

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-503520  
(P2009-503520A)

(43) 公表日 平成21年1月29日(2009.1.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 8 5	4 C 0 8 4
<b>CO 7 K 16/18 (2006.01)</b>	CO 7 K 16/18	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	
<b>A 6 1 P 25/28 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-524203 (P2008-524203)  
 (86) (22) 出願日 平成18年7月27日 (2006. 7. 27)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年3月24日 (2008. 3. 24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/029452  
 (87) 国際公開番号 W02007/016357  
 (87) 国際公開日 平成19年2月8日 (2007. 2. 8)  
 (31) 優先権主張番号 60/703, 653  
 (32) 優先日 平成17年7月29日 (2005. 7. 29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

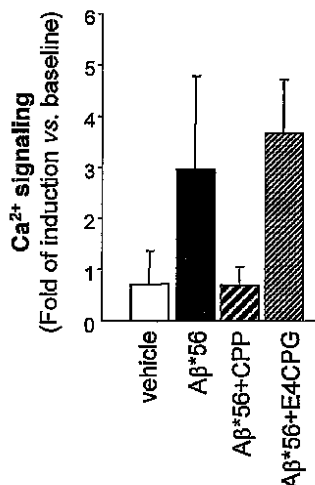
(71) 出願人 305023366  
 リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ  
 オブ ミネソタ  
 アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 1 4 -  
 8 6 5 8, セント ポール, ウェストゲ-  
 ト ドライブ 1 0 0 0, スイート 1 6  
 0  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ベータアミロイド受容体及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体がNMDA受容体アンタゴニストとして機能する同定に関する。本発明はまた、神経変性疾患及び認知障害の検出及び治療のための方法及び組成物、並びにNMDA受容体機能に対する $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体のアンタゴニスト効果を調整する薬剤を同定するためのスクリーニング方法を提供する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

対象の神経変性疾患及び/又は認知障害を検出する方法であって、以下のステップ：  
対象から試料を得；及び  
NMDA受容体に対する抗体を用いて当該試料を免疫沈降させること、  
を含み、ここで、 $\beta$ -アミロイドとNMDA受容体との共沈殿は、当該対象が神経変性疾患及び/又は認知障害を有することを示す、前記方法。

**【請求項 2】**

対象の前駆症状性神経変性疾患及び/又は認知障害を検出する方法であって、以下のステップ：  
対象から試料を得；及び  
NMDA受容体に対する抗体を用いて当該試料を免疫沈降させること、  
を含み、ここで、 $\beta$ -アミロイドとNMDA受容体との共沈殿は、当該対象が前駆症状性神経変性疾患及び/又は認知障害を有することを示す、前記方法。

10

**【請求項 3】**

NMDA受容体に対する抗体が、NR1、NR2A及びNR2Bからなる群より選ばれるNMDA受容体サブユニットに結合する抗体である、請求項 1 又は 2 記載の方法。

**【請求項 4】**

NMDA受容体機能を阻害する方法であって、NMDA受容体と $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体とを接触させることを含む、前記方法。

20

**【請求項 5】**

$\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体のNMDA受容体機能に対するアンタゴニスト効果を変える薬剤のスクリーニング法であって、以下のステップ：

NMDA受容体を、当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触させ；  
当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されたNMDA受容体のNMDA受容体機能を決定し；  
当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されたNMDA受容体のNMDA受容体機能を、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されかつ当該薬剤とは接触されないNMDA受容体機能と比較すること、  
を含み、

30

ここで、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されかつ当該薬剤とは接触されないNMDA受容体機能に対する、当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されたNMDA受容体におけるNMDA受容体機能のレベルの相違は、当該薬剤が、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体のNMDA受容体機能に対するアンタゴニスト効果を変えることを示す、前記方法。

**【請求項 6】**

神経変性疾患及び/又は認知障害の治療のための薬剤のスクリーニング法であって、以下のステップ：

NMDA受容体を、当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触させ；  
当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されたNMDA受容体のNMDA受容体機能を決定し；  
当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されたNMDA受容体のNMDA受容体機能を、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されかつ当該薬剤とは接触されないNMDA受容体機能と比較すること、  
を含み、

40

ここで、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されかつ当該薬剤とは接触されないNMDA受容体機能に対する、当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されたNMDA受容体におけるNMDA受容体機能のレベルの相違は、当該薬剤が、神経変性疾患及び/又は認知障害の治療のための薬剤であることを示す、前記方法。

**【請求項 7】**

50

前記薬剤が、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体のNMDA受容体に対するアンタゴニスト効果を阻害する、請求項5又は6記載の方法。

【請求項8】

NMDA受容体機能が、パッチクランプ全細胞記録によって決定される、請求項5～7のいずれか1項記載の方法。

【請求項9】

NMDA受容体機能が、 $Ca^{2+}$ 蛍光画像によって決定される、請求項5～7のいずれか1項記載の方法。

【請求項10】

対象の神経変性疾患及び/又は認知障害の治療方法であって、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体のNMDA受容体に対するアンタゴニスト効果を変える薬剤の有効量を当該対象に投与することを含む、前記方法。

10

【請求項11】

前記神経変性疾患及び/又は認知障害が、アルツハイマー病である、請求項1～3及び6～10のいずれか1項記載の方法。

【請求項12】

$\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体が、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって測定された約56 kDaの分子量を有する、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。

【請求項13】

$\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体が、 $\beta$ -アミロイドタンパク質のドデカマーを含む、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。

20

【請求項14】

$\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体がA $\beta$ 56である、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。

【請求項15】

単離されたA $\beta$ 56/NMDA受容体複合体。

【請求項16】

$\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体のNMDA受容体に対する阻害効果を変える、薬剤。

【請求項17】

請求項5～9のいずれか1項記載の方法によって同定される薬剤。

30

【請求項18】

$\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体に結合し、 $\beta$ -アミロイド/NMDA受容体複合体の形成を抑制する、抗体。

【請求項19】

NMDA受容体に結合し、 $\beta$ -アミロイド/NMDA受容体複合体の形成を抑制する、抗体。

【請求項20】

対象の神経変性疾患及び/又は認知障害の治療方法であって、請求項18又は19に記載の抗体の有効量を当該対象に投与することを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

40

【背景技術】

【0001】

継続出願データ

本願は、本明細書に文献として引用されている、2005年7月29日に出版された米国仮出願第60/703,653号の利益を請求する。

【0002】

政府資金

本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成番号NS33249の下で、政府支持によってなされた。政府は、本発明においてある権利を有することがある。

【0003】

50

## 背景

ペータアミロイドタンパク質 (A $\beta$ ) は、アルツハイマー病(AD)の病因に関連する。A $\beta$ ペプチドは、AD脳に堆積された主なアミロイドタンパク質であり、天然及び合成体は、神経の存続可能性及び機能に対して破壊的な影響を有する。例えば、Yankner他, Science 250, 279-82 (1990); Pike他, Brain Res 563, 311-4 (1991); Pike他, J Neurosci 13, 1676-87 (1993); Lambert他, Proc Natl Acad Sci U S A 95, 6448-53 (1998); Walsh他, Nature 416, 535-9 (2002); 及びKayed他, Science 300, 486-9 (2003) 参照。しかしながら、A $\beta$ タンパク質の堆積は、脳における生理的機能を変更し、記憶及び認知機能を破棄することによるメカニズムを不明確にする。

【発明の開示】

10

【0004】

### 発明の概要

本発明は、対象における神経変性疾患及び/又は認知障害の検出方法であって、以下のステップ：当該対象から試料を得；NMDA受容体に対する抗体で試料を免疫沈降すること、を含み、 $\beta$ -アミロイドの、NMDA受容体との共沈は、当該対象が、神経変性疾患及び/又は認知障害を有することを示す、前記方法を含む。ある実施態様では、 $\beta$ -アミロイドは、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体である。ある実施態様では、NMDA受容体に対する抗体は、NR1、NR2A及び/又はNR2Bから選ばれるNMDA受容体サブユニットに結合する抗体である。

20

【0005】

本発明はまた、対象の、前駆症状性神経変性疾患及び/又は認知障害の検出方法であって、以下のステップ：当該対象から試料を得；NMDA受容体に対する抗体で試料を免疫沈降すること、を含み、 $\beta$ -アミロイドの、NMDA受容体との共沈は、当該対象が、前駆症状性神経変性疾患及び/又は認知障害を有することを示す、前記方法を含む。ある実施態様では、 $\beta$ -アミロイドは、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体である。ある実施態様では、NMDA受容体に対する抗体は、NR1、NR2A及び/又はNR2Bから選ばれるNMDA受容体サブユニットに結合する抗体である。

【0006】

本発明は、NMDA受容体機能を阻害する方法であって、NMDA受容体を $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触させることを含む、前記方法を含む。

30

【0007】

本発明は、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体のNMDA受容体機能に対するアンタゴニスト効果を変える薬剤のスクリーニング法であって、以下のステップ：NMDA受容体を、当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触させ；当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されたNMDA受容体のNMDA受容体機能を決定し；当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されたNMDA受容体のNMDA受容体機能を、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されかつ当該薬剤とは接触されないNMDA受容体機能と比較すること、を含み、ここで、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されかつ当該薬剤とは接触されないNMDA受容体機能に対する、当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されたNMDA受容体におけるNMDA受容体機能のレベルの相違は、当該薬剤が、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体のNMDA受容体機能に対するアンタゴニスト効果を変えることを示す、前記方法を含む。ある実施態様では、当該薬剤は、NMDA受容体機能に対する $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体のアンタゴニスト機能を阻害する。ある実施態様では、NMDA受容体機能は、パッチクランプ全細胞記録によって決定される。ある実施態様では、NMDA受容体機能は、Ca<sup>2+</sup>蛍光画像によって決定される。本発明はまた、このような方法によって特定される薬剤を含む。

40

【0008】

本発明は、神経変性疾患及び/又は認知障害の薬剤のスクリーニング法であって、以下のステップ：当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されたNMDA受

50

容体のNMDA受容体機能を測定し；当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されたNMDA受容体のNMDA受容体機能を、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されかつ当該薬剤とは接触されないNMDA受容体機能と比較すること、を含み、ここで、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されかつ当該薬剤とは接触されないNMDA受容体機能に対する、当該薬剤及び $\beta$ -アミロイドタンパク質の水溶性集合体と接触されたNMDA受容体におけるNMDA受容体機能の変更されたレベルは、当該薬剤が、神経変性疾患及び/又は認知障害の治療薬であることを示す、前記方法を含む。ある実施態様では、当該薬剤は、NMDA受容体機能に対する $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体のアンタゴニスト機能を阻害する。ある実施態様では、NMDA受容体機能は、パッチクランプ全細胞記録によって決定される。ある実施態様では、NMDA受容体機能は、 $Ca^{2+}$ 蛍光画像によって決定される。本発明はまた、このような方法によって特定される薬剤を含む。

10

## 【0009】

本発明は、対象における神経変性疾患及び/又は認知障害の治療方法であって、以下のステップ： $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体のNMDA受容体に対するアンタゴニスト効果を変更する薬剤の有効量を当該対象に投与すること、を含む前記方法を含む。

## 【0010】

本発明は、単離されたA $\beta$ \*56/NMDA受容体複合体を含む。

## 【0011】

本発明は、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体のNMDA受容体に対する阻害効果を変更する薬剤を含む。

20

## 【0012】

本発明は、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体に結合し、 $\beta$ -アミロイド/NMDA受容体複合体の形成を抑制する抗体を含む。本発明はまた、対象の神経変性疾患及び/又は認知障害の治療方法であって、以下のステップ：かかる抗体の有効量を当該対象に投与することを含む、前記方法を含む。

## 【0013】

本発明は、NMDA受容体に結合し、 $\beta$ -アミロイド/NMDA受容体の形成を抑制する抗体を含む。本発明はまた、対象の神経変性疾患及び/又は認知障害の治療方法であって、以下のステップ：かかる抗体の有効量を当該対象に投与すること、を含む前記方法を含む。

## 【0014】

本発明の方法では、神経変性疾患及び/又は認知障害はアルツハイマー病でよい。

30

## 【0015】

本発明の任意の方法では、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって測定される約56 kDaの分子量を有することがある。

## 【0016】

本発明の任意の方法では、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体は、 $\beta$ -アミロイドタンパク質のドデカマーでよい。

## 【0017】

本発明の任意の方法では、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体は、A $\beta$ \*56でよい。

40

## 【0018】

他に反対のことを言及しない限り、「a (1つの)」、「an (1つの)」、「the (その)」及び「少なくとも1つ」は、交換して使用され、1以上を意味する。

## 【0019】

#### 本発明の例証的实施態様の詳細な説明

本発明は、 $\beta$ -アミロイド(A $\beta$ )タンパク質の溶解性集合体が、NMDA受容体に結合し、NMDA受容体のアンタゴニストとして機能することを初めて証明するものである。特に、本発明は、A $\beta$ \*56、すなわちA $\beta$ タンパク質の溶解性集合体が、記憶障害Tg2576マウス(アルツハイマー病をモデル化したプラーク-形成マウス)及びアルツハイマー病(AD)の患者のNMDA受容体に結合することを示す。本発明はまた、A $\beta$ \*56がNMDA-誘起電流を阻害す

50

ることを示す。NMDA受容体は、長期間のシナプス可塑性及び記憶の重要なメディエーターであり、本発明は、A タンパク質が神経変性疾患及び認知障害、例えばアルツハイマー病の記憶機能を損なうことによる新しいメカニズムを定義する。

【0020】

神経伝達物質グルタミン酸の受容体の主な部類は、受容体はN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)に選択的に結合するので、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体(NMDAR)と称される。NMDAは、アスパラギン酸の化学的アナログである。それは、通常、実際には生ぜず、NMDAは脳に存在しない。NMDA分子がNMDARを有する神経と接触する場合に、NMDA分子は、NMDARを強く活性化し(すなわち、強力な受容体アゴニストとして働く)、グルタミン酸がするのと同じタイプの神経興奮を起こす。NMDA受容体は、シナプス可塑性メカニズムにおいて重要な役割を果たし、いくつかの種類の学習及び記憶に必要である、興奮性イオンチャンネル型受容体である。NMDA受容体は、必須のNR1サブユニットの集合、及び2つの調節性NR2サブユニットの集合によって形成されるヘテロマーの内在性膜タンパク質である。NR1サブユニットは、グリセリン結合サブユニットであり、単一遺伝子の8スプライス変異体として存在する。グルタミン酸結合サブユニットは、NR2サブユニットであり、4つの異なる遺伝子の産物として生成し、NMDA受容体における異質性の構造的基礎のほとんどを与える。NR3 A-Cサブユニットの関連遺伝子ファミリーは、特定の脳部位においてNR2サブユニットに置き換わり、受容体活性に対して阻害効果を有する。異なる脳分布及び機能特性を有する複数の受容体アイソフォームは、NR1転写物の選択的スプライシング及びNR2サブユニットの発現差異によって生じる。例えば、Dingledine他, "The glutamate receptor ion channels," *Pharmacol Rev.* 1999 51(1): 7-61参照。本明細書で用いるように、NMDA受容体は、NR1サブユニットを有し、(NR2A、NR2B、NR2C、及びNR2D、NR3A及びNR3Bとして設計された)4つの異なるNR2及びNR3サブユニットの内の少なくとも1つを有する。NR1サブユニットの例は、ヒトNMDAR1ポリペプチドである。当該ポリペプチド及び対応する核酸の配列は、Genbank、受入番号L05666から得られ、Planells-Cases他, (1993) *P.N.A.S.* 90(11): 5057-5061に公表されている。NR2サブユニットの例は、ヒトNMDAR2Aポリペプチドである。当該ポリペプチド及び対応する核酸の配列は、Genbank、受入番号U09002から得られ、Foldes他, (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1223 (1): 155-159に公表されている。別のNR2サブユニットは、ヒトNMDAR2Bポリペプチドである。当該ポリペプチド及び対応する核酸の配列は、Genbank、受入番号U11287から得られ、Adams他, (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1260 (1): 105-108に公表されている。NMDA受容体は、それらがイオン、例えばCa<sup>2+</sup>を流束するので、「イオンチャンネル型」である。受容体がグルタミン酸、アスパラギン酸又はアゴニスト薬によって活性化される場合に、これらのイオンチャンネルは、シナプス後の膜の脱分極時にイオンを神経に流入する。

【0021】

本明細書で使用される「ベータアミロイドタンパク質」は、「ベータアミロイドポリペプチド」、「ベータアミロイドペプチド」、「ベータアミロイド分子」、「アミロイドタンパク質」、「アミロイドポリペプチド」、「アミロイドペプチド」、「アミロイド分子」、「A タンパク質」、「A ポリペプチド」、「A ペプチド」、「A 分子」、「ベータアミロイド」、「アミロイド」又は「A」とも称され、アルツハイマー病に感染した個体の脳におけるアミロイドプラークの主な構成成分であり、Glennner及びWong(例えば、Glennner他, (1984) *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885-890; 及びGlennner及びWong (1984) *Biochem Biophys Res Commun* 122, 1131-1135)、並びにMasters他, (Masters他, (1985) *Embo J* 4, 2757-2764; 及びMasters他, (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4245-4249)によって最初に特定された39~43アミノ酸残基のポリペプチドである。ベータアミロイドタンパク質のアミロイド前駆体タンパク質(APP)の遺伝子は、クローニングされ、配列決定されている(例えば、Kang他, (1987) *Nature* 325, 733; Tanzi他, (1987) *Science* 235, 880-884; 及びSelkoe (1994) *Annual Review of Neuroscience* Vol, 17, 489-517)。本明細書で使用される、ベータアミロイドタンパク質は、ベータアミロイドタンパク質の様々な公知のアレル変異体及び突然変異体の任意でよい。

## 【0022】

ベータアミロイドペプチドは、2つのステップにおいてベータアミロイド前駆体タンパク質（ベータAPP）から生じる。第1のステップは、ベータAPPの細胞外アミノ-末端ドメインの開裂を含む、タンパク質開裂は、ベータ-セクレターゼ（BACE）と称されるアスパルチル・プロテアーゼによって実行される。この酵素は、プロホルモン・コンバーターゼであるフューリンによって成熟かつ活性化形態に修飾されなければならないプロペプチドとして合成される。BASEの成熟形成によるベータAPP開裂は、ベータAPPの断片の細胞内分泌及び膜-結合残遺物を生じる。この残遺物は、次いで、ガンマ-セクレターゼと称される別のプロテアーゼによって処理される。ガンマ-セクレターゼは、ベータAPPのカルボキシ末端ドメインの膜内部位を開裂し、よってベータアミロイドペプチドを生じる。ガンマ-セクレターゼは、プレセニリン-1及び2を主な成分として含む多-サブユニット複合体であると考えられる。膜貫通型糖タンパク質ニカストリンは、プレセニリンと関係することが見出されている。ニカストリンは、ベータAPPのカルボキシ末端に結合し、ベータアミロイドペプチドの産生の調節を助けることが見出されている。アルツハイマー病の神経原線維病変では、タウと称されるタンパク質も見出されている。タウは、軸策で主に見出される神経微小管-関連タンパク質である。タウの機能は、チューブリン重合化を促進し、微小管を安定化させることである。過剰リン酸化形態にあるタウは、対となったヘリックス状フィラメント（PHF）の主な成分であり、アルツハイマー病の脳の神経原線維病変の構築単位である。例えば、J. Neurosci. 18: 1743-1752, 1998 and Neuron, 19: 939-945, 1997 参照。

10

20

## 【0023】

本明細書で使用する、ベータアミロイドタンパク質は、モノマー型ポリペプチドであり、1つのポリペプチド鎖からできている。モノマー型ポリペプチドは、本明細書では、「モノマー」とも称される。

## 【0024】

本明細書で使用される、 $n$ -アミロイドのオリゴマーは、 $n$ -アミロイドのオリゴマー形態とも称され、1超のベータアミロイドタンパク質の界面活性剤-安定構造である。オリゴマーは、必ずしも重合化されていない。 $n$ -アミロイドのオリゴマーは、溶解性でよい。本明細書で使用される「ダイマー」は、2つのベータアミロイドタンパク質の界面活性剤-安定構造である。本明細書で用いる「トリマー」は、3つのベータアミロイドタンパク質の界面活性剤-安定構造である。本明細書で用いる「テトラマー」は、4つのベータアミロイドタンパク質の界面活性剤安定構造である。本明細書で用いる「ペントマー」は、5つのベータアミロイドタンパク質の界面活性剤安定構造である。本明細書で用いる「ヘキサマー」は、6つのベータアミロイドタンパク質の界面活性剤安定構造である。

30

## 【0025】

本明細書で用いる「集合体」は、 $A$  タンパク質の1以上のオリゴマーの構造である。好ましい実施態様では、集合体は、1超の $A$  タンパク質オリゴマーの構造である。 $A$  タンパク質のオリゴマーの集合体は、例えば、 $A$  タンパク質の2つのオリゴマー、 $A$  タンパク質の3つのオリゴマー、 $A$  タンパク質の4つのオリゴマー、 $A$  タンパク質の5つのオリゴマー、 $A$  タンパク質の6つのオリゴマー、又は $A$  タンパク質のそれ以上のオリゴマー、の集合体でよい。ある実施態様では、 $A$  タンパク質のオリゴマーの集合体は、例えば、9つの $n$ -アミロイドタンパク質のナノマー、又は12つの $n$ -アミロイドタンパク質のドデカマーでよい。ある実施態様では、 $A$  タンパク質のオリゴマーの集合体は、例えば、 $n$ -アミロイドタンパク質の1超のヘキサマー、 $n$ -アミロイドタンパク質の1超のペントマー、 $n$ -アミロイドタンパク質の1超のテトラマー、 $n$ -アミロイドタンパク質の1超のトリマー、又は $n$ -アミロイドタンパク質の1超のダイマー、の集合体でよい。ある実施態様では、 $A$  タンパク質のオリゴマーの集合体は、例えば、 $n$ -アミロイドの2つのヘキサマー、 $n$ -アミロイドの3つのヘキサマー、 $n$ -アミロイドタンパク質の2つのテトラマー、 $n$ -アミロイドタンパク質の3つのテトラマー、 $n$ -アミロイドタンパク質の4つのテトラマー、 $n$ -アミロイドタンパク質の2つのトリマー、 $n$ -アミロイドタンパク質の3つのトリマー、 $n$ -アミ

40

50

ロイドタンパク質の4つのトリマー、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の5つのトリマー、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の2つのダイマー、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の3つのダイマー、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の4つのダイマー、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の5つのダイマー、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の6つのダイマー、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の7つのダイマー、又は $\beta$ -アミロイドタンパク質の8つのダイマー、の集合体である。

【0026】

実施態様によっては、 $\beta$ -アミロイドタンパク質集合体は、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の界面活性剤-安定ダイマーを含むことがある。実施態様によっては、 $\beta$ -アミロイドタンパク質集合体は、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の界面活性剤-安定トリマーを含むことがある。実施態様によっては、 $\beta$ -アミロイドタンパク質集合体は、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の界面活性剤-安定テトラマーを含むことがある。実施態様によっては、 $\beta$ -アミロイドタンパク質集合体は、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の界面活性剤-安定ペンタマーを含むことがある。実施態様によっては、 $\beta$ -アミロイドタンパク質集合体は、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の界面活性剤-安定ヘキサマーを含むことがある。

10

【0027】

実施態様によっては、1以上のペータアミロイドトリマーを有する、単離された溶解性の $\beta$ -アミロイドタンパク質集合体も含む。本明細書で使用される「 $\beta$ -アミロイドタンパク質トリマー」は、3つのA分子の界面活性剤-安定構造である。ある実施態様では、溶解性 $\beta$ -アミロイドタンパク質集合体は、1つ超の $\beta$ -アミロイドタンパク質トリマーを有する。ある実施態様では、 $\beta$ -アミロイドタンパク質集合体は、3つの $\beta$ -アミロイドタンパク質トリマーを含む。ある実施態様では、 $\beta$ -アミロイドタンパク質集合体は、 $\beta$ -アミロイドタンパク質のナノマーである。ある実施態様では、 $\beta$ -アミロイドタンパク質集合体は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって測定される、約40 kDaの分子量を有する。実施態様によっては、 $\beta$ -アミロイドタンパク質集合体は、4つの $\beta$ -アミロイドタンパク質トリマーを含む。ある実施態様では、 $\beta$ -アミロイドタンパク質集合体は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって測定される、約56 kDaの分子量を有する。

20

【0028】

ある実施態様では、 $\beta$ -アミロイドタンパク質集合体は、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の6つのダイマー、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の4つのトリマー、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の3つのテトラマー、又は $\beta$ -アミロイドタンパク質の2つのヘキサマーでよい。ある実施態様では、 $\beta$ -アミロイドタンパク質のドデカマーは、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって測定される、約56 kDaの分子量を有する。

30

【0029】

本明細書で使用される、「界面活性剤安定な」とも称される「界面活性剤-安定な」は、構造が界面活性剤溶液中の成分サブユニットに分解又は解離しないことを意味する。かかる界面活性剤溶液は、例えば、1% Triton X-100溶液又は2% SDS溶液でよい。従って、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の界面活性剤安定なオリゴマーは、界面活性剤溶液中で個々の $\beta$ -アミロイドタンパク質モノマーに分離しない。本発明の $\beta$ -アミロイドタンパク質の集合体は、溶解性である。本明細書で使用する用語「溶解性」は、水溶液中の残留を意味する。ある実施態様では、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体は、例えば超遠心を含む遠心後の上清中に存在する。 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体は、水、等張溶液、組織、培養培地、緩衝液、界面活性剤緩衝剤、有機緩衝剤、又は例えば、血漿又は脳脊髄液を含む体液を含むがこれらに限定されない幅広い溶液の溶液中に存在することができる。 $\beta$ -アミロイドタンパク質の集合体は、生理的緩衝剤の溶液中に存在することができる。

40

【0030】

$\beta$ -アミロイドタンパク質の集合体は、ある範囲の温度の溶液中に存在することができる。例えば、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の集合体は、0より高い温度の溶液中に存在することができる。 $\beta$ -アミロイドタンパク質の集合体は、0より高い温度の溶液中に存在することができる。 $\beta$ -アミロイドタンパク質の集合体は、例えば、少なくとも約4の温度、少な

50

くとも約10 の温度、少なくとも約15 の温度、少なくとも約25 の温度、少なくとも約37 の温度、少なくとも約42 の温度、少なくとも約50 の温度、少なくとも約55 の温度、少なくとも約60 の温度、少なくとも約70 の温度、少なくとも約75 の温度、少なくとも約80 の温度、少なくとも約85 の温度、少なくとも約90 の温度、及び/又は少なくとも約95 の温度、の溶液中に存在することがある。

【0031】

-アミロイドタンパク質の集合体は、例えば、少なくとも約4 未満の温度、少なくとも約10 未満の温度、少なくとも約15 未満の温度、少なくとも約25 未満の温度、少なくとも約37 未満の温度、少なくとも約42 未満の温度、少なくとも約50 未満の温度、少なくとも約55 未満の温度、少なくとも約60 未満の温度、少なくとも約70 未満の温度、少なくとも約75 未満の温度、少なくとも約80 未満の温度、少なくとも約85 未満の温度、少なくとも約90 未満の温度、少なくとも約95 未満の温度、及び/又は少なくとも約100 未満の温度、の溶液中に存在することがある。

10

【0032】

-アミロイドタンパク質の集合体は、例えば、約4 の温度、約10 の温度、約15 の温度、約25 の温度、約37 の温度、約42 の温度、約50 の温度、約55 の温度、約60 の温度、約70 の温度、約75 の温度、約80 の温度、約85 の温度、約90 の温度、及び/又は約95 の温度、の溶液中に存在することがある。

【0033】

-アミロイドタンパク質の集合体は、上記の様々な温度の任意の範囲の溶液中に存在することがある。

20

【0034】

A の溶解性集合体は、-アミロイドタンパク質の1以上の界面活性剤-安定オリゴマーを有する、単離された溶解性の非-繊維状 -アミロイドタンパク質集合体を含む。本発明の溶解性の非-繊維状 -アミロイドタンパク質 (A ) 集合体は、-アミロイドタンパク質の1以上の界面活性剤-安定オリゴマーからなってもよい。本発明の溶解性の非-繊維状 -アミロイドタンパク質 (A ) 集合体は、本明細書では、A \*集合体、A \*分子、A スター集合体、A スター状分子、A-ベータ\*集合体、A-ベータ\*分子、A-ベータスター状集合体、A-ベータスター状分子、A \*56、又はA\*56 (PCT/US2005/037828, "オリゴマー型 -アミロイドタンパク質の集合体及びその使用、及びLesnetar他, Nature. 2006 Mar 16 ; 440(7082): 352-7," 脳損傷記憶における特定の -アミロイドタンパク質集合体") とも称される。ある実施態様では、溶解性の非-繊維状 -アミロイドタンパク質 (A ) の集合体は、1超の、-アミロイドタンパク質の界面活性剤-安定オリゴマーを有する。実施態様によっては、本発明の溶解性の非-繊維状 -アミロイドタンパク質 (A ) の集合体は、単離し又は精製できる。

30

【0035】

-アミロイドタンパク質の集合体は、非常に多くの供給源から得られる。-アミロイドタンパク質の集合体は、天然供給源から得られる：例えば、血漿、脳組織及び脳脊髄液を含むがこれらに限定されない、体液、細胞又は組織。-アミロイドタンパク質の集合体は、内因性又はトランスフェクトされた -アミロイドタンパク質前駆体遺伝子を発現する細胞の培養培地から得られる。例えば、-アミロイドタンパク質の集合体は、-アミロイドタンパク質を発現するように安定的にトランスフェクトされた、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞の培養培地から得られる (Podlinsky他, J Biol. Chem., 1995, 270(16): 9564-9570)。-アミロイドタンパク質の集合体は、合成的に製造できる。-アミロイドタンパク質の集合体は、組換え的に産生できる。

40

【0036】

-アミロイドタンパク質の集合体は、認知障害に代表される、認知機能を崩壊させる。かかる認知障害は、軽度の認知障害、記憶障害、加齢に関連する記憶減退、及び前駆症状性のアルツハイマー病及び初期のアルツハイマー病を含むアルツハイマー病を含むがこれらに限定されない。認知機能の崩壊は、前駆症状的的局面、前臨床局面又は神経疾患の初

50

期局面を含むがこれらに限定されない、神経疾患の任意の局面を代表することがある。認知障害の崩壊は、加齢に関連する記憶減退又は加齢に関連する記憶障害を代表することがある (Craik, F. I. in Handbook of the Psychology of Aging (Birren, J. E. & Schaie, K. 著) 384-420 (Van Nostrand-Reinhold, New York, 1977)、及び Morrison and Hof, Science 1997, 278; 412-9参照)。かかる機能障害は、一次的であるか又は永続的である。かかる機能障害は、神経病理学的損傷の非存在下で観察されることがある。かかる神経病理学は、例えば、アミロイドプラーク形成、アミロイド沈着、酸化ストレス、星膠症、小膠細胞症、サイトカイン産生、ジストロフィー性神経、神経細線維もつれの形成、神経障害、肉眼で見える神経萎縮、神経欠損、シナプス欠損、及び他の神経病理学の兆候を含む。

10

## 【0037】

学習行動及び/又は認知機能の崩壊をアッセイする方法は、例えば、Cleary他, Nat. Neuroscience 8, 79-84 (2005); 米国仮出願第60/584,695号明細書 (2004年6月30日に出願); 米国仮出願第60/621,549号明細書 (2004年10月22日に出願); 及びPCT出願 " -アミロイドの溶解性オリゴマーは、学習行動の記憶を崩壊する" (2005年6月30日に出願) に記載のものを含む。

## 【0038】

認知崩壊は、様々な方法のいずれかによりアッセイできる。認知機能を評価する1つの手段は、認知機能を測定するために感受性であることが明らかになっている、Alternating Lever Cyclic Ratio (ALCR) 試験である (O'Hare他, Behav Pharmacol 1996, 7: 742-753; 及び Richardson他, Brain Res 2002, 954: 1)。ALCRの下では、ラットは、2-レバー実験チャンバ内の補強飼料を求めてレバー-押し要件の複雑な手順を学習する。ラットは、餌のペレットを取るくらいに十分に第1のレバーを押した後に他のレバーに移るというように、2つのレバー間を行ったり来たりするに違いない。各々の餌の褒美に必要な押し数は、平方指数  $x^2 - x$  に基いて中間値を含み、低 (2押し) から高 (56押し) に及ぶ。1サイクルは、これらの反応要件の全体的な昇順及び降順 (例えば、2、6、12、20、30、42、56、56、42、30、20、12、6、2押し/餌の褒美) である。6つのこのような全サイクルは、各々の活動中に示される。対象が褒美の後のレバーに励むとき、すなわち交互にやらない (精励エラー) ときに、又は対象がレバーについての反応要件を完了する前にレバーを切り替える (切り替えエラー) ときにエラーが得点される。

20

30

## 【0039】

認知機能を評価するために使用される他の方法は、試験を設置するための遅延非-マッチング、モリス水迷路 (ラット及びマウスのワーキングメモリを評価するために一般的に使用される)、サンプル試験に対する遅延マッチング (ワーキングメモリを試験するためのオペラント方法)、及び一定間隔のオペラント反応試験 (非-特異的認知効果を評価するための感度よい方法、例えば、試験されるべき認識の種類及び解剖学上の位置が不明であるとき)、遅延調節方法 (どの動物が褒美又は処罰と対になった刺激に曝露されるか、そして遅延の後、刺激-褒美の組合せに好適に反応する動物の能力を評価する、様々なオペラント又は非-オペラント試験を示す)、又は繰り返し取得方法 (どの対象が新しい刺激列を繰り返し学習する必要があるかのオペラント試験、を含むが、これらに限定されない)。

40

## 【0040】

本発明は、NMDA受容体、NMDA受容体サブユニットに対する抗体、及び/又はNMDA受容体と -アミロイドの溶解性集合体との複合体に対する抗体と、試料とを接触させ、次いで抗体の結合を検出することによって、対象から得られる試料における -アミロイドタンパク質の集合体の存在を検出する方法を含む。試料は、例えば、血清、血液、脳脊髄液 (CSF)、又は脳組織でよい。

## 【0041】

本発明は、対象における神経変性疾患及び/又は認知障害を検出する方法であって、以下のステップ: 対象から試料を得; 当該試料を、NMDA受容体又は受容体サブユニットに対

50

する抗体で免疫沈降すること、ここで、 $\beta$ -アミロイドのNMDA受容体との共沈は、対象が神経変性疾患及び/又は認知障害を有することを示す、を含む、前記方法を含む。ある局面では、 $\beta$ -アミロイドは、本明細書に記載の、A $\beta$ 56を含むがこれに限定されない $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体のいずれかを含む、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体である。ある局面では、NMDA受容体に対する抗体は、NR1、NR2A及び/又はNR2Bから選択されるNMDA受容体サブユニットに結合する抗体である。

#### 【0042】

本発明はまた、対象における前駆症状性神経変性疾患及び/又は認知障害を検出する方法であって、以下のステップ：対象から試料を得；当該試料を、NMDA受容体又は受容体サブユニットに対する抗体で免疫沈降すること、ここで、 $\beta$ -アミロイドのNMDA受容体との共沈は、対象が前駆症状性神経変性疾患及び/又は認知障害を有することを示す、を含む、前記方法を含む。ある局面では、 $\beta$ -アミロイドは、本明細書に記載の、A $\beta$ 56を含むがこれに限定されない、 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体のいずれかを含む、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体である。ある局面では、NMDA受容体に対する抗体は、NR1、NR2A及び/又はNR2Bから選択されるNMDA受容体サブユニットに結合する抗体である。本方法は、アルツハイマー病の検出に用いられる。本方法は、前駆症状性アルツハイマー病の検出に用いられる。

10

#### 【0043】

本発明は、NMDA受容体機能を阻害する方法であって、NMDA受容体を、本明細書に記載のアミロイドタンパク質の溶解性集合体の任意を含む、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体と接触させることを含む、前記方法を含む。ある実施態様では、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体は、A $\beta$ 56である。

20

#### 【0044】

本発明は、NMDA受容体機能に対する $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体のアンタゴニスト効果を変更又は調節する薬剤をスクリーニングする方法を含む。かかる方法は、NMDA受容体を、薬剤及び $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体と接触させ、当該薬剤及び当該 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体と接触させたNMDA受容体のNMDA受容体機能を測定し、当該薬剤及び当該 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体と接触させたNMDA受容体のNMDA受容体機能を、当該 $\beta$ -アミロイド溶解性集合体と接触させ当該薬剤とは接触させないNMDA受容体のNMDA受容体機能と比較すること、を含むことがある。当該 $\beta$ -アミロイド溶解性集合体と接触させ当該薬剤とは接触させないNMDA受容体のNMDA受容体機能と比べた、当該薬剤及び当該 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体と接触させたNMDA受容体におけるNMDA受容体機能のレベルの相違は、当該薬剤が、NMDA受容体機能に対する $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体のアンタゴニスト効果を変えることを示す。 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体は、A $\beta$ 56を含むがこれに限定されない、本明細書に記載の集合体の任意を含み得る。

30

#### 【0045】

本明細書に記載される、アンタゴニスト効果は、受容体の通常の生理的機能における阻害又は減少である。受容体についてアゴニストと競争するアンタゴニストは、競争的アンタゴニストである。他の手段によって拮抗するアンタゴニストは、非-競争的アンタゴニストである。

40

#### 【0046】

本発明は、神経変性疾患及び/又は認知障害の治療に効果的な薬剤をスクリーニングする方法を含む。かかる方法は、薬剤及び $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体とNMDAとを接触させ、該薬剤及び該 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体と接触させたNMDA受容体のNMDA受容体機能を測定し、該薬剤及び該 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体と接触させたNMDA受容体のNMDA受容体機能を、 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体と接触させたが薬剤とは接触させてないNMDA受容体のNMDA受容体機能と比較すること、を含んでもよい。 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体と接触させたが薬剤とは接触させてないNMDA受容体のNMDA受容体機能と比べた、該薬剤及び該 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体と接触させたNMDA受容体におけるNMDA受容体機能の変更されたレベルは、神経変性疾患及び/又は認知障害の治療に効果的であり得る。 $\beta$ -ア

50

ミロイドの溶解性集合体は、A \*56を含むがこれに限定されない、本明細書に記載のものの任意を含む。本発明はまた、本明細書に記載のスクリーニング法によって特定される薬剤、及びかかる薬剤の投与を含む治療法を含む。

【0047】

このような方法で使用されるNMDA受容体は、例えば、単離された受容体、再構成された膜、細胞膜調製物、全細胞又は組織を含む、様々な形式のいずれかで提供できる。例えば、神経細胞培養物、神経皮質細胞培養物、並びに神経及び脳の組織。NMDA受容体機能は、様々な手段のいずれかによって決定される。例えば、NMDA受容体機能は、組織培養で維持される細胞又は組織中の細胞内カルシウムの濃度の変化をアッセイすることによって決定される。カルシウム濃度は、例えば、カルシウムインジケータ色素の使用によって測定

10

【0048】

カルシウムインジケータ色素（カルシウムイオンプローブとも称される）は、細胞内インジケータとして広く使用される（Cellular Calcium, A Practical Approach, (1991) McCormack, J.G. and P.H. Cobbold eds. IRL Press at Oxford Press, New York, New York）。カルシウム検出は、再認識部位及び蛍光を与える部位を有する色素を用いて行うことができる。カルシウム特異的結合の構造に通常使用されるものは、1,2-ビス(2-アミノフェノキシ)エタン-N,N,N',N'-四酢酸（BAPTA）である。カルシウムインジケータ色素は、少なくとも2つの群に分離される；第1の群は、カルシウムの存在下でその蛍光を増加させる色素、第2群は、カルシウムの非存在下で励起及び/又は発光波長を有する色素とは異なる、カルシウムの存在下で励起及び/又は発光波長を有する色素。カルシウムインジケータ色素、カルシウムグリーン-1、カルシウムグリーン-2、及びFluo-4は、波長を変えなく、カルシウムイオンの存在下で蛍光を増加させる色素の代表例である。Fura-2及びIndo-1は、ほとんどの実験において交換可能と一般的に考えられるレシオメトリックCaインジケータである。Ca<sup>2+</sup>を結合したときのFura-2は、338 nm~366 nmの吸収又は励起ピークにおいてシフトを示し（Haughland, R., (2002) Handbook of Fluorescent Compounds and Research Products, 第9版, Molecular Probes, Inc）、発光よりも励起波長を変えることが簡単である顕微鏡用にFura-2色素を一般的に選択させる。一方、Indo-1は、カルシウムの存在下、485 nm~405 nmの発光においてシフトする。従って、Indo-1は、フローサイトメトリーを用いることにより大きな有用性を有する。そこでは、励起のための単一アルゴン-イオンレーザーを使用し、2つの異なった発光をモニターするのがより簡便である。カルシウムインジケータ色素は、フィルター型マイクロプレートリーダーを用いて効率的に測定できる。Principles of Fluorescence Spectroscopy 第2版 (1999) Lakowicz, J.R. Editor, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, New York; The Encyclopedia of Molecular Biology (1994) Kendrew, J Editor, Blackwell Science Ltd. Cambridge, MA; Cellular Calcium, A Practical Approach, (1991) McCormack, J. G. and P.H. Cobbold eds. IRL Press at Oxford Press, New York, New York; Haughland, R., (2002) Handbook of Fluorescent Compounds and Research Products, 第9版, Molecular Probes, Inc; 及びbiotek.com/resources/tech\_res\_detail.php?idで世界中のウェブで利用できる、P. Held, (2003年6月6日) "FLx800蛍光マイクロプレートリーダーを用いるカルシウム濃度変化の検出," Applications Department, Bio-Tek Instruments, Inc.も参照。

20

30

40

【0049】

あるいは、NMDA受容体機能は、本明細書で詳細に記載される、全細胞パッチクランプアッセイで決定できる。全細胞パッチクランプアッセイの代替法も使用できる。例えば、不連続単一電極電圧クランプ（dSEVC）（Roelfsema他, J Exp Bot. 2001 Sep; 52(362): 193-9）、及び細胞電極ハイブリッドの多電極細胞外記録を利用するハイ-スループット法（Natarajan他, Toxicol In Vitro. 2006 Apr; 20(3): 375-81. Epub 2005 Sep 29）。

【0050】

本発明の薬剤は、NMDA受容体機能に対する -アミロイドの溶解性集合体のアンタゴニ

50

スト効果を変える。アンタゴニスト効果を変えることは、アンタゴニスト効果を阻害し又は減少させることを含む。本明細書で使用される「アゴニスト」又は「活性化剤」は、標的受容体タンパク質との相互作用が、標的タンパク質の生物活性の効果の程度又は期間を長くする場合に、標的タンパク質の生物活性の効果の程度又は期間を長くする分子である。対照的に、本明細書で使用される用語「アンタゴニスト」又は「阻害剤」は、標的受容体タンパク質との相互作用が、標的タンパク質の生物活性の効果の程度又は期間を長くする場合に、標的タンパク質の生物活性の効果の程度又は期間を長くする分子を称する。アゴニスト及びアンタゴニストは、タンパク質、核酸、糖質、抗体又はタンパク質の効果を増加させる任意の他の分子を含むが、これらに限定されない。

【0051】

用語「アナログ」は、対象の分子を構造的に模倣した分子であって、別の置換基で参照分子の特定の置換基を置換することにより、標的された及び調節された方法で修飾されている分子を称する。出発分子に比べて、アナログは、同一でも、類似でも又は改良された有用性を示してもよい。改良された特徴（例えば、特定の受容体種に高い効力、又は標的された受容体種の高い感受性、及び他の受容体種の低い活性レベル）を有する公知の化合物の変異体を同定するための、アナログの合成及びスクリーニングは、薬化学でよく知られている方法である。本発明は、本明細書に記載の薬剤のアナログを含む。

【0052】

本明細書で使用される用語「調節」又は「変更」は、例えば刺激させることによる、生物活性のアプレギュレーション、（活性化又は刺激）；及び例えば拮抗させることによる、生物活性のダウンレギュレーション（すなわち、阻害又は抑制）を称する。モジュレーターは、機能の「活性化剤」及び「阻害剤」を含むがこれらに限定されない。「活性化剤」は、機能を直接的又は間接的に亢進する物質であり、NMDA受容体をより活性にする。反対に、「阻害剤」は、NMDA受容体機能を直接的又は間接的に減少させ、NMDA受容体をより不活性にする。減少は完全でも又は部分的でもよい。本明細書で用いられる、NMDA-Rシグナル伝達のリグランドは、アンタゴニスト及びアゴニストを包含する。

【0053】

ある実施態様において、NMDA-R活性を亢進又は阻害する薬剤の効力は、*in vitro*系でアッセイされる。一般的に、*in vitro*アッセイ形式は、薬剤及びNMDA-Rを添加し、NMDA受容体の生物活性を測定することを含む。

【0054】

本発明のアッセイ及び方法において、薬剤及び $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体と接触させたNMDA受容体の受容体機能は、 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体のみと接触させ、薬剤とは接触させないNMDA受容体の受容体機能と比べることができる。 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体のみと接触させ、薬剤とは接触させないNMDA受容体のNMDA受容体機能は、NMDA受容体を $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体と接触させ、受容体機能を決定することによって、アッセイで測定できる。あるいは、 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体のみと接触させ、薬剤とは接触させないNMDA受容体の受容体機能は、別個のアッセイで測定される値として提供できる。

【0055】

本発明は、 $\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体に結合し、 $\beta$ -アミロイド/NMDA受容体複合体の形成を抑制する抗体を含む。かかる抗体は、対象の神経変性疾患及び/又は認知障害の検出及び治療の方法であって、かかる抗体の有効量を当該対象に投与することを含む、前記方法において使用できる。

【0056】

本発明は、NMDA受容体に結合し、 $\beta$ -アミロイド/NMDA受容体複合体の形成を抑制する抗体を含む。かかる抗体は、対象の神経変性疾患及び/又は認知障害の検出及び治療の方法であって、かかる抗体の有効量を当該対象に投与することを含む、前記方法において使用できる。

【0057】

10

20

30

40

50

本発明は、 $\gamma$ -アミロイド/NMDA受容体複合体NMDA受容体に結合し、単離された $\gamma$ -アミロイドに結合せず、単離されたNMDAに結合しない、抗体を含む。かかる抗体は、対象の神経変性疾患及び/又は認知障害の検出及び治療の方法であって、かかる抗体の有効量を当該対象に投与することを含む、前記方法において使用できる。

【0058】

本発明の抗体は、本明細書に記載の方法のいずれかを含むがこれに限定されない、多くの方法のいずれかによって産生でき、特徴付けることができる。NMDA-誘起電流のA \*56-介在阻害を阻害する抗体の能力は、本明細書に記載のアッセイのいずれかを含むがこれに限定されない、多くの利用可能なアッセイのいずれかにより測定できる。

【0059】

本発明はまた、本明細書に記載の1以上の抗体を含む組成物を含む。かかる組成物は、薬学的に許容される担体を含んでもよい。本発明はまた、本発明の1以上の抗体を有するキットを含む。

【0060】

本明細書で用いられる用語「抗体（複数）」は、ポリクローナル抗体、アフィニティ-精製ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体及びその抗原-結合フラグメント、例えば、F(ab')<sub>2</sub>及びFabタンパク質分解フラグメントを含む。遺伝子工学的なインタクト抗体又はフラグメント、例えばキメラ抗体、Fvフラグメント、単一鎖抗体等、並びに合成抗原-結合ペプチド及びポリペプチドも含む。用語「ポリクローナル抗体」は、血漿細胞の1超のクローンから産生される抗体を意味し；対照的に、「モノクローナル抗体」は、血漿細胞の単一クローンから産生される抗体を意味する。ポリクローナル抗体は、様々な温血動物、例えばウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、トリ、ウサギ、マウス、ハムスター、ギニアピッグ及びラット、並びにトランスジェニック動物、例えばトランスジェニックヒツジ、ウマ、ヤギ又はブタを免疫源で免疫することによって得られる。モノクローナル抗体は、当業者によく知られている様々な技術によって得られる。

【0061】

治療的に有効な抗体は、「ヒト化」モノクローナル抗体から得られる。ヒト化モノクローナル抗体は、マウス（又は他の種の）免疫グロブリンの重可変鎖及び軽可変鎖由来の1上のCDRをヒト可変ドメインに導入し、次いで、ヒト残基をネズミの対応残基の骨格部位に置換することによって産生される。ヒト化モノクローナル抗体由来の抗体成分の使用は、ネズミの定常領域の免疫原性に関連する潜在的な問題を未然に防ぐ。ヒト化モノクローナル抗体の産生方法は、例えば、Jones他、Nature (1986); 321: 522、及びSinger他、J. Immunol, (1993); 150: 2844に見出される。

【0062】

本発明の抗体は、例えば、腫瘍壊死因子（TNF）アダリムマブ（HUMIRAとしても知られている）（例えば、<http://www.rxabbott.com/pdf/humira.pdf>、又はBaker, DE, "アダリムマブ：ヒト組換え免疫グロブリンG1抗-腫瘍壊死因子モノクローナル抗体," Rev Gastroenterol Disord. 2004 Fall; 4(4): 196-210参照）、又はインフリキシマブ（REMICADEとしても知られている）（例えば、<http://www.remicade.com/pdf/IN04810.pdf>、Harriman他, "インフリキシマブを用いるリウマチ様関節炎の臨床試験の概要、抗-TNF 治療," Ann Rheum Dis. 1999 Nov;58 Suppl 1: 161-4、又はHochberg他, "活性リウマチ様関節炎に罹患した患者のメトトレキサートを与えたときの、腫瘍壊死因子 ブロッキング剤、アダリムマブ、エタネルセプト及びインフリキシマブの効力の比較," Ann Rheum Dis. 2003 Nov; 62 Suppl 2: ii13-6参照）に対する抗体の投与のために使用される方法のいずれかに従って投与される。

【0063】

加えて、キメラ抗体は、好適な抗原特異性を有するマウス抗体分子から得られる遺伝子及び好適な生物特異性のヒト抗体分子から得られる遺伝子をスプライシングすることによって得られる；例えば、Takeda他、Nature (1985); 314: 544-546。キメラ抗体は、異なった部分が異なった動物種から得られる抗体である。

10

20

30

40

50

## 【0064】

抗体について言う場合に、用語「特異的に結合する」又は「特異的に免疫反応する」は、タンパク質及び他の生物物質の異種集団におけるタンパク質の存在の決定因子である結合反応を意味する。従って、所定の免疫アッセイ条件下では、特定の抗体は、バックグラウンドの少なくとも約2倍で特定のタンパク質に結合し、試料中に存在する他のタンパク質にかなりの量では実質的に結合しない。典型的に、特異的な又は選択的な反応は、バックグラウンドシグナル又はノイズの少なくとも約2倍、より典型的は、バックグラウンドシグナルの約10～約100倍超であろう。かかる条件下での抗体への特異的結合は、特定のタンパク質に対する特異性について選択される抗体を必要とすることがある。

## 【0065】

「結合アフィニティ」又は「アフィニティ結合」は、分子（例えば、抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原又は抗原性エピトープ）との非共有結合的相互作用の総強度を意味する。分子XのそのパートナーYへのアフィニティは、解離定数（Kd）によって示される。これは、当業者に公知の方法、例えば、BIAcore Inc., Piscataway, NJから商業的に入手可能なBIAcoreバイオセンサーを用いて、一般的に決定され得る。本発明の抗体はまた、 $\alpha$ -アミロイド、A $\beta$ \*56、NMDA受容体、及び/又はNMDA受容体と $\alpha$ -アミロイドとの複合体の結合アフィニティの点から記載できる。

## 【0066】

本発明の抗体は、当業者に公知の任意の好適な方法によって特異的結合についてアッセイされ得る。使用できる免疫アッセイは、技術、例えば、2～3例を挙げると、BIAcore分析、FACS（蛍光活性化セルソーター）分析、免疫蛍光、免疫細胞化学、ウェスタンブロット、放射免疫アッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着剤アッセイ）、「サンドウィッチ」型免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル内沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集gアッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量測定、蛍光免疫アッセイ、プロテインA免疫アッセイ、を用いる競争的及び非-競争的アッセイ系を含むが、これらに限定されない。かかるアッセイは、ルーチンであり、当業者によく知られている（例えば、Ausubel他著、Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., N. Y. (1994) 参照）。

## 【0067】

本発明は、本発明の抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞株、形質転換されたB-細胞株、宿主細胞及び子孫、その誘導体又は等価物を含む。本発明はまた、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチド、又はその抗原-結合フラグメントを含む。

## 【0068】

様々な送達系が知られ、本発明の薬剤、抗体又は医薬組成物を投与するために使用できる。注入の方法は、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下的、鼻腔内、硬膜外及び経口経路を含むがこれらに限定されない。化合物又は組成物は、任意の簡便な経路、例えば、注入又はポラス注射によって、上皮又は粘膜皮膚の裏張り（口腔粘膜、直腸及び腸粘膜等）による吸収によって投与することができ、他の生物活性剤と共に投与することができる。投与は、全身性でも又は局所的でもよい。ある実施態様では、治療の必要な部位に局所的に本発明の医薬化合物又は組成物を投与することが望ましい；このことは、例えば、手術中の局所的注入によって、手術後の創傷包帯と合わせて局所適用によって、注射によって、カテーテルの手段によって、座薬の手段によって、又はインプラントの手段によって行うことができる。他の実施態様では、化合物又は組成物は、小胞、例えばリポソーム中で送達できる。更に他の実施態様では、化合物又は組成物は、制御された放出系で送達できる。ある実施態様では、ポンプが使用できる。他の実施態様では、ポリマー性材料が使用できる。

## 【0069】

本発明はまた、医薬組成物を提供する。かかる組成物は、本発明の化合物の治療上有効量、及び薬学的に許容される担体を含む。ある実施態様では、用語「薬学的に許容される」は、米国の管理機関によって承認された、又は動物、より具体的にはヒトでの使用のた

10

20

30

40

50

めに米国局方もしくは他の一般的に承認された国際的局方に記載されたことを意味する。用語「担体」は、一緒に治療薬と投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒクルを意味する。かかる薬学的担体は、殺菌済の液体、例えば水及び油、石油、動物、野菜又は合成起源の油、例えばピーナツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等であり。ある実施態様では、水は、医薬組成物が静脈的に投与されるときに担体として使用できる。生理食塩水並びに水溶性グルコース及びグリセロール溶液も液状担体、特に注射可能な溶液として使用できる。好適な薬学的賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等を含む。組成物はまた、必要であれば、少量の湿潤剤又は乳化剤、あるいはpH緩衝剤を含む。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、エマルション、錠剤、ピル剤、カプセル剤、粉剤、徐放調製物等の形態を取り得る。組成物は、典型的な結合剤及び担体、例えばトリグリセリドによって、座薬として調合できる。経口調合物は、標準的な担体、例えば、医薬用の、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、又は炭酸マグネシウムを含むことができる。好適な医薬担体の例は、Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martinに記載されている。かかる組成物は、患者に正確な投与用の形態を提供するために、好適な量の担体と共に、化合物の治療上有効量を、好ましくは精製された形態で含むだろう。当該調合剤は投与形式に適合しなければならない。

10

20

30

40

50

#### 【0070】

他の実施態様では、組成物は、対象への静脈内投与に適した医薬組成物としてルーチンの方法に従って調合される。典型的には、静脈投与用の組成物は、殺菌済みの等張緩衝液中での液剤である。必要であれば、組成物はまた、注射部位での痛みを緩和するために、溶解剤及び局所麻酔、例えばリグノカインを含むことができる。一般的に、成分は、密封された容器、例えば、活性剤の量を表示するアンプル又はサシェ内に、単位投薬形態、例えば、凍結乾燥粉末又は水を含まない濃縮物で、別個に又は一緒に混合するかのいずれかで供給される。組成物が注入によって投与される場合には、殺菌済みの医薬用の水又は生理食塩水を含む注入ボトルで調合できる。組成物が注射によって投与される場合には、注射用殺菌水又は生理食塩水のアンプルは、成分が投与前に混合され得るように提供できる。

#### 【0071】

本発明の薬剤及び/又は抗体は、単独で、あるいは他の化合物又は組成物と組み合わせて使用できる。本発明の薬剤及び/又は抗体は、*in vitro*及び*in vivo*の診断法及び治療法において使用できる。本発明はまた、かかる*in vitro*及び*in vivo*の診断法及び治療法を含む。

#### 【0072】

薬剤又は抗体は、様々な手段のいずれかによって投与できる。例えば、経口的、皮下の、筋肉内、静脈内、鞘内、及び/又は頭蓋内に送達される。送達は、局所送達又は注射でよい。送達は、ポンプ型組成物又は長期間放出組成物でよい。薬剤又は抗体は、別の治療剤の送達の前に、送達中に及び/又は送達後に投与できる。1以上の薬剤が投与できる。

#### 【0073】

本発明はまた、本発明の薬剤及び/又は抗体を含むキットを提供する。キットは、本発明の1以上の薬剤及び/又は抗体を入れた1以上の容器を含むことができる。更に、キットは、他の試薬、例えば緩衝剤を含んでもよく、本発明を実施するために必要とされる溶液も含まれる。場合により、かかる容器(複数)は、注意書又は印刷された教示を含むことができる。本明細書で使用される用語「パッケージ材料」は、キットの内容物を収めるために用いられる1以上の物理的構造を意味する。パッケージ材料は、好ましくは殺菌済みの汚染のない環境を提供するために、周知の方法によって構築される。本明細書で使用される用語「パッケージ」は、所定の限度内でポリペプチドを保持できる固体のマトリックス又は材料、例えば、ガラス、プラスチック、紙、フォイル等を意味する。従って、例え

ば、パッケージは、抗体のミリグラム量を含むために使用されるガラスバイアルでよい。

【0074】

本発明はまた、本明細書に記載のスクリーニング法及び薬剤の投与を含む治療法によって特定される薬剤を含む。かかる薬剤は、アルツハイマー病を含むがこれに限定されない神経変性疾患及び/又は認知障害の治療のために対象に投与できる。好適な薬剤は、様々な分子の任意を含む。用語「薬剤」は、任意の物質、分子、要素、化合物、構成要素、又はそれらの組合せを含む。それは、例えば、ポリペプチド、オリゴペプチド、小有機分子、多糖、ポリヌクレオチド、アンチセンス分子、リボザイム、抗体等を含むが、これらに限定されない。それは、天然物、合成物もしくは化学化合物、又は2以上の物質の組合せでよい。他に特定しない限り、用語「薬剤」、「物質」及び「化合物」は交換して使用できる。

10

【0075】

本明細書で用いる「治療すること」又は「治療」は、治療的処置及び予防的処置を含む。治療の所望の効果は、疾患の発症又は再発の予防、症候の緩和、疾患の任意の直接的又は間接的な病的結果の軽減、疾患の進行率の減少、疾患状態の緩和又は軽減、及び回復又は改善された予後を含む。

【0076】

本発明は、 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体とNMDA受容体との、単離された複合体を含む。好ましい実施態様では、単離された複合体は、NMDA受容体とA $\beta$ 56との複合体である。単離された複合体は、天然起源から単離しても、又は合成的に調製してもよく、例えば、単離された $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体、例えばA $\beta$ 56と、1以上のNMDA受容体もしくは1以上のNMDA受容体サブユニットとの複合体、のインキュベーションによって得られる。かかる複合体は、例えば、 $\beta$ -アミロイドとNMDA受容体との共沈を検出する方法、及びNMDA受容体機能に対する $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体のアンタゴニスト効果を変える薬剤を検出する方法を含むが、これらに限定されない、様々なアッセイのいずれかにおいて、陽性対照として有用である。本発明はまた、 $\beta$ -アミロイドの溶解性集合体とNMDA受容体との単離された複合体の組成物を含む。

20

【0077】

$\beta$ -アミロイドタンパク質の溶解性集合体とNMDA受容体との単離された複合体は、動物を免疫するための抗原又はワクチンとして働いて、免疫反応を誘起する。かかる抗原及びワクチンの調製物及び使用は、当該分野でよく知られている。免疫は、アジュバント、例えばフロイント・アジュバントの存在又は非存在下で行われる。追加免疫は、一定の間隔、例えば、2~8週間でもよい。本明細書で使用される「単離された」は、その元の環境（例えば、天然の場合には、天然環境）から除かれた物質を意味し、従って、その天然状態から「人の手によって」変更される。

30

【0078】

WO 2004/031400 (" $\beta$ -アミロイド-由来拡散性リガンド(ADDLS)、ADDL-代替物、ADDL-結合分子、及びその使用")、及びLacor他, Neurobiology of Disease 23(45): 101991-10200, 2004 (" $\beta$ -アミロイドオリゴマーによるシナプスターゲティング")に記載の任意の方法が本発明で使用できる。

40

【0079】

本発明は、以下の実施例によって例証される。当然のことながら、特定の実施例、材料、量及び手段は、本明細書に記載の本発明の範囲及び趣旨に従って広く解釈されるべきである。表題の全ては、読み手の便宜のためであり、特に断らない限り、表題に従う明細書の意味を限定するために使用してはならない。

【実施例】

【0080】

実施例 1 A $\beta$ 56はNMDA受容体アンタゴニストである

$\beta$ -アミロイド(A $\beta$ )タンパク質は、アルツハイマー病(AD)に集積するが、それが認知機能を混乱させるメカニズムは不明である。本実施例は、A $\beta$ 56(A $\beta$ スター56)、す

50

なわちA<sub>β</sub>分子の56-kD複合体は、Tg2576及びAD脳内のNMDA受容体のNR1及びNR2Aサブユニットに特異的に結合する。精製されたA<sub>β</sub>\*56は、NMDA-介在自発的回路を増大し、培養されたニューロン内のNMDA誘発電流を阻害する。これらの結果から、A<sub>β</sub>\*56がNMDA受容体アンタゴニストであると結論できる。NMDA受容体は長く続くシナプス可塑性及び記憶の重要なモジュレーターであるので、データは、A<sub>β</sub>がADに関連する認知機能を損なうかもしれないという新しいメカニズムを明確にする。

#### 【0081】

合成溶解性A<sub>β</sub>オリゴマー及び培養細胞から分泌されたA<sub>β</sub>オリゴマーの効果は、神経持続の破壊 (Lambert他, Proc Natl Acad Sci USA 95, 6448 (1998); Kaye他, Science 300, 486 (2003))、長期間のシナプス可塑性の阻害 (Wang他, Brain Res 924, 133 (2002); Walsh他, Nature 416, 535 (2002); 及びWang他, J Neurosci 24, 3370 (2004))、及び行動破壊 (Cleary他, Nat Neurosci 8, 79 (2005))、並びにシナプス前初期遺伝子Arcのアップ-レギュレーション (Lacor他, J Neurosci 24, 10191 (2004))、及びNMDA受容体のエンドサイトーシス (Snyder他, Nature Neuroscience 8, 1051 (2005))を含む。しかしながら、*in vivo*で生じた内因性溶解性A<sub>β</sub>タンパク質集合体の効果は、最近、報告されているにすぎない (WO 2006/047254)。内因性A<sub>β</sub>集合体、すなわちA<sub>β</sub>\*56は、Tg2576マウスの空間的記憶と強く相関し、神経欠損又はアミロイドブラーク堆積の非存在下で、ラットの認知機能を損なう (WO 2006/047254)。グルタミン酸受容体は、シナプス可塑性及び記憶における重要な要素であり (Collingridge, Nature 330, 604 (1987); Malinow他, Annu Rev Neurosci 25, 103 (2002); 及びDudai, "Memory from A to Z: Keywords, Concepts and Beyond" (Oxford University Press, Oxford, 2002))、Arc及び記憶の連結のために重要な他のシナプス遺伝子のダウン-レギュレーションは、Tg2576及び他のAPPトランスジェニックマウスにおいて起こるので (Dickey他, J Neurosci 23, 5219 (2003); Palop他, Proc Natl Acad Sci USA 100, 9572 (2003))、本実施例では、A<sub>β</sub>\*56がグルタミン酸受容体と直接相互作用することによって記憶を損なうという可能性を試験した。

#### 【0082】

##### 材料及び方法

トランスジェニック動物。Tg2576マウス (Hsiao他, Science 274, 99-102 (1996)) は、B6SJLF1ブリーダーに成功的に戻し交配されたマウスの子孫であった。

#### 【0083】

ヒト脳組織。大脳皮質の冷凍標本は、3人のアルツハイマー病患者、突発性アルツハイマー病センター (Chicago, IL) 由来の2人の認知インタクト対照患者、及びRegions病院のアルツハイマー治療及び研究センター (St. Paul, MN) 由来の1人のアルツハイマー患者から得た。

#### 【0084】

培養されたニューロン。P1スピローグ・ドーリーの子ラット由来の大脳皮質の培養物を先に公表されたプロトコール (Dubinsky, J Neurosci 13, 623-631 (1993)) に従って調製した。皮質被着物を解体して、髄膜、海馬、中隔部位及び基底核を除いた。10% NuSerum (Life Technologies, Grand Island NY)、27ミリモラー (mM) グルコース、50 単位/ミリリットル (U/ml) ペニシリン、及び50 マイクログラム/ミリリットル (µg/ml) ストレプトマイシンを補充したグルタミン無しの最小必須培地で、Themanoxプラスチック製カバースリップ (Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA) 上に予め播いた皮質星状膠フィーター層 (Dubinsky, J Neurosci 13, 623-631 (1993)) 上に、皮質ニューロンを約50,000~100,000/平方センチメートル (cm<sup>2</sup>) の密度で播き、5% CO<sub>2</sub>、37 °Cで維持した。シナプス網が十分に発達するとき *in vitro*で、培養物を12~16日間使用した (Dichter, Brain Res 149, 279-293 (1978))。

#### 【0085】

抗体。以下の一次抗体を使用した：それぞれ、A<sub>β</sub>1-17及びA<sub>β</sub>17-25に対する6E10及び4G8 [1:100~10,000] (Signet Laboratories, USA)、APP C-末端に対するAPPCter-C17 [1:5000] (Sergeant他, J. Neurochem 81(4): 663-72 (2002))、PSD95、NR1、NR2サブユニッ

ト (A~D)、GluRに対する抗体 [1:200] (SantaCruz Biotechnologies Inc, USA)。

【0086】

タンパク質抽出。溶解性の細胞外-濃縮分画は、50ミリモラー (mM) Tris-HCl (pH 7.6)、0.01% NP-40、150 mM NaCl、2 mM EDTA、0.1% SDS、1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、及びプロテアーゼインヒビターカクテル (Sigma) を含む溶液の500マイクロリットル ( $\mu$ l) で採取された半前脳から作製した。溶解性の細胞外濃縮タンパク質は、3,000 rpmで5分間遠心後に、機械的にホモジナイズされた溶解物から回収した (1ミリリットル (ml) シリンジ、ゲージ20ニードル (10反復))。膜-濃縮分画は、50mM Tris-HCl (pH 7.6)、0.1% NP-40、150 mM NaCl、2 mM EDTA、0.1% SDS、1 mM PMSF、2 mM 1,10-PTH及びプロテアーゼインヒビターカクテル (Sigma) を含む溶液の500マイクロリットル ( $\mu$ l) で採取された半前脳から作製した。溶解物は、機械的にホモジナイズし (1 ml シリンジ及びニードル、ゲージ20ニードル (10反復))、13,000 rpmで90分間遠心した。膜関連タンパク質は、13,000 rpmで90分間遠心後、500  $\mu$ lの緩衝剤 (50 mM Tris-HCl [pH 7.4]、150 mM NaCl、0.5% Triton X-100、1 mM EGTA、3% SDS、1% デオキシコール酸塩、1 mM PMSF) で再-懸濁したペレットから作製した。

10

【0087】

上清は全て、ウェスタンブロット分析の前に、13,000 rpmで90分間遠心することによって浄化した。タンパク質量を決定した (BCA Protein Assay, Pierce)。ウェスタンブロット及び免疫沈降は、WO 2006/047254に記載のようにして行った。

【0088】

免疫アフィニティクロマトグラフィー。RIPA緩衝剤を用いる組織溶解及び4、13,000 rpmで90分間の遠心後に残るTg2576脳タンパク質は、精製抗体 (6E10又は4G8) の200マイクログラム ( $\mu$ g) を詰めたアフィニティカラムで、終夜、インキュベートした。カラムは、製造者の教示に従って、Seize (商標) 一次免疫沈降キット (Pierce) を用いて作製した。

20

【0089】

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)。免疫アフィニティ精製タンパク質抽出物をTricorn Superdex (登録商標) 75カラム (Amersham Life Sciences, Piscataway, NJ) に充填し、約0.3ミリリットル/分 (ml/分) の流速で実行した。50 mM 酢酸アンモニウム、pH 8.5での500  $\mu$ lの溶出物分画を神経生理学実験において1:100又は1:750に希釈し、又は真空装置 (VacuFugeTM, Brinkmann-Eppendorf) を用いて濃縮し、銀染色によって分析した。

30

【0090】

銀染色。SEC分画及びSDSポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) に従って、ゲルを銀染色に供し、試料の純度を調節した。感度の目的で、好適なプロトコール付のSilverXpress (登録商標) 銀染色キット (Invitrogen (商標) Life Technologies, USA) を用いて、好適なプロトコールによりタンパク質を染色した。全ての洗浄ステップは、4回繰り返し、ゲルは15分間、展開溶液でインキュベートした。

【0091】

カルシウム画像。神経培養物は、 $Ca^{2+}$ -インジケーター色素Fluo-4 AM (31  $\mu$ g/ml) 及びプルロニック酸 (2.6 mg/ml) で室温で30分間インキュベートした。カルシウムインジケーター色素蛍光を488 ナノメートル (nm) 励起、500 nmのロングパスバリアフィルター及び共焦点顕微鏡 (Odyssey scanner, Noran, Middleton, WI) でモニターした。培養物は、空気で平衡化したHEPES-緩衝生理食塩水 (pH 7.4) で灌流した。この灌流物にリシンは添加しなかった。神経 $Ca^{2+}$ 反応を定量化するために、 $Ca^{2+}$ 蛍光は、単一ニューロン又はニューロン群から測定した。ベースライン蛍光は1つに標準化し、曲線とベースラインとの間の面積は、Originソフトウェア分析ルーチン (OriginLab Corporation, Northampton, MA) を用いて計算した。

40

【0092】

全細胞パッチ記録。神経培養物は、10  $\mu$ Mグリシン及び200 ナノモラー (nM) テトラ

50

ドトキシンで補充したHEPES-緩衝生理食塩水で灌流した。個々のニューロンは、50  $\mu$ M NMDA及び10  $\mu$ Mグリシンの局所的放出によって刺激した。細胞はクランプされた全細胞電圧であり、-35 mVの維持電圧で記録されたNMDA-誘起内部電流であった。HEPES-緩衝生理食塩水は、135.5 mM NaCl, 3.0 mM KCl; 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>; 1.0 mM MgSO<sub>4</sub>; 0.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 15.0 mM D-グルコース; 10 mM HEPES; pH 7.4を含んだ。細胞内ピペット溶液は、5.0 mM Na-メタンスルホン酸塩; 128.0 mM K-メタンスルホン酸塩; 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>; 5.0 mM K-EGTA; 1.0 mM グルタチオン; 2.0 mM MgATP; 0.2 mM NaGTP; 5.0 mM HEPES; pH 7.4を含んだ。

#### 【0093】

##### 結果及び考察

Tg2576マウスでは、A\*56は、溶解性で、脳の細胞外-過剰タンパク質分画に見られる (WO 2006/047254)。A\*56が受容体リガンドであるという仮説を試験するために、膜-過剰分画を (A 1-16に対する) 6E10モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティングにより試験した。分子量がA\*56に相当する免疫反応バンド、並びに完全長APP及びその誘導体CTF-、及びモノマーA に対応する予測されるバンドを見出した (図1A)。重要なことに、A\*56は溶解性の細胞外過剰タンパク質分画におけるA オリゴマーの種類の1つであるが、A\*56は、少ないフィルム露光時間の後に検出されるA 種にすぎなかった。これは、細胞膜と関連する主要A 種であることを示す。56キロダルトン (kD) バンドがAPPの分解産物であるという可能性は、22C11 (APPのN-末端領域に対する) 及びAPP17Cter (APPのC-末端領域に対する) が56-kD種に結合できなかったという証明によって

#### 【0094】

次に、交差-免疫沈降は、イオンチャネル型グルタミン酸受容体サブユニット及び膜-過剰Tg2576脳抽出物中のA に対して行った。タンパク質が、NMDA受容体サブユニットNR1、A\*56に対する抗体で捕獲される場合には、他のA 種は、6E10 (図1B) 抗体でも4G8抗体でも検出されなかった。A\*56は、同量のA\*56を含む溶解性の細胞外-過剰抽出物中のNR1抗体によって免疫沈降されなかった (図1A及び1B)。これは、NR1免疫沈降後のNR1免疫反応性が、期待されたように、膜-過剰抽出物中にのみ存在したためである (図1B)。A\*56は、9ヶ月及び24ヶ月内にNR1抗体で沈降したが、2月齢Tg2576脳抽出物は沈降しなかった (図1B)。このことは、通常の空間的記憶を示す6月齢未満のマウスにおけるA\*56の非存在と一致する (WO 2006/047254)。NR2A抗体もまたA\*56を免疫沈降し、A\*56の免疫沈降の点では、NR2B抗体よりかなり効率的であった。(A 17-24に対する) 4G8抗体は、NR1、NR2Aを免疫沈降したが、NR2B、膜-過剰Tg2576脳抽出物由来の受容体サブユニットを免疫沈降しなかった (図1C)、このことは、NR1、NR2A及びNR2B抗体を用いる免疫沈降実験を確認した。タンパク質がAMPA受容体サブユニット、GluR1及びGluR2に対する抗体により捕獲されるときに、A\*56も任意の他のA オリゴマーも免疫沈降しなかった (図4A~4B)。このことは、A\*56がAMPA受容体に結合しないことを示す。

#### 【0095】

ADに罹患した患者及び痴呆でない対照個体由来の脳組織における、A 集合体とイオンチャネル型グルタミン酸受容体との相互作用を試験した。NR1、NR2A、及びかなり程度は低いNR2B抗体は、アルツハイマー病に罹患した4人全ての患者由来の脳組織試料においてA\*56と共移動する56-kDの6E10免疫反応タンパク質を免疫沈降したが、認知障害のない (NCI) 対照個体由来の2つの試料ではいずれも免疫沈降しなかった (図2A及び2B)。NR2Aサブユニットの等しくないレベルは、ローディング試料における不一致に起因するものではなく (図5)、脳試料における現実の受容体サブユニットレベルを反映した。これらのデータは、A\*56又はA\*56-様分子がアルツハイマー病において選択的にNMDA受容体に結合することを示している。

#### 【0096】

溶解性A オリゴマーは、7-ニコチンアセチルコリン (nACh) 受容体に結合し (Dineley他, J Neurosci 21, 4125 (2001))、それによって、NMDA受容体の増加したエンドサイ

トーシスを介在する、と仮定されてきた。そこで、A \*56が 7-nACh受容体に結合するかどうかを試験した。A \*56は、抗-7-nACh受容体抗体を用いて、膜-過剰Tg2576脳抽出物からは免疫沈降しなかった(図2C)。当該受容体は、A \*56の非存在についての可能な説明として受容体を免疫沈降できなかったことを除いて、免疫沈降された物質中で7-nACh受容体抗体で検出した。データは、A \*56がヒト又はTg2576脳組織における7-nACh受容体に結合しないことを示す。

#### 【0097】

A \*56とNMDA受容体との物理的相互作用が機能的に関連するか否かを確認するために、Tg2576脳から精製されたA \*56を一次培養ニューロンに適用し、ニューロン細胞内カルシウムイオン( $Ca^{2+}$ )及びNMDA誘起電流の変化を測定した。A \*56は免疫アフィニティークロマトグラフィーで精製し、次いでサイズ排除クロマトグラフィーで精製し、銀-染色ゲル上で単一バンドとして移動するA \*56の調製物を得た(図6A及び6B)。細胞間 $Ca^{2+}$ の変化をA \*56の外部適用に対する反応における一次培養ニューロンでモニターし、共焦点顕微鏡を用いて100秒間に渡って $Ca^{2+}$ インジケーター色素蛍光によって、 $Ca^{2+}$ 濃度を定量した。7~8.5 nM A \*56の添加は、静止 $Ca^{2+}$ シグナルの約3倍の上昇( $2.95 \pm 1.83$ 、5つの細胞培養物由来の $n = 26$ 細胞集団)をもたらした(図3A及び図3B)。これは、競争的NMDA受容体アンタゴニストである、(+/-)-3-(2-カルボキシピペラジン-4-イル)-プロピル-1-リン酸(CPP)がA \*56と同時適用された時に、完全に除かれた(図3B)。対照的に、群I/群IIのmGluRアンタゴニストである(RS)- $\alpha$ -エチル-4-カルボキシフェニルグリシン(E4CPG)は、A \*56によって誘発された $Ca^{2+}$ の増加を妨害できなかった(図3B)。単一細胞測定において、A \*56は、数秒間で急激な $Ca^{2+}$ 増加を誘導し、25分よりも長く上記のベースラインに十分に留まった(図3C)。 $Ca^{2+}$ の増加は、培養ディッシュからA \*56を洗浄した後の少なくとも10分間に上昇し続けた。これらの結果は、A \*56が数秒間にNMDA受容体に作用して培養物中のニューロン網の回路活動を増加することを示し、A \*56-NMDA受容体複合体が最初の曝露の後の比較的長時間(すなわち、すくなくとも25分間)に神経膜で機能的に活性であり続けることを示唆している。ニューロン網の増加した電気的活性は、2つの方法で説明できる:A \*56は、NMDA受容体を発現するニューロンを脱分極し、次に連結されたニューロンのシナプス活性化をもたらす、NMDA受容体アゴニストでよい;あるいは、A \*56は、ネットワークにおけるNMDA受容体アンタゴニストでよい。そのネットワークでは、阻害介在ニューロンは、NMDA受容体を発現するニューロンによって活性化され、その阻害は、ネットワーク活性の全体的な増加をもたらす。

#### 【0098】

NMDA-誘起電流に対するA \*56の効果を直接試験するために、全細胞パッチクランプ記録は、培養されたニューロンで行った(図3D)。1nM A \*56の添加は、A \*56の曝露の5分以内に、NMDA-誘起電流を対照の値の $70 \pm 8\%$ に顕著に減少させ( $n = 15$ 、 $p < 0.005$ )、一方、ピヒクルのみの適用は、NMDA-誘起電流を変更しなかった(対照の $106 \pm 7\%$ 、 $n = 7$ )。これらの結果は、A \*56が試験された濃度(1 nM)でのNMDA受容体アンタゴニストであることを示す。これは、ヒト脳脊髄液中の標準的な酵素-関連免疫吸着剤アッセイによって測定されたA \*56濃度である(Walsh他, Nature 416, 535 (2002))。A \*56がNMDA受容体機能を阻害できたいくつかの可能なメカニズムが存在する。それは、競争的NMDA受容体アンタゴニストであり得た。それは、NMDA受容体エンドサイトーシスを誘導することができたが、7-nACh受容体を介してではないだろうが(Snyder他, Nature Neuroscience 8, 1051 (2005))、グリシンによるNMDA受容体エンドサイトーシスのプライミングを模倣することによって可能となる(Nong他, Nature 422, 302 (2003))。あるいは、これらの活性の組合せによって作用することができた。A \*56がNMDA受容体機能を拮抗するメカニズムを明らかにするのは将来の研究において重要であろう。

#### 【0099】

A \*56は、認識機能に与えるその崩壊効果が記載されている唯一のA \*56タンパク質複合体である(WO 2006/047254)。Tg2576及びADにおけるシナプスNMDA受容体へのA \*56の結合、及び生理的なナノモラー濃度でのNMDA受容体アンタゴニストとしてのその同定は、

10

20

30

40

50

脳内で薬物のように機能することを示唆する。A \*56は、長期間に渡るシナプス可塑性の重要なメディエーター (Collingridge, Nature 330, 604 (1987); Collingridge他, Nat Rev Neurosci 5, 952 (2004); 及びBliss and Collingridge, Nature 361, 31 (1993))、及び記憶の重要なメディエーター (Dudai, "Memory from A to Z: Keywords, Concepts and Beyond" (Oxford University Press, Oxford, 2002); Morris他, Nature 319, 774 (1986)) である、NMDA受容体の本質的な生理的機能を変えることによって記憶及び認識機能を崩壊すると提案されている。Tg2576及び他のAPPトランスジェニックマウスにおける予め存在する記憶障害の可逆性 (Kotilinek他, J Neurosci 22, 6331 (2002); Dodart他, Nat Neurosci 5, 452 (2002))、及び通常のラットにおけるA \*56によって誘導される認識崩壊の一時性 (Cleary他, Nat Neurosci 8, 79 (2005)) は、A \*56の薬理的性質と一致する。Tg2576及び他のAPPトランスジェニックマウスにおける長期間に渡るシナプス可塑性のために重要な遺伝子の選択的ダウン-レギュレーション (Dickey他, J Neurosci 23, 5219 (2003); Palop他, Proc Natl Acad Sci USA 100, 9572 (2003)) は、A \*56のNMDA受容体アンタゴニスト特性の結果かもしれない。本実施例は、A が不可逆的な構造的変性よりも可逆的な神経障害を引き起こすメカニズムを定義する。A \*56とNMDA受容体との間の相互作用を目的とした薬物で可逆的神経障害を標的することは、ADの危険にある人において痴呆を予防し、アルツハイマー病の初期のステージにおける脳機能を回復させることができる。

10

【0100】

実施例 2

20

A に対する抗体は、NMDA-誘起電流のA \*-介在阻害をブロックする

抗-A \*モノクローナルが最初から折り畳まれたA \*56を特異的に認識し、線維性又はモノマー型A と結合しない、ことを確実にする方法を用いて、抗-A クローンの候補は包括的に選別されるだろう。ドットプロット法、次いで確証的な液相免疫沈降及びイムノプロットング実験は、この目的のために使用できる。直接的な液相ELISA法も使用できる。ドットプロット法は、その迅速なスループット及び好適なクローンの検出を妨害する立体障害の最小の可能性によって有利である。ELISA法は、最初から折り畳まれたA \*56を直接検出するその能力によって有用である。

【0101】

A \*56を特異的に検出する抗体のモノクローナル候補を選別するために様々な方法が使用できる。ドットプロットアッセイでは、A \*56、合成モノマーA (1-42)、溶解性A (1-42)オリゴマー及び線維性A (1-42)は、ニトロセルロース又はナイロンフィルター上に公知の濃度でスポットできる。フィルターは、モノクローナル候補で被覆できる。A \*56を低濃度で選択的に染色するクローンを選択できる。ドットプロットアッセイの確認試験であるウェスタンブロットアッセイでは、A \*56、合成モノマーA (1-42)、溶解性A (1-42)オリゴマー及び線維性A (1-42)は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってサイズ分画され、ニトロセルロース又はナイロンフィルターに転写され得る。フィルターは、モノクローナル候補で被覆できる。A \*56を選択的に染色するが、他のA の形態を染色しないクローンが選択できる。液相ELISA法では、モノクローナル抗-A 抗体6E10又は4G8は、プラスチックプレートのウェルに固定され、A \*56で被覆され得る。モノクローナル候補は、ウェルに適用できる。A \*56に結合するクローンは、蛍光マーカーに複合化されたヤギ抗-マウス抗体を用いて検出できる。

30

40

【0102】

抗-A \*モノクローナルを作製するために、6月齢より大きいTg2576マウス、AD患者もしくはダウン症患者の脳由来の精製A \*56、又は約56 kDaの種を含む合成A オリゴマーで、マウスを免疫する。A \*56は、銀染色ゲル上に単一のバンドを有するように、免疫アフィニティクロマトグラフィーで、次いでサイズ排除クロマトグラフィーで精製できる。A \*56を精製するために、ほとんどの球形タンパク質を変性する8 M尿素中のA \*56の安定性を利用する生物化学的方法も使用できる。

【0103】

50

精製された免疫源が生物的に活性であることを決定するために、免疫源として注入する前に、培養されたニューロン中のNMDA-誘起電流を阻害する能力をアッセイできる。しかしながら、それは必須のステップではない。これらの方法は、特に、多重化タンパク質が、B-細胞上で免疫グロブリンと架橋するために、モノマー型タンパク質よりも優れた免疫源である傾向があるので、A \*56に対する特異的抗体の作製を成功的にもたらずと期待される。

#### 【0104】

ヒト脳（AD患者由来）及びマウス脳（Tg2576マウス由来）のA \*56は、構造が微妙に異なる可能性がある。そのため、ヒトAD脳及びTg2576マウス脳組織から精製された最初から折り畳まれたA \*56は、モノクローナルを選別するために使用できる。結果は、AD-A \*56、Tg2576-A \*56、AD-A \*56及びTg2576-A \*56の特異的認識を示すか、又はいずれのタンパク質複合体も認識しないことを示す、2つずつのクローンのリストを生じるだろう。このリストは、ヒトでの使用のための最も好適な抗-A \*モノクローナルを選択するために役立つだろう。

10

#### 【0105】

培養されたラット皮膚ニューロン及びヒト神経細胞株におけるNMDA-誘起電流のA \*-介在阻害をブロックする、A \*-モノクローナルの能力の評価。培養された皮膚ニューロンにおけるNMDA-誘起電流に対するTg2576-A \*56又はAD-A \*56の阻害効果をブロックする抗-A \*モノクローナルの能力の確認は、NMDA-誘起電流に対するTg2576-A \*56の効果を評価する、実施例1に記載の方法を用いて達成できる。これらの実験は、抗-A \*モノクローナルは、Tg2576-A \*56又はAD-A \*56と、ラット及びヒトNMDA受容体との相互作用を特異的にブロックする、ことを確実にするだろう。機能的に及び生物化学的に有効であると確認された抗-A \*モノクローナルは、用量-効果曲線を定義するために低濃度での更なるスクリーニングを経ることがある。それは、記憶に対するA \*56の効果、認識機能及びNMDA受容体機能の最も強力なモノクローナル・インヒビターを同定するために役立つだろう。

20

#### 【0106】

##### 実施例 3

##### Ca<sup>2+</sup>蛍光画像法によって決定されたNMDA受容体機能

アッセイは、培養中のニューロンの電気的活性をモニターするためにCa<sup>2+</sup>蛍光画像法を使用するだろう。アッセイは、NMDA受容体への結合におけるA \*56の有効量を決定する。アッセイの利点は、NMDA受容体機能に対するA \*56の効果が迅速かつ容易に決定できることである。

30

#### 【0107】

培養されたニューロン。確立されたプロトコルに従って、子ラット由来の皮膚ニューロンの培養物を調製する。ニューロンは、ガラス製カーブスリップ上にグリア細胞で共培養する。シナプス網が十分に発達し、自発的な電気的活性が生じる、12日～16日の間、in vitroで培養されたニューロンを使用する。

#### 【0108】

カルシウム画像法。カーブスリップ上で培養されたニューロンは、Ca<sup>2+</sup>-インジケータ色素Fluo-4 AM (31 µg/ml) 及びプルロニック酸 (2.6 mg/ml) で、室温で30分間、インキュベートする。カーブスリップは、次いで濯ぎ、空気で平衡化したpH 7.4のHEPE S-緩衝生理食塩水を含むペトリ皿に置く。カルシウムインジケータ色素蛍光は、488 nmの励起、500 nmのロングパスフィルター、及び共焦点顕微鏡又はエピ-蛍光顕微鏡のいずれかを用いてモニターする。

40

#### 【0109】

分析。カルシウム蛍光は、神経活性を定量化するための、単一のニューロン又はニューロン群から測定する。ベースライン蛍光は標準化し、曲線とベースラインとの間の面積は、Originソフトウェア分析ルーチンを用いて計算した。得られた積算Ca<sup>2+</sup>シグナルは、ニューロンの活動の指標として使用する。

50

## 【0110】

A \*56用量-反応相関を決定するための実験的プロトコル。

対照溶液のベースラインニューロンの活動は、Ca<sup>2+</sup>蛍光アッセイを用いて測定されるだろう。溶液中のA \*56の濃度は、徐々に上昇し、ニューロンの活動は、各A \*56濃度で測定されるだろう。ピヒクル対照もまた、ニューロンの活動の変化がA \*56を含む緩衝溶液に起因しないことを確実にするために行われるだろう。

## 【0111】

本明細書に引用された、全ての特許、特許出願、並びに刊行物及び電子的に入手可能な文献（例えば、ヌクレオチド配列の提供、例えばGenBank及びRefSeq、及び例えばSwissProt、PIR、PRF、PDBでのアミノ酸配列の提供、並びにGenBank及びRefSeqでの注釈付のコーディング部位の翻訳）は、参考文献として援用される。先の詳細な説明及び実施例は、理解を明確にするためのみに記載してきた。それから理解される不必要な限定はない。本発明は、示された及び記載された正確な詳細に限定されない。変更がクレームによって定義される発明内に含まれることは、当業者には明らかであろう。

10

## 【0112】

別個のステップを含む本明細書に記載の任意の方法について、ステップは、任意の実行可能な順序で行うことができる。好適には、2以上のステップの組合せが同時に実行できる。

## 【0113】

表題の全ては読者の便宜のためであり、特定しない限り、表題に従うテキストの意味を限定するため使用してはならない。

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【0114】

【図1A】図1Aは、Tg2576脳内の溶解性A \*56がNMDA-受容体サブユニットNR1及びNR2Aと物理的に相互作用することを示す。図1Aは、A \*56が、細胞外-過剰及び膜抽出物に存在することを示す。抗-A (1-16)抗体(6E10)を用いるウェスタンブロット(WB)は、13-月齢のTg2576マウスの溶解性抽出物中の溶解性APP (sAPP)に加えて、複数のA トリマーを示す(左パネル)。膜抽出物では、完全長APP (f1-APP)及びそのBACE-生成CTFフラグメント、CTF- は、A モノマー及びA \*56と共に検出される(右パネル)。Tg2576<sup>-/-</sup>及びTg2576<sup>+/-</sup>は、それぞれ、ゼロ(非-Tg)及び1つの導入遺伝子列を有するマウスを意味する；マウスの年齢(月数)は、対応する遺伝子型の下に太字で示す。合成ヒトA 1-42ペプチド(hA<sub>42</sub>)は、サイズマーカー及び陽性対照として使用した。矢印は、モノマー(1-マー)、ダイマー(2-マー)、トリマー(3-マー)、テトラマー(4-マー)、ヘキサマー(6-マー)、ナノマー(9-マー)及びドデカマー(12-マー)、並びにsAPP及びf1-APPの各々の移動位置を示す。

30

【図1B】図1Bは、Tg2576脳内の溶解性A \*56がNMDA-受容体サブユニットNR1及びNR2Aと物理的に相互作用することを示す。図1Bは、年齢-依存的方法でTg2576マウスにおいてNR1サブユニットに物理的に結合することを示す。NR1特異的抗体を用いるイムノプロテイング(IP)は、潜在的なA \*56-NMDA受容体複合体を捕獲するために使用した。IP後のNR1受容体サブユニットレベルは、ローディング対照として下パネルにタンパク質抽出プロトコルの忠実性を確認するために示す。

40

【図1C】図1Cは、Tg2576脳内の溶解性A \*56がNMDA-受容体サブユニットNR1及びNR2Aと物理的に相互作用することを示す。図1Cは、A \*56-NMDA受容体複合体が抗-A (17-24)抗体(4G8)を用いて免疫捕獲されることを示す。NR2Bの複合体ではなく、NR1及びNR2Aの複合体は容易にブルダウンし、N-ter (N-末端特異的)及びC-ter (C-末端特異的)NMDA受容体抗体によって検出される。

【図2A】図2Aは、ヒト由来のA \*56がNMDA受容体に物理的に結合することを示す。図2Aは、A \*56が、アルツハイマー(AD)患者であるが、認知障害のない(NCI)対照対象由来でない脳組織におけるNR1 NMDA受容体サブユニット、又は脳タンパク質(NP)を含まない抽出物と共免疫沈降することを示す。

50

【図 2 B】図 2 B は、ヒト由来の A \*56 が NMDA 受容体に物理的に結合することを示す。図 2 B は、A \*56 が NR2A と共免疫沈降するが、AD に罹患した対象であるが対照対象 (NCI) 由来でない脳組織における NR2B NMDA 受容体サブユニットとはほとんど免疫沈降しないことを示す。

【図 2 C】図 2 C は、ヒト由来の A \*56 が NMDA 受容体に物理的に結合することを示す。図 2 C は、A \*56 が ニコチン酸アセチルコリン受容体 (7nAChR) と免疫沈降しないことを示す。各プロットの下のパネルは、各々の受容体又は受容体サブユニットを免疫沈降する様々な受容体抗体の能力を確認する。

【図 3 A】図 3 A は、A \*56 は、培養された皮質ニューロンにおけるカルシウムシグナル伝達を増加し、NMDA-誘起電流を阻害することを示す。図 3 A は、ニューロン群から測定したカルシウム蛍光を示す。7 nM A \*56 の添加は、細胞中の  $Ca^{2+}$  シグナル伝達を示す。培養中のニューロン網内の回路活動を起こすことを示している。

【図 3 B】図 3 B は、A \*56 は、培養された皮質ニューロンにおけるカルシウムシグナル伝達を増加し、NMDA-誘起電流を阻害することを示す。図 3 B は、 $Ca^{2+}$  シグナル伝達における A \*56-誘起増加が、NMDA 受容体アンタゴニスト (CPP) によってブロックされ、mGluR アンタゴニスト (E4CPG) によってブロックされないことを示す。カルシウムシグナル伝達は、ビヒクルのみが添加される場合には増加しない。バーは、平均  $\pm$  SD を示す。

【図 3 C】図 3 C は、A \*56 は、培養された皮質ニューロンにおけるカルシウムシグナル伝達を増加し、NMDA-誘起電流を阻害することを示す。図 3 C は、単一ニューロンから測定されたカルシウム蛍光を示す。7 nM A \*56 の添加後の数秒内にカルシウムシグナル伝達は増加し、A \*56 洗浄後の 10 分超間、増加し続けた。

【図 3 D】図 3 D は、A \*56 は、培養された皮質ニューロンにおけるカルシウムシグナル伝達を増加し、NMDA-誘起電流を阻害することを示す。図 3 D は、ニューロンへの 50  $\mu$ M NMDA の局所的放出によって誘起される内部電流が、1 nM A \*56 の添加によって減少することを示す。

【図 4 A】図 4 A は、A \*56 は AMPA 受容体に結合しない。図 4 A は、AMPA 受容体の GluR 1 及び GluR2 サブユニットに対する抗体が、13-月 Tg2576 マウスの脳から生じた溶解性又は膜-過剰分画由来の A \*56 を免疫沈降できなかったことを示す。合成ヒト A 1-42 ペプチド (hA<sub>42</sub>) は、サイズマーカー及び陽性対照として並行して使用した。矢印は、モノマー (1-マー)、ダイマー (2-マー)、トリマー (3-マー)、テトラマー (4-マー)、ヘキサマー (6-マー)、ナノマー (9-マー) 及びドデカマー (12-マー)、並びに完全長 APP (f1-APP) 及び溶解性 APP (sAPP) の各々の移動位置を示す。ウェスタンプロット (WB)、免疫沈降 (IP)、溶解性細胞外-過剰分画 (Sol)、膜-過剰分画 (MB)。

【図 4 B】図 4 B は、A \*56 は AMPA 受容体に結合しない。図 4 B は、GluR1 及び GluR2 AMPA 受容体サブユニットは、A \*56 を検出できないことは、抗体が AMPA 受容体サブユニットを免疫沈降できないことに起因する可能性を除いて、膜-過剰であるが溶解性ではない分画中の GluR1 及び GluR2 抗体によって免疫沈降されることを示す。Tg2576<sup>-/-</sup> 及び Tg2576<sup>+/-</sup> は、それぞれ、ゼロ (非-Tg) 及び 1 つの導入遺伝子列を有するマウスを意味する。合成ヒト A 1-42 ペプチド (hA<sub>42</sub>) は、サイズマーカー及び陽性対照として並行して使用した。矢印は、モノマー (1-マー)、ダイマー (2-マー)、トリマー (3-マー)、テトラマー (4-マー)、ヘキサマー (6-マー)、ナノマー (9-マー) 及びドデカマー (12-マー)、並びに完全長 APP (f1-APP) 及び溶解性 APP (sAPP) の各々の移動位置を示す。ウェスタンプロット (WB)、免疫沈降 (IP)、溶解性細胞外-過剰分画 (Sol)、膜-過剰分画 (MB)。

【図 5】図 5 は、膜過剰分画由来の免疫沈降物中の免疫グロブリン G の類似のレベルは、試料間の一致したローディングを示す図である。Tg2576<sup>+/-</sup> は、1 つの導入遺伝子列を有するマウスを意味する；その年齢 (月数) は、各ゲルの上に示す。矢印は、免疫グロブリン G (IgG) の移動位置を示す。ウェスタンプロット (WB)、免疫沈降 (IP)、アルツハイマー脳 (AD)、認知障害のない (NCI) 対象由来の脳、添加された脳タンパク質なし (NP)、添加された抗体なし (No Ab)。

10

20

30

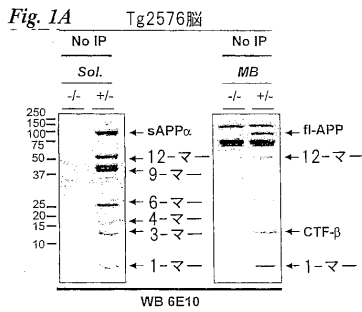
40

50

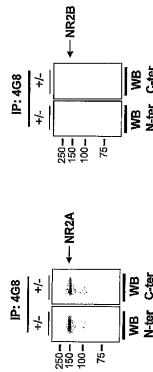
【図 6 A】図 6 A は、精製された A\*56 の調製物を示す図である。図 6 A は、200 μg 6E10 (IPC 6E10-200) 又は 4G8 (IPC 4G8-200) 抗体でパックしたカラム内で免疫アフィニティ精製の後に溶出され、6E10 抗体によってプローブされた、24-月齢マウス由来の Tg2576 脳タンパク質のウェスタンブロット (WB) による図である。A\*56 (ドデカマー) 及び A トリマーに対応する分画から選ばれる銀染色。合成ヒト A<sub>1-42</sub> ペプチド (hA<sub>42</sub>) は、サイズマーカー及び陽性対照として並行して使用した。矢印は、モノマー (1-マー)、ダイマー (2-マー)、トリマー (3-マー)、テトラマー (4-マー)、ヘキサマー (6-マー)、ナノマー (9-マー) 及びドデカマー (12-マー)、並びに APP (完全長形態及び溶解性形態の混合) の各々の移動位置を示す。

【図 6 B】図 6 B は、4G8-パックカラムを用いて、免疫アフィニティ精製された Tg2576 脳タンパク質のサイズ排除クロマトグラフィーによって集めた分画の光学密度 (A595) を示す図である。A\*56 (ドデカマー) 及び A トリマーに対応する分画から選ばれる銀染色。合成ヒト A<sub>1-42</sub> ペプチド (hA<sub>42</sub>) は、サイズマーカー及び陽性対照として並行して使用した。矢印は、モノマー (1-マー)、ダイマー (2-マー)、トリマー (3-マー)、テトラマー (4-マー)、ヘキサマー (6-マー)、ナノマー (9-マー) 及びドデカマー (12-マー)、並びに APP (完全長形態及び溶解性形態の混合) の各々の移動位置を示す。

【図 1 A】



【図 1 C】



【図 1 B】

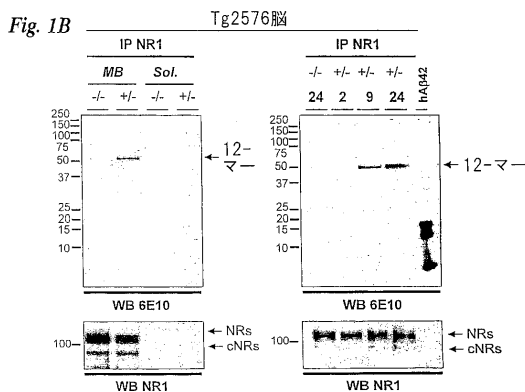
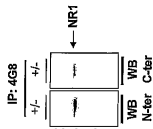
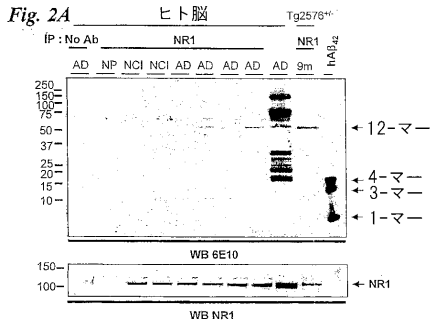


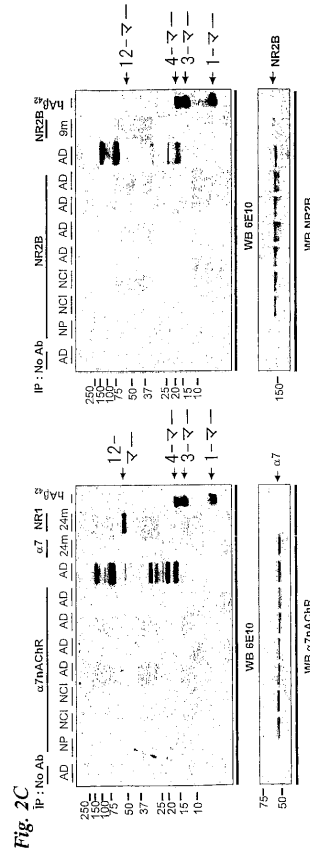
Fig 1C



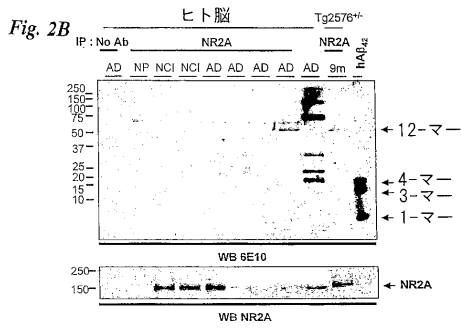
【 図 2 A 】



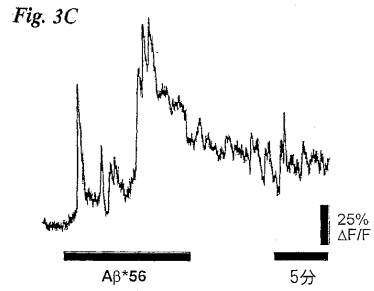
【 図 2 C 】



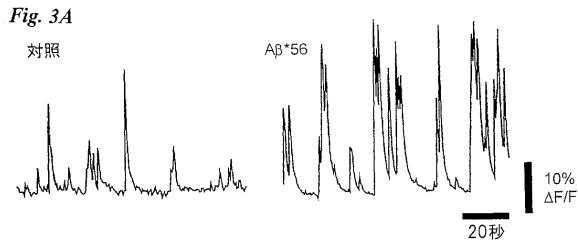
【 図 2 B 】



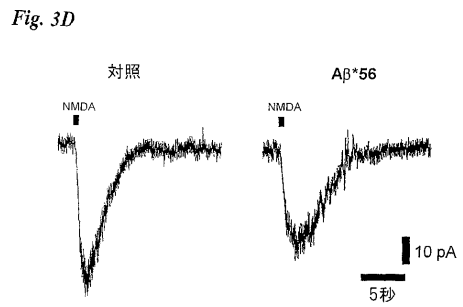
【 図 3 C 】



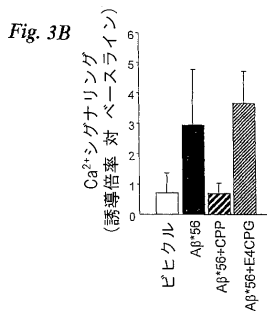
【 図 3 A 】



【 図 3 D 】



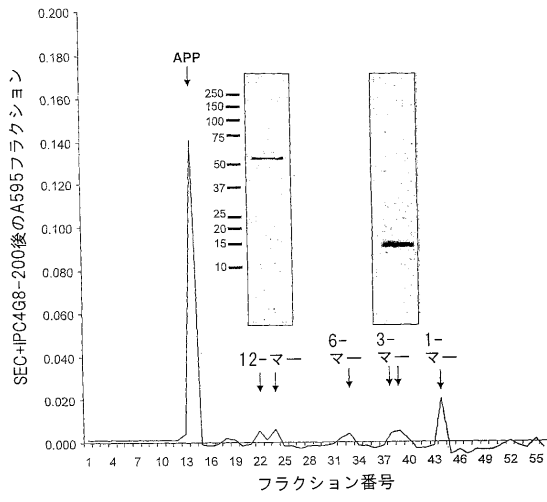
【 図 3 B 】





【 図 6 B 】

Fig. 6B



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2006/029452
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 A61K39/00 A61K31/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CULLEN WILLIAM K ET.AL: "Beta-Amyloid produces a delayed NMDA receptor-dependent reduction in synaptic transmission in rat hippocampus" NEUROREPORT, vol. 8, no. 1, 1996, pages 87-92, XP008071648 ISSN: 0959-4965 abstract figure 3	4,10-14, 16,17
X	US 2003/105152 A1 (INGRAM VERNON M [US] ET AL) 5 June 2003 (2003-06-05) the whole document in particular: abstract example 1 paragraph [0170]	4
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  20 November 2006		Date of mailing of the international search report  13/12/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Tuyman, Antonin

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/029452

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOLNAR ZSOLT ET AL: "Enhancement of NMDA responses by beta-amyloid peptides in the hippocampus in vivo" NEUROREPORT, vol. 15, no. 10, 19 July 2004 (2004-07-19), pages 1649-1652, XP008071651 ISSN: 0959-4965 abstract page 1651, right-hand column, line 38 - line 40	5-7
X	WO 01/77170 A2 (UNIV EDINBURGH [GB]; GRANT SETH GARRAN NIELS [GB]; HUSI HOLGER [GB] UN) 18 October 2001 (2001-10-18) the whole document in particular: abstract examples 1,2	1-3
A	COWBURN RICHARD F ET AL: "Effects of beta-amyloid-(25-35) peptides on radioligand binding to excitatory amino acid receptors and voltage-dependent calcium channels: Evidence for a selective affinity for the glutamate and glycine recognition sites of the NMDA receptor" NEUROCHEMICAL RESEARCH, vol. 22, no. 12, 1997, pages 1437-1442, XP002408132 ISSN: 0364-3190 abstract	1-3
P,X	LESNE SYLVAIN ET AL: "A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory" NATURE (LONDON), vol. 440, no. 7082, March 2006 (2006-03), pages 352-357, XP002408133 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document	15-17
P,X	WO 2006/047254 A (UNIV MINNESOTA [US]; LESNE SYLVAIN E [US]; ASHE KAREN H [US]; CLEARY J) 4 May 2006 (2006-05-04) cited in the application the whole document	1-17

International Application No. PCT/US2006/029452

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box II.1

Although claims 4,10-14 and 20 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

## Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 4,10-14 (in part); 18-20

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

## Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 18-20

Present claim 18-20 relate to antibodies or the use thereof (claim 20), which have a given desired property or effect, namely an antibody that binds to a soluble assembly of amyloid b protein and prevents the formation of an amyloid b /NMDA receptor complex (claim 18) or an antibody that binds to a NMDA receptor and prevents the formation of an amyloid b /NMDA receptor complex (claim 19). However, the description does not provide support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT for any such antibody having the said property or effect and there is no common general knowledge of this kind available to the person skilled in the art. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of the claim (PCT Guidelines 9.19 and 9.20), no search was performed for these claims.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2006/029452**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.: 4,10-14 (in part); 18-20  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 4,10-14 and 20 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.: 18-20  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

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

**Remark on Protest**

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2006/029452

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003105152	A1	05-06-2003	NONE
WO 0177170	A2	18-10-2001	AU 4441101 A 23-10-2001 CA 2405311 A1 18-10-2001 EP 1272517 A2 08-01-2003 JP 2003530125 T 14-10-2003 US 2003176651 A1 18-09-2003
WO 2006047254	A	04-05-2006	NONE

## フロントページの続き

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

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

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 アッシュ, カレン エイチ.

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 2 7, ノース オークス, オリオール レーン 7

(72)発明者 レスネ, シルバン イー.

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 4 0 3, ミネアポリス, サーティーンズ ストリート ナンバー 1 8, アpartment エー 1 1 2

(72)発明者 ニューマン, エリック エー.

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 4 0 3, ミネアポリス, ジェイムズ アベニュー サウス 1 9 0 5

Fターム(参考) 4C084 AA17 NA14 ZA152 ZA162

4C085 AA13 AA14 BB11 BB41 BB43 CC14 CC21 DD61

4H045 AA11 DA75 EA21

专利名称(译)	β淀粉样蛋白受体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009503520A</a>	公开(公告)日	2009-01-29
申请号	JP2008524203	申请日	2006-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	明尼苏达大学		
申请(专利权)人(译)	明尼苏达大学校董		
[标]发明人	アッシュカレンエイチ レスネシルバンイー ニューマンエリックエー		
发明人	アッシュ,カレン エイチ. レスネ,シルバン イー. ニューマン,エリック エー.		
IPC分类号	G01N33/543 C07K16/18 A61K45/00 A61K39/395 A61P25/28 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/0007 A61P25/28 C07K16/18 G01N33/6896 G01N2333/70571 G01N2500/04 G01N2800/2814 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/543.585 C07K16/18 A61K45/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/28 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC14 4C085/CC21 4C085/DD61 4H045/AA11 4H045/DA75 4H045/EA21		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 中村弘 渡边洋一 喀米·金加缪拉		
优先权	60/703653 2005-07-29 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及作为NMDA受体拮抗剂起作用的β-淀粉样蛋白的可溶性聚集体的鉴定。本发明还提供：方法和组合物用于检测和治疗神经变性疾病和认知障碍，以及筛选方法用于鉴定调节β-淀粉样蛋白的可溶性组件的对NMDA受体功能的拮抗作用的药剂。

