

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-522583

(P2006-522583A)

(43) 公表日 平成18年10月5日(2006.10.5)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/90	(2006.01)	C 1 2 N 9/90	Z N A		4 B O 2 4
G O 1 N 33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53	D		4 B O 5 0
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A		

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2004-561108 (P2004-561108) (86) (22) 出願日 平成14年12月20日 (2002.12.20) (85) 翻訳文提出日 平成17年8月3日 (2005.8.3) (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/014631 (87) 国際公開番号 W02004/056855 (87) 国際公開日 平成16年7月8日 (2004.7.8) (81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW	(71) 出願人 591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCH E AKTIENGESELLSCHAFT スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツアーヘルストラッセ124 (74) 代理人 100095832 弁理士 細田 芳徳 (72) 発明者 ファーツ, エルケ ドイツ連邦共和国 フグルフィンゲ 82 386 シュタインクロイツ 1
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的タンパク質およびペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンの可溶性複合体ならびにそれらの製造方法および使用方法

(57) 【要約】

本発明は、アルツハイマー病の診断に関する。本発明は特に、シャペロンがPpplaseファミリーのメンバーである可溶性Aβ-シャペロン複合体の生成、ならびに特にイムノアッセイにおけるAβの検出におけるかかるシャペロン-Aβ複合体の有利な使用および免疫原としてのその使用を教示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

共有結合したA β およびPPIシャペロンを含む可溶性A β -シャペロン複合体の製造方法であって：

該ポリペプチドを可溶化する工程、

およびバッファーを生理的条件下に調節する工程を含み、

ここで、形成されたA β -シャペロン複合体は、7.4のpHを有し、20 mMリン酸ナトリウムおよび150 mM塩化ナトリウムからなる溶液中で測定した場合に少なくとも100 nM溶解できる製造方法。

【請求項 2】

A β とペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンとが共有結合している、請求項 1 記載の複合体。

【請求項 3】

ペプチジルプロリルイソメラーゼがFKBPシャペロンである、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

FKBPシャペロンがSlyD、FkpAおよびトリガー因子からなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の方法。

【請求項 5】

7.4のpHを有し、20 mMリン酸ナトリウムおよび150 mM塩化ナトリウムからなる溶液中に少なくとも100 nM溶解できる複合体であって：

A β 、および

ペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンを含み、

ここで、A β とペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンとが共有結合している複合体。

【請求項 6】

A β とペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンとが共有結合している、請求項 5 記載の複合体。

【請求項 7】

7.4のpHを有し、20 mMリン酸ナトリウムおよび150 mM塩化ナトリウムからなる溶液中に少なくとも100 nM溶解できる組換えポリペプチドであって：

A β 、

ペプチド性リンカー、および

ペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンを含む、組換えポリペプチド。

【請求項 8】

A β ペプチドがA β (1~40)、A β (1~42) およびA β (1~43) からなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 いずれか記載の方法、請求項 5 もしくは 6 記載の可溶性複合体または請求項 7 記載の組換えポリペプチド。

【請求項 9】

イムノアッセイにおける請求項 5 もしくは 6 記載のA β -シャペロン複合体または請求項 7 記載の組換えタンパク質の使用。

【請求項 10】

請求項 5 もしくは 6 記載の可溶性A β -シャペロン複合体または請求項 7 記載の組換えタンパク質およびA β 測定を行うための補助試薬を含む試薬の少なくとも1つの構成物を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病 (AD) の診断に関する。本発明は特に、可溶性A β -シャペロン複合体の生成、ならびにかかるシャペロン-A β 複合体の、特にイムノアッセイにおけ

10

20

30

40

50

るA β の検出における有利な使用、および免疫原としてのその使用を教示する。

【0002】

背景

アルツハイマー病(AD)は、徐々に甚大な精神的不全をもたらし、ついには死をもたらす進行性の記憶、認識、理論、判断および情動安定性の喪失で臨床的に特徴付けられる変性脳障害である。ADは、高齢のヒトにおける進行性精神的不全(痴呆)の非常に一般的な原因であり、米国で4番目に一般的な医学的死因を表すと考えられている。ADは、世界中の全ての人種および民族で見られ、現在および未来の公衆衛生の主な問題をもたらす。

【0003】

ドイツでは、約65,000件のADが、毎年新たに診断される。該疾患は、現在米国だけで約200万~300万人が罹患していると推定されている。ADは現在不治である。効果的にADを予防するか、またはその症状もしくは進行を後退させる処置は、現在知られていない。

【0004】

ADを有する個体の脳は、老人斑と呼ばれる特徴的な病変および神経細線維もつれを示す。これらの病変の多数は、一般的に、AD患者の記憶および認知の機能に重要なヒト脳のいくつかの野で見られる。より制限された解剖学的分布におけるより少ない数のこれらの病変が、臨床的ADを有さない高齢のヒトの脳に時々見られる。老人斑およびアミロイド血管症はまた、ある年齢を超えた21トリソミー(ダウン症候群)を有する個体の脳、およびグッチ型(HCHWAD)のアミロイドーシスを有する遺伝性脳出血を特徴付ける。

【0005】

現在のところ、ADの確定的な診断は、通常該疾患で死亡した患者の脳組織、またはまれに、侵襲性神経外科処置の過程で取られた小さい生検された脳組織の試料における前述の病変の観察を要する。ADおよび上述の他の障害に特徴的な老人斑および脈管内アミロイド沈着(アミロイド血管症)の主な化学的構成物は、もともとアミロイド β ペプチド(A β)、または時々 β AP、A β Pまたは β /A4と呼ばれる約39~43アミノ酸の、およそ4.2キロダルトン(kD)のタンパク質である。現在のところ、名称A β が、このポリペプチドを記述するのに一般的に認められている。

【0006】

A β は、Glenner, G.G.およびWong, C.W., Biochem. Biophys. Res. Commun. 120 (1984) 885-890で最初に精製され、報告された部分的なアミノ酸配列であった。最初の28アミノ酸に関する単離方法および配列データは、米国特許第4,666,829号に記載されている。40を超える数のアミノ酸を有するA β の形態は、Kang, J.ら, Nature 325 (1987) 733-736によって最初に報告された。

【0007】

Roher, A.E.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 10836-10840は、A β (1~42)が有意な量の異性体化およびラセミ化アスパルチル残基を有する神経炎症性局面の主な構成物(90%)であることを示した。該筆者らはまた、A β (17~42)もまた散在性の斑において支配的(70%)であり、一方でA β (1~40)が髄膜血管斑の主な構成物であり、全A β の60%を含み、実質の脈管内では沈着A β (1~42)は全A β の75%に相当することを示した。

【0008】

Iwatsubo, T.ら, Neuron 13 (1994) 45-53は、A β 42(43)陽性老人斑が散発性AD脳におけるA β の主な種であることを示した。

【0009】

ここ数年の間に行われた分子生物学的およびタンパク質化学的分析によって、A β は、通常、ヒトを含む種々の動物の多くの組織中で細胞によって産生される、アミロイド前駆体タンパク質(APP)と呼ばれる大いにより大きい前駆体タンパク質の小さい断片であることが示された。APPをコードする遺伝子の構造の知識によって、A β が、APPのカルボキシル末端から、 α 、 β および γ セクレターゼと呼ばれる一連の酵素によって切断されたペプチド断片として生じることが立証された。A β 断片がAPPから切断されて、その後アミロ

10

20

30

40

50

イド斑として脳組織中ならびに脳および髄膜の血管の壁に沈着する正確な生化学的機構は、現在のところ知られていない。

【 0 0 1 0 】

いくつかの方向の根拠により、進行性の脳でのA β の沈着は、ADの病因において、重要な役割を果たし、認知の症状に数年または数十年先立つことができる（総説として、Selkoe, D.J., J. Neuropath. and Exp. Neurol. 53 (1994) 438-447; およびSelkoe, D.J., Neuron 6 (1991) 487参照）ことが示唆される。

【 0 0 1 1 】

基礎となるADの機構の理解においてなされてきた前進にもかかわらず、該疾患の診断で用いるための方法を開発する必要が未だある。

10

【 0 0 1 2 】

多数の生化学的電子顕微鏡および免疫化学的研究によって、A β は正常なpHの生理的溶液中で高度に不溶性であることが報告された。例えば、Glennner, G.G.およびWong, C.W., Biochem. Biophys. Res. Commun. 122 (1984) 1131-1135; Masters, C.L.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 4245-4249; Selkoe, D.J.ら, J. Neurochem. 46 (1986) 1820-1834参照。

【 0 0 1 3 】

さらに、この不溶性は、親タンパク質（APP）を細胞の脂質膜中に固定する領域の一部を構成するある範囲の疎水性アミノ酸を含むA β のアミノ酸配列から予測され、該アミノ酸配列と一致する。APPのA β 部分等の疎水性、脂質固定タンパク質は、細胞膜または膜断片と関連し続けていると予測され、したがって生理的細胞外液中に存在しないと予測される。前述の研究および他の多くから、生理的溶液中のAD脳アミロイド沈着から精製された天然のA β 、またはA β 配列を含む合成ペプチドの不溶性が報告されている。脳アミロイド沈着からのA β の抽出およびその後の可溶化には、強力な、非生理的溶媒および変性剤の使用が必要であった。

20

【 0 0 1 4 】

ヒト組織の細胞外液を模倣した生理的緩衝化塩溶液は、一様にA β を可溶化できなかった。

【 0 0 1 5 】

イムノアッセイは一般的に、生理的pHで行われる。したがって、生理的バッファー条件で可溶性のポリペプチドは、例えばELISA（酵素結合イムノソルベント検定法）等の種々のイムノアッセイ方法において広範に、例えば特定の疾患の診断およびスクリーニングに用いられる。

30

【 0 0 1 6 】

生理的バッファー条件で不溶性なために、および粘着性の性質のために、A β ペプチドはイムノアッセイに用いにくい。例えば、サンドイッチアッセイ形式において、A β は扱いにくい。なぜなら、A β は集合しやすく、沈殿しやすくさえあるからである。粘着性の性質のために、A β はまた、非特異的結合による誤った結果を導き得る。

【 0 0 1 7 】

強力にカオトロピックな試薬または適切な界面活性剤によってA β を可溶化することができるが、かかる方法で可溶化された物質は、診断用手段としての限られた役にしか立たない。

40

【 0 0 1 8 】

生理的バッファー条件におけるA β の不溶性は、さらにこのタンパク質を、通常の（生）化学的手順の非常に困難な標的にする。非常に大部分の「標識化学」、すなわち標識、例えばマーカー群のポリペプチドへの結合に用いられる化学的手順は、求核化学に基づき、したがって約pH6～約pH8のpH領域にやや制限され、そのため多少生理的なバッファー条件でのみ作用する。これらの通常の手順は、例えば「Bioconjugation」, M. AslamおよびA. Dent編, McMillan Reference, London (1998), pp.216-363のAslam, M.およびDent, A., The preparation of protein-protein conjugatesに記載されるように、適切に働かな

50

いか、またはA β ペプチドを用いて行うことが困難である。

【0019】

したがって、A β を容易に溶解できる形態、A β が例えば生理的pHで可溶性で、溶液中で安定で、かつ/または生成および/または操作に便利な形態で提供する必要が非常に大きい。

【0020】

本発明の課題は、A β が、生理的バッファー条件で容易に溶解できる形態で提供され得るかどうかを調べることであった。

【0021】

本発明者らは、折りたたみヘルパー (folding helper)、例えばペプチジルプロリルイソメラーゼ (PPI) クラスの多くのメンバー、特にFKBPファミリーのメンバーが、触媒活性を示すだけでなく、アミロイド生成性タンパク質、つまりより一般的にはA β ペプチドのように集合しがちなタンパク質の可溶性に対して強烈で有益な効果を引き起こすことを見出した。それらは、そうでなければ (すなわち、シャペロンされていないか、単離された形態で) 集合しがちなタンパク質と可溶性複合体を形成することによってそのようにする。生理的条件下でほとんど溶けないかまたは不溶性のA β は、一旦適切なPPIシャペロンとの複合体の形で存在すれば、穏やかな生理的条件下 (すなわち、界面活性剤またはカオトロピック剤等の添加物を可溶化する必要がない) で可溶性であるとわかった。そのため、本発明者らは、例えばA β (1~42) ペプチド (そうでなければ集合しがちな) タンパク質およびSlyD、FkpAまたは他のFKBPを可溶性付与シャペロンとして含む可溶性A β -シャペロン複合体を生成することができた。

【0022】

A β ペプチドおよびPPIクラスシャペロンを含む可溶性複合体は、例えばA β ペプチドおよびPPIクラスシャペロンのいずれも含む単一の組換えタンパク質から得ることができる。A β およびシャペロンのペプチジルプロリルイソメラーゼクラスから選択されるシャペロンを含む組換えタンパク質を説明する。

【0023】

最も興味深いことに、A β およびPPIシャペロンのいずれも含む融合タンパク質は、例えば容易に可溶化および再生され得、例えば複合体の便利な標識ができるようになる可溶性分子内A β -シャペロン複合体を形成することが見出されている。

【0024】

イムノアッセイにおける標準物質として使用するために、容易に溶解できる形態でA β を提供することが今や可能である。また、標識によってA β 抗原が修飾されたり悪影響を受けたり (例えば立体構造に関して) しないように、シャペロンのみが標識されている標識シャペロン-A β 複合体を生成することもできる。

【0025】

本発明者らが本明細書中に記載するA β -シャペロン複合体は、用いられる検出形式に関係ない、イムノアッセイのための可溶性標識A β ペプチドを生成する便利な手段を提供する。

【0026】

A β およびSlyDを含む新規の複合体は、例えば生理的条件下で容易に溶解でき、便利なpH範囲で容易に標識され得、免疫学的技術によるA β の検出または免疫化に大いに有利に用いられ得る。

【0027】

詳細な説明

本発明は、共有結合したA β およびPPIシャペロンを含む可溶性A β -シャペロン複合体の製造方法であって：該ポリペプチドを可溶化する工程、およびバッファーを生理的条件下に調節する工程を含み、ここで、形成されたA β -シャペロン複合体は、7.4のpHを有し、20 mMリン酸ナトリウムおよび150 mM塩化ナトリウムからなる溶液中で測定した場合に少なくとも100 nMまで可溶性である製造方法に関する。

【 0 0 2 8 】

本発明のA β ペプチドまたは「A β 」は、A β のアミノ酸位38、39、40、41、42または43で終わるA β 分子のC末端を含む少なくとも20個の連続したアミノ酸長のAPPの任意の断片であり得る。より好ましくは、A β ペプチドは少なくとも30個のアミノ酸長である。好ましくは、A β はA β のアミノ酸1で始まってC末端で終わる全長A β である。好ましいC末端は、それぞれA β 残基40、42または43で終わるペプチドである。A β のアミノ酸1からアミノ酸42までのアミノ酸(=A β (1~42))およびA β のアミノ酸1からアミノ酸43までのA β (=A β (1~43))を含むA β 形態が特に好ましい。

【 0 0 2 9 】

下記で、A β は時々「標的タンパク質」とも呼ばれる。

10

【 0 0 3 0 】

非ヒトの他の哺乳動物種由来のA β および天然に存在するか、または合成で生成されたA β のバリエーションもまた大いに有利に用いられ得、また本発明に含まれることは、当業者に明らかである。ヒトA β および自然に存在するそのバリエーションが最も好ましい。

【 0 0 3 1 】

タンパク質は、20 mMリン酸ナトリウムpH 7.4、150 mM NaClからなるバッファーに50 nM以下の濃度で可溶性である場合、「本質的に不溶性」とであると見なす。A β はかかるバッファーに本質的に不溶性であり、集合体および/または沈殿を形成する。

【 0 0 3 2 】

しかしながら、本発明のA β -シャペロン複合体は、20 mMリン酸ナトリウムpH 7.4、150 mM NaClからなるバッファーに「可溶性」である。かかるバッファーに、標的タンパク質A β は、A β -PPIシャペロン複合体に含まれる場合、100 nM以上の濃度で可溶性である。

20

【 0 0 3 3 】

用語「複合体」は、A β に対応するペプチドドメインおよびシャペロンに対応するペプチドドメインが互いに相互作用し、それによってシャペロンがA β に可溶化効果を付与することを示すために用いられる。

【 0 0 3 4 】

可溶性シャペロン-標的タンパク質複合体の生成は、可溶化バッファー状態から、すなわち標的タンパク質およびシャペロンのいずれも可溶性であるバッファーから始まる。適切なバッファーは、「非生理的」または「可溶化」バッファーと呼ばれ得、標的タンパク質およびPPIシャペロンのいずれもが変性していないか、または少なくとも不可逆的に変性していないという要件を満たさなければならない。かかるバッファー条件から開始すると、シャペロンは標的タンパク質に結合し、非生理的条件から生理的条件へのバッファー条件の変化が、標的タンパク質の沈殿なしに可能である。

30

【 0 0 3 5 】

適切な(非生理的)バッファー、すなわち標的タンパク質およびPPIシャペロンのいずれもが可溶性であるバッファーは、高pHもしくは低pH、または高カオトロピック塩濃度またはこれらの組み合わせを使用する。

【 0 0 3 6 】

シャペロンおよびA β ペプチドは別々のポリペプチドとして用いられ得るが、本発明者らは、両方のタンパク質を共有結合させることが有利であることを観察した。かかる共有結合は、従来の化学的架橋手順によって可能である；しかしながら、好ましくは、共有結合はA β ペプチドおよびシャペロンを含む組換えポリペプチドを生成することによって達成される。

40

【 0 0 3 7 】

さらに好ましい態様において、本発明は、組換え的に結合されたA β およびペプチジルプロリルイソメラーゼクラスから選択されたシャペロンタンパク質を含むタンパク質を、適切なバッファー条件下で可溶化する工程、ならびにその後バッファーを生理的条件に調節する工程を含む、可溶性A β -シャペロン複合体の生成方法に関する。このように、7.4のpHを有し、20 mMリン酸ナトリウムおよび150 mM塩化ナトリウムからなるバッファーに

50

少なくとも100 nMまで可溶性である分子内複合体が得られる。最も好ましくは、この方法は、いわゆる封入体から開始して行われる。

【0038】

PPIシャペロンおよびA β を含む分子内複合体を生成する場合には、可溶化バッファは、好ましくはやや高濃度のカオトロピック塩、例えば6.0 M塩化グアニジニウムを有する、約7.8のpHのバッファである。再生に際して、標的タンパク質はその天然様構造および分子内可溶性複合体形態をとる。

【0039】

本発明は、ペプチジルプロリルシス/トランスイソメラーゼ (PPIまたはPPIase) と呼ばれる折りたたみヘルパーのクラス由来のシャペロンの使用を教示する (Dartigalongue, C.およびRaina, S., *Embo J.* 17 (1998) 3968-3980と比較)。このファミリーの周知の例は、CypA、PpiD (Dartigalongue, C.およびRaina, S., 前掲; Schmid, F.X., *Molecular chaperones in the life cycle of proteins*, A.L. FinkおよびY. Goto編, Marcel Dekker Inc., New York (1998), pp.361-389)、FkpA (Danese, P.N.ら, *Genes Dev.* 9 (1995) 387-398) およびトリガー因子 (Crooke, E.およびWickner, W., *Proc. Natl. Sci. USA* 84 (1987) 5216-5220; Stoller, G.ら, *Embo J.* 14 (1995) 4939-4948) と呼ばれるメンバーである。

【0040】

ペプチジルプロリルイソメラーゼは、3つのファミリー、パルブリン (parvuline) (Schmid, F.X., 前掲; Rahfeld, J.U.ら, *FEBS Lett.* 352 (1994) 180-184)、シクロフィリン (Fischer, G.ら, *Nature* 337 (1989) 476-478、およびFKBPファミリー (Lane, W.S.ら, *J. Protein Chem.* 10 (1991) 151-160) に再分される。FKBPファミリーは、興味深い生化学的特性を示す: このメンバーは、もともとマクロライド系抗生物質、例えばFK 506およびラバマイシンに対する結合能によって同定された (Kay, J.E., *Biochem J.* 314 (1996) 361-385)。

【0041】

いくつかのプロリルイソメラーゼは、種々の機能の種々のサブユニットまたはモジュール、例えば酵素活性を示すモジュールおよびシャペロンまたは結合活性を示すモジュールを含む。かかるFKBPファミリーのモジュールメンバーは、FkpA (Ramm, K.およびPluckthun, A., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 17106-17113)、SlyD (Hottenrott, S.ら, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 15697-15701) およびトリガー因子 (Scholz, C.ら, *Embo J.* 16 (1997) 54-58) を含む。好ましくは、シャペロンのPPIクラスのFKBPファミリーのメンバーが用いられる。

【0042】

さらなる態様において、真核生物由来のホモログを用いるのが好ましく、ヒト由来のPPIaseを用いるのが非常に好ましい。なぜならこれらのPPIaseはヒト血清由来の抗体によって認識されないはずであり、そのため血清学的分析 (すなわちヒト抗体の検出に基づく分析) に干渉しないはずだからである。

【0043】

いつも分子シャペロンの完全な配列を用いなければならないわけではないことは、周知であり、理解されている。必要な能力および機能を依然として有するシャペロンの機能的断片 (いわゆるモジュール) もまた用いられ得る (WO 98/13496と比較)。

【0044】

例えば、FkpAは、不活性な前駆体分子として細菌の細胞質ゾル中で合成され、細胞質膜を横切って転位されるペリプラズムのPPIである。FkpAの活性型 (成熟FkpAまたはペリプラズムのFkpA) は、シグナル配列 (アミノ酸1~25) を欠き、したがって前駆体分子のアミノ酸26~270を含む。FkpAに関して関連のある配列情報は、公共のデータベース、例えば「SWISS-PROT」から、受託番号P 45523で容易に得ることができる。

【0045】

FkpAと近縁な関係にあるもの、すなわちSlyDは、触媒およびシャペロン機能を担う構造

化N末端ドメイン、ならびに非常にヒスチジンおよびシステイン残基に富む、主に構造化されていないC末端からなる (Hottenrott, S.ら, J. Biol. Chem. 272 (1997) 15697-15701)。本発明者らは、アミノ酸1~165を含む、C末端がトランケートされたSlyDのバリエーションが効率的にA β に対するその可溶化機能を発揮することを見出した。野生型SlyDの場合と異なり、ジスルフィドシャッフリングを損なう危険性は、用いられるトランケートされたSlyDバリエーション(1~165)においてうまく回避される。

【0046】

上で検討したシャペロンのバリエーションは、1つまたは数個のアミノ酸置換または欠失を有し、本発明の方法を行うのにも用いられ得る。

【0047】

勿論、本発明は具体的に言及したペプチジルプロリルイソメラーゼクラスのメンバーの使用に制限されず、同じシャペロンのクラス由来だが異なる細菌の種由来のシャペロンを用いても行われ得る。

【0048】

代替の供給源由来の適切なシャペロンおよびPPIシャペロンの適切な断片または変異体は、実施例に記載されるような手法を用いて容易に選択され得る。PPIシャペロンの好ましい代替の供給源は、ペスト菌、コレラ菌、パストレラ・ムルトシダおよび梅毒トレポネーマである。

【0049】

本発明の好ましい態様において、結合能のあるPPIaseシャペロンは、細菌の細胞質ゾルで高発現の遺伝子産物を産生する方法でA β ペプチドに組換え的に結合される。結合能のあるPPIaseは、本発明で言及される場合、その触媒的PPIase活性と無関係に、少なくとも、広範なA β ペプチド基質(すなわち、基質結合またはシャペロンモチーフ)への結合を媒介する機能単位を含む。

【0050】

モジュラーPPIが優先的に、変性したまたは部分的に変性したタンパク質に結合することが知られている(例えば、Scholzら, 前掲)。現在、PPIaseがタンパク質の折りたたみを触媒するだけでなく、かかるタンパク質と安定な複合体を形成する著しい特性を有し、そのため可溶性を付与することが見出されている。驚くべきことに、研究されたPPIase(TF、SlyDおよびFkpD等)は天然様A β ペプチドに結合し、そのため、例えば該ペプチドを可溶化する。

【0051】

モデル生体分子間、例えば抗体と抗原との間の複合体形成に関する情報は多量にある(総説として、Braden, B.C.およびPoljak, R.J., Faseb J. 9 (1995) 9-16参照)。通常、複合体の形成および解離は平行して起こる;複合体および結合パートナーは自由平衡状態で(in free equilibrium)同時に存在する。同様に、本発明で説明されているように、PPIシャペロンと、A β のようなアミロイド生成性タンパク質との間の複合体に関しても同じことが言えるようである。

【0052】

複合体の形成は、本発明で説明されているように、特に重要な特性である。なぜなら、PPIシャペロンと、それ自体では本質的に不溶性なタンパク質であるA β との間の複合体は、例えば生理的バッファー条件下で容易に溶解できるということが現在見出されているからである。生理的条件下で可溶性な抗原は、診断への応用に大いに有利である。これらは、例えば標準物質として、直接使用され得る。さらに、これらは適切なマーカーまたは適切な結合基に結合させ得る。

【0053】

アミロイド生成性ペプチドの典型的な例として、A β ペプチドは非常に操作しにくく、極めて珍しい特性を示す。すでに言及したように、A β 分子の最も重要な特性の1つは、生理的バッファー条件下での不溶性である。

【0054】

10

20

30

40

50

通常生理的バッファー条件は、動物の血漿または血清中に見られる塩およびpH条件に相当すると理解され、約7.4のpH値および約150 mMの塩濃度で定義される。本発明のA β -シャペロン複合体は、これらのバッファー条件下で容易に溶解できる。その中に存在するA β は、免疫学的に活性があり、そのため天然様構造を示す。適切な界面活性剤の非存在下、または適切な界面活性剤による前処理なしでA β は生理的バッファー条件下（例えば、20 mMリン酸ナトリウム pH 7.4、150 mM NaCl）で本質的に不溶性であるのに対し、記載される本発明の複合体は、適切なプロトコールに従った再折りたたみの後に、容易に溶解できる。A β は、本発明の複合体に含まれている場合、少なくとも100 nMの濃度で、好ましくは1 μ M以上の濃度で、最も好ましくは10 μ M以上の濃度で溶解できる。このように、溶解度は低いナノモル濃度から約マイクロモル濃度まで実質的に上昇する。

10

【0055】

本発明の範囲をよりよく理解するために、可溶化および再生に適用されるバッファー条件は必要に応じて変更され得、適切であり得、かつ本発明の過度な制限として理解されてはならず、本発明は広範囲のバッファー条件に渡ってうまく行われることは、強調する必要がある。

【0056】

生理的バッファーの全体の塩濃度は、シャペロン-A β 複合体が解離しないように注意が払われ、A β が溶液中に留まっている限りは重要でない。好ましくは、生理的バッファーは、少なくとも10 mMかつ多くとも200 mMのバッファー系を含む。バッファー構成物の残りは、あるとしても、有意なバッファー容量を有さない塩、例えば塩化ナトリウムであり得る。生理的バッファーは、好ましくは20~500 mMの間、より好ましくは50~300 mMの間、最も好ましくは100~200 mMの間の塩濃度を有する。

20

【0057】

本発明の方法において、生理的バッファーは、5.0~8.5の範囲のpH値を有する範囲であり得；より好ましくはかかるバッファーの範囲はpH5.5~pH8.3の間である。さらにより好ましくは、かかる生理的バッファー条件は、上に示されたような塩濃度および6.0~8.0の間のpH値によって定義され；最も好ましくは、かかる生理的バッファーのpHは6.5~7.8の間である。

【0058】

本発明の好ましい態様は、組換えによってペプチジルプロリルイソメラーゼに結合したA β ペプチドを含む可溶性A β -シャペロン複合体の生成方法であって：該方法は該組換えA β -シャペロンポリペプチドの可溶化およびバッファーの生理的条件への調節を含む。そうした場合にA β ペプチドは単独で、本発明の組換えタンパク質の一部として自然に沈殿するのに、これは驚くべきことに上記方法において溶液中に留まる。この重要な発見は、A β ペプチドとシャペロンとの間の分子内複合体の形成のためである見込みが最も高い。

30

【0059】

大腸菌におけるA β の組換え生成の場合、組換え的に生成されたA β は、好ましくは封入体の形で得られる。この物質は、高度にカオトロピックな試薬、例えば7.0 M塩化グアニジニウム（guanidinium tchloride）を用いて可溶化される。A β ポリペプチドは、これらの条件下で、大部分が構造化されていない。適切な工程でバッファーを生理的バッファー条件に変えることにより、溶液中のA β は、その天然様構造として認められるものを呈する。（集合体のような）迷光粒子（light-straying particles）に関する情報は、標準的UVスペクトルから容易に得ることができる。

40

【0060】

ここで強調すべき重要なことは、A β -ペプチドシャペロン複体内のA β ペプチドは、本発明によると、生理的バッファー条件への移行の間に、天然様折りたたみと見なされるものを採用することである。逆にA β ペプチドは、カオトロピック剤によって中性pHで可溶化され、大部分が構造化されておらず、そのため秩序立った立体構造エピトープを失っている。また、代替的に界面活性剤を用いることによってA β ペプチドを可溶化することも可能である。例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）をうまく用いてA β が可溶化さ

50

れた。しかしながら、かかる「SDS可溶性物質」は、例えばイムノアッセイにおける使用のために選り抜きの物質ではない。さらに（上述のように）かかるイムノアッセイは好ましくは $A\beta$ の立体構造エピトープと反応する抗体を利用し、界面活性剤が立体構造エピトープを部分的に廃することは考慮しないわけにはいかない。

【0061】

好ましくは、本発明の $A\beta$ -シャペロン複合体は、そこに含まれる $A\beta$ が天然様に折りたたまれていることを特徴とする。かかる複合体中の天然様に折りたたまれた $A\beta$ は、例えば所望の免疫学的または物理的特性を示す。

【0062】

可溶性シャペロン- $A\beta$ 複合体の生成は、非生理的バッファー条件から始まる。「非生理的」バッファーは、二つの要求、(a) $A\beta$ の変性とその天然様構造と可逆的であること、および(b)PPIシャペロンの変性とその天然様構造と可逆的であること、を満たさなければならない。かかるバッファー条件から開始して、シャペロンがアミロイド生成性標的タンパク質に結合し、非生理的条件から多少生理的な条件へのバッファー条件の変化が、アミロイド生成性 $A\beta$ ペプチドを含むポリペプチドの沈殿なしに、可能である。

【0063】

シャペロンは通常変性タンパク質に結合してそれらに作用し、それによってそれらの正しい（再）折りたたみを容易にするのに対し、本発明の基礎となる状態は著しく異なる。シャペロン機能の習慣的な見解と異なり、本発明の方法において、シャペロンは、そうでなければ $A\beta$ が不溶性で集合および/または沈殿するバッファー条件で、天然様に折りたたまれたタンパク質に結合し、このタンパク質を安定化するようである。

【0064】

本発明の好ましい態様において、PPIシャペロンは、FkpA、SlyDおよびトリガー因子を含む群から選択される。

【0065】

特にFkpAまたはSlyDが $A\beta$ の可溶性を向上させ、それとやや安定な複合体を形成することが見出されている。したがって、さらに好ましい態様は、シャペロンがFkpAおよびSlyDを含む群から選択されることを特徴とする。最も好ましくは、シャペロンSlyDは、 $A\beta$ に可溶性を付与するために用いられる。

【0066】

さらに上述のように、シャペロンの断片もまた、所望の機能を引き起こすのに用いられ得る。FKBPのような、触媒モジュールおよび結合モジュールを含むモジュラーシャペロンの場合、かかる断片が少なくとも結合ドメインを含むこと、またはかかる断片が少なくとも結合ドメインに匹敵する機能を本質的に示すことが好ましい。PPIシャペロンの好ましい機能的断片は、例えば大腸菌由来のEcSlyD（1～165）である。EcSlyDに対応するSlyDホモログもまた、本発明の好ましい態様を表す。

【0067】

FKBP12は、FKBPファミリーのヒトのメンバーであり、本質的にPPIaseの触媒イソメラーゼドメインを含む。これはさらなるポリペプチド結合ドメインを欠くために、FKBPファミリーの他のメンバーと比較して実質的に減少した、変性されたかまたは部分的に折りたたまれたタンパク質基質に対する結合アフィニティを示す。FKBP12の変性および再折りたたみは可逆的過程であることが示されている（Egan, D.A.ら, Biochemistry 32 (1993) 1920-1927; Scholz, C.ら, J. Biol. Chem. 271 (1996) 12703-12707）。本発明者らは、FkpA（25～270）およびSlyD（1～165）の再折りたたみおよび変性が可逆的であり、そのため本明細書中に記載される方法の中核の要件を満たすことを見出す。

【0068】

可溶性 $A\beta$ シャペロン複合体はまた、（例えば組換え技術によって生成された）PPIシャペロンを、従来のペプチド合成によって得られたか、または組換えによって生成されたかのいずれかの $A\beta$ と混合することによっても調製され得る。しかしながら、上述のように、好ましくは、かつ極めて容易に、PPIシャペロンおよび $A\beta$ を含む組換えポリペプチドの

10

20

30

40

50

適切な処理によってA β が可溶性の形態で得られる。

【0069】

好ましい態様では、本発明は、A β 、およびペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンを含有し、ここでA β およびペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンが共有結合している、7.4のpHを有しかつ20mMリン酸ナトリウムおよび150mM塩化ナトリウムからなる溶液に少なくとも100nMで可溶性である複合体に関する。

【0070】

複合体形成は、解離および再会合が平行して起こる動的過程である。これは、例えば、SlyDとA β との間の分子間会合および分子内（例えば、融合構築物における）会合の両方について真実である。A β は生理的バッファーから沈殿するので、両方のパートナーの濃度は、非臨界または非凝集濃度の遊離形態のA β のみが存在すること、および大部分のA β が結合し、A β -シャペロン複合体の形態で安定であることを確実にするように選ばなければならない。

10

【0071】

両方のドメインが共有結合する場合、1:1(A β 対PPIシャペロン)の比が可溶性複合体を形成するのに十分であることが見出されている。A β 対シャペロンの最も有利なモル比は、1:1および1:2である。

【0072】

組換え結合形態のA β ペプチドおよびPPIシャペロンを含有する可溶性複合体は、本発明による非常に好ましい態様を表す。かかる組換えポリペプチドに含まれる最も好ましいA β ペプチドは、A β (1-40)、A β (1-42)、およびA β (1-43)からなる群より選ばれる。

20

【0073】

少なくとも1つのA β ドメインおよび少なくとも1つのPPI-シャペロンドメインを含有する組換えタンパク質に関して、非生理的から生理的バッファー条件への移行は、種々の方法で達成されうる。A β ドメインと、例えばSlyDドメインとの間の可溶性分子間複合体は、透析、迅速な希釈またはマトリックス支援再折り畳みによって非生理的バッファー条件を生理的バッファー条件に調整することにより容易に得られる。マトリックス支援再折り畳みは好ましい方法の代表である。可溶性A β -シャペロン複合体を含有する、このようにして得られる溶液は、さらなる修飾のために直接使用されうる。

【0074】

好ましくは、本発明の組換えポリペプチドは、1つのシャペロンドメイン当たり1つのA β ドメインを含む。なおさらに好ましい態様では、本発明は、少なくとも1つのA β ドメインおよび少なくとも2つのPPI-シャペロンドメインを含有する組換えタンパク質に関する。1つのA β ドメインおよび2つのPPI-シャペロンを含有する組換えポリペプチドもまた好ましい。

30

【0075】

本発明による可溶性A β -シャペロン複合体を得るために使用される組換えポリペプチドは、標準的な分子生物学技術により発現される。好ましくは、シャペロン遺伝子は、A β およびシャペロンの遺伝子情報の両方ならびに任意に適切なペプチドのリンカー配列の遺伝子情報を含有する発現ベクターの標的タンパク質遺伝子上流のフレームに配置される。かかる組換え融合タンパク質の大規模生産のための好ましい宿主は大腸菌である。

40

【0076】

好ましい態様では、本発明は、A β およびシャペロンのペプチジルプロリルイソメラーゼクラスから選択されたシャペロンを含有する可溶性複合体に関する。組換えポリペプチドの最も好ましいPPIシャペロン部分は、任意の輸出シグナルペプチド（対応する前駆体分子の）を欠失し、成熟PPIシャペロンに対応する。この好ましい態様では、組換えタンパク質は機能性シグナル配列を欠失しているので、遺伝子産物は、細菌細胞質ゾルにおいて蓄積する。

【0077】

例えば、組換え産生SlyD-A β に含まれるA β の顕著な特徴は、「シャペロンされてい

50

い」 $A\beta$ と比べて優れた溶解性である。興味深いことに、「カオトロピック材料」(すなわち、6.0~7.0M GuHCl中のSlyD- $A\beta$)が種々の方法で再折り畳みされ得、全て熱力学的に安定な可溶性天然様形態を生じる。再折り畳みは、透析および迅速な希釈の両方により、ならびに再生サイズ排除クロマトグラフィーまたはマトリックス支援再折り畳みにより高収量で達成される。これらの知見は、この共有結合形態において、 $A\beta$ -SlyD融合ポリペプチドは準安定なタンパク質よりも熱力学的に安定であることを示唆している。

【0078】

組換えSlyD- $A\beta$ ポリペプチドは、異なる折り畳み必要条件を有する2つのタンパク質ドメインを含有する。精製プロトコルは、初期変性工程を含むので、シャペロンの折り畳みが可逆的であることが不可欠である。実際、共有結合タンパク質複合体内のSlyDおよび $A\beta$ の両方の可逆的変性および再折り畳みに関する説得力のある分光学的証拠がある。

10

【0079】

$A\beta$ 、ペプチドリinker、およびペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンを含有し、7.4のpHを有し、20mMリン酸ナトリウムおよび150mM塩化ナトリウムからなる溶液中に少なくとも100nMで可溶性である組換えポリペプチドも好ましい。

【0080】

かかる組換えポリペプチドのペプチドリinker配列は、使用される $A\beta$ およびシャペロンドメインの最適な分子内会合を確実にするように選ばれる。好ましくは、かかるリンカー配列は、約20アミノ酸長であり、柔軟性および可溶性の両方を支持するアミノ酸、例えば、グリシンおよびセリンを含有する。好ましくは、リンカーは10~50アミノ酸長である。より好ましい長さは12~40アミノ酸であり、最も好ましいリンカーは15~35アミノ酸を含有する。 $A\beta$ およびシャペロンの両方は、常に近位にある(例えば、適切なリンカーによりまとまっている)。好ましい態様では、組換えポリペプチドは、柔軟性のあるリンカーを介して標的タンパク質に結合した成熟FkpAまたは情報はトランケートされたSlyD(アミノ酸1~165)を含有する。これは、データが示すように、さらなる安定化効果をもたらす。

20

【0081】

PPIシャペロンと $A\beta$ との間の分子内複合体の一部としての $A\beta$ は、可溶性であり、かつ安定であることが驚くべきことに見出された。かかる複合体の $A\beta$ の改善された安定性は、さらなる利点をもたらす。例えば、完全に再生した組換え $A\beta$ -シャペロン分子を非常に容易に得ることができる。組換えタンパク質は、カオトロピック剤(例えば、塩化グアニジニウム)での処理により最初に可溶性になる。適切な生理的バッファーで平衡化したゲル濾過カラムに可溶性物質を単純に通過させることにより、共有結合タンパク質ドメインを含有する完全に再生したタンパク質が得られうる。

30

【0082】

マトリックス支援再折り畳みはまた容易に、大いに好都合に適用され得る、実施例2および図2参照。非常に簡便な再生および容易な精製工程において、可溶性SlyD-SlyD- $A\beta$ 融合タンパク質は約90%の純度で得られることが示されている。

【0083】

かかる複合体 $A\beta$ 内の $A\beta$ が生理的バッファー条件下、例えば、20mMリン酸塩、150mM塩化ナトリウムバッファー、pH7.4で、可溶性形態で存在することは、本発明の複合体の非常に重要な特徴である。遊離 $A\beta$ とは異なり、かかる複合体中に含まれる $A\beta$ は、粘着性もなく、凝集傾向もない。これは、治療および診断適用に極めて有利である。好ましい態様では、本発明は、 $A\beta$ ペプチドおよびシャペロンのペプチジルプロリルイソメラーゼクラスから選ばれるシャペロンを含有する分子内複合体を含有し、生理的バッファー条件下で可溶性である試薬の組成物に関する。

40

【0084】

天然様の折り畳まれた $A\beta$ およびシャペロンのペプチジルプロリルイソメラーゼクラスから選ばれるシャペロンを含有する可溶性複合体は、本発明の非常に好ましい態様を表す。

50

【0085】

A β での免疫化に関して、「可溶性かつ天然様」A β を提供することにより成される前進は全く明白である。今や初めて、可溶性かつ天然様のA β は、生理的バッファ条件下で注射に利用可能である

【0086】

好ましい態様では、記載される可溶性複合体は、医薬として使用するための試薬の組成物を製造するために使用される。試薬の組成物は、生理的に許容されうる賦形剤と共にA β -シャペロン複合体、および適切である場合、適切な添加物および/または従来の補助的物質を含有する。

【0087】

A β -シャペロン複合体を含有する試薬の組成物を形成すること、および哺乳動物における免疫応答を引き起こすためにかかる組成物を使用することは、本発明によるさらに好ましい態様を表す。記載される複合体は、公知の他のいかなるA β 免疫原よりも大いにA β エピトープを利用可能にする。それ故、新規免疫原は、より広い免疫応答を誘導することが予測される。

10

【0088】

診断手順に関して、本発明の可溶性A β -シャペロン複合体の明白な利点は、例えば、生理的バッファ条件下でのA β ペプチドの増大した可溶性、および/または診断感受性における増大、および/または存在するコンフォメーションエピトープの数の増大、および/またはA β -シャペロン複合体を容易に標識できる可能性である。

20

【0089】

標識に関して、化学結合の様式およびストラテジーは、今や要求に応じて選択されうる。ポリペプチドの場合、-SH、-NH₂または-COO⁻残基ならびにチロシンの-OH基、ヒスチジンのイミダゾール基、またはトリプトファンの複素環イミノ基を標的化する結合化学は利用可能である。いくつかの適切な結合化学が、これらの官能基の各々について公知である(Aslam, M.およびDent, A., 前出)。決まりきったタンパク質結合化学は、タンパク質が作動バッファ条件下で、例えば、約5~8.5のpH範囲内で、可溶性であることを必要とする。

【0090】

周知の標識は、固相結合基のようなマーカー基またはエフェクター基である。標識した可溶性A β -シャペロン複合体は、本発明によるさらに好ましい態様を表す。

30

【0091】

標識基は、色素、化学発光基(例えば、アクリジニウムエステルもしくはジオキセタン)または蛍光色素(例えば、フルオレセイン、クマリン、ローダミン、オキサジン、レゾルフィン、シアニンおよびその誘導体)等の発光標識基等の任意の公知の検出可能なマーカー基から選ばれうる。標識基の他の例は、ルテニウムまたはユウロピウム複合体等の発光金属複合体、酵素(例えば、ELISAまたはCEDIA(クローン酵素ドナー免疫アッセイ、例えば、EP-A-0 061 888)に使用されるような)、および放射性同位体である。

【0092】

エフェクター基は、例えば、バイオアフィニティー(bioaffine)結合対の1つのパートナーを含む。アッセイを行っている間、エフェクター基は、バイオアフィン結合対のもう一方のパートナーと特異的に、および好ましくは非共有結合的に相互作用する。適切な結合対の例は、ハプテンまたは抗原/抗体、ピオチンまたはアミノピオチン、イミノピオチンまたはデスチオピオチン等のピオチンアナログ/アビジンもしくはストレプトアビジン、糖/レクチン、核酸または核酸アナログ/相補的核酸、およびレセプター/リガンド、例えば、ステロイドホルモンレセプター/ステロイドホルモンである。好ましい結合対メンバーは、ハプテン、抗原およびホルモンを含む。ジゴキシンおよびピオチンならびにそのアナログのようなハプテンが特に好ましい。

40

【0093】

免疫アッセイは当業者に周知である。かかるアッセイを行う方法および実用的応用およ

50

び手順は関連する教科書に要約されている。関連する教科書の例は、Tijssen, P., Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates, "Practice and theory of enzyme immunoassays", R.H. Burdon and v. P.H. Knippenberg, Elsevier 編, Amsterdam (1990), pp. 221-278) および免疫学的検出方法を扱っている種々の巻 "Methods in Enzymology", S.P. Colowick, N.O. Caplan 編, Academic Press (1980)), 特に 70, 73, 74, 84, 92 および 121 巻である。

【 0 0 9 4 】

本発明は、免疫アッセイにおける可溶性シャペロン-A β 複合体の使用に関する。A β および PPI シャペロンを含有する可溶性複合体は、A β ペプチドの検出のための免疫アッセイにおける標準的な材料として好適に使用される。さらに好ましい態様では、A β および PPI シャペロンを含有する標識可溶性複合体が A β に対する抗体の検出のための免疫アッセイにおいて使用される。 10

【 0 0 9 5 】

新規シャペロン-A β 複合体は、かかる複合体のシャペロンを誘導体化する可能性を提供し、抗原(A β)自身の修飾を必要としない。一般に、第2の化学的部分によるポリペプチドの修飾、例えば、その分子への標識の結合は、ポリペプチドに負に影響する危険性を含むことが一般に認められている。例えば、調査中のエピトープは妥協され得るか、またはかかる標識は非特異的結合を引き起こしうる。本発明によれば、今やシャペロン-A β 複合体内のシャペロンを特異的に誘導体化することができる。 20

【 0 0 9 6 】

免疫アッセイのような、特異的結合アッセイの分野における診断試薬は、通常、キットの形態で最もよく提供され、これは、アッセイを行うために必要とされる1つまたは複数の特異的結合剤、および助剤を含む。それ故、本発明はまた、本発明によるA β -シャペロン複合体を含有する試薬の少なくとも1つの組成物およびA β 測定を行うための助剤を含有する免疫学的キットに関する。好ましくは、A β -シャペロン複合体を含有する試薬の組成物は液体形態で提供される。

【 0 0 9 7 】

別の態様では、A β および PPI シャペロンを含有する可溶性複合体はまた、ヒトまたは非ヒト動物等の被験体における免疫応答を誘発するために使用されうる。可溶性複合体は、賦形剤または担体を含みうるもの等の組成物中で被験体に投与されうる。かかる組成物はまたアジュバントを含みうる。従来のアジュバントの例としては、フロイントの不完全、フロイントの完全、Merck 65、AS-2、ミョウバン、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム等のミネラルゲル、ならびにリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、およびジニトロフェノール等の界面活性物質が挙げられるがこれらに限定されない。他の有用なアジュバントとしては、細菌莢膜多糖、デキストラン、IL-12、GM-CSF、CD40リガンド、IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-10、IL-13、IL-18または任意のサイトカインまたは細菌DNA断片が挙げられるがこれらに限定されない。 30

【 0 0 9 8 】

1回の投与量(投与)の可溶性複合体組成物が与えられうる。しかし、例えば1回、2回、3回またはそれより多くのブースト投与量が1回目の投与に続きうる。被験体に投与される投与の回数は、可溶性複合体組成物に対する被験体の応答に一部依存する。本発明の範囲内で、適切な回数の投与は、可溶性複合体に対して動物を免疫するのに必要とされる任意の回数を含む。 40

【 0 0 9 9 】

可溶性複合体組成物の2回目の投薬(ブースター)は、最初の投与後の約7日~1年の間に与えられうる。1回目と2回目の投与の間の時間は、14日~6ヶ月、21日~3ヶ月、しばしば最初の投与後約28日~2ヶ月でありうる。3回目の投与(2回目のブースター)は、1回目の投与後約14日~10年、例えば、1回目の投与後約14日~3年、しばしば約21日~1年、非常にしばしば約28日~6ヶ月でありうる。引き続くブースターは、2週間間隔、 50

1ヶ月、3ヶ月または6ヶ月から10年間隔で投与されうる。

【0100】

典型的には、抗原に対して動物を免疫するのに十分である可溶性複合体の量が被験体に投与される(すなわち、「免疫学的に有効な投与量」または「治療的に有効な投与量」)。「免疫学的に有効な投与量」を達成するのに十分な量は、被験体の体重および全般的な健康状態、ならびに処方する医師または他の有資格者の判断に一部依存する。

【0101】

可溶性複合体の有効量は、免疫応答の誘導を達成するために動物モデルにおいて処方されうる；かかるデータは、動物データに基づいてヒトへの投与を容易に最適化するために使用されうる。投与量は、典型的には、約1fg～約100μg、しばしば1pg～約100μg、さらにしばしば約1ng～約50μg、通常約100ng～約50μgである。いくつかの態様では、投与量は約1fg～約100μg/kg被験体体重、しばしば約1pg～約100μg、さらにしばしば約1ng～約50μg、通常約100ng～約50μg/kg被験体体重である。

10

【0102】

本発明の可溶性複合体含有組成物は、種々の方法および種々の形態で投与されうる。可溶性複合体組成物は、バッファー、糖質、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはグリシン等のアミノ酸、抗酸化剤、静菌剤、キレート剤、懸濁剤、増粘剤および/または防腐剤；水、油、食塩水、水性デキストロースおよびグリセロール溶液、緩衝剤、張度調整剤、湿潤剤等のほぼ生理的な条件に必要とされる他の薬学的に許容されうる補助物質等の担体および賦形剤を含みうる。従来のアジュバントはまた組成物に取り込まれうる。

20

【0103】

任意の適切な担体が発明の組成物を投与するために使用され得るが、担体のタイプは投与の形態に応じて変化する。化合物はまた、リポソーム内に封入されうる。生分解性ミクロスフェア(例えば、米国特許第5,942,252号に記載されるもの等)が担体としていくつかの場合に好都合である。

【0104】

滅菌濾過等の従来技術により達成されるような組成物の滅菌が望ましい。得られる水溶液はそのまま使用するために包装してもよいし、凍結乾燥してもよい。

【0105】

本発明の可溶性複合体組成物は、注射(例えば、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内等)、吸入、局所投与、坐薬、経皮貼布の使用または経口を含む種々の方法で投与され得る。

30

【0106】

投与が注射による場合、組成物は、水溶液、好ましくはハंक溶液、リンゲル溶液、20mMリン酸塩150mM塩化ナトリウムバッファー(pH7.4)、または生理的食塩水バッファー等の生理的に適合するバッファー中に製剤化されうる。

溶液は、懸濁剤、安定化剤および/または分散剤等の製剤化剤を含みうる。あるいは、組成物は、使用する前に、適切なビヒクル、例えば、無菌発熱物質非含有水で形成するために粉体形態でありうる。吸入送達組成物は、適切な高圧ガス、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、二酸化炭素または他の適切なガスの使用を伴う加圧バックまたは噴霧器からのエアゾール噴霧でありうる。加圧エアゾールの場合、投薬単位は、計量した量を送達するためのバルブを提供することにより決定されうる。例えば、吸入器または注入器において使用するためのゼラチンのカプセルおよびカートリッジが、タンパク質の粉体混合物およびラクトースまたはスターチ等の適切な粉体ベースを含有して製剤化されうる。局所投与のために、組成物は、当該分野で周知であるように、溶液、ゲル、軟膏、クリーム、懸濁物等として製剤化されうる。いくつかの態様では、投与は経皮貼布による。坐剤組成物はまた、従来の坐剤ベースを含むように製剤化されうる。

40

【0107】

投与が経口である場合、組成物は、組成物と薬学的に許容されうる担体とを組み合わせることにより容易に製剤化されうる。固体担体はマンニトール、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム等を含む；かかる担体は経口摂取のために錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル

50

、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁物等の形成を可能にする。かかる製剤は、粉体、カプセルおよび錠剤でありうる；適切な賦形剤は、糖、セルロース調製物等の充填剤、造粒剤、および結合剤でありうる。

【0108】

結合断片(例えば、F(ab)₂)および単鎖バージョンを含むポリクローナルおよびモノクローナル抗体を製造する方法は周知である。しかし、多くの抗原は十分な抗体応答を引き起こすことができない。ある態様では、本発明の可溶性複合体および抗原を含有する組成物は、動物に投与され、そのようにして動物における免疫応答を誘発する。ポリクローナルまたはモノクローナル抗体は標準的な技術によって、その後に調製される。

【0109】

以下の実施例、参考文献、配列表および図面は、本発明の理解を補助するために提供され、本発明の真の範囲は、添付の特許請求の範囲に示される。発明の意図を逸脱することなく示される手順において変更がなされることが理解される。

【実施例】

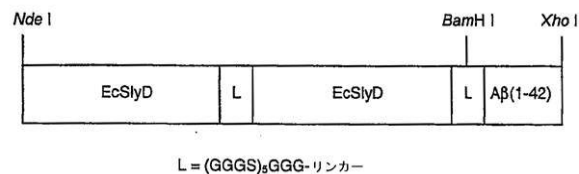
【0110】

実施例1 SS-A β (1-42)発現ベクターの構築

シャペロンSlyDをコードする遺伝子は、大腸菌(Ec)の染色体から決まりきったクローニング手順により単離された。組換え発現のために、SlyDのアミノ酸1~165(=EcSlyD)をコードするDNA構築物を調製した。融合パートナーとしてEcSlyD(1-165)(=SS)を2回および標的タンパク質としてA β (1-42)を含有する発現ベクターを構築した。

【0111】

Novagen(Madison, WI, USA)のpET24a発現プラスミドに基づいて、以下のクローニング工程を行った。ベクターをNdeIおよびXhoIで消化し、タンデム-EcSlyDおよびA β (1-42)を含有する半合成カセットを挿入した：



【0112】

得られたプラスミドの挿入物を配列決定し、所望の融合タンパク質をコードしていることを見出した。

【0113】

挿入されたカセットの核酸配列(=配列番号：1)を以下に示す：

10

20

30

CATATGAAAGTAGCAAAAGACCTGGTGGTCAGCCTGGCCTATCAGGTACGT
 ACAGAAGACGGTGTGTTGGTTGATGAGTCTCCGGTGAGTGCGCCGCTGGA
 CTACCTGCATGGTCACGGTTCCTGATCTCTGGCCTGGAAACGGCGCTGGA
 AGGTCATGAAGTTGGCGACAAATTTGATGTCGCTGTTGGCGCGAACGACGC
 TTACGGTCAGTACGACGAAAAACCTGGTGCAACGTGTTCTAAAGACGTATT
 TATGGGCGTTGATGAACTGCAGGTAGGTATGCGTTTCTGGCTGAAACCGA
 CCAGGGTCCGGTACCGGTTGAAATCACTGCGGTTGAAGACGATCAGTCG
 TGGTTGATGGTAACCATGCTGGCCGGTCAGAACCTGAAATTCAACGTTG
 AAGTTGTGGCGATTGCGGAAGCGACTGAAGAAGAACTGGCTCATGGTCAC
 GTTCACGGCGCGCACGATCACCACCACGATCAGACCACGACGGTGGCGG
 TTCCGGCGGTGGCTCTGGTGGCGGAAGCGGTGGCGGTTCCGGCGGTGGCT
 CTGGTGGCGGTAAAGTAGCAAAAGACCTGGTGGTCAGCCTGGCCTATCAG
 GTACGTACAGAAGACGGTGTGTTGGTTGATGAGTCTCCGGTGAGTGCGCC
 GCTGGACTACCTGCATGGTCACGGTTCCTGATCTCTGGCCTGGAAACGGC
 GCTGGAAGGTTCATGAAGTTGGCGACAAATTTGATGTCGCTGTTGGCGCGAA
 CGACGCTTACGGTCAGTACGACGAAAAACCTGGTGCAACGTGTTCTAAAGA
 CGTATTTATGGGCGTTGATGAACTGCAGGTAGGTATGCGTTTCTGGCTGA
 AACCGACAGGGTCCGGTACCGGTTGAAATCACTGCGGTTGAAGACGATC
 ACGTCGTGGTTGATGGTAACCATGCTGGCCGGTCAGAACCTGAAATTCA
 ACGTTGAAGTTGTGGCGATTGCGGAAGCGACTGAAGAAGAACTGGCTCAT
 GGTACGTTTCACGGCGCGCACGATCACCACCACGATCAGACCACGACGG
 TGGCGGTTCCGGCGGTGGCTCTGGTGGCGGATCCGGTGGCGGTTCCGGCG
 GTGGCTCTGGTGGCGGTGACGCTGAATTCGTCACGACTCCGGTTACGAA
 GTTCACCACCAGAACTGGTTTCTTCGCTGAAGACGTTGGTTCCAACAAA
 GGTGCTATCATCGGTCTGATGGTTGGTGGTGTGTTATCGCTCTCGAGCAC
 CACCACCACCACCTGA

10

20

【 0 1 1 4 】

得られた融合ポリペプチドのアミノ酸配列を以下に示す (= 配列番号 : 2) :

1 MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETEALE

51 GHEVGDKFDV AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL
 QVGMRFLEAT

30

101 DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR
 EATEEELAHG

151 HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG SGGSGGGKV
 AKDLVVSLEY

201 QVRTEDGVLV DESPVSA PLDYLHGHGSLIS GLETELEGHE
 VGDKFDVAVG

251 ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG
 PVPVEITAVE

40

301 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH
 GAHDHHHDHD

351 HDGGSGGGG GGGSGGGSGG GSGGGDAEFR HD SGYEVHHQ
 KLVFFAEDVG

401 SNKGAIIGLM VGGVVIALEH HHHHHH

【 0 1 1 5 】

実施例 2 : SS-A β (1-42) 融合タンパク質の産生および精製

50

発現プラスミドを保有する大腸菌BL21(DE3)細胞をLB培地 + カナマイシンにおいてOD600 (600nmでの光学密度)が1になるまで増殖させ、イソプロピル- β -D-チオガラクトシド(IPTG)を最終濃度1mMまで添加することにより細胞質ゾル過剰発現を37℃の増殖温度で誘導した。誘導の4時間後、細胞を遠心分離により収集し(5000xgで20分)、-20℃で凍結させ、保存した。細胞溶解のために、凍結ペレットを室温の50mM Tris/HCl pH8.5, 7.0M GuHCl, 5mMイミダゾール中に再懸濁し、得られた懸濁物をPolytronic(登録商標)PT3100ホモジナイザー(Kinematica)での処理にさらに供した。遠心分離(20000xg, 4℃, 30分)および濾過後、溶解物を前述の溶解バッファーで予め平衡化したNi-NTA(ニッケル-ニトリロ三酢酸)カラムにアブライした。

【0116】

10

過剰の洗浄工程(>20カラム体積の溶解バッファー)後、マトリックス結合タンパク質を再折り畳みさせるために、カオトロピック溶解バッファーを50mMリン酸ナトリウムpH7.8, 100mM塩化ナトリウムに置換した。少なくとも10カラム体積の再折り畳みバッファーをアブライし、残存するカオトロピックまたは干渉濃縮物中にGuHClが存在しないことを確実にした。最後に、ネイティブな融合タンパク質を50mMリン酸ナトリウムpH7.8, 100mM塩化ナトリウム中の5~500mMイミダゾール勾配を適用することにより溶出させた。タンパク質を含有する画分をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により純度について評価し、プールした。

【0117】

興味深いことに、SS-A β (1-42)は可溶性タンパク質として溶出する。A β (1-42)自身がよく知られた疎水性にも関わらず、組換え産生およびマトリックス再折り畳み融合タンパク質のUVスペクトルはいかなる凝集傾向も示唆しない。図1に示されるように、生理的バッファー条件中のSS-A β のUV-吸収スペクトルのベースラインは、横座標(310nmより高い)とほぼ等しく、従って自己会合または凝集現象から生じる迷光粒子は存在しないことを示す。実際、図1に示されるスペクトルの形状は、診断ツール(例えば、A β 免疫アッセイのための標準として)または免疫原として有用であることが証明されるはずであるA β (1-42)ペプチドを含有する可溶性の取り扱いが容易な融合ポリペプチドを指す。

20

【0118】

手短に言えば、本明細書に記載される方法は、可溶性形態の高量(>20mg融合タンパク質/大腸菌細胞集団の湿潤重量g)のA β の簡便な組換え産生を容易にする。

30

【0119】

融合タンパク質SS-A β (1-42)は、Ni-NTAカラムから、約150mMイミダゾールで溶出する。融合タンパク質を含有するプール画分の純度を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により評価した。SDS-PAGEにより示されるように、単一組み合わせ産生および再生工程において得られる融合ポリペプチドの純度は、単純な単一工程クロマトグラフィープロトコル後に90%を超える(図2参照)。

【0120】

参考文献のリスト

- Aslam, M. and Dent, A., The preparation of protein-protein conjugates in "Bioconjugation", eds. M. Aslam and A. Dent, McMillan Reference, London (1998), pp. 216-363
- Braden, B.C., and Poljak, R.J., *Faseb J.* 9 (1995) 9-16
- Crooke, E., and Wickner, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 5216-5220
- Danese, P.N., et al., *Genes Dev.* 9 (1995) 387-398
- Dartigalongue, C., and Raina, S., *Embo J.* 17 (1998) 3968-3980
- Egan, D. A., et al., *Biochemistry* 32 (1993) 1920-1927
- EP-A-0 061 888
- Fischer, G., et al., *Nature* 337 (1989) 476-478
- Glenner, G.G., and Wong, C.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120 (1984) 885-890
- Glenner, G.G., and Wong, C.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122 (1984) 1131-1135
- Hottenrott, S., et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 15697-15701
- Iwatsubo, T., et al., *Neuron* 13 (1994) 45-53
- Kang, J., et al., *Nature* 325 (1987) 733-736
- Kay, J. E., *Biochem J.* 314 (1996) 361-385
- Lane, W.S., et al., *J. Protein Chem.* 10 (1991) 151-160
- Masters, C.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 4245-4249
- Rahfeld, J.U., et al., *FEBS Lett.* 352 (1994) 180-184
- Ramm, K., and Pluckthun, A., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 17106-17113
- Roher, A.E., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 10836-10840
- Schmid, F. X., *Molecular chaperones in the life cycle of proteins*, eds. A.L. Fink and Y. Goto, Marcel Dekker Inc., New York (1998), pp. 361-389
- Scholz, C., et al., *Embo J.* 16 (1997) 54-58
- Scholz, C., et al., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12703-12707
- Selkoe, D.J., et al., *J. Neurochem.* 46 (1986) 1820-1834
- Selkoe, D.J., *J. Neuropath. and Exp. Neurol.* 53 (1994) 438-447
- Selkoe, D.J., *Neuron* 6 (1991) 487
- Stoller, G., et al., *Embo J.* 14 (1995) 4939-4948
- SWISS-PROT, accession number P 45523
- Tijssen, In: "Methods in Enzymology", eds. S.P. Colowick, N.O. Caplan, Academic Press (1980)
- Tijssen, P., Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates, In: "Practice and theory of enzyme immunoassays", eds. R.H. Burdon and v. P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam (1990), pp. 221-278
- US Patent 5,942,252
- WO 98/13496

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【 0 1 2 1 】

【図 1】図 1 は、マトリックス支援再折りたたみおよびグラジエント溶出後の SS-A β (1 ~ 42) の UV スペクトルである。50 mM リン酸ナトリウム pH 7.8 および 100 mM 塩化ナトリウムのバッファー中の約 150 mM イミダゾール濃度で Ni-NTA (ニッケルニトリロ三酢酸) カラムから溶出した A β -シャペロン複合体。UV スペクトルは、36 μ M のタンパク質濃度でモニタリングされた。スペクトルの形状 (特に波長領域 > 300 nm において) は、「シャペロンされた」アルツハイマー-A β ペプチドの顕著な可溶性を強調する。集合または会合減少を示す迷光効果は観察されない。明らかに、シャペロンキャリア SlyD-SlyD (= SS) は、そうでなければ集合しがちなペプチド A β (1 ~ 42) に例外的な可溶性を付与する。

【図 2】図 2 は、SDS-PAGE によって文書化された SS-A β (1 ~ 42) の精製を示す。マトリ

ックス支援再折りたたみによって得られるようなSS-A β (1~42)を、SDS-PAGEによって分析した。示されている試料は：Novagenのタンパク質標準M12(レーン1)、カオトロピック溶解後の不溶性画分(レーン2)、カオトロピック溶解後の可溶性画分(レーン3)、Ni-NTAフロースルー(flowthrough)(レーン5)、マトリックス支援再折りたたみ後のSS-A β (1~42)を含む溶出プール(レーン7)である。レーン4およびレーン6には、サンプルをアプライしなかった。ゲルは、組換え的に生成された可溶性SS-A β (1~42)が簡単な一段階再生/精製プロトコールによって入手可能(90%を超える驚くべき高い純度で)であることを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

5 <110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Soluble complexes of target proteins and peptidyl
prolyl isomerase chaperones and methods of making and
using them

10 <130> 21547 WO

<140>
<141>

15 <160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1
<211> 1281
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

25 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: coding for a
fusion protein

30 <220>
<221> CDS
<222> (4)..(1278)

<400> 1
cat atg aaa gta gca aaa gac ctg gtg gtc agc ctg gcc tat cag gta
48

35 Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val
1 5 10 15

cgt aca gaa gac ggt gtg ttg gtt gat gag tct ccg gtg agt gcg ccg
96

40 Arg Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro
20 25 30

ctg gac tac ctg cat ggt cac ggt tcc ctg atc tct ggc ctg gaa acg
144

45 Leu Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr
35 40 45

gcg ctg gaa ggt cat gaa gtt ggc gac aaa ttt gat gtc gct gtt ggc
192

50 Ala Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly
50 55 60

gcg aac gac gct tac ggt cag tac gac gaa aac ctg gtg caa cgt gtt
240

55 Ala Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val
65 70 75

cct aaa gac gta ttt atg ggc gtt gat gaa ctg cag gta ggt atg cgt
288

10

20

30

40

Pro Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg
 80 85 90 95
 5 ttc ctg gct gaa acc gac cag ggt ccg gta ccg gtt gaa atc act gcg
 336
 Phe Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala
 100 105 110
 10 gtt gaa gac gat cac gtc gtg gtt gat ggt aac cac atg ctg gcc ggt
 384
 Val Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly
 115 120 125
 15 cag aac ctg aaa ttc aac gtt gaa gtt gtg gcg att cgc gaa gcg act
 432
 Gln Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr
 130 135 140
 20 gaa gaa gaa ctg gct cat ggt cac gtt cac ggc gcg cac gat cac cac
 480
 Glu Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His
 145 150 155
 25 cac gat cac gac cac gac ggt ggc ggt tcc ggc ggt ggc tct ggt ggc
 528
 His Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 160 165 170 175
 30 gga agc ggt ggc ggt tcc ggc ggt ggc tct ggt ggc ggt aaa gta gca
 576
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Lys Val Ala
 180 185 190
 35 aaa gac ctg gtg gtc agc ctg gcc tat cag gta cgt aca gaa gac ggt
 624
 Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg Thr Glu Asp Gly
 195 200 205
 40 gtg ttg gtt gat gag tct ccg gtg agt gcg ccg ctg gac tac ctg cat
 672
 Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Tyr Leu His
 210 215 220
 45 ggt cac ggt tcc ctg atc tct ggc ctg gaa acg gcg ctg gaa ggt cat
 720
 Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala Leu Glu Gly His
 225 230 235
 50 gaa gtt ggc gac aaa ttt gat gtc gct gtt ggc gcg aac gac gct tac
 768
 Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala Asn Asp Ala Tyr
 240 245 250 255
 55 ggt cag tac gac gaa aac ctg gtg caa cgt gtt cct aaa gac gta ttt
 816
 Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Asp Val Phe
 260 265 270

10

20

30

atg ggc gtt gat gaa ctg cag gta ggt atg cgt ttc ctg gct gaa acc
 864
 Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu Ala Glu Thr
 275 280 285
 5
 gac cag ggt ccg gta ccg gtt gaa atc act gcg gtt gaa gac gat cac
 912
 Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu Asp Asp His
 290 295 300
 10
 gtc gtg gtt gat ggt aac cac atg ctg gcc ggt cag aac ctg aaa ttc
 960
 Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn Leu Lys Phe
 305 310 315
 15
 aac gtt gaa gtt gtg gcg att cgc gaa gcg act gaa gaa gaa ctg gct
 1008
 Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu Glu Glu Leu Ala
 320 325 330 335
 20
 cat ggt cac gtt cac ggc gcg cac gat cac cac cac gat cac gac cac
 1056
 His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His Asp His Asp His
 340 345 350
 25
 gac ggt ggc ggt tcc ggc ggt ggc tct ggt ggc gga tcc ggt ggc ggt
 1104
 Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 355 360 365
 30
 tcc ggc ggt ggc tct ggt ggc ggt gac gct gaa ttc cgt cac gac tcc
 1152
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser
 370 375 380
 35
 ggt tac gaa gtt cac cac cag aaa ctg gtt ttc ttc gct gaa gac gtt
 1200
 Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
 385 390 395
 40
 ggt tcc aac aaa ggt gct atc atc ggt ctg atg gtt ggt ggt gtt gtt
 1248
 Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 400 405 410 415
 45
 atc gct ctc gag cac cac cac cac cac tga
 1281
 Ile Ala Leu Glu His His His His His His
 420 425
 50
 <210> 2
 <211> 425
 <212> PRT
 55
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: coding for a
 fusion protein
 <400> 2

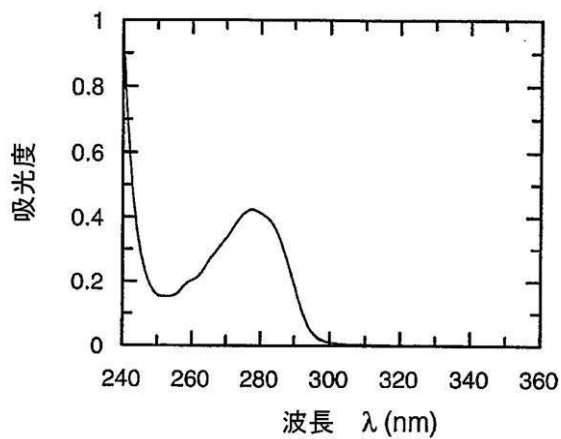
	Met	Lys	Val	Ala	Lys	Asp	Leu	Val	Val	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gln	Val	Arg	
	1				5					10					15		
5	Thr	Glu	Asp	Gly	Val	Leu	Val	Asp	Glu	Ser	Pro	Val	Ser	Ala	Pro	Leu	
				20					25					30			
	Asp	Tyr	Leu	His	Gly	His	Gly	Ser	Leu	Ile	Ser	Gly	Leu	Glu	Thr	Ala	
			35					40					45				
10	Leu	Glu	Gly	His	Glu	Val	Gly	Asp	Lys	Phe	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Ala	
		50					55					60					
	Asn	Asp	Ala	Tyr	Gly	Gln	Tyr	Asp	Glu	Asn	Leu	Val	Gln	Arg	Val	Pro	
	65					70					75					80	
15	Lys	Asp	Val	Phe	Met	Gly	Val	Asp	Glu	Leu	Gln	Val	Gly	Met	Arg	Phe	
				85						90					95		
20	Leu	Ala	Glu	Thr	Asp	Gln	Gly	Pro	Val	Pro	Val	Glu	Ile	Thr	Ala	Val	
				100				105						110			
	Glu	Asp	Asp	His	Val	Val	Val	Asp	Gly	Asn	His	Met	Leu	Ala	Gly	Gln	
			115					120					125				
25	Asn	Leu	Lys	Phe	Asn	Val	Glu	Val	Val	Ala	Ile	Arg	Glu	Ala	Thr	Glu	
		130					135					140					
	Glu	Glu	Leu	Ala	His	Gly	His	Val	His	Gly	Ala	His	Asp	His	His	His	
	145					150					155					160	
30	Asp	His	Asp	His	Asp	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
					165					170					175		
35	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Lys	
				180					185						190		
	Asp	Leu	Val	Val	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gln	Val	Arg	Thr	Glu	Asp	Gly	Val	
			195					200					205				
40	Leu	Val	Asp	Glu	Ser	Pro	Val	Ser	Ala	Pro	Leu	Asp	Tyr	Leu	His	Gly	
		210					215					220					
	His	Gly	Ser	Leu	Ile	Ser	Gly	Leu	Glu	Thr	Ala	Leu	Glu	Gly	His	Glu	
	225					230					235					240	
45	Val	Gly	Asp	Lys	Phe	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Ala	Asn	Asp	Ala	Tyr	Gly	
					245					250					255		
	Gln	Tyr	Asp	Glu	Asn	Leu	Val	Gln	Arg	Val	Pro	Lys	Asp	Val	Phe	Met	
			260						265					270			
50	Gly	Val	Asp	Glu	Leu	Gln	Val	Gly	Met	Arg	Phe	Leu	Ala	Glu	Thr	Asp	
			275					280					285				
55	Gln	Gly	Pro	Val	Pro	Val	Glu	Ile	Thr	Ala	Val	Glu	Asp	Asp	His	Val	
		290					295					300					
	Val	Val	Asp	Gly	Asn	His	Met	Leu	Ala	Gly	Gln	Asn	Leu	Lys	Phe	Asn	
	305					310					315					320	

Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu Glu Glu Leu Ala His
 325 330 335
 5 Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His Asp His Asp His Asp
 340 345 350
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 355 360 365
 10 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly
 370 375 380
 Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly
 385 390 395 400
 15 Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile
 405 410 415
 20 Ala Leu Glu His His His His His His
 420 425
 25

10

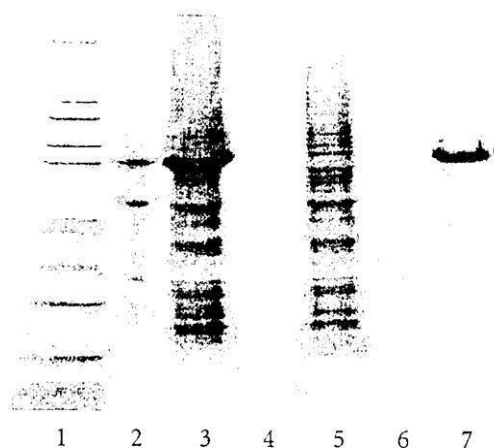
【 図 1 】

Figure 1



【 図 2 】

Figure 2



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成17年8月3日 (2005.8.3)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

共有結合したA β およびPPIシャペロンを含む可溶性A β -シャペロン複合体の製造方法であって：

該ポリペプチドを可溶化する工程、

およびバッファーを生理的条件下に調節する工程を含み、

ここで、形成されたA β -シャペロン複合体は、7.4のpHを有し、20 mMリン酸ナトリウムおよび150 mM塩化ナトリウムからなる溶液中で測定した場合に少なくとも100 nM溶解できる製造方法。――

【 請求項 2 】

7.4のpHを有し、20 mMリン酸ナトリウムおよび150 mM塩化ナトリウムからなる溶液中に少なくとも100 nM溶解できる複合体であって：

A β 、および

ペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンを含み、

ここで、A β とペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンとが共有結合している複合体。

【 請求項 3 】

A β とペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンとが共有結合している、請求項 2記載の複合体。

【 請求項 4 】

7.4のpHを有し、20 mMリン酸ナトリウムおよび150 mM塩化ナトリウムからなる溶液中に少なくとも100 nM溶解できる組換えポリペプチドであって：

A β 、

ペプチド性リンカー、および

ペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンを含む、組換えポリペプチド。

【請求項 5】

A β ペプチドが A β (1~40)、A β (1~42) および A β (1~43) からなる群から選択される、請求項 1 記載の方法、請求項 2 もしくは 3 記載の可溶性複合体または請求項 4 記載の組換えポリペプチド。

【請求項 6】

イムノアッセイにおける請求項 2 もしくは 3 記載の A β -シャペロン複合体または請求項 4 記載の組換えタンパク質の使用。

【請求項 7】

請求項 2 もしくは 3 記載の可溶性 A β -シャペロン複合体または請求項 4 記載の組換えタンパク質および A β 測定を行うための補助試薬を含む試薬の少なくとも1つの構成物を含むキット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/14631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C07K14/47	C12N15/62 C12N9/90 G01N33/53 G01N33/68
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C07K C12N		
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, MEDLINE, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 316 405 B1 (SOLOMON MICHAEL E ET AL) 13 November 2001 (2001-11-13) column 9, paragraph 2	1-10
Y	US 6 207 420 B1 (DAVIS GREGORY D ET AL) 27 March 2001 (2001-03-27) claim 13	1-10
A	IVERY MICHAEL T G: "Immunophilins: Switched on protein binding domains?" MEDICINAL RESEARCH REVIEWS, vol. 20, no. 6, November 2000 (2000-11), pages 452-484, XP009010948 ISSN: 0198-6325 the whole document	1-10

	--- --	
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
16 May 2003		02/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Weikl, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/14631

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 26251 A (HOLTZMAN JORDAN L) 11 May 2000 (2000-05-11) the whole document	1-10
A	--- YANG YUNNING ET AL: "The chaperone BiP/GRP78 binds to amyloid precursor protein and decreases Abeta40 and Abeta42 secretion." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 40, 2 October 1998 (1998-10-02), pages 25552-25555, XP002241416 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-10
A	--- MATSUBARA ET AL: "Apolipoprotein J and Alzheimer's amyloid ss solubility" BIOCHEMICAL JOURNAL, PORTLAND PRESS, LONDON, GB, vol. 316, 1996, pages 671-679, XP002138702 ISSN: 0264-6021 abstract	1-10
A	--- EHRNSPERGER MONIKA ET AL: "Stabilization of proteins and peptides in diagnostic immunological assays by the molecular chaperone Hsp25." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 259, no. 2, 1 June 1998 (1998-06-01), pages 218-225, XP002241417 ISSN: 0003-2697 the whole document	1-10
A	--- PENNISI E: "Expanding the eukaryote's cast of chaperones." SCIENCE. UNITED STATES 6 DEC 1996, vol. 274, no. 5293, 6 December 1996 (1996-12-06), pages 1613-1614, XP009010982 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/14631

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 6316405	B1	13-11-2001	AU	8918998 A	16-03-1999
			AU	9203898 A	16-03-1999
			WO	9910373 A1	04-03-1999
			WO	9910374 A1	04-03-1999
			US	6270957 B1	07-08-2001
US 6207420	B1	27-03-2001	US	5989868 A	23-11-1999
			AU	9482098 A	29-03-1999
			WO	9913091 A1	18-03-1999
WO 0026251	A	11-05-2000	AU	1810500 A	22-05-2000
			CA	2348545 A1	11-05-2000
			EP	1125135 A2	22-08-2001
			JP	2002528555 T	03-09-2002
			NO	20012114 A	14-06-2001
			WO	0026251 A2	11-05-2000

フロントページの続き

(72)発明者 ショルツ, クリスチャン

ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 8 2 3 7 7 ジンデルスドルファー シュトラーセ 3 5 アー

(72)発明者 シャールシュミット, ペーター

ドイツ連邦共和国 エーベルフィンゲ 8 2 3 9 0 ビルケンシュトラーセ 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA07 CA07 GA11 HA11

4B050 CC05 CC07 DD11 EE10 LL01 LL03

专利名称(译)	靶蛋白和肽基脯氨酰异构酶伴侣蛋白的可溶性复合物及其制备和使用方法		
公开(公告)号	JP2006522583A	公开(公告)日	2006-10-05
申请号	JP2004561108	申请日	2002-12-20
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ファーツエルケ シヨルツクリスチャン シャールシュミットペーター		
发明人	ファーツ,エルケ シヨルツ,クリスチャン シャールシュミット,ペーター		
IPC分类号	C12N9/90 G01N33/53 C12N15/09 C07K14/47 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 C07K14/4711 C12N9/90 C12Y502/01008 G01N2333/4709 G01N2800/2821		
FI分类号	C12N9/90.ZNA G01N33/53.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/CA07 4B024/GA11 4B024/HA11 4B050/CC05 4B050/CC07 4B050/DD11 4B050/EE10 4B050/LL01 4B050/LL03		
其他公开文献	JP4459819B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及阿尔茨海默病的诊断。本发明特别教导其作为产生可溶性A β -伴侣复合物的有益用途和免疫原性的用途是Ppplase家族的成员，并在免疫测定中检测A β 的特别是根据伴侣-A β 复合。

