

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-91572

(P2010-91572A)

(43) 公開日 平成22年4月22日 (2010.4.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	4 B 0 6 3
<b>CO 7 K 16/18 (2006.01)</b>	CO 7 K 16/18 Z N A	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 25/28 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/28	
審査請求 有 請求項の数 21 O L (全 76 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-247556 (P2009-247556)	(71) 出願人	399044160
(22) 出願日	平成21年10月28日 (2009.10.28)		イノジェネティックス・ナムローゼ・フェ
(62) 分割の表示	特願2005-505654 (P2005-505654)		ンノートシャップ
	の分割		I N N O G E N E T I C S N. V.
原出願日	平成15年7月18日 (2003.7.18)		ベルギー、ペー—9052ヘント、テヒノ
(31) 優先権主張番号	02447147.6		ロギーパルク6番
(32) 優先日	平成14年7月24日 (2002.7.24)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	60/401,497		
(32) 優先日	平成14年8月6日 (2002.8.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

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病の防止、処置および診断

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 アルツハイマー病などの疾患を決定或いは予想する方法を提供する。

【解決手段】 - 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哺乳動物の感受性を決定する、あるいはアルツハイマー病などの - アミロイド形成および／または凝集に関連する疾患を発展する哺乳動物の危険性を決定する、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をする、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方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

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哺乳動物の感受性を決定するためか、あるいはアルツハイマー病などの - アミロイド形成および / または凝集に関連する疾患を発展する哺乳動物の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、前記方法が、以下の工程：

(a) 前記哺乳動物のサンプルにおける 5 位で開始する N - 末端短縮 - アミロイドまたはその N - 末端フラグメント (以下、 - アミロイド ( 5 - x ) という) の量、 - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な抗体の量、あるいは - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な反応性 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のサンプルにおける - アミロイド ( 5 - x ) の量、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な抗体の量、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な反応性 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 - アミロイド負荷がどのレベルであるかを結論付ける工程、

## 【請求項 2】

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 1 に記載の方法であって、前記方法が、以下の工程：

(a) - アミロイド ( 5 - x )、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な抗体、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な反応性 T 細胞、または - アミロイド ( 5 - x ) をコードする核酸を含む組成物を前記哺乳動物に対して投与する工程；

(b) 前記哺乳動物のサンプルにおいて、 - アミロイド ( 5 - x ) 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サンプルにおける - アミロイド ( 5 - x ) 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 - アミロイド負荷がどのレベルであるかを結論付ける工程、

## 【請求項 3】

5 位で開始する N - 末端短縮 - アミロイドもしくはその N - 末端フラグメント ( - アミロイド ( 5 - x ) )、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な抗体、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な反応性 T 細胞、または - アミロイド ( 5 - x ) をコードする核酸を含む組成物の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、前記方法が、以下の工程：

(a) 前記適用後の哺乳動物のサンプルにおいて、 - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な抗体または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な反応性 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、前記適用前の - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な抗体または反応性 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、哺乳動物が前記適用に応答しているかどうかを結論付ける工程であって、 - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な抗体または反応性 T 細胞の量の増加が、哺乳動物がワクチン化もしくは治療適用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、方法。

## 【請求項 4】

前記 - アミロイド ( 5 - x ) が翻訳後修飾を含むものである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

翻訳後修飾がメチル化である、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

サンプルが脳抽出物である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

サンプルが脳脊髄液である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

サンプルが血液サンプルである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

10

【請求項 9】

疾患の防止のための予防ワクチンの製造のための、5 位で開始する N - 末端短縮 - アミロイドもしくはその N - 末端フラグメント ( - アミロイド ( 5 - x ) )、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な抗体、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な反応性 T 細胞、または - アミロイド ( 5 - x ) をコードする核酸の使用。

【請求項 10】

前記疾患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ものである、請求項 9 記載の使用。

【請求項 11】

疾患の処置のための治療薬の製造のための、5 位で開始する N - 末端短縮 - アミロイドもしくはその N - 末端フラグメント ( - アミロイド ( 5 - x ) )、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な抗体、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な反応性 T 細胞、または - アミロイド ( 5 - x ) をコードする核酸の使用。

20

【請求項 12】

前記疾患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ものである、請求項 11 記載の使用。

【請求項 13】

診断または療法診断キットの製造のための、5 位で開始する N - 末端短縮 - アミロイドもしくはその N - 末端フラグメント ( - アミロイド ( 5 - x ) )、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な抗体、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な反応性 T 細胞、または - アミロイド ( 5 - x ) をコードする核酸の使用。

30

【請求項 14】

前記診断または療法診断キットが、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をスクリーニングするためか、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ものである、請求項 13 記載の使用。

【請求項 15】

前記診断または療法診断キットが、 - アミロイド ( 5 - x )、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な抗体、または - アミロイド ( 5 - x ) に特異的な反応性 T 細胞、または - アミロイド ( 5 - x ) をコードする核酸を含む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ものである、請求項 13 記載の使用。

40

【請求項 16】

前記 - アミロイド ( 5 - x ) が翻訳後修飾を含むものである、請求項 9 ~ 15 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 17】

翻訳後修飾がメチル化である、請求項 16 記載の使用。

【請求項 18】

50

5 位で開始する N - 末端短縮 - アミロイドもしくはその N - 末端フラグメント ( - アミロイド ( 5 - X ) ) を特異的に認識する抗体の調製のための方法であって、前記方法が、以下の工程：

( a ) ヒトとは異なる動物を - アミロイド ( 5 - X ) または - アミロイド ( 5 - X ) をコードする核酸で免疫する工程；

( b ) ( a ) の免疫化工程により作成される抗体を得る工程；

( c ) - アミロイド ( 5 - X ) の特異的認識に関して、工程 ( b ) で得られる抗体をスクリーニングする工程、  
を含んでなる、方法。

【請求項 19】

前記 - アミロイド ( 5 - X ) が翻訳後修飾を含むものである、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

翻訳後修飾がメチル化である、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項記載の方法により得ることができる抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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 ( A P P ) ペプチドならびに前記 A および A P P 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 ( C o n g o ) ・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タンパク質 ( A S c r または P r P - 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、神経炎症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。

【0003】

アルツハイマー病 ( A D ) 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。A D 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。A D 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 A D の影響は莫大である。

【0004】

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 e l i c i a n ) およびサンドソン ( S a n d s o n ) 、 1999 年 ) :

10

20

30

40

50

( 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 ; ( i i ) 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 D e f 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 )。

10

#### 【 0 0 0 6 】

A は老人斑の主要成分である。A は、それぞれ40 ( A<sub>40</sub> ) および42 ( A<sub>42</sub> ) 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 A P P 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 )。A P P 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。

20

#### 【 0 0 0 7 】

A P P 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 A P P 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、A P P の大きな N - 末端領域 ( A P P s ) 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ため、これは非アルデヒド発生経路である。第2の A P P プロセッシング経路は、 - および - セクレターゼによる A P P 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、A P P の中心フラグメント、A<sub>40</sub> および A<sub>42</sub> であり、A<sub>40</sub> 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 A P P 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 )。

30

#### 【 0 0 0 8 】

A を生成する A P P 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<sub>42</sub> / A<sub>40</sub> 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、アミロイドーシスは 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。

40

#### 【 0 0 0 9 】

50

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 A<sub>42</sub> ペプチドの散在性凝集体として、続いて、A<sub>40</sub> ペプチドの沈着として観察される（デラコウルテ（Delacourte）ら、2001年；2002年）。A<sub>42</sub> から A<sub>40</sub> 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（Barulli）ら、1997年；Wisniewski（ウィスニエフスキ）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 グラムの湿潤組織を超える A<sub>42</sub> 凝集体の存在を伴う患者で診断される。臨床外（infraclinical）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 A<sub>42</sub>、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知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 A<sub>42</sub> 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）「純粋なコントロール」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られると思われる（段階 1 ~ 3）。しかし、これらの老齢非痴呆患者は、検出可能な A<sub>42</sub> 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指す。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戦略は、A の抗体仲介クリアランスを得るための 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 負荷および認知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、

10

20

30

40

50

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(シェンクラ、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、 $A_{39}$ 、 $A_{40}$ 、 $A_{41}$ 、 $A_{42}$ または $A_{43}$ 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、合形成態の $A_{42}$ を含有する処方による第II相臨床試験は、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 $A_{42}$ -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 $A_{42}$ -アミロイド( $A_{42}$ )の発見(グレンナー(Glenner)およびウONG(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、サイドラ(サイド(Saido)ら、1995年;1996年)およびハリガヤラ(ハリガヤ(Harigaya)ら、2000年)によって、主にダウン症の患者のA $\beta$ 沈着において同定された。AD痴呆患者由来のA $\beta$ 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 $\beta$ のC-末端変異体( $A_{39}$ 、 $A_{40}$ 、 $A_{41}$ 、 $A_{42}$ または $A_{43}$ )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 $\beta$ 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 $\beta$ 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)をトランスフェ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)およびパガネッティ(Paganeetti)、1996年)場合、N-末端短縮A $\beta$ ペプチドもまた産生され得る。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 $\beta$ はアミロイド沈着の成分であることを示唆する。それらの産生は、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 $\beta$ 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

10

20

30

40

50

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。

#### 【発明の概要】

##### 【0015】

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、A D 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 - 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 - 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に関する。

10

##### 【0016】

好適な実施態様では、本発明は、N - 末端短縮 - アミロイド変異体あるいはその 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 - 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を提供する。

20

##### 【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 - 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、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 - 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を提供する。

30

##### 【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 - 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 - 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、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 - 末端フラグメントを含んでなる調製物を提供する。

##### 【0020】

A P P 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 A P P 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 A P P 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、A P P のセクレターゼ切断によって得ることのできる N - 末端 A P P 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 A P P 可溶性フラグメントの C - 末端フラグメントに関する。

40

##### 【0021】

好適な実施態様では、本発明は、N - 末端 A P P 可溶性フラグメントまたはその C - 末

50



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。

【0022】

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

【0023】

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

【0024】

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。

【0025】

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

【0026】

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。

【0027】

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

【0028】

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。

【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

50

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 A P P 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。

【 0 0 3 0 】

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。

【 0 0 3 1 】

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 A P P 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 A P P 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 A P P 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する。

【 0 0 3 2 】

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 A P P 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 A P P 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。

【 0 0 3 3 】

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

10

20

30

40

50

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。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 4 】

【図 1】A P P 7 7 0 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 ( 4 k D a ) および二量体 ( 8 k D a ) を、A アミノ末端領域に対する抗体 W O 2 および 6 E 1 0 で標識した ( それぞれ、N - 末端 ( 5 - 8 ) および N - 末端 ( 4 - 1 3 ) パネル ) 。 A <sub>4 2</sub> および A <sub>4 0</sub> のカルボキシ末端テイルを 2 1 F 1 2 および A D A 4 0 で検出した ( それぞれ A - 4 2 および A - 4 0 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 ( C o o m a s s i e B l u e ) で染色し、その後 1 0 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 A D 患者から得た。等電点 ( p I ) 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 ( C o o m a s s i e B l u e ) で染色されていないことに留意すること。

【図 3】臨床外 A D 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。A <sub>4 0</sub> 種は、本発明者らの A D A 4 0 抗血清では検出されない。2 1 F 1 2 は、A <sub>4 2</sub> 単量体 ( 4 k D a 染色 ) および二量体 ( 8 k D a 染色 ) の両方を検出する。W O 2 ( パネル N - 末端 ( 5 - 8 ) ) および 6 E 1 0 ( パネル N - 末端 ( 4 - 1 3 ) ) 抗体の両方とも、p I 5 . 3 0 で単一の A ペプチドスポットを染色した。

【図 4】臨床外 A D 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 ( S 0 ) 、3 例の非痴呆症例 ( S 1 、S 2 、および S 6 ) ならびに 1 例の A D 症例 ( S 1 0 ) をギ酸に溶解した。デラコウルテ ( D e l a c o u r t e ) ら ( 2 0 0 2 ) ならびにブラアク ( B r a a k ) およびブラアク ( B r a a k ) ( 1 9 9 1 ) によって規定された命名法に従って、タウ病変 ( S 0 ~ S 1 0 ) 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。1 0 n g の A ペプチド 1 - 4 0 および 1 - 4 2 を、平行して充填した ( 第 1 および第 2 のレーン ) 。A <sub>x - 4 2</sub> を 2 1 F 1 2 で同定し ( パネル A - 4 2 ) 、アミノ末端領域を W O 2 で同定した ( W O 2 パネル ) 。分子量を左側で同定し、矢印は、2 1 F 1 2 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 A D 症例を使用したことに留意すること。

【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 H R P - ペプチドコンジュゲートを検出に使用した。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。いくつかの段階のアルツハイマー病変のギ酸抽出物の 1 / 2 0 希釈物について、O D 4 5 0 値を示す。2 1 F 1 2 によりプレート上でペプチドを捕獲し ( キット K - 1 0 8 0 、インノジェネティクス ( I n n o g e n e t i c s ) 、ベルギー、ヘント ( G h e n t , B e l g i u m ) ) 、1 - 4 2 についてはビオチン化 3 D 6 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。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 5 】

N - 末端短縮および / または翻訳後修飾 A ペプチド

10

20

30

40

50

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「純粋なコントロール」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、AD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AD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。

10

20

#### 【0036】

A ペプチド、A 、 - アミロイドペプチド、またはA4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（A<sub>39</sub>、A<sub>40</sub>、A<sub>41</sub>、A<sub>42</sub>またはA<sub>43</sub>）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のプロセッ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）。A<sub>42</sub>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）

30

#### 【0037】

A<sub>41</sub>、A<sub>40</sub>およびA<sub>39</sub>は、C - 末端からそれぞれAla（A）、Ile - Ala（IA）、およびVal - Ile - Ala（VIA）が脱落している点がA<sub>42</sub>と異なる。A<sub>43</sub>は、C - 末端にスレオニン残基が存在している点がA<sub>42</sub>と異なる。

#### 【0038】

- 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（DLB）、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。

40

#### 【0039】

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。 - 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、 - 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

50

とを支持する。

【0040】

従って、本発明は、  
- 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の特徴とする、  
- 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  
- 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。

【0041】

本発明の調製物は、典型的に実質的に純粋である。これは、  
- 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。

- 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。

【0042】

臨床外アルツハイマー病患者由来の脳に存在した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  
- アミロイドまたはそのN - 末端フラグメントが  
- アミロイドの2、3、4、5、6、7、8、9、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。

【0043】

本発明の好適な実施態様では、  
- アミロイド変異体またはそのN - 末端フラグメントは  
- 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、  
- アミロイド変異体またはそのN - 末端フラグメントは、  
- 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、  
- 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、  
- 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  
- 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上記の調製物に関する。

【0044】

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  
- アミロイド変異体のN - 末端部分由来の少なくとも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。

【0045】

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

10

20

30

40

50

、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 ( p I ) および 2 次元ゲル上の分子量 ( M W ) 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。

#### 【 0 0 4 6 】

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疫応答を標的にする。従って、得られる免疫応答は、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

#### 【 0 0 4 7 】

免疫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 ( 抗体仲介性 ) 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仲介される ) 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 ( p r i m e d ) 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 M H C 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 C D 4 T 細胞ヘルパー細胞および / または C D 8 + 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、N K 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關与し得る。

#### 【 0 0 4 8 】

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、またはジフテリア、大腸菌 ( E . c o l i ) 、コレラ、もしくは H . ピロリ ( H . p y l o r i ) 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。免疫応答を刺激または増強するための他のキャリアとして、I L - 1、I L - 1 および ペプチド、I L - 2、T N F、I L - 1 0、G M - C S F などのサイトカイン、ならびに M I P 1

および ならびに R A N T E S 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 9 7 / 1 7 6 1 3 号パンフレットおよび国際公開第 9 7 / 1 7 6 1 4 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 ( S P D 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 ( S M C C ) 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

10

20

30

40

50

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 - 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 ( J a n s s e n ) ら ( 1 9 8 2 ) 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。

#### 【 0 0 4 9 】

##### N - 末端 A P P 可溶性フラグメント

A P P 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、様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 A P P 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、 - および - セクレターゼによる A P P の N - および C - 末端切断によって A P P から代謝される ( 図 1 )。A P P は、3つのイソ型、A P P 6 9 5、A P P 7 5 1、および A P P 7 7 0 で見出されており、それぞれヒト A P P 遺伝子によってコードされる 6 9 5、7 5 1、および 7 7 0 アミノ酸残基長ポリペプチドを指す ( カング ( K a n g ) ら、1 9 8 7 ; ポンテ ( P o n t e ) ら、1 9 8 8 ; キタグチ ( K i t a g u c h i ) ら、1 9 8 8 )。本発明では、ヒトアミロイド前駆体タンパク質 ( A P P ) 内のアミノ酸を、A P P 7 7 0 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、A P P の 6 7 1 位と 6 7 2 位との間の - 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 - 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 A P P フラグメントを生じる。従って、本発明は、N - 末端 A P P 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、A P P のセクレターゼ切断によって得ることのできる N - 末端 A P P 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 A P P 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 A P P 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、1 4 ~ 1 8、2 7 ~ 3 0、5 3 ~ 5 5、6 6 ~ 6 7、7 9、および 1 6 6 ~ 2 6 1 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、上記の調製物に関する。

#### 【 0 0 5 0 】

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 A P P 可溶性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 . c o l i ) 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、サンプルック ( S a m b r o o k ) ら ( 1 9 8 9 ) らが記載している。

#### 【 0 0 5 1 】

また、本発明の A ペプチドおよび A P P 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、哺乳動物レシビエントにおいて免疫応答を誘

10

20

30

40

50

導するためか、または前記本発明の A ペプチドおよび A P P 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 A P P 可溶性フラグメントを模倣することができる。

#### 【0052】

##### 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 A P P 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む分子配列を含むし、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 A P P 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与する 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 A P P 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ー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。

#### 【0053】

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（Tumin）、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ボ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（Ohe）ら、1995；国際公開第 94/12629 号パンフレット；シャオ（Xiao）およびブランドスマ（Brandσμα）、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。

#### 【0054】

##### 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 - アミロイド変異体の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。

【0055】

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。

【0056】

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こと、  
を含んでなる。

【0057】

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。

【0058】

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。

【0059】

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、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 、および $\alpha$ 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、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、または  $\epsilon$  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<sub>L</sub>)」および「可変重鎖(V<sub>H</sub>)」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。

【0060】

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

10

20

30

40

50

たはキメラ抗体、単一可変フラグメント ( s s F v )、単一鎖フラグメント ( s c F v )、F a b フラグメント、F ( a b ' ) フラグメント、F a b 発現ライブラリーによって産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 9 8 / 2 9 4 4 2 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、I g G、I g E、I g M、I g D および I g A ) 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。

10

#### 【 0 0 6 1 】

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 A P P 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 A P P 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ら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バント、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、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、または B C G ( 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バントを含んでなるがこれらに限定されない多様なアジュバント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、骨髓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 ( K o h l e r ) およびマイルスタイン ( M i l s t e i n ) ( 1 9 7 5 ) 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 ( K o z b o r ) ら、1 9 8 3 ) またはヒトモノクローナル抗体を産生するための E B V - ハイブリドーマ技術 ( コレ ( C o l e ) ら、1 9 8 5 ) 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、E L I S A 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 A P P 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 A P P 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 1 0 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 変異体あるいは本発明の N - 末端 A P P 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 A P P 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 1 0 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 変異体あるいは本発明の N - 末端 A P P 可溶性フラグメントに結合する抗体を提供する。

20

30

40

#### 【 0 0 6 2 】

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 ( i n t a c t ) 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 D N A 方法論を

50

利用することによって、デノボ合成することが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。

#### 【0063】

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鎖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鎖をコードする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）。これらの方法では、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（W093/12227；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пит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。

#### 【0064】

##### 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。

#### 【0065】

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、疾患の初期徴候（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。

#### 【0066】

10

20

30

40

50

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、哺乳動物は霊長類である。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。

【0067】

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疫応答を誘導する。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。

10

【0068】

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。

【0069】

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、DNAまたはRNAであることができる。CNSの細胞への組換えDNA分子の導入を容易にするために、組換えDNA分子に関連して、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、血液脳関門を横切るDNA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クター、脂質/リボソーム、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DNA、または該DNAを含有するベクターは、リボ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5,208,036号明細書、同第5,264,618号明細書、同第5,279,833号明細書および同第5,283,185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DNA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（McGee）ら、1996）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、腹腔内、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5,399,346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DNAを送達することができる。DNA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（Xiao）およびブランドスマ（Brandtma）、1996）。免疫原をコードするDNA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トイルは、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（Agacetis, Inc.）（米国、ウィスコンシン州、ミドルトン（Middleton WI, US））により製造されたジ・アクセル（The Accel<sup>TM</sup>）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キソビポ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、ベクターを組み込んでいる細胞の選択後、細胞は患者に再移植される。

20

30

40

【0070】

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

50

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。

10

#### 【0071】

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。

20

#### 【0072】

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療するか、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効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。

30

#### 【0073】

本発明のワクチンおよび治療組成物の有効用量は、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、アジュバントも投与されるかどうかに依存し、アジュバント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1μg/患者を超え、通常10μg/患者を超える。アジュバントが存在しない場合、用量は10μg/患者を超え、通常100μg/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。

40

#### 【0074】

抗体による受動免疫のために、用量は、約0.0001~100mg/kgの範囲であり、より通常的には、0.01~5mg/kgの宿主の体重の範囲である。免疫原をコー

50

ドする核酸の用量は、患者あたり約  $10 \text{ ng} \sim 1 \text{ g}$ 、 $100 \text{ ng} \sim 100 \text{ mg}$ 、 $1 \mu\text{g} \sim 10 \text{ mg}$ 、または  $30 \sim 300 \mu\text{g}$  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。

#### 【0075】

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、免疫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 (L e m e r e) ら、2000b、c)。

10

#### 【0076】

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 (ドリッ (D r i n) およびテムサマニ (T e m s a m a n i) 、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 (T e m s a m a n i) ら (2001) が再検討している。

20

#### 【0077】

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、抗原に対する免疫応答を増加するが、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疫応答を増加することができる。免疫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 (GB 2220211 号明細書)。QS 21 は、南アメリカで見出されるキラヤ (Q u i l l a j a S a p o n a r i a M o l i n a) 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 (ケンシル (K e n s i l) 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 (S t o u t e) ら、1997)。別のアジュバントは CpG である (デイビス (D a v i s) ら、1998)。あるいは、N - 末端短縮および/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 (L i v i n g s t o n) 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。

30

40

#### 【0078】

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、MP

50

L 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、水中油型乳剤処方である。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 - イソグルタミン - L - アラニン - 2 - （1' - 2' ジバルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ヒドロキシホスホリルオキシ） - エチルアミン（MTP - PE）、N - アセチルグルコサミニル - N - アセチルムラミル（acetyl inuramyl） - L - Ala - D - イソglu - L - Ala - ジバルミトキシプロピルアミド（DTP - DPP）セラミド<sup>TM</sup>）（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%プ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）<sup>TM</sup>）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（Ribi）<sup>TM</sup> アジュバントシステム（RAS）、（リビ・イムノケム（Ribi Immunochem）、米国、モンタナ州、ハミルトン（Hamilton, MT, US））を含む。

#### 【0079】

好適なアジュバントの別の好適なクラスは、スティミュロン（Stimulon）<sup>TM</sup>（QS21、アクイラ（Aquila）、マサチューセッツ州、ウォルスター（Worcester, MA））などのサポニン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）、ならびに腫瘍壊死因子（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）。

#### 【0080】

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、またはいくつ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ュ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）。

#### 【0081】

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態様に依存する。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、リンゲル液、デキストロス溶液およびハंक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。

10

#### 【0082】

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。

20

#### 【0083】

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（Brayden）ら、2001）。

#### 【0084】

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。

30

#### 【0085】

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（Langer）ら、1997）。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。

40

#### 【0086】

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%～10%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、サッカリンナトリウム、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

50



、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、10%～95%、好ましくは25%～70%の有効成分を含有する。

【0087】

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る（グレン（Glenn）ら、1998）。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る。

【0088】

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（transferosome）を使用して達成することができる（ポール（Paul）ら、1995；セベク（Cevc）ら、1998）。

【0089】

薬物の処方および投与のためのさらなる技術は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」においても見出すことができる。

【0090】

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る。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。

【0091】

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。

【0092】

非痴呆のヒトでは、いずれの年齢（例えば、10、20、30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40、50、60、または70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。

【0093】

本発明はさらに、- 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、- 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。

【0094】

10

20

30

40

50

したがって、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。

【 0 0 9 5 】

#### 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 A P P 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。

【 0 0 9 6 】

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 A P P 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 A P P 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 A P P 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 I g 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 A P P 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。

【 0 0 9 7 】

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 3 H - チミジンとして供給することができる。

【 0 0 9 8 】

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疫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。従って、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。

【 0 0 9 9 】

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

10

20

30

40

50

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应答していることを示すものである工程、  
を含んでなる。

#### 【 0 1 0 0 】

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）、ウエスタンブロット、リボ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。

10

#### 【 0 1 0 1 】

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应答でプライム化 T 細胞による 3 Hチミジンの組み入れによって（パーク（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（Tiggess）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。細胞仲介免疫学的应答の存在は、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（パーク（Burke）ら、1994；ティギス（Tiggess）ら、1996）によって決定することができる。

20

#### 【 0 1 0 2 】

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应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应答の値とを比較することを必要とする。免疫应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疫应答を達成もしくは増加していること）を示す。免疫应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应答の増加を示し、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、免疫应答は増加している。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。

30

#### 【 0 1 0 3 】

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ッ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

40

50

ブ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。

【0104】

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 A P P 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 A P P 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 A P P 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 A P P 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 A P P 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 A P P 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。

10

20

【0105】

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：

30

(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 A P P 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 A P P 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。

40

【0106】

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 A P P 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 A P P 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

50

- 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 A P P 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 A P P 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。

10

## 【0107】

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 A P P 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 A P P 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 A P P 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 A P P 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 A P P 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。

20

30

## 【0108】

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 A P P 可溶性フラグメントの量を決定する工程；

40

（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 A P P 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。

50

## 【0109】

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。

10

#### 【0110】

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 (Arbitt) ら (1995)、タマダ (Tamada) ら (1995)、ワカバヤシ (Wakabayashi) ら (1995)、フアング (Huang) ら (1996)、サンドロック (Sandrock) ら (1996)、およびマリアーニ (Mariani) 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産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 (Spinelli) ら、2000; マイルダーマンズ (Muyldermans) 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)、スモール (Small) (2002)、およびペトレラ (Petrelli) ら (2003) によって記載されている。

20

30

40

#### 【0111】

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 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、哺乳動物から得られるサンプルにおいて、インビ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 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

50

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 変異体あるいは本発明の N - 末端 A P P 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 変異体あるいは本発明の N - 末端 A P P 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。

#### 【0112】

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 (De Mattos) 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。

#### 【0113】

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 A P P 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 変異体あるいは本発明の N - 末端 A P P 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 変異体あるいは本発明の N - 末端 A P P 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 変異体あるいは本発明の N - 末端 A P P 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 A P P 可溶性フラグメント (またはその C - 末端フラグメント) をサンプルに添加し、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 A P P 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 A P P 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 A P P 可溶性フラグメントの濃度に反比例する。

#### 【0114】

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 A P P 可溶性フラグメントのレベルは、以下の工程：

(a) 抗原 - 抗体複合体を産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 A P P 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 A P P 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 A P P 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。

【0115】

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 A P P 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 A P P 可溶性フラグメントは、以下の工程 :

(a) 抗原 - 抗体複合体を産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 A P P 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 A P P 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 - 抗体複合体を産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 A P P 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 A P P 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 ;

(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 A P P 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 E L I S A によって検出することができる。

【0116】

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。

【0117】

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)<sup>TM</sup>)、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、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、または<sup>32</sup>P)、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 E L I S A 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。



## 【 0 1 1 8 】

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 - ジヒドロフタラジンジオン、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, 3 9 1, 9 0 4 号明細書において得ることができる。

## 【 0 1 1 9 】

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。

## 【 0 1 2 0 】

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。

## 【 0 1 2 1 】

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 】

## 【 0 1 2 2 】

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、INSERM U 4 2 2（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 (ヘイマン (Hyman) およびトロジァノウスキ (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。

10

20

30

40

50

### 【0123】

#### 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。A x - 42 種は、21F12 抗体および ADA42 抗血清を使用して研究した。A x - 40 種は、抗血清 ADA40 で分析した (デラコウルテ (Delacourte) ら、2002)。

### 【0124】

#### 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 (Pro Labo)、フォンテナイ (Fontenay) s / Bois、仏国 (France)) 抽出脳組織ホモジネート (100  $\mu$ L) を窒素下でエバポレートし、400  $\mu$ L の 2 次元電気泳動溶解緩衝液 (7 M 尿素、2 M 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) <sup>T M</sup> 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) トランスファー・ユニット (アマシャム - ファルマシア・バイオテック (Amersham - Pharmacia Biotech)、仏国、サクレイ (Saclay, France)) 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 (Coomassie Brilliant Blue) G250 (シグマ (Sigma)、仏国 (France)) 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、メラニー (Melanie) III 2 - D ゲル解析ソフトウェア (ジーンバイオ (Genebio)、スイス、ジュネーブ (Geneva, Switzerland)) を使用して決定した。

### 【0125】

#### 質量分析の特徴付け

クマシー・ブルー (Coomassie Blue) 染色ペプチドのスポットを 1 mm<sup>2</sup> のゲル片に切断し、25 mM トリス (Tris) - HCl pH 9 中 50 % CH<sub>3</sub>CN で 2 回洗浄した。ゲル片をスピード・バック (Speed-Vac) 中で脱水し、次いで、3  $\mu$ l のトリス (Tris) - HCl pH 9 中 10 ng のエンドプロテイナーゼ (Endoproteinase) Lys - C (EC 3.4.21.19、ロッシュ・モレキュラー・バイオケミカルズ (Roche Molecular Biochemicals)、仏国、メイライン (Meylan, France)) で 1 晩ゲル内消化した。得られる消化したペプチドを、50 % CH<sub>3</sub>CN および 1 % トリフルオロ酢酸 (TFA) 10  $\mu$ l 中に回収した。次いで、サンプルを乾燥飛沫 (dry-droplet) 法で調製した。1 ml 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 ml (50 % CH<sub>3</sub>CN および 0.1 % TFA 中 5 mg/ml) 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  $\mu$ l の 0.1 % TFA 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 20 kV、グリッド 61 %、遅延引き出し 90 ns、低質量ゲート 500 amu に設定した MALDI - TOF ボイジャー (Voyager) - DE - STR (アップライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems)、カリフォルニア州、パロアルト (Palo Alto, CA)) 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<sup>+</sup>] モノアイソトピックイオンを使用して、スペクトルを外部校正した。

10

20

#### 【0126】

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 $\beta$  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 $\beta$  ペプチドを特徴付けた (デラコウルテ (Delacourte) ら、2002)。アルツハイマー脳におけるアミロイド ペプチド (A $\beta$ ) よりなる凝集体は、すでに記載されている (デラコウルテ (Delacourte) ら、2002; カルバック (Kalback) ら、2002) 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 $\beta$  種を 2 次元ゲル (2-D) 電気泳動で分離し、A $\beta$  x - 40 および A $\beta$  x - 42 種の両方が存在することが示された特異的 A $\beta$  抗体のパネルを使用して、特徴付けた (図 2; A $\beta$  - 40 および A $\beta$  - 42 パネル)。ギ酸可溶性 A $\beta$  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 (AD) 患者の脳組織でさらなる特徴付けを実施した。10 個の A $\beta$  スポットを 2-D 電気泳動で分離 (図 2; クマシー・ブルー (Coomassie Blue) 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 $\beta$  に対応した。免疫検出された 8 kDa 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 $\beta$  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 ~ 10 は、A $\beta$  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 ~ 10 位で開始する A $\beta$  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 (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 $\beta$  変異体を含有了が、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。

30

40

#### 【0127】

クマシー・ブルー (Coomassie Blue) 染色は、各 A $\beta$  種の正確な定量を可能にした。完全長 A $\beta$  ペプチドは、すべての A $\beta$  種のうちわずか 33 % にしか認められなかった。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 A $\beta$ <sub>40</sub> の 2-D パターンは、A $\beta$  のアミノ末端領域を検出する WO 2 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

50

よび 10 由来の同定された短縮 A<sub>42</sub> が A<sub>42</sub> 種由来であり A<sub>40</sub> 種由来ではないことを示す。

#### 【0128】

#### 3. 非痴呆患者から得られる脳における A<sub>42</sub> ペプチドの特徴付け

その後、アミロイドシスの第 1 の工程で凝集する A<sub>42</sub> 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<sub>42</sub> を有する 5 例の症例について研究した。A<sub>42</sub> 凝集体は、排他的に、A<sub>42</sub> 種からなり（図 3；A<sub>40</sub> および A<sub>42</sub> パネル）、アルツハイマー病変の臨床外段階では、A<sub>40</sub> 種がまったく存在しないことを示す。A<sub>42</sub> の N - 末端領域に対する抗体は、完全長 A<sub>42</sub> 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、A<sub>42</sub> 特異的抗体 21F12 は、スポット 4、5、6、および 10（図 3；A<sub>42</sub> 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 A<sub>42</sub> 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<sub>42</sub> 抗体による A<sub>42</sub> 二量体の染色が認められなかった（図 3 および図 4；N - 末端（5 - 8）パネル）ことは、A<sub>42</sub> 二量体が、排他的に N - 末端短縮 A<sub>42</sub> 種からなることを実証する（図 3 および図 4；A<sub>42</sub> パネル）。

10

#### 【0129】

合成 A<sub>42</sub> 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ったため、これらの A<sub>42</sub> 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）。

20

#### 【0130】

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 K L H（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。

30

#### 【0131】

#### 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。

40

#### 【0132】

#### 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）。

#### 【0133】

モノクローナル抗体 3D6（K - 1080 の HS - 形式、インノジェネティクス（In

50

nogenetics)、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 - 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A 42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、 - 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、A 42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。

#### 【0134】

**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; インノジェネティクス(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PS20プロテインチップ(ProteinChip)(登録商標)アレイ(シファージェン(Ciphergen)カタログ番号C553-0045)上に結合させることによって、アフィニティーアレイを調製した。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/ml BSA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ウェルパイオプロセッサに配置した。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)アレイをパイオプロセッサから取り出し、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ヘプス(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(CHA; シファージェン(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; シファージェン(Ciphergen))上で、質量解析を実施した。

#### 【0135】

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られるCSFサンプルの分析

異なる神経学的疾患の161例の患者から得られるCSF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(DLB; マクケイス(McKeith)ら、1996)を患う患者、後にADを発展した軽度の認知障害の患者(MCI-AD; ピーターセン(Petersen)ら、1999)、ADを発展しなかった認知障害患者(コゲン(Cogn); ワーランド(Wahlund)ら、2003)、パーキンソン病を患う患者(PD; ラングストン(Langston)ら、1992)、およびアルツハイマー病を患う患者(マックハン(McKhann)ら、1984)。ADを患う患者を、MMSE評価(ホルスタイン(Folstein)ら、1975)に基づいて、さらに3つのグループに分けた: 軽度(Mild)AD(MMSE 24-28)、中等度(Mod)AD(

10

20

30

40

50

MMSE 17 - 23) および重度 (Sev) AD (MMSE 2 - 16)。3つのCSF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200μl利用可能である)。これらのCSF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4D7A3で被覆したシファーゲン(Ciphergen)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CSF中で検出され、ADの臨床症状がまだ観察されない極めて早期のADにおいてでもADに特異的であることを示唆している。

#### 【0136】

#### 実施例4：モデル系におけるA 変異体の分析

ヒト変異型アミロイド前駆体タンパク質(APP)遺伝子を含む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(Games)ら、1995; ヒアオ(Hsiao)ら、1996、スターヒラー - ピアラット(Sturchler - Pierrot)ら、1997; モエチャーズ(Moechars)ら、1999; タケウチ(Takeuchi)ら、2000; カワラバヤシ(Kawarabayashi)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、<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(Moechars)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。

#### 【0137】

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(Triton) X - 100を有するトリス(Tris) HCl 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100,000gで1時間、4℃で遠心分離する。上清を回収し、ペレットを、100μl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ェスタンブロッティングを実施する。

#### 【0138】

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(Sergeant)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。

#### 【0139】

10

20

30

【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 Aβペプチド

βA 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

【 0 1 4 0 】

【表 2】

表1. 続き

3-6	ヒ°ログルタミル	PyrE-FRH	40
3-7	ヒ°ログルタミル	PyrE-FRHD	41
3-8	ヒ°ログルタミル	PyrE-FRHDS	42
3-9	ヒ°ログルタミル	PyrE-FRHDSG	43
3-10	ヒ°ログルタミル	PyrE-FRHDSGY	44
3-11	ヒ°ログルタミル	PyrE-FRHDSGYE	45
3-12	ヒ°ログルタミル	PyrE-FRHDSGYEV	46
3-13	ヒ°ログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVH	47
3-14	ヒ°ログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVHH	48
3-15	ヒ°ログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVHHQ	49
3-16	ヒ°ログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVHHQK	50
3-17	ヒ°ログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVHHQKL	51
3-18	ヒ°ログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVHHQKLV	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	FRHDSGYEVHHQK	62
4-17	なし/メチル	FRHDSGYEVHHQKL	63
4-18	なし/メチル	FRHDSGYEVHHQKLV	64
4-19	なし/メチル	FRHDSGYEVHHQKLVF	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	RHDSGYEVHHQK	74
5-17	なし/メチル	RHDSGYEVHHQKL	75
5-18	なし/メチル	RHDSGYEVHHQKLV	76
5-19	なし/メチル	RHDSGYEVHHQKLVF	77
5-20	なし/メチル	RHDSGYEVHHQKLVFF	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	HDSGYEVHHQKLVFF	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	DSGYEVHHQ	97
7-16	なし/メチル	DSGYEVHHQK	98
7-17	なし/メチル	DSGYEVHHQKL	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	DSGYEVHHQKLVFF	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	SGYEVHHQKLVFF	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	GYEVHHQKLVFF	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

【表 4】

表 1. 続き

10-14	なし	YEVHH	132
10-15	なし	YEVHHQ	133
10-16	なし	YEVHHQK	134
10-17	なし	YEVHHQKL	135
10-18	なし	YEVHHQKLV	136
10-19	なし	YEVHHQKLVF	137
10-20	なし	YEVHHQKLFFF	138
10-21	なし	YEVHHQKLFFFA	139
10-22	なし	YEVHHQKLFFFAE	140
10-23	なし	YEVHHQKLFFFAED	141
10-24	なし	YEVHHQKLFFFAEDV	142
10-25	なし	YEVHHQKLFFFAEDVG	143
1-42	メチル	DAEFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	144
2-42	なし/メチル	AEFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	145
3-42		EFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	146
3-42	ピログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	147
4-42	なし/メチル	FRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	148
5-42	なし/メチル	RHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	149
6-42	なし/メチル	HDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	150
7-42	なし/メチル	DSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	151
8-42		SGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	152
9-42		GYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	153
10-42		YEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	154
1-40	メチル	DAEFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	155
2-40	なし/メチル	AEFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	156
3-40		EFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	157
3-40	ピログルタミル	PyrE-FRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	158
4-40	なし/メチル	FRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	159
5-40	なし/メチル	RHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	160

【 0 1 4 3 】

10

20

30

40

## 【表 5】

表 1. 続き

6-40	なし/メチル	HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	161
7-40	なし/メチル	DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	162
8-40		SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	163
9-40		GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	164
10-40		YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	165

10

【 0 1 4 4 】

【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- $\beta$ -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

## 【表 7】

表 2. 続き

669-4	VKMDAEF	207
668-4	EVKMDAEF	208
667-4	SEVKMDAEF	209
666-4	ISEVKMDAEF	210
665-4	EISEVKMDAEF	211
664-4	EEISEVKMDAEF	212
663-4	TEEISEVKMDAEF	213
662-4	KTEEISEVKMDAEF	214
661-4	IKTEEISEVKMDAEF	215
660-4	NIKTEEISEVKMDAEF	216
673-5	AEFR	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 7 】

## 【表 9】

表 3. アルツハイマー病患者に存在する Aβ変異体の消化されたペプチド

スポット	Aβ 提唱された 同一性 <sup>1</sup>	理論的 質量	観察された 質量	相対量 <sup>2</sup>	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 <sub>3</sub>	1968.905	1968.863	-	5.31	5.3
2	1-16	1954.879	1954.875	10%	5.31	5.3
	1-16+CH <sub>3</sub>	1968.905	1968.863	-	5.31	5.3
3	2-16	1839.852	1839.851	6%	5.78	5.8
	2-16+CH <sub>3</sub>	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
7	8-16	1084.517	1084.518	13%	5.96	6.1
	9-16	997.485	997.477	-	6.01	6.1
	10-16	940.463	940.460	-	6.01	6.1
9&10	4-16	1639.772	1639.848	16%	6.27	6.3
	4-16+CH <sub>3</sub>	1653.798	1653.859	-	6.27	6.3
	5-16	1492.704	1492.770	-		

<sup>1</sup> メチル化されたフラグメントを CH<sub>3</sub> 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ン酸残基に対応する Aβ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)

<sup>2</sup> 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 8 】

## 【表 1 0】

表 4. N-末端短縮 Aβ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(インノジェネティクス(Innogenetics)の番号付け)

短縮	配列	Aβ	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	GYEVHHQK-	9-16	680-687	IGP-2122	PG-125	PG-130	122

## 【 0 1 4 9 】

10

20

30

40

## 【表 1 1】

**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)	力価	選択基準	さらなる研究
短縮 5	IGP-2121	466	13145	最大力価	Rb466
		467	45115		
短縮 6	IGP-2120	468	42623	最大力価	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

## 【 0 1 5 0】

20

## 【表 1 2】

**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 $\beta$  (1-42)および N-末端短縮 A $\beta$ 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

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

30

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

40

## 【 0 1 5 1】



## 【表 1 3】

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 (中央値; 最小-最大)	MMSE (中央値; 最小-最大)	タウ (pg/ml) (平均、SD)	リン酸化-タウ (pg/ml) (平均、SD)	AB1-42 (pg/ml) (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)

10

## 【 0 1 5 2 】

20

## 【表 1 4】

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来の PS-20 チップ上で観察されるピークの分子量質量  
実験は、100 $\mu$ l の CSF に対して 2 回反復で行われた

A $\beta$ 配列 予想分子質量		11-42 3335.92	10-42ox 3515.1	8-42ox 3659.23	5-42ox 4067.64
グループ	Nr				
コントロール	150	-/-	3515.9/-	-/-	-/-
	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/-	-/-
	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
	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/-	-/-	-/-

10

20

30

40

## 【0153】

## 参考文献

アービット E. (Arbit E.)、チェウング N. K. (Cheung N. K.)、エー S. D. (Yeh S. D.)、ダグヒグヒャン 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.

50

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.

## 【0154】

バックスカイ B. J. (Bacskai B. J.)、カジュデイズ 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.)、ヘイマン 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.

10

## 【0155】

バックスカイ B. J. (Bacskai B. J.)、クルンク W. E. (Klunk W. E.)、マシス C. A. (Mathis C. A.)、ヘイマン 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.

20

## 【0156】

バード F. (Bard F.)、キャノン C. (Cannon C.)、バーボーラ 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. (Kholodenko D.)、リー M. (Lee M.)、リーベルベルグ I. (Lieberburg I.)、マター R. (Mottter 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.

30

40

## 【0157】

バレリ H. (Barelli H.)、レビーウ 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.)、マラムバウド 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. (Muller M.)

50

- 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: プ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 of 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 immunohistochemistry of sporadic Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy cases. ) Mol. Med. 3: 695 - 707 . 10
- 【0158】  
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 .
- 【0159】  
ブラーク H. (Braak H. ), ブラーク E. (Braak E. ) (1991) アルツハイマー関連変化の神経病理学的分類 (Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. ) Acta Neuropathol. 82: 239 - 259 . 20
- 【0160】  
ブライデン D. J. (Brayden D. J. ), テンブルトン L. (Templeton L. ), マッククリーン S. (McClean S. ), バルボア R. (Barbour R. ), フアング J. (Huang J. ), ヌグエン M. (Nguyen M. ), アヘルン D. (Ahern D. ), マター R. (Mottet 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 (Encapsulation in biodegradable microparticles enhances serum antibody response to parenterally-delivered - amyloid in mice. ) Vaccine 19: 4185 - 4193 . 30
- 【0161】  
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. (Flament-Durand J. ) (1985) Mise en evidence immunologique de la proteine tau au niveau des lesions de degenerescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. Arch. Biol. 95: 229 - 235 . 40
- 【0162】  
バーク 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バントの効果 (The influence of adjuvant on the therapeutic efficacy of a recombinant genital her 50

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

【0163】

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. (Duboid 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-ダルボウクス 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.

10

【0164】

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. (Pagannetti 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 alternatively cleaved beta-amyloid peptides in cells expressing mutants of the amyloid precursor protein defective in endocytosis.) J. Neurochem. 74:1131-1139.

20

【0165】

セベク G. (Cevc G.)、ゲバウアー D. (Gebauer D.)、ステューベル 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、トランスファース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, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport the therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin.) Biochim Biophys Acta 1368:201-215.

30

【0166】

チェン G. Q. (Chen G. Q.)、チェン K. S. (Chen K. S.)、クノックス J. (Knox J.)、イングリシ J. (Inglis J.)、バーナード A. (Bernard A.)、マーチン S. J. (Martin S. J.)、ジャスティス 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

40

50

: 975 - 979 .

【0167】

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. Liss, Inc.) 77 ~ 96 頁。

【0168】

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

【0169】

コルテス - レタモゾ V. (Cortez - Retamozo V.)、ロイウエレイズ M. (Lauwereys M.)、ハッサンザデ Gh. G. (Hassanzadeh Gh. G.)、ゴーベルト M. (Goibert M.)、コンラス K. (Conrath K.)、ムルダーマン S. (Muyldermans S.)、デ・バトセリアー P. (De Baetselier P.)、レベッツ H. (Revelts H.) (2002) ラクダの単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

【0170】

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 .

【0171】

デイビス H. L. (Davis H. L.)、ウィラットナ R. (Weerantna 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.)、ウィラットナ R. (Weerantna 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

【0172】

デラコウルテ A. (Delacourte A.)、デフォセッス A. (Defosse 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

【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 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

一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.

【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 F. (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

【0175】

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 F. (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 synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease.) *Neurology* 59: 398 - 407.

20

【0176】

デマトス R. B. (DeMattos R. B.), バレス K. R. (Bales K. R.), クミンズ 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. (Holtzman 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

【0177】

デマトス R. B. (DeMattos R. B.), バレス K. R. (Bales K. R.), クミンズ D. J. (Cummins D. J.), パウル S. M. (Paul S. M.), ホルツマン D. M. (Holtzman 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

【0178】

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ッ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.

【0179】

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.)、グリーン 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

【0180】

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.

20

【0181】

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. (Pollo J.M.)、ベリ B.A. (Bellli 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) シンビスウイルス DNA 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

【0182】

デュークカーツ C. (Duyckaerts C.)、コレ M.A. (Colle 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.)、ウィンラド B. (Winlad B.)、ウィスニエフスキ H.M. (Wisniewski H.M.) (編)。ジョン・ウィリー・アンド・ソンズ (John Wiley and Sons)、英国、サセックス州 (Sussex, UK)、137~152 頁。

40

【0183】

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. (McClure 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 processing of its precursor.) Science 248:1122-1124.

【0184】

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.

【0185】

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.

【0186】

フレンケル D. (Frenkel D.)、カツツ 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.

【0187】

フレンケル D. (Frenkel D.)、カリブ N. (Kariv 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.

【0188】

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.

【0189】

ゲイムス D. (Games D.)、アダムス D. (Adams D.)、アレサンドリニ R. (Alessandrini R.)、バーボウ R. (Barbour R.)、バーセレット P. (Berthellette 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-am

10

20

30

40

50

yl oid precursor protein.) Nature. 373: 523 - 527.

【0190】

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.)

【0191】

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.

【0192】

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.

【0193】

グランデ - イクバル I. (Grundke - Iqbal I.), イクバル K. (Iqbal K.), ツング Y. (Tung Y.), クインラン M. (Quinlan M.), ウィスニエフスキ 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.

【0194】

ハース C. (Haass C.), シュロスメイチャー M.G. (Schlossmacher M.G.), フング A.Y. (Hung A.Y.), ビゴー - ペルフェリー C. (Vigo - Pelfrey C.), メロン A. (Mellon A.), オスタスゼウスキー 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 ペプチドは、正常な代謝中の培養細胞によって産生される (Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism.) Nature 359: 322 - 325.

【0195】

ハース C. (Haass C.), カペル A. (Capell A.), シトロソ 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ッシングに異なる影響を及ぼす (The vacuolar H (+) - ATPase inhibitor bafilomycin A1 differs

10

20

30

40

50

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

【0196】

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.

10

【0197】

ヒアオ K. (Hsiao K.), チャプマン 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.

20

【0198】

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) ヒト脳神経腫瘍の標的画像診断。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.

30

【0199】

ヘイマン B. T. (Hyman B. T.), トロジアノウスキー 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.

40

【0200】

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. (Carriere 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.

50

(Paolucci F.)、パウ B. (Pau B.)、ボンセレット P. (Poncellet 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.

#### 【0201】

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. (Mathews 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. (Christi 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.

#### 【0202】

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バントのアジュバント活性 (Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant.) Adv. Drug Deliv. Rev. 32: 173 - 186.

#### 【0203】

カルバック 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. (Bruno D.)、シソディア S. S. (Sisodia S. S.)、スタウゲンビール 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.

#### 【0204】

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.)、グルゼシク K. H. (Grzeschik K. H.)、ムルサウプ G. (Multhaup G.)、バイレウサー K. (Beyreuther K.)、ムラー・ヒル B.

10

20

30

40

50

(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.

【0205】

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Tg2576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 Tg2576 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease.) J. Neuroscience 21: 372 - 381.

10

【0206】

ケンシル(Kensil)ら(1995) In: Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. ポーウェル(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.)

20

【0207】

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.

【0208】

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.

30

【0209】

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続培養(Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.) Nature 256: 495 - 497.

40

【0210】

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.

【0211】

50

コシク K. S. (Kosik K. S.), ジョアキム C. L. (Joachim C. L.), セルコエ D. J. (Selkoe D. J.) (1986) 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 (Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease.) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83: 4044 - 4048.

【0212】

コズボール D. (Kozbor D.), デキスター D. (Dexter D.), ローダー J. C. (Roder J. C.) (1983) 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 comparative analysis of the phenotypic characteristics of available fusion partners for the construction of human hybridomas.) Hybridoma 2: 7 - 16.

10

【0213】

ランガー R. (Langer R.) (1990) 薬物送達の新規方法 (New methods of drug delivery.) 249: 1527 - 1533.

【0214】

ランガー R. (Langer R.), クレランド J. L. (Cleland J. L.), ハーネス J. (Hanes J.) (1997) 微小球に基づく単回用量ワクチンの新たな前進 (New advances in microsphere-based single-dose vaccines.) Adv. Drug Deliv. Rev. 28: 97 - 119.

20

【0215】

ラングストン J. W. (Langston J. W.), ウィンダー H. (Widner H.), ゴーツ C. G. (Goetz C. G.), ブルックス D. (Brooks D.), ファン S. (Fahn S.), フリーマン T. (Freeman T.), ワッツ R. (Watts R.) (1992) 脳内移植のためのコア評価プログラム (Core assessment program for intracerebral transplantations (CAPIT).) Mov. Disord. 7: 2 - 13.

30

【0216】

ラウリー (Lawrie) およびツミン (Tumin) (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3: 102 - 109.

【0217】

レメレ C. A. (Lemere C. A.), マーロン R. (Maron R.), スプーナー E. T. (Spoonner E. T.), グレンフェル T. J. (Greenfell T. J.), モリ C. (Mori C.), デサイ R. (Desai R.), ハンコック W. W. (Hancock W. W.), ウェイナー H. L. (Weiner H. L.), セルコエ D. J. (Selkoe D. J.) (2000a) 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 (Nasal A treatment induces anti-A antibody production and decreases cerebral amyloid burden in PD - APP mice.) Ann. N. Y. Acad. Sci. 920: 328 - 331.

40

【0218】

レメレ C. A. (Lemere C. A.), マーロン R. (Maron R.), スプーナー E. T. (Spoonner E. T.), グレンフェル T. J. (Greenfell T. J.), モリ C. (Mori C.), デサイ R. (Desai

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.

#### 【0219】

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. (Greenfell 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.

10

#### 【0220】

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.

20

#### 【0221】

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. (Wollscheid V. ), ノイマン M. (Neumann M. ), オット M. (Otto M. ), マーラー J. M. (Maler J. M. ), ルーサー E. (Ruther E. ), コーンフーパー J. (Kornhuber J. ), ウィルトファング J. (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 carboxyterminally elongated Abeta peptide.) Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 17: 1291-1296.

30

#### 【0222】

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. (Ishiooka G. ), チサリ F. V. (Chisari F. V. ), フィクス J. (Fike J. ), グレイ H. (Grey H. ), チェスナット 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.

40

#### 【0223】

50

マリアーニ G. (Mariani 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.)、タドデイ G. Z. (Taddei G. Z.)、カステルラーニ P. (Castellani P.)、シリゴス K. (Syrgios 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.

10

## 【0224】

マスターズ C. L. (Masters C. L.)、シムス G. (Simms G.)、ウェイマン N. A. (Weinman N. A.)、マルサアップ G. (Multhaup G.)、マクドナルド B. L. (McDonald B. L.)、ベyro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: 4245 - 4249.

20

## 【0225】

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.

30

## 【0226】

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.)、ロウエ 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.)、ウィルコック 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サスガイドライン: DLB 国際研究集会に関するコンソーシアムの報告 (Consensus g

40

50



uidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Report of the consortium on DLB international workshop.) *Neurology* 47:1113-1124.

【0227】

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.), カッツマン 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.

10

【0228】

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.), リバーズ D. (Reversé D.), ベークランド V. (Baekelandt V.), ナーイドゥ 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.), チェクラ 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.* 274:6483-6492.

20

30

【0229】

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

【0230】

モーガン D. (Morgan D.), ダイヤモンド D. M. (Diamond D. M.), ゴットシャル 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)

40

【0231】

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

50

## 【0232】

オヒ Y. (Ohe Y.), ザオ D. (Zhao 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.

## 【0233】

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.

10

## 【0234】

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. (Cumplings J. L.), デコスキー S. T. (DeKosky S. T.) (2001) 実践パラメータ: 軽度の認知障害 (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.

20

## 【0235】

ポンテ P. (Ponte P.), ゴンザレス - デウィット 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.

30

## 【0236】

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.), アブダロビク N. M. (Avdalovic N. M.), レビット M. (Levitt M.), ジュンハンス R. P. (Junghans 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.

40

## 【0237】

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, US.)

【0238】

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

【0239】

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: 173 - 176.

20

【0240】

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かり (Degradation of amyloid-peptide: a key to Alzheimer pathogenesis, prevention and therapy.) Neurosci. News 3: 52 - 62.

【0241】

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・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbour 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

【0242】

サンドロック D. (Sandrock D.)、ベルヘーゲン R. (Verheggen R.)、ヘルピック 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 (Immunoscintigraphy for the detection of brain abscesses.) Nucl. Med. Commun. 17: 311 - 316.

40

【0243】

シェンク D.B. (Schenk D.B.)、バーバー R. (Barbour R.)、ズン 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. (Kholodenko D.)、リー M. (Lee M.)、リャオ 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. ), バスクエス N. (Vasquez N. ), バンデバート C. (Vandeververt C. ), ウォーカー S. (Walker S. ), ボグルリス 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

## 【0244】

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. ), ウォールス 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 .

## 【0245】

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

## 【0246】

シュレイダー - フィッシャー G. (Schneider - 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 alkalizing agents on the processing of the beta - amyloid precursor protein. ) Brain Res. 716 : 91 - 100 .

30

## 【0247】

セオ J. (Seo J. ), キム S. (Kim S. ), キム H. (Kim H. ), パーク C. H. (Park C. H. ), ジョング 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 Abeta - or CT (105) - induced toxicity. ) Biol. Psychiatry 49 : 240 - 247 .

40

## 【0248】

サージャント N. (Sergeant N. ), デイビッド J. P. (David J. P. ), シャンパイン D. (Champain D. ), ゲステム A. (Ghestem A. ), ワッツ 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.

【0249】

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.)、コスタジェベキ V. (Kostanjevecki V.)、ミシアン 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. (Sergheraert 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

【0250】

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.)、スウィンドルハースト C. (Swindehurst 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

【0251】

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.)、フランギオン B. (Frangione B.)、ウイスニエフスキ 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

【0252】

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

【0253】

スパイネル S. (Spinelli S.)、フレンケン L. G. (Frenken L. G.)、ハーマンス P. (Hermans P.)、ベリップス T. (Verrips T.)、ブラウン K. (Brown K.)、テゴニ M. (Tegoni M.)、キャンピラウ 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.

【0254】

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.

【0255】

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. (Krzysz U.), マーシャン M. (Marchand M.) (1997) 熱帯熱マラリア原虫に対する組換えスボ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.

【0256】

スターヒラー - ピアラット C. (Sturchler-Pierrat C.), エイブラモスキー D. (Abramowski D.), ドーク 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.), パゲネティー P. A. (Paganetti P. A.), ワリデル C. (Waridel C.), カルフーン M. E. (Calhoun M. E.), ジャッカー M. (Jucker M.), プロブスト A. (Probst A.), シュタウフェンビール 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モデル (Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology.) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13287 - 13292.

【0257】

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.

【0258】

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) ウイルスに感染したラット脳における単純ヘルペスウイルス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.

【0259】

テサマニー J. (Temsamani J.)、ロウセレ C. (Rousselle 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.

【0260】

サール 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.

【0261】

ティギス M.A. (Tigges M.A.)、レング S. (Leng S.)、ジョンソン D.C. (Johnson D.C.)、バーク R.L. (Burke R.L.) (1996) ヒト単純ヘルペスウイルス (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、HSV2 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 shut off functions are disabled.) J. Immunol. 156: 3901 - 3910.

【0262】

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>.

【0263】

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 ジェンハーゲン M. (Eriksson Joenhagen 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.

【0264】

ワカバヤシ T. (Wakabayashi T.)、ヨシダ J. (Yoshida J.)、オカダ H. (Okada H.)、スギタ K. (Sugita K.)、イトウ K. (Itouh K.)、タドコロ M. (Tadokoro M.)、オオシマ M. (Ohshima M.) (1995) インジウム-111 標識 G-22 抗神経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-111 labelled G-

10

20

30

40

50

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

【0265】

ウェイナー H . L . ( We i n e r H . L . ) 、 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 . ) 、 イッサザデ S . ( I s s a z a d e h S . ) 、 ハンコック W . W . ( H a n c o c k W . W . ) 、 セルコエ D . J . ( S e l k o e 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 ( N a s a l a d m i n i s t r a t i o n o f a m y l o i d - b e t a p e p t i d e 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 a m o u s e m o d e l o f A l z h e i m e r ' s d i s e a s e . ) A n n . N e u r o l . 48 : 567 - 579 .

10

【0266】

ワイルド D . ( W i l d D . ) ( 編 ) ( 2001 ) The Immunoassay Handbook 第2版 . ネイチャーPr . ( N a t u r e P r . ) 英国、ロンドン ( L o n d o n , U K . )

【0267】

ウイスニエフスキ H . M . ( W i s n i e w s k i H . M . ) 、 ボルブロット A . W . ( V o r b r o d t A . W . ) 、 ウェギール J . ( W e g i e l 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 ( A m y l o i d a n g i o p a t h y a n d b l o o d - b r a i n b a r r i e r c h a n g e s i n A l z h e i m e r ' s d i s e a s e . ) A n n . N . Y . A c a d . S c i . 826 : 161 - 172 .

20

【0268】

ウッド J . ( W o o d J . ) 、 ミラ S . ( M i r r a S . ) 、 ポロック N . ( P o l l o c k N . ) 、 バインダー L . ( B i n d e r 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 ( N e u r o f i b r i l l a r y t a n g l e s o f A l z h e i m e r ' s d i s e a s e s h a r e a n t i g e n i c d e t e r m i n a n t s w i t h t h e a x o n a l m i 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 . ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . ( U S A ) 83 : 4040 - 4043 .

30

【0269】

シャオ W . ( X i a o W . ) 、 ブランドスマ J . L . ( B r a n d s m a 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 ( C R P V ) DNAの高効率、長期臨床発現 ( H i g h e f f i c i e n c y , l o n g - t e r m c l i n i c a l e x p r e s s i o n o f c o t t o n t a i l r a b b i t p a p i l l o m a v i r u s ( C R P V ) D N A i n r a b b i t s k i n f o l l o w i n g p a r t i c l e - m e d i a t e d D N A t r a n s f e r . ) N u c l e i c A c i d s R e s . 24 : 2620 - 2622 .

40

【0270】

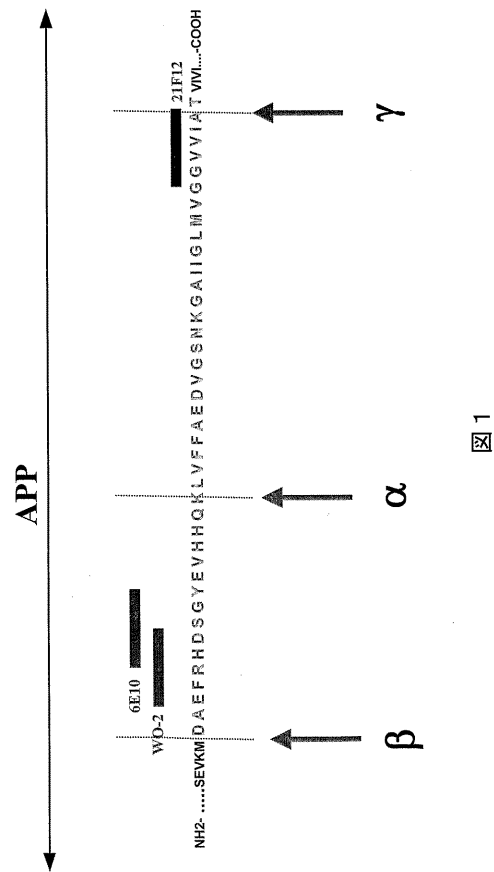
チョウ S . Z . ( Z h o u S . Z . ) 、 クーパー S . ( C o o p e r S . ) 、 カング L . Y . ( K a n g L . Y . ) 、 ルギーリ L . ( R u g g i e r i L . ) 、 ヘイムフェルド S . ( H e i m f e l d S . ) 、 スリバスタバ A . ( S r i v a s t a v a A . ) 、 プロキシメヤー H . E . ( B r o x m e y e r H . E . ) ( 1994 ) ヒト臍帯血における造血性前駆細胞の未成熟および成熟サブセットへのアデノ随伴ウイルス2仲介高効率遺伝子導入 ( A d e n o - a s s o c i a t e d v i r u s 2 - m e d i a t e d h i g h e f f i c i e n c y g e n e t r a n s f e

50



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

【 図 1 】



【 図 2 】

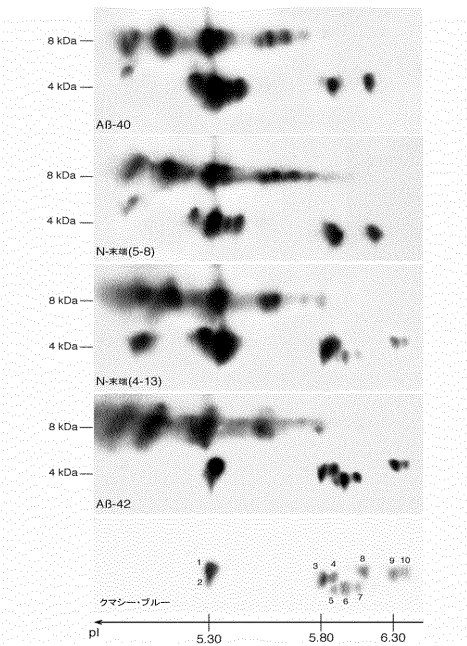


図 2

【図 3】

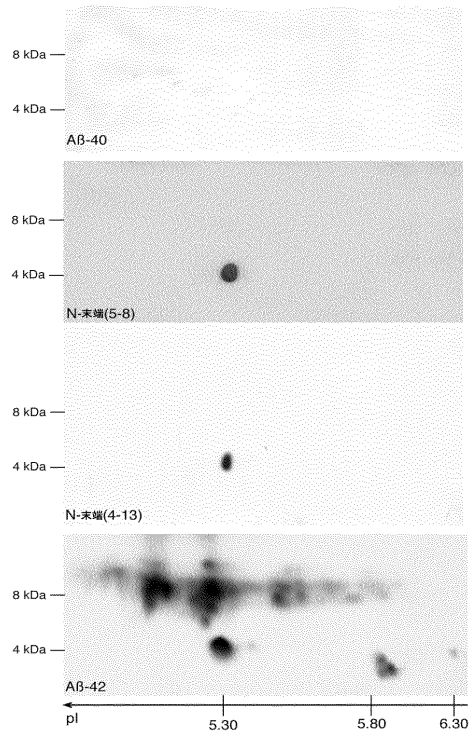


図 3

【図 4】

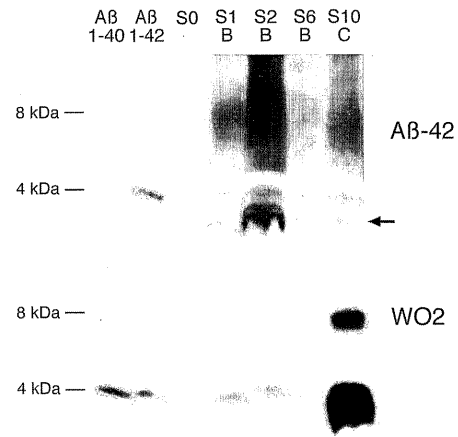


図 4

【図 5】

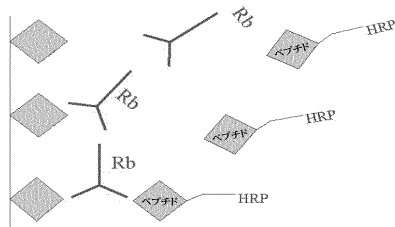


図 5

【図 6】

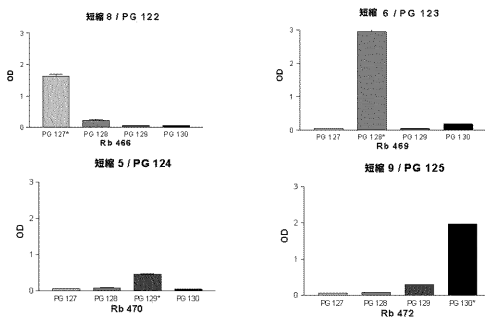


図 6

【 図 7 】

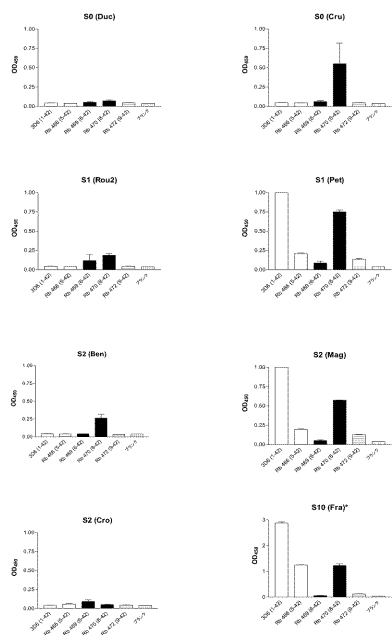


図 7

【 配 列 表 】

2010091572000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K	7/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 0 7 K	5/113 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	
		C 0 7 K 5/113	

(71)出願人 592236234  
 アンスティテュー・ナショナル・ドゥ・ラ・サンテ・エ・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・メディカル・  
 (イ・エヌ・エス・ウ・エール・エム)  
 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECH  
 RCHE MEDICALE (I.N.S.E.R.M.)  
 フランス75654パリ・セデックス13、リュ・ドゥ・トルビアック101番

(74)代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100116311  
 弁理士 元山 忠行

(74)代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史

(72)発明者 アンドレ・ドゥラクールト  
 フランス、エフ - 5 9 1 5 5 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・セルジャン  
 フランス、エフ - 5 9 7 9 0 ロンシャン、リュ・ジャン・ジョレス9番

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ79 QQ96 QR72 QS28 QS33 QS36  
 4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 DD62 EE01  
 4H045 AA11 BA13 BA15 CA40 DA76 EA21 EA50 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	<a href="#">JP2010091572A</a>	公开(公告)日	2010-04-22
申请号	JP2009247556	申请日	2009-10-28
[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 国家健康科学研究所		
申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司，Namuroze芬恩笔记本闭嘴 在研究所国立德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 (李NTT S.宇耶鲁大学EM)		
[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	G01N33/53 C07K16/18 A61K39/395 A61P25/28 C12Q1/02 C07K7/06 C07K5/113 A61K39/00 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	G01N33/53.D C07K16/18.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/28 C12Q1/02 C07K7/06 C07K5/113		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR72 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS36 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA13 4H045/BA15 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	2002447147 2002-07-24 EP 60/401497 2002-08-06 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

# 摘要(译)

要解决的问题：提供一种确定或预测疾病（例如阿尔茨海默氏病）的方法。哺乳动物确定哺乳动物对与β-淀粉样蛋白形成和/或聚集相关的疾病或发展与β-淀粉样蛋白形成和/或聚集相关的疾病（例如阿尔茨海默氏病）的风险。或筛选哺乳动物中β-淀粉样蛋白沉积物的清除率，或预测哺乳动物中β-淀粉样蛋白负荷的水平。[选择图]无

βA の位置	残基	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