

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-513259
(P2006-513259A)

(43) 公表日 平成18年4月20日(2006.4.20)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 38/00 (2006.01)	A 61 K 37/02	4 C084
C07K 16/18 (2006.01)	C 07 K 16/18	Z N A 4 C085
A61K 39/00 (2006.01)	A 61 K 39/00	H 4 H045
A61K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	D
A61K 48/00 (2006.01)	A 61 K 39/395	N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 88 頁) 最終頁に続く

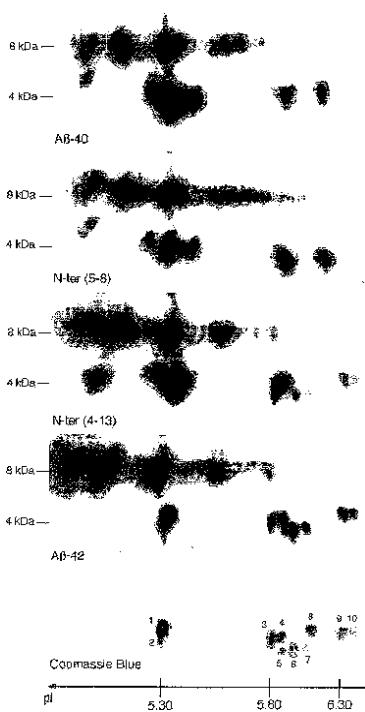
(21) 出願番号	特願2005-505654 (P2005-505654)	(71) 出願人	399044160
(86) (22) 出願日	平成15年7月18日 (2003.7.18)		イノジエネティックス・ナムローゼ・フェ
(85) 翻訳文提出日	平成17年1月18日 (2005.1.18)		ンノートシャップ
(86) 國際出願番号	PCT/EP2003/007833		I N N O G E N E T I C S N. V.
(87) 國際公開番号	W02004/013172		ベルギー、ペー9052ヘント、テヒノ
(87) 國際公開日	平成16年2月12日 (2004.2.12)		ロギーパルク6番
(31) 優先権主張番号	02447147.6	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成14年7月24日 (2002.7.24)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張國	歐州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100106518
(31) 優先権主張番号	60/401,497		弁理士 松谷 道子
(32) 優先日	平成14年8月6日 (2002.8.6)	(74) 代理人	100116311
(33) 優先権主張國	米国 (US)		弁理士 元山 忠行
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ペーターアミロイド生成および／または凝集に関連した疾患の防止、処置および診断

(57) 【要約】

本発明は - アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患の防止ならびに処置のための組成物ならびに方法を提供する。そのような方法は、N - 末端短縮および／または翻訳後修飾A ペプチドに対する免疫応答の誘導を包含する。これらのペプチドは - アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患の診断のための組成物ならびに方法においてさらに使用される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントがN-末端短縮および/または翻訳後修飾を含有することを特徴とする、- アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントを含んでなる調製物。

【請求項 2】

N-末端短縮 - アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントが - アミロイドの2、3、4、5、6、7、8、9または10位で開始し、翻訳後修飾がメチル化またはピログルタミル化であることをさらに特徴とする、請求項1に記載の調製物。

【請求項 3】

ピログルタミル化が、- アミロイドの3位で開始するN-末端短縮 - アミロイド変異体の3位に存在することをさらに特徴とする、請求項2に記載の調製物。

【請求項 4】

- アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントが配列番号1～165よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項1～3のいずれか1項に記載の調製物。

【請求項 5】

- アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントがさらなる修飾を含み、その結果、二次元ゲル電気泳動において、前記さらなる修飾を伴わない - アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントにより得られるスポットと比較して、- アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントの分離したスポットが生じることをさらに特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載の調製物。

【請求項 6】

N-末端APP可溶性フラグメントのC-末端が - アミロイドの1位、1～2位、1～3位、1～4位、1～5位、1～6位、1～7位、1～8位、もしくは1～9位よりなることを特徴とする、APPのセクレターゼ切断によって得ることのできるN-末端APP可溶性フラグメントを含んでなる調製物、またはそのC-末端フラグメントを含んでなる調製物。

【請求項 7】

N-末端APP可溶性フラグメントまたはそのC-末端フラグメントが配列番号1～6、14～18、27～30、53～55、66～67、79、および166～261よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなることをさらに特徴とする、請求項6に記載の調製物。

【請求項 8】

請求項1～5のいずれか1項に記載の - アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントをコードすることが可能な核酸配列を含んでなる、核酸調製物。

【請求項 9】

請求項6または7のいずれか1項に記載のN-末端APP可溶性フラグメントまたはそのC-末端フラグメントをコードすることが可能な核酸配列を含んでなる、核酸調製物。

【請求項 10】

N-末端短縮および/または翻訳後修飾 - アミロイド変異体を特異的に認識する抗体の調製のための方法であって、以下の工程：

(a) 請求項1～5に記載の調製物または請求項8に記載の核酸調製物を動物に免疫する工程；

(b) 工程(a)の免疫化によって生成される抗体を得る工程；

(c) N-末端短縮および/または翻訳後修飾 - アミロイド変異体の特異的認識について、工程(b)において得られる抗体をスクリーニングする工程、を含んでなる、上記方法。

【請求項 11】

請求項10に記載の方法によって得ることのできる抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

請求項 6 または 7 のいずれか 1 項に記載の N - 末端 APP 可溶性フラグメントを特異的に認識する抗体の調製のための方法であって、以下の工程：

(a) 請求項 6 もしくは 7 のいずれか 1 項に記載の N - 末端 APP 可溶性フラグメントまたはその C - 末端フラグメントの調製物あるいは請求項 9 に記載の核酸調製物を動物に免疫する工程；

(b) 工程 (a) の免疫化によって生成される抗体を得る工程；

(c) 請求項 6 または 7 のいずれか 1 項に記載の N - 末端 APP 可溶性フラグメントの特異的認識に関して、工程 (b) において得られる抗体をスクリーニングする工程、を含んでなる、上記方法。

10

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の方法によって得ることのできる抗体。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の調製物を含んでなるか、請求項 1 1 に記載の抗体を含んでなるか、もしくは請求項 8 に記載の核酸調製物を含んでなる、ワクチン組成物または治療組成物。

【請求項 1 5】

アルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患の防止のための予防ワクチンとしての使用のための請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の調製物、請求項 1 1 に記載の抗体、または請求項 8 に記載の核酸調製物。

20

【請求項 1 6】

アルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患の処置のための治療薬としての使用のための請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の調製物、請求項 1 1 に記載の抗体、または請求項 8 に記載の核酸調製物。

【請求項 1 7】

アルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患の防止のための予防ワクチンの製造のための請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の調製物、請求項 1 1 に記載の抗体、または請求項 8 に記載の核酸調製物の使用。

【請求項 1 8】

アルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患を処置のための治療薬の製造のための請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の調製物、請求項 1 1 に記載の抗体、または請求項 8 に記載の核酸調製物の使用。

30

【請求項 1 9】

アルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患の哺乳動物における防止ならびに / あるいは処置のための方法であって、前記方法は、請求項 1 4 に記載のワクチン組成物もしくは治療組成物の前記哺乳動物への投与を含んでなる、上記方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の調製物を含んでなるか、請求項 6 もしくは 7 のいずれか 1 項に記載の調製物を含んでなるか、または請求項 1 1 もしくは 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体を含んでなる診断あるいは療法診断キット。

40

【請求項 2 1】

それぞれ請求項 1 4 に記載のワクチン組成物もしくは治療組成物によるワクチン化もしくは治療適用により哺乳動物において誘導される免疫応答の測定のための診断薬または療法診断薬として使用される請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の調製物。

【請求項 2 2】

それぞれ請求項 1 4 に記載のワクチン組成物もしくは治療組成物によるワクチン化もしくは治療適用により哺乳動物において誘導される免疫応答の測定のための診断または療法診断キットの製造のための請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の調製物の使用。

【請求項 2 3】

50

それぞれ請求項 1 4 に記載のワクチン組成物もしくは治療組成物によるワクチン化もしくは治療適用により哺乳動物において誘導される免疫応答の測定のための方法であって、以下の工程：

(a) 前記哺乳動物から得られるサンプルにおいて、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の - アミロイド変異体に特異的な抗体の量を決定する工程；

(b) 工程 (a) において決定される量と請求項 1 4 に記載のワクチンまたは治療組成物によるワクチン化または治療適用の前に哺乳動物に存在する前記 - アミロイド変異体に特異的な抗体の量とを比較する工程；

(c) 工程 (b) における比較から、哺乳動物がワクチン化または治療に応答しているかどうかを結論付ける工程であって、前記 - アミロイド変異体に特異的な抗体の量の増加が、哺乳動物がワクチン化または治療に応答していることを示すものである工程、を含んでなる、上記方法。

【請求項 2 4】

哺乳動物におけるアルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患に対する感受性を決定するためか、あるいは哺乳動物におけるアルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患を発展する危険性を決定するためか、あるいは哺乳動物における - アミロイド沈着のクリアランスのスクリーニングのためか、あるいは哺乳動物における - アミロイド負荷のレベルを予想するための診断薬あるいは療法診断薬として使用される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の調製物、請求項 1 1 または 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体、あるいは請求項 6 または 7 のいずれか 1 項に記載の調製物。

【請求項 2 5】

哺乳動物におけるアルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患に対する感受性を決定するためか、あるいは哺乳動物におけるアルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患を発展する危険性を決定するためか、あるいは哺乳動物における - アミロイド沈着のクリアランスのスクリーニングのためか、あるいは哺乳動物における - アミロイド負荷のレベルを予想するための診断あるいは療法診断キットの製造のための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の調製物、請求項 1 1 または 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体、あるいは請求項 6 または 7 のいずれか 1 項に記載の調製物の使用。

【請求項 2 6】

哺乳動物におけるアルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患に対する感受性を決定するためか、あるいは哺乳動物におけるアルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患を発展する危険性を決定するためか、あるいは哺乳動物における - アミロイド沈着のクリアランスのスクリーニングのためか、あるいは哺乳動物における - アミロイド負荷のレベルを予想するための方法であって、以下の工程：

(a) 前記哺乳動物における請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の - アミロイド変異体の量、請求項 6 もしくは 7 のいずれか 1 項に記載の N - 末端 APP 可溶性フラグメントの量、または前記 - アミロイド変異体または前記 APP 可溶性フラグメントに特異的な抗体の量を決定する工程；

(b) 工程 (a) において決定される量とコントロール哺乳動物における前記 - アミロイド変異体、前記 N - 末端 APP 可溶性フラグメント、または前記抗体の量とを比較する工程；

(c) 工程 (b) における比較から、哺乳動物がアルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患にかかり易いかどうか、哺乳動物がアルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患を発展する危険性にあるかどうか、哺乳動物における - アミロイド沈着が浄化されているかどうか、あるいは前記哺乳動物における - アミロイド負荷はどのレベルであるかを結論付ける工程、を含んでなる、上記方法。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

- アミロイド変異体の量、N - 末端APP可溶性フラグメントの量または前記 - アミロイド変異体もしくは前記N - 末端APP可溶性フラグメントに特異的な抗体の量が、前記哺乳動物から得られる組織サンプルに対して決定されることをさらに特徴とする、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

哺乳動物における - アミロイド負荷のレベルを予想するための請求項27に記載の方法であって、前記方法は、以下の工程：

(a) 請求項14に記載のワクチン組成物または治療組成物を前記哺乳動物に対して投与する工程；

(b) 前記哺乳動物から得られる生物学的液体サンプルにおいて、請求項1～5のいずれか1項に記載 - アミロイド変異体の量を決定する工程；

(c) 工程(b)において決定される量とコントロール哺乳動物から得られる生物学的液体サンプルにおける前記 - アミロイド変異体の量とを比較する工程；

(d) 工程(c)における比較から、前記哺乳動物における - アミロイド負荷はどのレベルであるかを結論付ける工程、

を含んでなる、上記方法。

【発明の詳細な説明】**【発明の詳細な説明】****【0001】**

20

(技術分野)

本発明は、 - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患の防止、処置および診断に関する。より詳細には、本発明は、 - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患の防止、処置および診断における使用のための新規の - アミロイド(A)およびアミロイド前駆体タンパク質(APP)ペプチドならびに前記A およびAPPペプチドを認識する新規の抗体を提供する。

【背景技術】**【0002】**

アミロイドーシスはアミロイド線維の存在を特徴とする哺乳動物における病状を指す。アミロイドは、多様であるが特異なタンパク質沈着のグループを指す一般的用語である。すべてのアミロイド沈着は、共通の形態学的特性を有し、特定の染料(例えば、コンゴー(Congo)・レッド)により着色し、染色後偏光下で特徴的な赤～緑色の複屈折様相を有する。異なるアミロイドはまた、沈着に存在するタンパク質のタイプによって特徴付けられる。例えば、スクレイピー、牛海面状脳症、クロイツフェルト・ヤコブ病などの神経変性疾患は、中枢神経系におけるプロテアーゼ耐性型のプリオントンパク質(AscrまたはPrP-27と称される)の出現および蓄積を特徴とする。同様に、もう1つの神経変性疾患であるアルツハイマー病は、神経炎性斑および神経原線維変化を特徴とする。この場合、斑および血管アミロイドは、線維性 - アミロイドタンパク質によって形成される。

30

【0003】

アルツハイマー病(AD)は、最も一般的なタイプの老人性痴呆症であり、痴呆症の全症例の40～60%を担うと考えられている。ADの発症率は加齢と共に増加し、65歳を超えるヒトの10名に1名、85歳を超えるヒトの2名にほぼ1名が冒される。全般的に、該疾患の自然経過は、究極的に破壊的な記憶喪失、重大な行動および人格の変化、ならびに認識能力の重度の損傷を生じる不可逆的な進行性の脳障害として特徴付けることができる。これらの障害は、脳細胞の根本的な死および脳細胞間のコミュニケーションの破損に関連する。AD患者に制度上および介護ケアを提供しなければならないヘルス・ケア・システムのための大きな経費を考えると、社会および国民経済に対するADの影響は莫大である。

40

【0004】

50

神経細胞に関連するA D脳では、主要な2つのタイプの組織学的病巣が観察される（フェリシアン（F el i c i a n）およびサンドソン（S and s o n）、1999年）：（i）細胞内レベルでは、A D患者の神経細胞骨格は進行的に崩壊し、対になった螺旋状フィラメント（P H F）からなる神経原線維変化（N F T）に置き換えられる；（ii）細胞外レベルでは、アミロイド斑は線維性 - アミロイド（A ）の沈着によって形成される。

【0 0 0 5】

微小管結合タンパク質タウは、アルツハイマー病に関連する対になった螺旋状フィラメント（P H F）および神経原線維変化（N F T）の主要なタンパク質成分である（ブリオン（B r i o n）ら、1985年；デラコウルテ（D e l a c o u r t e）およびDef f o s s e z（デフォセス）、1986年；グランデ - イクバル（G r u n d k e - I q b a l）ら、1986年；コシク（K o s i k）ら、1986年；ウッド（W o o d）ら、1986年；コンドウ（K o n d o）ら、1988年）。連続的に影響を受ける10の脳領域に従って、10段階のタウ病変（S 0 ~ S 1 0）が規定された（デラコウルテ（D e l a c o u r t e）ら、1999年）。

【0 0 0 6】

A は老人斑の主要成分である。A は、それぞれ A_{40} （A 4 0 ）および A_{42} （A 4 2 ）アミノ酸からなる主に2つのサイズで見出される小さなペプチドであり、他のサイズも少量存在する。A は、既知であるが、神経向性機能が完全には明らかにされていない大きな膜貫通タンパク質（セオ（S e o）ら、2001年）であるAPPのタンパク質分解切断から代謝されることが公知である（サイド（S a i d o）、2000年）。APPは、2つの主要な経路、主要な非アミロイド発生経路および究極的産物としてA を生じる第2の主要なアミロイド発生経路を介して切断され得る。

【0 0 0 7】

APPの異化作用のための主要経路は、 - アミロイドペプチド領域の中心付近のAPPにおける単一の部位での - セクレターゼによる切断を介する（E s c h（エシュ）、1991年；シソディア（S i s o d i a）、1992年）。この経路によって生じる産物は、APPの大きなN - 末端領域（APPs ）および以後に - セクレターゼによって加水分解されて、ほとんど知られていない小さなp 3ペプチドを生じる膜結合C - 末端フラグメント（C 8 3）である。切断部位はA 配列のほぼ中央に位置し、A 形成の可能性を伴わないと認められ、これは非アルデヒド発生経路である。第2のAPPプロセシング経路は、 - および - セクレターゼによるAPPのN - およびC - 末端切断である（図1）。これらの2つのタンパク質分解工程で得られる分子は、APPの中心フラグメント、 A_{40} および A_{42} であり、 A_{40} の方が形成される全A のなかでも量が多い（コンデ（C o n d e）、2002年）。 - セクレターゼは、 - アミロイドペプチドのアミノ末端で切断し、第1のペプチドを生じ、続いて - セクレターゼによって、ペプチドのカルボキシ末端を放出する。この状態は、 - セクレターゼによって産生されるC - 末端フラグメントが細胞において容易に認められるが、単一のC - 末端 切断に対応するAPPフラグメントは認められないという観察に基づく（ハース（H a a s s）ら、1992年；セウベルト（S e u b e r t）ら、1992年）。

【0 0 0 8】

A を生成するAPPの分子不均一性は、特に、または 切断部位付近に位置する家族性常染色体優性アルツハイマー病（F A D A D）における異なるタイプの変異から生じる（デストローパー（D e S t r o o p e r）およびアナエルト（A n a e r t）、2000年）。これらの異なる病原性変異は、トランスジェニックマウスにおいてモデルを作製することができる（チェン（C h e n）ら、2000年）。しかし、A Dは、本質的に非家族性（非F A D A D）であり、この形態は、大規模集団研究に基づきすべての患者のうち99%を超える患者を含む（カンピオン（C a m p i o n）ら、1999年）。A の過剰発現または A_{42} / A_{40} 比の変化は、F A D A Dでは良好に実証されているが、非F A D A Dでは実証されておらず、非F A D A Dでは、アミロイド -

10

20

30

40

50

シスは A クリアランスの欠如または線維形成の増加によって説明される。

【0009】

ヒトの脳では、アミロイドーシスは、はじめ、アミロイド斑として進行的に蓄積する A₄₂ ペプチドの散在性凝集体として、続いて、A₄₀ ペプチドの沈着として観察される（デラコウルテ（Delacourt）ら、2001年；2002年）。A₄₂ から A₄₀ 種への小膠細胞タンパク質分解も示唆されている（フクモト（Fukumoto）ら、1996年）。後者のペプチドはまた、脳血管壁において大量に観察され、AD 脳において多様な量で見出されるアミロイド血管症を構成することが認められる（バレリ（Barelli）ら、1997年；ウィスニエフスキ（Wisniewski）ら、1997年）。老人斑は、主として、ニューロンおよび神経膠プロセスに囲まれた不溶性の A からなる。この無定形な無細胞性材料は、脳神経細胞間の空間に見出される。

【0010】

タウの病変および A 凝集の両方は、AD の神経病理学的診断基準として使用すべきである（ハイマン（Hyman）およびトロジャノフスキ（Trojanowski）、1997年）。臨床的 AD は、前頭極および頭頂皮質におけるタウ病変（デラコウルテら、1999年による段階 7～10）および皮質領域における 50 μg / 1 グラムの湿润組織を超える A₄₂ 凝集体の存在を伴う患者で診断される。臨床外（infractinal）AD は、前頭極もしくは頭頂皮質などの新皮質領域において 10 μg / 1 グラムの組織の濃度で A₄₂、および海馬領域においてタウ病変を有する非痴呆患者または軽度の認識障害を伴う患者において診断される。臨床外 AD 患者では、タウ病変は段階 6 まで無症状であり得る。タウ病変が、海馬領域を含むすべての皮質領域に存在せず、かつ A₄₂ 凝集体の痕跡が新皮質領域に認められない場合、非痴呆患者は（タウおよび APP 病変に関する限り）「純粹なコントロール」または「正常な加齢」とみなすことができる。患者が 75 歳を超える場合、加齢または痴呆を保持する病理学的プロセスのため、極めて不連続または中等度のタウ病変が海馬領域に見出されると思われる（段階 1～3）。しかし、これらの老齢非痴呆患者は、検出可能な A₄₂ 凝集体を有さないため、コントロールとみなすことができる（デラコウルテら、1999年；2001年）。

【0011】

AD のための多くの治療選択肢を試験するために、極めて重大な努力が進行中である。これらのアプローチは、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDS）、エストロゲン、神経栄養因子、およびビタミンなどの多数の薬剤を含む（スラメク（Sramek）およびカトラー（Cutler）、2000年；タール（Thal）、2000年）。3つの一般的サブアプローチは、AD の進行を遅らせるか、停止するかまたは覆すために、A の存在を制限する究極的目的により生じている。これらのアプローチは、A の沈着の形成を防止し、すでに形成された A を排除することを目的とする。第 1 の方法は、-セクレターゼの活性を増強するかまたは - および -セクレターゼを阻害することによって、着手することができる。しかし、確かに、酵素の正常な生物学的活性が完全には知られていない場合、酵素のアップレギュレーションまたは阻害は精密かつ不安定な作業である。第 2 の焦点は、すでに形成された A の細線維への凝集を回避することである。しかし、このアプローチでは、凝集または線維形成阻害剤がプロセスを覆す可能性を考慮しなければならない（クレイン（Klein）ら、2001年）。第 3 の経路、および AD の処置のための現在最も将来性のあるストラテジーは、A の抗体介クリアランスを得るために A またはその適切なフラグメントによる免疫化である。多様な研究チームが、A による異なる株の APP トランスジェニックマウスの免疫化の有益性について報告している。A による免疫化は、-アミロイド斑形成の発達を防止し、存在する斑を除去した（シェンク（Schenk）ら、1999年；2000年）。該免疫化は、脳細線維 A の沈着、脳 A 負荷および認識機能障害を減少させた（ジャヌス（Janus）ら、2000年；モーガン（Morgan）ら、2000年；ウェイナー（Weiner）ら、2000年；レメレ（Lemere）ら、2000年 a；シグルドソン（Sigurdsson）ら、2001年；レメレら、2001年）。抗

10

20

30

40

50

体のみの受動的投与であっても、斑病変を減少させ(バード(Bard)ら、2000年;バクスカイ(Bacskaï)ら、2001年;デマトス(Demattos)ら、2001年)、記憶障害を覆す(ドダート(Dodart)ら、2002年)のに十分であった。抗A抗体は斑に結合するようであり、次いで、Fc仲介食作用プロセスと思われるものを介して、斑物質が小膠細胞に取り込まれ、加水分解される。Aペプチドに対するワクチン化を使用するAD患者の脳におけるアミロイド沈着のクリアランスは、処置の展望を開く新規のアプローチである(シェンクら、2001年)。

【0012】

しかし、上記の技術は、ワクチン化ストラテジーにおいて用いるべきAペプチドの特異な化学的性質を同定していない。上記の教示は、-アミロイドペプチドまたはペプチド複合体(即ち、A₃₉、A₄₀、A₄₁、A₄₂またはA₄₃)の特異な天然に存在する形態の使用に制限される。しかし、Aはまた、不明な機能を有する生理学的産物でもあり、天然に存在するAによるワクチン化は、所望されない免疫反応を生じ得る。AN-1792、合成形態のA₄₂を含有する処方による第I相臨床治験は、CNSにおける炎症に一致する症状が15~19例の患者に報告されたため、中止しなければならなかった(コンデ(Conde)、2002年)。従って、治療ストラテジーの効率は、自己免疫応答を回避するために、線維形成を刺激し、生理学的ではなく、病理学的な最初のアミロイド沈着の化学的性質の正確な知識による。凝集傾向があり、極めて早期の沈着物に存在する病理学的A種の正確な化学的性質を明確に理解すれば、ADなどの-アミロイド形成および/または凝集に関連する疾患にかかり易いかあるいは該疾患を発展する危険性にあるヒトの正確な診断が可能となり、従って、ワクチン化によるA凝集の以後の防止または以後のアミロイド負荷の除去が可能となる。

【0013】

アルツハイマー病(AD)におけるアミロイド沈着の主要構成成分としての-アミロイド(A)の発見(グレナー(Glenner)およびウォング(Wong),1984年)以来、アミノ短縮Aペプチドは、AD患者の斑において同定されている(マスターズ(Masters)ら、1985年)。A配列の3位のピログルタミン酸から開始する修飾されたAペプチドが、サイドら(サイド(Saido)ら、1995年;1996年)およびハリガヤら(ハリガヤ(Harigaya)ら、2000年)によって、主にダウン症の患者のA沈着において同定された。AD痴呆患者由来のAペプチド沈着ではN-末端分解が観察された(カルバック(Kalback)ら、2002年)。しかし、これらの研究は、AのC-末端変異体(A₃₉、A₄₀、A₄₁、A₄₂またはA₄₃)を同定することもまたは該変異体の間を区別することもしていない。さらに、AペプチドのこれらのN-末端短縮は、AD患者のインサイチュアミロイドのAペプチドを抽出するために使用される実験手順の人為構造の結果である可能性が高い(マスターズ、1985年;カルバックら、2002年)。それらはまた、AD脳において生成される後期でのタンパク質分解活性(例えば、小膠細胞によって生成される)によるアミロイド沈着の異化作用からも生じ得る(カワラバヤシ(Kawarabayashi)ら、2001年)。変異型アミロイド前駆体タンパク質(APP)をトランスクエクトした細胞モデルによって(セスカト(Cescato)ら、2000年)、またはバフィロマイシンA1もしくは塩化アンモニウムなどの薬物で細胞を処置する(ハース(Haass)ら、1995年;シュラーダー・フィッシャー(Schrader-Fischer)およびパガネットティ(Paganetti)、1996年)場合、N-末端短縮Aペプチドもまた產生され得る。また、誘導される劇的な生理学的機能障害は、膜結合プロテアーゼによるタンパク質分解活性を誘発する。要約すると、上記のデータは、十分に発展したADを伴う個体において、アミノ短縮Aはアミロイド沈着の成分であることを示唆する。それらの產生は、小膠細胞または実験的に誘導されるタンパク質分解活性によって生じる後期の事象であり得る。

【0014】

しかし、アミロイドーシスの診断、防止および処置のためには、進行中の小膠細胞また

10

20

30

40

50

は星状膠細胞の反応がタンパク質分解活性を生じる前のアミロイド沈着の極めて早期の段階でAペプチドの特異な化学的性質を知ることが必須である。現在のところ、凝集傾向があり、および/または線維形成を刺激するアミロイド沈着に存在し、ならびになお小膠細胞および星状膠細胞活性によって仲介されるタンパク質分解を受け難い病理的Aペプチドの特異な構造に関するデータは得られていない。

【0015】

(発明の概要)

本発明は、極めて特異な化学的性質を有するAペプチド、即ち、ADの極めて早期で線維形成を刺激するアミロイド二量体の病変Aペプチドとして同定されたN-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドを提供する。それらのAペプチドは、アルツハイマー病などの-Aミロイド形成および/または凝集を特徴とする疾患を防止ならびに処置するための方法における免疫応答の誘導のために使用し得る。従って、本発明は、-アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントがN-末端短縮および/または翻訳後修飾を含有することを特徴とする-Aミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントを含んでなる調製物に関する。

【0016】

好適な実施態様では、本発明は、N-末端短縮-Aミロイド変異体あるいはそのN-末端フラグメントが-Aミロイドの2、3、4、5、6、7、8、9、または10位で開始すること、ならびに翻訳後修飾がメチル化またはピログルタミル化であることをさらに特徴とする、N-末端短縮および/または翻訳後修飾-Aミロイド変異体あるいはそのN-末端フラグメントを含んでなる調製物を提供する。

【0017】

別の好適な実施態様では、本発明は、ピログルタミル化が、-アミロイドの3位で開始するN-末端短縮-Aミロイド変異体の3位に存在することをさらに特徴とする、N-末端短縮および/または翻訳後修飾-Aミロイド変異体あるいはそのN-末端フラグメントを含んでなる調製物を提供する。

【0018】

別の好適な実施態様では、本発明は、-アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントが、配列番号1~165よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなることをさらに特徴とする、N-末端短縮および/または翻訳後修飾-Aミロイド変異体あるいはそのN-末端フラグメントを含んでなる調製物を提供する。

【0019】

本発明の別の好適な実施態様では、本発明は、N-末端短縮および/または翻訳後修飾-Aミロイド変異体あるいはそのN-末端フラグメントが、二次元ゲル電気泳動において、さらなる修飾を伴わないN-末端短縮および/または翻訳後修飾-Aミロイド変異体あるいはそのN-末端フラグメントにより得られるスポットと比較して、N-末端短縮および/または翻訳後修飾-Aミロイド変異体あるいはそのN-末端フラグメントの分離したスポットが生じるさらなる修飾を含有することをさらに特徴とする、N-末端短縮および/または翻訳後修飾-Aミロイド変異体あるいはそのN-末端フラグメントを含んでなる調製物を提供する。

【0020】

APP代謝の異常な経路の結果である前記N-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体に関する知見は、様セクレターゼによる異常な切断から生じるC-末端テイルの過剰アミノ酸(即ち、Aのアミノ酸1、2、3、4、5、6、7、8、または9より後方)を含有するN-末端APP可溶性フラグメントの存在を支持する。従って、本発明はまた、N-末端APP可溶性フラグメントのC-末端が、-アミロイドの1位、または1~2位、1~3位、1~4位、1~5位、1~6位、1~7位、1~8位、もしくは1~9位よりなることを特徴とする、APPのセクレターゼ切断によって得ることのできるN-末端APP可溶性フラグメントを含んでなる調製物に関する。本発明はまた、そのようなN-末端APP可溶性フラグメントのC-末端フラグメントに関する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 1 】

好適な実施態様では、本発明は、N - 末端APP可溶性フラグメントまたはそのC - 末端フラグメントが、配列番号1～6、14～18、27～30、53～55、66～67、79、および166～261よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなることをさらに特徴とする、APPのセクレターゼ切断によって得ることのできるN - 末端APP可溶性フラグメント、またはそのC - 末端フラグメントを含んでなる調製物に関する。

【 0 0 2 2 】

本発明は、本発明のN - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾 - アミロイド変異体あるいはそのN - 末端フラグメントをコードすることが可能な核酸配列を含んでなる核酸調製物にさらに関する。本発明はまた、本発明のN - 末端APP可溶性フラグメントまたはそのC - 末端フラグメントをコードすることが可能な核酸配列を含んでなる核酸調製物に関する。

10

【 0 0 2 3 】

本発明は、N - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾 - アミロイド変異体を特異的に認識する抗体の調製のための方法であって、以下の工程：

- (a) N - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾 - アミロイド変異体またはそのN - 末端フラグメントを含んでなる調製物あるいはN - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾 - アミロイド変異体またはそのN - 末端フラグメントをコードする核酸調製物を動物に免疫する工程；
- (b) 工程(a)の免疫化によって生成される抗体を得る工程；
- (c) N - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾 - アミロイド変異体の特異的認識に関して、工程(b)において得られる抗体をスクリーニングする工程、を含んでなる、上記方法にさらに関する。

20

【 0 0 2 4 】

本発明はまた、上記方法によって得ることのできる抗体に関する。

【 0 0 2 5 】

本発明はまた、本発明のN - 末端APP可溶性フラグメントを特異的に認識する抗体の調製のための方法であって、以下の工程：

- (a) 本発明のN - 末端APP可溶性フラグメントまたはそのC - 末端フラグメントの調製物あるいは本発明のN - 末端APP可溶性フラグメントまたはそのC - 末端フラグメントをコードする核酸調製物を動物に免疫する工程；
- (b) 工程(a)の免疫化によって生成される抗体を得る工程；
- (c) 本発明のN - 末端APP可溶性フラグメントの特異的認識に関して、工程(b)において得られる抗体をスクリーニングする工程、を含んでなる、上記方法にさらに関する。

30

【 0 0 2 6 】

本発明はまた、上記方法によって得ることのできる抗体に関する。

【 0 0 2 7 】

上に示したように、本発明は、動物において、 - アミロイド形成および／または凝集を特徴とする疾患を防止ならびに処置するための調製物ならびに方法を提供する。従って、本発明はまた、N - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾 - アミロイド変異体またはそのN - 末端フラグメントを含んでなるか、前記N - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾 - アミロイド変異体を認識する抗体を含んでなるか、あるいは前記N - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾 - アミロイド変異体またはそのN - 末端フラグメントをコードする核酸を含んでなるワクチン組成物あるいは治療組成物に関する。

40

【 0 0 2 8 】

従って、本発明はまた、アルツハイマー病などの - アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患の哺乳動物における防止ならびに／あるいは処置のための方法であって、前記方法は、本発明のワクチン組成物もしくは治療組成物の前記哺乳動物への投与を含んでなる。

50

【0029】

本発明の別の局面は、本発明のN-末端短縮および／もしくは翻訳後修飾 - アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントの調製物を含んでなるか、本発明のN-末端APP可溶性フラグメントまたはそのC-末端フラグメントの調製物を含んでなるか、あるいは前記ペプチドまたはフラグメントを認識する抗体を含んでなる診断あるいは療法診断キットに関する。

【0030】

本発明はまた、本発明のワクチン組成物もしくは治療組成物によるワクチン化もしくは治療適用により哺乳動物において誘導される免疫応答の測定のための方法であって、以下の工程：

(a) 前記哺乳動物から得られるサンプルにおいて、本発明のN-末端短縮および／または翻訳後修飾 - アミロイド変異体に特異的な抗体の量を決定する工程；

(b) 工程(a)において決定される量と本発明のワクチンまたは治療組成物によるワクチン化または治療適用の前に哺乳動物に存在する前記N-末端短縮および／または翻訳後修飾 - アミロイド変異体に特異的な抗体の量とを比較する工程；

(c) 工程(b)における比較から、哺乳動物がワクチン化または治療に応答しているかどうかを結論付ける工程であって、前記N-末端短縮および／または翻訳後修飾 - アミロイド変異体に特異的な抗体の量の増加が、哺乳動物がワクチン化または治療に応答していることを示すものである工程、

を含んでなる、上記方法に関する。

10

20

30

40

【0031】

本発明は、哺乳動物におけるアルツハイマー病などの - アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患に対する感受性を決定するため、あるいは哺乳動物におけるアルツハイマー病などの - アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患を発展する危険性を決定するため、あるいは哺乳動物における - アミロイド沈着のクリアランスのスクリーニングのため、あるいは哺乳動物における - アミロイド負荷のレベルを予想するための方法であって、以下の工程：

(a) 前記哺乳動物における本発明のN-末端短縮および／または翻訳後修飾 - アミロイド変異体の量、本発明のN-末端APP可溶性フラグメントの量、あるいは本発明の前記 - アミロイド変異体または前記APP可溶性フラグメントに特異的な抗体の量を決定する工程；

(b) 工程(a)において決定される量とコントロール哺乳動物における前記N-末端短縮および／または翻訳後修飾 - アミロイド変異体、前記N-末端APP可溶性フラグメントあるいは前記抗体の量とを比較する工程；

(c) 工程(b)における比較から、哺乳動物がアルツハイマー病などの - アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患にかかり易いかどうか、哺乳動物がアルツハイマー病などの - アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患を発展する危険性にあるかどうか、哺乳動物における - アミロイド沈着が浄化されているかどうか、あるいは前記哺乳動物における - アミロイド負荷はどのレベルであるかを結論付ける工程、

を含んでなる、上記方法にさらに関連する。

【0032】

好適な実施態様では、本発明は、N-末端短縮および／または翻訳後修飾 - アミロイド変異体の量、N-末端APP可溶性フラグメントの量あるいは前記 - アミロイド変異体または前記APP可溶性フラグメントに特異的な抗体の量が、前記哺乳動物から採取される組織サンプルに対して決定されることをさらに特徴とする、上記の方法に関する。

【0033】

好適な実施態様では、本発明はまた、哺乳動物における - アミロイド負荷のレベルを予想するための方法であって、以下の工程：

(a) 本発明のワクチン組成物または治療組成物を前記哺乳動物に対して投与する工程；
(b) 前記哺乳動物から得られる生物学的液体サンプルにおいて、本発明のN-末端短縮

50

および / または翻訳後修飾 - アミロイド変異体の量を決定する工程；

(c) 工程 (b) において決定される量とコントロール哺乳動物から得られる生物学的液体サンプルにおける前記 N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 - アミロイド変異体の量とを比較する工程；

(d) 工程 (c) における比較から、前記哺乳動物における - アミロイド負荷はどのレベルであるかを結論付ける工程、

を含んでなる、上記方法に関する。

【0034】

(発明の詳細な説明)

N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチド

本発明は、アルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集を特徴とする疾患を防止ならびに処置するための組成物ならびに方法を提供する。本発明の方法は、極めて特異な化学的性質を有する A ペプチド、即ち、N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチドに対する免疫応答の誘導を包含する。N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体は、アルツハイマー病変の臨床外段階におけるアミロイド沈着を刺激する A の凝集した種である。それらは、はじめ、神経原線維変性および低レベルのアミロイド沈着の両方を伴う非痴呆個体の脳組織において同定されたが、それらは、神経原線維変性もアミロイド沈着も伴わない「純粹なコントロール」個体では認められなかった。従って、これらの N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体は、A D の臨床外段階（即ち、ブラアク (B r a a k) およびブラアク (B r a a k) 、1991により記載の A D 病変の可能な最も早い段階 I および II 、またはデラコウルテ (D e l a c o u r t e) ら、1999に従うタウ病変段階 1 ~ 6 ）に対応し、アミロイド沈着の根源を形成する。これらの N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体は、タンパク質分解活性を生じる小膠細胞および星状膠細胞反応の影響をまだ受けていない脳組織において観察された。このことは、これらの N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体は後期のタンパク質分解活性の結果ではなく、それらは、APP 代謝の異常な経路から生じるインサイチュ産物であるべきであることを示す。従って、これらの N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体は、アミドーシスの早期事象に関連する極めて最初の病理学的種とみなすことができる。

【0035】

A ペプチド、A 、 - アミロイドペプチド、または A 4 ペプチドは、本発明全体を通して交換可能に使用され、アルツハイマー病の特徴的な斑の主成分である 39 ~ 43 アミノ酸のペプチド (A₃₉、A₄₀、A₄₁、A₄₂ または A₄₃) を指す。A は、 - および - セクレターゼと呼ばれる 2 つの酵素によるより大きなタンパク質 APP のプロセシングによって生成される (ハース (H a a s s) ら ; セウベルト (S e u b e r t) ら)。A₄₂ ペプチドの配列は以下の通りである：

D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V
I A

(配列番号 144)

【0036】

A₄₁、A₄₀ および A₃₉ は、C - 末端からそれぞれ A 1 a (A) 、I 1 e - A 1 a (I A) 、および V a 1 - I 1 e - A 1 a (V I A) が脱落している点が A₄₂ と異なる。A₄₃ は、C - 末端にスレオニン残基が存在している点が A₄₂ と異なる。

【0037】

- アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患は、APP の - および - 切断として - アミロイドが脳において形成されるならびに / あるいは前記 - アミロイドがオリゴマーを形成する疾患である。 - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患は、アミロイドによるレビー小体型痴呆 (D L B) 、ダウン症候群、アルツハイマー病、後期および早期発症の両方を含むが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0038】

本発明で使用する構成要素に分かれたまたは単量体Aは、Aの可溶性の単量体ペプチドを意味する。構成要素に分かれたAは、非共有結合によって単量体単位が共に保持されるオリゴマーの混合物である。「構成要素に分かれている」は、非共有結合によって典型的に共に保持されている凝集したタンパク質の可溶化を指す。¹⁰-アミロイド沈着は、AD患者の脳において形成されるような凝集した形態でAペプチドを含んでなる。ほとんどの場合、凝集体は、プリーツシート構造を有する。本発明は、A二量体、A沈着における極めて最初の凝集体は、主にあるいは排他的にN-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体からなることを実証している。このことは、¹⁰-アミロイドーシスの基本的機構が、N-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体の凝集に関連することを支持する。

【0039】

従って、本発明は、²⁰-アミロイド変異体あるいはそのN-末端フラグメントがN-末端短縮および/または翻訳後修飾を含有することを特徴とする、²⁰-アミロイド変異体あるいはそのN-末端フラグメントを含んでなる調製物に関する。これらの²⁰-アミロイド変異体およびそのN-末端フラグメントは、合わせて「N-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチド」と呼ばれる。

【0040】

本発明の調製物は、典型的に実質的に純粋である。これは、²⁰-アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントが典型的に少なくとも約50%w/w(重量/重量)純粋であり、ならびに干渉するタンパク質および混入物を実質的に含まないことを意味する。

²⁰-アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントは少なくとも約80%w/w、より好ましくは少なくとも90%または約95%w/w純粋であることが好ましい。従来のタンパク質精製技術を使用して、少なくとも99%w/wの均質なペプチドを得ることができる。

【0041】

臨床外アルツハイマー病患者由來の脳に存在したN-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体は、典型的に、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10位で開始するAよりなっていた。特徴付けた翻訳後修飾は、メチル化またはピログルタミル化である。しかし、いずれの翻訳後修飾をも伴わないN-末端短縮A変異体も同定した。従って、本発明は、N-末端短縮³⁰-アミロイドまたはそのN-末端フラグメントが³⁰-アミロイドの2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10で開始すること、および存在する場合、翻訳後修飾がメチル化またはピログルタミル化であることをさらに特徴とする、上記の調製物に関する。

【0042】

本発明の好適な実施態様では、⁴⁰-アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントは⁴⁰-アミロイドの2、3、4、5、8、9、もしくは10で開始する。別の好適な実施態様では、⁴⁰-アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントは、⁴⁰-アミロイドの3、4、5、8、もしくは9で開始する。別の好適な実施態様では、⁴⁰-アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントは、1、2、4、もしくは6位のいずれか1つでメチル化を含有する。別の好適な実施態様では、⁴⁰-アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントは3位でピログルタミル化されている。従って、本発明は、ピログルタミル化が⁴⁰-アミロイドの3位で開始するN-末端短縮⁴⁰-アミロイド変異体の3位に存在することをさらに特徴とする上記の調製物に関する。

【0043】

本発明のN-末端フラグメントは、典型的にN-末端短縮および/または翻訳後修飾⁵⁰-アミロイド変異体のN-末端部分由來の少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはそれ以上の連続アミノ酸の配列を有する。従って、本発明のN-末端フラグメントは、配列番号1~143において同定されるペプチドよりなるか、または該ペプチドを含んでなり得る。他

の場合、本発明の - アミロイドペプチドは、他のアミノ酸と共に - アミロイド変異体を含むより長いポリペプチドよりなり得る。従って、本発明の - アミロイドペプチドはまた、配列番号 144 ~ 165において同定されるペプチドよりなるか、または該ペプチドを含んでなり得る。従って、本発明は、 - アミロイド変異体またはその N - 末端フラグメントが配列番号 1 ~ 165 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなることをさらに特徴とする上記調製物に関する。

【0044】

メチル化またはピログルタミル化に加えて、本発明の - アミロイドは他の修飾を含んでなることができる。従って、本発明はまた、N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 - アミロイド変異体あるいはその N - 末端フラグメントが、二次元ゲル電気泳動において、さらなる修飾を伴わない N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 - アミロイド変異体あるいはその N - 末端フラグメントで得られるスポットと比較して、N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 - アミロイド変異体あるいはその N - 末端フラグメントの分離したスポットが生じるさらなる修飾を含有することをさらに特徴とする、上記の調製物に関する。さらなる修飾は、等電点 (pI) および 2 次元ゲル上の分子量 (MW) の明らかなシフトを含む任意の修飾を含む。これらは、リン酸化、イソアスパラギン酸の付加、アセチル化、グリコシル化、ラセミ化、異性化、タンパク質分解、ステレオマー化、環化を含むが、これらに限定されない。好適な実施態様では、さらなる修飾は N - 末端短縮 A ペプチドの 7 位のイソアスパラギン酸である。

【0045】

本発明らが、N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体がアルツハイマー病の最も早期の病理学的抗原の 1 つであることを実証したことは、該変異体がワクチン化の理想的な標的であることを実証している。実際に、N - 末端短縮および / または翻訳後修飾ペプチドは、天然には存在しないこれらの N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体に対して特異的な免役応答を標的にする。従って、得られる免役応答は、これらの病理学的 N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体を選択的に浄化する

【0046】

免役応答を誘導するために、本発明の調製物は免疫原性であるべきである。「免疫原性調製物」は、必要であれば、アジュバントと組み合わせて、レシピエント哺乳動物への投与時に自体に対する免疫学的応答を誘導することが可能な「免疫原性因子」または「免疫原」を含んでなる調製物である。本発明の免疫原性調製物は、免疫原として N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチドを含んでなることができる。用語「免疫学的」または「免疫」応答は、レシピエント哺乳動物における N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチドに対する有益な体液性（抗体介在性）および細胞性（抗原特異的 T 細胞またはそれらの分泌産物によって介在される）応答の発達を指す。そのような応答は、免疫原の投与によって誘導される能動的応答であるか、または抗体もしくはプライム化 (primed) T 細胞の投与によって誘導される受動応答であることができる（以下を参照のこと）。細胞性免疫応答は、クラス I またはクラス II MHC 分子との共同によるペプチドエピトープの活性化された CD4 T 細胞ヘルパー細胞および / または CD8 + 細胞障害性 T 細胞への提示によって誘発される。応答はまた、単球、マクロファージ、NK 細胞、好塩基球、樹状細胞、星状膠細胞、小膠細胞、好酸球または自然免疫の成分の活性化に関与し得る。

【0047】

免疫応答を誘導するためのいくつかの因子は、アミロイド沈着に対する免疫応答の誘導に適切なエピトープを含有するが、それ自体は小さすぎて免疫原性ではない。この状態では、ペプチド免疫原は、適切なキャリアに連結し、免疫応答の誘発を援助することができる。適切なキャリアとしては、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシニアン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、オボアルブミン、破傷風トキソイド、またはジフェリア、大腸菌 (E. coli)、コレラ、もしくは H. ピロリ (H. pylori) などの他の病原性細菌由来のトキソイド、あるいは弱毒化毒素が挙げられる。免役応答を刺

10

20

30

40

50

激または増強するための他のキャリアとして、IL-1、IL-1 および ペプチド、IL-2、TNF、IL-10、GM-CSFなどのサイトカイン、ならびにMIP1 および ならびにRANTESなどのケモカインが挙げられる。免疫原性因子はまた、国際公開第97/17613号パンフレットおよび国際公開第97/17614号パンフレットに記載のように、組織を横切る輸送を増強するペプチドに連結させることができる。免疫原性因子は、化学架橋によって、キャリアに連結させることができる。免疫原をキャリアに連結させるための技術は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジル-チオ)プロピオン酸(SPD P)およびスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸(SMCC)を使用するジスルフィド結合の形成を含む(ペプチドがメルカプト基を欠如する場合、システイン残基の付加によってこれを提供することができる)。これらの試薬は、それら自体と1つのタンパク質上のペプチドシステイン残基との間のジスルフィド結合、リジン上の-N-アミノ、または他のアミノ酸における他の遊離のアミノ基を介するアミド結合を生成する。そのような多様なジスルフィド/アミド形成薬剤については、ジャンセン(Janssen)ら(1982)により記載されている。他の二官能性カップリング剤はジスルフィド結合よりむしろチオエーテルを形成する。これらの多くのチオ-エーテル形成剤は市販されており、6-マレイミドカプロン酸、2-ブロモ酢酸、および2-ヨード酢酸、4-(N-マレイミド-メチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の活性エステルを含む。カルボキシル基は、それらをスクシンイミドまたは1-ヒドロキシル-2-ニトロ-4-スルホン酸、ナトリウム塩と結合させることによって活性化することができる。免疫原性ペプチドはまた、キャリアとの融合タンパク質として発現させることができる。免疫原性ペプチドは、キャリアに対してアミノ末端、カルボキシル末端、または内部に連結させることができる。必要であれば、免疫原性ペプチドの複数の反復を融合タンパク質に存在させることができる。

10

20

30

40

【0048】

N-末端APP可溶性フラグメント

APP代謝の異常な経路からの結果としてのN-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体の所見は、-セクレターゼによる短縮切断から生じるC-末端テイルでの過剰なアミノ酸(即ち、Aのアミノ酸1、2、3、4、5、6、7、8、または9より後方)を含有するN-末端APP可溶性フラグメントの存在を支持する。背景技術のセクションで考察したように、Aは、-セクレターゼによるAPPのN-およびC-末端切断によってAPPから代謝される(図1)。APPは、3つのイソ型、APP695、APP751、およびAPP770で見出されており、それぞれヒトAPP遺伝子によってコードされる695、751、および770アミノ酸残基長ポリペプチドを指す(カング(Kang)ら、1987;ポンテ(Ponte)ら、1988;キタグチ(Kitaguchi)ら、1988)。本発明では、ヒトアミロイド前駆体タンパク質(APP)内のアミノ酸を、APP770イソ型の配列に従って番号を割り当てている(図1)。-セクレターゼは、APPの671位と672位との間の-N-アミロイドペプチドのアミノ末端で切断する。しかし、この-N-セクレターゼがよりA配列側へ異常に切断すると、1個またはそれ以上のさらなるAアミノ酸を有するN-末端APPフラグメントを生じる。従って、本発明は、N-末端APP可溶性フラグメントのC-末端が-N-アミロイドの1位、または1~2位、1~3位、1~4位、1~5位、1~6位、1~7位、1~8位、もしくは1~9位となることを特徴とする、APPのセクレターゼ切断によって得ることのできるN-末端APP可溶性フラグメントを含んでなる調製物に関する。本発明はまた、そのようなN-末端APP可溶性フラグメントのC-末端フラグメントに関する。特定の実施態様では、本発明は、N-末端APP可溶性フラグメントまたはそのC-末端フラグメントが、配列番号1~6、14~18、27~30、53~55、66~67、79、および166~261となる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなることをさらに特徴とする、上記の調製物に関する。

40

【0049】

本発明のA変異体、それらのN-末端フラグメント、本発明のN-末端APP可溶性

50

フラグメントおよびそのC-末端フラグメントは、固相ペプチド合成もしくは組換え発現によって合成することができるか、または天然の供給源から得ることができる。自動ペプチド合成機は、アプライド・バイオシステムズ（米国、カリフォルニア州、フォスター市）などの多数の供給者から市販されている。組換え発現は、大腸菌（*E. coli*）などの細菌、酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞において可能である。組換え発現のための手順は、サンブルック（Sambrook）ら（1989）らが記載している。

【0050】

また、本発明のAペプチドおよびAPP可溶性フラグメントの本質的な3次元形状および免疫学的結合能を保持するペプチド模倣物とも呼ばれるペプチドならびに分子も本発明に含まれる。これらのペプチド模倣物は、哺乳動物レシピエントにおいて免役応答を誘導するためか、または前記本発明のAペプチドおよびAPP可溶性フラグメントに特異的な抗体との免疫学的複合体の形成のために、本発明のAペプチドおよびAPP可溶性フラグメントを模倣することができる。

【0051】

核酸

本明細書はまた、本発明の - アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントをコードすることが可能であるか、あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントまたはそのC-末端フラグメントをコードすることが可能である核酸配列を含んでなる核酸調製物に関する。本発明の核酸は、DNAまたはRNAであることができる。DNA分子が転写および翻訳調節情報を含有する分子配列を含有し、そのような配列がポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に「作動可能に連結」する場合、該DNA分子は、本発明の

- アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントあるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントまたはそのC-末端フラグメントなどのポリペプチドを「発現することが可能」である。作動可能な連結は、調節DNA配列および発現させようとするDNA配列が、遺伝子発現を可能にするような方法で接続される連結である。遺伝子発現に必要な調節領域は、一般に、プロモーター領域ならびにRNAに転写される場合にタンパク質合成の開始をシグナル伝達するDNA配列を含む。そのような領域は、普通、転写および翻訳の開始に関する5' - 非コーディング配列を含む。プロモーター領域は、プロモーターがDNA配列の転写を生じることが可能であるならば、該DNA配列に作動可能に連結される。従って、本発明の - アミロイド変異体またはそのN-末端フラグメントあるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントまたはそのC-末端フラグメントをコードする核酸セグメントは、目的の宿主において核酸セグメントの発現を可能にするプロモータおよびエンハンサーなどの調節エレメントに連結するべきである。血液細胞における発現のために、例えば、哺乳動物における免疫応答の誘導が所望される場合、軽もしくは重鎖免疫グロブリン遺伝子由来のプロモーターおよびエンハンサーエレメントまたはCMV主要即時早期プロモーターおよびエンハンサーが、直接発現に適切である。

【0052】

連結された調節エレメントおよびコーディング配列は、しばしば、ベクターにクローニングされる。ベクターは、核酸、好ましくは、細胞における自律複製が可能なDNA分子であり、付着したセグメントの複製が生じるように、該ベクターには核酸セグメント（例えば、遺伝子またはポリヌクレオチド、好ましくは、DNA）が作動可能に連結される。1つもしくはそれ以上のタンパク質をコードする核酸（好ましくは、DNA）セグメント（遺伝子）の発現を指令することが可能なベクターを「発現ベクター」と呼ぶ。従って、発現ベクターは、外来性ヌクレオチド配列（好ましくは、DNA）が挿入もしくは発現されれる任意のプラスミドまたはウイルスである。レトロウイルス系（ラウリー（Lawrie）およびツミン（Tummin）、1993）、アデノウイルスベクター（ベット（Bett）ら、1993）、アデノ随伴ウイルスベクター（チョウ（Zhou）ら、1994）、ワクシニアウイルスおよび鶏痘ウイルスを含むポックスウイルス科のウイルスベクター、シンドビスおよびセムリキ森林ウイルス由来などのアルファウイルス属（デュベンスカイ（Dubensky）ら、1996）、ならびにパピローマウイルス（オヒ（Oh

10

20

30

40

50

e) ら、 1995 ; 国際公開第 94 / 12629 号パンフレット ; シャオ (X i a o) およびブランドスマ (B r a n d s m a) 、 1996) を含む (但し、これらに限定されない) 多くのウイルスベクター系が利用可能である。

【 0053 】

抗体

別の実施態様では、本発明は、本発明の N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 - アミロイド変異体を特異的に認識する抗体の調製のための方法に関する。前記方法は、以下の工程 :

(a) N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチドを含んでなる免疫原性調製物あるいは前記 N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチドをコードする核酸調製物を動物に免疫する工程 ;

(b) 工程 (a) の免疫化によって生成される抗体を得る工程 ;

(c) N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 - アミロイド変異体の特異的認識について、工程 (b) において得られる抗体をスクリーニングする工程、を含んでなる。

【 0054 】

本発明はさらに、上記方法によって得ることのできる抗体に関する。

【 0055 】

さらなる実施態様では、本発明は、本発明の N - 末端 APP 可溶性フラグメントを特異的に認識する抗体の調製のための方法に関する。前記方法は、以下の工程 :

(a) 本発明の N - 末端 APP 可溶性フラグメントまたはその C - 末端フラグメントの調製物あるいは本発明の前記 N - 末端 APP 可溶性フラグメントまたはその前記 C - 末端フラグメントをコードする核酸調製物を動物に免疫すること ;

(b) 工程 (a) の免疫化によって生成される抗体を得ること ;

(c) 本発明の N - 末端 APP 可溶性フラグメントの特異的認識について、工程 (b) において得られる抗体をスクリーニングすること、

を含んでなる。

【 0056 】

本発明はさらに、上記方法によって得ることのできる抗体に関する。

【 0057 】

用語「特異的認識」、「特異的に認識する」、「特異的に結合する」、「特異的に反応する」または「特異的に免疫学的反応を形成する」は、他のタンパク質および / または生物製剤の異種集団の存在下において、試験されるサンプルにおける、それぞれ、 N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 - アミロイド変異体あるいは N - 末端 APP 可溶性フラグメントの存在の決定因子である、それぞれ、 N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 - アミロイド変異体あるいは N - 末端 APP 可溶性フラグメントに対する抗体による結合反応を指す。従って、指定されたイムノアッセイ条件下では、特定の抗体は、 N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 - アミロイド変異体あるいは本発明の N - 末端 APP 可溶性フラグメントに好適に結合する一方、他のタンパク質またはタンパク質イソ型に対する結合は、有意な量では生じない。好適な実施態様では、特定の抗体は、 N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 - アミロイド変異体あるいは本発明の N - 末端 APP 可溶性フラグメントに好適に結合する一方、正常、非病理学的 A または正常な N - 末端 APP フラグメントに対する結合は、有意な量では生じない。

【 0058 】

本明細書において使用する「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによって実質的にコードされる 1 つもしくはそれ以上のペプチドよりなるタンパク質を指す。認識される免疫グロブリン遺伝子は、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 、 τ および μ 定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、または のいずれかに分類される。重鎖は、 κ 、 λ 、 μ 、 τ 、 γ または α に分類され、それぞれこの順で、免疫グロブリンクラス、 IgG 、 IgM 、 IgA 、 IgD 、および IgE

10

20

30

40

50

Eを規定する。基本的な免疫グロブリン(抗体)の構造単位は、四量体または二量体を含んでなることが公知である。各四量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一な対よりなり、各対は、1本の「軽鎖」(約25kD)および1本の「重鎖」(約50~70kD)を有する。各鎖のN-末端は、主に抗原認識を担う約100~110もしくはそれ以上のアミノ酸の可変領域を規定する。用語「可変軽鎖(V_L)」および「可変重鎖(V_H)」は、それぞれ、軽および重鎖のこれらの可変領域を指す。必要であれば、抗体または抗体の免疫学的部分は、他のタンパク質に化学的にコンジュゲートするか、または他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることができる。

【0059】

本発明の抗体として、ポリクローナル、モノクローナル、二重特異性、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、单一可変フラグメント(ssFv)、単一鎖フラグメント(scFv)、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリーによって產生されるフラグメント、抗イデオタイプ抗体および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントが挙げられるが、これらに限定されず、但し、それらは、本来の結合特性を保持する。また、ミニ抗体および二重特異性抗体、三重特異性抗体、4価抗体および五重特異性抗体などの多価抗体を本発明の方法に使用することができる。これらのフラグメントおよび多価抗体の調製ならびに使用については、国際特許出願国際公開第98/29442号パンフレットに広範に記載されている。本発明の免疫グロブリン分子は、任意のクラス(即ち、IgG、IgE、IgM、IgDおよびIgA)またはサブクラスの免疫グロブリン分子であることができる。

【0060】

N-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体、そのN-末端フラグメント、本発明のN-末端APP可溶性フラグメントもしくはそのC-末端フラグメントを免疫原として使用し、そのような免疫原に特異的に結合する本発明の抗体を作製することができる。前記N-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体、そのN-末端フラグメント、本発明のN-末端APP可溶性フラグメントもしくはそのC-末端フラグメントによる注入のために、ウサギ、マウス、ラットなどを含むがそれに限定されない多様な動物に免疫することができる。免疫学的応答を増強するために、宿主種に依存して、完全または不完全フロイントアジュvant、水酸化アルミニウムなどの鉱物ゲル、リゾレシチンなどの表面活性物質、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホールリンベットヘモシアニン、ジニトロフェノール、またはBCG(ウシ型弱毒結核菌ワクチン)もしくはコリネバクテリウム・パルヴムなどのアジュvantを含んでなるがこれらに限定されない多様なアジュvantを使用することができる。モノクローナル抗体の調製のために、培養中の連続細胞株による抗体分子の調製のための任意の技術を使用することができる。抗原による適切なドナー、一般にマウスの過剰免疫を行う。次いで、脾臓抗体産生細胞の単離を行う。これらの細胞を、骨髄腫細胞などの不死を特徴とする細胞と融合させ、培養中に維持することができ、必要とされるモノクローナル抗体を分泌する融合細胞雑種(ハイブリドーマ)を提供する。次いで、細胞を大量培養し、使用のために培養培地から物を回収する。特定の技術として、コラー(Kohler)およびマイルスタン(Milstein)(1975)が開発したハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(コズボール(Kozbor)ら、1983)またはヒトモノクローナル抗体を產生するためのEBV-ハイブリドーマ技術(コレ(Cole)ら、1985)が挙げられるが、これらに限定されない。所望の抗体のスクリーニングは、ELISAなどの当該分野において公知の技術によって行うことができる。N-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントに特異的に結合するが、別のタンパク質、正常Aペプチドまたは正常N-末端APP可溶性フラグメントには特異的に結合しない抗体の選択は、第1のタンパク質に対してポジティブに結合し、第2のタンパク質に対する結合を欠如することに基づいて行われる。従って、特定の実施態様では、本発明は、別のタンパク質に対するよりも大きな親和性(詳細には、少なくとも2倍、より詳細には少なくとも5倍、さらにより詳細には少なくとも10倍大きな親和性

10

20

30

40

50

) で N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 可溶性フラグメントに結合する抗体を提供する。別の好適な実施態様では、本発明は、正常 A ペプチドまたは正常 N - 末端 APP 可溶性フラグメントに対するよりも大きな親和性(詳細には、少なくとも 2 倍、より詳細には少なくとも 5 倍、さらにより詳細には少なくとも 10 倍大きな親和性)で N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 变異体あるいは本発明の N - 末端 APP 可溶性フラグメントに結合する抗体を提供する。

【 0 0 6 1 】

パパイン、ペプシンまたは他のプロテアーゼによる無傷な (intact) 抗体の酵素的消化について、多様な抗体フラグメントが規定されているが、当業者であれば、そのような抗体フラグメントならびにフルサイズの抗体は、化学的または組換え DNA 方法論を利用することによって、デノボ合成できることを理解するであろう。従って、本明細書で使用する用語である抗体はまた、抗体全体の修飾によって生成されるかまたは組換え DNA 方法論を使用してデノボ合成されるかのいずれかである抗体および抗体フラグメントを含む。

【 0 0 6 2 】

用語「ヒト化抗体」は、免疫グロブリンのフレームワーク部分領域の少なくとも一部がヒト免疫グロブリン配列由来であることを意味する。マウスモノクローナル抗体のヒト化バージョンは、例えば、H または L 鎮をコードするマウスおよび / またはヒトゲノム DNA 配列あるいは H および L 鎮をコードする cDNA クローンから出発する組換え DNA 技術によって作製することができる。ヒト化形態のマウス抗体は、組換え DNA 技術によって、非ヒト抗体の CDR 領域をヒト定常領域に連結することにより作製することができる(クイーン (Queen) ら、1989; 国際公開第 90/07861 号パンフレット)。あるいは、本発明において使用されるモノクローナル抗体はヒトモノクローナル抗体であってもよい。ヒト抗体は、例えば、ファージディスプレイ法を使用して、得ることができる(国際公開第 91/17271 号パンフレット; 国際公開第 92/01047 号パンフレット)。これらの方では、メンバーがそれらの該表面上で異なる抗体を提示するファージのライブラリーが生成される。抗体は、通常、Fv または Fab として提示される。所望の特異性を有するファージ提示抗体は、N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A

ペプチドあるいは本発明の APP 可溶性フラグメント(もしくはその C - 末端フラグメント)に対するアフィニティー富化によって選択される。N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチドあるいは APP 可溶性フラグメントに対するヒト抗体は、少なくともヒト免疫グロブリン座位のセグメントおよび不活性型内因性免疫グロブリン座位をコードする導入遺伝子を有する非ヒトトランスジェニック哺乳動物からも産生させることができる(WO93/12227; 国際公開第 91/10741 号パンフレット)。ヒト抗体は、競合的結合実験によって、またはそうでなければ、特定のマウス抗体として同じエピトープ特異性を有するように選択することができる。そのような抗体は、特に、マウス抗体の有用な機能的特性を共有すると思われる。ヒトポリクローナル抗体もまた、免疫原性因子を免疫したヒト由来の血清の形態で提供することができる。必要であれば、そのようなポリクローナル抗体は、アフィニティー試薬として N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチドあるいは N - 末端 APP 可溶性フラグメントもしくはその C - 末端フラグメントを使用するアフィニティー精製によって濃縮することができる。モノクローナル抗体は、国際公開第 99/60846 号パンフレットに記載の技術に従って血清から得ることができる。

【 0 0 6 3 】

ワクチンおよび治療組成物

上記のように、本発明は、哺乳動物において、前記哺乳動物における免疫応答の誘導による - アミロイド形成および / または凝集を特徴とする疾患を防止ならびに処置するための調製物ならびに方法を提供する。従って、本発明はまた、上記の N - 末端短縮および / もしくは翻訳後修飾 A ペプチドを含んでなるか、上記の N - 末端短縮および / もしくは翻訳後修飾 A ペプチドに特異的な抗体または T 細胞を含んでなるか、あるいは上記の

10

20

30

40

50

N - 末端短縮および / もしくは翻訳後修飾 A ペプチドをコードする核酸を含んでなるワクチン組成物あるいは治療組成物を提供する。

【 0 0 6 4 】

本明細書で使用する用語「疾患を防止する」は、疾患の発症を阻害または覆すこと、疾患の初期徵候（即ち、A 変異体の形成および / または凝集）を阻害または覆すこと、疾患の臨床症状の出現を阻害または覆することを意味する。本明細書で使用する用語「疾患を処置する」は、疾患を実質的に阻害するか、疾患の進行を実質的に遅らせるもしくは覆すか、疾患の臨床症状を実質的に改善するかまたは疾患の臨床症状の出現を実質的に防止することを含む。

【 0 0 6 5 】

本発明において実験される哺乳動物は、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、サル、ウサギ、ノウサギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ヘラジカ、シカ、またはトラなどの非ヒト哺乳動物であってもよい。好適な実施態様では、哺乳動物は靈長類である。別の好適な実施態様では、哺乳動物はヒトであり、より好ましくは、哺乳動物はヒト成人である。

【 0 0 6 6 】

本発明のワクチンまたは治療組成物は、本発明の特異的な N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチドに対する免役応答を誘導する。免疫原に対して反応性である抗体または T 細胞を誘導するために免疫原を投与する場合、免疫応答の誘導は「能動的」である。哺乳動物においてそれ自体が N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体に結合する抗体を投与する場合、免疫応答の誘導は「受動的」である。

【 0 0 6 7 】

従って、本発明のワクチンまたは治療組成物はまた、本発明の N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体に特異的に結合する抗体を含んでなる。

【 0 0 6 8 】

さらに、本発明の N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチドに対する免疫応答はまた、前記 N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチドをコードするか、あるいは前記 N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチドを特異的に認識する組換え抗体をコードする核酸の投与によって誘導することができる。そのような核酸は、D N A または R N A であることができる。C N S の細胞への組換え D N A 分子の導入を容易にするために、組換え D N A 分子と関連して、遺伝子送達のための多くの異なる手段を使用することができる。用語「遺伝子送達のための手段」は、血液脳閂門を横切る D N A 分子の送達および / または細胞膜を横切る膜貫通送達に適切な任意の技術を含むことを意味する。遺伝子送達のための非制限的例にウイルスベクター（例えば、アデノ随伴ウイルスベースベクター、脂質 / リポソーム、細胞表面受容体に対するリガンドなど）がある。免疫原をコードする D N A 、または該 D N A を含有するベクターは、リポソームにパッケージすることができる。適切な脂質および関連類似体については、米国特許第 5 , 2 0 8 , 0 3 6 号明細書、同第 5 , 2 6 4 , 6 1 8 号明細書、同第 5 , 2 7 9 , 8 3 3 号明細書および同第 5 , 2 8 3 , 1 8 5 号明細書に記載されている。ベクターおよび免疫原をコードする D N A はまた、粒状キャリアに吸着または会合させることができ、該粒状キャリアの例として、ポリメチルメタクリレートポリマーおよびポリラクチドならびにポリ (ラクチド - コ - グリコリド) (マクジー (M c G e e) ら、 1 9 9 6) が挙げられる。個体患者への投与、典型的に、全身投与（例えば、静脈内、腹膜内、鼻、胃、皮内、筋肉内、皮下、もしくは頭蓋内輸滴）または局所適用（例えば、米国特許第 5 , 3 9 9 , 3 4 6 号明細書を参照のこと）によって、遺伝子療法ベクターまたは裸の D N A を送達することができる。D N A はまた、遺伝子銃を使用して、投与することができる（シャオ (X i a o) およびブランドスマ (B r a n d s m a) 、 1 9 9 6 ）。免疫原をコードする D N A を、微小な金属ビーズの表面上に沈殿させる。マイクロプロジェクタイルは、衝撃はまたはヘリウムガスを膨張させることによって加速され、いくらかの細胞層の深さにまで組織に貫通する。例えば、アガセタス・インク (A g a c e t u s , I n c .) (米国、ウィスコンシン州、ミドルトン (M i d d l e t o n W I , U S)) により製造されたジ・アクセル

10

20

30

40

50

(The AccelTM) 遺伝子送達デバイスが適切である。あるいは、単純に、化学的または機械的刺激によりDNAを皮膚にスポットすることによって、裸のDNAを皮膚を介して血流に通過させることができる(国際公開第95/05853号パンフレット)。さらなる変体では、N-末端短縮および/または翻訳後修飾ペプチドをコードするか、あるいは前記N-末端短縮および/または翻訳後修飾ペプチドを特異的に認識する組換え抗体をエクスピボで細胞に送達することができ、ここで細胞は個体患者から外植した細胞(例えば、リンパ球、骨髄吸引、組織生検)または万能給血者の造血幹細胞であり、続いて、通常、ベクターを組み入れている細胞の選択後、細胞は患者に再移植される。

【0069】

さらなる変異体では、N-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドは、ウイルスあるいは細菌ワクチンとして提示することができる。免疫原性ペプチドをコードする核酸は、ウイルスまたは細菌のゲノムもしくはエピソームに組み入れられる。必要であれば、ペプチドが提示されるように、免疫原性ペプチドを分泌型タンパク質またはウイルスの外表面タンパク質もしくは細菌の膜貫通タンパク質との融合タンパク質として発現させる様式で、核酸が組み入れられる(フレンケル(Frenkel)ら、2000; 2001; 国際公開第01/18169号パンフレット)。そのような方法において使用されるウイルスまたは細菌は、非病原性または弱毒型であるべきである。適切なウイルスとして、糸状バクテリオファージなどのバクテリオファージ、アデノウイルス、HSV、ワクシニアウイルス、および鶏痘が挙げられる。HBVのHBsAgへの免疫原性ペプチドの融合は特に適切である。

【0070】

本発明のワクチンおよび/または治療組成物はまた、本発明のN-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドに結合するT細胞を含んでなる。例えば、昆虫細胞からヒトMHCクラスI遺伝子およびヒト2マイクログロブリン遺伝子を発現させることによって、前記ペプチドに対しT細胞を活性化することができる。細胞の表面上に、本発明のN-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドを充填することができる空の複合体が形成される。細胞株に接触したT細胞は、本発明のペプチドに対して特異的に活性化される(米国特許第5,314,813号明細書)。CD4 T細胞を活性化するために、MHCクラスII抗原を発現する昆虫細胞株も同様に使用することができる。

【0071】

予防アプリケーションでは、-アミロイド形成および/または凝集に関連する疾患にかかり易いか、あるいは該疾患を発展する危険性にある哺乳動物に、前記疾患の危険性を除去もしくは減少するかまたは発症を遅らせるのに十分な量で、ワクチン組成物が投与される。治療適用では、そのような疾患にかかり易いか、あるいは該疾患をすでに患っている哺乳動物に、疾患の症状およびその合併症を治癒するか、または部分的に停止するのに十分な量で、組成物が投与される。これを達成するのに適切な量は、治療または薬学的有用量として規定される。予防および治療レジメの両方において、十分な免疫応答が達成されるまで、薬剤は、通常、数回の投薬で投与される。典型的に、免疫応答はモニターされ、免疫応答が失効し始める場合、反復投薬される。

【0072】

本発明のワクチンおよび治療組成物の有用量は、投与の手段、標的部位、哺乳動物の生理学的部位、患者がヒトであるかまたは動物であるかどうか、投与される他の医薬品、および処置が予防的であるかまたは治療的であるかどうかを含む異なる多くの要因に依存して変動する。処置は、安全性および効力を最適化するために滴定する必要がある。免疫原の量は、アジュvantも投与されるかどうかに依存し、アジュvantが存在しない場合はより高い用量が必要とされる。投与のための免疫原の量は、しばしば、哺乳動物あたり1~500μgで変動し、より通常的には、ヒト投与のための注入あたり5~500μgで変動する。時折、注入あたり1~2mgのより高い容量が使用される。典型的に、それぞれのヒトへの注入に対し、約10、20、50または100μgが使用される。注入のタイミングは、1日に1回から1年に1回、10年に1回まで有意に変動することができ

10

20

30

40

50

る。免疫原の投薬が行われる任意の所定の日では、アジュバントも投与される場合、用量は $1 \mu g$ / 患者を超える、通常 $10 \mu g$ / 患者を超える。アジュバントが存在しない場合、用量は $10 \mu g$ / 患者を超える、通常 $100 \mu g$ / 患者を超える。典型的なレジメンは、免疫化に続いて6週間間隔での追加注入よりなる。別のレジメンは、免疫化に続いて1、2および12ヶ月後の追加注入よりなる。別のレジメンは、生涯にわたって2ヵ月ごとの注入よりなる。あるいは、追加注入は、免疫応答のモニタリングに従って不定期で行うことができる。

【0073】

抗体による受動免疫のために、用量は、約 $0.0001 \sim 100 mg / kg$ の範囲であり、より通常的には、 $0.01 \sim 5 mg / kg$ の宿主の体重の範囲である。免疫原をコードする核酸の用量は、患者あたり約 $10 ng \sim 1 g$ 、 $100 ng \sim 100 mg$ 、 $1 \mu g \sim 10 mg$ 、または $30 \sim 300 \mu g$ のDNAの範囲である。感染ウイルスベクターの用量は、投薬あたり $10 \sim 10^9$ もしくはそれ以上で変動する。

【0074】

免疫応答のための薬剤は、予防および/または治療処置のために、非経口、局所、静脈内、経口、皮下、腹腔内、鼻内、または筋肉内手段によって投与することができる。最も典型的な投与経路は皮下であるが、他も同等に有効である。次に最も一般的なものは、筋肉内注入である。このタイプの注入は、上肢または下肢の筋肉において最も典型的に実施される。静脈内注入ならびに腹腔内注入、動脈内、頭蓋内、または皮内注入もまた、免役応答を生じさせるのに有効である。いくつかの方法では、薬剤は、沈着物が累積する特定の組織に直接注入される。鼻内免疫化は、野生型マウスにおける抗A抗体の産生を増加するために首尾よく使用された(レメレ(Lemere)ら、2000b、c)。

【0075】

本発明のワクチンおよび治療組成物は、必要であれば - アミロイド形成および/または凝集に関連する疾患の処置に少なくとも有効である他の薬剤を含んでなることができる。脳において - アミロイド凝集が生じるアルツハイマー病およびダウン症候群の場合、本発明のワクチンおよび治療組成物はまた、本発明の有効成分の血液脳関門への通過を増加させる他の薬剤を含んでなってもよい。例えば、ストランド抗菌性ペプチドのファミリーに属するペプチド、プロテグリンPG-1は、治療化合物を真核細胞に送達するために首尾よく使用されている(ドリン(Drinn)およびテムサマニ(Temsamani)、2002)。血液脳関門への薬物送達を増強するための他のストラテジー、具体的には、ベクター仲介ストラテジーは、テサマニー(Temsamani)ら(2001)が再検討している。

【0076】

ペプチドなどの本発明の免疫原性薬剤は、時々、アジュバントと併用して投与される。用語「アジュバント」は、抗原と共に投与される場合、抗原に対する免役応答を増加するが、単独で投与される場合は抗原に対する免疫応答を生じない化合物を指す。アジュバントは、リンパ球補充、Bおよび/またはT細胞の刺激、ならびにマクロファージの刺激を含むいくらかの機構によって免役応答を増加することができる。免役応答を誘発するために、本発明のN-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドと併用して、様々なアジュバントを使用することができる。好適なアジュバントは、応答の質的形態に影響を及ぼす免疫原のコンホーメーション変化を引き起こすことなく、免疫原に対する固有の応答を増加する。好適なアジュバントは、ミョウバン、3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質A(MPL)を含む(GB2220211号明細書)。QS21は、南アメリカで見出されるキラヤ(Quillaja saponaria Molina)木の樹皮から単離されるトリテルペングリコシドまたはサポニンである(ケンシリ(Kensi1)ら、1995;米国特許第5,057,540号明細書)。他のアジュバントは、必要であれば、モノホスホリル脂質Aなどの免疫刺激物質と併用される(スクアレンまたはピーナツ油などの)水中油型乳剤である(スタウテ(Stoute)ら、1997)。別のアジュバントはCpGである(デイビス(Davis)ら、1998)。あるいは、N-末端短縮

10

20

30

40

50

および／または翻訳後修飾A ペプチドをアジュバントに結合させることができる。例えば、N-末端短縮および／または翻訳後修飾A ペプチドのリポペプチドバージョンは、D型肝炎抗原ワクチン化について記載されている（リビングストン（Livingston）ら、1997）ように、パルミチン酸または他の脂質を直接N-末端短縮および／または翻訳後修飾A ペプチドに結合させることによって、調製することができる。しかし、そのような結合は、免疫応答の性質に影響を及ぼすように、N-末端短縮および／または翻訳後修飾A ペプチドのコンホメーションを実質的に変化させるべきではない。

【0077】

アジュバントの好適なクラスは、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなどのアルミニウム塩（ミョウバン）である。そのようなアジュバントは、MPLまたは3-DMP、QS21、ポリグルタミン酸もしくはポリリジンなどのポリマー性またはモノマー性アミノ酸を伴うかあるいは伴わずに使用することができる。別のクラスのアジュバントは、水中油型乳剤处方である。そのようなアジュバントは、ムラミルペプチド（例えば、N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン（thr-MDP）、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン（nor-MDP）、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-（1'-2'ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ）-エチルアミン（MTP-PE）、N-アセチルグルコサミニル-N-アセチルムラミル（acetyl inuramyl）-L-Ala-D-Isoglu-L-Ala-ジパルミトイキシプロピルアミド（DTP-DPP）セラミドTM）（ボーゲル（Vogel）ら、2003）、または他の細胞壁成分などの他の特定の免疫刺激剤伴うかあるいは伴わずに使用することができる。水中油型乳剤は、（a）モデル（Model）110Yマイクロフルイダイザー（マイクロフルイディスク（Microfluidics）、米国、マサチューセッツ州、ニュートン（Newton, MA, US））などのマイクロフルイダイザーを使用して、サブミクロン粒子に処方された5%スクアレン、0.5%ツイーン（Tween）80、および0.5%スパン（Span）85を含有するMF59（必要であれば多様な量のMTP-PEを含有する）（国際公開第90/14837号パンフレット）、（b）サブミクロン乳剤にマイクロフルダイズされたかまたはより大きな粒子サイズの乳剤を作製するためにボルテックス攪拌された10%スクアレン、0.4%ツイーン（Tween）80、5%ブルロニックブロック化ポリマー-L121およびthr-MDPを含有するSAF、ならびに（c）2%スクアレン、0.2%ツイーン（Tween）80、およびモノホスホリル脂質A（MPL）、トレハロースジミコレート（TDM）、および細胞壁骨格（CWS）、好ましくはMPL+CWS（デトックス（Detox）TM）よりなる群由来の1つもしくはそれ以上の細菌細胞壁成分を含有するリビ（Rib）TMアジュバントシステム（RAS）、（リビ・イムノケム（Ribii Immunochem）、米国、モンタナ州、ハミルトン（Hamilton, MT, US））を含む。

【0078】

好適なアジュバントの別の好適なクラスは、ステミュロン（Stimulon）TM（QS21、アクイラ（Aquila）、マサチューセッツ州、ウォルスター（Worcester, MA））などのサポニアアジュバントまたはISCOM（免疫刺激複合体）およびイスコマトリックス（ISCOMATRIX）などのそれらから作製される粒子である。他のアジュバントは、完全フロイントアジュバント（CFA）および不完全フロイントアジュバント（IFA）を含む。他のアジュバントは、インターロイキン（IL-1、IL-2、およびIL-12）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、ならびに腫瘍死因子（TNF）などのサイトカインを含む。公開された粘膜アジュバントは、約80%相同であるコレラ毒素（CT）および大腸菌（E. coli）LTなどの細菌エンテロトキシンを含む（ダラス（Dallas）およびファルコー（Falkow）、1980）。

【0079】

10

20

30

40

50

アジュバントは、単一の組成物として免疫原と共に投与することができるか、または免疫原の投与前、同時もしくは後に投与することができる。免疫原およびアジュバントは、同じバイアルに包装および供給することができるか、またはいくらかの個別のバイアルに包装し、使用前に混合することができる。免疫原およびアジュバントは、目的の使用アプリケーションを示す標識と共に典型的に包装される。免疫原およびアジュバントが個別に包装される場合、パッケージングは、典型的に、使用前の混合のための取り扱い説明書を含む。アジュバントおよび／またはキャリアの選択は、アジュバントを含有するワクチンの安定性、投与経路、投薬スケジュール、ワクチン化されるシユに対するアジュバントの効力に依存し、ヒトでは、薬学的に許容可能なアジュバントは、承認されているアジュバントであるか、または適切な規制団体によってヒトへの投与が承認されている。例えば、完全フロイントアジュバントは、ヒトへの投与は適切ではない。ミョウバン、MPLおよびQS21は好適である。必要であれば、2つもしくはそれ以上の異なるアジュバントを同時に使用することができる。好適な組み合わせとして、ミョウバンおよびMPL、ミョウバンおよびQS21、MPLおよびQS21、ならびにミョウバン、QS21およびMPLが挙げられる。また、不完全フロイントアジュバントは、必要であれば、ミョウバン、QS21、およびMPLのいずれか、ならびにそれらのすべての組み合わせと併用して使用することができる（ジェンセン（Jensen）ら、1998）。

10

20

【0080】

ワクチンおよび／または治療組成物の好適な形態は、投与およびアプリケーションの目的の様に依存する。組成物はまた、所望される処方に依存して、動物またはヒトへの投与のための薬学的組成物を処方するのに使用されるビヒクルとして規定される薬学的に許容可能な非毒性キャリアまたは希釈剤を含む。希釈剤は、組み合わせの生物学的活性に影響を及ぼさないように選択される。そのような希釈剤の例として、蒸留水、リン酸緩衝化生理食塩水、リングル液、デキストロース溶液およびハンクス液が挙げられる。さらに、薬学的組成物および処方物はまた、他のキャリア、アジュバント、または非毒性、非治療性、非免疫原性安定化剤などを含んでもよい。

30

30

【0081】

ワクチンまたは薬学的組成物はまた、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびコポリマー（ラテックス官能基化セファロース、アガロース、セルロースなど）などの大きな、緩徐に代謝される巨大分子、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマー、ならびに脂質凝集体（油敵またはリポソームなど）を含むことができる。さらに、これらのキャリアは、免疫刺激剤（即ち、アジュバント）として機能することができる。

40

【0082】

非経口投与のために、本発明の組成物は、水、油、食塩水、グリセロール、もしくはエタノールなどの滅菌液体であり得る薬学的キャリアと共に生理学的に許容可能な希釈剤中物質の溶液または懸濁液の注入可能な調剤として、投与することができる。また、生分解性微粒子へのカプセル化を、非経口送達系として使用することができる（ブライデン（B rayden）ら、2001）。

40

【0083】

さらに、湿潤または乳化剤、界面活性剤、pH緩衝化物質などの補助物質は、ワクチンおよび／または治療組成物中に存在させることができる。薬学的組成物の他の成分は、石油、動物、植物、または合成由来の組成物、例えば、ピーナツ油、ダイズ油、および鉱油である。一般に、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールは、特に注入用溶液に好適な液体キャリアである。

50

【0084】

典型的に、組成物は、液体の溶液または懸濁液のいずれかとして、注入用として調製される。注入前の液体ビヒクルにおける溶液または懸濁液に適切な固体形態を調製することもできる。調製物はまた、上記のように、アジュバント効果の増強のために、リポソームまたはポリラクチド、ポリグリコリド、もしくはコポリマーなどの微粒子に乳化あるいはカプセル化することができる（ランガー（Langer）、1990；ランガー（Lan

50

g e r) ら、 1 9 9 7) 。本発明の組成物は、 有効成分の徐放または周期性放出を可能にするような様式で処方することができる蓄積注入またはインプラント調製物の形態で投与することができる。

【 0 0 8 5 】

他の投与態様に適切な更なる処方物として、 経口、 経鼻、 および肺処方物、 座剤、 および経皮アプリケーションが挙げられる。 座剤では、 結合剤およびキャリアは、 例えば、 ポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドを含む。 そのような座剤は、 0 . 5 % ~ 1 0 % の範囲で有効成分を含有する混合物から形成することが可能である。 経口処方物は、 薬剤用マンニトール、 ラクトース、 デンプン、 ステアリン酸マグネシウム、 サッカリソルトウム、 セルロース、 および炭酸マグネシウムなどの賦形剤を含む。 これらの組成物は、 溶液、 懸濁液、 錠剤、 ピル、 カプセル、 徐放処方物、 または散剤の形態を取り、 1 0 % ~ 9 5 % 、 好ましくは 2 5 % ~ 7 0 % の有効成分を含有する。

【 0 0 8 6 】

局所アプリケーションは経皮または皮内送達を生じることができる。 局所投与は、 薬剤とコレラ毒素またはその無毒化誘導体もしくはサブユニットあるいは他の類似の細菌毒素との同時投与によって容易にすることができます (グレン (G l e n n) ら、 1 9 9 8) 。 同時投与は、 混合物または化学架橋もしくは融合タンパク質としての発現によって得られる連結された分子として使用することによって、 達成することができます。

【 0 0 8 7 】

あるいは、 経皮送達は、 皮膚パッチまたはトランスフェロソーム (t r a n s f e r o s o m e) を使用して達成することができる (ポール (P a u l) ら、 1 9 9 5 ; セベク (C e v c) ら、 1 9 9 8) 。

【 0 0 8 8 】

薬物の処方および投与のためのさらなる技術は、「 R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s 」においても見出すことができる。

【 0 0 8 9 】

従って、 本発明のワクチンおよび治療組成物は、 - アミロイド形成および / または凝集に関連する任意の疾患の防止ならびに / あるいは処置に使用することができます。 好適な実施態様では、 本発明のワクチンおよび治療組成物は、 アルツハイマー病またはダウン症候群の防止および / または処置に使用される。

【 0 0 9 0 】

従って、 本発明は、 - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患の防止のための予防ワクチンとしての使用のための上記の N - 末端短縮および / もしくは翻訳後修飾 A ペプチド、 上記の N - 末端短縮および / もしくは翻訳後修飾 A ペプチドに特異的な抗体または T 細胞、 あるいは、 上記の N - 末端短縮および / もしくは翻訳後修飾 A ペプチドをコードする核酸に関する。 従って、 本発明はまた、 - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患の防止のための予防ワクチンの製造のための上記で考察した N - 末端短縮および / もしくは翻訳後修飾 A ペプチド、 上記で考察した N - 末端短縮および / もしくは翻訳後修飾 A ペプチドに特異的な抗体または T 細胞、 あるいは上記で考察した N - 末端短縮および / もしくは翻訳後修飾 A ペプチドをコードする核酸の使用に関する。

【 0 0 9 1 】

非痴呆のヒトでは、 いずれの年齢 (例えは、 1 0 、 2 0 、 3 0 歳) においても予防を開始することができる。 しかし、 通常、 患者が 4 0 、 5 0 、 6 0 、 または 7 0 歳の年齢に達するまでは、 予防を開始する必要はない。 典型的に、 予防は、 ある期間にわたる複数の投薬を包含する。 応答は、 抗体、 あるいは N - 末端短縮および / もしくは翻訳後修飾ペプチドに対する活性化された T 細胞または B 細胞応答を経時的にアッセイすることによって、 モニターすることができる (以下を参照のこと) 。 応答が低下する場合、 追加投薬が指示される。

【 0 0 9 2 】

10

20

30

40

50

本発明はさらに、¹⁰ -アミロイド形成および/または凝集に関連する疾患の処置のための治療薬としての使用のための上記で考察したN-末端短縮および/または翻訳後修飾A

ペプチド、上記で考察したN-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドに特異的な抗体、あるいは上記で考察したN-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドをコードする核酸の使用に関する。従って、本発明はまた、²⁰ -アミロイド形成および/または凝集に関連する疾患の処置のための治療薬の製造のための上記で考察したN-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチド、上記で考察したN-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドに特異的な抗体、あるいは上記で考察したN-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドをコードする核酸の使用に関する。

【0093】

したがって、本発明はまた、哺乳動物における、³⁰ -アミロイド形成および/または凝集に関連する疾患の防止ならびに/あるいは処置のための方法を包含し、前記方法は、上記のワクチン組成物または治療組成物の前記哺乳動物への投与を包含する。

【0094】

診断および療法診断キット

本発明の別の局面は、上記のN-末端短縮および/または翻訳後修飾ペプチドの調製物を含んでなるか、上記の本発明のN-末端APP可溶性フラグメントまたはそのC-末端フラグメントの調製物を含んでなるか、あるいは、前記ペプチドまたはフラグメントを特異的認識する抗体を含んでなる診断および療法診断(theranostic)キットに関する。

【0095】

1つの実施態様では、キットは、N-末端短縮および/もしくは翻訳後修飾Aペプチドを認識するかまたは本発明のN-末端APP可溶性フラグメント(もしくはそのC-末端フラグメント)を認識するか抗体に特異的に結合するか、あるいはN-末端短縮および/もしくは翻訳後修飾Aペプチドに特異的であるかまたは本発明のN-末端APP可溶性フラグメント(もしくはそのC-末端フラグメント)に特異的であるT細胞に反応するペプチドあるいはペプチドフラグメントを含有する。キットはまた、典型的には、標識を含んでもよい(以下を参照のこと)。N-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドあるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメント(またはそのC-末端フラグメント)に対する抗体の検出のために、標識は、典型的に、標識された抗Ig抗体の形態である。抗体の検出のために、N-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドあるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントまたはそのC-末端フラグメントは、マイクロタイターディッシュのウェルなどの固相に予め結合させて、供給することができる。

【0096】

反応性T細胞の検出のために、標識は、増殖応答を測定するための³⁰H-チミジンとして供給することができる。

【0097】

N-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドを含んでなる診断ならびに療法診断キットは、哺乳動物におけるN-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドに対する免役応答を検出する方法を援助する。免疫応答は、N-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドに特異的に結合する抗体あるいはT細胞の存在から決定することができる。哺乳動物に投与される処置の経過をモニタリングするための方法が特に有用である。キットは、症状のある患者に対する治療処置および症状のない患者に対する予防処置の両方をモニターするために使用することができる。従って、本発明は、それぞれ、本発明のワクチン組成物または治療組成物によるワクチン化または治療適用によって、哺乳動物において誘導される免疫応答の測定のための診断あるいは療法診断としての使用のためのN-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドを含んでなる調製物に関する。従つて、本発明はまた、それぞれ、本発明のワクチン組成物または治療組成物によるワクチン化または治療適用によって、哺乳動物において誘導される免疫応答の測定のための診断あるいは療法診断キットの製造のためのN-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドを含んでなる調製物の使用に関する。

10

20

30

40

50

【0098】

従って、本発明の診断または療法診断キットは、哺乳動物において、それぞれ、本発明のワクチン組成物または治療組成物によるワクチン化または治療適用によって誘導される免疫応答の測定のための方法を援助する。前記方法は、以下の工程：

(a) 前記哺乳動物から得られるサンプルにおいて、N-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドに特異的な抗体あるいは反応性T細胞の量を決定する工程；

(b) 工程(a)において決定される量と本発明のワクチンまたは治療組成物によるワクチン化または治療適用の前に哺乳動物に存在する前記N-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドに特異的な抗体あるいは反応性T細胞の量とを比較する工程；

(c) 工程(b)における比較から、哺乳動物がワクチン化または治療に応答しているかどうかを結論付ける工程であって、前記N-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドに特異的な抗体あるいは反応性T細胞の量の増加が、哺乳動物がワクチン化または治療に応答していることを示すものである工程、

を含んでなる。

【0099】

前記N-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドに特異的な抗体は、イムノアッセイによって検出することができる。本明細書で使用する「イムノアッセイ」は、抗原(即ち、N-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチド)に特異的に結合する抗体を利用するアッセイである。従って、イムノアッセイは、抗体に対するタンパク質の特異的結合の検出を特徴とする。免疫学的方法として、液体またはゲル沈降反応、免疫拡散(単純または二重)、凝集アッセイ、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素免疫吸着測定法(ELISA)、ウエスタンプロット、リポソームイムノアッセイ(モンロー(Monroe)ら、1986)、補体結合アッセイ、免疫放射線検定法、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ、またはイムノPCRが挙げられるが、これらに限定されない。異なるイムノアッセイの概観については、ワイルドD.(Wild D.)(2001)およびギンジリス(Ghindilis)ら、(2002)に掲載されている。

【0100】

特定のエピトープを認識するT細胞は、エピトープに対する応答でプライム化T細胞による³Hチミジンの組み入れによって(バーク(Burke)ら、1994)か、抗原依存性死滅によって(細胞障害性Tリンパ球アッセイ；ティギス(Tigges)ら、1996)か、またはサイトカイン分泌によって決定される抗原依存性増殖を測定するインビトロアッセイにより同定することができる。細胞介免疫学的応答の存在は、増殖アッセイ(CD4+ T細胞)またはCTL(細胞障害性Tリンパ球)アッセイ(バーク(Burke)ら、1994；ティギス(Tigges)ら、1996)によって決定することができる。

【0101】

方法は、ワクチンまたは治療組成物の製剤を投与する前の患者における免疫応答の基準値を決定し、これとワクチン化または治療後の免疫応答の値とを比較することを必要とする。免疫応答の値の有意な増加(即ち、より大きいとは、同じサンプルの反復測定における典型的実験誤差の範囲外にあることである)は、ポジティブなワクチン化または治療結果(即ち、ワクチンまたは治療組成物の投与が免役応答を達成もしくは増加していること)を示す。免疫応答の値が有意に変化しない、または減少する場合、ネガティブなワクチン化または治療結果が示される。一般に、ワクチンまたは治療組成物による処置をはじめて経験する患者は、連続投薬による免疫応答の増加を示し、究極的に安定期に達することが予測される。ワクチンまたは治療組成物の投与は、一般に継続される一方、免疫応答は増加している。安定期の達成は、投与の中止または用量もしくは回数の減少の指標である。

【0102】

用語「サンプル」は、生物学的材料の任意の供給源、例えば、体液、脳抽出物、末梢血

10

20

30

40

50

液、粘膜、あるいはN - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾A ペプチドに対する抗体または反応性T細胞を含んでなる他の任意のサンプルを指す。好適な実施態様では、哺乳動物の体液サンプルにおいて、前記抗体または反応性T細胞のレベルが決定される。用語「体液」は、検出すべき抗体または反応性T細胞を含んでなる血液、リンパ、尿、および髄液（CSF）を含むがこれらに限定されない哺乳動物の身体に存在するすべての液体を指す。用語「髄液」または「CSF」は、髄液全体または当業者に周知のその画分の誘導体を含むことが意図される。従って、髄液サンプルは、多様な分画された形態の髄液を含むことができるかまたは保存もしくは特定のアッセイにおけるプロセシングを用意するために添加された多様な希釈剤を含むことができる。そのような希釈剤は、当業者に周知であり、多様な緩衝剤、保存剤などを含む。別の好適な実施態様では、哺乳動物の血液サンプルにおいて抗体のレベルが検出される。血液サンプルは、血漿サンプルまたは血清サンプルを含むことができる。

【0103】

本発明の別の実施態様では、本発明の診断あるいは療法診断キットは、N - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾A 変異体を認識する抗体または本発明のN - 末端APP可溶性フラグメントに特異的に結合するかあるいはN - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾A 変異体または本発明のN - 末端APP可溶性フラグメントに特異的なT細胞に反応するペプチドあるいはペプチドフラグメントを含んでなる。N - 末端短縮および／または翻訳後修飾A ペプチド、本発明のN - 末端APP可溶性フラグメントまたはそのC - 末端フラグメントを含んでなる診断または療法診断キットは、-アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患にかかり易いかあるいは該疾患を発展する危険性にある哺乳動物を検出する方法を援助する。そのような疾患に対する感受性あるいは該疾患を発展する危険性は、N - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾A ペプチド、本発明のN - 末端APP可溶性フラグメントもしくはそのC - 末端フラグメントに特異的に結合する抗体またはT細胞の存在から決定することができる。従って、本発明は、哺乳動物における-アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患に対する感受性を決定するためか、あるいは哺乳動物における-アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患を発展する危険性を決定するための診断薬または療法診断薬としての使用のために、N - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾A ペプチド、本発明のN - 末端APP可溶性フラグメントもしくはそのC - 末端フラグメントを含んでなる調製物に関する。従って、本発明はまた、哺乳動物における-アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患に対する感受性を決定するためか、あるいは哺乳動物における-アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患を発展する危険性を決定するための診断薬または療法診断薬の製造のために、N - 末端短縮および／もしくは翻訳後修飾A ペプチド、本発明のN - 末端APP可溶性フラグメントもしくはそのC - 末端フラグメントを含んでなる調製物の使用に関する。

【0104】

従って、本発明の診断あるいは療法診断キットは、哺乳動物における-アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患に対する感受性を決定するためか、あるいは-アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患を発展する危険性の測定のための方法を援助する。前記方法は、以下の工程：

(a) 前記哺乳動物から得られるサンプルにおいて、N - 末端短縮および／または翻訳後修飾A ペプチド、本発明のN - 末端APP可溶性フラグメントまたはそのC - 末端フラグメントに特異的な抗体あるいは反応性T細胞の量を決定する工程；

(b) 工程(a)において決定される量とコントロール哺乳動物における前記抗体または反応性T細胞の量とを比較する工程；

(c) 工程(b)における比較から、哺乳動物が-アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患にかかり易いかどうか、あるいは哺乳動物が-アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患を発展する危険性にあるかどうかを結論付ける工程であって、前記N - 末端短縮および／または翻訳後修飾A ペプチド、本発明の前記N - 末端APP可溶性フラグメントまたはその前記C - 末端フラグメントに特異的な抗体あるいは反応性T細胞の量を決定する工程；

10

20

30

40

50

性 T 細胞の量の増加が、哺乳動物が - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患にかかり易いかあるいは該疾患を発展する危険性にあることを示すものである工程、を含んでなる。

【 0 1 0 5 】

別の実施態様では、本発明の診断あるいは療法診断キットは、N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチド、本発明の N - 末端 APP 可溶性フラグメントまたはその C - 末端フラグメントを特異的に認識する抗体を含んでなる。次いで、本キットは、哺乳動物における N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体あるいは本発明の N - 末端 APP 可溶性フラグメントのレベルを決定するために使用することができ、哺乳動物が - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患にかかり易いかどうか、哺乳動物が - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患を発展する危険性にあるかどうか、 - アミロイド沈着が浄化されているかどうか、あるいは前記哺乳動物における - アミロイド負荷のレベルを示す。従って、本発明は、哺乳動物における - アミロイド形成および / もしくは凝集に関連する疾患に対する感受性を決定するためか、哺乳動物における - アミロイド形成および / もしくは凝集に関連する疾患を発展する危険性を決定するためか、哺乳動物における - アミロイド沈着のクリアランスのスクリーニングのためか、または哺乳動物における - アミロイド負荷のレベルを予想するための診断薬あるいは療法診断薬としての使用のために、N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体あるいは本発明の N - 末端 APP 可溶性フラグメントを特異的に認識する抗体に関する。本発明はさらに、哺乳動物における - アミロイド形成および / もしくは凝集に関連する疾患に対する感受性を決定するためか、哺乳動物における - アミロイド形成および / もしくは凝集に関連する疾患を発展する危険性を決定するためか、哺乳動物における - アミロイド沈着のクリアランスのスクリーニングのためか、または哺乳動物における - アミロイド負荷のレベルを予想するための診断あるいは療法診断キットの製造のために、N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体あるいは本発明の N - 末端 APP 可溶性フラグメントを特異的に認識する抗体の使用に関する。

【 0 1 0 6 】

本発明の方法を行うための好適なキットは：

- 検出すべき N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体あるいは本発明の N - 末端 APP 可溶性フラグメントと免疫学的複合体を形成する抗体（1次抗体）；
- 検出すべき N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体あるいは本発明の N - 末端 APP 可溶性フラグメントを特異的に認識する抗体（2次抗体）；
- 前記 2 次抗体への特異的タグ付けまたは結合のいずれかのためのマーカー；
- 1 次抗体と N - 末端短縮および / もしくは翻訳後修飾 A 変異体または N - 末端 APP 可溶性フラグメントとの間、2 次抗体と 1 次抗体 - N - 末端短縮および / もしくは翻訳後修飾 A 変異体または - N - 末端 APP 可溶性フラグメント複合体との間ならびに / あるいは結合 2 次抗体とマーカーとの間の免疫学的反応を行うための適切な緩衝溶液；
- おそらく、標準化目的のために、精製された N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体あるいは精製された N - 末端 APP 可溶性フラグメント（またはその C - 末端フラグメント）、

を含んでなる。

【 0 1 0 7 】

本発明のキットは、哺乳動物における - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患に対する感受性を決定するためか、哺乳動物における - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患を発展する危険性を決定するためか、哺乳動物における - アミロイド沈着のクリアランスのスクリーニングのためか、あるいは哺乳動物における - アミロイド負荷のレベルを予想するための方法において使用することができる。前記方法は、以下の工程：

(a) 前記哺乳動物における N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A 変異体の量あるいは本発明の N - 末端 APP 可溶性フラグメントの量を決定する工程；

10

20

30

40

50

(b) 工程 (a) において決定される量とコントロール哺乳動物におけるN-末端短縮および / または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントの量とを比較する工程；

(c) 工程 (b) における比較から、哺乳動物が - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患にかかり易いかどうか、哺乳動物が - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患を発展する危険性にあるかどうか、哺乳動物における - アミロイド沈着が浄化されているかどうか、あるいは前記哺乳動物における - アミロイド負荷はどのレベルであるかを結論付ける工程、
を含んでなる。

【0108】

10

試験する哺乳動物の脳におけるN-末端短縮および / または翻訳後修飾A変異体のレベルの増加は、例えば、哺乳動物が、 - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患にかかり易いか、あるいは該疾患を発展する危険性にあることを示し得る。また、それは、哺乳動物におけるA沈着がまだ浄化されていないことも示し得る。ワクチン化又は治療後の所定の体液におけるN-末端短縮および / または翻訳後修飾A変異体のレベルの増加は、A負荷のレベルの増加を示す(デマトス (De Mattos) ら、2002)。N-末端APP可溶性フラグメントは、主に、所定の体液において見出される。これらのN-末端APP可溶性フラグメントの存在は、N-末端短縮A変異体を生じ、その結果、哺乳動物による - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患に対する感受性あるいは該疾患を発展する危険性が増加するAPPの異常な切断を示す。

20

【0109】

20

本発明の実施態様では、N-末端短縮および / または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントのレベルは、インビボ画像化によって決定することができる。薬剤またはリガンド(標識されたAペプチドまたは抗体)およびA沈着のインビボ画像化のための方法については、バックスカイ (Bacskai) ら(2002)により記載されており、N-末端短縮および / または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントの特異的かつ選択的検出に適応することができる。N-末端短縮および / または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントのレベルは、アービット (Arbit) ら(1995)、タマダ (T amada) ら(1995)、ワカバヤシ (Wakabayashi) ら(1995)、ファング (Huang) ら(1996)、サンドロック (Sandrock) ら(1996)、およびマリアーニ (Marianni) ら(1997)により記載されている脳画像化方法を含むがこれに限定されない非侵襲的方法によって、インサイチュで決定することができる。これらのインビボ画像化方法は、例えば、前記N-末端短縮および / または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントを特異的に認識するリガンドとしての標識抗体の使用によって(以下を参照のこと)、N-末端短縮および / または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントの位置決定および定量化を可能にすることができる。インビボ多光子顕微鏡(バックスカイ (Bacskai) ら、2001)は、N-末端短縮および / または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントに特異的な標識抗体を使用して、N-末端短縮および / または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントの存在の画像化に使用することができる。ラクダ科の哺乳動物の体液性免疫応答の部分として產生される重鎖可変ドメイン (VHH) は、上記の方法におけるリガンドとして特に有用であり得る。「ラクダ化」ヒトVHライブラリーから選択される組換えVHHは、N-末端短縮および / または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントのインビボ画像化のための優れたリガンドを構築し得る(スパイネル (Spine11i) ら、2000; マイルダーマンズ (Muyldermaans) ら、2001; コルテス - レタモゾ (Cortez-Retamozo) ら、2002)。A沈着のインビボ検出のための他の薬剤および方法については、ポダスロ (Poduslo) ら(2002)、スマール (Smal1) (2002)、およびペトレラ (Petrella) ら(2002)によ

30

40

50

(Petrella) ら (2003) によって記載されている。

【0110】

本発明の別の実施態様では、N-末端短縮および / または翻訳後修飾 A 变異体あるいは本発明の N-末端 APP 可溶性フラグメントのレベルは、哺乳動物から得られるサンプルにおいて、インピトロで決定することができる。従って、本発明はまた、N-末端短縮および / または翻訳後修飾 A 变異体の量あるいは本発明の N-末端 APP 可溶性フラグメントの量が哺乳動物から得られるサンプルに対して決定されることをさらに特徴とする、哺乳動物における - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患に対する感受性を決定するためか、 - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患を発展する危険性を決定するためか、哺乳動物における - アミロイド沈着のクリアランスのスクリーニングのためか、あるいは哺乳動物における - アミロイド負荷のレベルを予想するための方法に関する。従って、本発明は、以下の工程：

(a) 前記哺乳動物から得られるサンプルにおいて、N-末端短縮および / または翻訳後修飾 A 变異体あるいは本発明の N-末端 APP 可溶性フラグメントの量を決定する工程；

(b) 工程 (a) において決定される量とコントロール哺乳動物から得られる組織サンプルにおける N-末端短縮および / または翻訳後修飾 A 变異体あるいは本発明の N-末端 APP 可溶性フラグメントの量とを比較する工程；

(c) 工程 (b) における比較から、哺乳動物が - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患にかかり易いかどうか、哺乳動物が - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患を発展する危険性にあるかどうか、哺乳動物における - アミロイド沈着が浄化されているかどうか、あるいは前記哺乳動物における - アミロイド負荷はどのレベルであるかを結論付ける工程、

を含んでなる。

【0111】

本発明はさらに、哺乳動物における - アミロイドの負荷のレベルを予想するための方法 (デマトス (DeMato) ら、2002) に関し、前記方法は、以下の工程：

(a) 上記のワクチン組成物または治療組成物を前記哺乳動物に対して投与する工程；

(b) 前記哺乳動物から得られる生物学的液体サンプルにおいて、N-末端短縮および / または翻訳後修飾 - アミロイド变異体の量を決定する工程；

(c) 工程 (b) において決定される量とコントロール哺乳動物から得られる生物学的液体サンプルにおける前記 N-末端短縮および / または翻訳後修飾 - アミロイド变異体の量とを比較する工程；

(d) 工程 (c) における比較から、前記哺乳動物における - アミロイド負荷はどのレベルであるかを結論付ける工程、

を含んでなる。

【0112】

N-末端短縮および / または翻訳後修飾 - アミロイド变異体あるいは本発明の N-末端 APP 可溶性フラグメントのレベルは、上記で考察したイムノアッセイによって検出することができる。N-末端短縮および / または翻訳後修飾 A 变異体あるいは本発明の N-末端 APP 可溶性フラグメントを検出するためのイムノアッセイは、競合的であってもまたは非競合的であってもよい。非競合的イムノアッセイは、捕捉された分析物 (即ち、N-末端短縮および / または翻訳後修飾 A 变異体あるいは本発明の N-末端 APP 可溶性フラグメント) の量が直接測定されるアッセイである。競合的アッセイでは、サンプル中に存在する分析物 (即ち、N-末端短縮および / または翻訳後修飾 A 变異体あるいは本発明の N-末端 APP 可溶性フラグメント) の量は、サンプル中に存在する分析物によって捕捉因子 (即ち、抗体) から置き換えられた (または競合して遊離した) 添加された (外因性) 分析物の量を測定することにより、間接的に測定される。1つの競合的アッセイでは、既知の量の (外因性) N-末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチドあるいは本発明の N-末端 APP 可溶性フラグメント (またはその C-末端フラグメント) を

10

20

30

40

50

サンプルに添加し、次いで、サンプルを抗体に接触させる。抗体に結合した添加された(外因性)N-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドあるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメント(またはそのC-末端フラグメント)の量は、外因性N-末端短縮および/または翻訳後修飾Aペプチドあるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメント(またはそのC-末端フラグメント)が添加される前のサンプル中のN-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントの濃度に反比例する。

【0113】

好適な実施態様では、N-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントのレベルは、以下の工程:

10

- (a) 抗原-抗体複合体を產生させるのに適切な条件下で、サンプル中に存在するN-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントとN-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントを特異的に認識する抗体とを接触させる工程;ならびに
- (b) 抗体とN-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントとの間に生じた免疫学的結合を検出する工程、を含んでなるイムノアッセイによって決定される。

【0114】

1つの好適な「サンドイッチ」アッセイでは、例えば、抗体を直接固体基体に結合させることができ、ここで、それらは固定化される。次いで、これらの固定化された抗体は、サンプル中に存在するN-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントを捕捉し、その後、2次抗体によって検出される。好適な実施態様では、N-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントは、以下の工程:

20

- (a) 抗原-抗体複合体を產生させるのに適切である条件下で、サンプル中に存在する前記N-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントを、前記N-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明の前記N-末端APP可溶性フラグメントを認識する抗体(1次抗体または捕捉抗体)に接触させる工程;

(b) 抗原-抗体複合体を產生させるのに適切である条件下で、前記N-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明の前記N-末端APP可溶性フラグメントと前記1次抗体との間で形成された複合体を、N-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメントを特異的に認識する別の抗体(2次抗体または検出抗体)に接触させる工程;

30

(c) 抗原-抗体複合体を、前記2次抗体への特異的タグ付けまたは結合のいずれかのためのマーカーと接触させる工程であって、前記マーカーは、当業者に既知の任意の可能なマーカーである工程;

(d) おそらくまた、標準化目的のために、抗体を、両方の抗体に反応性である精製されたN-末端短縮および/または翻訳後修飾A変異体あるいは本発明のN-末端APP可溶性フラグメント(またはそのC-末端フラグメント)に接触させる工程、を含んでなるサンドイッチELISAによって検出することができる。

40

【0115】

有利には、2次抗体自体は、マーカーまたはマーカーに直接的もしくは間接的に結合するための基を担持している。

【0116】

本発明の診断または療法診断方法において使用される抗体を、適切な標識で標識してもよい。本アッセイで使用される特定の標識または検出可能な基は、該標識がアッセイにおいて使用される抗体の特異的結合を顕著に妨害しない限り、本発明の極めて重要な局面ではない。検出可能な基は、検出可能な物理的または化学的特性を有する任意の材料であることができる。そのような検出可能な標識は、イムノアッセイの領域において良好に開発

50

されており、一般に、そのような方法において有用なほとんどの標識も本発明の方法に適用することができる。従って、標識は、分光的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、放射線的または化学的手段によって検出可能な任意の組成物である。本発明において有用な標識として、磁気ビーズ（例えば、ダイナビーズ（Dyna beads）TM）、蛍光染料（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサス・レッド、ローダミン）、放射性標識物（例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびELISAにおいて一般に使用される他の酵素）、ならびに金コロイド、着色ガラスまたはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）ビーズなどの比色標識物が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0117】

標識物は、当該分野において周知の方法に従って、アッセイの所望される成分に直接的または間接的に結合させてもよい。上記で示されるように、広範な標識物を使用することができ、標識の選択は、要求される感受性、化合物とのコンジュゲーションの簡便性、安定性要件、利用可能な器械および処理規定に依存する。非放射性標識は、しばしば、間接的手段によって付着される。一般に、リガンド分子（例えば、ビオチン）を抗体に共有結合する。次いで、リガンドを、本来的に検出可能であるか、または検出可能な酵素、蛍光化合物、もしくは化学発光化合物などのシグナル系に共有結合されるかのいずれかである抗リガンド（例えば、ストレプトアビジン）分子に結合させる。多くのリガンドおよび抗リガンドを使用することができる。リガンドが天然の抗リガンド、例えば、ビオチン、チロキシン、およびコルチゾールを有する場合、該リガンドを、標識した天然に存在する抗リガンドと共に使用することができる。あるいは、ハプテン性および抗原性化合物を、抗体と共に使用することができる。抗体はまた、例えば、酵素または蛍光団とのコンジュゲートによって、シグナル発生化合物に直接コンジュゲートさせることができる。標識物としての目的の酵素は、本来、加水分解酵素、特に、ホスファターゼ、エステラーゼおよびグリコシダーゼ、または酸化還元酵素、特に、ペルオキシダーゼである。蛍光化合物としては、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロンなどが挙げられる。化学発光化合物としては、ルシフェリン、および2,3-ジヒドロフラジンジオン、例えば、ルミノールが挙げられる。他の標識またはシグナル生成系の再検討については、米国特許第4,391,904号明細書において得ることができる。

20

【0118】

標識を検出するための手段は、当該技術分野において周知である。従って、例えば、標識が放射性標識である場合、検出のための手段は、シンチレーションカウンターまたはオートラジオグラフィにおけるような写真フィルムを含む。標識が蛍光標識である場合、それは、適切な波長の光で蛍光団を誘発し、得られる蛍光を検出することによって検出することができる。蛍光は、写真フィルムによって、電化結合素子（CCD）または光電子増倍管などの電子検出器の使用によって、可視で検出することができる。同様に、酵素標識は、適切な基質を酵素に提供し、得られる反応産物を検出することによって、検出することができる。最後に、簡単な比色標識は、標識に伴う色を観察することによって、簡単に検出することができる。

30

【0119】

いくつかのアッセイ形式は、標識化合物の使用を必要としない。例えば、凝集アッセイを使用して、標的抗体の存在を検出することができる。この場合、抗原被覆粒子は、標的抗体を含んでなるサンプルによって、凝集する。この形式では、標識を必要とする成分は存在せず、標的抗体の存在は、簡単な目視検査で検出される。

40

【0120】

本明細書および特許請求の範囲の全体を通じ、本文中で断らない限り、語句「含んでなる（comprise）」、ならびに「含んでなる（comprises）」および「含んでなっている（comprising）」は、陳述した完全体もしくは工程または陳述

50

した完全体もしくは工程の群の包含を意味するものであるが、他の完全体もしくは工程または完全体もしくは工程の群のいずれかの除外を意味するものではないことが理解されよう。

【実施例】

【0121】

実施例1：十分に発展したアルツハイマー病患者および非痴呆患者におけるAペプチドの特徴付け

1. 材料および方法

患者

本研究において使用したすべての脳剖検材料は、INSEIRM U422（仏国、リール（Lille, France））由来であった。5例のAD症例および5例の非痴呆症例については、すでに記載している（デラコウルテ（Delacourte）ら、2002；デラコウルテ（Delacourte）ら、（1999））。5例のAD症例は、アルツハイマー病の神経病理学的評価のための診断基準に関するナショナル・インスティテュート・オン・エイジング・アンド・ザ・レーガン・インスティテュート・ワーキング・グループ（the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group）により確立されたADの神経病理学的診断基準（ハイマン（Hyman）およびトロジアノウスキ（Trojanowski）、1997）を満たした。5例の非痴呆症例は、ブラアク（Braak）およびブラアク（Braak）（1991）に従う神経原線維段階IおよびII、またはデラコウルテ（Delacourte）ら（1999；2002）に従うタウ病変段階1～6およびブラアク（Braak）およびブラアク（Braak）（1991）の神経病理学的段階に従うアミロイド沈着の段階Bに対応する。剖検では、一方の脳半球を凍結保存して、生化学的分析に使用し、他方の半球を、神経病理学的検査および組織化学の両方のためにホルマリン固定した。

【0122】

抗体

Aペプチドのアミノ末端領域を、WO2（Abeta、GmbH、独国（Germany））および6E10（セネテック（Senetek）米国、ミズーリ州（MO, USA））抗体で分析した。これらは、それぞれ、Aのアミノ酸配列5～8および4～13を認識する。Ax-42種は、21F12抗体およびADA42抗血清を使用して研究した。Ax-40種は、抗血清ADA40で分析した（デラコウルテ（Delacourte）ら、2002）。

【0123】

A凝集体のギ酸単離および2次元ゲル電気泳動

側頭、前頭、頭頂、および後頭皮質由来の脳組織サンプルを、すでに記載の通り（デラコウルテ（Delacourte）ら、2002）に処理した。ギ酸（プロラボ（Prolabo）、フォンテナイ（Fontenay）s/Bois、仏国（France））抽出脳組織ホモジネート（100 μL）を窒素下でエバポレートし、400 μlの2次元電気泳動溶解緩衝液（7M尿素、2Mチオ尿素、4%トリトン（Triton）X-100、20 mM DTTおよび0.6%ファーマライト（Pharmalytes）TM pH 3～10）に溶解した。サンプルを音波処理し、IPGストリップpH 4～7（バイオラド（BioRad）、仏国、マルヌス・ラ・コケット（Marnes la Coquette, France））をサンプルで15時間平衡化した（サージャント（Sergeant）ら、2002）。製造者（バイオラド（BioRad）、仏国、マルヌス・ラ・コケット（Marnes la Coquette, France））の指示に従って、プロテアン（Protean）IEF細胞を使用して、等電点電気泳動を実施した。先に記載（サージャント（Sergeant）ら、2002）のように、ポリペプチドを、トリス-トリシン（Tris-Tricine）ゲル上で分離した。製造者の指示に従って、マルチフォア（Multiphor）ransformerユニット（アマシャム・フ

10

20

30

40

40

50

アルマシア・バイオテック (A m e r s h a m - P h a r m a c i a B i o t e c h) 、仏国、サクレイ (S a c l a y , F r a n c e) を使用し、ゲルを免疫検出に移すか、または質量分析解析のために、クマシー・ブリリアント・ブルー (C o o m a s s i e B r i l l i a n t B l u e) G 2 5 0 (シグマ (S i g m a) 、仏国 (F r a n c e)) で染色した。等電点、分子量、および各 A ペプチド変異体の量は、マラニー (M e l a n i e) I I I 2 - D ゲル解析ソフトウェア (ジーンバイオ (G e n e b i o) 、スイス、ジュネーブ (G e n e v a , S w i t z e r l a n d)) を使用して決定した。

【 0 1 2 4 】

質量分析の特徴付け

クマシー・ブルー (C o o m a s s i e B l u e) 染色ペプチドのスポットを 1 mm² のゲル片に切断し、2 5 m M トリス (T r i s) - H C l p H 9 中 5 0 % C H₃ C N で 2 回洗浄した。ゲル片をスピード - バック (S p e e d - V a c) 中で脱水し、次いで、3 μl のトリス (T r i s) - H C l p H 9 中 1 0 n g のエンドプロテイナーゼ (E nd o p r o t e i n a s e) L y s - C (E C 3 . 4 . 2 1 . 1 9 、ロッシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ (R o c h e M o l e c u l a r B i o c h e m i c a l s) 、仏国、メイライン (M e y l a n , F r a n c e)) で 1 晩ゲル内消化した。得られる消化したペプチドを、5 0 % C H₃ C N および 1 % トリフルオロ酢酸 (T F A) 1 0 μl 中に回収した。次いで、サンプルを乾燥飛沫 (d r y - d r o p l e t) 法で調製した。1 m l のペプチド混合物を、新たに溶解した - シアノ - 4 - ヒドロキシシナモン酸 0 . 5 m l (5 0 % C H₃ C N および 0 . 1 % T F A 中 5 m g / m l) と混合し、サンプルプレート上にスポットした。次いで、乾燥スポットを 5 μl の 0 . 1 % T F A で洗浄した。次のパラメータ：ポジティブモード、反射面、電圧 2 0 k V 、グリッド 6 1 % 、遅延引き出し 9 0 n s 、低質量ゲート 5 0 0 a m u に設定した M A L D I - T O F ボイジャー (V o y a g e r) - D E - S T R (アップライド・バイオシステムズ (A p p l i e d B i o s y s t e m s) 、カリフォルニア州、パロアルト (P a l o A l t o , C A)) で質量分析を実施した。サンプルを吸着 / イオン化するのに必要なレーザーエネルギーを、良好なシグナル / ノイズ比に匹敵する低値に保持した。トリプシン処理したリゾチーム由来の [M + H⁺] モノアイソトピックイオンを使用して、スペクトルを外部較正した。

【 0 1 2 5 】

2 . 十分に発展したアルツハイマー病患者から得られる脳における A ペプチドの特徴付け

臨床外症例の脳組織におけるアミロイド負荷の量が低いため、本発明者らはまず、十分に発展したアルツハイマー病の症例において大量に見出された A ペプチドを特徴付けた (デラコウルテ (D e l a c o u r t e) ら、2 0 0 2) 。アルツハイマー脳におけるアミロイド ペプチド (A) よりなる凝集体は、すでに記載されている (デラコウルテ (D e l a c o u r t e) ら、2 0 0 2 ; カルバック (K a l b a c k) ら、2 0 0 2) ように、純粋なギ酸においてのみ可溶性である。そのようなギ酸可溶性 A 種を 2 次元ゲル (2 - D) 電気泳動で分離し、A x - 4 0 および A x - 4 2 種の両方が存在することが示された特異的 A 抗体のパネルを使用して、特徴付けた (図 2 ; A - 4 0 および A - 4 2 パネル)。ギ酸可溶性 A の総量でその後の質量分析が可能であったアルツハイマー病 (A D) 患者の脳組織でさらなる特徴付けを実施した。1 0 個の A スポットを 2 - D 電気泳動で分離 (図 2 ; クマシー・ブルー (C o o m a s s i e B l u e) パネル) し、そのうち 9 個を質量分析で同定した (表 3)。それらは、すべて単量体の A に対応した。免疫検出された 8 k D a の二量体種は少量しか存在せず、質量分析解析は行えなかった。完全長 A ペプチドは、スポット 1 およびスポット 2 に対応した (表 3)。スポット 3 ~ 7 および 9 ~ 1 0 は、A のアミノ末端短縮および翻訳後修飾変異体に対応した (表 3)。主要な短縮変異体は、アミノ酸 2 ~ 5 位および 8 ~ 1 0 位で開始する A よりなる。特徴付けられた翻訳後修飾は、3 位のピログルタミル化およびメチル化であった (

10

20

30

40

50

表3）。興味深いことに、スポット6、7、9、および10は、同様のA変異体を含有したが、2つのスポットとして分離されたことから、未知の修飾が存在することが示唆される。

【0126】

クマシーカラム（Coomassie Blue）染色は、各A種の正確な定量を可能にした。完全長Aペプチドは、すべてのA種のうちわずか33%にしか認められなかつた。すなわち、短縮変異体は65%を超え、そのうち16%および23%は、それぞれ残基4、5、8、9、および10で開始する短縮種に対応した。さらに、ADA40抗血清によって示されるA₄₀の2-Dパターンは、Aのアミノ末端領域を検出するWO2で得られるパターンに完全に重複した。これらの結果は、スポット6、7、9、および10由来の同定された短縮AがA₄₂種由来でありA₄₀種由来ではないことを示す。

【0127】

3. 非痴呆患者から得られる脳におけるAペプチドの特徴付け

その後、アミロイドーシスの第1の工程で凝集するA種を、非痴呆患者の脳組織において調べた。本発明者らは、微量～低量のAを有する5例の症例について研究した。A凝集体は、排他的に、A₄₂種からなり（図3；A₄₀およびA₄₂パネル）、アルツハイマー病変の臨床外段階では、A₄₀種がまったく存在しないことを示す。AのN-末端領域に対する抗体は、完全長Aペプチドに対応する単一のスポットのみを検出した（図3；N-末端（5-8）およびN-末端（4-13）パネル）。さらに、A₄₂特異的抗体21F12は、スポット4、5、6、および10（図3；A₄₂パネル）ならびに二量体を標識した。アルツハイマー脳としての非痴呆患者の脳におけるA₄₂種は、3-ピログルタミル、4、5、8、および9位で開始するN-末端短縮変異体に対応した。N-末端A抗体によるA二量体の染色が認められなかつた（図3および図4；N-末端（5-8）パネル）ことは、A二量体が、排他的にN-末端短縮A₄₂種からなることを実証する（図3および図4；A₄₂パネル）。

【0128】

合成Aペプチド1～40および1～42をギ酸で処置しても、ヒト脳組織由来の短縮変異体を生じなかつたため、これらのA₄₂変異体はギ酸で脳を処置しても生じない（デラコウルテ（Delacourte）ら、2002）。

【0129】

実施例2：N-末端短縮（5、6、8、9）-アミロイドを特異的に認識する抗体の作製および脳サンプルホモジネートに対するそれらの特徴付け

1. 抗体の作製

ミリポア（Millipore）9050合成機上で、異なるN-末端短縮を有するペプチドを合成した。さらなるグリセリン残基をスペーサーとして添加し、マレイミド化学を使用して、カルボキシ末端で結合するためのシステイン残基（表4）を添加した。ペプチドをKLH（キーホールリンペットヘモシニアン、ピアス（Pierce）カタログ番号77606）にコンジュゲートし、ウサギにおける抗血清の作製のための免疫原として使用した（ペプチドあたり2羽のウサギ；表5）。被覆のためにBSA（ICN、カタログ番号810667）にコンジュゲートしたペプチドおよび検出のためのHRP-結合ペプチド（西洋ワサビペルオキシダーゼ、ベーリンガー（Boehringer）、カタログ番号814407）により、ELISAにおいて力価を決定した。力価は、EC50値として表し、他のペプチド免疫化とは力価で比較することが可能である（表5）。さらなる研究に使用するための抗血清の選択は、高力価または特異性に基づいた。

【0130】

2. 抗体の特異性

得られる抗体の特異性は、「架橋アッセイ」によって決定した。架橋アッセイの原理を図5に示す。BSAにコンジュゲートした異なるペプチドを被覆に使用し、HRPコンジュゲートペプチドを使用して、検出を実施した（表4）。図6に示されるように、抗血清

10

20

30

40

50

は、それらの対応するペプチドにのみ反応性であり、重複配列を有する他のペプチドには反応性を示さなかった。このことは、抗体が主にペプチドのN-末端に対するものであることを示唆する。

【0131】

3. ヒト脳抽出物におけるN-末端短縮ペプチドの検出

これらの粗抗血清を架橋アッセイにさらに使用して、コントロール症例(2)、臨床外段階1および2、ならびに末期AD(S10)由来のギ酸脳抽出物におけるN-末端短縮ペプチドの量を決定した(表6; Delacourteら、2002)。

【0132】

モノクローナル抗体3D6(K-1080のHS-形式、Innogenetics)、ベルギー、ヘント(Ghent, Belgium))によりA(1-42)の量を測定した。異なるAD段階由来の脳抽出物に存在する異なるN-末端短縮Aの再検討を表6および図7に示す。3例の症例は、多量の-x-アミロイド(1-42)を有した:S1(Pet)、S2(Mag)、およびS10(Fra)。これらの症例はまた、実質的な量のN-末端短縮A42種を有する。特に、アミノ酸8でN-末端短縮したAは、高い反応性を示す。これらのN-末端短縮種はまた、-x-アミロイド(1-42)が検出されない臨床外段階S1(Rou2)およびS2(Ben)の症例に存在する。このことは、A42の短縮種が、疾患の最も早期の生化学マーカーであることを示唆する。

【0133】

実施例3: コントロール患者およびAD患者から得られるCSFにおけるA変異体の検出

1. プロテインチップ(Proteinchip)(登録商標)アレイの調製およびSELDI-TOF解析

ヒトAペプチド(4D7A3; Innogeneticsカタログ番号BR032D)のC-末端(特にx-42に対する)に特異的なモノクローナル抗体を使用して、CSFサンプルを抗体捕捉に使用した。4D7A3抗体またはコントロールマウスIgGをPBS20プロテインチップ(Proteinchip)(登録商標)アレイ(シファーゲン(Ciphergen)カタログ番号C553-0045)上に結合させることによって、アフィニティアレイを調製した。プロテインチップ(Proteinchip)を5μlのPBSで予め湿潤させた後、PBS中1mg/ml抗体の3μlアリコートを加湿チャンバ内で3時間、室温でインキュベートし、アレイへの共有結合を可能にした。スポットに対し、PBS/0.1%トリトン(Triton)X-100で2回、PBSで1回、アレイの洗浄を実施した。次いで、PBS中10mg/mlBSAの3μlを2時間、室温でインキュベートすることによって、未反応部位をブロックした。PBS/0.5%トリトン(Triton)X-100で2回、生じた過剰のBSAを洗浄除去し、続いて、PBSで3回洗浄した。次いで、アレイを、100μlの容積のCSFを適用した96ウェルバイオプロセッサーに配置した。サンプルを1晩、4、一定の振盪でインキュベートした。CSFを捨てた後、プロテインチップ(Proteinchip)アレイをバイオプロセッサーから取り出し、スポットに対して、PBS/0.1%トリトン(Triton)X-100で3回、続いて、PBSで3回洗浄および5mMヘペス(Hepes)で2回洗浄した。アレイを乾燥した後、0.5%(v/v)トリフルオロ酢酸(TFA)、50%(v/v)アセトニトリル(ACN)中シアノ-4-ヒドロキシシナモン酸(CHCA;シファーゲン(Ciphergen)カタログ番号C300-0001)の20%飽和溶液の0.8μlを各スポットに適用した。プロテインチップ(Proteinchip)リーダー(モデルPBS-II;シファーゲン(Ciphergen))上で、質量解析を実施した。

【0134】

2. 異なる神経学的疾患または異なる段階のAD発展を臨床診断された患者から得れるCSFサンプルの分析

10

20

30

40

50

異なる神経学的疾患の 161 例の患者から得られる C S F サンプルに対して研究を行った。以下の患者群を臨床パラメータ（表7）に基づいて識別した：コントロール患者（コントロール）、レビー小体型痴呆（D L B；マクケイス（M c K e i t h）ら、1996）を患う患者、後に A D を発展した軽度の認識障害の患者（M C I - A D；ピーターセン（P e t e r s e n）ら、1999）、A D を発展しなかった認識障害患者（コグン（C o g n）；ワーランド（W a h l u n d）ら、2003）、パーキンソン病を患う患者（P D；ラングストン（L a n g s t o n）ら、1992）、およびアルツハイマー病を患う患者（マックハン（M c K h a n n）ら、1984）。A D を患う患者を、M M S E 評価（ホルスタイン（F o l s t e i n）ら、1975）に基づいて、さらに 3 つのグループに分けた：軽度（M i l d）A D（M M S E 24 - 28）、中等度（M o d）A D（M M S E 17 - 23）および重度（S e v）A D（M M S E 2 - 16）。3 つの C S F サンプルを、各神経学的疾患グループから選択した（分析には少なくとも 200 μl 利用可能である）。これらの C S F サンプルを、A 42 のカルボキシ末端に特異的な抗体である 4 D 7 A 3 で被覆したシファーゲン（C i p h e r g e n）由来の免疫チップ上で稼動させた。1 - 42 とは異なるそれらの A 42 ペプチドの分析を表8に示す。データは、酸化された N - 末端短縮 A ペプチド 8 - 42 および 5 - 42 が C S F 中で検出され、A D の臨床症状がまだ観察されない極めて早期の A D においてでも A D に特異的であることを示唆している。10

【 0 1 3 5 】

実施例 4：モデル系における A 变異体の分析

ヒト変異型アミロイド前駆体タンパク質（A P P）遺伝子を含有するトランスジェニックマウスなどの任意の動物供給源の脳組織または任意の組織において、N - 末端短縮 A 種の有無について研究した（ゲイムス（G a m e s）ら、1995；ヒアオ（H s i a o）ら、1996、スターヒラー - ピアラット（S t u r c h l e r - P i e r r a t）ら、1997；モエチャーズ（M o e c h a r s）ら、1999；タケウチ（T a k e u c h i）ら、2000；カワラバヤシ（K a w a r a b a y a s h i）ら、2001；利用可能なトランスジェニックモデルのより完全なリストについては、[h t t p : / / w w w . a l z f o r u m . o r g / h o m e . a s p](http://www.alzforum.org/home.asp) を参照のこと）。これらのトランスジェニック動物におけるアミロイド沈着は加齢依存性であるため、脳は、異なる段階、例えば、モエチャーズ（M o e c h a r s）ら（1999）のトランスジェニックマウスにおいて極めて早期（6ヶ月）、早期（9ヶ月）、中期（15ヶ月）、および後期（21ヶ月）で試験する必要がある。20

【 0 1 3 6 】

使用する方法論は、ヒト脳組織について先に記載されている方法に類似する。組織を、2 % トリトン（T r i t o n）X - 100 を有するトリス（T r i s）H C l pH 6.8 中、10 容積の均質化緩衝液あたり 1 容積の割合で、均質化する。ホモジネート 100, 000 g で 1 時間、4 °C で遠心分離する。上清を回収し、ペレットを、100 μl の純粋ギ酸中で均質化し、音波処理する。窒素下でギ酸をエバポレートし、2 - D 溶解緩衝液中で均質化する。ヒト脳組織について記載されているように、2 次元ゲル電気泳動およびウエスタンブロッティングを実施する。30

【 0 1 3 7 】

ヒト脳において特徴付けられる N - 末端短縮 A 種と同じ分子量および等電点で正確に検出されるスポットによって、N - 末端短縮 A 主の存在の証拠を示す。げっ歯類 A 配列は、ヒト配列とは異なる（サージャント（S e r g e a n t）ら、2003）。従って、ヒトまたはげっ歯類由来の N - 末端短縮 A ペプチドの存在は、A ペプチドの反応性内因性配列の理論的等電点に近い分子量および等電点での A ペプチドスポットによって示すことができる。40

【 0 1 3 8 】

【表1】

表1. 本発明の調製物に含まれるN-末端短縮および／または翻訳後修飾A β ペプチド

β A の位置	修飾	配列	配列番号
1-4	メチル	DAEF	1
1-5	メチル	DAEFR	2
1-6	メチル	DAEFRH	3
1-7	メチル	DAEFRHD	4
1-8	メチル	DAEFRHDS	5
1-9	メチル	DAEFRHDSG	6
1-10	メチル	DAEFRHDSGY	7
1-11	メチル	DAEFRHDSGYE	8
1-12	メチル	DAEFRHDSGYEV	9
1-13	メチル	DAEFRHDSGYEVH	10
1-14	メチル	DAEFRHDSGYEVHH	11
1-15	メチル	DAEFRHDSGYEVHHQ	12
1-16	メチル	DAEFRHDSGYEVHHQK	13
2-5	なし/メチル	AEFR	14
2-6	なし/メチル	AEFRH	15
2-7	なし/メチル	AEFRHD	16
2-8	なし/メチル	AEFRHDS	17
2-9	なし/メチル	AEFRHDSG	18
2-10	なし/メチル	AEFRHDSGY	19
2-11	なし/メチル	AEFRHDSGYE	20
2-12	なし/メチル	AEFRHDSGYEV	21
2-13	なし/メチル	AEFRHDSGYEVH	22
2-14	なし/メチル	AEFRHDSGYEVHH	23
2-15	なし/メチル	AEFRHDSGYEVHHQ	24
2-16	なし/メチル	AEFRHDSGYEVHHQK	25
2-17	なし/メチル	AEFRHDSGYEVHHQKL	26
3-6	なし	EFRH	27
3-7	なし	EFRHD	28
3-8	なし	EFRHDS	29
3-9	なし	EFRHDSG	30
3-10	なし	EFRHDSGY	31
3-11	なし	EFRHDSGYE	32
3-12	なし	EFRHDSGYEV	33
3-13	なし	EFRHDSGYEVH	34
3-14	なし	EFRHDSGYEVHH	35
3-15	なし	EFRHDSGYEVHHQ	36
3-16	なし	EFRHDSGYEVHHQK	37
3-17	なし	EFRHDSGYEVHHQKL	38
3-18	なし	EFRHDSGYEVHHQKLV	39

10

20

30

40

【0139】

【表2】

表1. 続き

3-6	ピログルタミル	PyrE-FRH	40
3-7	ピログルタミル	PyrE-FRHD	41
3-8	ピログルタミル	PyrE-FRHDS	42
3-9	ピログルタミル	PyrE-FRHDSG	43
3-10	ピログルタミル	PyrE-FRHDSGY	44
3-11	ピログルタミル	PyrE-FRHDSGYE	45
3-12	ピログルタミル	PyrE-FRHDSGYEV	46
3-13	ピログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVH	47
3-14	ピログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVHH	48
3-15	ピログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVHHQ	49
3-16	ピログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVHHHQK	50
3-17	ピログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVHHHQKL	51
3-18	ピログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVHHHQKLV	52
4-7	なし/メチル	FRHD	53
4-8	なし/メチル	FRHDS	54
4-9	なし/メチル	FRHDSG	55
4-10	なし/メチル	FRHDSGY	56
4-11	なし/メチル	FRHDSGYE	57
4-12	なし/メチル	FRHDSGYEV	58
4-13	なし/メチル	FRHDSGYEVH	59
4-14	なし/メチル	FRHDSGYEVHH	60
4-15	なし/メチル	FRHDSGYEVHHQ	61
4-16	なし/メチル	FRHDSGYEVHHHQK	62
4-17	なし/メチル	FRHDSGYEVHHHQKL	63
4-18	なし/メチル	FRHDSGYEVHHHQKLV	64
4-19	なし/メチル	FRHDSGYEVHHHQKLVF	65
5-8	なし/メチル	RHDS	66
5-9	なし/メチル	RHDSG	67
5-10	なし/メチル	RHDSGY	68
5-11	なし/メチル	RHDSGYE	69
5-12	なし/メチル	RHDSGYEV	70
5-13	なし/メチル	RHDSGYEVH	71
5-14	なし/メチル	RHDSGYEVHH	72
5-15	なし/メチル	RHDSGYEVHHQ	73
5-16	なし/メチル	RHDSGYEVHHHQK	74
5-17	なし/メチル	RHDSGYEVHHHQKL	75
5-18	なし/メチル	RHDSGYEVHHHQKLV	76
5-19	なし/メチル	RHDSGYEVHHHQKLVF	77
5-20	なし/メチル	RHDSGYEVHHHQKLVFF	78
6-9	なし/メチル	HDSG	79
6-10	なし/メチル	HDSGY	80
6-11	なし/メチル	HDSGYE	81
6-12	なし/メチル	HDSGYEV	82
6-13	なし/メチル	HDSGYEVH	83
6-14	なし/メチル	HDSGYEVHH	84
6-15	なし/メチル	HDSGYEVHHQ	85

10

20

30

40

【表3】

表1. 続き

6-16	なし/メチル	HDSGYEVHHQK	86
6-17	なし/メチル	HDSGYEVHHQKL	87
6-18	なし/メチル	HDSGYEVHHQKLV	88
6-19	なし/メチル	HDSGYEVHHQKLVF	89
6-20	なし/メチル	HDSGYEVHHQKLFFF	90
6-21	なし/メチル	HDSGYEVHHQKLVFFA	91
7-10	なし/メチル	DSGY	92
7-11	なし/メチル	DSGYE	93
7-12	なし/メチル	DSGYEV	94
7-13	なし/メチル	DSGYEVH	95
7-14	なし/メチル	DSGYEVHH	96
7-15	なし/メチル	DSGYEVHQ	97
7-16	なし/メチル	DSGYEVHQK	98
7-17	なし/メチル	DSGYEVHQKL	99
7-18	なし/メチル	DSGYEVHHQKLV	100
7-19	なし/メチル	DSGYEVHHQKLVF	101
7-20	なし/メチル	DSGYEVHHQKLFFF	102
7-21	なし/メチル	DSGYEVHHQKLVFFA	103
7-22	なし/メチル	DSGYEVHHQKLVFFAE	104
8-11	なし	SGYE	105
8-12	なし	SGYEV	106
8-13	なし	SGYEVH	107
8-14	なし	SGYEVHH	108
8-15	なし	SGYEVHHQ	109
8-16	なし	SGYEVHHQK	110
8-17	なし	SGYEVHHQKL	111
8-18	なし	SGYEVHHQKLV	112
8-19	なし	SGYEVHHQKLVF	113
8-20	なし	SGYEVHHQKLFFF	114
8-21	なし	SGYEVHHQKLVFFA	115
8-22	なし	SGYEVHHQKLVFFAE	116
8-23	なし	SGYEVHHQKLVFFAED	117
9-12	なし	GYEV	118
9-13	なし	GYEVH	119
9-14	なし	GYEVHH	120
9-15	なし	GYEVHHQ	121
9-16	なし	GYEVHHQK	122
9-17	なし	GYEVHHQKL	123
9-18	なし	GYEVHHQKLV	124
9-19	なし	GYEVHHQKLVF	125
9-20	なし	GYEVHHQKLFFF	126
9-21	なし	GYEVHHQKLVFFA	127
9-22	なし	GYEVHHQKLVFFAE	128
9-23	なし	GYEVHHQKLVFFAED	129
9-24	なし	GYEVHHQKLVFFAEDV	130
10-13	なし	YEVH	131

10

20

30

40

【表4】

表1. 続き

10-14	なし	YEVHH	132
10-15	なし	YEVHHQ	133
10-16	なし	YEVHHHQK	134
10-17	なし	YEVHHHQKL	135
10-18	なし	YEVHHHQKLV	136
10-19	なし	YEVHHHQKLVF	137
10-20	なし	YEVHHHQKLVFF	138
10-21	なし	YEVHHHQKLVFFA	139
10-22	なし	YEVHHHQKLVFFAE	140
10-23	なし	YEVHHHQKLVFFAED	141
10-24	なし	YEVHHHQKLVFFAEDV	142
10-25	なし	YEVHHHQKLVFFAEDVG	143
1-42	メチル	DAEFRHDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLM MVGGVIA	144
2-42	なし/メチル	AEFRHDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMV VGGVIA	145
3-42		EFRHDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMV GGVIA	146
3-42	ピログルタミル	PytE-FRHDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNK GAIIGLMVGGVIA	147
4-42	なし/メチル	FRHDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMV GVIA	148
5-42	なし/メチル	RHDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG VIA	149
6-42	なし/メチル	HDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG VIA	150
7-42	なし/メチル	DSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV VIA	151
8-42		SGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIA	152
9-42		GYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIA	153
10-42		YEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIA	154
1-40	メチル	DAEFRHDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGL MVGGV	155
2-40	なし/メチル	AEFRHDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLM VGGV	156
3-40		EFRHDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMV GGV	157
3-40	ピログルタミル	PytE-FRHDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNK GAIIGLMVGGV	158
4-40	なし/メチル	FRHDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMV GV	159
5-40	なし/メチル	RHDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG VV	160

【0142】

【表5】

表1. 続き

6-40	なし/メチル	HDSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG VV	161
7-40	なし/メチル	DSGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV V	162
8-40		SGYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	163
9-40		GYEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	164
10-40		YEVHHQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	165

【0 1 4 3】

【表6】

表2. 本発明のN-末端APP可溶性フラグメントのC-末端フラグメント

位置: APP-β-アミロイド	配列	配列番号
669-1	VKMD	166
668-1	EVKMD	167
667-1	SEVKMD	168
666-1	ISEVKMD	169
656-1	EISEVKMD	170
664-1	EEISEVKMD	171
663-1	TEEISEVKMD	172
662-1	KTEEISEVKMD	173
661-1	IKTEEISEVKMD	174
660-1	NIKTEEISEVKMD	175
659-1	TNIKTEEISEVKMD	176
658-1	LTNIKTEEISEVKMD	177
657-1	GLTNIKTEEISEVKMD	178
670-2	KMDA	179
669-2	VKMDA	180
668-2	EVKMDA	181
667-2	SEVKMDA	182
666-2	ISEVKMDA	183
665-2	EISEVKMDA	184
664-2	EEISEVKMDA	185
663-2	TEEISEVKMDA	186
662-2	KTEEISEVKMDA	187
661-2	IKTEEISEVKMDA	188
660-2	NIKTEEISEVKMDA	189
659-2	TNIKTEEISEVKMDA	190
658-2	LTNIKTEEISEVKMDA	191
671-3	MDAE	192
670-3	KMDAE	193
669-3	VKMDAE	194
668-3	EVKMDAE	195
667-3	SEVKMDAE	196
666-3	ISEVKMDAE	197
665-3	EISEVKMDAE	198
664-3	EEISEVKMDAE	199
663-3	TEEISEVKMDAE	200
662-3	KTEEISEVKMDAE	201
661-3	IKTEEISEVKMDAE	202
660-3	NIKTEEISEVKMDAE	203
659-3	TNIKTEEISEVKMDAE	204
672-4	DAEF	1
671-4	MDAEF	205
670-4	KMDAEF	206

10

20

30

40

【0144】

【表7】

表2. 続き

669-4	VKMDAEC	207
668-4	EVKMDAEC	208
667-4	SEVKMDAEC	209
666-4	ISEVKMDAEC	210
665-4	EISEVKMDAEC	211
664-4	EEISEVKMDAEC	212
663-4	TEEISEVKMDAEC	213
662-4	KTEEISEVKMDAEC	214
661-4	IKTEEISEVKMDAEC	215
660-4	NIKTEEISEVKMDAEC	216
673-5	AECR	14
672-5	DAEFR	2
671-5	MDAEFR	217
670-5	KMDAEFR	218
669-5	VKMDAEFR	219
668-5	EVKMDAEFR	220
667-5	SEVKMDAEFR	221
666-5	ISEVKMDAEFR	222
665-5	EISEVKMDAEFR	223
664-5	EEISEVKMDAEFR	224
663-5	TEEISEVKMDAEFR	225
662-5	KTEEISEVKMDAEFR	226
661-5	IKTEEISEVKMDAEFR	227
674-6	EFRH	27
673-6	AEFRH	15
672-6	DAEFRH	3
671-6	MDAEFRH	228
670-6	KMDAEFRH	229
669-6	VKMDAEFRH	230
668-6	EVKMDAEFRH	231
667-6	SEVKMDAEFRH	232
666-6	ISEVKMDAEFRH	233
665-6	EISEVKMDAEFRH	234
664-6	EEISEVKMDAEFRH	235
663-6	TEEISEVKMDAEFRH	236
662-6	KTEEISEVKMDAEFRH	237
675-7	FRHD	53
674-7	EFRHD	28
673-7	AEFRHD	16
672-7	DAEFRHD	4
671-7	MDAEFRHD	238
670-7	KMDAEFRHD	239
669-7	VKMDAEFRHD	240
668-7	EVKMDAEFRHD	241
667-7	SEVKMDAEFRHD	242
666-7	ISEVKMDAEFRHD	243

10

20

30

40

【表8】

表2. 続き

665-7	EISEVKMDAEFRHD	244
664-7	EEISEVKMDAEFRHD	245
663-7	TEEISEVKMDAEFRHD	246
676-8	RHDS	66
675-8	FRHDS	54
674-8	EFRHDS	29
673-8	AEFRHDS	17
672-8	DAEFRHDS	5
671-8	MDAEFRHDS	247
670-8	KMDAEFRHDS	248
669-8	VKMDAEFRHDS	249
668-8	EVKMDAEFRHDS	250
667-8	SEVKMDAEFRHDS	251
666-8	ISEVKMDAEFRHDS	252
665-8	EISEVKMDAEFRHDS	253
664-8	EEISEVKMDAEFRHDS	254
677-9	HDSG	79
676-9	RHDSG	67
675-9	FRHDSG	55
674-9	EFRHDSG	30
673-9	AEFRHDSG	18
672-9	DAEFRHDSG	6
671-9	MDAEFRHDSG	255
670-9	KMDAEFRHDSG	256
669-9	VKMDAEFRHDSG	257
668-9	EVKMDAEFRHDSG	258
667-9	SEVKMDAEFRHDSG	259
666-9	ISEVKMDAEFRHDSG	260
665-9	EISEVKMDAEFRHDSG	261

10

20

30

【0 1 4 6】

【表9】

表3. アルツハイマー病患者に存在する A β 変異体の消化されたペプチド

スポット	A β 提唱された同一性 ¹	理論的質量	観察された質量	相対量 ²	理論的pI	観察されたpI
1	1-16	1954.879	1954.875	23%	5.31	5.3
	1-16+CH ₃	1968.905	1968.863	-	5.31	5.3
2	1-16	1954.879	1954.875	10%	5.31	5.3
	1-16+CH ₃	1968.905	1968.863	-	5.31	5.3
3	2-16	1839.852	1839.851	6%	5.78	5.8
	2-16+CH ₃	1853.878	1853.854	-	5.78	5.8
	(3-16)	1768.815	1768.804	-	5.78	5.8
4	pyrE 3-16	1751.784	1750.790	10%	6.27	5.9
	(2-16)	1839.852	1839.833	-	5.78	5.9
5	pyrE 3-16	1751.784	1750.881	8%	6.27	6.3
6	8-16	1084.517	1084.557	10%	5.96	6.0
	9-16	997.485	998.525	-	6.01	6.0
	8-16	1084.517	1084.518	13%	5.96	6.1
7	9-16	997.485	997.477	-	6.01	6.1
	10-16	940.463	940.460	-	6.01	6.1
	4-16	1639.772	1639.848	16%	6.27	6.3
9&10	4-16+CH ₃	1653.798	1653.859	-	6.27	6.3
	5-16	1492.704	1492.770	-		

¹ メチル化されたフラグメントを CH₃ で示す。PyrE は、同定されたフラグメントの N-末端でピログルタミル残基に対応する A β のアミノ酸配列 17 から 28 に対応するペプチドは、すべてのスポットにおいて見出された(示さず)

² 相対量は、クマシー染色ゲルに対してメラニー(Melanie)III ソフトウェアを使用する定量化に対応する

【0 1 4 7】

【表10】

表4. N-末端短縮 A β およびそれらの対応する BSA-および HRP-コンジュゲートに特異的な抗体の作成に使用されるペプチドの再検討(インノジエネティクス(Innogenetics)の番号付け)

短縮	配列	A β	APP770	Cys-ペプチド	HRP-ペプチド	BSA-ペプチド	配列番号
短縮 5	RHDSGYEV-	5-12	676-683	IGP-2121	PG-124	PG-129	70
短縮 6	HDSGYEVH-	6-13	677-684	IGP-2120	PG-123	PG-128	83
短縮 8	SGYEVHHQ-	8-15	679-686	IGP-2119	PG-122	PG-127	109
短縮 9	GYEVHHHQK-	9-16	680-687	IGP-2122	PG-125	PG-130	122

【0 1 4 8】

【表11】

表5. KLH-結合ペプチドで免疫したウサギの再検討

2羽のウサギを各ペプチドで免疫した
さらなる研究に選択される抗血清を示す

免疫原	ペプチド	ウサギ (Rb)	力値	選択基準	さらなる研究
短縮 5	IGP-2121	466	13145	最大力値	Rb466
		467	45115		
短縮 6	IGP-2120	468	42623	最大力値	Rb469
		469	31291		
短縮 8	IGP-2119	470	15235	特異性	Rb470
		471	26627		
短縮 9	IGP-2122	472	22735	特異性	Rb472
		473	45855		

10

20

【0149】

【表12】

表6. 異なる症例(コントロール、臨床外段階1および2、ならびに末期 AD)から得られる

ギ酸脳抽出物における A β (1-42)および N-末端短縮 A β の量の分析

臨床パラメータならびにデラコーテラ(2002)に従う段階を示す

30

症例	段階	年齢	臨床診断	3D6 (1-42) (pg/ml)	Rb470 (8-42) (1/20)*
Duc	S0	26	コントロール	<125	0.073
Cru	S0	43	コントロール	<125	0.55
Rou2	S1	78	コントロール	<125	0.189
Pet	S1	83	コントロール	>10000	0.751
Cro	S2	72	コントロール	<125	0.05
Ben	S2	89	コントロール	<125	0.263
Mag	S2	95	コントロール	>10000	0.574
Fra	S10	64	Prob AD	>10000	1.225

* エバボレーションおよび PBS における可溶化後のギ酸抽出物の 1/20 希釈の OD 値

40

【0150】

【表13】

表7. 実施例3で分析した異なる神経学的疾患で臨床診断された患者グループの人口統計およびCSFデータの概要

グループ	n	年齢	MMSE	タウ (pg/ml)	リン酸化-タウ (pg/ml)	AB1-42 (pg/ml)
		(中央値; 最小-最大)	(中央値; 最小-最大)	(平均, SD)	(平均, SD)	(平均, SD)
コントロール	29	66 (61-80)	30 (28-30)	356 (152)	57 (23)	711 (164)
軽度 AD	22	77 (68-87)	26.5 (24-28)	701 (216)	98 (42)	382 (80)
中等度 AD	22	78.5 (49-89)	20.5 (17-23)	748 (234)	95 (36)	361 (115)
重度 AD	22	76.5 (61-84)	13.5 (2-16)	819 (359)	105 (46)	367 (61)
DLB	12	77 (65-87)	23 (17-27)	388 (134)	57 (15)	466 (34)
MCI-AD	14	78 (65-78)	29 (28-30)	654 (191)	97 (30)	503 (54)
Cogn	25	63 (39-92)	30 (25-30)	257 (126)	44 (18)	614 (163)
PD	15	71 (59-82)	29 (25-30)	306 (65)	54 (10)	671 (142)

【0151】

10

20

【表14】

表8. カルボキシ末端42特異的抗体4D7A3で被覆されるシファーゲン由來のPS-20チップ上で観察

されるピークの分子量質量

実験は、100μlのCSFに対して2回反復で行われた

Aβ配列		11-42	10-42ox	8-42ox	5-42ox	
予想分子質量		3335.92	3515.1	3659.23	4067.64	
グループ	Nr					
コントロール	150	-/-	3515.9/-	-/-	-/-	10
	148	-/3335.7	3514.6/3514.9	3653.2/-	-/-	
	147	-/-	-/-	-/-	-/-	
Cogn	87	-/-	3515.1/3516.1	-/-	-/-	
	78	3337.2/-	3518.6/3519.4	-/-	-/-	
	69	-/-	3516.8/3516.6	-/-	-/-	
MCI-AD	111	-/-	3515.6/-	3652.4/-	-/-	20
	110	-/-	3515.3/-	3651.9/-	-/-	
	112	-/-	-/-	-/-	4073.2/4071.8	
軽度AD	54	-/-	-/-	-/-	-/-	
	57	-/-	-/-	3652.6/3651.8	4072.2/-	
	64	-/-	-/-	3652.5/3654.5	-/-	
中等度AD	40	-/-	-/-	3653.4/3652.8	-/4074.4	30
	47	-/-	3516.5/3515.5	3654.7/-	-/-	
	15	-/-	-/-	3652.8/3653.7	-/4071.6	
重度AD	31	-/-	3516.3/3523.5	3652.3/3652.7	-/4072.4	
	32	-/-	-/3515.5	-/3652.1	-/4071.9	
	22	-/-	3516.0/3523.2	3653.8/3653.3	-/4072.4	
DLB	94	-/-	-/-	-/-	-/-	
	101	-/-	-/-	-/-	-/-	
	103	-/-	3517.9/-	-/-	-/-	40

【0152】

参考文献

アービット E. (Arbitt E.)、チェウング N. K. (Cheung N. K.)、エー S. D. (Yeh S. D.)、ダグヒグヒヤン F. (Daghigian F.)、サング J. J. (Shang J. J.)、コードン・カルド C. (Cordon-Cardo C.)、ペントロー K. (Pentlow K.)、カネテ A. (Canete A.)、フィン R. (Finn R.)、ラルソン S. (Larson S.)

M. (Larson S.M.) (1995) ヒト脳腫瘍におけるジシアロガングリオシドGD2を標的とするモノクローナル抗体の定量的研究 (Quantitative studies of monoclonal antibody targeting to disialogangliosid GD2 in human brain tumors.) Eur. J. Nucl. Med. 22: 419 - 426.

【0153】

バックスカイ B.J. (Bacskaï B.J.)、カジュディズ S.T. (Kajdasz S.T.)、クリスティー R.H. (Christie R.H.)、カーター C. (Carter C.)、ゲイムス D. (Games D.)、ソイベルト P. (Seubert P.)、シェンク D. (Schenk D.)、ハイマン B.T. (Hyman B.T.) (2001) 生体マウスの脳におけるアミロイド沈着の画像化は免疫療法による斑のクリアランスの直接観察を可能にする (Imaging of amyloid-beta deposits in brains of living mice permits direct observation of clearance of plaques with immunotherapy.) Nature Med. 7: 369 - 372.

【0154】

バックスカイ B.J. (Bacskaï B.J.)、クルンク W.E. (Klunk W.E.)、マシス C.A. (Mathiss C.A.)、ハイマン B.T. (Hyman B.T.) (2002) インビボにおけるアミロイド沈着の画像化 (Imaging amyloid-beta deposits in vivo.) J. Cereb. Blood Flow Metab. 22: 1035 - 1041.

【0155】

バード F. (Bard F.)、キャノン C. (Cannon C.)、バーボラ R. (Barbour R.)、バーク R.L. (Burke R.L.)、ゲイムス D. (Games D.)、グラジェダ H. (Grajeda H.)、グイド T. (Guido T.)、フー K. (Hu K.)、ホアン J. (Huan J.)、ジョンソン・ウッド K. (Johnson-Wood K.)、カーン K. (Khan K.)、クホールデンコ D. (Kholidenko D.)、リー M. (Lee M.)、リーベルベルグ I. (Lieberburg I.)、マター R. (Motter R.)、ヌグエン M. (Nguyen M.)、ソリアーノ F. (Soriano F.)、バスケス N. (Vasquez N.)、ベイス K. (Weiss K.)、ベルシュ B. (Welsch B.)、ソイベルト P. (Seubert P.)、シェンク D. (Schenk D.)、エドノック T. (Ednock T.) (2000) 末梢に投与されたアミロイド沈着ペプチドに対する抗体は中枢神経系に進入し、アルツハイマー病のマウスモデルの病状を軽減する (Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease.) Nature Med. 6: 916 - 919.

【0156】

バレリ H. (Barelli H.)、レビー A. (Lebeau A.)、ビザボナ J. (Vizzavona J.)、デラーエラ P. (Delaere P.)、チェバリヤー N. (Chevallier N.)、ドロート C. (Drouot C.)、マラムバイド P. (Marambaud P.)、アンコリオ K. (Ancolio K.)、バクスバウム J.D. (Buxbaum J.D.)、クホーコバ O. (Khorkova O.)、ヘロウクス J. (Heroux J.)、サハスラブッデ S. (Sahasrabudhe S.)、マルチネス J. (Martinez J.)、ウォーター J.M. (Warter J.M.)、モール M. (Möller M.)

Mohr M.)、チェクラー F. (Checler F.) (1997) 40または
42アミノ酸長アミロイド ペプチドに特異的な新規ポリクローナル抗体の特徴付け：ブ
レセニリンの細胞生物学ならびに散発性アルツハイマー病および脳アミロイド血管症症例
の免疫組織化学を試験するためのそれらの使用 (Characterization o
f new polyclonal antibodies specific for
40 and 42 amino acid-long amyloid beta
peptides: their use to examine the cell
biology of presenilins and the immunohis
tochemistry of sporadic Alzheimer's dise
ase and cerebral amyloid angiopathy case 10
s.) Mol. Med. 3 : 695 - 707 .

【0157】

ベット A. J. (Bett A. J.)、プレベック L. (Prevec L.)
、グラハム F. L. (Graham F. L.) (1993) ヒトアデノウイルス5型
ベクターのパッケージング能力および安定性 (Packaging capacity
and stability of human adenovirus type 5
vectors.) J. Virol. 67 : 5911 - 5921 .

【0158】

ブラアク H. (Braak H.)、ブラアク E. (Braak E.) (199
1) アルツハイマー関連変化の神経病理学的分類 (Neuropathological 20
stageing of Alzheimer-related changes.)
Acta Neuropathol. 82 : 239 - 259 .

【0159】

ブライデン D. J. (Brayden D. J.)、テンプルトン L. (Temp
leton L.)、マッククリーン S. (McClean S.)、バルボア R.
(Barbour R.)、ファング J. (Huang J.)、ヌグエン M. (N
guyen M.)、アヘルン D. (Ahern D.)、マター R. (Motte
r R.)、ジョンソン・ウッド K. (Johnson-Wood K.)、バスケス
N. (Vasquez N.)、シェンク D. (Schenk D.)、ソイベルト
P. (Seubert P.) (2001) 生分解性微粒子へのカプセル化はマウスに
おいて非経口的に送達された - アミロイドに対する血清中抗体応答を増強する (Enc
apsulation in biodegradable microparticles enhances serum antibody response to p
arenterally-delivered - amyloid in mice.) Vaccine 19 : 4185 - 4193 . 30

【0160】

ブリオン J. (Brion J.)、パッサレイロ J. (Passareiro
J.)、ヌネス J. (Nunez J.)、フラメント - デュランド J. (Flam
ent-Durand J.) (1985) Mise en evidence im
munologique de la protéine tau au niveau 40
des lésions de dégénérescence neurofib
illaire de la maladie d'Alzheimer. Arch. B
iol. 95 : 229 - 235 .

【0161】

バーカ R. L. (Burke R. L.)、ゴールドベック C. (Goldbeck
C.)、ンガ P. (Ng P.)、スタンベリー L. (Stanberry L.
.)、オット G. (Ott G.)、バン・ネスト G. (Van Nest G.)
(1994) 組換え陰部ヘルペスワクチンの治療効力に対するアジュvantの効果 (Th
e influence of adjuvant on the therapeutic 50
efficacy of a recombinant genital her

pes vaccine.) J. Infect. Dis. 170: 1110-1119.

【0162】

カンピオン D. (Campion D.)、デュマンチン C. (Dumanchin C.)、ハンネクイン D. (Hannequin D.)、デュボイド B. (Dubois B.)、ベリアード S. (Belliard S.)、ピュエル M. (Puel M.)、トーマス・アンテリオン C. (Thomas-Anterion C.)、ミコン A. (Michon A.)、マーチン C. (Martin C.)、チャーボニー F. (Charbonnier F.)、ロウクス G. (Raux G.)、カムザット A. (Camuzat A.)、ペネット C. (Penet C.)、メスネイジ V. (Mesnage V.)、マルチネス M. (Martinez M.)、クレゲット・ダルポウクス F. (Clerget-Darpoux F.)、ブライス A. (Brice A.)、フレボルク T. (Frebourg T.) (1999) 早期発症常染色体優性遺伝性のアルツハイマー病：有病率、遺伝子異質性、および変異スペクトル (Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum.) Am. J. Hum. Genet. 65: 664-670.

【0163】

セスカト R. (Cescato R.)、デュメルムス E. (Dumermuth E.)、スピース M. (Spiess M.)、パゲネティー P.A. (Paganetti P.A.) (2000) 飲食作用においてアミロイド前駆体タンパク質欠損を発現する変異を発現する細胞における代替的に切断される - アミロイドペプチドの生成の増加 (Increased generation of alternative ly cleaved beta-amyloid peptides in cells expressing mutants of the amyloid precursor protein defective in endocytosis.) J. Neurochem. 74: 1131-1139.

【0164】

セベク G. (Cevec G.)、ゲバウアー D. (Gebauer D.)、ステイベル J. (Stieber J.)、シャツレイン A. (Schatzlein A.)、ブルーメ G. (Blume G.) (1998) 超柔軟性小胞、トランスファーソームは極めて低い細孔透過耐性を有し、インタクトな哺乳動物の皮膚を横切って治療量のインスリンを輸送する (Ultraflexible vesicles, Transfomers, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin.) Biochim Biophys Acta 1368: 201-215.

【0165】

チエン G.Q. (Chen G.Q.)、チエン K.S. (Chen K.S.)、クノックス J. (Knox J.)、イングリス J. (Inglis J.)、バーナード A. (Bernard A.)、マーチン S.J. (Martin S.J.)、ジャステイス A. (Justice A.)、マックコンログ L. (McConlogue L.)、ゲイムス D. (Games D.)、フリードマン S.B. (Freedman S.B.)、モーリス R.G.M. (Morris R.G.M.) (2000) アルツハイマー病のマウスモデルにおける加齢および - アミロイド斑に関連する学習欠乏 (A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease.) Nature 408 50

: 975 - 979 .

【0166】

コレ(Cole)ら(1985)In:モノクローナル抗体とガン治療(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy.)アランR.リス・インク(Alan R. Liess, Inc.)77~96頁。

【0167】

コンデ S. (Conde S.) (2002)アルツハイマー病の処置の標的としての - アミロイドペプチド(-amyloid peptide as a target for treatment of Alzheimer's disease.) Expert Opin. Ther. Patents 12: 503 - 512. 10

【0168】

コルテス・レタモゾ V. (Cortez-Retamozo V.)、ロイウェレイズ M. (Lauwerys M.)、ハッサンザデ Gh. G. (Hassanza deh Gh. G.)、ゴーベルト M. (Gobert M.)、コンラス K. (Conrath K.)、ムルダーマン S. (Muyldermaans S.)、デ・バトセリアー P. (De Baetselier P.)、レベツ H. (Reverts H.) (2002)ラクダの単一ドメイン抗体による効率的腫瘍標的化(Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels.) Int. J. Cancer 98: 456 - 462. 20

【0169】

ダラス W. S. (Dallas W. S.)、ファルコー S. (Falkow S.) (1980)コレラ毒素と大腸菌易熱性毒素との間のアミノ酸配列相同性(Amino acid sequence homology between cholera toxin and Escherichia coli heat-labile toxin.) Nature 288: 499 - 501.

【0170】

デイビス H. L. (Davis H. L.)、ウイラットナ R. (Weeranta R.)、ワルドシュミット T. J. (Waldschmidt T. J.)、タイグレット L. (Tygrett L.)、ショール J. (Schorr J.)、クリーク A. M. (Krieg A. M.)、ウイラットナ R. (Weeranta R.) (1998) CpG DNAは、組換えB型肝炎表面抗原で免疫したマウスにおける特異的免疫の強力なエンハンサーである(CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen.) J. Immunol. 162: 3103. 30

【0171】

デラコウルテ A. (Delacourte A.)、デフォセス A. (Defosez A.) (1986)アルツハイマー病:タウタンパク質、微小管集成の促進因子は、対になった螺旋状フィラメントの主要成分である(Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments.) J. Neurol. Sci. 76: 173 - 180. 40

【0172】

デラコウルテ A. (Delacourte A.)、セルゲアント N. (Sergeant N.)、チャンパイン D. (Champain D.)、ワッテス A. (Wattez A.)、マウレージ C. - A. (Maurage C. - A.)、レベルト F. (Lebert F.)、パスクイア F. (Pasquier F.)、デビッド J. - P. (David J. - P.) (1999)加齢およびアルツハイマ 50

ー病における神経原線維分解の生化学的経路 (The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease.) Neurology, 52: 1158 - 1165.

【0173】

デラコウルテ A. (Delacourte A.)、セルゲアント N. (Sergeant N.)、チャンパイン D. (Champain D.)、ワッテス A. (Wattez A.)、マウレージ C. - A. (Maurage C. - A.)、レベルト F. (Lebert F.)、パスクイアーフ. (Pasquier F.)、デビッド J. - P. (David J. - P.) (2001) 加齢および散発性アルツハイマー病におけるタウおよびアミロイド前駆体タンパク質病変の生化学的分布 (The Biochemical Spreading of Tau and Amyloid - Precursor Protein Pathologies in Aging and Sporadic Alzheimer's Disease.) Brain Aging 1: 33 - 42. 10

【0174】

デラコウルテ A. (Delacourte A.)、セルゲアント N. (Sergeant N.)、チャンパイン D. (Champain D.)、ワッテス A. (Wattez A.)、マウレージ C. A. (Maurage C. A.)、レベルト F. (Lebert F.)、パスクイアーフ. (Pasquier F.)、デビッド J. P. (David J. P.) (2002) 散発性アルツハイマー病における非重複であるが共同的なタウおよびAPP病変 (Nonoverlapping but synergistic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease.) Neurology 59: 398 - 407. 20

【0175】

デマトス R. B. (Demattos R. B.)、バレス K. R. (Bales K. R.)、クミンス D. J. (Cummins D. J.)、ドダート J. - C. (Dodart J. - C.)、パウル S. M. (Paul S. M.)、ホルツマン D. M. (Holzman D. M.) (2001) 末梢抗A抗体は、CNSおよび血漿中Aクリアランスを変更し、アルツハイマー病のマウスモデルにおける脳A負荷を減少する (Peripheral anti-A antibody alters CNS and plasma A clearance and decreases brain A burden in a mouse model of Alzheimer's disease.) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98: 8850 - 8855. 30

【0176】

デマトス R. B. (Demattos R. B.)、バレス K. R. (Bales K. R.)、クミンス D. J. (Cummins D. J.)、パウル S. M. (Paul S. M.)、ホルツマン D. M. (Holzman D. M.) (2002) 脳から血漿へのアミロイド流出: アルツハイマー病のマウスモデルにおける脳アミロイド負荷の測定 (Brain to Plasma Amyloid - Efflux: a Measure of Brain Amyloid Burden in a Mouse Model of Alzheimer's Disease.) Science 295: 2264 - 2267. 40

【0177】

デストローパー B. (De Strooper B.)、アナート W. (Annaert W.) (2000) アミロイド前駆体タンパク質のタンパク質分解プロセシングおよび細胞生物学的機能 (Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid 50

precursor protein.) J. Cell Sci. 113: 1857-1870.

【0178】

ドダート J. - C. (Dodart J. - C.)、バレス K. R. (Bales K. R.)、ガンノン K. S. (Gannon K. S.)、グリーネ S. J. (Greene S. J.)、デマトス R. B. (Demattos R. B.)、マシス C. (Mathis C.)、デロング C. A. (DeLong C. A.)、ウ S. (Wu S.)、ウ X. (Wu X.)、ホルツマン D. M. (Holtzman D. M.)、パウル S. M. (Paul S. M.) (2002) 免疫化は、アルツハイマー病における脳 A 負荷を減少することなく、記憶欠損を回復する (Immunization reverses memory deficits without reducing brain A burden in Alzheimer's disease model.) Neuroscience 5: 452-457. 10

【0179】

ドリン G. (Drin G.)、テムサマニ J. (Temsamani J.) (2002) リン脂質膜を介するプロテグリンIの転移：ペプチドホールディングの役割 (Translocation of protegrin I through phospholipid membranes: role of peptide folding.) Biochim. Biophys. Acta 1559: 160-170

.

【0180】

デュベンスカイ T. W. Jr (Dubensky T. W. Jr)、ドライバー D. A. (Driver D. A.)、ポロ J. M. (Polo J. M.)、ベリ B. A. (Belli B. A.)、ラタム E. M. (Latham E. M.)、イバネス C. E. (Ibanez C. E.)、チャダ S. (Chada S.)、ブルム D. (Brumm D.)、バンクス T. A. (Banks T. A.)、メント S. J. (Mento S. J.)、ジョリー D. J. (Jolly D. J.)、チャン S. M. (Chang S. M.) (1996) シンドビスウイルスDN Aに基づく発現ベクター：インビトロおよびインビボ遺伝子導入のための有用性 (Sindbis virus DNA-based expression vectors: utility for in vitro and in vivo gene transfer.) J. Virol. 70: 508-519. 30

【0181】

デュークカーツ C. (Duyckaerts C.)、コレ M. A. (Collie M. A.)、ハウ J. J. (Hauw J. J.) (1999) アルツハイマー病組織病理学の概要 (A sketch of Alzheimer's disease histopathology.) In: Alzheimer's disease and related disorders. Etiology, pathogenesis and therapeutics. イクバル K. (Iqbal K.)、スワブ D. F. (Swaab D. F.)、ワインラド B. (Winlad B.)、wisniewski H. M. (Wisniewski H. M.) (編)。ジョン・ウィリー・アンド・サンズ (John Wiley and Sons)、英国、サセクス州 (Sussex, UK)、137~152頁。 40

【0182】

エシュ F. S. (Esch F. S.)、ケイム P. S. (Keim P. S.)、ビーティ E. C. (Beattie E. C.)、ブラチャー R. W. (Blacher R. W.)、クルウェル A. R. (Culwell A. R.)、オルタースドルフ T. (Oltersdorf T.)、マックカルエ D. (McCullure D.)、ワード P. J. (Ward P. J.) (1990) 前駆体の構成的プロセシング中のアミロイド ペプチドの切断 (Cleavage of amyloid 50

beta peptide during constitutive process ing of its precursor.) Science 248: 1122-1124.

【0183】

フェリシアン O. (Felician O.)、サンドソン T. A. (Sandson T. A.) (1999) アルツハイマー病の神経生物学および薬物療法 (The neurobiology and pharmacotherapy of Alzheimer's disease.) J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. 11: 19-31.

【0184】

ホルスタイン M. F. (Folstein M. F.)、ホルスタイン S. E. (Folstein S. E.)、マックフーフ P. R. (McHugh P. R.) (1975) ミニメンタルステート。臨床家のための患者の認識状態を等級付けする実践的方法 (Mini-Mental State. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician.) J. Psychiatr. Res. 12: 189-198.

【0185】

フレンケル D. (Frenkel D.)、カツ O. (Katz O.)、ソロモン B. (Solomon B.) (2000) EFRHファージ投与によるアルツハイマー - アミロイド斑に対する免疫化 (Immunization against Alzheimer's - amyloid plaques via EFRH phage administration.) Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 11455-11459.

【0186】

フレンケル D. (Frenkel D.)、カリブ N. (Karib N.)、ソロモン B. (Solomon B.) (2001) アルツハイマー病ワクチン化に対する自己抗体の生成 (Generation of auto-antibodies towards Alzheimer's disease vaccination.) Vaccine 19: 2615-2619.

【0187】

フクモト H. (Fukumoto H.)、アサミ - オダカ A. (Asami - Odaka A.)、スズキ N. (Suzuki N.)、イワツボ T. (Iwatsubo T.) (1996) アルツハイマー病患者の脳および非痴呆性加齢型個体における 40 陽性老人斑と小膠細胞との関連 (Association of A beta 40-positive senile plaques with microglial cells in the brains of patients with Alzheimer's disease and in non-demented aged individuals.) Neurodegeneration 5: 13-17.

【0188】

ゲイムス D. (Games D.)、アダムス D. (Adams D.)、アレサン드리ニ R. (Alessandrini R.)、バーボウ R. (Barbour R.)、バーセレッテ P. (Berthelette P.)、ブラックウェル C. (Blackwell C.)、カル T. (Carr T.)、クレメンス J. (Clemens J.)、ドナルドソン T. (Donaldson T.)、ギレスピー F. (Gillespie F.) ら (1995) V717F - アミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスにおけるアルツハイマー型神経病理学 (Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid protein.)

10

20

30

40

50

yloid precursor protein.) Nature. 373: 523 - 527.

【0189】

ギンジリス A. L. (Ghindilis A. L.)、パブロフ A. R. (Pavlov A. R.)、アタナソフ P. B. (Atanassov P. B.) (編) (2002) Immunoassay Methods and Protocols. ヒューマナ・プレス (Humana Press) 米国、ニュージャージー州、トトワ (Totowa, NJ, US.)

【0190】

グレン G. M. (Glenn G. M.)、ラオ M. (Rao M.)、マットヤス G. R. (Matyas G. R.)、アルビング C. R. (Alving C. R.) (1998) コレラ毒素により可能になる皮膚免疫化 (Skin immunization made possible by cholera toxin.) Nature 391: 851.

【0191】

グレンナー G. G. (Glennner G. G.)、ウォング C. W. (Wong C. W.) (1984) アルツハイマー病：新規脳血管アミロイドタンパク質の精製および特徴づけに関する最初の報告 (Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120: 885 - 890.

【0192】

グラント - イクバル I. (Grundke-Iqbali I.)、イクバル K. (Iqbali K.)、ツング Y. (Tung Y.)、クインラン M. (Quinlan M.)、wisniewski H. (Wisniewski H.)、バインダー L. (Binder L.) (1986) アルツハイマー細胞骨格病理学における微小管結合タンパク質 (タウ) の異常リン酸化 (Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer's cytoskeletal pathology.) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83: 4913 - 4917.

【0193】

ハース C. (Haass C.)、シュロスマイチャー M. G. (Schlossmacher M. G.)、フング A. Y. (Hung A. Y.)、ビゴー - ペルフレー C. (Vigo-Pelfrey C.)、メロン A. (Mellon A.)、オスタスゼウスキ - B. L. (Ostaszewski B. L.)、リーバーバルク I. (Lieberburg I.)、コー E. H. (Koo E. H.)、シェンク D. (Schenk D.)、テプロー D. B. (Teplow D. B.)ら (1992) アミロイドベプチドは、正常な代謝中の培養細胞によって產生される (Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism.) Nature 359: 322 - 325.

【0194】

ハース C. (Haass C.)、カペル A. (Capell A.)、シトロン M. (Citron M.)、テプロー D. B. (Teplow D. B.)、セルコ D. J. (Selkoe D. J.) (1995) 液胞型H(+) - ATPase阻害剤のバフィロマイシンA1は、変異および野生型 - アミロイド前駆体タンパク質のタンパク質分解プロセシングに異なる影響を及ぼす (The vacuolar H(+) - ATPase inhibitor bafilomycin A1 differentially affects the processing of the wild-type and mutant forms of the pre-amyloid protein.) J. Biol. Chem. 270: 22000 - 22004.

ntially affects proteolytic processing of mutant and wild-type beta-amyloid precursor protein.) J. Biol. Chem. 270: 6186 - 6192.

【0195】

ハリガヤ Y. (Harigaya Y.)、サイド T. C. (Saido T. C.)、エックマン C. B. (Eckman C. B.)、プラダ C. - M. (Prada C. - M.)、ショウジ M. (Shoji M.)、ヨウキン S. G. (Younkin S. G.) (2000) 3位のピログルタミン酸で開始するアミロイドタンパク質は、アルツハイマー病脳のアミロイド沈着の主要成分である (Amyloid Protein Starting Pyroglutamate at Position 3 Is a Major Component of the Amyloid Deposits in the Alzheimer's Disease Brain.) Biochemical and Biophysical Research Communications 276: 422 - 427.

【0196】

ヒアオ K. (Hsiao K.)、チャップマン P. (Chapman P.)、ニルセン S. (Nilsen S.)、エックマン C. (Eckman C.)、ハリガヤ Y. (Harigaya Y.)、ヨウキン S. (Younkin S.)、ヤング F. (Yang F.)、コレ G. (Cole G.) (1996) トランスジェニックマウスにおける相関的記憶障害、Aベータの上昇、およびアミロイド斑 (Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice.) Science 274: 99 - 102.

【0197】

フアング Q. (Huang Q.)、ホー G. (He G.)、ラン Q. (Lan Q.)、リ X. (Li X.)、キアン Z. (Qian Z.)、チェン J. (Chen J.)、ル Z. (Lu Z.)、デュ Z. (Du Z.) (1996) ヒト脳神経膠腫の標的画像診断。40症例の臨床解析 (Target imaging diagnosis of human brain glioma. Clinical analysis of 40 cases.) Clin. Med. J. 109: 93 - 96.

【0198】

ハイマン B. T. (Hyman B. T.)、トロジアノウスキ J. Q. (Trojanowski J. Q.) (1997) アルツハイマー病の神経病理学的評価のための診断基準に関するナショナル・インスティテュート・オン・エイジング・アンド・ザ・レーガン・インスティテュート・ワーキング・グループのアルツハイマー病の検死診断のための一一致勧告 (Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease.) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 56: 1095 - 1097.

【0199】

ジャンセン F. K. (Jansen F. K.)、ブライスマン H. E. (Blythman H. E.)、キャリアレ D. (Carrierre D.)、カセラス P. (Casellas P.)、グロス O. (Gros O.)、グロス P. (Gros P.)、ラウレント J. C. (Laurent J. C.)、パオルッシ F. (Paolucci F.)

(Paolucci F.)、パウ B. (Pau B.)、ポンセレット P. (Poncelet P.)、リヒャー G. (Richer G.)、ビダル H. (Vidal H.)、ボイシン G.A. (Voisin G.A.) (1982) イムノトキシン：高い特異性および強力な細胞障害性を組み合わせたハイブリッド分子 (Immunotoxins: hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity.) Immunol. Rev. 62: 185-216.

【0200】

ジャヌス C. (Janus C.)、ピールソン J. (Pearson J.)、マックラウリン J. (McLaurin J.)、マセウス P.M. (Matthews P.M.)、ジアング Y. (Jiang Y.)、シュミット S.D. (Schmidt S.D.)、クリスティ M.A. (Christie M.A.)、ホルネ P. (Horne P.)、ヘスリン D. (Heslin D.)、フレンチ J. (French J.)、マウント H.T.J. (Mount H.T.J.)、ニクソン R.A. (Nixon R.A.)、メルケン M. (Mercken M.)、ベルゲロン C. (Bergeron C.)、フライザー P.E. (Fraser P.E.)、ジョージ・ハイスロップ P. (George-Hyslop P.)、ウェスタウェイ D. (Westaway D.) (2000) A ペプチド免疫化は、アルツハイマー病のモデルの行動損傷および斑を減少する (A peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease.) Nature 408: 979-982.

【0201】

ジェンセン F.C. (Jensen F.C.)、サバリー J.R. (Savary J.R.)、ディベレイ J.P. (Diveley J.P.)、チャン J.C. (Chang J.C.) (1998) 不完全フロイントアジュvantのアジュvant活性 (Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant.) Adv. Drug Deliv. Rev. 32: 173-186.

【0202】

カルバッカ W. (Kalback W.)、ワトソン M.D. (Watson M.D.)、コクジョン T.A. (Kokjohn, T.A.)、クオ Y.-M. (Kuo Y.-M.)、ウェイス N. (Weiss N.)、ルエルス D.C. (Luehrs D.C.)、ロペス J. (Lopez J.)、ブルネ D. (Brunne D.)、シソディア S.S. (Sisodia S.S.)、スタウゲンビル M. (Staugenbiel M.)、エマーリング M. (Emmerling M.)、ロヘル A.E. (Roher A.E.) (2002) APPトランスジェニックマウスTg2576は、アルツハイマー病老人班に沈着した化学修飾されたかつ不溶性ペプチドとは異なるA ペプチドを蓄積する (APP transgenic mice Tg2576 accumulate Abeta peptides that are distinct from the chemically modified and insoluble peptides deposited in Alzheimer's disease senile plaques.) Biochemistry 41: 922-928.

【0203】

カング J. (Kang J.)、レマイレ H.G. (Lemaire H.G.)、ウンターベック A. (Unterbeck A.)、サルバウム J.M. (Salbaum J.M.)、マスターズ C.L. (Masters C.L.)、グルゼシック K.H. (Grzeschik K.H.)、ムルサウプ G. (Mullthaup G.)、ベイレウサー K. (Beyreuther K.)、ムラー・ヒル B. (Mueller-Hill B.) (2006) APPトランスジェニックマウスTg2576は、アルツハイマー病老人班に沈着した化学修飾されたかつ不溶性ペプチドとは異なるA ペプチドを蓄積する (APP transgenic mice Tg2576 accumulate Abeta peptides that are distinct from the chemically modified and insoluble peptides deposited in Alzheimer's disease senile plaques.) Biochemistry 41: 922-928.

(Muller-Hill B.) (1987) アルツハイマー病アミロイドA4タンパク質の前駆体は細胞表面受容体に類似する (The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.) Nature 325: 733-736.

【0204】

カワラバヤシ T. (Kawarabayashi T.)、ヨウキン L.H. (Younkin L.H.)、サイド T.C. (Saido T.C.)、ショウジ M. (Shoji M.)、アシェ K.H. (Ashe K.H.)、ヨウキン S.G. (Younkin S.G.) (2001) アルツハイマー病の Tg 2576 トランスジェニックマウスモデルの脳内加齢依存性変化、CSF、および血症中アミロイドタンパク質 (Age-Dependent Changes in Brain, CSF, and Plasma Amyloid Protein in the Tg 2576 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease.) J. Neuroscience 21: 372-381.

【0205】

ケンシリル (Kensil) ら (1995) In: Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. ポーウエル (Powell) およびニューマン (Newman) (編)、プレナム・プレス (Plenum Press)、ニューヨーク (NY.)

【0206】

キタグチ N. (Kitaguchi N.)、タカハシ Y. (Takahashi Y.)、トクシマ Y. (Tokushima Y.)、シオジリ S. (Shiojiri S.)、イトウ H. (Ito H.) (1988) アルツハイマー病アミロイドタンパク質の新規前駆体はプロテアーゼ阻害活性を示す (Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity.) Nature 331: 530-532.

【0207】

クレイン W.L. (Klein W.L.)、クラフト G.A. (Krafft G.A.)、フィンチ C.E. (Finch C.E.) (2001) 小さな A オリゴマーの標的化: アルツハイマー病の謎の解決? (Targeting small A oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?) Trends Neurosci. 24: 219-224.

【0208】

コラー G. (Kohler G.)、マイルスタイン C. (Milstein C.) (1975) 予め規定された特異性の抗体を分泌する融合細胞の連續培養 (Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.) Nature 256: 495-497.

【0209】

コンドウ J. (Kondo J.)、ホンダ T. (Honda T.)、モリ H. (Mori H.)、ハマダ Y. (Hamada Y.)、ミウラ R. (Miura R.)、オガワラ M. (Ogawara M.)、イハラ Y. (Ihara Y.) (1988) タウのカルボキシル側の3分の1は、対になった螺旋フィラメントに緊密に結合する (The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments.) Neuron 1: 827-834.

【0210】

10

20

20

30

40

50

コシク K . S . (K o s i k K . S .) 、 ジョアキム C . L . (J o a c h i m C . L .) 、 セルコエ D . J . (S e l k o e D . J .) (1 9 8 6) 微小管結合タンパク質タウは、アルツハイマー病の対になった螺旋フィラメントの主要抗原性成分である (M i c r o t u b u l e - a s s o c i a t e d p r o t e i n t a u i s a m a j o r a n t i g e n i c c o m p o n e n t o f p a i r e d h e l i c a l f i l a m e n t s i n A l z h e i m e r ' s d i s e a s e .) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . (U S A) 8 3 : 4 0 4 4 - 4 0 4 8 .

【 0 2 1 1 】

コズボール D . (K o z b o r D .) 、 デキスター D . (D e x t e r D .) 、 ローダー J . C . (R o d e r J . C .) (1 9 8 3) ヒトハイブリドーマの構築のための利用可能な融合パートナーの表現型特長の比較分析 (A c o m p a r a t i v e a n a l y s i s o f t h e p h e n o t y p i c c h a r a c t e r i s t i c s o f a v a i l a b l e f u s i o n p a r t n e r s f o r t h e c o n s t r u c t i o n o f h u m a n h y b r i d o m a s .) H y b r i d o m a 2 : 7 - 1 6 .

【 0 2 1 2 】

ランガー R . (L a n g e r R .) (1 9 9 0) 薬物送達の新規方法 (N e w m e t h o d s o f d r u g d e l i v e r y .) 2 4 9 : 1 5 2 7 - 1 5 3 3 .

【 0 2 1 3 】

ランガー R . (L a n g e r R .) 、 クレランド J . L . (C l e l a n d J . L .) 、 ハーネス J . (H a n e s J .) (1 9 9 7) 微小球に基づく単回用量ワクチンの新たな前進 (N e w a d v a n c e s i n m i c r o s p h e r e - b a s e d s i n g l e - d o s e v a c c i n e s .) A d v . D r u g D e l i v . R e v . 2 8 : 9 7 - 1 1 9 .

【 0 2 1 4 】

ラングストン J . W . (L a n g s t o n J . W .) 、 ウィンダー H . (W i d n e r H .) 、 ゴーツ C . G . (G o e t z C . G .) 、 ブルックス D . (B r o o k s D .) 、 ファン S . (F a h n S .) 、 フリーマン T . (F r e e m a n T .) 、 ワッツ R . (W a t t s R .) (1 9 9 2) 脳内移植のためのコア評価プログラム (C o r e a s s e s s m e n t p r o g r a m f o r i n t r a c e r e b r a l t r a n s p l a n t a t i o n s (C A P I T) .) M o v . D i s o r d . 7 : 2 - 1 3 .

【 0 2 1 5 】

ラウリー (L a w r i e) およびツミン (T u m i n) (1 9 9 3) C u r . O p i n . G e n e t . D e v e l o p . 3 : 1 0 2 - 1 0 9 .

【 0 2 1 6 】

レメレ C . A . (L e m e r e C . A .) 、 マーロン R . (M a r o n R .) 、 スプーナー E . T . (S p o o n e r E . T .) 、 グレンフェル T . J . (G r e n f e l l T . J .) 、 モリ C . (M o r i C .) 、 デサイ R . (D e s a i R .) 、 ハンコック W . W . (H a n c o c k W . W .) 、 ウェイナー H . L . (W e i n e r H . L .) 、 セルコエ D . J . (S e l k o e D . J .) (2 0 0 0 a) 鼻A 処置は、 PD - APPマウスの抗A 抗体産生を誘導し、脳アミロイド負荷を減少する (N a s a l A t r e a t m e n t i n d u c e s a n t i - A a n t i b o d y p r o d u c t i o n a n d d e c r e a s e s c e r e b r a l a m y l o i d b u r d e n i n P D - A P P m i c e .) A n n . N . Y . A c a d . S c i . 9 2 0 : 3 2 8 - 3 3 1 .

【 0 2 1 7 】

レメレ C . A . (L e m e r e C . A .) 、 マーロン R . (M a r o n R .) 、 スプーナー E . T . (S p o o n e r E . T .) 、 グレンフェル T . J . (G r e n f e l l T . J .) 、 モリ C . (M o r i C .) 、 デサイ R . (D e s a i

10

20

30

40

50

R.)、ウェイナー H. L. (Weiner H. L.)、セルコエ D. J. (Selkoe D. J.) (2000b) 鼻A免疫化はPDAPPマウスのアミロイドタンパク質負荷を減少する (Nasal A immunization reduces amyloid-protein burden in PDAPP mice) [abstract 567] Neurobiol. Aging 21: S126.

【0218】

レメレ C. A. (Lemere C. A.)、スプーナー E. T. (Spooner E. T.)、デサイ R. (Desai R.)、グレンフェル T. J. (Grenfell T. J.)、モリ C. (Mori C.)、ベクレリス K. (Vekrellis K.)、セルコエ D. J. (Selkoe D. J.) (2000c) マウスにおけるA免疫化およびA抗体による小膠細胞のプライミングの効果 (Effects of A immunization in mice and of the priming of microglia with A antibodies) [abstract 397.3] Soc. Neurosci. Abstr. 26: 1060.

【0219】

レメレ C. A. (Lemere C. A.)、マーロン R. (Maron R.)、セルコエ D. J. (Selkoe D. J.)、ウェイナー H. L. (Weiner H. L.) (2001) アルツハイマー病の処置のための -アミロイドペプチドによる鼻ワクチン化 (Nasal Vaccination with -Amyloid Peptide for the Treatment of Alzheimer's Disease.) DNA and Cell Biology 20: 705-711.

【0220】

レウズク P. (Lewczuk P.)、エッセルマン H. (Esselmann H.)、メイヤー M. (Meyer M.)、ウォルシード V. (Wollschied V.)、ノイマン M. (Neumann M.)、オット M. (Otto M.)、マーラー J. M. (Maier J. M.)、ルーサー E. (Ruther E.)、コーンフーバー J. (Kornhuber J.)、ウィルトファン G. (Wiltfang J.) (2003) アルツハイマー病における脳脊髄液のアミロイド (A) ペプチドパターン: 新規カルボキシ末端伸張Aペプチドの証拠 (The amyloid-beta (Abeta) peptide pattern in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease: evidence of a novel carboxyterminal ly elongated Abeta peptide.) Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 17: 1291-1296.

【0221】

リビングストン B. D. (Livingston B. D.)、クライミ C. (Crimi C.)、グレイ H. (Grey H.)、イシオカ G. (Ishioka G.)、チサリ F. V. (Chisari F. V.)、フィケス J. (Fikes J.)、グレイ H. (Grey H.)、チエスナット R. W. (Chesnut R. W.)、セッテ A. (Sette A.) (1997) リポペプチドワクチン化によりヒトにおいて誘導されるB型肝炎ウイルス特異的CTL応答は、急性ウイルス感染により誘発される応答に匹敵する (The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection.) J. Immunol. 159: 1383-1392.

【0222】

10

20

30

40

50

マリアーニ G. (Marianni G.)、ラスク A. (Lasku A.)、パウ A. (Pau A.)、ビラ G. (Villa G.)、モッタ C. (Motta C.)、カルカグノ G. (Calcagno G.)、タドディ G. Z. (Taddei G. Z.)、カステルラーニ P. (Castellani P.)、シリゴス K. (Syrigos K.)、ドルカラット A. (Dorcaratto A.)、エペネトス A. A. (Epenetos A. A.)、ザーディ L. (Zardi L.)、ビアレ G. A. (Viale G. A.) (1997) 脳腫瘍患者の腫瘍胎児性フィブロネクチンに対するテクネチウム-99m標識モノクローナル抗体BC-1によるパイロット薬物動態および免疫シンチグラフィー研究 (A pilot pharmacokinetic and immunoscintigraphic study with the technetium-99m labeled monoclonal antibody BC-1 directed against oncofetal fibronectin in patients with brain tumours.) *Cancer* 15: 2484-2489.

【0223】

マスターズ C. L. (Masters C. L.)、シムス G. (Simms G.)、ウェインマン N. A. (Weinman N. A.)、マルサアップ G. (Multaup G.)、マクドナルド B. L. (McDonald B. L.)、ベイロイサー K. (Beyreuther K.) (1985) アルツハイマー病およびダウン症候群におけるアミロイド斑コアタンパク質 (Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome.) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 82: 245-249.

【0224】

マクジー J. P. (McGee J. P.)、サイ M. (Singh M.)、リ X. M. (Li X. M.)、クウ H. (Qiu H.)、オハーガン D. T. (O'Hagan D. T.) (1997) 多様なサイズのポリ(D,Lラクチド-コ-グリコリド)微粒子におけるモデルタンパク質のカプセル化: プロセス再生の評価 (The encapsulation of a model protein in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles of various sizes: an evaluation of process reproducibility.) *J. Microencapsul.* 14: 197-210.

【0225】

マクケイス I. G. (McKeith I. G.)、ガラスコ D. (Galasko D.)、コサカ K. (Kosaka K.)、ペリー E. K. (Perry E. K.)、ディクソン D. W. (Dickson D. W.)、ハンセン L. A. (Hansen L. A.)、サルモン D. P. (Salmon D. P.)、ロウェ J. (Lowe J.)、ミラ S. S. (Mirra S. S.)、バーン E. J. (Byrne E. J.)、レノックス G. (Lennox G.)、クイン N. P. (Quinn N. P.)、エドワードソン J. A. (Edwardson J. A.)、インス P. G. (Ince P. G.)、バーゲロン C. (Bergeron C.)、バーンズ A. (Burns A.)、ミラー B. L. (Miller B. L.)、ラバーストーン S. (Loverstone S.)、コラートン D. (Collerton D.)、ジャンセン E. N. H. (Jansen E. N. H.)、バラード C. (Ballard C.)、ド・ボス R. A. I. (d'Vos R. A. I.)、ウィルcock G. K. (Wilcock G. K.)、ジェリンガー K. A. (Jellinger K. A.)、ペリー R. H. (Perry R. H.) (1996) レビー小体型痴呆 (DLB) の臨床および病理診断のコンセンsusガイドライン: DLB国際研究集会に関するコンソーシアムの報告 (Consensus g 50

u i d e l i n e s f o r t h e c l i n i c a l a n d p a t h o l o g i c d i a g n o s i s o f d e m e n t i a w i t h L e w y b o d i e s (D L B) : R e p o r t o f t h e c o n s o r t i u m o n D L B i n t e r n a t i o n a l w o r k s h o p .) N e u r o l o g y 4 7 : 1 1 1 3 - 1 1 2 4 .

【0226】

マックハン G. (McKhann G.)、ドラクマン D. A. (Drachman D. A.)、ホルスタイン M. F. (Folstein M. F.)、カツマン R. (Katzman R.)、プライス D. L. (Price D. L.)、スタッドラン E. (Stadlan E.) (1984) アルツハイマー病の臨床診断：アルツハイマー病に関する保健福祉省後援NINCDS-ADRDAワーク・グループの報告 (Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease.) Neurology 34: 939-944.

【0227】

モエチャーズ D. (Moechars D.)、デワッチャー I. (Dewachter I.)、ロレント K. (Lorent K.)、リバース D. (Reverese D.)、ベーカーランド V. (Baekelandt V.)、ナーアドウ A. (Naidu A.)、テッセウル I. (Tesseur I.)、スピッタエルス K. (Spittaels K.)、ホイテ C. V. (Haute C. V.)、チエクラー F. (Checler F.)、ゴーダックス E. (Godaux E.)、コーデル B. (Cordell B.)、バン・ロイベン F. (Van Leuven F.) (1999) 脳においてアミロイド前駆体タンパク質の異なる変異体を過剰発現するトランスジェニックマウスの早期表現型の変化 (Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain.) J. Biol. Chem. 27304: 6483-6492.

【0228】

モンロー (Monroe) ら (1986) Amer. Clin. Prod. Rev. 5: 34-41.

【0229】

モーガン D. (Morgan D.)、ダイヤモンド D. M. (Diamond D. M.)、ゴットシャール P. E. (Gottschall P. E.)、ユーゲン K. E. (Ugen K. E.)、ディッキー C. (Dickey C.)、ハーディー J. (Hardy J.)、ダフ K. (Duff K.)、ヤンセン P. (Jantzen P.)、ジカリオ G. (DiCarlo G.)、ウィルコック D. (Wilcock D.)、コナー K. (Connor K.)、ハッチャリー J. (Hatcher J.)、ホープ C. (Hope C.)、ゴードン M. (Gordon M.)、アーレンダッシュ G. W. (Arendash G. W.) (2000) A ペプチドワクチン化は、アルツハイマー病の動物モデルにおける記憶の喪失を防止する (A peptide vaccination prevents memory loss in an animal model)

【0230】

マイルダーマンズ S. (Muylleermans S.) (2001) 単一ドメインラクダ抗体：現状 (Single domain camel antibodies: current status.) J. Biotechnol. 74: 277-302.

【0231】

オヒ Y. (Ohe Y.)、ザオ D. (Zha o D.)、サイジョウ N. (Saijo N.)、ポダック E. R. (Podack E. R.) (1995) 遺伝子導入に適切な検出可能な形質転換活性を伴わない新規なウシパピローマウイルスベクターの構築 (Construction of a novel bovine papillomavirus vector without detectable transforming activity suitable for gene transfer.) *Hum. Gene Ther.* 6: 325 - 333.

【0232】

ポール A. (Paul A.)、セベク G. (Cevc G.)、バッハハワット B. K. (Bachhawat B. K.) (1995) 超可変キャリアによる大きなタンパク質での経皮免疫化 (Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers.) *Eur. J. Immunol.* 25: 3521 - 3524.

【0233】

ピーターセン R. C. (Petersen R. C.)、スティーブンズ J. C. (Stevens J. C.)、ガングリ M. (Ganguli M.)、タンガロス E. G. (Tangalos E. G.)、カミングス J. L. (Cumming s J. L.)、デコスキュー S. T. (DeKosky S. T.) (2001) 実践パラメータ：軽度の認識障害（証拠に基づくレビュー）。米国神経学会の品質基準分科会の報告 (Practice parameter: Early detection of dementia: Mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology.) *Neurology* 56: 1133 - 1142.

【0234】

ポンテ P. (Ponte P.)、ゴンザレス・デウェット P. (Gonzalez - DeWhitt P.)、シリング J. (Schilling J.)、ミラー J. (Miller J.)、シュ D. (Hsu D.)、グリーンバーグ B. (Greenberg B.)、デイビス K. (Davis K.)、ウォーレス W. (Wallace W.)、リーバーバーグ I. (Lieberburg I.)、フラー F. (Fuller F.) (1988) 新規A4アミロイドmRNAは、セリンプロテアーゼ阻害剤に相同なドメインを含有する (A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors.) *Nature* 331: 525 - 527.

【0235】

クイーン C. (Queen C.)、シュナイダー W. P. (Schneider W. P.)、セリック H. E. (Selick H. E.)、ペイン P. W. (Payne P. W.)、ランドルフィ N. F. (Landolfi N. F.)、ダンカン J. F. (Duncan J. F.)、アブダロビック N. M. (Avdalovic N. M.)、レビット M. (Levitt M.)、ジュンハンス R. P. (Jung hans R. P.)、ウォールドマン T. A. (Waldmann T. A.) (1989) インターロイキン2受容体に結合するヒト化抗体 (A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor.) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86: 10029 - 10033.

【0236】

10

20

30

40

50

レミントン薬学化学 (Remington's Pharmaceutical Sciences.) (1995) マック・パブリッシング・コ (Mack Publishing Co.)、米国、ペンシルバニア州、イーストン (Easton, PA, U.S.A.)

【0237】

サイド T.C. (Saido T.C.)、イワツボ T. (Iwatsubo T.)、マン DM.A. (Mann DM.A.)、シマダ H. (Shimada H.)、イハラ Y. (Ihara Y.)、カワシマ S. (Kawashima S.) (1995) 老人斑における異なる -アミロイドペプチド種、A N3 (pE) の優性および特異な沈着 (Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3 (pE), in senile plaques.) *Neuron* 14: 457-466. 10

【0238】

サイド T.C. (Saido T.C.)、ヤマオ - ハリガヤ W. (Yamao - Harigaya W.)、イワツボ T. (Iwatsubo T.)、カワシマ S. (Kawashima S.) (1996) ヒト脳に沈着したアミノおよびカルボキシ末端異種 (Amino- and carboxy-terminal heterogeneity of -amyloid peptides deposited in human brain.) *Neuroscience Letters* 215: 20 173-176.

【0239】

サイド T.C. (Saido T.C.) (2000) アミロイド ペプチドの分解 : アルツハイマーの病原性、防止および治療への手掛けり (Degradation of amyloid-peptide: a key to Alzheimer pathogenesis, prevention and therapy.) *Neurosci. News* 3: 52-62.

【0240】

サンブルック J. (Sambrook J.)、フリッシュ E. (Fritsch E.)、マニアティス T. (Maniatis T.) (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリリー・プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、米国、ニューヨーク州、コールド・スプリング・ハーバー (Cold Spring Harbor, NY, USA.). 30

【0241】

サンドロック D. (Sandrock D.)、ベルヘーゲン R. (Verheggen R.)、ヘルビック A.T. (Helwig A.T.)、ムンズ D.L. (Munz D.L.)、マーカキス E. (Markakis E.)、エムリッヒ D. (Emrich D.) (1996) 脳膿瘍の検出のための免疫シンチグラフィー (Immunoscintigraphy for the detection of brain abscesses.) *Nucl. Med. Commun.* 17: 311-316. 40

【0242】

シェンク D.B. (Schenk D.B.)、バーバー R. (Barbour R.)、ダン W. (Dunn W.)、ゴードン G. (Gordon G.)、グラジェダ H. (Grajeda H.)、ガイド T. (Guido T.)、フー K. (Hu K.)、ホアン J. (Huan J.)、ジョンソン - ウッド K. (Johnson-Wood K.)、カーン K. (Khan K.)、コロデンコ D. (Khodenko D.)、リー M. (Lee M.)、リヤオ Z. (Liao Z.)、リーバーバーク I. (Lieberburg I.)、マター R. (Mo 50

tter R.)、ムター L. (Mutter L.)、ソリアーノ F. (Soriano F.)、ショップ G. (Shopp G.)、バスケス N. (Vasquez N.)、バンデバート C. (Vandevert C.)、ウォーカー S. (Walker S.)、ボグリス M. (Wogulis M.)、エドノック T. (Yednock T.)、ゲイムス D. (Games D.)、ソイベルト P. (Seubert P.) (1999) アミロイドによる免疫化は、PDAPPマウスにおけるアルツハイマー病様病変を減衰する (Immunization with amyloid-attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse.) Nature 400 : 173 - 177.

10

【0243】

シェンク D.B. (Schenk D.B.)、ソイベルト P. (Seubert P.)、リーバーバーク I. (Lieberburg I.)、ウォーレス J. (Wallace J.) (2000) ペプチド免疫化。アルツハイマー病の可能な新規の処置。(Peptide immunization. A possible new treatment for Alzheimer's disease.) Arch. Neurol. 57 : 934 - 936.

【0244】

シェンク D. (Schenk D.)、ソイベルト P. (Seubert P.)、シカレリー R.B. (Ciccarelli R.B.) (2001) アルツハイマー病のための -アミロイドによる免疫療法：新たなフロンティア(Immunotherapy with beta-amyloid for Alzheimer's disease: a new frontier.) DNA Cell Biol. 20 : 679 - 681.

20

【0245】

シュレイダー・フィッシャー G. (Schrader-Fischer G.)、パゲネティー P.A. (Paganetti P.A.) (1996) -アミロイド前駆体タンパク質のプロセッシングに対するアルカリ化剤の効果 (Effect of alkalinizing agents on the processing of the beta-amyloid precursor protein.) Brain Res. 716 : 91 - 100.

30

【0246】

セオ J. (Seo J.)、キム S. (Kim S.)、キム H. (Kim H.)、パーク C.H. (Park C.H.)、ジョン S. (Jeong S.)、リー J. (Lee J.)、チョイ S.H. (Choi S.H.)、チャン K. (Chang K.)、ラー J. (Rah J.)、クー J. (Koo J.)、キム E. (Kim E.)、サ Y. (Suh Y.) (2001) ニコチンのAPP分泌物およびA またはCT (105) 誘導毒性に対する効果 (Effects of nicotine on APP secretion and A beta- or CT (105)-induced toxicity.) Biol. Psychiatry 49 : 240 - 247.

40

【0247】

サージャント N. (Sergeant N.)、デイビッド J.P. (David J.P.)、シャンペイン D. (Champain D.)、ゲステム A. (Ghestem A.)、ワッテ A. (Wattez A.)、デラコート A. (Delacourte A.) (2002) アルツハイマー病においてタウ病理段階に関連するアミロイド前駆体タンパク質カルボキシ末端フラグメント (APP-CTF) の漸進的減少 (Progressive decrease of amyloid precursor protein carboxy terminal fragments (APP-CTFs), associated with tau pathology

50

stages, in Alzheimer's disease.) J. Neurochem. 81: 663-672.

【0248】

サージャント N. (Sergeant N.)、ボムボイス S. (Bombois S.)、ゲステム A. (Ghestem A.)、ドロベク H. (Drobecq H.)、コスタジエベキ V. (Kostanjevecki V.)、ミシア恩 C. (Missiaen C.)、ワッテス A. (Wattez A.)、デイビッド J. P. (David J. P.)、バンメケレン E. (Vanmechelen E.)、サーゲラート C. (Sergheeraert C.)、デラコート A. (Delacourte A.) (2003) ワクチン化アプローチのための新規標的としての前臨床アルツハイマー病における短縮 - アミロイド (Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach.) J. Neurochem. 85: 1581-1591. 10

【0249】

ソイベルト P. (Seubert P.)、ビゴ - ペルフレイ C. (Vigo - Pelfrey C.)、エシュ F. (Esch F.)、リー M. (Lee M.)、ドベイ H. (Dovey H.)、デイビス D. (Davis D.)、シンハ S. (Sinha S.)、シュラスマキサ M. (Schlossmacher M.)、ホエーレイ J. (Whaley J.)、ス温ンドルハースト C. (Swindlehurst C.) ら (1992) 生物学的液体由来の可溶性アルツハイマー病ペプチドの単離および定量 (Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids.) Nature 359: 325-327. 20

【0250】

シグルドソン E. M. (Sigurdsson E. M.)、ショルトゾバ H. (Scholtzova H.)、メタ P. D. (Mehta P. D.)、フランギオニ B. (Frangione B.)、ウィスニエフスキ T. (Wisniewski T.) (2001) 非毒性 / 非細線維のアミロイド 相同ペプチドによる免疫化は、トランスジェニックマウスにおけるアルツハイマー病関連病変を減少する (Immunization with a non-toxic/non-fibrillar amyloid-homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice.) Am. J. Pathol. 159: 439-447. 30

【0251】

シソディア S. S. (Sisodia S. S.) (1992) 膜結合プロテアーゼによる - アミロイド前駆体タンパク質切断 (Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease.) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6075-6079. 40

【0252】

スペイネル S. (Spinelli S.)、フレンケン L. G. (Frenken L. G.)、ハーマンス P. (Hermanns P.)、ベリップス T. (Verrips T.)、ブラウン K. (Brown K.)、テゴニ M. (Tegoni M.)、キャンビラウ C. (Cambillau C.) (2000) ラクダ重鎖可変ドメインは、ハプテンに対する効率的な結合部位を提供する (Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens.) Biochem 50

istry . 39 : 1217 - 1222 .

【0253】

スラメク J. J. (Sramek J. J.)、カルター N. R. (Cutler N. R.) (2000) アルツハイマー病の実施中の治験 (Ongoing trials in Alzheimer's disease.) Expert Opin. Investig. Drugs 9 : 899 - 915 .

【0254】

スタウテ J. A. (Stoute J. A.)、スラオウイ M. (Slaoui M.)、ヘプナー D. G. (Heppner D. G.)、モミン P. (Momin P.)、ケスター K. E. (Kester K. E.)、デズモンズ P. (Desmons P.)、ウェルデ B. T. (Wellde B. T.)、ガルコン N. (Garcon N.)、クリズィヒ U. (Krzzych U.)、マーシャン M. (Marchand M.) (1997) 热帯热マラリア原虫に対する組換えスプロゾイト周囲タンパク質ワクチンの予備評価 (A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against Plasmodium falciparum malaria.) RTS, S Malaria Vaccine Evaluation Group. N. Engl. J. Med. 336 : 86 - 91 .

【0255】

スターヒラー-ピアラット C. (Sturchler-Pierrat C.)、エイブラモスキ D. (Abramowski D.)、ドゥーク M. (Duke M.)、ウィーダーホールド K. H. (Wiederhold K. H.)、ミスチル C. (Mistl C.)、ロサチャー S. (Rothacher S.)、レーダーマン B. (Ledermann B.)、ブルキ K. (Burki K.)、フレイ P. (Frey P.)、パゲネットィー P. A. (Paganetti P. A.)、ワリデル C. (Waridel C.)、カルフーン M. E. (Calhoun M. E.)、ジャッカ M. (Jucker M.)、プロブスト A. (Probst A.)、シュタウフェンビル M. (Staufenbiel M.)、ソマー B. (Sommer B.) (1997) アルツハイマー病様病変を有する2つのアミロイド前駆体タンパク質トランスジェニックマウスマodel (Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology.) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 13287 - 13292 .

【0256】

タケウチ A. (Takeuchi A.)、イリザリー M. C. (Irizarry M. C.)、ダフ K. (Duff K.)、サイド T. C. (Saido T. C.)、シャオ アシェ K. (Hsiao Ashe K.)、ハセガワ M. (Hasegawa M.)、マン D. M. (Mann D. M.)、ハイマン B. T. (Hyman B. T.)、イワツボ T. (Iwatsubo T.) (2000) アルツハイマー変異体プレセニリン1およびアミロイド 前駆体タンパク質スウェーデン型変異体の両方を過剰発現するトランスジェニックマウスにおける加齢関連アミロイド 沈着は、包括的神経消失に関連しない (Age-related amyloid beta deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and amyloid beta precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss.) Am. J. Pathol. 157 : 331 - 339 .

【0257】

タマダ K. (Tamada K.)、フジナガ S. (Fujinaga S.)、ワタナベ R. (Watanabe R.)、ヤマシタ R. (Yamashita R)

10

20

30

40

50

.) 、タケウチ Y . (Takeuchi Y .) 、オサノ M . (Osano M .) (1995) ウィルスに感染したラット脳における単純ヘルペスウィルス 1 型に対する受動移動したモノクローナル抗体の特異的沈着 (Specific deposition of passively transferred monoclonal antibodies against herpes simplex virus type 1 in rat brain infected with the virus .) *Microbiol - Immunol* . 39 : 861 - 871 .

【 0258 】

テサマニー J . (Temsamani J .) 、ロウセレ C . (Roussel le C .) 、リーズ A . R . (Rees A . R .) 、スケルマン J . M . (Scherrmann J . M .) (2001) 脳へのベクター仲介薬物送達 (Vector-mediated drug delivery to the brain .) *Expert Opin. Biol. Ther.* . 1 : 773 - 782 .

【 0259 】

サーク L . J . (Thal L . J .) (2000) 進行を遅らせ、疾患の発症を防止するための治験 (Trials to slow progression and prevent disease onset .) *J. Neural. Transm. Suppl.* . 59 : 243 - 249 .

【 0260 】

ティギス M . A . (Tiggess M . A .) 、レング S . (Leng S .) 、ジョンソン D . C . (Johnson D . C .) 、バーカ R . L . (Burke R . L .) (1996) ヒト単純ヘルペスウィルス (HSV) 特異的 CD8 + CTL は、IFN - による処置後またはビリオン宿主シャットオフ機能が無効にされる場合、HSV 2 感染線維芽細胞を認識する (Human herpes simplex virus (HSV) - specific CD8 + CTL clones recognize HSV-2-infected fibroblasts after treatment with IFN - or when virion host shutoff functions are disabled .) *J. Immunol.* . 156 : 3901 - 3910 .

【 0261 】

ボーゲル F . R . (Vogel F . R .) 、パウエル M . F . (Powell M . F .) 、アルビング C . R . (Alving C . R .) (2003) ワクチンアジュバントおよび賦形剤の概論 (A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients) (第2版) <http://vrc.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf> .

【 0262 】

ウォーランド L . - O . (Wahlund L . - O .) 、ピルストランド E . (Pihlstrand E .) 、エリクスドッター ジエンハーゲン M . (Eriksson dotter Joenhangen M .) (2003) 軽度の認識障害：記憶クリニックでの経験 (Mild cognitive impairment: experience from a memory clinic .) *Acta Neurol. Scand.* . 107 (Suppl. 179) : 21 - 24 .

【 0263 】

ワカバヤシ T . (Wakabayashi T .) 、ヨシダ J . (Yoshiida J .) 、オカダ H . (Okada H .) 、スギタ K . (Sugita K .) 、イトウ K . (Itoh K .) 、タドコロ M . (Tadokoro M .) 、オオシマ M . (Ohshima M .) (1995) インジウム - 11 標識 G - 22 抗神経膠腫モノクローナル抗体によるヒト神経膠腫の放射性画像化 (Radioimaging of human glioma by indium - 11 labelled G - 50

22 anti-glioma monoclonal antibody.) Nosh
uyoo-Byori 12:105-110.

【0264】

ウェイナー H. L. (Weiner H. L.)、レメレ C. A. (Lemere C. A.)、マーロン R. (Maron R.)、スプーナー E. T. (Spoo-
ner E. T.)、グレンフェル T. J. (Grenfell T. J.)、モリ C. (Mori C.)、イッサザデ S. (Issazadeh S.)、ハンコック W. W. (Hancock W. W.)、セルコエ D. J. (Selkoe D. J.) (2000) アミロイドペプチドの鼻投与は、アルツハイマー病のマウスモデルにおける脳アミロイド負荷を減少する (Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease.) Ann. Neurol. 48: 567-579. 10

【0265】

ワイルド D. (Wild D.) (編) (2001) The Immunoassay Handbook 第2版. ネイチャー Pr. (Nature Pr.) 英国、ロンドン (London, UK.)

【0266】

ヴィスニエフスキ H. M. (Wisniewski H. M.)、ボルブロット A. W. (Vorbrodt A. W.)、ウェギール J. (Wegiel J.) (1997) アルツハイマー病におけるアミロイド脈管障害および血液脳関門の変化 (Amyloid angiopathy and blood-brain barrier changes in Alzheimer's disease.) Ann. N. Y. Acad. Sci. 826: 161-172. 20

【0267】

ウッド J. (Wood J.)、ミラ S. (Mirra S.)、ポロック N. (Pollock N.)、バインダー L. (Binder L.) (1986) アルツハイマー病の神経原線維変化は、軸索微小管結合タンパク質タウと抗原決定基を共有する (Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau.) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83: 4040-4043. 30

【0268】

シャオ W. (Xiao W.)、ブランドスマ J. L. (Brandsma J. L.) (1996) 粒子仲介DNA伝達後のウサギ皮膚におけるワタオウサギパピローマウイルス (CRPV) DNAの高効率、長期臨床発現 (High efficiency, long-term clinical expression of cotton tail rabbit papillomavirus (CRPV) DNA in rabbit skin following particle-mediated DNA transfer.) Nucleic Acids Res. 24: 2620-2622. 40

【0269】

チョウ S. Z. (Zhou S. Z.)、クーパー S. (Cooper S.)、カング L. Y. (Kang L. Y.)、ルギーリ L. (Ruggieri L.)、ヘイムフェルド S. (Heimfeld S.)、スリバスタバ A. (Srivastava A.)、ブロキシメーヤー H. E. (Broxmeier H. E.) (1994) ヒト臍帯血における造血性前駆細胞の未成熟および成熟サブセットへのアデノ隨伴ウイルス2仲介高効率遺伝子導入 (Adeno-associated virus 2-mediated high efficiency gene transfe 50

rinto immature and mature subsets of hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood.) J. Exp. Med. 179: 1867-1875.

【図面の簡単な説明】

【0270】

【図1】APP770の部分アミノ酸配列であって、Aのアミノ酸配列を表し、-、-、および-セクレターゼ切断部位を示す。

【図2】アルツハイマー病患者から得られる脳に存在するA種の2次元電気泳動分析を表す。ギ酸で可溶化したA凝集体を2-Dゲル電気泳動により分離した。A単量体(4kDa)および二量体(8kDa)を、Aアミノ末端領域に対する抗体WO2および6E10で標識した(それぞれ、N-末端(5-8)およびN-末端(4-13)パネル)。A₄₂およびA₄₀のカルボキシ末端テイルを21F12およびADA40で検出した(それぞれA-42およびA-40パネル)。本発明者らの抽出方法で回収した主要なA種をクマシー・ブルー(Coomassie Blue)で染色し、その後10個のスポットを質量分析によって分析した(表3)。示した結果は、最大量のアミロイド沈着を示したAD患者から得た。等電点(pI)および質量分析の解析に使用したAスポットを示す。Aの二量体種はクマシー・ブルー(Coomassie Blue)で染色されていないことに留意すること。

【図3】臨床外AD患者から得られた脳に存在する凝集したA種を表す。非痴呆患者の脳組織由来のギ酸可溶化A種を2-Dゲル電気泳動により分離した。A₄₀種は、本発明者らのADA40抗血清では検出されない。21F12は、A₄₂単量体(4kDa染色)および二量体(8kDa染色)の両方を検出する。WO2(パネルN-末端(5-8))および6E10(パネルN-末端(4-13))抗体の両方とも、pI5.30で単一のAペプチドスポットを染色した。

【図4】臨床外ADにおけるAの二量体は、本質的にアミノ短縮Aペプチドよりなる。コントロール個体(S0)、3例の非痴呆症例(S1、S2、およびS6)ならびに1例のAD症例(S10)をギ酸に溶解した。デラコウルテ(Delacourte)ら(2002)ならびにブラアク(Braak)およびブラアク(Braak)(1991)によって規定された命名法に従って、タウ病変(S0-S10)の段階およびアミロイド段階分類(BまたはC)を、それぞれレーンの頂部で同定する。10ngのAペプチド1-40および1-42を、平行して充填した(第1および第2のレーン)。A₄₂を21F12で同定し(パネルA-42)、アミノ末端領域をWO2で同定した(WO2パネル)。分子量を左側で同定し、矢印は、21F12により標識されたアミノ短縮変異体を示す。2-D電気泳動分析および質量分析について、同じAD症例を使用したこと留意すること。

【図5】実施例2で使用する架橋アッセイの原理を表す。

【図6】架橋アッセイの使用による抗体の特異性の分析を表す。異なるN-末端短縮アミロイドペプチドをコーティングに使用し、特異なHRP-ペプチドコンジュゲートを検出しに使用した。抗体を実施例2に記載のように作製した。

【図7】ヒト脳抽出物に存在するN-末端短縮Aペプチドの分析を表す。いくらかの段階のアルツハイマー病変のギ酸抽出物の1/20希釀物について、OD450値を示す。21F12によりプレート上でペプチドを捕獲し(キットK-1080、インノジエティクス(Innogenetics)、ベルギー、ヘント(Ghent, Belgium))、1-42についてはビオチン化3D6により、短縮アミロイドに特異的な異なる抗血清については架橋アッセイにより検出した。

【図1】

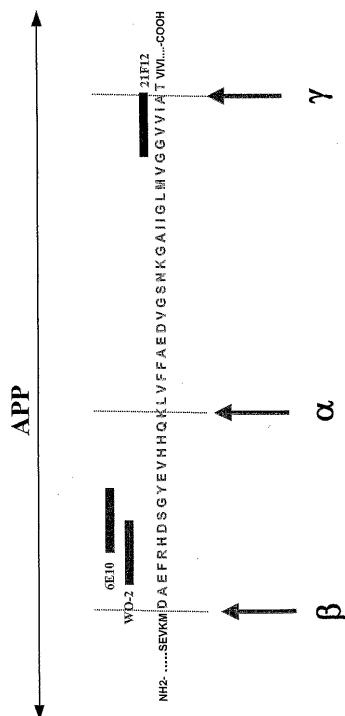


Figure 1

【図2】

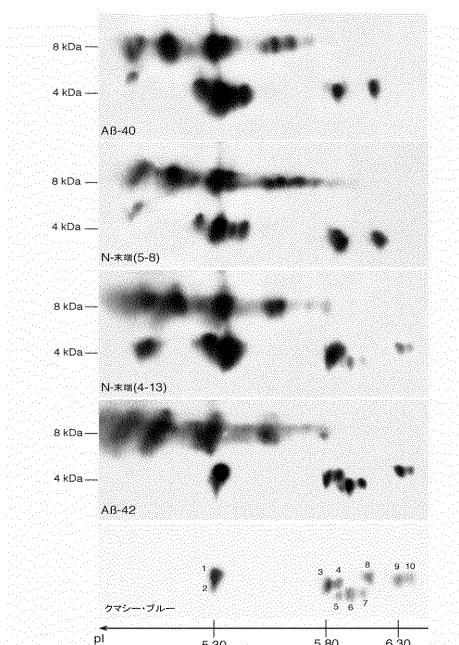


図2

【図3】

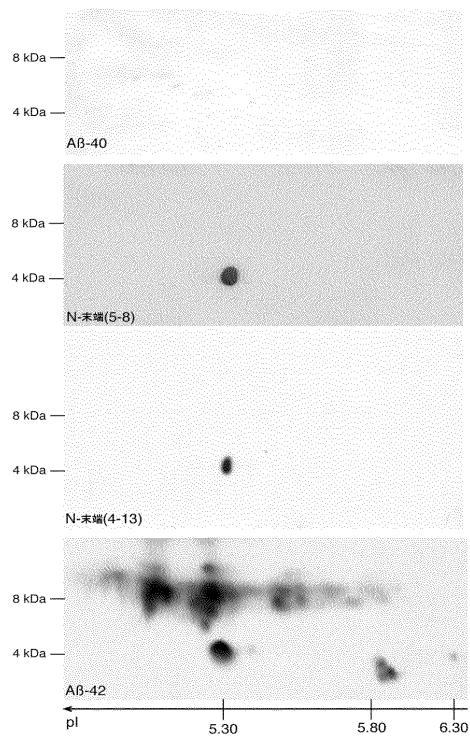


図3

【図4】

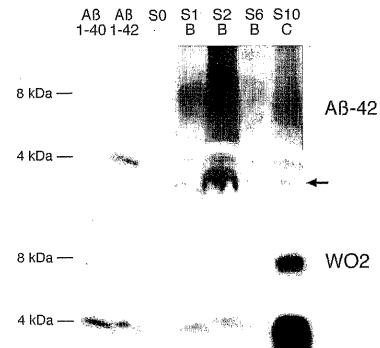
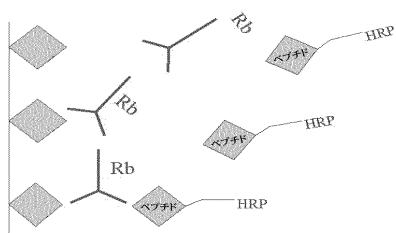


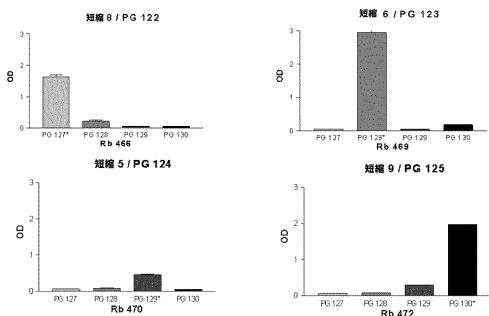
Figure 4.

【 四 5 】



5

【 四 6 】



6

【図7】

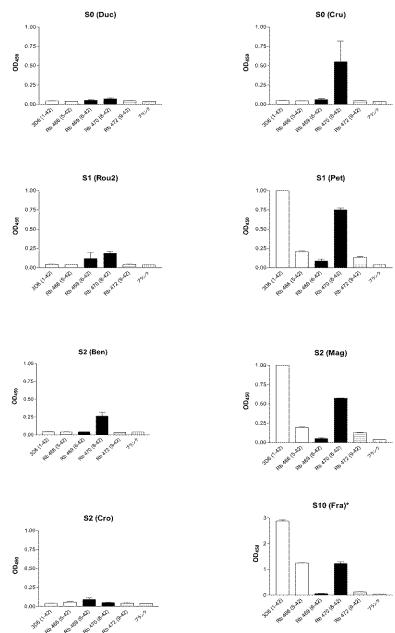


圖 7

【手続補正書】

【提出日】平成17年2月4日(2005.2.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2006513259000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 03/07833
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 A61K39/00 C07K16/44 G01N33/50		
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 C07K A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, INSPEC, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIGURDSSON EINAR M ET AL: "Immunization for Alzheimer's disease." DRUG DEVELOPMENT RESEARCH, vol. 56, no. 2, June 2002 (2002-06), pages 135-142, XP002247946 June, 2002 ISSN: 0272-4391 page 138, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 2 the whole document ----- -/-	1-28
<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 *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 October 2003	Date of mailing of the international search report 20.01.04	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Petri, B	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 03/07833

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SOLOMON BEKA: "Immunological concept in the treatment of Alzheimer's disease." DRUG DEVELOPMENT RESEARCH, vol. 56, no. 2, June 2002 (2002-06), pages 163-167, XP002247947 June, 2002 ISSN: 0272-4391 the whole document page 166, column 1, paragraph 3	1-28
X	IMBIMBO BRUNO P: "beta-Amyloid immunization approaches for Alzheimer's disease." DRUG DEVELOPMENT RESEARCH, vol. 56, no. 2, June 2002 (2002-06), pages 150-162, XP002247948 June, 2002 ISSN: 0272-4391 the whole document page 156, column 2, paragraph 2 - page 158, column 2, paragraph 2	1-28
X	WO 00/72880 A (SCHENK DALE B ;YEDNOCK TED (US); BARD FREDERIQUE (US); NEURALAB LT) 7 December 2000 (2000-12-07) *-Invention I-* page 14, line 30 - page 15, line 6	1-28
X	WO 98/44955 A (MINDSET LTD ;CHAIN DANIEL G (IL); MCINNIS PATRICIA A (US)) 15 October 1998 (1998-10-15) *-Invention I-* page 47	1-28
X	US 2002/094335 A1 (HEBERT LISE ET AL) 18 July 2002 (2002-07-18) *-Invention I-* page 15, paragraph 177	1-28
X	HENDRIX, JULIA C. ET AL: "Synthesis of a protected peptide corresponding to residues 1-25 of the beta.-amyloid protein of Alzheimer's disease" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY (1992), 57(12), 3421-6, XP001153618 *-Invention I-* page 3423, column 1, paragraph 3	1-28
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 03/07833

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HENDRIX, JULIA C. ET AL: "Studies related to a convergent fragment-coupling approach to peptide synthesis using the Kaiser oxime resin" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY (1992), 57(12), 3414-20, XP000115314 *-Invention I-* page P3415; figure 1 -----	1-28
X	HENDRIX, JULIA C. ET AL: "A novel solvent system for solid-phase synthesis of protected peptides: the disaggregation of resin-bound antiparallel beta.-sheet" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY (1990), 55(15), 4517-18, XP001153617 *-Invention I-*table 1 -----	1-28
X	LANSBURY, PETER T., JR. ET AL: "A practical method for the preparation of protected peptide fragments using the Kaiser oxime resin" TETRAHEDRON LETTERS (1989), 30(37), 4915-18, XP009013542 *-Invention I-*table 1 -----	1-28
X	INUI, TATSUYA ET AL: "Synthesis of amyloid beta-peptides in solution employing chloroform-phenol mixed solvent for facile segment condensation of sparingly soluble protected peptides" LETTERS IN PEPTIDE SCIENCE (2001), 8(6), 319-330, XP009013540 *-Invention I-*figure 1 -----	1-28
X	HENDRIX, JULIA C. ET AL: "A convergent synthesis of the amyloid protein of Alzheimer's disease" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (1992), 114(20), 7930-1, XP001153616 *-Invention I-*figure 1 -----	1-28
X	US 4 666 829 A (WONG CAINE W ET AL) 19 May 1987 (1987-05-19) *-Invention I-*claim 24; examples VII,IX -----	1-28
X	WO 94/19692 A (GEN HOSPITAL CORP) 1 September 1994 (1994-09-01) *-Invention I-* page 8, line 26 -----	1-28
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 03/07833

C-(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BERGAMASCHINI LUIGI ET AL: "The region 1-11 of Alzheimer amyloid-beta is critical for activation of contact-kinin system." NEUROBIOLOGY OF AGING, vol. 22, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 63-69, XP001153615 ISSN: 0197-4580 page 64, column 1, paragraph 4 -----	1-28
X	GIULIAN DANA ET AL: "The HHQK domain of beta-amyloid provides a structural basis for the immunopathology of Alzheimer's disease." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 45, 6 November 1998 (1998-11-06), pages 29719-29726, XP002247949 ISSN: 0021-9258 *-Invention I-*figure 1 -----	1-28
X	MESKE V ET AL: "The effects of beta/A4-amyloid and its fragments on calcium homeostasis, glial fibrillary acidic protein and S100beta staining, morphology and survival of cultured hippocampal astrocytes." NEUROSCIENCE, vol. 85, no. 4, August 1998 (1998-08), pages 1151-1160, XP001153614 ISSN: 0306-4522 *-Invention I-* page 1153, column 2, line 12 -----	1-28
X	AKSENOV, MICHAEL Y. ET AL: "Oxidative modification of glutamine synthetase by amyloid beta peptide" FREE RADICAL RESEARCH (1997), 27(3), 267-281, XP009013538 *-Invention I-* page 268, column 2, line 8 -----	1-28
X	WO 92/03474 A (HARVARD COLLEGE) 5 March 1992 (1992-03-05) *-Invention I-* page 15, line 7 - line 10 ----- -/-	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 03/07833

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG RONG ET AL: "The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 50, 1996, pages 31894-31902, XP002247951 ISSN: 0021-9258 *-Invention I-*table II -----	1-28
X	WO 96/28471 A (PHARM PEPTIDES INC) 19 September 1996 (1996-09-19) *-Invention I-* page 74; example 12; table VI -----	1-28
X	US 5 876 948 A (YANKNER BRUCE A) 2 March 1999 (1999-03-02) *-Invention I-*table 1 -----	1-28
X	EP 0 683 234 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 22 November 1995 (1995-11-22) *-Invention I-* page 9, line 51 -----	1-28
E	WO 03/000719 A (SOLOMON BEKA ;RAMOT AT TEL AVIV UNIVERSITY L (IL); MCINNIS PATRICI) 3 January 2003 (2003-01-03) *-Invention I-*table 1 -----	1-28
E	WO 02/096350 A (UNITED BIOMEDICAL INC) 5 December 2002 (2002-12-05) *-Invention I-*table 3 -----	1-28
P,X	SERGEANT NICOLAS ET AL: "Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach." JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 85, no. 6, June 2003 (2003-06), pages 1581-1591, XP002257887 ISSN: 0022-3042 the whole document -----	1-28
X	"Antibodies to Beta Amyloid Proteins" THALZHEIMER RESEARCH FORUM WWW.ALZFORUM.ORG, 'Online! - 3 June 2002 (2002-06-03) XP002257888 Retrieved from the Internet: <URL: http://web.archive.org/web/20020623071147/www.alzforum.org/members/resources/antibodies/Beta-Amyloid/page_set.html > 'retrieved on 2003-10-15! the whole document -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP 03/07833

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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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:

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.:

1-28 (partially)

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/EP 03 A7833

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**Continuation of Box I.1**

Although claim 19 is 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.

Although claims 26-28 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

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/EP 03/07833

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1: Claims 1-28 (partially)

Group 1: Subject-matter relating to N-terminal fragments with N-terminal DAEF, i.e. Seq.Id.Nos.: 1-13

Invention 2-10: Claims 1-28 (partially)

As Invention 1 however relating to:

Group 2: Subject-matter relating to N-terminal fragments with N-terminal AEFR, i.e. Seq.Id.Nos.: 14-26

Group 3: Subject-matter relating to N-terminal fragments with N-terminal EFRH, i.e. Seq.Id.Nos.: 27-52

Group 4: Subject-matter relating to N-terminal fragments with N-terminal FRHD, i.e. Seq.Id.Nos.: 53-65

Group 5: Subject-matter relating to N-terminal fragments with N-terminal RHDS, i.e. Seq.Id.Nos.: 66-78

Group 6: Subject-matter relating to N-terminal fragments with N-terminal HDSG, i.e. Seq.Id.Nos.: 79-91

Group 7: Subject-matter relating to N-terminal fragments with N-terminal DSGY, i.e. Seq.Id.Nos.: 92-104

Group 8: Subject-matter relating to N-terminal fragments with N-terminal SGYE, i.e. Seq.Id.Nos.: 105-117

Group 9: Subject-matter relating to N-terminal fragments with N-terminal GYEV, i.e. Seq.Id.Nos.: 118-130

Group 10: Subject-matter relating to N-terminal fragments with N-terminal YEVH, i.e. Seq.Id.Nos.: 131-143

Invention 11-32: Claims 1-28 (partially)

International Application No. PCT/EP 03 07833

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Invention 11-32: Subject-matter relating to Seq.Id.No. 144-165, respectively

Invention 33-41: Claims 1-28 (partially)

Group 33: Subject-matter relating to fragments with C-terminal VKMD, i.e. Seq.Id.Nos.: 166-178

Group 34: Subject-matter relating to fragments with C-terminal KMDA, i.e. Seq.Id.Nos.: 179-191

Group 35: Subject-matter relating to fragments with C-terminal MDAE, i.e. Seq.Id.Nos.: 192-204

Group 36: Subject-matter relating to fragments with C-terminal DAEF, i.e. Seq.Id.Nos.: 205-216

Group 37: Subject-matter relating to fragments with C-terminal AEFR, i.e. Seq.Id.Nos.: 217-227

Group 38: Subject-matter relating to fragments with C-terminal EFRH, i.e. Seq.Id.Nos.: 228-237

Group 39: Subject-matter relating to fragments with C-terminal FRHD, i.e. Seq.Id.Nos.: 238-246

Group 40: Subject-matter relating to fragments with C-terminal RHDS, i.e. Seq.Id.Nos.: 247-254

Group 41: Subject-matter relating to fragments with C-terminal HDSG, i.e. Seq.Id.Nos.: 255-261

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 03/07833

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0072880	A	07-12-2000	AU BG BR CA CN CZ DE EE EP GB HU JP NO SK TR TR WO ZA	5303100 A 106241 A 0011000 A 2370311 A1 1359301 T 20013824 A3 10084643 T0 200100626 A 1185298 A2 2368794 A 0201250 A2 2003517461 T 20015773 A 16982001 A3 200103447 T2 200202231 T2 0072880 A2 200109487 A	18-12-2000 30-08-2002 19-02-2002 07-12-2000 17-07-2002 13-11-2002 11-07-2002 17-02-2003 13-03-2002 15-05-2002 28-08-2002 27-05-2003 25-01-2002 06-11-2002 22-04-2002 21-11-2002 07-12-2000 17-02-2003
WO 9844955	A	15-10-1998	AU AU CN EP JP NZ US WO US	743827 B2 7103498 A 1254294 T 0994728 A1 2002503092 T 337765 A 2003073655 A1 9844955 A1 2002086847 A1	07-02-2002 30-10-1998 24-05-2000 26-04-2000 29-01-2002 28-09-2001 17-04-2003 15-10-1998 04-07-2002
US 2002094335	A1	18-07-2002	WO AU BR WO CA CN EP NO	02096937 A2 1847301 A 0016022 A 0139796 A2 2388559 A1 1433321 T 1235587 A2 20022531 A	05-12-2002 12-06-2001 06-08-2002 07-06-2001 07-06-2001 30-07-2003 04-09-2002 12-07-2002
US 4666829	A	19-05-1987	CA	1268131 A1	24-04-1990
WO 9419692	A	01-09-1994	WO US	9419692 A1 5578451 A	01-09-1994 26-11-1996
WO 9203474	A	05-03-1992	EP JP WO US US US	0546101 A1 6500560 T 9203474 A1 5506097 A 5780587 A 5338663 A	16-06-1993 20-01-1994 05-03-1992 09-04-1996 14-07-1998 16-08-1994
WO 9628471	A	19-09-1996	US US AT AU CA DE DE EP	5817626 A 5854215 A 218583 T 5252496 A 2214247 A1 69621607 D1 69621607 T2 0815134 A1	06-10-1998 29-12-1998 15-06-2002 02-10-1996 19-09-1996 11-07-2002 02-01-2003 07-01-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/07833

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9628471	A	ES JP WO US US US US US US	2175083 T3 11514333 T 9628471 A1 5854204 A 6319498 B1 6303567 B1 2002098173 A1 2002103134 A1 5985242 A	16-11-2002 07-12-1999 19-09-1996 29-12-1998 20-11-2001 16-10-2001 25-07-2002 01-08-2002 16-11-1999
US 5876948	A 02-03-1999	US AU EP JP WO	5137873 A 8392291 A 0541686 A1 6500103 T 9202248 A1	11-08-1992 02-03-1992 19-05-1993 06-01-1994 20-02-1992
EP 0683234	A 22-11-1995	AT DE EP EP WO US US	239797 T 69432629 D1 1308461 A2 0683234 A1 9417197 A1 5750349 A 5955317 A	15-05-2003 12-06-2003 07-05-2003 22-11-1995 04-08-1994 12-05-1998 21-09-1999
WO 03000719	A 03-01-2003	WO	03000719 A2	03-01-2003
WO 02096350	A 05-12-2002	US WO	2003068325 A1 02096350 A2	10-04-2003 05-12-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
		G 0 1 N 33/53 N

(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,M W,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 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 アンドレ・ドゥラクールト

フランス、エフ-59155ファシェ・トゥムニル、リュ・ガンベッタ75番

(72)発明者 ニコラ・セルジヤン

フランス、エフ-59790ロンシャン、リュ・ジャン・ジョレス9番

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA13 BA02 BA16 BA17 BA18 NA14 ZA16
4C085 AA03 AA13 AA14 BB11 CC21 DD88 EE01 EE06 FF01 FF02
FF14 GG02 GG03 GG04
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 FA71

专利名称(译)	预防，治疗和诊断与β-淀粉样蛋白生成和/或聚集有关的疾病		
公开(公告)号	JP2006513259A	公开(公告)日	2006-04-20
申请号	JP2005505654	申请日	2003-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司南玫瑰汾笔记本闭嘴 基因创新有限公司		
申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司，Namuroze芬恩笔记本闭嘴		
[标]发明人	アンドレドウラクールト ニコラセルジャン		
发明人	アンドレ·ドウラクールト ニコラ·セルジャン		
IPC分类号	A61K38/00 C07K16/18 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P25/28 G01N33/53 C07K14/47 C07K16/44 G01N33/50 G01N33/68		
CPC分类号	A61K39/0007 A61P25/28 C07K14/4711 C07K16/18 G01N33/6896 G01N2800/2821		
FI分类号	A61K37/02 C07K16/18.ZNA A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P25/28 G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA02 4C084/BA16 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/NA14 4C084/ /ZA16 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF01 4C085/FF02 4C085/FF14 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4H045 /AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA71		
代理人(译)	田中，三夫 富田健二		
优先权	2002447147 2002-07-24 EP 60/401497 2002-08-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于预防和治疗与β-淀粉样蛋白形成和/或聚集相关的疾病的组合物和方法。这些方法包括诱导针对N-末端截短和/或翻译后修饰的A 2肽的免疫应答。这些肽还用于诊断与β-淀粉样蛋白形成和/或聚集有关的疾病的组合物和方法中。

