

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 Q 1/37		C 1 2 Q 1/37	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 25/16		A 6 1 P 25/16	4 B 0 6 3
25/28		25/28	4 C 0 8 4
C 1 2 N 9/99		C 1 2 N 9/99	
審査請求 未請求 予備審査請求（全 45数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 532104(P2001 - 532104)	(71)出願人	スミスクライン ビーチャム パブリック リミテッド カンパニー SM I T H K L I N E B E E C H A M P . L . C . イギリス国 ティダブリュ8 9ジーエス,ミ ドルセックス,ブレントフォード,グレート ウェスト ロード 980
(86)(22)出願日	平成12年10月19日(2000.10.19)	(74)代理人	弁理士 青山 葆 (外 2 名)
(85)翻訳文提出日	平成14年4月22日(2002.4.22)		
(86)国際出願番号	PCT/GB00/04039		
(87)国際公開番号	W001/029563		
(87)国際公開日	平成13年4月26日(2001.4.26)		
(31)優先権主張番号	9924957.5		
(32)優先日	平成11年10月21日(1999.10.21)		
(33)優先権主張国	イギリス(GB)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 A S P 2 の阻害剤のスクリーニング方法

(57)【要約】

A s p 2 が介在するポリペプチドまたは蛋白基質の切断を阻害する化合物を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、A s p 2 および基質を含む反応系を提供し；試験化合物不在下での切断の程度と比較した試験化合物の存在下での基質の切断の程度を測定することを特徴とする方法、およびそれにより同定される化合物、ならびにA s p 2 制御のA P P 切断の阻害剤である化合物およびA Dを含むβアミロイド蛋白に関連する疾患の治療または予防を包含する治療におけるそれらの使用。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Asp2が介在するポリペプチドまたは蛋白基質の切断を阻害する化合物を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、Asp2および基質を含む反応系を準備し、試験化合物の存在下での基質の切断の程度を試験化合物の不存在下での切断の程度と比較して測定することを含む、方法。

【請求項2】 基質がAPPスウェーデン変異体配列（P6からP5'まで）のベータ-セクレターゼ切断部位にスパンニングするペプチドである、請求項1記載の方法。

【請求項3】 基質が：

Ile-Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Argであり、種々の蛍光フォーマットに使用するのに適する基質を得るためにQ-タグで蛍光的に標識されていてもよい、請求項2記載の方法。

【請求項4】 Asp2および基質をコードするDNAを含有する発現ベクターで同時トランスフェクトされる宿主細胞を含む細胞を基礎とするアッセイであり、基質フラグメントに拮抗して生じるポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いて宿主細胞の蛋白含量をアッセイすることによって切断産物の存在を検出する、上記した請求項いずれかに記載の方法。

【請求項5】 適当な反応緩衝液中、Fc融合部としてであってもよい精製された組換えAsp2、および基質を含む無細胞アッセイであり、基質の切断を免疫アッセイによるか、あるいは直接的または間接的にシグナルの制御の結果により測定する、請求項1ないし3のいずれか1項記載の方法。

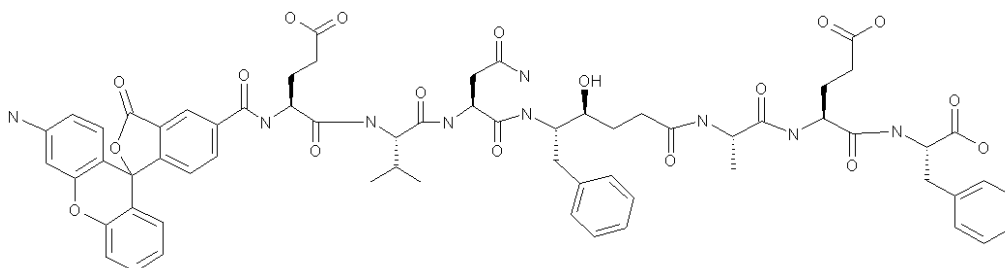
【請求項6】 Asp2が介在するポリペプチドまたは蛋白基質の切断を阻害する化合物を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、Asp2および活性部位の標識されたりガンドを含む反応系を準備し、試験化合物の存在下での標識リガンドの結合の程度を試験化合物の不存在下での標識リガンドの結合の程度と比較し、結合アフィニティーを測定することを含む、方法。

【請求項7】 リガンドについてのアッセイ方法が並進または旋回拡散を基礎とする、請求項6記載の方法。

【請求項8】 アッセイ方法が蛍光偏光法（F P）を基礎とする、請求項7記載の方法。

【請求項9】 標識されたりガンドが、式（I I I）：

【化1】



（I I I）

で示される化合物である、請求項8記載の方法。

【請求項10】 請求項1ないし9のいずれか1項に記載の方法により同定される化合物。

【請求項11】 治療にて用いられる請求項10記載の化合物。

【請求項12】 請求項10記載の化合物および医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項13】 A s p 2 制御のA P P 切断を阻害するための医薬の製造における請求項10記載の化合物の使用。

【請求項14】 β アミロイド蛋白関連疾患の治療または予防用医薬の製造における請求項10記載の化合物の使用。

【請求項15】 有効量の請求項10記載の化合物を患者に投与することを含む、A s p 制御のA P P 切断の阻害方法。

【請求項16】 β アミロイド蛋白関連疾患の治療または予防方法であって、有効量の請求項10記載の化合物を患者に投与することを含む、方法。

【請求項17】 A s p 2 制御のA P P 切断の阻害剤である、化合物。

【請求項18】 β アミロイド蛋白関連疾患を治療するための医薬の製造における請求項17記載の化合物の使用。

【請求項19】 β アミロイド蛋白関連疾患の治療または予防方法であって、有効量の請求項17記載の化合物を投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は治療において有用である可能性のある化合物を同定するのに用いられるアッセイに関する。本発明はまた治療にてポリペプチドを切断するモジュレーターの使用に関する。

【0002】**(従来技術)**

β アミロイド ($A\beta$) 蛋白関連疾患は、 $A\beta$ 蛋白の不溶性沈殿物が脳内に沈殿することにより特徴付けられる、一群の異種の障害である (Roberts G W、Leigh P N および Weinberger D. Neuropsychiatric Disorders. Gower Medical Press. London 1993)。実質的な数の $A\beta$ 蛋白が沈殿した結果、認識力が低下し、痴呆が向上する臨床的症候群が出現する。かかる沈殿物は多くの痴呆性症候群に存在することが知られており、これらの症候群としてアルツハイマー病、皮質レビ小体病、パーキンソン病およびダウン症候群の患者におけるアルツハイマー型疾患が挙げられる。加えて、 $A\beta$ 沈殿物は血管疾患および脳血管疾患の患者の脳にも存在し (Adams J H および Duchon L W (編) Greenfields Neuropathology 第5版、Edward Arnold、London 1992)、これらの後者の症状は上記した疾患に罹患しやすくするか、またはその原因となりうる。

【0003】

アルツハイマー病 (AD) は、臨床的には痴呆により、神経病理学的には多数の老人斑および神経原線維タanglesの存在により特徴付けられる中枢神経系の進行性消耗性疾患である。ADは、典型的には、老人の後期発症性疾患である。しかしながら、この疾患の早期発症形態が年齢に依存した浸透率で常染色体性優性遺伝子として遺伝する家系がわずかながら報告されている。該疾患を発症する年齢は60歳より下であることが最も一般的である。遺伝子は早期および後期発症ADの両方に関与している。

脳における39-43残基のアミロイド- β 蛋白の生成および沈殿 ($A\beta$ 、Glennner, G.G. & Wong, C.W. Biochem. Biophys. Res. Commun. 120、885-890

(1984))はADの不変的神経病理学的特徴である。A β は、まず β -セクレターゼ、ついで γ -セクレターゼの連続的作用により、1型インテグラル膜から糖蛋白であるアミロイド先駆体蛋白(A β P β)が切断されることで産生される(Selkoe, D.J. Annu. Rev. Cell. Biol. 10、373-403(1994))。

【0004】

A β P β は α -または β -セクレターゼにより細胞中で切断することができ、その結果、該蛋白の可溶性N-末端フラグメント(sA β P β α およびsA β P β β)が遊離する。得られた膜アンカーのC-末端フラグメント(CTF α およびCTF β)が γ -セクレターゼの基質であり；CTF α を切断すると3kDaのペプチドp3が生じ、CTF β の切断でA β ペプチドが生じる。 β -セクレターゼの切断事象は、粗面小胞体およびトランス-ゴルジ網を含む、数種の細胞内オルガネラ内で生じることが明らかにされている(Hartmann.ら、Nature Medicine. 3、1016-1020(1997)；Cook, D.G.ら、Nature Medicine. 3、1021-1023(1997)；Wild-Bode, C.ら、J. Biol. Chem. 272、16085-16088(1997))。A β はその分泌前に細胞内で遅い速度で生成され、時間と共に培養細胞に蓄積するA β の神経内プールが報告されている(Skovronsky, D.M.、Doms, R.W. & Lee, V.M.-Y.、J. Biol. Chem. 141、1031-1039(1998))。

【0005】

A β P β の工程に関与するセクレターゼは同定されていないが、阻害剤の研究により、 α -セクレターゼはメタロプロテイナーゼであることが示唆されている(Parvathy, S.、Hussain, I.、Karran, E.H.、Turner, A.J. & Hooper, N.M.、Biochemistry 37、1680-1685(1998))。 β -セクレターゼの多くの候補体が提案されており、例えば、プロテアソーム(Ishiura, S.、Tsukahara, T.、Tabira, T. & Sugita, H.、FEBS Lett. 257、388-392(1989))、メタロプロテイナーゼチメット(McDermott, J.R.、Biggins, J.A. & Gibson, A.M.、Biochem. Biophys. Res. Commun. 185、746-752(1992))、数種のチモトリプシン様セリンプロテイナーゼ(Nelson, R.B.、Siman, R.、Iqbal, M.A. & Potter, H.、J. Neurochem 61、567-577(1993)；Sahasrabudhe

,S.R.ら、J.Biol.Chem. 268、16699-16705(1993); Savage, M.J.ら、Neuroscience 60、607-619(1994)、メタロプロテイナーゼMP78(Thompson,A.、Grueninger-Leitch,F.、Huber,G. & Malherde P.、Brain Res. 48、206-214(1997))およびMP100(Huber,G.ら、J.Neurochem. 72、1215-1223(1999))ならびにカテプシンD(Ladror,U.S.、Snyder,S.W.、Wang,G.T.、Holzman,T.F. & Krafft,G.A.、J. Biol.Chem. 269、18422-18428(1994))などが斟酌されている。最近では、プレセニリン-1が γ -セクレターゼに対する独特なジアスパルチル共同因子であるか、または γ -セクレターゼその物であると報告されている(Wolfe,M.S.ら、Nature. 398、513-517(1999))。WO96/40085は、ヒト脳組織およびヒト293細胞から単離した、ゲル排除クロマトグラフィーで測定した場合に260kDaないし300kDaの範囲にある見かけ分子量の、 β -セクレターゼ候補体を提案している。

【0006】

Asp2(エンドクレプシン2としても知られている)は、脳および脾臓において高レベルでの発現を示す、貫膜アスパルチルプロテイナーゼである(EP0855444)。その後、130位の残基は、EP0855444(Hussain,I.ら、Molec.Cell.Neuosci, 14、419-427(1999))に記載されるようにグルタミン酸ではなく、バリンであることがわかった。細胞中に一時的にトランスフェクトさせた後に、ゲル電気泳動により測定した場合、プロテイナーゼの分子量は60-65kDaである。成熟形態のAsp2は残基Glu46から始まる(Sinha.S.ら、Nature 402、537-540(1999))。スプライス変異体もまた見つかった(WO00/17369)。

Gloshらは、J.Amer.Chem.Soc. (2000)122、3522-3523において、OM99-2(Glu-Val-Asn-Leu*Ala-Ala-Glu-Phe、ここで*はヒドロキシエチレン遷移状態のアイソスターを示す)を含む、メマプシン2(Asp2)の阻害剤を開示する。

【0007】

本発明はAsp2がAPPの β -セクレターゼ切断経路にて機能するという

知見に基づくものである。プロテイナーゼは、それがADの脳を含む、脳に存在し、A β を産生することが知られている細胞系にて見出されており、751アミノ酸のAPPのイソ型を安定して発現する細胞のゴルジ/小胞体にてAPPと共に局在化している点で、 β -セクレターゼの予想される多くの特徴を有する。加えて、Asp2は触媒性ドメインを有するI型インテグラル膜蛋白であり、膜オルガネラのルーメンに存することもわかった。Asp2のAPP発現細胞へのトランスフェクションは細胞における β -セクレターゼ活性の増加をもたらし、その結果、sAPP β が培地に分泌され、C-末端フラグメント由来の β -セクレターゼが蓄積される。提案されているAsp2の触媒性アスパルチル残基が成熟すると、APPの β -セクレターゼ切断の特徴であるこれらフラグメントの産生がなくなる。これらの知見はAsp2の蛋白分解活性を阻害することが、アルツハイマー病を含む、 β アミロイド蛋白-関連疾患の治療に関する療法において有用である可能性があることを示唆する。

【0008】

したがって、本発明は、ポリペプチドまたは蛋白基質のAsp2介在切断を阻害する化合物を同定するために化合物をスクリーニングする方法であって、Asp2および基質を含む反応系を準備し、試験化合物の存在下での基質の切断の程度を試験化合物の不存在下での切断の程度と比較して測定することを含む、方法を提供する。本発明はまたそれにより同定された化合物ならびにADを含め β アミロイド蛋白関連の疾患の治療または予防を含む療法におけるその使用に関する。

基質はAsp2酵素により加水分解されうる蛋白またはペプチドである。これは非特異的蛋白基質であってもよく、例えば、カゼイン、ヘモグロビン、インスリンB-鎖、チトクロムCなどである。それはまた、全長の組換え体または末端切断したアミロイド先駆体蛋白である。基質はまたペプチドであってもよく、より大きな蛋白の合成フラグメントであることも多い。例えば、APPの β -セクレターゼ切断部位に広がるペプチドは都合のよい基質として供することができ、野生型 β -部位配列(P6からP5'まで、Berger, A. & Schechter, I. Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol.] 257, 249-264 (1970))

Ile-Ser-Glu-Val-Lys-Met-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg (配列番号1)

またはスウェーデン変異体配列 (P6からP5'まで)

Ile-Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg (配列番号2)

または野生型またはスウェーデン変異体配列のより小さなもしくはより大きなペプチド、およびこれらの配列を基礎とする他の変異体を含む、このペプチドを用いることができるかもしれない。

【0009】

Asp2基質配列をコードするように修飾された大きな蛋白もまたスクリーニングのための有用な基質として供することができる。例えば、マルトース結合蛋白(MBP)をそのC-末端で野生型またはスウェーデン変異体のβ-部位配列をコードするように修飾し、

マルトース結合蛋白 - Ile-Ser-Glu-Val-Lys-Met-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg
(野生型β-部位) (配列番号3)

マルトース結合蛋白 - Ile-Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg
(スウェーデン変異体β-部位) (配列番号4)

を産生することができる。

【0010】

これらをさらにC-末端Q-タグ(Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Gly-Pro (配列番号5))をコードするように修飾し、

マルトース結合蛋白 - Ile-Ser-Glu-Val-Lys-Met-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Gly-Pro (野生型β-部位) (配列番号6)

マルトース結合蛋白 - Ile-Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Gly-Pro (スウェーデン変異体β-部位) (配列番号7)

を産生することができる。

【0011】

これらの蛋白をQ-タグを介して蛍光標識し、種々の蛍光フォーマットでの使用に適する基質を形成することができる。

該アッセイは、WO 96 / 4 0 8 8 5 に記載されるような、従来のアッセイフォーマットを用いる無細胞または細胞を基礎とする反応系にて行うことができる。

本発明において使用される A s p 2 酵素として、スプライス変異体を含むイソ形態が挙げられる。

細胞を基礎とするアッセイは、A s p 2 および基質をコードする DNA を含有する発現ベクターでの同時トランスフェクションを含むであろう。

切断産物の存在は、基質フラグメントに拮抗して産生されるポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いることによって宿主細胞の蛋白含量を検定することにより検出することができる。いずれか適当な配置の免疫アッセイ、例えば、ウェスタンブロットアッセイまたは E L I S A を利用してもよい。

【 0 0 1 2 】

無細胞アッセイは、適当な反応緩衝液中に、所望により F c 融合部としてであってもよい精製された組換え A s p 2 および基質を含むであろう。該酵素は優勢的に成熟形態であることが好ましい。

該酵素は蛋白 A アフィニティークロマトグラフィーを用いる精製を容易にするために F c 融合部として存在してもよい。この F c 融合部はヒト I g G から誘導されるのが適当である。

【 0 0 1 3 】

無細胞アッセイにおいて、その切断産物は上記したようにイムノアッセイにより検出することができる。また、ペプチド基質は、切断部位をはさんで広がる、一対のマーカース基を含有していてもよい。切断によりマーカースを分離し、これらのマーカースの同時局在化を反映する技法を用いて検出することができる。検出は 2 つのマーカースの間にある視覚的相互作用によるものであってもよく、あるいはより一般的には、基質での同時局在化によるシグナル発生であってもよい。視覚的相互作用を基礎とする技法は、Forster 理論により説明されるように、蛍光エネルギー移動 (F Q) および冷光エネルギー移動 (Selvin および Hearst、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、1994、91、10024) を包含する。並進または巡回拡散の変化を基礎とするアッセイは、蛍光相関的分光法 (F C S) (Eigen およ

びRigler、Proc.Nat.Acad.Sci.USA、1994、91、5740)および蛍光偏光法(FCS)(fluorescence polarisation)(Levineら、Anal Biochem.、1997、247、83)を包含する。放射活性を基礎とするアッセイはシンチレーション近接アッセイおよびニトロセルロース濾過技法を包含する。表面吸収技法は、吸収、蛍光、化学ルミネセンスまたは時間分解蛍光(TRF)検出のいずれかを用いる免疫アッセイを包含する(Wallac Oy、フィンランド)。

【0014】

このように、基質の切断は、直接的または間接的に、シグナル、例えば放射活性、冷光または蛍光シグナルの調節をもたらす。

あるマーカー基はシグナルジェネレーターを有し、あるいは別個のレポーターシステムとの結合能を有する。レポーターシステムそれ自体がシグナルジェネレーターを有していてもよく、あるいはさらなるシグナルジェネレーターに結合してもよい。他のマーカー基がモジュレーターとして機能し、あるいは結合した複合体それ自体が分子との結合能を有し、その結果、モジュレーターとして機能する。

シグナルジェネレーター基として、例えば、放射活性、冷光(三重項状態発光)および蛍光(一重項状態発光)標識が挙げられる。

【0015】

別個のレポーターシステムとの結合能を有するマーカー基として、例えば、抗体、酵素および受容体についてのリガンドが挙げられる。抗体、酵素または受容体のレポーター系はその自体を標識するか、免疫アッセイにて関連付けることができる。かかるリガンドの適当な例は、抗-ジニトロフェノール抗体で捕獲され、つづいて適当な免疫アッセイで検出することのできるジニトロフェノールである。

モジュレーター基として、例えば、標識および部分が基質と共有結合するかまたは非共有結合した場合に、蛍光または冷光標識の光学特性あるいは全体としての基質の光学特性を調節する部分が挙げられる。基質を蛋白分解性切断に付した後、標識の、または全体としての分子の光学特性を蛋白分解活性を分光学的にモニター観察できるように調節する。

【0016】

モジュレーターとして機能することのできる、あるいは分子と結合し、モジュレーター複合体を形成することのできる基として、例えば、ストレプトアビジンまたはアビジンとの結合能を有するビオチンリガンドなどの蛋白用のリガンド、または溶液のまたは固定されていない抗体用のハプテンが挙げられる。ビオチンリガンドは、適当なリンカー基、例えばアミノヘキサノイルで誘導されていてもよいビオチンを包含する。

シグナルジェネレーター基および蛍光シグナルジェネレーターの光学特性を調節する他のモジュレーター基として、フルオロホル（吸収および蛍光スペクトルの範囲を示す分子ファミリー）、例えばクマリン、キサンテン（ローダミン、ロードールおよびフルオレセインを含む）、フルオレスカミン誘導体、ナフタレン、ピレン、キノリン、レソルフィン、ジフルオロボラジアザインダセン、アクリジン、ピリジルオキサドール、イソインドール、ダンシル、ダブチル、ダブシル、ベンゾフラニル、フタルイミド、ナフタールイミドおよびフタル性ヒドラジド（ルミノールおよびイソルミノールを含む）が挙げられる。

【0017】

適当な標識/モジュレーター対として、例えば、従来の蛍光エネルギー移動またはクエンチされた蛍光（FQ）の供与/受容体システム、例えばローダミン/ローダミン、特にローダミングリーン/テトラメチルローダミン、フルオレセイン/クマリン、5-ジメチルアミノ-1-ナフタレンスルホニル（DANSYL）/4-（4'-ジメチルアミノフェニルアゾ）安息香酸（DABCYL）または5-（2-アミノエチル）アミノナフタレン-1-スルホン酸（EDANS）/DABCYLが挙げられ、それにより受容体の吸収スペクトルが供与体の発光スペクトルと重なり、Forster（1948）理論に従って、ペプチドが切断されるとエネルギー移動の変化が観察される。

FQを用いて検出する場合、対となるマーカー基は、組み合わせEDANS/DABCYLおよびフルオレセイン/ローダミンを有するアミノ酸より選択されることが好ましい。この対は5-（および/または6-）カルボキシフルオレセインと5-（および/または6-）テトラメチルローダミン（TAMRA）とであ

ることが最も好ましい。

【0018】

別の標識の例として、(例えば、具体的には均一系時間分解蛍光(HTRF)技法またはランタニドキレート励起(LANCE)技法により示される)ランタニド共鳴エネルギーを蛍光またはクロモホール受容体に移すための発光用供与体としてのランタニドイオン(典型的には、テルビウムおよびユーロピウム)が挙げられる。スピン-カップリングしたランタニド供与体のクエンチもまた、酸化窒素ラジカル受容体、典型的にはピペリジニルオキシまたはピロリジニルオキシラジカルを用いて行うこともできる(M.V.Rogers(1997)DDT 2(4)156を参照のこと)。

【0019】

モジュレーター基が、基質を蛋白分解性切断に付した後の、全体としての基質の光学特性を調節する部分である場合、適当な標識/モジュレーター対として、例えば蛍光標識と、蛋白用リガンド、例えばストレプトアビジンまたはアビジンとの結合能を有するビオチンが挙げられる。切断によってもたらされるペプチドの旋回拡散の変化は、蛍光偏光(FP)における変化を観察することによりモニターすることができる。また、蛍光相関的分光法(FCS)を用いて旋回拡散の変化をモニターすることもできる。

かくして、FPまたはFCSを用いて検出する場合、マーカー基は、上記したように、フルオロホールを有し、蛋白リガンド、例えばビオチン誘導体、またはハプテン、例えばジフルオロボラジアザインダセン、ダンシル、ジニトロフェノール、フルオロセイン、ドーダミンおよびナフタルイミドを有するアミノ酸が組み合わされたアミノ酸から選択される。マーカー基対は、好ましくは、フルオロホール/ビオチンリガンドを組み合わせたものである。該対はアミノヘキサネート結合ビオチン(ビオチン-X)を組み合わせた5-(および/または6)-カルボキシフルオレセインであることがより好ましい。

【0020】

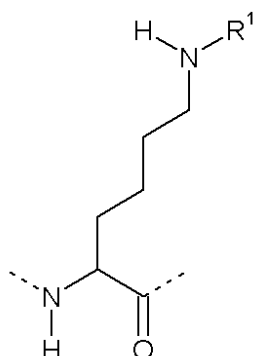
好ましい態様において、マーカー基対は蛍光-クエンチ(FQ)、蛍光-偏光(FP)または蛍光相関的分光学(FCS)アッセイを提供する。

マーカース基は、蛍光と、リジン、オルニチン、システイン、ホモシステイン、セリン、ホモセリンおよびチロシンなどの容易に化学修飾することのできる側鎖を有するアミノ酸の蛋白リガンド誘導体であることが好ましい。

【0021】

好ましい態様において、マーカース基は、式：

【化2】



[式中、 R^1 は、連結部分を介して直接または間接的に、リジンに結合する適当なマーカース基より選択される]

で示される修飾リジン基であるか、またはその修飾リジン基を含み、マーカース基対と一緒に上記したマーカース基対を形成する。

【0022】

基質はペプチド合成のいずれか適当な慣用的方法により調製することができる。これは、例えば、固相合成における Fmoc - および Boc - 版を基礎とし、鎖をアセンブリーするために順序かつフラグメントの変数またはその組み合わせを含む方法を包含する。さらに、また順序またはフラグメントの変数またはその組み合わせを利用する、溶液方法によってペプチドを化学合成する多様な方法も包含する。酵素カップリングなどを基礎とする方法等の別の合成方法も考えることができる。ペプチドを合成するのに、可能な多くの変数、例えば、異なる保護基、樹脂およびリンカー、カップリング試薬、溶媒、脱遮断剤などで開始する変数があることは当業者であれば理解するであろう。かかる方法の例示を、例えば、「Solid Phase Synthesis by J M Stewart and J D Young」、サンフランシスコ、フリーマン、1969；「The Chemical Synthesis of Peptides」、J Jones, Clarendon Press、オックスフォード、1991；「Principles of Peptide

Synthesis」、M Bodanszky、Springer-Verlag、NY、NY、1984；「Solid Phase Peptide Synthesis」、E AthertonおよびR C Sheppard、IRL Press、Oxford University Press、オックスフォード、1989を含む、教科書に見ることができる。より近代的な方法が、「Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis」、R Epton編を含む、最近のシンポジウムの、ならびにヨーロッパ・アンド・アメリカン・ペプチド・ソサイエティーにより計画され、表題「ペプチド」の下に公開されたシンポジウムの、一連の周知のプロシーディング(Proceedings)に記載されている。

【0023】

マーカー基の導入は、慣用的方法、例えば塩基性条件下、マーカー基の活性化エステル(例えば、スクシンイミジル)、混合無水物(例えば、エトキシカルボニル)、酸塩化物、マレイミド、イソシアニドまたはイソチオシアニド誘導体を、単一のリジン、オルニチン、セリンまたはホモセリン残基がその側鎖に保護されていない第一アミンまたはヒドロキシルを有する、その基礎となる基質(樹脂結合した、または溶液中の)に添加することによりなされる。別法として、単一のシステインまたはホモシステイン残基が保護されていないままである、基礎となる基質(樹脂結合した、または溶液中の)を、塩基性条件下、マーカー/受容体基の主たるハロゲン化アルキルまたはマレイミド誘導体と反応させる。

一般に、試験化合物の不存在下での切断速度は、所定の時点での切断の程度として認識されるであろう。該アッセイは特定の時点での切断の阻害についての、または切断速度についての試験である。

【0024】

基質切断は、溶液中で、または固体支持体を利用して行うことができる。

基質添加する前に試験化合物をプロテアーゼと一緒にプレインキュベートしてもよく、また別法として基質を直接添加してもよい。プロテアーゼおよび基質の最終濃度を、アッセイを行うのに適当な処理速度が得られるように計算する。例えば、メタノールまたはトリフルオロ酢酸を添加することで反応を停止させ、慣用的システムを用いて生成物を分析してもよい。

例えば、UV検出を行いながら、逆相HPLCを使用することができる(例え

ば、Kuo,Dら、Biochemistry、8347(1994)およびAllsopら、Bioorganic and Med.Chem.Lett.、443(1995)を参照のこと)。試験化合物の活性は所定の濃度での酵素活性の減少割合%として表すことができる。HPLCアッセイにおいては、これは対照と比較した生成物のピーク面積の減少として計算される。基質がマーカー対を含有する場合、別法としてメタノールまたは外因結合蛋白を用いて該反応を停止させ、利用するマーカー基の選択に適するいずれか慣用的なシステムを用いて生成物を分析してもよい。

【0025】

放射活性法はビオチン/放射性標識対の使用を包含する。基質を従来の濾過(例えば、ニトロセルロース)法によりストレプトアビジン被覆のフラッシュプレートまたはストレプトアビジン被覆のシンチレーション近接アッセイピース上に捕獲させる。シンチレーション計数により、放射性標識を検出してもよい。

抗体を基礎とするペプチド検出法は、リガンド/リガンド対、例えばビオチン/ジニトロフェノール標識の使用を包含する。例えば、ストレプトアビジン被覆のプレート上に一のリガンドを介して捕獲した後、固定した基質の検出を他のリガンド、例えば抗DNP抗体に対する抗体を用いて行い、つづいて酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)、解離強化時間分解蛍光法(DELFIA法、Wallac Oy)、イムノソルベントルミネッセンス化学ルミネッセンス法または蛍光検出法などの免疫アッセイに付す。

【0026】

エネルギー移動の変化を測定する光学方法は、フルオリメーターを用いて蛍光全体の強度を肉眼で測定してもよく、あるいは例えば、Evotec Biosystems GmbHにより開発されたアルゴリズムを用いる蛍光相関的分光学(FCS)を介して個々の蛍光分子からの光子放出のシグナルを処理することにより行うことができる。同様のアルゴリズムを、FCSを用いて分子光度および粒子数の両者の変化を介して、および/または間接的に標識されたペプチド基質を用いて蛋白分解速度を決定するのに用いることもできる。

モジュレーター基が、基質を蛋白分解的に切断した後の、全体としての基質の光学特性を調節する部分である場合、例えば、二元的なビオチニル化に付し、蛍

光標識したペプチドが切断された結果としての蛍光偏光 (FP) の変化を、例えばストレプトアビジンまたはアビジンを添加することなく、あるいは最も好ましくは添加して、プロテアーゼ活性をモニター観察するのに用いることができる。ストレプトアビジンまたはアビジンを添加し、または添加することなく、蛋白分解の結果として、この蛍光的に標識されたペプチド基質の拡散時間の変化もまた、並進的 FCS によりモニターすることができる。蛍光偏光は、例えば、蛍光偏光プレートリーダーで測定することができる。

【0027】

本発明の方法により同定可能な阻害剤は、競合結合アッセイにて用いるための試薬を創製するのに標識することのできる活性部位リガンドである。

したがって、本発明は、ポリペプチドまたは蛋白基質の Asp2 介在切断を阻害する化合物をスクリーニングし、かかる化合物を同定する方法であって、Asp2 および標識された活性部位のリガンドを含む反応系を準備し、試験化合物の存在下での標識リガンドの結合の程度を試験化合物の不存在下での標識リガンドの結合の程度と比較し、結合アフィニティーを測定することを含む、方法を提供する。

本発明はまた、上記方法により同定される化合物および、ADを含め、 β アミロイド蛋白 - 関連疾患の治療または予防を含む治療における使用に関する。

リガンドについてのアッセイ方法は一般的であり、切断アッセイについて上記した並進または巡回拡散を基礎とする方法を包含する。好ましい態様において、スクリーニング方法は蛍光偏光 (FP) を基礎とする。好ましい標識は上記したフルオロホルであり、好ましくはローダミンググリーンである。

【0028】

該アッセイは、切断アッセイについて上記したような従来のアッセイフォーマットを用いる、無細胞または細胞を基礎とする反応系にて行うことができる。

宿主細胞は、例えば、クローニングベクターまたは発現ベクターであってもよい、ベクターを用いて遺伝的操作 (形質導入、形質転換またはトランスフェクト) されている。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ファージなどの形態であってもよい。遺伝的操作を施した宿主細胞を、プロモーターを活性化する

ために、形質転換体を選択するために、またはその遺伝子を増幅するために適当に修飾した従来の栄養培地に培養することができる。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択される宿主細胞と同じく、今まで使用されている条件であり、当業者に明らかであろう。

【0029】

適当な発現ベクターは染色体、非染色体および合成DNA配列、例えばSV40の誘導體；細菌性プラスミド；ファージDNA；バキュロウイルス；酵母プラスミド；プラスミドとファージDNA、ワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、および偽狂犬病ウイルスなどウイルスDNAの組み合わせから誘導されたベクターを包含する。しかしながら、宿主において複製可能であり、かつ生存可能である限り、いずれの他のベクターも用いることができる。

適当なDNA配列を種々の方法によりベクター中に挿入することができる。一般に、当該分野にて公知の方法により、DNA配列を適当なエンドヌクレアーゼ部位に挿入する。かかる操作および別の操作は当業者の範囲内にあると考えられる。

発現ベクターにおけるDNA配列を、mRNA合成を指向するように、適当な発現対照配列（プロモーター）に機能的に結合させる。かかるプロモーターの代表例として、LTRまたはSV40プロモーター、イー・コリ・lacまたはtrp、ファージラムダP_Lプロモーターおよび原核生物または真核生物細胞あるいはウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られている他のプロモーターに言及することができる。発現ベクターはまた、翻訳を開始するためのリボソーム結合部位および転写ターミネーターを含有する。該ベクターはまた、発現を増幅するための適当な配列を含んでいてもよい。

【0030】

加えて、発現ベクターは1またはそれ以上の選択可能なマーカー遺伝子を含有し、真核生物細胞を培養するためにジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性、あるいはイー・コリにおけるテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性などの形質転換された宿主細胞を選択するための表現型特性を提供する。

遺伝子は、プロモーター、リボソーム結合部位（細菌発現の場合）、所望によ

りオペレーター（以下、包括的に「制御」因子という）の制御下に置くことができ、そうすれば、所望の蛋白をコードするDNA配列はこの発現構造を含有するベクターにより形質転換される宿主細胞中のRNAに転写される。そのコード化配列はシグナルペプチドまたはリーダー配列を含んでいてもいなくてもよい。本発明の蛋白配列は、例えば、イー・コリ *tac* プロモーターまたは蛋白A遺伝子（*spa*）プロモーターおよびシグナル配列を用いて発現することができる。リーダー配列は翻訳後プロセッシングにて細菌性宿主により除去することができる。プロモーター領域はCAT（クロラムフェニコール・トランスフェラーゼ）ベクターまたは他のベクターを選択可能なマーカーと一緒に用いて所望の遺伝子より選択することができる。2つの適当なベクターがPKK232-8およびPCM7である。個々に命名された細菌性プロモーターは、*lacI*、*lacZ*、T3、T7、*gpt*、ラムダP_R、P_Lおよび*trp*を包含する。真核生物プロモーターは、CMV即時型、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来のLTRおよびマウスメタロチオネイン-Iを包含する。適当なベクターおよびプロモーターの選択は十二分に当業者の範囲内にある。

【0031】

調節配列に加えて、宿主細胞の増殖に関連して蛋白配列の発現を制御することを可能とする制御配列を添加することが望ましい。制御配列は当業者に公知であり、例えば、制御化合物の存在を含む、化学的または物理的刺激に応答してスイッチがオンまたはオフとなる遺伝子の発現を引き起こすものが挙げられる。制御因子の他の型はまたベクター、例えばエンハンサー配列に存在してもよい。

【0032】

発現ベクターは、特定のコード化配列が適当な制御配列を有するベクター中にあるように、調節配列に関してコード化配列の位置および配向がそのコード化配列が調節配列の「調節」下で転写されるように、構築される（すなわち、調節配列でDNA分子に結合するRNAポリメラーゼがコード化配列を転写する）。そのコード化配列の修飾はこの目的を達成するために行うことが望ましい。例えば、ある場合には、適当な配向で調節配列に結合するように、すなわち読取枠を維持するように、その配列を修飾する必要がある。調節配列および他の制御配列を

上記したクローニングベクターなどのベクターに挿入する前にコード化配列にライゲートしてもよい。また、そのコード化配列を既に調節配列および適当な制限部位を含有する発現ベクター中に直接的にクローンすることもできる。また、このコード化配列の修飾を行い、選択された宿主細胞が発現を亢進するのに適するようにコドン使用頻度を改変することもできる。

【0033】

一般に、組換え発現ベクターは、宿主細胞の複写の起源および形質転換を可能とする選択可能なマーカー、例えば、イー・コリのアンピシリン耐性遺伝子およびエス・セレピシアエTRP1遺伝子、および下流の構造配列の転写を指令するための高度に発現した遺伝子から由来のプロモーターを含んでいるであろう。異種構造配列を適当な時期に翻訳開始および停止配列と、好ましくは翻訳蛋白の周辺腔または細胞外培地への分泌指令能を有するリーダー配列と組み合わせる。異種配列は、所望の特性、例えば、発現された組換え産物の安定性または精製の単純化を付与するN-末端同定ペプチドを含む、融合蛋白をコードすることができることが望ましい。

上記した適当なDNA配列ならびに適当なプロモーターまたは調節配列を含有するベクターを利用して適当な宿主を形質転換し、その宿主が蛋白を発現させることができる。

【0034】

クローニング用の組換えDNAベクターおよびそれにより形質転換することのできる宿主細胞として、例えば、バクテリオファージλ（イー・コリ）、pBR322（イー・コリ）、pACYC177（イー・コリ）、pKT230（グラム陰性菌）、pME290（イー・コリ以外のグラム陰性菌）、pLAFR1（グラム陰性菌）、pME290（イー・コリ以外のグラム陰性菌）、pHV14（イー・コリおよびバシラス・サチリス）、pBD9（バシラス）、pIJ61（ストレプトマイセス）、pUC6（ストレプトマイセス）、YIp5（サッカロマイセス）、バキュロウイルス昆虫細胞系、YCP19（サッカロマイセス）が挙げられる。通常、「DNA Cloning」：Vol.I&II、Gloverら編、IRL Press Oxford（1985）（1987）および；T.Maniatisら、「Molecular Cloning」

Cold Spring Harbor Laboratory (1982) を参照のこと。

【0035】

ある場合には、ポリペプチドを宿主生物から分泌させ、その後に分泌性シグナルを切断する配列を付加することが望ましい。

酵母発現ベクターはまた当該分野にて知られている。例えば、米国特許第4446235号；第4443539号を参照のこと；欧州特許出願番号103409；100561；96491も参照のこと。SV40後期プロモーターを用いて哺乳動物細胞にて発現を駆動させるpSV2neo (Southern, PJおよびBerg, PJ, Mol. Appl. Genet. 1: 327-341 (1982) に記載) またはCMVプロモーターを用いて発現を駆動させるpCDNA1から由来のベクター、pCDNA1neo (Nelson, Jら、Mol. Cell Biol. 7: 4125-29 (1987) などである。これら後者の2つのベクターを哺乳動物細胞における一時的または安定した(G418耐性を利用)発現のために利用することができる。昆虫細胞発現系、例えば、ドロソフィラもまた有用である。例えば、PCT出願のWO90/06358およびWO92/06212ならびにEP290261-B1を参照のこと。

【0036】

高等真核生物によるDNAの転写はエンハンサー配列をベクターに挿入することで向上する。エンハンサーは、プロモーターに作用してその転写を向上させる、通常、約10ないし300bpの、DNAのシス作用座因子である。例えば、bp100ないし270の複製起源の後期側上のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起源の後期側上のポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。

上記のベクターを含有する宿主細胞は、哺乳動物細胞のような高等真核生物細胞または酵母細胞のような下等真核生物細胞とすることができ、または宿主細胞は細菌細胞のような原核生物細胞とすることができる。適当な宿主の代表例として、原核生物、例えば、イー・コリ、ストレプトミセス、サルモネラ・チフィムリウム (Salmonella typhimurium) のような細菌細胞、および真核生物、例えば、酵母、ドロソフィラおよびスポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugipe

rda)などの昆虫細胞、CHO、COSまたはボウズ(Bowes)黒色腫などの哺乳動物細胞、植物細胞等のような真菌細胞が挙げられる。適当な宿主の選択は、本明細書の教示から当業者の範囲内にあると考えられる。

【0037】

構築物の宿主細胞中への導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクションまたはエレクトロポレーションによって行うことができる(Davis,L.、Dibner,M.、Battey,I.、Basic Methods in Molecular Biology(1986))。

適当な宿主系統を形質転換し、宿主系統を適当な細胞密度まで増殖させた後、選択されたプロモーターを適当な方法(例えば、温度シフトまたは化学的誘導)によって誘導し、細胞をさらなる期間培養する。

細胞は、典型的には、遠心分離によって収穫され、物理的または化学的方法によって崩壊され、得られた粗抽出物をさらなる精製用に保持する。

【0038】

蛋白の発現に用いられた微生物細胞は、冷凍-解凍循環、超音波処理、機械的崩壊または細胞溶解剤の使用を包含する当業者によく知られたいずれかの慣用的な方法によって崩壊させることができる。

種々の哺乳動物細胞培養系はまた、組換え蛋白を発現するために用いることができる。哺乳動物発現系の例は、Gluzman、Cell、23:175(1981)によって記載されたサル腎臓繊維芽細胞のCOS-7系統、および適合性ベクターの発現能を有する他の細胞系統、例えば、C127、3T3、CHO、HeLおよびBHK細胞系統を包含する。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、適当なプロモーターおよびエンハンサー、また、いずれかの必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終止配列、および5'フランキング非転写配列を含むであろう。SV40スプライスおよびポリアデニル化部位由来のDNA配列を所望の非転写遺伝子を提供するために用いてもよい。

【0039】

ヒト以外のトランスジェニック動物を宿主として使用してもよい。

本発明のアッセイが無細胞である場合、発現されたポリペプチドの回収方法は選択された発現系および宿主に依存する。発現系がポリペプチドを増殖培地中に分泌する場合、ポリペプチドを培地から直接精製することができる。ポリペプチドが分泌されない場合、それは細胞ライゼートから単離されるか、または細胞膜フラクションから回収される。ポリペプチドが細胞表面に局在する場合、全細胞または単離した膜を所望の遺伝子産物のアッセイ可能な供給源として使用することができる。イー・コリのような細菌宿主中に発現されたポリペプチドは、封入体からの単離およびリフォールディングを必要とするかもしれない。適当な増殖条件および回収方法の選択は、当該分野の範囲内である。

【0040】

該ポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈澱、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを包含する、方法によって組換え細胞培養物から回収および精製できる。必要ならば、蛋白リフォールディング工程を成熟蛋白の配置を完成する際に用いることができる。最終的に、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）を最終精製工程に用いることができる。

組換え生産手法において使用される宿主に応じて、ポリペプチドをグリコシル化してもよく、または非グリコシル化してもよい。ポリペプチドはまた、最初のメチオニンアミノ酸残基を包含してもよい。

【0041】

「組換え」ポリペプチドなる語は、組換えDNA技術によって生産された、すなわち、所望のポリペプチドをコードしている外来性DNA構築物によって形質転換された細胞から生産されたポリペプチドをいう。「合成」ポリペプチドなる語は、化学合成によって調製されたものをいう。

「レプリコン」なる語は、インビボにおけるDNA複製の自律性単位として機能する、すなわち、それ自体の調節下で複製能を有するいずれかの遺伝子（例えば、プラスミド、染色体、ウイルス）をいう。

「ベクター」なる語は、プラスミド、ファージまたはコスミドなどのレプリコンであって、それに別のDNAセグメントが結合して結合したセグメントの複製を引き起こし得るものをいう。

【0042】

「二本鎖DNA分子」なる語は、弛緩型およびスーパーコイルの両方の二本鎖ヘリックスにおけるデオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミンまたはシトシン塩基）の重合形態をいう。この用語は、分子の一次および二次構造のみに言及し、いずれか特定の三次形態に限定するものではない。よって、該用語は、特に、直線状DNA分子（例えば制限フラグメント）、ウイルス、プラスミド、および染色体において見出される二本鎖DNAを包含する。特定の二本鎖DNA分子の構造を議論する場合、配列は本明細書においてDNAのセンス鎖に沿った5'から3'への方向の配列のみを与える通常の慣例にしたがって記載される。

【0043】

特定の蛋白のDNA「コーディング配列」または特定の蛋白を「コードするヌクレオチド配列」なる語は、適当な制御配列の調節下に置かれたときにポリペプチドに転写および翻訳されるDNA配列である。

「プロモーター配列」なる語は、細胞中でRNAポリメラーゼとの結合能を有し、下流の（3'方向）コーディング配列の転写を開始できるDNA調節領域をいう。プロモーター配列内には、転写開始部位（慣用的にヌクレアーゼS1でのマッピングによって定義される）ならびにRNAポリメラーゼの結合の原因となる蛋白結合ドメイン（コンセンサス配列）が見られる。真核生物プロモーターは、いつもというわけではないが、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含有することが多い。

【0044】

DNA「調節配列」なる語は、包括的には、宿主細胞におけるコーディング配列の発現（すなわち、転写および翻訳）を提供する、プロモーター配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル、転写終止配列、上流調節ドメイン、エンハンサーなどをいう。

調節配列は、RNAポリメラーゼがプロモーター配列と結合し、コーディング配列をmRNAに転写し、次いで、それがコーディング配列によってコードされるポリペプチドに翻訳されるとき、細胞中においてコーディング配列の「発現を指示」する。

【0045】

「宿主細胞」なる語は、外来性DNA配列によって形質転換またはトランスフェクトされた、または形質転換またはトランスフェクトされることのできる細胞をいう。

外来性DNAが細胞膜内に導入されたとき、細胞はその外来性DNAによって「形質転換」されている。外来性DNAは、細胞のゲノムを構成している染色体DNA中に組み込まれていても（共有結合）いなくてもよい。原核生物および酵母において、例えば、外来性DNAはプラスミドのようなエピソードエレメント上に維持されうる。真核生物細胞に関して、安定に形質転換またはトランスフェクトされた細胞は、外来性DNAが染色体中に組み込まれ、その結果、染色体複製を介して娘細胞によって受け継がれるものである。該安定性は、真核生物細胞の外来性DNAを含有する娘細胞の集団よりなる細胞系統またはクローンを確立する能力によって示される。

「クローン」なる語は、有糸分裂によって単一細胞または共通の祖先から誘導される細胞の集団をいう。「細胞系統」なる語は、多世代にわたってインビトロにて安定して増殖することのできる一次細胞のクローンをいう。

【0046】

本発明はまた、Asp2調節のAPP切断の阻害剤である化合物、およびアルツハイマー病を包含するβアミロイド蛋白関連疾患の治療におけるその使用に関する。

本発明はさらに、Asp2調節のAPP切断を阻害するための、特に、アルツハイマー病を包含するβアミロイド蛋白関連疾患の治療のための医薬の調製における本発明の化合物の使用を提供する。

本発明はさらに、Asp2調節のAPP切断を阻害する方法、特に、アルツハイマー病を包含するβアミロイド蛋白関連疾患の治療または予防方法であって、

有効量の本発明の化合物を患者に投与することを特徴とする方法を提供する。

【0047】

療法において使用する場合、本発明の化合物は標準的な製薬習慣にしたがって処方される。

したがって、本発明は、本発明の化合物および医薬上許容される担体を含んでなる医薬組成物を提供する。

経口投与される場合に活性な化合物を液体、例えば、シロップ、懸濁液またはエマルジョン、錠剤、カプセルおよびロゼンジとして処方できる。

液体処方は、一般に、化合物または医薬上許容される塩の、懸濁化剤、保存料、フレーバー剤または着色料を含む適当な液体担体、例えば、エタノール、グリセリン、非水性溶媒、例えば、ポリエチレングリコール、油、または水中懸濁液または溶液を含むであろう。

【0048】

錠剤形態の組成物は、固形処方の調製に慣例的に使用されるいずれかの適当な医薬担体を用いて調製できる。かかる担体の例は、ステアリン酸マグネシウム、デンプン、ラクトース、シュクロースおよびセルロースを包含する。

カプセル形態の組成物は、慣例的なカプセル化手法を用いて調製できる。例えば、活性材料を含有するペレットを標準的な担体を用いて調製し、次いで、ハードゼラチンカプセル中に充填でき、別法では、分散液または懸濁液をいずれかの適当な医薬担体、例えば、水性ガム、セルロース、珪酸塩または油を用いて調製し、次いで、分散液または懸濁液をソフトゼラチンカプセル中に充填することができる。

【0049】

典型的な非経口組成物は、化合物または医薬上許容される塩の、滅菌水性担体または非経口で許容される油、例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、レシチン、落花生油または胡麻油中溶液または懸濁液を含む。別法として、溶液を凍結乾燥し、次いで、投与直前に適当な溶媒を用いて復元できる。

典型的な坐剤処方は、式(Ⅰ)の化合物またはこの方法で投与される場合に活性なその医薬上許容される塩を結合剤および/または滑沢剤、例えば、ポリマー

グリコール、ゼラチンまたはカカオ脂または他の低融点植物もしくは合成ワックスまたは脂肪を含んでなる。

【0050】

好ましくは、組成物は錠剤またはカプセルのような単位投与形態で存在する。

経口投与用の各投与単位は、好ましくは、1～250mgの本発明の阻害剤を含有する（非経口投与の場合、好ましくは0.1～25mgを含有する）。

成人患者の1日の投与計画は、例えば、式（I）の化合物または遊離の塩として計算されるその医薬上許容される塩が1mg～500mg、好ましくは1mg～250mgである経口投与量、あるいは0.1mg～100mg、好ましくは0.1mg～25mgである静脈内、皮下、または筋肉内投与量であってもよく、化合物は1日に1～4回投与される。適当には、化合物は連続的な治療の期間投与される。

本発明は、さらに、下記の実施例に関して記載されるが、本発明がかかる実施例に限定されないということは理解されるべきである。全ての部または量は、特記しないかぎり、重量によるものである。

【0051】

方法

哺乳動物細胞におけるAsp2の一過性発現

Asp2をコードするDNAを哺乳動物細胞における一過性発現用の発現ベクター中にクローンさせた。Asp2遺伝子をプライマー：

5' TATTATCTACTCGAGCCACCATGGCCCAAGCCCTGCC 3'（配列番号8）

および

5' GTTAATATAAAGCTTCAGCAGGGAGATGTCATCAGC 3'（配列番号9）

を用いて増幅し、pCR2.1（Invitrogen）中にクローンさせた。次いで、Asp2遺伝子をEcoRI/HindIIIで消化したpcDNA3.1aMycHis（Invitrogen）にライゲートした。

ヒトAPPイソ型695を過剰発現するSH-SY5Yヒト神経芽細胞（SH-SY5Y APP695）を、10%CO₂/90%空気の加湿雰囲気中、37℃において、10%胎仔ウシ血清（v/v）、ペニシリン（50単位/ml）

、ストレプトマイシン (50 μ g/ml)、2 mM グルタミンおよび 260 μ g/ml ヒグロマイシン B を補足したダルベッコ修飾必須培地: F12 中で培養した。野生型および APP スウェーデン型変異 (Haass, C.ら、Nature. Med. 1: 1291-1296 (1995))、Lys 595 $\rightarrow$ Asn および Met 596 $\rightarrow$ Leu (APP 695 ナンバリング) を有する COS-7 APP 751 細胞を 300 μ g/ml ヒグロマイシン B を有する上記の培地中で培養した。一過性トランスフェクションのために、細胞を 75 cm² 組織培養フラスコ中において約 60% 集密度で播種し、LipofectAMINE PLUS 試薬 (Life Technologies) を用いて製造者による記載とおりにトランスフェクトした。トランスフェクションの 24 時間後、培地を OptiMEM-1 (10 ml) に変えた。24 時間後に培地を収集し、簡単に遠心分離して (500 $\times$ g、10 分間) いずれの細胞も除去し、次いで、Centriprep 10 コンセントレーター (Amicon) を用いて濃縮した。酵素不含細胞解離バッファー (Life Technologies) を用いてフラスコから細胞を解離させることによって採取し、プロテアーゼ阻害剤のカクテル (Boehringer Mannheim) を含有する 50 mM トリス/HCl pH 7.4、1% Triton X-100 中、4℃ で 30 分間インキュベーションすることによって溶解させた。遠心分離後 (3000 $\times$ g、5 分間)、上清を吸引し、アッセイまで -20℃ で保管した。

【0052】

Asp2 の細胞下局在化

My c エピトープタグを有する Asp2 をコードする cDNA を COS-7 APP-751 細胞中にトランスフェクトした。細胞を固定し、Spector, D.L., Goldman, R.D. & Leinwald, L.A. によって Laboratory Manual、3、105.3、Cold Spring Harbor Lab Press、Cold Spring Harbor、New York (1998) に記載されるように、間接的免疫蛍光法用に処理した。APP を抗 C-末端抗体 Ab54 を用いて可視化させた。対照となる抗体は、Sigma からのモノクローナル抗-ゴルジ 58 K 蛋白、Transduction Labs からのモノクローナル初期エンドソーム抗原 1 (EEA1)、Stressgen からのモノクローナル抗 KDE1、SantaCruz Biotechnology からのモノクローナル抗 My c であった。Molecular Probes からの

抗マウス抗体で標識したAlexa 488または抗ウサギ抗体で標識したAlexa 568を用いて検出した。Leica共焦点顕微鏡を用いて顕微鏡検査を行った。

【0053】

免疫組織化学

Asp2免疫組織化学：2人のアルツハイマー病患者（女性、62歳および89歳）および2人の高齢の対照（女性、80歳および86歳）から由来のパラホルムアルデヒドで固定化した海馬ならびに前頭部および側頭部皮質の10 μ mのセクションを再水和し、4 にて一夜インキュベートすることによってAsp2に対する抗体で標識した。その後の処理は、ビオチン-アビジン系（ビオチニル化したヤギ抗ウサギ抗体を用いる）およびクロモゲン、ジアミノベンジジン（Vector Laboratories）を用いた。

【0054】

変異誘発

Stratagene QuickChange変異誘発装置を用いてAsp2活性部位の変異体を構築した。2つのオリゴヌクレオチドを消化して各AspをAsnに導入した。

D93N1：

5' CTCAACATCCTGGTGAATACAGGCAGCAGTAAC 3'（配列番号10）

D93N2：

5' GTTACTGCTGCCTGTATTCACCAGGATGTTGAG 3'（配列番号11）

D289N1：

5' GACAAGAGCATTGTGAACAGTGGCACCACCAAC 3'（配列番号12）

D289N2：

5' GTTGGTGGTGCCACTGTTCAATGCTCTTGTC 3'（配列番号13）

（上記した位置D93およびD289は成熟蛋白の位置D48およびD244に対応する）

変異を、QuickChangeプロトコルに従って、pcDNA3.1+Asp2構築物中に導入した。変異体を配列決定し、所望の活性部位変異の存在およびPCR変異の不存在を確認した。

【0055】

SDS PAGEおよびウェスタンブロッティング

細胞ライゼート(20 µg)または培地(20倍濃縮した培地の15 µl)試料を等量のLamelli試料バッファ(0.5 Mトリス/HCl、pH 6.8、10% (w/v) SDS、0.1% ブロモフェノールブルー、20% (v/v) グリセロールおよび5% β-メルカプトエタノール)と混合し、プレキャストを用いて10% トリスグリシンSDS ポリアクリルアミドゲル(Novex)上で電気泳動に付した。電気泳動後、ウェットブロット(wet blot)装置(Novex)を用いて、ゲルをPVDF上に100 Vにて60分間エレクトロブロットした。転移バッファは35 mM トリスHCl、193 mM グリシンおよび20% メタノール(v/v)を含んだ。転移後、膜を5% Marvel、リン酸緩衝化セリン(PBS)、0.1% Tween-20中、室温で3時間遮断した。次いで、膜を一次抗体と一緒に2% ウシ血清アルブミン、PBS、0.1% Tween-20中、4℃で一夜インキュベートした。抗-His₆抗体(Boehringer Mannheim)は1:1000倍希釈で用い、APPのC末端(アミノ酸配列676-695)に対して生じた抗体、Ab54(Allsop, D.ら、Alzheimer's Disease: Biology, Diagnostics and Therapeutics、Iqbal, K., Winblad, B., Nishimura, T., Takeda, M. & Wisneski, H.M., 717-727, John Wiley, New York (1997))は1:25000倍希釈で用い、APPのAβドメインのアミノ酸1-16に対して生じた抗体WO2(Ida N.ら、J.Biol.Chem. 271: 22908-22914 (1996))は1:3000倍希釈で用い、β-セクレターゼによる切断後に生じた可溶性APPのネオエピトープ領域に対して生じた抗体1A9(Le Brocq, D.ら、Biochem. 37: 14558-14565 (1998))は1:3000倍希釈で用いた。結合した抗体を強化化学ルミネセンス(ECL)検出法(Amesham)と共に、ペルオキシダーゼ結合型二次抗体(sigma)を用い、抗体1A9および抗体WO2でプローブした膜の場合、付加的なペルオキシダーゼ抗-ペルオキシダーゼ抗体を用いて検出した。

【0056】

APP C末端フラグメントの場合、細胞ライゼート(20 µg)を等量のLamelli試料バッファ(0.5 M トリス/HCl、pH 6.8、10% (w/v) SDS、0.1% ブロモフェノールブルー、20% (v/v) グリセロ

ールおよび5%β-メルカプトエタノール)と混合し、プレキャストを用いて10-20%トリストリンSDSポリアクリルアミドゲル(Nevex)上で電気泳動した。電気泳動後、ゲルを0.45μmニトロセルロース上に0.38Aで35分間、ウェットプロット装置(Novex)を用いてエレクトロプロットした。転移バッファは、35mMトリスHCl、193mMグリシン、0.01%SDSおよび20%メタノール(v/v)からなった。転移後、プロットを沸騰PBS中で10分間、電子レンジにかけた。転移後、Ab54で検出する場合、膜を5%ミルク粉末、リン酸緩衝化セイライン(PBS)、0.1%Tween-20中、室温で1時間遮断した。次いで、膜を2%ウシ血清アルブミン、PBS、0.1%Tween-20中においてAb54(1:25000の希釈率で使用する)と一緒に4℃で一夜インキュベートした。WO2の場合、膜を10%ミルク粉末、PBS中、室温で1時間遮断した。次いで、膜をPBS中1μg/mlのWO2と一緒に4℃で一夜インキュベートした。強化化学ルミネセンス(ECL)検出法(Amersham)と共にペルオキシダーゼ結合型二次抗体(Sigma)を用いて、結合した抗体を検出した。

【0057】

結果

ヒトにおけるAsp2免疫反応性の証明

ADおよび対照海馬を、Asp2由来のペプチド配列に対して生じた蛋白A精製ポリクローナル抗血清を用いてAsp1に対して免疫染色した。明らかな神経細胞の染色はあるが、星状細胞、小グリア細胞または希突起グリア細胞に関連した染色はなかった。いくつかの神経細胞は、他よりも強く標識されたようであったが、それらは全て、神経細胞形質および樹状突起の細胞質だけに局在する免疫反応性を有する類似の染色パターンを示した。樹状突起の染色はめったに10-15μmを超えて広がらず、軸索の標識化は観察されなかった。陽性細胞体そのものの内で、染色は不均一であり、わずかな粒状を示した。神経細胞内染色もまた、高齢の対照から由来の前頭部および側頭部皮質において、および脳において明らかであった。

【0058】

A s p 2 は、A P P の 6 9 5 イソ型を安定して発現するトランスフェクトされていない S H - S Y 5 Y 細胞 (S H - S Y 5 Y A P P - 6 9 5) に、および A P P の 7 5 1 7 5 1 イソ型を発現する C O S - 7 細胞 (C O S - 7 A P P - 7 5 1) にて存在することがわかった。A s p 2 のレベルは、A s p 2 遺伝子を有するベクター p c D N A 3 . 1 での一過性トランスフェクションで増加した。その蛋白での一過性トランスフェクションに付すと、A s p 2 は 6 5 k D a での主要なバンドとして存在した。E C L プロットを長期間にわたって照射すると、6 0 k D a でのバンドが弱くなるのは明らかであった。脱糖鎖形成実験により、これら 2 つのバンドがその同じ蛋白とは別に糖鎖形成された形態であることがわかった。

【 0 0 5 9 】

A s p 2 および A P P の細胞下局在化

M y c エピトープでタグ化した A s p 2 を有するベクター p c D N A 3 . 1 を C O S - 7 A P P - 7 5 1 細胞中にトランスフェクトした。いくつかの報告 (K u e n t z e l , S . L . , A l i , S . M . , A l t m a n , R . A . , G r e e n b e r g , B . D . & R a u b , T . J . , J . B i o c h e m . 2 9 5 , 3 6 7 - 3 7 8 (1 9 9 3) ; W a l t e r , J . ら , M o l . M e d . 2 , 6 7 3 - 6 9 1 (1 9 9 6)) と矛盾することなく、特有の核近位染色および細胞全体にわたるさらに全体的な網状染色により明らかにされるように、A P P がゴルジ / 小胞体の領域に局在化したのは明らかであった。C O S - 7 A P P - 7 5 1 細胞中の M y c タグ化 A s p 2 および A P P を同時に検出することで明らかにされるように、A s p 2 は本質的に同じ細胞下分布を示し、A P P との明らかな共同局在化を示した。共同局在化が絶対的ではなく ; A P P が A s p 2 よりも細胞周辺に向かってより簡単に検出されることは興味のあることである。このことはこれら 2 つの蛋白が処理され、細胞内を移動する際に、それら蛋白が分離する可能性のあることを示唆する。これら蛋白の分布は、初期エンドソームおよび小胞体を特定するマーカーの分布とは全く異なる。

【 0 0 6 0 】

s A P P β 分泌に対する A s p 2 の発現および A s p 2 活性部位変異体の効果
活性部位変異体および A s p 2 の両方が S H - S Y 5 Y A P P - 6 9 5 細胞

において同様なレベルまで発現された。空ベクター p c D N A 3 . 1 M y c H i s トランスフェクト対照細胞と比べて、s A P P β (1 1 0 k D a) の増加が A s p 2 トランスフェクト細胞から由来の培地中で観察された。A s p - A s n 変異体 D 9 3 N または D 2 8 9 N のいずれかでトランスフェクトした細胞から分泌された s A P P β は何の増加も示さなかった。s A P P β で見られたのとは対照的に、A s p 2 は可溶性 A P P α の分泌または細胞中における全長 A P P に対して効果がなかった。

【 0 0 6 1 】

A P P C 末端フラグメントに対する A s p 2 の発現および A s p 2 活性部位変異体の効果

A P P の C 末端フラグメントがスウェーデン変異の有るまたは無い A P P - 7 5 1 を安定して発現する C O S - 7 細胞中で検出された。A P P の C 末端領域に対して生じた A b 5 4 によって、1 2 k D a および 1 0 k D a のバンドが検出された。1 2 k D a フラグメントはヒト A β の 5 - 9 残基に特異的な抗体 W O 2 と免疫反応したので、 β - セクレターゼの作用によって生産された C 末端フラグメント (C T F β) である。1 0 k D a フラグメントバンドはこの抗体と免疫反応せず、したがってこのことおよびその分子量に基づいて、該フラグメントバンドは α - セクレターゼの作用によって生産された C 末端フラグメント、C T F α である。 γ - セクレターゼの作用によって生産された C 末端フラグメントは検出されなかった。これは、該フラグメントが低レベルであるため、または細胞におけるその迅速なクリアランスのためであるかもしれない。

A s p 2 でのトランスフェクションは、A b 5 4 および W O 2 抗体によって検出した場合、C O S - 7 A P P - 7 5 1 細胞中における 1 2 k D a C T F の蓄積をもたらした。A s p 2 との一過性トランスフェクションはまた、スウェーデン変異を含む A P P - 7 5 1 を発現する C O S - 7 にてこの 1 2 k D a β - セクレターゼ誘導の C T F の蓄積の原因となる。

D 9 3 N および D 2 8 9 N 活性部位変異体では C T F β の増加はなく、エンドクレプシン - 2 の発現が触媒的アスパラギン酸残基が存在する必要がある機能的プロテイナーゼをコードすることを確認した。

【0062】

A s p 2 - F c 融合蛋白 (A s p 2 (1 - 4 6 0) - F c) の調製

A s p 2、アミノ酸1～460 (E P 8 5 5 4 4 4 ; ただしG l u -> V a l) をコードするc D N Aフラグメントをサブクローン化して、ヒト免疫グロブリン、I g G 1の99 - 330残基との融合蛋白を創製し、哺乳動物発現ベクターp C D N (Aiyarら) 中にクローン化した。N o t 1での消化によってプラスミドを線状にし (15 μ g D N A、37℃、一夜)、滅菌的に沈殿させ、50 μ l 1 x T E バッファー (10 mM トリス、1 mM E D T A、p H 7 . 5) 中に再懸濁した。Hensleyらの技術を用いて、D N AをBio - Rad Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories) を用いてチャイニーズハムスター卵巣 (C H O E 1 A) 細胞系統 (維持培地中の懸濁液中での生育に順応させたD G -44 (Urlaubら) から由来) 中にエレクトロポレートした。選択するまでの24時間、細胞を96ウェル培養プレート中に維持培地中5 x 10⁵細胞/プレートにて播種した。細胞はヌクレオシドを含有しない維持培地 (選択培地) 中で選択した。個々のコロニー由来の条件付培地を、O r i g e n アナライザー (IGEN) 上で電気化学ルミネセンス検出法を用いてアッセイした (この技術はYangが1994年に報告されている) 。高発現コロニーを30リットルの選択培地を含有する250 ml 振盪フラスコ中に秤量し、精製のための条件培地を得た。

【0063】

Aiyar, N., Baker, E., Wu, H-L, E., Nambi, P., Edwards, R.M., Trill, J.J., Ellis, C., Bergsma, D.,

Human AT1 receptor is a single copy gene : characterization in a stable cell line. Molecular and Cellular Biochemistry 131 : 75 - 86、1994 ;

Urlaub, G., Kas, E., Carothers, A.M. および Chasin, L.A. (1983) Cell 33、405 - 412 ;

Hensley, P., McDevitt, P.J., Brooks, I., Trill, J.J., Feild, J.A., McNulty, D. E., Connor, J.R., Griswold, D.E., Kumar, V., Kopple, K.D., Carr, S.A., Dalton, B.J., Johanson, K. The soluble form of E-selectin is an asymmetric monom

er : Expression, purification and characterization of the recombinant protein. J.Biol.Chem 269 : 23949 - 23958 (1994) ;

Yang,H., Leland,J.K., Yost,D., Massey,R.J. Electrochemiluminescence : A new diagnostic and research tool. Biotechnology, 12 : 193 - 194 (1994)

【 0 0 6 4 】

A s p 2 - F c 精製

上記に従って調製したA s p 2 - F cをCHO E1a培地から蛋白Aアフィニティークロマトグラフィー (BioProcessing LtdのP r o S e p A樹脂) によって捕獲した。その融合蛋白を0.1Mグリシン - HCl (pH3.0) でカラムより溶出させ、1Mトリス - HCl (pH8.0) を用いて中和し、0.25M NaClを含有する25mM H e p e s (pH7.4) に対して透析した。N - 末端配列決定およびDTTと共にまたは無しでのSDS - PAGE分析は蛋白がA s p 2 / F c - F cのジスルフィド結合ヘテロダイマーであることを示した。N末端配列決定は、シグナル配列の全てを処理し、プロフォーム (T h r 22より開始) が37.5%および成熟形態 (G l u 46より開始) が62.5%からなることが分った。

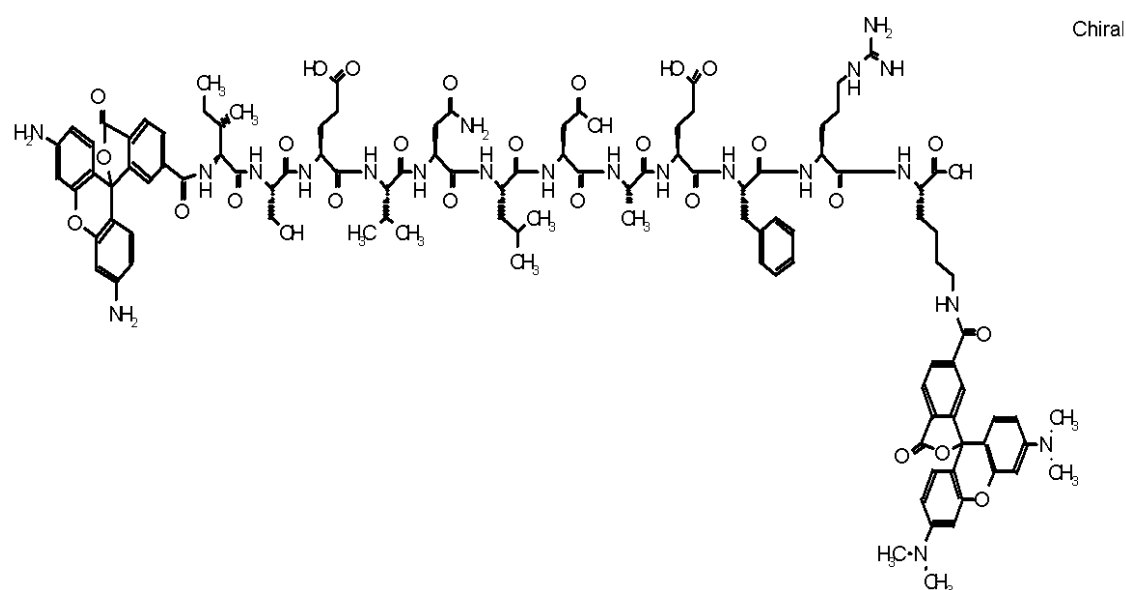
【 0 0 6 5 】

A s p 2 に関する蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 切断アッセイ

スウェーデン変異体A P Pベータ部位配列の配列に基づくペプチド (X) をFRETアッセイにおける使用のために二重標識した。

【 0 0 6 6 】

【化3】



【0067】

該ペプチドは、N末端にローダミンググリーン基を、C末端にテトラメチルローダミン基を有する、スウェーデン変異体ベータ - 切断部位をスパンニングする11残基 (I l e - S e r - G l u - V a l - A s n - L e u * A s p - A l a - G l u - P h e - A r g) を包含する。これは、A s p 2 による介在するペプチド配列の切断を2つの蛍光基間のエネルギー移動によってモニターすることを可能にする。

【0068】

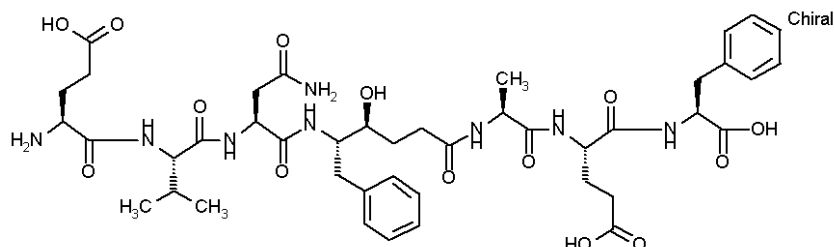
実際、アッセイは下記のように行われた。

蛍光ペプチド基質 (0 . 5 μ M) を 5 0 m M 酢酸ナトリウム、2 0 m M 塩化ナトリウム、5 % グリセロール、0 . 1 % C H A P S (3 - [(3 - コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ] - 1 - プロパン - スルホネート)、p H 3 . 8) を含有するバッファー中において、上記のように調製された A s p 2 - F c 酵素と一緒にインキュベートした。アッセイは、酵素 (2 5 n M 最終濃度) の添加によって開始され、切断は 4 8 5 n m 励起、5 3 8 n m 発光を用いる蛍光プレートリーダーにおいてモニターされた。ペプチドのC末端TAMRA基は効果的な消光剤として作用したので、ローダミンググリーン強度の増加が切断において観察された。

【0069】

該アッセイは、目的化合物の IC_{50} および K_i 値を決定するために使用された。

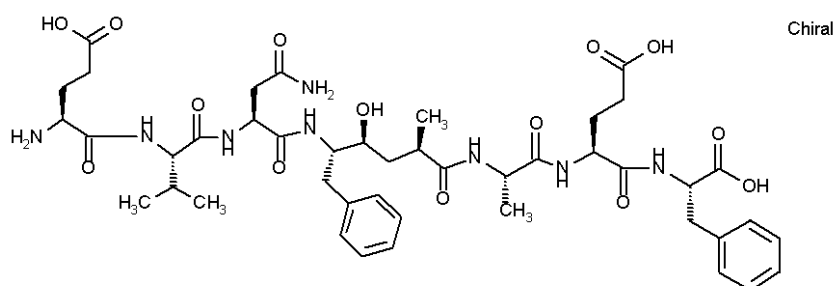
【化4】



(I)

【0070】

【化5】



(II)

を含む、多くのヒドロキシエチレン化合物が該アッセイにおける阻害剤であることがわかった。(I) および (II) について、各々、 7.7 nM および 7.3 nM の K_i 値が測定された。

【0071】

A s p 2 蛍光偏光アッセイ

A s p 2 活性部位で作用する化合物を同定するためにさらに競合アッセイを設計した。5 - , 6 - ローダミンググリーンをヒドロキシエチレン阻害剤 (I) の遊離N末端アミンに付加することによって該化合物を修飾し、標識したリガンド (III) を創製した。

【0072】

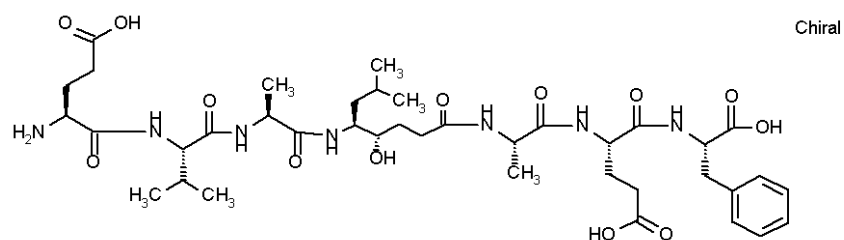
[illegible]

【 0 0 7 3 】

酵素およびリガンド (I I I) を変える 3 次元分析を行った。リガンド濃度範囲は 1、3、10、30 および 100 nM であった。酵素濃度範囲は、100 nM から下に連続 2 倍希釈 (11 回希釈 + 酵素なしの対照) であった。適当な濃度のリガンドを 5 % DMSO 中で調製した。酵素溶液を 2 倍の (x 2) アッセイバッファー (ここに、x 1 = 50 mM 酢酸ナトリウム、20 mM 塩化ナトリウム、5 % グリセロール、0.1 % CHAPS、pH 4.0) 中において調製した。5 μ l の酵素溶液 (種々の濃度) を 5 μ l のリガンド (種々の濃度) と低容量 384 ミクロタイタープレート中で混合した。試料を 15 分間平衡化した後、蛍光偏光を L J L Acquest プレートリーダーにおいて読取った。

【 0 0 7 4 】

【化7】



(I V)

【 0 0 7 5 】

酵素（固定濃度 2.5 nM）、リガンド（ I I I ）（固定濃度 2.5 nM）および試験化合物（10 μM から下に 2 倍の連続希釈）を最終アッセイ容量 10 μl において x 1 アッセイバッファー（50 mM 50 mM 酢酸ナトリウム、20 mM 塩化ナトリウム、5 % グリセロール、0.1 % CHAPS、pH 3.8）中で混合し、3 時間平衡化した。次いで蛍光偏光を読取った。実験は二重反復試験で行った。

蛍光リガンド（ I I I ）の完全な置換が、アッセイ中、試験化合物の最高濃度で観察された。67.5 nM の平均 K_i が得られた。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/GB 00/04039	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C12Q1/37 C07K7/02 C07K7/04	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages E WO 01 00663 A (OKLAHOMA MED RES FOUND) 4 January 2001 (2001-01-04) examples 7,8 Y WO 95 13084 A (HAEBICH DIETER ;MILES INC (US); KOENIG GERHARD (US); BENZ GUENTER) 18 May 1995 (1995-05-18) page 28, paragraph 3 -page 29, line 3 page 87, paragraph 2 -page 102 Y EP 0 855 444 A (SMITHKLINE BEECHAM PLC ;SMITHKLINE BEECHAM CORP (US)) 29 July 1998 (1998-07-29) cited in the application claim 16 --- -/--
Relevant to claim No.	1-19 1-9 1-9
☒ Further documents are listed in the continuation of box C.	
☒ Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 15 March 2001	Date of mailing of the international search report 02/04/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hart-Davis, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .onal Application No

PCT/GB 00/04039

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAHASRABUDHE, SUDHIR R. ET AL: "Enzymic generation of the amino terminus of the .beta.-amyloid peptide" J. BIOL. CHEM. (1993), 268(22), 16699-705 XP000573976 the whole document	1-9
A	WO 96 40885 A (MCCONLOGUE LISA C ;KEIM PAMELA S (US); SINHA SUKANTO (US); TAN HUA) 19 December 1996 (1996-12-19) cited in the application page 41, line 17 -page 48, line 34; claims 23-39	1-9
A	WO 98 15828 A (SCIOS INC ;CORDELL BARBARA (US); HIGAKI JEFFREY N (US)) 16 April 1998 (1998-04-16) claim 1; figure 1	1-9
P,X	ERMOLIEFF, JACQUES ET AL: "Proteolytic Activation of Recombinant Pro-memapsin 2 (Pro-.beta.-secretase) Studied with New Fluorogenic Substrates" BIOCHEMISTRY (2000), 39(40), 12450-12456 , XP002162928 the whole document	1-9
P,A	A K GHOSH, D SHIN, D DOWNS, G KOELSCH, X LIN, J ERMOLIEFF, J TANG: "Design of Potent Inhibitors for Human Brain Memapsin 2 (beta-Secretase)" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 122, March 2000 (2000-03), pages 3522-3523, XP002162929 cited in the application the whole document	10-19
P,X	HONG, LIN ET AL: "Structure of the protease domain of memapsin 2 (.beta.-secretase) complexed with inhibitor" SCIENCE (WASHINGTON, D. C.) (2000), 290(5489), 150-153 , XP002162930 the whole document	10-19

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 00/04039

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	SINHA SUKANTO ET AL: "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." NATURE (LONDON), vol. 402, no. 6761, 2 December 1999 (1999-12-02), pages 537-540, XP002162931 ISSN: 0028-0836 cited in the application	
P,A	HUSSAIN ISHRUT ET AL: "Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase." MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCE, vol. 14, no. 6, December 1999 (1999-12), pages 419-427, XP000908710 ISSN: 1044-7431 cited in the application the whole document	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 10-19

Present claims 10-19 relate to compounds defined by reference to a desirable property, namely their ability to inhibit the Asp 2 mediated cleavage of a polypeptide or protein substrate.

No technical features of the compounds are present in the above-mentioned claims which would lead to this desirable property, the technical features formulated so as to permit the execution of a meaningful search. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found for only a very small proportion of the substances which could fall within the scope of these claims. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. No means are present in the above-mentioned claims by which compounds known in the prior art could be distinguished from novel substances. No definition of the subject matter for which protection is sought is therefore derivable from these claims (Article 6 PCT) or the description (Article 5 PCT). Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search for claims 10-19 has been restricted to the substances which are clearly defined and supported by the description, namely the tested inhibitors (I), (II), (III) and (IV) exemplified in the description of the present application (pages 23-24).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. l. Application No

PCT/GB 00/04039

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0100663 A	04-01-2001	WO 0100665 A	04-01-2001
WO 9513084 A	18-05-1995	AU 679675 B	10-07-1997
		AU 3711093 A	18-11-1993
		AU 5726494 A	04-07-1994
		CA 2095888 A	12-11-1993
		CA 2151927 A	23-06-1994
		EP 0569777 A	18-11-1993
		EP 0694076 A	31-01-1996
		JP 8268911 A	15-10-1996
		JP 8508464 T	10-09-1996
		MX 9302725 A	31-08-1994
		NZ 247575 A	25-09-1996
		WO 9413319 A	23-06-1994
		NZ 272218 A	27-07-1997
		ZA 9303249 A	11-03-1994
		AU 7115094 A	29-05-1995
		CA 2175564 A	18-05-1995
		EP 0744954 A	04-12-1996
		JP 9505284 T	27-05-1997
EP 0855444 A	29-07-1998	CA 2221686 A	28-07-1998
		JP 10327875 A	15-12-1998
		JP 2000060579 A	29-02-2000
WO 9640885 A	19-12-1996	US 5744346 A	28-04-1998
		AU 6383396 A	30-12-1996
		EP 0871720 A	21-10-1998
		JP 11507538 T	06-07-1999
		US 5942400 A	24-08-1999
WO 9815828 A	16-04-1998	AU 4589297 A	05-05-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁷ (参考)	
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N	33/15	Z
	33/50		33/50	Z
	33/53		33/53	D
	33/533		33/533	
	33/566		33/566	
	33/58		33/58	Z
// C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	Z N A			A
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			
(71)出願人	スミスクライン・ビーチャム・コーポレイ ション SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406 - 0939、キング・オブ・プルシア、スウェー ドランド・ロード709番			
(72)発明者	ゲイリー・クリスティー イギリス、シーエム19・5エイダブリュ ー、エセックス、ハーロウ、サード・アベ ニュー、ニュー・フロンティアーズ・サイ エンス・パーク・サウス、スミスクライ ン・ビーチャム・ファーマシューティカル ズ			

(72)発明者 イシュレット・フセイン
イギリス、シーエム19・5エイダブリュ
ー、エセックス、ハーロウ、サード・アベ
ニュー、ニュー・フロンティアーズ・サイ
エンス・パーク・サウス、スミスクライ
ン・ビーチャム・ファーマシューティカル
ズ

(72)発明者 デイビッド・ジェイ・パウエル
イギリス、シーエム19・5エイダブリュ
ー、エセックス、ハーロウ、サード・アベ
ニュー、ニュー・フロンティアーズ・サイ
エンス・パーク・サウス、スミスクライ
ン・ビーチャム・ファーマシューティカル
ズ

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA20 DA36 FA15 FB01
FB03 FB07 FB12
4B024 AA11 BA14 CA04 CA07 DA02
GA11
4B063 QA18 QQ20 QR16 QR48 QR57
QS36 QX02
4C084 AA16 ZA02 ZA15 ZA16

专利名称(译)	筛选ASP2抑制剂的方法		
公开(公告)号	JP2003512043A	公开(公告)日	2003-04-02
申请号	JP2001532104	申请日	2000-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	史密丝克莱恩比彻姆公司		
申请(专利权)人(译)	史克必成公共有限公司 史克必成公司		
[标]发明人	ゲイリー・クリスティー イシュルト・フセイン デイビッド・ジェイ・パウエル		
发明人	ゲイリー・クリスティー イシュルト・フセイン デイビッド・ジェイ・パウエル		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P25/16 A61P25/28 C07K7/02 C12N9/99 C12N15/09 C12Q1/37 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/566 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/16 A61P25/28 C07K7/02 C07K14/4711 C12Q1/37 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2333/96472 G01N2500/00 G01N2500/02		
FI分类号	C12Q1/37 A61K45/00 A61P25/16 A61P25/28 C12N9/99 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/533 G01N33/566 G01N33/58.Z C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FA15 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/ /FB12 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/GA11 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QR57 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA16 4C084/ /ZA02 4C084/ZA15 4C084/ZA16		
优先权	1999024957 1999-10-21 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种筛选化合物以鉴定抑制多肽或蛋白质底物的Asp2介导的裂解的化合物的方法，其提供了包含Asp2和底物的反应系统；以及在不存在测试化合物的情况下的裂解程度。方法的特征在于在比较的测试化合物的存在下测量底物的裂解程度，由此鉴定的化合物，以及作为Asp2调节的APP裂解抑制剂和含β-淀粉样蛋白的化合物 它们在治疗中的用途，包括治疗或预防蛋白质相关疾病。

