

(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2020-524132

(P2020-524132A)

(43) 公表日 令和2年8月13日 (2020.8.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 47/64</b> (2017.01)	A 6 1 K 47/64	4 C 0 7 6
<b>C 0 7 K 7/00</b> (2006.01)	C 0 7 K 7/00	Z N A 4 C 0 8 4
<b>C 0 7 K 14/00</b> (2006.01)	C 0 7 K 14/00	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 45/00</b> (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 P 25/28</b> (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 54 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-565526 (P2019-565526)  
 (86) (22) 出願日 平成30年6月5日 (2018.6.5)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年12月20日 (2019.12.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/036116  
 (87) 国際公開番号 W02018/226735  
 (87) 国際公開日 平成30年12月13日 (2018.12.13)  
 (31) 優先権主張番号 62/515, 272  
 (32) 優先日 平成29年6月5日 (2017.6.5)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(71) 出願人 597138069  
 ケース ウェスタン リザーブ ユニバー  
 シティ  
 アメリカ合衆国, オハイオ 44106,  
 クリーブランド, ユークリッド アベニュー  
 10900  
 (71) 出願人 512253017  
 オハイオ ステート ユニバーシティ  
 アメリカ合衆国, オハイオ州 43210  
 , コロンブス, 333 ダブリュー. 10  
 番 アベニュー  
 (74) 代理人 100114775  
 弁理士 高岡 亮一  
 (74) 代理人 100121511  
 弁理士 小田 直

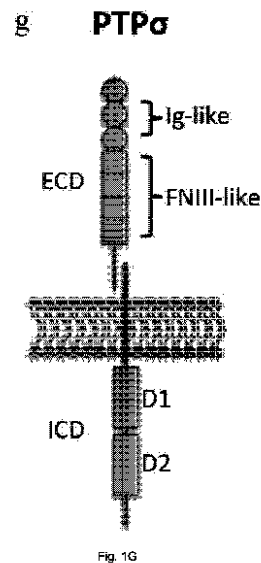
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病を治療するための組成物および方法

## (57) 【要約】

アミロイド蓄積および/またはタウ凝集の阻害および/または低減を必要とする対象に対し、それを実施する方法であって、LARファミリーのホスファターゼの触媒活性、シグナル伝達、および機能の1つまたは複数を阻害する治療薬を対象に投与することを含む、方法。

【選択図】図1G



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

アミロイド蓄積および/またはタウ凝集の阻害および/または低減を必要としている対象に対しそれを実施する方法であって、

LARファミリーのホスファターゼの触媒活性、シグナル伝達、および機能の1つまたは複数を阻害する治療薬を前記対象に投与することを含む、方法。

**【請求項 2】**

前記LARファミリーホスファターゼが、受容体タンパク質チロシンホスファターゼシグマ(PTP)であり、前記治療薬が治療用ペプチドを含み、前記治療用ペプチドが、PTPのくさび形ドメインの約10~約20個の連続するアミノ酸に対して少なくとも約85%同一であるアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の方法。

10

**【請求項 3】**

前記LARファミリーホスファターゼが、受容体タンパク質チロシンホスファターゼシグマ(PTP)であり、前記治療薬が治療用ペプチドを含み、前記治療用ペプチドが、PTPのくさび形ドメインの約10~約20個の連続するアミノ酸に対して少なくとも約95%同一であるアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記治療薬が、配列番号9~13および16からなる群より選択される治療用ペプチドを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記治療薬が、配列番号16からなる治療用ペプチドを含む、請求項1に記載の方法。

20

**【請求項 6】**

前記治療薬が、配列番号16に対して少なくとも約65%同一であり、配列番号16の残基4、5、6、7、9、10、12または13の内の少なくとも1つのアミノ酸の保存的置換を含む治療用ペプチドを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記治療薬が、治療用ペプチドに連結されている輸送部分を含み、治療される神経細胞による前記治療用ペプチドの取り込みを容易にする、請求項2~6のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記輸送部分が、HIV Tat輸送部分である、請求項7に記載の方法。

30

**【請求項 9】**

前記治療薬が、治療される前記対象に全身投与される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記治療薬が、前記細胞中で発現される、請求項2~6のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記対象がアルツハイマー病である、請求項1~10のいずれかに1項に記載の方法。

**【請求項 12】**

治療を必要としている対象のアルツハイマー病を治療する方法であって、前記LARファミリーのホスファターゼの触媒活性、シグナル伝達、および機能の1つまたは複数を阻害する治療薬を前記対象に投与することを含む、方法。

40

**【請求項 13】**

前記LARファミリーホスファターゼが、受容体タンパク質チロシンホスファターゼシグマ(PTP)であり、前記治療薬が治療用ペプチドを含み、前記治療用ペプチドが、PTPのくさび形ドメインの約10~約20個の連続するアミノ酸に対して少なくとも約85%同一であるアミノ酸配列を有する、請求項12に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記LARファミリーホスファターゼが、受容体タンパク質チロシンホスファターゼシグマ(PTP)であり、前記治療薬が治療用ペプチドを含み、前記治療用ペプチドが、PTPのくさび形ドメインの約10~約20個の連続するアミノ酸に対して少なくとも

50

約 95% 同一であるアミノ酸配列を有する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記治療薬が、配列番号 9 ~ 13 および 16 からなる群より選択される治療用ペプチドを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

前記治療薬が、配列番号 16 からなる治療用ペプチドを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 17】

前記治療薬が、配列番号 16 に対して少なくとも約 65% 同一であり、配列番号 16 の残基 4、5、6、7、9、10、12 または 13 の内の少なくとも 1 つのアミノ酸の保存的置換を含む治療用ペプチドを含む、請求項 12 に記載の方法。

10

【請求項 18】

前記治療薬が、治療用ペプチドに連結されている輸送部分を含み、治療される神経細胞による前記治療用ペプチドの取り込みを容易にする、請求項 3 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記輸送部分が、HIV Tat 輸送部分である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記治療薬が、治療される前記対象に全身投与される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 21】

前記治療薬が、前記細胞中で発現される、請求項 13 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記治療薬が、分泌酵素阻害剤と組み合わせて投与される、請求項 13 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記分泌酵素阻害剤が、BACE1 阻害剤または - 分泌酵素阻害剤の内の少なくとも 1 つを含む、請求項 22 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

関連出願

本出願は、2017年6月5日に出願された米国仮特許出願第62/515,272号からの優先権を主張する。この仮出願の主題は、全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本出願は、白血球共通抗原関連(LAR)ファミリーのホスファターゼの活性、シグナル伝達および/または機能を阻害または低減する組成物および方法、ならびにアミロイドーシスを阻害し、アルツハイマー病を治療するための方法および組成物に関する。

40

【背景技術】

【0003】

アルツハイマー病(AD)の確定的病理学的特徴は、アミロイドーシスとしても知られる過程である、脳内でのアミロイド(A)ペプチドの徐々に進行する凝集であり、多くの場合、神経炎症および微小管結合タンパク質のタウを含有した神経原線維濃縮体の形成が付随して起こる。

【0004】

ADの病因学的機序については、議論が続けられているところであるが、ヒトの遺伝的調査からの具体的証拠は、遺伝子変異によるAの過剰産生が細胞傷害性イベントのカスケードを不可避的にもたらし、最終的に神経変性および脳機能の崩壊に繋がることを示し

50

た。従って、A ペプチドの、特にそれらの可溶型での蓄積は、AD発症の重要な犯人として認識されている。脳では、A ペプチドは主に、神経アミロイド前駆体タンパク質 (APP) の - および - 分泌酵素による逐次切断から生ずる。しかし、数十年に及ぶ研究にもかかわらず、アミロイド形成性分泌酵素活性の分子調節は、理解が進んでおらず、APPアミロイド形成経路を特異的に標的とする治療薬の設計を妨げている。

#### 【0005】

- および - 分泌酵素活性の薬理的阻害は、A 産生の抑制では効果的であるが、分泌酵素の他の基質に対する生理学的機能を妨害する。従って、このような介入戦略は、不都合な副作用に本質的に関連する場合が多く、このことが、過去における臨床試験のいくつかの失敗に繋がった。現在まで、ADの発症を防ぐ、または進行を抑制するために利用可能な治療法は存在しない。

10

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

本明細書で記載の実施形態は、アミロイド蓄積および/またはタウ凝集の阻害および/または低減を必要としている対象に対しそれを実施する方法に関する。方法は、LARファミリーのホスファターゼ触媒活性、シグナル伝達および機能の1つまたは複数を阻害する治療薬を対象に投与することを含む。

#### 【0007】

いくつかの実施形態では、LARファミリーのホスファターゼは、受容体タンパク質チロシンホスファターゼシグマ (PTP) であり、治療薬には、PTP のくさび形ドメインの約10~約20個の連続するアミノ酸に対して少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%同一のアミノ酸配列を有する治療用ペプチドが含まれる。例えば、治療薬は配列番号9~13および16からなる群より選択される治療用ペプチドを含むことができる。

20

#### 【0008】

他の実施形態では、LARファミリーのホスファターゼは、受容体タンパク質チロシンホスファターゼシグマ (PTP) であり、治療薬は、配列番号16のアミノ酸配列に対して少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%同一の治療用ペプチドを含むことができる。治療用ペプチドは、例えば、配列番号16の残基4、5、6、7、9、10、12または13個の内の少なくとも1、2、3または4個のアミノ酸の保存的置換を含むことができる。

30

#### 【0009】

いくつかの実施形態では、治療薬は、対象に、または神経細胞、グリア細胞、グリア前駆細胞または神経前駆細胞に全身投与または局所投与される。

#### 【0010】

他の実施形態では、治療薬は、治療用ペプチドと連結され、細胞による治療用ペプチドの取り込みを容易にする輸送部分を含む。例えば、輸送部分はHIVのTat輸送部分であり得る。

40

#### 【0011】

さらに他の実施形態では、細胞は治療される対象中にあり、治療薬は治療される対象に局所投与または全身投与される。

#### 【0012】

さらに他の実施形態では、治療用ペプチドは対象の細胞により発現される。

#### 【0013】

本明細書で記載の実施形態は、治療を必要としている対象の アミロイド蓄積および/またはタウ凝集に関連する疾患、障害、および/または状態を治療する方法にも関する。方法は、LARファミリーのホスファターゼの触媒活性、シグナル伝達および機能の1つまたは複数を阻害する治療薬を対象に投与することを含む。

50

## 【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、疾患、障害および／または状態には、神経系の疾患、障害および／または状態の少なくとも1つが含まれる。

## 【 0 0 1 5 】

他の実施形態では、神経系の疾患、障害および／または状態には、神経障害、神経精神障害、神経損傷、神経毒性障害、神経障害性疼痛、および神経変性障害の少なくとも1つが含まれる。

## 【 0 0 1 6 】

例えば、神経障害には、アルツハイマー病またはアルツハイマー病関連認知症の内の少なくとも1つを含み得る。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 1 7 】

【図1】(A～I)。PTP は、脳中でAPPの結合相手であることを示す画像および免疫プロットである。A～F：成体ラットの海馬CA1ニューロン中のPTP (A)およびAPP(B)の共局在化が共焦点画像化により示される。CA1ニューロンの核がDAPIで染色されている(C)。D：3つのチャンネルをマージしたもの。スケールバーは50 μm。E：Dの神経細胞体層の拡大像。矢印は、頂端部樹状突起の初期セグメント中のPTPとAPPの強い共局在化を示す；矢頭は、核周辺領域中の共局在化点状物を示す。スケールバーは20 μm。F：Dの軸索コンパートメント中の極微粒子状の点状物の拡大像。矢印は、焦点面に垂直に突き出た軸索中のPTPとAPPの共局在化を示す。スケールバーは10 μm。G：2つのサブユニット複合体として細胞表面上で発現したPTPの概略図。PTPは、細胞外ドメイン(ECD)および膜貫通型細胞内ドメイン(ICD)へと翻訳後プロセッシングされる。これらの2つのサブユニットは、非共有結合を介して相互に結合する。Ig様：免疫グロブリン様ドメイン；FNIII様：フィブロネクチンIII様ドメイン；D1およびD2：2つのホスファターゼドメイン。H、I：マウス前脳溶解物由来のPTPおよびAPPの共免疫沈降(co-IP)。左パネル：マウス前脳中のPTPおよびAPPの発現。右パネル：APPのC末端(C-term)に対し特異的な抗体を用いたIP。抗APP C-term抗体により、完全長APP(APP FL)が検出される。H：PTP-ECDに対する抗体により検出して、PTPは、野生型の前脳溶解物由来のAPPと共免疫沈降するが、PTP欠損マウス(Balb/c背景)の場合には、そうではない。I：PTP-ICDに対する抗体により検出して、PTPは、野生型の前脳溶解物由来のAPPと共免疫沈降するが、APPノックアウトマウス(B6背景)の場合には、そうではない。Iの点線は、相互に隣接するように移動した同じウェスタンプロット曝露時のレーンを示す。示した画像は、少なくとも3回の独立した実験の代表例である。

【図2】(A～I)。PTPの遺伝子欠乏が、APPのアミロイド形成性生成物を低減させることを示す模式図、免疫プロット、およびグラフである。A：-および-分泌酵素によるAPPのアミロイド形成プロセッシングを示す模式図である。完全長APP(APP FL)は、-分泌酵素により可溶性N末端(sAPP)およびC末端(CTF)フラグメントに切断される。APP CTFは、-分泌酵素により、C末端細胞内ドメイン(AICD)およびAペプチドにさらにプロセッシングされ得る。Aの凝集は、ADの確定的病理学的特徴である。B：PTP欠損は、APP FLの発現に影響を与えることなく、マウス前脳溶解物中の約15 KDのAPP CTFのレベルを低減する。APPのC末端に対する抗体は、マウスおよびヒト両方の起源のAPP FLおよびCTFを認識する。CおよびD：15 KD APP CTFは、ダイアグラム(A)でマークされた抗体対を用いて、ウェスタンプロット分析の後の免疫沈殿(IP)によりCTFと特定される。Aのアミノ酸1～16に対する抗体(抗A 1-16)は、CTFを検出するが、CTF中にはエピトープが存在しないので、CTFを検出しない。C：マウス内在性CTFレベルは、PTP欠損マウス脳中で低減されている。4回実施した反復実験をデンシトメトリーにより定量化した。D：ヒト遺伝子導入CTF

10

20

30

40

50

レベルは、ヒト A P P - S w D I 導入遺伝子を含む P T P 欠損マウス脳中で低減されている。6 回行った反復実験をデンシトメトリーにより定量化した。C および D 両方の各実験内で、P T P 欠損試料由来の値は、野生型 P T P の試料由来の値に正規化された。E および F : P T P 欠損は、E L I S A アッセイで測定して、T g A P P - S w D I マウス中の A 40 ( E ) および A 42 ( F ) のレベルを低減する。各群 n = 12。P T P 欠損試料からの平均値は、野生型 P T P の試料由来の値に正規化された。G および H : 10 月齢の T g A P P - S w D I マウスの海馬中での A の沈着。A ( 緑 ) は、抗 A 抗体クローン 6 E 10 ( G ) およびクローン 4 G 8 ( H ) を用いて免疫蛍光染色により検出される。D A P I 染色を示す。P T P 欠損は、T g A P P - S w D I マウスの脳中の A 量を有意に低減させる。H : 上段パネル : 背側海馬台 ( D S ) と C A 1 との間の多形細胞層 ( G の矢印でも示されている ) ; 中段パネル : C A 1 と C A 2 との間の多形細胞層 ; 下段パネル : 歯状回の門部 ( D G ; G の矢頭でも示される ) 。左列 : 一次抗体を用いない対照染色 ( 1 次 A b なし ) 。A シグナルは非遺伝子導入マウスでは検出されない ( データは示さず ) 。スケールバー G : 500  $\mu$ m、h : 100  $\mu$ m。示した画像は、9 ~ 11 月齢の同年、同性のマウス 5 対中の代表的な対を示す。I : P T P の遺伝子欠乏は、T g A P P - S w D I マウスの A の病状進行を抑制する。9 および 16 月齢 T g A P P - S w D I マウス由来の D G 門部の A 免疫蛍光染色 ( 6 E 10 による ) の I m a g e J 定量化。各群 n = 3。D G 門部中の A の総密度を門部の面積サイズに正規化し、平均強度を得て、棒グラフとして示した。各群の平均値を、野生型 P T P を発現している 16 月齢 T g A P P - S w D I マウスの値に正規化した。全 p 値 : スチューデントの両側 t 検定。エラーバー : S E M。

【図 3】( A ~ C )。P T P 欠損脳中の B A C E 1 と A P P との間の低親和性を示す免疫プロット、グラフ、およびプロットである。A : 共免疫沈降実験は、緩やかな洗浄剤条件 ( 1 % N P 40 ) 下で、野生型および P T P 欠損マウス脳中でほぼ同じ B A C E 1 - A P P 結合を示す。しかし、P T P 欠損脳では、共免疫沈降により検出された B A C E 1 - A P P 結合は、野生型脳の場合に比べて、洗浄剤の過酷さの増大に対し影響をより受けやすい。プロットのパネルは、マウス前脳溶解物由来の抗 B A C E 1 抗体でブルダウンした完全長 A P P ( A P P F L ) を示す。N P 40 : N o n i d e t P - 40、非イオン洗浄剤。S D S : ナトリウムドデシルスルフェート、イオン性洗浄剤。B : A の中段パネルに示す、1 % N P 40 および 0 . 3 % S D S を用いた緩衝液条件下で共免疫沈降を 3 回反復した。各実験をデンシトメトリーにより定量化し、P T P 欠損試料由来の値を野生型試料の値のパーセンテージとして計算した ( C のオレンジ色の点としても示される ) 。エラーバー : S E M。p 値 : スチューデントの両側 t 検定。C : 各洗浄剤条件下で共免疫沈降実験を反復した。ドットで示すパーセンテージ値は、B の場合と同じ方法を用いて誘導される。バーは平均を表す。次第に増加する過酷な緩衝液条件により、P T P 欠損脳中のより低い B A C E 1 - A P P 親和性が顕在化する。p 値および R<sup>2</sup> : 線形回帰。

【図 4】( A ~ F )。P T P は、総じて および 分泌酵素を調節しないことを示す免疫プロットの図である。分泌酵素の発現レベルも、他の大部分の基質に対するそれらの活性も、P T P 欠乏により影響を受けない。P T P を含むまたは含まないマウス前脳溶解物をウェスタンプロットにより分析した。A および B : P T P 欠損は、B A C E 1 ( A ) または - 分泌酵素サブユニット ( B ) の発現レベルを変えない。プレセニン 1 および 2 ( P S 1 / 2 ) は、- 分泌酵素の触媒サブユニットであり、これは、それらの成熟型の N 末端および C 末端フラグメント ( N T F および C T F ) にプロセッシングされる。ニカストリン、プレセニンエンハンサー 2 ( P E N 2 )、および A P H 1 は、- 分泌酵素の他の不可欠なサブユニットである。C : P T P 欠損は、ニューレグリン 1 ( N G R 1 ) C T F ( B A C E 1 による C 末端切断産物 ) のレベルを変えない。N R G 1 F L : 完全長ニューレグリン 1。D : - 分泌酵素によるノッチ切断産物のレベルは、P T P 欠損により影響を受けない。T M I C : ノッチ膜貫通 / 細胞内フラグメント、これは、- 分泌酵素により C 末端細胞内ドメイン N I C D ( 上段パネルのノッチ C 末端に対する抗体、および下段パネルの - 分泌酵素切断 N I C D に対する特異的抗体により、検

出される)に切断できる。E：AおよびCに対するアクチン負荷対照。F：BおよびDに対するアクチン負荷対照。示した全ての画像は、少なくとも3回の独立した実験の代表例である。示した全ての画像は、少なくとも3回の独立した実験の代表例である。

【図5】(A~I)。PTP 欠損がAPP遺伝子導入マウス中の反応性アストログリオシスを弱めることを示す画像およびグラフである。GFAP(反応性星状膠細胞のマーカー)の発現レベルは、PTP 欠乏により、TgAPP-SwDIマウスの脳中で抑制される。代表的画像は、9ヶ月齢TgAPP-SwDIマウスの脳の核のGFAPおよびDAPI染色を示す。A~D：海馬の歯状回(DG)；スケールバー 100 μm。E~H：一次体性感覚皮質；スケールバー 200 μm。I：9~11ヶ月齢のTgAPP-SwDIマウス由来のDG門部中のGFAPレベルのImageJ定量化。APP-SwDI(-)PTP (+/+): 非遺伝子導入野生型同腹仔(PTP を発現しているが、ヒトAPP導入遺伝子は発現していない)。DG門部中のGFAPの総密度を門部の面積サイズに正規化し、平均強度を得て、棒グラフとして示した。各群の平均値を、APP-SwDI(-)PTP (+/+)マウスの値に正規化した(画像は示さず)。APP-SwDI(-)PTP (+/+), n=4; APPSwDI(+ )PTP (+/+), n=4; APP-SwDI(+ )PTP (-/-), n=6。全p値：スチューデントの両側t検定。エラーバー：SEM。

【図6】(A~G)。PTP 欠損がシナプスの減少からAPP遺伝子導入マウスを保護することを示す画像およびグラフである。代表的画像は、CA3領域の苔状線維終末域におけるシナプス前のマーカーのシナプトフィジンの免疫蛍光染色を示す。A~F：シナプトフィジン：赤；DAPI：青。スケールバー：100 μm。G：9~11ヶ月齢のマウス由来のCA3苔状線維終末域中のシナプトフィジン発現レベルのImageJ定量化。CA3苔状線維終末域中のシナプトフィジンの総密度を面積サイズに正規化し、平均強度を得て、棒グラフとして示した。各群の平均値を、野生型APP-SwDI(-)PTP (+/+)マウスの値に正規化した。APP-SwDI(-)PTP (+/+) : n=4; APP-SwDI(+ )PTP (+/+) : n=6、APP-SwDI(+ )PTP (-/-) : n=6。全p値：スチューデントの両側t検定。エラーバー：SEM。

【図7】(A~H)。PTP 欠損が、TgAPP-SwDIマウスのタウ病状を軽減することを示す模式図、画像、およびグラフである。A：9~11ヶ月齢のTgAPP-SwDI遺伝子導入マウスの脳で、抗タウ抗体を用いて免疫蛍光染色により検出されたタウ凝集の分布パターンを示す模式図。凝集したタウは、APPSwDI(+ )PTP (+/+)マウスの梨状葉皮質および嗅内皮質の分子層中に最も顕著に認められ、また、海馬領域中で、たまに認められる。B：PTP 欠損は、タウ凝集を減少させる。棒グラフは、4対の同年、同性の9~11ヶ月齢のAPP-SwDI(+ )PTP (+/+)およびAPP-SwDI(+ )PTP (-/-)マウス由来の冠状脳切片中のタウ凝集の定量化を示す。各対に対し、APP-SwDI(+ )PTP (-/-)試料由来の値をAPP-SwDI(+ )PTP (+/+)試料由来の値に正規化する。p値：スチューデントの両側t検定。エラーバー：SEM。C、D：APP-SwDI(+ )PTP (+/+)脳中のタウ凝集を有する多くの領域の代表的画像。F、G：同年のAPP-SwDI(+ )PTP (-/-)脳中のタウ凝集を有するいくつかの領域の代表的画像。CおよびF：海馬領域。D~H：梨状葉皮質。E：dに隣接する部分の染色であるが、一次抗体は用いていない(1次Abなし)。H：同年の非遺伝子導入野生型同腹仔(PTP を発現しているが、ヒトAPP導入遺伝子は発現していない)では、タウ凝集体が検出されない。矢印は、タウ凝集体を示す。スケールバー：50 μm。

【図8】(A~C)。PTP 欠損が、TgAPP-SwDIマウスの行動欠陥を救済することを示すグラフである。A：Y-迷路アッセイでは、空間ナビゲーションの能力が、総アーム進入の内の自発的交替行動のパーセンテージによりスコア化される。値は、コロニー内の非遺伝子導入野生型APP-SwDI(-)PTP (+/+)マウスの値に正規化される。非遺伝子導入野生型マウスと比較して、APP-SwDI(+ )PTP (-/-)マウスの値は、

+ / + ) マウスは、短期空間記憶の障害を示し、これは、APP - SwDI ( + ) PTP ( - / - ) マウスの PTP の遺伝子欠乏により救済される。APP - SwDI ( - ) PTP ( + / + ) : n = 23 ( 18 匹の雌および 5 匹の雄 ) ; APP - SwDI ( + ) PTP ( + / + ) : n = 52 ( 30 匹の雌および 22 匹の雄 ) ; APP - SwDI ( + ) PTP ( - / - ) : n = 35 ( 22 匹の雌および 13 匹の雄 ) 。全ての遺伝子型群の年齢は、4 ヶ月齢および 11 ヶ月齢の間で類似になるように分配される。B、C : 新奇物体試験。NO : 新奇物体。FO : 馴染物体。探索時間 ( B ) および進入回数 ( C ) の観点から、NO に対する注意力が NO 探索の総物体探索 ( NO + FO ) に対する比率により測定される。値は、非遺伝子導入野生型マウスの値に正規化される。APP - SwDI ( + ) PTP ( + / + ) マウスは、野生型 APP - SwDI ( - ) PTP ( + / + ) マウスに比べて、NO への関心の低減を示した。障害は、APP - SwDI ( + ) PTP ( - / - ) マウスの PTP 欠乏により回復される。APP - SwDI ( - ) PTP ( + / + ) : n = 28 ( 19 匹の雌および 9 匹の雄 ) ; APP - SwDI ( + ) PTP ( + / + ) : n = 46 ( 32 匹の雌および 14 匹の雄 ) ; APP - SwDI ( + ) PTP ( - / - ) : n = 29 ( 21 匹の雌および 8 匹の雄 ) 。全ての群の年齢は、4 ヶ月齢および 11 ヶ月齢の間で類似になるように分配される。全 p 値 : スチューデントの両側 t 検定。エラーバー : SEM。

【図 9】PTP 欠損が、Tg APP - SwDI マウスの短期空間記憶を回復することを示すグラフである。Y - 迷路アッセイでは、空間ナビゲーションの能力が、総アーム進入の内の自発的交替行動のパーセンテージによりスコア化される。ここで示される生の値は、図 6 A の正規化前のものである。非遺伝子導入野生型 APP - SwDI ( - ) PTP ( + / + ) マウスと比較して、APP - SwDI ( + ) PTP ( + / + ) マウスは、短期空間記憶の障害を示し、これは、PTP の遺伝子欠乏により救済される。APP - SwDI ( - ) PTP ( + / + ) : n = 23 ( 18 匹の雌および 5 匹の雄 ) ; APP - SwDI ( + ) PTP ( + / + ) : n = 52 ( 30 匹の雌および 22 匹の雄 ) ; APP - SwDI ( + ) PTP ( - / - ) : n = 35 ( 22 匹の雌および 13 匹の雄 ) 。全ての遺伝子型群の年齢は、4 ヶ月齢および 11 ヶ月齢の間で類似になるように分配される。全 p 値 : スチューデントの両側 t 検定。エラーバー : SEM。

【図 10】( A ~ D ) 。PTP 欠損が Tg APP - SwDI マウスによる新奇物体探索を高めることを示すグラフである。NO : 新奇物体。FO : 馴染物体。A および B : 新奇物体試験では、NO の嗜好性が、NO および FO 探索の間の比率により測定され、NO / FO > 1 は、NO に対する嗜好性を示す。C および D : さらに、NO に対する注意力が、識別指数 : NO / ( NO + FO ) 、NO 探索の総物体探索 ( NO + FO ) に対する比率、により測定される。ここで示した c および d の生の値は、図 6 B および C の正規化前のものである。このコロニーのマウスは、それらの親 B a l b / c 株からの遺伝であると思われる、低いベースラインの NO / ( NO + FO ) 識別指数を示す。非遺伝子導入野生型 APP - SwDI ( - ) PTP ( + / + ) マウスに対しては、識別指数は僅かに 0.5 ( 確率値 ) より高く、以前に B a l b / c 野生型マウス 27 に関し報告されたものと類似である。従って、識別指数の測定値だけでは、NO / FO 比のように、NO に対する嗜好性を示さないかもしれない。物体の嗜好性の測定では高感度ではないが、NO / ( NO + FO ) 指数は、総物体探索活動に対する NO 探索の正規化を与えるので、最もよく使われる。それぞれは、それ自体の利点と欠点を有するが、NO / FO および NO / ( NO + FO ) 測定値は、Tg APP - SwDI 遺伝子の発現が NO に対する注意力の障害に繋がり、一方で、PTP の遺伝子欠乏が、新奇物体の探索を非遺伝子導入野生型マウスに近いレベルまで回復させることを一貫して示す。A および C : 探索時間の観点での測定値。B および D : 進入回数の観点での測定値。APP - SwDI ( - ) PTP ( + / + ) : n = 28 ( 19 匹の雌および 9 匹の雄 ) ; APP - SwDI ( + ) PTP ( + / + ) : n = 46 ( 32 匹の雌および 14 匹の雄 ) ; APP - SwDI ( + ) PTP ( - / - ) : n = 29 ( 21 匹の雌および 8 匹の雄 ) 。全ての群の年齢は、4 ヶ月齢および 11 ヶ月齢の間で類似になるように分配される。全 p 値 : スチューデントの両側 t 検定。エラーバー



: S E M。

【図 1 1】(A ~ C)。PTP 欠損が T g A P P - S w I n d マウスの行動成績を改善することを示す。A: Y - 迷路アッセイでは、空間ナビゲーションの能力が、総アーム進入の内の自発的交替行動のパーセンテージによりスコア化される。A P P - S w I n d ( + ) P T P ( + / + ) マウスに比べて、A P P - S w I n d ( + ) P T P ( - / - ) マウスは、短期空間記憶の改善を示した。A P P - S w I n d ( + ) P T P ( + / + ) : n = 4 0 ( 2 0 匹の雌および 2 0 匹の雄 ) ; A P P - S w I n d ( + ) P T P ( - / - ) : n = 1 8 ( 9 匹の雌および 9 匹の雄 )。両方の遺伝子型群の年齢は、4 ヶ月齢および 1 1 ヶ月齢の間で類似になるように分配される。B、C: 新奇物体試験。NO: 新奇物体。FO: 馴染物体。NO 嗜好性が NO 探索時間の総物体探索時間に対する比率 ( B ) および NO 探索時間の FO 探索時間に対する比率 ( C ) により測定される。PTP 欠乏は、これらの遺伝子導入マウスにおける新奇物体嗜好性を改善する。A P P - S w I n d ( + ) P T P ( + / + ) : n = 4 3 ( 2 1 匹の雌および 2 2 匹の雄 ) ; A P P - S w I n d ( + ) P T P ( - / - ) : n = 2 4 ( 1 0 匹の雌および 1 4 匹の雄 )。両方の群の年齢は、5 ヶ月齢および 1 5 ヶ月齢の間で類似になるように分配される。全 p 値: スチューデントの両側 t 検定。エラーバー: S E M。

10

【図 1 2】単独で投与された - 分泌酵素阻害剤または - 分泌酵素阻害剤と組み合わせて投与された B A C E 1 阻害剤と比較して、A P P プロセッシングに対する - 分泌酵素阻害剤と組み合わせた I S P の効果を示す免疫プロットである。

20

【発明を実施するための形態】

【0018】

本明細書に記載される実施形態は、特定の方法論、プロトコールおよび試薬等に限定されず、従って、変わり得る。本明細書で用いられる用語は特定の実施形態を記載するためのみのものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、本発明の範囲は、特許請求の範囲によってのみ定義される。操作例における場合以外または別義が指示される場合以外、本明細書で使用される成分または反応条件の量を表す全ての数は、全ての場合において、用語の「約」によって修飾されているものとして理解されるべきである。

【0019】

特定される特許および他の出版物はすべて、例えば、本発明との関連で使用され得るこのような出版物で記載された方法論を記載し、開示する目的で、参照により明示的に本明細書に組み込まれる。これらの出版物は本出願の出願日に先立つそれらの開示のためにのみ提供される。これに関しては、先行発明を理由にしてまたは何らかの他の理由で本発明者らがそのような開示に先行する権利を与えられないことを承認するものと解釈されるべきではない。これらの文書の内容に関する日付または表現に関する記載はすべて出願者に利用可能な情報に基づくものであり、これらの文書の日付または内容の正確さに関する承認を構成するものではない。

30

【0020】

別に定めのない限り、本明細書で使用される科学技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈により別義が要求されない限り、単数用語は複数を含むものとし、複数用語は単数を含むものとする。一般に、本明細書で記載される細胞および組織の培養、分子生物学、およびタンパク質およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの化学およびハイブリッド形成と関連して利用される命名法、ならびにそれらの技法は、当該技術で周知であり、一般に使用されるものである。

40

【0021】

本明細書で使用される場合、「a、b および c の 1 つまたは複数」は a、b、c、a b、a c、b c または a b c を意味する。本明細書における「または」の使用は、包含的なまたはである。

【0022】

本明細書で使用される場合、患者に「投与する」という用語には、脳脊髄液へのまたは

50

脳血管関門を横切る投与、非経口または経口の経路による送達、筋肉内注射、皮下または皮内注射、静脈内注射、頬内投与、経皮送達、および直腸、結腸、膣、鼻腔内のまたは気道経路による投与を含む、対象の所望の位置に活性化合物を送達するために（例えば、それにより、所望のニューロンなどの所望の細胞に接触させるために）好適な経路により、対象への医薬製剤中の活性化合物の分配、送達または適用が含まれる。薬剤は、例えば、静脈内注射を介して昏睡状態、麻酔下のもしくは麻痺した対象に投与され得、または妊娠した対象の静脈内に投与して胎児の軸索成長を刺激し得る。投与の特定の経路には、局所投与（例えば、まぶたの下に投入される点眼薬、クリームまたは浸食性の製剤）、水性体液または硝子体液への眼内注射、結膜下注射またはテノン嚢下注射を介するなどの眼の外層への注射、非経口投与または経口経路を介した投与が挙げられ得る。

10

#### 【0023】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」には、ヒトおよび動物のmAb、およびポリクローナル抗体、組換え抗体（抗血清）、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体およびその誘導体などのキメラ抗体を含む合成抗体の調製が挙げられる。抗体の一部またはフラグメントは、特定のエピトープに結合する能力（結合の特異性および親和性）の少なくとも一部を保持する抗体の領域を意味する。用語「エピトープ」または「抗原決定基」は抗体のパラトープが結合する抗原上の部位を意味する。連続アミノ酸により形成されるエピトープは通常、変性溶媒への暴露の際、保持されるが、三次折り畳みにより形成されるエピトープは通常、変性溶媒による処理の際に失われる。エピトープは通常、特有の空間配置中に少なくとも3個、少なくとも5個または8～10個、または約13～15個のアミノ酸を含む。エピトープの空間配置を決定する方法には、例えば、X線結晶学および二次元核磁気共鳴が挙げられる。例えば、66 EPI TOPE MAPPING PROTOCOLS IN METS. IN MOLECULAR BIO. (Morris, ed., 1996); Burke et al., 170 J. Inf. Dis. 1110-19 (1994); Tigges et al., 156 J. Immunol. 3901-10を参照されたい。

20

#### 【0024】

本明細書で使用される場合、「中枢神経系（CNS）のニューロン」には脳、脳神経および脊髄のニューロンが含まれる。

#### 【0025】

本明細書で使用される場合、「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、ポリペプチドをコードする第1のアミノ酸配列と、第1のポリペプチドのドメインに対して外来性であり、実質的に相同ではないドメイン（例えば、ポリペプチドの一部）を規定する第2のアミノ酸配列との融合体である。キメラタンパク質は、第1のタンパク質も発現する生物で見出される外来性のドメイン（異なるタンパク質中ではあるが）であってもよく、またはキメラタンパク質は、異なる種類の生物により発現されるタンパク質構造体の「種間」、「遺伝子間」等の融合体であってもよい。

30

#### 【0026】

本明細書で使用される場合、用語「ニューロンに接触すること」または「ニューロンを治療すること」は、薬剤がニューロン中でその医薬効果を示すことが可能である細胞または全生物への薬剤の送達または「投与」の任意の様式を意味する。「ニューロンに接触すること」には、本発明の薬剤をインビボおよびインビトロの両方でニューロンの近傍に運ぶ方法が含まれる。好適な投与方法は、当業者により決定することができ、このような投与方法は、薬剤の間で変化し得る。

40

#### 【0027】

本明細書で使用される場合、薬剤または治療用ペプチドの「有効量」は、所望の治療効果または医薬効果を達成するのに十分な量、例えば、アミロイド蓄積またはタウ凝集を阻害できる量である。本明細書で定義される薬剤の有効量は、例えば、対象の疾患の状態、年齢および体重、ならびに対象において、所望の応答を誘発する薬剤の能力などの因子により変化し得る。投与計画を調節して最適な治療応答をもたらし得る。有効量はまた、

50

治療上の有益な効果が活性化合物の毒性効果または有害効果に勝るものでもある。

【0028】

本明細書で使用される場合、用語の「治療有効量」は、必要な用量と期間で、所望の治療結果を達成するために有効な量を意味する。治療結果は、例えば、症状の減少、生存の延長、運動の改善などであり得る。治療結果は「治癒」である必要はない。

【0029】

本明細書で使用される場合、用語「発現」は、核酸がペプチドに翻訳されるまたは、例えば、ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質に翻訳できるRNAに転写される過程を意味する。核酸がゲノムDNAに由来するのであれば、発現は、適当な真核宿主細胞または生物が選択される場合、mRNAのスプライシングを含む。宿主細胞中で発現される異種核酸については、それは先ず細胞に送達され、その後、いったん細胞に入って、最終的に核に存在しなければならない。

10

【0030】

本明細書で使用される場合、用語の「遺伝子治療」には、治療または診断が求められる障害または状態にある哺乳動物、特にヒトの細胞への異種のDNAの移入が含まれる。選択された標的細胞にDNAが導入され、それにより、異種のDNAが発現され、それにより、コードされた治療用産物が産生される。あるいは、異種のDNAは、治療用産物をコードするDNAの発現を何らかの形で媒介し、治療用産物の発現を何らかの形で直接的にまたは間接的に媒介するペプチドまたはRNAなどの産物をコードし得る。遺伝子治療を用いて遺伝子産物をコードする核酸を送達して欠陥のある遺伝子を置き換えてもよく、またはそれが導入された哺乳動物または細胞により産生される遺伝子産物を補完してもよい。導入された核酸は、通常は哺乳動物宿主では産生されないまたは治療上有効な量でもしくは治療上有効な時間で産生されない、治療用化合物をコードし得る。治療用産物をコードする異種のDNAは、その産物または発現を増大するかまたは別の方法で変えるために、罹患している宿主の細胞に導入する前に修飾され得る。

20

【0031】

本明細書で使用される場合、用語の「遺伝子」または「組換え遺伝子」はエクソンおよび（任意に）イントロンの配列の両方を含むポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸を意味する。

【0032】

本明細書で使用される場合、用語の「異種核酸配列」は通常、それが発現される細胞によって、インビボでは通常産生されないRNAおよびタンパク質をコードするDNA、または転写、翻訳若しくは他の調節性の生物過程に影響を及ぼすことにより、内在性のDNAの発現を変更するメディエーターを媒介するもしくはそれをコードするDNAである。異種核酸配列はまた外来性のDNAとも呼ばれる。それが発現される細胞に対して異種または外来性であると当業者が認識するまたは見なすDNAは本明細書では異種DNAにより包含される。異種DNAの例には、限定されないが、薬剤耐性を付与するタンパク質などの追跡可能なマーカータンパク質をコードするDNA、治療上有効な物質をコードするDNA、ならびに抗体などの他の種類のタンパク質をコードするDNAが挙げられる。異種のDNAによって、コードされる抗体は、異種のDNAが導入されている細胞の表面で分泌され得るかまたは発現され得る。

30

40

【0033】

本明細書で使用される場合、用語の「相同性」および「同一性」は、全体を通して同義に使用され、2つのペプチド間のまたは2つの核酸分子間の配列類似性を意味する。相同性は、比較の目的で並べられ得る各配列における位置を比較することによって、決定できる。比較した配列における位置が同一の塩基またはアミノ酸で占められれば、その位置で分子は相同または同一である。配列間の相同性または同一性の程度は配列により共有される一致するまたは相同性の位置の数の関数である。

【0034】

本明細書で使用される場合、用語の「神経障害」には、対象の神経系の正常な機能また

50

は解剖学的構造に直接または間接的に影響する疾患、障害または状態が含まれる。

【0035】

本明細書で使用される場合、語句の「非経口投与」および「非経口で投与される」は本明細書で使用される場合、腸内投与および局所投与以外の、通常は注射による投与方法を意味し、これには、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、脳室内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節腔内、嚢下、クモ膜下、脊髄内および胸骨内の注射および注入が挙げられる。

【0036】

本明細書で使用される場合、語句の「全身投与」、「全身に投与される」、「末梢投与」および「末梢に投与される」は、本明細書で使用される場合、標的組織（例えば、中枢神経系）への直接投与以外の化合物、薬物またはその他の物質の投与を意味し、それにより、動物の体系に入り、従って、代謝および他の類似の過程、例えば、皮下投与を受ける。

10

【0037】

本明細書で使用される場合、用語の「患者」または「対象」または「動物」または「宿主」は任意の哺乳動物を意味する。対象はヒトであり得るが、獣医治療を必要とする哺乳動物、例えば、愛玩動物（例えば、イヌ、ネコ等）、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ニワトリ、ブタ、ウマ等）および実験動物（例えば、ラット、マウス、モルモット等）でもあり得る。

【0038】

本明細書で使用される場合、用語の「末梢神経系（PNS）のニューロン」には、CNSの外側に存在するまたは伸びるニューロンが含まれる。PNSは、感覚ニューロンおよび運動ニューロンを含む末梢神経系に分類されるとして一般的に理解されるニューロンを含むことが意図されている。

20

【0039】

本明細書で使用される場合、用語の「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」は本明細書では同じ意味で用いられる。

【0040】

本明細書で使用される場合、用語の「ペプチド」および「ポリペプチド」は、本明細書では同じ意味に用いられ、約2～約90個（包括的）のアミノ酸残基からなる化合物を意味し、1つのアミノ酸のアミノ基がペプチド結合により、別のアミノ酸のカルボキシル基に連結される。ペプチドは例えば、酵素切断または化学切断によって、ネイティブのタンパク質から導き出すまたは取り出すことができ、または従来のペプチド合成法（例えば、固相合成）または分子生物学的な技法により、調製できる（Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: LAB. MANUAL (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)を参照）。「ペプチド」は、好適なL-および/またはD-アミノ酸、例えば、一般的な-アミノ酸（例えば、アラニン、グリシン、バリン）、非-アミノ酸（例えば、P-アラニン、4-アミノ酪酸、6-アミノカプロン酸、サルコシン、スタチン）および異常アミノ酸（例えば、シトルリン、ホモシトルリン、ホモセリン、ノルロイシン、ノルバリン、オルニチン）を含むことができる。ペプチド上のアミノ基、カルボキシル基および/または他の官能基は遊離状態（例えば、非修飾）、または好適な保護基で保護され得る。アミノ基およびカルボキシル基の好適な保護基、および保護基を付加するまたは取り外す手段は当該技術で既知である。例えば、Green & Wuts, PROTECTING GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (John Wiley & Sons, 1991)を参照されたい。ペプチドの官能基も既知の方法を用いて誘導体化（例えば、アルキル化）することができる。

30

40

【0041】

ペプチドは合成することができ、また、多数の別々の分子種を含むライブラリを構築することができる。このようなライブラリはコンビナトリアル化学の周知の方法を用いて調

50

製することができ、本明細書で記載されるように、またはライブラリが、C S P G / P T P の相互作用に拮抗できるペプチドを含むかどうかを判定する好適な他の方法を用いて、スクリーニングすることができる。次いで好適な手段により、このようなペプチドのアンタゴニストを単離できる。

#### 【0042】

本明細書で使用される場合、用語の「ペプチド模倣体」は、ペプチドを模倣するように設計されたタンパク質様分子を意味する。ペプチド模倣体は通常、既存のペプチドの修飾から、またはペプトイドおよび - ペプチドなどのペプチドを模倣する類似の系を設計することによって、生じる。手法に関わりなく、化学構造を変えた設計を行うことにより、安定性または生物活性などの分子特性が有利に調節される。これらの修飾には、天然に存在しないペプチドに対する変更（例えば、変化した骨格および非天然のアミノ酸の取り込み）を含む。

10

#### 【0043】

本明細書で使用される場合、用語の「前駆細胞」は、その高分化型の子孫の特徴の全部ではない一部を有する幹細胞の分化の間に生成される細胞である。例えば、「神経前駆細胞」などの明確な前駆細胞は、系列に関係付けられているが、特定のまたは高分化細胞型には関係付けられない。

#### 【0044】

本明細書で使用される場合、用語「幹細胞」は、自己複製を受けることができ（すなわち、同じ分化能を持つ子孫）、分化能においてさらに拘束されている子孫細胞を生じることができる細胞を意味する。本発明の文脈の範囲内では、幹細胞は、例えば、核移入により、さらに原始的な幹細胞との融合により、特定の転写因子の導入により、または特定の条件下での培養により、脱分化しているさらに分化した細胞も包含する。例えば、Wilmut et al., Nature, 385: 810 - 813 (1997); Ying et al., Nature, 416: 545 - 548 (2002); Guan et al., Nature, 440: 1199 - 1203 (2006); Takahashi et al., Cell, 126: 663 - 676 (2006); Okita et al., Nature, 448: 313 - 317 (2007); and Takahashi et al., Cell, 131: 861 - 872 (2007)を参照されたい。

20

30

#### 【0045】

ポリヌクレオチド配列（DNA、RNA）は、発現制御配列がそのポリヌクレオチド配列の転写および翻訳を制御し、調節する場合、発現制御配列に「動作可能に連結される」。用語の「動作可能に連結される」には、発現されるポリヌクレオチド配列の前で適切な開始シグナル（例えば、ATG）を有すること、および正しいリーディングフレームを維持して発現制御配列の制御下でポリヌクレオチド配列の発現を可能にし、ポリヌクレオチド配列によりコードされる所望のポリペプチドの産生を可能にすることが含まれる。

#### 【0046】

本明細書で使用される場合、本明細書で使用される用語の「組換え」は、タンパク質が原核生物発現系または真核生物発現系に由来することを意味する。

40

#### 【0047】

本明細書で使用される場合、用語「組織特異的なプロモーター」は、プロモーターとして役立つ、すなわち、プロモーターに動作可能に連結された選択された核酸配列の発現を調節し、上皮細胞の細胞などの組織の特定の細胞の選択された核酸配列の発現に影響を与える核酸配列を意味する。この用語はまた1つの組織で主として選択された核酸の発現を調節するが、同様に他の組織でも発現を生ずるいわゆる「漏出性」プロモーターも網羅する。用語「遺伝子導入」は細胞による外来性DNAの取り込みを意味するのに使用される。外因性DNAが細胞膜の内側に導入されている場合、細胞は「遺伝子導入」されている。多数の遺伝子導入方法が当該技術で一般に知られている。例えば、Graham et al., Virology 52: 456 (1973); Sambrook et a

50

l., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986); Chu et al., Gene 13: 197 (1981)を参照されたい。このような技法を用いて、例えば、ヌクレオチド組込み型ベクターおよび他の核酸分子などの1つまたは複数の外来性DNA部分を好適な宿主細胞に導入できる。この用語は化学的、電気的、およびウイルス媒介遺伝子導入の手順を含む。

#### 【0048】

本明細書で使用される場合、用語の「転写調節配列」は、それらが動作可能に連結されるタンパク質コード配列の転写を誘導するまたは制御する開始シグナル、エンハンサーおよびプロモーターなどの核酸配列を意味するのに明細書全体を通して使用される一般的な用語である。いくつかの実施例では、組換え遺伝子の転写は、プロモーター配列（または他の転写調節配列）の制御下であり、それは、発現が意図される細胞型の組換え遺伝子の発現を制御する。組換え遺伝子は、これらの配列と同一であるまたは異なる、タンパク質の天然に存在する形態の転写を制御する転写調節配列の制御下であり得ることも理解されよう。

10

#### 【0049】

本明細書で使用される場合、用語の「ベクター」はそれが連結されている別の核酸を輸送することが可能である核酸分子を意味する。好ましいベクターは、それらが結合する核酸の自律複製および発現の1つまたは複数が可能であるものである。それらが動作可能に連結された遺伝子の発現を指示することが可能であるベクターは、本明細書では「発現ベクター」と呼ばれる。

20

#### 【0050】

本明細書で使用される場合、用語の「野生型」は、インビボでそれが正常に存在するような、それぞれ、タンパク質、またはその一部、またはタンパク質配列、またはその一部をコードする天然のポリヌクレオチドを意味する。本明細書で使用される場合、用語の「核酸」はデオキシリボ核酸(DNA)、および該当する場合には、リボ核酸(RNA)などのポリヌクレオチドを意味する。この用語は、ヌクレオチド類似体から作られ、記載の実施形態に適用可能なRNAまたはDNAの等価物、類似体として、一本鎖(センスまたはアンチセンス)および二本鎖のポリヌクレオチドを含むことは理解されるべきである。

30

#### 【0051】

本明細書で記載される方法で使用される薬剤、化合物、組成物、抗体等は、使用前に精製および/または単離することが検討される。精製された物質は通常、「実質的に純粋」であり、核酸、ポリペプチド、またはそのフラグメント、または他の分子が天然ではそれに付随する成分から分離されていることを意味する。通常、それが天然で結合するタンパク質および他の有機分子を、重量で少なくとも60%、70%、80%、90%、95%またはさらに99%含まない場合、ポリペプチドは実質的に純粋である。例えば、実質的に純粋なポリペプチドは、天然源からの抽出により、正常ではそのタンパク質を発現しない細胞における組換え核酸の発現により、または化学合成により、得られ得る。「単離された物質」はその天然の位置および環境から取り出されている。単離されたまたは精製されたドメインまたはタンパク質フラグメントの場合、ドメインまたはフラグメントは、天然配列のタンパク質に隣接するアミノ酸配列を実質的に含まない。用語の「単離されたDNA」は、DNAが天然のゲノム中で所与のDNAに隣接する遺伝子を実質的に含んでいないことを意味する。従って、用語の「単離されたDNA」は、例えば、cDNA、クローニングされたゲノムDNAおよび合成DNAを包含する。

40

#### 【0052】

本明細書で使用される場合、用語の「一部」、「フラグメント」、「バリエント」、「誘導体」および「類似体」は、本発明のポリペプチドを意味する場合、本明細書で言及される少なくとも一部の生物活性(例えば、結合などの相互作用の阻害)を保持するいずれかのポリペプチドを含む。本明細書で記載されるポリペプチドには、ポリペプチドが依然

50

としてその機能を果たす限り、限定されないが、一部、フラグメント、バリエーション、または誘導体分子が含まれ得る。本発明のポリペプチドまたはその一部には、タンパク分解フラグメント、欠失フラグメント、および特に、または動物に送達された際、作用部位にさらに容易に到達するフラグメントが含まれ得る。

#### 【0053】

本明細書で記載の実施形態は、アミロイド蓄積および/またはタウ凝集の阻害および/または低減を必要としている対象に対しそれを実施する方法に関する。アミロイド蓄積およびタウ凝集は、アルツハイマー病の特徴であるが、それらの根底にある分子機構は不明瞭なままである。我々は、2つのマウスモデルで、神経受容体PTPが、アミロイドおよびタウ病変形成の両方を媒介することを見出した。脳では、PTPは、アミロイド前駆体タンパク質(APP)に結合する。PTPの欠乏は、APPと-分泌酵素の間の親和性を、分泌酵素の他の主要な基質に影響を与えることなく低下させ、-および-切断によりAPPタンパク分解性産物を漸減させ、これは、アミロイド形成性調節の特異性を示唆する。ヒトAPP遺伝子導入加齢マウスでは、アミロイドーシス、タウ凝集、神経炎症、シナプスの減少、ならびに行動欠陥の進行は、全て、PTPの発現に対する明確な依存性を示す。さらに、内在性タウの凝集体は、アルツハイマー脳の初期段階神経原線維濃縮体に類似の分布パターンで見つかる。

10

#### 【0054】

PTPの細胞内触媒ドメイン(例えば、配列番号9を有するISP)のくさび形状ドメイン(すなわち、くさび形ドメイン)の小型ペプチド模倣体を用いたPTP活性または機能の遮断は、BACE1によるAPPアミロイド形成プロセッシングを、PTP欠乏と類似の程度まで抑制できる。好都合にも、PTPのくさび形ドメインのペプチド模倣体は、それを必要としている対象に送達されると、アミロイドおよびタウ病変形成の両方を阻害し、受動的アミロイド免疫療法に比べて、アミロイドを活性に抑制し、分泌酵素の他の基質に影響を与えることなく、APPプロセッシングを調節し、従って、分泌酵素阻害剤よりもより安全な治療法を提供できる。

20

#### 【0055】

したがって、本明細書で記載のいくつかの実施形態では、触媒活性、シグナル伝達およびPTPなどのLARファミリーのホスファターゼの機能の内の1つまたは複数を阻害する治療薬を、それを必要としている対象に投与して、それを必要としている対象のアミロイド蓄積および/またはタウ凝集を阻害および/または低減でき、および/またはアルツハイマー病および/またはアルツハイマー病に関連する認知症を治療できる。

30

#### 【0056】

PTPなどのLARファミリーのホスファターゼの活性、シグナル伝達、および/または機能は、次記を含むいくつかの方法で抑制、阻害、および/または遮断できる：LARファミリーのホスファターゼの細胞内ドメインの活性の直接阻害(例えば、小分子、ペプチド模倣体またはドミナントネガティブポリペプチドの使用により)；LARファミリーのホスファターゼの細胞内ドメインの活性、シグナル伝達、および/または機能の1つまたは複数を阻害する遺伝子および/またはタンパク質の活性化(例えば、遺伝子および/またはタンパク質の発現または活性を高めることにより)；LARファミリーのホスファターゼの下流メディエーターである遺伝子および/またはタンパク質の阻害(例えば、メディエーター遺伝子および/またはタンパク質の発現および/または活性を遮断することにより)；LARファミリーのホスファターゼの活性、シグナル伝達、および/または機能の1つまたは複数を負に制御する遺伝子および/またはタンパク質の導入(例えば、組換え遺伝子発現ベクター、組換えウイルスベクターまたは組換えポリペプチドを用いることにより)；または例えば、LARファミリーのホスファターゼの発現低下変異体による遺伝子の置換(例えば、組み換え遺伝子発現またはウイルスベクター、または変異誘発を用いた相同組換え、過剰発現により)。

40

#### 【0057】

PTPなどのLARファミリーのホスファターゼの活性、シグナル伝達および/また

50

は機能の1つまたは複数を阻害するまたは低減する治療薬には、CSPGなどのプロテオグリカンによるLARファミリーのホスファターゼの結合または活性化を阻害することなく、LARファミリーのホスファターゼの活性、シグナル伝達および/または機能を低下させるおよび/または抑制する薬剤を挙げることができる。このような薬剤は、細胞内にまたは細胞外に投与でき、送達されると、神経に有益な(neurosally)効果を生成する。

#### 【0058】

神経に有益な効果には、ニューロン、神経系の一部、または神経系全般の健康または機能に好ましい応答または結果を挙げることができる。そのような効果の例には、ニューロンまたは神経系の一部の損傷に耐える、再生する、所望の機能を維持する、増殖するまたは生存する能力における改善が挙げられる。神経に有益な効果には、神経系の構成成分の中での機能または回復力におけるこのような応答または改善を生成することまたは生じさせることを挙げることができる。神経に有益な効果の生成の例には、ニューロンに対する損傷後の軸索の成長を刺激すること；ニューロンをアポトーシスに対し抵抗性にする；ニューロンをアミロイド、アンモニア、またはその他の神経毒などの毒性化合物に対し抵抗性にする；加齢性神経萎縮または機能の低下を元に戻すこと；加齢性コリン作動性神経支配の低下を元に戻すこと；変性退縮を元に戻すおよび/または低減すること、および/または神経新芽形成を促進すること、が挙げられる。

#### 【0059】

LARファミリーのホスファターゼの調節、調整、および/または阻害に対して可能性のあるメカニズムの1つには、LARファミリーのホスファターゼの細胞内部分の二量体化が含まれる。二量体として活性があり、単量体としては不活性である受容体チロシンキナーゼとは対照的に、いくつかのタンパク質チロシンホスファターゼ(PTP)は二量体化した状態で不活性であり、単量体として活性がある。これらには、PTP、PTP1BおよびCD45が含まれる。これらの分子のそれぞれは、活性な単量体形態および不活性の二量体形態の両方に結晶化できる。さらに、LARおよびCD45は、特定の酸化条件下で同種親和性結合を示す一方で、PTPはリガンド結合に応答して二量体化できる。このことは、LARファミリーのホスファターゼに対するリガンドが、LARおよびPTPなどのLARファミリーのホスファターゼの活性化状態を誘導できることを示唆している。従って、細胞内標的療法を用いて、二量体化を模倣することにより、細胞外マトリックスまたは他のリガンドを変更することなく、LARファミリーのホスファターゼを直接不活化できる。

#### 【0060】

一実施形態では、PTPなどのLARファミリーのホスファターゼの活性、シグナル伝達および/または機能の1つまたは複数を阻害するまたは低減する治療薬には、少なくとも1つのLARファミリーのホスファターゼの細胞内ドメインに結合し、および/またはそれと複合体形成してLARファミリーのホスファターゼの活性、シグナル伝達および/または機能を阻害する治療用ペプチドまたは小分子を挙げることができる。従って、神経細胞の少なくとも1つのLARファミリーのホスファターゼの細胞内ドメインに結合する、および/またはそれと複合体形成する治療用ペプチドまたは小分子を用いて、アミロイド蓄積またはタウ凝集を阻害できる。

#### 【0061】

いくつかの実施形態では、治療薬は、LARファミリーのホスファターゼの細胞内触媒ドメインのくさび形形状のドメイン(すなわち、くさび形ドメイン)のペプチド模倣体であり得る。構造および配列の解析により、LARファミリーの全メンバーが、同種/異種親和性受容体の相互作用を媒介する可能性を有する第1の細胞内触媒ドメイン中に保存された24アミノ酸のくさび形形状のヘリックス・ループ・ヘリックスモチーフを含有することが明らかになった。表1は、くさび形ドメインを含有するLARファミリーのホスファターゼのメンバーの細胞内部分のアミノ酸配列を示す。LARファミリーのホスファターゼのこれらの細胞内部分の24アミノ酸のくさび形ドメインは下線で特定されている。



くさび形ドメインの特定の構造がLARファミリーのくさび形ドメインのほとんどで保存されている一方で、くさび形ドメインを構成する正確なアミノ酸は個々のタンパク質およびサブファミリーの間で変化する。

【表 1】

表 1

LAR くさび形ドメインアライメント				
マウス	1338	PIPITDLADNIERLKANDGKLFSQEYESIDPGQ	1370	配列番号 1
ラット	1338	PIPITDLADNIERLKANDGKLFSQEYESIDPGQ	1370	配列番号 2
ヒト	1347	PIPITDLADNIERLKANDGKLFSQEYESIDPGQ	1379	配列番号 3
PTP $\sigma$ くさび形ドメインアライメント				
マウス	1347	PIPITDMAEHMERLKANDSLKLSQEYESIDPGQ	1379	配列番号 4
ラット	1303	PIPITDMAEHMERLKANDSLKLSQEYESIDPGQ	1335	配列番号 5
ヒト	1368	PIPIADMAEHTERLKANDSLKLSQEYESIDPGQ	1400	配列番号 6
PTP $\delta$ くさび形ドメインアライメント				
マウス	1326	PIPILELADHIERLKANDNLKFSQEYESIDPGQ	1379	配列番号 7
ヒト	1335	PIPILELADHIERLKANDNLKFSQEYESIDPGQ	1367	配列番号 8

10

## 【0062】

特定のLARファミリーのメンバーのくさび形ドメインはその特定のLARファミリーのメンバーとの同種親和性相互作用または結合に関与することが明らかになった。例えば、プルダウンアッセイでは、LARのくさび形ドメインは完全長LARと特異的に相互作用することができたが、PTPなどの他のファミリーメンバーは相互作用できなかった。さらに、インビトロ結合アッセイは、PTP $\mu$ およびLARのくさび形ドメインペプチド（くさび形ドメイン+HIV-TAT）は、無差別に相互に結合するのではなく、同種親和性的に特異的に凝集した。特に興味深いのは、LARのくさび形ドメインがシグマに結合することができず、これは、類似のファミリーのメンバー間でさえ特異性があることを示している。

20

## 【0063】

いくつかの実施形態では、治療薬は、例えば、国際公開第2013/155103A1（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のものなどのPTPの細胞内触媒ドメインのくさび形形状のドメイン（すなわち、くさび形ドメイン）のペプチド模倣体であり得る。細胞（例えば、神経細胞）で発現される場合または細胞内輸送部分に結合される場合の、PTPのくさび形ドメインのペプチド模倣体を用いて、神経細胞におけるPTPシグナル伝達を消滅させることができ、アミロイド蓄積およびタウ凝集を阻害できる。これらの治療用ペプチドのPTPの無傷のくさび形ドメインへの結合は、可能性として、(i) PTPがホスファターゼ標的などの標的タンパク質を相互作用する能力を妨害する；(ii) PTPと、触媒的不活性な第2のホスファターゼドメインD2などのPTP中に含まれる別のドメインとの分子間相互作用促進活性を妨害する；タンパク質の活性ホスファターゼ部位へのアクセスを妨害する；(iii) くさび形ドメインの正常な相互作用を排除する；および/または(iv) ホスファターゼ活性を立体的に阻害する。

30

40

## 【0064】

いくつかの実施形態では、ペプチド模倣体（すなわち、治療用ペプチド）は、約10～約20個のアミノ酸を含み、それから本質的に成り、および/またはそれからなることができ、PTPなどのLARファミリーのホスファターゼのくさび形ドメインのアミノ酸配列の約10～約20個の連続するアミノ酸部分に対して少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または約100%同一であるアミノ酸配列を有する。

## 【0065】

他の実施形態では、治療用ペプチドは約10～約20個のアミノ酸を含み、から本質的

50

に成り、および／またはからなることができ、PTP のくさび形ドメインの約10～約20個の連続するアミノ酸部分に対して少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または100%同一であるアミノ酸配列を有する。

#### 【0066】

特定のLARファミリーメンバーのくさび形ドメイン配列を表2に示す。

#### 【表2】

表2

くさび形ドメインアライメント																									
0										1										2					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4		
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	ヒト PTP $\sigma$	配列番 号 9
D	L	A	D	N	I	E	R	L	K	A	N	D	G	L	K	F	S	Q	E	Y	E	S	I	LAR (Larフ ァミリー)	配列番 号 10
E	L	A	D	H	I	E	R	L	K	A	N	D	N	L	K	F	S	Q	E	Y	E	S	I	デルタ (Lar ファ ミリー)	配列番 号 11
K	L	E	E	E	I	N	R	R	M	A	D	D	N	K	I	F	R	E	E	F	N	A	L	ptp アル ファ	配列番 号 12

10

20

#### 【0067】

PTP のくさび形ドメインの第1のヘリックスは、アミノ酸1～10を含み、ターン領域はアミノ酸11～14を含み、第2のヘリックスはアミノ酸15～24を含む。例えば、ヒトPTP のくさび形ドメインの第1のヘリックスは、DMAEHTE RLK (配列番号13) のアミノ酸配列を有し、ターンはANDS (配列番号14) のアミノ酸配列を有し、第2のヘリックスはLKLSQEYESI (配列番号15) を有する。

#### 【0068】

くさび形ドメインはまた、LARファミリーの他のメンバー、LARおよびPTP と配列相同性を共有する。これらのアミノ酸はくさび形ドメインの全体構造に必要であると思われる。保存されたアミノ酸には13位のアラニンが含まれ、それは第1のヘリックスの末端およびターンの開始にマークし、一般的なくさび形のサイズおよび構造に必要な可能性が高い。

30

#### 【0069】

くさび形ドメインの大略の二次構造および三次構造がほとんどの受容体PTPで変わらないままなので、PTP のくさび形ドメインを標的とする治療用ペプチドに対していくつかの保存的置換を行って類似の結果を得ることができる。保存的置換の例には、例えば、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンなどの1つの非極性(疎水性)残基の別の残基への置換、アルギニンとリシンの間、グルタミンとアスパラギンの間、グリシンとセリンの間などの1つの極性(親水性)残基の別の残基への置換、リシン、アルギニンまたはヒスチジンなどの1つの塩基性残基の別の残基への置換、および／またはアスパラギン酸またはグルタミン酸などの1つの酸性残基の別の残基への置換が挙げられる。

40

#### 【0070】

これらの保存的置換は、ヘリックスまたはターンにおける独特ではないドメイン、特に第1のヘリックスにおける1～3位および7～10位、ターンにおける12および13位、ならびに第2のヘリックスにおける15、16、18～24位で行なうことができる。これらのアミノ酸はくさび形ドメインの全体構造に対して必要であり得るが、PTP へのくさび形の結合の特異性には必要ではない。

#### 【0071】

PTP に対する独特のアミノ酸、特にPTP とLARで差次的に発現されるアミノ酸は、くさび形ドメインの結合の特異性に必要であることが見出された。これらには、第

50

1のヘリックスの4位および5位、それに続く6位のスレオニンまたはメチオニン（ラットとマウスでの置換）におけるEHドメインが挙げられる。ターンでは、高等哺乳動物すべてにおいて、14位の独特のセリンがある。最後に、第2のヘリックスでは17位に独特のロイシンがある。これらの独特のアミノ酸の可能な役割は以下で考察する。

#### 【0072】

14位でのターンにおけるセリン残基はくさび形ドメインのその位置のために特に興味深い。ヘリックス間のターンに位置するこのアミノ酸は、PTPの一般的な二次構造および三次構造からやや伸びて、結合の相互作用にそれを利用できるようにしている。加えて、セリンは、そのヒドロキシル基およびそれが有する極性のために、例えば、隣接するセリン間の水素結合などのいくつかの同種親和性および異種親和性の結合事象を促進することが知られている。セリンはまたリン酸化のような種々の修飾を受けることも知られ、特異性のためのその必要性の可能性を高くしている。くさび形ドメインのターンに焦点を置き、保存されたセリンを含む小さなペプチドが類似の機能と共にさらに大きな安定性を提供し得ることは可能である。そのようなペプチドは、システインのいずれかの末端と共にループとして合成されてジスルフィド結合を生成することができる。

10

#### 【0073】

第1のヘリックスにおける独特のアミノ酸には、4位のグルタミン酸、5位のヒスチジンおよび6位のスレオニンまたはメチオニンが挙げられる。ヒスチジンはコンセンサスクさび形ドメインに関与するが、それはLAR、PTP、PTPmuまたはCD45には見つからない。これらの3個のアミノ酸はすべて帯電しているかまたは極性なので、この配列またはその成分の1つがPTPのくさび形の特異性に必要であると思われる。

20

#### 【0074】

さらに、第2のヘリックスは17位で独特のロイシンを含む。ロイシンは、ロイシンジッパーの三次元構造にとって重要な接着性分子に関係があるとされている。くさび形ドメインに構造的に類似するこれらの分子では、ほぼ7間隔で配置されている、対向するヘリックスのロイシンは、対向するヘリックスの疎水性領域と相互作用する。第1のヘリックスには9位に位置するロイシンもあるので、この独特のロイシンはPTPのくさび形の全体三次構造の構造的健全性に必要であると考えられる。

#### 【0075】

従って、他の実施形態では、治療用ペプチドは、約14～約20個のアミノ酸を含む、それから本質的になる、またはそれからなることができ、アミノ酸配列EHX<sub>1</sub>ERLKANDSLKL（配列番号16）を含み、配列中、X<sub>1</sub>はTまたはMである。配列番号16を含む治療用ペプチドは、治療用ペプチドが配列番号16に対して少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%相同であるアミノ酸配列を有するように少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、または少なくとも5個の保存的置換を含むことができる。

30

#### 【0076】

いくつかの実施形態では、保存的置換は、配列番号16のアミノ酸残基4E、5R、6L、7K、9N、10D、12L、または13Kのものであり得る。一例を挙げると、アミノ酸残基4EをDまたはQで置換することができ、アミノ酸残基5RをH、LまたはKで置換することができ、アミノ酸残基6LをI、VまたはMで置換することができ、アミノ酸残基7KをRまたはHで置換することができ、アミノ酸残基9NをEまたはDで置換することができ、アミノ酸残基10DをEまたはNで置換することができ、アミノ酸残基12LをI、VまたはMで置換することができ、および/またはアミノ酸残基13KをRまたはHで置換できる。

40

#### 【0077】

本明細書で記載される治療用ペプチドは、他の種々の変更、置換、挿入、および欠失を受けることができ、このような変更は、その使用時に、特定の利点をもたらす。この点で、LARファミリーのホスファターゼのくさび形ドメインに結合および/またはそれと複

50

合体形成する治療用ペプチドは、1つまたは複数の変更が行われ、それがLARファミリーのホスファターゼ機能の活性、シグナル伝達および/または機能の1つまたは複数に阻害するまたは低減する能力を保持する記述されたポリペプチドの配列に一致するのではなく、むしろ、それに相当し得る、または実質的に相同であり得る。

【0078】

治療用ペプチドは、アミド、タンパク質との複合体、環化ポリペプチド、重合ポリペプチド、類似体、フラグメント、化学修飾ポリペプチド、などの誘導体を含む種々の形態のポリペプチド誘導体のいずれかであり得る。

【0079】

保存的置換は、そのようなペプチドが必要な結合活性を示すという条件で非誘導体化残基の代わりに化学的に誘導体化した残基を使用することも含むことができることが十分に理解されよう。

【0080】

「化学的誘導体」は、官能側基の反応によって、化学的に誘導体化された1つまたは複数の残基を有する当該ポリペプチドを意味する。そのような誘導体化された分子には、例えば、遊離のアミノ基が誘導体化されてアミン塩酸塩、p-トルエンスルホニル基、カルボベンゾキシ基、t-ブトキシカルボニル基、クロロアセチル基、またはホルミル基を形成する分子が挙げられる。遊離のカルボキシル基は誘導体化されて塩、メチルエステルおよびエチルエステル、または他の種類のエステルまたはヒドラジドを形成し得る。遊離のヒドロキシル基は誘導体化されてO-アシルまたはO-アルキル誘導体を形成し得る。ヒスチジンのイミダゾール窒素は誘導体化されてN-イン-ベンジルヒスチジンを形成し得る。また、化学的な誘導体として包含されるのは、20個の標準アミノ酸の1個または複数の天然に存在するアミノ酸誘導体を含むポリペプチドである。例えば、4-ヒドロキシプロリンは、プロリンを置換してもよく、5-ヒドロキシリシンはリシンを置換してもよく、3-メチルヒスチジンはヒスチジンを置換してもよく、ホモセリンはセリンを置換してもよく、オルニチンはリシンを置換してもよい。本明細書で記載されるポリペプチドはまた、必要な活性が維持される限り、その配列が本明細書で示されるポリペプチドの配列に対する1つまたは複数の残基の付加および/または欠失を有する任意のポリペプチドも含む。

【0081】

本明細書で記載される治療用ペプチドの1種または複数のペプチドを、例えば、当該技術で既知である、翻訳後プロセッシングなどの天然の過程、および/または化学修飾法により修飾できる。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、および/またはアミノ末端またはカルボキシ末端を含むペプチドで行われ得る。同じ種類の修飾が所与のペプチドのいくつかの部位で、同じまたは異なる程度で存在し得ることは理解されよう。修飾は、例えば、限定されないが、アセチル化、アシル化、アセトアミドメチル(Acm)基の付加、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンへの共有結合、ヘム部分への共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、-カルボキシル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化およびユビキチン化などの転移RNAが介在するタンパク質へのアミノ酸の付加を含む(参考のために、例えば、Protein-structure and molecular properties, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New-York, 1993を参照されたい)。

【0082】

本明細書で記載のペプチドおよび/またはタンパク質は、例えば、生物学的に活性のある変異体、バリエーション、フラグメント、キメラおよび類似体も含み得る; フラグメントは、1個または複数のアミノ酸の短縮化を有するアミノ酸配列を包含し、短縮化は、アミノ

10

20

30

40

50

末端（N末端）、カルボキシ末端（C末端）、またはタンパク質の内部を起源とし得る。本発明の類似体には1個または複数のアミノ酸の挿入または置換を含む。バリエーション、変異体、フラグメント、キメラおよび類似体は、LARファミリーのホスファターゼの阻害剤として機能し得る（本発明の実施例に限定されることなく）。

#### 【0083】

本明細書で記載の治療用ポリペプチドは、当業者に既知の方法で調製され得る。ペプチドおよび/またはタンパク質は組換えDNAを用いて調製され得る。例えば、調製の1つには、細胞の中でペプチドおよび/またはタンパク質の発現を提供する条件下で宿主細胞（細菌または真核細胞）を培養することが含まれ得る。

#### 【0084】

ポリペプチドの精製は、アフィニティ法、イオン交換クロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィ、疎水性、またはタンパク質精製に通常使用される他の精製法により行われ得る。精製ステップは非変性条件下で実施できる。一方、変性ステップが必要である場合には、当該技術で既知の技法を用いてタンパク質が復元され得る。

#### 【0085】

いくつかの実施形態では、本明細書で記載される治療用ペプチドは、ポリペプチドが他のポリペプチド、タンパク質、検出可能な部分、標識、固体マトリクスまたはキャリアに好都合に連結され、および/または取り付けられ得るリンカーを提供することを目的として、ポリペプチドのいずれかの末端に付加され得る追加の残基を含むことができる。

#### 【0086】

アミノ酸残基のリンカーは普通、少なくとも残基1個であり、40個以上の残基であることができ、1~10個の残基であることがさらに多い。連結に使用される典型的なアミノ酸残基は、グリシン、チロシン、システイン、リシン、グルタミン酸およびアスパラギン酸等である。加えて、当該ポリペプチドは、末端-NH<sub>2</sub>アシル化、例えば、アセチル化により、または末端カルボキシルアミド化、例えば、アンモニア、メチルアミン等の末端修飾によるチオグリコール酸のアミド化により修飾されている配列によって、異なり得る。末端修飾は、周知のように、プロテアーゼ消化による感受性を低減するのに有用であるので、プロテアーゼが存在し得る溶液、特に生体液中のポリペプチドの半減期を延ばすように役立つ。この点で、ポリペプチドの環化も有用な末端修飾であり、環化により形成される安定な構造のために、および本明細書で記載のこのような環状ペプチドで認められる生物活性の観点で特に好ましい。

#### 【0087】

いくつかの実施形態では、リンカーは、治療用ペプチドを他のポリペプチド、タンパク質および/または検出可能な部分などの分子、標識、固体マトリクスまたはキャリアに連結する柔軟性のペプチドリinkerであり得る。柔軟性のペプチドリinkerは長さ約20個以下のアミノ酸であり得る。例えば、ペプチドリinkerは約12個以下のアミノ酸残基、例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11および12個を含み得る。いくつかの事例では、ペプチドリinkerは2個以上の次記のアミノ酸：グリシン、セリン、アラニンおよびスレオニンを含む。

#### 【0088】

いくつかの実施形態では、本明細書で記載される治療用ペプチドを含む治療薬は、治療用ペプチドに連結される少なくとも輸送用のサブドメインまたは部分（すなわち、輸送部分）を含む複合体タンパク質または薬剤送達構築物の形態で提供される。輸送部分は、治療用ポリペプチドの哺乳動物（すなわち、ヒトまたは動物）の組織または細胞（例えば、神経細胞）への取り込みを容易にできる。輸送部分は治療用ペプチドに共有結合できる。共有結合にはペプチド結合および不安定結合（例えば、容易に切断可能なまたは内部の標的細胞環境で化学変化にさらされる結合）が挙げられ得る。さらに、輸送部分は治療用ポリペプチドに架橋（例えば、化学架橋、UV架橋）することができる。輸送部分は本明細書で記載の連結ポリペプチドで治療用ポリペプチドに連結することもできる。

#### 【0089】

輸送部分は治療薬中で2回以上反復できる。輸送部分の反復は所望の細胞によるペプチドおよび/またはタンパク質の取り込みに影響し得る(例えば、取り込みを増やす)。輸送部分はまた、治療用ペプチドのアミノ末端またはそのカルボキシ末端の領域のいずれか、または両方の領域に位置し得る。

#### 【0090】

一実施形態では、輸送部分は、いったん輸送部分に連結されると治療用ペプチドが受容体に独立した機序によって、細胞に侵入することを可能にする少なくとも1つの輸送用ペプチドを含むことができる。一例では、輸送用ペプチドは、Tat媒介タンパク質送達配列と、配列番号9~13および16の少なくとも1つを含有する合成ペプチドである。これらのペプチドはそれぞれ、配列番号17~22のアミノ酸配列を有し得る。

10

#### 【0091】

既知の輸送用の部分、サブドメイン等の他の例は、例えば、カナダ特許第2,301,157号(アンテナペディアのホメオドメインを含有する複合体)、ならびに米国特許第5,652,122号、同第5,670,617号、同第5,674,980号、同第5,747,641号、および同第5,804,604号(Tat HIVタンパク質のアミノ酸含有複合体;単純性ヘルペスウイルス-1 DNA結合タンパク質VP22、4~30のヒスチジン反復長さの範囲のヒスチジントグ、または受容体とは独立した方法によって、活性カーゴ部分の取り込みを容易にすることが可能であるその変異誘導体またはホモログ)に記載されている。前述の全ての特許は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

#### 【0092】

アンテナペディアのホメオドメインの第3ヘリックスの16アミノ酸領域は、タンパク質(融合タンパク質として作られた)が細胞膜の通過を可能にすることが示されている(国際公開第99/11809号およびカナダ特許出願第2,301,157号)。同様に、HIVのTatタンパク質も細胞膜を通過することができることが示された。

#### 【0093】

加えて、輸送部分は、活性薬剤部分(例えば、細胞内ドメイン含有フラグメント阻害物質ペプチド)に共有結合された塩基性アミノ酸リッチ領域を有するポリペプチドを含むことができる。本明細書で使用される場合、用語の「塩基性アミノ酸リッチ領域」は、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン、グルタミン、リシンなどの塩基性アミノ酸の含量が高いタンパク質の領域に関する。「塩基性アミノ酸リッチ領域」は、例えば、15%以上の塩基性アミノ酸を有し得る。いくつかの事例では、「塩基性アミノ酸リッチ領域」は、15%未満の塩基性アミノ酸を有し得るが、依然として輸送剤領域として機能する。他の例では、塩基性アミノ酸領域は30%以上の塩基性アミノ酸を有する。

30

#### 【0094】

輸送部分は、プロリンリッチ領域をさらに含み得る。本明細書で使用される場合、用語のプロリンリッチ領域は、その配列に5%以上(100%までの)プロリンを有するポリペプチドの領域を意味する。いくつかの事例では、プロリンリッチ領域は、5%~15%のプロリンを有し得る。さらに、プロリンリッチ領域は、天然タンパク質(例えば、ヒトゲノムによりコードされるタンパク質)で通常観察されるものより多いプロリンを含有するポリペプチドの領域を意味する。本出願のプロリンリッチ領域は輸送剤領域として機能できる。

40

#### 【0095】

一実施形態では、本明細書で記載の治療用ペプチドは形質導入剤に非共有結合できる。非共有結合ポリペプチド形質導入剤の例は、Charriotタンパク質送達システム(米国特許第6,841,535号;J Biol Chem 274(35):24941-24946;およびNature Biotech. 19:1173-1176を参照されたい(これらの文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる))である。

#### 【0096】

他の実施形態では、遺伝子治療を用いて治療される細胞中で治療用ペプチドを発現させ

50

て、LARファミリーのシグナル伝達を阻害できる。遺伝子治療は、治療用ペプチドをコードするヌクレオチドを含むベクターを使用できる。「ベクター」(遺伝子送達または遺伝子導入「ビークル」とも呼ばれることがある)は、細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む高分子または分子の複合体を意味する。送達されるポリヌクレオチドは遺伝子治療の対象にしているコード配列を含み得る。ベクターには、例えば、ウイルスベクター(例えば、アデノウイルス(Ad)、アデノ随伴ウイルス(AAV)およびレトロウイルス)、リボソームおよび他の脂質含有複合体、および標的細胞へのポリヌクレオチドの送達を媒介することが可能である他の高分子複合体が挙げられる。

#### 【0097】

ベクターはまた、遺伝子送達および/または遺伝子発現をさらに調節する、または他の方法で標的細胞に有益な特性を提供する他の成分または官能基を含むことができる。このような他の成分には、例えば、細胞への結合またはターゲティングに影響を与える成分(細胞型または組織に特異的な結合を媒介する成分を含む)、細胞によるベクター核酸の取り込みに影響を与える成分、取り込み後、細胞内でのポリヌクレオチドの局在化に影響を与える成分(例えば、核での局在化を媒介する薬剤)、およびポリヌクレオチドの発現に影響を与える成分が挙げられる。このような成分はまた、ベクターにより送達された核酸を取り込み、発現している細胞を選択し、検出するのに使用できる検出可能なおよび/または選択可能なマーカーなどのマーカーも含み得る。このような成分は、ベクターの固有の特徴として提供することができ(例えば、結合および取り込みを媒介する成分または官能基を有する特定のウイルスベクターの使用)、またはベクターは修飾されてこのような官能基を提供できる。

10

20

#### 【0098】

選択可能なマーカーは、ポジティブ、ネガティブ、または二官能性であり得る。ポジティブ選択マーカーマーカーはマーカーを運ぶ細胞の選択を可能にするが、ネガティブ選択マーカーは、マーカーを運ぶ細胞が選択的に除去されるのを可能にする。二官能性(すなわち、ポジティブ/ネガティブ)のマーカーを含む種々のこのようなマーカー遺伝子が記載されている(例えば、1992年5月29日に公開されたLupton, S.の国際公開第92/08796号、および1994年12月8日に公開されたLupton, S.の国際公開第94/28143号を参照されたい)。このようなマーカー遺伝子は、遺伝子治療の状況で有利であり得る制御の追加の尺度を提供できる。多種多様なこのようなベクターが当該技術で既知であり、一般に利用可能である。

30

#### 【0099】

本明細書で使用するためのベクターには、本明細書で記載される治療用ペプチドをコードするヌクレオチドを標的細胞に送達することが可能であるウイルスベクター、脂質系ベクターおよび他の非ウイルスベクターが挙げられる。ベクターは、標的化ベクター、特にニューロンに選択的に結合する標的化ベクターであり得る。本出願で使用するためのベクターには、標的細胞に対して低い毒性を示し、治療上有用な量の治療用ペプチドの細胞特異的な産生を誘導するものが挙げられる。

#### 【0100】

ウイルスベクターの例は、アデノウイルス(Ad)またはアデノ随伴ウイルス(AAV)に由来するものである。ヒトおよび非ヒトのウイルスベクター両方を使用することができ、組換えウイルスベクターはヒトでは複製欠損であり得る。ベクターがアデノウイルスである場合、ベクターは治療用ペプチドをコードする遺伝子に動作可能に連結されたプロモーターを有するポリヌクレオチドを含むことができ、ヒトでは複製欠損である。

40

#### 【0101】

本明細書で使用する他のウイルスベクターには単純性ヘルペスウイルス(HSV)系のベクターが挙げられる。1つまたは複数の前初期遺伝子(IE)を欠失させたHSVベクターは、通常、非毒性であり、標的細胞において潜伏に似た状態で生き残り、効率的な標的細胞への形質導入を提供するので有利である。組換えHSVベクターはおよそ30 kbの異種の核酸を組み入れることができる。

50

## 【0102】

C型レトロウイルスおよびレンチウイルスなどのレトロウイルスも本出願で使用され得る。例えば、レトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス(MLV)をベースにし得る。例えば、Hu and Pathak, Pharmacol. Rev. 52:493-511, 2000 and Fong et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 17:1-60, 2000を参照されたい。MLV系ベクターは、ウイルス遺伝子の代わりに8 kbまでの異種(治療用)のDNAを含有し得る。異種のDNAは組織特異的なプロモーターおよび治療用ペプチドをコードする核酸を含み得る。神経細胞への送達方法では、それは組織特異的な受容体に対するリガンドもコードし得る。

10

## 【0103】

使用され得る追加のレトロウイルスベクターはヒト免疫不全ウイルス(HIV)系ベクターを含む複製欠損のレンチウイルス系ベクターである。例えば、Vigna and Naldini, J. Gene Med. 5:308-316, 2000 and Miyoshi et al., J. Virol. 72:8150-8157, 1998を参照されたい。レンチウイルスベクターは、活発に分裂している細胞および分裂しない細胞の両方に感染させることが可能であるという点で有利である。

## 【0104】

本出願で使用するためのレンチウイルスはヒトおよび非ヒト(SIVを含む)のレンチウイルスに由来し得る。レンチウイルスベクターの例には、ベクターの感染に必要とされる核酸配列ならびに治療用ペプチドをコードする核酸に動作可能に連結される組織特異的なプロモーターを含む。これら前者はウイルスLTR、プライマー結合部位、ポリプリン配列、att部位およびカプシド形成部位を含み得る。

20

## 【0105】

一部の態様では、レンチウイルスベクターを採用できる。レンチウイルスは、異なる種類のCNSニューロンに形質導入するのが可能であることが判明しており(Azzouz et al., (2002) J. Neurosci. 22:10302-12)、その大きなクローニング能力のためにいくつかの実施形態で使用され得る。

## 【0106】

レンチウイルスベクターは任意のレンチウイルスカプシドにパッケージされ得る。1つの粒子タンパク質を異なるウイルスに由来する別の粒子タンパク質で置き換えることを「シュードタイピング」と呼ぶ。ベクターカプシドは、マウス白血病ウイルス(MLV)または水泡性口内炎ウイルス(VSV)を含む他のウイルスに由来するウイルスエンベロープタンパク質を含有し得る。VSVのGタンパク質の使用は高いベクター力価を生じ、ベクターウイルス粒子の高い安定性をもたらす。

30

## 【0107】

セムリキ森林ウイルス(SFV)およびシンドビスウイルス(SIN)から作製されるものなどのアルファウイルス系ベクターも本出願で使用され得る。アルファウイルスの使用は、Lundstrom, K., Intervirology 43:247-257, 2000 and Perri et al., Journal of Virology 74:9802-9807, 2000に記載されている。

40

## 【0108】

組換え複製欠損のアルファウイルスベクターは、高レベルの異種(治療用)遺伝子の発現が可能であり、広い範囲の標的細胞に感染することができるので有利である。同族の結合相手を発現している標的細胞への選択的な結合を可能にする機能的な異種のリガンドまたは結合ドメインをそのビリオン表面に表示させることにより、アルファウイルスのレプリコンは特定の細胞型を標的化し得る。アルファウイルスのレプリコンは潜伏を成立させ得るので、標的細胞における長期の異種の核酸の発現を樹立し得る。レプリコンはまた標的細胞中で一時的な異種の核酸の発現も示し得る。

## 【0109】

50



本出願の方法に適合する多数のウイルスベクターの中で、2つ以上のプロモーターをベクターに導入して、2つ以上の異種の遺伝子がベクターにより発現させるのを可能にすることができる。さらに、ベクターは、標的細胞からの治療用ペプチドの発現を促進するシグナルペプチドまたは他の部分をコードする配列を含むことができる。

#### 【0110】

2つのウイルスベクターの系の有利な特性を組み合わせるために、ハイブリッドウイルスベクターを使用して治療用ペプチドをコードする核酸を標的のニューロン、細胞または組織に送達し得る。ハイブリッドベクターの構築の標準的な技法は当業者に周知である。このような技法は、例えば、Sambrook, et al., In Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor, N.Y. または組換えDNA技法について考察するいくつかの実験マニュアル中に見出すことができる。AAVとアデノウイルスITRの組み合わせを含有するアデノウイルスのカプシド中の二本鎖AAVゲノムを用いて細胞に形質導入し得る。別の変異では、AAVベクターが「パワー不足の」、「ヘルパー依存性の」または「高い許容量」のアデノウイルスベクター中に配置され得る。アデノウイルス/AAVのハイブリッドベクターは、Lieber et al., J. Virol. 73: 9314-9324, 1999で考察されている。レトロウイルス/アデノウイルスのハイブリッドベクターは、Zheng et al., Nature Biotechnol. 18: 176-186, 2000で考察されている。アデノウイルスの中に含有されるレトロウイルスのゲノムを、標的細胞のゲノムに統合し、安定な遺伝子発現を行い得る。

10

20

#### 【0111】

治療用ペプチドの発現およびベクターのクローニングを容易にする他のヌクレオチド配列要素がさらに意図されている。例えば、プロモーターの上流のエンハンサーまたはコーディング領域の下流のターミネーターの存在は、例えば、発現を容易にできる。

#### 【0112】

別の実施形態では、本明細書で記載される治療用ペプチドをコードするヌクレオチドに組織特異的なプロモーターを融合できる。アデノウイルス構築物内でこのような組織特異的なプロモーターを融合することにより、導入遺伝子の発現は特定の組織に限定される。本出願の組換えアデノウイルスの系を用いて、組織特異的なプロモーターにより提供される遺伝子発現の有効性および特異性の程度を決定できる。例えば、血小板由来増殖因子鎖(PDGF-)のプロモーターなどのニューロン特異的なプロモーターおよびベクターは当該技術で既知である。

30

#### 【0113】

ウイルスベクター系の方法に加えて、非ウイルス系の方法を用いて治療用ペプチドをコードする核酸を標的細胞に同様に導入し得る。遺伝子送達の方法の概説は、Nishikawa and Huang, Human Gene Ther. 12: 861-870, 2001で提供されている。本出願による非ウイルス性の遺伝子送達法の例は、プラスミドDNAを採用して治療用ペプチドをコードする核酸を標的細胞に導入する。プラスミド系遺伝子送達法は当該技術で一般に知られている。

#### 【0114】

合成の遺伝子導入分子を設計してプラスミドDNAとの多分子凝集体を形成できる。これらの凝集体を標的細胞に結合するように設計できる。リポポリアミンおよびカチオン性脂質を含むカチオン性両親媒性物質を用いて受容体とは独立した標的細胞への核酸導入を提供できる。

40

#### 【0115】

加えて、事前に形成されたカチオン性リポソームまたはカチオン性脂質を、プラスミドDNAと混合して細胞-遺伝子導入複合体を生成し得る。カチオン性脂質配合物を含む方法は、Felgner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 772: 126-139, 1995およびLasica and Templeton, Adv. Drug Delivery Rev. 20: 221-266, 1996で概説されている。

50

遺伝子送達のために、DNAはまた、両親媒性のカチオン性ペプチドにも結合され得る (Fominaya et al., J. Gene Med. 2: 455 - 464, 2000)。

#### 【0116】

ウイルス系および非ウイルス系成分の両方を含む方法の本出願に従って使用し得る。例えば、治療用の遺伝子送達のためのエプスタイン・バーウイルス (EBV) 系プラスミドについては、Cui et al., Gene Therapy 8: 1508 - 1513, 2001に記載されている。さらに、アデノウイルスに結合させたDNA/リガンド/ポリカチオン性の付加物を含む方法は、Curie et al., D.T., Nat. Immun. 13: 141 - 164, 1994に記載されている。

10

#### 【0117】

さらに、電気穿孔法を用いて標的細胞に遺伝子導入することにより、治療用ペプチドをコードする核酸を標的細胞に導入できる。電気穿孔法は周知であり、プラスミドDNAを用いた細胞の遺伝子導入を容易にするために使用できる。

#### 【0118】

必要に応じて、例えば、生理食塩水などの薬学的に許容可能なキャリアを含有する注射可能な製剤の形態で、治療用ペプチドの発現をコードするベクターをインビボで標的細胞に送達できる。本出願に従って、他の医薬キャリア、製剤および調剤を使用することもできる。

#### 【0119】

標的細胞が、静止ニューロンまたは休眠ニューロンなどの治療されるニューロンを含む場合、高効果的療法を可能にする程度に治療用ペプチドが発現されるのに十分な量での直接注入によって、ベクターを送達することができる。ニューロンに直接にまたはその周辺部近傍にベクターを注入することによって、ベクターの遺伝子導入を予想以上に効果的に標的とすることができ、組換えベクターの損失を最小限にすることができる。この種の注入は、特にCNS損傷の部位での所望の数の細胞の局所的遺伝子導入を可能にし、それにより、遺伝子導入の治療効力を最大化し、ウイルスタンパク質に対する炎症反応の可能性を最少化する。標的細胞にベクターを投与する他の方法を用いることができ、それは採用される特定のベクターに左右されるであろう。

20

#### 【0120】

一時的な発現および安定した長期的な発現を含めて、標的細胞の中で所望の長さの時間、治療用ペプチドを発現させることができる。本出願の一態様では、治療用ペプチドをコードする核酸は、遺伝子導入された細胞の活性および増殖を誘導するのに効果的な一定の時間長さにわたり、治療量で発現される。本出願の別の態様では、治療用ペプチドをコードする核酸は、それを必要としている対象のアミロイド蓄積および/またはタウ凝集を阻害および/または低減するのに効果的な一定の時間長さにわたり治療量で発現される。

30

#### 【0121】

治療量は、治療される動物またはヒトにおいて、医学的に望ましい結果をもたらすことができる量である。医療技術で周知のように、動物またはヒトのいずれかの対象に対する投与量は、対象の大きさ、体表面積、年齢、投与される特定の組成物、性別、投与の時間および経路、総体的な健康、および同時に投与される他の薬物を含む多くの因子に依存する。タンパク質および核酸の特定の投与量は、以下に記載される実験方法を用いて業者が容易に決定できる。

40

#### 【0122】

本明細書で記載される治療薬はさらに修飾され得る (例えば、化学的に修飾される)。このような修飾は、分子の取り扱いまたは精製を容易にする、分子の溶解度を高める、投与を容易にする、所望の位置を標的とする、半減期を増減するように設計し得る。多くのこのような修飾が当該技術で既知であり、技量のある開業医により適用できる。

#### 【0123】

いくつかの実施形態では、本明細書で記載される治療薬および治療薬を含む医薬組成物

50

が、CNSおよび/またはPNSのニューロンに送達され得る。このようなニューロンは、損傷されたニューロン、または罹患したニューロンであり得る。あるいは、このようなニューロンは健常で、損傷されていないニューロンであり得る。このようなニューロンは損傷の部位または損傷に付随する部位に位置し得る。本明細書で記載される薬剤および組成物の治療投与、送達/接触の標的とされるニューロンは、ニューロンの伸長が対象にとって有益であると分かると考えられるニューロンである。このような決定は、わずかな日常の実験を通して行われ、技量のある開業医の能力の範囲内である。

#### 【0124】

本明細書で記載される治療薬および治療用の医薬組成物はまた、CNSおよび/またはPNSの、例えば、神経細胞を支持する非ニューロン細胞などの非ニューロン細胞にも送達され得る。このような細胞には、限定されないが、グリア細胞（例えば、CNSでは、星状細胞、オリゴ樹状細胞、上衣細胞、放射状グリア、およびPNSでは、シュワン細胞、サテライトグリア細胞、腸管グリア細胞）が挙げられる。

10

#### 【0125】

一実施形態では、投与は対象の神経系の範囲内で1つまたは複数の特定の位置に特異的である。好ましい投与方法は選択される特定の薬剤および特定の標的に応じて変化し得る。

#### 【0126】

治療薬が対象に送達される場合、例えば、経口で（例えば、カプセル、懸濁剤または錠剤で）、全身性に、または非経口での投与を含む任意の好適な経路により投与できる。非経口投与には、例えば、筋肉内、静脈内、関節内、動脈内、くも膜下腔内、皮下または腹腔内の投与を挙げ得る。薬剤はまた、経口で、経皮で、局所に、吸入によって、（例えば、気管支内、鼻腔内、経口吸入、または点鼻剤）、または直腸内に投与することもできる。投与は適応があれば、局所性または全身性として行うことができる。

20

#### 【0127】

局所投与および全身性投与の両方が本明細書で意図されている。局所投与の望ましい特徴には、治療薬の有効な局所濃度を達成すること、ならびに治療薬の全身性投与に由来する有害な副作用を回避することが挙げられる。一実施形態では、対象の脳脊髄液への導入により治療薬を投与できる。特定の態様では、治療薬は、脳室、腰部または大槽に導入できる。別の態様では、治療薬は、神経または脊髄の損傷の部位に、疼痛または神経変性の部位に、または神経網膜細胞に接触する眼内に導入できる。

30

#### 【0128】

薬学的に許容可能な製剤を水性ビークルに懸濁し、従来の皮下注射針を介してまたは注入ポンプを用いて導入できる。

#### 【0129】

別の実施形態では、対象のくも膜下腔内に治療薬を投与できる。本明細書で使用される場合、用語の「くも膜下腔内投与」は、穿頭孔または大槽または腰椎穿刺を介した側脳室への注入などを含む技法により、対象の脳脊髄液に直接治療薬を送達することを含むように意図される（Lazorthes et al., 1991, and Ommaya, 1984に記載されている；この文献の内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。用語の「腰部」は、第3腰椎から第4腰椎（腰部）の間の領域を含むように意図される。用語の「大槽」は、後頭部で、頭蓋骨が終わり、脊髄が開始する領域を含むように意図される。用語の「脳室」は脊髄中心管に続く脳中の空洞を含むように意図される。上述の部位のいずれかへの治療薬の投与は、治療薬の直接注入または注入ポンプの使用により達成できる。埋め込み可能なまたは外部のポンプおよびカテーテルが使用され得る。

40

#### 【0130】

注射用として、治療薬は、液体溶液、通常、例えば、ハanks液またはリンゲル液などの生理的に適合性の緩衝液中で処方できる。加えて、治療薬は固形形態で処方され、使用の直前に再溶解または懸濁され得る。凍結乾燥された形態も含まれる。注入は、例えば、治療薬のボラス注入の形態または連続点滴（例えば、注入ポンプを用いて）の形態であ

50

り得る。

【0131】

一実施形態では、対象の脳への側脳室注入により治療薬を投与できる。注入は、例えば、対象の頭蓋骨に作られた頭蓋穿孔を介して行うことができる。別の実施形態では、治療薬は、対象の脳室に外科的に挿入されたシャントを介して投与できる。例えば、第3および第4のより小さい脳室への注入も行うことができるとしても、注入はさらに大きな側脳室に対して行うことができる。さらに別の実施形態では、治療薬は、対象の大槽または腰部への注入により投与できる。

【0132】

頭蓋内組織への投与の追加の手段には、嗅上皮への適用と、その後の嗅球への伝播および脳のさらに近傍部分への輸送が含まれる。このような投与は、噴霧化またはエアロゾル化製剤により実施し得る。

【0133】

別の実施形態では、対象の損傷部位に、または対象の全身に治療薬を投与できる。

【0134】

いくつかの実施形態では、治療薬を対象に長期間投与できる。例えば、1週間、数週間、1ヵ月以上などの期間にわたる活性化合物の反復投与により、活性化合物との持続的接触を達成できる。治療薬の投与に使用される薬学的に許容可能な製剤を処方して、活性化合物の対象への持続送達を提供することもできる。例えば、対象への最初の投与に続いて、少なくとも1、2、3または4週間（包括的）にわたり製剤は活性化合物を送達し得る。例えば、本発明に従って治療される対象は、少なくとも30日間活性化合物により治療される（反復投与または持続送達系の使用のいずれかまたは両方によって）。

【0135】

治療薬の持続送達は、例えば、長時間にわたる治療薬の連続治療効果によって、実証することができる。あるいは、治療薬の持続送達は、長時間にわたってインビボでの治療薬の存在を検出することによって、実証され得る。

【0136】

持続送達への手法には、高分子カプセル、製剤を送達するためのミニポンプ、生分解性インプラントまたは移植遺伝子導入自己細胞の使用が挙げられる（米国特許第6,214,622号を参照されたい）。埋め込み可能な注入ポンプシステム（例えば、INFUS AIDポンプ（Towanda, PA）；Zierski et al., 1988；Kanooff, 1994を参照されたい）および浸透圧ポンプ（Alza Corporationにより販売）が市販されており、また、他の方法は、当該技術で既知である。別の投与方法は、埋め込み可能で外部からプログラム可能な注入ポンプを経由するものである。注入ポンプシステムおよびリザーバシステムはまた、例えば、米国特許第5,368,562号および同第4,731,058号にも記載されている。

【0137】

治療用ペプチドをコードするベクターは、多くの場合、他の型の治療薬に比べてあまり頻繁に投与されない。例えば、このようなベクターの有効量は、約0.01mg/kg～約5または10mg/kg（包括的）の範囲であり、毎日、毎週、二週に1回、毎月またはさらに少ない頻度で投与される。

【0138】

治療用ペプチドを送達するまたは発現させる能力は、多数の異なる細胞型での細胞の活性調節を可能にする。治療用ペプチドは、例えば、アルツハイマー病などの変性疾患に冒された神経細胞または脳領域で発現させることができる。

【0139】

いくつかの実施形態では、治療薬を使用して、それを必要としている対象の アミロイド蓄積および/またはタウ凝集に関連する疾患、障害、または状態を治療することができる。

【0140】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、疾患、障害および/または状態には、神経系の疾患、障害および/または状態の少なくとも1つが含まれる。

#### 【0141】

他の実施形態では、神経系の疾患、障害および/または状態には、神経障害、神経精神障害、神経損傷、神経毒性障害、神経障害性疼痛、および神経変性障害の少なくとも1つが含まれる。

#### 【0142】

例えば、神経障害には、アルツハイマー病またはアルツハイマー病関連認知症の内の少なくとも1つを含み得る。

#### 【0143】

他の実施形態では、本明細書で記載の治療薬は、抗アルツハイマー病薬と組み合わせて投与できる。本明細書で用いられる用語の「抗アルツハイマー病薬」または「抗アルツハイマー薬」は、限定されないが、アルツハイマー病およびその他の認知症の治療に使用できる、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体(NMDA)受容体アンタゴニスト、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、アセチルコリン合成モジュレーター、アセチルコリン貯蔵モジュレーター、アセチルコリン放出モジュレーター、A阻害剤、Aブランク除去剤、Aブランク形成阻害剤、アミロイド前駆体タンパク質プロセッシング酵素阻害剤、

アミロイド変換酵素阻害剤、分泌酵素阻害剤、分泌酵素モジュレーター、神経成長因子アゴニスト、ホルモン受容体遮断薬、神経伝達モジュレーター、およびこれらの組み合わせ、などの化合物を意味する。一実施形態では、抗アルツハイマー病薬は、NMDA受容体アンタゴニストである。一実施形態では、NMDA受容体アンタゴニストには、限定されないが、メマンチン、アマンタジン、ネラメキサ(1,3,3,5,5-ペンタメチルシクロヘキサ-1-アミン)、ケタミン、リマンチジン、エリプロディル、イフェンプロジル、ジゾシルピン、レマセミド、リルゾール、アブチガネル、フェンシクリジン、フルピルチン、セルフォテル、フェルバメート、スペルミン、スペルミジン、レベモパミル、および/またはこれらの組み合わせが挙げられる。別の実施形態では、本発明で用いられるNMDA受容体アンタゴニストは、抗アルツハイマー薬である。一実施形態では、抗アルツハイマー病薬は、コリンエステラーゼ阻害剤である。一実施形態では、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤には、限定されないが、ドネペジル、タクリン、リバスチグミン、ガランタミン、フィゾスチグミン、ネオスチグミン、フペルジンA、イコペ

ジル(CP-118954、5,7-ジヒドロ-3-[2-[1-(フェニルメチル)-4-ピペリジニル]エチル]-6H-ピロロ-[4,5-f]-1,2-ベンゾイソオキサゾール-6-オンマレエート)、ER-127528(4-[ (5,6-ジメトキシ-2-フルオロ-1-インダノン)-2-イル]メチル-1-(3-フルオロベンジル)ピペリジン塩酸塩)、ザナペジル(TAK-147; 3-[1-(フェニルメチル)ピペリジン-4-イル]-1-(2,3,4,5-テトラヒドロ-1H-1-ベンゾアゼピン-8-イル)-1-プロパンフマレート)、メトリホネート(T-588;-)(-R-[ [2-(ジメチルアミノ)エトキシ]メチル]ベンゾ[b]チオフェン-5-メタノール塩酸塩)、FK-960(N-(4-アセチル-1-ピペラジニル)-p-フルオロベンズアミド-水和物)、TCH-346(N-メチル-N-2-ピロピニルジベンゾ[b,f]オキセピン-10-メタンアミン)、SDZ-220-581((S)-アミノ-5-(ホスホノメチル)-[1,1'-ビフェニル]-3-プロピオン酸)、およびこれらの組み合わせが挙げられる。

#### 【0144】

別の実施形態では、抗アルツハイマー病薬は、A阻害剤、Aブランク除去剤、Aブランク形成阻害剤、アミロイド前駆体タンパク質プロセッシング酵素阻害剤、アミロイド変換酵素阻害剤、分泌酵素阻害剤、分泌酵素モジュレーターである。

#### 【0145】

別の実施形態では、A阻害剤には、限定されないが、タレンフルルビル、トラミプロサート、クリオキノール、PBT-2およびその他の8-ヒドロキシキノリン誘導体、A

10

20

30

40

50

ブラック除去剤、A ブラック形成阻害剤、アミロイド前駆体タンパク質プロセッシング酵素阻害剤、アミロイド変換酵素阻害剤、 $\beta$ -分泌酵素阻害剤、 $\beta$ -分泌酵素モジュレーター（LY450139；N-[N-(3,5-ジフルオロフェナセチル)-L-アラニル]-S-フェニルグリシン t-ブチルエステル）、およびこれらの組み合わせが挙げられる。

#### 【0146】

別の実施形態では、抗アルツハイマー病薬は、神経成長因子アゴニストである。神経成長因子アゴニストは、限定されないが、キサリプロデンまたは脳由来神経栄養因子または神経成長因子である。

#### 【0147】

別の実施形態では、抗アルツハイマー病薬は、ホルモン受容体遮断薬である。ホルモン受容体遮断薬は、限定されないが、ロイプロリドまたはその誘導体である。

#### 【0148】

別の実施形態では、抗アルツハイマー病薬は、神経伝達モジュレーターである。神経伝達モジュレーターは、限定されないが、イスプロニクリンである。

#### 【0149】

以下の実施例により、本発明をさらに例示する。この実施例は、特許請求の範囲を限定することを意図するものではない。

#### 【0150】

##### 実施例 1

ホスファターゼの白血球共通抗原関連（LAR）ファミリーは3つのメンバー：LAR自体、受容体タンパク質チロシンホスファターゼシグマ（RPTP $\sigma$ ）および受容体タンパク質チロシンホスファターゼデルタ（RPTP $\delta$ ）からなる。構造解析および配列解析により、LARファミリーの全てのメンバーが、同種/異種親和性の受容体相互作用を媒介する第1の細胞内触媒ドメイン中にくさび形のヘリックス・ループ・ヘリックスモチーフを含有することが明らかになった。細胞質に局在するTAT配列にタグとして付けられたこのくさび形ドメインのペプチド模倣体を用いて、ニューロトロフィンシグナル伝達のパラダイムにおけるLAR活性を上手く消滅させた。我々は、NIHのBLASTを利用して、RPTP $\sigma$  およびRPTP $\delta$  のオーソログ配列を特定し、各標的に対するくさび形ドメインのペプチドを設計した。ペプチドは、新造語による名称の細胞内LAR遮断ペプチド（ILP）、細胞内シグマ遮断ペプチド（ISP）および細胞内デルタ遮断ペプチド（IDP）であった。興味深いことに、このドメインが高等脊椎動物で高度に保存されており、これは、機能的に重要な領域であることを示している。ペプチドはタグとしてHIV-TATに結合されて、次の機能遮断ペプチドを生成する：

##### 【化1】

NH<sub>2</sub>GRKKRRRQRRRCDMAEHTMERLKKANDSLKLSQEYESI  
-NH<sub>2</sub> PTP $\sigma$  ヒト（配列番号17）（ISP）。

NH<sub>2</sub>GRKKRRRQRRRCDLADNIERLKKANDGLKFSQEYESI-  
NH<sub>2</sub> LAR（配列番号18）（ILP）。

NH<sub>2</sub>GRKKRRRQRRRCELADHIERLKKANDNLKFSQEYESI-  
NH<sub>2</sub> PTP $\delta$ （配列番号19）（IDP）。

#### 【0151】

##### 実施例 2

この実施例は、神経受容体PTP（タンパク質チロシンホスファターゼシグマ）がアミロイド（A $\beta$ ）病変形成およびタウの凝集を抑制することを示す。PTPの遺伝子欠乏は、 $\beta$ -分泌酵素のAPPに対する親和性を低下させ、 $\beta$ -および $\gamma$ -分泌酵素活性を包括的には阻害しない特異的な方法でA $\beta$ 蓄積を抑制する。PTPの遺伝子欠乏はタウの凝集も阻害する。

## 【0152】

本明細書で記載の2つのマウスモデルで、一連のAD神経病理学および行動欠陥は、全て、明確なPTP依存性を実証し、このニューロン受容体がAD病変形成における上流の重要な主因であることを示す。

## 【0153】

データは、PTPの標的化は、このような主要な遺伝的駆動力に打ち勝って、AD進行を抑制することができる可能性を有する治療手法であることを示唆する。この標的化戦略の利点は、- および - 分泌酵素の他の主要な基質に広く影響を与えることなくA蓄積を抑制し、それにより、分泌酵素を総括的に阻害する臨床試験中のものに比べて、より有望な技術移転の可能性が予測される。

10

## 【0154】

材料および方法

マウス株：

マウスは、実験動物委員会により承認された標準条件下で維持された。Balb/c背景の野生型およびPTP欠損マウスは、Michael L. Tremblay博士から提供された。ホモ接合のTgAPP-SwDIマウス、C57BL/6-Tg(Thy1-APP<sup>SwDutIowa</sup>)BWev<sup>n</sup>/Mmjax、ストック番号007027、をJackson Laboratoryから入手した。これらのマウスは、Swedish、DutchおよびIowa変異を含むヒトAPP導入遺伝子を発現し、PTP遺伝子とヘテロ接合のBalb/cマウスと交配させて、TgAPP-SwDIおよびPTP遺伝子の両方にヘテロ接合のバイジェニックマウスを生成した。このマウスは、50%のC57BL/6Jおよび50%のBalb/c遺伝的背景のハイブリッドである。これらのマウスをPTP遺伝子に対しヘテロ接合のBalb/cマウスとさらに交配した。この交配由来の出生児を実験で使用し、これには、次の遺伝子型の同腹仔を含む：TgAPP-SwDI(+/-)PTP(+/-)：野生型PTPを有するTgAPP-SwDI導入遺伝子に対しヘテロ接合のマウス；TgAPP-SwDI(+/-)PTP(-/-)：PTP遺伝子欠乏のTgAPP-SwDI導入遺伝子に対しヘテロ接合のマウス；TgAPP-SwDI(-/-)PTP(+/-)：野生型PTPを有し、TgAPP-SwDI導入遺伝子不含のマウス。TgAPP-SwDI(-/-)PTP(+/-)およびBalb/cPTP(+/-)の両マウスは、野生型マウスであるが、異なる遺伝的背景を有する。ヘテロ接合のTgAPP-SwInd(J20)マウス、6.Cg-Tg(PDGFβ-APP<sup>SwInd</sup>)20Lms/2MmjaxをLennart Mucke博士から提供された。これらのマウスは、SwedishおよびIndiana変異を含むヒトAPP導入遺伝子を発現し、上記と同じ戦略で交配させて、TgAPP-SwInd(+/-)PTP(+/-)およびTgAPP-SwInd(+/-)PTP(-/-)の遺伝子型を有するマウスを得た。

20

30

## 【0155】

免疫組織化学的検査

成体ラットおよびマウスを新しく作製した低温のリン酸塩緩衝生理食塩水(PBS)中の4%パラホルムアルデヒドで心臓内灌流した。脳を収集し、4℃で2日間、後固定した。10μm厚さのパラフィン包埋切片を免疫染色法用に収集した。切片を脱パラフィンし、順次再水和した。抗原回収をトリス-EDTA緩衝液(pH9.0)中、100℃で50分間実施した。その後、切片を蒸留水およびPBSで洗浄し、ブロッキング緩衝液(5%正常ロバ血清、5%正常ヤギ血清、および0.2%トリトンX-100含有PBS)中、室温で1時間インキュベートした。一次抗体インキュベーションを加湿チャンバー中、4℃で一晩実施した。0.2%トリトンX-100含有PBSで3回の洗浄後、切片を二次および三次抗体混合物と共に、室温で2時間インキュベートした。ブロッキング緩衝液を用いて、全抗体を製造者による推奨濃度に希釈した。マウス一次抗体は、ロバ抗ヤギA1exa488抗体と一緒に、ヤギ抗マウスA1exa488で検出し；ウサギ一次抗体はニワトリ抗ウサギCF568およびロバ抗ニワトリCy3抗体で検出し；ニワトリ抗体

40

50

は、ロバ抗ニワトリCy3抗体で検出した。二次および三次抗体のみ（一次抗体なし）で染色した切片を陰性対照として使用した。最後に、DAPI（Invitrogen、300nM）を核染色のために切片に適用した。取り付ける前に、切片をFluoromount（SouthernBiotech）で5回洗浄した。

#### 【0156】

広視野および共焦点画像を、それぞれ、Zeiss Axio Imager M2およびLSM780を用いて取得した。Zen2ProソフトウェアおよびImageJを用いて画像を定量化する。

#### 【0157】

タンパク質抽出、免疫沈殿、およびウェスタンブロット分析

APPおよびPTPの共免疫沈殿のために、RIPA緩衝液（50mMトリス塩酸、pH8.0、1mMのEDTA、150mMのNaCl、1%NP40、0.1%SDS、0.5%デオキシコール酸ナトリウム）を用いた。APPおよびBACE1の共免疫沈殿のために、0.1%、0.3%、および0.4%の濃度におけるSDSを含む場合と含まない場合のNP40緩衝液（50mMトリス塩酸、pH8.0、1mMのEDTA、150mMのNaCl、1%NP40）を用いた。CTFの総タンパク質抽出および免疫精製のために、RIPA緩衝液中のSDSの濃度を1%に調節し、脂質ラフトからのタンパク質抽出を確実にした。マウスまたはラット前脳を、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤（Thermo Scientific）含有ホモジナイゼーション緩衝液（上述）中、氷上で完全にホモジナイズした。それぞれ半分の前脳に対し、マウスに対しては少なくとも5mlの緩衝液体積およびラットに対しては8mlを使用して、十分な洗浄剤/組織比率を確保した。ホモジネートを4の緩やかな混合および1時間インキュベートを行い、氷上で超音波dismembrator（Fisher Scientificモデル120、50%パルス出力、1秒オン2秒オフ）で2分間超音波処理し、続けて、さらに1時間、4で緩やかに混合した。全て、凍結および解凍を行わない、新しい試料を用いた。

#### 【0158】

次に、共免疫沈殿および免疫精製のために、ホモジネートを85,000xg、4で1時間、遠心分離し、上清を収集した。BCAプロテインアッセイキット（Thermo Scientific）を用いて、タンパク質濃度を測定した。0.5mgの総タンパク質の脳ホモジネートを、5μgの指定抗体および30μlのタンパク質-Aセファロースビーズ（50%スラリー、Roche）を加えて、RIPA緩衝液で総体積を1mlに調節して、これらと共にインキュベートした。試料を4で緩やかに一晚混合した。その後、ビーズを低温の免疫沈殿緩衝液で5回洗浄した。その後、試料を100mMのDTT含有レムリ緩衝液中、75で20分間インキュベートし、ウェスタンブロット分析に供した。

#### 【0159】

タンパク質発現レベルの分析のために、ホモジネートを23,000xg、4で30分間、遠心分離し、上清を収集した。BCAプロテインアッセイキット（Thermo Scientific）を用いて、タンパク質濃度を測定した。30μgの総タンパク質をウェスタンブロット分析に供した。

#### 【0160】

MOPSまたはMES緩衝液およびNovex Sharp Pre-stained Protein Standardを含む、4~12%ビス-トリスBolt Plusゲルを用いて、タンパク質試料の電気泳動を実施した（全てInvitrogenから入手）。タンパク質をニトロセルロース膜（0.2μm細孔径、Bio-Rad）に転写し、製造者により提案された濃度の選択抗体（上表参照）でブロットした。一次抗体をSuperblock TBSブロッキング緩衝液（Thermo Scientific）中に希釈し、ニトロセルロース膜と共に4で一晩インキュベートし；二次抗体を5%脱脂乳および0.2%ツイーン20含有PBSで希釈し、室温で2時間インキュベートし



た。一次抗体と二次抗体の間で、および Super Signal West Pico 化学発光基質 (Thermo Scientific) を用いて、化学発光検出の前に膜を 0.2% ツイーン 20 含有 PBS で 4 回洗浄した。

#### 【0161】

ウェスタンブロットのバンド強度をデンシトメトリーで定量化した。

#### 【0162】

##### A の ELISA アッセイ

プロテアーゼ阻害剤反応混液 (Roche) 含有組織ホモジナイゼーション緩衝液 (2 mM トリス pH 7.4、250 mM スクロース、0.5 mM EDTA、0.5 mM EGTA) 中で、マウス前脳を完全にホモジナイズし、続けて、135,000 × g (SW 50.1 ローターで 33,500 RPM) 下、4 で 1 時間、遠心分離した。ペレット状態のタンパク質をギ酸 (FA) で抽出し、109,000 × g (SW 50.1 ローターで 30,100 RPM) 下、4 で 1 時間、遠心分離した。上清を収集し、中和緩衝液 (1 M トリス塩基、0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.05% NaN<sub>3</sub>) で 1:20 に希釈し、その後、ELISA 緩衝液 (0.05% ツイーン 20、1% BSA、および 1 mM AEB SF 含有 PBS) で 1:3 に希釈した。希釈試料を 6E10 抗体 (Biolegend) でプレコートした ELISA プレートにロードし、A ペプチドを捕捉した。合成ヒト A<sub>1-40</sub> または 1-42 (American Peptide) の段階希釈試料をロードし、検量線を決定した。A<sub>1-40</sub> または 1-42 に対して、HRP 標識抗体を用いて A を検出した (上表を参照)。ELISA を、TMB 基質 (Thermo Scientific) を用いて発色させ、1 N の HCl で反応を停止した。プレートを 450 nm で読み取り、検量線を用いて試料中の A 濃度を決定した。

#### 【0163】

##### 行動アッセイ

##### Y - 迷路アッセイ

マウスを Y - 迷路の中心に置き、各アームを通して自由に移動させた。マウスの探索活動を 5 分間記録した。アーム進入は、4 本全ての肢がアーム内にあるときとして定義される。各マウスに対し、トライアドの数を「自発的交替行動」として数え、その後、これを総アーム進入数で除算して、パーセンテージスコアを得る。新奇物体試験: 1 日目: マウスを、黒色化壁を備えた空のケージ (45 cm x 24 cm x 22 cm) に曝露し、活動領域への探索および馴化を行わせた。2 日目 ~ 4 日目: マウスを同じケージに戻し、2 つの同じ物体を等距離の位置に置いた。毎日、マウスを 1 日のほぼ同じ時間にケージに戻し、10 分間探索させた。それぞれの動物の間で、ケージと物体を 70% のエタノールで清浄化した。その後、4 日目の習熟期間の 2 時間後、マウスを同じケージに戻し、馴染物体の 1 つ (無作為に選択) を新奇物体と共に置き、5 分間探索させた。Observer ソフトウェア (Noldus) を用いてどちらかの物体の探索のための持続時間および進入回数に関しマウスをスコア化した。物体探索を、物体に向かって、積極的に物体を嗅ぐ動作または物体に触ることとして定義し、よじのぼる行動はスコア化しなかった。新奇物体への関心を反映した識別指数は、新奇物体探索の総物体探索に対する比率 (NO / NO + FO)、または新奇物体探索の馴染物体探索に対する比率 (NO / FO) として表記される。全ての試験およびデータ解析を二重盲検方式で行った。

#### 【0164】

2 つの群の比較には、両側スチューデントの t 検定を用いた。2 つの変数の間の関係 (図 3 に示すような、SDS 濃度と APP - BACE 1 結合) は、線形回帰を用いて解析した。全てのエラーバーは、平均値の標準誤差 (SEM) を示す。

#### 【0165】

PTP は、脳中では APP の結合相手である

細胞外のプロテオグリカンのニューロン受容体として既に特定されている、PTP は、成体神経系全体にわたり発現されるが、大多数は、AD で最も早期に罹患する能の領域の 1 つである海馬中で発現される。免疫組織化学的検査および共焦点画像化を用いて、我

々はPTP およびAPP (A の前駆物質) が、成体ラット脳の海馬錐体ニューロン中の、先端樹状突起の初節中、ならびに核周辺領域および軸索領域中で最も集中的に、点状物パターンで共存していることを見出した(図1A~F)。この共存がこれらの2つの分子間の結合相互作用を反映しているかどうかを評価するために、我々は、脳ホモジネートからのそれらの共免疫沈降を試験した。異なる遺伝的背景を有するラットおよびマウスの脳では、APPおよびPTP の種々の抗体を用いて、我々は、常に、APPと共免疫沈降する一部のPTP を検出し、これらの2つの膜貫通タンパク質間の分子複合体の証拠を得た(図1H、I)。

#### 【0166】

PTP の遺伝子欠乏は、APPの アミロイド形成性産物を低減する

10

PTP とAPPとの間の分子相互作用は、我々に、PTP がAPPのアミロイド形成プロセッシングにおいて何らかの役割を果たしているのかどうかを調査するように促す。ニューロンでは、APPは主に、 - または - 分泌酵素による代替切断によりプロセッシングされる。これらの分泌酵素は、APPのN末端部をその膜係留C末端フラグメント(それぞれ、CTF またはCTF ) から放出し、これは、 - 分泌酵素によりさらにプロセッシングされ得る。 - および - 分泌酵素によるAPPの逐次切断は、それがA ペプチドを生成するので、アミロイド形成プロセッシングと見なされる。過剰産生されると、A ペプチドは、細胞傷害性カスケードの分岐の引き金を引く可溶性オリゴマーを形成でき、一方、A の進行性凝集は、最終的にAD患者の脳中に老人斑を形成する(図2a)。このアミロイド形成プロセッシングにおけるPTP の効果を試験するために、我々は、PTP 含有または非含有マウス脳におけるAPP - および 切断産物のレベルを分析した。

20

#### 【0167】

マウス脳由来のタンパク質抽出物のウェスタンブロット分析は、PTP の遺伝子欠乏は、完全長APPの発現レベルに影響を与えないことを示した(2B)。しかし、C末端のAPPに対する抗体は、CTF に一致する分子量の位置にバンドを検出し、これは、それらの同年、同性の野生型同腹仔に比べて、PTP 欠損マウスでは低下する(図2B)。さらに、アミロイド形成変異を有する2匹のヒトAPP遺伝子を発現しているADマウスモデルでは、我々は、PTP 欠乏の場合に、同様のAPP CTFの低減を認めた(図2B)。 - 切断部位近くにSwedish変異を含むAPP導入遺伝子をそれぞれ発現しているTgAPP-SwDIおよびTgAPP-SwIndマウスを、PTP 株と交雑させて、それらのそれぞれのAPP導入遺伝子に対しヘテロ接合である、PTP 含有または非含有の出生児を生成した。これらのAPP導入遺伝子により保持されるSwedish変異は、 - 切断の傾向があるため、これらの遺伝子導入マウスのAPP CTFの優勢型は、CTF であると予測される。従って、PTP 欠損APP遺伝子導入マウスにおけるAPP CTFの減少は、CTF レベルに対するPTP の調節の役割を示す可能性がある。しかし、これらの実験で使用されたAPP C末端抗体は、CTF およびCTF の両方、ならびにこれらのCTFのリン酸化種(ウェスタンブロットのより長期曝露は、複数のCTFバンドを示した)を認識できるので、低減したCTFの素性をその分子量で単純に判断するのは、不適切であるかもしれない。従って、我々は、CTF を認識するがCTF を認識しない抗体を用いて、CTF 免疫精製とそれに続くウェスタンブロット検出を行った(図2C、D)。この絶対的標準法を用いて、我々は、PTP 欠乏が、マウス内在性およびヒト遺伝子導入APPの両起源のCTF のレベルを低減することを確認した。

30

40

#### 【0168】

CTF は、 - 切断と - 切断との間の中間タンパク分解性産物であるので、その低い定常状態レベルは、 - 切断による低減した産生またはそれに続く - 分泌酵素切断による増大した分解から生じ得る(図2A)。これらの2つの可能性を区別するために、我々は、 - 切断によるCTF 分解の下流生成物であるA ペプチドのレベルを測定した。TgAPP-SwDIマウス由来の脳ホモジネートのELISAアッセイを用いて、我

50

々は、PTP 欠乏が、A ペプチドのレベルをCTF のレベルと類似の程度まで低減することを見出した(図2E、F)。遺伝子導入マウスの加齢の間に、常に、A ペプチドがプラークに徐々に凝集するので、我々は、野生型PTP を発現している同年のAPP 遺伝子導入同腹仔に比べて、PTP 欠損マウスにおける脳A 沈着の実質的低減を認めた(図2G、H)。従って、- および - 切断産物の同時低減は、増大した - 分泌酵素活性とは反対の主張をするが、その代わりに、APPの低減した - 分泌酵素切断を示唆し、これは、CTF のレベルを抑制するのみでなく、下流のPTP 欠損脳中のA 産生も抑制する。

#### 【0169】

PTP の非存在下における アミロイドーシスの進行の抑制

進行性脳A 凝集(アミロイドーシス)は、AD進行の指標と見なされる。PTP のこの病理学的発生に対する効果を調査するために、我々は、9月齢(中年)および16月齢(老年)TgAPP-SwDIマウスの脳中のA 沈着物を監視した。9~11月齢では、A 沈着物は、主に海馬中、特に歯状回(DG)の門部中で認められる(図2G、H)。16月齢までに、病状は全体脳を通して広範囲に広がる。しかし、A 沈着の伝播は、代表的領域としてDG門部を用いて定量化されたように、PTP の遺伝子欠乏により抑制される(図2I)。9~16月齢の間では、A 量は、野生型PTP [APP-SwDI(+ )PTP (+ / +)]を発現しているTgAPP-SwDIマウスの2倍を超えるが、機能的PTP [APP-SwDI(+ )PTP (- / -)]を欠く遺伝子導入マウスでは、ほんの僅かな増大を示すだけである。一方、9月齢のAPP-SwDI(+ )PTP (+ / +)マウスで測定されたA 量は、16月齢APP-SwDI(+ )PTP (- / -)マウスと類似であり( $p = 0.95$ )、PTP 欠乏による疾患進行の抑制を示す(図2I)。

#### 【0170】

PTP 欠損脳におけるBACE1-APP親和性の低減

APP - 切断でPTP の役割の促進を示唆するこれらの観察と一致して、我々のデータは、PTP 欠乏が脳中でAPPとBACE1、- 分泌酵素との相互作用を弱めることをさらに明らかにする。BACE1とAPPとの間のインビボ親和性を試験するために、我々は、順次に過酷さの増大する洗浄剤を含む緩衝液中で、マウス脳ホモジネート由来の酵素および基質の共免疫沈降を実施した。BACE1-APP結合は、過酷でない緩衝液状態下では、野生型とPTP 欠損脳ではほぼ等しいが、緩衝液中の洗浄剤の過酷さの漸増により、PTP がなければ、分子複合体が脳中で解離をより受けやすいことが明らかになる(図3)。従って、PTP 欠損脳におけるより低いBACE1-APP親和性は、低減されたレベルのCTF およびその誘導体A に対する根底にある機序の可能性がある。

#### 【0171】

いくつかの別の特徴づけられていない経路が、PTP 欠損PTP 欠損脳中のCTF およびA の同時低減の一因となり得ることを排除できないが、これらのデータは、おそらく、A 産生の初期過程であるAPPに対するBACE1活性の促進を介して、PTP がAPPアミロイド形成プロセッシングを調節するという考えを一貫して裏付ける。

#### 【0172】

PTP による アミロイド形成性調節の特異性

PTP のAPPアミロイド形成産物に対する抑制効果は、我々に、この考えが、APP代謝の特異的調節を反映しているのか、あるいは、- および - 分泌酵素に対する包括的調節を反映しているのかに関するさらなる問題をもたらした。我々は、最初に、PTP 含有または非含有のマウス脳中でのこれらの分泌酵素の発現レベルを評価し、BACE1または - 分泌酵素の不可欠なサブユニットに関し変化がないことを見出した(図4A、B)。さらに、我々は、それらの他の基質のタンパク分解性プロセッシングを試験することにより、PTP が、- および - 分泌酵素活性を広範に調節するかどうかを試験した。APPの他に、ニューレグリン1(NRG1)およびノッチは、それぞれ、BA

C E 1 および  $\beta$ -分泌酵素の主要なインビボ基質である。N R G 1 の B A C E 1 切断も、ノッチの  $\gamma$ -分泌酵素切断も、P T P 欠損により影響を受けない(図 4 C、D)。まとめると、これらのデータは、 $\beta$ -および  $\gamma$ -分泌酵素の包括的調節を排除しないが、むしろ、P T P による A P P アミロイド形成調節の特異性を示唆している。

#### 【0173】

P T P 欠乏は、A P P 遺伝子導入マウスにおいて神経炎症およびシナプス障害を軽減する

以前の研究からの十分な証拠は、脳中の A  $\beta$  の過剰産生は、持続性アストログリオーシスなどのグリアの慢性炎症反応を含む多様な下流の病理学的イベントを誘発することを確定了。反応性(炎症性)グリアは、ニューロンとクロストークし、疾患進行中に神経変性を増幅する不完全なフィードバックループを引き起こす。

10

#### 【0174】

T g A P P - S w D I モデルは、既存の多くの A D マウスモデル中で、最も早く神経変性病態および行動欠陥を発症するモデルの 1 つである。従って、我々は、神経毒性 A  $\beta$  の下流の A D 病態における P T P の役割のさらなる試験のために、これらのマウスを選択する。

#### 【0175】

T g A P P - S w D I 導入遺伝子および野生型 P T P を発現する A P P - S w D I (+) P T P (+/+ ) マウスは、アストログリオーシスのマーカーである G F A P (グリア線維酸性タンパク質) のレベルで測定して、9 月齢までに、脳中に重度神経炎症を発症した(図 5)。D G 門部では、例えば、A P P - S w D I (+) P T P (+/+ ) マウス中の G F A P 発現レベルは、同年の非遺伝子導入同腹仔 [ A P P - S w D I (-) P T P (+/+ ) ] のレベルと比較して、10 倍超である。しかし、P T P 欠損は、アミロイド形成導入遺伝子により誘導されたアストログリオーシスを効果的に弱める。A P P - S w D I (+) P T P (-/- ) 脳中では、P T P の欠乏は、D G 門部中の G F A P 発現を非遺伝子導入野生型同腹仔のレベル近くまで回復する(図 5 k)。

20

#### 【0176】

全ての脳領域中で、T g A P P - S w D I 導入遺伝子の発現により最も影響を受けるのは、A  $\beta$  沈着およびアストログリオーシスの両方が最も激しいことが明らかになった D G の門部であるように見える(図 2 G、H ; 図 5)。従って、我々は、この領域の病態が、門部を通過して、それらが C A 3 樹状突起と共にシナプスを形成する C A 3 領域中に突き出た D G 錐体ニューロンの苔状線維軸索に対し影響を与えるかどうかについて疑問視した。C A 3 苔状線維終末域中のシナプス前のマーカーの試験時に、我々は、A P P - S w D I (+) P T P (+/+ ) マウスにおいて、それらの同年非遺伝子導入同腹仔と比較して、シナプトフィジンおよびシナプシン - 1 のレベルが低減しているのを見出した(図 6、シナプシン - 1 のデータは示していない)。明らかに、A P P 導入遺伝子の発現およびおそらく A  $\beta$  の過剰産生から生じたものであるこのようなシナプス障害は、A P P - S w D I (+) P T P (-/- ) マウスにおける P T P の遺伝子欠乏により回復される(図 6)。

30

#### 【0177】

興味深いことに、我々は、A P P - S w D I (+) P T P (-/- ) マウスは、C A 3 終末域中で、それらの同年の非遺伝子導入野生型同腹仔より高いレベルのシナプス前のマーカーを発現することがあることを認めた(図 6 g)。この観察は、以前の研究で観察されたように、我々の定量分析では統計的に有意ではないが、A P P 導入遺伝子とは無関係の P T P の追加のシナプス効果を示唆している可能性がある。

40

#### 【0178】

加齢 A D マウス脳のタウ病態は P T P に依存する

高リン酸化され、凝集したタウから構成される神経原線維濃縮体は通常、A D 脳で見出される。これらの濃縮体は、階層型パターンで発生する傾向があり、最初に、嗅内皮質中に出現し、その後、その他の脳領域に広がる。しかし、濃縮体形成の正確な機序は十分に

50

理解されていない。タウ濃縮体およびA 沈着物は、死後脳中の別々の位置で見つけることができるという事実は、ADにおけるタウ病状はA 蓄積とは無関係なのかどうかという疑問をもたらした。さらに、多くのAPP遺伝子導入マウスモデルにおいて、重篤な脳アミロイドーシスにもかかわらず、タウ濃縮体は報告されておらず、インビボでのA とタウ病態との間の関連性についてさらに疑問が生じている。

#### 【0179】

それにもかかわらず、いくつかの研究は、APP遺伝子導入マウス株のA プラーク周辺のジストロフィーの神経突起中でタウの非濃縮体様構築物を示し、タウ病態の正確な性質は、ヒトとマウスとの間で異なり得るにも関わらず、A は、タウ調節不全の原因因子であり得ることを主張している。タウのプロリンリッチドメインに対する抗体を用いた我々の組織学的分析で、我々は、加齢過程中的TgAPP-SwDIおよびTgAPP-SwIndの両方のマウス（APP-SwDI（+）PTP（+/+）マウスは約9月齢、およびAPP-SwInd（+）PTP（+/+）マウスは15月齢）の脳中にタウ凝集を認めた（図7）。このような凝集は、同年非遺伝子導入同腹仔で認められず（図7h）、これが、アミロイド形成APP導入遺伝子の発現の下流の病理学的イベント、おそらくA 細胞傷害性の結果、であることを示唆している。A レベルを低下させるPTPの遺伝子欠乏は、TgAPP-SwDIおよびTgAPP-SwInd両マウスのタウ凝集を抑制する（図7）。

#### 【0180】

TgAPP-SwDIおよびTgAPP-SwInd両マウスでは、タウ凝集体は、主に、梨状葉皮質および嗅内皮質の分子層中に、場合により、海馬領域中に認められ（図7）、AD脳中の初期段階濃縮体部位が想起される。より細密な調査では、タウ凝集体は、変質した細胞体および神経突起由来のデブリのような点状物形状で、核染色のない領域中でばらばらに見つかる場合が多い。希に、いくつかは、原繊維構造中（おそらく、分解前の変質細胞中の）に存在する。これらの知見を確認するために、我々は、タウのC末端を認識する追加の抗体を使用し、同じ形態ならびに分布パターンを検出した（図7A）。

#### 【0181】

死後AD脳の調査結果と一致して、TgAPP-SwDI脳中のタウ凝集体の分布パターンは、A 沈着のパターンと相関せず、これは、9月齢では、海馬中で顕著で、しかも、梨状葉皮質または嗅内皮質中ではまばらに存在するにすぎない（図2G、H）。これらのマウスにおけるタウ病状の因果関係は、おそらく、過剰産生A に関連することを考慮すると、A およびタウ沈着の主要な領域の分離は、細胞傷害性は堆積したアミロイドではなく、可溶性A が起源であることを示す可能性がある。異なる脳領域におけるニューロンが、タウ病状を等しく発症しやすい訳ではないことも明らかである。

#### 【0182】

我々は、次に、APP導入遺伝子の発現またはPTPの遺伝子欠乏がタウ凝集を調節するかどうかを、その発現レベルおよび/またはリン酸化状態を変えることにより調査した。脳ホモジネートのウェスタンブロット分析は、タウタンパク質発現がAPP導入遺伝子またはPTPにより影響を受けないことを示し、凝集が、このタンパク質の過剰発現ではなく、タウの局所的ミスフォールディングに起因し得ることを示唆する。脳ホモジネートを用いたこれらの実験はまた、明らかにタウ凝集の原因である、TgAPP-SwDIまたはTgAPP-SwInd導入遺伝子は、セリン191、トレオニン194、およびトレオニン220を含むタウ残基のリン酸化を強化しない（データは示さず）ことを明らかにした。ヒトタウ中のこれらの残基の同族体（セリン202、トレオニン231）は通常、神経原線維濃縮体中で高リン酸化されている。これらの知見は、野生型およびTgAPP-SwIndマウス中のタウの類似の翻訳後修飾を示す最近の定量的調査と一致する。さらに、以前の報告とは異なり、我々は、タウ凝集体中でこれらのリン酸化残基を検出できず、エピトープがない（残基がリン酸化されていないかまたは切断されている）か、またはミスフォールディングの内側に包埋されているかを示唆する。タウの翻訳後修飾の複雑さを考慮すると、凝集がいくつかのタウの未知の改質により媒介されている可能性

10

20

30

40

50

があることを排除できない。その他の因子、例えば、タウに結合する分子が、凝集物を沈降させ得るという可能性もある。

#### 【0183】

根底にある機序はまだ明確ではないが、我々のこれらのマウスにおけるタウ病状の知見は、アミロイド形成 A P P 導入遺伝子の発現とタウ構築の調節不全との間の因果関係を確立する。我々のデータはまた、P T P 欠乏が、A P P のアミロイド形成産物を低減させることにより、タウ凝集を抑制するという可能性を示唆する。

#### 【0184】

タウの機能不全は、微小管の劣化を示すので、神経変性マーカーとして広く認識されている。従って、P T P の遺伝子欠乏によるタウ凝集に対する抑制効果は、神経完全性の重要な調節因子としてのこの受容体の役割に対する追加の証拠を提供する。

10

#### 【0185】

P T P 欠損が A D マウスモデルの行動欠陥を救済する

次に、我々は、P T P 欠乏による神経病理学の軽減が、A D 関連行動欠陥からの救済を伴うかどうかを評価した。A D の最もよくある症状には、最初期段階中の短期記憶喪失およびアパシー、続けて、認知症進行に伴う多くの認知機能の障害の内の空間的見当識障害が挙げられる。Y - 迷路および新奇物体アッセイを代用モデルとして用いて、我々は、T g A P P - S w D I および T g A P P - S w I n d マウスにおけるこれらの認知および精神的特徴を評価した。

20

#### 【0186】

3つの同一のアームをマウスに自由に探索させる Y - 迷路アッセイは、マウスの短期空間記憶を測定する。これは、繰り返ししないでアーム探索を交替するマウスの天然の傾向に基づいている。能力は、総アーム進入中の自発的交替行動のパーセンテージによりスコア化され、より高いスコアは、より良好な空間ナビゲーションを示す。コロニー内の非遺伝子導入野生型マウスと比較して、A P P - S w D I ( + ) P T P ( + / + ) マウスは、それらの能力の明確な障害を示す。しかし、A P P - S w D I ( + ) P T P ( - / - ) マウスの P T P 遺伝子欠乏は、認知機能を非遺伝子導入野生型マウスのレベルまで回復する ( 図 8 A 、 図 9 ) 。

#### 【0187】

A D の個体中で報告されている最もよくある精神神経症状であるアパシーは、意欲喪失および新奇物体に対する注意力の低下を特徴とし、次第に、前臨床および初期症候前認知症期の早期診断を下されるようになる。初期段階 A D の多くの患者は、彼らの新規刺激を特定する能力に関係なく、新規状況に対する注意力を失い、新規情報のさらなる処理に参与する回路における根底にある障害を示唆する。アパシーの重要な特徴として、このような新奇物体に対する注意力の障害は、患者の「キュリオシティーフイギュアーズ ( c u r i o s i t y f i g u r e s ) 課題」または「オドボール課題」により知ることができる。これらの視覚ベース新奇物体の神経信号を脳に受容可能な形にする課題は、げっ歯類に対する新奇物体アッセイに極めて類似しており、新奇物体アッセイは、げっ歯類が事前馴染物体 ( F O ) に対し新奇物体 ( N O ) と同時に曝露された場合に、新奇物体に対する動物の関心を測定する。従って、我々は、このアッセイを、A P P 遺伝子導入マウスの新奇物体に対する注意力を試験するために使用した。マウスが、F O を認識するように予備訓練されている場合、新奇物体に対するマウスの注意力は、N O 探索の総物体探索 ( N O + F O ) に対する比率として識別指数により、あるいは、N O 探索の F O 探索に対する比率により測定される。両方の比率がよく使われるが、これらの評価の組み合わせは、動物行動のより包括的な評価を提供する。本試験では、両方の測定値により示されるように、A P P - S w D I ( + ) P T P ( + / + ) マウス中の A P P - S w D I 導入遺伝子の発現は、非遺伝子導入野生型マウスに比べて、N O 探索の実質的な低減に繋がる ( 図 8 B 、 C ; 図 10 ) 。N O / F O 比率で判定して、遺伝子導入および非遺伝子導入群の両方は、2つの物体を認識し、これらの間を識別できることは明らかである ( 図 10 A 、 B ) 。従って、A P P - S w D I ( + ) P T P ( + / + ) マウスによる低減した N O 探索は、N

30

40

50

Oへの注意力の欠如またはNOに対する注意に切り替えることができないことを表している。再度、この行動欠陥は、APP - SWDI (+) PTP (-/-)マウスのPTPの欠損により大きく回復され(図8B、C;図10)、以前のPTPの非存在下でのNO嗜好性の増加の観察と一致する。

#### 【0188】

これらの行動状況に対するPTPの効果をさらに検証するために、我々は、両アッセイでTgAPP - SWIndマウスを追加で試験して、類似の結果を観察し、PTPの遺伝子欠乏の場合に、両方の短期空間記憶および新奇物体に対する注意力の改善を確認した(図11)。

#### 【0189】

図12は、 $\alpha$ -分泌酵素阻害剤単独でまたは $\alpha$ -分泌酵素阻害剤と組み合わせて投与されたBACE1阻害剤と比較して、APPプロセッシングに対する $\alpha$ -分泌酵素阻害剤と組み合わせたISPの効果を示す免疫プロットである。この図で示すように、 $\alpha$ -分泌酵素阻害剤単独でまたは $\alpha$ -分泌酵素阻害剤と組み合わせて投与されたBACE1阻害剤と比較して、 $\alpha$ -分泌酵素阻害剤と組み合わせたISPは、APPプロセッシングを実質的に阻害した。

#### 【0190】

本発明を、その好ましい実施形態に関連して、詳細に提示し、説明してきたが、添付した特許請求の範囲に包含される本発明の範囲から逸脱することなく、その形態や詳細を様々に変更し得ることを当業者なら理解するであろう。前述の明細書で引用された特許、出版物および参考文献はすべてその全体が参照によって、本明細書に組み込まれる。

10

20

#### 【図1A】

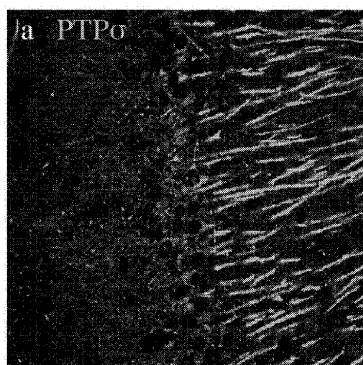


Fig. 1A

#### 【図1C】

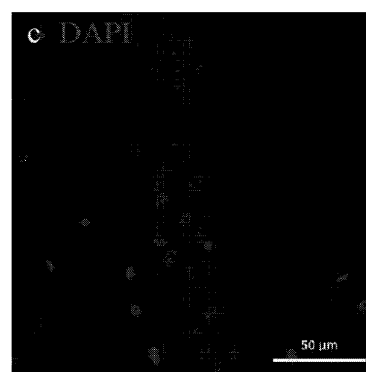


Fig. 1C

#### 【図1B】

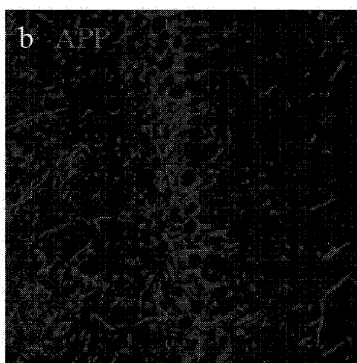


Fig. 1B

#### 【図1D】

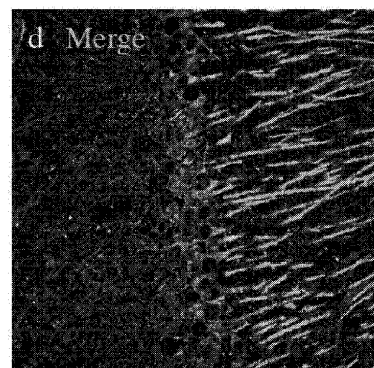
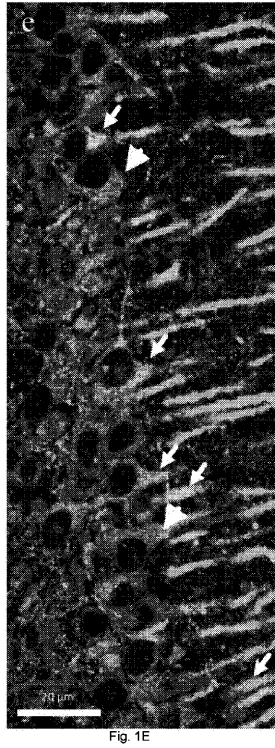


Fig. 1D

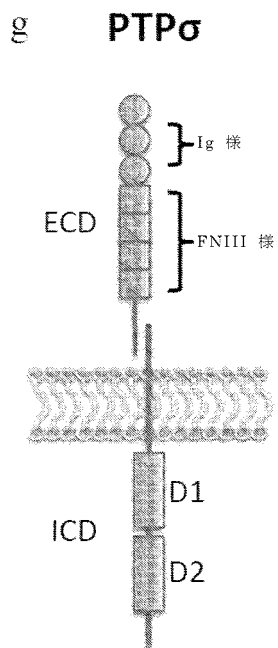
【図 1 E】



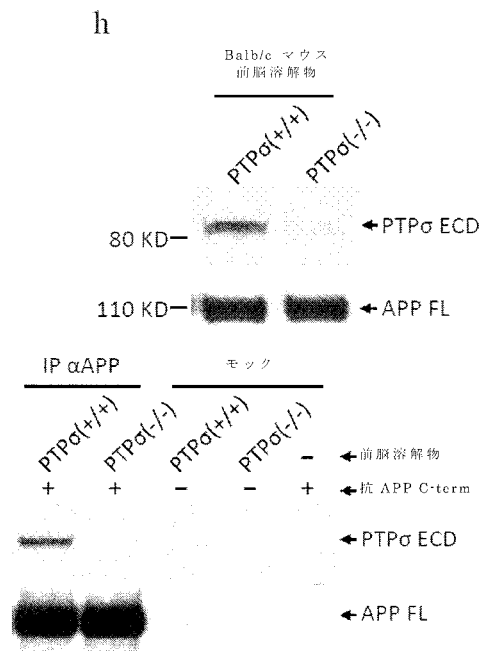
【図 1 F】



【図 1 G】

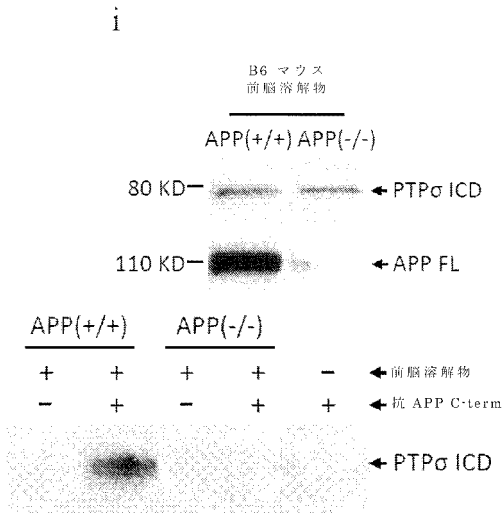


【図 1 H】





【図 1 I】



【図 2 - 1】

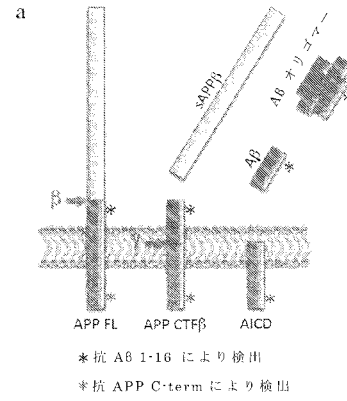


図 2 A

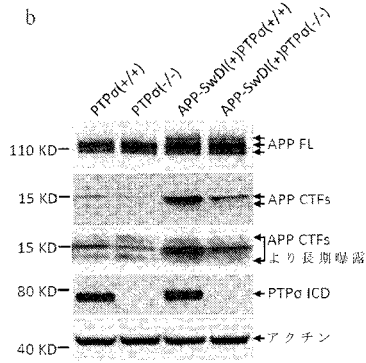


図 2 B

【図 2 - 2】

c IP: 抗マウス A $\beta$  1-16\*, プロット: 抗 APP C-term\*

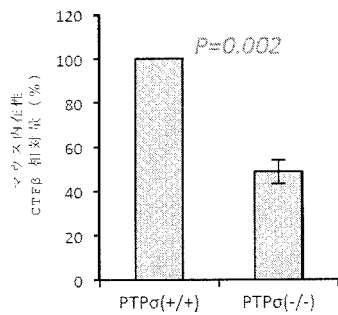
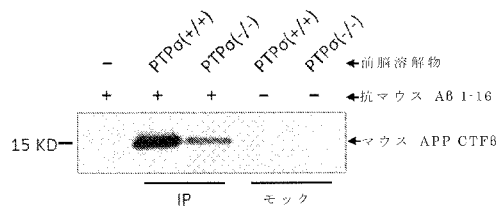


図 2 C

【図 2 - 3】

d IP: 抗 APP C-term\*, プロット: 抗ヒト A $\beta$  1-16\*

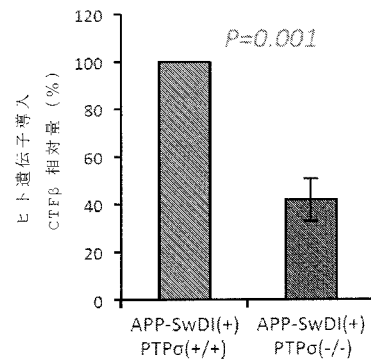
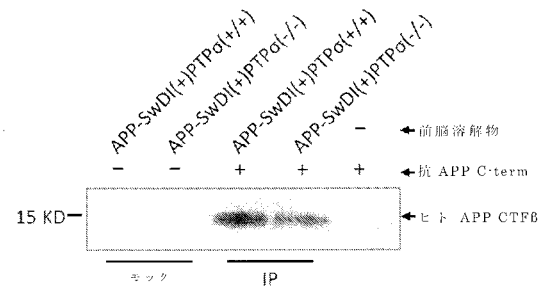


図 2 D

## 【 図 2 - 4 】

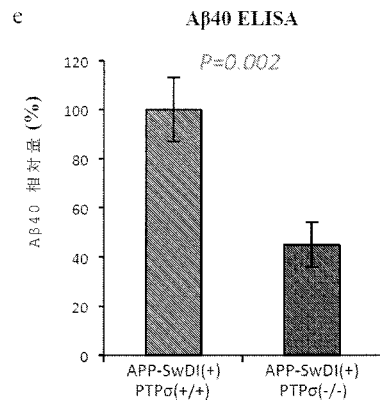


図 2 E

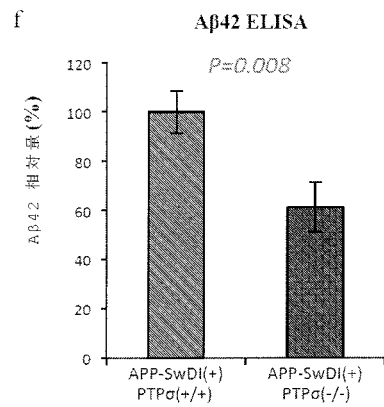


図 2 F

## 【 図 2 - 5 】

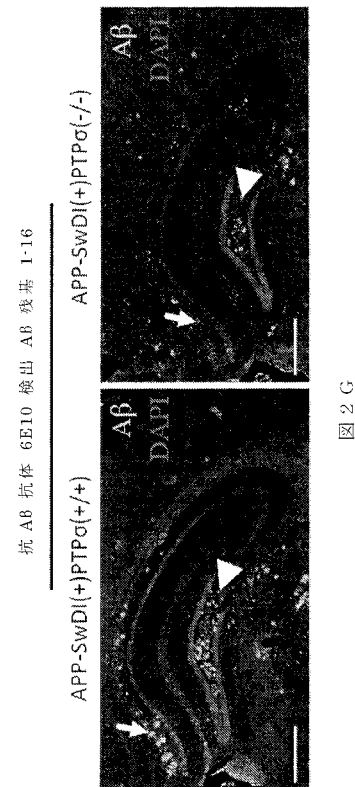
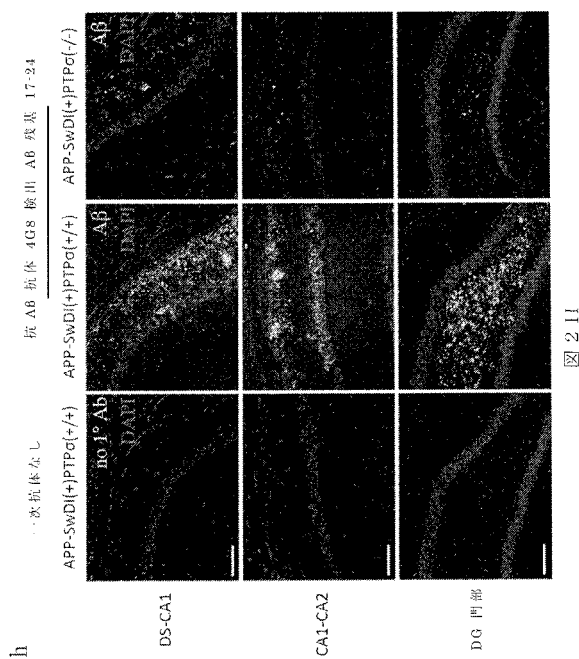


図 2 G

50

## 【 図 2 - 6 】



## 【 図 2 - 7 】

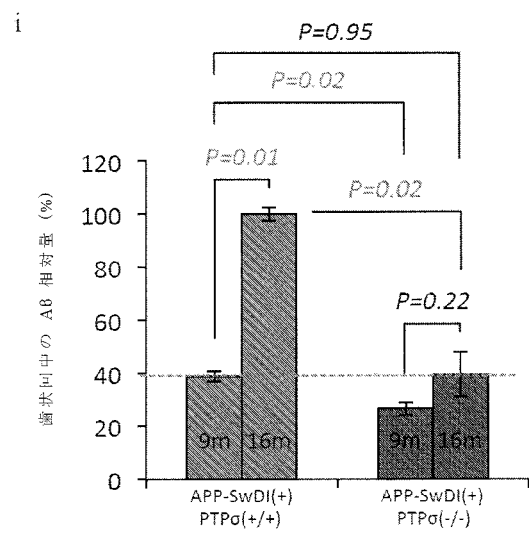


図 2 I

## 【図 3 - 1】

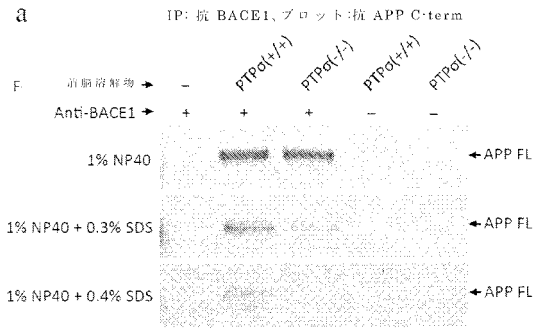


図 3 A

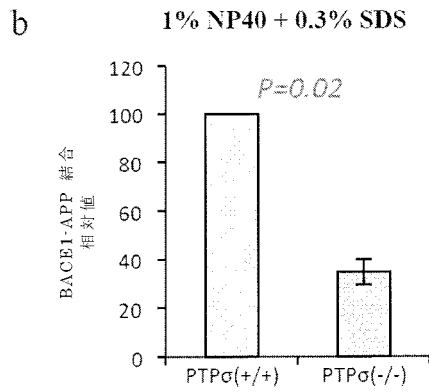


図 3 B

## 【図 3 - 2】

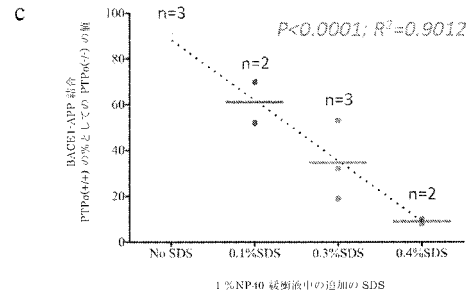
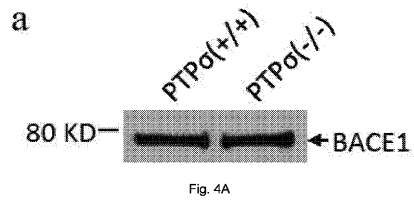


図 3 C

## 【図 4 A】



## 【図 4 - 1】

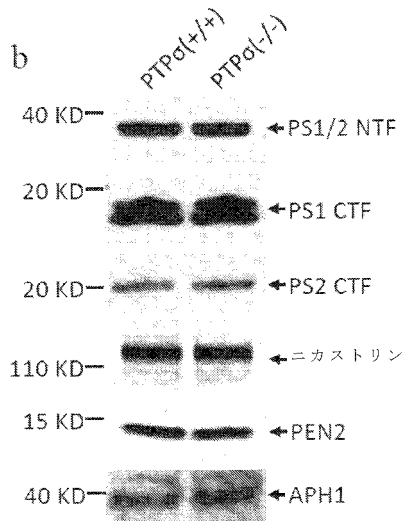


図 4 B

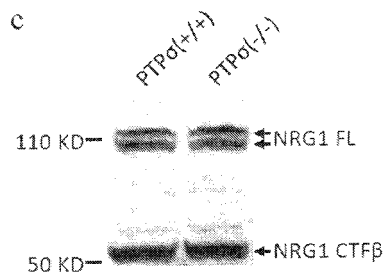


図 4 C

## 【図 4 - 2】

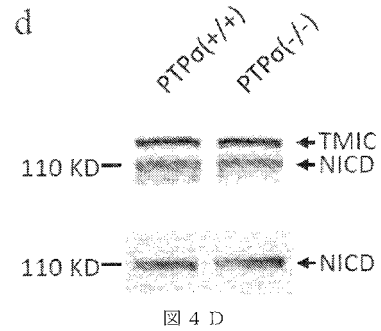


図 4 D

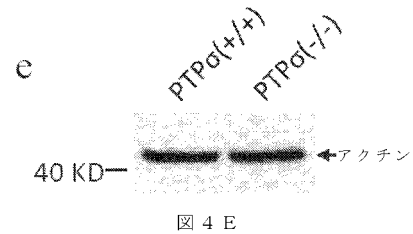


図 4 E

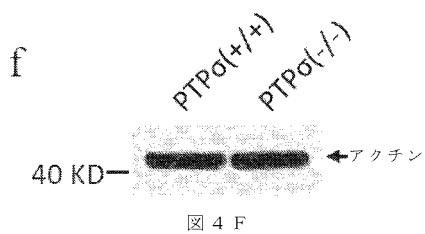


図 4 F

【 図 5 A 】

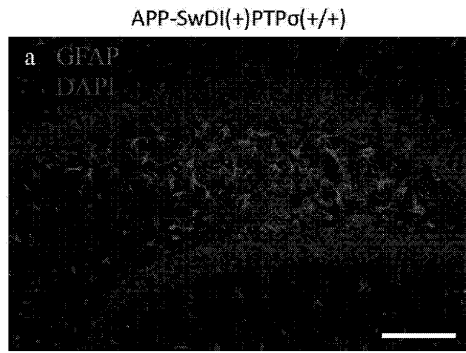


Fig. 5A

【 図 5 B 】



Fig. 5B

【 図 5 E 】

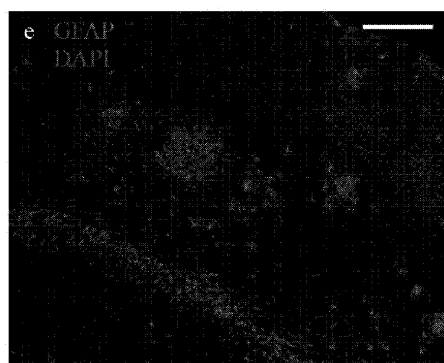


Fig. 5E

【 図 5 F 】



Fig. 5F

【 図 5 C 】

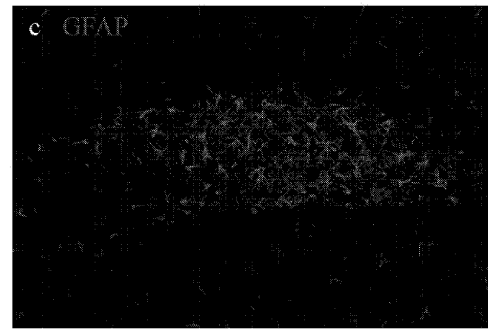


Fig. 5C

【 図 5 D 】



Fig. 5D

【 図 5 G 】

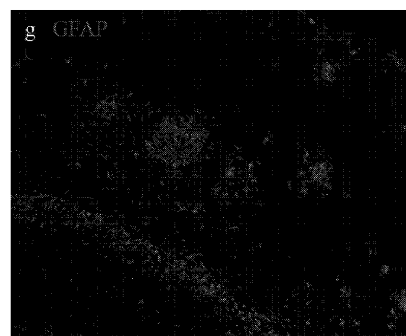


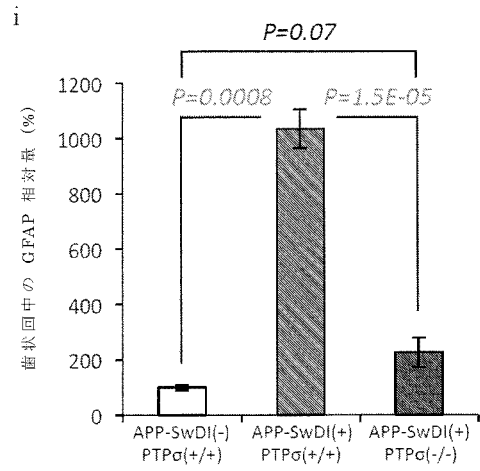
Fig. 5G

【 図 5 H 】

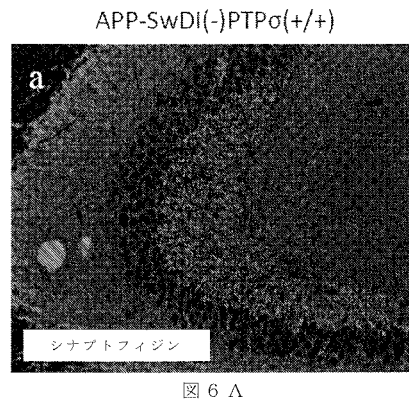


Fig. 5H

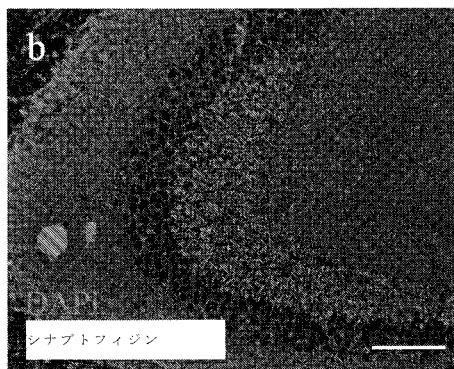
【図 5 I】



【図 6 - 1】



【図 6 - 2】

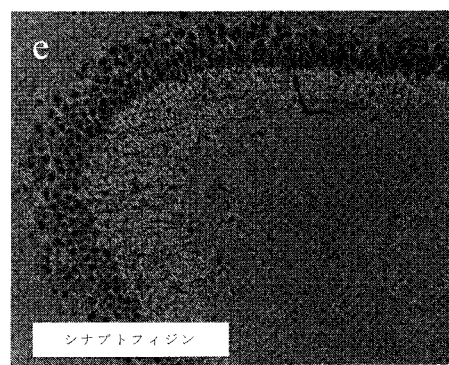
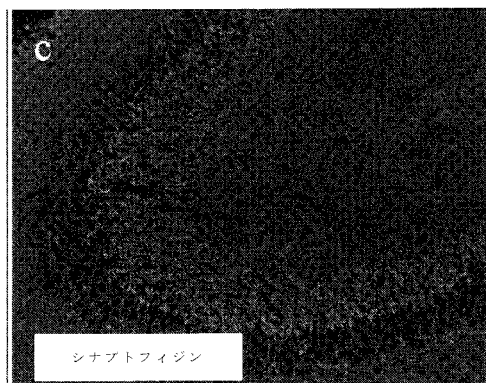


APP-SwDI(+/-)PTPσ(+/+)

【図 6 - 3】



APP-SwDI(+/-)PTPσ(-/-)



## 【図 6 - 4】

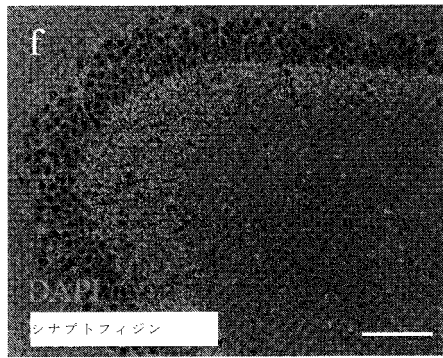


図 6 F

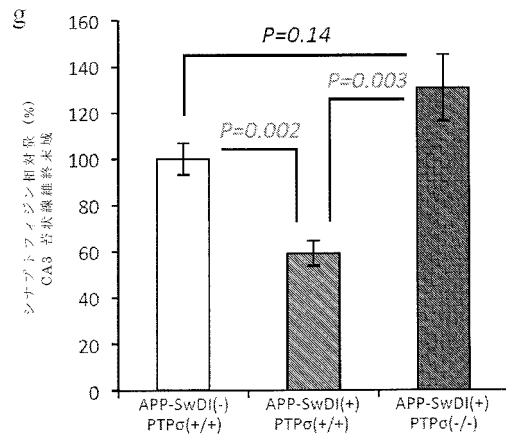


図 6 G

## 【図 7 - 1】

a

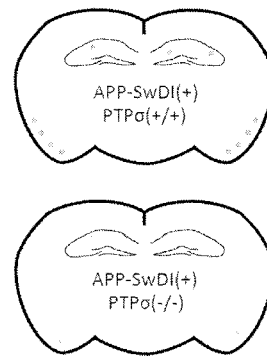


図 7 A

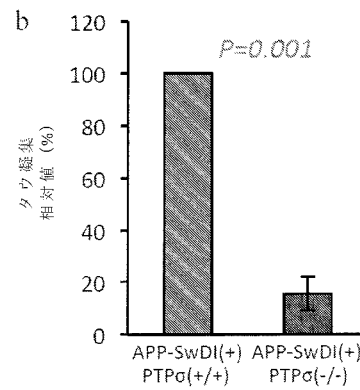


図 7 B

## 【図 7 - 2】

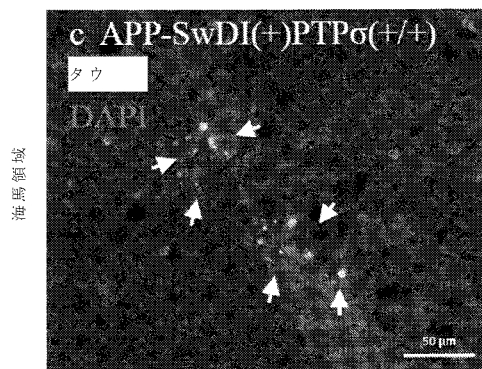


図 7 C

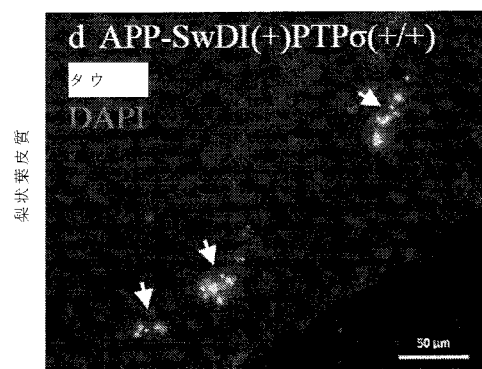


図 7 D

## 【図 7 - 3】

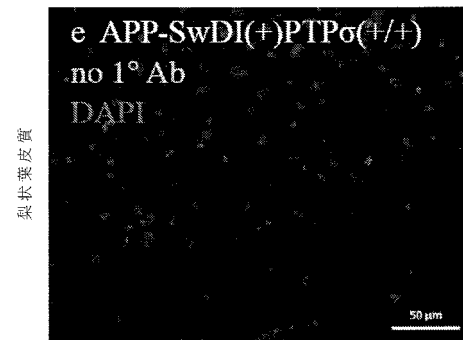


図 7 E

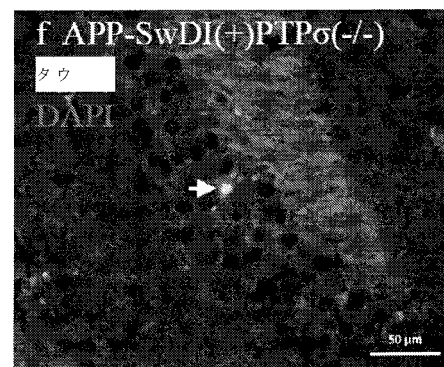


図 7 F

【図 7 - 4】

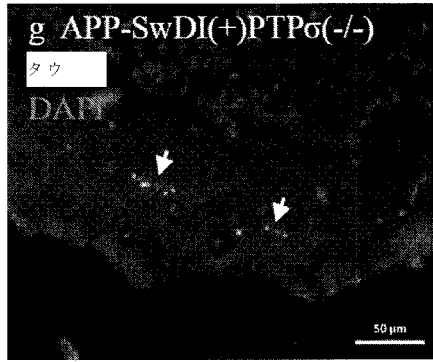


図 7 G

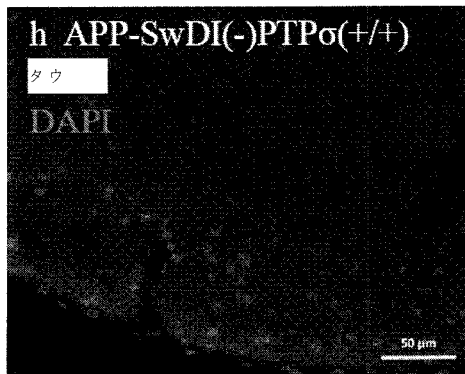


図 7 H

【図 8 - 1】

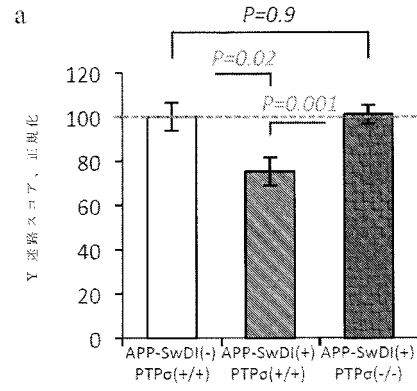


図 8 A

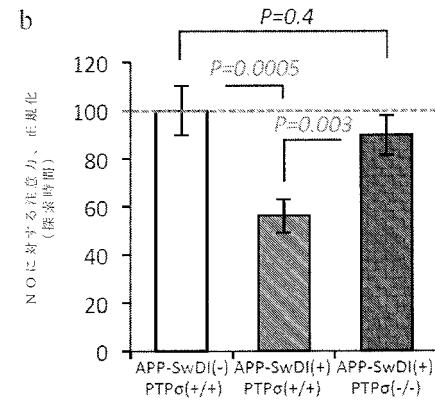


図 8 B

【図 8 - 2】

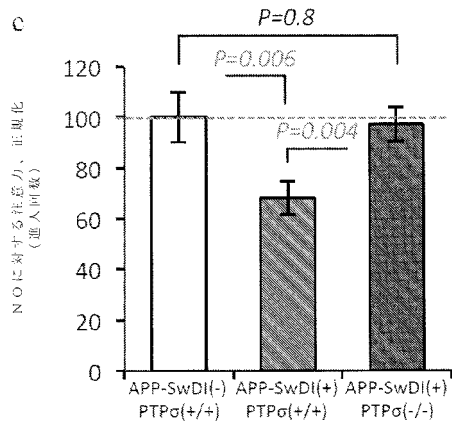
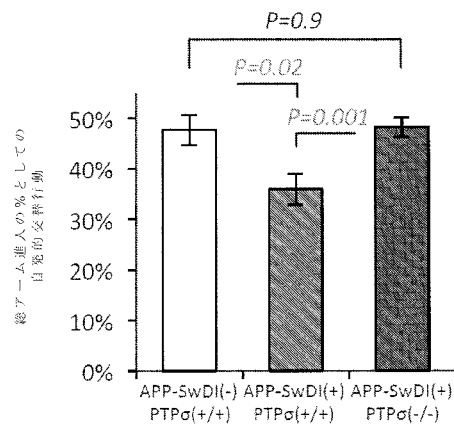
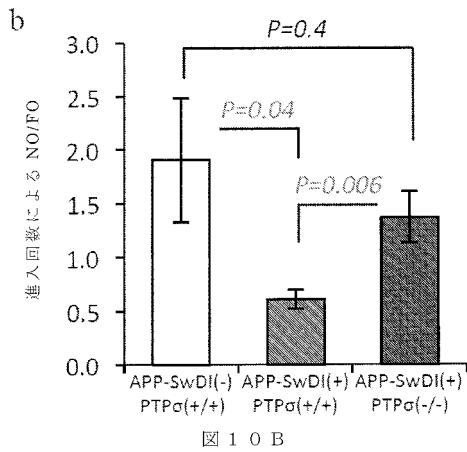
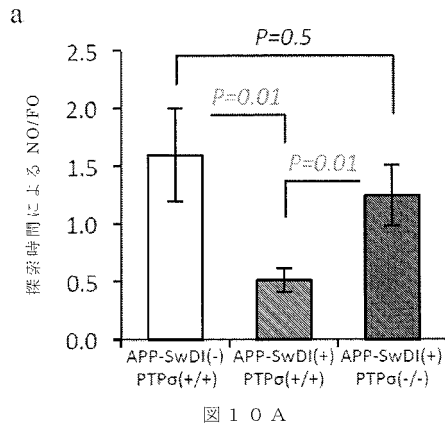


図 8 C

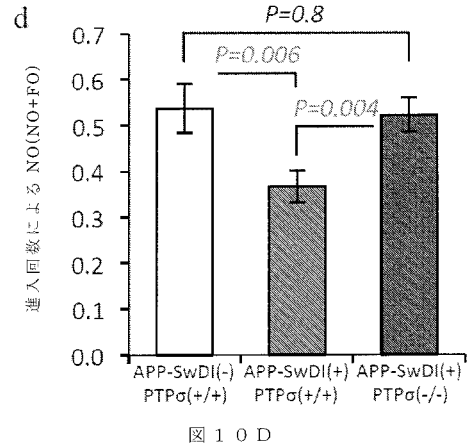
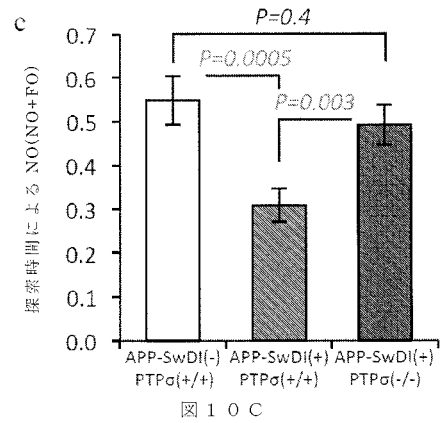
【図 9】



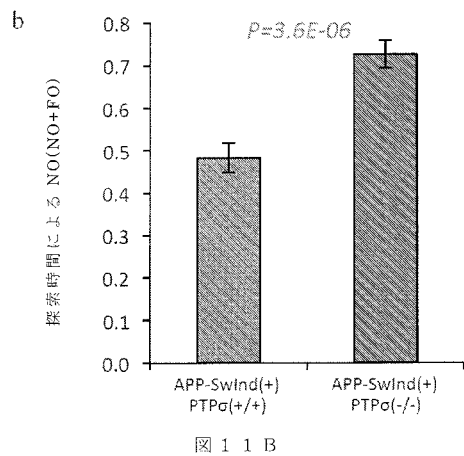
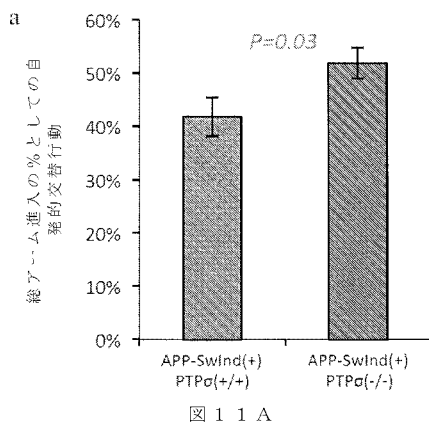
【図 10 - 1】



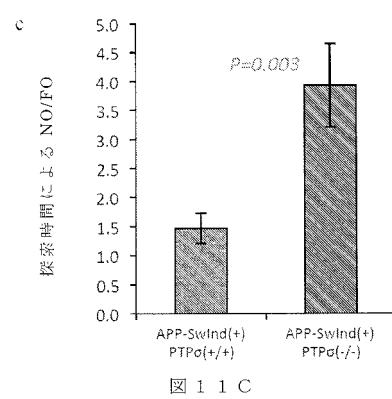
【図 10 - 2】



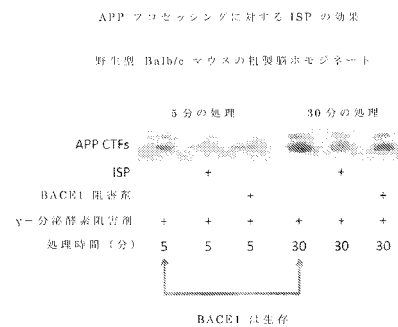
【図 11 - 1】



【図 11 - 2】



【図 12】





【手続補正書】

【提出日】令和2年2月14日(2020.2.14)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2020524132000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/36116

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:  
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.  
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter. I(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:  
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter. I(a)).  
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter. I(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 18/36116

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 11  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-10, 12-23, drawn to a method of inhibiting beta-amyloid accumulation or Tau aggregation or treating Alzheimer's disease with a therapeutic peptide derived from PTP sigma. The method will be searched to the extent that the therapeutic peptide encompasses SEQ ID NO: 9. It is believed that claims 1-4, (7-8)(in part), 9, 10(in part), 12-15, (18-19)(in part), 20, (21-23)(in part) encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 9. Additional therapeutic peptide(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected therapeutic peptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a therapeutic peptide encompasses SEQ ID NO: 16 (Claims 1-23).

-----continued on supplementary sheet-----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-4, (7-8)(in part), 9, 10(in part), 12-15, (18-19)(in part), 20, (21-23)(in part) limited to SEQ ID NO: 9

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ 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.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 18/36116

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC(8) - C07K 7/06, A61K 38/46 (2018.01)  
CPC - C07K 7/06, A61K 38/465, C12Y 301/03048

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)

See Search History Document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History Document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History Document

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2002/083182 A2 (MCGILL UNIVERSITY) 24 October 2002 (24.10.2002) claim 1; claim 4-6	12
X	US 2015/0366949 A1 (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 24 December 2015 (24.12.2015) Abstract; para [0012]; para [0016]; para [0121]; claim 1; claim 4; claim 6; claim 36; claim 40-41; claim 46-47	12-15, (18-19)/(13-15), 20, 21/(13-15)
Y		1-4, (7-8)/(2-4), 9, 10/(2-4), (22-23)/(13-15)
Y ✓	GU et al. "Alzheimer's disease pathogenesis is dependent on neuronal receptor PTPsigma" 2016 [online] [Retrieved on 1 October 2018] Retrieved from website <URL: <a href="https://www.biorxiv.org/content/early/2016/12/06/079806">https://www.biorxiv.org/content/early/2016/12/06/079806</a> > especially, Abstract; page 4, para 2; page 6, para 1	1-4, (7-8)/(2-4), 9, 10/(2-4)
Y	US 2012/0237526 A1 (DE STROOPER et al.) 20 September 2012 (20.09.2012) Abstract; claim 1; claim 8-9	(22-23)/(13-15)
A	US 2010/0226969 A1 (MASLIAH et al.) 9 September 2010 (09.09.2010) Abstract	1, 12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent 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

2 October 2018

Date of mailing of the international search report

16 OCT 2018

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450  
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300  
PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/36116

Continuation of Box III: Observations where unity of invention is lacking:

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

No technical features are shared between the amino acid sequences of therapeutic peptides of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of including: a method of inhibiting beta-amyloid accumulation or Tau aggregation or treating Alzheimer's disease with a therapeutic peptide derived from PTP sigma, these shared technical features are previously disclosed by US 2015/0366949 A1 to Case Western Reserve University (hereinafter 'CWRU') and US 2010/0226969 A1 to Masliah et al. (hereinafter 'Masliah').

CWRU teaches a method to treat Alzheimer's disease in a subject in need thereof, the method comprising: administering to the subject a therapeutic agent that inhibits one or more of catalytic activity, signaling, and function of the LAR family phosphatases (para [0013] "Embodiments herein also relate to methods of treating diseases, disorders, and/or conditions associated with activation and signaling of LAR family phosphatases. The methods include administering to a cell of the subject a therapeutic agent that inhibits one or more of catalytic activity, signaling, and function of the LAR family phosphatases..."; para [0016] "The neurological disorder can also include at least one of Alzheimer's disease,..."). CWRU does not specifically teach a method of inhibiting beta-amyloid accumulation or Tau aggregation.

Masliah teaches a method of inhibiting beta-amyloid accumulation or Tau aggregation that is related to Alzheimer's diseases (abstract, the compositions of the invention specifically target synuclein, beta-amyloid and/or tau protein aggregates, and the methods of the invention can be used to specifically prevent, reverse, slow or inhibit synuclein, beta-amyloid and/or tau protein aggregation. In alternative embodiments, the compositions and methods of the invention, are used to treat, prevent or ameliorate (including slowing the progression of) degenerative neurological diseases related to...Alzheimer's Disease,...). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to have tested whether therapeutic peptides derived from LAR family phosphatases could have inhibited beta-amyloid accumulation or Tau aggregation in a subject having Alzheimer's disorder, because therapeutic peptides derived from LAR family phosphatases is an effective agent in treating Alzheimer's disease, as taught by CWRU.

Some inventions of Groups I+ share the technical features of therapeutic peptides derived from the wedge domain of PTP sigma. CWRU teaches therapeutic peptides derived from the wedge domain of PTP sigma (para [0007] In some embodiments, the LAR family phosphatase is a receptor protein tyrosine phosphatase sigma (PTPs), and the therapeutic agent includes a therapeutic peptide having an amino acid sequence that is ..., at least about 85 percent, ... homologous to about 10 to about 20 consecutive amino acids of the wedge domain of PTPs").

As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 P 43/00</b>	<b>1 1 1</b>	
<b>A 6 1 K 38/10 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 K 38/10</b>		
<b>A 6 1 K 38/08 (2019.01)</b>		<b>A 6 1 K 38/08</b>		
<b>A 6 1 K 38/16 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 K 38/16</b>		

(81)指定国・地域 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, JO, 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

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 シェン, インジー

アメリカ合衆国, オハイオ州 4 3 2 1 0 , コロンブス , 3 3 3 ダブリュー . 1 0 番 アベニュー

(72)発明者 グ, ヤンチェン

アメリカ合衆国, オハイオ州 4 3 2 1 0 , コロンブス , 3 3 3 ダブリュー . 1 0 番 アベニュー

(72)発明者 シルバー, ジェリー

アメリカ合衆国, オハイオ州 4 4 1 0 6 , クリーブランド , 1 0 9 0 0 ユークリッド アベニュー

(72)発明者 ラン, ブラッドリー ティー .

アメリカ合衆国, オハイオ州 4 4 1 0 6 , クリーブランド , 1 0 9 0 0 ユークリッド アベニュー

F ターム(参考) 4C076 AA95 BB11 CC01 CC41 EE59 FF70

4C084 AA17 AA19 BA01 BA08 BA17 BA18 BA19 BA23 NA05 NA14

ZA151 ZA152 ZA161 ZA162 ZC201 ZC202

4H045 AA30 BA15 BA16 BA18 CA40 EA28 FA33