態様44記載の方法。

30

【0302】

47. (a) 標的タンパク質の特定の構造型に選択的に結合する、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、試料を接触させる段階；

(b) ペプチドプローブと特定の構造型で存在する任意の標的タンパク質との間の任意の結合を検出する段階

を含む、特定の構造型で試料に存在する標的タンパク質を特定するための方法。

【0303】

48. 標的タンパク質の構造型が α -ヘリックス立体構造である、態様47記載の方法。

40

【0304】

49. 標的タンパク質の構造型が β -ヘリックス立体構造である、態様47記載の方法。

【0305】

50. 標的タンパク質の構造型がタンパク質のモノマーである、態様47記載の方法。

【0306】

51. 標的タンパク質の構造型がタンパク質の可溶性オリゴマーである、態様47記載の方法。

【0307】

52. 標的タンパク質の構造型がタンパク質の不溶性自己凝集体である、態様47記載の方法。

50

【0308】

53. 標的タンパク質の構造型が不溶性の無定形自己凝集体、原線維前駆体および原線維から選択される、態様52記載の方法。

【0309】

54. 標的タンパク質が、膵島アミロイドポリペプチド前駆体タンパク質、アミロイドタンパク質またはAペプチド、血清アミロイドA、インスリン、アミリン、非アミロイド成分、プリオン、ヘモグロビン、免疫グロブリンまたはその断片、 α_2 -ミクログロブリン、 α -シヌクレイン、ロドプシン、 β 1-アンチキモトリプシン、シスタリン、タウ、p53、プレセニン、低密度リポタンパク質受容体、アポリポタンパク質、スーパーオキシドジスムターゼ、神経フィラメントタンパク質、トランスサイレチン、プロカルシトニンまたはカルシトニン、心房性ナトリウム利尿因子、ゲルゾリン、嚢胞性線維症膜貫通制御因子、ハンチントン病タンパク質、フィブリノゲン鎖、フェニルアラニン水酸化酵素、コラーゲン、 α -ヘキササミニダーゼ、ならびにシスタチンCタンパク質からなる群より選択される、態様47記載の方法。

10

【0310】

55. ペプチドプローブがフルオロフォア標識をさらに含む、態様47記載の方法。

【0311】

56. フルオロフォアがピレンまたはトリプトファンを含む、態様55記載の方法。

【0312】

57. ペプチドプローブが蛍光ポリペプチド標識をさらに含む、態様47記載の方法。

20

【0313】

58. 蛍光ポリペプチド標識が緑色蛍光タンパク質(GFP)を含む、態様57記載の方法。

【0314】

59. ペプチドプローブが放射性核種標識をさらに含む、態様47記載の方法。

【0315】

60. ペプチドプローブが固体支持体に固定化される、態様47記載の方法。

【0316】

61. ペプチドプローブが、アビジン部分をさらに含み、ビオチン部分を介して固体支持体にカップリングされる、態様60記載の方法。

【0317】

62. (A) (i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、

30

(b) β -ヘリックス立体構造から α -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ

(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、

参照ペプチドプローブと、

(ii) 緑色蛍光タンパク質と

を含む参照融合タンパク質によって生じた第一のシグナルを、検出する段階:

(B) 試験ペプチドプローブが、参照ペプチドプローブのアミノ酸配列と比べてアミノ酸の挿入、欠失または置換を含む参照ペプチドプローブの変異体である、試験ペプチドプローブおよび緑色蛍光タンパク質を含む試験融合タンパク質によって生じた第二のシグナルを検出する段階; ならびに

40

(C) 第一のシグナルと比べて第二のシグナルの強度を関連付け、それにより参照ペプチドプローブと比べて凝集体を形成する傾向の増大または低下を示す標的タンパク質に対するペプチドプローブを特定する段階

を含む、参照ペプチドプローブと比べて凝集体を形成する傾向の増大または低下を示す標的タンパク質に対するペプチドプローブを特定する方法。

【0318】

63. 第一のシグナルの強度と比べて第二のシグナルの強度の増大は、試験ペプチドプローブが凝集体を形成する傾向の低下を示唆し、第一のシグナルプローブの強度と比べて第

50

二のシグナルの強度の低下は、試験ペプチドプローブが凝集体を形成する傾向の増大を示唆する、態様62記載の方法。

【0319】

64. 第一のシグナルの強度と比べて第二のシグナルの強度の低下は、試験ペプチドプローブが凝集体を形成する傾向の低下を示唆し、第一のシグナルの強度と比べて第二のシグナルの強度の増大は、試験ペプチドプローブが凝集体を形成する傾向の増大を示唆する、態様62記載の方法。

【0320】

65. 試験ペプチドプローブが参照ペプチドプローブに対し少なくとも約15%の配列同一性を有する、態様62記載の方法。

10

【0321】

66. 試験ペプチドプローブが、ランダムな配列突然変異を参照ペプチドプローブのアミノ酸配列に導入する段階を含む工程によってデザインされる、態様62記載の方法。

【0322】

67. (A) 融合タンパク質が、

(i) (a) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、

(b) β -ヘリックス立体構造から α -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ

(c) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、

20

標的タンパク質に対するペプチドプローブと、

(ii) 緑色蛍光タンパク質と

を含む、自己凝集を促進する条件に融合タンパク質を供する段階；

(B) 融合タンパク質によって生じたシグナルを検出する段階；ならびに

(C) シグナルの強度を、特定の構造状態の標的タンパク質に対するペプチドプローブの特異性と相関させ、それにより特定の構造状態の標的タンパク質に特異的なペプチドプローブを特定する段階

を含む、低級の可溶性モノマーから高級の不溶性自己凝集体に及ぶ構造状態の範囲に入る特定の構造状態の標的タンパク質に特異的なペプチドプローブを特定する方法。

【0323】

68. より高い強度のシグナルは、ペプチドプローブが構造状態の範囲のうち低級の標的タンパク質に特異的であることを示唆し、より低い強度のシグナルは、ペプチドプローブが構造状態の範囲のうち高級の標的タンパク質に特異的であることを示唆する、態様67記載の方法。

30

【0324】

69. より低い強度のシグナルは、ペプチドプローブが構造状態の範囲のうち低級の標的タンパク質に特異的であることを示唆し、より高い強度のシグナルは、ペプチドプローブが構造状態の範囲のうち高級の標的タンパク質に特異的であることを示唆する、態様67記載の方法。

【0325】

70. 標的タンパク質に選択的に結合する、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、標的タンパク質を接触させ、それによって標的タンパク質の高次タンパク質凝集体の形成を阻止する段階を含む、標的タンパク質のタンパク質凝集体の形成を阻止するための方法。

40

【0326】

71. ペプチドプローブが標的タンパク質のモノマーに選択的に結合し、それによってタンパク質凝集体の形成を阻止する、態様70記載の方法。

【0327】

72. ペプチドプローブが標的タンパク質の可溶性オリゴマーに選択的に結合し、それによって不溶性タンパク質凝集体の形成を阻止する、態様70記載の方法。

50

【0328】

73. ペプチドプローブが標的タンパク質の不溶性凝集体に選択的に結合し、それによって標的タンパク質の原線維の形成を阻止する、態様70記載の方法。

【0329】

74. 不溶性タンパク質凝集体が無定形自己凝集体、原線維前駆体および原線維の一つまたは複数を含む、態様73記載の方法。

【0330】

75. (i) 標的タンパク質に選択的に結合する、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、

(ii) 治療用作用物質と

を含む融合タンパク質と、標的タンパク質を接触させる段階を含む、標的タンパク質に関連する疾患を処置するための方法。

【0331】

76. 疾患がアルツハイマー病であり、標的タンパク質がA₄₂、A₄₀またはその両方であり、治療用作用物質が重金属キレート剤および帯電部分からなる群より選択される、態様75記載の方法。

【0332】

77. 疾患がTSEであり、標的タンパク質がプリオンタンパク質であり、治療用作用物質が重金属キレート剤および帯電部分からなる群より選択される、態様75記載の方法。

【0333】

78. 疾患が老人性全身性アミロイドーシスまたは家族性アミロイドポリニューロパシーであり、標的タンパク質がトランスサイレチンであり、治療用作用物質が重金属キレート剤および帯電部分からなる群より選択される、態様75記載の方法。

【0334】

79. 疾患がハンチントン病であり、標的タンパク質がハンチンチンであり、治療用作用物質が重金属キレート剤および帯電部分からなる群より選択される、態様75記載の方法。

【0335】

80. 疾患がパーキンソン病であり、標的タンパク質が α -シヌクレインであり、治療用作用物質が重金属キレート剤および帯電部分からなる群より選択される、態様75記載の方法。

【0336】

81. 以下を含む、治療用組成物:

(a) (i) α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、

(ii) β -ヘリックス立体構造から α -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ

(iii) 標的タンパク質の完全長の配列を含まない、
標的タンパク質に対するペプチドプローブ; および

(b) 薬学的賦形剤。

【0337】

82. さらに治療用作用物質をさらに含む、態様81記載の組成物。

【0338】

83. さらに治療用作用物質が抗アミロイド活性を有する、態様82記載の組成物。

【0339】

84. α -ヘリックス立体構造から β -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こす標的タンパク質の一部に対応するアミノ酸配列を含み、 β -ヘリックス立体構造から α -ヘリックス立体構造への立体構造の転換を起こし、かつ標的タンパク質の完全長の配列を含まない、標的タンパク質に対するペプチドプローブと、治療用作用物質を組み合わせる段階を含む、標的タンパク質の凝集を阻止するための治療用作用物質を送達する方法。

【0340】

10

20

30

40

50

85. 治療用作用物質が抗アミロイド活性を有する、態様84記載の方法。

【0341】

実施例

以下の例は、例証であり、本開示を限定するものと解釈されるべきではない。

【0342】

実施例1: GFP-ペプチドプローブ融合タンパク質の構築

ヒトプリオンタンパク質またはA₄₂に対するペプチドプローブをコードするdsDNAオリゴヌクレオチドを合成する。このdsDNAオリゴヌクレオチドは、GFP発現ベクターにdsDNAオリゴヌクレオチドをクローニングするために5'および3'末端に制限部位を含む(Waldo et al., Nature Biotechnol. 17:691-695 (1999)を参照のこと)。dsDNAオリゴヌクレオチドおよびGFP発現ベクターを、対応する制限酵素で消化し、dsDNAオリゴヌクレオチドをGFP発現ベクターの中に連結して、GFP-融合タンパク質発現ベクターを作出する。この発現ベクターを用いて大腸菌を形質転換し、これをカナマイシン選択下で増殖させる。特定の変種GFP-ペプチドプローブの一つでは、I41DおよびA42Qの置換を有する完全長の変異体A₄₂(すなわち「DQ変異体」)であって、緩徐な凝集を起こすことが認められる該変異体を含む、GFP-融合タンパク質発現ベクターを作出する。

10

【0343】

実施例2: GFP融合タンパク質の発現のスクリーニング

形質転換した大腸菌株からDNAライブラリーを単離し、IPTG誘導性のタンパク質発現に適した別の菌株に形質転換する。形質転換した細菌をニトロセルロース紙の上に置く。37で終夜増殖の後、ニトロセルロース紙を、選択用のカナマイシンおよび発現誘導用のIPTG (1 mM)を含んだLBプレートに移す。コロニーをカウントし、緑色の表現型は可溶性の融合タンパク質(例えば、非凝集ペプチドプローブ)に対応し、白色の表現型は不溶性の融合タンパク質(例えば、凝集ペプチドプローブ)に対応するとして、緑色対白色の表現型に留意する。

20

【0344】

実施例3: GFP蛍光の測定

コロニーをピックし、カナマイシンを含有するLB液体培地中で増殖させる。培養物が吸光度(A_{600nm}) 0.8に達した後に、IPTGを濃度1 mMにまで加えることで発現を誘導し、増殖を37でまたは30で継続する。誘導後、培養物をTris-緩衝生理食塩水中で A_{600nm} 0.15にまで希釈する。蛍光光度計を用い490 nmの励起および510 nmの発光により蛍光を測定する。図4はアルツハイマープローブペプチド-GFP融合体(Alz)およびプリオンプローブペプチド-GFP融合体(Pri)のGFP蛍光測定の例示的な結果を示す。発現を誘導し、細胞を37で3時間(左グラフ)または30で5時間(右グラフ)インキュベートした後に、測定値を得る。細胞培養物200 μ lを取り出し、SDS-PAGEにより全細胞含有物を分析することによって、GFP-融合タンパク質の発現も評価する。

30

【0345】

実施例4: プリオン凝集阻害剤のGFP蛍光スクリーニング

上記のアッセイ法において白色の表現型をもたらす(例えば、凝集体を形成する)ことが分かっているGFP-ペプチドプローブ融合タンパク質を用いて、凝集を阻害する作用物質を特定する。GFP-ペプチドプローブ(プリオン)融合タンパク質を発現するためのベクターを、IPTG誘導性の発現のため細菌細胞に形質転換する。形質転換した細菌を、選択用にカナマイシンを補充したLB培地中で増殖させる。培養物が $OD_{600} = 0.8$ に達した時点で、培養物の一定分量(100 μ l)をマルチウェルプレートのウェルに移す。試験作用物質を各ウェルに加え、IPTGを終濃度1 mMまで加えることによってタンパク質の発現を誘導する。試料を37で穏やかに攪拌しながらインキュベートする。3時間のインキュベーションの後、各ウェルの蛍光を自動プレートリーダーにより512 nm (励起490 nm)で測定する。細胞密度が全試料にわたって一致することを確認するため、 OD_{600} も測定する。試験作用物質を複数の濃度で試験する。緑色の表現型をもたらす試験作用物質を、凝集を阻害する作用物質と特定する。

40

50

【0346】

実施例5: 感染性PrP^{Sc}に特異的なペプチドプローブの特定

高感染型のPrP^{Sc}に特異的なペプチドプローブを次のように特定する。

【0347】

異なる凝集状態のPrP^{Sc}タンパク質の試料を、例えば、Silveira et al., Nature 437: 257-61 (2005)に記述されている方法によって調製する。手短かに言えば、精製PrP^{Sc}タンパク質の調製物(例えば、スクレイピーに感染したハムスターの脳由来などの)を、例えば、界面活性剤および/または超音波処理での処理に供し、その後、サイズで(例えば、流れ場流れ分画(flow field-flow fractionation)または「FIFFF」を用い)複数の画分(例えば、Silveiraで報告の30画分など)に分画して、異なる凝集状態のプリオンタンパク質の試料を得る。任意で、正常脳由来の等価な試料を用いて並行な試料調製を行ってもよい。

10

【0348】

PrP^{Sc}タンパク質に特異的なピレン標識ペプチドプローブを各試料と接触させ、試料中に存在する任意のPrP^{Sc}とのその相互作用を評価する。上記のように、PrP^{Sc}とのピレン標識ペプチドプローブの相互作用を定常状態の蛍光によって評価することができる。標識ペプチドプローブがPrP^{Sc}と相互作用する場合に観察される、ピレン標識間の相互作用によって、蛍光ダイマーおよび/またはエキシマーの形成が起こる。すなわち、ピレンダイマーに関連する蛍光強度(I_D , 495 nmで測定される)の、ピレンモノマーのそれ(I_M , 378 nmで測定される)に対する特性比を用いて標識プローブと、試料中に存在する任意のPrP^{Sc}との間の相互作用を評価することができ、高い I_D/I_M は高い反応性と相関する。(図5はピレン標識ペプチドプローブのモノマーおよびダイマーに特有の蛍光を図示する。)

20

【0349】

図6は、上記のように得られた30画分のそれぞれに存在するPrP^{Sc}との、PrP^{Sc}タンパク質に特異的なペプチドプローブの反応性を図示する。(y軸は相対的 I_D/I_M 比を示し; 各画分中に存在するPrP^{Sc}凝集体のサイズはx軸に沿って増大する)。ペプチドプローブは、以下のアミノ酸配列を有していた。

VVAGAAAAGAVHKMNTKPKMKHVAGAAAAGAVV (SEQ ID NO:

43)

【0350】

これらのデータから、このプローブが、画分番号3、16、10~12、23および29に存在するPrP^{Sc}と選択的に相互作用することが示唆される。(Silveiraら、前記によれば、最も感染性の高いPrP^{Sc}型は画分番号12に見られる。)少なくとも二つの傾向がこれらのデータから明らかであり、その潜在的有用性を以下に概説する。

30

【0351】

第一に、ペプチドプローブは大きなPrP^{Sc}凝集体よりも、小さなPrP^{Sc}凝集体と反応する。小さなPrP^{Sc}凝集体とのペプチドプローブの反応性は、例えば、当技術分野の現況から、最も感染性の高いPrP^{Sc}型が大きな凝集体または原線維よりもむしろ、小さな凝集体型であることが示唆されているので、臨床的有用性を与える。

【0352】

第二に、分画粒子とのペプチドプローブの反応性は、直線的ではなく周期的であり、PrP^{Sc} 1 μg当たりの最大感度は、<30 kDから1,000 kDまでに及ぶPrP^{Sc}凝集体に対応する画分で観察される。この周期性は、ペプチドプローブに対する類まれな基質として働く、PrP^{Sc}オリゴマー単位の階層的な構造集合体を反映しうる。この周期性から、種を越えて感染性のPrP^{Sc}構造を標的とするために、例えば、ヒトPrP^{Sc}の人畜共通感染症の供給源で臨床的に特に重要な種変種(species variant)を検出するために、異なる構造状態のPrP^{Sc}に選択的に結合するペプチドプローブをデザインできることの臨床的有用性も強調される。

40

【0353】

大きなPrP^{Sc}凝集体と比べて小さなPrP^{Sc}凝集体とのペプチドプローブの選択的結合は、超音波処理実験でさらに実証することができる。例えば、ペプチドプローブとほとんどま

50

たは全く反応性を示さない感染ハムスター脳ホモジネートの未分画試料は、超音波処理に供された後に反応性の増大を示すことが実証された。反応性は超音波処理時間とともに増大し、反応性の増大は超音波処理の5~10分後に観察される。超音波処理は、抽出試料中に存在するPrP^{Sc}凝集体を小さなPrP^{Sc}凝集体に壊すので、これらの結果から、ペプチドプローブが超音波処理によって生じた新しいプールの小さなPrP^{Sc}オリゴマー構造と直接的に反応することが示唆されうる。さらにまたはあるいは、超音波処理はPrP^{Sc}凝集体の再構築を、ペプチドプローブとさらに反応性の高い、異なる構造状態(異なる立体構造状態などの)にさせている可能性がある。この場合も先と同様に、小さなPrP^{Sc}凝集体とのペプチドプローブの反応性は、上記のように、臨床的有用性を与える。

【0354】

実施例6: ヒツジ血液中のPrP^{Sc}の検出

PrP^{Sc}に特異的なペプチドプローブ(SEQ ID NO:43)を次のように、ヒツジ血中のPrP^{Sc}を検出するために用いる。ピレン標識ペプチドプローブを、スクレイピーのヒツジ、末期のヒツジおよび正常のヒツジから得た血清より調製した試料と接触させ、得られる蛍光を上記のように測定する。(血清に組織調製法を取り入れて、試料をGrosset et al., Peptides 26: 2193-200 (2005)に記述のように調製する)。図7は、ペプチドプローブが、感染ヒツジ由来の血清中PrP^{Sc}と反応し、正常ヒツジ由来の血清と反応しなかったことを図示する。図中、「HP1」は3ヶ月齢の健常ヒツジのプール血清由来試料を指し; 「HP2」は2歳齢の健常ヒツジのプール血清由来試料を指し; 「In1」から「In4」は18~24ヶ月齢のスクレイピーのヒツジ由来血清を指し、および「In5」は末期のヒツジ由来の血清を指す。これらのデータから、ペプチドプローブがこのアッセイ法において100%の感度および特異性を示し、ヒツジ血中のPrP^{Sc}を的確に検出したことが実証される。

【0355】

別のアッセイ法において、上記のヒツジ血清試料をペプチドプローブとの反応の前に超音波処理した。図8は、超音波処理が「正常」試料中のバックグラウンドを下げることによりシグナル対ノイズ比を改善したことを図示する。図8は感染試料の、年齢を適合させた、2歳齢の動物由来正常プール(HP2)対3ヶ月齢の動物由来プールとの良好な差異も図示する。

【0356】

実施例7: ヒツジ白血球層、血清および血漿中のPrP^{Sc}の検出

PrP^{Sc}に特異的なペプチドプローブ(SEQ ID NO:43)を次のように、ヒツジ血液成分中のPrP^{Sc}を検出するために用いる。ピレン標識ペプチドプローブを感染(スクレイピー)および正常(健常)ヒツジ由来の白血球層、血清、および血漿試料と接触させ、得られる蛍光を上記のように測定する。図9は、ペプチドプローブが白血球層 > 血清 > 血漿の順でヒツジ血液成分と相対反応性を示すことを図示する。

【0357】

実施例8: A ペプチドプローブの特定

A ペプチドプローブを次のように特定する。A に特異的なペプチドプローブ(SEQ ID NO:36)およびGFPを含む、融合タンパク質を構築する。(i) A 42 (SEQ ID NO:42)およびGFP、または(ii) A 42変異体クローンGM6 (SEQ ID NO:44)およびGFPを含む、参照融合タンパク質を構築する。タンパク質を発現させ、GFP蛍光を上記のように検出する。図10に示すように、A 42-GFP融合タンパク質は、A 42部分の素早い凝集によって蛍光に必要なGFP部分の適切な折り畳みが阻止されるので、ほとんど蛍光を示さない。対照的に、変異体-GFP融合タンパク質は、GM6がA 42の緩徐な折り畳み変異体であるので、高レベルの蛍光を示す。すなわちGM6部分は、蛍光に必要なGFP部分の折り畳みを等しく妨げることがない。ペプチドプローブ-GFP融合タンパク質は中レベルの蛍光を示し、ペプチドプローブ部分がGFPの折り畳みを中レベルで妨げることが示唆される。これらのデータから、A ペプチドプローブ(SEQ ID NO:36)が、A ペプチドの凝集に影響を及ぼす作用物質を特定する方法において有用であることが示唆される。

【0358】

10

20

30

40

50

実施例9: A オリゴマーに対するA ペプチドプローブの特異性

A に特異的なペプチドプローブ(SEQ ID NO:36)を、A 40およびA 42の特定の構造型を検出するために用いる。ペプチドプローブをピレンにより各末端の位置で標識する。このペプチドプローブを、A 42オリゴマー、A 40オリゴマーおよびA 40モノマーを含んだ異なる試料と接触させる。

【0359】

上記の方法論を用いて、チオフラビンT結合によりおよび円偏光二色性によりA タンパク質の形態学的状態を測定する。例えば、ペプチドを円偏光二色性測定のため30%のTFE/Tris中で成長させ、CDPROデコンボリューションソフトウェアを二次構造計算に用いる(CelIcon II (Freeware), Robert Woody, Colorado State University)。標識ペプチドプローブは18.3%のヘリックス構造、27.6%の鎖(シート)構造、および54.1%のターン/不規則構造を示す。ペプチドプローブは19.4%のヘリックス構造、25.1%の鎖(シート)構造、および55.5%のターン/不規則構造を示す。A 42線維は12.6%のヘリックス構造、60.2%の鎖(シート)構造、および27.2%のターン/不規則構造を示す。A 40線維は、5.6%のヘリックス構造、58.4%の鎖(シート)構造、および35.9%のターン/不規則構造を示す。A 42のオリゴマー(ダイマー、トリマー、テトラマー、ヘキサマーおよび12-merを含む)の試料は、3.2%のヘリックス構造、52.7%の鎖(シート)構造、および45.4%のターン/不規則構造を示す。

10

【0360】

ペプチドプローブと試料との間の相互作用を350 nmの励起および360~600 nmの蛍光の走査によって検出する。ペプチドプローブは、A 40線維およびオリゴマーならびにA 42線維およびオリゴマーと用量依存的に反応するが、A 40モノマーと用量依存的に反応しない。図11A (線維およびモノマー)ならびに11B (オリゴマー)。これらのデータから、ペプチドプローブがA 40およびA 42のオリゴマー型に選択的に結合することが、明らかである。

20

【0361】

実施例10: ヒトCSF試料中でのA ペプチドの検出

A に特異的なペプチドプローブ(SEQ ID NO:36)を、アルツハイマーの患者から得たおよび年齢を適合させた健常患者から得たヒト脳脊髄液(CSF)試料中のA 40およびA 42を検出するために用いる。ペプチドプローブをピレンにより各末端の位置で標識する。CSF試料40 μ Lを、2 μ Mのペプチドプローブとともにインキュベートし、350 nmでの励起および360~600 nmの蛍光の走査の前に、1時間インキュベートさせる。データをモノマー領域(370~385 nm)に対するエキシマー領域(430~530 nm)の比として図12に示す。ペプチドプローブはアルツハイマーの患者(黒)を、年齢を適合させた健常患者(白)から層別化することができる。図12に示す結果はp値 = 0.0005を有する。図12Aは各患者に対するデータを示し、その一方で図12Bは各患者群に対する平均データを示す。抗体に基づく市販のキット(Biosource ELISA, Invitrogen)を用いA タンパク質について患者試料を同様にアッセイしたが、そのアッセイ法ではA タンパク質が検出されず、ペプチドプローブは感受性が高いことを示唆している。

30

【0362】

磁気ビーズに固定化されている、A に特異的なビオチン化ペプチドプローブ(SEQ ID NO:36)ならびにアルツハイマーの患者および年齢を適合させた健常患者由来の血清試料200 μ Lを用いて類似のアッセイ法を行う。ビオチン化ペプチドプローブは、ストレプトアビジンでコーティングされているDynal磁気ビーズに固定化される。これらのビーズを1時間血清試料とともに直接的にインキュベートし、その後、磁気ビーズおよび捕捉された材料をプルダウンして血清試料を除去する。その後、40%のトリフルオロエタノール:60%の10 mM Tris, pH 7.4中で予め平衡化した2 μ M濃度のジピレン標識ペプチドプローブ(SEQ ID NO:36) 200 μ Lをビーズおよび捕捉された材料に直接添加し、さらに3~5時間インキュベートさせた後に、磁気ビーズをプルダウンし、上記の分析のために液体をマイクロタイタープレートに移す。

40

50

【0363】

ペプチドプローブはアルツハイマーの患者(黒)を、年齢を適合させた健常患者(白)から層別化することができる。図13に示す結果は0.045のp値を有する。抗体に基づく市販のキット(Biosource ELISA, Invitrogen)を用いA タンパク質について患者試料を同様にアッセイしたが、そのアッセイ法ではA タンパク質が検出されず、ペプチドプローブは感受性が高いことを示唆している。

【0364】

実施例11: A プラークの標的化

以下は、ペプチドプローブがインビトロでもインビボでもともにA プラーク(例えば、アルツハイマー病に関連するA タンパク質の不溶性自己凝集体)を標的化する能力を例証する。A に特異的なかつピレンにより各末端の位置で標識したペプチドプローブ(SEQ ID NO:36)を用いる。

10

【0365】

LondonおよびSwedish突然変異の有るヒトAPP751 (hAPP751_{SL})を過剰発現するトランスジェニックマウスから得た脳切片に対して、インビトロ試験を行う。このタンパク質は、トランスジェニックマウスにおいて神経炎性プラークを形成するA 変異体である。非トランスジェニック同腹子マウス由来の組織を対照組織として役立てた。

【0366】

異なる二種の組織スライス、つまりクリオカットした(凍結し、スライスした)もの、およびパラフィン包埋し、スライスしたものを評価する。ペプチドプローブを脳スライス上でインキュベートし、脳との、具体的には、アミロイド沈着/プラークとのペプチドプローブの結合を定性的に評価する。参考のため、連続的なスライスを抗A 抗体、6E10抗体またはチオフラビンSで免疫組織化学的に染色する。抗A 対照の使用により、神経炎性プラークに対する染色の特異性が確認される。

20

【0367】

備え付けのPixelFlyカメラを有するNikon E800顕微鏡にて画像を記録する。タイル画像の記録の場合、顕微鏡に、StageProソフトウェア制御の自動テーブルを装備する。ペプチドプローブ染色ならびに抗体およびチオフラビンS染色の画像を、それぞれ、Adobe Photo Shopソフトウェアの中で重ね合わせる。

【0368】

0.5 ml/mg濃度のペプチドプローブにより、パラフィンまたはクリオカットの両スライス上で、プラーク特異的な染色が明らかである。連続的なスライスからの抗体染色像を重ね合わせることで、パラフィンスライスに対する染色はクリオカットスライスに対する染色よりもプラークに特異的であることが明らかになった。後者の試料では、海馬のニューロン層由来の細胞が顕著であり、皮質中のプラーク周囲の脳組織も顕著である。したがって、染色の質はパラフィン切片に対していっそう良好でありうる。神経炎性プラークを染色することに加えて、ペプチドプローブは同様に、hAPP751_{SL}トランスジェニックにおいて典型的に存在する、ヒトアミロイドペプチドを含んだ血管を特異的に染色した。

30

【0369】

インビボ試験では10ヶ月齢のホモ接合性hAPP751SLトランスジェニックマウス4匹および同腹子対照(トランス遺伝子を保有しない同胞種) 4匹を用いる。予定した30分の投与間隔を、処置後の動物の状態に応じて調整しながら、一投与あたり液体10 μ lで(0.1~2.0 mg/mlの濃度で)、標識ペプチドプローブを鼻腔内に投与する。

40

【0370】

処置の終わった時点で、マウスを殺処理し、CSFおよび脳を抽出する。(全てのマウスを標準的な吸入麻酔、イソフルラン、Baxterにより鎮静させる)。

【0371】

脳脊髄液を大後頭孔の鈍的切開および露出によって得る。露出後、パストゥールピペットを大後頭孔中0.3~1 mmのおおよその深さに挿入する。流れが完全に止まるまで、吸引および毛細管作用によりCSFを回収する。CSFをすぐに凍結し、使用するまで-80 で保管し

50

た。

【0372】

CSF試料採取の後に、胃、胃内容物および脳を素早く取り除く。脳を二等分し、全マウスの右脳を室温で1時間、新たに作出した4%パラホルムアルデヒド/PBS (pH 7.4)中にて浸漬固定し、24時間15%スクロース/PBS溶液に移して、凍結保護を確実にする。その後、脳を翌日に液体イソペンタン中で凍結し、組織学的検査に用いるまで-80 で保存する。もう一方の脳半分を後で使うために液体イソペンタン中で素早く衝撃凍結する。

【0373】

最高用量のペプチドプローブで処置したトランスジェニックマウスからの、ならびに対照マウスからのおよびトランスジェニック媒体対照(例えば、ペプチドプローブに用いた希釈剤)からの画像を記録して、ペプチドプローブが血液脳関門(BBB)を通過することを確認するが、実際、ペプチドプローブは血液脳関門を通過する。

10

【0374】

ペプチドプローブによる染色の特異性を評価するため、顕微鏡のUV-2AおよびB-1Eフィルタを用い蛍光を励起して、より低いスペクトルにおいて起こりうる自己蛍光を検出する。連続的スライスにおいて蛍光部分を記録して、不純物(例えば、ほこり)が蛍光を引き起こしていないことを確実にする。トランスジェニックのスライスをチオフラビンSで染色して、プラーク負荷を評価する。

【0375】

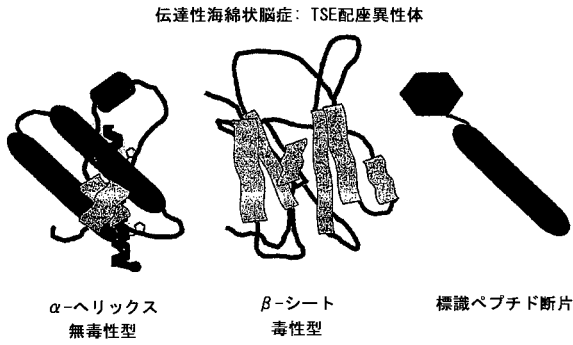
上記のように、hAPP751_{SL}トランスジェニックマウスは脳辺縁中のある種の血管においてhAPPを発現する。ペプチドプローブは、脳内の血管外側のアミロイドおよび集塊物に結合する。非トランスジェニックマウスにおいて、ペプチドプローブは嗅球に達するが、特定できる形態学的構造に結合しない。

20

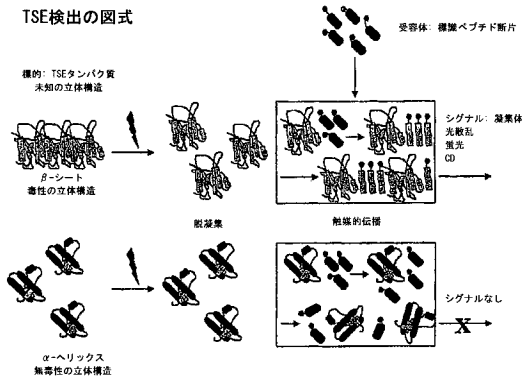
【0376】

本発明の範囲または趣旨から逸脱することなく、本発明の実践においてさまざまな変更および変形がなされてもよいことは当業者には明らかであろう。本発明の他の態様は、本発明の明細および実践の考慮から当業者には明らかであろう。本明細書および実施例は例示のみとみなされるべきであり、発明の真の範囲および趣旨は、以下の特許請求の範囲によって示されることが意図される。

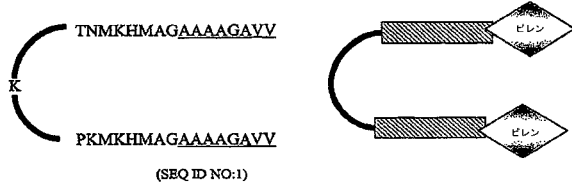
【 図 1 】



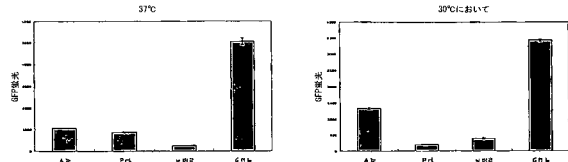
【 図 2 】



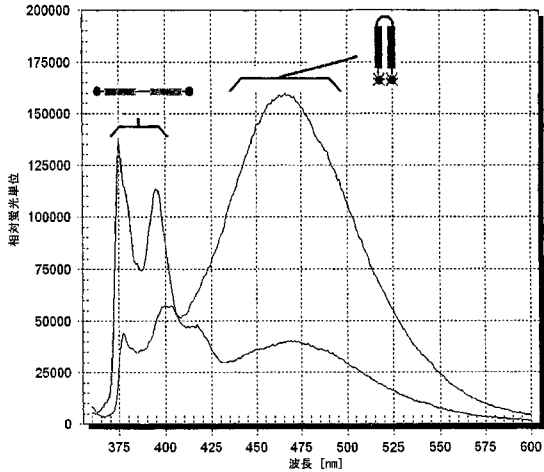
【 図 3 】



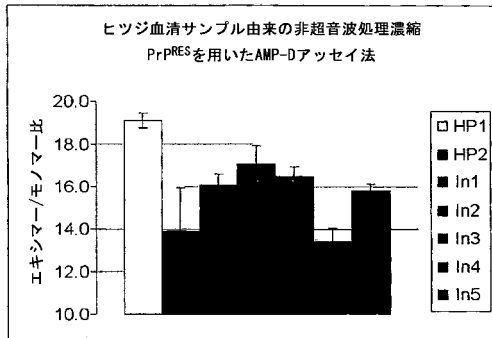
【 図 4 】



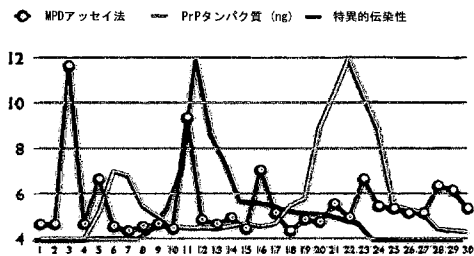
【 図 5 】



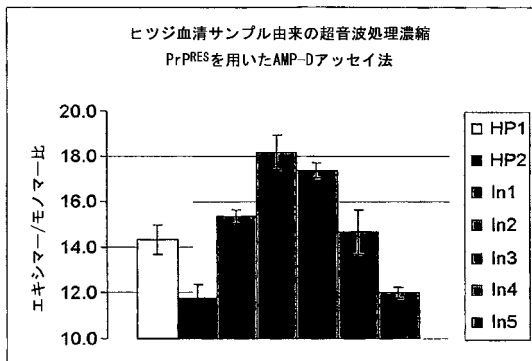
【 図 7 】



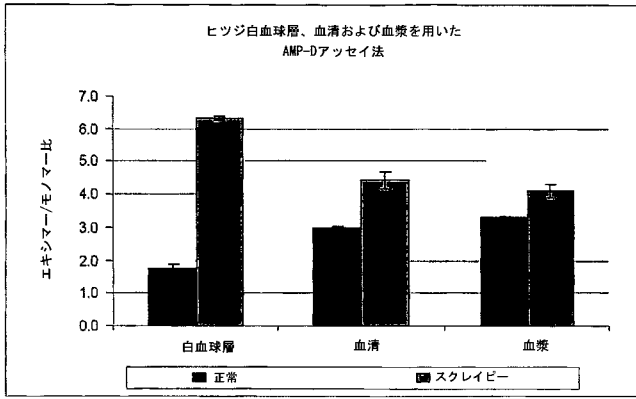
【 図 6 】



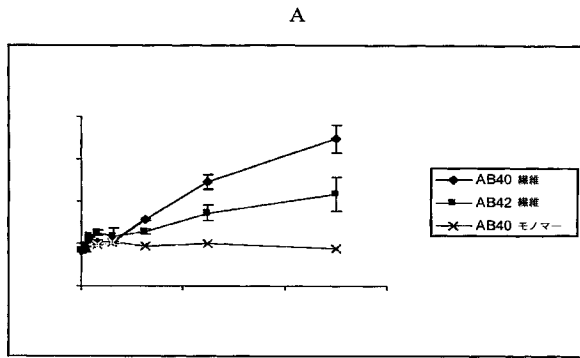
【 図 8 】



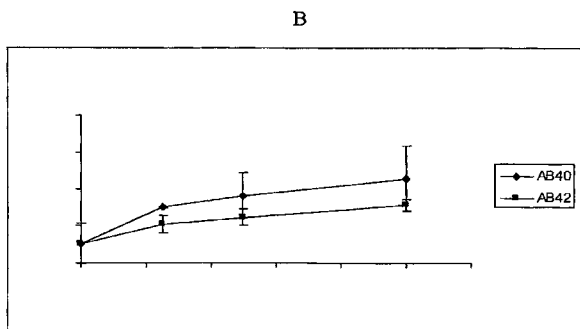
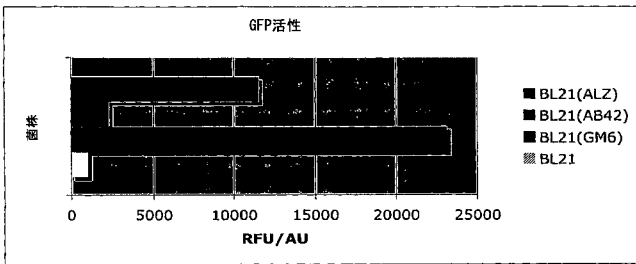
【 図 9 】



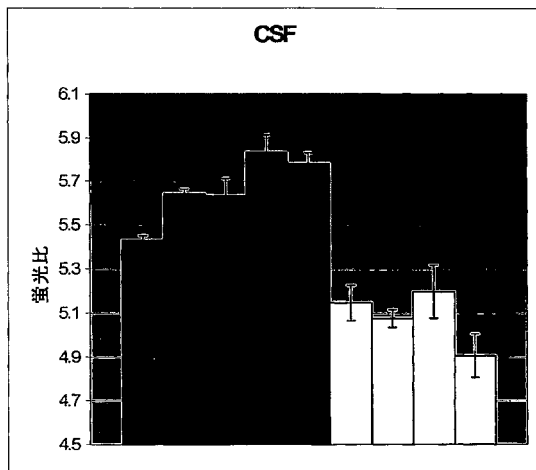
【 図 1 1 】



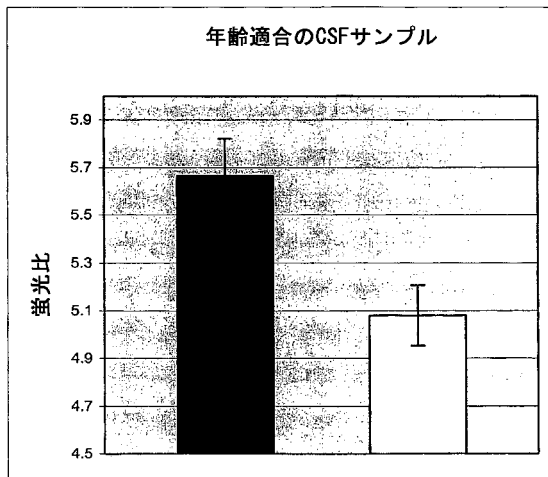
【 図 1 0 】



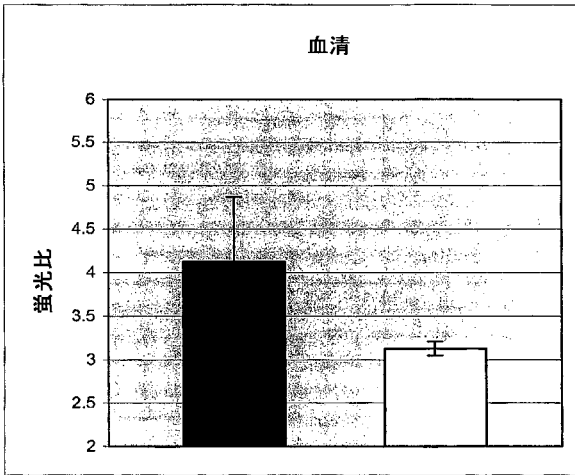
【 図 1 2 A 】



【 図 1 2 B 】



【图 13】



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 31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 K	47/48	
C 0 7 K 14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	

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

(74) 代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(72) 発明者 シバプラサド シャンカーラマ

アメリカ合衆国 メリーランド州 ゲイサーズバーグ ウェストサイド ドライブ 309 アパートメント 302

(72) 発明者 ルドッフ アラン

アメリカ合衆国 メリーランド州 ポトマック サウス グレン ロード 11305

(72) 発明者 オーサー シンディー エス.

アメリカ合衆国 バージニア州 マクリーン リッジ ドライブ 915

(72) 発明者 ウェガジン レネー

アメリカ合衆国 ワシントン ディーシー ダンカン プレイス ノースイースト 1221

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA20 DA36 FB03 FB07 FB15

4C076 CC01 CC41 EE41 EE59 FF67

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 EA50 FA74 GA21

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2010502938A5	公开(公告)日	2011-02-03
申请号	JP2009521822	申请日	2007-07-26
申请(专利权)人(译)	埃迪人寿股份有限公司		
[标]发明人	シバプラサドシャンカーラマ ルドッフアラン オーサーシンディーエス ウェガジンレネー		
发明人	シバプラサド シャンカーラマ ルドッフ アラン オーサー シンディー エス. ウェガジン レネー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50 A61K47/42 A61P25/28 A61P31/00 A61K47/48 C07K14/47		
CPC分类号	A61P25/28 A61P31/00 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2500/00 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/15.Z G01N33/50.Z A61K47/42 A61P25/28 A61P31/00 A61K47/48 C07K14/47		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB15 4C076/CC01 4C076/CC41 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF67 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA21		
代理人(译)	清水初衷 小林智彦 渡边真一 井上隆一 正人大关		
优先权	60/833854 2006-07-28 US 60/848358 2006-10-02 US		
其他公开文献	JP2010502938A JP5097206B2		

摘要(译)

公开了可用于诊断和治疗与构象改变的蛋白质有关的多种疾病的试剂和方法。所述试剂和方法可用于鉴定和递送可用于治疗与构象改变的蛋白质有关的疾病的药物。