

(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2005-537254

(P2005-537254A)

(43) 公表日 平成17年12月8日(2005.12.8)

| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------|----------------|-------------|
| A 6 1 K 45/00 | A 6 1 K 45/00 | 2 G O 4 5 |
| A 6 1 K 38/00 | A 6 1 K 39/395 | 4 C O 8 4 |
| A 6 1 K 39/395 | A 6 1 K 39/395 | 4 C O 8 5 |
| A 6 1 P 3/10 | A 6 1 P 3/10 | |
| A 6 1 P 7/02 | A 6 1 P 7/02 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2004-519368 (P2004-519368) | (71) 出願人 | 502006069 |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年7月8日 (2003.7.8) | | ユニベルシテア、メディッシュ、セントラム、ユトレヒト |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成17年2月22日 (2005.2.22) | | UNIVERSITAIR MEDISCH CENTRUM UTRECHT |
| (86) 国際出願番号 | PCT/NL2003/000501 | | オランダ国3584、シーエックス、ユトレヒト、ハイデルベルグラーン、100 |
| (87) 国際公開番号 | W02004/004698 | (71) 出願人 | 503208194 |
| (87) 国際公開日 | 平成16年1月15日 (2004.1.15) | | ユニベルシテイト、ユトレヒト、ホールディング ベスローテン、フェンノートシャップ |
| (31) 優先権主張番号 | 02077797.5 | | UNIVERSITEIT UTRECHT HOLDING B. V. |
| (32) 優先日 | 平成14年7月9日 (2002.7.9) | | オランダ国3584、ツェーカー、ユトレヒト、ジェナラーン、18アー |
| (33) 優先権主張国 | 欧州特許庁 (EP) | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 アミロイド結合タンパク質を含んでなる交差-β構造、および交差-β構造の検出方法、交差-β構造フィブリル形成の調節方法、および交差-β構造によって伝達される毒性の調節方法

(57) 【要約】

本発明は、交差 - 構造、およびこれらの交差 - 構造の生物学的役割に関する。透析により細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを調節し、または交差 - 構造形成および/または組織プラスミノゲンアクチベーター (t P A) 様活性を調節することによるコンホメーション病に伴うプラークを減少させる方法、並びに交差 - 構造を可視化することによる診断方法が開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

循環中に含まれる細胞外タンパク質の交差 - 構造形成を調節することを含んでなる、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを調節する方法。

【請求項 2】

循環中に含まれる細胞外タンパク質の交差 - 構造形成を増加させることを含んでなる、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを増加させる方法。

【請求項 3】

循環中に含まれる細胞外タンパク質の交差 - 構造形成を増加させることができる化合物を供給することを含んでなる、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを増加させる方法。

10

【請求項 4】

前記化合物がグルコースである、請求項 3 に記載の細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを増加させる方法。

【請求項 5】

循環中に含まれる細胞外タンパク質の交差 - 構造を安定化することを含んでなる、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを増加させる方法。

【請求項 6】

循環中に含まれる細胞外タンパク質の交差 - 構造形成を減少させることを含んでなる、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法。

20

【請求項 7】

循環中に含まれる細胞外タンパク質の交差 - 構造形成を減少させることができる化合物を供給することを含んでなる、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法。

【請求項 8】

組織プラスミノゲンアクチベーター (t P A) 様活性を調節することを含んでなる、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを調節する方法。

【請求項 9】

t P A 様活性を増加させることができる化合物を供給することを含んでなる、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを増加させる方法。

30

【請求項 10】

前記化合物が交差 - 構造を含んでなる、請求項 9 に記載の細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを増加させる方法。

【請求項 11】

前記化合物が、B 型カルボキシペプチダーゼ活性を阻害することができる、請求項 9 に記載の細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを増加させる方法。

【請求項 12】

前記化合物が、カルボキシペプチダーゼインヒビター (C P I) または C P I 様活性を含んでなる、請求項 9 または 11 に記載の細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを増加させる方法。

40

【請求項 13】

t P A 様活性を減少させることができる化合物を供給することを含んでなる、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法。

【請求項 14】

前記化合物が、タンパク質および/またはその機能的に同等のものおよび/またはその機能的断片である、請求項 13 に記載の細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法。

【請求項 15】

前記タンパク質が、タンパク質および/またはペプチド由来のカルボキシ末端リシンまたはアルギニンを開裂することができる B 型カルボキシペプチダーゼ、および/またはそ

50

の機能的に同等のものおよび/または機能的断片を含んでなる、請求項 1 4 に記載の細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法。

【請求項 1 6】

前記化合物が、リシン、アルギニンまたはそれらの機能的に同等のものである、請求項 3 に記載の細胞外タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法。

【請求項 1 7】

前記化合物が、e - アミノ - カプロン酸またはトラネキサム酸である、請求項 1 3 に記載の細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法。

【請求項 1 8】

交差 - 構造を含んでなる化合物と t P A 様活性を含んでなる化合物との相互作用を調節することを含んでなる、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを調節する方法。

【請求項 1 9】

交差 - 構造を含んでなる化合物と t P A 様活性を含んでなる化合物との相互作用を減少させることを含んでなる、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法。

【請求項 2 0】

交差 - 構造を含んでなる化合物と t P A 様活性を含んでなる化合物との相互作用を減少させることができる化合物を供給することを含んでなる、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法。

【請求項 2 1】

前記化合物が、タンパク質、および/またはその機能的に同等のものおよび/またはその機能的断片である、請求項 2 0 に記載の細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法。

【請求項 2 2】

前記タンパク質がフィンガードメインを含んでなる、請求項 2 1 に記載の細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法。

【請求項 2 3】

前記タンパク質が、抗体および/またはその機能的に同等のものおよび/またはその機能的断片を含んでなる、請求項 2 1 に記載の細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法。

【請求項 2 4】

t P A 様活性を含んでなる化合物と t P A 様活性の基質との相互作用を調節することを含んでなる、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを調節する方法。

【請求項 2 5】

交差 - 形成タンパク質の受容体の活性を調節することを含んでなる、細胞外タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを調節する方法。

【請求項 2 6】

コンホメーション病に伴うプラークを減少させるための、交差 - 構造形成を増加させることができる化合物の使用。

【請求項 2 7】

コンホメーション病に伴うプラークを減少させるための、交差 - 構造に結合することができる化合物の使用。

【請求項 2 8】

交差 - 構造を除去するための、交差 - 構造に結合することができる化合物の使用。

【請求項 2 9】

上記化合物が、タンパク質、および/またはその機能的に同等のものおよび/またはその機能的断片である、請求項 2 7 または 2 8 に記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 30】

前記化合物が、t P A または t P A 様活性、および/またはその機能的に同等のものおよび/または機能的断片を含んでなる、請求項 27 または 28 に記載の使用。

【請求項 31】

前記機能的断片がフィンガードメインを含んでなる、請求項 30 に記載の使用。

【請求項 32】

前記タンパク質が、抗体および/またはその機能的に同等のものおよび/または機能的断片である、請求項 29 に記載の使用。

【請求項 33】

コンホメーション病に伴うプラークを減少させるための、t P A 様活性を増加させることができる化合物の使用。 10

【請求項 34】

コンホメーション病に伴うプラークを減少させるための、交差 - 構造を含んでなる化合物と t P A 様活性を含んでなる化合物との相互作用を増加または安定化させることができる化合物の使用。

【請求項 35】

前記疾患が、アミロイドーシス型疾患、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、出血、血栓症、癌、敗血症および他の炎症性疾患、多発性硬化症、自己免疫疾患、記憶の喪失に関連した疾患またはパーキンソン病、および他のニューロン性疾患（癲癇）である、請求項 26 ~ 34 のいずれか一項に記載の使用。 20

【請求項 36】

コンホメーション病に伴うプラークの存在を決定するための、交差 - 構造エピトープを認識することができる抗体の使用。

【請求項 37】

コンホメーション病に伴うプラークの存在を決定するための、交差 - 構造結合ドメインの使用。

【請求項 38】

前記疾患がアルツハイマー病または糖尿病である、請求項 36 または 37 に記載の使用。

【請求項 39】 30

改良した 1 個の交差 - 構造結合ドメインまたは複数の交差 - 構造結合ドメインを含んでなる、組換え t P A。

【請求項 40】

請求項 39 に記載の組換え t P A を含んでなる、血栓崩壊の治療の方法。

【請求項 41】

フィンガードメインおよび/または B 型カルボキシペプチダーゼ活性を含んでなる化合物の有効量を個体に供給することを含んでなる、交差 - 構造によって伝達される効果を阻害する方法。

【請求項 42】

交差 - 構造によって伝達される効果を局所的に増加させることを含んでなる、細胞毒性およびタンパク質分解を局所的に増加させる方法。 40

【請求項 43】

交差 - 構造および/または t P A または t P A 様活性および/または C P I または C P I 様活性の有効量を供給することを含んでなる、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

透析によってまたは透析中に行われる、請求項 1 ~ 25 または 40 ~ 43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

請求項 1 ~ 25 または 40 ~ 44 のいずれか一項に記載の方法を行うための分離装置であって、

循環体液をエクス・ピボで輸送するための系を含んでなり、この系は、系に流入し且つ系から上記患者の循環に戻るための、患者の循環に連結するための手段を備えており、かつ、この系は、固相を含んでなり、固相は交差 - 構造を結合することができる少なくとも1種類の化合物を含んでなる、分離装置。

【請求項46】

透析装置である、請求項45に記載の分離装置。

【請求項47】

化合物が、交差 - 構造に対する抗体、またはその断片または誘導体、t P Aフィンガードメインおよび/またはその機能的に同等のもの、または交差 - 構造のマルチリガンド受容体を含んでなる、請求項45または46に記載の分離装置。

10

【請求項48】

試料中の交差 - 構造を検出する方法であって、

試料を交差 - 構造に結合することができる化合物と接触させ、交差 - 構造を前記化合物へ結合させ、結合によって生成した複合体を検出することを含んでなる、方法。

【請求項49】

試料が体液に由来する、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

体液が血液、血清または液である、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

化合物が、交差 - 構造、t P Aフィンガードメインおよび/またはその機能的に同等のもの、または交差 - 構造のマルチリガンド受容体に対する抗体またはその断片および/または誘導体である、請求項48～50のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項52】

化合物を固相に供給する、請求項48～51のいずれか一項に記載の方法。

【請求項53】

請求項48～52のいずれか一項に記載の方法を行うための診断装置であって、

試料容器、試料を交差 - 結合化合物と接触させる手段、交差 - 結合化合物、および結合した交差 - 構造を検出する手段を含んでなる、診断装置。

【請求項54】

未結合交差 - 構造を結合した交差 - 構造から分離する手段をさらに含んでなる、請求項53に記載の診断装置。

30

【請求項55】

交差 - 化合物を固相に供給する、請求項53または54に記載の診断装置。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

発明の分野

本発明は、生化学、分子生物学、構造生物学および医学の分野に関する。更に詳細には、本発明は、交差 - 構造、それらの結合タンパク質、およびそれらの生物学的役割に関する。

40

【0002】

緒言

増加しつつある一連の証拠は、球状タンパク質の変性により毒性を生じる可能性があることを示唆している。¹ 変性タンパク質は、部分構造化コンホメーションを採用することによってタンパク質凝集とフィブリル化を開始することができる。このようなフィブリル状凝集体は、様々な種類の組織に(ゆっくりと)蓄積し、様々な退行性疾患に関連している。「アミロイド」という用語は、これらのフィブリル状沈着物を記載するのに用いられる。アミロイドを特徴とする疾患はアミロイドーシスと呼ばれ、アルツハイマー病(AD)、軽鎖アミロイドーシス、糖尿病II型、および海綿状脳障害が挙げられる。最近、毒性がミスフォールドタンパク質の固有の特性であることが見出された。本発明によれば、こ

50

これらのコンホメーション病 (conformational disease) についてのこの共通の機構¹に関連する。

【0003】

交差 - 構造は、ペプチドまたはタンパク質の二次構造要素である。交差 - 構造は、タンパク質の変性、タンパク質分解または変性 (unfolding) によって形成することができる。これらの二次構造要素は、典型的にはタンパク質の球状領域には見られない。交差 - 構造は、アミロイドフィブリルに見出される。アミロイドペプチドまたはタンパク質は、細胞に対して細胞傷害性である。交差 - 構造は、積み重なった - シートから構成されている。交差 - 構造では、個々の - スtrandはフィブリルの長軸に垂直に並んでいるか、または - スtrandが繊維の長軸に平行に並んでいる。交差 - 構造における - シートの積み重なり方向は、繊維の長軸に垂直である。

10

【発明の概要】

【0004】

本発明者らは、本明細書において、タンパク質のグリケーションが交差 - 構造の形成も誘発することを報告する。現存する文献情報と組み合わせた本発明者らの結果は、球状タンパク質の変性によって共通構造が誘発されることを示している。従って、本発明は交差 - 構造を伴う新規経路を開示し、この経路は「交差 - 構造経路」と呼ばれる。この経路は、いわゆるマルチリガンド受容体を包含する幾つかの交差 - 構造結合タンパク質からなり、タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスに関与している。本発明者らは、交差 - 構造結合モジュールを含む新規な交差 - 結合タンパク質の同定も報告する。これらの知見は、交差 - 構造経路の同定を支持している。この新規経路の多数の様相の概略を下記に述べる。

20

【0005】

例えば、本発明は、タンパク質分解した、変性した、変性した (unfolded)、グリコ (glycated)、酸化した、アセチル化した、あるいは構造的に変化したタンパク質が交差 - 構造を有することを開示する。既知の交差 - 構造形成タンパク質の例は、アミロイドーシスを引き起こす総てのタンパク質、または疾患に関連したアミロイド沈着に見られるタンパク質であり、例えば、アルツハイマー - アミロイド (A β) およびアミリン (Islet A myloid PolyPeptide; IAPP) であるが、これらに限定されない。本発明は、フィブリン、グリコタンパク質 (例えば、グリコアルブミンおよびグリコヘモグロビン)、およびエン

30

【0006】

本発明は、更にタンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスのシグナルとしての交差 - 構造の形成の確認を開示する。

【0007】

セリンプロテオグリカン組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA) は、プラスミノゲンの開裂を介してプラスミンの形成を誘発する。プラスミンはフィブリンを開裂し、これは血餅のリーシスの際に起こる。マウスのフィブリン分解に本質的なものではないが^{3, 4}、tPAはフィブリン分解におけるその役割について長い間認められてきた^{5, 6}。プラスミノゲンのtPAによる活性化はフィブリンまたはフィブリン断片によって刺激されるが、その前駆体であるフィブリノーゲンによっては刺激されない⁷⁻¹⁰。これは、部分的にはtPAのフィブリンへの強力な結合とフィブリノーゲンへの弱い結合によって説明することができる。tPAの結合および活性化に関与するフィブリンおよびtPAにおける結合部位は、マッピングされており、詳細に研究されている⁸⁻²¹。しかしながら、tPAとフィブリンの相互作用についての正確な構造上の基礎は知られていない。フィブリンおよびフィブリン断片の他に、同様にtPAと結合し、tPAによって伝達されるプラスミン形成を刺激することができる他の多くのタンパク質も報告されている²²⁻³⁶。フィブリンおよびフィブリン断片の場合と同様に、これらのtPAについてのリガンドとtPAとの間の(複数の)相互作用の正確な性質は知られていなかった。更に、一次配列相同性を欠いているこれら総てのタンパク質がtPAと結合する理由および

40

50

仕方が知られていなかった。本発明は、交差 - 構造と結合することができるタンパク質としての組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) を開示する。更に、本発明は、交差 - 構造結合モジュールとしてのフィンガードメイン (フィブロネクチン I 型ドメインとも呼ばれる) および他の類似のフィンガードメインを開示する。本発明は、更にこれらのフィンガーに結合するタンパク質が典型的には交差 - 構造を形成することができることも開示する。

【0008】

フィブリンは交差 - 構造を含むので、本発明は、交差 - 構造の生成が生理学的過程に役割を果たしていることも開示する。本発明は、交差 - 構造の生成がシグナル形成経路の一部であり、タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを制御する「交差 - 構造経路」である。この経路の不適当な機能は、コンホメーション病^{3 7} および/またはアミロイドーシスのような疾患を発現することがある。

10

【0009】

本発明は、更に交差 - 構造がマルチリガンド受容体のリガンドにおける共通の通性であることを開示する^{3 8}。従って、本発明は、マルチリガンド受容体が「交差 - 構造経路」に属することを開示する。

【0010】

交差 - 構造の受容体の検討された最良の例は RAGE^{3 9 - 4 4} である。RAGE についてのリガンドの例は、A β 、タンパク質 - 高次グリケーション最終生成物 (AGE) 付加物 (グリコ - BSA など)、アンホテリンおよび S100 である。RAGE は、一層大きなファミリーのマルチリガンド受容体の一つであり^{3 8}、幾つかの他のを含み、CD36 などそれらのあるものは交差 - 構造を含むタンパク質に結合することが知られている (図 1 も参照されたい)。現在のところ、これらの受容体への結合に介在するこれらの受容体のリガンドにおける構造または構造類の正確な性質が何であるかは明らかになっていない。本発明者らは、タンパク質のグリケーションが交差 - 構造の形成も誘発することを報告する。従って、本発明者らは、これら総ての受容体が望ましくないまたは有害なタンパク質または病原体の分解および除去を扱う機構の一部を形成していることを開示する。これらの受容体は、感染性病原体または細胞の認識、アポトーシス細胞の認識、およびタンパク質複合体および/または病原体のインターナリゼーションに役割を果たしている。更に、これら総ての受容体は同一または同様の構造である交差 - 構造を認識して、望ましくない分子に応答することも開示される。本発明者らは、tPA が交差 - 構造と結合して、tPA がマルチリガンド受容体ファミリーに属する証拠を提供することを示す。本明細書に開示されるように、tPA および他のマルチリガンド受容体は交差 - 構造と結合して、望ましくない生体分子の分解に関与する。この経路におけるプロテアーゼ tPA の顕著な役割は、プラスミンの形成を包含するタンパク質分解カスケードを開始するその能力にある。タンパク質分解は、細胞外マトリックス成分の分解とその後の除去に本質的であると思われる。細胞外マトリックスに対する tPA の効果は、例えばインテグリンが介在する過程を介する細胞接着、細胞移行および細胞死に影響を及ぼす。本発明者らの研究に基づいて、本発明者らは少なくとも 3 種類の他のタンパク質である FXII (XII 因子) としても知られる FXII、肝細胞増殖因子アクチベーター (HGF α)、およびフィブロネクチンであって、1 個以上のフィンガードメインを含むものも「交差 - 構造経路」の部分であることの強力な証拠を提供した。

20

30

40

【0011】

特に、FXII の役割は、これが固有の凝固経路を活性化するので、重要である。固有経路の活性化、およびそれによる血管作用性ペプチドの形成および他の重要なタンパク質の活性化は、望ましくないタンパク質または病原体の防御および/またはクリアランスの過程に寄与する。「交差 - 構造経路」は、多くの方法で調節される。この経路を調節する因子としては、合成および分泌のモジュレーター、並びに活性のモジュレーターが挙げられる。この経路は、多くの生理学的および病理学的過程に関与している。従って、本発明は、更に交差 - 構造を形成するタンパク質の受容体の活性を調節することを含んでな

50

る、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを調節する方法も提供する。交差 - 構造形成タンパク質の例としては、RAGE、CD36、低密度リポタンパク質関連タンパク質(LRP)、スカベンジャー受容体B-1(SR-BI)、SR-Aが挙げられる。本発明は、FXII、HGFαおよびフィブロンectinも交差 - 構造の受容体であることを開示する。

【0012】

本発明は、組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)が交差 - 構造結合タンパク質、マルチリガンド受容体および「交差 - 構造経路」の構成因子であることを開示する。本発明は、tPAが、交差 - 構造によって誘発される細胞機能障害および/または細胞毒性に介在していることを開示する。本発明は、tPAが、プラスミノゲンの活性化による細胞機能障害および/または毒性に少なくとも部分的に介在していることを開示する。プラスミノゲンに依存する効果はB型カルボキシペプチダーゼ活性Bによって阻害され、その結果、交差 - 構造経路におけるカルボキシ末端リシン残基の役割が明らかになる。

10

【0013】

本発明は、とりわけ、tPAと結合するフィブリンおよび他のタンパク質における(複数の)構造、tPAにおける結合ドメイン、およびこの構造によって制御される(複数の)経路に関する。本発明は、tPAと結合することができるタンパク質およびペプチドにおける交差 - 構造の存在を開示する。本明細書に開示される結果は、交差 - 構造の存在と分子がtPAと結合する能力とに強い相関があることを示している。更に、これらの結果は、フィブリンにアミロイド構造が存在することを示している。これは、生理学的条件下では交差 - 構造が、以前には認識されていなかった現象を生じることができると示している。交差 - 構造の形成は、これまでは重篤な病理学的異常とのみ関連付けられてきた。tPAは変性タンパク質と結合し、これは、総てのタンパク質ではないにしても、多数のタンパク質が交差 - 構造または(複数の)交差 - 様構造を含むコンホメーションを採用することができることを示している。まとめれば、交差 - 構造の形成は、望ましくない分子、すなわちミスフォールドタンパク質、アポトーシス細胞または病原体の除去を適性に扱うのに必要な事象の生理学的カスケードを開始しおよび/またはこれに関与するものと思われる。図1は、「交差 - 構造経路」の図解表現を示している。この経路は、フィブリン溶解、ニューロンのシナプスネットワークの形成、使用済の、望ましくないおよび/または破壊された(変性)タンパク質のクリアランス、アポトーシスの誘発、およびアポトーシス細胞および病原体のクリアランスなどの幾つかの過程における望ましくない生体分子の除去を調節する。調節が不十分であるかまたは不適當であったり、または不均衡であったりすると、この経路は重篤な疾患を生じることがある。

20

30

【0014】

従って、第一の態様では、本発明は、循環中に含まれる細胞外タンパク質の交差 - 構造形成(および/または交差 - 構造によって伝達される活性)を調節することを特徴とする、上記タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを調節する方法を提供する。

【0015】

2種類の主要な規則的タンパク質フォールディングパターンがあり、それらはβ-シートおよびα-ヘリックスとして知られている。逆平行β-シートは、伸びたポリペプチドが前後してそれ自身の上に折り重なるときに形成し、鎖のそれぞれの部分はその直ぐ隣のものとは逆方向になっている。これによって、隣接した鎖のペプチド結合を連結する水素結合によって互いに固定された構造が得られる。同じ方向に伸びるポリペプチド鎖の領域は、平行β-シートを形成する。交差 - 構造は、層板状β-シートから構成されている。交差 - 構造において、個々のα-ストランドはフィブリルの長軸に垂直に伸び、またはβ-ストランドは繊維の長軸に平行に伸びる。交差 - 構造におけるβ-シートの積み重なる方向は、長い繊維軸に垂直である。本明細書で実験の部に開示されているように、広範囲のタンパク質は交差 - 構造を採用することができ、その上、これらの交差 - 構

40

50

造を含んでなるタンパク質は、総て t P A に結合してこれを刺激し、これによって望ましくないまたは損傷しているタンパク質または病原体の破壊を促進することができる。

【 0 0 1 6 】

細胞外タンパク質は、典型的には 1 個の細胞または複数の細胞の外側に存在するタンパク質として定義される。

【 0 0 1 7 】

タンパク質分解および / またはタンパク質クリアランスは、望ましくないタンパク質、例えば望ましくないおよび / または破壊された (例えば、変性した) タンパク質の分解および除去を包含する。また、フィブリン溶解、ニューロンのシナプスネットワークの形成、使用済の、望ましくないおよび / または破壊された (変性) タンパク質のクリアランス、アポトーシスの誘発、およびアポトーシス細胞および病原体のクリアランスなどの幾つかの過程における望ましくない生体分子の除去も包含する。

10

【 0 0 1 8 】

「循環中の」という用語は、本明細書では、1 個の細胞または複数の細胞の外側の循環、例えば血液の継続的運動として定義されるが、これに限定されない。

【 0 0 1 9 】

更にもう一つの態様では、本発明は、交差 - 構造の形成および / または循環中に含まれる細胞外タンパク質の交差 - 構造によって伝達される活性を増加させることを特徴とする、上記タンパク質の分解および / またはタンパク質クリアランスを増加させる方法を提供する。特定のタンパク質の交差 - 構造形成の増加により、例えば t P A が活性化され、これが次にプラスミノゲンの開裂によるプラスミンの形成を誘発し、このようにして分解および / またはタンパク質クリアランスが増加する。

20

【 0 0 2 0 】

好ましい態様では、本発明は、循環中に含まれる細胞外タンパク質の交差 - 構造形成 (および / または交差 - 構造によって伝達される活性) を増加することができる化合物を提供することを特徴とする、上記タンパク質の分解および / またはタンパク質クリアランスを増加する方法を提供する。更に一層好ましい態様では、交差 - 構造形成を増加することができる上記化合物はグルコースである。ある種の状況では、グルコースのタンパク質への付加によって、不可逆的な非酵素的グリケーション反応を生じ、主にグルコース分子はタンパク質のリシン残基の遊離アミノ基に結合する。更に、アルギニン残基の N - 末端および遊離アミノ基は、グリケーションを受けやすい。本明細書の実験の部には、グリケーションによって交差 - 構造が形成されることが開示されている。従って、本発明は、循環中に含まれる細胞外タンパク質の交差 - 構造形成を増加することができる化合物を提供することを特徴とする、上記タンパク質の分解および / またはタンパク質クリアランスを増加する方法を提供する。

30

【 0 0 2 1 】

タンパク質における交差 - 構造形成を増加 (または模倣) することができる化合物の他の例は、無極性溶液、尿素 (本明細書の実験の部に開示) 、イオン (例えば、 Zn^{2+}) である。しかしながら、例えば変性、低 pH、温度、突然変異、または一般的にはタンパク質修飾 (例えば、酸化) により交差 - 構造形成を増加しまたは模倣する他の方法もあることは明らかである。

40

【 0 0 2 2 】

好ましくは交差 - 構造を含んでなるタンパク質を分解しおよび / または除去するための上記方法のいずれかによって循環中に含まれる細胞外タンパク質の交差 - 構造形成を増加することを特徴とする、上記タンパク質の分解および / またはタンパク質クリアランスを増加する方法の他に、交差 - 構造から構成されていないタンパク質を分解しおよび / または除去することもできる。これは、例えば、分解および / または除去する必要があるタンパク質またはその附近に交差 - 構造を含んでなる化合物および t P A 様活性を含んでなる化合物を供給することによって達成される。交差 - 構造を含んでなる化合物の一例は、フィブリン、または上記交差 - 構造を含んでなる断片であり、t P A 様活性を

50

含んでなる化合物の一例は t P A である。

【 0 0 2 3 】

もう一つの態様では、本発明は、循環中に含まれる細胞外タンパク質の交差 - 構造形成を減少させることを特徴とする上記タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法を提供する。更に好ましくは、本発明は、循環中に含まれる細胞外タンパク質の交差 - 構造形成を減少させることができる化合物を提供することを特徴とする上記タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法を提供する。交差 - 構造形成の現象は、交差 - 構造の形成に参与する基を保護しまたはブロックすることによって達成される。交差 - 構造形成を減少させることができる化合物の例は、コンゴレッド、抗体、 - 遮断薬 (- breakers)、ホスホネート、ヘパリン、アミノ - グアニジン、またはラミニン^{4 5} である。タンパク質での交差 - 構造形成を減少させる更にもう一つの方法は、上記タンパク質のグリケーションに参与するグルコース基の除去によるものである。

10

【 0 0 2 4 】

更にもう一つの態様では、本発明は、 t P A または t P A 様活性を調節することを特徴とする細胞外タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを調節する方法を提供する。 t P A は、プラスミノゲンの開裂によりプラスミンの形成を誘発する。プラスミンはフィブリンを開裂し、これは血餅のリーシス中に起こる。プラスミノゲンの t P A による活性化はフィブリンまたはフィブリン断片によって刺激されるが、その前駆体であるフィブリノーゲンによっては刺激されない。「 t P A 様活性」という用語は、本明細書では様々な量の可能性があるプラスミンの形成を誘発することができる化合物および/または他の t P A によって伝達される活性として定義される。好ましくは、 t P A 様活性は、その基質および/または補助因子に対して一層高い活性または親和性を有するように修飾される。これは、例えば、上記 t P A 様活性に交差 - 構造を含んでなるタンパク質の複数の結合ドメインを提供することによって達成される。好ましくは、上記 t P A 様活性は複数のフィンガードメインを備えている。本明細書では、 t P A フィンガードメインおよびフィブロネクチンフィンガードメインの三次元構造 4 - 5 は局部電荷密度分布に関して顕著な構造的相同性を示すことを開示する。いずれの構造も、電荷が交互になっている 5 個のアミノ酸残基の同様な溶媒に暴露したストレッチ (solvent exposed stretch) を含んでおり、 t P A については、 Arg7、 Glu9、 Arg23、 Glu32、 Arg30、 およびフィブロネクチンについては、 Arg83、 Glu85、 Lys87、 Glu89、 Arg90 であるそれぞれ 5 番目のフィンガードメインに位置したものである。帯電した残基整列は、フィンガーモジュールの同じ側に位置している。従って、好ましくは t P A 様活性は ArgXGlu(X)13Arg(X)8GluXArg または ArgXGluXLysXGluArg を含んでなる 1 個以上の追加フィンガードメインを備えている。

20

30

【 0 0 2 5 】

t P A の活性および/または t P A によって伝達されるプラスミノゲンの活性化は、フィブリン断片、またはカルボキシ末端にリシンまたはアルギニンを含む他のタンパク質断片への結合によって増加する。カルボキシペプチダーゼ B (C p B) またはトロンビン活性化フィブリン溶解インヒビター (T A F I、カルボキシペプチダーゼ U またはカルボキシペプチダーゼ R と呼ばれる) などこれらに限定されない B 型カルボキシペプチダーゼは、他の場合には t P A および/またはプラスミノゲンに結合してプラスミン形成を刺激するフィブリン断片のカルボキシ末端リシンおよびアルギニン残基を開裂させる酵素である。

40

【 0 0 2 6 】

好ましい態様では、本発明は、細胞外タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを増加させる方法であって、 t P A 様および/または t P A によって伝達される活性または複数の活性を増加させることができる化合物を提供することを特徴とする方法を提供する。更に好ましい態様では、本発明は、細胞外タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを増加させる方法であって、 t P A 様活性を増加することができる化合物を提供し、上記化合物が交差 - 構造を含んでなることを特徴とする方法を提供す

50

る。もう一つの態様では、本発明は、B型カルボキシペプチダーゼ活性を阻害することができる化合物を供給することを特徴とする、細胞外タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを増加する方法を提供する。更に好ましい態様では、上記化合物はカルボキシペプチダーゼインヒビター(CPI)活性を含んでなる。

【0027】

更にもう一つの態様では、本発明は、tPA様活性を減少させることができる化合物を供給することを特徴とする細胞外タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法を提供する。更に好ましくは、本発明は、細胞外タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法であって、tPA様活性またはtPAによって伝達される活性または複数の活性を減少させることができる化合物を提供し、上記化合物がタンパク質、および/またはその機能的に同等なものおよび/または機能的断片であることを特徴とする、方法を提供する。例えば、tPA様活性を減少させることができるこのような化合物は、結合し且つ開裂しないtPAのインヒビターまたはtPAの基質である。tPA様活性またはtPAによって伝達される活性を減少させることができる化合物の例としては、リシン、アルギニン、e-アミノ-カプロン酸またはトランネキサム酸(tranexamic acid)、セルピン(例えば、ニューロセルピン、PAI-1)、tPA-Pevabloc、tPA様活性またはtPAによって伝達される活性を阻害する抗体、または(複数の)B型カルボキシペプチダーゼが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、リシンを供給することによって、C末端リシン残基を含んでなるタンパク質のプラスミノーゲンのクリングルドメインへの結合が防止または阻害される。従って、tPAの活性化が防止または阻害される。好ましくは、tPA様活性またはtPAによって伝達される活性または複数の活性を減少させることができる上記化合物は、tPA様活性またはtPAによって伝達される活性または複数の活性を減少させ、更に一層好ましくは、tPA様活性またはtPAによって伝達される活性または複数の活性は完全に阻害される。

【0028】

機能的断片および/または機能的に同等なものは、典型的には様々な量の可能性がある同一機能を行うことができる断片および/または同等なものとして定義される。例えば、交差-構造に結合することができる抗体の機能的断片は、上記抗体のFab'断片である。

【0029】

更にもう一つの態様では、本発明は、交差-構造を含んでなる化合物とtPA様活性を含んでなる化合物との相互作用を調節することを特徴とする細胞外タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを調節する方法を提供する。もう一つの態様では、本発明は、交差-構造を含んでなる化合物とtPA様活性を含んでなる化合物との相互作用を減少させることを特徴とする細胞外タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法を提供する。このような化合物は、例えば、化学薬品、タンパク質性物質、またはそれらの組合せである。更に好ましい態様では、本発明は、交差-構造を含んでなる化合物とtPA様活性を含んでなる化合物との相互作用を減少させることができる化合物を提供することを特徴とする細胞外タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法を提供する。更に一層好ましくは、本発明は、本発明による細胞外タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法であって、上記化合物がタンパク質、および/またはその機能的に同等なものおよび/または機能的断片であるものを提供する。更に一層好ましくは、上記タンパク質は抗体、および/またはその機能的に同等なものおよび/または機能的断片である。他の例は、コンゴレッドまたはチオフラビンである。本発明は、交差-構造を含んでなる化合物とtPA様活性を含んでなる化合物との相互作用を減少させ、上記相互作用が、この相互作用と競合することができる化合物を提供することによって減少することを特徴とする、細胞外タンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスを減少させる方法も提供する。更に詳細には、上記相互作用と競合することができる上記化合物はフィンガードメインを含んでなり、更に一層好ましくは、上記フィンガードメインは、電荷が交互になっている少なくとも5個のアミノ酸残基のストレッチ、例えばArgXGlu(X)₁₋₃Ar

10

20

30

40

50

g(X)。G l u X A r g または A r g X G l u X L y s X G l u A r g を含んでなる。好ましくは、上記化合物はフィブロネクチン、F X I I、H G F a または t P A である。本発明は、交差 - 構造を含んでなる化合物と t P A 様活性を含んでなる化合物との相互作用を増加させることを特徴とする細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを増加させる方法も含んでなることは明らかである。これは、例えば、交差 - 構造を含んでなる化合物と t P A 様活性を含んでなる化合物との相互作用を増加させることができる化合物を提供することによって達成される。好ましくは、交差 - 構造を含んでなる化合物と t P A 様活性を含んでなる化合物との相互作用を増加させることができる上記化合物は、タンパク質、および/またはその機能的に同等なものおよび/または機能的断片である。例えば、交差 - 構造を含んでなる化合物と t P A 様活性を含んでなる化合物との相互作用を安定化する抗体が上記 t P A 様活性を継続的な活性化状態にすると、これによってタンパク質の分解および/またはタンパク質クリアランスが増加する。しかしながら、交差 - 構造を含んでなる化合物と t P A 様活性を含んでなる化合物との相互作用の増加は、例えば、t P A 様活性を含んでなる上記化合物に (t P A、フィブロネクチン、F X I I または H G F a から得ることができる) 他のまたはそれ以上のフィンガードメインを供給することによるまたは R A G E または C D 3 6 などの結合ドメインを包含することによるドメインの交換のように、交差 - 構造を含んでなる化合物または t P A 様活性を含んでなる化合物での突然変異によっても達成されることが分かる。

10

【 0 0 3 0 】

更にもう一つの態様では、本発明は、t P A 様活性を含んでなる化合物と上記活性の基質との相互作用を調節することを特徴とする、細胞外タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスを調節する方法を提供する。相互作用を増加または減少させることができる多数の方法があることは明らかである。t P A 様活性を含んでなる化合物と上記活性の基質との相互作用の増加は、例えば、t P A 様活性を含んでなる化合物に 1 回の突然変異または複数の突然変異を行って、t P A 様活性を有する化合物のその基質に対する親和性を向上させることによって達成される。

20

【 0 0 3 1 】

更にもう一つの態様では、本発明は、交差 - 構造結合ドメインを含んでなる化合物を用いて循環中から交差 - 構造を除去する方法を提供する。好ましくは、上記化合物は t P A または t P A のフィンガードメインである。本発明は、H G F a、F X I I およびフィブロネクチンのフィンガードメインなどこれらに限定されない他の交差 - 構造をも含んでなることは明らかである。本発明は、交差 - 構造と結合する抗体をも含んでなることは明らかである。

30

【 0 0 3 2 】

本発明は、コンホメーション病、糖尿病 I I 型および/または老化 (例えば、アルツハイマー病) に関与する (アミロイド) プラークの形成を予防しまたは減少させ/少なくする新規な方法の使用を開示する。プラークは、典型的には細胞外のフィブリル状タンパク質沈着物 (フィブリル状凝集体) として定義され、退行性疾患に特徴的である。成分のアミロイドタンパク質の「本来の」特性は変化することがあり、あるものはイン・ビボで可溶性オリゴマー (例えば、家族性のアミロイド多発性ニューロパシーにおけるトランスチレチン) であり、一方他のものは柔軟なペプチド (例えば、アルツハイマー病 (A D) におけるアミロイド - b) である。例えば、神経変性疾患 (A D、プリオン異常) のコンホメーション病の基本的病因は、異常な病理学的タンパク質のコンホメーション、すなわち正常な細胞および/または循環タンパク質の不溶性の構造リッチな集合形態であって、脳に沈着するものへの転換に関係すると考えられる。これらの沈着物は毒性であり、神経障害や死をもたらす。交差 - 構造の形成は、重篤な病理学的異常としか関連付けられてこなかった。本発明者らの結果は、t P A および交差 - 構造形成タンパク質の他の受容体に変性タンパク質と結合することができることを示しており、多数のタンパク質が交差 - または交差 - 様構造を含むコンホメーションを採用することができることを示唆している。まとめて考えると、交差 - 構造の形成は、望ましくない分子、すなわちミスフ

40

50

オールドタンパク質、アポトーシス細胞または病原体の除去を適性に扱うのに必要な事象の生理学的カスケードを開始しおよび/またはこれに関与する。コンホメーション病に伴うタンパク質において交差 - 構造形成を増加することによって、タンパク質分解および/またはタンパク質クリアランスの経路が劣化して、プラークが減少し、または更に好ましくは、上記プラークは完全に除去される。従って、コンホメーション病の影響は少なくなり、または更に好ましくは、完全になくなる。

【0033】

もう一つの態様では、本発明は、コンホメーション病に伴うプラークを減少させるため、交差 - 構造形成を増加させることができる化合物の使用を提供する。もう一つの態様では、本発明は、コンホメーション病に伴うプラークを少なくしおよび/または交差 - 構造によって伝達される毒性を抑制するための、交差 - 構造に結合することができる化合物の使用を提供する。本発明の好ましい使用では、上記化合物はタンパク質および/またはその機能的に同等のものおよび/または機能的断片であり、更に一層好ましくは、上記タンパク質は t P A、フィンガードメイン、抗体および/またはその機能的に同等のものおよび/または機能的断片である。このような抗体の例は、4 B 5 または 3 H 7 である。

10

【0034】

更にもう一つの態様では、本発明は、コンホメーション病に伴うプラークを減少させるため、t P A 様活性を増加することができる化合物の使用を提供する。好ましくは、t P A 様活性は、その基質および/または補助因子に対して一層高い活性または親和性を有するように修飾される。これは、例えば、上記 t P A 様活性に交差 - 構造を含んでなるタンパク質についての複数の結合ドメインを供給することによって達成される。好ましくは、上記結合ドメインはフィンガードメインを含んでなり、更に一層好ましくは、上記フィンガードメインは、電荷が交互になっている少なくとも5個のアミノ酸残基のストレッチ、例えば $\text{A r g X G l u (X)}_{1-3} \text{A r g (X)}_8 \text{G l u X A r g}$ または $\text{A r g X G l u X L y s X G l u A r g}$ を含んでなる。更に一層好ましくは、上記フィンガードメインはフィブロネクチン、F X I I、H G F a または t P A から誘導される。

20

【0035】

更にもう一つの態様では、本発明は、交差 - 構造を除去するための、交差 - 構造に結合することができる化合物の使用を提供する。好ましくは、上記化合物は、タンパク質および/またはその機能的に同等のものおよび/または機能的断片である。更に好ましくは、上記化合物は、t P A または t P A 様活性、および/またはその機能的に同等のものおよび/または機能的断片を含んでなる。更に一層好ましくは、上記機能的断片はフィンガードメインを含んでなる。好ましくは、上記フィンガードメインは、電荷が交互になっている少なくとも5個のアミノ酸残基のストレッチ、例えば $\text{A r g X G l u (X)}_{1-3} \text{A r g (X)}_8 \text{G l u X A r g}$ または $\text{A r g X G l u X L y s X G l u A r g}$ を含んでなる。更に一層好ましくは、上記フィンガードメインは、フィブロネクチン、F X I I、H G F a または t P A から誘導される。もう一つの好ましい態様では、上記タンパク質は、抗体および/またはその機能的に同等のものおよび/または機能的断片である。この使用により、本発明は、例えば循環から、好ましくは体外透析により交差 - 構造を含んでなるタンパク質を除去するための治療方法などを提供する。例えば、敗血症の患者に、例えば、好ましくは固定化したフィンガードメインを備えた手段により上記患者の血液を透析することによるこの使用を行う。例えば、このフィンガードメインを、キャリアー、または上記透析に用いたチューブの内側に結合することができる。この方法では、総ての交差 - 構造を含んでなるタンパク質は上記患者の血流から除去され、これによって上記患者から上記交差 - 構造を含んでなるタンパク質によって引き起こされる負の効果が軽減される。フィンガードメインを含んでなる化合物の他に、抗体またはコンゴレッドのような他の交差 - 構造に結合する化合物を用いることもできる。また、この使用を腎臓患者の血液透析に応用できることは明らかである。

30

40

【0036】

50

更にもう一つの態様では、本発明は、コンホメーション病に伴うプラークを減少させるための、交差 - 構造を含んでなる化合物と t P A 様活性を含んでなる化合物との相互作用を増加しまたは安定させることができる化合物の使用を提供する。交差 - 構造を含んでなる化合物と t P A 様活性を含んでなる化合物との相互作用を増加しまたは安定させることができる化合物の例は、本明細書に示されている。好ましくは、本発明による使用であって、上記コンホメーション病がアルツハイマー病または糖尿病であるものを提供する。本発明は、コンホメーション病に伴うプラークを減少し / 少なくするための使用を提供するだけでなく、上記疾患の攻撃を抑制することもでき、更に好ましくは、完全に予防することもできることは明らかである。本発明によって予防および / または治療することができる疾患の例は、コンホメーション病、アミロイドーシス型疾患、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、出血、血栓症、癌、敗血症および他の炎症性疾患、多発性硬化症、自己免疫疾患、記憶の喪失に関連した疾患またはパーキンソン病、および他のニューロン性疾患（癲癇）である。

10

【0037】

もう一つの態様では、本発明は、コンホメーション病に伴うプラークの存在を決定するための交差 - 構造エピトープを認識することができる抗体の使用を提供する。更にもう一つの態様では、本発明は、コンホメーション病に伴うプラークの存在を決定するための、交差 - 構造結合ドメイン（好ましくは、例えば t P A 由来のフィンガードメイン）の使用を提供する。

【0038】

本発明のこれらの使用は、新たな診断手段を提供する。本発明により、初めて一般的な構造エピトープが開示され、且つ診断分析法が上記交差 - 構造の存在に基づくものとすることができた。このような使用は、コンホメーション病、またはアルツハイマーや糖尿病のようなアミロイド形成に関連した疾患の診断的同定に特に有用である。この診断的使用は、総てのアミロイドーシス型疾患、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、出血、癌、敗血症および他の炎症性疾患、多発性硬化症、自己免疫疾患、記憶の喪失に関連した疾患またはパーキンソン病、および他のニューロン性疾患（癲癇）のような交差 - 構造形成を伴う他の疾患にも有用である。例えば、（例えば、t P A の）フィンガードメインを用いて、これに標識（放射性、蛍光性など）を供給することができる。次に、この標識したフィンガードメインをイン・ピトロまたはイン・ピボで交差 - 構造を含んでなるタンパク質の検出に用いることによって、コンホメーション病に伴うプラークの存在を決定することができる。例えば、E L I S A 分析法を用いて患者の敗血症の量を決定することができ、またはコンホメーション病に伴うプラークの存在を突き止めることができる。

20

30

【0039】

更にもう一つの態様では、本発明は、1個の改良された交差 - 構造結合ドメインまたは複数の交差 - 構造結合ドメインを含んでなる組換え t P A を提供する。好ましくは、上記 t P A は、複数の場合によっては様々なフィンガードメインを備えている。1個の改良された交差 - 構造結合ドメインまたは複数の交差 - 構造結合ドメインを含んでなる組換え t P A は、様々な目的に用いられる。例えば、血栓崩壊の改良治療、または交差 - 構造を含んでなるタンパク質の循環からの除去を必要としている患者の循環から交差 - 構造を含んでなるタンパク質を除去する方法で用いられる。1個の改良された交差 - 構造結合ドメインまたは複数の交差 - 構造結合ドメインを含んでなる組換え t P A のもう一つの使用は、診断分析法、例えば B S E 検出キットまたは像形成実験における使用である。1個の改良された交差 - 構造結合ドメインまたは複数の交差 - 構造結合ドメインを含んでなる組換え t P A を用いるこの像形成は、例えばアポトーシスの検出に有用である。例えば、放射能標識した t P A に限定されないが、標識 t P A を個体に接種した後、体内における上記標識 t P A を検出して、局在化する。1個の改良された交差 - 構造結合ドメインまたは複数の交差 - 構造結合ドメインを含んでなる上記組換え t P A は、治療目的にも有用であることは明らかである。

40

【0040】

50

本発明は、交差 - 構造が身体のある部分、例えば、脳に存在するときには有害であり且つ交差 - 構造と t P A の結合によって損傷が引き起こされることを明らかにしているので、フィンガードメインを含んでなるタンパク質の有効量を供給して t P A についての交差 - 構造の結合部位をブロックすることを含んでなる交差 - 構造によって伝達される効果を阻害する方法を提供する。上記の交差 - 構造によって伝達される効果は、B 型カルボキシペプチダーゼ活性の有効量を供給して t P A 活性を抑制することによって更に減少させることができる。

【 0 0 4 1 】

もう一つの態様では、局所的な交差 - 構造によって伝達される効果を、腫瘍に対して用いることができる。この効果に対して、交差 - 構造および / または交差 - 構造誘発化合物の有効量を t P A または t P A 様活性を有する化合物、および / または C P I または C P I 様活性を有する化合物と共に局所投与することを含んでなる局所的細胞毒性および / またはフィブリン溶解を増加させる目的で、交差 - 構造によって伝達される効果を局所的に誘発させる。

【 0 0 4 2 】

本発明は、もう一つの態様では、エクス・ピボ、例えば、透析によって行う本発明による方法を提供する。この態様によれば、患者の循環体液（血液）を身体の外側の系に導いて、循環から交差 - 構造を除去する。好ましくは、このような系は、入口と出口で対循環に連結されたフロールー系である。交差 - 構造は、本明細書で以前に定義したように、交差 - 結合化合物に結合することによって除去される。いかなる要素も系からの交差 - 結合化合物を患者の循環に導くようになっていないことが極めて重要である。好ましい系は、その理由からとりわけ透析系である。本発明は、上記の方法を行うための装置も提供する。例えば、本発明は、本発明による方法を行うための分離装置を提供し、上記装置は循環体液をエクス・ピボで輸送する系を含んでなり、上記系は、系に流入し且つ系から上記患者の循環に戻るための、患者の循環に連結するための手段を備えており、上記系は、固相を含んでなり、上記固相は交差 - 構造を結合することができる少なくとも 1 種類の化合物を含んでなる。交差 - 構造を結合するための化合物は、本明細書に開示されている。好ましい装置は透析装置である。

【 0 0 4 3 】

本発明は、試料中の交差 - 構造の検出方法も提供する。このような試料は、組織試料、生験材料など、体液試料、例えば、血液、血清、体液、C S F、尿などでよい。従って、本発明は、試料を交差 - 構造と結合することができる化合物と接触させ、交差 - 構造を上記化合物に結合させ、結合によって形成した複合体を検出することを含んでなる、試料中の交差 - 構造を検出する方法を提供する。

【 0 0 4 4 】

交差 - 結合化合物は、本明細書で上記に定義されている。複合体またはその構成成分の 1 つは、抗体または他の特異結合化合物、その他の交差 - 結合化合物などを伴う任意の通常的手段によって検出することができる。検出は、上記複合体、または上記複体の結合パートナーまたはその構成成分を標識することによる、または複合体対未結合材料の物理的または化学的パラメータの変化を測定することによる直接的なものであることができる。これは、標識を備えた化合物を更に結合することによる間接的なものであることもできる。標識は、放射性標識、酵素、蛍光分子などでよい。

【 0 0 4 5 】

本発明は、上記診断法を行うための装置も提供する。例えば、本発明は、試料容器、上記試料を交差 - 結合化合物と接触させる手段、交差 - 結合化合物、および結合した交差 - 構造を検出する手段を含んでなる、本発明による方法を行うための診断装置を提供する。好ましくは、この装置は、未結合交差 - 構造を結合した交差 - 構造から分離する手段を含んでなる。これは、典型的には固相上で交差 - 結合化合物を提供することによって行うことができる。

【 発明の具体的説明 】

10

20

30

40

50

【0046】

本発明は、(i)「交差 - 構造経路」の同定、(ii)交差 - 構造受容体としてのマルチリガンド受容体の同定、(iii)交差 - 結合モジュールとしてのフィンガードメインの同定、および(iv)「交差 - 構造経路」の一部としてのtPA、FXII、HGFαおよびフィブロネクチンなどのフィンガー含有タンパク質の同定を開示する。

【0047】

本発明は、交差 - 構造と結合することが以前は知られていなかった化合物も提供する。

【0048】

本明細書に開示されるように、本発明は、交差 - 構造の過剰形成に関連した疾患の検出および治療のための化合物および方法を提供する。このような疾患としては、アルツハイマー病および他の種類のアミロイドーシスなど既知のコンホメーション病が挙げられる。しかしながら、本発明は、交差 - 構造の過剰形成に関連していることが知られていない他の疾患も交差 - 構造の過剰形成によって引き起こされることも開示する。このような疾患としては、アテローム性動脈硬化症、敗血症、散在性血管内凝固症候群、溶血性尿毒症症候群、子癇前症、慢性関節リウマチ、自己免疫疾患、血栓症および癌が挙げられる。

【0049】

本発明によれば、この化合物は交差 - 構造結合分子であり、好ましくはフィンガードメイン、または1個以上のフィンガードメインを含む分子であるか、または1個以上のフィンガードメインのペプチド様類似体である。この化合物は、交差 - 構造に向けられた抗体またはその機能的断片であることもできる。

【0050】

本発明によれば、上記化合物はマルチリガンド受容体またはその断片であってもよい。上記化合物は、例えば、RAGE、CD36、低密度リポタンパク質関連タンパク質(LRP)、スカベンジャー受容体B-1(SR-BI)、SR-A、またはこれらのタンパク質の1つの断片であってもよい。

【0051】

フィンガードメイン、フィンガー含有分子、または抗体は、ヒト、マウス、ラット、または任意の他の種由来のものであってもよい。

【0052】

本発明によれば、それぞれのタンパク質のアミノ酸は、ペプチドの親和性、効力、バイオアベイラビリティおよび/または半減期を増加/減少することができる他のアミノ酸によって置き換えることができる。変更としては、通常置換(酸-酸、バルキー-バルキーなど)、D-アミノ酸の導入、ペプチドを環状にすることなどが挙げられる。

【0053】

更に、本発明は、

- 1) 交差 - 構造の存在を検出、
- 2) アミロイドフィブリルの形成を抑制、
- 3) 交差 - 構造によって誘発される毒性を調節、
- 4) 循環から交差 - 構造含有分子を除去

するための化合物および方法を提供する。

【0054】

本発明は、試料溶液における交差 - 構造を測定するための分析法を調製する方法を提供する。

【0055】

本発明は、組織試料または生体細胞または動物から得られる他の試料における交差 - 構造を検出する方法を提供する。

【0056】

本発明は、交差 - 構造フィブリル形成を抑制する組成物を調製するための化合物およ

び方法を提供する。

【0057】

本発明は、交差 - 構造によって誘発される毒性を調節する組成物を調製するための化合物および方法を提供する。

【0058】

略号：A , - アミロイドペプチド；AD , アルツハイマー病；AGE , 高次グリケーション最終生成物；CpB , カルボキシペプチダーゼB；COI (カルボキシペプチダーゼインヒビター)；ELISA , 酵素結合免疫ソープメントアッセイ (ELISA)；FN , フィブロネクチン；FXII , XII因子 (ハーゲマン因子)；HGFa , 肝細胞増殖因子アクチベーター；IAPP , ランゲルハンス島アミロイドポリペプチド；PCR , ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)；RAGE , AGEの受容体；tPA , 組織型プラスミノゲンアクチベーター。

10

【0059】

本発明は、交差 - 構造の過剰形成に関連した疾患の検出および治療のための化合物および方法を提供する。

【0060】

交差 - 構造は、A フィブリルの一部または別のアミロイドフィブリルの一部であることができる。交差 - 構造は、変性タンパク質に存在することもできる。

【0061】

本発明は、交差 - 構造を検出する方法を提供する。一態様では、交差 - 構造結合化合物、好ましくはフィンガードメインまたは1個以上のフィンガードメインを含んでなる分子を固体表面、好ましくはマイクロタイタープレートに結合または固定させる。この態様に有用な固体表面は、当業者には知られているであろう。例えば、固体表面の一態様は、ビーズ、カラム、プラスチック皿、プラスチックプレート、顕微鏡スライド、ナイロン膜などである。(ブロックした後、)表面を試料と共にインキュベーションする。(未結合試料を除去した後、)交差 - 構造を含んでなる結合分子を続いて第二の交差 - 構造結合化合物、好ましくは抗交差 - 構造抗体またはフィンガーマジュールを含む分子を用いて検出する。第二の交差 - 構造化合物を、標識、好ましくはペルオキシダーゼのような酵素に結合する。検出可能な標識は、蛍光標識、ビオチン、ジゴキシゲニン、放射性原子、常磁性イオン、および化学発光標識であってもよい。酵素または放射性同位体のような部分を有する化学的、酵素的または他の適当な手段のような共有結合的手段によって標識することもできる。本発明の上記化合物の一部を検出可能なマーカー物質 (例えば、¹²⁵Iで放射能標識またはビオチン化)と会合させることによって標識し、固形組織、および血液、脳脊髄液、尿などのような体液試料での化合物またはその受容体を有する細胞またはその誘導体の検出および定量に有用な試薬を提供することができる。このような試料としては、組織培養に用いられる血清または組織培養に用いられる培地を挙げることもできる。

20

30

【0062】

もう一つの態様では、固体表面は凝集試験などの微小球であることができる。

【0063】

一態様では、フィンガーマジュールを含む化合物を用いて、試料を染色する。好ましくは、化合物を、タンパク質、ペプチド、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼに融合させる。あるいは、化合物を標識にカップリングさせる。検出可能な標識は、蛍光標識、ビオチン、ジゴキシゲニン、放射性原子、常磁性イオン、および化学発光標識であってもよい。酵素または放射性同位体のような部分を有する化学的、酵素的または他の適当な手段のような共有結合的手段によって標識することもできる。本発明の上記化合物の一部を検出可能なマーカー物質 (例えば、¹²⁵I、^{99m}Tc、¹³¹Iで放射能標識またはビオチン化)と会合させることによって標識し、固形組織、および血液、脳脊髄液または尿のような体液試料での化合物またはその受容体を有する細胞またはその誘導体の検出および定量に有用な試薬を提供することができる。化合物を試料と共にインキュベ

40

50

ションし、洗浄後に、好ましくはグルタチオン - S - トランスフェラーゼのような融合タンパク質またはポリペプチドに対する抗体で可視化する。

【0064】

一態様では、上記試料はコンホメーション病のまたはコンホメーション病に罹っていることが予想される患者の組織である。あるいは、組織は動物由来のものであるか、またはイン・ビトロで培養した細胞由来のものである。

【0065】

本発明の方法は、新規な診断手段を提供する。本発明により、初めて一般的な構造エピトープが開示され、且つ診断分析法が上記交差 - 構造の存在に基づくものとして行うことができた。このような使用は、コンホメーション病、またはアルツハイマーや糖尿病のようなアミロイド形成に関連した疾患の診断的同定に特に有用である。この診断的使用は、総てのアミロイドーシス型疾患、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、出血、癌、敗血症および他の炎症性疾患、多発性硬化症、自己免疫疾患、記憶の喪失に関連した疾患またはパーキンソン病、および他のニューロン性疾患（癲癇）のような交差 - 構造形成を伴う他の疾患にも有用である。例えば、（例えば、t P A の）フィンガードメインを用いて、これに標識（放射性、蛍光性など）を供給することができる。次に、この標識したフィンガードメインをイン・ビトロまたはイン・ビボで交差 - 構造を含んでなるタンパク質の検出に用いることによって、コンホメーション病に伴うプラークの存在を決定することができる。例えば、ELISA分析法を用いて患者の敗血症の量を決定することができ、またはコンホメーション病に伴うプラークの存在を突き止めることができる。

10

20

【0066】

もう一つの態様では、本発明は、アミロイドフィブリルの形成を抑制しまたは交差 - 構造によって誘発される毒性を調節する方法を提供する。化合物は交差 - 結合モジュール、好ましくはフィンガードメイン、フィンガードメインを含む分子、ペプチド様類似体、および/または抗交差 - 構造抗体、および/またはマルチリガンド受容体またはその断片である。

【0067】

本発明によれば、フィブリル形成を阻害することによって、フィブリルの負荷量が減少する。

【0068】

フィブリル形成の阻害または交差 - 構造毒性の調節によって、細胞死を調節することもできる。細胞は任意の細胞であることができるが、好ましくはニューロン細胞、内皮細胞、または腫瘍細胞である。細胞は、ヒト細胞または任意の他の種由来の細胞であることができる。

30

【0069】

細胞は、典型的には患者に存在することがある。化合物を投与する患者は、哺乳類、または好ましくはヒトでよい。

【0070】

患者は、アミロイドーシス、他のコンホメーション病、プリオン疾患、慢性腎不全および/または透析関連のアミロイドーシス、アテローム性動脈硬化症、循環器疾患、自己免疫疾患に罹っていることがあり、または患者は肥満であることがある。患者は、炎症、慢性関節リウマチ、糖尿病、網膜症、敗血症、散在性血管内凝固症候群、溶血性尿毒症症候群、および/または子癇前症に罹っていることもある。本発明の方法で治療または予防することができる疾患としては、糖尿病、アルツハイマー病、老化、腎不全、高脂血症性アテローム性動脈硬化症、ニューロン性細胞毒性、ダウン症候群、頭部外傷に関連した痴呆、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、アミロイドーシス自己免疫疾患、炎症、腫瘍、癌、男性不能、創傷治癒、歯周病、ニューロパシー、網膜症、ネフロパシー、またはニューロン変性が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0071】

本発明による化合物の投与は、常時であってもまたは一定期間であってもよい。化合物

50

は、時間毎、日毎、週毎、月毎に（例えば、時間放出形態で）送達することができ、または一回送達として送達することもできる。送達は、連続的、例えば、静脈内送達であってもよい。

【0072】

キャリアーを用いることができる。キャリアーは希釈剤、エアゾール、水溶液、非水溶液、または固形キャリアーでよい。本発明は、治療上有効量のポリペプチド組成物または化合物を適当な希釈剤、防腐剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバントおよび/またはキャリアーと共に含む医薬組成物も提供する。このような組成物は液体、または凍結乾燥したあるいは他の方法で乾燥した処方物であることができ、様々な緩衝剤含量（例えば、トリス-HCl、酢酸塩、リン酸塩）、pHおよびイオン強度の希釈剤、表面への吸収を防止するためのアルブミンまたはゼラチンのような添加剤、洗剤（例えば、Tween 20、Tween 80、Pluronic F68、胆汁酸塩）、可溶化剤（例えば、グリセロール、ポリエチレングリセロール）、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、防腐剤（例えば、チメロサル、ベンジルアルコール、パラベン）、増量物質(bulking substances)または毒性調節剤（例えば、ラクトース、マンニトール）、化合物に対するポリエチレングリコールのようなポリマーの共有的結合、金蔵イオンとの複合体形成、またはポリ乳酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲルなどのようなポリマー化合物の粒状製剤中または上への、またはリポソーム、マイクロエマルジョン、ミセル、単層または多層小胞、赤血球ゴースト、またはスフェロプラスト上への化合物の組込みが挙げられる。

10

【0073】

本発明による化合物の投与は、病変内、腹腔内、筋肉内または静脈内注射、輸液、リポソームによって介在される送達、局所的、髄腔内、歯肉嚢、直腸、気管支内、鼻内、口腔、目または耳への送達を含んでなることがある。もう一つの態様では、投与としては、気管支内投与、肛門、髄腔内投与、または経皮送達が挙げられる。

20

【0074】

本発明によれば、化合物は、時間毎、日毎、週毎、月毎、年毎に投与することができる。もう一つの態様では、化合物の有効量は約 0.000001 mg/kg 体重 ~ 約 100 mg/kg 体重である。

【0075】

本発明による化合物は、薬剤を経時的に持続放出するカプセルにより局所的に送達することができる。制御または持続放出組成物としては、親油性ディーポー（例えば、脂肪酸、ワックス、油性物）での処方物が挙げられる。本発明には、ポリマー（例えば、ポロキサマーまたはポロキサミン）でコーティングした粒状組成物、および組織特異的受容体、リガンドまたは抗原に対する抗体にカップリングしたまたは組織特異的受容体のリガンドにカップリングした薬剤も挙げられる。本発明の組成物の他の態様は、非経口、肺、鼻および口腔などの様々な投与経路に保護コーティング、プロテアーゼインヒビターまたは浸透増進剤のような粒状形態で組込む。

30

【0076】

本発明による化合物の有効量は、好ましくは 1 ng/kg 体重 - 約 1 g/kg 体重である。実際的な有効量は、化合物の大きさおよび組成物の特性に基づいて変化する。

40

【0077】

tPAの活性および/またはtPAによって伝達されるプラスミノゲンの活性化は、フィブリン断片、またはカルボキシ末端にリシンまたはアルギニンを有する他のタンパク質断片への結合によって増加する。カルボキシペプチダーゼB (CpB) またはトロンビン活性化フィブリン溶解インヒビター (TAFI、カルボキシペプチダーゼUまたはカルボキシペプチダーゼRとも呼ばれる) などこれらに限定されないB型カルボキシペプチダーゼは、他の場合にはtPAおよび/またはプラスミノゲンに結合してプラスミン形成を刺激するフィブリン断片のカルボキシ末端リシンおよびアルギニン残基を開裂させる酵素である。

【0078】

50

本発明は、交差 - 構造が、例えば脳のような身体のある部分に存在するときには有害であり交差 - 構造が t P A と結合することによって損傷が生じることを明らかにしたので、フィンガードメインを含んでなるタンパク質の有効量を供給して交差 - 構造の t P A に対する結合部位をブロックすることを特徴とする、交差 - 構造によって伝達される効果を抑制する方法を提供する。上記の交差 - 構造によって伝達される効果は、B型カルボキシペプチダーゼ活性の有効量を供給して t P A 活性を抑制することによって更に少なくすることができる。

【0079】

本発明は、交差 - 構造に結合して交差 - 構造を除去することができる化合物の使用を提供する。上記化合物は交差 - 結合分子であり、好ましくはタンパク質および/またはその機能的に同等なものおよび/または機能的断片である。更に好ましくは、上記化合物は、フィンガードメイン、またはフィンガードメイン含有分子またはその機能的に同等なものおよび/または機能的断片を含んでなる。更に一層好ましくは、上記フィンガードメインは、フィブロネクチン、F X I I、H G F a または t P A から誘導される。本発明は、交差 - 構造説け都合する抗体をも含んでなることは明らかである。もう一つの好ましい態様では、上記タンパク質は、抗体、および/またはその機能的に同等のものおよび/または機能的断片である。この使用により、本発明は、例えば循環から好ましくは体外透析により交差 - 構造を含んでなるタンパク質を除去するための治療方法などを提供する。例えば、敗血症の患者に、例えば好ましくは固定化したフィンガードメインを備える手段によって上記患者の血液を透析することによる上記使用を行う。例えば、上記フィンガードメインを固体表面または上記透析に用いたチューブの内側に結合することができた。この方法で、総ての交差 - 構造を含んでなるタンパク質が上記患者の血流から除去され、これによって上記患者の上記の交差 - 構造を含んでなるタンパク質によって引き起こされる負の効果が緩和される。フィンガードメインを含んでなる化合物の他に、抗体または可溶性のマルチリガンド受容体のような他の交差 - 構造結合化合物を用いることもできる。上記使用は、腎患者の血液透析に応用できることも明らかである。

【0080】

本明細書で用いられる「フィンガー」とは、図14に概略を示した基準を満足する配列を包含する。この配列は、明瞭な空間を空けて4個のシステイン残基を含む約50アミノ酸を包含する。好ましくは、t P A、F X I I、H G F a またはフィブロネクチンのフィンガードメインが用いられる。あるいは、「フィンガー」は、ポリペプチド類似体または三次元的コンホメーションを有することなどによる同様な機能を有するペプチド様のものであってもよい。このような類似体が改良された特性を有することもあり得る。

【実施例】

【0081】

実験

試薬

ウシ血清アルブミン (B S A) 画分 V p H 7 . 0 および D - グルコース - 6 - リン酸二ナトリウム (g 6 p)、D , L - グリセルアルデヒド、およびニワトリ卵白リゾチームは I C N 製であった (Aurora, Ohio, 米国)。ウサギ抗 - 組換え組織型プラスミノゲンアクチベーター (t P A) 3 8 5 R およびマウス抗 - 組換え t P A 3 7 4 B は American Diagnostica (Veenendaal, オランダ) から購入した。抗 - ラミニン (L 9 3 9 3) は Sigma 製であった。ブタ抗 - ウサギ免疫グロブリン / H R P (S W A R P O) およびウサギ抗 - マウス免疫グロブリン / H R P (R A M P O) は D A K O Diagnostics B.V. (オランダ) 製であった。Alteplase (組換え組織型プラスミノゲンアクチベーター, t P A) は Boehringer-Ingelheim (ドイツ) から入手した。クリングル 2 と触媒ドメインだけを含む組換え突然変異体 t P A (K 2 P - t P A) である Reteplase (Rapi lysin) は、Roche, Hertfordshire, 英国 から入手し、ブタ膵臓カルボキシペプチダーゼ B (C p B) は Roche, Mannheim, ドイツ 製であった。カルボキシペプチダーゼインヒビター (C P I) は Calbiochem (La Jolla, CA, 米国) 製であった。Tween20 は、Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, ドイツ) が

ら購入した。コンゴレッドはAldrich(Milwaukee, WI, 米国)製であった。Thioflavin Tおよび凍結乾燥したヒトヘモグロビン(Hb)はSigma(St. Louis, MO, 米国)製であった。凍結乾燥したヒトフィブリノーゲンはKordia(Leiden, オランダ)製であった。発色性プラスミン基質S-2251はChromogenix(Milan, イタリア)から購入した。オリゴヌクレオチドは、Sigma-Genosys(英国)から購入した。ホウ素ガラス毛细管(0.5 mm)は、Mueller(Berlin, ドイツ)製であった。

【0082】

合成ペプチド

上記のヒトアルツハイマーペプチドに存在するアミノ酸を含むペプチドA(1-40)、(DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV)、フィブリンペプチド85(またはFP13)(KRLVDIDIKIRS)、86(またはFP12)(KRLVDIDIKIR)および87(またはFP10)(KRLVDIDIK)、ヒトフィブリン(フィブリノーゲン)に由来、およびランゲルハンス島アミロイドポリペプチド(IAPP)ペプチドまたは誘導体(fl-hIAPP: KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNTY, hIAPP(SNNFGAILSS)、mIAPP(SNNLGPVLP))は、Pepscan, Inc.(オランダ)またはthe Netherlands Cancer Institute(NCI, Amsterdam, オランダ)のペプチド合成施設から入手した。ペプチドをリン酸緩衝食塩水(PBS)に溶解して1mg/mlの最終濃度とし、室温(RT)で3週間保管し、フィブリルを形成させた。この期間中に、懸濁液を毎週2回攪拌した。3週間後、懸濁液を4で保管した。NCI製の凍結乾燥したA(1-40)を、同様の方法で交差-構造を形成させた。交差-構造の形成を適時にコンゴレッド結合および偏光での緑色複屈折の検査によって追跡した。

【0083】

コンゴレッド結合およびフィブリン血餅のThioflavin T蛍光

Thioflavin T蛍光測定のため、1mg/mlのフィブリノーゲンを2U/mlのIIa因子と共に150mM NaCl、20mMトリス-HCl pH7.5、10mM CaCl₂、50μMチオフラビンT中で37でインキュベーションした。血餅のバックグラウンド蛍光をThioflavin Tの非存在下で記録し、Thioflavin Tのバックグラウンド蛍光をIIa因子の非存在下で測定した。蛍光は、Sarstedt REF67.754キュベットを用いてHitachi F-4500蛍光分光光度計(Ltd., Tokyo, 日本)で測定した。装置の設定値: 励起435nm(スリット幅10nm)、発光485nm(スリット幅10nm)、PMT電圧950V、測定時間10"、遅延0"。コンゴレッド結合の検出のため、フィブリン血餅を上記のようにして室温で形成した(Thioflavin Tは、緩衝液では省いた)。血餅をコンゴレッド溶液と共にインキュベーションして、製造業者の勧める方法に従って洗浄した(Sigma Diagnostics, MO, 米国)。血餅を、偏光下で分析した。

【0084】

グリコアルブミン、ヘモグロビン(Hb)およびリゾチームの最初の調製

高次グリケーション最終生成物で修飾したウシ血清アルブミン(アルブミン-g6p)の調製のため、アルブミン100mg/mlを1M g6pおよび0.05% m/v NaN₃を含むPBSと共に37にて暗所でインキュベーションした。1つのアルブミン溶液を2週間グリケーションを行い、別のバッチのアルブミンは4週間グリケーションを行った。グリケーションは、残りのバッチの一部では23週間まで延長した。ヒトHb 5mg/mlを、1M g6pおよび0.05% m/v NaN₃を含むPBSと共に37にて10週間インキュベーションした。更に、50mg/mlのHb溶液を、同じ緩衝液で8週間インキュベーションした。グリセルアルデヒドで修飾したアルブミン(アルブミン-グリセルアルデヒド)、およびニワトリ卵白リゾチーム(リゾチーム-グリセルアルデヒド)の濾過殺菌したタンパク質溶液15mg/mlを、10mMグリセルアルデヒドを含むPBSと共に2週間インキュベーションした。コントロールでは、g6pまたはグリセルアルデヒドを、溶液で省いた。インキュベーションの後、アルブミンおよびリ

ゾチーム溶液を蒸留水に対して十分に透析した後、-20 で保管した。タンパク質濃度を、高次タンパク質分析試薬ADV01 (Cytoskeleton, Denver, CO, 米国) を用いて決定した。グリケーションは、高次グリケーション最終生成物からの固有蛍光シグナルを励起波長380 nm、発光波長435 nmで測定することによって確かめた。

【0085】

グリケーションを伴う他の実験

アルブミン-AGEの調製のため、100 mg/ml ウシ血清アルブミン (画分V, カタログ番号; A-7906, 熱ショックによる初期分画化, 純度: 98% (電気泳動), 残りのほとんどはグロブリン, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 米国) を、リン酸緩衝食塩水 (PBS, 140 mM 塩化ナトリウム, 2.7 mM 塩化カリウム, 10 mM リン酸水素二ナトリウム, 1.8 mM リン酸二水素カリウム, pH 7.3), 1 M D-グルコース-6-リン酸二ナトリウム塩水和物 (乾燥) (ICN, Aurora, Ohio, 米国), および0.05% (m/v) NaN_3 と共に37 で暗所にてインキュベーションした。ウシアルブミンは、83個の潜在的なグリケーション部位を有する (59個のリシン、および23アルギニン残基、N末端)。アルブミンを、2週間 (アルブミン-AGE: 2)、4週間 (アルブミン-AGE: 4)、または23週間 (アルブミン-AGE: 23) グリケーションした。コントロールでは、g6pを省いた。インキュベーションの後、溶液を蒸留水に対して十分に透析した後、4 で保管した。タンパク質濃度は、高次タンパク質分析試薬ADV01 (Cytoskeleton, CO, 米国) で決定した。あるいは、アルブミンを、1 M g6p、250 mM DL-グリセルアルデヒド (ICN, Aurora, Ohio, 米国) / 100 mM NaCNBE_3 、1 M -D-()-フルクトース (ICN, Aurora, Ohio, 米国)、1 M D(+)-グルコース (BDH, Poole, 英国)、500 mM グリオキシル酸一水和物 (ICN, Aurora, Ohio, 米国) / 100 mM NaCNBH_3 、および相当するPBSおよびPBS/ NaCNBH_3 緩衝液コントロールと共に86週間インキュベーションした。グリケーションは、(i) 濃い褐色染色の観察、(ii) SDS-ポリアクリルアミドゲル上のマルチマーの存在、(iii) AGE特異抗体moab抗-アルブミン-g6p 4B5⁴⁶ とpoab抗フィブロネクチン-g6p (Ph. De Groot/I. Bobbink, UMC Utrecht; 未公表データ) の結合の分析、および(iv) AGE由来の固有蛍光シグナルの測定 (励起波長380 nm、発光波長445 nm) によって確かめた。アルブミンコントロールの自己蛍光シグナルはアルブミン-AGEについて測定したシグナルの4%未満であり、バックグラウンド補正に用いた。

【0086】

ヒト赤血球からHbの単離

ヒトHbは、3名の健常人と16名の糖尿病患者のEDTAで血液凝固防止した血液の赤血球から単離した。全血100 μl を生理食塩水 (154 mM NaCl) 5 ml で希釈し、細胞を緩やかに分離し、生理塩5 ml に再懸濁した。室温で16時間インキュベーションした後、細胞を再度分離した。ペレット状細胞に0.1 M ホウ酸, pH 6.5, 2 ml を加えてリーシスした後、細胞細片を分離した。上清を集めて、-20 で保管した。

【0087】

グリコHb濃度の決定

健常人ドナーまたは糖尿病患者のEDTA-血液中のグリコヘモグロビンまたはHb_{A_{1c}}とも呼ばれるグリコHbの濃度を、溶血した全血を用いる比濁分析的阻害イムノアッセイを用いて、製造業者の推奨に従って (Roche Diagnostics, Mannheim, ドイツ) 決定した。標準偏差は、測定したHb_{A_{1c}}濃度の2.3%である。

【0088】

コンゴレッドのグリコアルブミンへの結合

コンゴレッドの、炭水化物であるグルコース、フルクトースおよびグルコース-6-リン酸、または炭水化物誘導体であるグリセルアルデヒドおよびグリオキシル酸を用いて86週間グリコアルブミン-AGEへの結合を、風乾試料を用いて試験した。このため、5

μg アルブミンをガラスカバースリップに塗布して、風乾した。試料をコンゴレッドとインキュベーションした後、製造業者の推奨に従って洗浄した (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, 米国)。それぞれ 596 nm および 620 nm の励起および発光波長を用い、Leica DMIRBE 蛍光顕微鏡 (Rijswijk, オランダ) で撮影を行った。

【0089】

エンドスタチン製剤

エンドスタチンは、本質的に文献記載の方法で *Escherichia coli* から精製した。^{4,7} 簡単に説明すれば、エンドスタチンを発現する B121, DE3 細菌を 8 M 尿素、10 mM トリス (pH 8.0)、10 mM イミダゾールおよび 10 mM β -メルカプト-エタノールを含む緩衝液でリーシスした。Ni²⁺-アガロース上で精製した後、タンパク質試料を H₂O に対して十分に透析した。透析中に、エンドスタチンは微細な白色固形物として沈澱する。この材料の一部を後で使用するために -80 で保管するか、または凍結乾燥の後に保管した。酵母株 *Pichia pastoris* で産生した可溶性エンドスタチンは、Dr. Kim Lee Sim (EntreMed, Inc., Rockville, MA) の厚意により提供された。エンドスタチン凝集体は、下記のようにして可溶性エンドスタチンから調製した。可溶性の酵母エンドスタチンを 8 M 尿素中で一晩透析した後、H₂O に対して 3 回透析を行った。細菌性エンドスタチンと同様に、酵母エンドスタチンは、微細な白色固形物として沈澱する。

10

【0090】

コンゴレッド染色

凍結乾燥した細菌性エンドスタチンを 0.1% ギ酸 (FA) またはジメチルスルホキシドに再懸濁し、ガラス毛细管に集めた。溶媒を蒸発させ、生成するエンドスタチン材料を製造業者のプロトコールに従ってコンゴレッド (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, 米国) で染色した。

20

【0091】

円偏光二色性

ペプチドおよびタンパク質溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、H₂O 中) の UV 円偏光二色性 (CD) スペクトルを、JASCO J-810 CD 分光偏光計 (Tokyo, 日本) で測定した。フィブリンペプチド 85、86、87、またはアルブミン、グリコアルブミンおよび ヒト Ap (16-22) について、それぞれ 190-240 nm または 190-250 nm の 5 または 10 回の単回測定の平均吸収スペクトルを測定する。Ap (16-22) の CD スペクトルを、ポジティブコントロールとして測定した。Ap (16-22) を H₂O^{4,5} 中でインキュベーションすると、容易に交差- β 構造を有するアミロイドフィブリルコンホメーションを採用する。存在する二次構造要素のアルブミンおよび Ap (16-22) の相対比率は、k2d ソフトウェア^{4,8} を用いて推計した。

30

【0092】

繊維の X 線回折

エンドスタチン凝集体を 0.1% FA 中で可溶化し、凍結乾燥したフィブリンペプチドを H₂O に溶解し、グリコアルブミンを水に対して十分に透析した。試料をガラス毛细管に集めた。次に、溶媒を数日間かけて蒸発させた。乾燥試料を含む毛细管を、Nonius・カッパー・CCD 回折計 (Bruker-Nonius, Delft, オランダ) に入れた。散乱を、CCD 領域検出器上で黒鉛モノクロメーターで密封チューブ Mo K α 線を用いて 16 時間測定した。空気およびガラス毛细管壁からの散乱を、社内ソフトウェアを用いて差し引いた (VIEW/EVAL, Dept. of Crystal- and Structural Chemistry, Utrecht University, オランダ)。

40

【0093】

透過型電子顕微鏡法

エンドスタチン、ヘモグロビンおよびアルブミン試料を、炭素コーティングしたコロジオンフィルムで被覆した 400 メッシュ標本グリッドに塗布した。5 分後、液滴を濾紙で除去し、調製物を 1% メチルセルロースおよび 1% 酢酸ウラシルで染色した。H₂O で洗浄した後、試料を一連の等級付けしたの EtOH とヘキサメチルジシラザンで脱水した。

50

透過型電子顕微鏡法 (TEM) 画像を、JEM-1200EX 電子顕微鏡 (JEOL, 日本) 上で 60 kV で記録した。

【0094】

固相酵素免疫検定法 : tPA のグリコアルブミン、Hb および A (1-40) への結合
tPA のアルブミン - g6p (4 週間および 23 週間インキュベーション)、アルブミン - グリセルアルデヒド、コントロールアルブミン、ヒト Hb - g6p (10 週間インキュベーション)、Hb コントロール、または A (1-40) への結合を、固相酵素免疫検定法 (ELISA) の装置を用いて試験した。アルブミン - g6p および コントロールアルブミン (2.5 μg/ml、コート緩衝液中、50 mM Na₂CO₃ / NaHCO₃ pH 9.6、0.02 % m/v NaN₃、50 μl / ウェル) を、96 穴タンパク質イモビライザー (Immobilizer) プレート (Exiqon, Vedbaek, デンマーク) に室温で 1 時間固定した。A (1-40) (10 μg/ml、コート緩衝液中) を、96 穴タンパク質イモビライザープレート (Exiqon, Vedbaek, デンマーク) に室温で 75 分間固定した。コントロールウェルを、コート緩衝液のみと共にインキュベーションした。PBS / 0.1 % v/v Tween 20 200 μl を用いる線上段階の後、プレートを振盪しながら PBS / 1 % v/v Tween 20 300 μl で室温にて 2 時間ブロックした。その後の総てのインキュベーションは、振盪を行いながら、PBS / 0.1 % v/v Tween 20 中で、ウェル当たり 50 μl の容量を用いて室温にて 1 時間行った。それぞれのインキュベーションの後、ウェルを PBS / 0.1 % v/v Tween 20 200 μl で 5 回洗浄した。fl. tPA または K2-P tPA の増加量を、コーティングを施したウェルおよびコントロールウェルに 3 回加えた。抗体 385R および続いて SWARPO、または抗体 374B および続いて RAMPO を 1 μg/ml の濃度でウェルに加えた。結合したペルオキシダーゼを標識した抗体を、オルトフェニレンジアミン 8 mg および 0.0175 % v/v H₂O₂ を 50 mM クエン酸 / 100 mM Na₂HPO₄ pH 5.0 20 ml 中に含む溶液 100 μl を用いて可視化した。染色は、2 M H₂SO₄ 溶液 50 μl を加えて停止した。吸光度を、V_{max} 動力学的マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, 米国) 上で 490 nm で読み取った。競合実験は、tPA 20 または 40 nM を用いて、それぞれアルブミン - g6p または A (1-40) および コングレドを PBS / 0.08 % v/v Tween 20 / 2 % v/v EtOH に溶解したものの増加量を用いて行った。

10

20

30

【0095】

ELISA : tPA のアルブミン - AGE への結合

交差 - 構造マーカー tPA のアルブミン - AGE への結合を、ELISA 装置を用いて試験した。本発明者らは、tPA がプロトタイプアミロイドペプチドヒト A (1-40) および ヒト IAPP⁴⁻⁹ (本明細書) へ結合することを示した。従って、本発明者らは、これら 2 種類のペプチドへ結合する tPA をポジティブコントロールとして用いた。86 週間のグリケーション試料およびコントロールを、Greiner マイクロロン・プレート (microlon plates) (カタログ番号 655092, Greiner, Frickenhausen, ドイツ) にコーティングした。ウェルは、Superblock (Pierce, Rockford, IL, 米国) でブロックした。それに続く総てのインキュベーションは、PBS / 0.1 % (v/v) Tween 20 中で、50 μl / ウェルの容量で、振盪を行いながら室温で 1 時間行った。インキュベーションの後、ウェルを 300 μl の PBS / 0.1 % (v/v) Tween 20 で 5 回洗浄した。増加濃度の tPA を、コーティングしたウェル並びにコントロールウェルに 3 回加えた。86 週間インキュベーションした試料の tPA インキュベーション中に、少なくとも 123,000 倍モル過剰量の - アミノカブロン酸 (ACA, 10 mM) を溶液に加えた。ACA はリシン類似物であり、tPA のそのクリングル 2 ドメイン⁵⁰ を介するアルブミンへの潜在的結合を回避する目的で用いられる。モノクローナル抗体 374b (American Diagnostica, Instrumentation laboratory, Breda, オランダ)、および続いて RAMPO (Dako diagnostics, Glostrup, デンマーク) を、0.3 μg/ml の濃度でウェルに加えた。結合したペルオキシダーゼ標識抗体を、50 mM クエン酸 / 0.0175

40

50

% (v/v) H_2O_2 を含む 100 mM Na_2HPO_4 pH 5.0 20 ml に 8 mg のオルトフェニレンジアミンを含む溶液 100 μ l を用いて可視化した。染色は、2 M H_2SO_4 溶液 50 μ l を加えて停止した。吸光度を V_{max} 動力学的マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, 米国) 上で 490 nm で読み取った。コーティングを行っていないコントロールウェルからのバックグラウンドシグナルを、相当するコーティングを施したウェルから差し引いた。

【0096】

最初に、グリコアルブミンおよびリゾチームのチオフラビン T 蛍光、および tPA。蛍光測定のため、アルブミン - g6p 500 nM、アルブミン - グリセルアルデヒド、コントロールアルブミン、リゾチーム - グリセルアルデヒド、またはコントロールリゾチームを、50 mM グリシン - NaOH, pH 9 中で増加量のチオフラビン T とインキュベーションした。ブランクの読みには、同一のチオフラビン T の希釈範囲をタンパク質なしで調製し、またはチオフラビン T をタンパク質溶液で省いた。試料は 3 個調製した。

10

【0097】

チオフラビン T 蛍光

他の実験の蛍光測定では、アルブミン - g6p : 2、アルブミン - g6p : 4、アルブミン - g6p : 23 およびコントロールを 50 mM グリシン - NaOH, pH 9 に溶解したものを、アミロイド交差 - 構造のまま⁵¹ である増加量の ThT (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, ドイツ) とインキュベーションした。アルブミン - AGE : 4 濃度は 175 nM であり、他のタンパク質濃度は 500 nM であった。86 週間のグリケーション試料の蛍光測定のため、140 nM のタンパク質を固定濃度の 20 μ M ThT と共にインキュベーションした。蛍光は、室温で 1 時間インキュベーションした後、Hitachi F-4500 蛍光分光光度計 (Ltd., Tokyo, 日本) 上で 3 回測定した。励起および発光治療は、それぞれ 435 nm (スリット幅 10 nm) および 485 nm (スリット幅 10 nm) であった。緩衝液および ThT なしの溶液からのバックグラウンドシグナルを、ThT とインキュベーションしたタンパク質溶液での相当する測定値から差し引いた。

20

【0098】

蛍光：チオフラビン T と tPA のアルブミン - g6p への競合結合

430 nM アルブミン - g6p および 19 μ M チオフラビン T を、増加濃度の tPA と共に室温で 1 時間インキュベーションした。ブランクの読みには、アルブミン - g6p を省いた。試料は、50 mM グリシン - NaOH pH 9 中で 4 回調製した。発光測定は、上記の通りに行った。

30

【0099】

吸光度：チオフラビン T と tPA のアルブミン - g6p への競合結合

アルブミン - g6p (500 nM) およびチオフラビン T (10 μ M) を、増加量の tPA と共に 50 mM グリシン - NaOH pH 9 中で室温にて 1 時間インキュベーションした。吸光度測定は、420 nm のアルブミン - g6p チオフラビン T 吸光度最大値で行った。試料は 4 回調製した。ブランクの読みには、アルブミン - g6p を溶液から省いた。吸光度は、Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 UV / 可視分光光度計 (Cambridge, 英国) 上で石英セル中で読み取った。

40

【0100】

プラスミノゲン活性化分析法

プラスミノゲン (200 μ g/ml) を、補助因子 (5 μ M のエンドスタチン、A (1-40)、またはフィブリン由来のペプチド 85、86 および 87 の一つ) の存在下または非存在下で tPA (200 pM) と共にインキュベーションした。所定の時間間隔で試料を採取し、反応を 5 mM EDTA および 150 mM ACA を含む緩衝液で停止した。試料を集めた後、発色性プラスミン基質 S-2251 を加え、プラスミン活性を分光光度計で 37 °C にて動的に決定した。

【0101】

N1E-115 細胞培養および分化

50

N I E - 1 1 5 マウス神経芽腫細胞は、抗生物質を補足した 5 % F C S を含む D M E M 中で常法により培養した^{5 2}。細胞は、有糸分裂後ニューロンに分化した。細胞を 2 0 μ g / m l の プラスミノーゲンの存在下または非存在下にて 5 0 μ g / m l の C p B の存在下または非存在下で A (5 0 μ g / m l) に 2 4 時間暴露した。細胞を写真撮影し、計数して、培地に 4 × 試料緩衝液 (2 5 0 m M トリス p H 6 . 8 , 8 % S D S , 1 0 % グリセロール , 1 0 0 m M D T T , 0 . 0 1 % w / v プロモフェノールブルー) を加えてリーシスした。接着および浮遊 (乾燥および / または死んでいると思われる) 細胞並びに培地を含む溶解生成物を、プラスミノーゲンおよびプラスミン、並びにラミニンの存在についてプラスミノーゲン (MoAb 3642, American Diagnostics)、ラミニン (PoAb L9393, Sigma) に対する特異抗体を用いるウェスタンブロット分析によって分析を行った。

10

【 0 1 0 2 】

ヒト X I I 因子の交差 - 構造フォールドを有するアミロイドペプチドおよびタンパク質への結合

本発明者らは、ヒト F X I I (Calbiochem, La Jolla, CA, 米国, カタログ番号 233490) のアミロイド (ポリ) ペプチドへの結合を試験した。プロトタイプアミロイドペプチドヒトアミロイド - (1 - 4 0) (h A (1 - 4 0)) およびヒトフィブリン断片₁₄₇₋₁₅₉ F P 1 3、およびグルコース - 6 - リン酸グリケーションしたウシアルブミン (アルブミン - 高次グリケーション最終生成物 (A G E)) およびグルコース - 6 - リン酸グリケーションしたヒトヘモグロビン (H b A G E) であって、総て交差 - 構造を有するもの、並びにネガティブコントロールであるマウス ランゲルハンス島アミロイドポリペプチド (m I A P P)、アルブミンコントロールおよび H b コントロールであって、総てアミロイド特異構造を書いているものを E L I S A プレートにコーティングし、一連の濃度のヒト X I I 因子を積層した。F X I I の結合は、ウサギポリクローナル抗 - F X I I 抗体 (Calbiochem, La Jolla, CA, 米国, カタログ番号 233504) およびペルオキシダーゼ標識ブタ抗 - ウサギ I g G を用いて検出した。ウェルは、3 回コーティングした。F X I I 結合緩衝液は、1 0 m M H E P E S p H 7 . 3、1 3 7 m M N a C l、1 1 m M D - グルコース、4 m M K C l、1 m g / m o l アルブミン、5 0 μ M Z n C l₂、0 . 0 2 % (m / v) N a N₃、および 1 0 m M - アミノカプロン酸 (A C A) からなっていた。リシン類似物 A C A を加えて、F X I I クリングルドメインを介する交差 - 構造への F X I I の推定的結合を回避した。更に、F X I I の h A (1 - 4 0) およびプロトタイプアミロイドヒトアミリン断片 h I A P P をドットブロット分析を用いて試験した。交差 - 構造を含むペプチド 1 0 μ g、並びにネガティブコントロールペプチド m I A P P およびリン酸緩衝食塩水 (P B S) を、メタノール活性化ニトロセルロースに 2 回スポットした。次いで、スポットを 2 n M F X I I / F X I I 緩衝液または F X I I 緩衝液のみ、抗 F X I I 抗体、および S W A R P O と共にインキュベーションした。F X I I の結合は、強化ルミノール試薬 (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, 米国) とインキュベーションしたときの化学発光によって可視化した。交差 - 構造フォールド^{4 9} を有するポリペプチドへ結合する能力について知られている F X I I および t P A がアミロイド (ポリ) ペプチド上の積層結合部位に結合するかどうかを試験するため、競合的 E L I S A を行った。コーティングした h A (1 - 4 0) またはアミロイドアルブミン - A G E を、一連の濃度のヒト組換え組織型プラスミノーゲンアクチベーター (A c t i l y s e (商標) , 完全長 t P A) または R e t e p l a s e (商標) (K 2 P - t P A) の存在下にて 2 . 5 n M または 1 5 n M F X I I / 結合緩衝液を用いてインキュベーションした。Retepase は、切頭型の t P A であって、第二のクリングルドメインとプロテアーゼドメインからなっている。f . l . t P A - および K 2 P - t P A 濃度は、最大で h A (1 - 4 0) へ結合する t P A の k_D の 1 3 5 倍 (5 0 n M) またはアルブミン - A G E へ結合する t P A の k_D の 1 5 0 倍 (1 n M) であった。

20

30

40

【 0 1 0 3 】

クローニングの手順

プロペプチド (残基 Met35-Arg1) および B g 1 I I 制限部位が先行する残基 Ser1-Ser50

50

であるヒト tPA のアミノ末端フィンガードメイン (F) のクローニングは、PCR および標準的組換え DNA 手法を用いて行った。簡単に説明すれば、プロペプチド - フィンガード領域を、tPA を鋳型としてコードする cDNA を含むプラスミド p17⁵³1ng を用いる PCR によって増幅した。用いたオリゴヌクレオチドは、それぞれ SalI - または NotI 制限部位 (下線部) を含んでなる下記の通りのものであった。

【化 1】

5'AAAAGTCGACAGCCGCCACCATGGATGCAATGAAGAGA (1) および

3'AAAAGCGGCCGCCCCTTTGACAGGCACTGAG (2)

10

PCR 産物を、SalI / NotI で消化した発現ベクター pMT2 - GST⁵⁴ 中でクローニングした。その結果、SalI 制限部位、tPA のフィンガードメインのコード配列、NotI および KpnI 制限部位、トロンピン開裂部位 (TCS)、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (GST) タグおよび EcoRI 制限部位を含む構築物が生成する。この構築物の適当な配列を、配列分析によって確かめた。同様にして、tPA F - EGF ドメインからなる構築物を調製した。次に、これらの構築物を、pGEM3Zf (-) (Promega, Madison, WI, 米国) 中で SalI - EcoRI 連結した。HindIII - SalI - tPA プロペプチド - BglIII - F - NotI - KpnI - TCS - GST - EcoRI 構築物を、tPA K1、F - EGF - K1、EGF、並びにヒト肝細胞増殖因子アクチベーター F および F - EGF、ヒト XII F 因子および F - EGF、およびヒトフィブロネクチン F4、F5、F4 - 5 および F10 - 12 を含む構築物の調製のクローニングカセットとして用いた。次いで、構築物を pcDNA3 発現ベクター (Invitrogen, Breda, オランダ) 中で HindIII - EcoRI で連結した。更に、GST タグのみを、tPA プロペプチドが先行した pcDNA3 にクローニングした。構築物に用いたプライマーは、下記の通りであった：

20

【化 2】

tPA F-EGF

3'AAAAGCGGCCGCGTGGCCCTGGTATCTATTTTC (3) および (1)

30

tPA EGF

5'AAAAGAGATCTGTGCCTGTCAAAAGTTGC (4) および (2)

tPA K1

5'AAAAGAGATCTGATACCAGGGCCACGTGCTAC (5)

3'AAAAGCGGCCGCCCCTGTCCTGTTTCCCTCAGAGCA (6)

40

tPA F-EGF-K1

(1) および (6)

GSTタグ

(1) and AAAAGCGGCCGCCTGGCTCCTCTTCTGAATC (7)

フィブロネクチンF4

5'TGCAAGATCTATAGCTGAGAAGTGTTTTGAT (8)

3'GATGCGGCCGCCTGTATTCCTAGAAGTGCAAGTG (9)

10

フィブロネクチンF5

5'TGCAAGATCTACTTCTAGAAATAGATGCAAC (10)

3'TGATGCGGCCGCCCCACAGAGGTGTGCCTCTC (11)

フィブロネクチンF4-5

(8) および (11)

20

フィブロネクチンF10-12

5'AAAAAAGATCTAACCAACCTACGGATGACTC (12)

3'AAAAAAGGTACCGACTGGGTTACCCCCAGGT (13)

XII F因子

5'GAAACAAGATCTCAGAAAGAGAAGTGCTTTGA (14)

3'ACGGGCGGCCGCCCGGCCTGGCTGGCCAGCCGCT (15)

30

XII F-EGF因子

5'AAAAAAGATCTCAGAAAGAGAAGTGCTTTGA (16)

3'AAAAAGGTACCGGCTTGCTTGGTGTCCACG (17)

HGFa F

5'GCAAGAAGATCTGGCACAGAGAAATGCTTTGA (18)

3'AAGGGCGGCCGCCAGCTGTATGTCGGGTGCCTT (19)

40

HGFa F-EGF

5'AAAAAAGATCTGGCACAGAGAAATGCTTTGA (20)

3'AAAAAGGTACCGCTCATCAGGCTCGATGTTG (21)

293T細胞におけるtPA-F-GSTの一過性発現

最初に、293T細胞を、5% v/v ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシンおよびグアニジンで補足したRPMI 1640培地 (Invitrogen, Scotland, 英国) で15%のコンフルエンスまで増殖した。細胞を、製造業者の推奨に従ってFugene-6を用いて一過的にトランスフェクションした (Roche, IN, 米国)。tPA断片を含むpMT2-tPA-F-GST、または受容体様タンパク質チロシンホスファターゼ μ (RPTP μ)⁵⁴の細胞外ドメインを含むコントロールプラスミドpMT2-RPTP μ -GSTをトランスフェクションし、培地を48時間のトランスフェクションの後に回収した。293T培地でのtPA-F-GSTおよびRPTP μ -GSTの発現を、イムノブロットイングによって証明した。集めた試料を、2x試料緩衝液を加えた後、SDS-PAGEゲル上で展開した。膜を1%ミルク (Nutricia) でブロックし、最初にモノクローナル抗-GST抗体2F354および二番目にHRP接合ウサギ抗-マウスIgG (RAMPO) とインキュベーションした。プロットを、Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, MA, 米国) を用いて展開した。

【0105】

BHK細胞におけるフィンガー構築物の安定発現

仔ハムスター腎細胞を、5% v/v ウシ胎児血清 (FCS)、ペニシリン、ストレプトマイシンおよびグアニジンで補足したDMEM/NUT混合F-12 (HAM) 培地 (Invitrogen, 英国) で1%のコンフルエンスまで播種した。細胞を、Ca₃(PO₄)₂-DNA沈澱法を用いて、安定にトランスフェクションした。24時間後、培地に1mg/mlゲネティシン (geneticin) G-418硫酸塩 (Gibco, 英国) を補足した。G-418を含む培地を10日間に数回新しくして、死細胞を除去した。その後、安定な単一コロニーを新たな培養フラスコに移して、細胞をコンフルエンスまで増殖させた。次に、構築物の発現をイムノブロットイングによって立証した。集めた試料を、2x試料緩衝液を加えた後にSDS-PAGEゲル上で展開した。ゲルは、ニトロセルロース膜上でブロッキングした。膜を、1.5% m/v BSAを含む5%ミルク (Nutricia) 中でブロックし、最初にモノクローナル抗-GST抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 米国, カタログ番号Z-5) および二番目にHRP接合ウサギ抗-マウスIgG (RAMPO) とインキュベーションした。プロットを、Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, MA, 米国) を用いて展開した。安定なクローンを、以後250 μ g/mlのG-418の存在下で増殖させた。プルダウン実験のために、目的とする構築物を産生する安定なクローンの5% FCSを有するコンディショニングした培地を用いた。精製のため、tPA-F-EGF-GSTの安定なクローンの細胞を三層の培養フラスコに移して、0.5% v/v Ultrosor G (ITK Diagnostics, Uithoorn, オランダ) を含む培地で増殖させた。培地は、3または4日毎に新しくした。tPA-F-EGF-GSTは、Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Uppsala, スウェーデン) カラム上で培地から単離して、100 mM還元グルタチオン (Roche Diagnostics, Mannheim, ドイツ) で溶出した。構築物の純度を、SDS-PAGEの後、クーマシー染色またはウェスタンブロット法によってチェックした。これらの分析から、幾らかのGSTが調製物中に存在することは明らかである。精製したtPA-F-EGF-GSTをPBSに対して透析し、-20 $^{\circ}$ Cで保管した。

【0106】

GSTで標識したtPA-F-GSTおよびRPTP μ -GSTの精製

培地をNanosep 10K遠心分離装置 (Pall Gelman Laboratory, MI, 米国) を用いて20倍に濃縮し、製造業者の推奨に従ってSepharose 4Bにカップリングしたグルタチオンと共にインキュベーションした (Pharmacia Biotech, Uppsala, スウェーデン) と共にインキュベーションした。結合した構築物をPBSで洗浄し、50 mMトリス-HCl pH 8.0中10 mMグルタチオンで溶出した。構築物を、使用前に-20 $^{\circ}$ Cで保管した。

【0107】

アミロイドプロダウン

GSTで標識した t P A F、F - E G F、E G F、K 1、F - E G F - K 1、F X I I F、H G F a F、F n F 4、F n F 5、F n F 4 - 5 および G S T を発現する B H K 細胞のコンディショニングした培地を用いて、アミロイド結合分析を行った。最初に、構築物を、ウェスタンブロット法を用いてほぼ等濃度に調整した。組換え断片の定性的結合は、「プルダウン」分析法を用いて評価した。この目的のため、組換えによって作製した断片を A または I A P P フィブリルと共にインキュベーションした。これらのペプチドは不溶性繊維を形成するので、未結合タンパク質は遠心分離によって繊維から容易に除去することができる。結合断片を含むベレットは、続いて水で数回洗浄した。結合断片を S D S - 試料緩衝液中で可溶化し、P A G E によって分析し、上清画分および出発材料中の未結合タンパク質も同様に処理した。ゲルを、抗 - G S T 抗体 Z - 5 を用いるイムノブロッティングを用いて分析する。 10

【0108】

t P A F - E G F - G S T を用いるアミロイド E L I S A

精製した t P A F - E G F - G S T 組換えタンパク質の親和性を画定するため、固定化アミロイド(ポリ)ペプチドおよび非アミロイドコントロール m I A P P を用いて E L I S A を行った。A、F P 1 3、I A P P または m I A P P 2 5 μ g / m l を、E x i q o n ペプチド固定化プレート上で固定した。過剰の A C A の存在下にて一連の濃度の t P A F - E G F - G S T をウェルに加えて、抗 - G S T 抗体 Z - 5 を用いて結合を分析した。コントロールとして、G S T (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 米国, カタログ番号 G-5663) を同じ濃度で用いた。 20

【0109】

免疫組織化学: t P A F - E G F のヒト A D 脳への結合

A D に冒されたヒトのパラフィン脳切片は、Slootweg 教授 (Dept. of Pathology, UMC Utrecht) の厚意により送られた。切片を、一連のキシレン - エタノールで脱パラフィン化した。内在性ペルオキシダーゼを、メタノール / 1 . 5 % H₂O₂ で 1 5 分間ブロックした。H₂O で洗浄した後、切片を未希釈ギ酸と共に 1 0 分間インキュベーションした後、P B S 中で 5 分間インキュベーションした。切片を、1 0 % H P S / P B S 中で 1 5 分間ブロックした。切片を、P B S / 0 . 3 % B S A 中で 7 n M t P A F - E G F - G S T または G S T に 2 時間暴露した。P B S で 3 回洗浄した後、切片に 2 0 0 n g / m l の抗 - G S T 抗体 Z - 5 を 1 時間積層した。洗浄後、使用準備のできたヤギ抗 - ウサギ Powervision (Immunologic, Duiven, オランダ, カタログ番号 DPVR-55AP) を適用して、1 時間インキュベーションした。洗浄後、切片を 3 , 3 ' - ジアミノベンジジン (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, 米国, カタログ番号 D-5905) で 1 0 分間染色した後、ヘマトキシリン染色を 1 0 秒間行った。H₂O で洗浄した後、切片を製造業者の推奨に従ってコンゴレッドと共にインキュベーションした (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, 米国)。切片をキシレンで洗浄し、D.P.X. Mounting Medium (Nustain, Nottingham, 英国) で固定した。切片の分析は、L e i c a D M I R B E 蛍光顕微鏡 (Rijswijk, オランダ) 上で行った。コンゴレッドの蛍光は、励起波長 5 9 6 n m および発光波長 6 2 0 n m を用いて分析した。 30

【0110】

E L I S A : t P A - F - G S T および R P T P μ - G S T のヒト Ab (1-40) およびグリコアルブミンへの結合

t P A - F - G S T および R P T P μ - G S T の繊維状アミロイドヒト A (1 - 4 0) およびアルブミン - g 6 p への結合を、E L I S A で分析した。簡単に説明すれば、ヒト A (1 - 4 0)、アルブミン - g 6 p または緩衝液のみを、それぞれペプチド I イモビライザーまたはタンパク質 I イモビライザーにコーティングした。ウェルを精製した G S T で標識した構築物またはコントロール培地と共にインキュベーションし、結合を一次抗 - G S T モノクローナル抗体 2 F 3 および R A M P O を用いて検出した。ウェルはまた、1 0 m M e A C A の存在下にて 5 0 0 n M t P A と共にインキュベーションした 40

10

20

30

40

50

。次に、t P Aの結合は、クリングル2ドメインに位置したリシル結合部位から独立している。t P Aの結合を、一次抗体374BおよびRAMP Oを用いて測定した。実験は、3回行う、コーティングを行っていないウェルのブランク読みを差し引いた。

【0111】

抗 - A G E 抗体

グルコース - 6 - リン酸でグリケーションしたウシ血清アルブミンに対する抗体を、標準的免疫機構を用いてウサギで誘導した。2週間グリケーションしたアルブミン - A G E (Prof. Dr. Ph. G. de Groot/Dr. I. Bobbink; 未公表データ)で免役した後、抗 - A G E 1を得た。抗体を、Protein Gカラムを用いて血清から精製した。抗 - A G E 2を、Davids Biotechnologie (Regensburg, ドイツ)によって展開した。アルブミン - A G E : 2 3で免役した後、抗体をE M D - E p o x y活性化ビーズ (Merck, Darmstadt, ドイツ)に接合したヒトA (1 - 40)上でアフィニティー精製した。ポリクローナルマウス抗 - A G E抗体は、アルブミン - A G E : 23およびヒトA (1 - 40)で9 : 1のモル比で免役した後を得た。ポリクローナル血清は、標準的免疫手順を用いて得て、これはAcademic Biomedical Cluster Hybridoma Facility (Utrecht University, オランダ)によって行った。次に、モノクローナルは、標準的手順を用いて生成した。

【0112】

E L I S A : アミロイドペプチドまたはグリコタンパク質のタンパク質 - A G E およびアミロイドフィブリルへの結合

E L I S Aのため、アミロイド化合物を、上記と同様にして、E x i q o nペプチドまたはタンパク質イモビライザー (Vedbaek, デンマーク)に固定した。抗 - A G E抗体および市販の抗 - A (1 - 42) H-43 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 米国)を、0.1% v/v T w e e n 20を含むP B Sで希釈した。ウサギ抗 - ヒトピトロネクチンK9234はDr. H. de Boer (UMC Utrecht)の厚意により提供を受け、ネガティブコントロールとして用いた。マウスポリクローナル抗 - アルブミン - A G E / A を用いるE L I S Aのため、関連のないタンパク質に対して誘導された抗体を含むコントロール血清を用いた。マウスポリクローナル抗 - アルブミン - A G E / A の結合は、P B S / 0.1% T w e e n 20中の血清の希釈系列を用いて行った。I A P Pとの競合結合分析のために、抗 - A G E 1を様々な濃度のI A P Pとインキュベーションした。I A P Pフィブリルを分離し、上清をA をコーティングしたE L I S Aプレートのウェルに3回塗布した。マルチリガンド交差 - 構造結合セリンプロテアーゼt P Aを用いる競合結合分析は、若干異なる方法で行った。コーティングしたA およびI A P Pにk Dに関連した抗 - A G E 1または抗 - A (1 - 42) H - 43濃度を一連の濃度のt P Aと共に積層した。10⁷ - 10⁴倍モル過剰量のリシン類似物 A C A (10 mM)が結合緩衝液に存在し、t P AのA およびI A P Pのリシン残基への結合を回避し、これはアミロイド構造の存在とは独立していた。

【0113】

アミロイドペプチドおよびウサギ抗 - A G E 1抗体を用いるプルダウン分析法

抗 - A G E 1を、A (16 - 22)、A (1 - 40)およびI A P Pのアミロイド凝集体と共にインキュベーションした。遠心分離の後、ペレットを非還元性試料緩衝液 (1.5% (m/v) ドデシル硫酸ナトリウム、5% (v/v) グリセロール、0.01% (m/v) プロモフェノールブルー、30 mM トリス - H C l pH 6.8)に溶解したP B S / 0.1% T w e e n 20で3回洗浄した。アミロイドフィブリルをペレット化の後、上清を2x試料緩衝液で1 : 1に希釈した。試料をポリアクリルアミドゲルに適用して、ウェスタンブロット法の後、抗 - A G E 1をS W A R P Oで検出した。

【0114】

A Dに冒されたヒト脳の切片におけるアミロイドプラークへの抗 - A G E 2の結合の免疫組織化学的分析

A カラム上でアフィニティー精製したウサギ抗 - A G E 2を用いて、A Dに罹っているヒトの脳切片におけるアミロイドプラークに対する結合特性を分析した。手順は、本質

的に上記の通りに行った。11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗-A G E 2のタンパク質-A G E付加物または脳切片におけるヒトアルブミンへの終局的な結合を回避するため、300 nMのg 6 p - グリケーションジペプチドG l y - L y sを0.3% m / v B S Aと共に結合緩衝液に加えた。免疫組織化学的染色の後、切片をコンゴレッドで染色した。

【0115】

溶液中のアミロイドアルブミン-A G Eの検出のためのサンドイッチE L I S A

溶液中でのアミロイド交差 - 構造を検出するため、サンドイッチE L I S A法を用いた。Actilyse tPAを、96穴タンパク質イモビライザープレート(Exiqon, Vedbaek, デンマーク)のウェルに10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で固定した。一連の濃度のアルブミン-A G E : 23およびアルブミン-コントロール: 23をt P Aをコーティングしたウェル並びにコーティングしていないコントロールウェルに加えた。アミロイド構造の結合は、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗-A (1-42) H - 43 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, C A, 米国)、続いて0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のS W A R P Oと共にインキュベーションした後に、オルト-フェニレン-ジアミン/ H_2O_2 / H_2SO_4 染色によって検出した。

10

【0116】

結果

1. 交差 - 構造は、フィブリンおよびフィブリン由来の合成ペプチドに存在する。

本発明者らは、フィブリン血餅がコンゴレッドで染色し(図示せず)チオフラビンT蛍光を示し(図2A)、フィブリン血餅におけるアミロイド構造の存在を示していることを明らかにした。コンゴレッド染色(図示せず)、円偏光二色性測定およびX線回折分析を用いて、本発明者らは、フィブリンの配列から誘導される合成ペプチドが交差 - 構造を採用していることを示す(図2B, C)。これらのペプチドは、以前にt P A - 結合とt P A活性化特性^{1,8}を有することが見出された。これらのペプチドにおける交差 - 構造の存在により、t P Aによって伝達されるプラスミノゲン活性化を刺激する能力と相関することを見出した(図2D)。

20

【0117】

結論において、これらのデータは交差 - 構造の形成のための生理学的出現/関連性の証拠、およびt P Aのフィブリンへの結合におけるこの構造要素の役割を提供する。

【0118】

2. A は交差 - 構造を含み、プラスミン(プラスミノゲン)とt P Aを結合し、プラスミノゲン活性化を刺激し、マトリックス分解を誘発し、プラスミノゲンによって増加し且つC p Bによって阻害される細胞脱着を誘発する。

30

t P A、プラスミノゲンおよびプラスミンがA と結合するかどうかを試験するため、固相結合分析を行った。A をプラスチック製の96穴プレートにコーティングし、ペプチドのプラスミン(プラスミノゲン)またはt P Aへの結合を、コーティングしたペプチドに増加濃度のt P A、プラスミノゲンまたはプラスミンを積層することによって評価した。結合は、E L I S Aを行うことによってプラスミン(プラスミノゲン)またはt P Aに対する特異抗体を用いて評価した。図3Aは、t P AがA にフィブリンに結合するt P AのK dと同様の約7 nMのK dで結合することを示す。対照的に、プラスミノゲンのA への検出可能な結合は見られなかった(図3B)。しかしながら、活性化プラスミノゲン(プラスミン)はA に結合し、47 nMのK dで結合する。(活性化)プラスミンはA に結合するが、(不活性)プラスミノゲンはA に結合しないという事実は、プラスミン活性、従って遊離リシンの生成はプラスミンのA への結合に重要であることを示唆している。これを試験するため、リシン類似物である - アミノカプロン酸(A C A)を用いてプラスミンおよびt P Aのその存在におけるA への結合を試験した。本発明者らは、プラスミンのA への結合は A C Aの存在下で完全に廃止されることを示す(図3D)。対照的に、 A C Aはt P A - A 相互作用に対して効果がない(図3C)。従って、プラスミンは、恐らくは(複数の)リシン結合クリングルドメインを介してインキュベーション期間中に生成した遊離リシンに結合すると結論される。これと協力して、フィブリン中の遊離リシンへのプラスミノゲンクリングルドメインの

40

50

K_dは、A に対するプラスミンの結合のためのK_dに類似している。

【0119】

A の非存在下および存在下におけるプラスミノゲン活性化の動態を検討した。Kingston et al.^{2,4} によって公表されているように、A はtPAによるプラスミノゲンの活性化を強く刺激することが分かっている(図4A)。しかしながら、本発明者らは、反応が一次速度論よりは二次速度論的に進行することを見出している。本発明者らは、反応中の遊離リシンの生成がこの現象を引き起こすことの可能性を考察した(下記参照)。tPAによって伝達されるプラスミノゲン生成は、虚血または興奮毒性アミノ酸によって引き起こされるニューロン性細胞死に関与していた。最新のデータは、プラスミンがAを分解することができ、それによってA毒性を防止することができることを示唆している^{5,6;5,7}。本発明者らは、Aを分化したN1E-115細胞の培養物に加えて48時間後に、細胞の大半は死滅して、マトリックスから脱着していることを見出した(図示せず)。Aと共に加えると、プラスミン(100nMまで)はAによって誘発される細胞脱着を緩和することができなかった。100nMのプラスミンと共にAの予備インキュベーションを延長しても、Aによって誘発される細胞脱着には影響しなかった(図4B)。従って、本発明者らは、プラスミン生成がAによって誘発される細胞脱着および生存を阻害するよりは増強することができることの可能性を考慮した。これを試験するため、N1E-115細胞をAの最適下限濃度および低濃度のプラスミノゲンに24時間暴露した。Aの非存在下では、プラスミノゲンは細胞接着に全く影響しない(図4C)。しかしながら、プラスミノゲンは、Aによって誘発される細胞脱着に劇的な増進効果を有する。Aによって誘発される細胞脱着を増進するのに必要なプラスミノゲンの最低レベル(10-20μg/ml)は、ヒト血漿で見られるレベルよりかなり下回る(250μg/ml)。細胞外マトリックス分子ラミニンのプラスミンによって伝達される分解は、ニューロン脱着および虚血脳細胞死に先行する。本発明者らは、Aによって刺激されたプラスミン生成によってラミニンが分解するかどうかを試験した。細胞脱着は、細胞外マトリックスタンパク質ラミニンの分解を伴った(図4D)。

【0120】

本発明者らは、Aによって刺激されるプラスミン形成中の遊離リシンの生成が、観察された二次速度論に関与することの可能性を考察した。これを試験するため、C末端リシンおよびアルギニン残基を開裂する酵素であるカルボキシペプチダーゼB(CpB)と、CpB-インヒビターCPIを使用した。図5Aは、CpBの存在下では、プラスミンの生成は著しく減少することを示している。更に、この効果は、CPIとの同時インキュベーションによって完全になくなるように、CpB活性に依存している。図5Aは、CpBがAによって刺激されるプラスミン生成を完全になくするのではなく、反応が遅い一次速度論で進行することも示している。これらのデータは、反応中の遊離リシンの(プラスミンによって伝達される)生成が、恐らくはプラスミノゲンとtPA結合をそれらのそれぞれのクリングルドメインとの相互作用を介して支持することによる効率的なAによって刺激されるプラスミン生成に本質的であることを示唆している。C末端リシンの生成に対する同様な依存性は、効率的なフィブリンによって伝達されるプラスミン生成について示されている^{5,8}。これらの結果は、Aによって刺激されるプラスミン形成がイン・ビトロではカルボキシペプチダーゼBによって調節されることを示している。従って、細胞脱着がプラスミン生成の結果であるときには、CpBはAによって誘発される細胞脱着および/または生育力に影響することがある。本発明者らは、プラスミノゲンおよびAによって誘発される細胞脱着はCpBと同時インキュベーションすることによって完全に予防されることを示している(図5B,C)。これは、いずれも培地中および細胞上でのAによって刺激されるプラスミン形成の完全な阻害を伴う(図5D)。

【0121】

3. エンドスタチンは交差-構造を含んでなるアミロイドフィブリルを形成することができる。

コンゴレッド染色(図示せず)、X線回折分析およびTEMを用いて、Escherichia co

10

20

30

40

50

li並びにPichia pastors由来のエンドスタチン凝集体における交差 - 構造の存在およびエンドスタチンがアミロイドフィブリルを形成する能力を示した(図6A-B)。細菌性エンドスタチンは4.7オングストローム(水素結合距離)並びに10-11オングストローム(シート間距離)で反射線を生じることを見出した。反射線は、反対回折核で最大強度を示す。水素結合繰り返し距離が4.7オングストロームの繊維軸は、軸方向の毛細管軸に沿って配向されている。これは、10-11オングストロームのシート間距離がこれらの水素結合に直交していることを意味する。これは、タンパク質が交差 - 構造を有する交差 - シートコンホメーションであることと一致する。球状タンパク質の分子内シートは、この方法で配列されている回折パターンを生じることができない。バックグラウンド散乱の量から、タンパク質のごく一部だけが交差 - 構造形成に参加していることになる。本発明者らは、エンドスタチンにおける交差 - 構造の存在がtPAによって伝達されるプラスミノゲン活性化を刺激する能力と相関し(図6C)、且つニューロン細胞死と相関する(図6D)ことを見出した。

10

【0122】

本明細書において、本発明者らは、エンドスタチンが示唆した公差 - 経路を刺激することができる変性タンパク質の一例であることを示した。

【0123】

4. IAPPはtPAと結合し、tPAによって伝達されるプラスミノゲン活性化を刺激する。

IAPPのアミロイド沈着物は、糖尿病II型患者の膵臓で形成される^{5 9}。IAPPはイン・ビトロで細胞死を引き起こすことができ、従ってイン・ビボで見られる細胞の破壊に寄与し、これによりインスリン産生が不十分となると考えられる。IAPPは、交差 - 構造を含んでなるフィブリルを形成する^{6 0}。

20

【0124】

IAPPがtPAによって伝達されるプラスミノゲン活性化を刺激することができるかどうかを試験した(図7)。実際に、Aと同様に、IAPPはtPAによるプラスミンの形成を増進することができる。

【0125】

5. グリコアルブミンはチオフラビンTおよびtPAと結合し、交差 - 構造を含んでなるアミロイドフィブリルとして凝集する。

30

幾つかのタンパク質のグリケーションによって、これらのタンパク質がtPAと結合する能力を誘発または増加することができ、且つtPAによって伝達されるプラスミン形成を刺激することができる^{2 2 ; 6 1}。本発明者らは、g6pを用いるアルブミンのグリケーションがアルブミンに対する高親和性tPA結合を与えるだけでなく(図8A)、チオフラビンTに結合することもできるようになることを示す(図8C)。tPAの結合は、コンゴレッドと競合することができる(図8B)。更に、チオフラビンTのグリコアルブミンへの結合をtPAと競合させることができる(図8D, E)。コンゴレッドおよび/またはチオフラビンTとtPAが競合するという事実は、それらが同一のまたは重複している結合部位を有することを示している。

【0126】

40

g6pで修飾したアルブミン製剤のTEMを用いる分析は、4週間インキュベーションした後、非晶質のアルブミン凝集体が形成され(図8G)、これは - シートにおけるアルブミンアミノ酸残基の7%の存在を示すCDスペクトルを示していることが明らかになった(表1)。23週間までインキュベーションを延長したところ、長さが約500nmであり、直径が約50-100nmの範囲の高次シート様繊維構造に転換した(図8H)。これらの繊維は、CD分光偏光法で分析したところ、19%の - シートまで増加した(表I)。同じ方法でグリケーションした異なるバッチからアルブミンは、2週間のインキュベーション後には繊維状凝集体の束を既に示したが(図8I)、 - シート含量の増加はCD分光偏光法では検出されない(表I)。それぞれの束において、約10本の分離した線状の幅が3-5nmであり長さが200-300nmの繊維を同定することができ

50

る。それぞれの束の最上部では、直径が約 5 nm の規則的に分布したスポットが見られる。これらのスポットは、繊維に結合しているあるいは部分的に繊維に組込まれている球状アルブミン分子によって説明することができる。凝集体はコントロールアルブミンには存在せず（図示せず）、 β -シートは CD 分光偏光法を用いて測定されなかった（表 I）。2 および 23 週間のグリケーションの後に得られる繊維構造も同様にチオフラビン T (ThT) の蛍光を増進するが、4 週間後に得られた非晶質沈澱では蛍光シグナルはほとんど増加しなかった。

【0127】

X 線繊維回折分析では、アルブミン - g 6 p (23 週間) がかなりの量の結晶性繊維を含んでなるが（図 8 J, L）、アルブミン - g 6 p (2 週間) およびアルブミン - g 6 p (4 週間) の回折パターンは、アルブミンコントロール（図 8 K）について得たパターンと極めて類似した非晶質の沈澱した球状タンパク質から生じる特徴を示すことが分かった。アルブミン - g 6 p (23 週間) については、4.7 オングストロームの繰り返しは β -シートの β -ストランド間の特徴的な水素結合距離に相当する。2.3 および 3.3 オングストロームの繰り返しは、4.7 オングストロームの繰り返しに直交する好ましい配向を有する（図 8 M）。2.3 および 3.3 オングストロームの繰り返しを合わせると、繊維軸は 6.8 オングストロームの繰り返しを有する水素結合の方向に直交して配向されていることが示唆される。この大きさは 2 個のペプチド結合の長さに相当し、 β -ストランドが繊維軸に平行になっていることを示す。これは、アルブミン - g 6 p (23 週間) 構造が水素結合した鎖のパックされた β -シートからなる交差 β -構造から構成されていることを示唆する（図 8 N）。同様な配向は、PrP^C の最初に予測された β -ヘリックス領域のアミロイドフィブリルで見られる。a-軸が 9.4 オングストロームであるかあるいは 4.7 オングストロームであり、c-軸が 6.8 オングストロームであるときには、2.5 および 6.0 オングストロームの繰り返しは単に (hk1) として示すことができる。これは、高次の b-軸繰り返しが内部 β -シート距離に相当することを示している。a-軸および c-軸がそれぞれ 4.7 または 9.4 オングストロームおよび 6.8 オングストロームでは、強い 3.8 オングストロームの繰り返しは (201) または (101) として示される。総ての観察を考慮すれば、アルブミン - g 6 p 繊維 (23 週間) はアミロイドフィブリルに特徴的な交差 β -構造によって構成されていることは明らかである。

【0128】

これらの結果は、糖残基と共にインキュベーションおよび / または修飾することにより、tPA 結合を支持することができるアルブミン中の交差 β -構造が形成されることを示している。

【0129】

6. ヘモグロビンのグリケーションにより tPA 結合およびフィブリル形成が誘発される。

ヒトヘモグロビンの g 6 p とのインキュベーションにより、高親和性 tPA 結合が生じた（図 9 A）。フィブリルを含む非晶質の凝集体 Hb - g 6 p 付加物が TEM で観察されたが（図 9 B）、コントロール Hb は凝集しなかった（図示せず）。糖尿病患者のヒト Hb は、12.4% を上回る Hb がグリケーションされると、フィブリル状凝集体を形成する傾向を有する（表 II）。

【0130】

7. アミロイドアルブミンは元の炭水化物（誘導体）とは無関係に形成される。

上記の観察から、アルブミンの -NH₂ 基の g 6 p による修飾によって、アミロイド交差 β -構造の形成が誘発されることは明らかである。本発明者らが検討した次の疑問は、球状アルブミンのアミロイドフォールドへのリフォールディングの誘発が g 6 p の制限特性であるかどうか、またはアミロイド形成が AGE 形成に用いた元の炭水化物または炭水化物誘導体とは無関係に起こるかどうかであった。アルブミン溶液を、1 M g 6 p、250 mM DL-グリセルアルデヒド / 100 mM NaCNBH₃、1 M D- (-

10

20

30

40

50

) - フルクトース、1 M D (+) - グルコース、500 mM グリオキシル酸 / 100 mM NaCNBH₃、および相当するPBSおよびPBS / NaCNBH₃ 緩衝液コントロールと共に37 で86週間インキュベーションした。グリセルアルデヒドおよびグリオキシル酸は、メイラード反応におけるAGEの前駆体である炭水化物誘導体である^{6 3} ; ^{6 4}。86週間後に、アルブミン - グリセルアルデヒドおよびアルブミン - フルクトースは淡黄 / 褐色懸濁液となった。コントロールは無色の透明溶液であった。アルブミン - グルコースおよびアルブミン - グリオキシル酸は透明な単黄 - 淡褐色溶液であった。アルブミン - g6p : 86は、透明な暗褐色溶液であった。AGE形成は、AGEに特異的な励起 / 発光波長 (図示せず)、moab抗 - AGE4B5の結合 (図示せず) およびpoab抗 - AGEの結合 (図示せず) を用いる自己蛍光測定によって確かめた。予想されたように、アルブミン - グリオキシル酸は (主として) 非蛍光性カルボキシメチル - リシン (CML) 付加物が形成されるという事実によって自己蛍光シグナルを示さなかった^{6 3}。

【0131】

上記のAGE - 特異抗体の自己蛍光データおよび結合は、様々な炭水化物および炭水化物誘導体を同様なAGE構造にすることができることを示している。AGE形成の出発点としてg6pを用いて、アルブミンは、A およびIAPPの十分に検討されたフィブリルで観察されるものと同様のアミロイド特性を採用したことを示した。従って、代替炭水化物および誘導体を用いて得たアルブミン - AGE付加物におけるアミロイド構造の存在について試験した。本発明者らは、アルブミン - AGE - ThT溶液 (図10J) および風乾したアルブミン - AGE製剤であって、コンゴレッドとインキュベーションしたものの蛍光を測定した (図10A - I)。アルブミンをグリセルアルデヒド、グルコースまたはフルクトースとインキュベーションしたところ、ThTの蛍光シグナルが増加した (図10J)。ThTおよび緩衝液のバックグラウンドシグナルを差し引いた後、特異的なアミロイド - ThT蛍光は、アルブミン - グリオキシル酸および緩衝液コントロールについて測定されなかった。アルブミン - g6p、アルブミン - グリセルアルデヒドおよびアルブミン - フルクトースは、A およびIAPPのシグナルと類似のコンゴレッド蛍光シグナルを生じた (図10C - E , G - H)。アルブミン - グルコースでは、蛍光沈澱の均一に分布したパターンが観察された (図10F)。アルブミン - グリオキシル酸および緩衝液コントロールでは、染色はほとんど見られなかった (図10A - B , I)。これらのThTおよびコンゴレッド蛍光データは、アルブミン - g6pの他に、アルブミン - グリセルアルデヒド、アルブミン - グルコースおよびアルブミン - フルクトースはアミロイド様特性を有することを示している。これらの知見を更に実証するため、ELISAでのアミロイド特異的セリンプロテアーゼtPAの結合について試験した。酵素は、アルブミン - g6p、アルブミン - グリセルアルデヒド、アルブミン - グルコースおよびアルブミン - フルクトース (図10K - L)、および上記のように、ポジティブコントロールA およびIAPPに特異的に結合した^{4 9}。アルブミン - グリオキシル酸および緩衝液コントロールについては、tPA結合は見られない。

【0132】

ThT、コンゴレッドおよびtPAデータから、アルブミンにおけるアミロイド特性の誘発はg6p唯一の特性ではないことは明らかである。明らかに、g6p、グルコース、フルクトース、グリセルアルデヒドなどを含んでなる炭水化物および炭水化物誘導体のスペクトルは、アルブミンに共有結合したときに球状の元のフォールドからアミロイド交差 - 構造フォールドへの転換を引き起こす能力を有する。

【0133】

8. A へのコンゴレッド結合およびtPA結合の分析

A はtPAおよびコンゴレッドに結合することができることは明らかにされている。本発明者らは、tPAのA への結合をコンゴレッドと競合させることができることを示す (図11)。これらの結果は、A 、フィブリンおよびグリコアルブミンの構造は類似しており、tPAへの結合を伝達することができるという本発明者らの知見を支持してい

る。

【0134】

9. ヒトFXIIの交差 - 構造フォールドを含むアミロイドペプチドおよびタンパク質への結合

図12のグラフは、FXIIが、試験した総てのアミロイド化合物に特異的に結合することを示している。hA (1-40)、FP13、アルブミン - AGEおよびHb - AGEについてのKDは、それぞれ約2、11、8および0.5 nMである。競合的FXII - tPA ELISAを用いて得たデータは、tPAがFXIIのアミロイド(ポリ)ペプチドへの結合を効率的に阻害することを示している(図12)。これらのデータから、FXIIおよびf.l.tPAはhA (1-40)上の結合部位の重複について競合していると結論した。K2P - tPAは、FXII結合を阻害しない。FXIIのアルブミン - AGEへの結合も、hA (1-40)について観察されたのと同様に、tPAによって効果的に廃止されるが、K2P - tPAによっては廃止されない。これは、FXIIが同様にしてhA (1-40)およびアルブミン - AGEに結合することができることを示している。更に、これらのデータは、tPAの最初の3個のドメイン(フィンガー、EGF様、クリングル1)が、FXIIとアミロイドhA (1-40)またはアルブミン - AGEとの相互作用に対するf.l.tPAの阻害効果に参与していると思われることを示している。ドットプロット分析法を用いて、FXIIのスポットしたアミロイドhIAPPおよびhA (1-40)への結合を試験した。ネガティブコントロールPBSおよびmIAPPについては、FXIIの結合は見られなかった(図12)しかしながら、FXIIは、初期の報告^{6 5}と一致してhA (1-40)並びにhIAPPと特異的に結合した(図12)。これらのデータは、図12A - Fに示されたELISAデータと共に、FXIIがアミノ酸配列相同性を共有しないポリペプチドに結合することができ、これによって交差 - 構造フォールドを共有することを示唆している。これは、アミロイド特異的フォールドを含むtPAとポリペプチドの相互作用についての本発明者らの最新のデータと一致している。

10

20

【0135】

10. tPAの交差 - 構造を含んでなる分子であるA およびグリコアルブミンへの結合は、フィンガードメインを含むtPAにおけるN末端領域の存在が必要である。

tPAの幾つかのドメインは、フィブリンまたはフィブリン断片への結合を伝達することが示されている^{1 2 ; 5 3 ; 6 6 ; 6 7}。しかしながら、tPAのどのドメインがAまたは他の交差 - 構造を含む分子への結合にとって必要であるかは知られていない。本発明者らは、レテブラーゼと呼ばれ、N末端フィンガー、EGFおよびクリングル1ドメイン(K2 - tPA)を欠いている突然変異tPAが交差 - 構造を含んでなる分子と結合することができないことを示す(図13A, B)。これらの結果は、N末端領域がtPAのフィブリルを含んでなる交差 - 構造への結合に必要なことを示唆している。

30

【0136】

tPA - F - GSTおよびRPTP - GSTの発現および精製

GSTで標識した構築物tPA - F - GSTおよびRPTP μ - GST(コントロール)を、Sepharose 4Bビーズにカップリングしたグルタチオンを用いて293T培地から精製したところ、それぞれ約35 kDaおよび150 kDaの単一バンドを生じた(図示せず)。培地で用いたFC5に由来する微量のBSAも、存在した。

40

【0137】

ELISA: tPA - F - GSTおよびRPTP - GSTのヒトA (1-40)およびグリコアルブミンへの結合

ELISAにおいて、コントロールtPAは、過剰のACAの存在下でヒトA (1-40)およびアルブミン - g6pへ結合した(図13C)これは、用いた分析法では、tPAは繊維状アミロイドにクリングル2から独立して結合することができることを示している。tPA - FドメインはヒトA (1-40)およびアルブミン - g6pに結合したが、RPTP μ - GSTでは結合は見られなかった。従って、tPA - F - GSTで見ら

50

れた結合は特異的であり、G S T タグに由来しない。この結果は、t P A フィンガードメインを交差 - 構造 d アミロイドフィブリルへの結合についての性質によってデザインされた特異的ドメインとして示している。

【0138】

ヒト t P A の F、F - E G F、E G F、F - E G F - K 1 および K 1 断片の p c D N A 3 における c D N A 構築物を調製した。C 末端の G S T タグを有する組換えタンパク質を B H K 細胞で発現させ、培地に分泌させた。G S T タグのみを発現する B H K 細胞からの培地を、コントロールとして用いた。コンディショニングした培地を A および I A P P フィブリルを用いるプルダウン分析の後にウェスタンブロット分析に用いた。A への効率的結合は、フィンガードメインを含む 3 種類総ての t P A 突然変異体、すなわち F - G S T、F - E G F - G S T および F - E G F - K 1 - G S T について明らかである (図 1 3 D)。K 1 - G S T および E G F - G S T 構築物並びに G S T タグのみ A インキュベーションの後に上清に留まる。同様なパターンは、I A P P プルダウンの後に得られた (図示せず)。

10

【0139】

精製した t P A F - E G F - G S T、組換え f.l. Actilyse t P A および G S T コントロールの固定アミロイド A、アミロイドフィブリン断片₁₄₈₋₁₆₀ F P 13、アミロイド I A P P、および非アミロイド m I A P P コントロールへの結合を調製した (図 1 3 E - G)。完全長 t P A および t P A F - E G F - G S T は、3 種類総てのアミロイドペプチドに結合し、A k a については、t P A および F - E G F に対してはそれぞれ 2 および 2 n M であり、F P 13 に対しては 5 および 2 n M であり、I A P P については 2 および 13 n M である。非アミロイド m I A P P に対する結合は見られなかった (図 1 3 E)。G S T は F P 13 および I A P P に結合しないが、A に対しては幾らかの結合が検出される。これは、プルダウン分析法において A に結合した G S T の小画分を反映している可能性がある (図 1 3 D)。

20

【0140】

免疫組織化学分析を用いて、精製した組換え t P A F - E G F - G S T 構築物の A D に冒されたヒト脳のパラフィン切片への結合を試験した。アミロイド沈着の存在は、標準的手法を用いて Dept. of Pathology (UMC Utrecht) によって確かめた。本発明者らの実験では、これらのアミロイド沈着はコンゴレッド蛍光を用いて確認した (図 1 3 I, K, M)。図 1 3 H および I、および図 1 3 J および K において、コンゴレッド結合にポジティブな領域は t P A F - E G F - G S T 結合についてポジティブな領域と一致することが明らかに分かる。G S T によるコントロール染色は、タグのみの特異結合を示さない (図 1 3 L - M)。

30

【0141】

現在のところ、配列および構造的相同性に基づいて、t P A の隣のタンパク質 1 以上のフィンガードメイン、すなわち H G F a (1 個の F ドメイン)、F X I I (1 個の F ドメイン)、F n (6 個の F ドメインの 1 個のストレッチ、3 個の F ドメインの 2 個のストレッチ) を含むものが知られている。上記の結果から、t P A の F ドメインは t P A のアミロイド (ポリ) ペプチドへの結合において重要な役割を果たしていると結論した。フィンガードメインは一般的な交差 - 構造結合モジュールであることができると仮定した。現在のところ、4 個のタンパク質 t P A、F X I I、H G F a およびフィブロネクチンは、フィンガーマチーフを含むことが知られている。図 1 4 A は、それぞれのタンパク質におけるフィンガーマチーフの局在化を略記している。図 1 4 B は、これらの 4 種類のタンパク質におけるフィンガードメインのヒトアミノ酸配列の整列を示す。図 1 4 C は、t P A のフィンガードメイン、およびフィブロネクチンの第四および第五のフィンガードメインの三次元構造を図解表現したものを示す。フィンガードメインが一般的にはアミロイドを結合するという仮定を試験するため、H G F a および F X I I の F ドメイン、並びに F n の第四および第五の F ドメインであって、フィブリンに結合する能力について知られているものをクローニングした^{6, 8}。プルダウン分析法を用いて、F n F 4 - G S T およ

40

50

びFn F4-5-GST、並びにFXIIF-GSTおよびHGFA F-GSTが特異的にA (図13 M-N)およびIAPP (図示せず)に特異的に結合することを示す。Fn F5-GSTは幾分かA に結合するが、これは培地から余り効率的にはなく抽出され、アミロイドペレットの洗浄手続き中に部分的に放出されると思われる(図13 M)。ポジティブコントロールtPA F-EGF-GSTの抽出後には、構築物は培地に残っていなかったが、ネガティブコントロールGSTはペレット画分には検出されなかった(図示せず)。これらのデータは、アミロイド(ポリ)ペプチドへの結合はtPA Fドメインのユニークな能力ではなく、試験を行ったFドメインの更に一般的な特性であることを示している。更に、これらのデータは、図13 A, HおよびShibayama et al. 6 5 によって示されるように、FXIIのアミロイド(ポリ)ペプチドへの観察された結合はFドメインによって調節されることを示している。

【0142】

1.1. tPAのアミロイド結合ドメイン

tPAのフィンガードメインは、フィブリンへの高親和性結合に重要であることが示されている^{1 2 ; 6 6}。レテプラゼ(K2-P tPA)およびF-tPA、F-EGF-tPAおよびF-EGF-K1-tPAを用いる本発明の結果は、フィブリン以外の刺激因子への結合におけるtPAのN末端フィンガードメインの重要な役割を示している。個々までは、これら総ての因子はコンゴレッドと結合し、交差-構造を含む。更に、フィブリンについてのフィブロネクチンの結合部位は、フィンガードメインタンデムF4-F5に対してマッピングされている^{6 8}。フィブリン断片FCB2の存在下における完全長tPAによるプラスミノゲン活性化はフィブロネクチンによって阻害することができると示されている^{6 9}。まとめて考えると、これらの観察は、tPAとフィブロネクチンがフィブリン上の同一または重複結合部位についてフィンガードメインによって競合することを示唆している。本発明者らのデータは、FnのF4-5ドメインがアミロイドA に結合することを示している。

【0143】

1.2. 抗-AGE抗体のアミロイド(ポリ)ペプチドへの結合、および抗-A のタンパク質-AGE付加物への結合

最近、O'Nuallain and Wetzel^{7 0}は、アミロイドの特徴を有するペプチドに対して誘発された抗体は、アミノ酸配列には関係なく同様なアミロイド特性を有する任意の他のペプチドに結合することができることを示した。これらのデータ、および組織型プラスミノゲンアクチベーターおよびXII因子は、アミロイド特異的交差-構造フォールドを共有する配列に関係のないポリペプチドのファミリーに結合することができるという本発明者らの観察に基づいて、一層広汎なクラスのタンパク質が特異的アミノ酸残基によって構成された線形またはコンホメーションエピトープに対するよりはこの構造単位に対する親和性を示すことができると仮定した。この仮定により、アミロイド交差-構造フォールドを含むアルブミン-AGEに対して誘発された抗体が、この交差-構造フォールドを有する任意の(ポリ)ペプチドに対して広範囲の特異性をも示すかどうかという疑問を刺激した。

【0144】

ELISA装置では、g6p-グリコアルブミン-AGEに対して誘発された-AGE1はアミロイドアルブミン-AGE:23(Kd=66nM)およびHb-AGE:32(Kd=20nM)、並びにA (1-40)(Kd=481nM)およびIAPP(Kd=18nM)に結合する(図15 A-C)。ネガティブコントロールは、IAPPについて非グリコアルブミンおよびHb、非アミロイドペプチドマウス IAPP、およびA についてポリクローナル抗-ヒトビトロネクチン抗体-hVnK9234であった。-AGE1の同一画分がIAPPおよびA に結合するかどうかを試験するために、抗体をIAPPフィブリルで予備インキュベーションした後、フィブリルを-AGE1の可能なアミロイド結合画分と共にペレット化した。上清に残った-AGE1のA (1-40)への結合は減少した(図15 D)。これは、-AGE1の同一画分がIAP

PおよびA (1-40)に結合することを示している。プルダウン分析法を用いて、抗-A G E 1のアミロイドペプチドへの結合を別の方法で評価した。抗-A G E 1溶液をアミロイドフィブリルA (16-22) (図15E; レーン1-2)、A (1-40) (図15E; レーン4-5)、およびI A P P (図15E; レーン6-7)を用いてインキュベーションし、次にアミロイドフィブリルをペレット化した後、上清をA (16-22)によって-A G E 1を完全に欠失した。I A P Pでは、抗体の約50%がアミロイド画分に見出されたが、A (1-40)では抗体は余りペレット化しない。相補的方法で得られたこれらのデータは、抗-A G E 1がアルブミン-A G E : 23とのアミノ酸配列相同性を共有しないアミロイドペプチドに結合することができ、これにより交差-構造フォールドを共有することも示している。更に、t P Aのアミロイドペプチドへの結合が抗-A G E 1の結合を阻害するという観察は、t P Aのような抗-A G E 1が交差-構造フォールドへ結合することも示している (図15F-G)。t P Aが抗-A G E 1のA への結合をI A P Pで見られる減少より少ない程度で減少させるという観察は、I A P Pと比較したときにコーティングしたA 上の抗-A G E I結合部位の数が一層多いこと (図15B-C参照)、およびE x i q o n E L I S Aプレートをを用いるときにA ($k_D = 46 \text{ nM}$)についてよりI A P P ($k_D = 6 \text{ nM}$)についてt P Aの親和性が一層高いことと推定的に関連付けられる (図示せず)。結合データは一緒になって、抗-A G E 1をマルチリガンド交差-構造結合タンパク質のクラスのものと同様に確認する交差-構造フォールドを有する (ポリ)ペプチドには関係なく、抗-A G E 1がアミロイドフォールドに結合することを示唆している。

10

20

【0145】

抗-A G E 1を用いて得た上記の結果に基づいて、市販のウサギ抗-ヒトA (1-42) H-43が、アミロイド特性を有していても関連のないアミノ酸配列を有する任意の (ポリ)ペプチドに対して広範囲の特異性も示すかどうかを試験した。実際に、E L I S Aにより、H-43はA (1-40)に結合するだけでなく、I A P Pおよびアルブミン-A G Eにも結合することを示すことができた (図15H)。更に、H-43の固定I A P Pへの結合は、t P Aによって効果的に減少した (図15I)。これらの観察結果は一緒になって、抗-A (1-42) H-43が、マルチリガンド交差-構造結合タンパク質t P Aと同様の方法で、他のアミロイドに結合することができることを示している。

30

【0146】

ポリクローナルマウス抗-アルブミン-A G E / A を用いるE L I S Aは、抗体がこれらの抗原に結合するだけでなく、固定に用いたもの以外の他のアミロイドペプチドに特異的に結合することを示している (図15J-L)。ウサギ抗-A G E 1抗体および抗-A (1-42) H-43と同様に、抗-アルブミン-A G E / A は、アミノ酸配列には関係なく、試験したアミロイドペプチドに対して親和性を示す。これは、マウス抗-アルブミン-A G E / A もマルチリガンドアミロイド結合抗体であることを示唆している。

【0147】

抗-A G E 1、抗-A (1-42) H-43および抗-アルブミン-A G E / A のアミロイド結合特性に基づいて、アルブミン-A G E : 23に対して誘発される抗-A G E 2のアミロイド結合画分をカラムに不可逆的にカップリングしたA フィブリルを用いて精製した。この画分を、アルツハイマー病に冒されているヒト脳切片の免疫組織化学的分析に用いた。図15Mでは、抗体が、図15Nに示されるコンゴレッド蛍光によって示される球状アミロイド沈着物に特異的に結合することが明らかに分かる。

40

【0148】

抗-アミロイドおよび抗-A G E抗体が、交差-構造フォールドが存在する限り、広範囲の配列的に関係のない (ポリ)ペプチドに対する親和性を示すという知見は、O'Nualain and Wetzel⁷⁰ およびKayed et al.⁷¹ によって最近に公表されたデータと一致する。文献における幾つかの古い報告から、抗-交差-抗体を得ることができることを精

50

選することができる。例えば、フィブリンおよび A に対するおよび A およびヘモグロビンに対する交差反応性抗体が記載されている^{7 2} ; ^{7 3}。本発明者らは、本明細書において、フィブリノーゲンとヘモグロビン - A G E が交差 - 構造フォールドを有し、これが抗 - A 抗体について観察された交差反応性が実際に A 、フィブリノーゲンおよびヘモグロビンでの同様な構造的エピトープへの抗 - 交差 - 構造抗体の結合であることを示唆していることを示した。

【0149】

ポリクローナル抗 - A G E およびアミロイド抗体での結果に基づいて、本発明者らは、抗 - 交差 - 構造抗体を得ることができると仮定した。従って、本発明者らは、グリコ B S A および A で免役したマウスの脾臓と骨髄腫細胞を融合させた。次に、ハイブリドーマによって産生した抗体のグリコヘモグロビンおよび I A P P への結合を検討することによって潜在的な抗 - 交差 - 構造抗体を選択した。この手順を用いて、グリコヘモグロビン並びに交差 - 構造を含む幾つかのペプチドを認識するモノクローナル抗体 3 H 7 を単離した (図 16)。グリケーションしていないヘモグロビン、またはアミロイドフィブリル (m I A P P) を形成しない合成ペプチドへは、結合は見られなかった。

10

【0150】

13. サンドイッチ E L I S A : 溶液からのアミロイド構造の探索

溶液状のアミロイドアルブミン - A G E : 23 を積層したコーティング t P A でのサンドイッチ E L I S A 法を用いた後、広範囲の抗 - A (1 - 42) H - 43 を検出し (図 17)、溶液状のタンパク質を含む交差 - 構造を検出することができた。

20

【0151】

t P A フィンガードメイン^{7 4} ; ^{7 5} およびフィブロネクチンフィンガードメイン 4 - 5^{7 5} ; ^{7 6} の三次元構造は局所的電荷密度分布に関して著しい構造的相同性を示すことが本明細書で開示されている。いずれの構造も、電荷が交互する 5 個のアミノ酸残基の同様な溶媒に暴露したストレッチを含み、t P A については、A r g 7、G l u 9、A r g 23、G l u 32、A r g 30 であり、フィブロネクチンについては、A r g 83、G l u 85、L y s 87、G l u 89、A r g 90 がそれぞれ第五のフィンガードメインに位置している。帯電した残基整列は、フィンガーマジュールの同じ側に位置している。これらの整列は、フィブリン結合に本質的である。

【0152】

本発明者らの観察、結果、および本明細書で開示した同様なものに基づいて、t P A について同じ結合部位が t P A と結合し、活性化する総てのタンパク質に存在することになり、且つこの結合部位が交差 - 構造を含んでなることを示す。

30

【0153】

一緒にまとめると、本発明者らのデータは、交差 - 構造は、発生がきっちりと調節されており且つ発現により正常な生理学的応答、すなわち望ましくない生体分子の除去が誘発される生理学的に関連のある四次構造要素であることを示している。本発明者らの知る限りでは、望ましくない生体分子の除去のために「交差 - 構造経路」と呼ぶ一般的系の存在は、本明細書で初めて開示されたものである。本発明者らの結果は、この機構が自然にとって基本的なものであり、多くの生理学的仮定を制御し、損傷の誘発からまたは役に立たないまたは変性した生体分子から生体を保護することを示している。どのような手段によってであれ制御されなくなれば、この系は重大な問題を引き起こす可能性がある。一方、適性に用いられれば、この系は、腫瘍細胞などのような特異的なターゲット細胞において細胞死を誘発するのに応用することができる。

40

【0154】

【表 1】

表 I CDスペクトルから計算した β -シート率

| 試料* | インキュベーション時間 (週) | β -シート (%) ** |
|---|-----------------|------------------------|
| A β (16-22) | | 100 |
| アルブミン-グリセルアルデヒド | 2 | 0 |
| アルブミンコントロール | 2 | 0 |
| アルブミン-g6p | 2 | 0 |
| アルブミン-g6p | 4 | 7 |
| アルブミンコントロール | 23 | 0 |
| アルブミン-g6p | 23 | 19 |
| * 2週間インキュベーションしたアルブミンは、4および23週間インキュベーションしたアルブミンとは異なるバッチのものであった。 | | |
| ** β -シートでのアミノ酸残基の比率を示す。 | | |

10

20

【0155】

【表 2】

表 I I Hb_{A1c}濃度およびイン・ビトロでのHbフィブリル形成の相関

| 健常コントロール | | | 糖尿病患者 | | |
|----------|------------------|------|-------|------------------|------|
| 試料 | [HbA1c] (%) * | 繊維** | 試料 | [HbA1c] (%) * | 繊維** |
| 1 | 5.6 | — | 1 | 5.5 | — |
| 2 | 5.9 | — | 2 | 5.8 | — |
| 3 | 6.2 | — | 3 | 5.8 | — |
| | | | 4 | 10.7 | — |
| | | | 5 | 11.3 | — |
| | | | 6 | 11.6 | — |
| | | | 7 | 12.4 | + |
| | | | 8 | 12.5 | — |
| | | | 9 | 12.5 | — |
| | | | 10 | 12.6 | + |
| | | | 11 | 12.7 | — |
| | | | 12 | 12.8 | — |
| | | | 13 | 13.3 | + |
| | | | 14 | 13.7 | + |
| | | | 15 | 14.8 | + |
| | | | 16 | 15.3 | + |

* HbA1c濃度は、糖尿病患者および健常人コントロールの赤血球に存在するHbの総量の百分率として示す。標準偏差は、示した値の2.3%である。

** TEMを用いて決定した繊維の存在。

10

20

30

40

【0156】

参考文献

【表 3】

1. Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, et al. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*. 2002;416:507-511.
2. Rochet JC, Lansbury PT, Jr. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr Opin Struct Biol*. 2000;10:60-68.
3. Carmeliet P, Bouche A, De Clercq C, et al. Biological effects of disruption of the tissue-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator, and plasminogen activator inhibitor-1 genes in mice. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;748:367-381. 10
4. Carmeliet P, Collen D. Genetic analysis of the plasminogen and coagulation system in mice. *Haemostasis*. 1996;26 Suppl 4:132-153.
5. Collen D, Lijnen HR. Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb Haemost*. 1995;74:167-171.
6. Lijnen HR, Collen D. Mechanisms of physiological fibrinolysis. *Baillieres Clin Haematol*. 1995;8:277-290. 20
7. Bosma PJ, Rijken DC, Nieuwenhuizen W. Binding of tissue-type plasminogen activator to fibrinogen fragments. *Eur J Biochem*. 1988;172:399-404.
8. Grailhe P, Nieuwenhuizen W, Angles-Cano E. Study of tissue-type plasminogen activator binding sites on fibrin using distinct fragments of fibrinogen. *Eur J Biochem*. 1994;219:961-967.
9. Nieuwenhuizen W. Fibrin-mediated plasminogen activation. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:237-246. 30
10. Yakovlev S, Makogonenko E, Kurochkina N, Nieuwenhuizen W, Ingham K, Medved L. Conversion of fibrinogen to fibrin: mechanism of exposure of tPA- and plasminogen-binding sites. *Biochemistry*. 2000;39:15730-15741.

11. Bakker AH, Weening-Verhoeff EJ, Verheijen JH. The role of the lysyl binding site of tissue-type plasminogen activator in the interaction with a forming fibrin clot. *J Biol Chem.* 1995;270:12355-12360.
12. de Munk GA, Caspers MP, Chang GT, Pouwels PH, Enger-Valk BE, Verheijen JH. Binding of tissue-type plasminogen activator to lysine, lysine analogues, and fibrin fragments. *Biochemistry.* 1989;28:7318-7325.
13. Fleury V, Loyau S, Lijnen HR, Nieuwenhuizen W, Angles-Cano E. Molecular assembly of plasminogen and tissue-type plasminogen activator on an evolving fibrin surface. *Eur J Biochem.* 1993;216:549-556. 10
14. Haddeland U, Sletten K, Bennick A, Nieuwenhuizen W, Brosstad F. Aggregated, conformationally changed fibrinogen exposes the stimulating sites for t-PA-catalysed plasminogen activation. *Thromb Haemost.* 1996;75:326-331.
15. Hasan AA, Chang WS, Budzynski AZ. Binding of fibrin fragments to one-chain and two-chain tissue-type plasminogen activator. *Blood.* 1992;79:2313-2321. 20
16. Nieuwenhuizen W, Vermond A, Voskuilen M, Traas DW, Verheijen JH. Identification of a site in fibrin(ogen) which is involved in the acceleration of plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta.* 1983;748:86-92.
17. Nieuwenhuizen W, Schielen WJ, Yonekawa O, Tesser GI, Voskuilen M. Studies on the localization and accessibility of sites in fibrin which are involved in the acceleration of the activation of plasminogen by tissue-type plasminogen activator. *Adv Exp Med Biol.* 1990;281:83-91. 30
18. Nieuwenhuizen W. Sites in fibrin involved in the acceleration of plasminogen activation by t-PA. Possible role of fibrin polymerisation. *Thromb Res.* 1994;75:343-347.
19. Schielen WJ, Adams HP, Voskuilen M, Tesser GI, Nieuwenhuizen W. The sequence A alpha-(154-159) of fibrinogen is capable of accelerating the t-PA catalysed activation of plasminogen. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1991;2:465-470.
20. Tsurupa G, Medved L. Identification and characterization of novel tPA- and plasminogen-binding sites within fibrin(ogen) alpha C-domains. *Biochemistry.* 2001;40:801-808. 40

21. Yonekawa O, Voskuilen M, Nieuwenhuizen W. Localization in the fibrinogen gamma-chain of a new site that is involved in the acceleration of the tissue-type plasminogen activator-catalysed activation of plasminogen. *Biochem J.* 1992;283 (Pt 1):187-191.
22. Bobbink IW, Tekelenburg WL, Sixma JJ, de Boer HC, Banga JD, de Groot PG. Glycated proteins modulate tissue-plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;240:595-601.
23. Hu GF, Riordan JF. Angiogenin enhances actin acceleration of plasminogen activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;197:682-687. 10
24. Kingston IB, Castro MJ, Anderson S. In vitro stimulation of tissue-type plasminogen activator by Alzheimer amyloid beta-peptide analogues. *Nat Med.* 1995;1:138-142.
25. Lind SE, Smith CJ. Actin accelerates plasmin generation by tissue plasminogen activator. *J Biol Chem.* 1991;266:17673-17678.
26. Machovich R, Owen WG. Denatured proteins as cofactors for plasminogen activation. *Arch Biochem Biophys.* 1997;344:343-349. 20
27. Machovich R, Ajtai K, Kolev K, Owen WG. Myosin as cofactor and substrate in fibrinolysis. *FEBS Lett.* 1997;407:93-96.
28. Machovich R, Komorowicz E, Kolev K, Owen WG. Facilitation of plasminogen activation by denatured prothrombin. *Thromb Res.* 1999;94:389-394.
29. Parkkinen J, Hacker J, Korhonen TK. Enhancement of tissue plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation by *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal septicaemia and meningitis. *Thromb Haemost.* 1991;65:483-486. 30
30. Parkkinen J, Rauvala H. Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphotericin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphotericin. *J Biol Chem.* 1991;266:16730-16735.
31. Pryzdial EL, Bajzar L, Nesheim ME. Prothrombinase components can accelerate tissue plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation. *J Biol Chem.* 1995;270:17871-17877. 40

32. Radcliffe R, Heinze T. Stimulation of tissue plasminogen activator by denatured proteins and fibrin clots: a possible additional role for plasminogen activator? *Arch Biochem Biophys.* 1981;211:750-761.
33. Sheng S, Truong B, Fredrickson D, Wu R, Pardee AB, Sager R. Tissue-type plasminogen activator is a target of the tumor suppressor gene maspin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:499-504.
34. Silverstein RL, Leung LL, Harpel PC, Nachman RL. Complex formation of platelet thrombospondin with plasminogen. Modulation of activation by tissue activator. *J Clin Invest.* 1984;74:1625-1633. 10
35. Stack S, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Regulation of plasminogen activation by components of the extracellular matrix. *Biochemistry.* 1990;29:4966-4970.
36. Wada H, Kumeda Y, Ogasawara Z, et al. Stimulation of tissue type plasminogen activator by leukaemic cell homogenates. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1993;4:591-597.
37. Carrell RW, Gooptu B. Conformational changes and disease--serpins, prions and Alzheimer's. *Curr Opin Struct Biol.* 1998;8:799-809. 20
38. Krieger M, Stern DM. Series introduction: multiligand receptors and human disease. *J Clin Invest.* 2001;108:645-647.
39. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res.* 1999;84:489-497. 30
40. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1498:99-111.
41. Schmidt AM, Hofmann M, Taguchi A, Yan SD, Stern DM. RAGE: a multiligand receptor contributing to the cellular response in diabetic vasculopathy and inflammation. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26:485-493.
42. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest.* 2001;108:949-955. 40

43. Weldon DT, Maggio JE, Mantyh PW. New insights into the neuropathology and cell biology of Alzheimer's disease. *Geriatrics*. 1997;52 Suppl 2:S13-S16.
44. Yan SD, Roher A, Chaney M, Zlokovic B, Schmidt AM, Stern D. Cellular cofactors potentiating induction of stress and cytotoxicity by amyloid beta-peptide. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1502:145-157.
45. Balbach JJ, Ishii Y, Antzutkin ON, et al. Amyloid fibril formation by A beta 16-22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR. *Biochemistry*. 2000;39:13748-13759. 10
46. Bobbink IW, de Boer HC, Tekelenburg WL, Banga JD, de Groot PG. Effect of extracellular matrix glycation on endothelial cell adhesion and spreading: involvement of vitronectin. *Diabetes*. 1997;46:87-93.
47. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*. 1997;390:404-407. 20
48. Andrade MA, Chacon P, Merelo JJ, Moran F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng*. 1993;6:383-390.
49. Kranenburg O, Bouma B, Kroon-Batenburg LM, et al. Tissue-type plasminogen activator is a multiligand cross-beta structure receptor. *Curr Biol*. 2002;12:1833-1839.
50. van Zonneveld AJ, Veerman H, Pannekoek H. On the interaction of the finger and the kringle-2 domain of tissue-type plasminogen activator with fibrin. Inhibition of kringle-2 binding to fibrin by epsilon-amino caproic acid. *J Biol Chem*. 1986;261:14214-14218. 30
51. LeVine H, III. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol*. 1999;309:274-84.:274-284.
52. Kranenburg O, Scharnhorst V, Van der Eb AJ, Zantema A. Inhibition of cyclin-dependent kinase activity triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Cell Biol*. 1995;131:227-234.
53. Johannessen M, Diness V, Pingel K, et al. Fibrin affinity and clearance of t-PA deletion and substitution analogues. *Thromb Haemost*. 1990;63:54-59. 40

54. Gebbink MF, Zondag GC, Koningstein GM, Feiken E, Wubbolts RW, Moolenaar WH. Cell surface expression of receptor protein tyrosine phosphatase RPTP mu is regulated by cell-cell contact. *J Cell Biol.* 1995;131:251-260.
55. Stewart RJ, Fredenburgh JC, Weitz JI. Characterization of the interactions of plasminogen and tissue and vampire bat plasminogen activators with fibrinogen, fibrin, and the complex of D-dimer noncovalently linked to fragment E. *J Biol Chem.* 1998;273:18292-18299. 10
56. Tucker HM, Kihiko M, Caldwell JN, et al. The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J Neurosci.* 2000;20:3937-3946.
57. Tucker HM, Kihiko-Ehmann M, Wright S, Rydel RE, Estus S. Tissue plasminogen activator requires plasminogen to modulate amyloid-beta neurotoxicity and deposition. *J Neurochem.* 2000;75:2172-2177.
58. Redlitz A, Tan AK, Eaton DL, Plow EF. Plasma carboxypeptidases as regulators of the plasminogen system. *J Clin Invest.* 1995;96:2534-2538. 20
59. Hayden MR, Tyagi SC. "A" is for amylin and amyloid in type 2 diabetes mellitus. *JOP.* 2001;2:124-139.
60. Moriarty DF, Raleigh DP. Effects of sequential proline substitutions on amyloid formation by human amylin₂₀₋₂₉. *Biochemistry.* 1999;38:1811-1818.
61. Saishoji T, Higashi T, Ikeda K, et al. Advanced glycation end products stimulate plasminogen activator activity via GM-CSF in RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;217:278-285. 30
62. Nguyen JT, Inouye H, Baldwin MA, et al. X-ray diffraction of scrapie prion rods and PrP peptides. *J Mol Biol.* 1995;252:412-422.
63. Motomiya Y, Oyama N, Iwamoto H, Uchimura T, Maruyama I. N epsilon-(carboxymethyl)lysine in blood from maintenance hemodialysis patients may contribute to dialysis-related amyloidosis. *Kidney Int.* 1998;54:1357-1366. 40
64. Sady C, Jiang CL, Chellan P, et al. Maillard reactions by alpha-oxoaldehydes: detection of glyoxal-modified proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1481:255-264.

65. Shibayama Y, Joseph K, Nakazawa Y, Ghebrehiwet B, Peerschke EI, Kaplan AP. Zinc-dependent activation of the plasma kinin-forming cascade by aggregated beta amyloid protein. *Clin Immunol.* 1999;90:89-99.
66. Bennett WF, Paoni NF, Keyt BA, et al. High resolution analysis of functional determinants on human tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem.* 1991;266:5191-5201.
67. Horrevoets AJ, Smilde A, de Vries C, Pannekoek H. The specific roles of finger and kringle 2 domains of tissue-type plasminogen activator during in vitro fibrinolysis. *J Biol Chem.* 1994;269:12639-12644. 10
68. Matsuka YV, Medved LV, Brew SA, Ingham KC. The NH₂-terminal fibrin-binding site of fibronectin is formed by interacting fourth and fifth finger domains. Studies with recombinant finger fragments expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1994;269:9539-9546.
69. Beckmann R, Geiger M, de Vries C, Pannekoek H, Binder BR. Fibronectin decreases the stimulatory effect of fibrin and fibrinogen fragment FCB-2 on plasmin formation by tissue plasminogen activator. *J Biol Chem.* 1991;266:2227-2232. 20
70. O'Nuallain B, Wetzel R. Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:1485-1490.
71. Kaye R, Head E, Thompson JL, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science.* 2003;300:486-489.
72. Cutler P, Brown F, Camilleri P, et al. The recognition of haemoglobin by antibodies raised for the immunoassay of beta-amyloid. *FEBS Lett.* 1997;412:341-345. 30
73. Stern RA, Trojanowski JQ, Lee VM. Antibodies to the beta-amyloid peptide cross-react with conformational epitopes in human fibrinogen subunits from peripheral blood. *FEBS Lett.* 1990;264:43-47.
74. Downing AK, Driscoll PC, Harvey TS, et al. Solution structure of the fibrin binding finger domain of tissue-type plasminogen activator determined by 1H nuclear magnetic resonance. *J Mol Biol.* 1992;225:821-833. 40

75. Smith BO, Downing AK, Driscoll PC, Dudgeon TJ, Campbell ID. The solution structure and backbone dynamics of the fibronectin type I and epidermal growth factor-like pair of modules of tissue-type plasminogen activator. *Structure*. 1995;3:823-833.
76. Williams MJ, Phan I, Harvey TS, Rostagno A, Gold LI, Campbell ID. Solution structure of a pair of fibronectin type 1 modules with fibrin binding activity. *J Mol Biol*. 1994;235:1302-1311.

10

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1】「交差 - 構造経路」の図解表現。交差 - 構造は多数のタンパク質に見出されている(1)。交差 - 構造の形成は幾つかの生理学的または病理学的条件によって引き起こされ、続いて事象のカスケード「交差 - 構造経路」を開始する。所定のタンパク質内で交差 - 構造の形成を引き起こすまたは調節する因子としては、1)タンパク質の物理化学特性、2)タンパク質分解、3)交差結合、酸化、ホスホリル化、グリコシル化、およびグリケーションなどの調節された翻訳後修飾、4)グルコース、および5)亜鉛が挙げられる。タンパク質の配列内のある種の突然変異は、交差 - 構造を採用し且つアミロイドフィブリルを形成するタンパク質の能力を増加することが知られている。これらの突然変異は、アミロイドーシスの遺伝形態、例えばADに見られることが多い。本発明は、交差 - 構造を採用することができるタンパク質の多数の新規な例を開示する。幾つかのタンパク質は、交差 - 含有タンパク質と結合することが知られている(2)。これらのタンパク質は、交差 - 構造の形成によって引き起こされる本明細書に開示したシグナルカスケード(「交差 - 構造経路」)の一部である。「交差 - 構造経路」は、多くの方法で調節される(3, 4, 5)。この経路を調節する因子としては、NOレギュレーターなど合成および分泌の調節因子、並びにプロテアーゼインヒビターなど活性の調節因子が挙げられる。経路は、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、アミロイドーシス、出血、炎症、多発性硬化症、パーキンソン病、敗血症、溶血性尿毒症症候群など、これらに限定されない多くの生理学的および病理学的過程に参与している(7)。長期相乗作用におけるtPAについて確立された役割を考慮すれば、「交差 - 構造経路」も学習に参与することがある。

20

30

【図2】フィブリンの交差 - 構造 (A) フィブリン血餅のチオフラビンT蛍光。フィブリン血餅をチオフラビンTの存在下で形成し、蛍光を所定の時点で記録した。緩衝液、チオフラビンT、およびチオフラビンTの非存在下で形成した血餅のバックグラウンド蛍光を差し引いた。(B) フィブリン由来のペプチド85、86および87の円偏光二色性分析。楕円率(Dg・cm²/dmol)を、波長(nm)に対してプロットした。CDスペクトルは、ペプチド85および86が β -シートを含むが、ペプチド87は含まないことを示している。(C) ペプチド85のX線繊維回折分析は、ペプチドが β -シートを形成することを示している。(D) フィブリンペプチド85、86および87を用いるプラスミノゲン活性化分析。ペプチド85および86はいずれも交差 - 構造を含み、tPAによるプラスミンの形成を刺激するが、ペプチド87は交差 - 構造を欠き、プラスミンの形成を刺激しない。

40

【図3】tPA、プラスミノゲンおよびプラスミンのAへの結合 Aをプラスチック製の96穴プレートにコーティングした。(A) tPAまたは(B)プラスミン(プラスミノゲン)の増加濃度により、固定ペプチドに結合させた。tPAおよびプラスミン(プラスミノゲン)を十分に洗浄した後、結合を抗-tPAおよび抗-プラスミノゲン抗体を用いて固相酵素免疫検定法によって評価した。50mM β -アミノカプロン酸(β -ACA)の存在下における(C) tPAおよび(D)プラスミンのAへの結合をAおよびBと同様に評価した。

50

【図4】A による t P A によって伝達されるプラスミン形成の刺激、およびプラスミノゲンおよび A による細胞脱着の刺激。(A) プラスミノゲン (200 μ g/ml) および t P A (200 pM) を、A (5 μ M) またはコントロール緩衝液とインキュベーションした。試料を所定の時点で反応混合物から採取し、プラスミン活性を 405 nm における発色性プラスミン基質 S - 2251 の転換によって測定した。(B) N1E - 115 細胞を分化して、25 μ M の A の存在下または非存在下で所定濃度のプラスミンを受け取った。48 時間後に、死細胞を洗浄除去し、残りの接着細胞をメチレンブルーで染色した。プラスミンは、A によって誘導される細胞脱着を防止することができない。(C) N1E - 115 細胞を分化して、10 μ M の A の存在下または非存在下で所定濃度のプラスミンを受け取った。次に、24 時間後に、細胞脱着を評価した。A またはプラスミノゲンのみでは細胞接着に影響しないが、療法とも添加するとかなりの細胞脱着を引き起こす。(D) プラスミン形成およびラミニン分解の免疫プロット分析。分化した N1E - 115 細胞を、添加したプラスミノゲンの非存在下または存在下にて A (10 μ M) でまたはなしで処理した。A の添加により、プラスミンが形成され(最下欄)、ラミニンが分解する(最上欄)。

10

【図5】カルボキシペプチダーゼ B は A によって刺激された t P A によって伝達されるプラスミン形成および細胞脱着を阻害する。(A) プラスミノゲン (200 μ g/ml) および t P A (200 pM) を、A (5 μ M) またはコントロール緩衝液と共にインキュベーションした。試料を所定の時点で反応混合物から採取し、プラスミン活性を 405 nm での発色性プラスミン基質 S - 2251 の転換によって測定した。反応は、50 μ g/ml のカルボキシペプチダーゼ B (CpB) の非存在下または存在下、および 3.5 μ M のカルボキシペプチダーゼインヒビター (CPI) の非存在下または存在下にて行った。CpB は、A によって刺激されたプラスミン形成を大幅に減衰する。(B) N1E - 115 細胞を分化し、上記のように A (10 μ M)、プラスミノゲン (Plg, 20 μ g/ml)、および/または CpB (1 μ M) で処理した。24 時間後に、細胞を写真撮影した。(C) 次に、細胞を PBS で 1 回洗浄し、残っている細胞をメチレンブルー染色によって接着細胞の百分率として定量した。(D) 細胞を、(B) および (C) と同様に処理し、培地と細胞画分を集め、抗 - プラスミン (プラスミノゲン) 抗体を用いてウェスタンプロット法によって分析した。A は、CpB によって阻害されるプラスミン形成を刺激する。

20

30

【図6】エンドスタチンは交差 - 構造を含んでなるフィブリルを形成することができ且つプラスミノゲン活性化を刺激する。(A) TEM は、エンドスタチンフィブリルの形成を示す。(B) X 線分析は、沈澱した(沈澱)エンドスタチンにおける交差 - 構造の存在を示している。(C) プラスミノゲン活性化分析は、t P A によって伝達されるプラスミン形成に対する交差 - 構造を含むエンドスタチンの刺激活性を示している。A を比較のために示す。(D) エンドスタチンの分析は、メチレンブルー染色により細胞死を誘発した。沈澱形態のみが効率的に細胞死を誘発することができることが分かる。直接的細胞死は、十分なグルコースの存在下で保護されるが細胞脱着は保護されない。緩衝液沈澱は、コントロール緩衝液を示している。

【図7】I A P P は t P A によって伝達されるプラスミノゲン活性化を刺激する。完全長 (f1 - h I A P P) および切頭アミロイドコア (A - h I A P P) は、t P A によって伝達されるプラスミノゲン活性化を刺激するが、マウス I A P P (- m I A P P) は刺激しない。

40

【図8a】グリコアルブミン：チオフラビン T および t P A 結合、TEM 像、X 線繊維回折。(A) t P A のアルブミン - g 6 p への結合を示す E L I S A。(B) E L I S A を用いて測定したコンゴレッドによる t P A 結合のアルブミン - g 6 p への競合。(C) チオフラビン T のアルブミン - g 6 p への結合の蛍光測定であり、2、4 または 23 週間インキュベーションしたもの。(D) 430 nM のアルブミン - g 6 p を 19 μ M のチオフラビン T と共にインキュベーションしたときに得られる蛍光シグナルの t P A による阻害。(E) 420 nm での分光光度分析は、t P A の量の増加により、500

50

n Mのアルブミン - g 6 pを10 μ MのチオフラビンTと共にインキュベーションしたときに得られる特異的吸光度が減少する。

【図8b】グリコアルブミン：チオフラビンTおよびtPA結合、TEM像、X線繊維回折。(G)4週間グリケーションを行ったアルブミン - g 6 pの非晶質沈澱を示す電子顕微鏡写真。(H)23週間インキュベーションしたアルブミン - g 6 pのフィブリル状凝集体の束。(I)2週間グリケーションを行ったアルブミン - g 6 p。(J)アルブミン - g 6 pのX線散乱(23週間)。散乱強度は線形尺度でカラーコード化されており、白 - 灰 - 黒の順に減少する。非晶質のコントロールアルブミンからの散乱、並びに毛細管ガラス壁および空気からの散乱を差し引く。d - スペーシングおよび繊維軸の方向を与え、好ましい配向を矢印で示す。(K)アルブミンコントロールおよびアルブミン - g 6 p(23週間)の放射状掃引。(L)皮脂溶質沈澱アルブミンのバックグラウンド散乱を差し引いた後の、繊維状構造から生じる繰り返しを示すアルブミン - g 6 p(23週間)の放射状掃引。d - スペーシング(オングストローム)を、ピーク上に示す。(M)所定のd - スペーシングに相当する2 散乱角の接線方向掃引。この掃引は、個々の - シート内の水素結合距離に相当する4.7オングストロームの繰り返し、および6オングストロームの繰り返し、繊維軸に平行に走る2.3オングストロームの繰り返しに垂直に配向していることを示す。(N)アルブミン - g 6 p(23週間)アミロイドフィブリルにおける交差 - 構造の配向の図解表現。

10

【図9】ヒトヘモグロビンのフィブリル形成。(A)tPAのイン・ビトロでのグリコHb - g 6 pへの結合。(B)非晶質および繊維状に集合しているイン・ビトロでグリコHbを示す電子顕微鏡写真。

20

【図10】アルブミン - AGEのアミロイド特性はグリケーションに用いられる炭水化物または炭水化物誘導体には関係なく導入される。(A-I)風乾したアルブミン製剤のコンゴレッド蛍光。蛍光は、緩衝液(A)、または緩衝液およびNaCNBH₃(B)、ヒトIAPPのアミロイドコアペプチド(C)、A (D)とインキュベーションしたアルブミン、g 6 p(E)、グルコース(F)、フルクトース(G)、グリセルアルデヒド(H)、およびグリオキシル酸(I)とインキュベーションしたアルブミンを用いて測定した。(J)チオフラビンT - アミロイド蛍光は、所定のアルブミン製剤を含む溶液で測定した。(K-L)アミロイド結合セリンプロテアーゼtPAのアルブミン製剤への結合は、ELISA装置を用いて分析した。(K)では、tPAのアルブミン - グルコース、 - フルクトース、 - グリセルアルデヒド、 - グリオキシル酸、およびアルブミン - 緩衝液コントロールへの結合を示す。(L)では、tPAのポジティブコントロールであるアルブミン - g 6 p、A およびIAPPへの結合、並びにコントロール緩衝液とインキュベーションしたアルブミンへの結合を示す。

30

【図11】A へのコンゴレッド - およびtPA結合の分析。(A)ELISAを用いて測定したtPAの固定A への結合。(B)tPAのA への結合に対するコンゴレッドの増加濃度の影響。ELISAでは、10 μ g / mlのA (1 - 40)をコーティングし、40 nMのtPAおよび0 - 100 μ Mのコンゴレッドと共にインキュベーションした。

【図12】交差 - 構造フォールドを含むアミロイドペプチドおよびタンパク質へのヒトFXIIの結合。(A-B)FXIIの、プロトタイプアミロイドペプチドhA (1 - 40)およびヒトフィブリン断片₁₄₇₋₁₅₉FP13、およびアルブミン - AGEおよびHb - AGEであって、いずれも交差 - 構造を含むものに対する結合を、ELISAで試験した。FXIIは、ネガティブコントロールであるマウスランゲルハンス島アミロイドポリペプチド(AmIAPP)、アルブミン - コントロールおよびHb - コントロールであって、3種類がいずれもアミロイド特異的構造を欠いているものには結合しない。hA (1 - 40)、FP13、アルブミン - AGEおよびHb - AGEについてのKDは、それぞれ約2、11、8および0.5 nMである。(C-D)コーティングしたhA (1 - 40)を、一連の濃度のヒト組換え組織型プラスミノゲンアクチベーター(Actilyse^(商標)、完全長tPA)、またはRetepase^(商標)

40

50

）(K2P - tPA)の存在下で、結合緩衝液中2.5 nM FXIIと共にインキュベーションした。f.l.tPA - およびK2P - tPA濃度は、最大でtPAのhA (1-40) (50 nM)への結合についての k_D の135倍であった。(E-F) コーティングしたアミロイドアルブミン - AGEを、一連の濃度のf.l.tPAまたはK2P - tPAの存在下にて、結合緩衝液中15 nMのFXIIとインキュベーションした。tPA濃度は、最大でtPAのアルブミンAGE (1 nM)への結合についての k_D の150倍であった。(G) FXIIのhA (1-40)およびプロトタイプアミロイドヒトアミリン断片hA I A P Pへの結合を、ドットプロット分析を用いて試験した。交差 - 構造を含むペプチド、並びにネガティブコントロールペプチドm I A P Pおよびリン酸緩衝食塩水(PBS) 10 μ gを、2回ずつスポットした。FXIIは、hA (1-40)並びにh I A P Pに特異的に結合した。 10

【図13a】フィンガードメインはアミロイド(ポリ)ペプチドに結合する。(A) tPAおよびK2 - P tPAのアルブミン - g6pへの結合。(B) tPAおよびK2 - P tPAのArs (1-40)への結合。検出に用いたtPA抗体は、tPAとK2 - P - tPAを同じ親和性で認識する(図示せず)。(C) tPA - F - GSTおよびtPAの固定A (1-40)およびアルブミン - g6pへの結合。コントロールRPTP μ - GSTは、A またはアルブミン - g6pと結合しない。(D)不溶性A フィブリルおよびtPAドメインを用いるプルダウン分析。C末端GSTタグを有するtPA F、F - EGF、EGF、F - EGF - K1およびK1並びにタグのみを発現する安定にトランスフェクションした細胞系からのコンディショニングしたBHK培地を用いた。「コントロール」はプルダウン前の培地、「A」はプルダウン後の洗浄したアミロイドA ペレット、「Sup」はA で抽出後の培地。試料を、ウサギ抗 - GST抗体Z - 5を用いてウェスタンブロット法で分析した。(E-G) tPA F - EGF - GSTおよびf.l.組換えtPAのアミロイドA (E)、FP13 (F)およびIAPP (G)への結合を示すELISA。m IAPPを、非アミロイドネガティブコントロール(E)としてコーティングした。ペプチドをELISAプレートに固定し、一連の濃度のtPAおよびF - EGF - GSTで積層した。GSTは、ネガティブコントロールとして用いた。結合は、ウサギ抗 - GST抗体Z - 5を用いて検出した。 20

【図13b】フィンガードメインはアミロイド(ポリ)ペプチドに結合する。(H-M) ADに冒されたヒトの脳のアミロイド沈着物に対するtPA FEGF - GSTの結合の免疫組織化学的分析。脳切片に、tPA F - EGF - GST (H, J)またはネガティブコントロールGST (L)を積層した。同じ切片をコンゴレッドとインキュベーションして(I, K, M)、アミロイド沈着物の位置を確認した。(N-O)不溶性A フィブリルおよびフィンガードメインを用いるプルダウン分析。C末端GSTタグを有する組換えFドメインを、安定にトランスフェクションしたBHK細胞によって発現させた。「コントロール」はプルダウン前の培地、「A」はプルダウン後の洗浄したアミロイドA ペレット、「Sup」はA で抽出後の培地。試料を、ウサギ抗 - GST抗体Z - 5を用いてウェスタンブロット法で分析した。 30

【図14A】フィンガードモジュール。(A) tPA、XII因子、HGF α およびフィブロネクチンにおけるフィンガードメインの位置の図解表現。(B)それぞれのタンパク質のフィンガードメインのアミノ酸配列の整列。(C) tPAフィンガードメイン、およびFNの第四および第五のフィンガードメインペプチド主鎖を表したものの。保存されるジスルフィド結合を、ボールと棒で示す。 40

【図14B】フィンガードモジュール。(B)それぞれのタンパク質のフィンガードメインのアミノ酸配列の整列。

【図14C】フィンガードモジュール。(C) tPAフィンガードメイン、およびFNの第四および第五のフィンガードメインペプチド主鎖を表したものの。保存されるジスルフィド結合を、ボールと棒で示す。

【図15a】アミロイドペプチドに対して誘発した抗体はグリコタンパク質と交差反応し、逆もまた起こる。(A-C)固定したg6p - グリコアルブミン - AGE : 23およ 50

びHb - AGEでのELISA。それらの非グリケーションコントロール(A)、A (1 - 40) (B)、およびIAPPおよびm IAPP (C)。A ELISAについては、ポリクローナル抗 - ヒトビトロネクチン抗体 - hVn K9234を、ネガティブコントロールとして用いた。(D) - AGE1をIAPPフィブリルと予備インキュベーションした後のELISAプレート上での - AGE1の固定A (1 - 40)への結合。(E)抗 - AGE1抗体と、A (16 - 22) (レーン1 - 2)、A (1 - 40) (レーン4 - 5)およびIAPP (レーン6 - 7)のアミロイドフィブリルを用いるブルダウン分析。フィブリルをペレット化して、洗浄した後、試料を非還元性試料緩衝液中で煮沸し、SDS - PAGEによって分析した。s = アミロイド抽出後の上清、p = 抽出後のアミロイドペレット、m = 分子マーカー。(F - G) ELISA装置では、固定A (1 - 40) (F)およびIAPP (G)を、tPAおよびそれぞれ250または18 nMの - AGE1 (H)と同時にインキュベーションする。ELISA装置では、 - A (1 - 42) H - 43の固定ポジティブコントロールA (1 - 40)、およびIAPPおよびアルブミン - AGE : 23への結合を試験する。アルブミン - コントロール : 23およびm IAPPを、ネガティブコントロールとして用いる。(I)一連の濃度のtPAの存在下でELISAプレート上に固定したIAPPへの100 nM - A (1 - 42) H - 43の結合。

10

【図15b】アミロイドペプチドに対して誘発した抗体はグリコタンパク質と交差反応し、逆もまた起こる。(J - K) アルブミン - AGE : 23およびA (1 - 40) (比9 : 1) (「poab抗 - アミロイド」)に対して誘発されたマウス血清中のポリクローナル抗体およびコントロールタンパク質(「コントロール血清」)に対して誘発されたポリクローナル抗体の固定IAPP (J)およびアルブミン - AGE : 23 (K)への結合を示すELISA。血清は、0.1% v/v Tween20を有するPBS中で希釈した。(L)マウスpoab抗 - アミロイド血清のアミロイドA (1 - 40)、h IAPPおよびフィブリン断片₁₄₈₋₁₆₀FP13への結合を示すELISA。関連のないタンパク質に対して誘導された抗体を含むコントロール血清、緩衝液、および固定した非アミロイドm IAPPおよびフィブリン断片₁₄₈₋₁₅₇FP10を、ネガティブコントロールとして用いた。(M) ADに冒されたヒト脳の切片における球状のアミロイドブランク(矢印)へのウサギ抗 - AGE2の結合の免疫組織化学的分析。倍率400x。(N)同じ切片のコンゴレッド蛍光

20

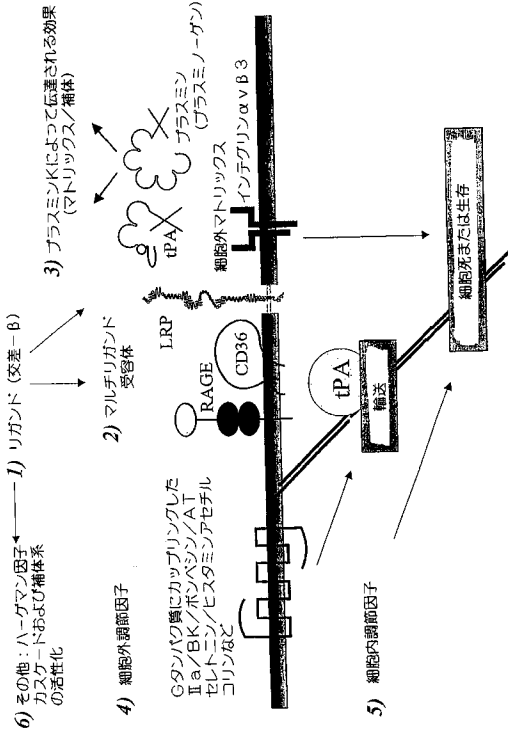
30

【図16】モノクローナル抗 - 交差 - 構造抗体3H7はグリコヘモグロビン、A、IAPPおよびFP13を検出する。マウスモノクローナル抗 - 交差 - 構造抗体3H7の(A)グリコヘモグロビン対コントロールの未グリコヘモグロビン、または(B)A、h IAPP、m IAPPおよびフィブリン断片₁₄₈₋₁₆₀FP13に対する結合を示すELISA。

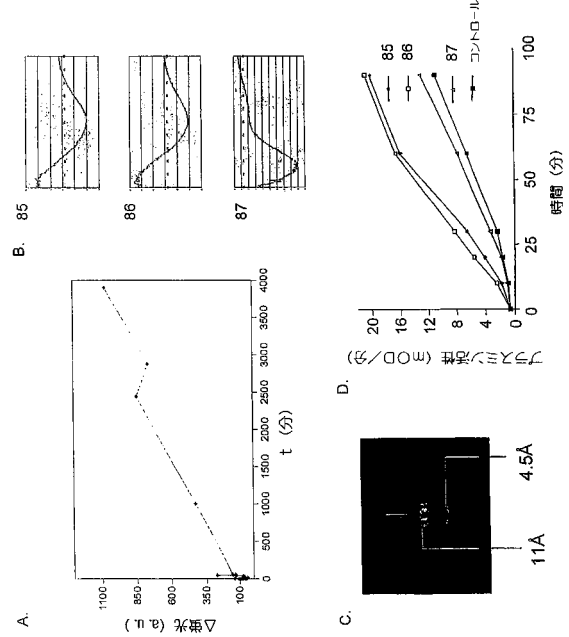
【図17】溶液中のアミロイドアルブミン - AGEまたはアミロイドヘモグロビンの検出のためのサンドイッチELISA Exiqonタンパク質イモビライザー上の固定した組換えtPAに、所定濃度のアルブミン - AGE : 23溶液またはアルブミン - コントロール : 23溶液を積層した。次に、結合したアミロイド構造を、抗 - A (1 - 42) H - 43 (A)で検出した。

40

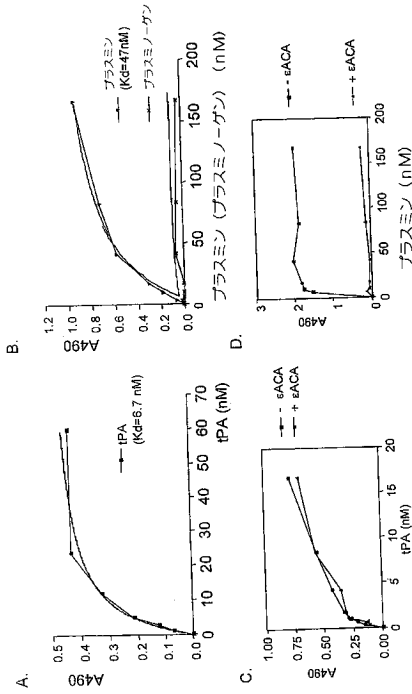
【 図 1 】



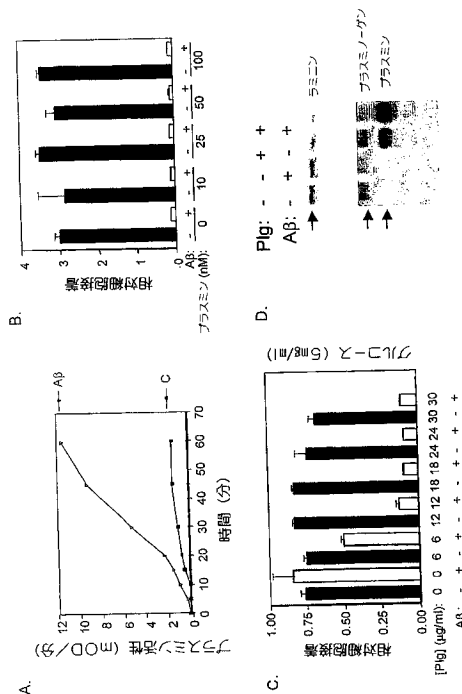
【 図 2 】



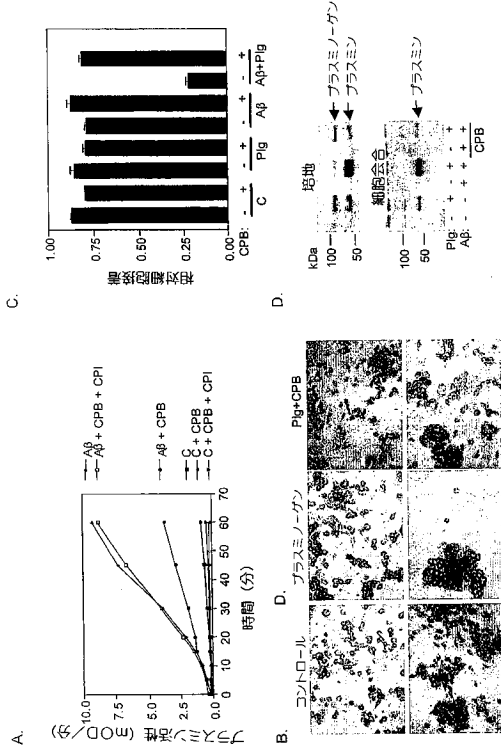
【 図 3 】



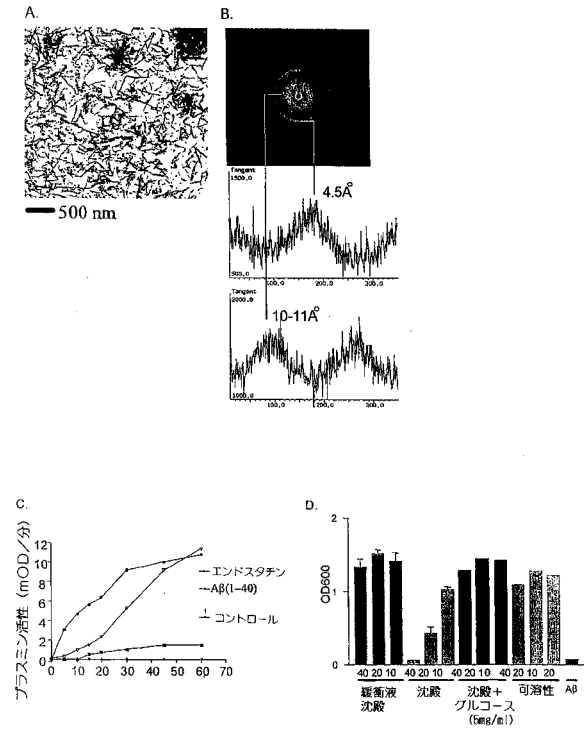
【 図 4 】



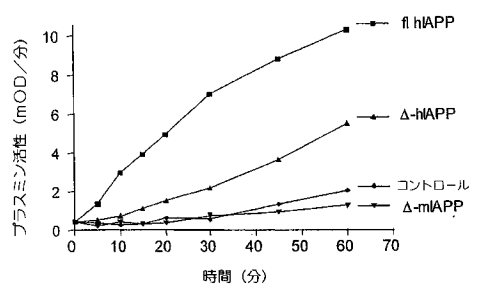
【 図 5 】



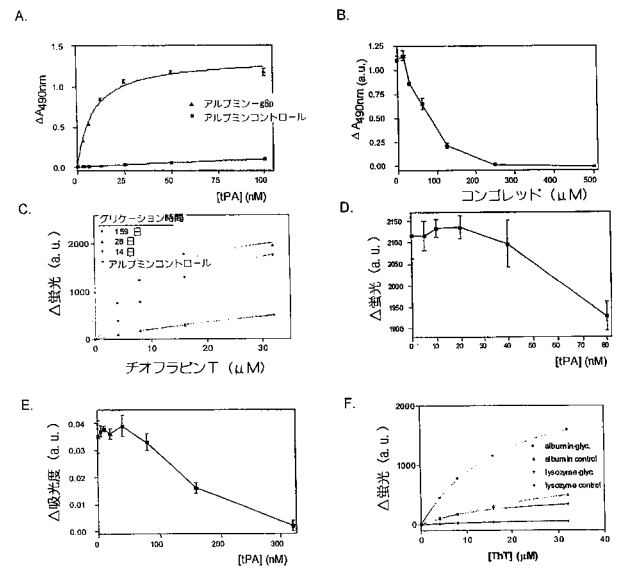
【 図 6 】



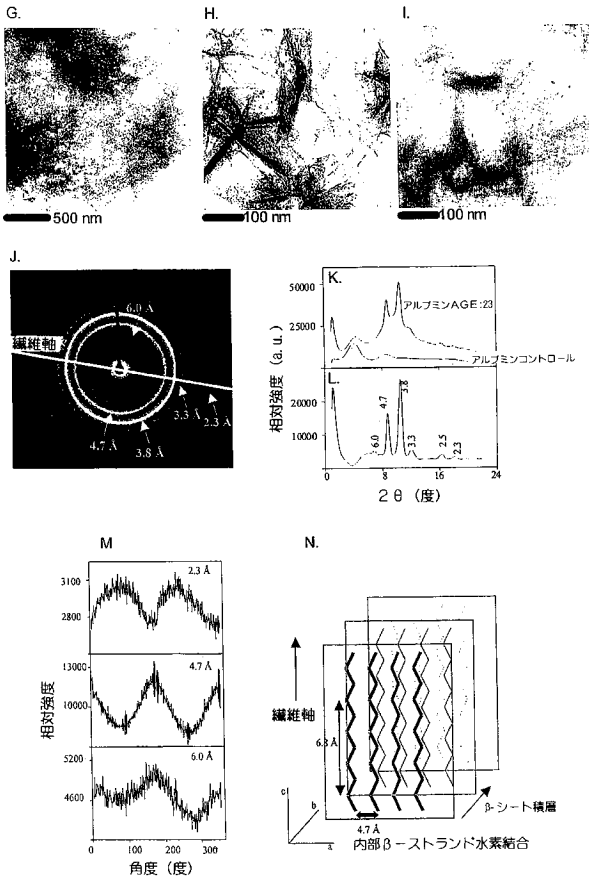
【 図 7 】



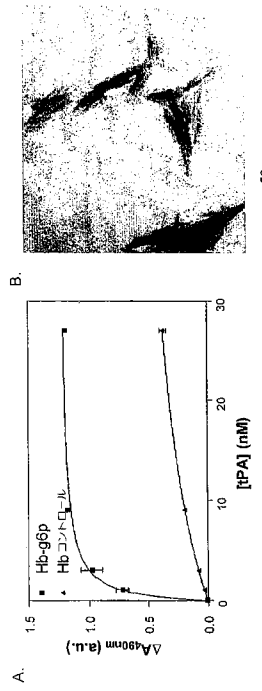
【 図 8 a 】



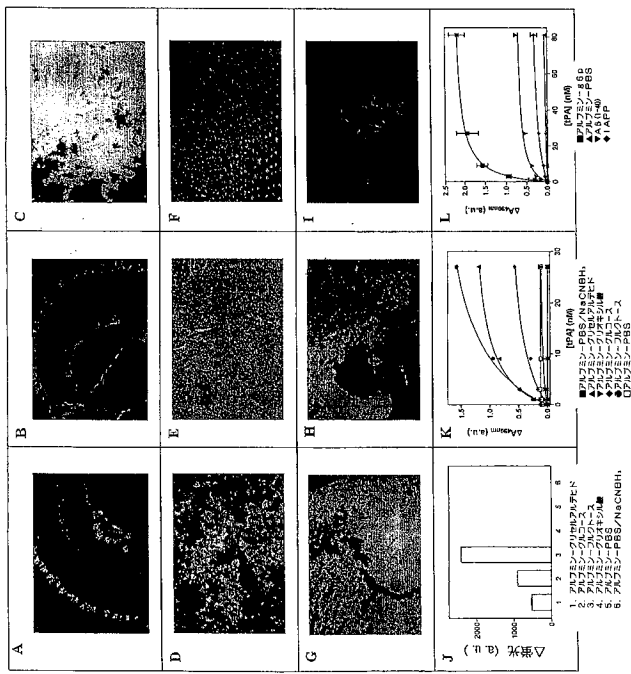
【 図 8 b 】



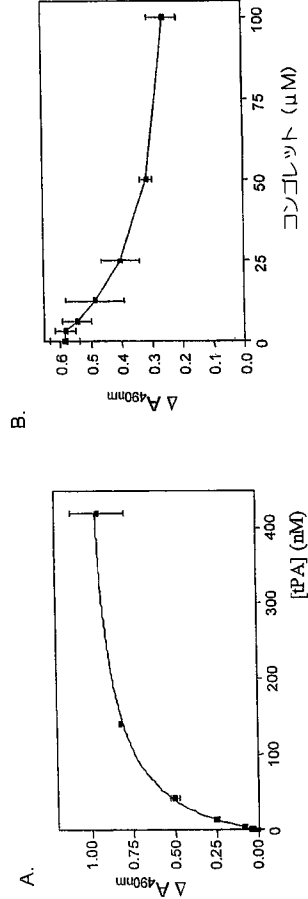
【 図 9 】



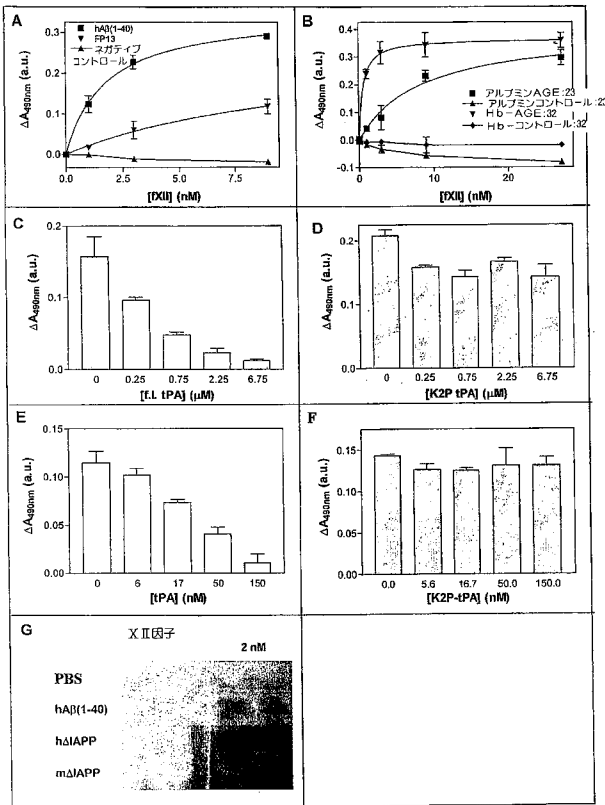
【 図 10 】



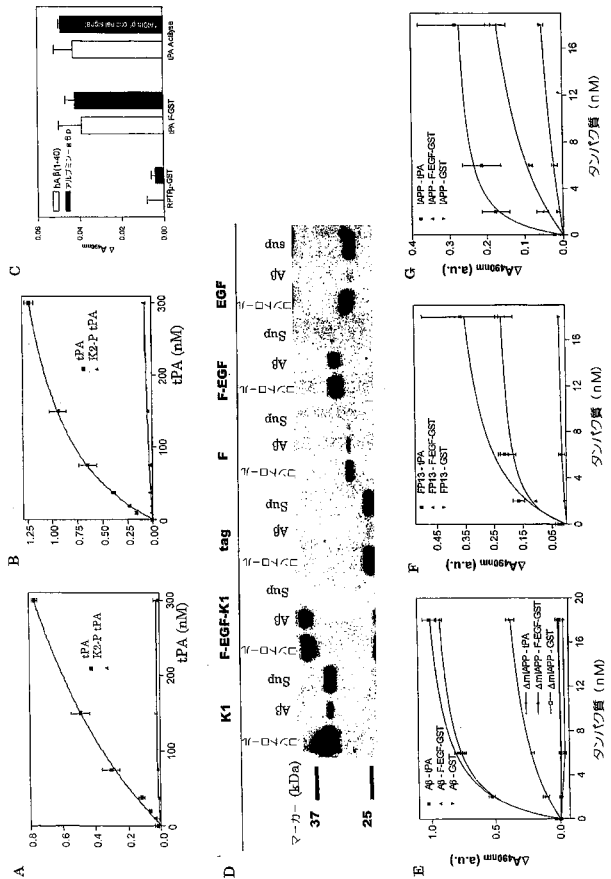
【 図 11 】



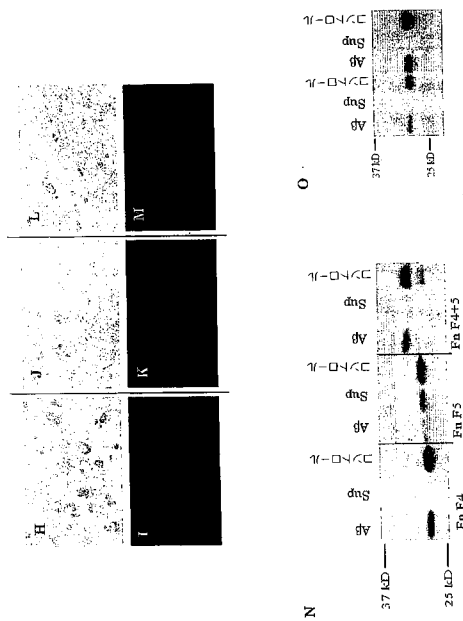
【 1 2 】



【 1 3 a 】



【 1 3 b 】



【 1 4 】

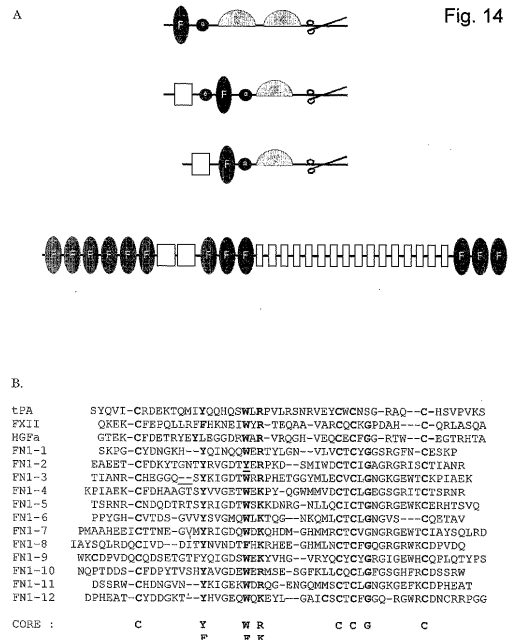


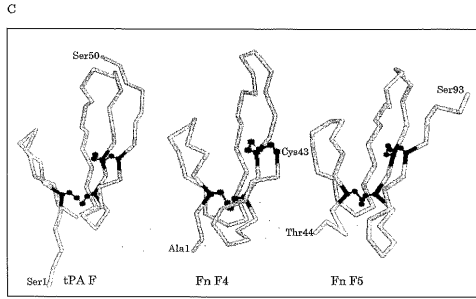
Fig. 14

【 14 B 】

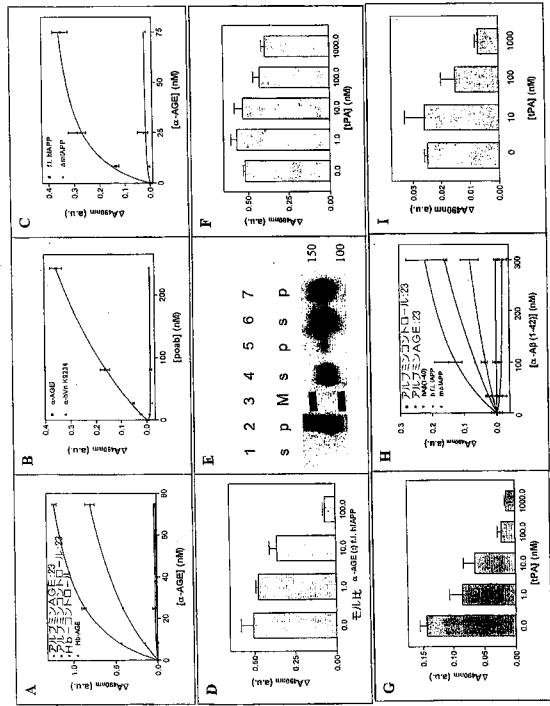
tPA S Y Q V I - C R E K T O M I Y Q Q H S W L R P V L R S N R V E Y C W C N S G - R A Q - - C - H S V P V K S
 FXII Q K E K - C F E P Q L L R F P H K N E I W Y R - T E Q A A - V A R C Q C K G P D A H - - - C - Q R L A S Q A
 HGFA G T E K - C F D E T R Y E Y L E G G D R W A R - V R Q G H - V E Q C E C F G G - R I W - - C - E G T R H T A
 FN1-1 S K P G - C Y D N G K H - - Y Q I N Q Q W E R T Y L G N - - V I V C T C Y G G S R G F N - C E S K P
 FN1-2 E A E E T - C F D R Y T G N T Y R V G D T Y E R P K D - - S M I W D C T C I G A G R G R I S C T I A N R
 FN1-3 T I A N R - C H E G G Q - - S Y K I G D T W R R P H E T G G Y M L C V C L G N G S G R I T C T P I A E K
 FN1-4 K P I A E K - C F D H A A G T S Y V G E T W E K P Y - Q G M M V D C T C L G E G S G R I T C T S R N R
 FN1-5 T S R N R - C N D Q D T R T S Y R I G D T W S K K D N R G - N L L Q C I C T G N G R G E W K C E R H T S V Q
 FN1-6 P P Y G H - C V I D S - G V V Y S V G M Q W L K T Q G - - N K Q M L C T C L G N G V S - - - C O S T A V
 FN1-7 P M A A H S E I C T T N E - G V M Y R I G D Q W D K Q H D M - G H M M R C T C V G N G R G E W T C I A Y S Q L R D
 FN1-8 I A Y S Q L R D Q C I V D - - D I T Y N V N D T F P K R H E E - G H M L N C T C F G Q G R G R W K D P V D Q
 FN1-9 W K C D P V D Q C Q D S E T G T F Y Q I G D S W E K Y V H G - - V R Y Q C Y C Y G R G I G E W H C Q P L Q T Y P S
 FN1-10 N Q P T D D S - C F D P Y T V S H Y A V G D S W E R M S E - S G F K L L C C L G P G S G H F R C D S S R W
 FN1-11 D S S R W - C H D N G V N - - Y K I G E K W D R Q G - E N G Q M M S C T C L G N G K G E F K C D P H E A T
 FN1-12 D P H E A T - C Y D D G K T I - - Y H V G E Q W O K E Y L - - G A I C S C T C F G G Q - R G W R C D N C R R P G G

コア : C Y W R C C G C
 F F K

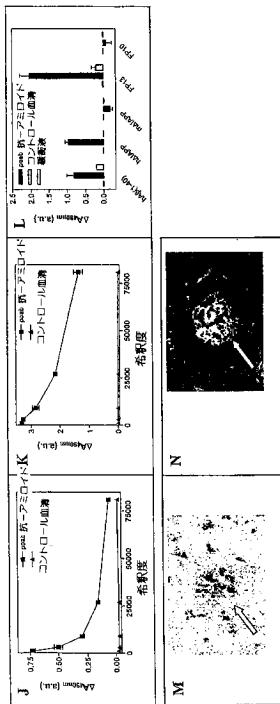
Fig. 14, contd.



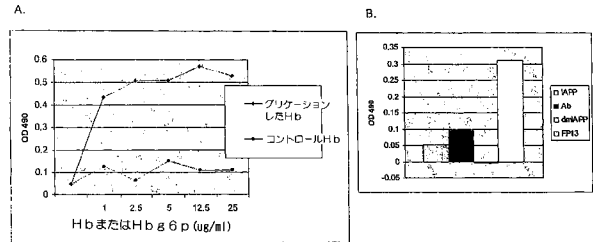
【 15 a 】



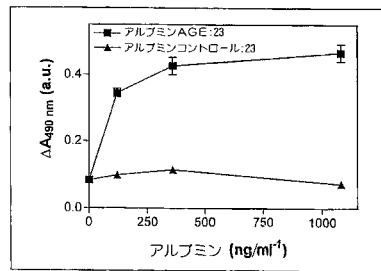
【 15 b 】



【 16 】



【 17 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | | |
|--|---|---|
| | | International Application No PCT/NL 03/00501 |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC 7 | A61K31/00 A61K31/7004 A61K31/195 A61K31/197 A61K31/198 | A61K31/198 |
| | A61K39/395 A61K38/49 G01N33/53 C12N9/72 A61P9/10 | A61P9/10 |
| | A61P3/10 A61P7/04 A61P35/00 A61P31/00 A61P37/00 | A61P37/00 |
| 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 A61K A61M | | |
| 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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, CHEM ABS Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 99/21565 A (BLASS JOHN P ; CORNELL RES FOUNDATION INC (US)) 6 May 1999 (1999-05-06) page 5, line 9 - line 30 page 7, line 16 - line 19 page 8, line 32 - page 9, line 10 page 9, line 32 - page 10, line 12 examples 1,2 claims 1,7,8,18,19,27-30,34 ----- -/-- | 1-4,26, 35 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> 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 | | "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 |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | | "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 |
| "I" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | | "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. |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | "Z" document member of the same patent family |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 3 December 2003 | | 31 03 2004 |
| 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 Cielen, E |

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/NL 03/00501

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | KOROL D L ET AL: "GLUCOSE, MEMORY, AND AGING" AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION, BETHESDA, MD, US, vol. 67, no. 6, April 1998 (1998-04), pages 764S-771S, XP000951458 ISSN: 0002-9165 abstract page 767S, column 1, paragraph 3 page 769S, column 2, paragraph 2 - page 770S, column 1, paragraph 2 | 1-4,26, 35 |
| X | US 5 624 908 A (BICHER HAIM I) 29 April 1997 (1997-04-29) abstract column 3, line 55 - column 4, line 42 examples II,IV | 1-4,26, 35 |
| X | WO 98/06418 A (MCDANIEL H REGINALD ;MANNATECH INC (US); MOORE D ERIC (US); VENNUM) 19 February 1998 (1998-02-19) abstract page 1, line 1 - line 5 page 7, line 1 - line 30 table 3 examples 2,5,8 page 22, line 4 - line 12 table 4 claim 1 | 1-4,26, 35 |
| X | BRONSVELD W ET AL: "Use of glucose-insulin-potassium (GIK) in human septic shock." CRITICAL CARE MEDICINE, (1985 JUL) 13 (7) 566-70., XP008011134 abstract page 569, column 2, paragraph 2 | 1-4,26, 35 |
| X | WASTERLAIN C G ET AL: "Status epilepticus in immature rats. Protective effects of glucose on survival and brain development." ARCHIVES OF NEUROLOGY, UNITED STATES DEC 1976, vol. 33, no. 12, December 1976 (1976-12), pages 831-837, XP008011138 ISSN: 0003-9942 abstract page 821, column 2, paragraph 1 - column 3, paragraph 2 page 825, column 1, paragraph 2 - page 826, column 1, paragraph 1 page 827, column 1, paragraph 1 page 827, column 3, paragraph 1 | 1-4,26, 35 |
| | -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International Application No PCT/NL 03/00501 |
|---|

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-------------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | J. REINBOLD, OFTERSHEIM: "Wenn der "Zucker" entgleist - Akuttherapie der diabetischen Notfälle" NOTFALLMEDIZIN, vol. 28, February 2002 (2002-02), pages 82-84, XP008011142 abstract page 83, column 2, paragraph 2 | 1-4,26, 35 |
| X | WO 91/18610 A (LJUNGQVIST OLLE MEDICAL AB) 12 December 1991 (1991-12-12) page 4, line 5 - line 11 page 5, line 24 - line 26 page 7, line 4 - line 15 claim 1 | 1-4,26, 35 |
| X | TESTA I ET AL: "The effect of different glucose endovenous administrations on amylin and insulin blood concentration in healthy subjects." BOLLETTINO - SOCIETA ITALIANA BIOLOGIA SPERIMENTALE, (1996 MAR-APR) 72 (3-4) 103-8., XP008011133 the whole document | 1-4,26, 35 |
| X | JACKSON R L ET AL: "Glucose infusions increase plasma levels of amyloid proteins in high density lipoproteins." BIOMEDICINE, (1980 DEC) 33 (8) 245., XP008011135 the whole document | 1-4,26, 35 |
| X A | WO 99/09999 A (UNIV WASHINGTON) 4 March 1999 (1999-03-04) abstract page 1, line 6 - line 10 page 2, line 5 - page 3, line 17 page 4, line 11 - line 33 page 6, line 7 - line 10 page 6, line 23 - line 28 page 7, line 3 - line 5 page 7, line 12 - line 25 page 14, line 22 - line 35 examples 3,5 page 28, line 1 - line 7 claims 1,4,14 | 1,4, 26-28,35 2-4 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International Application No PCT/NL 03/00501 |
|---|

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|---|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | YUTANI KATSUhide ET AL: "The process of amyloid-like fibril formation by methionine aminopeptidase from a hyperthermophile, Pyrococcus furiosus." BIOCHEMISTRY, vol. 39, no. 10, 14 March 2000 (2000-03-14), pages 2769-2777, XP001128143 ISSN: 0006-2960 | 1-3 |
| A | abstract | 6 |
| | page 2770, column 1, paragraph 1 page 2775, column 1, paragraph 2 page 2776, column 1, paragraph 1 - paragraph [0004] | |
| X | ----- US 6 136 548 A (ANDERSON STEPHEN) 24 October 2000 (2000-10-24) | 1,8,9, 13, 18-21, 23, 27-30, 33,35, 39,40 |
| | column 1, line 16 - line 42 column 2, line 24 - line 40 column 3, line 2 - line 13 column 3, line 57 - line 62 column 4, line 22 - column 5, line 20 column 7, line 7 - line 20 column 7, line 47 - line 52 column 8, line 47 - column 9, line 58 column 13, line 15 - column 14, line 21 column 15, line 46 - line 57 column 16, line 56 - column 17, line 16 | |
| X | ----- WO 96/39834 A (UNIV NEW YORK) 19 December 1996 (1996-12-19) page 1, line 26 - line 34 page 4, line 26 - line 35 page 5, line 8 - page 6, line 11 page 8, line 19 - line 25 page 9, line 4 - line 11 figures 3,6A-B,14A-B,19 page 15, line 17 - line 23 page 18, line 3 - line 22 page 20, line 15 - page 22, line 1 page 26, line 24 - line 28 page 27, line 18 - line 29 page 31, line 20 - line 36 claims 1,2,4,5,12,13 ----- -/-- | 1,27-29, 35 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International Application No PCT/NL 03/00501 |
|---|

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-------------------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>EP 1 130 031 A (UNI MEDISCH CT UTRECHT) 5 September 2001 (2001-09-05)</p> <p>column 1, line 5 - line 9 column 2, line 18 - line 37 column 3, line 5 - line 37 column 4, line 2 - line 21 column 4, line 39 - line 57 column 6, line 10 - column 7, line 18 column 7, line 49 - line 53 claims 1,2,4,5,9-11,14</p> <p>-----</p> | <p>1,8-10, 27-30, 33,35</p> |
| X | <p>WO 01/012598 A (SCHMIDT ANN MARIE ;STERN DAVID (US); UNIV COLUMBIA (US); YAN SHI D) 22 February 2001 (2001-02-22) abstract page 1, line 32 - page 2, line 5 page 2, line 27 - page 3, line 2 page 3, line 29 - page 4, line 15 page 6, line 1 - page 7, line 5 page 26, line 15 - line 30 page 34, line 11 - line 14 page 37, line 6 - line 18 page 39, line 30 - page 41, line 25 page 55, line 5 - line 12 page 68, line 1 - line 22 page 76, line 12 - line 30 page 91, line 26 - page 93, line 19 page 106, line 20 - line 21 page 108, line 11 - line 29 page 110, line 30 - page 111, line 2 claims 1-4,6,15,17,22,23,27,31,32</p> <p>-----</p> | <p>1,25,27, 28,35</p> |
| X | <p>WO 94/01116 A (US HEALTH) 20 January 1994 (1994-01-20) abstract page 1, line 3 - line 15 page 2, line 16 - line 28 page 3, line 11 - page 4, line 27 page 5, line 16 - page 6, line 7 table 1 page 13, line 1 - page 14, line 3 claims 1-4,12,13,15</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | <p>1,6,7, 27,28,35</p> |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/NL 03/00501

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|--------------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X A | WO 01/050134 A (AMERICAN CYANAMID CO) 12 July 2001 (2001-07-12) abstract page 1, line 6 - page 4, line 6 page 5, line 9 - line 11 page 7, line 29 - line 31 page 11, line 15 - line 21 page 12, line 31 - page 13, line 14 page 14, line 14 - page 17, line 25 page 25, line 19 - page 26, line 24 page 31, line 11 - line 12 page 35, line 9 - line 25 claims 1-4,11,13,14,16-18,25 ----- | 1,6,7, 27,28,35 44 |
| X | WO 00/68263 A (NEUROCHEM INC ;GUPTA AJAY (CA); CHALIFOUR ROBERT (CA); GERVAIS FRA) 16 November 2000 (2000-11-16) page 1, line 6 - page 2, line 28 page 4, line 1 - line 19 page 7, line 4 - line 27 page 8, line 13 - line 31 page 9, line 22 - line 25 page 10, line 12 - line 16 page 14, line 8 - line 10 page 17, line 11 - page 18, line 4 claims 1,18,22,29,34,35 ----- | 1,27-29, 35 |
| X A | US 5 780 615 A (CERAMI ANTHONY ET AL) 14 July 1998 (1998-07-14) column 17, line 49 - column 18, line 37 claims 1,10 ----- | 1,27,28, 35 44 |
| X | US 6 001 331 A (HAYS SHERYL J ET AL) 14 December 1999 (1999-12-14) column 1, line 6 - column 2, line 10 column 5, line 4 - line 21 column 13, line 7 - line 30 column 14, line 7 - line 22 column 15, line 5 - line 38 ----- -/-- | 1,27,28, 35 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International Application No PCT/NL 03/00501 |
|---|

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|---------------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>WO 00/59493 A (KHALIFAH RAJA ;HUDSON BILLY (US); KANSAS UNIVERSITY MEDICAL CENT ()) 12 October 2000 (2000-10-12) page 1, line 14 - line 32 page 3, line 31 - page 4, line 12 page 5, line 5 - page 6, line 7 page 11, line 12 - page 12, line 25 page 14, line 7 - line 15 page 19, line 5 - line 9 page 27, line 21 - line 24 page 31, line 10 - line 14 page 38, line 6 - line 17 page 45, line 5 - line 7 example 7 page 56, line 7 - line 26 claims 8,12</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | 1,6,7, 27,28, 35,44 |
| X | <p>WO 97/46547 A (TEXAS A & M UNIVERSITY SYST) 11 December 1997 (1997-12-11) page 1, line 4 - line 16</p> <p>page 4, line 8 - line 16 page 8, line 8 - line 16 page 18, line 1 - line 28 page 20, line 8 - line 22 page 25, line 8 - line 25 page 30, line 1 - page 33, line 7 claims 20,33,34,37-40</p> <p style="text-align: center;">-----</p> | 1,27,29, 32,35 |
| X | <p>PEPYS M B: "Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis." PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON B BIOLOGICAL, vol. 356, no. 1406, 2001, pages 203-211, XP008011132 28 February, 2001 ISSN: 0962-8436 abstract page 203, column 2, paragraph 1 page 206, column 1, paragraph 2 page 207, column 2, paragraph 3 page 208, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 1,27,28, 35 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/NL 03/00501

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>CHAUHAN VED P S ET AL: "Metal cations defibrillize the amyloid beta-protein fibrils." NEUROCHEMICAL RESEARCH, vol. 22, no. 7, 1997, pages 805-809, XP008011139 ISSN: 0364-3190 abstract page 806, column 1, paragraph 2 page 808, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 2 -----</p> | 1,4,27, 28,35 |
| X | <p>CARDOSO I ET AL: "Aprotinin binding to amyloid fibrils." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY / FEBS. GERMANY APR 2000, vol. 267, no. 8, April 2000 (2000-04), pages 2307-2311, XP001128718 ISSN: 0014-2956 abstract page 2307, column 2, paragraph 2 page 2310, column 1, paragraphs 2,4 page 2310, column 2, paragraph 2 -----</p> | 1 |
| X | <p>MAGGIO JOHN E ET AL: "Brain amyloid: A physicochemical perspective." BRAIN PATHOLOGY, vol. 6, no. 2, 1996, pages 147-162, XP008011141 ISSN: 1015-6305 abstract page 148, column 2, paragraph 1 figure 1 page 159, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 1 -----</p> | 1,27,28, 35 |
| X | <p>EP 0 234 051 A (STICHTING CENTRAAL LAB) 2 September 1987 (1987-09-02) column 1, line 1 - line 10 column 7, line 48 - line 51 column 8, line 7 - line 10 column 9, line 8 - line 24 claim 1 ----- -/--</p> | 1,39,40 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International Application No PCT/NL 03/00501 |
|---|

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|--------------------------------|
| Category ^o | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>WO 01/058476 A (EUROP MOLECULAR BIOLOGY LAB ;DOTTI CARLOS G (DE); LEDESMA MARIA D) 16 August 2001 (2001-08-16) page 1, line 4 - line 33 page 4, line 6 - line 20 page 5, line 10 - line 17 page 7, line 16 - page 8, line 26 page 10, line 3 - line 22 page 11, line 5 - line 9 page 23, line 6 - line 7 page 27, line 26 - page 28, line 8 page 37, line 23 - page 38, line 10 claims 1,2,7,20,22,30,34,36,43,44,49</p> | 1,20-22, 27-30, 33,35 |
| X | <p>WO 91/19488 A (RATH MATTHIAS W ;PAULING LINUS C (US)) 26 December 1991 (1991-12-26) page 1, line 5 - line 9 page 3, line 33 - page 4, line 7 page 6, line 13 - page 8, line 19 page 15, line 28 - page 17, line 11 claims 14-16,19,20</p> | 1,13,16, 17,27, 28,35,44 |
| X | <p>WO 01/007474 A (STOTT KELVIN) 1 February 2001 (2001-02-01) page 1, line 4 - page 4, line 10 page 7, line 6 - line 22 page 8, line 11 - line 24 page 10, line 14 - line 20 page 11, line 11 - line 34 page 13, line 1 - line 5 page 14, line 27 - line 32 page 15, line 13 - line 17 page 29, line 11 - line 24 page 34, line 11 - page 35, line 7 page 36, line 4 - line 27 page 42, line 1 - line 26 page 43, line 23 - line 29 page 45, line 13 - line 16 claims 1,23,24</p> | 1,6,7, 27-29, 35,44 |
| X | <p>EP 1 179 588 A (MATSUMOTO AKIRA) 13 February 2002 (2002-02-13) page 3, line 2 - line 21 page 4, line 1 - line 15 page 5, line 37 - line 42 page 7, line 57 - line 58 page 8, line 19 - line 23 page 9, line 45 - line 48 page 19, line 45 - line 54 claims 2,18-20</p> | 1,13-15, 27,28,35 |
| | ----- -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International Application No PCT/NL 03/00501 |
|---|

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|---------------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 6 399 314 B1 (KRISHNAMURTHY GIRIJA) 4 June 2002 (2002-06-04) column 1, line 5 - line 55 column 2, line 49 - line 67 column 3, line 42 - line 53 column 8, line 11 - column 9, line 48 column 19, line 50 - line 54 column 22, line 4 - line 21 ----- | 1,6,7, 27,28,35 |
| X | US 6 037 458 A (TANI NOBUTAKA ET AL) 14 March 2000 (2000-03-14) column 1, line 1 - column 2, line 67 column 4, line 1 - line 19 column 5, line 44 - line 59 column 11, line 45 - line 55 claims 1-3 ----- | 1,6,7,44 |
| X | EP 0 319 144 A (ASAHI CHEMICAL IND ;ASAHI MEDICAL CO (JP)) 7 June 1989 (1989-06-07) page 2, line 5 - line 10 page 2, line 38 - line 50 page 4, line 54 - line 58 page 9, line 4 - line 8 claim 1 ----- | 1,6,7, 27,28, 35,44 |
| X | DE 197 35 902 A (IMTEC IMMUNDIAGNOSTIKA GMBH) 25 February 1999 (1999-02-25) the whole document ----- | 1,28,44 |
| X | US 5 958 883 A (SNOW ALAN D) 28 September 1999 (1999-09-28) column 1, line 10 - line 20 column 5, line 61 - line 66 column 15, line 60 - column 16, line 10 column 57, line 45 - column 58, line 39 column 59, line 5 - line 50 claims ----- | 1,27-29, 31,35 |
| X | EP 0 494 848 A (KABI PHARMACIA AB) 15 July 1992 (1992-07-15) page 3, line 6 - line 30 page 5, line 31 - page 6, line 17 claims 1,8,10,11 ----- | 1,13,16, 44 |
| | ----- -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/NL 03/00501

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|------------------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>US 6 410 598 B1 (CERAMI ANTHONY ET AL) 25 June 2002 (2002-06-25)</p> <p>column 1, line 25 - line 29 column 5, line 55 - column 7, line 50 column 9, line 36 - line 59 column 11, line 56 - column 12, line 9 column 13, line 14 - line 19 column 14, line 20 - line 28 column 17, line 45 - line 56 column 18, line 30 - line 44 claim 1</p> | 1,6,7, 13,16, 27,28,35 |
| X | <p>WO 99/02545 A (NOVOPHARM BIOTECH INC ;DAN MICHAEL D (CA)) 21 January 1999 (1999-01-21) page 1, line 6 - line 14 page 43, line 6 - line 11 page 44, line 27 - line 31</p> | 1,28,29, 32,35,42 |
| X | <p>WO 01/062284 A (NIELSEN KLAUS GREGORIUS ;BIRK PETER (DK); JENSEN MARTIN ROLAND (DK) 30 August 2001 (2001-08-30) page 1, line 3 - page 3, line 13 page 16, line 5 - line 21 page 21, line 18 - line 28 page 75, line 13 - page 76, line 4 claim 1</p> | 1,21,23, 27,28,35 |
| X | <p>WO 02/16333 A (MATHIS CHESTER A JR ;KLUNK WILLIAM E (US); UNIV PITTSBURGH (US); W) 28 February 2002 (2002-02-28) page 1, line 5 - line 10 page 3, line 4 - line 6 page 6, line 8 - line 17 page 20, line 13 - page 21, line 14 page 26, line 16 - line 23 page 39, line 24 - page 40, line 6 page 47, line 5 - line 19 page 48, line 12 - line 18</p> | 1,18,27, 28,35 |
| X | <p>SOTO C ET AL: "BETA-SHEET BREAKER PEPTIDES INHIBIT FIBRILLOGENESIS IN A RAT BRAIN MODEL OF AMYLOIDOSIS: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S THERAPY" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 4, no. 7, 1998, pages 822-826, XP000914747 ISSN: 1078-8956 abstract page 823, column 2, paragraph 3 page 824, column 2, paragraph 1</p> | 1,6,7, 27,28,35 |
| | ----- -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International Application No PCT/NL 03/00501 |
|---|

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|---|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | SUNDE M ET AL: "Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 273, no. 3, 31 October 1997 (1997-10-31), pages 729-739, XP004453904 ISSN: 0022-2836 abstract page 729, column 1, paragraph 1 - page 731, column 1, paragraph 1 table 1 figure 3 page 736, column 1, paragraph 1 - page 737, column 1, paragraph 1 ----- | 1 |
| P,X | WO 03/006893 A (RYDEL RUSSELL ;ELAN PHARM INC (US); WRIGHT SARAH (US); PRENNER IRE) 23 January 2003 (2003-01-23) paragraph [0012] - paragraph [0013] paragraph [0016] - paragraph [0030] paragraph [0054] paragraph [0135] - paragraph [0140] paragraph [0163] - paragraph [0170] paragraph [0180] - paragraph [0181] paragraph [0190] paragraph [0240] ----- | 1,20-22, 25,27, 28,35 |
| P,X | KRANENBURG ONNO ET AL: "Tissue-type plasminogen activator is a multiligand cross-beta structure receptor." CURRENT BIOLOGY, vol. 12, no. 21, 29 October 2002 (2002-10-29), pages 1833-1839, XP001172448 ISSN: 0960-9822 (ISSN print) cited in the application the whole document ----- | 1,8-10, 13, 18-24, 27-31, 33-35 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NL 03/00501**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-35 and 40-44 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-35, 39, 40-44

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/NL 03/00501

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: -

1. Claims 1-35 and 41-44 relate to the modulation (increasing/decreasing) of extracellular protein degradation and/or protein clearance (claims 1-25), diminishing plaques involved in a conformational disease, removal of cross-beta structures (claims 26-34), inhibiting cross-beta structure mediated effects (claim 41), locally increasing cytotoxicity and proteolysis comprising locally increasing cross-beta structure mediated effects (claims 42-43). Such pharmacological effects cannot in itself be considered therapeutic applications.

The discovery on which the invention is based, even if representing an important piece of scientific knowledge, still needs to find practical application in the form of a defined, real treatment of any pathological condition in order to make a technical contribution to the art and be considered an invention eligible for patent protection.

The use of the above-mentioned definitions in the present context is considered to lead to a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT. It is not fully possible to determine the diseases for which protection might legitimately be sought. The lack of clarity is such as to render a meaningful complete search impossible. The only diseases which appear to be clear with respect to invention I are the diseases specifically mentioned in claims 35, 38 and 40 and the use in dialysis (claim 44).

However, the use of the expressions "an amyloidosis type disease" and "other neuronal diseases" in claim 35 in the present context is considered to lead to a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT. It is not fully possible to determine the diseases for which protection might legitimately be sought. The lack of clarity is such as to render a meaningful complete search impossible.

2. Claims 1, 2, 5, 6, 8, 18, 25 and 42 do not define the means with which the intended result should be achieved. The skilled artisan consequently would not know how to achieve such result. Therefore, these claims have only partially been searched.

3. (a) Claims 3, 7, 9-14, 19-20, 24-28, 30-31, 33-35, 39-41 encompass a genus of compounds defined by their function wherein the relationship between the structural features of the members of the genus and said function have not been defined. In the absence of such a relationship either disclosed in the as-filed application or which would have been recognised based upon information readily available to one skilled in the art, the skilled artisan would not know how to make and use compounds that lack structural definition. The fact that one could have assayed a compound of interest does not overcome this defect since one

International Application No. PCT/ISA/ 210

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

would have no knowledge beforehand as to whether or not any given compound (other than those that might be particularly disclosed in an application) would fall within the scope of what is claimed. It would require undue experimentation (be an undue burden) to randomly screen undefined compounds for the claimed activity.

(b) The definition of the compounds in claims 14, 21-23 and 29-32 is insufficient for a structural identification.

(c) The only compounds which appear to be clear, supported and disclosed with respect to invention I are the following ones:

for claims 2-4 and 26: glucose, urea and Zn²⁺ (description, p. 8, par. 2); for claims 6-7: Congo Red, heparin, amino-guanidine and laminin (p. 8, par. 4 - p. 9, par. 1); for claim 13: neuroserpin, PAOI-1 or tPA-Pevablock (p. 10, par. 3), as well as the compounds of claims 16 and 17; for claims 14-15: carboxypeptidase B, TAFI (= CpU or CpR) (p. 9, par. 3 - p. 10, par. 1); for claim 18: Congo Red and Thioflavin (p. 12, line 1); for claims 19-22: fibronectin, Hageman factor (=FXII), HGfA, tPA (p. 12, lines 10-11); for claims 27-31: tPA or finger domains of tPA, HGfA, FXII and fibronectin (p. 13, par. 3; p. 14, par. 2; p. 15, par. 2); for claim 32: 4B5 or 3H7 (p. 14, par. 2); for claim 39-40: a recombinant tPA

(d) Of these compounds, only the ones of claims 4 (see claim 26), 27-32 and 9-12 (see claim 33) appear to be associated with the diseases mentioned in claim 35, which refers to claims 26-34. No specific compounds appear to be associated with claim 34. The compounds of claims 2-4, 6-7, 13-22 and 40 are associated with dialysis (see claim 44).

Consequently, the search for the first invention has been restricted to the use of glucose, urea, Zn²⁺, tPA or finger domains of tPA, HGfA, FXII and fibronectin or 4B5 or 3H7 in relation to the treatment of the diseases specified in claim 35, namely atherosclerosis, diabetes, bleeding, thrombosis, cancer, sepsis, Multiple Sclerosis, diseases associated with loss of memory, Parkinson's disease and epilepsy; the use of a recombinant tPA for the treatment of thrombolysis; the use of the compounds of claims 1-25 and 40-43 (as mentioned above) in dialysis.

The applicant's attention is drawn to the fact that 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. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/NL 03/00501

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-35, 39, 40-44

A method for modulating extracellular protein degradation and/or protein clearance and its use in therapy and/or dialysis.

1.1. claims: 1 (partially), 2-5 (entirely), 26 (entirely), 35 (partially), 44 (partially)

A method for modulating, which is increasing, extracellular protein degradation and/or protein clearance and its use in therapy or dialysis, comprising providing a compound capable of increasing cross-beta structure formation or a compound which is capable of stabilising cross-beta structure of said protein present in the circulation.

1.2. claims: 1 (partially), 8 (partially), 9-12 (entirely), 27-34 (entirely), 35 (partially), 39-40 (entirely), 42-43 (entirely), 44 (partially)

A method for modulating, which is increasing, extracellular protein degradation and/or protein clearance and its use in therapy or dialysis, comprising providing a compound capable of increasing tPA-like activity or a compound capable of binding to a cross-beta structure or a compound capable of increasing or stabilising an interaction of a compound comprising a cross-beta structure and a compound comprising tPA-like activity.

1.3. claims: 1 (partially), 24 (entirely), 44 (partially)

A method for modulating extracellular protein degradation and/or protein clearance and its use in dialysis, comprising modulating an interaction of a compound comprising tPA-like activity and the substrate of said activity.

1.4. claims: 1 (partially), 25 (entirely), 44 (partially)

A method for modulating extracellular protein degradation and/or protein clearance and its use in dialysis, comprising modulating the activity of a receptor for cross-beta forming proteins.

1.5. claims: 1 (partially), 6-7 (entirely), 44 (partially)

A method for modulating, which is decreasing, extracellular protein degradation and/or protein clearance and its use in dialysis, comprising providing a compound capable of decreasing cross-beta structure formation of said protein present in the circulation.

International Application No. PCT/ML 03 00501

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1.6. claims: 1 (partially), 8 (partially), 13-17 (entirely), 41 (entirely), 44 (partially)

A method for modulating, which is decreasing, extracellular protein degradation and/or protein clearance and its use in dialysis, comprising providing a compound capable of decreasing tPA-like activity.

1.7. claims: 1 (partially), 18-23 (entirely), 44 (partially)

A method for modulating, which is decreasing, extracellular protein degradation and/or protein clearance and its use in dialysis, comprising providing a compound capable of decreasing an interaction of a compound comprising a cross-beta structure and a compound comprising tPA-like activity.

2. claims: 36-38, 48-52

Use of a compound capable of recognising a cross-beta structure epitope or of a cross-beta structure binding domain or of a compound capable of binding cross-beta structures for the detection of cross-beta structures and diseases associated therewith.

3. claims: 45-47

A separation device for carrying out a method according to any of the claims 1-25 or 40-44.

4. claims: 53-55

A diagnostic device for carrying out a method according to any of the claims 48-52.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/NL 03/00501

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 9921565 | A | 06-05-1999 | AU 760140 B2 | 08-05-2003 |
| | | | AU 9213998 A | 17-05-1999 |
| | | | CA 2306875 A1 | 06-05-1999 |
| | | | EP 1032403 A1 | 06-09-2000 |
| | | | JP 2001521002 T | 06-11-2001 |
| | | | WO 9921565 A1 | 06-05-1999 |
| | | | US 2003176365 A1 | 18-09-2003 |
| | | | US 6537969 B1 | 25-03-2003 |
| | | | US 5624908 | A |
| AU 6959694 A | 03-01-1995 | | | |
| CZ 9503248 A3 | 17-07-1996 | | | |
| EP 0707480 A1 | 24-04-1996 | | | |
| JP 9501411 T | 10-02-1997 | | | |
| WO 9428909 A1 | 22-12-1994 | | | |
| WO 9806418 | A | 19-02-1998 | AT 218065 T | 15-06-2002 |
| | | | AU 734183 B2 | 07-06-2001 |
| | | | AU 3819997 A | 06-03-1998 |
| | | | BR 9711054 A | 11-01-2000 |
| | | | CA 2262972 A1 | 19-02-1998 |
| | | | CN 1227495 A | 01-09-1999 |
| | | | DE 69712896 D1 | 04-07-2002 |
| | | | DE 69712896 T2 | 28-11-2002 |
| | | | EP 1172041 A2 | 16-01-2002 |
| | | | EP 0923382 A1 | 23-06-1999 |
| | | | ES 2175442 T3 | 16-11-2002 |
| | | | HK 1020531 A1 | 18-10-2002 |
| | | | JP 2002511051 T | 09-04-2002 |
| | | | KR 2000029878 A | 25-05-2000 |
| | | | NO 990572 A | 08-04-1999 |
| | | | NZ 334021 A | 26-01-2001 |
| | | | PL 331541 A1 | 19-07-1999 |
| | | | SK 16399 A3 | 12-09-2000 |
| | | | TR 9900278 T2 | 21-04-1999 |
| | | | WO 9806418 A1 | 19-02-1998 |
| US 2003072770 A1 | 17-04-2003 | | | |
| ZA 9707102 A | 19-02-1998 | | | |
| HU 9904491 A2 | 28-04-2000 | | | |
| WO 9118610 | A | 12-12-1991 | SE 502414 C2 | 16-10-1995 |
| | | | AU 7957991 A | 31-12-1991 |
| | | | SE 9001906 A | 29-11-1991 |
| | | | WO 9118610 A1 | 12-12-1991 |
| WO 9909999 | A | 04-03-1999 | AT 241365 T | 15-06-2003 |
| | | | AU 9125798 A | 16-03-1999 |
| | | | CA 2301725 A1 | 04-03-1999 |
| | | | DE 69815122 D1 | 03-07-2003 |
| | | | DE 69815122 T2 | 24-12-2003 |
| | | | DK 1014996 T3 | 29-09-2003 |
| | | | EP 1014996 A1 | 05-07-2000 |
| | | | JP 2001513569 T | 04-09-2001 |
| | | | WO 9909999 A1 | 04-03-1999 |
| | | | US 6037327 A | 14-03-2000 |
| US 6136548 | A | 24-10-2000 | US 5589154 A | 31-12-1996 |
| | | | US 6471960 B1 | 29-10-2002 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/NL 03/00501

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| US 6136548 A | | AU 4239196 A | 17-06-1996 |
| | | EP 0792156 A1 | 03-09-1997 |
| | | JP 10509457 T | 14-09-1998 |
| | | WO 9615799 A1 | 30-05-1996 |
| WO 9639834 A | 19-12-1996 | US 5948763 A | 07-09-1999 |
| | | AU 715662 B2 | 10-02-2000 |
| | | AU 6112996 A | 30-12-1996 |
| | | CA 2222690 A1 | 19-12-1996 |
| | | EP 0843516 A1 | 27-05-1998 |
| | | JP 2001519753 T | 23-10-2001 |
| | | WO 9639834 A1 | 19-12-1996 |
| | | US 2003087407 A1 | 08-05-2003 |
| | | US 6462171 B1 | 08-10-2002 |
| | | EP 1130031 A | 05-09-2001 |
| AU 4126201 A | 03-09-2001 | | |
| CA 2400823 A1 | 30-08-2001 | | |
| EP 1257582 A2 | 20-11-2002 | | |
| WO 0162799 A2 | 30-08-2001 | | |
| US 2003050245 A1 | 13-03-2003 | | |
| WO 0112598 A | 22-02-2001 | AU 6766800 A | 13-03-2001 |
| | | CA 2382095 A1 | 22-02-2001 |
| | | EP 1307219 A2 | 07-05-2003 |
| | | JP 2003507013 T | 25-02-2003 |
| | | WO 0112598 A2 | 22-02-2001 |
| WO 9401116 A | 20-01-1994 | US 5276059 A | 04-01-1994 |
| | | AU 4678193 A | 31-01-1994 |
| | | WO 9401116 A1 | 20-01-1994 |
| WO 0150134 A | 12-07-2001 | US 6399314 B1 | 04-06-2002 |
| | | AU 1810301 A | 16-07-2001 |
| | | BR 0016883 A | 01-10-2002 |
| | | CA 2395789 A1 | 12-07-2001 |
| | | CN 1415074 T | 30-04-2003 |
| | | EP 1242822 A2 | 25-09-2002 |
| | | JP 2003519383 T | 17-06-2003 |
| | | NO 20023163 A | 27-08-2002 |
| | | WO 0150134 A2 | 12-07-2001 |
| | | WO 0068263 A | 16-11-2000 |
| WO 0068263 A2 | 16-11-2000 | | |
| CA 2388092 A1 | 16-11-2000 | | |
| EP 1173480 A2 | 23-01-2002 | | |
| JP 2003503312 T | 28-01-2003 | | |
| US 5780615 A | 14-07-1998 | US 5869534 A | 09-02-1999 |
| | | AU 712004 B2 | 28-10-1999 |
| | | AU 3751397 A | 04-12-1997 |
| | | AU 684258 B2 | 11-12-1997 |
| | | AU 5726294 A | 26-09-1994 |
| | | CA 2157865 A1 | 15-09-1994 |
| | | EP 0688209 A1 | 27-12-1995 |
| | | JP 8507516 T | 13-08-1996 |
| | | WO 9420083 A1 | 15-09-1994 |
| | | US 5700447 A | 23-12-1997 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/NL 03/00501

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|----|------------------|---|--|
| US 5780615 | A | | US 5801200 A US 5733933 A US 5733524 A | 01-09-1998 31-03-1998 31-03-1998 |
| US 6001331 | A | 14-12-1999 | AU 1529297 A WO 9726919 A2 ZA 9700571 A | 20-08-1997 31-07-1997 30-07-1997 |
| WO 0059493 | A | 12-10-2000 | AU 4078300 A CA 2360311 A1 EP 1165079 A2 WO 0059493 A2 US 2003017995 A1 US 6436969 B1 | 23-10-2000 12-10-2000 02-01-2002 12-10-2000 23-01-2003 20-08-2002 |
| WO 9746547 | A | 11-12-1997 | US 6034211 A AU 3295497 A WO 9746547 A1 | 07-03-2000 05-01-1998 11-12-1997 |
| EP 0234051 | A | 02-09-1987 | EP 0234051 A1 AT 70301 T DE 3682891 D1 JP 62192323 A | 02-09-1987 15-12-1991 23-01-1992 22-08-1987 |
| WO 0158476 | A | 16-08-2001 | AU 3173301 A WO 0158476 A2 | 20-08-2001 16-08-2001 |
| WO 9119488 | A | 26-12-1991 | US 5230996 A US 5278189 A AU 8416391 A DE 69109676 D1 DE 69109676 T2 EP 0532706 A1 WO 9119488 A1 US 5650418 A | 27-07-1993 11-01-1994 07-01-1992 14-06-1995 08-02-1996 24-03-1993 26-12-1991 22-07-1997 |
| WO 0107474 | A | 01-02-2001 | AU 767396 B2 AU 6300400 A CA 2379241 A1 EP 1204679 A1 WO 0107474 A1 JP 2003505470 T NZ 516442 A | 06-11-2003 13-02-2001 01-02-2001 15-05-2002 01-02-2001 12-02-2003 31-10-2003 |
| EP 1179588 | A | 13-02-2002 | AU 4316600 A EP 1179588 A1 WO 0066717 A1 | 17-11-2000 13-02-2002 09-11-2000 |
| US 6399314 | B1 | 04-06-2002 | AU 1810301 A BR 0016883 A CA 2395789 A1 CN 1415074 T EP 1242822 A2 JP 2003519383 T NO 20023163 A WO 0150134 A2 | 16-07-2001 01-10-2002 12-07-2001 30-04-2003 25-09-2002 17-06-2003 27-08-2002 12-07-2001 |
| US 6037458 | A | 14-03-2000 | JP 1135532 A | 29-05-1989 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/NL 03/00501

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date | |
|--|------------------|-------------------------|------------------|------------|
| US 6037458 | A | JP 1135533 A | 29-05-1989 | |
| | | JP 1898550 C | 23-01-1995 | |
| | | JP 6020549 B | 23-03-1994 | |
| | | JP 1171638 A | 06-07-1989 | |
| | | JP 1812101 C | 27-12-1993 | |
| | | JP 5018625 B | 12-03-1993 | |
| | | DE 3853219 D1 | 06-04-1995 | |
| | | DE 3853219 T2 | 29-06-1995 | |
| | | DE 3880647 D1 | 03-06-1993 | |
| | | DE 3880647 T2 | 18-11-1993 | |
| | | EP 0321703 A1 | 28-06-1989 | |
| | | EP 0476721 A2 | 25-03-1992 | |
| | | US 5216127 A | 01-06-1993 | |
| | | ----- | | |
| EP 0319144 | A | 07-06-1989 | JP 2045065 A | 15-02-1990 |
| | | JP 2052669 A | 22-02-1990 | |
| | | JP 1124468 A | 17-05-1989 | |
| | | JP 2665526 B2 | 22-10-1997 | |
| | | EP 0319144 A1 | 07-06-1989 | |
| | | US 5051185 A | 24-09-1991 | |
| ----- | | | | |
| DE 19735902 | A | 25-02-1999 | DE 19735902 A1 | 25-02-1999 |
| ----- | | | | |
| US 5958883 | A | 28-09-1999 | US 6340783 B1 | 22-01-2002 |
| ----- | | | | |
| EP 0494848 | A | 15-07-1992 | SE 468881 B | 05-04-1993 |
| | | AT 157866 T | 15-09-1997 | |
| | | AT 204753 T | 15-09-2001 | |
| | | AU 9152891 A | 17-08-1992 | |
| | | DE 69132710 D1 | 04-10-2001 | |
| | | DE 69132710 T2 | 18-04-2002 | |
| | | DE 69223426 D1 | 15-01-1998 | |
| | | DE 69223426 T2 | 12-03-1998 | |
| | | DK 566644 T3 | 27-04-1998 | |
| | | DK 719550 T3 | 10-12-2001 | |
| | | EP 0494848 A1 | 15-07-1992 | |
| | | EP 0566644 A1 | 27-10-1993 | |
| | | EP 0715849 A1 | 12-06-1996 | |
| | | EP 0719550 A2 | 03-07-1996 | |
| | | ES 2109338 T3 | 16-01-1998 | |
| | | ES 2163543 T3 | 01-02-2002 | |
| | | GR 3025573 T3 | 31-03-1998 | |
| | | JP 3200604 B2 | 20-08-2001 | |
| | | JP 6504058 T | 12-05-1994 | |
| | | PT 715849 T | 30-01-2002 | |
| SE 9100059 A | 10-07-1992 | | | |
| WO 9211847 A1 | 23-07-1992 | | | |
| ----- | | | | |
| US 6410598 | B1 | 25-06-2002 | AU 692237 B2 | 04-06-1998 |
| | | AU 1870195 A | 21-08-1995 | |
| | | EP 0802797 A1 | 29-10-1997 | |
| | | JP 9511492 T | 18-11-1997 | |
| | | US 5935927 A | 10-08-1999 | |
| | | CA 2182731 A1 | 10-08-1995 | |
| | | WO 9520979 A1 | 10-08-1995 | |
| ----- | | | | |
| WO 9902545 | A | 21-01-1999 | AU 7927398 A | 08-02-1999 |
| | | CA 2295375 A1 | 21-01-1999 | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/NL 03/00501

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|---------------|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 9902545 | A | | EP 1000082 | A2 17-05-2000 |
| | | | WO 9902545 | A2 21-01-1999 |
| | | | JP 2001509369 | T 24-07-2001 |
| | | | NZ 501990 | A 27-09-2002 |
| | | | US 2003118593 | A1 26-06-2003 |
| ----- | | | | |
| WO 0162284 | A | 30-08-2001 | AU 3362001 | A 03-09-2001 |
| | | | BR 0108566 | A 19-11-2002 |
| | | | CA 2400838 | A1 30-08-2001 |
| | | | CN 1416350 | T 07-05-2003 |
| | | | CZ 20022748 | A3 17-03-2004 |
| | | | WO 0162284 | A2 30-08-2001 |
| | | | EE 200200444 | A 15-12-2003 |
| | | | EP 1259251 | A2 27-11-2002 |
| | | | HU 0300067 | A2 28-05-2003 |
| | | | JP 2003523402 | T 05-08-2003 |
| | | | NO 20023961 | A 20-08-2002 |
| | | | NZ 521442 | A 26-09-2003 |
| | | | SK 11782002 | A3 03-02-2004 |
| | | | US 2003086938 | A1 08-05-2003 |
| US 2002187157 | A1 12-12-2002 | | | |
| ----- | | | | |
| WO 0216333 | A | 28-02-2002 | AU 8670201 | A 04-03-2002 |
| | | | BR 0113470 | A 30-12-2003 |
| | | | CA 2419420 | A1 28-02-2002 |
| | | | EP 1334091 | A2 13-08-2003 |
| | | | HU 0302956 | A2 29-12-2003 |
| | | | NO 20030860 | A 24-04-2003 |
| | | | WO 0216333 | A2 28-02-2002 |
| | | | US 2003236391 | A1 25-12-2003 |
| | | | US 2002133019 | A1 19-09-2002 |
| | | | ----- | |
| WO 03006893 | A | 23-01-2003 | CA 2453403 | A1 23-01-2003 |
| | | | WO 03006893 | A2 23-01-2003 |
| | | | US 2003109435 | A1 12-06-2003 |
| ----- | | | | |

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 P 9/10 | A 6 1 P 9/10 | |
| A 6 1 P 25/00 | A 6 1 P 25/00 | |
| A 6 1 P 25/08 | A 6 1 P 25/08 | |
| A 6 1 P 25/16 | A 6 1 P 25/16 | |
| A 6 1 P 25/28 | A 6 1 P 25/28 | |
| A 6 1 P 29/00 | A 6 1 P 29/00 | |
| A 6 1 P 31/04 | A 6 1 P 31/04 | |
| A 6 1 P 35/00 | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 37/06 | A 6 1 P 37/06 | |
| G 0 1 N 33/15 | G 0 1 N 33/15 | Z |
| G 0 1 N 33/50 | G 0 1 N 33/50 | Z |
| G 0 1 N 33/68 | G 0 1 N 33/68 | |
| | A 6 1 K 37/02 | |

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

(74) 代理人 100075812

弁理士 吉武 賢次

(74) 代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74) 代理人 100094640

弁理士 紺野 昭男

(74) 代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(74) 代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(72) 発明者 マルティン、フランス、ベン、ヘラルド、ヘピンク

オランダ国 3 7 5 5、ハーエル、エームネス、ザードコレル、3 4

(72) 発明者 バレンド、パウマ

オランダ国 3 9 9 4、セーエー、ハウテン、タッペルスギルデ、3

(72) 発明者 オンノ、パウター、クラネンブルフ

オランダ国 1 0 9 2、ヘーデー、アムステルダム、プレトリウスストラート、9 1、ザ、サード

(72) 発明者 ルイーゼ、マリア、ヨハンナ、クローン

オランダ国 3 9 8 1、ヘーエン、ブンニク、ドミネー、ファン、デル、クラーンプラントスーン、2 2

F ターム(参考) 2G045 DA36 FA11 FB03 FB12 GC15

4C084 AA17 NA14 ZA011 ZA061 ZA151 ZA361 ZA451 ZA531 ZA541 ZB261

ZB351 ZC35

4C085 AA13 AA14 BB31 CC04 CC13 DD33

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 包含淀粉样蛋白结合蛋白的交叉β结构，检测交叉β结构的方法，调节交叉β结构原纤维形成的方法，以及调节交叉β结构传递的毒性的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2005537254A | 公开(公告)日 | 2005-12-08 |
| 申请号 | JP2004519368 | 申请日 | 2003-07-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | UNIVIR MEDISCH CENT 乌得勒支大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Yuniberushitea，主菜，中枢，乌得勒支 Yuniberushiteito，乌得勒支，控股Besuroten，奋笔记本闭嘴 | | |
| [标]发明人 | マルティン フランス ベン ヘルルド ヘビंक バレンド バウマ オンノ パウター クラネンブルフ ルイーゼ マリア ヨハンナ クローン | | |
| 发明人 | マルティン、フランス、ベン、ヘルルド、ヘビंक バレンド、バウマ オンノ、パウター、クラネンブルフ ルイーゼ、マリア、ヨハンナ、クローン | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 A61K31/00 A61K31/195 A61K31/197 A61K31/198 A61K31/7004 A61K38/00 A61K38/49 A61K39/395 A61K45/00 A61P3/10 A61P7/02 A61P7/04 A61P9/10 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 C12N9/72 G01N33 /15 G01N33/53 G01N33/68 | | |
| CPC分类号 | A61K31/00 A61K31/195 A61K31/197 A61K31/198 A61K31/7004 A61K38/49 A61P3/00 A61P3/10 A61P19/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P31 /04 A61P35/00 C07K16/18 C07K2319/23 C12N9/6459 C12Y304/21069 G01N33/6854 G01N33/6896 G01N2333/9726 G01N2800/042 G01N2800/2821 | | |
| FI分类号 | A61K45/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P3/10 A61P7/02 A61P9/10 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/68 A61K37/02 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084 /ZA011 4C084/ZA061 4C084/ZA151 4C084/ZA361 4C084/ZA451 4C084/ZA531 4C084/ZA541 4C084 /ZB261 4C084/ZB351 4C084/ZC35 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/CC04 4C085/CC13 4C085/DD33 | | |
| 代理人(译) | 耀希达凯贤治 中村KoTakashi | | |
| 优先权 | 2002077797 2002-07-09 EP | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及交叉β结构和这些交叉β结构的生物学作用。公开了通过调节交叉β结构形成和/或组织纤溶酶原激活物 (tPA) 样活性来调节细胞外蛋白质降解和/或蛋白质清除或减少涉及构象疾病的斑块的方法，以及通过可视化交叉的方法诊断方法。beta结构。

| 試料* | インキュベーション時間 (週) | β -シート (%) ** |
|-------------------|-----------------|------------------------|
| A β (16-22) | | 100 |
| アルブミン-グリセルアルデヒド | 2 | 0 |
| アルブミンコントロール | 2 | 0 |
| アルブミン-g6p | 2 | 0 |
| アルブミン-g6p | 4 | 7 |
| アルブミンコントロール | 23 | 0 |
| アルブミン-g6p | 23 | 19 |

* 2週間インキュベーションしたアルブミンは、4および23週間インキュベーションしたアルブミンとは異なるバッチのものであった。

** β -シートでのアミノ酸残基の比率を示す。