

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6675403号
(P6675403)

(45) 発行日 令和2年4月1日(2020. 4. 1)

(24) 登録日 令和2年3月12日(2020. 3. 12)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/566 (2006. 01)	GO 1 N 33/566
GO 1 N 33/536 (2006. 01)	GO 1 N 33/536 D
CO 7 K 14/47 (2006. 01)	CO 7 K 14/47 Z N A

請求項の数 21 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2017-531984 (P2017-531984)	(73) 特許権者	517076916
(86) (22) 出願日	平成27年9月4日(2015. 9. 4)		システム オブ システムズ アナリティクス インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2017-527828 (P2017-527828A)		アメリカ合衆国 ヴァージニア州 220
(43) 公表日	平成29年9月21日(2017. 9. 21)		30 フェアファックス ウェイブルズ
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/048504		ミル ロード 11250 スイート 300
(87) 国際公開番号	W02016/037036	(74) 代理人	100094569
(87) 国際公開日	平成28年3月10日(2016. 3. 10)		弁理士 田中 伸一郎
審査請求日	平成30年8月20日(2018. 8. 20)	(74) 代理人	100088694
(31) 優先権主張番号	62/046, 475		弁理士 弟子丸 健
(32) 優先日	平成26年9月5日(2014. 9. 5)	(74) 代理人	100103610
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 ▲吉▼田 和彦
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロイドベータオリゴマーを検出する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象から得られる生物学的サンプルでA β オリゴマーを検出する方法であって、

生物学的サンプル及びペプチドプローブを含む第一の試験サンプルを調製する工程であって、当該ペプチドプローブが配列番号:1-56及び62-65のいずれか1つと少なくとも70%同一のアミノ酸配列を含む10から34アミノ酸残基から成り、当該ペプチドプローブがA β オリゴマーに優先的に結合し、かつ蛍光シグナルを放射することができる蛍光標識で標識されており、当該ペプチドプローブが当該生物学的サンプルに存在する任意のA β オリゴマーと第一の標識された複合体を形成する、前記工程；

当該第一の試験サンプルをフローサイトメトリーに付して当該第一の標識された複合体の蛍光シグナルを検出する工程、

前記対象からの生物学的サンプル、合成A β オリゴマー、およびペプチドプローブを含む第二の試験サンプルを調製する工程であって、当該ペプチドプローブが当該生物学的サンプル中の任意のA β オリゴマーおよび当該合成A β オリゴマーと第二の標識された複合体を形成する、前記工程、

当該第二の試験サンプルをフローサイトメトリーに付して、当該第二の試験サンプル中の当該第二の複合体の蛍光シグナルを検出する工程、

を含み、第一のサンプル中の第一の標識された複合体のシグナルと当該第二の試験サンプル中の第二の標識された複合体のシグナルとの間の相違が当該生物学的サンプルのA β オリゴマーの存在及び量と逆相関関係を示す、前記方法。

10

20

【請求項2】

対象から得られる生物学的サンプルに存在する細胞と会合したA β オリゴマーを検出することによって当該対象のA β オリゴマー装荷を決定する方法であって、

細胞を含む対象由来の生物学的サンプル及びペプチドプローブを含む第一の試験サンプルを調製する工程であって、当該ペプチドプローブが、配列番号:1-56及び62-65のいずれか1つと少なくとも70%同一のアミノ酸配列を含む10から34アミノ酸残基から成り、当該ペプチドプローブがA β オリゴマーに優先的に結合しかつ蛍光シグナルを放射することができる蛍光標識で標識されており、当該ペプチドプローブが当該生物学的サンプルの細胞と会合したA β オリゴマーと第一の標識された複合体を形成する、前記工程；

当該第一の試験サンプルをフローサイトメトリーに付して当該第一の試験サンプル中の当該第一の標識された複合体の蛍光シグナルを検出する工程；

細胞を含む対象由来の生物学的サンプル、合成A β オリゴマー、及びペプチドプローブ、を含む第二の試験サンプルを調製する工程であって、当該ペプチドプローブが、当該生物学的サンプルの細胞と会合したA β オリゴマー及び合成A β オリゴマーと第二の標識された複合体を形成する前記工程；

当該第二の試験サンプルをフローサイトメトリーに付して、当該第二の試験サンプル中の第二の標識された複合体の蛍光シグナルを検出する工程、
を含み、第一の試験サンプル中の第一の標識された複合体のシグナルと第二の試験サンプル中の第二の標識された複合体のシグナルとの間の相違が、対象のA β オリゴマー装荷と逆相関関係を示す、前記方法。

【請求項3】

第二の試験サンプルが、生物学的サンプル及び合成A β オリゴマーを一緒にし、その後でペプチドプローブを導入することによって調製される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

対象から得た赤血球と会合したA β オリゴマーを検出するin vitroの方法であって、

赤血球およびペプチドプローブを含む第一の試験サンプルを調製する工程であって、当該ペプチドプローブが、配列番号:1-56及び62-65のいずれか1つと少なくとも70%同一のアミノ酸配列を含む10から34アミノ酸残基から成り、当該ペプチドプローブが、A β オリゴマーに優先的に結合しかつ蛍光シグナルを放射することができる蛍光標識で標識されており、当該ペプチドプローブが赤血球と会合したA β オリゴマーと第一の標識された複合体を形成する前記工程；

当該第一の試験サンプルをフローサイトメトリーに付して当該第一の標識された複合体の生成されたシグナルを検出する工程、

赤血球、合成A β オリゴマーおよびペプチドプローブを含む生物学的サンプルを含む第二の試験サンプルを調製する工程であって、当該ペプチドプローブが赤血球と会合したA β オリゴマーおよび合成A β オリゴマーと第二の標識された複合体を形成する、前記工程

、
当該第二の試験サンプルをフローサイトメトリーに付して当該第二の試験サンプル中の当該第二の標識された複合体の生成されたシグナルを検出する工程、

を含み、第一の試験サンプル中の第一の標識された複合体のシグナルと第二の試験サンプル中の第二の標識された複合体のシグナルとの間の相違が、対象からの赤血球のA β オリゴマー装荷と逆相関関係を示す、前記方法。

【請求項5】

血小板と会合して存在するA β オリゴマーを検出するin vitroの方法であって、

血小板をペプチドプローブと接触させる工程であって、当該ペプチドプローブが、配列番号:1-56及び62-65のいずれか1つと少なくとも70%同一のアミノ酸配列を含む10から34アミノ酸残基から成り、当該ペプチドプローブがA β オリゴマーに優先的に結合しかつ蛍光標識で標識されており、当該ペプチドプローブが血小板の表面に存在するA β オリゴマーと複合体を形成する、前記工程；及び

当該複合体のシグナルを検出する工程、

を含む、前記方法。

【請求項 6】

ペプチドプローブが配列番号:64 (Pep-11) から成る、請求項1-5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

蛍光標識がFITC標識である、請求項1-6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

蛍光標識がピレン部分であり、検出工程がピレンエキシマーの形成を検出することを含む、請求項1-6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

生物学的サンプルが体液のサンプルを含む、請求項1-3および6-8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

体液が血液、血漿、CSF又は脳ホモジネートから成る群から選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

体液が赤血球を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

赤血球が単離赤血球である、請求項4または11に記載の方法。

【請求項 13】

体液が血小板を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 14】

血小板が単離血小板である、請求項5または13に記載の方法。

【請求項 15】

A β オリゴマーが1つ以上の細胞と会合する、請求項1-3及び6-14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 16】

1つ以上の細胞が、赤血球、血小板、白血球および組織細胞から成る群から選択される、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

1つ以上の細胞が赤血球及び血小板を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

検出工程が、赤血球と会合したA β オリゴマー及び血小板と会合したA β オリゴマーを別々に検出することを含む、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

形成される及び/又は検出される第一の複合体が、ペプチドプローブ、A β オリゴマー、及び生物学的サンプル由来の赤血球を含む、請求項1-4及び6-18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 20】

形成される及び/又は検出される第一の複合体が、ペプチドプローブ、A β オリゴマー、及び生物学的サンプル由来の血小板を含む、請求項1-3及び5-18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 21】

形成される及び/又は検出される第一の複合体が、ペプチドプローブ、合成A β オリゴマー、及び生物学的サンプル由来の赤血球又は血小板を含む、請求項1-20のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互引用) 本出願は、米国仮特許出願62/046,4751 (2014年9月5日出願 (そ

10

20

30

40

50

の完全な内容は参照により本明細書に含まれる)) に対し優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

折り畳み異常タンパク質疾患の発症機序は、正常タンパク質が凝集しやすい β シートに富む高次構造に転換することを特徴とする。これらの高次構造はアミロイド形成性疾患に関与する。アルツハイマー病(AD)の場合には、アミロイドベータ($A\beta$)タンパク質の神経毒性オリゴマー及び原線維への自己集合が、AD発症の主要メカニズムに関する第一の仮説である。

アルツハイマー病は、 $A\beta$ タンパク質の固有の構造的形態(例えば“折り畳み異常タンパク質”又は自己凝集タンパク質)と密接に関係し、一方、異なる構造的形態の当該タンパク質(例えば“正常タンパク質”)は有害ではない。折り畳み異常 $A\beta$ タンパク質は凝集物を形成し、これら凝集物は自己集合して β プリーツシート高次構造という共通の特徴を有する非分枝原線維を形成する。中枢神経系(CNS)では、アミロイド沈着は脳血管及び髄膜血管に(脳血管沈着)及び脳実質に(プラーク)存在しうる。ヒト及び動物モデルにおける神経病理学的研究は、アミロイド沈着の基部近くの細胞はその正常な機能が妨害されることを示した。例えば以下を参照されたい:Mandybur, *Acta Neuropathol.* 78:329-331, 1989; Kawai et al., *Brain Res.* 623:142-146, 1993; Martin et al., *Am. J. Pathol.* 145:1348-1381, 1994; Kalaria et al., *Neuroreport* 6:477-80, 1995; Masliah et al., *J. Neurosci.* 16:5795-5811, 1996。加えて、他の研究は、アミロイド原線維が実際に神経変性を開始させうることを示している。例えば以下を参照されたい:Lendon et al., *J. Am. Med. Assoc.* 277:825-831, 1997; Yankner, *Nat. Med.* 2:850-852, 1996; Selkoe, *J. Biol. Chem.* 271:18295-18298, 1996; Hardy, *Trends Neurosci.* 20:154-159, 1997。

【0003】

タンパク質の異常折り畳みをもたらす基本的な分子メカニズムはなお完全には理解されていないが、共通の特徴は、凝集物及び/又は β シート構造又は他の高次構造を示す原線維を形成しやすいということである。原線維形成及びプラーク沈着と関係するその後の二次的 β シート構造の形成は、核生成期を含む複雑なメカニズムを介して生じる。核生成期にタンパク質モノマーは会合してオリゴマーを形成し、前記オリゴマーは会合して原線維を形成し、続いて原線維は各末端で伸長する。例えば、 $A\beta$ タンパク質モノマーは、健康な個体の多様な部分(体液(例えば血液及び脳脊髄液)及び組織(例えば脳)を含む)で見出されうる。 $A\beta$ タンパク質折り畳み異常によって引き起こされる疾患は、モノマーが自己集合してオリゴマー(可溶性凝集物)、不溶性オリゴマー(例えば不溶性不定形自己凝集物)、前原線維又は原線維を形成し、最終的には不溶性の大きな凝集した沈着物(例えば有病個体で見いだされるプラーク)を形成することと関係があるように思われる。

アミロイドプラークで見い出される $A\beta$ タンパク質の2つの豊富な形態は $A\beta_{1-40}$ ($A\beta$ 40とも称される)及び $A\beta_{1-42}$ ($A\beta$ 42とも称される)である。 $A\beta$ 40がより豊富であるが、 $A\beta$ 42はより原線維形成性であり、AD及びCAAの両方のアミロイド沈着で当該2つのうちの主要成分である。例えば以下を参照されたい:Wurth et al., *J. Mol. Biol.* 319: 1279-90, 2002。上記に記載したAD症例のアミロイド沈着に加えて、AD症例は血管壁のアミロイド沈着と密接に関係しうる。例えば以下を参照されたい:Vinters H. V., *Stroke* Mar-Apr; 18(2):311-324, 1987; Itoh Y., et al., *Neurosci. Lett.* 155(2):144-147, Jun. 11, 1993。

したがって、 $A\beta$ オリゴマーの検出方法が求められており、前記は、疾患のリスク、存在、進行、重篤度及び予後、及び/又は $A\beta$ タンパク凝集物形成の妨害を目的とする治療薬剤の有効性に関する識見を提供することができる。

【発明の概要】

【0004】

本明細書に開示されるものは、生物学的サンプルで $A\beta$ オリゴマーを検出する方法である。

いくつかの実施態様にしたがえば、当該方法は、対象から得られる生物学的サンプルでA β オリゴマーを検出する工程を含み、前記方法は、生物学的サンプル及びペプチドプローブを含む試験サンプルを調製する工程であって、当該ペプチドプローブは、配列番号:1-56及び62-65のいずれか1つと少なくとも70%同一のアミノ酸配列を含む10から34アミノ酸残基から成り、当該ペプチドプローブはA β オリゴマーと優先的に結合し、かつ蛍光シグナルを放射することができる蛍光標識で標識され、当該ペプチドプローブは当該生物学的サンプルに存在する任意のA β オリゴマーと複合体を形成する前記工程；当該試験サンプルをフローサイトメトリーに付して当該複合体の蛍光シグナルを検出する工程を含み、当該複合体の蛍光シグナルは当該生物学的サンプルのA β オリゴマーの存在及び量と正の相関関係を示す。

10

【0005】

さらに開示されるものは、対象から得られる生物学的サンプルに存在する細胞と会合したA β オリゴマーを検出することによって当該対象のA β オリゴマー装荷を決定する工程を含む方法であり、前記方法は、細胞を含む対象由来の生物学的サンプル及びペプチドプローブを含む第一の試験サンプルを調製する工程であって、当該ペプチドプローブは、配列番号:1-56及び62-65のいずれか1つと少なくとも70%同一のアミノ酸配列を含む10から34アミノ酸残基から成り、当該ペプチドプローブはA β オリゴマーに優先的に結合しかつ検出可能な標識で標識され、当該ペプチドプローブは、当該生物学的サンプルの細胞と会合したA β オリゴマーと第一の複合体を形成する前記工程；第一の試験サンプルで第一の複合体のシグナルを検出する工程；細胞を含む対象由来の生物学的サンプル、合成A β オリゴマー、及びペプチドプローブを含む第二の試験サンプルを調製する工程であって、当該ペプチドプローブは、当該生物学的サンプルの細胞と会合したA β オリゴマーと、及び合成A β オリゴマーと第二の複合体を形成する前記工程；第二の試験サンプルで第二の複合体のシグナルを検出する工程を含み、第一の試験サンプルの第一の複合体のシグナルと第二の試験サンプルの第二の複合体のシグナルとの間の相違は、対象のA β オリゴマー装荷と逆相関関係を示す。いくつかの実施態様では、第二の試験サンプルは、生物学的サンプル及び合成A β オリゴマーを合体させ、その後でペプチドプローブを導入することによって調製される。

20

【0006】

さらに開示されるものは赤血球と会合したA β オリゴマーを検出するin vitroの方法であり、前記方法は、赤血球をペプチドプローブと接触させる工程であって、当該ペプチドプローブは、配列番号:1-56及び62-65のいずれか1つと少なくとも70%同一のアミノ酸配列を含む10から34アミノ酸残基から成り、当該ペプチドプローブはA β オリゴマーに優先的に結合しかつ検出可能な標識で標識され、当該ペプチドプローブは赤血球と会合したA β オリゴマーと複合体を形成する前記工程；当該複合体のシグナルを検出する工程を含む。

30

さらに開示されるものは血小板と会合したA β オリゴマーを検出するin vitroの方法であり、前記方法は、血小板をペプチドプローブと接触させる工程であって、当該ペプチドプローブは、配列番号:1-56及び62-65のいずれか1つと少なくとも70%同一のアミノ酸配列を含む10から34アミノ酸残基から成り、当該ペプチドプローブはA β オリゴマーに優先的に結合しかつ検出可能な標識で標識され、当該ペプチドプローブは血小板の表面に存在するA β オリゴマーと複合体を形成する前記工程；及び当該複合体のシグナルを検出する工程を含む。

40

これらの方法のいずれでも、検出可能な標識は蛍光標識であることができ、検出工程は、試験サンプルをフローサイトメトリーに付して複合体の蛍光シグナルを検出する工程を含むことができる。これらの方法のいずれでも、蛍光標識はFITC標識であることができる。

【0007】

検出可能な標識を用いるこれらの方法のいずれでも、検出可能な標識は蛍光標識であることができ、検出工程は複合体の蛍光シグナルの直接検出を含むことができる。検出可能

50

な標識を用いるこれらの方法のいずれでも、検出可能な標識はピレン部分であることができる、検出工程はピレンエキシマーの形成を検出する工程を含むことができる。

これらの方法のいずれでも、ペプチドプローブは配列番号:64 (Pep-11) から成ることができる。

これらの方法のいずれでも、生物学的サンプルは、体液（例えば血液、血漿、CSF又は脳ホモジネート）のサンプルを含むことができる。これらの方法のいずれでも、生物学的サンプルは赤血球（単離赤血球を含む）を含むことができる。これらの方法のいずれでも、生物学的サンプルは血小板（単離血小板を含む）を含むことができる。いくつかの実施態様では、A β オリゴマーは、生物学的サンプルに存在する細胞（例えば赤血球及び/又は血小板）と会合する。いくつかの実施態様では、生物学的サンプルは赤血球及び血小板を含み、当該方法は、赤血球に会合したA β オリゴマー及び血小板に会合したA β オリゴマーを別々に検出する工程を含む。

10

いくつかの実施態様では、形成される及び/又は検出される複合体は、ペプチドプローブ、A β オリゴマー、及び生物学的サンプル由来の赤血球；ペプチドプローブ、A β オリゴマー、及び生物学的サンプル由来の血小板；及び/又はペプチドプローブ、合成A β オリゴマー、及び生物学的サンプル由来の赤血球又は血小板を含む。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1-1】本明細書に記載の方法で有用なペプチドプローブを示す。ハイライトは野生型配列に対するアミノ酸置換及び/又は標識を示す。

20

【図1-2】図1-1 続き

【図1-3】図1-2 続き

【図1-4】図1-3 続き

【図1-5】図1-4 続き

【図1-6】図1-5 続き

【図1-7】図1-6 続き

【図1-8】図1-7 続き

【図1-9】図1-8 続き

【図1-10】図1-9 続き

【図1-11】図1-10 続き

30

【図1-12】図1-11 続き

【図1-13】図1-12 続き

【図2】(i) 正常な対象又はアルツハイマー病の対照動物に由来する全血中の赤血球と会合した内因性A β オリゴマー、及び(ii) 標識ペプチドプローブ及び内因性A β オリゴマーを含む複合体を示す。

【図3】正常な対象又はアルツハイマー病の対象に由来する赤血球を含む全血サンプル及びPEP-11ペプチドプローブを含むサンプルのFITCシグナルを示す。プロファイルは、サンプル中の赤血球と会合した内因性A β オリゴマーの量を反映する。

【図4】(i) 正常な対象又はアルツハイマー病の対照動物に由来する全血中の赤血球と会合した内因性A β オリゴマー、(ii) 合成A β オリゴマーが添加されたサンプル、及び(iii) 標識ペプチドプローブ及び内因性A β オリゴマーを含む複合体、並びに標識ペプチドプローブ及び合成A β オリゴマーを含む複合体を示す。

40

【図5】(i) 正常な対象又はアルツハイマー病の対象に由来する赤血球を含む全血サンプル、及び(ii) 合成A β オリゴマー、及び(iii) PEP-11ペプチドプローブを含むサンプルのFITCシグナルを示す。プロファイルは、サンプル中の赤血球と会合した内因性及び合成A β オリゴマーの総量を反映する。

【図6】図3及び5のFITCシグナルを重ねる。正常な対象については、重ね合わせはシグナルの顕著な相違を示し、サンプル中の赤血球の内因性と最終的（内因性+合成）A β オリゴマー装荷の顕著な相違を反映する。アルツハイマー病の対象については、重ね合わせはほとんどシグナルの相違を示さず、サンプル中の赤血球の内因性と最終的A β オリゴマー

50

装荷の小さな相違を反映する。

【図7】合成A β オリゴマーの非存在下及び存在下における正常なヒト患者の全血及びPEP-11のサンプルのFITCシグナルの重ね合わせを示す。

【図8】ペプチド結合免疫吸着アッセイ (PLISA) の種々の様式を示す。

【図9】ペプチド結合免疫吸着アッセイ (PLISA) 及び酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) について、A β オリゴマー濃度の関数としての蛍光値 (O.D. 吸収) を示し、ペプチドプローブはより高い感度でA β オリゴマー検出に用いることができることを示す。

【図10】本明細書に記載のペプチドプローブをプローブとして用いたときの、緩衝液及び10%脳脊髄液中の異なる濃度のA β モノマー、オリゴマー及び線維について、A β モノマー/オリゴマー及びA β 線維/オリゴマーのシグナル比 (%) を示し、ペプチドプローブは優先的にA β オリゴマーを検出することを明示する。

【図11】PLISAによってA β オリゴマー、A β モノマー又はA β 線維を検出する種々のペプチドプローブ (Pep11-a、Pep11-b及びPep11-ds) の能力を示し、当該3つのペプチドプローブは優先的にA β オリゴマーを検出することを示す。

【図12】脳脊髄液で合成A β オリゴマーを検出する標識ペプチドプローブの能力を示す。

【図13】(i) 以下を含むサンプルのゲル電気泳動バンドを示す：(1) A β 42ビオチン化オリゴマー；(2) ストレプトアビジンを介してビーズに結合したA β 42ビオチン化オリゴマー；(3) ペプチドプローブ；(4) ストレプトアビジンを介してビーズに結合したA β ビオチン化オリゴマーに結合したペプチドプローブ；及び(5) ペプチドプローブ及びストレプトアビジン被覆ビーズ。図はまた(ii) A β 42オリゴマー濃度 (nM) の関数としての蛍光異方性 (milli-r) を示す。この情報は、ペプチドプローブは特異性をもってA β オリゴマーに結合すること、及び結合は用量応答プロファイルを示すことを明示している。

【図14】標識ペプチドプローブでプローブしたCSFサンプルのペプチド蛍光によって決定したとき、正常な対象及び軽度の認知障害を有する対象間 (pは0.012以下) 並びに正常な対象及びアルツハイマー病の疑いがある対象間 (pは0.030以下) を区別する標識ペプチドプローブの能力を示す。

【発明を実施するための形態】

【0009】

1. 定義

本明細書で用いられる、単数形 “a”、“an”、及び “the” は、明瞭に単数のみを示すということが記載されていないかぎり単数及び複数の両方を示す。

一般的に “約” という用語及び範囲の使用 (約という用語によって規定されているか否かにかかわらず) は、包含される数はこの中に示される正確な数に限定されず引用された範囲内の範囲を実質的に指し、ただし本発明の範囲を外れることはないことを意図する。本明細書で用いられる、“約” は当業者には理解され、当該用語が用いられる状況にしたがってある程度変動するであろう。当該用語が用いられる状況を与えられた業者にとって明確でない使用がある場合、“約” は個別の語句のプラス又はマイナス10%までを意味するであろう。

本明細書で用いられる “対象” は人間及び家畜化動物を含む任意の動物を指し、例えば魚類、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ウサギなどである。“対象” にはまた、実験的な研究動物モデル (例えば生物学的及び医学的研究で用いられるトランスジェニック動物) が含まれる。“対象” にはまた研究環境で用いられる動物が含まれ (魚類、虫類、マウス、及び他の小さな哺乳動物を含む)、脊椎動物及び無脊椎動物が含まれる。典型的な対象は、アミロイド形成性疾患に罹患していると疑われるか、アミロイド形成性疾患のリスクを生じる条件下に暴露されていたと疑われるか、アミロイド形成性疾患の遺伝的リスクを有するか (例えばアミロイド形成性疾患に罹患する家族メンバーを有するか又はApoE4対立遺伝子変種を有する個体)、又はアミロイド形成性疾患に関するリスク又は状況を決定することを希望する者でありうる。

【0010】

“生物学的サンプル”という用語は、本明細書では対象に由来するサンプルを指すために用いられる。“生物学的サンプル”は体液を含み、例えば血液、脳脊髄液、組織ホモジネート、尿、唾液、血清及び汗である。“血液”は、全血、血液細胞（赤血球、血小板、及び白血球）及び血漿を含む。“血漿”は血小板富裕血漿及び血小板希薄血漿を含む。“組織ホモジネート”は、脳ホモジネート、他の神経組織ホモジネート、目の組織のホモジネート、血管組織ホモジネート、肺組織ホモジネート、腎組織ホモジネート、心臓組織ホモジネート、肝組織ホモジネート及び他の組織のホモジネートを含む。

“内因性”、“天然のままの”及び“天然に存在する”オリゴマーは、天然に存在する又は天然から得られた供給源（例えば対象に由来する生物学的サンプル）に存在するオリゴマーを指す。内因性オリゴマーは、翻訳後修飾（アセチル化、カルボキシ化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、アシル化、ファルネシル化及び切断が含まれるが、ただしこれらに限定されない）を含むことができる。

10

【0011】

本明細書で用いられる、“A β タンパク質”はA β_{1-40} （A β 40とも称される）及びA β_{1-42} （A β 42とも称される）を含み、それらはまた別のAPPのカルボキシ末端切端形である。例えば以下を参照されたい：Selkoe et al., PNAS USA 85:7341-7345, 1988；Selkoe, Trends Neurosci. 16:403-409, 1993。A β 40及びA β 42は同一アミノ酸配列を有し、A β 42はそのC-末端に2つの追加残基（Ile及びAla）を有する。当該用語はまた天然に存在する変異体の全てを含み、前記には凝集物を形成する傾向の増加を示すことが知られている天然に存在する変異体が含まれる。そのような変異体は当業界で公知であり、例えば以下に開示されたものである：Murakami et al., J. Biol. Chem. 46:46179-46187, 2003（前記は参照によりその全体が本明細書に含まれる）。

20

“A β オリゴマー”という用語は、本明細書では2つ以上のA β モノマーの会合を指すために用いられる。モノマーは、共有結合的に又は非共有結合的に、例えば共有結合、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス相互作用などによって会合することができる。“A β オリゴマー”には、例えばA β ペプチドダイマー、トリマー、テトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、ドデカマー、及びより高次のオリゴマーが含まれる（ただしこれらに限定されない）。A β オリゴマーは、同じ又は異なるアミノ酸配列を有するA β モノマーを含むことができる。典型的には、A β オリゴマーは β シート構造のA β タンパク質を含む。

30

いくつかの実施態様では、A β オリゴマーは“可溶性A β オリゴマー”である。本明細書で用いられる、“可溶性A β オリゴマー”という用語は、25℃から37℃の範囲、例えば約5℃、約30℃、約35℃、及び約37℃の温度の水性及び/又は生理学的条件下で可溶性であることを意味する。例えば、可溶性A β オリゴマーを含む組成物は、人間の目で見ることができる微粒子状物質を全く有さないか、及び/又は、例えばThT染色によって決定される認知可能な量の原線維粒子を含まないであろう。

【0012】

本明細書で用いられる、“高次構造”は、タンパク質又はペプチドの二次元又は三次元構造、例えばアルファヘリックス、ランダムコイル又は β シート二次構造を指す。“高次構造シフト”は、タンパク質の非基本構造をもつ高次構造の任意の変化、例えばN及びC-末端間（又は任意の他の2点間）の距離の変化、更なる高又は低密集折畳み、ある主要二次構造から別の主要二次構造への変化、例えば主としてアルファヘリックス/ランダムコイルから主として β シートへの変化、又は種々の二次構造の相対量における任意の変化、例えば、主要二次構造に変化がないアルファヘリックス/ランダムコイルと β シート二次構造の相対量の変化を意味する。

40

“プローブ”は、A β オリゴマーに結合するペプチド又はペプチド-模擬物を指す。本明細書で用いられる、プローブはA β オリゴマーとの会合に際して高次構造シフトを経ることも経ないこともある。いくつかの実施態様では、プローブは、US 2010/0233095（前記は参照によりその内容の全体が本明細書に含まれる）に記載されているように、ヒトA β タンパク質配列に基づいて高次構造的に動的なペプチドである。便宜上、当該ペプチド及

50

びペプチド-模擬物は、他の環境におけるその有用性を減ずることなく本明細書では“プローブ”と称される。これらのプローブは下記でより詳しく考察される。

【0013】

“ペプチド-模擬物”はまたペプチド模擬物又はペプチド模倣物又はペプトイドとも称され、ペプチドの特性（例えばペプチド構造及びある種の生理化学的特性）を模倣する任意の分子を指す。ペプチド模擬物は、特定のペプチドの生物学的又は化学的特性を模倣するポリマー分子と同様、折り畳み及び/又は二次構造を模倣するものを含む。ペプチド模擬物はアミノ酸骨格を有し、非天然の化学物質又はアミノ酸置換を有しうる。ペプトイドは、ペプチドのアルファ炭素の代わりに骨格のアミド窒素上に側鎖（R-基）を有することができる。これは以下のいくつかの目的の1つ以上に貢献する：（1）ペプトイドはタンパク分解に耐性でありうる；（2）ペプトイドの二次構造形成は水素結合に依存しないことがあるので、それらはペプチドと比較して熱安定性の強化を示しうる；さらに（3）利用可能な多数のペプトイド残基が、アッセイ開発に役立ちうる非常に多様な三次元構造の生成を可能にする。また別には、ペプチド模擬物は、種々の化学的骨格、例えばβ-ペプチド、アントラニルアミドオリゴマー、オリゴ(m-フェニレンエチレン)、オリゴウレア、オリゴピロリノン、アザチドとN-置換グリシンのオリゴマーを有することができる。ペプチド模擬物は、種々の化学的特性（例えばプロテアーゼ耐性）を有することができ、一方、ペプチドの特徴（例えばペプチド折り畳み及びペプチド-ペプチド相互作用（例えば水素結合を介する相互作用など））を維持する。任意の適切なペプチド模擬物を本発明で用いることができ、前記には下記文献に記載されたように設計及び/又は構築されたものが含まれる：Chongsiriwatana, N. P, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2008, 105, (8), 2794-9; Kirshenbaum, K., et al. Current Opinion in Structural Biology 1999, 9, (4), 530-535; Lee, B. C., et al., Journal of the American Chemical Society 2005, 127, (31), 10999-11009（前記の各々が参照によりその全体が本明細書に含まれる）。

【0014】

2つのペプチド間の類似性は、あるペプチドを第二のペプチドの配列と比較することによって決定される。あるペプチドのアミノ酸配列が同一又は保存的アミノ酸置換である場合、それは第二のペプチドの当該対応するアミノ酸と類似する。保存的置換には以下に記載されたものを含む：Dayhoff, M.O., ed., The Atlas of Protein Sequence and Structure 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., 1978; 及びArgos, P., 1989, EMBO J. 8:779-785。例えば、以下のグループの1つに属するアミノ酸は保存的变化又は置換を表す：

-Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr;
 -Cys, Ser, Tyr, Thr;
 -Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe;
 -Lys, Arg, His;
 -Phe, Tyr, Trp, His; 及び
 -Asp, Glu。

【0015】

“相同性”、“～のホモログ”、“相同な”、“同一性”又は“類似性”は2つのペプチド間の配列類似性を指し、同一性はより厳格な比較である。相同性及び同一性はそれぞれ、比較の目的のためにアラインメントされうる各配列の位置を比較することによって決定できる。比較される配列の位置が同じアミノ酸によって占められるとき、当該分子は当該位置で同一である。アミノ酸配列の同一度は、当該アミノ酸配列によって共有される位置の同一アミノ酸の数の関数である。アミノ酸配列の相同性又は類似度は、当該アミノ酸配列によって共有される位置のすなわち構造的に関連するアミノ酸の数の関数である。“無関係の”又は“非相同”配列は本明細書に記載の配列の1つと10%以下の同一性を共有する。関連する配列は、10%を超える配列同一性、例えば少なくとも約15%の配列同一性、少なくとも約20%の配列同一性、少なくとも約30%の配列同一性、少なくとも約40%の配列同一性、少なくとも約50%の配列同一性、少なくとも約60%の配列同一性、少なくとも約70

10

20

30

40

50

%の配列同一性、少なくとも約80%の配列同一性、少なくとも約90%の配列同一性、少なくとも約95%の配列同一性、又は少なくとも約99%の配列同一性を共有する。

【0016】

“パーセント同一性”という用語は2つのペプチド間のアミノ酸配列同一性を指す。同一性は、比較の目的のためにアラインメントされる配列の各々の位置を比較することによって決定できる。ある比較される配列の同等の位置が、他方の配列の同じ位置で同じアミノ酸によって占められるとき、当該分子は当該位置で同一であり、同等の部位が同じ又は類似のアミノ酸残基（例えば立体的及び/又は電子的性質で類似する）によって占められるとき、当該分子は当該位置で相同（類似）であると称される。相同性、類似性又は同一性のパーセントとしての表現は、比較される配列によって共有される位置の同一又は類似アミノ酸の数の関数を指す。多様なアラインメントアルゴリズム及び/又はプログラム（FASTA、BLAST又はENTREZを含む）を用いることができる。FASTA及びBLASTはGCG配列分析パッケージ（University of Wisconsin, Madison, Wis.）の部分として利用可能であり、例えば初期設定値環境で用いることができる。ENTREZは、米国立生物工学情報センター、国立医学図書館（NIH, Bethesda, Md.）を介して利用できる。ある実施態様では、2つの配列のパーセント同一性は、ギャップ重1（例えば各アミノ酸ギャップは、それがあたかも2つの配列間の単一アミノ酸のミスマッチであるかのように加重される）でGCGプログラムによって決定できる。配列同一性を決定する他の技術も当業界で周知であり、報告されている。

10

【0017】

2. Aβオリゴマーの検出方法

本明細書に記載されるものは、対象由来のサンプルでアルツハイマー病と関係するAβオリゴマーを検出する方法である。当該方法論はフローサイトメトリーを用い、及び/又は生物学的サンプルに存在するか又は生物学的サンプルから得られる細胞と会合したAβオリゴマーを検出する。当該方法は、さらに下記で極めて詳細に記載されるように、Aβタンパク質のオリゴマー形（例えば可溶性Aβオリゴマー）に優先的に結合するペプチドプローブを用いる。

20

米国特許7,166,471号及び米国特許出願公開US 2006/0286672号、US 2005/0026165、US 2008/0171341、US 2006/0057671、US 2008/0095706、及びUS 2010/0233095は、例えば折畳み異常タンパク質、もっぱらβシート二次構造を有する標的タンパク質、及び自己凝集の特異的状态の標的タンパク質の検出に有用なペプチドプローブを記載する。これらの参照文献に記載されるペプチドプローブを本明細書に記載の方法で用いることができる。したがって、これら特許文書の各々の完全な内容は参照によりその全体が本明細書に含まれる。

30

具体的実施態様では、ペプチドプローブは10から34アミノ酸残基から成り、配列番号:1-56及び62-65の任意の1つと少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を含み、優先的にAβオリゴマーに結合し、検出可能な標識で標識される。さらに具体的実施態様では、ペプチドプローブは配列番号:64から成る。

【0018】

(i) フローサイトメトリー

40

フローサイトメトリーは、検出器を通して流動状の生物学的サンプル中の細胞又は粒子を通過させ、当該細胞又は粒子の検出を許容する液体系検出技術である。いったん検出されたら、細胞又は粒子は、サイズ又は当該細胞と会合した任意のマーカ（例えば蛍光標識）により区分けされる。

本発明の前には、フローサイトメトリーを用いてペプチドプローブとAβオリゴマーとの複合体を検出できるとは考えられなかった。なぜならば、複合体は検出には小さすぎるからであった。フローサイトメトリーを用いてAβタンパク質を検出する場合には、複合体は抗体及び/又は固体ビーズのプラットフォームを含んでいた（前記ははるかに大きな複合体である）。例えば以下を参照されたい：Santos et al., Journal of Alzheimer's Disease, 11:117-125, 2007；EP 1882944；Santos et al., Journal of Alzheimer's D

50

isease, 14:127-131, 2008。しかしながら、驚くべきことに、フローサイトメトリーを本明細書に記載の方法で用いることができることが見出された。

例示的な方法は、生物学的サンプル及び本明細書に記載のペプチドプローブを含む試験サンプルを調製する工程（当該ペプチドプローブは検出可能な標識で標識され、生物学的サンプルに存在する任意のA β オリゴマーと複合体を形成する）、及び当該試験サンプルをフローサイトメトリーに付して任意のそのような複合体を検出する工程を含む。そのような方法にしたがえば、複合体のシグナルは生物学的サンプルのA β オリゴマーの存在及び量と正の相関関係を示す。

上記に記したように、生物学的サンプルは、体液（例えば全血、脳脊髄液（CSF）、及び/又は組織ホモジネート（例えば脳ホモジネート）を含むことができる。いくつかの実施態様では、サンプルは血漿（血小板富裕又は血小板希薄血漿）を含む。いくつかの実施態様では、サンプルは赤血球を含み、及び/又は単離された赤血球を含むサンプルでありうる。いくつかの実施態様では、サンプルは血小板を含み、及び/又は単離された血小板を含むサンプルでありうる。いくつかの実施態様では、サンプルは赤血球及び血小板を含む。いくつかの実施態様では、サンプルは細胞を含まない。

いくつかの実施態様では、ペプチドプローブの標識は蛍光標識（例えばFITC標識）である。

いくつかの実施態様では、A β オリゴマーは、生物学的サンプルに存在する細胞と、例えば、下記でより詳細に考察するように生物学的サンプルに存在する赤血球又は血小板と会合する。いくつかの実施態様では、複合体は、ペプチドプローブ、A β オリゴマー及び生物学的サンプル由来の細胞を含む。

【0019】

(ii) 細胞会合A β オリゴマー

如何なる理論にも拘束されないが、ある種の細胞（例えば赤血球、血小板及び/又は白血球）はA β タンパク質のin vivoの輸送に関与すると考えられており、さらに内因性A β オリゴマーはそのような細胞と会合しうると考えられている。さらにまた、内因性A β オリゴマーは、組織細胞、例えば神経学的組織細胞（例えば脳組織細胞）と会合することができる。例えば、A β オリゴマーは、例えば細胞表面で、細胞膜で、又は細胞内で（共有結合的に又は他の態様で）結合することによってそのような細胞と会合することができる。

本発明は、細胞（例えば赤血球、血小板、白血球及び/又は組織細胞）と会合したA β オリゴマーをin vitroで検出する方法を提供する。いくつかの実施態様では、当該方法は、A β オリゴマーに優先的に結合しかつ検出可能な標識で標識されるペプチドプローブと細胞をex vivoで接触させ、そのようにして当該ペプチドが細胞と会合したA β オリゴマーと複合体を形成する工程、及び当該複合体のシグナルを検出する工程を含む。

ペプチドプローブの標識は任意の検出可能な標識であることができ、当該シグナルは任意の適切な検出方法によって検出することができる。前記検出方法はフローサイトメトリー、例えば蛍光顕微鏡法を用いる直接検出、蛍光活性化細胞区分け及び蛍光分光法を含む。いくつかの実施態様では標識は蛍光標識であるが、他の実施態様では、標識は別の検出可能標識（例えばエキシマー形成ピレン部分）又は任意の他の適切な検出可能標識（例えば下記でより詳しく考察される標識）である。

具体的実施態様では、サンプル（例えば対象由来の生物学的サンプル）は多数の細胞タイプ（例えば赤血球及び血小板）を含み、フローサイトメトリーに付され、フローサイトメトリーは、上記に記したように各細胞タイプとともに形成された複合体を分離する。例えば、いくつかの実施態様では、フローサイトメトリーは、赤血球と会合した複合体のシグナル及び血小板と会合した複合体のシグナルを、例えばそのような複合体の異なるサイズを基準にして別々に検出する。

【0020】

(iii) A β オリゴマー装荷

いくつかの実施態様では、当該方法は対象のA β オリゴマー装荷を決定する工程を含む

。上記に記したように（ただしいずれの理論にも拘束されないが）、ある種の細胞（例えば赤血球、血小板、及び/又は白血球）は、 $A\beta$ タンパク質の *in vivo* 輸送に必要とされ、そのような細胞は内因性 $A\beta$ オリゴマーが装荷されうると考えられる。さらにまた、内因性 $A\beta$ オリゴマーは、組織細胞（例えば神経学的細胞（例えば脳組織細胞））と会合することができる。そのような細胞の $A\beta$ オリゴマー装荷度を決定することによって、対象におけるアルツハイマー病のリスク、存在、進行、重篤度及び/又は予後を査定できると考えられ、より高い装荷は一般的にはより重度の疾患の進行を示唆する。

いくつかの実施態様では、 $A\beta$ オリゴマー装荷は対象から得られた生物学的サンプルに存在する細胞と会合した $A\beta$ オリゴマーを検出することによって決定される。前記は、例えば、細胞を含む対象由来の生物学的サンプル、及び検出可能な標識で標識されかつ当該生物学的サンプルの細胞と会合した $A\beta$ オリゴマーと第一の複合体を形成する本明細書に記載のペプチドプローブを含む第一の試験サンプルを調製する工程；第一の試験サンプル中の第一の複合体のシグナルを検出する工程；細胞を含む当該対象由来の生物学的サンプル、合成 $A\beta$ オリゴマー、及びペプチドプローブ（当該ペプチドプローブは当該生物学的サンプルの細胞と会合した $A\beta$ オリゴマーと、及び合成 $A\beta$ オリゴマーと第二の複合体を形成する）；及び第二の試験サンプル中の第二の複合体のシグナルを検出する工程によって決定される。

【0021】

そのような方法にしたがえば、第一の試験サンプルの第一の複合体のシグナルと第二の試験サンプルの第二の複合体のシグナルとの間の相違は、当該対象の $A\beta$ オリゴマー装荷と負の相関関係を示す。すなわち、第二の試験サンプルが第一のものより有意に強いシグナルを示すならば、それは、当該細胞は内因性 $A\beta$ オリゴマーによって完全には装荷されていないが合成 $A\beta$ オリゴマーによる更なる装荷に対して感受性を有し、その結果より強いシグナルを生じたことを示している。他方、第二の試験サンプルが第一のものより強いシグナルを示さないならば、それは、当該細胞は内因性 $A\beta$ オリゴマーによって装荷されており、したがって合成 $A\beta$ オリゴマーによる更なる装荷に対してさほど感受性をもたないことを示している。

これらの方法にしたがえば、内因性 $A\beta$ オリゴマーによって装荷され得る細胞を含む任意のサンプルを用いることができる。前記細胞は、例えば赤血球、血小板、白血球、又は組織細胞（例えば神経学的組織又は脳に由来する細胞）である。

いくつかの実施態様では、第二の試験サンプルは、生物学的サンプル及び合成 $A\beta$ オリゴマーを合わせ、続いて標識したペプチドプローブを添加することによって調製される。そのような実施態様は、当該ペプチドプローブが添加される前に、合成 $A\beta$ オリゴマーが生物学的サンプルの細胞と会合することを許容する。

ペプチドプローブの標識は任意の検出可能な標識であることができ、シグナルは任意の適切な検出方法によって検出できる。検出方法には、フローサイトメトリー、例えば蛍光顕微鏡法を用いる直接検出、蛍光活性化細胞区分け及び蛍光分光法を含む。いくつかの実施態様では標識は蛍光標識であるが、他の実施態様では、標識は別の検出可能標識（例えばエキシマー形成ピレン部分）又は任意の他の適切な検出可能標識（例えば下記でより詳しく考察される標識）である。

いくつかの実施態様では、異なる細胞タイプと会合した $A\beta$ オリゴマーに対応する異なるシグナルが、例えば上記で考察されたフローサイトメトリーによって検出される。

【0022】

(iv) 追加の検出方法

上記に記したように、いくつかの実施態様では、フローサイトメトリー以外の検出方法が本明細書に記載の方法で用いられる。いくつかの実施態様では、免疫アッセイと類似するが、抗体の代わりに本明細書に記載のペプチドプローブが生物学的サンプルの $A\beta$ オリゴマーの検出に用いられる。そのような方法はペプチド結合免疫吸着アッセイ（すなわち“PLISA”）と称される。具体的実施態様では、PLISAはサンドイッチアッセイ又は競合アッセイでありうる。いくつかの実施態様では、PLISAは固相を用いる。前記は、例えば、

蛍光検出装置（例えば蛍光プレートリーダー）で用いることができるプレート、又は捕捉抗体若しくは捕捉ペプチドを付着させたビーズである。そのような方法は、以下に記載されている：W02012/149145；W02011/149917；US2012/0282169；US2010/0233095；US2008/0095706；US8,372,593；及びW02006/031644（前記の内容は参照によりその全体が本明細書に含まれる）。

いくつかの実施態様では、検出方法を組み合わせて用いA β オリゴマーが検出される。具体的実施態様では、フローサイトメトリー及び非フローサイトメトリー方法を組み合わせて用いA β オリゴマーが検出される。

【0023】

3. 合成A β オリゴマー

上記に記したように、本明細書に記載の方法のいくつかは合成A β オリゴマーを用いる。合成A β オリゴマーには、W02011/149917（その内容は参照によりその全体が本明細書に含まれる）に記載された安定化合成A β オリゴマーが含まれる。合成A β オリゴマーは、A β モノマーの共有結合及び/又は非共有結合複合体を含むことができ、さらに数個から数百個のモノマーユニットを含むことがある。いくつかの実施態様では、合成A β オリゴマーは、約5から50アミノ酸、約10から40、約15-30、又は約20アミノ酸（約5から約40、約5から約30、約5から約20、約5から約15、約5から約10、約10から約50、約10から約40、約10から約30、約10から約20、約20から約50、約20から約40、約20から約30、約30から約50、約30から約40、約40から約50アミノ酸を含む）を含む。当該モノマーは1つ以上のA β 3-42、A β 37、A β 38、A β 39、A β 40及びA β 42を含むことができる。

【0024】

4. ペプチドプローブ

上記に記したように、本明細書に記載のペプチドプローブはA β オリゴマーに優先的に結合し、したがってA β オリゴマーの検出に有用である。いくつかの実施態様では、ペプチドプローブは、A β モノマー及びより高次のA β タンパク質凝集物（例えば不溶性オリゴマー、不溶性不定形自己凝集物、前原線維又は原線維）と比較して優先的に可溶性A β オリゴマーに結合する。

上記に記したように、米国特許7,166,471号及び米国特許出願公開US2006/0286672、US2005/0026165、US2008/0171341、US2006/0057671、US2008/0095706、及びUS2010/0233095は、本明細書に記載の方法で用いることができるペプチドプローブを記載している。具体的実施態様では、ペプチドプローブは、配列番号:1-56及び62-65のいずれか1つと少なくとも70%同一のアミノ酸配列を含む10から34アミノ酸残基から成り、A β オリゴマーに優先的に結合し、さらに検出可能な標識で標識される。さらに別の具体的実施態様では、ペプチドプローブは配列番号:64から成る。

いくつかの実施態様では、ペプチドプローブはA β タンパク質の完全長配列、例えばA β 40又はA β 42を含まない。いくつかの実施態様では、ペプチドプローブは、約10から約34アミノ酸、約10から約30アミノ酸、約10から約25アミノ酸、約10から約20アミノ酸、約10から約15アミノ酸、約15から約34アミノ酸、約15から約30アミノ酸、約15から約25アミノ酸、約15から約20アミノ酸、約20から約34アミノ酸、約20から約30アミノ酸、約20から約25アミノ酸、又は約10から約34の任意の他の範囲のアミノ酸から成る。さらに別の実施態様では、当該プローブは、約10アミノ酸、約15アミノ酸、約20アミノ酸、約25アミノ酸、約30アミノ酸、約34アミノ酸、又は約10から約34の間の任意の他の数のアミノ酸から成る。異なる長さのプローブは、異なる度合いのA β オリゴマーとの相互作用及び結合を示すことができ、当業者は本明細書の教示によって適切な長さを選択できる。

【0025】

プローブは、A β タンパク質のアミノ酸の連続する最小数を含むことができ、例えば、A β タンパク質の少なくとも約5、少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約16、少なくとも約17、少なくとも約18、少なくとも約19、少なくとも約20、少なくとも約21、少なくとも約22、少なくとも約23、少なく

10

20

30

40

50

とも約24、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約34の連続するアミノ酸、又はこれらの数の間の任意の範囲、例えばA β タンパク質配列の約10から約25の連続するアミノ酸を含むことができる。

プローブは、A β タンパク質のアミノ酸の連続する最大数を含むことができ、例えば、A β タンパク質配列の約5まで、約6まで、約7まで、約8まで、約9まで、約10まで、約11まで、約12まで、約13まで、約14まで、約15まで、約16まで、約17まで、約18まで、約19まで、約20まで、約21まで、約22まで、約23まで、約24まで、約25まで、約30まで、約34までの連続するアミノ酸、又はこれらの数の間の任意の範囲、例えばA β タンパク質配列の約10から約25の連続するアミノ酸を含むことができる。

いくつかの実施態様では、プローブは、A β オリゴマーとの会合に際して高次構造シフトを経ることも経ないこともある。いくつかの実施態様では、ペプチドプローブとA β オリゴマーとの会合は、生じる生じないにかかわらずいずれの高次構造シフトとも無関係に、例えば標的オリゴマーと会合したプローブの直接検出によって、例えば標的オリゴマーと会合したプローブの検出可能な標識の検出によって検出される。いくつかの実施態様では、会合は一時的で、例えばプローブとA β オリゴマーとの初期の会合及びプローブのA β オリゴマーからの後期の解離である。検出可能な標識は下記で大いに詳しく記載される。

【0026】

いくつかの実施態様では、ペプチドプローブは、高次構造シフト（例えば α ヘリックス/ランダムコイル高次構造から β シート高次構造へのシフト）を経るA β タンパク質のアミノ酸配列を含むか、又はそのような配列の変種を含む。例えば、A β タンパク質のアミノ酸16-35は β シート形成領域を含むことが知られている。したがって、プローブは、A β タンパク質のアミノ酸16-35若しくは17-35、又はその変種であるアミノ酸配列を含むことができる。プローブはまた、A β タンパク質のアミノ酸3-35若しくは5-42、又はその変種であるアミノ酸配列を含むことができる。したがって、ペプチドプローブのアミノ酸配列は、既存の配列及び高次構造情報に基づいてA β タンパク質配列から設計しうるか、或いはまた経験的に容易に決定しうる。

いくつかの実施態様では、ペプチドプローブは、主としてランダムコイル/アルファヘリックスの高次構造及び主として β シートの高次構造の両方を採用することができ、さらに結合に際して主として β シートの高次構造を採用して主として β シートの高次構造を示すオリゴマーを標的とする。いくつかの実施態様では、ペプチドプローブは、主として α ヘリックス/ランダムコイルの高次構造で提供され、主として β シート高次構造のA β オリゴマーとの接触、結合、会合及び/又は相互作用に際して主として β シートの高次構造への高次構造シフトを経る。他の実施態様では、ペプチドプローブは、より濃縮状態、より拡散状態になることによって、又は任意の異なる高次構造を採用することによって高次構造をシフトさせる。いくつかの実施態様では、ペプチドプローブは、A β オリゴマーの高次構造をより厳密に採用する。プローブは、生理学的に許容できる任意の溶液中で提供されうる。例えば、プローブはトリフルオロ酢酸塩として調製でき、有機溶媒（例えば100%ヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）又は50%アセトニトリル（CAN））に再懸濁できる。

【0027】

いくつかの実施態様では、ペプチドプローブは、A β タンパク質配列の対応する領域に基づく変種配列を含む。変種配列は、A β タンパク質配列に関して1つ以上のアミノ酸付加、置換又は欠失を含むことができ、例えば当該変種配列（又は全体としてペプチドプローブ）は、A β タンパク質配列と少なくとも60%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施態様では、ペプチドプローブは、参照配列と比較して1つ以上の付加アミノ酸をそのいずれかの末端又は両端に有することができる。付加、置換及び欠失はまた、参照配列の内部部分に、又は内部及び末端に実施できる。いくつかの実施態様では、ペプチドプローブはさらにC-末端にリジン残基の付加又は別の標識を含み、精製及び/又は標識を容易にすることができる。

参照配列は、A β タンパク質の連続する最小数のアミノ酸を含むことができ、例えば、A β タンパク質配列の少なくとも約5、少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約16、少なくとも約17、少なくとも約18、少なくとも約19、少なくとも約20、少なくとも約21、少なくとも約22、少なくとも約23、少なくとも約24、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約35の連続するアミノ酸、又はこれらの数の間の任意の範囲、例えばA β タンパク質配列の約10から約25の連続するアミノ酸を含むことができる。

参照配列は、A β タンパク質のアミノ酸の連続する最大数を含むことができ、例えば、A β タンパク質配列の約5まで、約6まで、約7まで、約8まで、約9まで、約10まで、約11ま
10
で、約12まで、約13まで、約14まで、約15まで、約16まで、約17まで、約18まで、約19ま
で、約20まで、約21まで、約22まで、約23まで、約24まで、約25まで、約30まで、約34ま
での連続するアミノ酸、又はこれらの数の間の任意の範囲、例えばA β タンパク質配列の
約10から約25の連続するアミノ酸を含むことができる。

【0028】

上記に開示されるように、変種配列は場合によって、 β シート高次構造を示す標的配列との結合に際してより高次又は低次の高次構造も採用することができる。いくつかの実施態様では、例えば、標的タンパク質はA β タンパク質であり、変種配列はG29H、G29R、G29K、及びG33Eから成る群から選択される1つ以上の置換を含む。加えて或いはまた別に、変種配列の β シート構造は参照配列のそれよりも熱力学的強度が低いことがある。具体的実施態様では、変種配列はI32S、F19S、S26D、H29D、I31D、L34D、及びL34Pから成る群から
20
選択される1つ以上の置換を含む。

加えて或いはまた別に、変種配列は、参照配列よりも水溶液中での増加した親水性及び/又は可溶性を有することができる。具体的実施態様では、変種配列は、グルタミン酸残基及び/又はd-アルギニン残基を導入する1つ以上のアミノ酸付加又は置換を含む。加えて或いはまた別に、変種配列は、親水性部分（例えば可溶性ポリエチレングリコール部分）と結合させることができる。

いくつかの実施態様では、変種配列は、グルタミン酸による少なくとも1つの残基の置換を含む。いくつかの実施態様では、変種配列は、ヒスチジン残基による少なくとも1つの残基の置換を含む。いくつかの実施態様では、変種配列は以下から成る群から選択される1つ以上の置換を含む：セリン残基によるイソロイシン残基の置換；プロリン残基、グリシン残基、グルタミン残基又はリジン残基のいずれかによるグルタミン酸残基の置換；セリン残基によるフェニルアラニン残基の置換；プロリン残基によるロイシン残基の置換；グリシン残基によるアラニン残基の置換；及びアスパラギン残基によるアスパラギン酸残基の置換。
30

【0029】

いくつかの実施態様では、本明細書に記載のペプチドプローブはA β タンパク質オリゴマーと結合し、そのような結合に際して高次構造シフトを経る。高次構造シフトは、プローブのN-末端とC-末端との間（又は他の任意の2点間）の距離の変化、更なる高又は低密集折畳み、ある主要二次構造から別の主要二次構造への変化、又は種々の二次構造の相対量における任意の変化、又はプローブの任意の標識間における任意の変化を含むことができる。いくつかの実施態様では、当該プローブは、US2010/0233095に記載されているように、ヒトA β 配列に基づいて高次構造的に動的なペプチドである。
40

本明細書に記載のプローブはいずれもD-又はL-鏡像体型として提供されうる。加えて或いはまた別に、本明細書に記載のアミノ酸配列と逆の順序のアミノ酸配列を有するプローブが提供されうる。例えば、ペプチドプローブがアミノ酸配列A-B-C-Dを有すると記載される場合、逆の配列はD-C-B-Aであろう。いくつかの実施態様では、プローブはD-又はL-鏡像体型、及び/又は逆の順序で提供される。

本明細書に記載のプローブはいずれも、C-末端及びN-末端の一方又は両方に約1から約5アミノ酸のサイズ範囲の小さな疎水性ペプチドの末端キャップを有することができる。い
50

いくつかの実施態様では、C-末端及びN-末端の一方又は両方が、例えば標識を容易にするためにリジン残基を有する。加えて或いはまた別に、C-末端及びN-末端の一方又は両方がシステイン残基を有する。加えて或いはまた別に、本明細書に記載のプロープはいずれも、酸化に耐性の残基（例えばアラニン残基）によるメチオニン残基の置換によって改変できる。加えて或いはまた別に、本明細書に記載のプロープはいずれも、参照配列の少なくとも3つの連続する残基のアラニン残基による置換によって改変できる。

いくつかの実施態様では、ペプチドプロープは、2つのピレン標識で（1つはN-末端アミン及び他方はC-末端リジン残基の側鎖において）標識される。具体的実施態様では、ピレン標識はPBAである。いくつかの実施態様では、ペプチドプロープは、カルボキシル基の代わりにC-末端アミドを含む。

10

【0030】

上述の実施態様のいずれかにしたがえば、ペプチドプロープは、ビオチン部分に例えばペプチドリinkerを介して結合される。具体的実施態様では、ペプチドリinkerは、可撓性リンカー、ヘリックスリンカー、トロンビンサイトリンカー及び屈折リンカーから成る群から選択される。他の実施態様では、ペプチドプロープは、内部リジン残基の側鎖を介してビオチン部分に結合される。他の適切なペプチドリinkerは当業界で記載され、例えば以下を参照されたい：US6,448,087；Wurth et al., J. Mol. Biol. 319:1279-1290, 2002；及びKim et al., J. Biol. Chem. 280:35059-35076, 2005（前記は参照によりその全体が本明細書に含まれる）。いくつかの実施態様では、適切なリンカーは長さが約8-12アミノ酸でありうる。さらに別の実施態様では、リンカーの約75%を超えるアミノ酸残基

20

がセリン、グリシン及びアラニン残基から選択される。

例えば、ビオチン化は、AD310（配列番号:38）によって示されるようにC-末端のヘリックスリンカー（例えばEAAAK（配列番号:57））を介して達成できる。一般的には、ヘリックスリンカーはアルファヘリックスを形成する残基（例えばアラニン）を含む。また別には、ビオチン化は、AD313（配列番号:39）によって示されるように、リジン残基（内部又は末端リジン残基を含む）の側鎖を介して達成できる。また別には、ビオチン化は、AD314（配列番号:40）によって示されるように、C-末端の可撓性リンカー（例えばGSSGSSK（配列番号:58））を介して達成できる。一般的には、可撓性リンカーは、1つ以上のグリシン及び/又はセリン残基、又はそれらのφ及びψ角の周りを自由に回転できる他の残基を含む。また別に、ビオチン化は、AD317（配列番号:4）によって示されるように、C-末端

30

【0031】

いくつかの実施態様では、プロープは配列番号:1-56から又は配列番号:1-56及び62-65から選択される。いくつかの具体的実施態様では、プロープは配列番号:2、22、23、41、56、62、63、64又は65から成る群から選択される。いくつかの実施態様では、プロープ

40

はPEP-10、PEP-11及びPEP-12である。Aβタンパク質を標的とするUS2008/0095706に記載のプロープ、及びUS2010/0233095にしたがって設計されるプロープを本明細書の記載のように用いることができる（これらの出願の内容は参照によりその全体が本明細書に含まれる）。

具体的実施態様では、プロープは、2つの点変異（例えば配列番号:2、配列番号:62）；2つのd-アルギニン残基（r）の付加（例えば配列番号:22、配列番号:56、配列番号:62、配列番号:64）；本明細書に記載の変異の組み合わせ（例えば配列番号:23、配列番号:62）；天然に存在する“イタリアン”変異体（配列番号:56）；又はリンカー及びビオチンの付加（例えば配列番号:41）から成りうる。

いくつかの実施態様では、1つ以上のアミノ酸付加、置換又は欠失は、2つの残基（例え

50

ばグルタミン酸残基とヒスチジン残基、グルタミン酸残基とアルギニン残基、及び/又はグルタミン酸残基とリジン残基)の間に塩架橋を導入できる。さらにまた、アミノ酸付加、置換又は欠失は、ペプチドプローブにA β 結合モチーフ(例えばGXXEGモチーフ(配列番号:25))を導入することができる。

本明細書に記載の原則にしたがって設計される例示的ペプチドプローブを図1に示す。図の配列で影付けによって示されるように、ペプチド配列の大半はA β ペプチドのアミノ酸16-35を土台にし、それはA β ペプチドの β シート形成領域であり(他のものはA β ペプチドのより長大な部分を土台にする)、標識を容易にするためにC-末端にリジン残基を有する。他のペプチド配列はA β ペプチドのアミノ酸17-35を土台にする。配列変種の区分が表に示される(例えば安定性の改善、塩架橋の提供、可溶性の増加、アルファ-ヘリックス形成の促進、 β シート構造の脱安定化及びA β 結合モチーフなどのために改変される)。ペプチドプローブの標識の選択肢(種々の標識部位及び標識ペアを含む)もまた示される。

【0032】

以下の略語が図1で用いられる:

“PBA”=ピレン酪酸

“r”=d-アルギニン

“Dabcyl”=4-(4-ジメチルアミノフェニル)ジアゼニル安息香酸

“EDANS”=5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸

“FAM”=5(6)カルボキシフルオレセイン

“Dansyl”=5-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホニル

“FITC”=フルオレセインイソチオシアネート

“Ahx”=アミノヘキシル

上記の特色物は本明細書に記載のペプチドプローブに関して選択自由である。これらの特色物を有する又は有しないプローブが図1に示されているが、図に列挙されたプローブのいずれも及び本明細書に記載のプローブのいずれも、これらの特色物の1つ以上を有することができる、又は欠くことができる。

プローブはまた別には、本明細書に記載のペプチドプローブのいずれかのペプチド模擬物(“ペプトイド”)でありうる。いくつかの実施態様では、プローブは、天然のペプチド骨格を有するが非天然アミノ酸又は化学物部分を有するペプチド模擬物である。他の実施態様では、プローブは、非ペプチド骨格を有し化学的骨格(例えばポリマー骨格)を含むペプチド模擬物である。いくつかの実施態様では、ペプチド模擬物は、対応するペプチドを超える増大安定性を示す。

追加のプローブを設計し、本方法での使用について試験することができる。略記すれば、ペプチド及びペプチド模擬物をコンピュータで設計し、疎水性トポロジー及び野生型A β ペプチド及び/又は上記記載の所望の特徴をもつプローブとの分子内ペア接触を厳密に適合させることができる。そのようなペプチド及びペプチド模擬物を設計するアルゴリズムは当業界で公知である。例えば以下を参照されたい: Mobley, D. L., et al., Structure 2009, 17, (4), 489-98; Fennell, C. J., et al., J Phys Chem B 2009; Voelz, V. A., et al., PLoS Comput Biol 2009, 5, (2), e1000281; Shell, M. S., et al., Biophys J 2009, 96, (3), 917-24; Mobley, D. L., et al., J Chem Theory Comput 2007, 3, (4), 1231-1235; Wu, G. A., et al., Structure 2008, 16, (8), 1257-66; Chorny, I., et al., J Phys Chem B 2005, 109, (50), 24056-60。

【0033】

5. 標識

上記に記したように、本明細書に開示のペプチドプローブは1つ以上の検出可能な標識を含むことができる。例えば、ペプチドプローブは、共有結合又は非共有結合によりリンカーとともに又はリンカーなしに標識に結合又は融合させることができる。上記に記したように、いくつかの実施態様では、標識は、プローブの高次構造の影響を受けることなく及び/又はいずれの高次構造シフト又はA β オリゴマーとの会合の影響も受けることなく検

出可能である。

いくつかの実施態様では、標識は、A β オリゴマーと会合したプローブの直接検出を許容するために選択される。したがって、例えば、1つ以上の標識は、直接検出（例えば蛍光標識、放射能標識など）によって検出されうる。いくつかの実施態様では、標識は蛍光標識（例えばFITC）である。他の実施態様では、標識はピレン（例えばピレンエキシマー）である。そのような会合はA β オリゴマーとの現在のプローブ会合又はA β オリゴマーとの過去のプローブ会合でありうる。追加の標識は下記に記載される。

いくつかの実施態様では、ペプチドプローブは、N-末端、C-末端、両末端、又はプローブの高次構造又は高次構造遷移の影響を受けないで検出できる1つ以上の位置（側鎖を含む）で検出可能標識により標識できる。

10

いくつかの実施態様では、ペプチドプローブは、N-末端、C-末端、両末端、又は当該ペプチドが標的タンパク質と会合するか又は標的タンパク質との結合に際して β シート高次構造をとるか若しくは高次構造変化を経るときにシグナルを発生する1つ以上の位置で検出可能標識により標識できる。したがって例えば、標識部位は以下から選択できる：(i) N-末端及びC-末端；(ii) N-末端及び、C-末端以外の別の部位；(iii) C-末端及び、N-末端以外の別の部位；(iv) N-末端及びC-末端以外の2つの部位。

【0034】

ペプチドプローブは2つ以上の標識で標識でき、前記ペプチドプローブが標的タンパク質と結合したときのペプチドプローブ上の2つ以上の標識間の距離は、ペプチドプローブが標的タンパク質と結合していないときの距離と相違する。ペプチドプローブは、加えて或いはまた別に、エキシマーペア、FRETペア及びフルオロフォア/クエンチャーペアから選択される検出可能な標識で標識できる。ペプチドプローブがエキシマーペア（例えばピレンエキシマーペア）で標識される場合、当該ペプチドプローブが β シート高次構造を示すとき前記はエキシマーシグナルを放射することができる。ペプチドプローブがFRETペア（例えばDACIA-I/NBD、マリナブルー/NBD、Dansyl/Trp及びEDANS/FAM）で標識される場合、当該ペプチドプローブが β シート高次構造を示すとき前記は蛍光共鳴移動（FRET）シグナルを放射することができる。ペプチドプローブがフルオロフォア/クエンチャーペア（例えばピレン/Dabcyl、EDANS/Dabcyl及びFAM/Dabcyl）で標識される場合、当該ペプチドプローブが β シート高次構造を示すときフルオロフォアシグナルは消光されうる。

20

いくつかの実施態様では、標識及び標識部位は、プローブの高次構造に基づいて標識が相互反応するように、又は相互反応しないように選択される。例えば、プローブが非会合高次構造にあるときには標識は相互反応せず、標的タンパク質との会合に際してプローブが高次構造シフトを経るときに標識は相互反応して検出可能なシグナルを発生させる（消光を含む）ように標識及び標識部位が選択され、逆もまた同様である。前記は、プローブの会合状態に応じて、例えばプローブが標的タンパク質との会合に際して高次構造シフトを経るか否かに応じて、さらに離れるかもっと近づく標的部位を選択することによって達成することができる。いくつかの実施態様では、会合プローブと連繋するシグナルの規模は検出される標的タンパク質の量と正の相関関係を有する。したがって、本発明の方法は標的タンパク質の検出及び定量を許容する。

30

【0035】

例えば、エキシマー、FRET又はフルオロフォア/クエンチャー標識ペアを用いて、プローブの特異的な高次構造（例えばプローブがアミロイド形成性疾患と関係するA β タンパク質凝集物と会合するとき生じる高次構造）の検出を許容できる。これらの実施態様では、プローブは、第一及び第二の標識により別々の部位で標識され、各標識はエキシマー、FRET又はフルオロフォア/クエンチャーペアの相補メンバーである。

40

例えば、エキシマー形成標識は、プローブがその非会合状態にあるときそれらのモノマーシグナルを放射でき、プローブが、標的タンパク質との会合に際して、標識を物理的により近接状態にする高次構造シフトを経るときにそれらのエキシマーシグナルを放射できる。同様に、FRET標識は、プローブが標識を物理的により近接状態にする高次構造シフトを経るときにそれらのFRETシグナルを放射できる。他方、フルオロフォア/クエンチャー

50

標識ペアは、プローブが非会合状態にあるときにフルオロフォアシグナルを放射でき、当該シグナルは、プローブが標識を物理的により近接状態にする高次構造シフトを経るときに消光されうる。上記に記したように、プローブが標的タンパク質との会合に際して高次構造シフトを経るときにシグナルで反対の変化が生じるように、標識を配置できる。

上述のいずれかにしたがえば、検出可能な標識は、ペプチドプローブの末端リジン残基の側鎖、及び/又はペプチドプローブの内部リジン残基の側鎖に結合させることができる。

【0036】

いくつかの実施態様では、検出可能標識はリンカーによってプローブに付加される。具体的実施態様では、ペプチドリinkerは、可撓性リンカー、ヘリックスリンカー、トロンビンサイトリンカー及び屈折リンカーから成る群から選択される。具体的実施態様では、リンカーはアミノヘキシルリンカーである。他の実施態様では、ペプチドプローブは、内部リジン残基の側鎖を介してリンカーに結合される。他の適切なペプチドリinkerは当業界で記載されている（例えば以下を参照されたい：US6,448,087；Wurth et al., J. Mol. Biol. 319:1279-1290, 2002；及びKim et al., J. Biol. Chem. 280:35059-35076, 2005（前記は参照によりその全体が本明細書に含まれる））。いくつかの実施態様では、適切なリンカーは長さが約8-12アミノ酸でありうる。さらに別の実施態様では、リンカーのアミノ酸残基の約75%を超えるものがセリン、グリシン及びアラニン残基から選択される。

本明細書に記載のプローブのいずれも、N-末端に及び/又はC-末端近くのリジン残基から延びるものに、及び/又は標識に適した任意の他の部位に酪酸ジビレン（PBA）を含むことができる。加えて或いはまた別に、本明細書に記載のプローブのいずれも改変されて、天然に存在するカルボキシル基の代わりにC-末端にアミド基を含むことができる。

さらにまた、これらの実施態様のいくつかは、1つのペプチドプローブにつき2つの標識の使用に関して記載されてきたが、多重標識を用いることができることは理解されよう。例えば、各標識部位に1つ以上の標識が存在することが可能であり、又はプローブの異なる標識部位にそれぞれ複数の標識が存在しうる。これらの実施態様では、標識は無関係のシグナルを発生させることができる。

これらの実施態様のいずれかで使用される例示的標識には以下が含まれる：蛍光因子（例えば、フルオロフォア、蛍光タンパク質、蛍光半導体超微細結晶）、燐光性因子、化学発光剤、色素形成因子、消光剤、染料、放射性核種、金属イオン、金属ゾル、リガンド（例えばビオチン、ストレプトアビジンハプテンなど）、酵素（例えばベータ-ガラクトシダーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）、酵素基質、酵素補助因子（例えばNADPH）、酵素阻害剤、シンチレーション剤、阻害剤、磁性粒子、オリゴヌクレオチド、及び当業界で公知の他の部分。

具体的実施態様では、フルオロフォア標識は、インドシアニン緑（ICG）、Cypate、Cy3、Cy5、Cy7又はFITCである。これら及び他の直接検出可能標識は、Aβオリゴマーとの会合時にペプチドプローブが高次構造シフト又は転移を経ることができない実施態様で有用である。いくつかの実施態様では、直接検出可能標識は、蛍光顕微鏡法、蛍光分光法の蛍光活性化細胞区分けを用いて検出される。

【0037】

上記に記したように、いくつかの実施態様では、標識はピレン部分を含む。本明細書で用いられるように、ピレン部分にはピレンが含まれ、前記は4つの縮合ベンゼン環又はピレン誘導体を含む。ピレン誘導体とは、ピレンの4つの縮合ベンゼン環を含む分子を意味し、その場合1つ以上のピレン炭素原子はさらに別の部分に置換されているか又は結合されている。例示的なピレン誘導体にはアルキル化ピレンが含まれ、その場合1つ以上のピレン炭素原子は、直鎖若しくは分枝した置換若しくは非置換のアルキル、アルキニル若しくはアシル基（例えばC₁-C₂₀）、直鎖若しくは分枝した置換若しくは非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル若しくはアシル基であり、当該基は、例えばO、N又はS原子を含む部分（例えばカルボニル、アミン、スルフヒドリル）で又はハロゲンで置換される。

いくつかの実施態様では、ピレン誘導体は1つ以上の遊離カルボキシル基及び/又は1つ以上の遊離アミン基を含み、その各々はピレン炭素原子に直接付加されるか、又は上記に記載の直鎖若しくは分枝した置換若しくは非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル若しくはアシル基の任意の位置に付加されることができ、例えば、ピレン炭素から1つ以上、例えば1から3、1から5又はそれより多くの原子だけ離れている炭素原子に付加されうる。いくつかの実施態様では、ピレンは、1つ以上の酢酸部分及び/又は1つ以上のエチルアミン部分で置換される。いくつかの実施態様では、ピレン誘導体はただ1つのメチル、エチル、プロピル又はブチル基で置換される。いくつかの実施態様では、ピレンは、短い脂肪酸鎖（例えば酪酸ピレン）で置換される。別の実施態様では、ピレンは、アルブミン、トランスフェリン又は抗体のFcフラグメントに結合される。いくつかの実施態様では、置換基は、炭素-炭素結合、アミノ基、ペプチド結合、エーテル、チオエーテル、ジスルフィド又はエステル結合を介してピレンに付加される。他の実施態様では、ピレン誘導体はPEG化ピレン（すなわちポリエチレングリコール（PEG）結合ピレン）である。そのようなピレン誘導体は、*in vivo*でより長い循環寿命を示すことができる。他の実施態様では、ピレン誘導体はアルブミン結合ピレンである。

【0038】

いくつかの実施態様では、標識は蛍光タンパク質を含み、前記は融合タンパク質の部分としてペプチドプローブに取り込まれる。蛍光タンパク質には以下が含まれる：緑色蛍光タンパク質（例えばGFP、eGFP、AcGFP、TurboGFP、エメラルド、アザミ緑、及びZsGreen）、青色蛍光タンパク質（例えばEBFP、サファイア、及びT-サファイア）、シアン蛍光タンパク質（例えばECFP、mCFP、セルリーン、CyPet、AmCyan1、及びミドリイシシアン）、黄色蛍光タンパク質（EYFP、トパーズ、ヴィーナス、mCitrine、YPet、PhiYFP、ZsYellow1、及びmBanana）、並びにオレンジ及び赤色蛍光タンパク質（例えばクサビラオレンジ、mOrange、dTomato、dTomato-Tandem、DsRed、DsRed2、DsRed-Express(T1)、DsRed-モノマー、mTangerine、mStrawberry、AsRed2、mRFP1、JRed、mCherry、HcRed1、mRaspberry、HcRed-Tandem、mPlum、及びAQ143）。他の蛍光タンパク質は当業界では記載されている（Tsien, R.Y., *Annual. Rev. Biochem.* 67:509-544, 1998；及びLippincott-Schwartz et al., *Science* 300:87-91, 2003）。これら及び他の直接検出可能標識は、ペプチドプローブが、A β オリゴマー会合時に高次構造シフト又は移転を経ることができない実施態様で有用である。

融合タンパク質の部分としての蛍光タンパク質は、当業界で記載されているようにペプチドリンカーを介して結合させることができる（US6,448,087；Wurth et al., *J. Mol. Biol.* 319:1279-1290, 2002；及びKim et al., *J. Biol. Chem.* 280:35059-35076, 2005（前記は参照によりその全体が本明細書に含まれる））。いくつかの実施態様では、適切なリンカーは長さが約8-12アミノ酸でありうる。さらに別の実施態様では、リンカーの約75%を超えるアミノ酸残基がセリン、グリシン及びアラニン残基から選択される。

本明細書で用いられるように、“フルオロフォア”は、光によって励起されて蛍光又は燐光を放射することができる化学基である。“クエンチャー”は蛍光ドナーの蛍光シグナルを消光できる因子である。第一のフルオロフォアは第二のフルオロフォアによって消光されるシグナルを放射できる。本明細書に開示のプローブは蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を経ることができる。

【0039】

フルオロフォア及びクエンチャーには以下の因子が含まれうる（又はフルオロフォア及びクエンチャーは以下の商品名で販売されている）：1,5 IAEDANS；1,8-ANS；ウンベリフェロン（例えば4-ウンベリフェロン）；アクラジウムエステル、5-カルボキシ-2,7-ジクロロフルオレセイン；5-カルボキシフルオレセイン（5-FAM）；5-カルボキシテトラメチルローダミン（5-TAMRA）；5-FAM（5-カルボキシフルオレセイン）；5-HAT（ヒドロキシトリプタミン）；5-ヒドロキシトリプタミン（HAT）；5-ROX（カルボキシ-X-ローダミン）；5-TAMRA（5-カルボキシテトラメチルローダミン）；6-カルボキシローダミン6G；6-CR 6G；6-JOE；7-アミノ-4-メチルクマリン；7-アミノアクチノマイシンD（7-AAD）；7-ヒ

ドロキシ-4-メチルクマリン；9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン；ABQ；酸フクシン；ACMA（9-アミノ-6-クロロ-2-メトキシアクリジン）；アクリジンオレンジ；アクリジンレッド；アクリジンイエロー；アクリフラビン；アクリジンフラビンヒュールゲンSITS A；Alexa Fluor 350TM；Alexa Fluor 430TM；Alexa Fluor 488TM；Alexa Fluor 532TM；Alexa Fluor 546TM；Alexa Fluor 568TM；Alexa Fluor 594TM；Alexa Fluor 633TM；Alexa Fluor 647TM；Alexa Fluor 660TM；Alexa Fluor 680TM；アリザリンコンプレクソン；アリザリンレッド；アロフィコシアニン（APC）；AMC；AMCA-S；AMCA（アミノエチルクマリン）；AMCA-X；アミノアクチノマイシンD；アミノクマリン；アミノメチルクマリン（AMCA）；アニリンブルー；ステアリン酸アントロシル；APC（アロフィコシアニン）；APC-Cy7；APTS；アストラゾンブリリアントレッド4G；アストラゾンオレンジR；アストラゾンレッド6B；アストラゾンイエロー7 GLL；アタブリン；ATTO-TAGTM CBQCA；ATTO-TAGTM FQ；アウラミン；アウロホスフィンG；アウロホスフィン；BAO 9（ビスアミノフェニルオキサジアゾール）；硫酸ベルベリン；ベータラクタマーゼ；BFPブルーシフトEDFP（Y66H）；青色蛍光タンパク質；BFP/GFP FRET；ビメイン；ビスベンズアミド；ビスベンズイミド（Hoechst）；Blancophor FFG；Blancophor SV；BOBOTM-1；BOBOTM-3；Bodipy 492/515；Bodipy 493/503；Bodipy 500/510；Bodipy 505/515；Bodipy 530/550；Bodipy 542/563；Bodipy 558/568；Bodipy 564/570；Bodipy 576/589；Bodipy 581/591；Bodipy 630/650-X；Bodipy 650/665-X；Bodipy 665/676；Bodipy FL；Bodipy FL ATP；Bodipy FL-セラミド；Bodipy R6G SE；Bodipy TMR；Bodipy TMR-Xコンジュゲート；Bodipy TMR-X，SE；Bodipy TR；Bodipy TR ATP；Bodipy TR-X SE；BO-PROTM-1；BO-PROTM-3；ブリリアントスルホフラビンFF；カルセイン；カルセイブルー；カルシウムクリムソンTM；カルシウムグリーン；カルシウムオレンジ；Calcofluor白；カルボキシ-X-ローダミン（5-ROX）；カスケードブルーTM；カスケードイエロー；カテコールアミン；CCF2（GeneBlazer）；CFDA；CFP-シアン蛍光タンパク質；CFP/YFP FRET；クロロフィル；クロモマイシンA；CL-NERF（染料比、pH）；CMFDA；コエレンテラジンf；コエレンテラジンfcp；コエレンテラジンh；コエレンテラジンhcp；コエレンテラジンip；コエレンテラジンn；コエレンテラジンO；クマリンファロイジン；C-フィコシアニン；CPMメチルクマリン；CTC；CTCフォルマザン；Cy2TM；Cy3.1 8；Cy3.5TM；Cy3TM；Cy5.1 8；Cy5.5TM；Cy5TM；Cy7TM；シアンGFP；Cypate；環状AMPフルオロセンサー（FiCrhR）；Dabcyl；Dansyl；Dansylアミン；Dansylカダベリン；Dansyl塩化物；Dansyl DHPE；フッ化物；DAPI；Dapoxyl；Dapoxyl 2；Dapoxyl 3；DCFDA；DCFH（ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート）；DDAO；DHR（ジヒドロローダミン123）；ジ-4-ANEPPS；ジ-8-ANEPPS（non-ratio）；DiA（4-ジ-16-ASP）；ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート（DCFH）；DiD-親油性トレーサー；DiD（DiIC18(5)）；DIDS；ジヒドロローダミン123（DHR）；DiI（DiIC18(3)）；ジニトロフェノール；DiO（DiOC18(3)）；DiR；DiR（DiIC18(7)）；DNP；ドーパミン；DsRed；DTAF；DY-630-NHS；DY-635-NHS；EBFP；ECFP；EGFP；ELF 97；EDANS；エオシン；エリスロシン；エリスロシンITC；臭化エチジウム；エチジウムホモダイマー-1（EthD-1）；ユークリシン；ユーコライト；塩化ユーロピウム（III）；EYFP；ファストブルー；FDA；ヒュールゲン（パラロサニリン）；FITC；フラゾオレンジ；Fluo-3；Fluo-4；フルオレセイン（FITC）；フルオレセイン二酢酸；フルオロ-エメラルド；フルオロ-ゴールド（ヒドロキシスチルバミジン）；Fluor-Ruby；FluorX；FM 1-43TM；FM 4-46；Fura RedTM；Fura RedTM/Fluo-3；Fura-2；Fura-2/BCECF；ゲナクリルブリリアントレッドB；ゲナクリルブリリアントイエロー10GF；ゲナクリルピンク3G；ゲナクリルイエロー5GF；ジーンブレイザー（CCF2）；蛍光タンパク質（例えばGFP（S65T）；GFPレッドシフトEDFP（rsGFP）；GFP野生型、非UV励起（wtGFP）；GFP野生型、UV励起（wtGFP）；及びGFPuv）；Gloxalic Acid；顆粒青；ヘマトポルフィリン；ヘキスト33258；ヘキスト33342；ヘキスト34580；HPTS；ヒドロキシクマリン；ヒドロキシスチルバミジン（FluoroGold）；ヒドロキシトリブタミン；Indo-1；インドジカルボシアニン（DiD）；インドシアニングリーン（ICG）；インドトリカルボシアニン（DiR）；イントラホワイトCf；JC-1；JO-JO-1；JO-PRO-1；ラウロダン；LDS 751（DNA）；LDS 751（RNA）；リユーコフォアPAF；リユーコフォアPAF；リユーコフォアSF；リユー

10

20

30

40

50

ーコフォアWS；リッサミンローダミン；リッサミンローダミンB；カルセイン/エチジウム
 ホモダイマー；LOLO-1；LO-PRO-1；ルシファーイエロー；ルミノール；リソトラッカーブ
 ルー；リソトラッカーブルー-ホホワイト；リソトラッカーグリーン；リソトラッカーレ
 ッド；リソトラッカーイエロー；リソセンサーブルー；リソセンサーグリーン；リソセン
 サーイエロー/ブルー；マググリーン；マグダラレッド（Phloxin B）；マグ-フラレッド；
 マグ-フラ-2；マグ-フラ-5；マグ-インド-1；マグネシウムグリーン；マグネシウムオレ
 ンジ；マラカイトグリーン；マリナブルー；マキシロンブリリアントフラビン10 GFF；マ
 キシロンブリリアントフラビン8 GFF；メロシアニン；メトキシクマリン；ミトトラッ
 カーグリーン；FM；ミトトラッカーオレンジ；ミトトラッカーレッド；ミトラマイシン；モ
 ノプロモビメン；モノプロモビメン（mBBBr-GSH）；モノクロロビメンMPS（メチルグリー
 ンピロニンスチルベン）；NBD；NBDアミン；ナイルレッド；NEDTM；ニトロベンズオキサ
 ジオール；ノルアドレナリン；ニュークリアファストレッド；ニュークリアーイエロー；ニ
 ロサンブリリアントイアヴィンE8G；オレゴングリーン；オレゴングリーン488-X；オレゴ
 ングリーンTM；オレゴングリーンTM488；オレゴングリーンTM500；オレゴングリーンTM51
 4；パシフィックブルー；パラロサニリン（Feulgen）；PBF1；PE-Cy5；PE-Cy7；PerCP；P
 erCP-Cy5.5；PE-テキサスレッド[Red 613]；Phloxin B（マグダラレッド）；Phorwite AR
 ；Phorwite BKL；Phorwite Rev；Phorwite RPA；ホスフィン3R；フィコエリトリンB [PE]
 ；フィコエリトリンR [PE]；PKH26（Sigma）；PKH67；PMIA；ポントクロムブルーブラッ
 ク；POPO-1；POPO-3；PO-PRO-1；PO-PRO-3；プリムリン；プロシオンイエロー；プロピジ
 ウムIodid（PI）；PyMP0；ピレン；ピロニン；ピロニンB；ピロザールブリリアントフラ
 ビン7GF；QSY 7；キナクリンマスタード；レッド613 [PE-テキサスレッド]；レゾルフィ
 ンRH 414；Rhod-2；ローダミン；ローダミン110；ローダミン123；ローダミン5 GLD；ロ
 ーダミン6G；ローダミンB；ローダミンB 200；ローダミンBエキストラ；ローダミンBB；
 ローダミンBG；ローダミングリーン；ローダミンファリシジン；ローダミンファロイジン
 ；ローダミンレッド；ローダミンWT；ローズベンガル；R-フィコシアニン；R-フィコエリ
 トリン（PE）；RsGFP；S65A；S65C；S65L；S65T；サファイアGFP；SBFI；セロトニン；セ
 ブロンブリリアントレッド2B；セブロンブリリアントレッド4G；セブロンブリリアントレ
 ッドB；セブロンオレンジ；セブロンイエロー-L；sgBFPTM；sgBFPTM（スーパーグローBFP
 ）；sgGFPTM；sgGFPTM（スーパーグローGFP）；SITS；SITS（プリムライン）；SITS（ス
 チルベンイソチオスルホン酸）；SNAFLカルセイン；SNAFL-1；SNAFL-2；SNARFカルセイン
 ；SNARF1；ナトリウムグリーン；スペクトラムアクア；スペクトラムグリーン；スペクト
 ラムオレンジ；スペクトラムレッド；SPQ（6-メトキシ-N-(3-スルホプロピル)キノリニウ
 ム）；スチルベン；スルホローダミンBStilbene；Sulphorhodamine B can C；スルホロー
 ダミンGエキストラ；SYTO 11；SYTO 12；SYTO 13；SYTO 14；SYTO 15；SYTO 16；SYTO 17
 ；SYTO 18；SYTO 20；SYTO 21；SYTO 22；SYTO 23；SYTO 24；SYTO 25；SYTO 40；SYTO 4
 1；SYTO 42；SYTO 43；SYTO 44；SYTO 45；SYTO 59；SYTO 60；SYTO 61；SYTO 62；SYTO
 63；SYTO 64；SYTO 80；SYTO 81；SYTO 82；SYTO 83；SYTO 84；SYTO 85；SYTOXブルー；
 SYTOXグリーン；SYTOXオレンジ；TETTM；テトラサイクリン；テトラメチルローダミン（T
 RITC）；；テキサスレッドTM；テキサスレッド-XTMコンジュゲート；チアジカルボシアニ
 ン（DiSC3）；チアジンレッドR；チアゾールオレンジ；チオフラビン5；チオフラビンS；
 チオフラビンTCN；チオライト；チオゾールオレンジ；チノポールCBS（カルコフルアホワ
 イト）；TMR；TO-PRO-1；TO-PRO-3；TO-PRO-5；TOTO-1；TOTO-3；トリカラー（PE-Cy5）
 ；TRITCテトラメチルローダミンイソチオシアネート；トゥルーブルー；TruRed；ウルト
 ラライト；ウラニンB；Uvitex SFC；VIC（商標）；wt GFP；WW 781；X-ローダミン；XRITC
 ；キシレンオレンジ；Y66F；Y66H；Y66W；イエローGFP；YFP；YO-PRO-1；YO-PRO-3；YOYO
 -1；YOYO-3；及び前記の塩。

【0040】

6. キット

本明細書に記載のペプチドプローブ、合成Aβオリゴマー、及び/又は標識を含むキット
 もまた提供される。キットは本明細書に記載の方法を実施するために調製できる。典型的

10

20

30

40

50

には、キットは、少なくとも1つの成分又はある方法を実施するために梱包された有用な成分の組み合わせ物を含む。“梱包された組み合わせ物”とは、キットが、1つ以上の成分（例えばプローブ、緩衝剤、使用のための指示など）の組み合わせ物を含む単一パッケージを提供することを意味する。単一容器を収納するキットは、“梱包された組み合わせ物”の定義に含まれる。キットは、本明細書に記載の方法を実施するために必要な成分のいくつか又は全てを含むことができる。典型的には、キットは少なくとも1つの容器に少なくとも1つのプローブを含む。キットは、同じ又は相違しうる複数のプローブ（例えば異なる配列及び/又は異なる標識を含むプローブ）を1つ以上の容器に含むことができる。複数のプローブは、単一容器又は別々の容器（各々はただ1つのプローブを含む）に存在できる。

10

【実施例1】**【0041】**全血によるフローサイトメトリー**A. 第一のサンプル：合成A β オリゴマーを含まない**

全血を含む第一のサンプルを静脈穿刺によって対象から入手し、EDTAチューブに収集する。有機溶媒中で保存されたFITC（PEP-11）標識ペプチドプローブを室温に戻す。続いて、有機溶媒をロータリーエバポレーション又は大気蒸発によって除去する。続いて、第一のサンプルをHEPES緩衝食塩水で希釈し、その後ペプチドプローブ溶液と一緒にする。得られた混合物を暗所に室温で1時間まで保存して、標識ペプチドプローブが、第一の試験サンプルに存在する細胞と会合した任意のA β オリゴマーと結合（例えば会合及び/又は複合体形成）することを可能にする。

20

B. 第二のサンプル：合成A β オリゴマーを含む

全血を含む第二のサンプルを上記に記載したものと同一態様で入手する。続いて第二のサンプルをHEPES緩衝食塩水で希釈し、その後合成A β オリゴマーと合わせて、合成A β オリゴマーが、第二のサンプルに存在する細胞と結合（例えば会合及び/又は複合体形成）するか又は細胞と会合した任意のA β オリゴマーに結合することを可能にする。有機溶媒中で保存されたFITC（PEP-11）標識ペプチドプローブを室温に戻し、食塩水で希釈する。有機溶媒を続いてロータリーエバポレーション又は大気蒸発によって除去する。続いて、ペプチドプローブ溶液を全血及び合成A β オリゴマーを含む第二のサンプルと一緒にする。一緒にした物を暗所に室温で保存して、標識ペプチドプローブの、任意のA β オリゴマーとの結合（例えば会合及び/又は複合体形成）及び細胞と会合した合成A β オリゴマーとの結合を可能にする。

30

C. フローサイトメトリー分析

保存後、第一及び第二のサンプルをTruCountチューブでFACScanフローサイトメーターに付して、試験サンプルの赤血球を単離する。試験サンプルの赤血球を対数性前方/側方散乱光ドットプロットでゲート処理し、FITC標識の蛍光を適切なバンドパスフィルターによって検出する。

【実施例2】**【0042】**全血中の赤血球によるフローサイトメトリーアッセイ

40

第一及び第二のサンプルを正常な対象（すなわちアルツハイマー病ではない）及びアルツハイマー病の対象から入手する。サンプルを実施例1の手順に従って処理及び分析する。

図2は各対象の第一のサンプルを示し、（i）標識ペプチドプローブがサンプルに添加される前（左列）及び（ii）標識ペプチドプローブがサンプルに添加された後（右列）である。左列で分かるように、内因性A β オリゴマーは、アルツハイマー病の対象でより強い度合いで赤血球と会合する。右列で分かるように、標識ペプチドプローブは赤血球と会合したA β オリゴマーと会合（例えば複合体を形成）し、赤血球と会合した内因性A β オリゴマーの検出及び定量を（例えばペプチドプローブ-A β オリゴマー-赤血球複合体の検出によって）許容する。

50

図3は、PEP-11ペプチドプローブ（配列番号:64）を用いて探索された第一のサンプル（内因性A β オリゴマーのみ）のFITCシグナルを示す。標識ペプチドプローブ-内因性A β オリゴマー-赤血球を含む複合体が検出される。アルツハイマー病の対象に対応するシグナル（蛍光強度）は正常な対象に対応するシグナルよりも強く、アルツハイマー病の対象のサンプルに存在するより大量のA β オリゴマーを反映している。

図4は各対象の第二のサンプルを示し、(i) 合成A β オリゴマー又は標識ペプチドプローブがサンプルに添加される前（左列）、(ii) 合成A β オリゴマーがサンプルに添加された後（中央列）、及び (iii) PEP-11ペプチドプローブがサンプルに添加された後（右列）である。図2と同様、左列で分かるように、内因性A β オリゴマーは、アルツハイマー病の対象でより強い度合いで赤血球と会合する。中央列で分かるように、合成A β オリゴマーは、アルツハイマー病の対象のサンプルと比較して、正常な対象から得られたサンプルでより強い度合いで赤血球と会合する。理論に拘束されないが、アルツハイマー病の対象の赤血球は内因性A β オリゴマーと会合し、したがって合成A β オリゴマーと会合する能力が低いと考えられる。右列で分かるように、標識ペプチドプローブは内因性及び合成A β オリゴマーと会合する。

【0043】

図5は、合成A β オリゴマー及び標識ペプチドプローブがサンプルに添加された後の第二のサンプルのFITCシグナルを示す。標識ペプチドプローブ-内因性A β オリゴマー-赤血球を含む複合体及び標識ペプチドプローブ-合成A β オリゴマー-赤血球を含む複合体が検出される。この図を図3と比べると、アルツハイマー病の対象のシグナルは図3とほぼ同じであり、赤血球と会合するA β オリゴマーの量は合成A β オリゴマー添加前と添加後でほぼ同じであることを示している。対照的に、正常な対象のシグナルは図3の右に顕著にシフトし（例えばより強いシグナル）、赤血球と会合するA β オリゴマーの量は合成A β オリゴマーの添加後により多い。

図6は、正常な対象及びアルツハイマー病の対象について図3及び図5のシグナルの重ね合わせであり、正常な対象において合成A β オリゴマーの存在下及び非存在下で得られるシグナルにおけるシグナルシフト又は“デルタ”（結合能力）を強調する。このシグナルシフトは赤血球の内因性A β オリゴマー装荷（したがって対象のA β オリゴマー装荷）と負の相関関係を有し、より強いシグナルシフトは低いA β オリゴマー装荷（したがって正常な（非AD）病状）と相関関係にあり、小さなシグナルシフトはより高いA β オリゴマー装荷（したがって病気のより高いリスク又はより進行した病状）と関係する。

これらのデータは、どのように実施例1及び2を用いて正常な対象とアルツハイマー病の対象を区別できるかを示す。さらにまた、このアッセイ様式を用いて、病気のリスク又は発症について時間の経過にしたがってモニターしうる、正常対象の基準値A β オリゴマー装荷状況を提供することができよう。同様に、このアッセイ様式を用いて、病気の進行及び/又は治療処置の成功について時間の経過にしたがってモニターしうる、AD対象の基準値A β オリゴマー装荷状況を提供できよう。

全血サンプルを別の正常対象から入手し、実施例1に示されたように処理した。図7は、第一のサンプル（合成A β オリゴマー無し）及び第二のサンプル（合成A β オリゴマー）のシグナル間におけるデルタシフト（結合能力）を示す。

【実施例3】

【0044】

血漿中の血小板によるフローサイトメトリー

血小板富裕血漿（PRP）を含む第一のサンプルは、全血の分離によって又は以前に分離した全血の凍結サンプルから入手される。第一のサンプルはフローサイトメトリーによってPRPを含むことが（例えば表面マーカーとしてCD-41を検出することによって）立証される。有機溶媒中で保存されたFITC（PEP-11）標識ペプチドプローブを室温に戻す。有機溶媒をロータリーエバポレーション又は大気蒸発によって除去する。第一のサンプルをHEPES緩衝食塩水で希釈し、その後ペプチドプローブ溶液と一緒にする。一緒にした物を暗所に室温で1時間まで保存して、標識ペプチドプローブが、第一のサンプルに存在する血小

板と会合した任意のA β オリゴマーと結合することを可能にする。

PRPを含む第二のサンプルを上記に記載したものと同一態様で入手する。第二のサンプルをHEPES緩衝食塩水で希釈し、その後合成A β オリゴマーと合わせて、合成A β オリゴマーが、第二のサンプルに存在する血小板と会合した任意のA β オリゴマーと結合することを可能にする。有機溶媒中で保存されたFITC (PEP-11) 標識ペプチドプローブを室温に戻す。有機溶媒をロータリーエバポレーション又は大気蒸発によって除去する。ペプチドプローブを第二のサンプルと一緒にし、一緒にした物を暗所に室温で保存して、標識ペプチドプローブがサンプルに存在する血小板と会合した任意のA β オリゴマー（内因性及び合成）と結合することを可能にする。

第一及び第二のサンプルをTruCountチューブでFACScanフローサイトメーターに付して、試験サンプルの血小板を単離する。試験サンプルの血小板を対数性前方/側方散乱光ドットプロットでゲート処理し、FITC標識の蛍光を適切なバンドパスフィルターによって検出する。第一のサンプルでは、標識ペプチドプローブ-内因性A β オリゴマー-血小板を含む複合体が検出され、一方、第二のサンプルでは、標識ペプチドプローブ-内因性A β オリゴマー-血小板を含む複合体及び標識ペプチドプローブ-合成A β オリゴマー-血小板を含む複合体が検出されるであろう。

【実施例4】

【0045】

脳脊髄液によるフローサイトメトリー

脳脊髄液 (CSF) を腰椎穿刺によって又は以前に分離した凍結サンプル（臨床収集物）から入手する。有機溶媒中で保存されたFITC (PEP-11) 標識ペプチドプローブを室温に戻す。有機溶媒をロータリーエバポレーション又は大気蒸発によって除去する。CSFをHEPES緩衝食塩水で希釈し、ペプチドプローブ溶液と一緒にする。一緒にした物を暗所に室温で1時間まで保存して、標識ペプチドプローブが、第一の試験サンプルに存在する任意のA β オリゴマーと結合することを可能にする。

サンプルをTruCountチューブでFACScanフローサイトメーターに付す。試験サンプルの一切のA β オリゴマーを対数性前方/側方散乱光ドットプロットでゲート処理し、FITC標識の蛍光を適切なバンドパスフィルターによって検出する。標識ペプチドプローブ及びA β オリゴマーを含む複合体が検出される。

【実施例5】

【0046】

ペプチド結合免疫吸着アッセイ (PLISA)

図8は本明細書に記載のPLISAのための種々の様式を示す。PLISA (A) はサンドイッチ様式を示し、前記では、標的オリゴマー、例えばA β オリゴマー (SDS oligo) は、表面結合ペプチドプローブ (ペプチド) 及び標識貼付ペプチドプローブ (Tag) の両方と結合する。複合体は標識抗体 (抗TagAb-標識) を用いて検出される。PLISA (B) はサンドイッチ様式を示し、前記では、標識貼付ペプチドプローブは、A β オリゴマーに特異的な標識抗体 (Ab-標識) で置き換えられる。PLISA (C) はサンドイッチ様式を示し、前記では、表面結合ペプチドプローブは、A β オリゴマーに特異的な抗体 (Ab-6E10) で置換えられる。PLISA (D) は競合様式を示し、前記では、生物学的サンプルのA β オリゴマーは、標識ペプチドプローブに対して表面結合A β オリゴマーと競合する。PLISA (A) - (D) の各々は固相様式を用いることができる（ここではビーズとして示され、ビーズは標識検出用装置に通される）。

【実施例6】

【0047】

PLISAはELISAよりも感度及び選択性が高い

種々の濃度のA β オリゴマー溶液をPLISA及びELISAの両方に付し、用量応答曲線で測定される各アッセイの感度を決定する。PLISAアッセイについて、用いたペプチドプローブはAD317（配列番号:41）である。ELISAについて、用いた抗体は、セイヨウワサビペルオキシダーゼで標識したA β 抗体6E10である。図9に示すように、PLISAは、ELISAよりもA β

オリゴマーの検出について感度が高いアッセイである。

異なる3濃度 (nN) のA β オリゴマー、A β モノマー及びA β 線維の溶液を緩衝液又は10% CSFのどちらかでPLISA及びELISAの両方に付し、他のA β 型と比較してA β オリゴマーに対する各アッセイの選択性を決定した。図10の表1及び2はそれぞれ緩衝液及び10% CSFにおける結果を示し、種々のオリゴマー濃度に対する(モノマー又は線維)/オリゴマーシグナルのパーセント比として提示されている。両方の表に提示されたデータは、ELISAと比較して、A β モノマー及びA β 線維の両方を超えるA β オリゴマーに対するPLISAのより強い選択性を示す。

【実施例7】

【0048】

PEP-11を用いるPLISAはA β オリゴマーをモノマー及び線維と区別する

A β タンパク質の種々の凝集形態(モノマー、オリゴマー及び線維)を、PEP-11ペプチドプローブ(Pep11-a、Pep11-b及びPep11-ds)及びPEP-11プローブを含まないコントロールサンプルを用いてPLISAに付した。Pep11-a及びPep11-bは両方とも配列番号:64から成り、高速液体クロマトグラフィー(200nm、C18、直線勾配)で決定したとき純度はそれぞれ86%(標準)及び95%(高い)である。PEP-11dsもまた配列番号:64によって表されるが、2つのシステインでジスルフィド架橋を有する。高速液体クロマトグラフィー(200nm、C18、直線勾配)はPEP-11dsの純度を86.46%と決定した。

図11は、全てのPEP-11ペプチドが用量依存態様でA β オリゴマーを検出し、A β モノマー又は線維と比較してA β オリゴマーとの優先的な結合を示すことを明示している。これらの結果は、PEP-11ペプチドプローブはA β オリゴマーと優先的に結合し、A β オリゴマーをA β タンパク質凝集物の他のタイプと区別できることを明示する。

【実施例8】

【0049】

ヒトCSF中のA β オリゴマーの検出

正常ヒト対象のCSFサンプルに種々の濃度の合成A β オリゴマーを投入し、ペプチドプローブAD315(配列番号:65)を用いる蛍光検出アッセイに付す。検出は以下の条件によるアッセイで実施する:10mM HEPES緩衝液(pH7.0);0.005% NP-40;10%正常なヒト脳脊髄液;70nMピレン化ペプチド1及び37°Cインキュベーション。

図12は、直線的な用量依存曲線を示す結果を提示する。この結果は、本アッセイを用いて脳脊髄液でA β オリゴマーを検出できることを明示する。

【実施例9】

【0050】

ペプチドプローブはA β 42オリゴマーと結合する

A β 42オリゴマーと結合するペプチドプローブを分析するためにアッセイを実施する。本ペプチドプローブは実施例8のプローブと同じである。以下の5つのサンプルが分析される:(1)陽性コントロールとしてA β 42ビオチン化オリゴマー;(2)ストレプトアビジンを介してビーズに結合したA β 42ビオチン化オリゴマー;(3)ペプチド陽性コントロール;(4)ストレプトアビジンを介してビーズに結合したA β 42ビオチン化オリゴマーと結合したペプチドプローブ;(5)ストレプトアビジンを介してビーズに結合したペプチドプローブ。検出はゲル電気泳動によった。結果は図13に示されている。カラム4がストレプトアビジンの存在によって示すように、ペプチドプローブはA β 42オリゴマーの検出に用いることができる。

図13は、A β 42オリゴマー濃度(nN)の関数としての蛍光異方性(milli-r)のグラフを示す。このデータを得るために用いられたペプチドプローブは上記のゲル電気泳動データのためのペプチドプローブと同じである。異方性はオリゴマー濃度が増加するにつれ減少する。

図13に提示されるアッセイの結果は、当該ペプチドプローブはA β タンパク質のオリゴマー型に対して特異性及び感受性を示すことを示している。

【実施例10】

10

20

30

40

50

【0051】

臨床試験

以下の対象からのヒトCSFサンプルをピレン化ペプチドによるアッセイに付す：（１）アルツハイマー病（AD）の可能性のある対象（47サンプル）；（２）軽度の認知障害（MCI）を有する対象（21サンプル）；（３）正常対象（すなわちAD又はMCIではない）（32サンプル）。本アッセイの目的は、ピレン化ペプチドがCSFサンプルを対象の臨床状態に基づいて正確に区別できるか否かを決定することである。アッセイの結果は、Aβ42オリゴマー（全タウ及びリン酸化タウ）を検出する市場で入手可能なELISAキットの結果と比較される。

図14は、ペプチドプローブAD272（配列番号:22）は、蛍光検出を用いてMCIと正常対象間（pは0.012以下）及びADと正常対象間（pは0.030以下）を区別できることを明示する。

10

【図1-1】

FIGURE 1 (following pages)

配列番号：	区分	名称	変更	配列
1	野生型	WT	Aβタンパク質 残基16-35、 C-末端に Lysを付加	KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM K
6	安定性	AD250	酸化性メチオニン 残基の置き換えの ためにM35A	KLVFF AEDVG SNKGA IIGLA K
2	塩架橋	P22	G29H及びG33Eで 塩架橋、 さらに アルファ ヘリックスの 誘導及び 可溶性の増加	KLVFF AEDVG SNKHA IIELM K

【図1-2】

配列番号：	区分	名称	変更	配列
65		AD315	G29H及びG33Eで 塩架橋、 さらに アルファ ヘリックスの 誘導及び 可溶性の増加； PBA及びNH ₂ の 付加	PBA-KLVFF AEDVG SNKHA IIELM K(PBA)- NH ₂
14		P22 v.1	G29R及びG33Eで 塩架橋	KLVFF AEDVG SNKRA IIELM K
15		P22 v.2	G29K及びG33Eで 塩架橋	KLVFF AEDVG SNKKA IIELM K
3	塩架橋+ アルファ ヘリク ス	P38	G29H及びG33Eで 塩架橋； アルファ ヘリックスの 増加のために Ala置換	KLVFF AEDAA AAKHA IIELM K

【図 1 - 3】

配列番号：	区分	名称	変更	配列
4		P45	G29H及びK33Eで塩架橋；アルファヘリックスの増加のためにAla付加	KAAA KLVFF AEDVG SNKHA IIELM K
16	塩架橋 + Aβ結合モチーフ	P77	塩架橋；Aβ結合モチーフの追加 (GxxEG (配列番号：25)；N-末端伸長	HHQ KLVFF AEDEG SRKHA IEGLM EG K
17		P69	塩架橋；Aβ結合モチーフの追加 (GxxEG (配列番号：25))	EAA KLVFF AEDEG SRKHA IEGLM EG K
19	天然に存在する変異体をベースにする	イタリアン	P22、E22Kの点変異を有する	KLVFF AKDVG SNKHA IIELM K

【図 1 - 5】

配列番号：	区分	名称	変更	配列
24		AD305	P22、2つのN-末端dArg残基、2つのC-末端残基及びまた別の標識部位を有する	rrK(PBA)LVFF AEDVG SNKHA IIELM K(PBA)EE
1		AD274	WT、C-末端にPEG10	(PBA)KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM K(PBA)PEG10
26		AD271	P45、C-末端に2つのdArg残基	(PBA)KAAA KLVFF AEDVG SNKHA IIELM K(PBA)rr
27	アルファヘリックスの誘導 + 可溶性	AD273	WT、Ala ストレッチの付加 (アルファヘリックス形成のため) 及びdArg残基 (可溶性のため) を有する	(PBA)KAAA KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM K(PBA)rr

【図 1 - 4】

配列番号：	区分	名称	変更	配列
20	Occurring Mutants	ダッチ	P22、E22Qの点変異を有する	KLVFF AQDVG SNKHA IIELM K
21		アークチック	P22、E22Gの点変異を有する	KLVFF AGDVG SNKHA IIELM K
22	溶解性	AD272	WT、2つのC-末端dArg残基及びまた別の標識部位を有する	(PBA)KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM K(PBA)rr
23		AD316	P22、2つのC-末端dArg残基及びまた別の標識部位を有する	PBA-KLVFF AEDVG SNKHA IIELM K(PBA)rr

【図 1 - 6】

配列番号：	区分	名称	変更	配列
28	B-シート安定性の低下	AD323	P22、点変異H29D及びI31Dを有する	KLVFF AEDVG SNKDA DIELM K
29		AD325	P22、点変異S26Dを有する	KLVFF AEDVG DNKHA IIELM K
30		AD330	P22、点変異I31Dを有する	KLVFF AEDVG SNKHA DIELM K
31		AD329	P22、点変異I34Dを有する	KLVFF AEDVG SNKHA IIEDM K
32		AD328	P22、点変異H29Dを有する	KLVFF AEDVG SNKDA IIELM K
33		AD327	P22、点変異S26D及びI31Dを有する	KLVFF AEDVG DNKHA DIELM K
34		GM6	P22、点変異F19S及びI34Pを有する	KLVSF AEDVG SNKHA IIEPM K
35		GM6 var.1	P22、点変異F19Sを有する	KLVSF AEDVG SNKHA IIELM K

【図 1 - 7】

配列番号：	区分	名称	変更	配列
5, 18		I32S	野生型、 点変異 I32S を有する	KL VFF AEDVG SNKGA IIGLM K
36		Label (PBA) Site	WT、N-末端 Lys の側鎖に 標識を有する	K(PBA)LVFF AEDVG SNKGA IIGLM K(PBA)
37		AD288	WT、N-末端 Lys 近くの側鎖に 標識：可溶性 dArg及び E残基の付加	EK(PBA)LVFF AEDVG SNKGA IIGLM K(PBA)rrr
38		AD310	P22、C-末端で ヘリックス リンカーにより ビオチン標識	(PBA)KL VFF AEDVG SNKHA IIELM K(PBA)EAAAK (t 杆)
39		AD313	P22、内部 リジンの側鎖で ビオチン標識	(PBA)KL VFF AEDVG SNK (t 杆) HA IIELM K(PBA)

【図 1 - 8】

配列番号：	区分	名称	変更	配列
40		AD314	P22、C-末端で 可溶性リンカー によりビオチン 標識	(PBA)KL VFF AEDVG SNKHA IIELM K(PBA)GSSGSSK (t 杆)
41		AD317	P22、C-末端で トロロニンサイト リンカーにより ビオチン標識	(PBA)KL VFF AEDVG SNKHA IIELM K(PBA)GLVP RGS GK (t 杆)
42		AD321	P22、C-末端で "ねじれ"リンカー によりビオチン 標識	(PBA)KL VFF AEDVG SNKHA IIELM K(PBA)PSGSPK (t 杆)
2, 43	標識/ クエン チャー ヘア	AD326	P22、ピレン 及びDabcyI クエンチャー	(PBA)KL VFF AEDVG SNKHA IIELM K(DabcyI)

【図 1 - 9】

配列番号：	区分	名称	変更	配列
44		AD309	WT、EDANS 及びDabcyI クエンチャー 並びに可溶性 E残基を有する	E(EDANS)LVFF AEDVG SNKGA IIGLM K(DabcyI)
45		AD306	野生型Aβ 残基5-42、 EDANS及び DabcyI クエンチャー 並びに可溶性 E残基を有する	E(EDANS)R HD SGY EVHHQ KL VFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGV V IA K(DabcyI)
46		AD303	野生型Aβ 残基3-35、 EDANS及び DabcyI クエンチャー 並びに可溶性 E残基を有する	E(EDANS)EFR HD SGY EVHHQ KL VFF AEDVG SNKGA IIGLM K(DabcyI)

【図 1 - 10】

配列番号：	区分	名称	変更	配列
47		AD302	P59、EDANS 及びDabcyI クエンチャー 並びに可溶性 E残基を有する	E(EDANS)AAA KL VFF AEDEG SRKHA IIGLM EGK(DabcyI)
48		AD301	P77、EDANS 及びDabcyI クエンチャー 並びに可溶性 E残基を有する	E(EDANS)HHQ KL VFF AEDEG SRKHA IEGLM EGK(DabcyI)
49		AD300	P22、EDANS 及びDabcyI クエンチャー 並びに可溶性 E残基を有する	E(EDANS)LVFF AEDVG SNKHA IIELM K(DabcyI)
50	FRET ヘア	AD295	P22、Dansyl 及びDrrpを有する	(Dansyl)KL VFF AEDVG SNKHA IIELM W

【図 1 - 1 1】

配列番号：	区分	名称	改変	配列
51		AD294	WT、FAM及びDansyl並びに可溶性E残基を有する	(FAM)KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM E(EDANS)
52		AD293	P22、FAM及びDansyl並びに可溶性E残基を有する	(FAM)KLVFF AEDVG SNKHA IIELM E(EDANS)
53		AD292	Aβ残基3-35、FAM及びDansyl並びに可溶性E残基を有する	(FAM)EFR HD SGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM E(EDANS)
54		AD291	P77、FAM及びDansyl並びに可溶性E残基を有する	(FAM)HHQ KLVFF AEDEG SRKHA IEGLM EGE(EDANS)

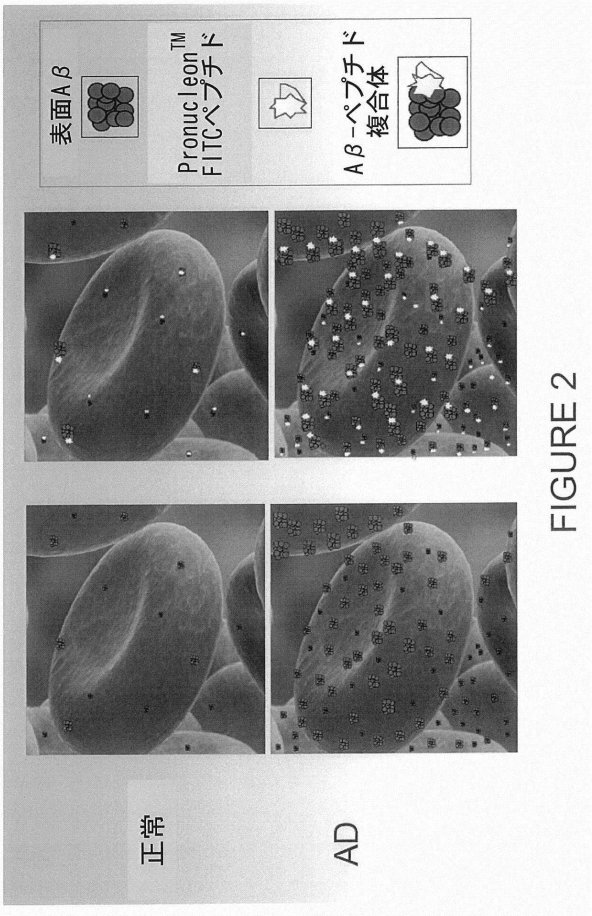
【図 1 - 1 3】

配列番号：	区分	名称	改変	配列
62		PEP-12	P22、FITC標識、C-末端のd-アラギニン並びにジン及びヒスチタミン酸グルタミン置換を有する	FITC-Ahx-CLVFF AEDVG SNKHA IIELMCRr-NH ₂

【図 1 - 1 2】

配列番号：	区分	名称	改変	配列
55		AD290	P59、FAM及びDansyl、並びにAla付加、並びに可溶性E残基を有する	(FAM)EAA KLVFF AEDEG SRKHA IEGLM EGE(EDANS)
56		WT17-35	Aβタンパク質残基17-35、N-及びC-末端Cysの付加を有する	CLVFF AEDVG SNKGA IIGLMC
63		PEP-10	WT 17-35、FITC標識を有する	FITC-Ahx-CLVFF AEDVG SNKGA IIGLMC-NH ₂
64		PEP-11	WT 17-35、FITC及びC-末端にd-アラギニンを有する	FITC-Ahx-CLVFF AEDVG SNKGA IIGLMCRr-NH ₂

【図 2】



【図 3】

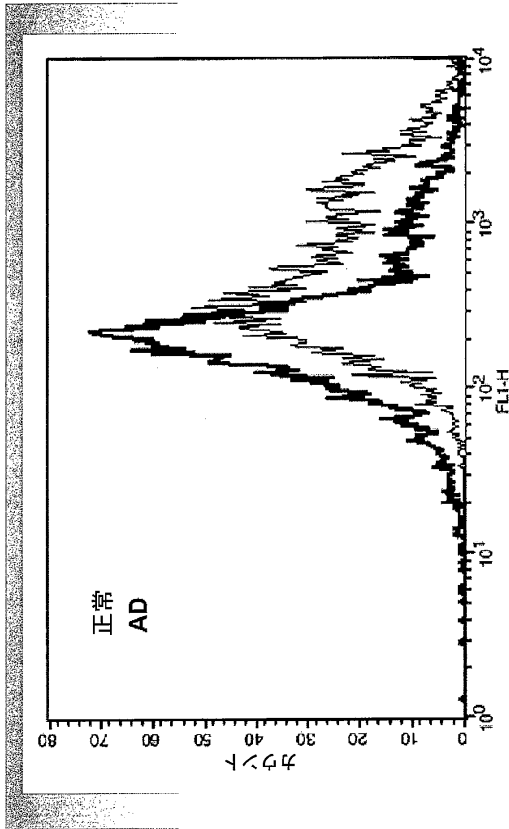


FIGURE 3

【図 4】

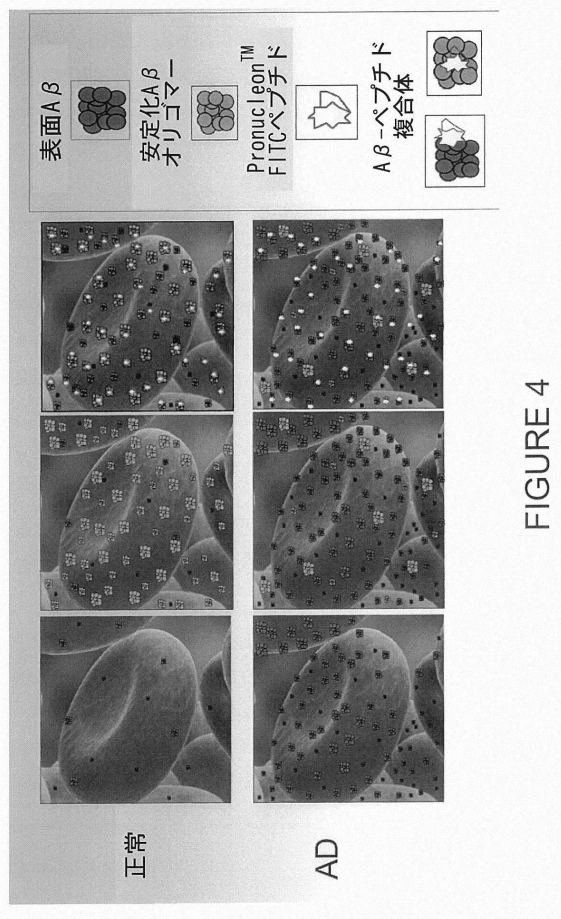


FIGURE 4

【図 5】

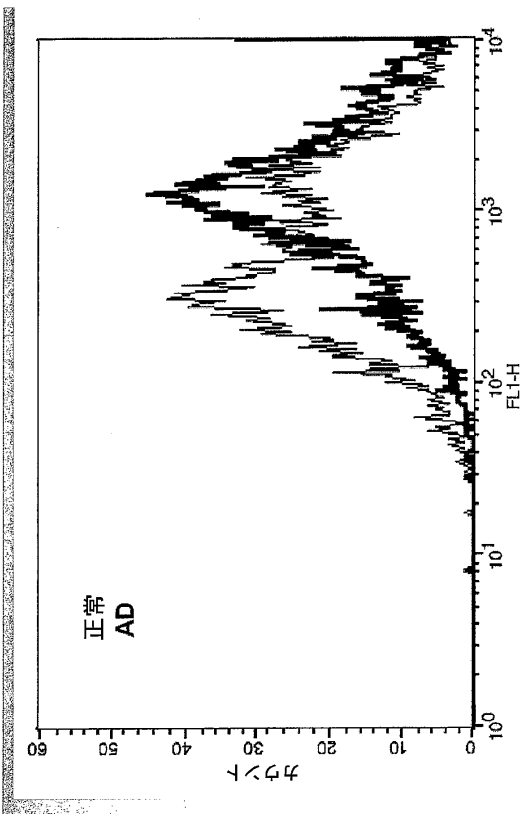


FIGURE 5

【図 6】

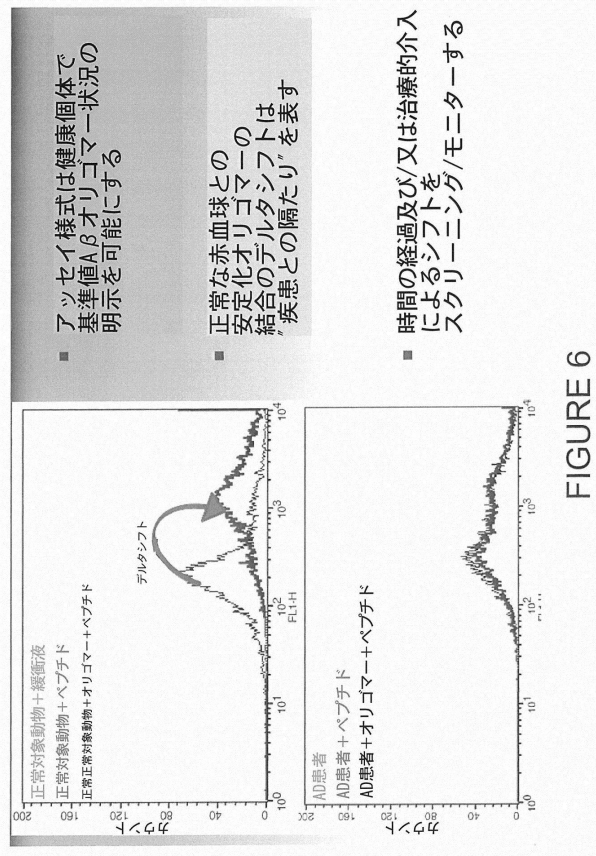
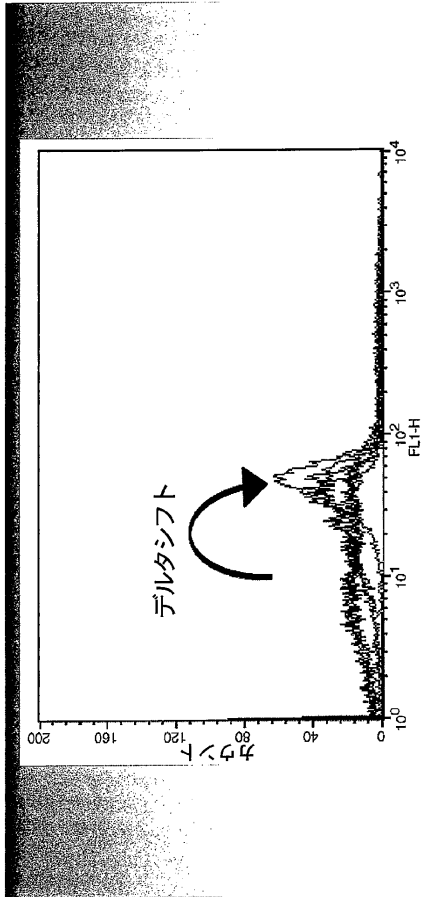


FIGURE 6

【図 7】



■ 正常赤血球と結合する安定化オリゴマーのデルタシフトは健康な個体の全血を用いた初めての試みである

FIGURE 7

【図 8】

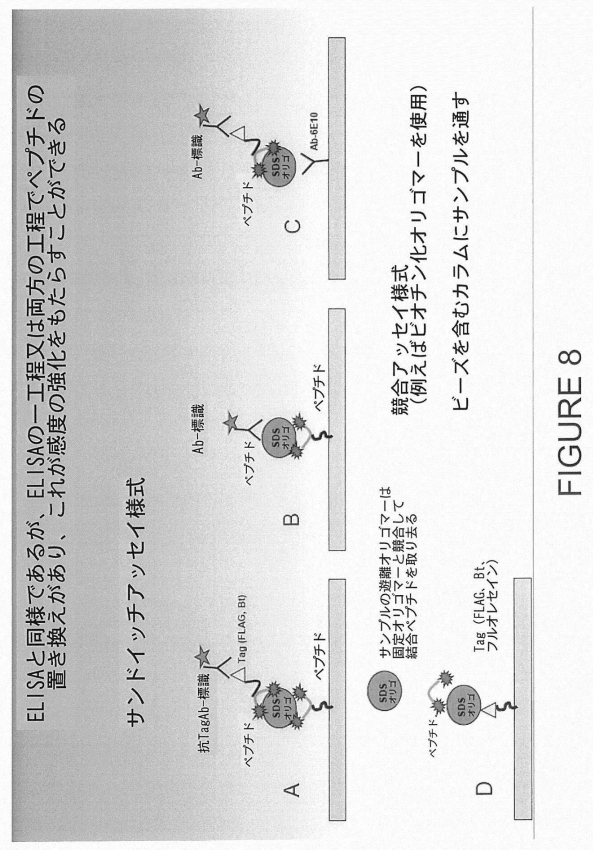


FIGURE 8

【図 9】

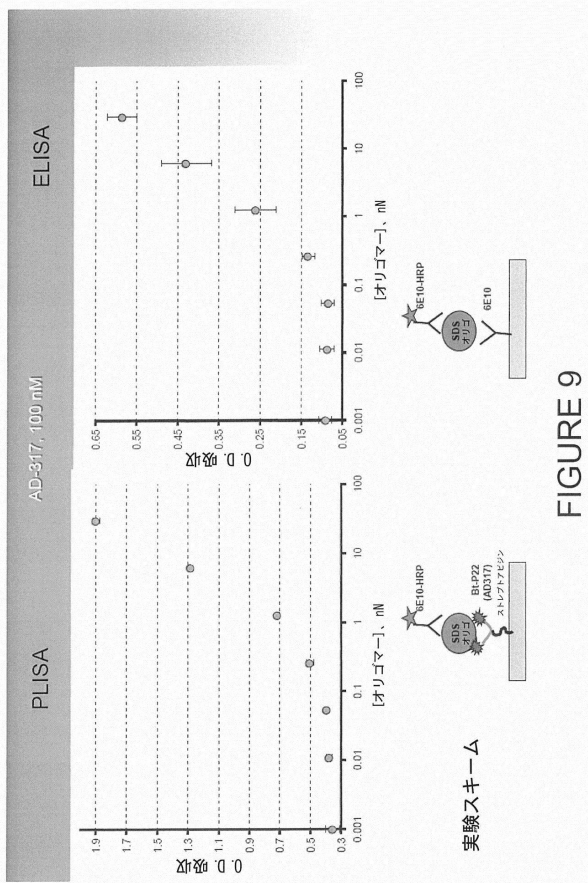


FIGURE 9

【図 10】

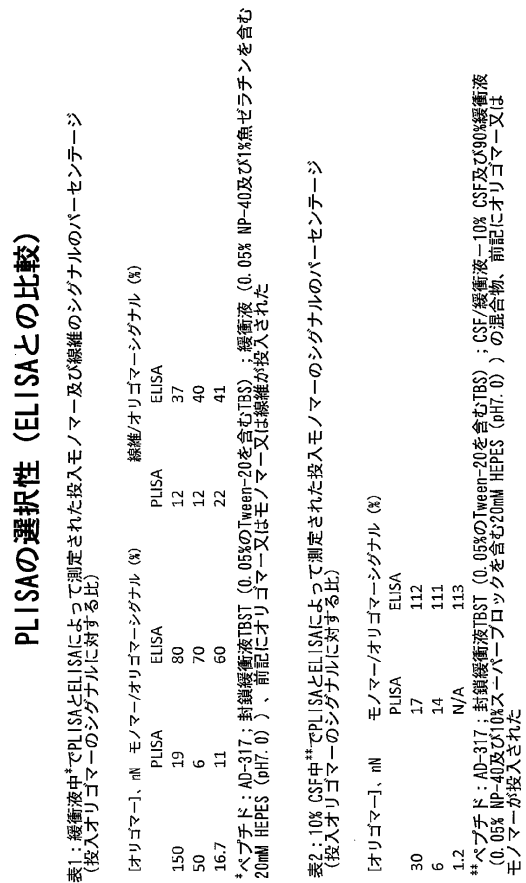
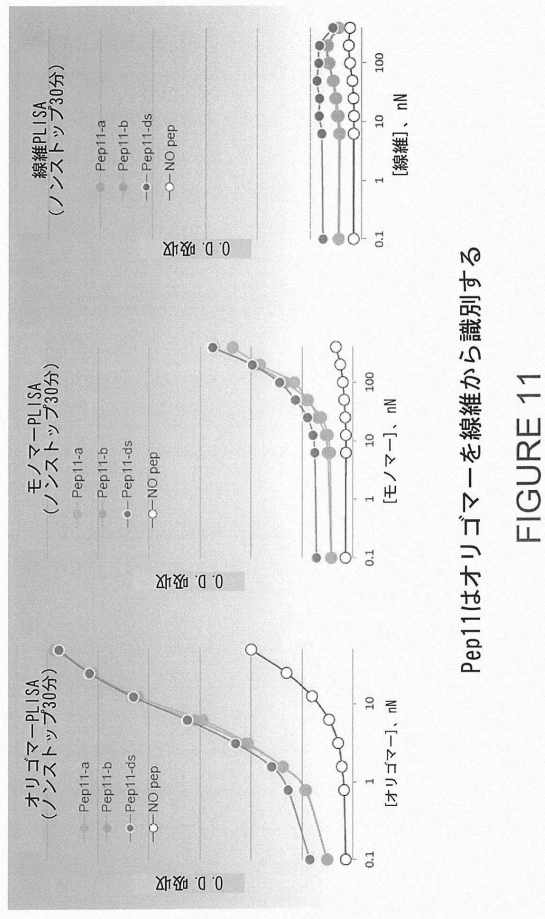


FIGURE 10

【図 1 1】



Pep11はオリゴマーを線維から識別する

FIGURE 11

【図 1 3】

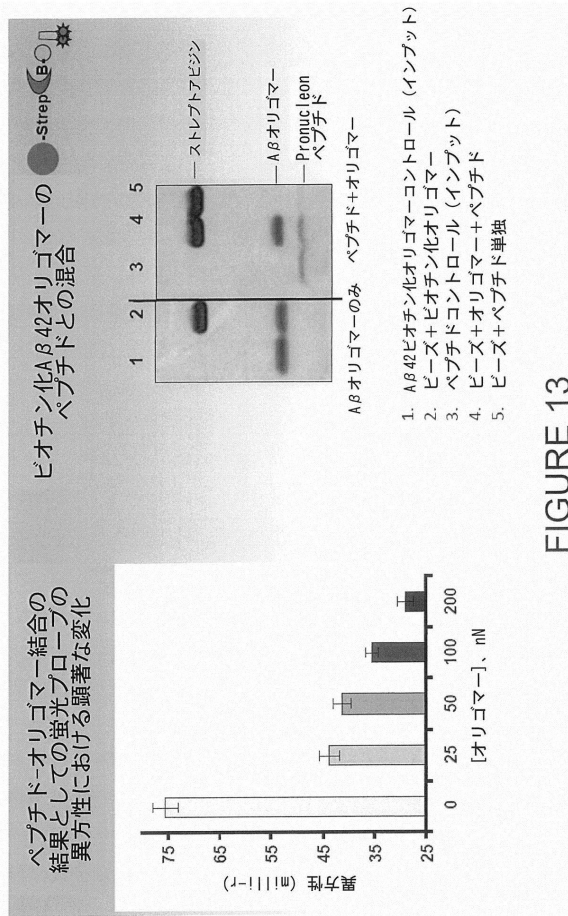


FIGURE 13

【図 1 2】

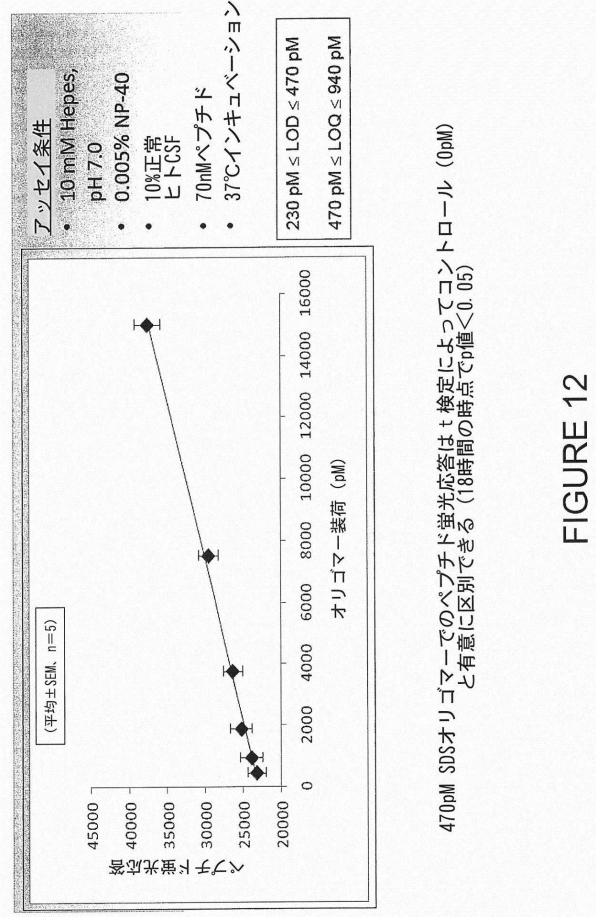


FIGURE 12

【図 1 4】

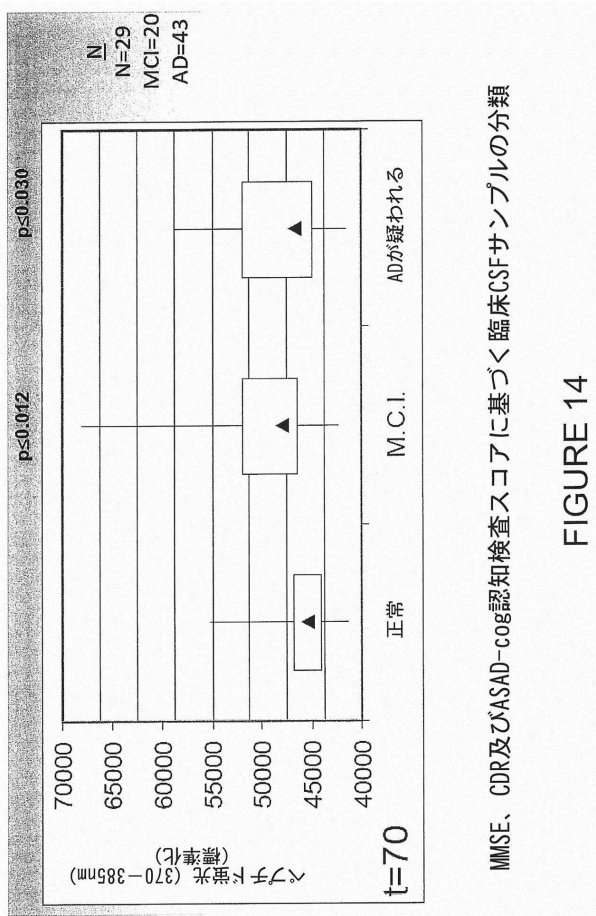


FIGURE 14

【配列表】

0006675403000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治
- (74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
- (74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
- (74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄
- (72)発明者 クリフ リチャード オー
アメリカ合衆国 ヴァージニア州 22030 フェアファックス ウェイブルズ ミル ロード
11250 スイート 300 システム オブ システムズ アナリティクス インコーポレ
イテッド内
- (72)発明者 フラワー ロバート ダブリュー
アメリカ合衆国 ヴァージニア州 22030 フェアファックス ウェイブルズ ミル ロード
11250 スイート 300 システム オブ システムズ アナリティクス インコーポレ
イテッド内
- (72)発明者 マトヴェーエワ エフゲニア ジー
アメリカ合衆国 ヴァージニア州 22030 フェアファックス ウェイブルズ ミル ロード
11250 スイート 300 システム オブ システムズ アナリティクス インコーポレ
イテッド内

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特表2014-514576 (JP, A)
特表2009-544954 (JP, A)
特表2012-513973 (JP, A)
特表2013-513791 (JP, A)
米国特許出願公開第2013/0295095 (US, A1)
国際公開第2011/056958 (WO, A2)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98
Caplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)