

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/179646

発行日 平成31年2月21日 (2019. 2. 21)

(43) 国際公開日 **平成29年10月19日 (2017. 10. 19)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18 Z N A	4 B 0 6 4
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 H 0 4 5
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		

出願番号	特願2018-512059 (P2018-512059)	(71) 出願人	511292334 T A Oヘルスライフファーマ株式会社 京都府京都市左京区吉田下阿達町46-2 9 京都大学医薬系総合研究棟
(21) 国際出願番号	PCT/JP2017/015089	(74) 代理人	110000040 特許業務法人池内アンドパートナーズ
(22) 国際出願日	平成29年4月13日 (2017. 4. 13)	(72) 発明者	星 美奈子 京都市左京区聖護院川原町53番地 京都 大学医学研究科メディカルイノベーション センター T A Oヘルスライフファーマ株 式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2016-81030 (P2016-81030)		
(32) 優先日	平成28年4月14日 (2016. 4. 14)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロスフェロイド (A S P D) 様構造体及び医薬組成物

(57) 【要約】

細胞分泌型アミロスフェロイド様構造体及びそれを用いた医薬及びワクチン並びにそれらの製法の提供。

一態様において、アミロイド前駆体タンパク質 (A P P) 又はアミロイド タンパク質 (A) 配列を含むその一部を発現する細胞を培養液中で培養し、該培養液中に細胞分泌型アミロスフェロイド (A S P D) 様構造体を得る工程を含む製造方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞分泌型アミロスフェロイド (A S P D) 様構造体の製造方法であって、アミロイド前駆体タンパク質 (A P P) 又はアミロイドタンパク質 (A) 配列を含むその一部を発現する細胞を培養液中で培養し、該培養液中に細胞分泌型 A S P D 様構造体を得る工程を含む、製造方法。

【請求項 2】

さらに、前記培養液中から細胞分泌型 A S P D 様構造体を回収することを含む、請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 3】

前記細胞が、A P P 又は A 配列を含むその一部の発現系が導入された細胞である、請求項 1 又は 2 に記載の製造方法。

【請求項 4】

前記 A P P は、野生型、又は、1 若しくは複数のアミノ酸変異を有する前記野生型の変異体である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 5】

前記 A P P は、A アミノ酸配列の G X X X G モチーフにおけるグリシンにアミノ酸変異を有する変異体の A P P である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 6】

A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を培養した培養液中に得られる構造体であって、A S P D に特異的な抗体に対して抗原性を示す、細胞分泌型 A S P D 様構造体。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体を有効成分とする医薬組成物。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体を含むワクチン。

【請求項 9】

請求項 6 に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体、及び、抗 A S P D 抗体を含むキット。

【請求項 10】

請求項 6 に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体の能動ワクチンとしての使用。

【請求項 11】

ワクチン製造における請求項 6 に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体の使用。

【請求項 12】

請求項 6 に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体の、A S P D 測定における標準物質としての使用。

【請求項 13】

A S P D が起因となる疾病の予防、改善、及び / 又は治療の方法であって、請求項 6 に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体、請求項 7 に記載の医薬組成物、又は、請求項 8 に記載のワクチンを対象に投与することを含む、方法。

【請求項 14】

A S P D が起因となる疾病が、アルツハイマー病及び / 又はレビー小体型認知症である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

A S P D、A S P D に起因する疾病、又は、アルツハイマー病及び / 又はレビー小体型認知症に対する免疫を対象に獲得させる方法であって、請求項 6 に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体、請求項 7 に記載の医薬組成物、又は、請求項 8 に記載のワクチンを対象に投与することを含む、方法。

【請求項 16】

請求項 6 に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体と、薬学的に許容される腑形剤とを組み合わせることを含む、医薬組成物又はワクチンの製造方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

請求項 6 に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体と、抗 A S P D 抗体とを組み合わせることを含む、キットの製造方法。

【請求項 18】

A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を有する、非ヒト動物。

【請求項 19】

A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を培養した培養液中に形成される構造体であって、A S P D 特異的抗体に対して抗原性を示す構造体の形成効率を指標とすることを含む、A S P D の形成に影響を与える物質のスクリーニング方法。

10

【請求項 20】

A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を培養した培養液中に分泌される、A 40、A 41、A 42、A 43 及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも 1 つを指標とする、A の C 末端切断に影響を与える物質のスクリーニング方法。

【請求項 21】

A の 25 ~ 37 番目のアミノ酸配列における G X X X G モチーフのグリシンに 1 又は複数の置換変異を有する変異型 A を含む液体を攪拌することで形成される合成 A S P D 様構造体。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、アミロスフェロイド (A S P D) 様構造体、その製造方法及びその使用、医薬組成物、その製造方法及びその使用、並びに、スクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アミロスフェロイド (amylospheroids (A S P D)) は、アミロイド タンパク質 (A) が約 30 個集まった直径約 10 nm の球状の A 集合体であって、アルツハイマー病が発症する不可逆的段階において重要な役割を果たすと考えられる構造体である。

30

【0003】

A S P D は、強い神経毒性を示す *in vitro* で合成された A 集合体 (すなわち、合成 A S P D) として単離された (非特許文献 1)。この合成 A S P D に対する特異的な抗体が作製され (特許文献 1 及び 2)、この抗体を用い、アルツハイマー病のヒト患者の脳から、実際に、生体内で形成された A S P D (すなわち、ネイティブ A S P D) が単離された (非特許文献 1)。

【0004】

ネイティブ A S P D 及び合成 A S P D は、同様に、成熟神経細胞に対して選択的に細胞死を誘発する。この神経細胞死における A S P D のターゲットが、神経の生存と機能に極めて重要な役割を果たしているシナプスタンパク質「N a⁺, K⁺ - A T P a s e ポンプの 3 サブユニット (以下、N A K 3)」であることが発見され、A S P D の結合により N A K 3 の機能が低下し、神経細胞が過剰に興奮することで神経細胞が死に至ることが明らかにされた (特許文献 3、非特許文献 2)。

40

【0005】

アルツハイマー病における臨床症状と最も相関するのが神経細胞の脱落である。神経細胞脱落が認められるアルツハイマー病患者の大脳皮質におけるネイティブ A S P D 量は、アルツハイマー病の重症度に相関して増加し、そして、神経細胞脱落があまり認められないアルツハイマー病患者の小脳におけるネイティブ A S P D 量は微量しか存在しないことが明らかとなった (非特許文献 3)。したがってアミロスフェロイドは、アルツハイマー病が発症する不可逆的段階において重要な役割を果たすと考えられる。さらに、ネイティ

50

ブ A S P D は、レビー小体型認知症患者の脳からも検出されており（非特許文献 3）、レビー小体型認知症においても A S P D はその発症において重要な役割を果たすと考えられる。

【 0 0 0 6 】

ネイティブ A S P D と等価であると考えられる合成 A S P D は、A を含む液体をゆっくり攪拌することにより製造されうる（非特許文献 1、特許文献 4）。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 W O 2 0 0 6 / 0 1 6 6 4 4

10

【 特許文献 2 】 W O 2 0 0 9 / 0 5 7 6 6 4

【 特許文献 3 】 W O 2 0 1 3 / 0 9 9 8 0 6

【 特許文献 4 】 W O 2 0 1 3 / 0 9 4 6 1 4

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 Hoshi et al., Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3, PNAS May 27, 2003 vol. 100 no. 11 6370-6375

【 非特許文献 2 】 Ohinishi et al., Na, K-ATPase 3 is a death target of Alzheimer patient amyloid- β assembly, PNAS August 11, 2015 vol. 112 no. 32 E4465-E4474

20

【 非特許文献 3 】 Noguchi et al., Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (A β) assembly from Alzheimer disease brains, J Biol Chem. 2009 Nov 20;284(47):32895-905

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

上述のとおり、アミロスフェロイド（A S P D）はアルツハイマー病やレビー小体型認知症において重要な役割を果たす。現時点では、ネイティブ A S P D を患者脳から精製して治療薬などの開発に使うことは非常に困難である。よって、患者脳に存在するネイティブ A S P D と等価若しくは部分的に等価な A S P D 様構造体が製造し易くなれば、アルツハイマー病やレビー小体型認知症の研究、並びに、これらの疾病に対する予防方法及び予防薬、及び、治療方法及び予防・治療薬の開発に大きく寄与するものと考えられる。

30

【 0 0 1 0 】

アミロイドタンパク質（A）を含む液体をゆっくり攪拌することで、ネイティブ A S P D とほぼ等価である合成 A S P D を in vitro で製造できる（非特許文献 1 及び特許文献 4）。そして、合成 A S P D は、アジュバントなしでウサギに免疫を誘導できること、老齢サルで一定のワクチン効果があり安全であることが見出された。一方で、合成 A S P D は、製造ロットごとに A S P D 量がある程度上下すること、製造された A S P D の長期保管が難しいこと、製造量のスケールアップが困難であること等の問題も見出された。

【 0 0 1 1 】

そこで、本開示は、一態様において、A S P D 様構造体及びその製造方法を提供する。

40

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 2 】

本開示は、一態様において、細胞分泌型 A S P D 様構造体の製造方法であって、A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する細胞を培養液中で培養し、該培養液中に細胞分泌型 A S P D 様構造体を得る工程を含む製造方法に関する。

【 0 0 1 3 】

本開示は、その他の態様において、A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を培養した培養液中に得られる構造体であって、A S P D に特異的な抗体に対して抗原性を示す、細胞分泌型 A S P D 様構造体に関する。

50

【 0 0 1 4 】

本開示は、その他の態様において、細胞分泌型 A S P D 様構造体を有効成分とする医薬組成物とする。

本開示は、その他の態様において、細胞分泌型 A S P D 様構造体を含むワクチンに関する。

本開示は、その他の態様において、細胞分泌型 A S P D 様構造体の能動ワクチンとしての使用に関する。

本開示は、その他の態様において、ワクチン製造における細胞分泌型 A S P D 様構造体の使用に関する。

本開示は、その他の態様において、細胞分泌型 A S P D 様構造体の、A S P D 測定における標準物質としての使用に関する。

10

【 0 0 1 5 】

本開示は、その他の態様において、A S P D が起因となる疾病の予防、改善、及び/又は治療の方法であって、細胞分泌型 A S P D 様構造体、前記医薬組成物、又は、前記ワクチンを対象に投与することを含む方法に関する。

本開示は、その他の態様において、A S P D、A S P D に起因する疾病、又は、アルツハイマー病及び/又はレビー小体型認知症に対する免疫を対象に獲得させる方法であって、細胞分泌型 A S P D 様構造体、前記医薬組成物、又は、前記ワクチンを対象に投与することを含む方法に関する。

本開示は、その他の態様において、細胞分泌型 A S P D 様構造体と、薬学的に許容される腑形剤とを組み合わせることを含む、医薬組成物又はワクチンの製造方法に関する。

20

【 0 0 1 6 】

本開示は、その他の態様において、細胞分泌型 A S P D 様構造体、及び、抗 A S P D 抗体を含むキットに関する。

本開示は、その他の態様において、細胞分泌型 A S P D 様構造体と、抗 A S P D 抗体とを組み合わせることを含む、キットの製造方法に関する。

本開示は、その他の態様において、A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を有する非ヒト動物に関する。

【 0 0 1 7 】

本開示は、その他の態様において、A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を培養した培養液中に形成される、A S P D に特異的な抗体に対して抗原性を示す構造体の形成効率を指標とすることを含む、A S P D の形成に影響を与える物質のスクリーニング方法に関する。

30

本開示は、A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を培養した培養液中に分泌される、A 4 0、A 4 1、A 4 2、A 4 3 及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1つを指標とする、A の C 末端切断に影響を与える物質のスクリーニング方法に関する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 8 】

【 図 1 】 図 1 は、発現させた A P P のバリエーション及びそれらの変異体の変異箇所を説明する概略図である。

40

【 図 2 】 図 2 は、試験例 1 ~ 1 4 の A P P の発現系で過剰発現させた細胞の培養液中の A S P D 濃度の測定結果を示すグラフである。

【 図 3 】 図 3 は、試験例 1 ~ 1 4 の A P P の発現系で過剰発現させた細胞の培養液中の A 1 - 4 0 濃度の測定結果を示すグラフである。

【 図 4 】 図 4 は、試験例 1 ~ 1 4 の A P P の発現系で過剰発現させた細胞の培養液中の A 1 - 4 2 濃度の測定結果を示すグラフである。

【 図 5 】 図 5 は、h A P P 6 9 5 s w - G 3 3 X を過剰発現させた細胞の培養液中の A S P D 濃度の測定結果を示すグラフである。

【 図 6 】 図 6 は、h A P P 6 9 5 s w - G 3 3 X を過剰発現させた細胞の培養液中の A

50

1 - 40 濃度の測定結果を示すグラフである。

【図7】図7は、hAPP695sw-G33Xを過剰発現させた細胞の培養液中のA1-42濃度の測定結果を示すグラフである。

【図8】図8は、合成ASPDの免疫原性を評価した結果の一例を示すグラフである。

【図9】図9は、合成ASPD（野生型）及び合成ASPD（G33L型）の神経細胞毒性を確認した結果の一例を示すグラフである。

【図10】図10は、試験例15～36のAPPの発現系で過剰発現させた細胞の培養液中のASPD濃度の測定結果を示すグラフである。

【図11】図11は、試験例15～36のAPPの発現系で過剰発現させた細胞の培養液中のA1-40濃度の測定結果を示すグラフである。

【図12】図12は、試験例15～36のAPPの発現系で過剰発現させた細胞の培養液中のA1-42濃度の測定結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本開示は、一又は複数の実施形態において、アミロイド前駆体タンパク質（APP）を発現する細胞を培養した培養液中にASPD様構造体の存在が確認されたことに基づく。

本開示は、一又は複数の実施形態において、簡便でスケールアップ可能な、細胞分泌型ASPD様構造体の提供に関する。

本開示における細胞分泌型ASPD様構造体は、一又は複数の実施形態において、保存安定性に優れる。

本開示における細胞分泌型ASPD様構造体は、一又は複数の実施形態において、Aモノマーの含有率を極めて低く製造することもできるため、限外ろ過によるAモノマーの除去が簡単となり、ワクチン等の製造効率の向上が可能となる。

また、本開示における細胞分泌型ASPD様構造体は、一又は複数の実施形態において、Aモノマーの含有率を低減できるから、生体に投与した場合の安全性を、例えば、ネイティブASPDや合成ASPDよりも、向上しうる。

【0020】

[アミロスフェロイド（ASPD）様構造体]

本開示において、ASPD様構造体とは、ASPDに特異的な抗体が抗原抗体反応する構造体、言い換えれば、ASPDに特異的な抗体に対して抗原性を示す構造体をいう。

なお、本開示において、単にアミロスフェロイド（ASPD）という場合には、ネイティブASPD及び合成ASPDを含みうる。

【0021】

ASPDに特異的な抗体としては、一又は複数の実施形態において、WO2006/016644及びWO2009/057664に開示されるポリクローナル抗ASPD抗体及びモノクローナル抗ASPD抗体が挙げられ、さらなる一又は複数の実施形態において、ウサギポリクローナル抗ASPD抗体（rpASD1、rpASD2及びrpASD3）、マウスモノクローナル抗ASPD抗体（MASD1、MASD2及びMASD3）、ハムスターモノクローナル抗ASPD抗体（haASD1、haASD2、haASD3、haASD4及びhaASD5）、並びに、ヒト化モノクローナル抗ASPD抗体（huASD2）等が挙げられる。

【0022】

[細胞分泌型ASPD様構造体]

本開示において、細胞分泌型ASPD様構造体は、本開示にかかる製造方法によって製造されるASPD様構造体をいう。一又は複数の実施形態において、APP又はA配列を含むその一部の発現系が導入された細胞の培養液中に見出されたASPD様構造体をいう。本開示に係る細胞分泌型ASPD様構造体は、APP又はA配列を含むその一部を発現する細胞の培養液中に得られるものであるから、細胞分泌型であるといえる。

【0023】

したがって、本開示は一態様において、APP又はA配列を含むその一部を発現する

10

20

30

40

50

発現系が導入された細胞を培養した培養液中に得られる構造体であって、A S P D に特異的な抗体に対して抗原性を示す、細胞分泌型 A S P D 様構造体に関する。

【 0 0 2 4 】

本開示に係る細胞分泌型 A S P D 様構造体は、一又は複数の実施形態において、A S P D と等価なものであってもよく、その他の一又は複数の実施形態において、A S P D と部分的に等価なものであってもよい。部分的に等価とは、少なくとも、A S P D に特異的な抗体が抗原抗体反応する構造体、言い換えれば、A S P D に特異的な抗体に対して抗原性を示す構造体であることをいう。

【 0 0 2 5 】

本開示に係る細胞分泌型 A S P D 様構造体は、一又は複数の実施形態において、A 集合体である。本開示において、単に A というときは、A 4 0 (A 1 - 4 0)、A 4 1 (A 1 - 4 1)、A 4 2 (A 1 - 4 2)、A 4 3 (A 1 - 4 3)、又はこれらの全部若しくは一部を指し得る。

10

【 0 0 2 6 】

本開示に係る細胞分泌型 A S P D 様構造体は、一又は複数の実施形態において、A S P D と同様の分子量であってもよく、その他の一又は複数の実施形態において、1 0 0 k D a 以上、又は、1 0 0 ~ 7 0 0 k D a である。

【 0 0 2 7 】

本開示に係る細胞分泌型 A S P D 様構造体は、A S P D 様構造体は、一又は複数の実施形態において、A S P D の細胞毒性、すなわち、機能的に成熟した神経細胞に選択的に細胞死を誘発する特性が、A S P D と同等であってもよく、或いは、A S P D よりも弱毒性であってもよく、或いは、細胞毒性を有していなくてもよく、或いは、A S P D と比べて毒性が高くてもよい。

20

【 0 0 2 8 】

本開示に係る細胞分泌型 A S P D 様構造体は、一又は複数の実施形態において、A S P D と同様な形状であってもよく、異なる形状であってもよい。本開示に係る細胞分泌型 A S P D 様構造体は、さらなる一又は複数の実施形態において、電子顕微鏡観察において直径 1 0 ~ 1 5 n m の球状であってもよく、該形状とは異なる形状であってもよい。

【 0 0 2 9 】

[細胞分泌型 A S P D 様構造体の製造方法]

30

本開示に係る細胞分泌型 A S P D 様構造体は、一又は複数の実施形態において、アミロイド前駆体タンパク質 (A P P) 又はアミロイドタンパク質 (A) 配列を含むその一部を発現する細胞を培養液中で培養することで、その培養液中に得ることができる。

したがって、本開示は一態様において、A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する細胞を培養液中で培養し、該培養液中に細胞分泌型 A S P D 様構造体を得る工程を含む、細胞分泌型 A S P D 様構造体の製造方法に関する。以下、前記製造方法を単に「本開示に係る製造方法」ともいう。

【 0 0 3 0 】

本開示に係る製造方法において、培養される細胞内で発現する A P P は、一又は複数の実施形態において、ヒト A P P であってもよく、ヒト以外の動物の A P P であってもよい。ヒト A P P は、h A P P 7 7 0、h A P P 7 5 1、及び h A P P 6 9 5 のいずれのスプライシングバリエーションであってもよい。A P P 及び A の配列は公知のデータベースからとることができる。例えば、h A P P 7 7 0 の N C B I のアクセッション番号は、N P _ 0 0 0 4 7 5 (VERSION NP_000475.1 GI:4502167) である。スプライシングバリエーションの配列は例えば U n i P r o t K B - P 0 5 0 6 7 (Modified: November 1, 1991 -v3) を参照できる。

40

【 0 0 3 1 】

また、本開示に係る製造方法の一又は複数の実施形態において、培養する細胞内で発現させる A P P は、細胞分泌型 A S P D 様構造体の形成量を向上させる点から、前記細胞に導入された A P P の発現系から発現させることが好ましく、かつ/あるいは、前記細胞に

50

おける過剰発現であることが好ましい。本開示に係る製造方法の一又は複数の実施形態において、培養する細胞内で発現させるAPPは、細胞分泌型ASPD様構造体の形成量を向上させる点から、APPのシグナル配列を有することが好ましい。

【0032】

本開示に係る製造方法の一又は複数の実施形態において、培養する細胞内で発現させるAPPは、野生型であってもよく、あるいは、変異型のAPPであってもよい。変異型APPとしては、家族性アルツハイマー病に連鎖する変異が挙げられ、例えば、Swedish変異、Italian変異、Leuven変異、Icelandic変異、London変異、Iranian変異、Austrian変異、German変異、French変異、Florida変異、Iberian変異、Australian変異、Belgian変異、Flemish変異、Icelandic変異、British変異、Tottori変異、Italian変異、Arctic変異、Osaka変異、Iowa変異、Dutch変異などが挙げられる。これらのなかでも、細胞分泌型ASPD様構造体の形成量を向上させる点からはSwedish変異を含むことが好ましい。

10

【0033】

さらに、本開示に係る製造方法の一又は複数の実施形態において、培養する細胞内で発現させるAPPは、細胞分泌型ASPD様構造体の形成効率を向上させる点から、Aの25～37番目のアミノ酸配列におけるGXGXGモチーフのグリシンに1又は複数の置換変異を有することが好ましい。すなわち、Aの25番目、29番目、33番目、及び37番目に相当するグリシンからなる群から選択される1又は複数のグリシンの置換変異を有することが好ましく、少なくとも33番目のグリシンの置換変異を有することが好ましい。置換変異としては、細胞分泌型ASPD様構造体の形成効率を向上する点、及び、培養液中のA量を低減する点から、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリン、メチオニン、チロシン、又はシステインへの置換変異が好ましい。本開示において、1又は複数とは、1、2、3若しくは4、又は、1、2若しくは3、又は、1若しくは2である。

20

その他の一又は複数の実施形態において、培養する細胞内で発現させるAPPは、細胞分泌型ASPD様構造体の形成効率を向上させる点から、Aの33番目及び37番目のグリシンの置換変異を有することが好ましい。本実施形態において、置換変異としては、細胞分泌型ASPD様構造体の形成効率を向上する点、及び、培養液中のA量を低減する点から、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリン、メチオニン、チロシン、又はシステインへの置換変異が好ましく、33番目及び37番目の少なくとも一方が、イソロイシンへの置換変異であることがより好ましい。

30

【0034】

本開示に係る製造方法の一又は複数の実施形態において、培養する細胞内で発現されるAPPは、細胞分泌型ASPD様構造体の形成効率を向上させる点から、Swedish変異並びにAの25番目、29番目、33番目、及び37番目に相当するグリシンからなる群から選択される1又は複数のグリシンの置換変異を有するものが挙げられる。その他の一又は複数の実施形態において、本開示におけるAPPは、hAPP770又はhAPP695においてSwedish変異並びにAの25番目、29番目、33番目、及び37番目に相当するグリシンからなる群から選択される1又は複数のグリシンの置換変異を有するものが挙げられる。さらにその他の一又は複数の実施形態において、本開示におけるAPPは、hAPP770又はhAPP695においてSwedish変異並びにAの33番目に相当するグリシンの置換変異を有するものが挙げられる。さらにその他の一又は複数の実施形態において、本開示におけるAPPは、hAPP770又はhAPP695においてSwedish変異並びにAの33番目及び37番目に相当するグリシンの置換変異（好ましくは少なくとも一方がイソロイシンへの置換変異）を有するものが挙げられる。本開示に係る製造方法の一又は複数の実施形態において、培養する細胞内で発現させるAPPは、ASPD様構造体の形成を著しく妨げない範囲でその他の変異を有してもよい。その他の変異としては、修飾アミノ酸、非天然アミノ酸、D-アミノ酸等

40

50

への変異を含みうる。修飾アミノ酸としては、一又は複数の実施形態において、アミノ基修飾、カルボキシル基修飾、チオール基修飾、水酸基修飾、糖化修飾、PEG化修飾等が挙げられる。

【0035】

本開示に係る製造方法の一又は複数の実施形態において、培養する細胞内で発現させるAPPは、APPの一部であってアミロイドタンパク質(A)配列を含む部分ペプチドであってもよい(該部分ペプチドを、以下では単に「APPの一部」ともいう)。ASPDは、APPから切り出されるAの集合体の一形態だからである。

本開示に係る製造方法の一又は複数の実施形態において、培養する細胞内で発現させるAPPの一部は、N末端が切断された形態であってもよく、さらなる一又は複数の実施形態において、N末端がシクレターゼの切断部位で切断された形態であってもよい。

本開示に係る製造方法の一又は複数の実施形態において、培養する細胞内で発現させるAPPの一部は、Aの1~43番目、1~42番目又は1~40番目を含む部分であることが挙げられ、さらなる一又は複数の実施形態において、Aの1~43番目、1~42番目又は1~40番目を含む部分、及び、APPのシグナル配列を有することが挙げられる。

【0036】

培養する細胞内におけるAPP又はその一部の発現は、APP又はその一部を発現可能な発現系を導入した細胞で行うことができる。APP又はその一部の発現は、一過性発現系によるものでもよく、安定発現細胞株によるのもであってもよい。APP又はその一部の発現は、ASPD様構造体の形成を妨げない範囲で、高発現又は過剰発現であることがASPD様構造体の形成量向上の点から好ましい。APP又はその一部の発現系は、制御可能なもであってもよい。

【0037】

APP又はその一部を発現可能な発現系は、一又は複数の実施形態において、APP又はその一部をコードする配列に、導入する宿主細胞に応じた発現調節配列が作動的に連結されている核酸を有する発現カセットが挙げられる。発現調節配列としては、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター等が挙げられ、その他には、開始コドン、イントロンのスプライシングシグナル、及び停止コドンなどが挙げられる。

【0038】

APP又はその一部の発現系は、一又は複数の実施形態において、発現させたい細胞(宿主)に応じた発現ベクターを適宜選択して導入することができる。該発現ベクターは、一又は複数の実施形態において、上述の発現カセットを有するベクターが挙げられる。発現ベクターとしては、一又は複数の実施形態において、プラスミド、コスミド、YACS、ウイルス(例えば、アデノウイルス、レトロウイルス、エピソームEBVなど)ベクター及びファージベクターが挙げられる。

【0039】

本開示に係る製造方法において培養する細胞は、APP又はその一部を発現する細胞である。本開示に係る製造方法において培養する細胞は、細胞分泌型ASPD様構造体の形成量向上の点から、APP又はその一部を発現可能な発現系が導入された細胞であることが好ましく、APP又はその一部を高発現若しくは過剰発現する又はすることが可能な細胞であることがより好ましい。本開示に係る製造方法のその他の実施形態において、APP又はその一部を発現する細胞は、遺伝子導入若しくはゲノム編集によりゲノムAPP遺伝子が過剰発現するようになった細胞であってもよい。

【0040】

また、本開示に係る製造方法において培養される細胞は、一又は複数の実施形態において、Aを産生可能な細胞が好ましく、シクレターゼとシクレターゼの双方が発現している細胞であることがより好ましい。

【0041】

APP又はその一部の発現系が導入される宿主細胞は、一又は複数の実施形態において

10

20

30

40

50

、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、微生物等、及びそれらの細胞株が挙げられる。動物細胞としては、哺乳類細胞、ヒト細胞、ヒト以外の哺乳類細胞が挙げられる。

A P P又はその一部の発現系が導入される宿主細胞は、一又は複数の実施形態において、取扱性の点から、細胞株が好ましい。限定されない具体的な細胞株としては、C H O細胞、H E K 2 9 3細胞、N e u r o 2 a細胞などが挙げられる。

【 0 0 4 2 】

本開示に係る製造方法におけるA P P又はその一部を発現する細胞の培養条件は、該細胞の種類、該細胞に導入されている発現系の種類、及び、その発現系の導入形態（一過性導入か安定導入か）などに応じて、当業者であれば、発現系に組み込まれたA P P又はその一部が発現（好ましくは過剰発現）するように、培地、温度、C O₂濃度などを適宜設定できる。

10

【 0 0 4 3 】

一又は複数の実施形態において、一過性のA P P発現系を用いる場合の培養としては、増殖培地で培養・形質導入し、その後、無血清培地に交換して24時間～48時間培養することが挙げられる。そして、前記培養の後に培地中に細胞分泌型A S P D様構造体が得られる。

【 0 0 4 4 】

細胞が動物細胞である場合、培地としては、M e d i u m 1 9 9培地、E a g l e ' s M i n i m u m E s s e n t i a l M e d i u m (E M E M)培地、M E M培地、D u l b e c c o ' s m o d i f i e d E a g l e ' s M e d i u m (D M E M)培地、H a m ' s F 1 2培地、R P M I 1 6 4 0培地、F i s c h e r ' s培地、およびこれらの混合培地などが挙げられる。これらの培地には、血清又は血清代替物が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、培地は、脂質、アミノ酸、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ビルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。

20

【 0 0 4 5 】

本開示に係る製造方法は、一又は複数の実施形態において、さらに、前記培養液中から細胞分泌型A S P D様構造体を回収することを含む。

培養液中の細胞分泌型A S P D様構造体の回収は、一又は複数の実施形態において、孔径0.22μmフィルターのろ液を50kDa又は100kDaの限外ろ過をした保持液を回収する工程により行うことができる。但し、A S P Dの回収方法はこの方法に限定されなくてもよい。

30

【 0 0 4 6 】

本開示に係る製造方法であれば、細胞分泌型A S P D様構造体の製造が容易になるため、一又は複数の実施形態において、細胞分泌型A S P D様構造体そのものを抗原とした能動ワクチン療法の開発や、能動ワクチンとして機能する医薬組成物の開発、神経細胞死阻止薬の開発が容易になる。

【 0 0 4 7 】

[ワクチン]

A S P Dを構成するA そのものを生体内に導入して免疫を付与する試みの結果、A の配列の一部（16～33番目の残基）がT細胞を活性化し炎症性反応を引き起こすことが報告された（Monsonogo, A. et al. J. Clin. Invest. 112:415-422 (2003), Monsonogo, A. et al. PNAS 103:5048-5053 (2006)）。したがって、A そのものをワクチンとして用いることは難しい。

40

一方、A S P Dは、T細胞を活性化するA の配列（16～33番目の残基）が球状構造の内部に折り畳まれてほぼ隠され（Ohnishi et al. PNAS 112:E4465-E4474 (2015)）、A ワクチンで問題となる炎症性T細胞応答を惹起しないというデータが得られている。

そして、合成A S P Dについては、アジュバントなしでウサギに免疫がつくこと、その免疫量は通常のペプチド抗原の1/5～1/10と少量で充分であることが見出された。さらに、A S P Dを用いて老齢カニクイザルの皮下投与で免疫すると、脳の糖代謝（神経

50

活動)が高まることも見出された。

これらの知見から、A S P Dは、安全性が高い能動ワクチンとして使用できるといえる。そして、本開示にかかる細胞分泌型A S P D様構造体も、能動ワクチンとして使用でき、また、ワクチンの製造に使用できる。

したがって、本開示は、一態様において、A S P Dを有効成分とする医薬組成物に関し、或いは、A S P Dを含むワクチンに関する。

【0048】

合成A S P Dを用いて、例えばワクチン等のような医薬組成物を製造しようとする場合、以下の問題点が見出された。すなわち、合成A S P Dの従来の製造法では、製造ロットごとにA S P D量がある程度上下し、また、製造されたA S P Dの長期保管が難しく、そして、製造量のスケールアップが困難であり、さらに、合成A S P Dを製造した後に残存するA の除去が必要であり、製造効率が下がる等の問題が見出された。

本開示に係る細胞分泌型A S P D様構造体を用いたワクチン等の医薬組成物であれば、一又は複数の実施形態において、これらの問題の1つ若しくは一部又はそれ以上を解消しうる。

【0049】

よって、本開示は、一態様において、細胞分泌型A S P D様構造体を有効成分とする医薬組成物に関する。本開示に係る医薬組成物の一又は複数の実施形態として、細胞分泌型A S P D様構造体を含むワクチンが挙げられる。本開示に係る医薬組成物及びワクチンは、薬学的に許容される腑形剤及び/又はアジュバントを含んでもよい。

【0050】

本開示に係る医薬組成物及びワクチンは、一又は複数の実施形態において、A S P Dに起因する疾病の予防、改善、及び/又は治療のために使用されうる。本開示に係る医薬組成物及びワクチンは、一又は複数の実施形態において、アルツハイマー病及び/又はレビー小体型認知症の予防、改善、及び/又は治療のために使用されうる。

本開示に係る医薬組成物及びワクチンは、一又は複数の実施形態において、A S P Dに起因する疾病を罹患するおそれのある対象、罹患したおそれのある対象、又は、罹患した対象に投与されうる。本開示に係る医薬組成物は、一又は複数の実施形態において、アルツハイマー病及び/又はレビー小体型認知症を罹患するおそれのある対象、罹患したおそれのある対象、又は、罹患した対象に投与されうる。該対象としては、哺乳類、ヒト、ヒト以外の哺乳類が挙げられる。

【0051】

本開示に係る医薬組成物及びワクチンをA S P D、A S P Dに起因する疾病、又は、アルツハイマー病及び/又はレビー小体型認知症に対する免疫を対象に獲得させる一又は複数の実施形態について説明する。本開示に係る医薬組成物及びワクチンの投与法は、一又は複数の実施形態において、筋内、腹腔内、皮内若しくは皮下への注射、又は、口道、消化管、気道、尿生殖路への経粘膜投与が含まれうる。本開示に係る医薬組成物及びワクチンにおける細胞分泌型A S P D様構造体の投与量としては、投与対象に著しい副作用を及ぼすことなく免疫防御応答を誘発する量が挙げられる。本開示に係る医薬組成物及びワクチンの投与量は、一又は複数の実施形態において、細胞分泌型A S P D様構造体を0.01 µg ~ 10 mg、0.1 ~ 1000 µg、1 ~ 100 µg、5 ~ 50 µg、又は5 ~ 25 µgの範囲で含むことになると量と見込まれる。初期投与に続いて、十分な間を置いて1回又は数回のブースター投与をしてもよい。

【0052】

したがって、本開示は一態様において、A S P Dに起因する疾病(例えば、アルツハイマー病及び/又はレビー小体型認知症)の予防、改善、及び/又は治療の方法であって、細胞分泌型A S P D様構造体又は本開示に係る医薬組成物若しくはワクチンを対象に投与することを含む方法に関する。

本開示は、その他の態様において、A S P D、A S P Dに起因する疾病、又は、アルツハイマー病及び/又はレビー小体型認知症に対する免疫を対象に獲得させる方法であって

10

20

30

40

50

、細胞分泌型 A S P D 様構造体又は本開示に係る医薬組成物若しくはワクチンを対象に投与することを含む方法に関する。

【 0 0 5 3 】

また、本開示は、一態様において、細胞分泌型 A S P D 様構造体と、腑形剤及び / 又はアジュバントとを組合せることを含む、医薬組成物又はワクチンの製造方法に関する。

本開示は、その他の態様において、細胞分泌型 A S P D 様構造体を有効成分とする医薬組成物、又は、細胞分泌型 A S P D 様構造体を有するワクチンの製造方法であって、本開示に係る製造方法により細胞分泌型 A S P D 様構造体を製造する工程を含む製造方法に関する。

【 0 0 5 4 】

本開示は、その他の態様において、本開示に係る製造方法に用いるキットであって、A P P 又はその一部の発現系が導入された細胞株を含むキットに関する。本開示にかかるキットによれば、細胞分泌型 A S P D 様構造体の製造が容易になる。本開示にかかるキットには、さらに、培養容器、培地、及び説明書の少なくとも 1 つが含まれてもよい。本開示に係る製造方法に用いるキットは、一又は複数の実施形態において、A P P 又はその一部の発現系が導入された細胞株に替えて、A P P 又はその一部の発現系を有するベクターであってもよい。

【 0 0 5 5 】

[モデル動物]

本開示は、その他の態様において、A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を有する非ヒト動物に関する。前記細胞は、細胞分泌型 A S P D 様構造体を分泌するから、前記非ヒト動物は、A S P D に起因する疾病、例えば、アルツハイマー病及び / 又はレビー小体型認知症のモデル動物となり得る。前記細胞としては、該モデル動物とする観点から、脳の細胞が好ましく、或いは、神経細胞が好ましい。前記発現系の導入方法は、特に制限されないが、遺伝子導入技術を用いる方法、ゲノム編集技術を用いる方法などが挙げられる。非ヒト動物としては、ヒト以外の哺乳類、ヒト以外の霊長類が挙げられる。本態様の一又は複数の実施形態は、A P P 又は A 配列を含むその一部を発現するように遺伝子改変された細胞を有する遺伝子改変動物である。

本態様のモデル動物において、遺伝子改変された細胞内で発現される A P P は、例えば、本開示で開示されるような、A P P の変異体又は A の変異体であってもよい。すなわち、前記細胞で発現される A P P は、上述と同様に、A の 2 5 番目、2 9 番目、3 3 番目、及び 3 7 番目に相当するグリシンからなる群から選択される 1 又は複数のグリシンの置換変異を有することが好ましく、少なくとも 3 3 番目のグリシンの置換変異を有することが好ましい。置換変異としては、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリン、メチオニン、チロシン、又はシステインへの置換変異が好ましい。

その他の一又は複数の実施形態において、前記細胞で発現される A P P は、A の 3 3 番目及び 3 7 番目のグリシンの置換変異を有することが好ましい。本実施形態において、置換変異としては、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリン、メチオニン、チロシン、又はシステインへの置換変異が好ましく、3 3 番目及び 3 7 番目の少なくとも一方が、イソロイシンへの置換変異であることがより好ましい。

【 0 0 5 6 】

[標準物質]

細胞分泌型 A S P D 様構造体は、一又は複数の実施形態において、A S P D 測定における A S P D の標準物質として使用できる。その他の一又は複数の実施形態において、細胞分泌型 A S P D 様構造体は、A S P D を測定するキットに使用できる。すなわち、本開示は、一態様において、細胞分泌型 A S P D 様構造体と抗 A S P D 抗体を含むキットに関する。抗 A S P D 抗体としては、上述の A S P D に特異的な抗体が挙げられる。また、本開示は、一態様において、細胞分泌型 A S P D 様構造体と、抗 A S P D 抗体とを組み合わせることを含む、キットの製造方法に関する。これらのキットは、例えば、A S P D の測定に使用できる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

[スクリーニング方法 1]

本開示は、一態様において、A S P D の形成に影響を与える物質のスクリーニング方法であって、A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を培養した培養液中に形成される、A S P D に特異的な抗体に対して抗原性を示す構造体（すなわち、細胞分泌型 A S P D 様構造体）の形成効率を指標とすることを含むスクリーニング方法に関する。

前記指標は、一又は複数の実施形態において、細胞分泌型 A S P D 様構造体の形成量であってもよく、A 40、A 41、A 42、A 43 又はこれらの合計量に対する相対量であってもよい。この形態のスクリーニング方法は、テスト物質を培養液に添加した場合と添加しない場合とにおける細胞分泌型 A S P D 様構造体の形成効率を比較して、A S P D の形成に影響を与える物質であるか否かを判断すること含んでもよい。例えば、テスト物質を培養液に添加した場合に該形成効率が低下すれば、該物質が A S P D の形成を阻害する影響があると判断できる。また、例えば、テスト物質を培養液に添加した場合に該形成効率が亢進すれば、該物質が A S P D の形成を促進する影響があると判断できる。

本態様のスクリーニング方法において、培養する細胞内で発現される A P P は、例えば、本開示で開示されるような、A P P の変異体又は A の変異体であってもよい。

【 0 0 5 8 】

[スクリーニング方法 2]

本開示は、一態様において、A の C 末端切断に影響を与える物質のスクリーニング方法であって、A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を培養した培養液中に形成される、A 40、A 41、A 42、A 43 及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも 1 つの A を指標とすることを含むスクリーニング方法に関する。

前記指標は、一又は複数の実施形態において、A 40、A 41、A 42、A 43 及びこれらの組合せの分泌量若しくは培養液中の濃度であってもよく、或いは、例えば、A 40 に対する A 42 の割合（ $A 42 / A 40$ ）といった相対量であってもよい。この形態のスクリーニング方法は、テスト物質を培養液に添加した場合と添加しない場合とにおける前記指標を比較して、A の C 末端切断に影響を与える物質であるか否か、或いは、セクレターゼに対する影響を与える物質であるか否かを判断すること含んでもよい。例えば、テスト物質を培養液に添加した場合に「 $A 42 / A 40$ 」が低下すれば、該物質が A 42 の産生を抑制する影響があると判断できる。

本態様のスクリーニング方法において、培養する細胞内で発現される A P P は、例えば、本開示で開示されるような、A P P の変異体又は A の変異体であってもよい。

【 0 0 5 9 】

[変異型合成 A S P D]

本開示は、さらにその他の態様において、変異型合成 A S P D に関する。本開示において、変異型合成 A S P D は、変異型の A を用いて、合成 A S P D の製造方法と同様の製法で合成される合成 A S P D 様構造体をいう。すなわち、本開示において、変異型合成 A S P D は、A の 25 ~ 37 番目のアミノ酸配列における G X X X G モチーフのグリシンに 1 又は複数の置換変異を有する変異型 A を含む液体を攪拌することで形成される合成 A S P D 様構造体をいう。前記液体には、変異型合成 A S P D の形成効率向上の観点から、例えば、フタル酸エステルなどの可塑剤が含まれていてもよい。一又は複数の実施形態において、変異型合成 A S P D は、前記変異型 A を、前記可塑剤を含む有機溶媒に溶解すること、前記変異型 A の溶液を水性溶液で希釈すること、及び、前記希釈後の溶液を攪拌することを含む製造方法で合成できる。

前記変異型 A としては、A の 25 番目、29 番目、33 番目、及び 37 番目に相当するグリシンからなる群から選択される 1 又は複数のグリシンの置換変異を有することが好ましく、少なくとも 33 番目のグリシンの置換変異を有することが好ましい。置換変異としては、合成 A S P D の形成効率向上の観点から、ロイシン、イソロイシン、フェニル

10

20

30

40

50

アラニン、バリン、メチオニン、チロシン、システインへの置換変異が好ましい。

前記変異型 A としては、その他の一又は複数の実施形態において、A の 33 番目及び 37 番目のグリシンの置換変異を有することが好ましい。本実施形態において、置換変異としては、合成 A S P D の形成効率向上の観点から、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリン、メチオニン、チロシン、又はシステインへの置換変異が好ましく、33 番目及び 37 番目の少なくとも一方が、イソロイシンへの置換変異であることがより好ましい。

本開示に係る変異型 A S P D は、一又は複数の実施形態において、A S P D 特異的抗体に対して抗原性を示す。また、本開示に係る変異型 A S P D は、その他の一又は複数の実施形態において、成熟神経細胞に対して細胞毒性を示す。

【0060】

本開示は、一又は複数の実施形態において、以下に關しうる；

[1] 細胞分泌型アミロスフェロイド (A S P D) 様構造体の製造方法であって、アミロイド前駆体タンパク質 (A P P) 又はアミロイドタンパク質 (A) 配列を含むその一部を発現する細胞を培養液中で培養し、該培養液中に細胞分泌型 A S P D 様構造体を得る工程を含む、製造方法。

[2] さらに、前記培養液中から細胞分泌型 A S P D 様構造体を回収することを含む、[1] 記載の製造方法。

[3] 前記細胞が、A P P 又は A 配列を含むその一部の発現系が導入された細胞である、[1] 又は [2] に記載の製造方法。

[4] 前記 A P P は、野生型、又は、1 若しくは複数のアミノ酸変異を有する前記野生型の変異体である、[1] から [3] のいずれかに記載の製造方法。

[5] 前記 A P P は、A アミノ酸配列の G X X X G モチーフにおけるグリシンにアミノ酸変異を有する野生型又は変異体の A P P である、[1] から [4] のいずれかに記載の製造方法。

[6] A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を培養した培養液中に得られる構造体であって、A S P D に特異的な抗体に対して抗原性を示す、細胞分泌型 A S P D 様構造体。

[7] [6] に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体を有効成分とする医薬組成物。

[8] [6] に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体を含むワクチン。

[9] [6] に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体、及び、抗 A S P D 抗体を含むキット。

[10] [6] に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体の能動ワクチンとしての使用。

[11] ワクチン製造における [6] に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体の使用。

[12] [6] に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体の、A S P D 測定における標準物質としての使用。

[13] A S P D が起因となる疾病の予防、改善、及び / 又は治療の方法であって、[6] に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体、[7] に記載の医薬組成物、又は、[8] に記載のワクチンを対象に投与することを含む、方法。

[14] A S P D が起因となる疾病が、アルツハイマー病及び / 又はレビー小体型認知症である、[13] に記載の方法。

[15] A S P D、A S P D に起因する疾病、又は、アルツハイマー病及び / 又はレビー小体型認知症に対する免疫を対象に獲得させる方法であって、[6] に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体、[7] に記載の医薬組成物、又は、[8] に記載のワクチンを対象に投与することを含む、方法。

[16] [6] に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体と、薬学的に許容される腑形剤とを組み合わせることを含む、医薬組成物又はワクチンの製造方法。

[17] [6] に記載の細胞分泌型 A S P D 様構造体と、抗 A S P D 抗体とを組み合わせることを含む、キットの製造方法。

[18] A P P 又は A 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を有す

10

20

30

40

50

る、非ヒト動物。

[1 9] A P P又はA 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を培養した培養液中に形成される構造体であって、A S P Dに特異的な抗体に対して抗原性を示す構造体の形成効率を指標とすることを含む、A S P Dの形成に影響を与える物質のスクリーニング方法。

[2 0] A P P又はA 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を培養した培養液中に分泌される、A 4 0、A 4 1、A 4 2、A 4 3及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1つを指標とする、A のC末端切断に影響を与える物質のスクリーニング方法。

[2 1] A の25～37番目のアミノ酸配列におけるG X X X Gモチーフのグリシンに1又は複数の置換変異を有する変異型A を含む液体を攪拌することで形成される合成A S P D様構造体。

【 0 0 6 1 】

以下に、実施例を用いて本発明の一又は複数の実施形態をさらに説明する。

【実施例】

【 0 0 6 2 】

1. h A P Pを発現する培養細胞のコンストラクション

(1 - 1) ヒトアミロイド前駆体タンパク質 (h A P P)

発現させるアミロイド前駆体タンパク質 (A P P) として、下記表 1 及び図 1 に示す試験例 1 ~ 14 の A P P を用いた。図 1 の配列 (配列番号 1) は、ヒトの A を含む h A P P の部分アミノ酸配列である。

試験例 1 ~ 7 の A P P は、h A P P 7 7 0 野生型、h A P P 7 7 0 Swedish 変異型、及び G X X X G モチーフの 1 又は 2 個のグリシンが変異した h A P P 7 7 0 Swedish 型である。

試験例 8 ~ 14 の A P P は、h A P P 6 9 5 野生型、h A P P 6 9 5 Swedish 変異型、及び G X X X G モチーフの 1 又は 2 個のグリシンが変異した h A P P 6 9 5 Swedish 型である。

【 0 0 6 3 】

【表 1】

表1	発現させたAPP	APPにおける変異	
試験例1	hAPP770-wild type	-	
試験例2	hAPP770-swedish (SW)	KM670/671NL	
試験例3	hAPP770-sw-G25/29L	KM670/671NL	G696/700L
試験例4	hAPP770-sw-G29/33L	KM670/671NL	G700/704L
試験例5	hAPP770-sw-G33/37L	KM670/671NL	G704/708L
試験例6	hAPP770-sw-G33L	KM670/671NL	G704L
試験例7	hAPP770-sw-G33I	KM670/671NL	G704I
試験例8	hAPP695-wild type	-	
試験例9	hAPP695-swedish (SW)	KM595/596NL	
試験例10	hAPP695-sw-G25/29L	KM595/596NL	G621/625L
試験例11	hAPP695-sw-G29/33L	KM595/596NL	G625/629L
試験例12	hAPP695-sw-G33/37L	KM595/596NL	G629/633L
試験例13	hAPP695-sw-G33L	KM595/596NL	G629L
試験例14	hAPP695-sw-G33I	KM595/596NL	G629I

【 0 0 6 4 】

(1 - 2) h A P P を過剰発現する培養細胞

上記試験例 1 ~ 14 の h A P P を過剰発現する C H O 細胞を以下のように作製した。

C H O / K 1 細胞を増殖培地にて 2.5×10^4 cells / cm² の密度で 12 ウェルプレートに播種し、37、5% C O₂ で維持した。24 時間後、遺伝子導入試薬 (F u

GENE HD)を用いて発現ベクターをCHO/K1細胞に導入した。導入方法は、1ウェルあたりOpti-MEM 25 μ L及びプラスミドDNA 0.5 μ gを混合し、さらに1.5 μ LのFuGENE HDを加え、室温で10分間反応させた。その間に0.5mL増殖培地を交換しておき反応終了後、反応液を25 μ L添加した。24時間後、新しい1mL増殖培地に交換してさらに培養した。

増殖培地：10%FBS含有Ham's F-12培地に、100ユニット/mL penicillin、及び、100 μ g/mL streptomycinを加えたもの【0065】

2. ASPDの形成と回収

(2-1) hAPPを過剰発現する培養細胞の培養と上清の回収

遺伝子導入から48時間後、細胞を1xPBS(-)にて2回洗浄したのち1mL無血清培地に交換した。無血清培地に交換24時間後、0.22 μ mフィルターでろ過した培養上清を回収し、直ちに液体窒素で凍結させて-80にて保存した。

無血清培地：DMEM/F-12に1xITS-Xを加えたもの

【0066】

(2-2) 分析

APP過剰発現細胞を培養した培養液を回収し、培養液中のASPD, A1-40、及びA1-42の含有量を下記条件のELISA法で確認した。その結果を図2~4に示す。

[ASPD ELISA]

回収した培養上清について、抗ASPD抗体2種類(rpASD1、MASD3)を用いたサンドイッチELISAで定量した。

詳細には、測定前日に白色96ウェルプレートに抗ASPDポリクローナル抗体(rpASD1)を500ng/ウェルとなるように分注し、4で一晚固相化した。翌日、ウェルをPBS-Tで3回洗浄した後、3%BSAにて30分間ブロッキングを行い、再度3回洗浄した。各ウェルに100 μ Lの標準液またはサンプルを分注し、1時間室温でインキュベーション後、3回洗浄し、100ng/ウェルとなるように抗ASPDモノクローナル抗体(MASD3)を添加し、さらに1時間室温でインキュベーションした。再度3回洗浄を行い、1/10,000希釈した二次抗体(抗マウスIgG-HRP)を100 μ L/ウェルで分注し、1時間室温でインキュベーションした。3回洗浄した後、100 μ Lの発光基質を添加して1分遮光で反応させ、ルミノメーターで発光を検出した。

[A ELISA]

回収した培養上清について、市販で入手可能なA monomer ELISA kitを用いて測定した。使用したKitは、以下の通り。測定は、Kit添付の説明書通り行った。

A1-40：ヒト アミロイド(1-40)ELISAキットワコー(Wako#292-62301)

A1-42：ヒト アミロイド(1-42)ELISAキットワコー高感度品(Wako#296-64401)

【0067】

図2~4に示すとおり、試験例1~14のAPPを過剰発現させたいずれの場合も培養液中にASPDの形成が認められた。

hAPP770とhAPP695を比較した場合、変異による大きな差は見られなかったが、若干hAPP695の方が、培養上清中のASPD濃度が高い傾向があった。また、変異の場所と数については、2カ所でも1カ所でもG704又はG629のG/L変異がASPD形成には重要であると考えられた。さらに、野生型(wt)に比べ、Swedish(sw)変異ではアミロイドがより多く分泌されるが、さらにGXXGモチーフに変異を入れることによって、ほとんどのアミロイドがASPDの構成要素として使用されることが示唆された。

【0068】

10

20

30

40

50

3. hAPP695sw-G33Xの過剰発現

hAPP695 Swedish変異型の629位(Aの33位)のグリシンを19種のアミノ酸に変異させたAPPを過剰発現する細胞を上記(1-2)と同様に作製し、上記2と同様に培養してその培養液中に培養液中のASPD, A1-40、及びA1-42の含有量を確認した。その結果を表2及び図5~7に示す。

【0069】

【表2】

表2

APP	ASPD様構造体
	swに対する割合(%)
sw	100
sw-G629L	251
sw-G629I	249
sw-G629F	245
sw-G629M	156
sw-G629V	196
sw-G629S	103
sw-G629P	81
sw-G629T	87
sw-G629A	114
sw-G629Y	123
sw-G629H	94
sw-G629Q	82
sw-G629N	81
sw-G629K	89
sw-G629D	78
sw-G629E	70
sw-G629C	147
sw-G629W	121
sw-G629R	65

10

20

30

【0070】

表2及び図5~7に示すとおり、hAPP695 Swedish変異型の629位(Aの33位)のグリシンを所定のアミノ酸、例えば、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、バリン、チロシン、システインへの置換をすることにより、培養液中のA量を著しく低減するとともに、細胞分泌型ASPD様構造体の形成量を向上できることが確認された。一方、プロリン(又はスレオニン)への置換をすることにより、A1-40、A1-42及びASPD様構造体のいずれについても培養液中濃度の低下が確認された。この結果から、これらのアミノ酸による629位(Aの33位)の変異によっては、APPからのAの切り出しが阻害され、且つASPD様構造体の形成が抑制されることが示唆された。以上のことから、アミロイド産生およびASPD形成の双方に対する阻害剤スクリーニングへの変異体の利用も可能と考えられた。

40

【0071】

3. 他の宿主細胞を用いた細胞分泌型ASPD様構造体の製造

CHOの他に、HEK293及びNeuro2aの細胞株においても、APP又はA配列を含むその一部の発現系が導入された細胞とすることで、細胞内でASPD様構造体が形成されることが認められた。

【0072】

4. 細胞分泌型ASPD様構造体の安定性確認：-80の保存安定性

50

試験例 14 の hAPP695-sw-G33I を発現させて得られた細胞分泌型 A S P D 構造体を 0 ヶ月、3 ヶ月及び 6 ヶ月間 - 80℃ 保存したサンプルを、2 種類の A S P D 特異的抗体（中和抗体）を用いたサンドイッチ E L I S A で測定して検量線を作成した。

その結果、その検量線の一次回帰直線の傾きは、3 つのサンプルでほぼ一定の値を示した。したがって、サンドイッチ E L I S A に使用している中和抗体 2 種類に対する反応性が安定しており、保存による劣化はないと考えられた。

一方、従来の方法で製造された合成 A S P D は、- 80℃ の保存後では一次回帰直線における傾きのバラツキが大きく、A S P D 濃度に対するシグナルの大きさもバラツキが大きく、保存安定性が低いと考えられる。

【 0 0 7 3 】

5 . 合成 A S P D の免疫原性

ニュージーランドホワイト（各条件 3 羽）に、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント、アジュバントなしで、合成 A S P D による 100 µg 免疫を 6 回行い、その後、全採血を行い、血清中の合成 A S P D に対する反応性をドットプロットで評価を行った。その結果の一例を図 8 に示す。全てのウサギでアジュバントなしでも十分な反応性が得られることがわかった。

【 0 0 7 4 】

6 . 合成 A S P D 及び変異型合成 A S P D (G 3 3 L) の神経細胞毒性

野生型 A 1 - 42 を用いて製造した合成 A S P D の神経細胞毒性と、G 3 3 L 変異型 A 1 - 42 を用いて製造した変異型合成 A S P D (G 3 3 L) の神経細胞毒性とを比較した。

具体的には、一定濃度の合成 A S P D (0 . 5 8 µ M) 及び変異型合成 A S P D (0 . 5 3 µ M) をそれぞれ成熟ラット海馬由来初代培養神経細胞に投与し、晩置いた後、蛍光試薬（Thermo Fisher 社製 CyQUANT）を添加し、共焦点イメージサイトメーター C Q 1 を用いて細胞生存率を確認した。その結果を図 9 の右に示す。同図に示す通り、変異型合成 A S P D (G 3 3 L 型) は、合成 A S P D (野生型) と同様に、成熟神経細胞に対して同程度の細胞毒性を示した。

【 0 0 7 5 】

7 . 変異型合成 A S P D と r p A S D 1 抗体との解離定数

合成 A S P D または変異型合成 A S P D (G 3 3 L) をリガンドとしてセンサーチップ上に固相化し、アナライトとして抗 A S P D ポリクローナル抗体 (r p A S D 1) を流して表面プラズモン共鳴 (S P R) により解離定数 (K_D) を求めた。その結果、抗 A S P D ポリクローナル抗体 (r p A S D 1) に対する反応性は、合成 A S P D と変異型合成 A S P D (G 3 3 L) とで同等であった。

【 0 0 7 6 】

8 . h A P P 6 9 5 s w の 1 及び 2 アミノ酸変異体の過剰発現

発現させるアミロイド前駆体タンパク質 (A P P) として、下記表 3 及び図 1 に示す試験例 15 ~ 36 の A P P を用いた。上記 1 及び 2 の記載と同様にして、A P P 過剰発現細胞を培養した培養液を回収し、培養液中の A S P D , A 1 - 40、及び A 1 - 42 の含有量を下記条件の E L I S A 法で確認した。その結果を図 10 ~ 12 に示す。

【 0 0 7 7 】

10

20

30

40

【表 3】

表3	発現させたAPP (hAAP695)	hAAP695における変異		A β における変異
試験例 15	wild type (WT)	-		-
試験例 16	swedish (SW)	KM595/596NL		-
試験例 17	sw-G621L	KM595/596NL	G621L	G25L
試験例 18	sw-G625L	KM595/596NL	G625L	G29L
試験例 19	sw-G629L	KM595/596NL	G629L	G33L
試験例 20	sw-G633L	KM595/596NL	G633L	G37L
試験例 21	sw-G621/625L	KM595/596NL	G621/625L	G25/29L
試験例 22	sw-G625/629L	KM595/596NL	G625/629L	G29/33L
試験例 23	sw-G629/633L	KM595/596NL	G629/633L	G33/37L
試験例 24	sw-G621I	KM595/596NL	G621I	G25I
試験例 25	sw-G625I	KM595/596NL	G625I	G29I
試験例 26	sw-G629I	KM595/596NL	G629I	G33I
試験例 27	sw-G633I	KM595/596NL	G633I	G37I
試験例 28	sw-G621/625I	KM595/596NL	G621/625I	G25/29I
試験例 29	sw-G625/629I	KM595/596NL	G625/629I	G29/33I
試験例 30	sw-G629/633I	KM595/596NL	G629/633I	G33/37I
試験例 31	sw-GG621/625LI	KM595/596NL	GG621/625LI	GG25/29LI
試験例 32	sw-GG621/625IL	KM595/596NL	GG621/625IL	GG25/29IL
試験例 33	sw-GG625/629LI	KM595/596NL	GG625/629LI	GG29/33LI
試験例 34	sw-GG625/629IL	KM595/596NL	GG625/629IL	GG29/33IL
試験例 35	sw-GG629/633LI	KM595/596NL	GG629/633LI	GG33/37LI
試験例 36	sw-GG629/633IL	KM595/596NL	GG629/633IL	GG33/37IL

10

20

【 0 0 7 8 】

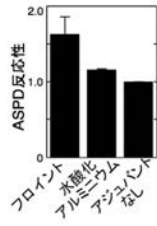
図 10 ~ 12 に示すとおり、試験例 15 ~ 36 の A P P を過剰発現させたいずれの場合も培養液中に A S P D の形成が認められた。

ロイシンへの 1 アミノ酸又は 2 アミノ酸置換変異と、イソロイシンのそれらとで、上清中の A S P D , A₁₋₄₀、及び A₁₋₄₂ の含有量に大きな差は見られなかった。しかし、A₃₃ の 33 番目及び 37 番目のグリシンが二つともイソロイシンに変異した A P P (試験例 30) の A S P D 形成量は、A₃₃ の 33 番目及び 37 番目のグリシンが二つともロイシンに変異した A P P (試験例 23) と比べて、著しく増加していた。

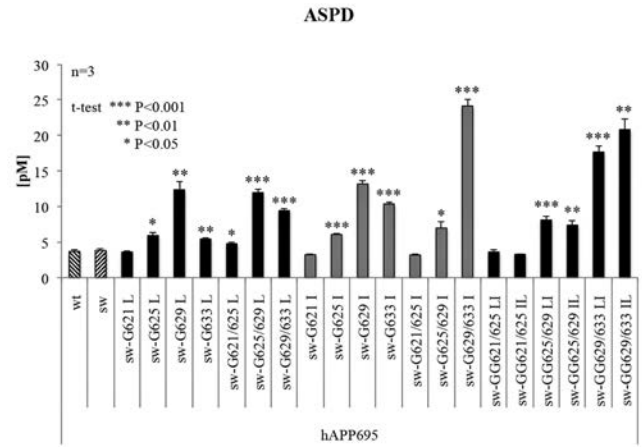
また、2 か所をロイシンとイソロイシンに変異させた A P P (試験例 31 - 36) では、A₃₃ の 33 番目及び 37 番目のグリシンをロイシンとイソロイシンに変異させた A P P (試験例 35 - 36) の A S P D の形成量が、A₃₃ の 33 番目及び 37 番目のグリシンが二つともイソロイシンに変異した A P P (試験例 30) と同程度に増加した。

30

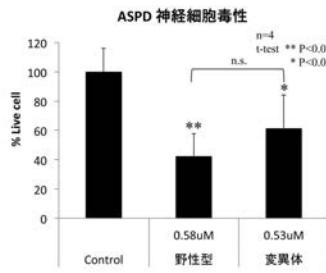
【 図 8 】



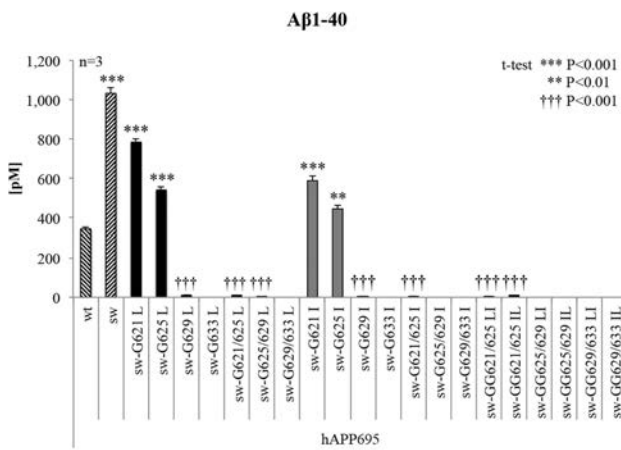
【 図 1 0 】



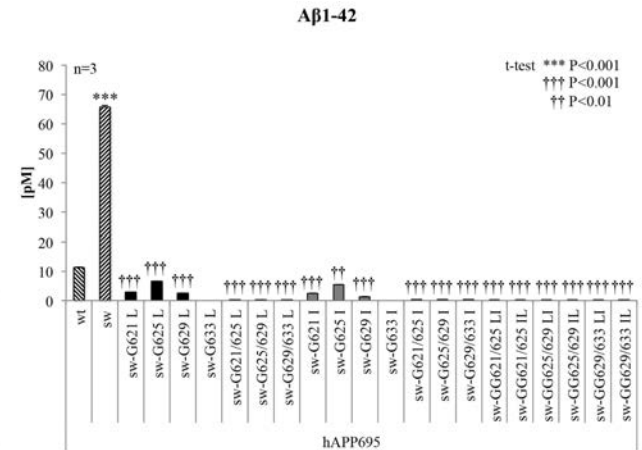
【 図 9 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【配列表】

2017179646000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015089

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, C07K14/46(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, A61K35/12(2015.01)n, 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) C12N15/09, A61K39/00, A61P25/28, A61P37/04, C07K14/46, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, A61K35/12, C12Q1/37		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JST7580 (JDreamIII), CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2007-267748 A (Elan Pharmaceuticals, Inc.), 18 October 2007 (18.10.2007), claims & US 5604102 A & WO 1995/011968 A1 & EP 730643 A1 claims	18 1-17, 19-21
X A	JP 2006-505272 A (Bioarctic Neuroscience AB.), 16 February 2006 (16.02.2006), claims; example 10 & US 2007/0099185 A1 & EP 1563066 A1 & WO 2004/041213 A2 claims; example 10	20 1-19, 21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	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
"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)	"X"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	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
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"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 29 June 2017 (29.06.17)		Date of mailing of the international search report 11 July 2017 (11.07.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015089

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Hitomi KOMURA et al., "Kazokusei Alzheimer-byo APP Hen'itai o Hatsugen shita Shinkei Saibo ni Okeru Ko Bunshiryo Aβ Gyoshutai Amylospheroid no Keisei to Shinkei Dokusei", Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Program·Yoshishu, 2013, vol.36, page 1P-0914, entire text	1, 3, 4 2, 5-21
X Y A	WALSH DM et al., Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo, Nature, 2002, Vol.416, No.6880, pp.535-539, Abstract, p.538	1, 3, 4 1-17, 19 18, 20, 21
X Y A	JP 2008-291025 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 04 December 2008 (04.12.2008), claims; examples (Family: none)	6, 9, 12, 17 1-17, 19, 21 18, 20
X Y A	NOGUCHI A et al., Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (Aβ) assembly from Alzheimer disease brains, J. Biol. Chem., 2009, Vol.284, No.47, pp.32895-32905, Figure2, p. 32896, 32898	6, 9, 12, 17 1-17, 19, 21 18, 20
X Y A	WO 2013/094614 A1 (TAO Health Life Pharma Co., Ltd.), 27 June 2013 (27.06.2013), claims; paragraphs [0008], [0024] & US 2014/0350229 A1 & EP 2796464 A1 claims; paragraphs [0008], [0024]	6-17 1-17, 19, 21 18, 20
Y A	LU Y et al., Effects of G33A and G33I mutations on the structures of monomer and dimer of the amyloid-β fragment 29-42 by replica exchange molecular dynamics simulations, J. Phys. Chem. B, 2011, Vol.115, No.5, pp. 1282-1288, ABSTRACT	5, 21 1-4, 6-20
Y A	HUNG LW et al., Amyloid-beta peptide (Aβ) neurotoxicity is modulated by the rate of peptide aggregation: Aβ dimers and trimers correlate with neurotoxicity, J. Neurosci., 2008, Vol.28, No.46, pp.11950-11958, ABSTRACT, Figure1, 3, 4	5, 21 1-4, 6-20
Y A	EP 2404612 A1 (BALAKRISHNAN K), 01 November 2012 (01.11.2012), paragraphs [0023] to [0028]; examples & WO 2012/004380 A1	5, 21 1-4, 6-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015089

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	GANDY S et al., Days to criterion as an indicator of toxicity associated with human Alzheimer amyloid-beta oligomers, <i>Ann. Neurol.</i> , 2010, Vol.68, No.2, pp.220-230, Abstract	1-17,19 18,20,21
Y A	PODLISNY MB et al., Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture, <i>J. Biol. Chem.</i> , 1995, Vol.270, No.16, pp.9564-9570, Abstract	1-17,19 18,20,21
A	Naoko IWATANI et al., "Daichokin de Hatsugen saseta Kumikae A β Monomer no ASPD Keiseino no Hyoka", Protein Science Society of Japan Nenkai Program·Yoshishu, 2013, vol.13, page 60, enter text	1-21
A	Yoshitaka UMETSU et al., "Kayosei A β Shugotai Amylospheroid no NMR ni yoru Kozo Kaiseki ni Muketa Shiryo Chosei", Protein Science Society of Japan Nenkai Program·Yoshishu, 2011, vol. 11, page 123, entire text	1-21
A	OHNISHI T et al., Na, K-ATPase α 3 is a death target of Alzheimer patient amyloid- β assembly, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 2015.08.11, Vol.112, No.32, pp.E4465-E4474, Abstract	1-21
A	FONTE V et al., A glycine zipper motif mediates the formation of toxic β -amyloid oligomers in vitro and in vivo, <i>Mol. Neurodegener.</i> , 2011, Vol.6, No.1, 61, Abstract	1-21
A	LEMMIN T et al., Perturbations of the straight transmembrane α -helical structure of the amyloid precursor protein affect its processing by γ -secretase, <i>J. Biol. Chem.</i> , 2014, Vol.289, No.10, pp.6763-6774, Abstract	1-21
A	LEE IS et al., Amyloid- β oligomers regulate the properties of human neural stem cells through GSK-3 β signaling, <i>Exp. Mol. Med.</i> , 2013, Vol.45, e60, Abstract	1-21
A	LAUREN J et al., Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers, <i>Nature</i> , 2009, Vol.457, No.7233, pp.1128-1132, Abstract	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2017/015089
--

<p><u>Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</u> (International Patent Classification (IPC))</p> <p>C12Q1/37(2006.01)n</p> <p>(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)</p>
--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015089

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: See extra sheet.</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015089

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Claims involve Inventions 1-4 as follows.

(Invention 1) claims 1-17 and 19

Claim 1 has no special technical feature, since said claim 1 lacks novelty in the light of the following documents 1, 2.

However, claim 2, which depends on claim 1, has a special technical feature "a method for producing a cell-secretory amylospheroid (ASPD)-like structure, comprising the steps of: culturing cells capable of expressing an amyloid precursor protein (APP) or a portion thereof containing an amyloid β protein (A β) sequence in a liquid culture medium to produce a cell-secretory ASPD-like structure in the liquid culture medium; and collecting the cell-secretory ASPD-like structure from the liquid culture medium". Therefore, claims 1 and 2 are classified into Invention 1.

Further, also claims 3-17 and 19 are classified into Invention 1.

(Invention 2) claim 18

It is not considered that claim 18 has a technical feature which is same as or corresponding to claim 2 classified into Invention 1.

Further, claim 18 has no relationship such that said claim 18 is substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1.

Consequently, claim 18 cannot be classified into Invention 1.

And claim 18 has a special technical feature "a non-human animal having cells into which an expression system capable of expressing an APP or a portion thereof containing an A β sequence is introduced", and is classified into Invention 2.

(Invention 3) claim 20

It is not considered that claim 20 has a technical feature same as or corresponding to claim 2 classified into Invention 1 or claim 18 classified into Invention 2.

In addition, claim 20 has no relationship such that said claim 20 is substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1 or Invention 2.

Therefore, claim 20 cannot be classified into either Invention 1 or Invention 2.

And claim 20 has a special technical feature "a method for screening for a substance having influence on the C-terminal cleavage of A β , wherein at least one substance selected from the group consisting of A β 40, A β 41, A β 42 and A β 43, which are substances secreted in a liquid culture medium in which cells having, introduced thereinto, an expression system capable of expressing an APP or a portion thereof containing an A β sequence are cultured, and a combination of two or more of the substances is employed as an indicator", and is classified into Invention 3.

(Invention 4) claim 21

It is not considered that claim 21 has a technical feature same as or corresponding to claim 2 classified into Invention 1, claim 18 classified into Invention 2 or claim 20 classified into Invention 3.

In addition, claim 21 has no relationship such that said claim 21 is substantially same as or equivalent to any claim classified into Inventions 1-3.

Consequently, claim 21 cannot be classified into any one of Inventions 1-3.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015089

And claim 21 has a special technical feature "a synthetic ASPD-like structure which is formed by stirring a solution containing an A β mutant in which one or more substitution mutations occur in glycine residues in a GXXXG motif in an amino acid sequence lying between position-25 to position-37 in the amino acid sequence for A β ", and is classified into Invention 4.

Document 1 Hitomi KOMURA et al., "Kazokusei Alzheimer-byo APP Hen'itai o Hatsugen shita Shinkei Saibo ni Okeru Ko Bunshiryo A β Gyoshutai Amylospheroid no Keisei to Shinkei Dokusei", Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Program Yoshishu, 2013, vol.36, page 1P-0914, entire text

Document 2 WALSH DM et al., Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo, Nature, 2002, Vol.416 No.6880, pp.535-539, Abstract, p.538

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 5 0 8 9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, C07K14/46(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, A61K35/12(2015.01)n, C12Q1/37(2006.01)n		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A61K39/00, A61P25/28, A61P37/04, C07K14/46, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, A61K35/12, C12Q1/37		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2017年 日本国実用新案登録公報 1996-2017年 日本国登録実用新案公報 1994-2017年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JST7580 (JDreamIII), CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	JP 2007-267748 A (エラン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 2007.10.18, 特許請求の範囲 & US 5604102 A & WO 1995/011968 A1 & EP 730643 A1, Claims	18 1-17, 19-21
X A	JP 2006-505272 A (バイオアークティック ニューロサイエンス アーバー) 2006.02.16, 特許請求の範囲、実施例 10 & US 2007/0099185 A1 & EP 1563066 A1 & WO 2004/041213 A2, Claims, Example10	20 1-19, 21
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 29.06.2017	国際調査報告の発送日 11.07.2017	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 西村 亜希子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 3435

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 5 0 8 9
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	小村仁美ほか, 家族性アルツハイマー病 APP 変異体を発現した神経細胞における高分子量 A β 凝集体アミロスフェロイドの形成と神経毒性, 日本分子生物学会年会プログラム・要旨集, 2013, Vol. 36, p. 1P-0914, 全文	1, 3, 4 2, 5-21
X Y A	WALSH DM et al., Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo, Nature, 2002, Vol. 416, No. 6880, pp. 535-539, Abstract, p. 538	1, 3, 4 1-17, 19 18, 20, 21
X Y A	JP 2008-291025 A (三菱化学株式会社) 2008.12.04, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	6, 9, 12, 17 1-17, 19, 21 18, 20
X Y A	NOGUCHI A et al., Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (Abeta) assembly from Alzheimer disease brains, J. Biol. Chem., 2009, Vol. 284, No. 47, pp. 32895-32905, Figure2, p. 32896, 32898	6, 9, 12, 17 1-17, 19, 21 18, 20
X Y A	WO 2013/094614 A1 (TAO ヘルスライフファーマ株式会社) 2013.06.27, 特許請求の範囲, [0008], [0024] & US 2014/0350229 A1 & EP 2796464 A1, Claims, [0008], [0024]	6-17 1-17, 19, 21 18, 20
Y A	LU Y et al., Effects of G33A and G33I mutations on the structures of monomer and dimer of the amyloid- β fragment 29-42 by replica exchange molecular dynamics simulations, J. Phys. Chem. B, 2011, Vol. 115, No. 5, pp. 1282-1288, ABSTRACT	5, 21 1-4, 6-20
Y A	HUNG LW et al., Amyloid-beta peptide (Abeta) neurotoxicity is modulated by the rate of peptide aggregation: Abeta dimers and trimers correlate with neurotoxicity, J. Neurosci., 2008, Vol. 28, No. 46, pp. 11950-11958, ABSTRACT, Figure1, 3, 4	5, 21 1-4, 6-20
Y A	EP 2404612 A1 (BALAKRISHNAN K) 2012.11.01, [0023]~ [0028], Examples & WO 2012/004380 A1	5, 21 1-4, 6-20
Y A	GANDY S et al., Days to criterion as an indicator of toxicity associated with human Alzheimer amyloid-beta oligomers, Ann. Neurol., 2010, Vol. 68, No. 2, pp. 220-230, Abstract	1-17, 19 18, 20, 21

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 5 0 8 9
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	PODLISNY MB et al., Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture, J. Biol. Chem., 1995, Vol.270, No.16, pp.9564-9570, Abstract	1-17, 19 18, 20, 21
A	岩谷奈央子ほか, 大腸菌で発現させた組換え A β モノマーの ASPD 形成能の評価, 日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集, 2013, Vol.13, p.60, 全文	1-21
A	梅津喜崇ほか, 可溶性 A β 集合体アミロスフェロイドの NMR による構造解析に向けた試料調製, 日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集, 2011, Vol.11, p.123, 全文	1-21
A	OHNISHI T et al., Na, K-ATPase α 3 is a death target of Alzheimer patient amyloid- β assembly, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2015.08.11, Vol.112, No.32, pp.E4465-E4474, Abstract	1-21
A	FONTE V et al., A glycine zipper motif mediates the formation of toxic β -amyloid oligomers in vitro and in vivo, Mol. Neurodegener., 2011, Vol.6, No.1, 61, Abstract	1-21
A	LEMMIN T et al., Perturbations of the straight transmembrane α -helical structure of the amyloid precursor protein affect its processing by γ -secretase, J. Biol. Chem., 2014, Vol.289, No.10, pp.6763-6774, Abstract	1-21
A	LEE IS et al., Amyloid- β oligomers regulate the properties of human neural stem cells through GSK-3 β signaling, Exp. Mol. Med., 2013, Vol.45, e60, Abstract	1-21
A	LAUREN J et al., Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers, Nature, 2009, Vol.457, No.7233, pp.1128-1132, Abstract	1-21

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 5 0 8 9

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
(特別ページ参照)

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2015年1月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 5 0 8 9

請求の範囲は、以下のとおり、発明 1～4 を含む。

(発明 1) 請求項 1～17, 19

請求項 1 は、下記文献 1, 2 により新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。しかしながら、請求項 1 の従属請求項である請求項 2 は、「細胞分泌型アミロスフェロイド (ASPD) 様構造体の製造方法であって、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 又はアミロイドβタンパク質 (Aβ) 配列を含むその一部を発現する細胞を培養液中で培養し、該培養液中に細胞分泌型 ASPD 様構造体を得る工程と、前記培養液中から細胞分泌型 ASPD 様構造体を回収することを含む、製造方法」という特別な技術的特徴を有しており、請求項 1, 2 を発明 1 に区分する。また、請求項 3～17, 19 も発明 1 に区分する。

(発明 2) 請求項 18

請求項 18 は、発明 1 に区分された請求項 2 と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえない。また、請求項 18 は、発明 1 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。したがって、請求項 18 は発明 1 に区分できない。

そして、請求項 18 は、「APP 又は Aβ 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を有する、非ヒト動物」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 2 に区分する。

(発明 3) 請求項 20

請求項 20 は、発明 1 に区分された請求項 2 又は発明 2 に区分された請求項 18 と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえない。また、請求項 20 は、発明 1 又は発明 2 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。したがって、請求項 20 は発明 1 及び発明 2 のいずれにも区分できない。そして、請求項 20 は、「APP 又は Aβ 配列を含むその一部を発現する発現系が導入された細胞を培養した培養液中に分泌される、Aβ40、Aβ41、Aβ42、Aβ43 及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも 1 つを指標とする、Aβ の C 末端切断に影響を与える物質のスクリーニング方法」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 3 に区分する。

(発明 4) 請求項 21

請求項 21 は、発明 1 に区分された請求項 2 又は発明 2 に区分された請求項 18 又は発明 3 に区分された請求項 20 と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえない。また、請求項 21 は、発明 1～3 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。したがって、請求項 21 は発明 1～3 のいずれにも区分できない。そして、請求項 21 は、「Aβ の 25～37 番目のアミノ酸配列における GXXGモチーフのグリシンに 1 又は複数の置換変異を有する変異型 Aβ を含む液体を攪拌することで形成される合成 ASPD 様構造体」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 4 に区分する。

文献 1 小村仁美ほか、家族性アルツハイマー病 APP 変異体を発現した神経細胞における高分子量 Aβ 凝集体アミロスフェロイドの形成と神経毒性、日本分子生物学会年会プログラム・要旨集、2013, Vol.36, p.1P-0914, 全文

文献 2 WALSH DM et al., Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo, Nature, 2002, Vol.416 No.6880, pp.535-539, Abstract, p.538

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	B
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	C 1 2 N 15/12	

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

(72) 発明者 荒井 由江

京都市左京区聖護院川原町53番地 京都大学医学研究科メディカルイノベーションセンター T
A Oヘルスライフファーマ株式会社内

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA25 AA29 BA13 BA14 BB20 CA18 CA25 CA26 CB17
DA35 DA36 FA11 FA16 FB01 FB03 FB12 FB13 FB15 GC11
GC15 JA01
4B064 AG01 AG26 CA19 CC24 DA01 DA13
4C084 AA02 AA06 BA44 CA53 DC50 NA14 ZA151 ZA161
4C085 AA03 BA99 CC01 CC21 DD23 DD62 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 BA40 CA45 DA75 EA31 EA50 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	类淀粉样蛋白 (ASPD) 样结构和药物组合物		
公开(公告)号	JPWO2017179646A1	公开(公告)日	2019-02-21
申请号	JP2018512059	申请日	2017-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	道健康生活醫藥株式會社		
申请(专利权)人(译)	陶健康生活制药有限公司		
[标]发明人	星美奈子 荒井由江		
发明人	星 美奈子 荒井 由江		
IPC分类号	C12P21/02 C07K16/18 A01K67/027 C07K14/47 A61K39/00 A61P25/28 A61K38/16 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12N15/12		
CPC分类号	A61K35/12 A61K39/0007 A61P25/28 A61K39/00 C07K16/00 C12Q1/02 C12Q1/37 G01N33/50 G01N33 /53 A01K67/027 A01K2267/0312 A01K2267/0318 A61K38/00 C07K14/4711 C07K16/18 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2500/00		
FI分类号	C12P21/02.C C07K16/18.ZNA A01K67/027 C07K14/47 A61K39/00.H A61P25/28 A61K39/00.B A61K38 /16 G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12N15/12		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB20 2G045/CA18 2G045 /CA25 2G045/CA26 2G045/CB17 2G045/DA35 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB15 2G045/GC11 2G045/GC15 2G045/JA01 4B064 /AG01 4B064/AG26 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C085/AA03 4C085 /BA99 4C085/CC01 4C085/CC21 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA40 4H045/CA45 4H045/DA75 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2016081030 2016-04-14 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

细胞分泌性类淀粉样球样结构，使用该结构的药物和疫苗及其制备方法。一方面，在培养基中培养表达淀粉样前体蛋白 (APP) 或淀粉样β 蛋白 (Aβ) 序列的一部分的细胞，并在培养基中培养类细胞分泌性淀粉样球蛋白 (ASPD) 样细胞。本发明涉及一种包括获得结构的步骤的制造方法。

(19) 日本国特許庁 (JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号 WO2017/179646
発行日 平成31年2月21日 (2019. 2. 21)	(43) 国際公開日 平成29年10月19日 (2017. 10. 19)	
(51) Int. Cl. C12P 21/02 (2006. 01) C07K 16/18 (2006. 01) A01K 67/027 (2006. 01) C07K 14/47 (2006. 01) A61K 39/00 (2006. 01)	FI C12P 21/02 C C07K 16/18 ZNA A01K 67/027 C07K 14/47 A61K 39/00 H	テーマコード (参考) 2G045 4B064 4C084 4C085 4H045 (全 35 頁) 最終頁に続く
出願番号 特願2018-512059 (P2018-512059)	(71) 出願人 511292334	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/015089	TAOヘルスライフファーマ株式会社	
(22) 国際公開日 平成29年4月13日 (2017. 4. 13)	京都府京都市左京区吉田下岡連町4-6-2	
(31) 優先権主張番号 特願2016-81030 (P2016-81030)	9 京都大学医薬系総合研究棟	
(32) 優先日 平成28年4月14日 (2016. 4. 14)	110000040	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 特許業務法人池内アンドパートナーズ	
	(72) 発明者 星 美奈子	
	京都市左京区聖護院川原町5-3番地 京都大学医学研究科メデイカルイノベーションセンター TAOヘルスライフファーマ株式会社内	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 アミロスフェロイド (ASPD) 様構造体及び医薬組成物		