

(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2011-529084

(P2011-529084A)

(43) 公表日 平成23年12月1日(2011.12.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47 Z N A	4 C O 8 4
C40B 40/10 (2006.01)	C 4 O B 40/10	4 C O 8 5
A61K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H O 4 5
A61P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A61K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 164 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-520233 (P2011-520233)
 (86) (22) 出願日 平成21年7月24日 (2009.7.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年3月16日 (2011.3.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/051721
 (87) 国際公開番号 W02010/011947
 (87) 国際公開日 平成22年1月28日 (2010.1.28)
 (31) 優先権主張番号 61/083,589
 (32) 優先日 平成20年7月25日 (2008.7.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

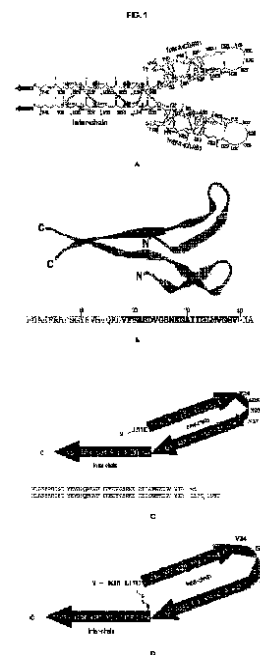
(71) 出願人 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
 パーク アボット パーク ロード 10
 O
 (71) 出願人 511020748
 アボット ゲーエムペーハー ウント カ
 ンパニー カーゲー
 ドイツ国、67061・ルードビヒスハー
 フェン、クノルシュトラッセ・50
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロイドβペプチド類似体、これらのオリゴマー、前記類似体またはオリゴマーを調製するためのプロセスおよび前記類似体またはオリゴマーを含む組成物ならびにこれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、(i) ループを形成しており、(ii) 天然Aβペプチドまたはその一部のアミノ酸配列と少なくとも66%の同一性を有し、(iii) 少なくとも6個の連続アミノ酸残基を含み、(iv) 相互に共有結合している少なくとも2個の非連続アミノ酸残基を有するアミノ酸配列またはこのペプチド模倣物を含むアミロイドβペプチド類似体に関し、前記アミロイドβペプチド類似体を含むオリゴマーに関し、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを調製するプロセスに関し、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを含む組成物に関し、ならびにアミロイドーシスを(例えば能動免疫法によって)治療するまたは予防するため、アミロイドーシスを診断するためおよびアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質を提供するための使用などのアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用に関する。本発明はアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質(例えば抗体)、作用物質を含む組成物ならびにアミロイドーシスを(例えば受動免疫法によって)治療するまたは予防



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列を含むアミロイドβペプチド類似体であって、前記配列は(i)ループを形成しており、(ii)天然ヒトAβペプチドまたはその一部と少なくとも66%の同一性を有し、(iii)少なくとも6個の連続アミノ酸残基を含み、(iv)相互に共有結合している少なくとも2個の非連続アミノ酸残基を有する、アミロイドβペプチド類似体。

【請求項 2】

アミノ酸配列を含むアミロイドβペプチド類似体であって、前記配列は(i)ループを形成しており、(ii)天然ヒトAβペプチドまたはその一部と少なくとも66%の同一性を有し、(iii)少なくとも6個の連続アミノ酸残基を含み、(iv)相互に共有結合している少なくとも2個の非連続アミノ酸残基を有する、アミロイドβペプチド類似体。

10

【請求項 3】

ループがβ-ヘアピンループである、請求項1または2のアミロイドβペプチド類似体。

【請求項 4】

天然Aβヒトペプチドまたはその一部がAβ(X...Y)であり、Xが1...23、15...23または18...22の数からなる群から選択され、ならびにYが28...43または28...43の数からなる群から選択される、請求項1から3のいずれか一項のアミロイドβペプチド類似体。

20

【請求項 5】

6個の連続アミノ酸残基が配列VGSNもしくはDVGSNKまたはAEDを含む、請求項1から4のいずれか一項のアミロイドβペプチド類似体。

【請求項 6】

アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が配列F₁₉X₂₀A₂₁-Q-A₃₀I₃₁I₃₂(X₂₀は1個のアミノ酸を表し、Qは配列VGSNを含むアミノ酸配列である。)を含む、請求項1から5のいずれか一項のアミロイドβペプチド類似体。

【請求項 7】

アミノ酸配列Qの少なくとも一部がループを形成しており、ならびにアミノ酸配列F₁₉X₂₀A₂₁とA₃₀I₃₁I₃₂とが逆平行配向にある、請求項6のアミロイドβペプチド類似体。

30

【請求項 8】

アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が、配列番号1-368からなる群から選択される配列を含み、前記配列の少なくとも2個のアミノ酸残基が、配列内共有結合を形成するように修飾されている、請求項1から7のいずれか一項のアミロイドβペプチド類似体。

【請求項 9】

アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が、配列番号369-698からなる群から選択される配列であり、

40

X₁₂が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₃が、ヒスチジン、チロシン、セリン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₄が、ヒスチジン、チロシン、セリン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₅が、グルタミン、アスパラギン、メチオニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₆が、リジン、アルギニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

50

X₁₇ が、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₈ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₉ が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₀ が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₁ が、アラニン、バリン、グリシン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₂ が、グルタミン酸、アスパラギン酸または配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₉ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₀ が、アラニン、バリン、グリシン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₁ が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₂ が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₃ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₄ が、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₅ が、メチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₆ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₇ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₈ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₉ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀、X₂₁ および X₂₂ からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基と X₂₉、X₃₀、X₃₁、X₃₂、X₃₃、X₃₄、X₃₅、X₃₆、X₃₇、X₃₈、X₃₉ からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している、請求項 1 から 8 のいずれか一項のアミロイド β ペプチド類似体。

【請求項 10】

アミロイド β ペプチド類似体のアミノ酸配列が配列 X₂₀ - Q - X₂₄ X₂₅ X₂₆ X₂₇ X₂₈ X₂₉ A₃₀ I₃₁ を含み、X₂₀、X₂₄、X₂₅、X₂₆、X₂₇、X₂₈、X₂₉ がそれぞれ独立にアミノ酸を表し、ならびに Q が配列 A E D を含むアミノ酸配列である、請求項 1 から 5 のいずれか一項のアミロイド β ペプチド類似体。

【請求項 11】

アミノ酸配列 X₂₄ X₂₅ X₂₆ X₂₇ の少なくとも一部がループを形成しており、ならびにアミノ酸配列 X₂₀ A₂₁ E₂₂ D₂₃ と X₂₈ X₂₉ A₃₀ I₃₁ とが逆平行配向にある、請求項 10 のアミロイド β ペプチド類似体。

【請求項 12】

アミロイド β ペプチド類似体のアミノ酸配列が、配列番号 699-960 からなる群か

10

20

30

40

50

ら選択される配列であり、

X₁₂ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₃ が、ヒスチジン、チロシン、セリン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₄ が、ヒスチジン、チロシン、セリン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₅ が、グルタミン、アスパラギン、メチオニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₆ が、リジン、アルギニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

10

X₁₇ が、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₈ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₉ が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₀ が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₄ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

20

X₂₅ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₆ が、セリン、グリシン、アラニン、スレオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₇ が、アルパラギン、グルタミン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₈ が、リジン、アルギニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₉ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

30

X₃₀ が、アラニン、バリン、グリシン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₁ が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₂ が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₃ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₄ が、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

40

X₃₅ が、メチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₆ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₇ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₈ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₉ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のア

50

ミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、
 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{20} からなる群
 から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基と X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} 、 X_{32} 、 X_{33} 、 X_{34} 、 X_{35} 、 X_{36} 、 X_{37} 、 X_{38} 、 X_{39} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している、請求項1から5のいずれか一項のアミロイドβペプチド類似体。

【請求項13】

請求項1から12のいずれか一項に定義される複数のアミロイドβペプチド類似体を含むオリゴマー。

【請求項14】

(i i i) ペプチドまたはこのペプチド模倣物を提供するステップ、

(i v) ペプチドまたはペプチド模倣物を、結合が形成するのに十分な条件に供するステップ
 を含む、請求項1から12のいずれか一項に定義されるアミロイドβペプチド類似体を調製するためのプロセス。

【請求項15】

(i) ペプチドまたはこのペプチド模倣物を提供するステップ、

(i i) ペプチドまたはペプチド模倣物をオリゴマーおよび結合が形成するのに十分な条件に供するステップ
 を含む、請求項13に定義されるオリゴマーを調製するためのプロセス。

【請求項16】

請求項1から13のいずれか一項に定義されるアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを含み、ならびに薬学的に許容される担体を必要に応じて含む、ワクチンなどの組成物。

【請求項17】

アルツハイマー病などのアミロイドーシスまたはダウン症候群のアミロイドーシスを治療するまたは予防する際の能動免疫法のための医薬組成物を調製するための、請求項1から13のいずれか一項に定義されるアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用。

【請求項18】

アルツハイマー病などのアミロイドーシスまたはダウン症候群のアミロイドーシスを診断するための組成物を調製するための、請求項1から13のいずれか一項に定義されるアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用。

【請求項19】

a) 対象の1つ以上の作用物質をアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに、1つ以上の作用物質がアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合するのに十分な時間および条件下でさらすステップ、およびb) アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合するこれらの作用物質を同定するステップを含む、請求項1から13のいずれか一項に定義されるアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質を同定する方法。

【請求項20】

i) アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを含む抗原を提供するステップ、

i i) 抗体レパートリーを前記抗原にさらすステップ、および

i i i) アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合する抗体を前記レパートリーから選択するステップ

を含む、請求項1から13のいずれか一項に定義されるアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる抗体を提供する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

(発明の分野)

本発明は、アミロイドβペプチド類似体、複数の前記アミロイドβペプチド類似体を含むオリゴマー、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを調製するためのプロセス、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを含む組成物ならびにアミロイドーシスを（例えば能動免疫法によって）治療または予防するため、アミロイドーシスを診断するためおよびアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質を提供するための使用などのアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用に関する。本発明は、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質（例えば抗体）、作用物質を含む組成物、ならびにアミロイドーシスを（例えば受動免疫法によって）治療または予防するためおよびアミロイドーシスを診断するための使用などの作用物質の使用も記載している。

10

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

1907年に医師アロイス・アルツハイマーは、後に彼に敬意を示してアルツハイマー病（AD）と名付けられる認知症の一形態の神経病理学的特性を初めて記載した。詳細にはADは、65才を超える人口における約10%の発症率を有して高齢者での認知症における最多原因である。加齢に伴って疾病の可能性も増加する。全世界では、約1500万人がこの疾患に罹っており、平均余命のさらなる延長によりこの疾患に罹患する人々の数が今後10年にわたって約3倍まで増加することが予想されている。

20

【0003】

分子的な観点からアルツハイマー病（AD）は、異常に凝集したタンパク質の沈着によって特徴付けられる。細胞外アミロイドプラークの場合、これらの沈着は主にアミロイドβペプチド線維からなり、細胞内神経原線維変化（NFT）の場合は主にタウタンパク質からなる。アミロイドβ（Aβ）ペプチドは、βアミロイド前駆体タンパク質からタンパク質切断によって生じる。この切断は、α-、β-およびγ-セクレターゼと称されるいくつかのプロテアーゼの協同的な活性によってもたらされる。切断は、異なる長さの多数の特異的断片を生じる。アミロイドプラークは、主に長さ40または42アミノ酸のペプチド（Aβ40、Aβ42）からなる。主要な切断産物はAβ40であるが、Aβ42ははるかに強い毒性効果を有する。アルツハイマー病において観察されるものとよく似た脳アミロイド沈着および認知障害は、出生800回に約1回の頻度で生じるダウン症候群（21トリソミー）の特徴でもある。

30

【0004】

ハーディーおよびヒギンスのアミロイドカスケード仮説は、Aβ（1-42）の産生の増加が前原線維および原線維（すなわちAβプラークの主要な要素）の形成を生じ、これらの原線維がアルツハイマー病の症状に関与すると仮定した。認知症の重症度と沈着したAβプラーク量との間の相間性が乏しいにもかかわらず、この仮説は最近まで支持されていた。

【0005】

US 7, 342, 091は、残基Gln15とVal24（APPにおいて686および695）との間の領域間にペプチド内架橋を有するアミロイドβペプチドの可溶性環状類似体を、架橋形成に関与する2個のアミノ酸を相対的にi+3、i+4、i+5、i+6またはi+7離して配置して記載している。具体的にはAβペプチドのAsp17およびLys21（APP番号付けでは残基688および692）の側鎖は共有結合を介して結合されている。US 7, 342, 091において記載のアミロイドβペプチドの可溶性環状類似体は、内在性Aβペプチドによるアミロイド生成またはアミロイド形成を阻害するように設計されている。つまり可溶性環状類似体は、Aβペプチドと物理学的に相互作用し、アミロイドの形成を阻止すると推定される。

40

【0006】

プラーク量よりもAD症状によりよく相関するAD脳中の可溶性Aβ形態の発見は、し

50

かしアミロイドカスケード仮説の改訂を導いた。

【0007】

ほとんどの条件下でアミロイドβペプチドは、原線維形態に迅速に転換する。しかし、界面活性剤または脂肪酸の添加は、マウスおよびウサギにおいて特異的抗体を誘発する強力な抗原である長寿命の可溶性形態を生じ得る(WO 2004/067561、WO 2006/094724、S. Barghornら、J. Neurochem. 95、834(2005))。これらは、海馬細胞培養物中でニューロンの樹状突起に結合し、ラット海馬切片において長期増強を完全に遮断することが示されている。これらのデータは、インビトロで調製された可溶性形態に類似する構造的特性を有するアミロイドβペプチドがインビボにも存在することを示唆している。

10

【0008】

より具体的には、WO 2004/067561は、Aβ(1-42)ペプチドの球状オリゴマー(「球状体」)およびこれらを調製するためのプロセスに関する。データは、1つ以上の特有の抗原決定基(本明細書以下で球状体抗原決定基と称する。)を提示するAβオリゴマーへのAβフォールディングおよび構築についてアミロイド原線維非依存性経路の存在を示唆している。球状体抗原決定基がAD患者およびAPP遺伝子導入マウスの脳で検出されたことおよび球状体がニューロンに特異的に結合しLTPを遮断することから、球状体は病理学的に関連するAβ配座異性体を意味している。WO 2004/067561は、球状体の限定的タンパク質分解がAβ(20-42)またはAβ(12-42)球状体などの前記球状体の切断バージョンを生じることをさらに記載している。これらのAβ(20-42)およびAβ(12-42)球状体は、球状体特異的抗体を生成するために使用されている。例えばWO 2007/062852は、Aβ(20-42)球状体の特異的に認識する数個のモノクローナル抗体を記載している。

20

【0009】

WO 2006/094724は、非拡散性球状Aβ(X-38...43)オリゴマーに関し、Xは1...24の数からなる群から選択される。これらの球状体は、WO 2004/067561での記載と同じプロセスによって、すなわちAβ(1-38...43)球状体を生成するためのAβ(1-38...43)ペプチドのSDSまたは脂肪酸誘発オリゴマー形成およびこれらの切断バージョン(すなわちXが2...24の数からなる群から選択されるAβ(X-38...43)球状体)を生成するためのAβ(1-38...43)球状体の限定タンパク質分解によって入手可能であると述べられている。

30

【0010】

WO 2004/067561およびWO 2006/094724の両方は、球状体をグルタルジアルデヒドなどの架橋剤と反応させることによって得られる架橋結合した球状体も記載している。架橋結合は、Lys-28を残す(したがってAβ(1-42)球状体の内部に隠されなければならない。)一方でN末端とLys-16のアミノ基の間にのみ生じることが観察された。得られた架橋結合は分子内よりもむしろ主に分子間である。

【0011】

WO 2007/064917は、アミロイドβペプチドの組換え形態のクローニング、発現および単離を記載している。大腸菌(E. coli)で発現されたペプチドは、そのN末端メチオニン残基を完全に保持しており、位置0から位置42までアミロイドベータの天然配列(本明細書以下でN-Met Aβ(1-42)と称する。)を示している。

40

【0012】

Aβ-(1-42)ペプチドと同様に、N-Met Aβ-(1-42)ペプチドの調製物に脂肪酸または炭化水素界面活性剤のいずれかを添加することは、オリゴマーの状態が残留界面活性剤(SDS)または脂質様添加物の量に依存することが観察された安定な可溶性凝集体の形成をもたらす。0.2% SDSの存在下でアミロイドβペプチドは、小さな可溶性凝集体(本明細書以下でN-Met Aβ(1-42)前球状体と称する。)を形成し、次いでSDS濃度が0.05%に希釈されると、より高MWの可溶性凝集体(本明

50

細書以下でN-MetA β (1-42) 球状体と称する。)に転換され得る。沈降研究に基づくN-MetA β (1-42) 前球状体は、MW 16 kDa (約4ペプチド/可溶性凝集体に相当する。)を有し、一方N-MetA β (1-42) 球状体は、MW 約64 kDa (約14-16ペプチド/可溶性凝集体に相当する。)を有する。

【0013】

N-MetA β (1-42) 前球状体の生物物理学的および構造的な特徴付けは、原線維の構造研究において見出された全ての平行アミロイド β ペプチドとは異なる混ざりあった分子間平行/分子内逆平行 β シートを含有することを明らかにした。

【0014】

球状体形成の前記方法は、高収率で均一なA β オリゴマー調製を成立させる能力において大きな一步を示している。しかし、この方法でさえもドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を除去すると徐々に、ある程度の不均一性を示す製剤を生じる場合がある。加えて、球状体抗原決定基の最良の提示のために行われている切断は、しばしば不均一性をさらに増加させ、A β 球状体の安定性を減少させる。これらの問題は、系からSDSが除去される場合にだけ増大する。加えて、N-末端切断A β 球状体は界面活性剤の非存在下では非常に低い可溶性を示す。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】米国特許第7,342,091号明細書

【特許文献2】国際公開第2004/067561号

【特許文献3】国際公開第2006/094724号

【特許文献4】国際公開第2007/062852号

【特許文献5】国際公開第2007/064917号

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】S. Barghornら、J. Neurochem. 95、834 (2005)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

したがってモノマーまたはオリゴマーである場合と同様の関連する高次構造または抗原決定基を提示するアミロイド β ペプチド類似体を提供することが本発明の目的であった。好ましくは、そのようなアミロイド β ペプチド類似体またはこのオリゴマーは、周知の球状体よりよい物理的/化学的特性を示し、例えば、より小さなサイズ、増強された均一性、増強された安定性、寿命の増大および/またはインビボでのプロテアーゼへのより強い耐性を示す。よりよい再現性もさらなる有利点となる。

【課題を解決するための手段】

【0018】

(発明の要旨)

本発明は、1)アルツハイマー病の進行に関与する毒性応答(A β ミスフォールドペプチド中に包含された「毒素」、2)この高次構造に対して特異的であり、CSFおよび血漿に検出可能な内在性の生理的単量体A β ペプチドに交差反応しない治療関連抗体の生成ならびに/もしくは3)ポリクローナルであるがこの毒性高次構造に単一特異性であり、CSFおよび血漿に検出可能な内在性の生理的単量体A β ペプチドに交差反応しない抗体応答を誘発する能動免疫法による免疫応答の発生、のために重要な抗原決定基を提示するA β ペプチドまたはその一部の安定化された高次構造を提供する。この安定化は、ペプチドまたはこのペプチド模倣物を両者がより安定に必要な抗原決定基を提示する高次構造に固定する分子内共有結合によって達成される。これらの安定化されたペプチドまたはペプチド模倣物の望ましい効力は、標準的免疫測定(例えば免疫沈降、ELISA、ドット

10

20

30

40

50

プロット)において、WO 2007/064972およびWO 2007/062852に記載のとおり利用できる球状体選択抗体での交差反応によって、またはAβペプチドの毒性を評価するために使用される標準的細胞アッセイにおいて容易に測定され得る。

【0019】

第1の態様によれば、本発明は、(i)ループを形成しており、(ii)天然Aβペプチドまたはその一部のアミノ酸配列と少なくとも66%の同一性を有し、(iii)少なくとも6個の連続アミノ酸残基を含み、(iv)相互に共有結合している少なくとも2個の非連続アミノ酸残基を有するアミノ酸配列を含むアミロイドβペプチド類似体に関する。

【0020】

第2の態様によれば、本発明は、本明細書において定義の前記アミノ酸配列のペプチド模倣物を含むアミロイドβペプチド類似体にも関する。

【0021】

アミロイドβペプチド類似体の具体的な実施形態は、
 ループがβヘアピンループであるアミロイドβペプチド類似体；
 天然Aβヒトペプチドまたはその一部がAβ(X...Y)であり、Xが1...23の数からなる群から選択され、Yが28...43の数からなる群から選択される、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；
 Xが15...23の数からなる群から選択される、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体；
 Xが18...22の数からなる群から選択される、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体；
 Yが28...43の数からなる群から選択される、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体；
 天然Aβペプチドまたはその一部が、配列番号1-368からなる群から選択される配列を有する、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；
 6個の連続アミノ酸残基が配列VGSNまたはDVGSNKを含む、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；
 6個の連続アミノ酸残基が配列AEDを含む、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；
 アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が配列X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃-VGSN-X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁X₃₂を含み、X₁₉、X₂₀、X₂₁、X₂₂、X₂₃、X₂₈、X₂₉、X₃₀、X₃₁、X₃₂がそれぞれ独立に、他のアミノ酸と共有結合できるアミノ酸を表す、前記実施形態のいずれか1つに記載のアミロイドβペプチド類似体；
 アミノ酸配列X₁₉X₂₀X₂₁とX₃₀X₃₁X₃₂とが逆平行配向にある、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体；
 X₁₉が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体；
 X₂₀が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；
 X₂₁が、アラニン、バリン、グリシンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；
 X₂₂が、グルタミン酸およびアスパラギン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；
 X₂₃が、グルタミン酸およびアスパラギン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；
 X₂₈が、リジンおよびアルギニンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記

10

20

30

40

50

実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

X₂₉が、グリシン、アラニンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

X₃₀が、アラニン、バリン、グリシンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

X₃₁が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

X₃₂が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が配列F₁₉X₂₀A₂₁—Q—A₃₀I₃₁I₃₂を含み、X₂₀がアミノ酸を表し、Qが配列VGSNを含むアミノ酸配列である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

アミノ酸配列Qの少なくとも一部がループを形成している、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体；

アミノ酸配列Qが5、6、7または8個のアミノ酸残基からなる、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体；

アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が配列F₁₉X₂₀A₂₁X₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈X₂₉A₃₀I₃₁I₃₂を含み、X₂₀、X₂₂、X₂₉がそれぞれ独立にアミノ酸残基を表す、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

アミノ酸配列F₁₉X₂₀A₂₁およびA₃₀I₃₁I₃₂が逆平行配向にある、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体；

F₁₉(NH)—I₃₂(NH)、F₁₉(NH)—I₃₂(HB)、F₁₉(NH)—I₃₂(CG2)、A₂₁(NH)—A₃₀(NH)、A₂₁(NH)—A₃₀(CB)、A₂₁(NH)—I₃₁(CD1)、A₂₁(NH)—I₃₁(CG2)、I₃₂(NH)—F₁₉(CD1)、I₃₂(NH)—F₁₉(CD2)、I₃₂(HN)—F₁₉(CB)およびA₃₀(NH)—A₂₁(CB)からなる群から選択される少なくとも1つの原子対についてのプロトン間距離が1.8から6.5オングストロームである、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

原子対F₁₉(CO)—I₃₂(N)、I₃₂(CO)—F₁₉(N)、A₂₁(CO)—A₃₀(N)およびA₃₀(CO)—A₂₁(N)が3.3±0.5Åの距離にあり、式中COが主鎖酸素原子を示し、残基のファイ(φ)角が-180から-30の範囲であり、残基のプサイ(ψ)角がおよそ60から180またはおよそ-180から-150の範囲である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が配列番号1-368からなる群から選択される配列を含み、前記配列の少なくとも2個のアミノ酸残基が、配列内共有結合を形成するように修飾されている、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が配列番号369-698からなる群から選択される配列であり、

X₁₂が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₃が、ヒスチジン、チロシン、セリン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₄が、ヒスチジン、チロシン、セリン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₅が、グルタミン、アスパラギン、メチオニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₆が、リジン、アルギニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ

10

20

30

40

50

酸残基であり、

X₁₇ が、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₈ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₉ が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₀ が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₁ が、アラニン、バリン、グリシン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₂ が、グルタミン酸、アスパラギン酸または配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₉ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₀ が、アラニン、バリン、グリシン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₁ が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₂ が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₃ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₄ が、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₅ が、メチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₆ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₇ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₈ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₉ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀、X₂₁ および X₂₂ からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基と X₂₉、X₃₀、X₃₁、X₃₂、X₃₃、X₃₄、X₃₅、X₃₆、X₃₇、X₃₈、X₃₉ からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している、前記実施形態のいずれか 1 つのアミロイド β ペプチド類似体；

X₁₂、X₁₃、X₁₄ からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基と X₃₇、X₃₈、X₃₉ からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している、前記実施形態のアミロイド β ペプチド類似体、X₁₃、X₁₄、X₁₅ からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基と X₃₆、X₃₇、X₃₈ からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している、前記実施形態のアミロイド β ペプチド類似体、X₁₄、X₁₅、X₁₆ からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基と X₃₅、X₃₆、X₃₇ からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している、前記実施形態のアミロイド β ペプチド類似体、X₁₅、X₁₆、X₁₇ からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基と X₃₄、X₃₅、X₃₆ からなる群から選択される少なくとも 1 個のア

10

20

30

40

50

ミノ酸残基とが相互に共有結合している、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{18} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基と X_{33} 、 X_{34} 、 X_{35} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体、 X_{17} 、 X_{18} 、 X_{19} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基と X_{32} 、 X_{33} 、 X_{34} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{20} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基と X_{31} 、 X_{32} 、 X_{33} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体、 X_{19} 、 X_{20} 、 X_{21} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基と X_{30} 、 X_{31} 、 X_{32} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体、 X_{20} 、 X_{21} および X_{22} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基と X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している、またはアミノ酸残基 X_{12} と X_{39} とが、 X_{13} と X_{38} とが、 X_{14} と X_{37} とが、 X_{15} と X_{36} とが、 X_{16} と X_{35} とが、 X_{17} と X_{34} とが、 X_{18} と X_{33} とが、 X_{19} と X_{32} とが、 X_{20} と X_{31} とが、 X_{21} と X_{30} とがまたは X_{22} と X_{29} とが相互に共有結合している、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体；

アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が配列 $X_{20}A_{21}E_{22}D_{23}-X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$ を含み、 X_{20} 、 X_{24} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{27} 、 X_{28} 、 X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} がそれぞれ独立に、他のアミノ酸に共有結合できるアミノ酸を表す、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

アミノ酸配列 $X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}$ と $X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$ とが逆平行配向にある、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体；

X_{20} が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体；

X_{24} が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

X_{25} が、グリシン、アラニンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

X_{26} が、セリン、グリシン、アラニンおよびスレオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

X_{27} が、アスパラギン、グルタミンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

X_{28} が、リジンおよびアルギニンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

X_{29} が、グリシン、アラニンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

X_{30} が、アラニン、バリン、グリシンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

X_{31} が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が配列 $X_{20}-Q-X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}A_{30}I_{31}$ を含み、 X_{20} 、 X_{24} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{27} 、 X_{28} 、 X_{29} がそれぞれ独立にアミノ酸を表し、Qが配列AEDを含むアミノ酸配列である前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

10

20

30

40

50

アミノ酸配列 $X_{24} X_{25} X_{26} X_{27}$ の少なくとも一部がループを形成している、前記実施形態のアミロイド β ペプチド類似体；

アミノ酸配列 Q が 3、4、5 または 6 個のアミノ酸残基からなる、前記実施形態のアミロイド β ペプチド類似体；

アミロイド β ペプチド類似体のアミノ酸配列が配列 $X_{20} A_{21} E_{22} D_{23} X_{24} X_{25} X_{26} X_{27} X_{28} X_{29} A_{30} I_{31}$ を含み、 X_{20} 、 X_{24} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{27} 、 X_{28} 、 X_{29} がそれぞれ独立にアミノ酸残基を表す、前記実施形態のいずれか 1 つのアミロイド β ペプチド類似体；

アミノ酸配列 $X_{20} A_{21} E_{22} D_{23}$ と $X_{28} X_{29} A_{30} I_{31}$ とが逆平行配向にある、前記実施形態のアミロイド β ペプチド類似体；

$A_{21} (NH) - A_{30} (NH)$ 、 $A_{21} (NH) - A_{30} (CB)$ 、 $A_{21} (NH) - I_{31} (CD1)$ 、 $A_{21} (NH) - I_{31} (CG2)$ および $A_{30} (NH) - A_{21} (CB)$ からなる群から選択される少なくとも 1 つの原子対についてのプロトン間距離が 1.8 から 6.5 オングストロームである、前記実施形態のアミロイド β ペプチド類似体；
原子対 $A_{21} (CO) - A_{30} (N)$ および $A_{30} (CO) - A_{21} (N)$ が 3.3 ± 0.5 Å の距離にあり、式中 CO が主鎖酸素原子を示し、残基のファイ (ϕ) 角が -180 から -30 の範囲であり、残基のプサイ (ψ) 角がおよそ 60 から 180 またはおよそ -180 から -150 の範囲である、前記実施形態のいずれか 1 つのアミロイド β ペプチド類似体；

アミロイド β ペプチド類似体のアミノ酸配列が配列番号 699-960 からなる群から選択される配列であり、

X_{12} が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X_{13} が、ヒスチジン、チロシン、セリン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X_{14} が、ヒスチジン、チロシン、セリン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X_{15} が、グルタミン、アスパラギン、メチオニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸であり、

X_{16} が、リジン、アルギニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X_{17} が、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X_{18} が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X_{19} が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X_{20} が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X_{24} が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X_{25} が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X_{26} が、セリン、グリシン、アラニン、スレオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X_{27} が、アスパラギン、グルタミン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X_{28} が、リジン、アルギニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X_{29} が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合してい

10

20

30

40

50

るアミノ酸残基であり、

X₃₀ が、アラニン、バリン、グリシン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₁ が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₂ が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₃ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₄ が、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₅ が、メチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₆ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₇ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₈ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₉ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX₂₉、X₃₀、X₃₁、X₃₂、X₃₃、X₃₄、X₃₅、X₃₆、X₃₇、X₃₈、X₃₉ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体；

X₁₂、X₁₃、X₁₄ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX₃₇、X₃₈、X₃₉ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合しており、X₁₃、X₁₄、X₁₅ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX₃₆、X₃₇、X₃₈ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合しており、X₁₄、X₁₅、X₁₆ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX₃₅、X₃₆、X₃₇ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合しており、X₁₅、X₁₆、X₁₇ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX₃₄、X₃₅、X₃₆ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合しており、X₁₆、X₁₇、X₁₈ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX₃₃、X₃₄、X₃₅ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合しており、X₁₇、X₁₈、X₁₉ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX₃₂、X₃₃、X₃₄ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合しており、X₁₈、X₁₉、X₂₀ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX₃₁、X₃₂、X₃₃ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合しており、X₁₉、X₂₀ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX₃₀、X₃₁、X₃₂ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合しており、アミノ酸残基X₂₀とX₂₉、X₃₀、X₃₁ からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している、またはアミノ酸残基X₁₂とX₃₉とが、X₁₃とX₃₈とが、X₁₄とX₃₇とが、X₁₅とX₃₆とが、X₁₆とX₃₅とが、X₁₇とX₃₄とが、X₁₈とX₃₃とが、X₁₉とX₃₂とが、またはX₂₀とX₃₁とが相互に共有結合している、前記実施形態のアミロイドβペプチド類似体；

アミノ酸残基がその側鎖を介して共有結合している、前記実施形態のいずれか1つのアミ

10

20

30

40

50

ロイド β ペプチド類似体；

アミノ酸残基の側鎖が、チオール基、アミノ基、カルボキシ基および水酸基からなる群から独立に選択される官能基を有する、前記実施形態のアミロイド β ペプチド類似体；

他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基が、システイン、リジン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基である、前記実施形態のいずれか 1 つのアミロイド β ペプチド類似体；

システインとシステインとの、システインとリジンとの、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸とリジンとの、またはリジンとリジンとの側鎖が相互に共有結合している、前記実施形態のアミロイド β ペプチド類似体；

側鎖が直接共有結合を介して共有結合している、前記実施形態のいずれか 1 つのアミロイド β ペプチド類似体；

側鎖がリンカーを介して共有結合している、前記実施形態のいずれか 1 つのアミロイド β ペプチド類似体；

リンカーがホモ二官能性またはヘテロ二官能性リンカーである、前記実施形態のアミロイド β ペプチド類似体；

リンカーが光反応性リンカーである、前記実施形態のアミロイド β ペプチド類似体；

共有結合がジスルフィド結合を含む、前記実施形態のいずれか 1 つのアミロイド β ペプチド類似体；

共有結合がアミド結合を含む、前記実施形態のいずれか 1 つのアミロイド β ペプチド類似体；

アミロイド β ペプチド類似体のアミノ酸配列が、2 個の非連続アミノ酸残基間の 1 つの共有結合を含む、前記実施形態のいずれか 1 つのアミロイド β ペプチド類似体を含む。

【0022】

第 3 の態様によれば、本発明は、複数の前記アミロイド β ペプチド類似体を含むオリゴマーに関する。

【0023】

オリゴマーの詳細な実施形態は、

複数の、2 から 28 個のアミロイド β ペプチド類似体であるオリゴマー；

各アミロイド β ペプチド類似体のアミノ酸配列が、1 つのアミロイド β ペプチド類似体の配列 $L^A_{34} M^A_{35} V^A_{36} G^A_{37} G^A_{38}$ が他のアミロイド β ペプチド類似体の配列 $L^B_{34} M^B_{35} V^B_{36} G^B_{37} G^B_{38}$ と平行配向にある配列 $L_{34} M_{35} V_{36} G_{37} G_{38}$ を含む、前記実施形態のオリゴマー；

$M^A_{35} (NH) - V^B_{36} (NH)$ 、 $G^A_{37} (NH) - G^B_{38} (NH)$ 、 $L^A_{34} (NH) - L^B_{34} (C_8H_3)$ 、 $M^A_{35} (NH) - V^B_{36} (C_YH_3)$ からなる群から選択される少なくとも 1 つの原子対についてのプロトン間距離が 1.8 から 6.5 オングストロームである、前記実施形態のオリゴマー；

各アミロイド β ペプチド類似体のアミノ酸配列が、1 つのアミロイド β ペプチド類似体の配列 $G^A_{33} L^A_{34} M^A_{35} V^A_{36} G^A_{37} G^A_{38} V^A_{39}$ が他のアミロイド β ペプチド類似体の配列 $G^B_{33} L^B_{34} M^B_{35} V^B_{36} G^B_{37} G^B_{38} V^B_{39}$ と平行配向にある配列 $G_{33} L_{34} M_{35} V_{36} G_{37} G_{38} V_{39}$ を含む、前記実施形態のいずれか 1 つのオリゴマー；

$G^A_{33} (NH) - G^B_{34} (NH)$ 、 $M^A_{35} (NH) - V^B_{36} (NH)$ 、 $G^A_{37} (NH) - G^B_{38} (NH)$ 、 $L^A_{34} (NH) - L^B_{34} (C_8H_3)$ 、 $M^A_{35} (NH) - V^B_{36} (C_YH_3)$ 、 $G^A_{38} (NH) - V^B_{39} (C_YH_3)$ および $V^A_{39} (NH) - V^B_{39} (C_YH_3)$ からなる群から選択される少なくとも 1 つの原子対についてのプロトン間距離が 1.8 から 6.5 オングストロームである、前記実施形態のオリゴマー；

分子間平行 β シートを含む、前記実施形態のいずれか 1 つのオリゴマー；

β シートが、あるアミロイド β ペプチド類似体のアミノ酸配列 $G^A_{33} L^A_{34} M^A_{35}$

10

20

30

40

50

$V^A_{36} G^A_{37} G^A_{38} V^A_{39}$ および別のアミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列 $G^A_{33} L^A_{34} M^A_{35} V^A_{36} G^A_{37} G^A_{38} V^A_{39}$ を含む、前記実施形態のオリゴマー；

原子対 $G^A_{33} (CO) - L^B_{34} (N)$ 、 $L^B_{34} (CO) - M^A_{35} (N)$ 、 $M^A_{35} (CO) - V^B_{36} (N)$ 、 $V^B_{36} (CO) - G^A_{37} (N)$ および $G^B_{37} (CO) - G^A_{38} (N)$ が $3.3 \pm 0.5 \text{ \AA}$ の距離にあり、式中COが主鎖酸素原子を示し、残基のファイ(φ)角が -180 から -30 の範囲であり、残基のプサイ(ψ)角がおよそ 60 から 180 またはおおよそ -180 から -150 の範囲である、前記実施形態のオリゴマーを含む。

10

【0024】

さらなる詳細な実施形態は、American Type Culture Collectionにより寄託番号PTA-7241と指定された融合細胞から得られるモノクローナル抗体5F7、American Type Culture Collectionにより寄託番号PTA-7240と指定された融合細胞から得られるモノクローナル抗体7C6、American Type Culture Collectionにより寄託番号PTA-7405と指定された融合細胞から得られるモノクローナル抗体4D10またはAmerican Type Culture Collectionにより寄託番号PTA-7809と指定された融合細胞から得られるモノクローナル抗体7E5からなる群から選択されるモノクローナル抗体によって認識される抗原決定基を含む、前記実施形態のいずれか1つのアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを含む。

20

【0025】

本発明は、

(i) ペプチドまたはこのペプチド模倣物を提供するステップ、

(ii) ペプチドまたはペプチド模倣物を結合の形成に十分な条件に供するステップを含む、本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体を調製するためのプロセスにも関する。

【0026】

本発明は、

(i) ペプチドまたはこのペプチド模倣物を提供するステップ、

(ii) ペプチドまたはペプチド模倣物をオリゴマーおよび結合の形成に十分な条件に供するステップを含む、本明細書において定義のオリゴマーを調製するためのプロセスにも関する。

30

【0027】

プロセスの詳細な実施形態は、オリゴマー形成がその結合形成に先行するプロセスを含む。

【0028】

さらに本発明は、本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを含む組成物に関する。

【0029】

プロセスの詳細な実施形態は、ワクチンであり、薬学的に許容される担体をさらに含む組成物を含む。

40

【0030】

本発明は、アミロイドーシスを治療または予防するための医薬組成物を調製するための本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用に関し、それに対応する本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを対象に投与することを含む、それを必要とする対象においてアミロイドーシスを治療または予防する方法にも関する。

【0031】

使用および方法の詳細な実施形態は、

50

医薬組成物が能動免疫法用である使用および方法；
アミロイドーシスがアルツハイマー病であるまたはアミロイドーシスがダウン症候群のアミロイドーシスである、前記実施形態の使用および方法を含む。

【0032】

本発明は、アミロイドーシスを診断するための組成物を調製するための本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用に関し、それに対応するアミロイドーシスを有すると疑われる対象由来試料を提供するステップ、試料を本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーにアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーおよび抗体を含む複合体の形成に十分な時間および条件下で接触させるステップを含む、アミロイドーシスを診断する方法（複合体の存在は対象がアミロイドーシスを有することを示す。）にも関する。

10

【0033】

使用および方法の詳細な実施形態は、アミロイドーシスがアルツハイマー病であるまたはアミロイドーシスがダウン症候群のアミロイドーシスである使用および方法を含む。

【0034】

さらに本発明は、本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質を前記作用物質を含む製剤中で濃縮する方法に関し、この方法は、a) アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを作用物質を含む製剤に、作用物質がアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合するための十分な時間および条件下でさらすステップならびにb) 作用物質を濃縮された形態で得るステップを含む。

20

【0035】

使用および方法の詳細な実施形態は、作用物質が抗体、アプタマーまたは低分子化合物である使用および方法を含む。

【0036】

本発明はまた、

i) アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを含む抗原を提供するステップ、
i i) 抗体レパートリーを前記抗原にさらすステップおよび
i i i) 前記レパートリーからアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合する抗体を選択するステップ
を含む、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質を提供するための本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用に関し、それに対応する方法、例えば本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる抗体を提供する方法に関する。

30

【0037】

使用および方法の詳細な実施形態は、作用物質が抗体、非抗体結合分子、アプタマーまたは低分子化合物である使用および方法を含む。

【0038】

前記プロセスによって得られる抗体も、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質と同様に記載される。

40

【0039】

さらに本発明は、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質を含む組成物；アミロイドーシスを治療または予防するための医薬組成物を調製するための本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質の使用およびそれに対応する本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質を対象に投与するステップを含む、それを必要とする対象においてアミロイドーシスを治療または予防する方法；アミロイドーシスを診断するための組成物を調製するための本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質の使用およびそれに対応するアミロイドーシスを有すると疑われる対象由来の試料を提供するステップ、試料を本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合で

50

きる作用物質に、作用物質および抗原を含む複合体の形成に十分な時間および条件下で接触させるステップを含むアミロイドーシスを診断する方法（複合体の存在は対象がアミロイドーシスを有することを示す。）を記載する。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1-1】Aは3次元フォールドを明らかにするために使用した残基間NOE'sを示すAβ前球状体のNMR由来構造の略図であり、破線は観察されたNOE'sを示し、丸はNH/ND交換実験において低い交換を示す骨格アミドを表す。BはSDS中のAβ前球状体のNMR由来の構造を表すリボン図であり、明確な構造を有する残基を太字で強調している。

【図1-2】CはLeuからCysへの変異を示す、NMRでのAβ前球状体構造で観察された一単量体の略図である。DはLeuからCysへの変異およびそれにより生じたジスルフィド結合構造を表すNMRでのAβ前球状体構造で観察された一単量体の略図である。

【図2-1】AはS#6046:wt N-Met Aβ(1-42)ペプチド、Mut Pre:0.2% SDS中の(17C、34C) N-Met Aβ(1-42)変異ペプチド、Mut Post:0.05% SDS中の(L17C、L34C) N-Met Aβ(1-42)変異ペプチドで作製した球状体から形成された典型的Aβ球状体バンドパターンでのSDS-PAGEゲルの図である。標準物質（レーン1およびレーン5）は、ミオシン(210kDa)、ホスホリラーゼ(98kDa)、BSA(78kDa)、グルタミン酸脱水素酵素(55kDa)、アルコール脱水素酵素(45kDa)、炭酸脱水素酵素(34kDa)、ミオグロビン赤(17kDa)、リゾチーム(16kDa)、アプロチニン(7kDa)およびインスリン(4kDa)である。バンドパターンの性状は、約40-50kDaのバンドクラスター、約15kDaのバンドクラスターおよび約5kDaのバンド（単量体）である。

【図2-2】Bは1) マーカートンパク質、2) (14C、37C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、3) サーモリシン消化後の(14C、37C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、4) (15C、36C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、5) サーモリシン消化後の(15C、36C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、6) (16C、35C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、7) サーモリシン消化後の(16C、35C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、8) (17C、34C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、9) サーモリシン消化後の(17C、34C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、10) (18C、33C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、11) サーモリシン消化後の(18C、33C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、のSDS-PAGEの図である。標準物質（マーカートンパク質）は、ミオシン(210kDa)、ホスホリラーゼ(98kDa)、BSA(78kDa)、グルタミン酸脱水素酵素(55kDa)、アルコール脱水素酵素(45kDa)、炭酸脱水素酵素(34kDa)、ミオグロビン赤(17kDa)、リゾチーム(16kDa)、アプロチニン(7kDa)およびインスリン(4kDa)である。バンドパターンの性状は、約40-50kDaのバンドクラスター、約15kDaのバンドクラスターおよび約5kDaのバンド（単量体）である。Cは1) マーカートンパク質、2) (19C、32C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、3) サーモリシン消化後の(19C、32C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、4) (20C、31C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、5) サーモリシン消化後の(20C、31C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、6) (21C、30C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、7) サーモリシン消化後の(21C、30C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、8) (22C、29C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、9) サーモリシン消化後の(22C、29C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー、10) Aβ(1-42)球状体、11) サーモリシン消化後のAβ(1-42)球状体、のSDS-PAGEの図である。標準物質（マーカートンパク質

10

20

30

40

50

）は、ミオシン（210 kDa）、ホスホリラーゼ（98 kDa）、BSA（78 kDa）、グルタミン酸脱水素酵素（55 kDa）、アルコール脱水素酵素（45 kDa）、炭酸脱水素酵素（34 kDa）、ミオグロビン赤（17 kDa）、リゾチーム（16 kDa）、アプロチニン（7 kDa）およびインスリン（4 kDa）である。バンドパターンの性状は、約40–50 kDaのバンドクラスター、約15 kDaのバンドクラスターおよび約5 kDaのバンド（単量体）である。

【図2–3】Dは1）（17 K、34 E）N–Met Aβ（1–42）オリゴマー（0.2% SDS）、2）（17 K、34 E）N–Met Aβ（1–42）オリゴマー（0.05% SDS）、3）（17 C（ACM）、34 C（ACM））Aβ（16–35）オリゴマー（0.2% SDS）、4）（17 C（ACM）、34 C（ACM））Aβ（16–35）オリゴマー（0.05% SDS）、5）（17 K、34 C）N–Met Aβ（1–42）オリゴマー（0.2% SDS）、6）（17 K、34 C）N–Met Aβ（1–42）オリゴマー（0.05% SDS）、7）（17 C、34 C）Aβ（16–42）オリゴマー（0.2% SDS）、8）（17 C、34 C）Aβ（16–42）オリゴマー（0.05% SDS）、9）（17 KC、34 C）Aβ（13–42）オリゴマー（0.2% SDS）、10）（17 KC、34 C）Aβ（13–42）オリゴマー（0.05% SDS）、11）N–Met Aβ（1–42）オリゴマーのSDS–PAGEの図である。バンドパターンの性状は、約40–50 kDaのバンドクラスター、約15 kDaのバンドクラスターおよび約5 kDaのバンド（単量体）である。

【図3–1】AはN–Met Aβ（1–42）球状体および（L17 C、L34 C）N–Met Aβ（1–42）変異体球状体の球状体特異的モノクローナル抗体5F7への直接ELISA応答の比較を示すグラフである。Bは球状体特異的mAb 5F7の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化（17 C、34 C）N–Met Aβ（1–42）変異体球状体対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でランケートした同じ変異体球状体で比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。

【図3–2】Cは球状体特異的mAb 7C6の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化（17 C、34 C）N–Met Aβ（1–42）変異体球状体対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でランケートした同じ変異体球状体で比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。Dは球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清5599の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化（17 C、34 C）N–Met Aβ（1–42）変異体球状体対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でランケートした同じ変異体球状体で比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。

【図3–3】Eは球状体特異的mAb 5F7の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化（17 C、34 C）Aβ（16–35）オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。Fは球状体特異的mAb 7C6の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化（17 C、34 C）Aβ（16–35）オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。

【図3–4】Gは球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清5599の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化（17 C、34 C）Aβ（16–35）オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。Hは球状体特異的mAb 5F7の見かけの結合親和性をAβ（16–35）オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。

【図3–5】Iは球状体特異的mAb 7C6の見かけの結合親和性をAβ（16–35）オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。

【図3–6】Jは球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清5599の見かけの結合親和

性をA β (16-35)オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でトランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。Kは球状体特異的mAb 5F7の見かけの結合親和性を(17C (ACM)、34C (ACM)) A β (16-35)オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でトランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。

【図3-7】Lは球状体特異的mAb 7C6の見かけの結合親和性を(17C (ACM)、34C (ACM)) A β (16-35)オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でトランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。Mは球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清5599の見かけの結合親和性を(17C (ACM)、34C (ACM)) A β (16-35)オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でトランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。

【図3-8】Nは球状体特異的mAb 5F7の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化(17C、34C) A β (16-35)オリゴマー(オリゴマー形成の前に環化された。)対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でトランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。Oは球状体特異的mAb 7C6の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化(17C、34C) A β (16-35)オリゴマー(オリゴマー形成の前に環化された。)対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でトランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。

【図3-9】Pは球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清5599の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化(17C、34C) A β (16-35)オリゴマー(オリゴマー形成の前に環化された。)対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でトランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。Qは球状体特異的mAb 5F7の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化(17C、34C) A β (16-35)オリゴマー(オリゴマー形成の前に環化された。)対、ジスルフィド安定化(17C、34C) A β (16-42)、(17C、34C) A β (16-35)および(17C、34C) N-Met A β (1-42)オリゴマー(全てオリゴマー形成の後に環化された。)で比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。

【図3-10】Rは球状体特異的mAb 5F7の見かけの結合親和性をサーモリシン切断ジスルフィド安定化(17C、34C) A β (16-35)オリゴマー(オリゴマー形成の前に環化された。)対、サーモリシン切断ジスルフィド安定化(17C、34C) A β (16-42)、(17C、34C) A β (16-35)および(17C、34C) N-Met A β (1-42)オリゴマー(全てオリゴマー形成の後に環化された。)で比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。Sは球状体特異的mAb 5F7の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化(17C、34C) A β (16-42)オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でトランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。

【図3-11】Tは球状体特異的mAb 7C6の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化(17C、34C) A β (16-42)オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でトランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。Uは球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清5599の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化(17C、34C) A β (16-42)オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でトランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。

【図3-12】Vは球状体特異的mAb 5F7の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化(17C、34C) A β (12-42)オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でトランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。Wは球状体特異的mAb 7C6の見かけの結合親和性をジスル

10

20

30

40

50

フィド安定化（17C、34C）A β （12-42）オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でトランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。

【図3-13】Xは球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清5599の見かけの結合親和性をジスルフィド安定化（17C、34C）A β （12-42）オリゴマー対、サーモリシンでの酵素的切断によって残基20でトランケートした同じオリゴマーで比較する直接ELISA結果の比較を示すグラフである。Yはジスルフィド安定化（17C、34C）（K挿入）A β （13-42）オリゴマーへの球状体特異的mAb 5F7の見かけの結合親和性を比較する直接ELISA結果を示すグラフである。

【図3-14】Zはジスルフィド安定化（17C、34C）（K挿入）A β （13-42）オリゴマーへの球状体特異的mAb 7C6の見かけの結合親和性を比較する直接ELISA結果を示すグラフである。AAはジスルフィド安定化（17C、34C）（K挿入）A β （13-42）オリゴマーへの球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清5599の見かけの結合親和性を比較する直接ELISA結果を示すグラフである。

【図4-1】（L17C、L34C）N-Met A β （1-42）変異体ペプチドと（A）ジスルフィド結合形成条件下および（B）DTTでの還元後に形成したA β 球状体から得た質量スペクトルを示すグラフであり；完全な同位体デコンボリューションが示されている。

【図4-2】（L17C、L34C）N-Met A β （1-42）変異体ペプチドと（A）ジスルフィド結合形成条件下および（B）DTTでの還元後に形成したA β 球状体から得た質量スペクトルを示すグラフであり；完全な同位体デコンボリューションが示されている。

【図4-3】（17C、34C）A β （16-35）オリゴマーから（C）ジスルフィド結合形成条件下および（D）DTTでの還元後に得た質量スペクトルを示すグラフであり；完全な同位体デコンボリューションが示されている。

【図4-4】（17C、34C）A β （16-35）オリゴマーから（C）ジスルフィド結合形成条件下および（D）DTTでの還元後に得た質量スペクトルを示すグラフであり；完全な同位体デコンボリューションが示されている。

【図4-5】（17C、34C）A β （16-42）オリゴマーから（E）ジスルフィド結合形成条件下および（F）DTTでの還元後に得た質量スペクトルを示すグラフであり；完全な同位体デコンボリューションが示されている。

【図4-6】（17C、34C）A β （16-42）オリゴマーから（E）ジスルフィド結合形成条件下および（F）DTTでの還元後に得た質量スペクトルを示すグラフであり；完全な同位体デコンボリューションが示されている。

【図4-7】（17C、42C）A β （12-42）オリゴマーから（G）ジスルフィド結合形成条件下および（H）DTTでの還元後に得た質量スペクトルを示すグラフであり；完全な同位体デコンボリューションが示されている。

【図4-8】（17C、42C）A β （12-42）オリゴマーから（G）ジスルフィド結合形成条件下および（H）DTTでの還元後に得た質量スペクトルを示すグラフであり；完全な同位体デコンボリューションが示されている。

【図4-9】（17KC、42C）A β （13-42）オリゴマーから（I）ジスルフィド結合形成条件下および（J）DTTでの還元後に得た質量スペクトルを示すグラフであり；完全な同位体デコンボリューションが示されている。

【図4-10】（17KC、42C）A β （13-42）オリゴマーから（I）ジスルフィド結合形成条件下および（J）DTTでの還元後に得た質量スペクトルを示すグラフであり；完全な同位体デコンボリューションが示されている。

【図5-1】AはN-Met A β （1-42）球状体（破線）およびジスルフィド安定化（L17C、L34C）N-Met A β （1-42）変異体球状体（実線）の5mM NaPO₄、35mM NaCl、pH7.4中での不均一性の沈降速度分析を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図5-2】BはN-Met Aβ(1-42)球状体(破線)およびサーモリシンでの酵素切断によって残基20で切断したジスルフィド安定化(L17C、L34C)N-Met Aβ(1-42)変異体球状体(実線)の0.05%SDSを含む5mM NaPO₄、35mM NaCl、pH7.4中での不均一性の沈降速度分析を示すグラフである。

【図5-3】Cはサーモリシンでの酵素切断によって残基20で切断したジスルフィド安定化(L17C、L34C)N-Met Aβ(1-42)変異体球状体(実線)の5mM NaPO₄、35mM NaCl、pH7.4中での不均一性の沈降速度分析を示すグラフである。

【図6】SELDI-MSで検出されたサーモリシン消化前後での(xC、yC)N-Met Aβ(1-42)オリゴマーのペプチド質量を示す表である。

【図7】SELDI-MSで検出されたヨードアセトアミド処理したサーモリシン切断(xC、yC)N-Met Aβ(1-42)オリゴマーまたはサーモリシン切断Aβ(1-42)球状体のペプチド質量ピークを示す表である。

【図8】A)モノクローナル抗体7C6およびB)ウサギポリクローナル抗体5599での反応性のドットプロット分析を示す図であり、1.(14C、37C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；2.サーモリシン切断(14C、37C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；3.(15C、36C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；4.サーモリシン切断(15C、36C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；5.(16C、35C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；6.サーモリシン切断(16C、35C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；7.(17C、34C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；8.サーモリシン切断(17C、34C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；9.(18C、33C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；10.サーモリシン切断(18C、33C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；11.(19C、32C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；12.サーモリシン切断(19C、32C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；13.(20C、31C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；14.サーモリシン切断(20C、31C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；15.(21C、30C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；16.サーモリシン切断(21C、30C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；17.(22C、29C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；18.サーモリシン切断(22C、29C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマー；19.Aβ(1-42)球状体；20.Aβ(1-42)サーモリシントランケート型球状体である。

【図9】SELDI-MSで検出されたヨードアセトアミド処理したサーモリシン切断(17C、34C)N-Met Aβ(16-35)オリゴマーのペプチド質量ピークを示す表である。

【図10】Aはヨードアセトアミドアルキル前処理を行わない(17C、34C)Aβ(16-35)オリゴマーの免疫沈降量を示す表である。BはDTT存在下でのヨードアセトアミドアルキル化後の(17C、34C)Aβ(16-35)オリゴマーの免疫沈降量を示す表である。

【図11-1】Aはスルホ-SMCCでの処置における(17K、34C)N-Met Aβ(1-42)のK16またはK17のいずれかでの架橋結合の位置を示す模式図である。Bはスルホ-MBSでの処置における(17K、34C)N-Met Aβ(1-42)のK16またはK17のいずれかでの架橋結合の位置を示す模式図である。

【図11-2】Cはスルホ-SIABでの処置における(17K、34C)N-Met Aβ(1-42)のK16またはK17のいずれかでの架橋結合の位置を示す模式図である。DはEDAC/NHSでの処置における(17K、34E)N-Met Aβ(1-42)の潜在的架橋結合の位置を示す模式図である。

【図12-1】Aはヘテロ二官能性架橋試薬スルホ-SMCCとの架橋反応後に(17K、34C)N-Met Aβ(1-42)ペプチドで作製したオリゴマーの質量スペクト

10

20

30

40

50

ル (E S I) を示すグラフである。矢印は、所望の架橋結合形成後に期待される質量を示す。

【図 1 2 - 2】B はヘテロ二官能性架橋試薬スルホ-M B S との架橋反応後に (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) ペプチドで作製した球状体の質量スペクトル (M A L D I) を示すグラフである。矢印は、所望の架橋結合形成後に期待される質量を示す。

【図 1 2 - 3】C はヘテロ二官能性架橋試薬スルホ-S I A B との架橋反応後に (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) ペプチドで作製した球状体の質量スペクトル (E S I) を示すグラフである。矢印は、所望の架橋結合形成後に期待される質量を示す。

【図 1 2 - 4】D はヘテロ二官能性架橋試薬 E D C および N H S との架橋反応後に (1 7 K、3 4 E) N-M e t A β (1 - 4 2) ペプチドで作製した球状体の質量スペクトル (M A L D I) を示すグラフである。矢印は、所望の架橋結合形成後に期待される質量を示す。

【図 1 3 - 1】A は架橋結合していない (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーとジスルフィド安定化 (1 7 C、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーとでの球状体特異的モノクローナル抗体 5 F 7 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。B は架橋結合していない (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーとジスルフィド安定化 (1 7 C、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーとでの球状体特異的モノクローナル抗体 7 C 6 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。

【図 1 3 - 2】C は架橋結合していない (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーとジスルフィド安定化 (1 7 C、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーとでの球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清 5 5 9 9 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。

【図 1 4 - 1】A は架橋結合していない (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーと、S M C C で架橋結合した (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーのサーモリシン切断の前後とでの球状体特異的モノクローナル抗体 5 F 7 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。B は架橋結合していない (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーと、S M C C で架橋結合した (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーのサーモリシン切断の前後とでの球状体特異的モノクローナル抗体 7 C 6 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。

【図 1 4 - 2】C は架橋結合していない (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーと、S M C C で架橋結合した (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーのサーモリシン切断の前後とでの球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清 5 5 9 9 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。

【図 1 5 - 1】A は架橋結合していない (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーと、M B S で架橋結合した (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーのサーモリシン切断の前後とでの球状体特異的モノクローナル抗体 5 F 7 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。B は架橋結合していない (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーと、M B S で架橋結合した (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーのサーモリシン切断の前後とでの球状体特異的モノクローナル抗体 7 C 6 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。

【図 1 5 - 2】C は架橋結合していない (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーのサーモリシン切断の前後とでの M B S で架橋結合した (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーの球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清 5 5 9 9 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。

【図 1 6 - 1】A は架橋結合していない (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーと、S I A B で架橋結合した (1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1 - 4 2) オリゴマーのサーモリシン切断の前後とでの球状体特異的モノクローナル抗体 5 F 7

への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。B は架橋結合していない (17 K、34 C) N-M e t A β (1-42) オリゴマーと、S I A B で架橋結合した (17 K、34 C) N-M e t A β (1-42) オリゴマーのサーモリシン切断の前後とでの球状体特異的モノクローナル抗体 7 C 6 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。

【図 16-2】C は架橋結合していない (17 K、34 C) N-M e t A β (1-42) オリゴマーと、S I A B で架橋結合した (17 K、34 C) N-M e t A β (1-42) オリゴマーのサーモリシン切断の前後とでの球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清 5599 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。

【図 17-1】A は架橋結合していない (17 C、34 E) N-M e t A β (1-42) オリゴマーと、ジスルフィド安定化 (17 C、34 C) N-M e t A β (1-42) オリゴマーとでの球状体特異的モノクローナル抗体 5 F 7 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。B は架橋結合していない (17 C、34 E) N-M e t A β (1-42) オリゴマーと、ジスルフィド安定化 (17 C、34 C) N-M e t A β (1-42) オリゴマーとでの球状体特異的モノクローナル抗体 7 C 6 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。

【図 17-2】C は架橋結合していない (17 C、34 E) N-M e t A β (1-42) オリゴマーと、ジスルフィド安定化 (17 C、34 C) N-M e t A β (1-42) オリゴマーとでの球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清 5599 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。

【図 18-1】A は架橋結合していない (17 K、34 C) N-M e t A β (1-42) オリゴマーと、E D C / N H S で架橋結合した (17 K、34 C) N-M e t A β (1-42) オリゴマーのサーモリシン切断前後とでの球状体特異的モノクローナル抗体 5 F 7 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。B は架橋結合していない (17 K、34 C) N-M e t A β (1-42) オリゴマーと、E D C / N H S で架橋結合した (17 K、34 C) N-M e t A β (1-42) オリゴマーのサーモリシン切断前後とでの球状体特異的モノクローナル抗体 7 C 6 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。

【図 18-2】C は架橋結合していない (17 K、34 C) N-M e t A β (1-42) オリゴマーと、E D C / N H S で架橋結合した (17 K、34 C) N-M e t A β (1-42) オリゴマーのサーモリシン切断前後とでの球状体特異的ウサギポリクローナル抗血清 5599 への直接 E l i s a 応答の比較を示すグラフである。

【図 19-1】A はメチレンジチオエーテル結合を形成するための戦略を示す模式図である。B はアシルグリシン間の閉環メタセシス反応を実施するための戦略を示す模式図である。

【図 19-2】C は修飾アミノ酸 X = (S) - F m o c - α (2' ペンテニル) アラニン間の閉環メタセシス反応を実施するための戦略を示す模式図である。D は L y s (N3) とプロバングリグリシンアミノ酸とのクリック化学を実施するための戦略を示す模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0041】

(発明の詳細な記述)

本発明のアミロイド β ペプチド類似体は、アミノ酸配列 (ペプチド) またはアミノ酸配列のペプチド模倣物を含む。詳細な実施形態によれば、本発明のアミロイド β ペプチド類似体は、前記アミノ酸配列または前記アミノ酸配列のペプチド模倣物以外のいかなるアミノ酸またはこれ以外のいかなるアミノ酸のペプチド模倣物も含まない (しかし本発明のアミロイド β ペプチド類似体は、前記アミノ酸配列またはペプチド模倣物に付着している化学基または成分をさらに含み得る。)。一態様によれば、アミノ酸配列は、45、44、43、42、41、40、39、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、20、16 アミノ酸まで (または相当するペプチド模倣物) から

10

20

30

40

50

なる。他の態様によれば、アミノ酸配列は、少なくとも10、11、12、13、14、15、16アミノ酸（または相当するペプチド模倣物）からなる。

【0042】

他に記載しない限り本明細書において使用する用語「アミノ酸」は、単独でまたは他の基の一部として、限定されることなく「 α 」炭素—CRR'—と称される同じ炭素（Rおよび/またはR'は水素を含む天然または非天然側鎖であり得る。）に結合したアミノ基およびカルボキシル基を有する。「 α 」炭素での完全な「S」立体配置は、通例「L」または「天然」立体配置と称される。「R」および「R'」（プライム）の両方の置換基が等しく水素である場合、アミノ酸はグリシンであり不斉ではない。

【0043】

アミノ酸は、遺伝的にコードされたL-鏡像異性アミノ酸（アラニン（A；Ala）、アルギニン（R；Arg）、アスパラギン（N；Asn）、アスパラギン酸（D；Asp）、システイン（C；Cys）、グルタミン（Q；Gln）、グルタミン酸（E；Glu）、グリシン（G；Gly）、ヒスチジン（H；His）、イソロイシン（I；Ile）、ロイシン（L；Leu）、リジン（K；Lys）、フェニルアラニン（F；Phe）、プロリン（P；Pro）、セリン（S；Ser）、スレオニン（T；Thr）、トリプトファン（W；Trp）、チロシン（Y；Tyr）、バリン（V；Val）、）、相当するD-アミノ酸ならびに、これだけに限らないが β -アラニン（ β -Ala）および3-アミノプロピオン酸、2, 3-ジアミノプロピオン酸（Dpr）、4-アミノ酪酸などの他のオメガアミノ酸； α -アミノイソ酪酸（Aib）； ϵ -アミノヘキサノ酸（Aha）； δ -アミノ吉草酸（Ava）；N-メチルグリシンまたはサルコシン（MeGly）；オルニチン（Orn）；シトルリン（Cit）；t-ブチルアラニン（t-BuA）；t-ブチルグリシン（t-BuG）；N-メチルイソロイシン（MeIle）；フェニルグリシン（Phg）；シクロヘキシルアラニン（Cha）；ノルロイシン（Nle）；ナフチルアラニン（Nal）；4-フェニルフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン（Phe（4-Cl））；2-フルオロフェニルアラニン（Phe（2-F））；3-フルオロフェニルアラニン（Phe（3-F））；4-フルオロフェニルアラニン（Phe（4-F））；ペニシラミン（Pen）；1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸（Tic）； β -2-チエニルアラニン（Thi）；メチオニンスルホキシド（MSO）；ホモアルギニン（hArg）；N-アセチルリジン（AcLys）；2, 4-ジアミノ酪酸（Dbu）；2, 3-ジアミノ酪酸（Dab）；p-アミノフェニルアラニン（Phe（pNH₂））；N-メチルバリン（MeVal）；ホモシステイン（hCys）；ホモフェニルアラニン（hPhe）およびホモセリン（hSer）；ヒドロキシプロリン（Hyp）；ホモプロリン（hPro）、N-メチル化アミノ酸ならびにペプチド（N置換グリシン）を含む遺伝的にコードされない多数のアミノ酸を含む。

【0044】

保存的なアミノ酸置換を定めるために、アミノ酸は好都合にも2つの主な種類、親水性および疎水性にアミノ酸側鎖の物理的・化学的特徴に主として基づいて分類され得る。これらの2つの主な種類は、アミノ酸側鎖の特徴をより明確に定義する下位の種類にさらに分類され得る。例えば親水性アミノ酸の種類は、酸性、塩基性および極性アミノ酸にさらに再分類され得る。疎水性アミノ酸の種類は、非極性および芳香族アミノ酸にさらに再分類され得る。

【0045】

用語「親水性アミノ酸」は、Eisenbergら、1984、J. Mol. Biol. 179: 125-142頁の標準化共通疎水性スケールによって0より少ない疎水性を呈するアミノ酸を意味する。遺伝的にコードされている親水性アミノ酸としてThr（T）、Ser（S）、His（H）、Glu（E）、Asn（N）、Gln（Q）、Asp（D）、Lys（K）およびArg（R）が挙げられる。

【0046】

用語「疎水性アミノ酸」は、Eisenberg、1984、J. Mol. Biol.

10

20

30

40

50

179:1. 25-142頁の標準化共通疎水性スケールによって0より大きい疎水性を呈するアミノ酸を意味する。遺伝的にコードされている疎水性アミノ酸としてPro (P)、Ile (I)、Phe (F)、Val (V)、Leu (L)、Trp (W)、Met (M)、Ala (A)、Gly (G) およびTrp (Y) が挙げられる。

【0047】

用語「酸性アミノ酸」は、7より少ない側鎖pK値を有する親水性アミノ酸を意味する。酸性アミノ酸は、水素イオンの損失により生理学的pHで典型的には負に荷電した側鎖を有する。遺伝的にコードされている酸性アミノ酸としてGlu (E) およびAsp (D) が挙げられる。

【0048】

用語「塩基性アミノ酸」は、7より大きい側鎖pK値を有する親水性アミノ酸を意味する。塩基性アミノ酸は、ヒドロニウムイオンとの会合により生理学的pHで典型的には正に荷電した側鎖を有する。遺伝的にコードされている塩基性アミノ酸としてHis (H)、Arg (R) およびLys (K) が挙げられる。

【0049】

用語「極性アミノ酸」は、生理学的pHで荷電しない側鎖を有する親水性アミノ酸を意味するが、通常原子2個によって共有される電子対が原子の内の1個によってより近くに保持される少なくとも1つの結合を有する。遺伝的にコードされている極性アミノ酸としてAsn (N)、Gln (Q)、Ser (S) およびThr (T) が挙げられる。

【0050】

用語「非極性アミノ酸」は、生理学的pHで荷電しない側鎖を有し、通常原子2個によって共有される電子対が2個の原子のそれぞれによって一般に等しく保持される結合（すなわち側鎖が極性でない。）を有する疎水性アミノ酸を意味する。遺伝的にコードされている非極性アミノ酸としてLeu (L)、Val (V)、Ile (I)、Met (M)、Gly (G) およびAla (A) が挙げられる。

【0051】

用語「芳香族アミノ酸」は、少なくとも1つの芳香環または芳香族複素環を有する側鎖を有する疎水性アミノ酸を意味する。芳香環または芳香族複素環は、-OH、-SH、-CN、-F、-Cl、-Br、-I、-NO₂、-NO、-NH₂、-NHR、-NRR、-C(O)R、-C(O)OH、-C(O)OR、-C(O)NH₂、-C(O)NHR、-C(O)NRRなど（各Rは独立に、(C₁-C₆)アルキル、置換(C₁-C₆)アルキル、(C₁-C₆)アルケニル、置換(C₁-C₆)アルケニル、(C₁-C₆)アルキニル、置換(C₁-C₆)アルキニル、(C₅-C₂₀)アリール、置換(C₅-C₂₀)アリール、(C₆-C₂₆)アルカリル、置換(C₆-C₂₆)アルカリル、5-20員環のヘテロアリール、置換5-20員環のヘテロアリール、6-26員環のアルクヘテロアリールまたは置換6-26員環のアルクヘテロアリールである)の1つ以上の置換基を含み得る。遺伝的にコードされている芳香族アミノ酸としてPhe (F)、Tyr (Y) およびTrp (W) が挙げられる。

【0052】

用語「脂肪族アミノ酸」は、脂肪族炭化水素側鎖を有する疎水性アミノ酸を意味する。遺伝的にコードされている脂肪族性アミノ酸としてAla (A)、Val (V)、Leu (L) およびIle (I) が挙げられる。

【0053】

アミノ酸残基Cys (C) は、他のCys (C) 残基とまたは他のスルファニル含有アミノ酸とジスルフィド架橋を形成できることにおいて独特である。還元された遊離の-SH形態または酸化されたジスルフィド架橋形態のいずれでもペプチド中に存在するCys (C) 残基（および-SHを含む側鎖を有する他のアミノ酸）の能力は、Cys (C) 残基が正味の疎水性または親水性特性をペプチドに与えるかどうかに影響する。

【0054】

当業者によって理解されたとおり、上に定義の分類は相互排他的ではない。したがって

10

20

30

40

50

2つ以上の物理的・化学的特性を呈する側鎖を有するアミノ酸は、複数の分類に含まれ得る。例えば極性置換基でさらに置換されている芳香族成分を有するアミノ酸側鎖、Tyr (Y)などは、芳香族疎水性特性および極性または親水性特性の両方を呈することができ、したがって芳香族分類および極性分類の両方に含まれ得る。任意のアミノ酸の適切な分類は、当業者に、特に本明細書において提供する詳細な開示を考慮すると明らかである。

【0055】

アミノ酸（ペプチド）の配列の代わりに本発明のアミロイドβペプチド類似体は、鑄型アミノ酸配列（ペプチド）に類似する特性を有する前記配列の類似体を含み得る。非ペプチド配列のこれらの種類を「ペプチド模倣体」または「ペプチド模倣物」（Fauchere, J. (1986) Adv. Drug Res. 15:29; VeberおよびFreidinger (1985) TINS 392頁; およびEvansら、(1987) J. Med. Chem 30:1229頁）と呼び、通例コンピューター分子モデルの助力で開発される。

10

【0056】

ペプチド模倣物は、特定のアミノ酸配列に「由来する」と称される。これは、ペプチド模倣物が、アミノ酸配列の機能のために必須であるその構造的・特性を保持するように明確なアミノ酸配列を参照して設計されることを意味している。これは、アミノ酸配列の具体的な側鎖または構造の水素結合能であり得る。そのような特性は、非ペプチド要素または1個以上のアミノ酸残基またはアミノ酸配列の前記アミノ酸残基を結合させている結合によって提供されることができ、安定性またはプロテアーゼ耐性などのアミノ酸配列の特定の機能を改善するためにその機能に必須であるアミノ酸配列の構造的・特性を保持しながら修飾され得る。言い換えると、アミノ酸配列のペプチド模倣物を含むアミロイドβペプチド類似体およびペプチド模倣物が由来するアミノ酸配列を含むアミロイドβペプチド類似体は、それらがループを形成する能力ならびに、適切であれば本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体のさらなる構造的および機能的特性を提示する能力に関して同じ機能的特徴を有する。

20

【0057】

ペプチド模倣物は、通例パラダイムペプチド（すなわち本発明のアミロイドβペプチド類似体に含まれるアミノ酸配列）に構造的に類似しているが、アミド結合に類似する結合（例えば、N-メチルアミド、チオアミド、チオエステル、ホスホン酸、ケトメチレン、ヒドロキシメチレン、フルオロビニル、(E)-ビニル、メチレンアミノ、メチレンチオまたはアルカン結合などのアミド同配体）によって任意に置換されている1つ以上のペプチド結合を有する。そのような結合は、詳細には： $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ （シスおよびトランス）、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ および $-\text{CH}_2\text{SO}-$ からなる群から選択され得る。これらの結合は、当技術分野において周知であり以下の文献にさらに記載されている：「Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins」B. Weinstein（編）、Marcel Dekker、New York、267頁（1983）におけるSpatola, A. F. ; Szatola, A. F.、Vega Data（1983年3月）、第1巻第3版、「Peptide Backbone Modifications」(general review); Morley, J. S.、Trends Pharm Sci (1980) 463-468頁（頁）; Hudson, D. ら、Int J Pent Prot Res (1979) 14:177-185頁; Spatola, A. F. ら、Life Sci (1986) 38:1243-1249頁; Hann, M. M.、J Chem Soc Perkin Trans I (1982) 307-314頁; Almqvist, R. G. ら、J Med Chem (1980) 23:1392-1398頁; Jennings-White, C. ら、Tetrahedron Lett (1982) 23:2533頁; Szelke, M. ら、EP 45665 (1982) CA:97:39405頁（1982）; Holladay, M. W. ら、Tetrahedron

30

40

50

L e t t (1 9 8 3) 2 4 : 4 4 0 1 - 4 4 0 4 頁 ; および H r u b y , V . J . 、 L i f e S c i (1 9 8 2) 3 1 : 1 8 9 - 1 9 9 頁。特に好ましい非ペプチド結合は $-CH_2NH-$ である。そのようなペプチド模倣体は、例えば：より経済的な生産、より大きな化学的安定性、増強された薬学的特性（半減期、吸収、強度、有効性など）などを含むペプチド実施形態を超える顕著な有利点を有し得る。

【0058】

ペプチド模倣物は、「逆行」または「逆」アミノ酸配列も含む。逆行または逆アミノ酸配列は、アミノ酸骨格におけるカルボキシルからアミノへの通常のペプチド結合形成の方向が、左から右の従来の方向に読むとペプチド結合のアミノ成分がカルボニル成分に（続くのではなく）先行するように逆行している共有結合アミノ酸残基を含む。概略的に G o o d m a n , M . a n d C h o r e v , M . A c c o u n t s o f C h e m . R e s . 1 9 7 9 , 1 2 , 4 2 3 を参照されたい。

10

【0059】

逆方向ペプチドは、(a) 1 個以上個のアミノ末端残基が逆方向（「rev」）に転換されているもの（したがって第2の「カルボキシル末端」が分子の最左部に得られる。）および (b) 1 個以上個のカルボキシル末端残基が逆方向（「rev」）に転換されているもの（第2の「アミノ末端」が分子の最右部に得られる。）を含む。ペプチド（アミド）結合は、正常方向の残基と逆方向の残基との境界では形成され得ない。

【0060】

したがって本発明の特定の逆行アミノ酸配列は、逆行ペプチド（逆行アミド）結合を利用する配列の2つの連続部分を結合するために適切なアミノ酸模倣成分を利用することによって形成され得る。上記 (a) の場合は、ペプチド模倣物構造をもたらしためにジケト化合物の中央残基が2つのアミド結合を有する構造を結合するために好都合に利用され得る。上記 (b) の場合は、ペプチド模倣物構造を形成するためにジアミノ化合物の中央残基が2つのアミド結合を有する構造を結合するために同様に有用である。

20

【0061】

加えて、そのような化合物中の逆方向の結合は、一般に、逆行していないアミノ酸のものと同様の側鎖の空間的配向性を維持するために逆行アミノ酸残基の鏡像的立体配置の転化を必要とする。ペプチドの逆行部分におけるアミノ酸の立体配置は、好ましくは (D) であり、逆行していない部分の立体配置は好ましくは (L) である。反対のまたは混合の立体配置は、結合活性を最適化するために適切である場合は許容され得る。

30

【0062】

本発明のアミロイド β ペプチド類似体に含まれるアミノ酸配列またはペプチド模倣物は、ループ（同義語：ターン）を含む詳細な2次構造によって特徴付けられる。本明細書において使用するループ（またはターン）は、少なくとも2つの $C\alpha$ 原子の近距離接近（通常 $< 7 \text{ \AA}$ ）を定義している。

【0063】

適切なループは、 α -、 β -、 γ - および π - ループを含む。本発明の詳細な実施形態によれば、ループは、 β - ループである。本明細書において使用する β - ループは、（供与残基と受容残基とが3残基離れている $i \rightarrow i + 3$ H-結合）（1つまたは複数の）水素結合によって特徴付けられるループを定義している。

40

【0064】

本発明の詳細な実施形態によれば、ループは、 β - ヘアピンループである。本明細書において使用する β - ヘアピンループは、ペプチドまたはペプチド模倣物骨格の方向が逆行しており、隣接する2次構造要素が相互作用しているループを定義している。

【0065】

本発明のさらなる詳細な実施形態によれば、アミロイド β ペプチド類似体は、分子内逆平行 β - シートを形成しているアミノ酸配列を含む。本明細書において使用する逆平行 β - シートは、3つ以上の水素結合によって側方につながっており、全体にねじれたひだ状のシートを形成している少なくとも2つの β - ストランドの会合体を定義している。 β -

50

ストランドは、ペプチド骨格がほとんど完全に引き延ばされた典型的には 3 - 10 個のアミノ酸を含むアミノ酸の伸展またはこのペプチド模倣物である。

【0066】

詳細な実施形態によれば、本発明のアミロイド β ペプチド類似体は、逆平行 β - シートを形成している β - ストランドがループ、好ましくは本明細書において定義の β - ヘアピンループを介してつながっているアミノ酸配列を含む。

【0067】

本発明のアミロイド β ペプチド類似体のアミノ酸配列は、天然ヒト A β ペプチドまたはその一部のアミノ酸配列と少なくとも 66 % の同一性を有する。

【0068】

10

本明細書において使用する用語「天然ヒト A β ペプチド」は、A β (1 - 40) または A β (1 - 42) ペプチドなどのヒト由来の天然に存在する A β (X - Y) ペプチドを意味する。

【0069】

本明細書における用語「天然に存在する A β (X - Y) ペプチド」は、ヒトアミロイド β タンパク質のアミノ酸位置 X からアミノ酸位置 Y までのアミノ酸配列を X および Y の両方を含んで意味し、詳細にはアミノ酸配列 D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A T (ヒト検索配列; アミノ酸位置 1 から 43 に相当する。) またはこの天然に存在する任意の変種のアミノ酸位置 X からアミノ酸位置 Y を意味し、詳細には A 2 T、H 6 R、D 7 N、A 2 1 G (「フレミッシュ」) 20、E 2 2 G (「アークティック」)、E 2 2 Q (「ダッチ」)、E 2 2 K (「イタリアン」)、D 2 3 N (「アイオワ」)、A 4 2 T および A 4 2 V (番号は A β ペプチドの開始に対してである。) からなる群から選択される少なくとも 1 つの変異を有するものを位置 X および位置 Y の両方を含んで意味する。

【0070】

例えば本明細書において用語「天然に存在する A β (1 - 42) ペプチド」は、ヒトアミロイド β タンパク質のアミノ酸位置 1 からアミノ酸位置 42 由来のアミノ酸配列を 1 および 42 の両方を含んで意味し、詳細にはアミノ酸配列 D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A またはこの天然に存在する任意の変種を意味し、詳細には A 2 1 G (「フレミッシュ」) 30、E 2 2 G (「アークティック」)、E 2 2 Q (「ダッチ」)、E 2 2 K (「イタリアン」)、D 2 3 N (「アイオワ」)、A 4 2 T および A 4 2 V (番号は A β ペプチドの開始に対してである。) からなる群から選択される少なくとも 1 つの変異を有するものを位置 1 および位置 42 の両方を含んで意味する。

【0071】

したがって本発明のアミロイド β ペプチド類似体は、天然に存在する A β ペプチド、機能的断片および上に記載のヒト検索配列またはその一部と少なくとも約 66 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、99 % またはこれを超えて同一であるこれらの変種配列に相当するアミノ酸配列を含む。

【0072】

40

本明細書において使用する用語「相当する」は、アミノ酸配列が参照アミノ酸配列の全てまたは一部に相同であること (すなわち同一である、厳密にではなく進化的に関連している) を意味する。

【0073】

以下の用語は、2 つ以上のポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間の配列関係性を記載するために使用される: 「参照配列」、「比較ウィンドウ」、「配列同一性」および「配列同一性の百分率」。「参照配列」または「検索配列」は、配列比較の基準として使用される明確な配列である; 参照配列は、より大きな配列の一部であることができ、例えば全長 c D N A、遺伝子配列またはポリペプチド配列の一部であることができる、または完全 c D N A、遺伝子配列または上に記載のヒト A β ペプチド配列などのポリペプチド配列を 50

含み得る。2つの配列がそれぞれ(1) 2つの配列間で類似している配列(すなわち完全な配列の一部)を含み得る、(2) 2つの配列間で相違する配列をさらに含み得ることから、2つ(またはそれを超える)ポリヌクレオチド間での配列比較は典型的には配列類似性の局在性領域を同定および比較するために「比較ウィンドウ」について2つの配列の配列を比較することによって実施される。本明細書において使用する「比較ウィンドウ」は、配列が少なくとも6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40または42個の連続アミノ酸または18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90、96、102、108、114、120または126個のヌクレオチドの参照配列と比較され得る少なくとも6個の連続アミノ酸または24個のヌクレオチド位置の概念的セグメントを意味し、比較ウィンドウ中の配列の一部は、2つの配列の最適な配列比較のために参照配列(付加または欠失を含まない)と比較して20パーセントまたはそれより少ない付加または欠失(すなわちギャップ)を含み得る。配列比較用の配列の最適な配列比較に関して、比較ウィンドウは、SmithおよびWaterman(1981) Adv. Appl. Math. 2:482の局在性相同性アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch(1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同性配列比較アルゴリズムによって、PearsonおよびLipman(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 85:2444の類似性検索法によって、これらのアルゴリズム(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0、Genetics Computer Group、575 Science Dr.、Madison、Wis.でのGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)のコンピューター化された実行によって、または検査によって実行されることができ、種々の方法によって生じた最良の(すなわち比較ウィンドウについて最も高い相同性の百分率値をもたらす)配列比較が選択される。用語「配列同一性」は、2つの配列が比較のウィンドウにおいて(すなわちヌクレオチドはヌクレオチドに基づいて、アミノ酸はアミノ酸に基づいて)同一であることを意味する。用語「配列同一性の百分率」は、最適に並べた2つの配列を比較のウィンドウについて比較し、一致する位置の数を得るために両方の配列において同一の核酸塩基またはアミノ酸が存在する位置の数を決定し、一致した位置の数を比較のウィンドウ中の位置の数(すなわちウィンドウの大きさ)で割り、配列同一性の百分率を得るために結果を100倍することによって算出される。

【0074】

アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列の天然ヒトAβペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が決定されると、比較のウィンドウは、アミロイドβペプチド類似体またはその一部に含まれる完全なアミノ酸配列を含み得る。アミロイドβペプチド類似体に含まれるアミノ酸配列が天然ヒトAβペプチドのアミノ酸配列より短い場合は、比較のウィンドウは天然ヒトAβペプチドの一部だけを含み、それにより配列同一性の百分率はその部分だけを参照する。アミロイドβペプチド類似体に含まれるアミノ酸配列が天然ヒトAβペプチドのアミノ酸配列より長い場合は、比較のウィンドウはアミロイドAβペプチド類似体に含まれるアミノ酸配列の一部だけを含み、それにより配列同一性の百分率はその部分だけを参照する。

【0075】

詳細な実施形態によれば、本発明は、アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が天然ヒトAβ(X-Y)配列(Xは1..23、例えば15、18、19、20、21、22または23の数からなる群から選択され、Yは28..43、例えば28、29、30、31、34、37、40、42または43の数からなる群から選択される)と少なくとも66%の同一性を有するアミロイドβペプチド類似体に関する。

【0076】

本明細書において使用する省略記号A..Bは、AからBのその両方を含める全ての自然数を含む集合を意味し、例えば「17..20」はしたがって17、18、19および

20の数の群を意味する。ハイフンはアミノ酸の連続配列を意味し、すなわち「X-Y」はアミノ酸Xからアミノ酸Yまでの配列を両方を含めて含む。したがって「A...B-C...D」は、これら2つの集合の要素間で可能な全ての組合せを含み、例えば「17...20-40...42」は、17-40、17-41、17-42、18-40、18-41、18-42、19-40、19-41、19-42、20-40、20-41および20-42の全てを含む。他に記載する場合を除いて、全ての数は成熟ペプチドの開始端を参照し、1はN末端アミノ酸を表す。

【0077】

詳細には、アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列は配列番号1-368：

【0078】

【表1】

配列	配列番号
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	1
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	2
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	3
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	4
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	5
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	6
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	7
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	8
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	9
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	10
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	11
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	12
-----HHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	13
-----HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	14
-----QKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	15
-----KLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	16
-----LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	17
-----VFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	18
-----FFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT-	19

10

20

30

-----FAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVIAT-	20
-----AEDVGSNKGAI IGLMVGGVVIAT-	21
-----EDVGSNKGAI IGLMVGGVVIAT-	22
-----DVGSNKGAI IGLMVGGVVIAT-	23
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	24
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	25
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	26
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	27
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	28
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	29
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	30
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	31
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	32
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	33
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	34
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	35
-----HHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	36
-----HQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	37
-----QKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	38
-----KLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	39
-----LVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	40
-----VFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	41
-----FFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	42
-----FAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	43
-----AEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	44
-----EDVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	45
-----DVGSNKGAI IGLMVGGVVI--	46
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	47
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	48
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	49
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	50
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	51
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	52
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	53
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	54
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	55
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	56
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	57
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	58

10

20

30

40

-----HHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	59
-----HQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	60
-----QKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	61
-----KLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	62
-----LVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	63
-----VFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	64
-----FFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	65
-----FAEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	66
-----AEDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	67
-----EDVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	68
-----DVGSNKGAI IGLMVGGVVI---	69
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	70
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	71
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	72
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	73
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	74
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	75
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	76
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	77
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	78
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	79
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	80
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	81
-----HHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	82
-----HQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	83
-----QKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	84
-----KLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	85
-----LVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	86
-----VFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	87
-----FFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	88
-----FAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	89
-----AEDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	90
-----EDVGSNKGAI IGLMVGGVV----	91
-----DVGSNKGAI IGLMVGGVV----	92
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGV-----	93
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGV-----	94
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGV-----	95
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGV-----	96
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGV-----	97

10

20

30

40

-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	98
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	99
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	100
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	101
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	102
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	103
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	104
-----HHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	105
-----HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	106
-----QKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	107
-----KLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	108
-----LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	109
-----VFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	110
-----FFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	111
-----FAEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	112
-----AEDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	113
-----EDVGSNKGAIIGLMVGGV-----	114
-----DVGSNKGAIIGLMVGGV-----	115
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	116
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	117
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	118
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	119
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	120
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	121
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	122
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	123
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	124
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	125
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	126
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	127
-----HHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	128
-----HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	129
-----QKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	130
-----KLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	131
-----LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	132
-----VFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	133
-----FFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	134
-----FAEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	135
-----AEDVGSNKGAIIGLMVGG-----	136

10

20

30

40

-----EDVGSNKGAI IGLMVG-----	137
-----DVGSNKGAI IGLMVG-----	138
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	139
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	140
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	141
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	142
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	143
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	144
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	145
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	146
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	147
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	148
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	149
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	150
-----HHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	151
-----HQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	152
-----QKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	153
-----KLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	154
-----LVFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	155
-----VFFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	156
-----FFAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	157
-----FAEDVGSNKGAI IGLMVG-----	158
-----AEDVGSNKGAI IGLMVG-----	159
-----EDVGSNKGAI IGLMVG-----	160
-----DVGSNKGAI IGLMVG-----	161
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	162
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	163
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	164
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	165
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	166
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	167
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	168
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	169
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	170
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	171
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	172
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	173
-----HHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	174
-----HQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	175

10

20

30

40

-----QKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	176
-----KLVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	177
-----LVFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	178
-----VFFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	179
-----FFAEDVGSNKGAI IGLMV-----	180
-----FAEDVGSNKGAI IGLMV-----	181
-----AEDVGSNKGAI IGLMV-----	182
-----EDVGSNKGAI IGLMV-----	183
-----DVGSNKGAI IGLMV-----	184
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	185
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	186
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	187
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	188
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	189
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	190
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	191
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	192
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	193
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	194
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	195
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	196
-----HHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	197
-----HQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	198
-----QKLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	199
-----KLVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	200
-----LVFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	201
-----VFFAEDVGSNKGAI IGLM-----	202
-----FFAEDVGSNKGAI IGLM-----	203
-----FAEDVGSNKGAI IGLM-----	204
-----AEDVGSNKGAI IGLM-----	205
-----EDVGSNKGAI IGLM-----	206
-----DVGSNKGAI IGLM-----	207
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGL-----	208
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGL-----	209
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGL-----	210
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGL-----	211
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGL-----	212
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGL-----	213
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGL-----	214

10

20

30

40

-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL-----	215
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL-----	216
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL-----	217
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL-----	218
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL-----	219
-----HHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL-----	220
-----HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL-----	221
-----QKLVFFAEDVGSNKGAIIGL-----	222
-----KLVFFAEDVGSNKGAIIGL-----	223
-----LVFFAEDVGSNKGAIIGL-----	224
-----VFFAEDVGSNKGAIIGL-----	225
-----FFAEDVGSNKGAIIGL-----	226
-----FAEDVGSNKGAIIGL-----	227
-----AEDVGSNKGAIIGL-----	228
-----EDVGSNKGAIIGL-----	229
-----DVGSNKGAIIGL-----	230
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	231
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	232
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	233
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	234
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	235
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	236
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	237
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	238
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	239
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	240
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	241
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	242
-----HHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	243
-----HQKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	244
-----QKLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	245
-----KLVFFAEDVGSNKGAIIG-----	246
-----LVFFAEDVGSNKGAIIG-----	247
-----VFFAEDVGSNKGAIIG-----	248
-----FFAEDVGSNKGAIIG-----	249
-----FAEDVGSNKGAIIG-----	250
-----AEDVGSNKGAIIG-----	251
-----EDVGSNKGAIIG-----	252
-----DVGSNKGAIIG-----	253

10

20

30

40

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	254
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	255
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	256
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	257
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	258
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	259
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	260
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	261
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	262
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	263
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	264
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	265
-----HHQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	266
-----HQKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	267
-----QKLVFFAEDVGSNKGAI I-----	268
-----KLVFFAEDVGSNKGAI I-----	269
-----LVFFAEDVGSNKGAI I-----	270
-----VFFAEDVGSNKGAI I-----	271
-----FFAEDVGSNKGAI I-----	272
-----FAEDVGSNKGAI I-----	273
-----AEDVGSNKGAI I-----	274
-----EDVGSNKGAI I-----	275
-----DVGSNKGAI I-----	276
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	277
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	278
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	279
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	280
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	281
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	282
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	283
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	284
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	285
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	286
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	287
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	288
-----HHQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	289
-----HQKLVFFAEDVGSNKGAI-----	290
-----QKLVFFAEDVGSNKGAI-----	291
-----KLVFFAEDVGSNKGAI-----	292

10

20

30

40

-----LVFFAEDVGSNKGAI-----	293
-----VFFAEDVGSNKGAI-----	294
-----FFAEDVGSNKGAI-----	295
-----FAEDVGSNKGAI-----	296
-----AEDVGSNKGAI-----	297
-----EDVGSNKGAI-----	298
-----DVGSNKGAI-----	299
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	300
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	301
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	302
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	303
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	304
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	305
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	306
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	307
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	308
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	309
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	310
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	311
-----HHQKLVFFAEDVGSNKG-----	312
-----HQKLVFFAEDVGSNKG-----	313
-----QKLVFFAEDVGSNKG-----	314
-----KLVFFAEDVGSNKG-----	315
-----LVFFAEDVGSNKG-----	316
-----VFFAEDVGSNKG-----	317
-----FFAEDVGSNKG-----	318
-----FAEDVGSNKG-----	319
-----AEDVGSNKG-----	320
-----EDVGSNKG-----	321
-----DVGSNKG-----	322
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	323
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	324
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	325
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	326
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	327
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	328
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	329
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	330
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	331

10

20

30

40

-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	332
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	333
-----VHHQKLVFFAEDVGSNKG-----	334
-----HHQKLVFFAEDVGSNKG-----	335
-----HQKLVFFAEDVGSNKG-----	336
-----QKLVFFAEDVGSNKG-----	337
-----KLVFFAEDVGSNKG-----	338
-----LVFFAEDVGSNKG-----	339
-----VFFAEDVGSNKG-----	340
-----FFAEDVGSNKG-----	341
-----FAEDVGSNKG-----	342
-----AEDVGSNKG-----	343
-----EDVGSNKG-----	344
-----DVGSNKG-----	345
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-----	346
-AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-----	347
--EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-----	348
---FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-----	349
----RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-----	350
-----HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-----	351
-----DSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-----	352
-----SGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-----	353
-----GYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-----	354
-----YEVHHQKLVFFAEDVGSNK-----	355
-----EVHHQKLVFFAEDVGSNK-----	356
-----VHHQKLVFFAEDVGSNK-----	357
-----HHQKLVFFAEDVGSNK-----	358
-----HQKLVFFAEDVGSNK-----	359
-----QKLVFFAEDVGSNK-----	360
-----KLVFFAEDVGSNK-----	361
-----LVFFAEDVGSNK-----	362
-----VFFAEDVGSNK-----	363
-----FFAEDVGSNK-----	364
-----FAEDVGSNK-----	365
-----AEDVGSNK-----	366
-----EDVGSNK-----	367
-----DVGSNK-----	368

10

20

30

40

からなる群から選択される配列と少なくとも66%の同一性を有する。

【0079】

詳細な実施形態によれば、本発明のアミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列は、選択された配列の少なくとも1個のアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されている配列番

50

号 1-368 からなる群から選択される配列に相当する。

【0080】

本発明の特定の実施形態においてアミノ酸置換が保存的である、すなわち置換するアミノ酸残基が置換されるアミノ酸残基と同様の物理的および化学的特性を有することは認識される。特に好ましい保存的アミノ酸置換群は、バリンーロイシンーイソロイシン、フェニルアラニンーチロシン、リジンーアルギニン、アラニンーバリンおよびアスパラギンーグルタミンである。

【0081】

さらに、同じ種類の D-アミノ酸（例えば L-リジンの代わりに D-リジン）での上の配列の 1 個以上個のアミノ酸の系統的置換も安定性を増強するために使用され得る。

10

【0082】

本発明の特定の実施形態においてアミノ酸置換は非保存的である、すなわち置換するアミノ酸残基が置換されるアミノ酸残基のものとは異なる物理的および化学的特性を有することは、さらに認識される。具体的にはこの実施形態は、結合を形成できる置換するアミノ酸残基に関する。つまり、そのようなアミノ酸置換は、置換するアミノ酸と、同様に置換するアミノ酸となり得るまたはなり得ない他のアミノ酸との間の共有結合の形成を可能にする。これはアミノ酸配列中の所定の位置のアミノ酸間での共有結合の導入を可能にする。

【0083】

さらなる詳細な実施形態によれば、本発明のアミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列は、配列番号 1-368 からなる群から選択される配列を含み、前記配列の少なくとも 2 個、例えば 2 個のアミノ酸は、所要の配列内共有結合を形成するために修飾される。例えば、2 つのアミノ酸のそれぞれはシステインに置換され得る。これは、種々の結合の形成を可能にする。そのようなアミノ酸置換の詳細な位置および種々の適切な結合は、本明細書に記載されている。さらに 1 個のアミノ酸は、システインによって置換されることができ、他のアミノ酸はリジンによって置換され得る。これは、種々の結合の形成を可能にする。そのようなアミノ酸置換の詳細な位置および種々の適切な結合は、本明細書に記載されている。さらに 1 個のアミノ酸は、グルタミン酸またはアスパラギン酸によって置換されることができ、他のアミノ酸はリジンによって置換され得る。これは、種々の結合の形成を可能にする。そのようなアミノ酸置換の詳細な位置および種々の適切な結合は、本明細書に記載されている。

20

30

【0084】

本発明のアミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列は、少なくとも 6 個、好ましくは少なくとも 8、10、12、14、16 または 18 個の連続アミノ酸残基を含む。さらに典型的な実施形態において、本発明のアミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列は、45、43、41、39、37 または 36 より少ない連続アミノ酸残基を含む。好ましい実施形態によれば、連続アミノ酸残基は、配列 VGSN、DVGSN または VGSNK を含む。他の好ましい実施形態によれば、連続アミノ酸残基は、配列 AED を含む。さらに他の好ましい実施形態によれば、連続アミノ酸残基は、配列 AED および配列 VGSN、DVGSN または VGSNK の内の 1 つの両方を、詳細には配列 AEDVGSN または AEDDVGSNK を含む。

40

【0085】

本発明のさらなる実施形態によれば、本発明のアミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列は、配列 $X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}-VGSN-X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$ を含み、 X_{19} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{23} 、 X_{28} 、 X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} 、 X_{32} がそれぞれ独立に、詳細には本明細書において定義のアミノ酸を表す。前記アミノ酸のそれぞれは他のアミノ酸と、他のアミノ酸が X_{19} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{22} 、 X_{23} 、 X_{28} 、 X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} 、 X_{32} または異なるアミノ酸残基を表すものから選択されて共有結合できる。好ましくはアミノ酸配列 $X_{19}X_{20}X_{21}$ と $X_{30}X_{31}X_{32}$ とは逆平行配向にある。

50

【0086】

本発明の詳細なアミロイドβペプチド類似体は、

X₁₉が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありフェニルアラニンが好ましく、

X₂₀が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありフェニルアラニンが好ましく、

X₂₁が、アラニン、バリン、グリシンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありアラニンが好ましく、

X₂₂が、グルタミン酸およびアスパラギン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基でありグルタミン酸が好ましく、

X₂₃が、グルタミン酸およびアスパラギン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基でありアスパラギン酸が好ましく、

X₂₈が、リジンおよびアルギニンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありリジンが好ましく、

X₂₉が、グリシン、アラニンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありグリシンが好ましく、

X₃₀が、アラニン、バリン、グリシンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありアラニンが好ましく、

X₃₁が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありイソロイシンが好ましく、

X₃₂が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありイソロイシンが好ましい、

またはこれらの任意の組合せであるものを含む。

【0087】

本発明のさらなる詳細なアミロイドβペプチド類似体は、アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が配列F₁₉X₂₀A₂₁—Q—A₃₀I₃₁I₃₂(X₂₀はアミノ酸を詳細には本明細書において定義のとおり表し、Qは配列VGSNを含むアミノ酸配列である。)を含むものを含む。

【0088】

アミノ酸配列Qは、通例5、6、7または8個のアミノ酸残基からなる。詳細な実施形態によれば、それはループを形成する、すなわちQのいくつかのまたは全てのアミノ酸はループを形成するように配置されている。

【0089】

配列F₁₉X₂₀A₂₁X₂₂D₂₃V₂₄G₂₅S₂₆N₂₇K₂₈X₂₉A₃₀I₃₁I₃₂(式中X₂₀、X₂₂、X₂₉がそれぞれ独立に、詳細には本明細書において定義のアミノ酸残基を表す。)を含むアミロイドβペプチド類似体は、本発明の好ましい実施形態を表す。これらのアミロイドβペプチド類似体において、アミノ酸配列F₁₉X₂₀A₂₁およびA₃₀I₃₁I₃₂は好ましくは逆平行配向にある。より詳細には、F₁₉(NH)—I₃₂(NH)、F₁₉(NH)—I₃₂(HB)、F₁₉(NH)—I₃₂(CG2)、A₂₁(NH)—A₃₀(NH)、A₂₁(NH)—A₃₀(CB)、A₂₁(NH)—I₃₁(CD1)、A₂₁(NH)—I₃₁(CG2)、I₃₂(NH)—F₁₉(CD1)、I₃₂(NH)—F₁₉(CD2)、I₃₂(HN)—F₁₉(CB)およびA₃₀(NH)—A₂₁(CB)からなる群から選択される少なくとも1つの原子対についてのプロトン間距離が1.8から6.5オングストロームである場合は好ましい。原子対F₁₉(CO)—I₃₂(N)、I₃₂(CO)—F₁₉(N)、A₂₁(CO)—A₃₀(N)およびA₃₀(CO)—A₂₁(N)が3.3±0.5Åの距離にあり(式中COが主鎖酸素原子を示す。)、残基のファイ(φ)角が-180から-30の範囲であり、残基のプサイ(ψ)角がおよそ60から180またはおよそ-180から-150の範囲である場合も好ましい。

【0090】

さらなる詳細な実施形態によれば、アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列は配列番号369-698からなる群から選択される配列であり、

X₁₂が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₃が、ヒスチジン、チロシン、セリン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₄が、ヒスチジン、チロシン、セリン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₅が、グルタミン、アスパラギン、メチオニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₆が、リジン、アルギニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₇が、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₈が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₉が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₀が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₁が、アラニン、バリン、グリシン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₂が、グルタミン酸、アスパラギン酸または配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₉が、グリシン、アラニンおよびセリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₀が、アラニン、バリン、グリシン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₁が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₂が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₃が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₄が、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₅が、メチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₆が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₇が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₈が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり

X₃₉が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀、X₂₁およびX₂₂からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX₂₉、X₃₀、X₃₁、X₃₂、X₃₃、X₃₄、X₃₅、X₃₆、X₃₇、X₃₈およびX₃₉からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 1 】

【 表 2 】

配列	
DAEFRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIAT	369
AEFRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIAT	370
EFRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIAT	371
FRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIAT	372
RHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIAT	373
HDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIAT	374
DSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIAT	375
SGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIAT	376
GYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIAT	377
YEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIAT	378
EX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIAT	379
X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIAT	380
X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ VVIAT	381
X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ GVVIAT	382
X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ GGVVIAT	383
X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ VGGVVIAT	384
X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ MVGGVVIAT	385
X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ LMVGGVVIAT	386
X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ GLMVGGVVIAT	387
X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ IGLMVGGVVIAT	388
X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ IIGLMVGGVVIAT	389
X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ AIIGLMVGGVVIAT	390
DAEFRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIA	391
AEFRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIA	392
EFRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIA	393
FRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIA	394
RHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIA	395
HDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ VIA	396

10

20

30

40

AEFRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ V	436
EFRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ V	437
FRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ V	438
RHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ V	439
HDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ V	440
DSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ V	441
SGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ V	442
GYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ V	443
YEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ V	444
EX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ V	445
X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉ V	446
X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ VV	447
X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ GVV	448
X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ GGVV	449
X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ VGGVV	450
X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ MVGGVV	451
X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ LMVGGVV	452
X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ GLMVGGVV	453
X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ I GLMVGGVV	454
X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ I I GLMVGGVV	455
X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ AI I GLMVGGVV	456
DAEFRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉	457
AEFRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉	458
EFRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉	459
FRHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉	460
RHDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉	461
HDSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉	462
DSGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉	463
SGYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉	464
GYEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉	465
YEX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉	466
EX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉	467
X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ X ₃₉	468
X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ X ₃₈ V	469
X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇ GV	470
X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ GGV	471
X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ VGGV	472
X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ MVGGV	473
X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ LMVGGV	474

20

30

40

40

X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ X ₃₇	514
X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆ G	515
X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ VG	516
X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ MVG	517
X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ LMVG	518
X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ GLMVG	519
X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ I GLMVG	520
X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ I I GLMVG	521
X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ AI I GLMVG	522
DAEFRHDSGYEVHXX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	523
AEFRHDSGYEVHXX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	524
EFRHDSGYEVHXX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	525
FRHDSGYEVHXX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	526
RHDSGYEVHXX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	527
HDSGYEVHXX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	528
DSGYEVHXX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	529
SGYEVHXX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	530
GYEVHXX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	531
YEVHXX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	532
EVHXX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	533
VHXX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	534
VHX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	535
HX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	536
X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ X ₃₆	537
X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅ V	538
X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ MV	539
X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ LMV	540
X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ GLMV	541
X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ I GLMV	542
X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ I I GLMV	543
X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ AI I GLMV	544
DAEFRHDSGYEVHHQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	545
AEFRHDSGYEVHHQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	546
EFRHDSGYEVHHQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	547
FRHDSGYEVHHQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	548
RHDSGYEVHHQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	549
HDSGYEVHHQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	550
DSGYEVHHQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	551
SGYEVHHQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	552

10

20

30

40

GYEVHHQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	553
YEVHHQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	554
EVHHQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	555
VHHQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	556
HHQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	557
HQX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	558
QX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	559
X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ X ₃₅	560
X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄ M	561
X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ LM	562
X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ GLM	563
X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ I GLM	564
X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ I I GLM	565
X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ AI I GLM	566
DAEFRHDSGYEVHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	567
AEFRHDSGYEVHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	568
EFRHDSGYEVHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	569
FRHDSGYEVHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	570
RHDSGYEVHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	571
HDSGYEVHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	572
DSGYEVHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	573
SGYEVHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	574
GYEVHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	575
YEVHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	576
EVHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	577
VHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	578
HHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	579
HQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	580
QKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	581
KX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	582
X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	583
X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ L	584
X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ GL	585
X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ I GL	586
X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ I I GL	587
X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ AI I GL	588
DAEFRHDSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	589
AEFRHDSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	590
EFRHDSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	591

10

20

30

40

FRHDSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	592
RHDSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	593
HDSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	594
DSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	595
SGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	596
GYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	597
YEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	598
EVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	599
VHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	600
HHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	601
HQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	602
QKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	603
KLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	604
LX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	605
X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	606
X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ G	607
X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ IG	608
X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ IIIG	609
X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ AIIG	610
DAEFRHDSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	611
AEFRHDSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	612
EFRHDSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	613
FRHDSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	614
RHDSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	615
HDSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	616
DSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	617
SGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	618
GYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	619
YEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	620
EVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	621
VHHQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	622
HHQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	623
HQKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	624
QKLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	625
KLX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	626
LVX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	627
VX ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	628
X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	629
X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ I	630

10

20

30

40

X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ I I	631
X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ A I I	632
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	633
AEFRHDSGYEVHHQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	634
EFRHDSGYEVHHQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	635
FRHDSGYEVHHQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	636
RHDSGYEVHHQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	637
HDSGYEVHHQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	638
DSGYEVHHQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	639
SGYEVHHQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	640
GYEVHHQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	641
YEVHHQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	642
EVHHQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	643
VHHQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	644
HHQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	645
HQKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	646
QKLVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	647
KLFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	648
LVFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	649
VFX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	650
FX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	651
X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	652
X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀ I	653
X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ A I	654
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	655
AEFRHDSGYEVHHQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	656
EFRHDSGYEVHHQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	657
FRHDSGYEVHHQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	658
RHDSGYEVHHQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	659
HDSGYEVHHQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	660
DSGYEVHHQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	661
SGYEVHHQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	662
GYEVHHQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	663
YEVHHQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	664
EVHHQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	665
VHHQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	666
HHQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	667
HQKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	668
QKLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	669

10

20

30

40

KLVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	670
LVFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	671
VFFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	672
FFX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	673
FX ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	674
X ₂₁ X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ X ₃₀	675
X ₂₂ DVGSNKX ₂₉ A	676
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	677
AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	678
EFRHDSGYEVHHQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	679
FRHDSGYEVHHQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	680
RHDSGYEVHHQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	681
HDSGYEVHHQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	682
DSGYEVHHQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	683
SGYEVHHQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	684
GYEVHHQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	685
YEVHHQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	686
EVHHQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	687
VHHQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	688
HHQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	689
HQKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	690
QKLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	691
KLVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	692
LVFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	693
VFFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	694
FFAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	695
FAX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	696
AX ₂₂ DVGSNKX ₂₉	697
X ₂₂ DVGSNKX ₂₉	698

10

20

30

【 0 0 9 2 】

1 つまたは複数の前記配列内共有結合は、記載のとおり、本発明のアミロイドβペプチド類似体のループを安定化させるためであり、必要に応じてさらなる2次構造要素を安定化させるためである。したがって共有結合しているアミノ酸残基は、少なくともループ形成アミノ酸によって、例えば配列V G S N、D V G S N、V G S N KまたはQによって本明細書において記載のとおり好都合にも分離される。配列番号3 6 9－6 9 8における配列内共有結合の特に好ましい位置は、以下の実施形態の形式で記載され得る。

40

【 0 0 9 3 】

X_{1 2}、X_{1 3}、X_{1 4}からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX_{3 7}、X_{3 8}、X_{3 9}からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【 0 0 9 4 】

X_{1 3}、X_{1 4}、X_{1 5}からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX_{3 6}、X_{3 7}、X_{3 8}からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互

50

に共有結合している。

【0095】

X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基と X_{35} 、 X_{36} 、 X_{37} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0096】

X_{15} 、 X_{16} 、 X_{17} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基と X_{34} 、 X_{35} 、 X_{36} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0097】

X_{16} 、 X_{17} 、 X_{18} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基と X_{33} 、 X_{34} 、 X_{35} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0098】

X_{17} 、 X_{18} 、 X_{19} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基と X_{32} 、 X_{33} 、 X_{34} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0099】

X_{18} 、 X_{19} 、 X_{20} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基と X_{31} 、 X_{32} 、 X_{33} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0100】

X_{19} 、 X_{20} 、 X_{21} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基と X_{30} 、 X_{31} 、 X_{32} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0101】

X_{20} 、 X_{21} および X_{22} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基と X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0102】

より詳細には、アミノ酸残基 X_{12} と X_{39} とが、 X_{13} と X_{38} とが、 X_{14} と X_{37} とが、 X_{15} と X_{36} とが、 X_{16} と X_{35} とが、 X_{17} と X_{34} とが、 X_{18} と X_{33} とが、 X_{19} と X_{32} とが、 X_{20} と X_{31} とが、 X_{21} と X_{30} とが、または X_{22} と X_{29} とが好都合にも相互に共有結合できる。

【0103】

本発明のさらなる実施形態によれば、本発明のアミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列は、配列 $X_{20}A_{21}E_{22}D_{23}X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$ を含み、 X_{20} 、 X_{24} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{27} 、 X_{28} 、 X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} がそれぞれ独立に、詳細には本明細書において定義のアミノ酸を表す。前記アミノ酸のそれぞれは他のアミノ酸と、他のアミノ酸が X_{20} 、 X_{24} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{27} 、 X_{28} 、 X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} または異なるアミノ酸を表すものから選択されて共有結合できる。好ましくはアミノ酸配列 $X_{20}A_{21}E_{22}D_{23}$ と $X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$ とは逆平行配向にある。

【0104】

本発明の詳細なアミロイドβペプチド類似体は、
 X_{20} が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありフェニルアラニンが好ましく、
 X_{24} が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありバリンが好ましく、
 X_{25} が、グリシン、アラニンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸残基であ

10

20

30

40

50

りグリシンが好ましく、

X₂₆が、セリン、グリシン、アラニンおよびスレオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありセリンが好ましく、

X₂₇が、アスパラギン、グルタミンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありアスパラギンが好ましく、

X₂₈が、リジンおよびアルギニンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありリジンが好ましく、

X₂₉が、グリシン、アラニンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありグリシンが好ましく、

X₃₀が、アラニン、バリン、グリシンおよびセリンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありアラニンが好ましく、

X₃₁が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニンおよびメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基でありイソロイシンが好ましい、

またはこれらの任意の組合せであるものを含む。

【0105】

本発明のさらなる詳細なアミロイドβペプチド類似体は、アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が配列X₂₀—Q—X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉A₃₀I₃₁を含み、X₂₀、X₂₄、X₂₅、X₂₆、X₂₇、X₂₈、X₂₉がそれぞれ独立に、詳細には本明細書において定義のアミノ酸を表し、Qが配列AEDを含むアミノ酸配列であるものを含む。

【0106】

アミノ酸配列Qは、通例3、4、5または6個のアミノ酸残基からなる。詳細な実施形態によりアミノ酸配列X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇の少なくとも一部はループを形成している。

【0107】

アミロイドβペプチド類似体は、配列X₂₀A₂₁E₂₂D₂₃X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉A₃₀I₃₁を含み、X₂₀、X₂₄、X₂₅、X₂₆、X₂₇、X₂₈、X₂₉がそれぞれ独立に、詳細には本明細書において定義のアミノ酸残基を表し、本発明の好ましい実施形態を表す。これらのアミロイドβペプチド類似体において、アミノ酸配列X₂₀A₂₁E₂₂D₂₃およびX₂₈X₂₉A₃₀I₃₁の少なくとも3個の連続アミノ酸は、好ましくは逆平行配向にある。より詳細には、A₂₁(NH)—A₃₀(NH)、A₂₁(NH)—A₃₀(CB)、A₂₁(NH)—I₃₁(CD1)、A₂₁(NH)—I₃₁(CG2)およびA₃₀(NH)—A₂₁(CB)からなる群から選択される少なくとも1つの原子対についてのプロトン間距離が1.8から6.5オングストロームである場合は好ましい。原子対A₂₁(CO)—A₃₀(N)およびA₃₀(CO)—A₂₁(N)が3.3±0.5Åの距離にあり、式中COが主鎖酸素原子を示し、残基のファイ(φ)角が−180から−30の範囲であり、残基のプサイ(ψ)角がおよそ60から180またはおよそ−180から−150の範囲である場合も好ましい。

【0108】

さらなる詳細な実施形態によれば、アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列は配列番号699—960からなる群から選択される配列であり、

X₁₂が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₃が、ヒスチジン、チロシン、セリン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₄が、ヒスチジン、チロシン、セリン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₅が、グルタミン、アスパラギン、メチオニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₆が、リジン、アルギニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ

10

20

30

40

50

酸残基であり、

X₁₇ が、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₈ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₁₉ が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₀ が、フェニルアラニン、チロシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₄ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、 10

X₂₅ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₆ が、セリン、グリシン、アラニン、スレオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₇ が、アスパラギン、グルタミン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₈ が、リジン、アルギニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₂₉ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、 20

X₃₀ が、アラニン、バリン、グリシン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₁ が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₂ が、イソロイシン、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₃ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₄ が、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、 30

X₃₅ が、メチオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₆ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₇ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₈ が、グリシン、アラニン、セリンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、

X₃₉ が、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、メチオニンまたは配列の他のアミノ酸残基に共有結合しているアミノ酸残基であり、 40

X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀ からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基と X₂₉、X₃₀、X₃₁、X₃₂、X₃₃、X₃₄、X₃₅、X₃₆、X₃₇、X₃₈ および X₃₉ からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0109】

【表 3】

配列	
DAEFRHDSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIAT}	699
AEFRHDSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIAT}	701
EFRHDSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIAT}	702
FRHDSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIAT}	703
RHDSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIAT}	704
HDSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIAT}	705
DSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIAT}	706
SGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIAT}	707
GYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIAT}	708
YEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIAT}	709
EX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIAT}	710
X _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIAT}	711
X _{13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38}VVIAT}	712
X _{14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37}GVIAT}	713
X _{15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36}GGVVIAT}	714
X _{16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35}VGGVVIAT}	715
X _{17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34}MVGGVVIAT}	716
X _{18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33}LMVGGVVIAT}	717
X _{19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32}GLMVGGVVIAT}	718
X _{20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31}I GLMVGGVVIAT}	719
DAEFRHDSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIA}	720
AEFRHDSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIA}	721
EFRHDSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIA}	722
FRHDSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIA}	723
RHDSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIA}	724
HDSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIA}	725
DSGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIA}	726
SGYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIA}	727
GYEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIA}	728
YEX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIA}	729
EX _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIA}	730
X _{12X13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38X39}VIA}	731
X _{13X14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37X38}VVIA}	732
X _{14X15X16X17X18X19X20AEDX_{24X25X26X27X28X29X30X31X32X33X34X35X36X37}GVVIA}	733

20

40

40

40

40

40

EVHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	891
VHHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	892
HHQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	893
HQKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	894
QKX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	895
KX ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	896
X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ X ₃₄	897
X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃ L	898
X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ GL	899
X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ IGL	900
DAEFRHDSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	901
AEFRHDSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	902
EFRHDSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	903
FRHDSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	904
RHDSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	905
HDSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	906
DSGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	907
SGYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	908
GYEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	909
YEVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	910
EVHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	911
VHHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	912
HHQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	913
HQKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	914
QKLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	915
KLX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	916
LX ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	917
X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ X ₃₃	918
X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂ G	919
X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ IG	920
DAEFRHDSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	921
AEFRHDSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	922
EFRHDSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	923
FRHDSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	924
RHDSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	925
HDSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	926
DSGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	927
SGYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	928
GYEVHHQKLX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	929

10

20

30

40

YEVHHQKLVX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	930
EVHHQKLVX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	931
VHHQKLVX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	932
HHQKLVX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	933
HQKLVX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	934
QKLVX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	935
KLX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	936
LVX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	937
VX ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	938
X ₁₉ X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ X ₃₂	939
X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ I	940
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	941
AEFRHDSGYEVHHQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	942
EFRHDSGYEVHHQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	943
FRHDSGYEVHHQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	944
RHDSGYEVHHQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	945
HDSGYEVHHQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	946
DSGYEVHHQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	947
SGYEVHHQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	948
GYEVHHQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	949
YEVHHQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	950
EVHHQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	951
VHHQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	952
HHQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	953
HQKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	954
QKLVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	955
KLX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	956
LVFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	957
VFX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	958
FX ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	959
X ₂₀ AEDX ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁	960

10

20

30

【0110】

1つまたは複数の前記配列内共有結合は、記載のとおり本発明のアミロイドβペプチド類似体のループを安定化させるためであり、必要に応じてさらなる2次構造要素を安定化させるためである。したがって共有結合しているアミノ酸残基は、少なくともループ形成アミノ酸、例えば配列X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇によって本明細書において記載のとおり好都合にも分離される。配列番号699-960における配列内共有結合の特に好ましい位置は、以下の実施形態の形式で記載され得る。

40

【0111】

X₁₂、X₁₃、X₁₄からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX₃₇、X₃₈、X₃₉からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0112】

X₁₃、X₁₄、X₁₅からなる群から選択される少なくとも1個のアミノ酸残基とX

50

X_{36} 、 X_{37} 、 X_{38} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0113】

X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基と X_{35} 、 X_{36} 、 X_{37} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0114】

X_{15} 、 X_{16} 、 X_{17} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基と X_{34} 、 X_{35} 、 X_{36} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

10

【0115】

X_{16} 、 X_{17} 、 X_{18} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基と X_{33} 、 X_{34} 、 X_{35} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0116】

X_{17} 、 X_{18} 、 X_{19} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基と X_{32} 、 X_{33} 、 X_{34} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0117】

X_{18} 、 X_{19} 、 X_{20} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基と X_{31} 、 X_{32} 、 X_{33} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

20

【0118】

X_{19} 、 X_{20} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基と X_{30} 、 X_{31} 、 X_{32} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0119】

アミノ酸残基 X_{20} と X_{29} 、 X_{30} 、 X_{31} からなる群から選択される少なくとも 1 個のアミノ酸残基とが相互に共有結合している。

【0120】

30

より詳細には、アミノ酸残基 X_{12} と X_{39} とが、 X_{13} と X_{38} とが、 X_{14} と X_{37} とが、 X_{15} と X_{36} とが、 X_{16} と X_{35} とが、 X_{17} と X_{34} とが、 X_{18} と X_{33} とが、 X_{19} と X_{32} とが、または X_{20} と X_{31} とが好都合にも相互に共有結合できる。

【0121】

本発明のアミロイド β ペプチド類似体のアミノ酸配列が、本明細書において具体的に記載される以外のアミノ酸残基も含み得ることに留意されたい。詳細には、1 個または 1 個を超える追加的アミノ酸残基が配列番号 1-960 からなる群から選択される配列の N 末端位置および／または C 末端位置に存在できる。例えば本発明のアミロイド β ペプチド類似体のアミノ酸配列は、特にアミノ酸配列に相当するペプチドが原核生物宿主において組換え的に産生される場合に、配列番号 1-960 に明記する配列の内の 1 つの N 末端位置にメチオニンを含み得る。さらに 1 個または 1 個を超えるアミノ酸が本明細書において記載のアミノ酸配列に挿入され得る。

40

【0122】

配列番号 1-960 において、配列番号 1、配列番号 369 または配列番号 699 のいずれかから N 末端アミノ酸を 3、11、15 または 19 個欠失している配列が本発明の詳細な実施形態を表すことにさらに留意されたい。

【0123】

同様に配列番号 1-960 において、配列番号 1、配列番号 369 または配列番号 699 のいずれかから C 末端アミノ酸を 1、2、3、4、5、6、7 または 8 個欠失している

50

配列が本発明の詳細な実施形態を表すことに留意されたい。

【0124】

本発明の詳細な実施形態は、アミノ酸配列がA β (1-42)、A β (12-42)、A β (16-42)、A β (20-42)またはA β (16-35)であり、位置14、15、16、17、18、19、20、21または22のアミノ酸がシステイン、リジン、グルタミン酸またはアスパラギン酸からなる群から選択され、具体的にはシステインまたはリジンであり、位置37、36、35、34、33、32、31、30または29のアミノ酸がシステイン、リジン、グルタミン酸またはアスパラギン酸からなる群から選択され、詳細にはシステイン、リジンまたはグルタミン酸であり、位置14のアミノ酸が位置37のアミノ酸と共有結合しており、位置15のアミノ酸が位置36のアミノ酸と共有結合しており、位置16のアミノ酸が位置35のアミノ酸と共有結合しており、位置17のアミノ酸が位置34のアミノ酸と共有結合しており、位置18のアミノ酸が位置33のアミノ酸と共有結合しており、位置19のアミノ酸が位置32のアミノ酸と共有結合しており、位置20のアミノ酸が位置31のアミノ酸と共有結合しており、位置21のアミノ酸が位置30のアミノ酸と共有結合しており、位置22のアミノ酸が位置29のアミノ酸と共有結合している、本明細書において定義のアミロイド β ペプチド類似体を含む。

10

【0125】

2個のアミノ酸残基間の共有結合は、当技術分野において周知の種々の手段、例えばジスルフィド架橋形成または架橋結合技術によって達成され得る。詳細には、アミノ酸残基の側鎖は、相互に結合され得る。特に官能基、例えばチオール、アミノ、カルボキシルまたはヒドロキシル基を有する側鎖は、例えばジスルフィド結合を形成する2個のシステイン残基などのように直接相互に結合でき、またはリンカーを介して間接的に結合できる。したがって他のアミノ酸残基と共有結合しているアミノ酸残基は、詳細には、システイン、リジン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基であり得る。

20

【0126】

タンパク質の架橋は、多くの先行文献を含む長く包括的な歴史を有する。天然または非天然アミノ酸側鎖の間に特定の共有結合架橋の作製を可能にする当業者に周知の任意の方法は、本発明において計画する位置特異的架橋を形成するために使用され得る。この方法のいくつかの例を下に列挙する。

30

【0127】

当業者に周知である多数の化学的架橋結合剤がある。本発明のために好ましい架橋剤としてホモ二官能性架橋リンカーおよびヘテロ二官能性架橋リンカーが挙げられ、ヘテロ二官能性架橋リンカーが段階的なやり方でアミノ酸を架橋するこれらの適合性のため好まれる。

【0128】

ヘテロ二官能性架橋リンカーは、より特異的な架橋を確立する能力も提供し、それにより望ましくない副反応の発生を低減する。

【0129】

多種多様なヘテロ二官能性架橋リンカーが当技術分野において周知である。

40

【0130】

これらは、2つのアミノ($-NH_2$)基の間、1つのアミノ基と1つのチオール(またはスフヒドリル、すなわち $-SH$)基の間または2つのチオール基の間の結合を形成するためのヘテロ二官能性架橋リンカーを含む。

【0131】

ヘテロ二官能性架橋リンカーの一部として有用な1つの反応基は、アミン反応基である。慣用のアミン反応基として、N-ヒドロキシサクシニミド(NHS)エステルが挙げられる。NHSエステルは、わずかに酸性から中性(pH 6.5-7.5)条件下で遊離アミン(例えばリジン残基)と数分の内に特異的に反応する。

【0132】

50

N-ヒドロキシサクシニミド成分を有する架橋結合剤は、一般により高い水溶性を有するこれらのN-ヒドロキシスルホサクシニミド類似体の形態においても使用され得ることが記載される。

【0133】

ヘテロ二官能性架橋リンカーの一部として有用な他の反応基は、チオール反応基である。慣用のチオール反応基として、マレイミド、ハロゲンおよびピリジルジスルフィドが挙げられる。マレイミドは、好ましくはわずかに酸性から中性 (pH 6.5-7.5) 条件下で遊離チオール基 (例えばシステイン残基中の) と数分の内に特異的に反応する。ハロゲン (ヨードアセチル官能基) は、-SH基と生理学的 pH で反応する。これら両方の反応基は、安定なチオエーテル結合の形成をもたらす。

10

【0134】

例えばサクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC) またはスルホ-SMCC は、例えば Lys 側鎖のアミンと例えば Cys 側鎖の遊離 SH との間の架橋結合を形成するために使用され得る。アミン反応性 N-ヒドロキシサクシニミド (NHS) エステルは、アミノ基 (例えば Lys 残基のアミノ基) と反応し安定なアミド結合を形成する。生じるマレイミド活性化ペプチドは、次いで同じペプチドのスルフヒドリル基 (例えば Cys 残基のスルフヒドリル基) と反応しジスルフィド結合を形成し、それにより共有結合を確立する。この化学は文献に十分に記載されており; 例えば、Uto, I. ら、(1991)、J. Immunol. Methods 138、87-94 頁; Bieniarz, C. ら、(1996)、Extended Length Heterobifunctional Coupling Agents for Protein Conjugations. Bioconjug. Chem. 7、88-95 頁; Chrisey, L. A. ら、(1996)、Nucleic Acids Res. 24 (15)、3031-3039 頁; Kuijpers, W. H. ら、(1993)、Bioconjug. Chem. 4 (1)、94-102 頁; Brinkley, M. A. (1992). A survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and crosslinking reagents. Bioconjugate Chem. 3、2-13 頁; Hashida, S. ら、(1984) More useful maleimide compounds for the conjugation of Fab to horseradish peroxidase through thiol groups in the hinge. J. Appl. Biochem. 6、56-63 頁; Mattson, G. ら、(1993). A practical approach to crosslinking. Molecular Biology Reports 17、167-183 頁; Partis, M. D. ら、(1983). Crosslinking of proteins by omega-maleimido alkanoyl N-hydroxysuccinimide esters. J. Protein. Chem. 2、263-277 頁; Samoszuk, M. K. ら (1989). A peroxide-generating immunoconjugate directed to eosinophil peroxidase is cytotoxic to Hodgkin's disease cells in vitro. Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 2、37-45 頁; Yoshitake, S. ら、(1982). Mild and efficient conjugation of rabbit Fab and horseradish peroxidase using a maleimide compound and its use for enzyme immunoassay. J. Biochem. 92、1413-1424 頁を参照されたい。

20

30

40

【0135】

さらなるヘテロ二官能性架橋リンカーは、同様に使用され得る、例えば ([N-ε-マ

50

レイミドカプロイルオキシ] サクシニミドエステル、N- [γ-マレイミドブチリルオキシ] サクシニミドエステル、N- [κ-マレイミドウンデカノイルオキシ] スルホサクシニミドエステル、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル (MBS) またはこれらのスルホサクシニミド類似体 (例えばスルホ-MBS)。

【0136】

例えばLys側鎖のアミンと例えばCys側鎖の遊離-SHとの間の架橋結合を形成するために使用され得るヘテロ二官能性架橋リンカーのさらなる例は、サクシニミジル-6-[(3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオン酸]ヘキサノ酸(LC-SPDP)またはスルホ-LC-SPDPである。アミン反応性N-ヒドロキシサクシニミド(NHS)エステルは、アミノ基(例えばLys残基の)と反応し安定なアミド結合を形成する。生じたペプチドは、次いで同じペプチドのスルフヒドリル基(例えばCys残基の)と反応し、ジスルフィド結合を形成するピリジルジスルフィド基を有し、それにより共有結合を確立する。この化学は文献に十分に記載されており; 例えばCarlsson, J. ら、(1978) Biochem. J. 173、723-737頁; Stan, R. V. (2004) Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 286、H1347-H1353; Mader, C. ら、(2004) J. Bacteriol. 186、1758-1768頁を参照されたい。

10

【0137】

さらなるヘテロ二官能性架橋リンカーは、同様の様式で使用され得る、例えば4-サクシニミジルオキシカルボニル-α-メチル-α-(2-ピリジルジチオ)-トルエン(SMPT)またはスルホ-SMPT、N-サクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオン酸(SPDP)またはスフホ-SPDP。

20

【0138】

(例えばLys側鎖の)アミンと(例えばCys側鎖の)遊離-SHとの間に架橋結合を形成するために使用され得るヘテロ二官能性架橋リンカーのさらなる例は、N-サクシニミジル-S-アセチルチオ酢酸(SATA)またはスフホ-SATAである。アミン反応性N-ヒドロキシサクシニミド(NHS)エステルは、アミノ基(例えばLys残基のアミノ基)と反応し、安定なアミド結合を形成する。得られたペプチドの保護された-SH基は、次いでヒドロキシルアミンでの処置によって脱保護され、得られた遊離-SHは、次いで同じペプチドのスルフヒドリル基(例えばCys残基のスルフヒドリル基)と反応してジスルフィド結合を形成し、それにより共有結合を確立する。

30

【0139】

さらなるヘテロ二官能性架橋リンカーは、同様の様式で使用され得る、例えばN-サクシニミジル-S-アセチルチオプロピオン酸またはそのスルホサクシニミド類似体。

【0140】

さらなる適切なヘテロ二官能性架橋リンカーとして、N-サクシニミジル-(4-ヨードアセチル)-アミノ安息香酸(SIAB)またはスルホ-SIABが挙げられる。

【0141】

特定の、段階的架橋結合もアミノ基(-NH₂)とカルボキシ基(-COOH)との間に形成され得る。

40

【0142】

例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)は、例えばLys側鎖のアミンと酸性側鎖の遊離-COOHとの間の架橋結合を形成するために使用され得る。カルボキシ反応性カルボジイミドは、カルボキシ基(例えばAsp、Glu、Dab(2,4-ジアミノ酪酸)、Dap(2,4-ジアミノプロピオン酸)またはオルニチン残基のカルボキシ基)と反応して不安定なo-アシルイソウレアエステルを形成する。反応性o-アシルイソウレアエステルは、次いで同じペプチドのアミノ基(例えばLys残基のアミノ基)と反応してアミド結合を形成し、それにより共有結合を確立する。別法として反応性o-アシルイソウレアエステルは、N-ヒドロキシサクシニミド、N-ヒドロキシスルホサクシニミドまたはスルホ-N-ヒドロキシスルホサ

50

クシニミドと反応でき、半安定性アミン反応性NHSEステルを生じ、次いで同じペプチドのアミノ基（例えばLys残基のアミノ基）と反応してアミド結合を形成し、それにより共有結合を確立する。この化学は文献に十分に記載されており、例えば：DeSliya, N. S. (2003) Interactions of Surfactant Protein D with Fatty Acids. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 29、757-770頁；Grabarek, Z. およびGergely, J. (1990) Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. Anal. Biochem. 185、131-135頁；Sinz, A. (2003). J. Mass Spectrom. 38、1225-1237頁。Staros, J. V. , Wright, R. W. およびSwingle, D. M. (1986) Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Anal. Biochem. 156、220-222頁；Taniuchi, M. ら、(1986). Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83、4094-4098頁を参照されたい。

10

【0143】

ヘテロ二官能性架橋リンカーは、Lys (N3) とプロパギルグリシンアミノ酸との反応も含む。この反応は、溶液中または樹脂上で実施され得る（例えばJiang, S. , (2008) Curr. Org. Chem. 12、1502-1542頁およびこの参照文献に記載のとおり。）。

20

【0144】

架橋リンカーの詳細な種類、具体的にはヘテロ二官能性架橋リンカーは光反応性架橋リンカーを含む。

【0145】

例えば(SDA)は、（例えばLys側鎖の）アミンと（例えば他のLys側鎖の）アミンとの間の架橋結合を形成するために使用され得る。アミン反応性N-ヒドロキシサクシニミド(NHS)エステルは、アミノ基（例えばLys残基のアミノ基）と反応し安定なアミド結合を形成する。生じるペプチドは、感光性ジアジリン成分を有し、UV光への暴露において同じペプチドのアミノ基（例えばLys残基のアミノ基）と反応して安定な結合を形成し、それにより共有結合を確立する。

30

【0146】

さらなる適切な光反応性架橋リンカーとして、ビス- $[\beta-(4\text{-アジドサリチルアミド})\text{-エチル}]\text{-ジスルフィド (BASED)}$ およびN-サクシニミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニル-アミノ)-ヘキサノ酸(SANPAH)が挙げられる。

【0147】

ヘテロ二官能性架橋リンカーに加えて、ホモ二官能性架橋リンカーを含む多数の他の架橋リンカー剤が存在する。

40

【0148】

これらは、2つのアミノ(-NH_2)基の間の結合を形成するためのホモ二官能性架橋リンカーを含む。

【0149】

例えばジサクシニミジルスベリン酸(DSS)は、（例えばLys側鎖の）アミンと（例えば他のLys側鎖の）アミンとの間の架橋結合を形成するために使用され得る。アミン反応性N-ヒドロキシサクシニミド(NHS)エステルは、アミノ基（例えばLys残基のアミノ基）と反応し安定なアミド結合を形成する。生じるペプチドは、次いで同じペプチドの他のアミノ基（例えばLys残基のアミノ基）と反応してさらなる安定なアミド結合を形成し、それにより共有結合を確立する。

50

【0150】

さらなる適切なホモ二官能性架橋リンカーは、ビスマレイミドヘキササン (BMH) およびピメルイミド酸ジメチル (DMP) を含む。

【0151】

さらなる適切なホモ二官能性架橋リンカーは、2個のシステイン間のメチレンジチオエーテル結合を含む。ペプチドとTBFAF (フッ化テトラブチルアンモニウム) との反応は、部分的に脱保護されたペプチドを含有する樹脂上で実施されることができ、切断が続く (例えば、Uekiら、(1999) Bioorg. Med. Chem. Lett.、9、1767-1772頁およびUekiら、in Peptide Science、1999、539-541頁を参照されたい。)。 10

【0152】

さらなる適切なホモ二官能性架橋リンカー系は、アリルグリシン間の (例えば、Wells, B. ら、(2005) Bioorg. Med. Chem. 13、4221-4227頁を参照されたい。) または修飾アミノ酸、例えば (S)-Fmoc- α (2' ペンテニル) アラニン間の (例えば、Walensky, L. D. ら、(2004) Science 305、1466-1470頁; Schafmeister, C. E. ら、(2000) J. Am. Chem. Soc. 122、5891-5892頁; Qiu, W. ら、(2000) Tetrahedron 56、2577-2582頁; Belokon, Y. N. ら、(1998) Tetrahedron: Asymmetry、9、4249-4252頁); Qiu W., (2008) Anaspec poster at 20th American Peptide Society Annual Meetingを参照されたい。) 閉環メタセシス反応を含む。これらの反応は、それぞれ溶液中の保護されたペプチド断片上でまたは樹脂上で実施され得る。 20

【0153】

ホモおよびヘテロ二官能性架橋リンカーは、スパーサーアームまたはブリッジを含み得る。ブリッジは、2つの反応性末端をつないでいる構造である。ブリッジの最も明らかな特質は、立体障害へのその効果である。ある場合には、長いブリッジは、2個のアミノ酸残基を結合するために必要な距離により容易に及び得る。

【0154】

2個の非連続アミノ酸残基間の1つの共有結合は十分な安定化を提供し得るが、本発明のアミロイド β ペプチド類似体は1つより多い共有結合を含み得る。 30

【0155】

本発明は、本明細書において定義の複数のアミロイド β ペプチド類似体を含むオリゴマーにも関する。

【0156】

用語「オリゴマー」は本明細書において、均一性および異なる物理的特徴を有する本明細書において定義の2つ以上のアミロイド β ペプチド類似体の非共有結合性会合を意味する。一態様によれば、オリゴマーは、アミロイド β ペプチド類似体の安定な、非原線維性のオリゴマー会合体である。一実施形態によれば、前記会合体は、2から28個のアミロイド β ペプチド類似体を含む。 40

【0157】

そのようなオリゴマーは、2つまたはアミロイド β ペプチド類似体間の具体的な相互作用によってさらに特徴付けられ得る。

【0158】

例えば各アミロイド β ペプチド類似体のアミノ酸配列が、1つのアミロイド β ペプチド類似体 (A) の配列 $L^A_{34} M^A_{35} V^A_{36} G^A_{37} G^A_{38}$ が別のアミロイド β ペプチド類似体 (B) の配列 $L^B_{34} M^B_{35} V^B_{36} G^B_{37} G^B_{38}$ と平行配向にある配列 $L_{34} M_{35} V_{36} G_{37} G_{38}$ を含む場合は好ましい。より詳細には、 $M^A_{35} (NH) - V^B_{36} (NH)$ 、 $G^A_{37} (NH) - G^B_{38} (NH)$ 、 $L^A_{34} (NH) - L^B_{34} (C_8H_3)$ 、 $M^A_{35} (NH) - V^B_{36} (C_\gamma H_3)$ からなる群から選択され 50

る少なくとも1つの原子対についてのプロトン間距離が1.8から6.5オングストロームである場合は好ましい。

【0159】

さらなる実施形態によれば、本発明は、各アミロイドβペプチド類似体のアミノ酸配列が、1つのアミロイドβペプチド類似体(A)の配列 $G^A_{33}L^A_{34}M^A_{35}V^A_{36}G^A_{37}G^A_{38}V^A_{39}$ が別のアミロイドβペプチド類似体(B)の配列 $G^B_{33}L^B_{34}M^B_{35}V^B_{36}G^B_{37}G^B_{38}V^B_{39}$ と平行配向にある配列 $G_{33}L_{34}M_{35}V_{36}G_{37}G_{38}V_{39}$ を含むオリゴマーに関する。より詳細には、 $G^A_{33}(NH)-G^B_{34}(NH)$ 、 $M^A_{35}(NH)-V^B_{36}(NH)$ 、 $G^A_{37}(NH)-G^B_{38}(NH)$ 、 $L^A_{34}(NH)-L^B_{34}(C_\delta H_3)$ 、 $M^A_{35}(NH)-V^B_{36}(C_\gamma H_3)$ 、 $G^A_{38}(NH)-V^B_{39}(C_\gamma H_3)$ および $V^A_{39}(NH)-V^B_{39}(C_\gamma H_3)$ からなる群から選択される少なくとも1つの原子対についてのプロトン間距離が1.8から6.5オングストロームである場合は好ましい。

10

【0160】

さらにオリゴマーが、異なるアミロイドβペプチド類似体のβ-ストランドによって形成される分子間平行β-シートを含む場合は好ましい。さらなる詳細な実施形態によれば、β-シートは、1つのアミロイドβペプチド類似体(A)のアミノ酸配列 $G^A_{33}L^A_{34}M^A_{35}V^A_{36}G^A_{37}G^A_{38}V^A_{39}$ および別のアミロイドβペプチド類似体(B)のアミノ酸配列 $G^A_{33}L^A_{34}M^A_{35}V^A_{36}G^A_{37}G^A_{38}V^A_{39}$ を含む。より詳細には、原子対 $G^A_{33}(CO)-L^B_{34}(N)$ 、 $L^B_{34}(CO)-M^A_{35}(N)$ 、 $M^A_{35}(CO)-V^B_{36}(N)$ 、 $V^B_{36}(CO)-G^A_{37}(N)$ および $G^B_{37}(CO)-G^A_{38}(N)$ が $3.3 \pm 0.5 \text{ \AA}$ の距離にあり、COが主鎖酸素原子を示し、残基のファイ(φ)角が -180 から -30 の範囲であり、残基のプサイ(ψ)角がおよそ 60 から 180 またはおよそ -180 から -150 の範囲であることは好ましい。

20

【0161】

逆平行β-シートの構造を決めるプロトン間距離は、主鎖アミド間および主鎖アミドと側鎖との間の分子内核オーバーハウザー効果(NOEs)によって測定され得る。

【0162】

平行β-シートの構造を決めるプロトン間距離は、主鎖NH-NH間および主鎖NHと側鎖のメチル基との間の分子間核オーバーハウザー効果(NOEs)によって測定され得る。

30

【0163】

分子内NOEs対分子間NOEsは、例えば参照により本明細書に組み込むWO2007/064917、詳細には実施例V、G部、NMR Featuresに記載のとおり異なる同位体標識試料を使用して区別され得る。

【0164】

NMRデータの分析からNOE由来距離制限を使用して、例えば、模擬アニーリングプロトコル[M. Nilgesら、FEBS Lett. 229、317-324頁(1988)]を使用するプログラムCNX[A. T. Brungerら、Acta Crystallogr. D54(Pt5)、905-21頁、(1998)]を使用して構造は算出されることができ、それにより2原子間のさらなる分子内および/または分子間距離を提供する。

40

【0165】

さらなる詳細な実施形態によれば、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーは、具体的な抗体とのこれらの反応性によって特徴付けられる。そのような抗体は、詳細には、Aβ(1-42)球状体への抗体の結合親和性より大きい結合親和性をAβ(20-42)トランケート型球状体に有する抗体を含む。

【0166】

本明細書において用語「Aβ(X-Y)球状体」(Aβ(X-Y)球状オリゴマー)は

50

、本明細書において定義の $A\beta$ (X-Y) ペプチドの可溶性で球状の非共有結合会合体を意味し、均一性および独特の物理的特徴を有する。一態様によれば、 $A\beta$ (X-Y) 球状体は、 $A\beta$ (X-Y) ペプチドの安定で非原線維性のオリゴマー会合体である。単量体および原線維とは対照的にこれらの球状体は、サブユニットの明確な会合体数によって特徴付けられる（例えば、WO 2004/067561に記載のとおり初期会合体形態、 $n=4-6$ 、「オリゴマーA」および後期会合体、 $n=12-14$ 「オリゴマーB」）。球状体は、3次元球状型構造（「モルテングロビュール」、Barghornら、2005, J Neurochem、95、834-847頁を参照されたい。）を有する。これらは、1つ以上の以下の特性：

- 球状体のランケート型形態を生じる無差別プロテアーゼ（サーモリシンまたはエンドプロテイナーゼ GluC など）でのN-末端アミノ酸 X-23 の切断性；
- 無差別プロテアーゼおよび抗体でのC末端アミノ酸 24-Y への非到達性；
- これらの球状体のランケート型形態が前記球状体の3次元コア構造をその球状体立体配置中でのコア抗原決定基 $A\beta$ (20-Y) のよりよい到達性を有して維持していることによってさらに特徴付けられ得る。

【0167】

用語「 $A\beta$ (X-Y) 球状体」は、WO 2007/064917に記載のN-Met $A\beta$ (X-Y) 球状体も含む。

【0168】

本明細書における用語「 $A\beta$ (X-Y) ランケート型球状体」は、 $A\beta$ (X-Y) 球状体を限定的なタンパク質消化に供することによって得ることができる $A\beta$ (X-Y) 球状体のランケート型形態を意味する。より具体的には $A\beta$ (X-Y) ランケート型球状体は、Xが2...4（好ましくはXは20または12である。）の数からなる群から選択され、Yが本明細書において定義のとおりであり、 $A\beta$ (1-Y) 球状体を適切なプロテアーゼでの処理によって切断することによって得られるN-末端ランケート型形態を含む。例えば $A\beta$ (20-42) 球状体は $A\beta$ (1-42) 球状体をサーモリシンタンパク質分解に供することによって得ることができ、 $A\beta$ (12-42) 球状体は $A\beta$ (1-42) 球状体をエンドプロテイナーゼ GluC タンパク質分解に供することによって得ることができる。所望の程度のタンパク質分解が達成されたときに、プロテアーゼは一般に周知のやり方で不活性化される。得られた球状体は、次いで本明細書においてすでに記載の手順に従って単離され、必要であればさらなる後処理および精製のステップによりさらに処理され得る。前記のプロセスの詳細な記載は、参照により本明細書に組み込むWO 2004/067561に開示されている。

【0169】

本発明の目的のために $A\beta$ (1-42) 球状体は、詳細には本明細書の参照実施例1に記載の $A\beta$ (1-42) 球状体であり；N-Met $A\beta$ (1-42) 球状体は、詳細には参照実施例2に記載のN-Met $A\beta$ (1-42) 球状体であり； $A\beta$ (20-42) ランケート型球状体は、詳細には本明細書の参照実施例3に記載の $A\beta$ (20-42) ランケート型球状体であり； $A\beta$ (12-42) ランケート型球状体は、詳細には本明細書の参照実施例4に記載の $A\beta$ (12-42) ランケート型球状体である。

【0170】

$A\beta$ (1-42) 球状体への抗体の結合親和性を超える $A\beta$ (20-42) ランケート型球状体への結合親和性を有する抗体は、WO 2007/062852に記載されており、例えば7C6、7E5、4D10および5F7からなる群から選択されるモノクローナル抗体を含む。

【0171】

詳細な実施形態によれば、前記抗体は、本発明のアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーに少なくとも 1×10^{-6} M の範囲の K_D で結合する。好ましくは抗体は、本発明のアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーに高親和性で結合する、例えば、 1×10^{-7} M の K_D またはより大きい親和性で結合する、例えば 3×10^{-8} M の K_D また

はより大きい親和性で結合する、 1×10^{-8} Mの K_D またはより大きい親和性で結合する、例えば 3×10^{-9} Mの K_D またはより大きい親和性で結合する、 1×10^{-9} Mの K_D またはより大きい親和性で結合する、例えば 3×10^{-10} Mの K_D またはより大きい親和性で結合する、 1×10^{-10} Mの K_D またはより大きい親和性で結合する、例えば 3×10^{-11} Mの K_D またはより大きい親和性で結合する、または 1×10^{-11} Mの K_D またはより大きい親和性で結合する。

【0172】

本明細書における用語「より大きい親和性」は、一方の未結合抗体および未結合アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーと、他方の抗体-アミロイドβペプチド類似体／オリゴマー複合体との間の平衡が、抗体-アミロイドβペプチド類似体／オリゴマー複合体をより支持している相互作用の程度を意味する。同様に本明細書における用語「より小さい親和性」は、一方の未結合抗体および未結合アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーと、他方の抗体-アミロイドβペプチド類似体／オリゴマー複合体との間の平衡が、未結合抗体および未結合アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーをより支持している相互作用の程度を意味する。用語「より大きい親和性」は、「より高い親和性」と同義語であり、用語「より小さい親和性」は「より低い親和性」と同義語である。

【0173】

所与の抗原（本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーなど）への抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）の結合活性は、ELISA、ドットプロットまたはBIACore分析（Pharmacia Biosensor AB、Uppsala、Sweden and Piscataway、NJ）などの標準的インビトロ免疫測定を使用することによって評価され得る。さらなる記載については、Jonsson, U. ら、(1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26頁；Jonsson, U. ら、(1991) Biotechniques 11:620-627頁；Johnsson, B. ら、(1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131頁；およびJohnsson, B. ら、(1991) Anal. Biochem. 198:268-277頁を参照されたい。

【0174】

詳細な実施形態によれば、本明細書において定義される親和性は、実施例12に記載のとおりドットプロットを実施し、それをデンストメトリーによって評価することによって得られる値を意味する。本発明の詳細な実施形態によりドットプロットによって結合親和性を測定することは、以下：一定量の抗原または好都合にはその適切な希釈物、例えば20mM NaH_2PO_4 、140mM NaCl 、pH7.4、0.2mg/ml BSA中の抗原濃度、例えば100pmol/μl、10pmol/μl、1pmol/μl、0.1pmol/μlおよび0.01pmol/μlでニトロセルロース膜に点を打ち、次いで非特異的結合を防ぐためにミルクで膜をブロックし洗浄する、次いで目的の抗体と接触させ、酵素抱合2次抗体および比色反応の手段による後者の検出が続くこと含み、規定の抗体濃度において結合した抗体の量が親和性測定を可能にする。したがって2つの異なる抗体の1つの標的への、または1つの抗体の2つの異なる標的への相対的親和性は、他は同一のドットプロット条件下で2つの抗体-標的組合せで観察された標的結合抗体それぞれの量の関係として本明細書において定義される。ウエスタンブロットに基づく同様の手法とは異なり、ドットプロット手法は、抗体の所与の標的への親和性を後者の天然立体構造で測定する。

【0175】

本明細書において使用する用語「 K_d 」は、当技術分野において周知のとおり具体的な抗体-抗原相互作用の解離定数を意味している。

【0176】

球状体特異的抗体と反応する本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーは、少なくとも1つの球状体抗原決定基を提示すると考えられている。したがって本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーは、Aβ(20-42) トランケート型球

状体または他のトランケート型球状体が免疫原として使用される際に誘発される免疫応答と同様のプロファイルを有する免疫応答を誘発できる。

【0177】

用語「抗原決定基」は、免疫グロブリンに特異的に結合できる任意のポリペプチド決定基を含む。特定の実施形態において抗原決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニルなどの分子の化学的に活性な表面配置を含み、特定の実施形態においては特定の3次元構造特徴および／または特定の荷電的特徴を有し得る。抗原決定基は、抗体に結合される抗原の領域である。抗原決定基は、免疫グロブリン以外の他の結合剤によっても認識され得る。

【0178】

さらなる詳細な実施形態により本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーは、例えば哺乳動物（例えばウサギまたはマウス）が本発明のオリゴマーまたは誘導体で免疫化される場合に、そのような具体的な免疫応答を誘発するこれらの能力によって特徴付けられる。

【0179】

免疫応答は、抗原（免疫原）で宿主をチャレンジ（免疫化）することから生じる抗体の混合物と考えられ得る。抗体の前記混合物は、宿主から得ることができ、本明細書以下でポリクローナル抗血清と称する。

【0180】

一態様においてそのような具体的な免疫応答、すなわち相当するポリクローナル抗血清は、単量体Aβ（1-42）、単量体Aβ（1-40）、単量体Aβ（20-42）、原線維性Aβ（1-42）、原線維性Aβ（1-40）およびAβ（1-42）球状体からなる群から選択される少なくとも1つのAβ形態への抗体の結合親和性よりも大きい結合親和性を本発明のアミロイドβペプチド類似体もしくはオリゴマーにまたはAβ（20-42）トランケート型球状体に有する抗体を含有することによって特徴付けられる。

【0181】

詳細な実施形態によれば、免疫応答、すなわち相当するポリクローナル抗血清は、本発明のアミロイドβペプチド類似体もしくはオリゴマーにまたはAβ（20-42）トランケート型球状体に、単量体Aβ（1-42）、単量体Aβ（1-40）、単量体Aβ（20-42）、原線維性Aβ（1-42）、原線維性Aβ（1-40）およびAβ（1-42）球状体からなる群から選択される少なくとも1つのAβ形態への抗血清の結合親和性よりも、少なくとも2倍大きい、例えば少なくとも3倍もしくは少なくとも5倍大きい、好ましくは少なくとも10倍大きい、例えば少なくとも20倍大きい、少なくとも30倍もしくは少なくとも50倍大きい、より好ましくは少なくとも100倍大きい、例えば少なくとも200倍大きい、少なくとも300倍もしくは少なくとも500倍およびさらに好ましくは少なくとも1000倍大きい、例えば少なくとも2000倍大きい、少なくとも3000倍もしくは少なくとも5000倍大きい、さらに好ましくは少なくとも10000倍大きい、例えば少なくとも20000倍大きい、少なくとも30000もしくは少なくとも50000倍大きい、最も好ましくは少なくとも100000倍大きい結合親和性を有することによって特徴付けられる。

【0182】

本明細書において用語「Aβ（X-Y）単量体」または「単量体Aβ（X-Y）」は、Aβ（X-Y）ペプチドの単離された形態を、好ましくは他のAβペプチドとの非共有結合性相互作用に本質的に関与していないAβ（X-Y）ペプチドの一形態を意味する。それは、球状体抗原決定基を提示していない本質的に折りたたまれていないペプチドを表す。実質的にAβ（X-Y）単量体は、通例は水溶液の形態で提供される。本発明の具体的な好ましい実施形態において単量体水溶液は、0.05%から0.2%、より好ましくは約0.1% NH₄OHを含有する。本発明の他の具体的な好ましい実施形態において単量体水溶液は、0.05%から0.2%、より好ましくは約0.1% NaOHを含有する。使用される際に（例えば本発明の抗体の結合親和性を測定するために）、前記溶液を適切

10

20

30

40

50

なやり方で希釈することは好都合であり得る。さらに前記溶液をその調製後2時間以内に、詳細には1時間以内に、特に30分以内に使用することは通例好都合である。

【0183】

より具体的には本明細書において用語「A β (1-40) 単量体」は、本明細書の参照実施例5において記載のA β (1-40) 単量体制剤を意味し、本明細書において用語「A β (1-42) 単量体」は、本明細書の参照実施例6に記載のA β (1-42) 単量体制剤を意味する。

【0184】

他の態様においてそのような免疫応答は、A β (1-42) 球状体への抗体の結合親和性よりも大きい結合親和性を本発明のアミロイド β ペプチド類似体もしくはオリゴマーにまたはA β (20-42) トランケート型球状体に有する抗体を含むことによって特徴付けられる。

10

【0185】

本明細書において用語「原線維」は、電子顕微鏡において原線維構造を示し、コンゴ赤に結合して偏光下で複屈折を呈し、X線回折パターンがクロス β 構造である、非共有結合的に会合した個々のA β (X-Y) ペプチドの会合体を含む分子構造を意味する。

【0186】

本発明の他の態様において原線維は、24単位を超える、好ましくは100単位を超える凝集体の形成をもたらす界面活性剤非存在下、例えば0.1M HCl中での適切なA β ペプチドの自己誘導ポリマー凝集を含むプロセスによって得ることができる分子構造である。このプロセスは当技術分野において十分に周知である。好都合には、A β (X-Y) 原線維は、水溶液の形態で使用される。本発明の詳細な好ましい実施形態において水溶性原線維溶液は、A β ペプチドを0.1% NH₄OH中に溶解し、それを1:4に20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH7.4で希釈し、続いてpHを7.4に再調整し、溶液を37℃、20時間温置し、10,000g、10分間の遠心分離および20mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH7.4中への再懸濁が続くことによって作製される。

20

【0187】

本明細書における用語「A β (X-Y) 原線維」は、本質的にA β (X-Y) サブユニットからなる原線維を意味し、平均でサブユニットの少なくとも90%がA β (X-Y) 型である場合が好ましく、サブユニットの少なくとも98%がA β (X-Y) 型である場合はより好ましく、非A β (X-Y) ペプチドの含有量が検出閾値より低い場合は最も好ましい。

30

【0188】

より詳細には本明細書における用語「A β (1-42) 原線維」は、本明細書の参照実施例7に記載のA β (1-42) 原線維製剤を意味する。

【0189】

本発明は、精製した本発明のアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーにも関する。本発明の一実施形態によれば、精製アミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーは、A β ペプチド全体の80重量%を超える、好ましくはA β ペプチド全体の90重量%を超える、好ましくはA β ペプチド全体の95重量%を超える純度を有するものである。

40

【0190】

本発明のアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーが、アミロイド β 由来アミノ酸配列またはこのペプチド模倣物に加えて1つ以上のさらなる成分を含むことは好都合であり得る。例えば診断的適用は、アミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーを標識する必要がある場合がある。能動免疫法においても、能動免疫的適用において好都合であることを示している成分を付着することは有利点であり得る。

【0191】

したがって本発明は、検出を促進する共有結合基、好ましくはフルオロフォア、例えばフルオレセインイソチオシアネート、フィコエリトリン、Alexa-488、アエクオ

50

レア・ビクトリア (*Aequorea victoria*) 蛍光タンパク質、ジクチオソーマ (*Dictyosoma*) 蛍光タンパク質またはこれらの任意の組合せもしくは蛍光活性誘導体；発色団；化学発光団、例えばルシフェラーゼ、好ましくはフォチヌス・ピラリス (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼ、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) ルシフェラーゼまたはこれらの任意の組合せもしくは化学発光活性誘導体；酵素的に活性な基、例えばペルオキシダーゼ、例えば西洋わさびペルオキシダーゼまたはこれらの任意の酵素的に活性な誘導体；高電子密度基、例えば重金属を含む基、例えば金を含む基；ハプテン、例えばフェノール誘導ハプテン；強力な抗原性構造、例えば抗原性が予測されるペプチド配列（例えばKolaskarおよびTong aonkarのアルゴリズムによって抗原性が予測される）；アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーへの免疫応答の誘発を助ける分子、例えば血清アルブミン、オボアルブミン、キーホールリンベットヘモシアニン、サイログロブリン、破傷風類毒素およびジフテリア類毒素などの細菌由来類毒素、天然に存在するT細胞抗原決定基、天然に存在するTヘルパー細胞抗原決定基；パンDR抗原決定基（「PADRE」、WO 95/07707）などの人工的T細胞抗原決定基または、マンナン、トリパルミトイル-S-グリセリンシステインなどの他の免疫賦活剤；他の分子に対するアプタマー；キレート基、例えばヘキサヒスチジニル；さらなる特異的なタンパク質-タンパク質相互作用を介在する天然または天然由来のタンパク質構造、例えばfos/junペアのメンバー；磁性基、例えば強磁性基；または放射性基、例えば¹H、¹⁴C、³²P、³⁵Sもしくは¹²⁵Iを含む基またはこれらの任意の組合せを含む本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーにも関する。望ましくない炎症誘発性免疫応答Th1-経路を避ける観点から、免疫応答を抗炎症経路（Th2経路）に方向付けることができる分子、例えばPADREなどのB細胞抗原決定基を含む分子を含むアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーは、能動免疫法において具体的な利点を提供することが予測されている（Petrushina I. ら、The Journal of Neuroscience 2007、27（46）：12721-12731頁；Woodhouse A. ら、Drugs Aging 2007；24（2）：107-119頁も参照されたい。）。

【0192】

そのような基およびこれらをペプチドまたはペプチド類似体に結合するための方法は、当技術分野において周知である。

【0193】

本明細書において開示するアミロイドβペプチド類似体およびオリゴマーは、当技術分野において周知であるやり方で産生され得る。

【0194】

第1ステップにおいて所望のアミロイドβペプチド類似体またはこのペプチド模倣物のアミノ酸配列を含むペプチドが、提供される。

【0195】

前記ペプチドまたはペプチド模倣物は、G. BaranyおよびR. B. Merrifield、「The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology」；第2巻-「Special Methods in Peptide Synthesis, Part A」、3-284頁、E. GrossおよびJ. Meienhofer編、Academic Press、New York、1980；ならびにJ. M. StewartおよびJ. D. Young、「Solid-Phase Peptide Synthesis」第2版、Pierce Chemical Co.、Rockford、IL、1984において記載のものなどの種々の固相技術を使用する化学合成によって産生され得る。この戦略は、アミノ酸側鎖の一時的保護のためのtert-ブチル基と組み合わせてのα-アミノ基の一時的保護のためのFmoc（9-フルオレニルメチルメチルオキシカルボニル）基に基づいている（例えば「The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology」；第9巻-「Spe

cial Methods in Peptide Synthesis, Part C」1-38頁、S. UndenfriendおよびMeienhofer編、Academic Press, San Diego、1987におけるE. AthertonおよびR. C. Sheppard、「The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group」を参照されたい。

【0196】

ペプチドは、ペプチドのC末端から開始して不溶性ポリマー支持体（「樹脂」とも称される。）上で段階的なやり方で合成され得る。合成は、アミドまたはエステル結合の形成を通じてペプチドのC末端アミノ酸を樹脂に付加することによって開始される。これは、それぞれC末端がアミドまたはカルボン酸として生じるペプチドの最終的遊離を可能にする。別法としてC末端アミノアルコールが存在する場合C末端残基は、本明細書において記載のとおり2-メトキシ-4-アルコキシベンジルアルコール樹脂（SASRIN（商標）、Bachem Bioscience, Inc., King of Prussia, PA）に付着でき、ペプチド配列会合の完了後、生じたペプチドアルコールはTHF中のLiBH₄で遊離される（J. M. StewartおよびJ. D. Young、上記92頁を参照されたい。）。

【0197】

C末端アミノ酸および合成に使用される他の全てのアミノ酸は、 α -アミノ保護基が合成中に選択的に除去され得るように特異的に保護されたそれらの α -アミノ基および側鎖官能性（存在する場合）を有する必要がある。アミノ酸のカップリングは、そのカルボキシ基の活性エステルとしての活性化およびこれらと樹脂に付着されているN末端アミノ酸の非遮断 α -アミノ基との反応によって実施される。 α -アミノ基脱保護とカップリングとの連続は、ペプチド配列全体が組み立てられるまで繰り返される。次いでペプチドは、通例、副反応を抑える適切なスカベンジャーの存在下で側鎖官能基の脱保護と同時に樹脂から遊離される。生じたペプチドは、最終的に逆相HPLCで精製される。

【0198】

最終的なペプチドへの前駆体として必要とされるペプチド-樹脂の合成は、商業的に入手可能な架橋結合ポリスチレンポリマー樹脂（Novabiochem, San Diego, CA; Applied Biosystems, Foster City, CA）を利用する。C末端カルボキサミドについて好ましい固体支持体は：4-（2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc-アミノメチル）-フェノキシアセチル-p-メチルベンズヒドリルアミン樹脂（LinkアミドMBHA樹脂；9-Fmoc-アミノ-キサンテン-3-イルオキシ-メリーフィールド樹脂）（シーバーアミド樹脂）；4-（9-Fmoc）アミノメチル-3, 5-ジメトキシフェノキシ）バレリル-アミノメチル-メリーフィールド樹脂（PAL樹脂）である。最初および続くアミノ酸のカップリングは、DIC/HOBT、HBTU/HOBT、BOP、PyBOPまたはDIC/HOAT、HATU/HOATからそれぞれ産生されるHOBTまたはHOAT活性エステルを使用して達成され得る。保護ペプチド断片について好ましい固体支持体は：2-塩化クロトリチル樹脂および9-Fmoc-アミノ-キサンテン-3-イルオキシ-メリーフィールド樹脂（シーバーアミド樹脂）である。2-塩化クロトリチル樹脂への最初のアミノ酸の付加は、Fmoc保護アミノ酸を樹脂とジクロロメタンおよびDIEA中で反応させることによって最もよく達成される。必要な場合は、アミノ酸の溶解を促進するために少量のDMFを添加してもよい。

【0199】

合成は、Advanced Chemtech Multiple Peptide Synthesizer（MPS396）またはApplied Biosystems Inc. peptide synthesizer（ABI 433a）などのペプチド合成機を使用することによって実施され得る。

【0200】

別法として：1）所望のペプチドペプチド模倣物を生じるペプチド結合の酵素的または

化学的切断のための適切な切断部位によって分離される所望のペプチドまたはペプチド模倣物の複数の複製物の合成、2) アミノ酸配列を含むAPPの当業者に周知の任意の系における組換え発現に続く所望のペプチドを得るための酵素的または化学的のいずれかのプロセッシング、3) 当業者に周知の任意の系における融合タンパク質としての所望のペプチドの組換え発現、4) 当業者に周知の任意の系における所望のペプチドの直接での組換え発現、を含む当業者に周知である任意の他の適切な方法が使用され得る。

【0201】

アミロイドβペプチドの組換え発現は、WO2007/064917に記載されている。さらに組換え宿主における異種タンパク質の発現について、ポリペプチドの化学合成についておよびインビトロ翻訳についての全般的な方法は、当技術分野において十分に周知であり、さらにManiatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) 第2版、Cold Spring Harbor, N. Y.; BergerおよびKimmel、Methods in Enzymology、第152巻、Guide to Molecular Cloning Techniques (1987)、Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Merrifield, J. (1969) J. Am. Chem. Soc. 91:501; Chaiken L. M. (1981) CRC Crit. Rev. Biochem. 11:255; Kaiserら (1989) Science 243:187; Merrifield, B. (1986) Science 232:342; Kent, S. B. H. (1988) Ann. Rev. Biochem. 57:957; およびOfford, R. E. (1980) Semisynthetic Proteins、Wiley Publishing)に記載されている。

【0202】

第2ステップにおいて得られたペプチドまたはペプチド模倣物は、結合が形成できる条件に供される。当然ながら条件は、形成する結合の種類に依存し、当業者によって容易に決定され得る。本明細書において提供する結合およびこれらの化学に関する記載について述べる。

【0203】

オリゴマー合成は、追加的にオリゴマー形成に関与する。したがって第2ステップは、結合だけでなくオリゴマー形成も含む。

【0204】

オリゴマー形成に適切な条件は、参照により本明細書に組み込む例えばWO 2004/067561; WO 2006/094724; S. Barghornら、J. Neurochem. 95、834 (2005) およびWO2007/064917に記載されている。

【0205】

原理上、オリゴマー形成は結合形成に先行できる。これは、先に形成されたオリゴマーが、結合が形成されるように方向付けるまたは促進する場合に有利である。別法として結合形成は、オリゴマー形成に先行できる。これは、先に形成された結合がオリゴマー形成を方向付けるまたは促進する場合に有利である。オリゴマー形成および結合形成は、同時に起こり得る。

【0206】

アミロイドβペプチド類似体およびオリゴマーの両方は、アミノ酸配列が異なるペプチドもしくはペプチド模倣物または最終アミロイドβペプチド類似体もしくはオリゴマーによって含まれるペプチド模倣物を使用して調製され得る。例えば開始ペプチドは、追加的アミノ酸をそのCおよび/またはN末端に含むことができ、次いで合成途中で、例えばタンパク質切断により除去される。

【0207】

本発明の一実施形態においてオリゴマーは、ペプチドまたはこのペプチド模倣物で形成され、次に1つ以上のペプチド内またはペプチド模倣物内の(1つまたは複数の)共有結合

によって安定化される。この実施形態において、ペプチド模倣物よりペプチドを使用することは好都合であり得る。

【0208】

本発明の他の実施形態においてオリゴマーは、ペプチドまたはこのペプチド模倣物で形成され、1つ以上のペプチド内またはペプチド模倣物内の共有結合によって安定化され、次に関連する構造要素をよりよく提示するランケート型形態に化学的または酵素的手段によってプロセスされる。別法としてオリゴマーは、ペプチドまたはこのペプチド模倣物で形成され、関連する構造要素をよりよく提示するランケート型形態に化学的または酵素的手段によってプロセスされ、次に1つ以上のペプチド内またはペプチド模倣物内の共有結合によって安定化される。これらの実施形態において、ペプチド模倣物よりペプチド

10

【0209】

本発明のさらに他の実施形態においてペプチドまたはこのペプチド模倣物は、関連する構造要素を形成するために使用され、ここでペプチドまたはペプチド模倣物は、オリゴマー中の隣接するペプチドまたはペプチド模倣物との相互作用よりむしろ1つ以上のペプチド内またはペプチド模倣物内の共有結合によって適正な高次構造に保持される。1つ以上の適切なペプチド内またはペプチド模倣物内共有結合で安定化されたこれらのアミロイド β ペプチド類似体が単量体として関連する構造要素を示すことは想定される。この実施形態において、ペプチドよりもペプチド模倣物を使用することは好都合であり得る。

【0210】

20

本発明のアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーは、多数の有用性を有する。例えばそれらは：1) 免疫法に基づく介入治療（例えばアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーは、アミロイドーシスを治療または予防するための能動免疫法において使用され得る。）、2) 診断検査（例えばアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーはアミロイドーシスを診断するために使用され得る。）、3) アミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーに結合する抗体およびアプタマーなどの作用物質を提供することおよび4) アミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーに結合する抗体およびアプタマーなどの作用物質を開発するための結晶学的またはNMRに基づく構造に基づく設計研究において使用され得る。

【0211】

30

本明細書において用語「アミロイドーシス」は、異常なフォールディング、塊化、凝集および／または特定のタンパク質（アミロイド、線維性タンパク質およびこれらの前駆体）の身体のさまざまな組織における蓄積によって特徴付けられる多数の障害を意味する。アルツハイマー病およびダウン症候群において神経組織は冒され、脳アミロイド血管造影（CAA）において血管が冒されている。本発明の詳細な実施形態によれば、アミロイドーシスは、アルツハイマー病（AD）およびダウン症候群のアミロイドーシスからなる群から選択される。

【0212】

能動免疫法においてA β （20-42）ランケート型球状体は、アルツハイマー病遺伝子導入マウスで認知障害を戻すことに有効であることが示された。本発明のアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーは、そのプロファイルがA β （20-42）ランケート型球状体によって誘発される免疫応答のプロファイルに類似している免疫応答を誘発できる。

40

【0213】

したがって本発明は、治療的使用のための本明細書において定義のアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーにも関する。

【0214】

一態様において本発明は、本明細書において定義のアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーを含む治療用組成物に関する。詳細な実施形態によれば、前記組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物である。

50

【0215】

さらなる態様において本発明は、アミロイドーシスを治療するまたは予防するための医薬組成物を調製するための本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用に関する。

【0216】

本発明の好ましい実施形態において医薬組成物は、能動免疫法のためのワクチンである。

【0217】

したがって本発明は、本発明において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを対象に投与することを含む、それを必要とする対象においてアミロイドーシスを治療するまたは予防する方法にも関する。

10

【0218】

本発明の好ましい実施形態において、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを投与することは、対象をアミロイドーシスに対して能動的に免疫化するためである。

【0219】

能動免疫法との関連で、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーが患者のCNSに相当量では侵入できない場合は特に好ましい。

【0220】

アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを含む医薬組成物がAβオリゴマーに対して強力な免疫応答を誘導できる、好ましくはAβオリゴマーに対してだけ方向付けられる強力な免疫応答を誘導できる、より好ましくはAβオリゴマーに対してだけ非炎症性の抗体に基づく強力な免疫応答を誘発できる場合も特に好ましい。したがって本発明の一実施形態において医薬組成物は、免疫アジュバントを含む、好ましくはアジュバントおよび免疫応答を非炎症性、抗体に基づく種類に方向付けるシグナル伝達分子、例えばサイトカインを含む。そのようなアジュバントおよびシグナル伝達分子は当業者に十分に周知である。

20

【0221】

能動免疫法のための医薬組成物が、静脈経路、筋肉内経路、皮下経路、鼻腔内経路および吸入からなる群から選択される経路を介して投与される場合は、特に好ましい。組成物が、注射、ボーラス注入および持続注入から選択される方法によって投与され、そのそれぞれが1回、繰り返しまたは不定期に実施され得る場合も特に好ましい。

30

【0222】

本発明の詳細な実施形態において長期持続注入は、埋め込み式デバイスを使用することによって達成される。本発明のさらなる詳細な実施形態において組成物は、埋め込み式の徐放性デポー剤または放出制御デポー剤として適用される。適切な製剤およびデバイスは当業者に周知である。任意の所与の経路について使用される方法の詳細は、疾患の段階および重症度ならびに対象の全体的な医学的パラメータに依存し、好ましくは治療している医師または獣医師の判断で個々に決定される。

【0223】

本発明の特に好ましい実施形態において能動免疫法のための医薬組成物は、薬学的に許容される保存剤、薬学的に許容される着色剤、薬学的に許容される保護コロイド、薬学的に許容されるpH調整剤および薬学的に許容される浸透圧調製剤からなる群から選択される1つ以上の物質を含む。そのような物質は、当技術分野において記載されている。

40

【0224】

球状体仮説と一致してアミロイドーシスを罹患している対象は、内在性球状体抗原決定基に対する免疫応答を発現していると考えられている。本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーが、前記抗原決定基に特異的に反応性である抗体と反応することから、オリゴマーは同じまたは非常によく似た抗原決定基を提示すると考えられている。

【0225】

したがって本発明は、診断的使用のための本明細書において定義のアミロイドβペプチ

50

ド類似体またはオリゴマーにも関する。

【0226】

一態様において本発明は、本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを含む診断用組成物に関する。詳細な実施形態により前記組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物である。

【0227】

さらなる態様において本発明は、アミロイドーシスを診断するための組成物を調製するための本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用に関する。

【0228】

したがって本発明は、アミロイドーシスを有すると疑われる対象由来の試料を提供するステップ、試料を本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーにアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーおよび抗体を含む複合体の形成に十分な時間および条件下で接触させるステップを含み、複合体の存在が対象がアミロイドーシスを有することを示す、アミロイドーシスを診断する方法にも関する。詳細な実施形態によれば、少なくとも試料を接触させるステップは、エクスピボ、詳細にはインビトロで実施される。

【0229】

したがって本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーは、種々の診断法およびアッセイにおいて使用され得る。

【0230】

一実施形態によれば、アミロイドーシスをこの疾患を有すると疑われる患者において診断する方法は：a) 患者由来の生体試料を単離するステップ、b) 生体試料をアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに抗体／アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマー複合体の形成に十分な時間および条件下で接触させるステップ、c) 得られた抗体／アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマー複合体に結合抗体に抱合体が結合できる十分な時間および条件下で加えるステップ（抱合体は検出可能なシグナルを生じ得るシグナル生成化合物に付着している抗体を含む。）およびd) シグナル生成化合物によって生じるシグナルを検出することによって生体試料中に存在する可能性がある抗体の存在を検出するステップ（シグナルは患者におけるアミロイドーシスの診断を示す。）のステップを含む。詳細な実施形態によれば、ステップb)、c) およびd) の内の少なくとも1つは、エクスピボ、詳細にはインビトロで実施される。さらに詳細な実施形態により方法は、ステップa) を含まない。

【0231】

さらなる実施形態によれば、アミロイドーシスをこの疾患を有すると疑われる患者において診断する方法は：a) 患者由来の生体試料を単離するステップ、b) 生体試料を試料中の抗体に特異的な抗抗体に抗抗体／抗体複合体の形成を可能にする十分な時間および条件下で接触させるステップ、b) 抱合体を得られた抗抗体／抗体複合体に抱合体が結合抗体に結合できる十分な時間および条件下で加えるステップ（ここで抱合体は、検出可能なシグナルを生じ得るシグナル生成化合物に付着している本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを含む。）およびc) シグナル生成化合物によって生じるシグナルを検出するステップ（シグナルは患者におけるアミロイドーシスの診断を示す。）のステップを含む。詳細な実施形態によれば、前記ステップb) およびc) の内の少なくとも1つは、エクスピボ、詳細にはインビトロで実施される。さらなる詳細な実施形態により方法はステップa) を含まない。

【0232】

より具体的には、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーが球状体抗原決定基を提示し、球状体抗原決定基が内在性免疫応答を生じさせる内在性抗原であると考えられていることからアミロイドーシスの診断は、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに特異的に結合する自己抗体の存在の測定に関し得る。

10

20

30

40

50

【0233】

したがって本発明は、オリゴマーまたは誘導体に結合する自己抗体を対象において検出するための組成物を調製するための本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用にも関する。したがって本発明は、対象においてアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合する自己抗体の検出方法にも関し、方法は本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを対象に投与するステップ、抗体およびアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーによって形成された複合体を検出するステップを含み、複合体の存在は、自己抗体の存在を示す。本発明の詳細な実施形態において対象は、任意の形態のアミロイドーシス、例えばアルツハイマー病を有することが疑われ、自己抗体の検出は、対象における任意の形態のアミロイドーシス、例えばアルツハイマー病の有無を診断するためである。

10

【0234】

本発明は、試料中のオリゴマーまたは誘導体に結合する自己抗体を検出するための本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用にも関する。したがって本発明は、試料中のAβアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合する自己抗体の検出方法にも言及し、方法は試料を本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに接触させるステップならびに抗体およびアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーによって形成される複合体を検出するステップを含み、複合体の存在は自己抗体の存在を示す。詳細な実施形態によれば、少なくとも試料を接触させるステップは、エクスピボ、詳細にはインビトロで実施される。本発明の好ましい実施形態において試料は、アミロイドーシス、例えばアルツハイマー病を有すると疑われる対象由来であり、自己抗体の検出は、対象におけるアミロイドーシス、例えばアルツハイマー病の有無を診断するためである。適切な試料は、前述の方法によって検査され得る生体液を含む。これらとして血漿、全血、乾燥全血、血清、脳脊髄液または組織および細胞の水性もしくは有機-水性抽出物が挙げられる。

20

【0235】

アミロイドーシスを有すると疑われる対象がアミロイドーシスを有するまたはアミロイドーシスに至る増大した危険性を有する対象である場合は特に好ましい。

【0236】

本発明の詳細な実施形態によれば、本明細書において記載の自己抗体を検出するステップは、自己抗体／抗原複合体の解離を生じる製剤（試料）の前処理をさらに含む。したがってそのような前処理を含む方法は、製剤（試料）中に存在する自己抗体の総量を決定するために使用され得る一方で、前記前処理を含まない方法は、抗原にまだ結合できる自己抗体の量を決定するために使用され得る。さらに両方法は、複合した自己抗体の量を間接的に決定できるようにする。

30

【0237】

自己抗体／抗原複合体の解離を誘発するために適切な条件は、当業者に周知である。例えば製剤（試料）を酸で、例えば得られる製剤（試料）のpHが1から5の範囲、好ましくは2から4の範囲、詳細には2から3の範囲であるような緩衝液を使用して処理するステップは好都合であり得る。適切な緩衝液として生理的濃度の塩、例えばNaClおよび酢酸が挙げられる。抗体／抗原複合体の分離のための方法は、本明細書にその全体を組み込むWO2005/037209に記載されている。

40

【0238】

簡潔には抗体／抗原複合体中の抗原から抗体を解離させるステップは、抗体／抗原複合体を含む試料を解離緩衝液と接触させるステップ、試料を温置するステップおよび任意選択により試料を濃縮するステップのステップを含む。

【0239】

解離緩衝液は、本明細書において記載の範囲のpHを有するPBS緩衝液であり得る。例えば約1.5%BSAおよび0.2Mグリシン-酢酸pH2.5または140mM NaClおよび0.58%酢酸を含むPBS緩衝液は、適切である。

50

【0240】

数分間、例えば10から30分間、例えば20分間、20から40℃の範囲の温度での温置が十分であると証明されている。

【0241】

濃縮は、周知のやり方、例えば試料をCentrprep YM30 (Amicon Inc.)に通すことによって達成され得る。

【0242】

本発明の一実施形態においてアミロイドβペプチド類似体もしくはオリゴマーまたはこれらの一部は、固相上にコートされ得る。次いで試料（例えば全血、脳脊髄液、血清など）は、固相上に接触させられ得る。抗体、例えば自己抗体が試料中に存在する場合、そのような抗体はアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに固相上で結合し、次いで直接的または間接的のいずれかの方法によって検出される。直接法は、複合体それ自体の存在したがつて抗体の存在を単純に検出することを含む。間接的方法において抱合体は、結合抗体に添加される。抱合体は、シグナル生成化合物または標識に付着し、1次結合抗体に結合する2次抗体を含む。2次抗体が結合1次抗体に結合すると、シグナル生成化合物は測定可能なシグナルを生じる。それによりそのようなシグナルは、試料中の1次抗体の存在を示す。

10

【0243】

診断用免疫測定において使用される固相の例は、多孔性および非多孔性材料、ラテックス粒子、磁性粒子、微小粒子（米国特許第5,705,330号を参照されたい。）、ビーズ、膜、マイクロタイターウェルおよびプラスチックチューブである。固相材料の選択および抱合体中に存在する抗原または抗体を標識する方法は、所望により、所望のアクセイ形式実施特性に基づいて決定される。

20

【0244】

本明細書において記載のとおり抱合体（または指示試薬）は、シグナル生成化合物または「標識」に付着した抗体（またはアクセイに応じて恐らく抗抗体）を含む。このシグナル生成化合物または標識は、それ自体が検出可能であるまたは検出可能な産物を生成するために1つ以上の追加的化合物と反応できる。シグナル生成化合物の例は本明細書に記載されており、詳細には発色団、放射性同位元素（例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S および ^{14}C ）、化学発光化合物（例えばアクリジニウム）、粒子（可視または蛍光）、核酸、錯化剤または酵素（例えばアルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼおよびリボヌクレアーゼ）などの触媒が挙げられる。酵素使用（例えばアルカリホスファターゼまたは西洋わさびペルオキシダーゼ）の場合は、発色性、蛍光発生または発光性基質の添加が検出可能なシグナルの発生をもたらす。時間分解蛍光、内部反射蛍光、増幅（例えばポリメラーゼ連鎖反応）およびラマン分光法などの他の検出可能な系も有用である。

30

【0245】

キットも本発明の範囲に含まれる。より詳細には本発明は、対象における自己抗体などの抗体の存在を決定するためのキットを含む。詳細には試料中の前記抗体の存在を決定するためのキットは、a) 本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーおよび任意選択によりb) 検出可能なシグナルを生じ得るシグナル生成化合物に付着している抗体を含む抱合体を含む。キットは、抗原に結合する試薬を含む対照物質または標準物質も含有できる。

40

【0246】

本発明は、試料中の自己抗体などの抗体を検出するための他の種類のキットも含む。キットは、a) 目的の抗体に特異的な抗抗体およびb) 本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを含み得る。アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合する試薬を含む対照物質または標準物質も含まれ得る。より詳細にはキットは、a) 自己抗体に特異的な抗抗体およびb) アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを含む抱合体（抱合体は検出可能なシグナルを生じ得るシグナル生成化合物に付着し

50

ている)を含み得る。再びキットは、抗原に結合する試薬を含む対照物質または標準物質も含み得る。

【0247】

キットは、バイアル、ビンまたは条片などの1つの容器(各容器はあらかじめ定めた固相を有する)およびそれぞれの抱合体を含んでいる他の容器も含み得る。これらのキットは、洗浄、処理および指示試薬などアッセイを実施するために必要な他の試薬のバイアルまたは容器も含み得る。

【0248】

本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーは、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質を提供するために有用である。そのような作用物質として、例えば抗体(本明細書以下で抗オリゴマー抗体とも称する。)、非抗体結合分子(例えばthe Handbook of Therapeutic Antibodies、Stefan Dubel編、第II巻、7章、Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim、2007に記載のとおりアフィボディ、アフィリン分子、アドネクチン、アンチカリン、ダーピン、ドメイン抗体、エピボディ、クノチン(knotins)、クニツ型ドメイン、マキシボディ、テトラネクチン、トランスボディおよびV(NAR)sなど)、アプタマーまたは低分子化合物が挙げられる。

【0249】

したがって一態様において本発明は、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質をスクリーニングするためのアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用に関する。したがって本発明は、そのような作用物質の同定方法にも関し、方法は：a)目的の1つ以上の作用物質を本明細書において記載のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに、1つ以上の作用物質がアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合するために十分な時間および条件下でさらすステップおよびb)アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合するこれらの作用物質を同定するステップ、を含む。

【0250】

他の態様において本発明は、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質を前記作用物質を含む製剤中で濃縮するためのアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用に関する。したがって本発明は、そのような作用物質を前記作用物質を含む製剤中で濃縮する方法にも関し、方法は：a)アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーをアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質を含む製剤に、作用物質がアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合するために十分な時間および条件下でさらすステップおよびb)濃縮された形態で作用物質を得るステップ、を含む。より詳細には作用物質が捕捉され得るようにアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーは(例えば樹脂上に)固定化され得る。したがって濃縮形態で作用物質を得るステップは、捕捉された作用物質を放出する(好ましくは捕捉された作用物質を放出するステップが捕捉された作用物質を高塩濃度緩衝液または酸性溶液に接触させるステップを含むような方法で)ステップを含み得る。例えばこの方法は、IVI GまたはOctagam(登録商標)(Octapharma Inc. Vienna、オーストリア)などの市販の免疫グロブリン製剤をこの方法に供することによって本明細書において記載の自己抗体を濃縮するために使用され得る。これらの免疫グロブリン製剤はAβに対する自己抗体を含有し、対象を治療することによって彼らの身体中の抗Aβ抗体のレベルを上昇させると考えられている。前記自己抗体について濃縮された製剤は、より有効であると予測されている。

【0251】

さらなる態様において本発明は、したがってアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合する抗体を提供するためのアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用に関する。したがって本発明は、本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体

またはオリゴマーに結合する抗体を提供するための方法にも関し、方法は：

- a) アミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーを含む抗原を提供するステップ、
 - b) 抗体レパートリーまたは潜在的抗体レパートリーを前記抗原にさらすステップ、
 - c) 前記レパートリーから前記アミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーに結合する抗体を選択するステップ
- を含む。

【0252】

ここで、「潜在的抗体レパートリー」がアミノ酸または相当する核酸配列の任意のライブラリー、収集物、会合体もしくはセット、またはインビボもしくはインビトロで抗体レパートリーを産生するために使用され得るアミノ酸配列の任意のそのようなライブラリー、収集物、会合体もしくはセットの発生源を意味することは理解される。本発明の好ましい実施形態において発生源は、動物の獲得免疫系であり、詳細には当業者に十分に周知の組換えプロセスによって抗体多様性を生じさせる哺乳動物の免疫系の抗原生成部分である。本発明の他の好ましい実施形態において発生源は、適切な抗体フレームへの挿入によって次いでインビトロで抗体レパートリーを産生するために使用され得るランダム核酸配列を生じさせるための系である。

10

【0253】

本発明の好ましい実施形態において抗体レパートリーまたは潜在的抗体レパートリーは前記抗原で生物を免疫化することによってインビボで抗原にさらされる。本発明の他の好ましい実施形態において潜在的抗体レパートリーは、当技術分野において記載のインビトロ親和性スクリーニング、例えばファージディスプレイおよびパニング系によって抗体にさらされる適切な核酸のライブラリーである。

20

【0254】

他の態様において本発明は、本明細書において定義の A β (X-38...43) アミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーに結合する抗体も提供する。

【0255】

本発明の好ましい実施形態において抗体は、本明細書において記載のレパートリーまたは潜在的抗体レパートリーから抗体を選択するステップを含む方法によって得られる。

【0256】

詳細な好ましい実施形態により本発明は、アミロイド β ペプチド類似体にまたはオリゴマーに特異的な抗体を提供する。これらは、詳細には本発明のアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーに対してよりも A β ペプチドの単量体および原線維形態の両方に対して比較的小さい親和性を有する抗体を含む。特定の実施形態において抗体は、タンパク質および／または巨大分子の混成物中でその標的抗原を優先的に認識する場合に、抗原に特異的に結合すると称される。

30

【0257】

本発明の好ましい実施形態においてアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーへの抗体の親和性は、単量体 A β (1-42) への抗体の結合親和性よりも少なくとも2倍大きい、例えば少なくとも3倍または少なくとも5倍大きい、好ましくは少なくとも10倍大きい、例えば少なくとも20倍大きい、少なくとも30倍または少なくとも50倍大きい、より好ましくは少なくとも100倍大きい、例えば少なくとも200倍大きい、少なくとも300倍または少なくとも500倍大きい、さらにより好ましくは少なくとも1000倍大きい、例えば少なくとも2000倍大きい、少なくとも3000倍または少なくとも5000倍大きい、さらにより好ましくは少なくとも10000倍大きい、例えば少なくとも20000倍大きい、少なくとも30000倍または少なくとも50000倍大きいおよび最も好ましくは少なくとも100000倍大きい。

40

【0258】

本発明の好ましい実施形態においてアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーへの抗体の親和性は、単量体 A β (1-40) への抗体の結合親和性よりも少なくとも2倍大きい、例えば少なくとも3倍または少なくとも5倍大きい、好ましくは少なくとも10倍

50

大きい、例えば少なくとも20倍大きい、少なくとも30倍または少なくとも50倍大きい、より好ましくは少なくとも100倍大きい、例えば少なくとも200倍大きい、少なくとも300倍または少なくとも500倍大きい、さらにより好ましくは少なくとも1000倍大きい、例えば少なくとも2000倍大きい、少なくとも3000倍または少なくとも5000倍大きい、さらにより好ましくは少なくとも10000倍大きい、例えば少なくとも20000倍大きい、少なくとも30000倍または少なくとも50000倍大きいおよび最も好ましくは少なくとも100000倍大きい。

【0259】

好都合には本発明の抗体は、1つまたは、より好ましくは両方の単量体に低い親和性で結合する、最も好ましくは 1×10^{-8} の K_D もしくはより小さい親和性で結合する、例えば、 3×10^{-8} Mの K_D もしくはより小さい親和性で結合する、 1×10^{-7} Mの K_D もしくはより小さい親和性で、例えば 3×10^{-7} Mの K_D もしくはより小さい親和性で結合する、または 1×10^{-6} Mの K_D もしくはより小さい親和性で結合する、例えば 3×10^{-5} Mの K_D もしくはより小さい親和性で結合する、または 1×10^{-5} Mの K_D もしくはより小さい親和性で結合する。

【0260】

本発明の好ましい実施形態において、アミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーへの抗体の親和性は、原線維性A β (1-42)への抗体の結合親和性よりも少なくとも2倍大きい、例えば少なくとも3倍または少なくとも5倍大きい、好ましくは少なくとも10倍大きい、例えば少なくとも20倍大きい、少なくとも30倍または少なくとも50倍大きい、より好ましくは少なくとも100倍大きい、例えば少なくとも200倍大きい、少なくとも300倍または少なくとも500倍大きい、さらにより好ましくは少なくとも1000倍大きい、例えば少なくとも2000倍大きい、少なくとも3000倍または少なくとも5000倍大きい、さらにより好ましくは少なくとも10000倍大きい、例えば少なくとも20000倍大きい、少なくとも30000倍または少なくとも50000倍大きいおよび最も好ましくは少なくとも100000倍大きい。

【0261】

本発明の好ましい実施形態においてアミロイド β ペプチド類似体またはオリゴマーへの抗体の親和性は、原線維性A β (1-40)への抗体の結合親和性よりも少なくとも2倍大きい、例えば少なくとも3倍または少なくとも5倍大きい、好ましくは少なくとも10倍大きい、例えば少なくとも20倍大きい、少なくとも30倍または少なくとも50倍大きい、より好ましくは少なくとも100倍大きい、例えば少なくとも200倍大きい、少なくとも300倍または少なくとも500倍大きい、さらにより好ましくは少なくとも1000倍大きい、例えば少なくとも2000倍大きい、少なくとも3000倍または少なくとも5000倍大きい、さらにより好ましくは少なくとも10000倍大きい、例えば少なくとも20000倍大きい、少なくとも30000倍または少なくとも50000倍大きいおよび最も好ましくは少なくとも100000倍大きい。

【0262】

好都合には本発明の抗体は、1つまたは、より好ましくは両方の原線維に低い親和性で結合する、最も好ましくは 1×10^{-8} の K_D もしくはより小さい親和性で結合する、例えば、 3×10^{-8} Mの K_D もしくはより小さい親和性で結合する、 1×10^{-7} Mの K_D もしくはより小さい親和性で結合する、例えば 3×10^{-7} Mの K_D もしくはより小さい親和性で結合する、または 1×10^{-6} Mの K_D もしくはより小さい親和性で結合する、例えば 3×10^{-5} Mの K_D もしくはより小さい親和性で結合する、または 1×10^{-5} Mの K_D もしくはより小さい親和性で結合する。

【0263】

本発明の抗体は、好ましくは単離された抗体である。「単離された抗体」は、上に記載の結合親和性を有し、異なる結合親和性を有する他の抗体を本質的に含まない抗体を意味する。用語「本質的に含まない」は、本明細書において少なくとも95%の抗体が所望の結合親和性を有する、好ましくは少なくとも98%の抗体が所望の結合親和性を有する、

10

20

30

40

50

より好ましくは少なくとも99%の抗体が所望の結合親和性を有する抗体製剤を意味する。さらに、単離された抗体は、他の細胞性物質および／または化学物質を実質的に含まない場合がある。

【0264】

本発明の単離された抗体は、モノクローナル抗体を含む。本明細書において使用する「モノクローナル抗体」は、さまざまなアミノ酸配列の抗体の混合物を含有する「ポリクローナル」抗体製剤とは対照的に共通の重鎖および共通の軽鎖アミノ酸配列を共有している抗体分子、抗体の製剤を意味している。モノクローナル抗体は、ファージ、細菌、酵母またはリボソームディスプレイなどのいくつかの新規技術によっておよび融合細胞由来抗体（例えば、標準的KohlerおよびMilstein融合細胞法（（1975）Nature 256：495-497頁）などの融合細胞技術によって調製される融合細胞によって分泌される抗体）によって例示される古典的方法によって生成され得る。したがって非古典的方法によっても得ることができるが、均一の配列を有する非融合細胞由来抗体も本明細書においてモノクローナル抗体と称され、用語「モノクローナル」は融合細胞由来抗体に限定されず、1つの核酸クローンに由来する全ての抗体を意味して使用される。

【0265】

したがって本発明のモノクローナル抗体は、組換え抗体を含む。用語「組換え」は、本明細書において、例えば化学合成によるまたは核酸の単離されたセグメントの遺伝子工学技術での操作による、他では分離している2つの配列のセグメントの任意の人工的組合せを意味する。詳細には用語「組換え抗体」は、宿主細胞に形質移入された組換え発現ベクターを使用して発現される抗体などの組換え手段によって産生、発現、生成または単離される抗体；組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離される抗体；ヒト免疫グロブリン遺伝子で遺伝子導入された動物（例えばマウス）から単離される抗体（例えば、Taylor, L. D. ら、（1992）Nucleic Acids Res. 20：6287-6295頁を参照されたい。）；または具体的な免疫グロブリン遺伝子配列（ヒト免疫グロブリン遺伝子配列など）が他のDNA配列と会合している任意の他の方法において産生、発現、生成または単離される抗体を意味する。組換え抗体は、例えばキメラ、CDRグラフトおよびヒト化抗体を含む。当業者は、従来の融合細胞由来モノクローナル抗体の異種系での発現が、たとえ得られる抗体タンパク質のアミノ酸配列が変更されていないまたは変更させるつもりの場合でも組換え抗体の生成を必要とすることを承知している。

【0266】

本発明の詳細な実施形態において抗体は、ヒト化抗体である。

【0267】

複数の実施形態により抗体は、ヒト抗体またはマウス抗体など単一の種に完全に由来するアミノ酸配列を含み得る。他の実施形態により抗体は、キメラ抗体もしくはCDRグラフト抗体またはヒト化抗体の他の形態であり得る。

【0268】

用語「抗体」は、ポリペプチド鎖4本、重（H）鎖2本および軽（L）鎖2本から構成される免疫グロブリン分子を意味している。鎖は通常はジスルフィド結合を介して相互に結合している。各重鎖は、前記重鎖の可変領域（本明細書においてHCVRまたはVHと省略する。）および前記重鎖の定常領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメインCH1、CH2およびCH3からなる。各軽鎖は、前記軽鎖の可変領域（本明細書においてLCVRまたはVLと省略する。）および前記軽鎖の定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、CLドメインからなる。VHおよびVL領域は、相補性決定領域（CDRs）と称される高頻度可変領域にさらに分割される場合があり、フレームワーク領域（FR）と称される保存領域が散在している。各VHおよびVL領域は、したがって3つのCDRsおよび4つのFRsからなり、N末端からC末端へ以下の順番：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配置されている。この構造は、当業者に周知である。

【0269】

用語、抗体の「抗原結合成分」（または単に「抗体成分」）は、本発明の抗体の1つ以上の断片を意味し、前記断片は、上に定義の結合親和性をいまだ有する。完全な抗体の断片は、抗体の抗原結合機能を実行できることが示されている。用語、抗体の「抗原結合成分」に従って結合断片の例として (i) Fab断片、すなわちVL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片、(ii) F(ab')₂断片、すなわちヒンジ領域においてジスルフィド架橋を介して相互に結合している2つのFab断片を含む二価断片、(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の1つの腕のFLおよびVHドメインからなるFv断片、(v) VHドメインからなるまたはVH、CH1、CH2、DH3もしくはVH、CH2、CH3からなるdAb断片(Wardら、(1989) Nature 341:544-546頁) および(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられる。Fv断片の2つのドメイン、すなわちVLおよびVHは、離れた遺伝子によってコードされているが、それらは合成リンカー(例えばポリ-G₄Sアミノ酸配列)を使用して相互にさらに結合されることができ、VLおよびVH領域が一価分子(単鎖Fv(ScFv))として周知、例えばBirdら、(1988) Science 242:423-426頁; およびHoustonら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883頁を参照されたい。)を形成するように組み合わせた単一のタンパク質鎖としてそれらを調製することを可能にする組換え法を使用して相互に結合され得る。用語、抗体の「抗原結合成分」もそのような単鎖抗体を含んでいる。「二重特異性抗体」などの単鎖抗体の他の形態は、同様に本明細書に含まれる。二重特異性抗体は、二価の、二重特異性の抗体であり、VHおよびVLドメインは単一のポリペプチド鎖上に発現されているが、2つのドメインを同じ鎖上で組み合わせ得るようにするためには短すぎるリンカーを使用しており、それにより異なる鎖の相補性ドメインと対になり、2つの抗原結合部位を形成することを前記ドメインに強いている(例えばHolliger, P. ら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448頁; Poljak, R. J. ら、(1994) Structure 2:1121-1123頁を参照されたい。)。免疫グロブリン定常ドメインは重鎖または軽鎖の定常ドメインを意味する。ヒトIgG重鎖および軽鎖定常ドメインアミノ酸配列は当技術分野において周知である。

【0270】

さらに本発明の抗体またはこの抗原結合成分は、前記抗体または抗体結合成分と1つ以上のさらなるタンパク質またはペプチドとの共有結合的または非共有結合的会合によって形成される、より大きな免疫付着分子の一部であり得る。そのような免疫付着分子に関するのは、四量体scFv分子を調製するためのストレプトアビジンコア領域の使用(Kipriyanov, S. M. ら、(1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101頁) および二価でビオチン化されたscFv分子を産生するためのシステイン残基、マーカーペプチドおよびC末端ポリヒスチジニルタグ、例えばヘキサヒスチジニルタグの使用(Kipriyanov, S. M. ら、(1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058頁)である。

【0271】

用語「ヒト抗体」は、例えばKabatra (Kabatra、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U. S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242を参照されたい。)によって記載されたとおり可変および定常領域がヒト生殖系の免疫グロブリン配列に相当するまたは、それに由来する抗体を意味する。しかし本発明のヒト抗体は、例えばCDRsにおいておよび詳細にはCDR3において、ヒト生殖系免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基(例えばインビトロでのランダムもしくは部位特異的変異導入によってまたはインビボでの体細胞変異によって導入される変異)を含有できる。本発明の組換えヒト抗体は、可変領域を有し、ヒト生殖系の免疫グロブリン配列の由来の定常領域も含有できる(Kabat, E. A. ら、(1991) Sequenc

es of Proteins of Immunological Interest、第5版、U. S. Department of Health and Human Services. NIH Publication No. 91-3242を参照されたい。) 。しかし詳細な実施形態によれば、そのような組換えヒト抗体はインビトロ変異導入に(またはヒトIg配列により遺伝子導入された動物が使用される場合は、体細胞インビボ変異導入に) 供され、それにより組換え抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系のVHおよびVL配列に関連するまたは由来するが、ヒト抗体生殖系レパートリー中にインビボでは天然に存在しない配列になる。詳細な実施形態によりこの種類の組換え抗体は、選択的変異導入もしくは逆変異またはこの両方の結果である。好ましくは変異導入は、親抗体の親和性よりも標的へのより大きい親和性および／または非標的構造へのより小さい親和性を生じる。

10

【0272】

用語「キメラ抗体」は、ヒト定常領域に結合しているマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体などの1つの種由来の重鎖および軽鎖の可変領域についての配列および他の種由来の定常領域配列を含有する抗体を意味する。

【0273】

用語「CDRグラフト抗体」は、1つの種由来の重鎖および軽鎖の可変領域配列を含むが、VHおよび／またはVLの1つ以上のCDR領域の配列が他の種のCDR配列に置換されている抗体、1つ以上のマウスCDR(例えばCDR3)がヒトCDR配列に置換されているマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体などを意味する。

20

【0274】

用語「ヒト化抗体」は、非ヒト種(例えばマウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ、ヒツジまたはヤギ)由来の重鎖および軽鎖の可変領域の配列を含むが、VHおよび／またはVL配列の少なくとも一部がより「ヒトらしく」なるように、すなわちヒト生殖系の可変配列により類似するように、改変されている抗体を意味する。ある種のヒト化抗体は、ヒトCDR配列が相当する非ヒトCDR配列を置換するように非ヒトVHおよびVL配列中に挿入されているCDRグラフト抗体である。

【0275】

本発明の抗体を産生する方法は、以下に記載されている。本明細書においてインビボ手法、インビトロ手法または両方の組合せは区別されている。

30

【0276】

本発明の抗体を産生するためのいくつかの方法は、以下に記載されている。インビボ手法インビトロ手法または両方の組合せは区別される。

【0277】

インビボ手法

所望の抗体の種類に応じて種々の宿主動物がインビボ免疫化のために使用され得る。それ自体が目的の抗原の内在性バージョンを発現している宿主が使用され得る。別法として、目的の抗原の内在性バージョンに欠損を作られている宿主を使用できる。例えば、具体的な内在性タンパク質に相当する内在性遺伝子での相同組換えを介して欠損を作られているマウス(すなわちノックアウトマウス)は、これらが免疫化されたタンパク質に対して液性応答を生じることが示されており、したがってタンパク質に対する高親和性モノクローナル抗体の産生のために使用され得る(例えばRoes, J. ら、(1995) J. Immunol. Methods 183: 231-237頁; Lunn, M. P. ら、(2000) J. Neurochem. 75: 404-412頁を参照されたい。)

40

【0278】

多数の非ヒト哺乳動物が、本発明の非ヒト抗体を産生するための抗体産生に適する宿主である。これらとして、マウス、ラット、ニワトリ、ラクダ、ウサギ、ヒツジおよびヤギ(ならびにこれらのノックアウトバージョン)が挙げられるが融合細胞の産生のためにはマウスに優先権が与えられる。さらにヒト抗体レパートリーを発現している非ヒト宿主動物は、二重特異性を有し、ヒト抗原に対する本質的にはヒトの抗体を産生するために使用

50

され得る。この種の非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン導入遺伝子を保持している遺伝子導入動物（例えばマウス）（キメラh u - P B M C S C I Dマウス）および以下により詳細に記載されるヒト／マウス放射線キメラを含む。

【0279】

一実施形態によれば、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーで免疫化された動物は、非ヒト哺乳動物、好ましくはマウスであり、抗原刺激で前記非ヒト哺乳動物がヒト抗体を作るようにヒト免疫グロブリン遺伝子により遺伝子導入されている。典型的にはヒト生殖系立体配置を有する重鎖および軽鎖についての免疫グロブリン導入遺伝子は、内在性重鎖および軽鎖遺伝子座が不活性になるように改変されているそのような動物に導入される。そのような動物が抗原で（例えばヒト抗原で）刺激される場合、ヒト免疫グロブリン配列（ヒト抗体）由来の抗体が産生される。標準的融合細胞技術を用いて、そのような動物のリンパ球からヒトモノクローナル抗体を作製することができる。ヒト免疫グロブリンを有する遺伝子導入マウスおよびヒト抗体の産生におけるこれらの使用についてのさらなる記載について、例えばUS 5, 939, 598、WO 96/33735、WO 96/34096、WO 98/24893およびWO 99/53049（Abgenix Inc.）ならびにUS 5, 545, 806、US 5, 569, 825、US 5, 625, 126、US 5, 633, 425、US 5, 661, 016、US 5, 770, 429、US 5, 814, 318、US 5, 877, 397およびWO 99/45962（Genpharm Inc.）を参照されたく、MacQuitty, J. J. およびKay, R. M. (1992) Science 257:1188; Taylor, L. D. ら、(1992) Nucleic Acids Res. 20:6287-6295頁; Lonberg, N. ら、(1994) Nature 368:856-859頁; Lonberg, N. およびHuszar, D. (1995) Int. Rev. Immunol. 13:65-93頁; Harding, F. A. およびLonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546頁; Fishwild, D. M. ら、(1996) Nature Biotechnology 14:845-851頁; Mendez, M. J. ら、(1997) Nature Genetics 15:146-156頁; Green, L. L. およびJakobovits, A. (1998) J. Exp. Med. 188:483-495頁; Green, L. L. (1999) J. Immunol. Methods 231:11-23頁; Yang, X. D. ら、(1999) J. Leukoc. Biol. 66:401-410頁; Gallo, M. L. ら、(2000) Eur. J. Immunol. 30:534-540頁も参照されたい。

【0280】

他の実施形態によれば、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーで免疫化された動物は、重症複合免疫不全（SCID）を有するマウスであってよく、ヒト末梢血単核細胞もしくはリンパ球細胞またはこれらの前駆細胞で再構成されている。キメラh u - P B M C S C I Dマウスと称されるそのようなマウスは、証明されているとおり抗原刺激でヒト免疫グロブリン応答を生じる。これらのマウスおよび抗体生成のためのこれらの使用についてのさらなる記載について、例えばLeader, K. A. ら、(1992) Immunology 76:229-234頁; Bombil, F. ら、(1996) Immunobiol. 195:360-375頁; Murphy, W. J. ら、(1996) Semin. Immunol. 8:233-241頁; Herz, U. ら、(1997) Int. Arch. Allergy Immunol. 113:150-152頁; Albert, S. E. ら、(1997) J. Immunol. 159:1393-1403頁; Nguyen, H. ら、(1997) Microbiol. Immunol. 41:901-907頁; Arai, K. ら、(1998) J. Immunol. Methods 217:79-85頁; Yoshinari, K. およびArai, K. (1998) Hybridoma 17:41-45頁; Hutchins, W. A. ら、(1999) Hybridoma 18:121-129頁; Murphy, W. J. ら、(1

10

20

30

40

50

999) Clin. Immunol. 90:22-27頁; Smithson, S. L. ら、(1999) Mol. Immunol. 36:113-124頁; Chamat, S. ら、(1999) J. Infect. Diseases 180:268-277頁; および Heard, C. ら、(1999) Molec. Med. 5:35-45頁を参照されたい。

【0281】

他の実施形態によれば、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーで免疫化された動物は、致死量の全身照射で処置され、次いで重症複合免疫不全(SCID)を有するマウス由来の骨髓細胞で照射から保護され、次に機能性のヒトリンパ球を移植されているマウスである。この種類のキメラ(トリメラ系と称される)は、目的の抗原で前記マウスを免疫化し、次いで標準的融合細胞技術を使用してモノクローナル抗体を産生することによってヒトモノクローナル抗体を産生するために使用される。これらのマウスおよび抗体を生成するためのこれらの使用についてのさらなる記載について、例えば Eren, R. ら、(1998) Immunology 93:154-161頁; Reisner, Y. および Dagan, S. (1998) Trends Biotechnol. 16:242-246頁; Ilan, E. ら、(1999) Hepatology 29:553-562頁; および Bocher, W. O. ら、(1999) Immunology 96:634-641頁を参照されたい。

【0282】

インビボで生成された抗体産生細胞から開始して、モノクローナル抗体は、Kohler および Milstein (1975, Nature 256:495-497頁) によって最初に記載された融合細胞技術などの標準的技術を用いて産生され得る (Brown ら、(1981) J. Immunol. 127:539-46頁; Brown ら、(1980) J. Biol. Chem. 255:4989-83頁; Yeh ら、(1976) PNAS 76:2927-31頁; および Yeh ら、(1982) Int. J. Cancer 29:269-75頁も参照されたい。)。モノクローナル抗体融合細胞の産生技術は十分に周知である (一般に Monoclonal Antibodies における R. H. Kenneth: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A. Lerner (1981) Yale J. Biol. Med., 54:387-402頁; M. L. Gefter ら、(1977) Somatic Cell Genet., 3:231-36頁を参照されたい。)。簡潔には不死化細胞系 (典型的には骨髓腫) は、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーで免疫化された哺乳動物のリンパ球 (典型的には脾細胞またはリンパ節細胞または末梢血リンパ球) と融合され、得られた融合細胞の培養上清は本発明のモノクローナル抗体を産生している融合細胞を同定するためにスクリーニングされる。リンパ球と免疫化された細胞系とを融合するための多数の十分に周知な手順のいずれでも、この目的のために適用され得る (G. Galfre ら、(1977) Nature 266:550-52頁; Gefter ら、Somatic Cell Genet., 上記に引用; Lerner, Yale J. Biol. Med., 上記に引用; Kenneth, Monoclonal Antibodies, 上記に引用も参照されたい。)。さらに当業者は、同様に有用であるそのような方法のさまざまな変法があることを理解する。典型的には不死化細胞系 (例えば骨髓腫細胞系) は、リンパ球と同じ哺乳動物種由来である。例えばマウス融合細胞は、本発明の免疫原性製剤で免疫化されたマウス由来のリンパ球と不死化マウス細胞系とを融合することによって確立され得る。好ましい不死化細胞系は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン (HAT 培地) を含有する培養培地に感受性のマウス骨髓腫細胞系である。多数の骨髓腫細胞系のいずれでも初期状態で融合パートナーとして使用され得る、例えば P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653 または Sp2/O-Ag14 骨髓腫細胞系。これらの骨髓腫細胞系は、American Type Culture Collection (ATCC)、Rockv

10

20

30

40

50

il1e、MDから入手可能である。典型的にはHAT感受性マウス骨髓腫細胞は、ポリエチレングリコール（PEG）を使用してマウス脾臓細胞に融合される。融合から生じた融合細胞は、次いでHAT培地を使用して選択され、それにより未融合細胞および非生産的に融合された骨髓腫細胞（未融合脾臓細胞は、それらが形質転換されていないことから数日後に死ぬ。）は殺される。本発明のモノクローナル抗体を産生する融合細胞は、融合細胞培養上清をそのような抗体についてスクリーニングすることによって、例えば本明細書において定義の結合親和性を有する抗体を選択するためにドットプロットアッセイを使用することによって、同定される。

【0283】

同様に前記融合細胞は、下にさらに詳細に記載されるとおり、本発明の抗体を組換え的に産生するための軽鎖および／または重鎖をコードする核酸の供給源として使用され得る。

【0284】

インビトロ手法

免疫化および選択により本発明の抗体を産生するための別法として、本発明の抗体は、所要の結合親和性を有する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離するためにアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーで組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングすることによって同定および単離され得る。ディスプレイライブラリーを生成およびスクリーニングするためのキットは、商業的に入手できる（例えばthe Pharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01；およびthe Stratagene SurfZAP（登録商標）Phage Display Kit、カタログ番号240612）。多数の実施形態においてディスプレイライブラリーは、scFvライブラリーまたはFabライブラリーである。組換え抗体ライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ技術は、的確に記載されている。抗体ディスプレイライブラリーを生成およびスクリーニングするために特に有利に使用され得る方法および化合物の例は、例えばMcCaffertyら、WO 92/01047、US 5, 969, 108およびEP 589 877（特にscFvディスプレイを記載。）、Ladnerら、US 5, 223, 409、US 5, 403, 484、US 5, 571, 698、US 5, 837, 500およびEP 436 597（例えばpIII融合を記載。）、Dowerら、WO 91/17271、US 5, 427, 908、US 5, 580, 717およびEP 527 839（特にFabディスプレイを記載。）、Winterら、国際公開WO 92/20791およびEP 368, 684（特に可変性免疫グロブリンドメインについての配列のクローニングを記載。）、Griffithsら、US 5, 885, 793およびEP 589 877（特に組換えライブラリーを使用するヒト抗原に対するヒト抗体の単離を詳細に記載。）、Garrardら、WO 92/09690（特にファージ発現技術を詳細に記載。）、Knappikら、WO 97/08320（ヒト組換え抗体ライブラリーHuCalを記載。）、Salfeldら、WO 97/29131、（ヒト抗原（ヒト腫瘍壊死因子アルファ）に対する組換えヒト抗体の産生および組換え抗体のインビトロ親和性成熟を記載。）ならびにSalfeldら、米国仮特許出願第60/126, 603号およびこれに基づく特許出願（同様にヒト抗原（ヒトインターロイキン-12）に対する組換えヒト抗体の産生を記載。）において見出され得る。

【0285】

組換え抗体ライブラリーのスクリーニングのさらなる記載は、Fuchsら、（1991）Bio/Technology 9:1370-1372頁；Hayら、（1992）Hum Antibod Hybridomas 3:81-85頁；Huseら、（1989）Science 246:1275-1281頁；Griffithsら、（1993）EMBO J 12:725-734頁；Hawkinsら、（1992）J Mol Biol 226:889-896頁；Clarksonら、（1991）N

ature 352:624-628頁; Gramら、(1992) PNAS 89:3576-3580頁; Garrardら、(1991) Bio/Technology 9:1373-1377頁; Hoogenboomら、(1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137頁; Barbasら、(1991) PNAS 88:7978-7982頁; McCaffertyら、Nature (1990) 348:552-554頁; および Knappikら、(2000) J. Mol. Biol. 296:57-86頁などの科学刊行物において見出され得る。

【0286】

バクテリオファージディスプレイ系を使用する別法として、組換え抗体ライブラリーは酵母細胞または細菌細胞の表面上に発現され得る。WO 99/36569は、酵母細胞の表面上に発現されたライブラリーの調製およびスクリーニングの方法を記載している。WO 98/49286は、細菌細胞の表面上に発現されたライブラリーの調製およびスクリーニングのより詳細な方法を記載している。

【0287】

全てのインビトロ手法において、所望の特性を有する組換え抗体を濃縮するための選択プロセスは、プロセスの不可欠な部分を形成しており、一般に「パニング」と称され、マトリックスに標的構造が付着しているカラムでの親和性クロマトグラフィーの形態をしばしばとる。有望な候補分子は、次いでそれらの絶対的および／または相対的親和性の個別測定に（好ましくは標準的ドットプロットアッセイを用いて）上に記載のとおり供される。

【0288】

当業者に理解されたとおり、選択および濃縮のためのそのようなインビトロ法は、非免疫グロブリン関連抗原結合成分を得るためにも適用され得る。

【0289】

ひとたびコンビナトリアルライブラリーの目的の抗体が、同定され、十分に特徴付けられると、前記抗体の軽鎖および重鎖をコードするDNA配列は標準的分子生物学的技術を用いて、例えばライブラリースクリーニング中に単離されるディスプレイパッケージ（例えばファージ）由来のDNAのPCR増幅を用いて単離される。PCRプライマーを調製するために使用され得る抗体軽鎖および重鎖についての遺伝子のヌクレオチド配列は、当業者に周知である。多数のそのような配列は、例えば Kabat, E. A. ら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U. S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242 およびヒト生殖系VBASEの配列データベースに記載されている。

【0290】

本発明の抗体または抗体結合成分は、宿主細胞中で免疫グロブリン軽鎖および重鎖についての遺伝子を組換え的に発現することによって産生され得る。抗体を組換え的に発現するために宿主細胞は、前記抗体の免疫グロブリン軽鎖および重鎖をコードするDNA断片を保有している1つ以上の組換え発現ベクターで形質移入され、それにより宿主細胞中で軽鎖および重鎖を発現し、それらを好ましくは前記宿主細胞が培養されている培地中に分泌する。抗体はこの培地から単離され得る。標準的組換えDNA法は、抗体軽鎖および重鎖についての遺伝子を得るため、前記遺伝子を組換え発現ベクターに挿入するためおよび前記ベクターを宿主細胞に導入するために使用される。この種の方法は、例えば Sambrook、Fritsch および Maniatis (編)、Molecular Cloning; A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor, N. Y.、(1989)、Ausubel, F. M. ら、(編) Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates、(1989) および Boss らによる US 4,816,397 に記載されている。

【0291】

ひとたび目的の抗体のVHおよびVLセグメントをコードするDNA断片が得られると、前記DNA断片は、標準的組換えDNA技術を使用して、例えば可変領域についての遺伝子を全長抗体鎖についての遺伝子に転換するため、Fab断片についての遺伝子に転換するためまたはscFv遺伝子に転換するためにさらに操作され得る。これらの操作は、VL—またはVH—をコードするDNA断片を他のタンパク質、例えば抗体定常領域または可動性リンカーをコードする他のDNA断片に機能的に結合させることを含む。用語「機能的に結合する」は、本明細書において2つのDNA断片が、前記2つのDNA断片によってコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように結合されているとの意味で理解される。

【0292】

VH領域をコードする単離されたDNA断片は、VH領域をコードするDNAを重鎖定常領域(CH1、CH2およびCH3)をコードする他のDNA分子と機能的に結合することによって全長重鎖についての遺伝子に転換され得る。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は周知であり(例えばKabat, E. A. ら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U. S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242を参照されたい。)、前記領域に及ぶDNA断片は、標準的PCR増幅を用いて得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgEまたはIgD由来の定常領域であり、IgG詳細にはIgG1またはIgG4由来の定常領域に優先権が与えられる。重鎖Fab断片についての遺伝子を得るためにVHをコードするDNAは、重鎖定常領域CH1だけをコードする他のDNA分子に機能的に結合され得る。

【0293】

VL領域をコードする単離されたDNA断片は、VLをコードするDNAを軽鎖定常領域CLをコードする他のDNA分子に機能的に結合することによって全長軽鎖についての遺伝子(およびFab軽鎖についての遺伝子)に転換され得る。ヒト軽鎖の定常領域の遺伝子の配列は周知であり(Kabat, E. A. ら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U. S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242を参照されたい。)、前記領域に及ぶDNA断片は、標準的PCR増幅を用いて得ることができる。軽鎖定常領域は、定常カップまたはラムダ領域であってよく、定常カップ領域が好ましい。

【0294】

scFv遺伝子を生成するためにVH—およびVL—をコードするDNA断片は、可動性リンカー、例えばアミノ酸配列(Gly₄-Ser)₃をコードする他の断片に、VHおよびVL配列がVL領域とVH領域とが前記可動性リンカーを介して相互に結合している連続した単鎖タンパク質として発現されるように機能的に結合され得る(Birdら、(1988) Science 242:423-426頁; Hustonら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883頁; McCaffertyら、Nature (1990) 348:552-554頁を参照されたい。)

【0295】

上に記載の結合親和性を有する単一ドメインVHおよびVLは、単一ドメインライブラリーから上に記載の方法によって単離され得る。所望の結合親和性を有する2つのVH単一ドメイン鎖(CH1を有するもしくは有さない)もしくは2つのVL鎖または1つのVH鎖と1つのVL鎖との対は、本発明の抗体について本明細書において記載のとおり有用であり得る。

【0296】

本発明の組換え抗体または抗体成分を発現するために、部分的または全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAは、遺伝子を適切な転写および翻訳調節配列に機能的に結合する

10

20

30

40

50

ように発現ベクターに挿入され得る。これに関連して用語「機能的に結合」は、ベクター中の転写および翻訳調節配列が前記抗体遺伝子の転写および翻訳を制御するそれらの目的の機能を全うするように抗体遺伝子がベクター中に連結されているとの意味で理解される。

【0297】

好都合には発現ベクターおよび発現調節配列は、使用される発現宿主細胞に適合するように選択される。抗体軽鎖についての遺伝子および抗体重鎖についての遺伝子は別々のベクターに挿入されることができ、または両遺伝子は同じ発現ベクターに挿入され、これが通常の場合である。抗体遺伝子は、標準的方法を用いて（例えば抗体遺伝子断片およびベクター上の相補的制限酵素切断部位の連結によってまたは制限酵素部位が存在しない場合は平滑末端の連結によって）発現ベクターに挿入される。発現ベクターは、軽鎖および重鎖についての配列の挿入より先に抗体定常領域についての配列をすでに保有していてもよい。例えば1つの手法はVHおよびVL配列を、重鎖および軽鎖定常領域それぞれをすでにコードしている発現ベクター中にそれらを挿入し、それによりVHセグメントをベクター中の1つまたは複数のCHセグメントに機能的に結合し、VLセグメントもベクター中のCLセグメントに機能的に結合することによって全長抗体遺伝子に転換することである。

【0298】

追加的にまたは別法として組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードできる。前記抗体鎖についての遺伝子はベクター中にクローン化されることができ、それによりシグナルペプチドを抗体鎖についての遺伝子のN末端にインフレームで結合する。シグナルペプチドは免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種のシグナルペプチド（例えば免疫グロブリンではないタンパク質由来のシグナルペプチド）であり得る。抗体鎖についての遺伝子に加えて本発明の発現ベクターは、宿主細胞中の抗体鎖についての遺伝子の発現を調節する制御配列も有し得る。

【0299】

用語「制御配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび抗体鎖についての遺伝子の転写または翻訳を調節するさらなる発現調節要素（例えばポリアデニル化シグナル）を含んでいる。この種の制御配列は、例えばGoeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)において記載されている。当業者は、制御配列の選択を含む発現ベクター設計が形質転換される宿主細胞の選択、タンパク質の発現の所望の強さなどの要因に依存し得ることを理解する。哺乳動物宿主細胞における発現のために好ましい制御配列として、サイトメガロウイルス (cytomegalovirus) (CMV) 由来のプロモーターおよび／またはエンハンサー (CMVプロモーター／エンハンサーなど)、シミアンウイルス40 (simian virus 40) (SV40) (SV40プロモーター／エンハンサーなど)、アデノウイルス (adenovirus) (例えばアデノウイルス主要後期プロモーター (AdMLP)) およびポリオーマ (polyoma) などの哺乳動物細胞において強く恒常的なタンパク質発現をもたらすウイルス性因子が挙げられる。ウイルス性制御因子およびこれらの配列のさらなる記載については、例えばStinskiへのUS 5, 168, 062、BellらへのUS 4, 510, 245およびSchaffnerらへのUS 4, 968, 615を参照されたい。

【0300】

抗体鎖についての遺伝子および制御配列とは別に、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中のベクター複製を制御する配列（例えば複製開始点）および選択マーカー遺伝子などの追加的配列を有し得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を促進する（例えば、全てAxelらへの米国特許第4, 399, 216号、米国特許第4, 634, 665号および米国特許第5, 179, 017号を参照されたい。）。例えば選択マーカー遺伝子がベクターが挿入されている宿主細胞に、G418、ハイ

グロマイシンまたはメトトレキサートなどの細胞障害性薬物への耐性を与えることは一般的である。好ましい選択マーカー遺伝子として、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）（メトトレキサート選択／増幅でのdhfr⁻宿主細胞における使用のため）およびneo遺伝子（G418選択）が挙げられる。

【0301】

軽鎖および重鎖の発現のために、前記重鎖および軽鎖をコードする1つまたは複数の発現ベクターは、標準的技術を用いて宿主細胞に形質移入される。種々の形態の用語「形質移入」は、外来性DNAを原核性または真核性宿主細胞中に導入するために習慣的に使用される多数の技術、例えば電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン形質移入などを含んでいる。原核性および真核性宿主細胞のいずれにおいても本発明の抗体を発現することは理論的に可能であるが、正しく折りたたまれ、免疫学的に活性な抗体が会合し、分泌される可能性は、真核細胞、特に哺乳動物細胞中においてが原核細胞においてよりも高いことから、優先権は真核細胞詳細には哺乳動物宿主細胞中で抗体を発現することに与えられる。抗体遺伝子の原核生物発現は、活性な抗体の高収率での産生のためには効果的でないことが報告されている（Boss, M. AおよびWood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13頁）。

【0302】

本発明の組換え抗体を発現するために好ましい哺乳動物宿主細胞として、CHO細胞（例えばR. J. KaufmanおよびP. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621頁に記載のDHFR-選択マーカーとともに使用されるUrlaubおよびChasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220頁に記載のdhfr⁻CHO細胞を含む。）、NS0骨髓腫細胞、COS細胞およびSP2細胞が挙げられる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、抗体は宿主細胞を前記宿主細胞中で抗体が発現されるまで培養することによって産生される、または好ましくは抗体は宿主細胞が増殖している培養培地中に分泌される。次いで抗体は、培養培地から標準的タンパク質精製法を使用して単離され得る。

【0303】

例えばFab断片またはscFv分子などの無処理の抗体の成分を産生するために宿主細胞を使用することも同様に可能である。上に記載の手順の変法は本発明にももちろん含まれる。例えば本発明の抗体の軽鎖または重鎖のいずれか（しかし両方ではなく）をコードするDNAで宿主細胞を形質移入することも望ましい場合がある。目的の抗原の結合のために必要でない軽鎖または重鎖のいずれかが存在する場合、次いでそのような軽鎖もしくはそのような重鎖のいずれかまたは両方をコードするDNAは、組換えDNA技術を用いて部分的にまたは完全に除去され得る。そのような切断DNA分子によって発現される分子も同様に本発明の抗体に含まれる。追加的に、1つの重鎖および1つの軽鎖が本発明の抗体であり、他方の重鎖および他方の軽鎖が目的の抗原とは異なる抗原に対する特異性を有する二機能性抗体を、本発明の抗体を第2の抗体に標準的化学的方法を用いて架橋結合することによって産生することは可能である。

【0304】

本発明の抗体またはこの抗原結合成分の組換え発現のための好ましい系において、抗体重鎖および抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターは、dhfr⁻CHO細胞にリン酸カルシウム介在形質移入を用いて導入される。組換え発現ベクター中で、重鎖および軽鎖抗体についての遺伝子は、それぞれが前記遺伝子の強い転写をもたらすために制御用CMVエンハンサー／AdMLPプロモーター要素に機能的に結合されている。組換え発現ベクターは、ベクターで形質移入されたdhfr⁻CHO細胞をメトトレキサート選択／増幅を使用して選択するために使用され得るDHFR遺伝子も保有する。選択された形質転換宿主細胞は、抗体重鎖および軽鎖が発現されるように培養され、未処理の抗体が培養培地から単離される。標準的分子生物学的技術は、組換え発現ベクターを調製するため、宿主細胞を形質移入するため、形質転換体を選択するため、前記宿主細胞を培養す

るためおよび培養培地から抗体を得るために使用される。したがって本発明は、本発明の宿主細胞を適切な培養培地中で本発明の組換え抗体が合成されるまで培養することによる本発明の組換え抗体の合成方法も提供する。方法は、前記組換え抗体を前記培養培地から単離することもさらに含み得る。

【0305】

ファージディスプレイによって組換え抗体ライブラリーをスクリーニングする別法として、当業者に周知の他の方法も本発明の抗体を同定するための大きなコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングのために使用され得る。基本的に、核酸とこれによりコードされている抗体との間に密接な物理的つながりが確立されており、適切な核酸配列をこれがコードする抗体の特性によって選択するために使用され得る任意の発現系が採用され得る。

10

【0306】

別法の発現系の1種において組換え抗体ライブラリーは、SzostakおよびRobertsへのWO 98/31700ならびにRoberts, R. W. およびSzostak, J. W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12297-12302頁に記載のとおりRNA-タンパク質融合体の形態で発現される。この系において、3'末端にピューロマイシン(ペプチジル受容体抗生物質)を保有している合成mRNAsのインビトロ翻訳は、mRNAとそれによってコードされるペプチドまたはタンパク質との共有結合融合体を生成する。したがってmRNAsの複合混合物(例えばコンビナトリアルライブラリー)の特定のmRNAは、コードされているペプチドまたはタンパク質(例えば抗体またはこの成分)の特性(前記抗体またはこの前記成分のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーへの結合など)に基づいて濃縮され得る。抗体またはこの成分をコードし、そのようなライブラリーのスクリーニングによって得られる核酸配列は、上に記載のやり方で(例えば哺乳動物宿主細胞において)組換え手段によって発現されることができ、加えてさらなるラウンドのmRNA-ペプチド融合体のスクリーニング、最初に選択された1つまたは複数の配列への変異の導入または上に記載のやり方での組換え抗体のインビトロ親和性成熟の他の方法を使用することのいずれかによりさらなる親和性成熟に供され得る。

20

【0307】

インビボおよびインビトロ手法の組合せ

30

本発明の抗体は、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーがアミロイドβペプチド類似体結合抗体またはオリゴマー結合抗体の産生を刺激するためにインビボで宿主動物中の抗体レパートリーに最初に作用できるようにし、次いでさらなる抗体選択および/または抗体成熟(すなわち最適化)が1つ以上のインビトロ技術の助力で達成される方法などのインビボおよびインビトロ手法の組合せを使用することによっても同様に産生され得る。一実施形態によれば、この種の組合せ法は、非ヒト動物(例えばマウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ、ヒツジもしくはヤギまたはこれらの遺伝子導入バージョンまたはキメラマウス)を前記オリゴマーまたは誘導体で抗原への抗体応答を刺激するために最初に免疫化すること、次いで前記オリゴマーまたは誘導体の作用によりインビボで刺激されているリンパ球の免疫グロブリン配列を使用することによるファージディスプレイ抗体ライブラリーの調製およびスクリーニングを含み得る。この組合せ手順の最初のステップは、インビボ手法と関連して上に記載されたやり方で実施されることができ、この手法の第2ステップはインビトロ手法と関連して上に記載されたやり方で実施され得る。前記の刺激されたリンパ球から調製されたファージディスプレイライブラリーのインビトロスクリーニングが続く非ヒト動物の過免疫化の好ましい方法は、BioSite Inc. によって記載された方法を含み、例えばWO 98/47343、WO 91/17271、US 5,427,908およびUS 5,580,717を参照されたい。

40

【0308】

他の実施形態によれば、組合せ方法は、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーで非ヒト動物(例えばマウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ、ヒツジ、ヤ

50

ギまたはこれらのノックアウトおよび／または遺伝子導入バージョン、またはキメラマウス）を前記アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーへの抗体応答を刺激するために最初に免疫化することおよび融合細胞（例えば免疫化された動物から調製）をスクリーニングすることにより所望の特異性を有する抗体を産生するリンパ球を選択することを含む。抗体または単一ドメイン抗体についての遺伝子は、（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応などの標準的クローニング法を用いて）選択されたクローンから単離され、1つ以上の選択された抗体の結合特性を改善するためにインビトロ親和性成熟に供される。この手順の最初のステップは、インビボ手法との関連で上に記載されたやり方で実行され得る一方で、この手順の第2ステップはインビトロ手法との関連で上に記載のやり方で、詳細にはWO 97/29131およびWO 00/56772に記載などのインビトロ親和性成熟の方法を使用することによって実行され得る。

10

【0309】

さらなる組合せ方法において組換え抗体は、個々に単離されたリンパ球から選択リンパ球抗体法（SLAM）として当業者に周知の手順およびUS 5,627,052、WO 92/02551およびBabcock, J. S. ら、（1996）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848頁に記載の手順を使用することによって生成される。この方法において非ヒト動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、ラクダ、ヒツジ、ヤギもしくはこれらの遺伝子導入バージョンまたはキメラマウス）は、最初にインビボにおいてアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーで、前記アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーへの免疫応答を刺激するために免疫化され、次いで目的の抗体を分泌している個々の細胞は抗原特異的溶血ブラークアッセイを使用することによって選択される。このために球状体もしくはこの誘導体または構造的に関連する目的の分子は、ビオチンなどのリンカーを使用してヒツジ赤血球にカップリングされることができ、それにより溶血ブラークアッセイを使用することによって適切な特異性を有する抗体を分泌している個々の細胞を同定することを可能にする。目的の抗体を分泌している細胞の同定に続いて、軽鎖および重鎖の可変領域についてのcDNAは、逆転写PCRによって細胞から得られ、前記可変領域は次いで適切な免疫グロブリン定常領域（例えばヒト定常領域）とともにCOSまたはCHO細胞などの哺乳動物宿主細胞において発現され得る。インビボで選択されたリンパ球由来の増幅された免疫グロブリン配列で形質移入された宿主細胞は、次いで、例えば結合親和性を有する抗体を発現している細胞を単離するために、形質移入細胞を広げることによりさらなるインビトロ分析およびインビトロ選択に供され得る。増幅された免疫グロブリン配列は、さらにインビトロで操作され得る。

20

30

【0310】

本明細書において定義の所要の親和性を有する抗体は、本質的に上に記載されたとおりのドットプロットを実施することによって選択され得る。簡潔には抗原は、固相マトリックスに付着しており、好ましくはニトロセルロース膜に系列希釈で点を打たれている。固定化した抗原は、次いで目的の抗体に接触させられ、酵素抱合2次抗体および発色反応を用いる後者の検出が続く、明確な抗体および抗原の濃度において抗体結合の量が親和性決定を可能にする。したがって2つの異なる抗体の1つの標的に対する、または1つの抗体の2つの異なる標的に対する相対的親和性は、本明細書において、他は同一のドットプロット条件下で2つの抗体-標的組合せについて観察された標的結合抗体のそれぞれの量の関係であると定義される。

40

【0311】

FabおよびF(ab')₂断片などの抗体成分は、抗体全体からパインまたはペプシンでの消化などの従来技術を使用して産生され得る。加えて抗体、抗体成分および免疫付着分子は、標準的組換えDNA技術を使用することによっても得られる。

【0312】

さらなる態様において本発明は、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合するアプタマー（本明細書以下で抗アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーアプタ

50

マーとも称する。)を提供するための本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの使用にも関する。したがって本発明は、本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに対する特異性を有するアプタマーを提供するための方法にも関し、方法は少なくとも

- a) アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーを含む結合標的を提供するステップ、
- b) アプタマーレパートリーまたは潜在的アプタマーレパートリーを前記結合標的にさらすステップおよび
- c) 前記レパートリーから前記アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに特異的に結合するアプタマーを選択するステップを含む。

10

【0313】

本明細書において「アプタマー」は、その標的に特異的な非共有結合できるオリゴ核酸またはペプチド分子を意味する。好ましくはアプタマーは、一端または両端がより大きな分子に付着し得る、好ましくは生化学的機能を介在しているより大きな分子に付着し得る、より好ましくは不活性化および／または分解を誘導するより大きな分子に付着し得る、最も好ましくはユビキチンに付着し得る、または好ましくは破壊を促進するより大きな分子に付着し得る、より好ましくは酵素もしくは蛍光タンパク質に付着し得る、ペプチド、DNAまたはRNA配列を含み、より好ましくは単量体約3から100個のペプチド、DNAまたはRNA配列を含む。

【0314】

20

ここで「潜在的アプタマーレパートリー」が、任意のアミノ酸配列もしくは核酸配列のライブラリー、収集物、会合体またはセット、またはインビボもしくはインビトロでアプタマーレパートリーを産生するために使用され得るアミノ酸配列のそのようなライブラリー、収集物、会合体またはセットの任意の発生源を意味することは理解される。

【0315】

他の態様において本発明は、本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合するアプタマーも提供する。

【0316】

本発明の好ましい実施形態においてアプタマーは、本明細書において記載のレパートリーまたは潜在的レパートリーからアプタマーを選択するステップを含む方法によって得られる。

30

【0317】

詳細な好ましい実施形態によれば、本発明は、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに特異的なアプタマーを提供する。これらは、詳細には本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに対してよりもAβペプチドの単量体および原線維形態の両方に対して比較的小さい親和性を有するアプタマーを含む。

【0318】

本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質は多くの潜在的用途も有し、そのいくつかは以下に記載されている。これらは治療目的および診断目的で特に有用である。

40

【0319】

球状体抗原決定基に特異的に結合する抗体は、治療用途および診断用途において有用な作用物質であることが示されている。本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーが前記抗体と反応することから、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーは、同じまたは非常によく似た抗原決定基を提示すると考えられている。

【0320】

したがって本発明は、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる治療的使用のための作用物質も提供する。

【0321】

一態様において本発明は、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結

50

合できる作用物質を含む治療用組成物も提供する。詳細な実施形態によれば、前記組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物である。

【0322】

本発明の前記医薬組成物は、少なくとも1つの追加的治療剤、例えば本発明の作用物質が軽減のために有用である疾患の治療のための1つ以上の追加的治療剤をさらに含有できる。例えば本発明の作用物質が本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合する場合、医薬組成物は、前記アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの活性が重要である障害の治療のために有用である1つ以上の追加的治療剤をさらに含み得る。

【0323】

薬学的に適切な担体として、任意の溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などがこれらが生理学的に適合性である限り挙げられる。薬学的に許容される担体として、例えば水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどおよびこれらの組合せが挙げられる。多くの場合等張剤、例えば糖類、マンニトールもしくはソルビトールなどのポリアルコールまたは追加的に塩化ナトリウムを使用することに優先権が与えられる。薬学的に適切な担体は、抗体の半減期または有効性を増加させる湿潤剤または乳化剤、保存剤または緩衝剤などの比較的少量の補助的物質をさらに含有できる。

【0324】

医薬組成物は、例えば非経口投与に適している場合がある。ここで作用物質は好ましくは、作用物質、例えば抗体、含有量0.1-250mg/mlを含む注射可能な溶液として調製される。注射可能な溶液は、剤形がフリントガラスもしくはバイアル、アンプルまたは充填シリンジである液体または凍結乾燥形態に調製され得る。緩衝剤は、L-ヒスチジン(1-50mM、好ましくは5-10mM)を含み、pHは5.0-7.0好ましくは6.0であり得る。さらなる適切な緩衝剤として、これらに限定されることなく、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウム緩衝剤が挙げられる。塩化ナトリウムは、溶液の浸透圧を0-300mMの濃度(液体剤形用には好ましくは150mM)に調整するために使用され得る。凍結保護剤、例えばスクロース(例えば0-10%、好ましくは0.5-1.0%)も凍結乾燥剤形に含まれ得る。他の適切な凍結保護剤はトレハロースおよびラクトースである。賦形剤、例えばマンニトール(例えば1-10%、好ましくは2-4%)も凍結乾燥剤形に含まれ得る。安定化剤、例えばL-メチオニン(例えば5-50mM、好ましくは5-10mM)も液体および凍結乾燥の両方の剤形において使用され得る。さらなる適切な賦形剤は、グリシンおよびアルギニンである。界面活性剤、例えばポリソルベート80(例えば0-0.05%、好ましくは0.005-0.01%)も使用され得る。さらなる界面活性剤は、ポリソルベート20およびBRIJ界面活性剤である。

【0325】

本発明の組成物は、多数の形態を有する。これらとして液体溶液(例えば注射可能なおよび注入可能な溶液)、分散剤もしくは懸濁剤、錠剤、丸剤、粉剤、リボソームおよび坐薬などの液体、半流動体および固体剤形が挙げられる。好ましい形態は、目的とする投与の種類および治療用途に依存する。典型的には、注射可能なまたは注入可能な溶液の形態での組成物、例えばヒトの受動免疫法用の抗体に類似している組成物に優先権が与えられる。投与の好ましい経路は、非経口(例えば静脈内、皮下、腹腔内または筋肉内)である。好ましい実施形態によれば、作用物質は、静脈内注入または注射によって投与される。他の好ましい実施形態によれば、作用物質は、筋肉内または皮下注射によって投与される。

【0326】

治療用組成物は、典型的には滅菌されなければならない、調製および保存条件下で安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散剤、リボソームまたは高濃度の活性物質に適する他の秩序構造として処方され得る。滅菌済の注射可能な溶液は、活性化合物(すなわち抗体などの作用物質)の所要量を適切な場合は必要に応じて上に記

載の成分の1つまたは組合せとともに適切な溶媒に入れ、次いで前記溶液を滅菌濾過することによって調製され得る。分散剤は、活性化合物を基礎分散媒および適切な場合は他の所要成分を含有する滅菌ビヒクル中に入れることによって通例調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌凍結乾燥粉末の場合は、真空乾燥および噴霧乾燥が好ましい調製法であり、活性成分と適切な場合はあらかじめ滅菌濾過した溶液からのさらなる所望成分との粉剤を産生する。溶液の正確な流動性は、例えばレクチンなどのコート剤を使用することによって維持され、分散剤の場合は所要の粒子サイズを維持することによって維持され、または界面活性剤を使用することによって維持され得る。注射用組成物の持続性の吸収は、吸収を遅らせる作用物質、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物に追加的に入れることによって達成され得る。

10

【0327】

本発明の作用物質は、当業者に周知の多数の方法によって投与され得るが、多くの治療用途について好ましい投与の種類は皮下注射、静脈注射または注入である。当業者は、投与の経路および／または種類は所望の結果に依存することを理解している。詳細な実施形態により活性化合物は、例えば放出が維持されるまたは制御される製剤（埋め込み型、経皮プラスターおよびマイクロカプセル化放出製剤を含む。）など急速な放出から化合物を保護する担体とともに調製され得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などの生物学的に分解性の生体適合性ポリマーが、使用され得る。そのような製剤の調製方法は、当業者に十分に周知であり、例えば *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson 編、Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 を参照されたい。

20

【0328】

詳細な実施形態によれば、本発明の作用物質は、経口で、例えば不活性希釈剤または代謝可能な食用担体中で投与され得る。作用物質（および所望によりさらなる成分）はハードまたはソフトゼラチンカプセル中に封入されることもでき、錠剤に圧縮されることもできまたは食物に直接添加され得る。経口治療用投与のために作用物質は、賦形剤と混合されることができ、経口錠剤、バッカル錠、カプセル、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤などの形態で使用され得る。本発明の作用物質を非経口ではない経路を介して投与しようとする場合、不活性化を予防する物質からコート剤を選択する必要がある場合がある。

30

【0329】

さらなる態様において本発明は、アミロイドーシスを治療または予防するための医薬組成物を調製するための本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質の使用を提供する。

【0330】

本発明の好ましい実施形態において医薬組成物は、受動免疫法用である。

【0331】

したがって本発明は、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質を対象に投与することを含む、それを必要とする対象においてアミロイドーシスを治療または予防するための方法も提供する。

40

【0332】

本発明の好ましい実施形態において、Aβ（本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質を投与することはアミロイドーシスに対して対象を受動免疫化するためである。

【0333】

生体試料のスクリーニングは、そのような試料が本発明の抗アミロイドβペプチド類似体抗体または抗オリゴマー抗体などのような、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質と反応する物質を含み得ることを明らかにした。前記作用物質に一定の結合活性を有するが、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに相当するとは言えないそのような物質は、本明細書以下においてアミロイドβペプチド類

50

似体またはオリゴマー抗原決定基を含む抗原と称される。

【0334】

したがって本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質は、インビトロおよびインビボの両方において、それらが結合するアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマー抗原決定基を含む抗原を検出することもできる。前記作用物質は、したがって前記抗原を、例えばアミロイドーシスを有することが疑われる対象由来の試料またはアミロイドーシスを有することが疑われる対象例えばヒト個体もしくは他の哺乳動物において検出するために使用され得る。

【0335】

したがって本発明は、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質も診断的使用のために提供する。

【0336】

一態様において本発明は、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質を含む診断用組成物を提供する。詳細な実施形態によれば、前記組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物である。

【0337】

さらなる態様において本発明は、アミロイドーシスを診断するための組成物を調製するための本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質の使用を提供する。

【0338】

したがって本発明は、アミロイドーシスを有することが疑われる対象由来の試料を提供するステップ、試料を本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質に、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質およびアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマー抗原決定基を含む抗原を含む複合体の形成に十分な時間および条件下で接触させるステップを含み、複合体の存在が対象がアミロイドーシスを有することを示すアミロイドーシスを診断する方法も提供する。詳細な実施形態によれば、少なくとも試料を接触させるステップは、エクスピボ、詳細にはインビトロで実施される。

【0339】

したがって本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質は、種々の診断法およびアッセイにおいて使用され得る。

【0340】

一実施形態によれば、アミロイドーシスをこの疾患を有することが疑われる対象において診断する方法は、1) 患者から生体試料を分離するステップ、2) 生体試料を本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる少なくとも1つの作用物質に、抗原/作用物質複合体の形成に十分な時間および条件下で接触させるステップ、3) 前記試料中で抗原/作用物質複合体の存在を検出するステップ、を含み、複合体の存在は患者でのアミロイドーシス、例えばアルツハイマー病の診断を示す。抗原は、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマー抗原決定基を含むものである。詳細な実施形態によれば、前記ステップ2) および3) の内の少なくとも1つは、エクスピボ、詳細にはインビトロで実施される。さらなる詳細な実施形態によれば、方法は、ステップ1) を含まない。

【0341】

さらなる実施形態によれば、アミロイドーシスをこの疾患を有することが疑われる対象において診断する方法は、1) 患者から生体試料を分離するステップ、2) 生体試料を抗原に、抗体/抗原複合体の形成に十分な時間および条件下で接触させるステップ、3) 抱合体を得られた抗体/抗原複合体に、抱合体が結合抗体に結合できる十分な時間および条件下で添加するステップ(ここで抱合体は、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合でき、検出可能なシグナルを生じ得るシグナル生成化合物に付着している作用物質の1つを含む。)、4) シグナル生成化合物によって生じるシグナルを検出することによって生体試料中に存在する可能性がある抗体存在を検出し、シグナルが患者に

10

20

30

40

50

におけるアミロイドーシス、例えばアルツハイマー病の診断を示すステップ、を含む。抗原は、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマー抗原決定基を含むものである。詳細な実施形態によれば、前記ステップ2)、3)および4)の内の少なくとも1つは、エキスピボ、詳細にはインビトロで実施される。さらなる詳細な実施形態によれば、方法は、ステップ1)を含まない。

【0342】

さらなる実施形態によれば、アミロイドーシスをこの疾患を有することが疑われる対象において診断する方法は、1)前記患者から生体試料を分離するステップ、2)生体試料を抗抗体(抗抗体は本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質の1つに特異的である。)に、抗抗体/作用物質複合体の形成を可能にする十分な時間および条件下で接触させるステップ(作用物質を含有する複合体は生体試料中に存在している。)、3)抱合体を得られた抗抗体/作用物質複合体に抱合体が結合作用物質に結合できる十分な時間および条件下で添加するステップ(抱合体は、検出可能なシグナルを生じることができるシグナル生成化合物に結合しており、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマー抗原決定基を含む作用物質を含む。)、4)シグナル生成化合物によって生じるシグナルを検出するステップを含み、シグナルは患者におけるアミロイドーシス、例えばアルツハイマー病の診断を示す。詳細な実施形態によれば、前記ステップ2)、3)および4)の内の少なくとも1つは、エキスピボ、詳細にはインビトロで実施される。さらなる詳細な実施形態により方法は、ステップ1)を含まない。

【0343】

本発明の診断的一実施形態において、本発明のアミロイドβペプチド類似体もしくはオリゴマーまたはこれらの一部に結合できる作用物質は、固相にコーティングされる(または液相に存在する)。検査試料または生体試料(例えば全血、脳脊髄液、血清など)は、次いで固相と接触させられる。抗原(例えば球状体)が試料中に存在する場合、そのような抗原は固相上で本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質に結合し、次いで直接法または間接法によって検出される。直接法は、複合体それ自体、したがって抗原の存在を単純に検出することを含む。間接法においては、抱合体が結合作用物質に添加される。抱合体は、結合抗原に結合し、シグナル生成化合物または標識に付着している2次抗体を含む。2次抗体は結合抗原に結合し、シグナル生成化合物は測定可能なシグナルを生じる。それによりそのようなシグナルは、検査試料中の抗原の存在を示す。

【0344】

診断用免疫測定において使用される固相の例は、多孔性および非多孔性材料、ラテックス粒子、磁性粒子、微小粒子(米国特許第5,705,330号を参照されたい。)、ビーズ、膜、マイクロタイターウェルおよびプラスチックチューブである。固相材料および所望により抱合体中に存在する抗原または抗体を標識する方法の選択は、所望のアッセイ形式実施特徴に基づいて決定される。

【0345】

上に記載のとおり抱合体(または指示試薬)は、シグナル生成化合物または標識に付着している抗体(またはアッセイに応じて抗抗体)を含む。このシグナル生成化合物または「標識」は、それ自体が検出可能であるまたは検出可能な産物を生成するために1つ以上の追加的化合物と反応できる。シグナル生成化合物の例として、発色団、放射性同位元素(例えば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S および ^{14}C)、化学発光化合物(例えばアクリジニウム)、粒子(可視または蛍光)、核酸、錯化剤または酵素(例えばアルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼおよびリボヌクレアーゼ)などの触媒が挙げられる。酵素使用(例えばアルカリホスファターゼまたは西洋わさびペルオキシダーゼ)の場合は、発色性基質、蛍光発生基質または発光性基質の添加が検出可能なシグナルの発生をもたらす。時間分解蛍光、内部反射蛍光、増幅(例えばポリメラーゼ連鎖反応)およびラマン分光法などの他の検出可能な系も有用である。

【0346】

上記の免疫測定によって検査され得る生体液の例として、血漿、全血、乾燥全血、血清、脳脊髄液または組織および細胞の水性もしくは有機-水性抽出物が挙げられる。

【0347】

キットも本発明の範囲に含まれる。より詳細には本発明は、対象におけるアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマー抗原決定基を含む抗原の存在を測定するためのキットを含む。詳細には試料中の前記抗原の存在を測定するためのキットは、a) 本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質、および任意選択によってb) 作用物質に結合し、検出可能なシグナルを生じ得るシグナル生成化合物に付着している抗体を含む抱合体を含む。キットは、抗原に結合する試薬を含む対照物質または標準物質も含有できる。

10

【0348】

本発明は、試料中の自己抗体などの抗体を検出するための他の種類のキットも含む。キットは、a) 本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質に対して特異的な抗体（例えば抗抗体）およびb) 本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマー抗原決定基を含む抗原、を含み得る。抗原に結合する試薬を含む対照物質または標準物質も含まれ得る。より詳細にはキットは、a) 自己抗体に特異的な抗抗体およびb) 本明細書において定義のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマー抗原決定基を含む抗原を含む抱合体（抱合体は検出可能なシグナルを生じ得るシグナル生成化合物に付着している。）を含み得る。再びキットは、抗原に結合する試薬を含む対照物質または標準物質も含み得る。

20

【0349】

キットは、バイアル、ビンまたは条片などの1つの容器（各容器はあらかじめ定めた固相を有する。）およびそれぞれの抱合体を含んでいる他の容器も含み得る。これらのキットは、洗浄、処理および指示試薬などアッセイを実施するために必要な他の試薬のバイアルまたは容器も含み得る。

【0350】

本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに結合できる作用物質へのそれらの結合親和性により、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマー抗原決定基を含む前記抗原は、そのような抗原決定基を含有することが疑われる調製物で検出されることができ、それらの量は前記調製物中で測定されることができ、それらは濃縮され得る。したがって本発明は、アミロイドβペプチド類似体またはオリゴマー抗原決定基をそのような抗原決定基を含むことが疑われるまたは知られている調製物中において検出するため、その量を測定するためおよび／または濃縮するための方法も提供する。ひとたび検出され、濃縮されると前記物質は、本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーに関して本明細書において記載されたものに似た潜在的用途を有し得る。

30

【0351】

さらに本発明は、患者におけるアミロイドーシスの治療または予防において有用な抗体、非抗体性生物学的作用物質または小分子などの作用物質の設計方法を含む。この方法は、a) 本明細書において記載のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの3次元構造を分析するステップ、b) ステップa) のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーの表面上の1つ以上の抗原決定基を同定するステップおよびc) ステップb) で同定された1つ以上の抗原決定基に結合する抗体、非抗体性生物学的作用物質または小分子などの作用物質を設計するステップを含み、抗体、非抗体性生物学的作用物質または小分子はアミロイドーシスの治療または予防において使用される。

40

【0352】

本発明の利点

本発明のアミロイドβペプチド類似体およびオリゴマーのアミノ酸組成は、十分に明確であり、再現可能である。

【0353】

50

本発明のアミロイドβペプチド類似体およびオリゴマーは、安定な高次構造を提示する。

【0354】

本発明のアミロイドβペプチド類似体およびオリゴマーは、よりよい水力学的特性を提示する。

【0355】

本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーでの能動免疫法は、Aβ球状体に対して高度に選択的な免疫応答を誘発することが予測される。本発明のアミロイドβペプチド類似体およびオリゴマーがN末端配列を欠くように容易に設計され得ることから、非特異的N末端Aβペプチドに向けられた免疫応答を誘発する危険性は削減され得る。本発明のアミロイドβペプチド類似体およびオリゴマーは、したがってAβペプチドの他の形態を、詳細には単量体および原線維を区別する免疫応答を誘発できる。

【0356】

さらに本発明のアミロイドβペプチド類似体またはオリゴマーでの能動免疫法が、誘発される抗体応答がAβ(20-42)トランケート型球状体での能動免疫法に匹敵することから、AD遺伝子導入マウスモデルにおける認知障害を戻すことに効果的であることが予測される。後者は、新規物認識タスクにおける障害を戻すことが証明されている。

【0357】

本明細書に参照する全ての特許、特許出願および刊行物は、参照により本明細書にその全体を組み込む。

【0358】

寄託情報：モノクローナル抗体5F7を産生する融合細胞は、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 20110へ2005年12月1日にブダペスト条約の下で寄託され、名称PTA-7241を与えられた。さらに、モノクローナル抗体10F11を産生する融合細胞は、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 10801へ2005年12月1日にブダペスト条約の下で寄託され、名称PTA-7239を与えられた。追加的に、モノクローナル抗体4B7を産生する融合細胞は、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 10801へ2005年12月1日にブダペスト条約の下で寄託され、名称PTA-7242を与えられ、モノクローナル抗体7C6を産生する融合細胞は、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 10801へ2005年12月1日にブダペスト条約の下で寄託され、名称PTA-7240を与えられた。追加的に、モノクローナル抗体6A2を産生する融合細胞は、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 10801へ2006年2月28日にブダペスト条約の下で寄託され、名称PTA-7409を与えられ、モノクローナル抗体2F2を産生する融合細胞は、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 10801へ2006年2月28日にブダペスト条約の下で寄託され、名称PTA-7408を与えられた。モノクローナル抗体4D10を産生する融合細胞は、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 10801へ2006年2月28日にブダペスト条約の下で寄託され、名称PTA-7405を与えられた。モノクローナル抗体7E5を産生する融合細胞は、American Type Culture Coll

as、Virginia 10801へ2006年8月16日にブダペスト条約の下で寄託され、名称PTA-7809を与えられた。モノクローナル抗体10C1を産生する融合細胞は、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 10801へ2006年8月16日にブダペスト条約の下で寄託され、名称PTA-7810を与えられた。モノクローナル抗体3B10を産生する融合細胞は、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 10801へ2006年9月1日にブダペスト条約の下で寄託され、名称PTA-7851を与えられた。全ての寄託物はAbbott Laboratories、100 Abbott Park Road、Abbott Park、Illionois 60064 (US)を代表して行われた。

10

これら全てのモノクローナル抗体はマウスモノクローナル抗体である。

【0359】

以下の実施例は、本発明をその範囲を限定することなく例示するものである。

【実施例】

【0360】

[実施例1]

ペプチド合成

全ての試薬は、特に明記しない限り、業者から入手して使用した。ジイソプロピルエチルアミン (DIEA)、N-メチルピロリドン (NMP)、ジクロロメタン (DCM)、(2-(7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート) (HATU)、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチル-ウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU)、1-ヒドロベンゾトリアゾール (HOBt) およびピペリジンを含むペプチド合成試薬は、Applied Biosystems, Inc. (ABI)、Foster City、CAまたはAmerican Bioanalytical、Natick、MAから入手した。標準的な9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) アミノ酸誘導体 (Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Cys (Trt)-OH、Fmoc-Cys (ACM)-OH、Fmoc-Asp (tBu)-OH、Fmoc-Glu (tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-His (Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Lys (Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Asn (Trt)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gln (Trt)-OH、Fmoc-Arg (Pbf)-OH、Fmoc-Ser (tBu)-OH、Fmoc-Thr (tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Trp (Boc)-OH、Fmoc-Tyr (tBu)-OH) は、Anaspec、San Jose、CAまたはABIから入手した。Fmoc-3-アミノ-1-カルボキシメチル-ピリジン-2-オンおよびFmoc-シス-3-フェニル-ピロリジン-2-カルボン酸は、NeoSystem、Strasbourg、フランスから入手した。ペプチド合成樹脂 (Fmoc-Ala-PEGポリスチレン樹脂、Fmoc-Ala-ワング樹脂、リンクアミドMBHA樹脂) は、ABI、CS-Bio、Menlo Park、CAまたはNovabiochem、Hohenbrunn、ドイツから入手した。トリフルオロ酢酸 (TFA) は、Oakwood Products、West Columbia、SCから入手した。チオアニソール、フェノール、トリイソプロピルシラン (TIS)、3,6-ジオキサ-1,8-オクタジチオール (DODT)、フェリシアン化カリウムおよびイソプロパノールは、Aldrich Chemical Co.、Milwaukee、WIから入手した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-MS) は、Applied Biosystems Voyager DE-PRO MSに記録した。エレクトロスプレー質量分析 (ESI-MS) を、Finnigan SSQ7000 (Finni

20

30

40

50

gan Corp.、San Jose、CA)は、陽および陰イオンの両モードで記録した。

【0361】

固相ペプチド合成の一般的な手順：

標準的なカップリングサイクル0.1mMを用いて、ABI Pioneerペプチドシンセサイザーにおいて100μmolの前処理した樹脂／管、またはABI 433ペプチドシンセサイザーにおいて250μmolの樹脂／管のいずれかによって、ペプチドを合成した。ABI Pioneerシンセサイザーのカップリングの標準的なFmoc-アミノ酸において、試薬0.4mmolを含む前処理したチューブを、4:4:8のFmoc-アミノ酸：HATU：DIEAでシングルカップリングにより使用した。ABI 433シンセサイザーにおいて、Fmoc-アミノ酸1mMを含む前処理したカートリッジを、4:4:4:8のFmoc-アミノ酸：HBTU：HOBt：DIEAとして事前に活性化したシングルカップリングにより使用した。各シンセサイザーにおいてカップリング後、Fmoc保護基を、ピペルジンをを用いる処理によって除去した。合成が完了したとき、樹脂を3×DCMおよび3×イソプロパノールで洗浄し、真空中で乾燥させて保護ペプチド樹脂を得た。

10

【0362】

樹脂結合ペプチドを切断および脱保護するための一般的な手順：

TFA80%、水5%、チオアニソール5%、フェノール5%、TIS2.5%およびDODT2.5%からなる切断カクテル中で、周囲温度で3時間、樹脂を振盪させることによって、ペプチドを樹脂から切断した(1mL/0.1g樹脂)。樹脂を濾過によって除去し、2×TFAでリンスし、TFAを濾液から蒸発させ、残留物をエーテルで沈殿させ(10mL/0.1g樹脂)、遠心分離によって回収し、2×エーテル(10mL/0.1g樹脂)で洗浄し、乾燥させて粗ペプチドを得た。

20

【0363】

ペプチドを精製するための一般的な手順：

粗ペプチドを、Zorbax(登録商標)-C3(7μm粒子、300Å孔径)で充填したAgilentの21.2×250mmカラムにおいて、Unipoint(登録商標)解析ソフトウェアを実行するGilsonの調製用HPLCシステム(Gilson、Inc.、Middleton、WI)で精製した。カラムの温度は、精製を通して60℃未満で維持した。3ミリリットルの粗ペプチド溶液(75:25のギ酸：水中5mg/mL)を、注入ごとに精製した。各実行からの生成物(複数可)を含むピークをプールして凍結乾燥させた。全ての調製用の実行を、緩衝液A:0.1%TFA水および緩衝液B:アセトニトリルの溶出液により、生成物が溶出されるまで1%/分のBの勾配を用いて、20mL/分で実行した。

30

【0364】

解析用HPLCのための一般的な手順：

Zorbax(登録商標)-C3、7μm粒子、300Å孔径により充填して、7分間、開始の条件で事前に平衡化した後、以下に載せた勾配法の1つにより溶出した、Agilentの0.46×250mmカラムにおいて、D-7000ソフトウェアを実行する二波長検出器により、Hitachi D-7000解析用HPLCシステムで、解析用HPLCを行った。全ての解析の実行を、緩衝液A:0.1%TFA水および緩衝液B:アセトニトリルの溶出液により、75℃で45分間、2%/分のBの勾配を用いて、1mL/分で実行した。

40

【0365】

以下では、Aβペプチドおよびオリゴマーは、(xXaa1、yXaa2)Aβ(X-Y)ペプチドおよびオリゴマーと称し、Aβ(X-Y)は、配列番号1(アミノ酸位置1から43に対応する。)に示されるヒトアミロイドβタンパク質のアミノ酸位置Xからアミノ酸位置Yまでのアミノ酸配列(XおよびYの両方を含む)を指し、Xaa1およびXaa2は、配列番号1におけるそれぞれ位置xおよびyのアミノ酸を置換するアミノ酸を

50

示す。用語「 $(x X a a 1 / y X a a 2) A \beta (X - Y)$ 」は、用語「 $A \beta (X - Y) (x X a a 1 / y X a a 2)$ 」と同義である。

【0366】

a) (17C、34C) N-Met $A \beta (1-42)$ (1a)

アミノ酸配列MDAEFRHDSGYEVHHQKCVFFAEDVGSNKGAIIGCMVGGVVIA (配列番号961) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、以下のように調製した。

【0367】

前処理した樹脂(0.59g、100 μ mol)を、一般的なペプチド合成手順を用いて伸長させ、保護された樹脂結合ペプチドを得た(0.989g、57%)。樹脂を、一般的な手順を用いて切断および脱保護し、白色固体として粗ペプチド1aを得た(0.319g、62.6%)。粗ペプチド1aを、適切なギ酸(6.7mg/mL)に溶解し、260nmでの吸光度に基づく採取によるHPLC精製の直前に、水で(5mg/mLまで)希釈した。主要なピークを単離し、凍結乾燥させて、白色固体として1aを得た(0.0274g、8.5%)；デコンボリューションESI-MSm/z=4625.4[(M+H)⁺]。

【0368】

以下のペプチド(1b)から(1j)を、C末端からN末端まで、標準的なFmoc固相合成によって合成した。合成に続き、ペプチドを逆相HPLCによって精製した。システインにおいて遊離のスルフィド基を維持する(酸化を避ける)ため、生成の間、酸性pHを維持した(通常の手順)。簡潔には、Fmoc保護基を、樹脂上にあるアミノ酸から除去した。配列における次のアミノ酸を添加し、HBTUを用いて最初のアミノ酸とカップリングした。Fmoc保護基を、第2アミノ酸から除去した。配列における次のアミノ酸を添加し、HBTUを用いて前のアミノ酸とカップリングした。配列が完成するまで、ステップ4および5を繰り返した。TFAを用いて、ペプチドを樹脂から切断した。TFA/アセトニトリル緩衝液系(酸性緩衝液系)を用いて、逆相HPLCにより、ペプチドを精製した。質量および純度のスペックを満たす精製画分を保存し、凍結乾燥させた。質量スペック解析およびRP-HPLCにより、ペプチドの種類を確認した。

【0369】

b) (14C、37C) N-Met $A \beta (1-42)$ (1b)

アミノ酸配列MDAEFRHDSGYEVHCKQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVCGVVIA (配列番号962) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、標準的なペプチド化学法を用いて調製した。

【0370】

c) (15C、36C) N-Met $A \beta (1-42)$ (1c)

アミノ酸配列MDAEFRHDSGYEVHHCKQLVFFAEDVGSNKGAIIGLMCGGVVVIA (配列番号963) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、標準的なペプチド化学法を用いて調製した。

【0371】

d) (16C、35C) N-Met $A \beta (1-42)$ (1d)

アミノ酸配列MDAEFRHDSGYEVHHQCLVFFAEDVGSNKGAIIGLCVGGVVIA (配列番号964) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、標準的なペプチド化学法を用いて調製した。

【0372】

e) (17C、34C) N-Met $A \beta (1-42)$ (1e)

アミノ酸配列MDAEFRHDSGYEVHHQKCVFFAEDVGSNKGAIIGCMVGGVVIA (配列番号965) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、標準的なペプチド化学法を用いて調製した。

【0373】

f) (18C、33C) N-Met $A \beta (1-42)$ (1f)

アミノ酸配列MDAEFRHDSGYEVHHQKLCFFAEDVGSNKGAIICLMVGGVVI A (配列番号966)を有するアミロイドβペプチド類似体を、標準的なペプチド化学法を用いて調製した。

【0374】

g) (19C、32C) N-Met Aβ (1-42) (1g)

アミノ酸配列MDAEFRHDSGYEVHHQKLVCF AEDVGSNKGAIICGLMVGGVVI A (配列番号967)を有するアミロイドβペプチド類似体を、標準的なペプチド化学法を用いて調製した。

【0375】

h) (20C、31C) N-Met Aβ (1-42) (1h)

アミノ酸配列MDAEFRHDSGYEVHHQKLVFCAEDVGSNKGACIICGLMVGGVVI A (配列番号968)を有するアミロイドβペプチド類似体を、標準的なペプチド化学法を用いて調製した。

【0376】

i) (21C、30C) N-Met Aβ (1-42) (1i)

アミノ酸配列MDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFCEDVGSNKGCIICGLMVGGVVI A (配列番号969)を有するアミロイドβペプチド類似体を、標準的なペプチド化学法を用いて調製した。

【0377】

j) (22C、29C) N-Met Aβ (1-42) (1j)

アミノ酸配列MDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFACDVGSNKCACIICGLMVGGVVI A (配列番号970)を有するアミロイドβペプチド類似体を、標準的なペプチド化学法を用いて調製した。

【0378】

k) (17C、34C) Aβ (12-42) (1k)

アミノ酸配列VHHQKCVFFAEDVGSNKGAIIGCMVGGVVI A (配列番号971)を有するアミロイドβペプチド類似体を、Fmoc-Ala-ワング樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製した。計算値MW [g/mol] : 3186.73; MALDI-MS: 実測値3186.7 [(M+H)⁺]。

【0379】

l) (17C (ACM)、34C (ACM)) Aβ (16-35) -アミド (1l)

アミノ酸配列KC (ACM) VFFAEDVGSNKGAIIGC (ACM) M-アミド (配列番号972)を有するアミロイドβペプチド類似体を、リンク-アミド-MBHA樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製した。計算値MW [g/mol] : 2230.67; MALDI-MS: 実測値2231.4、2228.9 [(M+H)⁺]。

【0380】

m) Aβ (16-35) -アミド (1m)

アミノ酸配列KLVFFAEDVGSNKGAIIGLM-アミド (配列番号973)を有するアミロイドβペプチド類似体を、リンク-アミド-MBHA樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製した。計算値MW [g/mol] : 2108.5; MALDI-MS: 実測値2108.1 [(M+H)⁺]、2130 [(M+Na)⁺]。

【0381】

n) (17K、34K) Aβ (16-35) -アミド (1n)

アミノ酸配列KKVFFAEDVGSNKGAIIGKM-アミド (配列番号974)を有するアミロイドβペプチド類似体を、リンク-アミド-MBHA樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製した。計算値MW [g/mol] : 2135.53; MALDI-MS: 実測値2137.96、2137.91 [(M+H)⁺]。

【0382】

10

20

30

40

50

o) (17C、34C) A β (16-35) -アミド、環状 (1o)

アミノ酸配列 KC*VFFAEDVGSNKGAIIGC*M-アミド (配列番号 975) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、上記に概説した一般的な手順によって調製した。ジメチルスルホキシド中 18mg/mL で、直鎖前駆体ペプチド (17C、34C) A β (16-35) -アミド (1p) を溶解することによって、ジスルフィド環化を成し遂げ、真空脱ガスした 3:2 の重炭酸アンモニウム:アセトニトリル 100mM (200mL、v:v) に、1アリコートで添加した。フェリシアン化カリウム溶液 (水中 0.05% w/v、44.3mL) を一度に添加し、反応液を周囲温度で 2 時間攪拌した。上記に概説した一般的な手順を用いる精製および解析の前に、黄色溶液を凍結乾燥させて乾かし、環化した (17C、34C) A β (16-35) -アミドを得た。計算値 MW [g/mol]: 2186.46; MALDI-MS: 実測値 2086.6 [(M+H)⁺]、2108.6 [(M+Na)⁺]。

10

【0383】

p) (17C、34C) A β (16-35) -アミド (1p)

アミノ酸配列 KCVFFAEDVGSNKGAIIGCM-アミド (配列番号 976) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、リンク-アミド-MBHA樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製した。計算値 MW [g/mol]: 2088.47; MALDI-MS: 実測値 2087.99 [(M+H)⁺]、2109.98 [(M+Na)⁺]。

20

【0384】

q) (17K、34K) N-Met A β (1-42) (1q)

アミノ酸配列 MDAEFRHDSGYEVHHQKKVFFAEDVGSNKGAIIGKMGVGGVVI A (配列番号 977) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、H-Ala-HMPB NovaPEG樹脂を用いて、上記に概説した一般的な方法によって調製した。計算値 MW [g/mol]: 4675.26; MALDI-MS: 実測値 4680.16 [(M+H)⁺]。

【0385】

r) (17KC、34C) A β (13-42) (1r)

アミノ酸配列 HHQKKKC VFFAEDVGSNKGAIIGCMVG VGGVVI A (配列番号 978) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、Fmoc-Ala-ワング樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製した。計算値 MW [g/mol]: 3215.77; MALDI-MS: 実測値 3214.72 [(M+H)⁺]。

30

【0386】

s) (17C、34C) A β (16-42) (1s)

アミノ酸配列 KCVFFAEDVGSNKGAIIGCMVG VGGVVI A (配列番号 979) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、Fmoc-Ala-ワング樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製した。計算値 MW [g/mol]: 2685.19; MALDI-MS: 実測値 2683.82 [(M+H)⁺]、2705.84 [(M+Na)⁺]。

【0387】

40

t) (17C (ACM)、34C (ACM)、35M (S-オキシド)) A β (16-35) -アミド (1t)

アミノ酸配列 KC (ACM) VFFAEDVGSNKGAIIGC (ACM) M (S-オキシド) -アミド (配列番号 980) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、Fmoc-Ala-ワング樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製した。計算値 MW [g/mol]: 2246.67; MALDI-MS: 実測値 2245.48 [(M+H)⁺]。

【0388】

u) (17C (ACM)、34C (ACM)) A β (16-35) -アミド (1u)

アミノ酸配列 KC (ACM) VFFAEDVGSNKGAIIGC (ACM) M-アミ

50

ド（配列番号 981）を有するアミロイド β ペプチド類似体を、リンクアミド MBHA 樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製した。計算値 MW [g/mol] : 2230.67; MALDI-MS: 実測値 2229.45 [(M+H)⁺]。

【0389】

v) (17K、34E) A β (16-35) - アミド (1v)

アミノ酸配列 KKVFFAEDVGSNKGAIIGEM - アミド（配列番号 982）を有するアミロイド β ペプチド類似体を、PEG-NOVA-BIOCHEM 樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製した。計算値 MW [g/mol] : 2139.47; MALDI-MS: 実測値 2161.1 [(M+Na)⁺]。

【0390】

w) (17K、34C) N-Met A β (1-42) (1w)

アミノ酸配列 MDAEFRHDSGYEVHHQKKVFFAEDVGSNKGAIIGCMVGGVVIA（配列番号 983）を有するアミロイド β ペプチド類似体を、Fmoc-Ala- Wang 樹脂を用いて上記に概説した一般的な手順によって調製した。計算値 MW [g/mol] : 4650.23; MALDI-MS: 実測値 4651.07 [(M+H)⁺]。

【0391】

x) (17K、34E) N-Met A β (1-42) (1x)

アミノ酸配列 MDAEFRHDSGYEVHHQKKVFFAEDVGSNKGAIIGEMVGGVVIA（配列番号 984）を有するアミロイド β ペプチド類似体を、Fmoc-Ala- Wang 樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製した。計算値 MW [g/mol] : 4676.21; MALDI-MS: 実測値 4676.2 [(M+H)⁺]。

【0392】

y) (17C、34C) N-Met A β (1-42) (1y)

アミノ酸配列 MDAEFRHDSGYEVHHQKCVFFAEDVGSNKGAIIGCMVGGVVIA（配列番号 985）を有するアミロイド β ペプチド類似体を、Fmoc-Ala- Wang 樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製した。計算値 MW [g/mol] : 4625.21; MALDI-MS: 実測値 4625.52 [(M+H)⁺]。

【0393】

z) (22C*, 29C*) A β (16-35) - アミド、環化 (1z)

アミノ酸配列 KKVFFA C* DVGSNKC* AII GKM - アミド（配列番号 986）を有するアミロイド β ペプチド類似体を、上記に概説した一般的な手順、およびペプチド (1o) に関して記載した環化方法を用いることによって、調製することができる。

【0394】

aa) (22C、29C) A β (16-35) - アミド (1aa)

アミノ酸配列 KKVFFA CDVGSNKC AII GKM - アミド（配列番号 987）を有するアミロイド β ペプチド類似体を、上記に概説した一般的な手順によって調製することができる。

【0395】

ab) (F20 $\rightarrow$ FA19501、L17C、L34C) N-Met A β (1-42) (1ab)

アミノ酸配列 MDAEFRHDSGYEVHHQKCVF - FA19501 - AEDVGSNKGAIIGCMVGGVVIA（配列番号 988）を有するアミロイド β ペプチド類似体を、Fmoc-Ala- Wang 樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製することができる。FA19501 は、ペプチド中の普通のアミノ酸に関して組み込むことができる Fmoc-cis-3-フェニルピロリジン-2-カルボン酸に関するカタログ番号である。

【0396】

10

20

30

40

50

a c) (22 C、29 C) A β (20-35) (1 a c)

アミノ酸配列 F A C D V G S N K C A I I G L M (配列番号 989) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、Fmoc-Ala-ワング樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製することができる。

【0397】

a d) (22 C、29 C) A β (20-42) (1 a d)

アミノ酸配列 F A C D V G S N K C A I I G L M V G G V V I A (配列番号 990) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、Fmoc-Ala-ワング樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製することができる。

【0398】

a e) (17 C、22 C、29 C、34 C) A β (20-42) N-Met A β (1-42) (1 a e)

アミノ酸配列 M D A E F R H D S G Y E V H H Q K C V F F A C D V G S N K C A I I G C M V G G V V I A (配列番号 991) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、Fmoc-Ala-ワング樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製することができる。

【0399】

a f) (K28G29->FA12401、L17C、L34C) N-Met A β (1-42) (1 a f)

アミノ酸配列 M D A E F R H D S G Y E V H H Q K C V F F A E D V G S N - F A 1 2 4 0 1 - A I I G C M V G G V V I A (配列番号 992) を有するアミロイド β ペプチド類似体を、Fmoc-Ala-ワング樹脂を用いて、上記に概説した一般的な手順によって調製することができる。FA12401は、ペプチド中の普通のアミノ酸に関して組み込むことができるFmoc-3-アミノ-1-カルボキシメチル-L-ピリジン-2-オンに関するカタログ番号である。

【0400】

[実施例 2]

オリゴマーの調製

【0401】

a) ジスルフィド安定化 (17 C、34 C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (2 a)

実施例 1 a の合成 (17 C、34 C) N-Met A β (1-42) (1 a) 83.1 mg、TFA 塩を、HFIP (ペプチド 6 mg ごとに 1 ml) で処理し、溶媒を凍結乾燥によって除去した。これを、4.0 ml の DMSO に溶解した。次いで、ペプチドのこの DMSO 溶液を攪拌しながら、0.2% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を含む 20 mM の PBS (20 mM の NaH₂PO₄、140 mM の NaCl、pH 7.4) 45 mL にゆっくり添加した。次いで、この溶液を DTT (ジチオスレイトール) 中で 5 mM にし、37°C で 6 時間温置した。

【0402】

次いで、試料を 3 倍の水で希釈し、3500 MWCO 透析膜を使用して、0.05% SDS を用いて 1/4 強度の PBS に対して、室温で一晩、透析した。透析を翌朝 4°C で 2 時間、1 L の新鮮な緩衝液に対して続けた。

【0403】

次いで、試料を Amicon 攪拌セル中で、YM10 膜を用いて濃縮した。0.5 mL アリコート、Pierce 10K slide lyzer を用いて、SDS なしで、1/4 強度の PBS に対して、4°C で一晩、透析した。

【0404】

[実施例 3]

オリゴマーの調製

【0405】

10

20

30

40

50

a) (14C、37C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (3a)

実施例1bの(14C、37C) N-Met Aβ (1-42) ペプチド(1b)を、100% 1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール(HFIP) 4 mg/mLに懸濁し、37℃で2時間、振盪下で、完全な可溶化のために温置した。HFIPは、水素結合ブレーカーとして働き、Aβペプチドにおいて事前に存在する構造的不均一性を排除するために使用する。HFIPを、Speed Vac中で蒸発によって除去し、Aβペプチドを、ジメチルスルホキシドに5mMの濃度で溶解または懸濁し、20秒間、超音波処理した。HFIPで前処理したDMSO中のAβペプチド20μlを、リン酸緩衝食塩水(PBS) 230μl + 0.2% SDS + 2mMのDTT(ヘリウムを通気した20mMのNaH₂PO₄ 9.8ml、140mMのNaCl、pH7.4 + H₂Oに溶解した10% SDS溶液0.2ml + DTT 3mg、Serva、Cat. no.: 20710)により400μMのペプチド濃度に希釈した。37℃で6時間の温置により、16/20-kDa(xC、yC) N-Met Aβ (1-42) 中間体およびAβ (1-42) 中間体が生じた。ヘリウムを通気したH₂Oにより3倍にさらに希釈し、37℃で18時間温置することによって、38/48-kDa(xC、yC) N-Met Aβ (1-42) オリゴマーを生成した。10,000gで10分間、遠心分離した後、上澄みを除去し、さらに使用するまで-30℃で保存した。

10

【0406】

b) (15C、36C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (3b)

実施例1cの(15C、36C) N-Met Aβ (1-42) ペプチド(1c)を、実施例3aに記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

20

【0407】

c) (16C、35C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (3c)

実施例1dの(16C、35C) N-Met Aβ (1-42) ペプチド(1d)を、実施例3aに記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0408】

d) (17C、34C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (3d)

実施例1eの(17C、34C) N-Met Aβ (1-42) ペプチド(1e)を、実施例3aに記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0409】

30

e) (18C、33C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (3e)

実施例1fの(18C、33C) N-Met Aβ (1-42) ペプチド(1f)を、実施例3aに記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0410】

f) (19C、32C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (3f)

実施例1gの(19C、32C) N-Met Aβ (1-42) ペプチド(1g)を、実施例3aに記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0411】

g) (20C、31C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (3g)

実施例1hの(20C、31C) N-Met Aβ (1-42) ペプチド(1h)を、実施例3aに記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

40

【0412】

h) (21C、30C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (3h)

実施例1iの(21C、30C) N-Met Aβ (1-42) ペプチド(1i)を、実施例3aに記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0413】

i) (22C、29C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (3i)

実施例1jの(22C、29C) N-Met Aβ (1-42) ペプチド(1j)を、実施例3aに記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0414】

50

j) A β (1-42) グロブロマー (3j)

A β (1-42) 野生型ペプチド (Bacchem H-1368) を、実施例 3a に記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0415】

k) (17C、34C) A β (12-42) オリゴマー (3k)

実施例 1k の (17C、34C) A β (12-42) ペプチド (1k) を、以下の修正により、実施例 2a に記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。HFIP 処理に続き、ペプチドを、35% アセトニトリル / 65% 水中の 1% アンモニアに溶解し、RT で約 30 分間温置し、アンモニウム塩を形成した。次いで、この塩をシェルフローズンし、凍結乾燥して一晩乾かした。次いで、オリゴマー化を実施例 2a に記載の 0.05% SDS のステップまで完了させた。

10

【0416】

実施例 1k の (17C、34C) A β (12-42) ペプチド (1k) を、HFIP で処理し (ペプチド 6mg ごとに 1ml)、溶媒を凍結乾燥によって除去した。HFIP 処理に続き、ペプチドを、35% アセトニトリル / 65% 水中の 1% アンモニア中で溶解し、RT で約 30 分間温置し、アンモニウム塩を形成した。次いで、この塩をシェルフローズンし、凍結乾燥して一晩乾かした。次いで、これを 4.0ml の DMSO に溶解した。ペプチドのこの DMSO 溶液を、次いで攪拌しながら、0.2% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を含む 20mM の PBS (20mM の NaH₂PO₄、140mM の NaCl、pH 7.4) 45mL にゆっくり添加した。次いで、この溶液を DTT (ジチオスレイトール) 中で 5mM にし、37°C で 6 時間温置した。

20

【0417】

l) (17C (ACM)、34C (ACM)) A β (16-35) オリゴマー (3l)

(17C (ACM)、34C (ACM)) A β (16-35) ペプチド (1l) を、DTT を使わなかったことを除き、実施例 3k に記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0418】

m) A β (16-35) - アミドオリゴマー (3m)

A β (16-35) - アミドペプチド (1m) を、DTT を使わなかったことを除き、実施例 3k に記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

30

【0419】

n) (17K、34K) A β (16-35) - アミドオリゴマー (3n)

(DTT を使用することなしに) 実施例 3k に記載の手順を用いて、(17K、34K) A β (16-35) - アミドペプチド (1n) をオリゴマー化に供することにより、オリゴマーが得られる。

【0420】

o) [(17C、34C) A β (16-35) - アミド、環状] オリゴマー (3o)

[(17C、34C) A β (16-35) - アミド、環状] ペプチド (1o) を、DTT を使用しなかったことを除き、実施例 3k に記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

40

【0421】

p) (17C、34C) A β (16-35) - アミドオリゴマー (3p)

(17C、34C) A β (16-35) - アミドペプチド (1p) を、実施例 3k に記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0422】

q) (17K、34K) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3q)

(DTT を使用することなく) 実施例 3k に記載の手順を用いて、(17K、34K) N-Met A β (1-42) ペプチド (1q) をオリゴマー化に供することにより、オリゴマーが得られる。

【0423】

50

r) (17KC、34C) A β (13-42) オリゴマー (3r)

(17KC、34C) A β (13-42) ペプチド (1r) を、実施例 3k に記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0424】

s) (17C、34C) A β (16-42) オリゴマー (3s)

(17C、34C) A β (16-42) ペプチド (1s) を、実施例 3k に記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0425】

t) (17C (ACM)、34C (ACM)、35M (S-オキシド)) A β (16-35) -アミドオリゴマー (3t)

(DTTを使用することなく) 実施例 3k に記載の手順を用いて、(17C (ACM)、34C (ACM)、35M (S-オキシド)) A β (16-35) -アミドオリゴマー (3t) をオリゴマー化に供することにより、オリゴマーが得られる。

【0426】

u) (17C (ACM)、34C (ACM)) A β (16-35) -アミドオリゴマー (3u)

(17C (ACM)、34C (ACM)) ペプチド (1u) を、DTTを使用しなかったことを除き、実施例 3k に記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0427】

v) (17K、34E) A β (16-35) オリゴマー (3v)

(17K、34E) A β (16-35) ペプチド (1v) を、DTTを使用しなかったことを除き、実施例 3k に記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0428】

w) (17K、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3w)

(17K、34C) N-Met A β (1-42) ペプチド (1w) を、DTTを使用しなかったことを除き、実施例 3k に記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0429】

x) (17K、34E) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3x)

(17K、34E) N-Met A β (1-42) ペプチド (1x) を、DTTを使用しなかったことを除き、実施例 3k に記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0430】

y) (17C、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3y)

(17C、34C) N-Met A β (1-42) ペプチド (1y) を、実施例 3k に記載の手順を用いて、オリゴマー化に供した。

【0431】

z) [(22C*、29C*) A β (16-35) -アミド、環化] オリゴマー (3z)

実施例 3k に記載の手順を用いて、[(E22C*、G29C*) A β (16-35) -アミド、環化] ペプチド (1z) をオリゴマー化に供することにより、オリゴマーが得られる。

【0432】

aa) (22C、29C) A β (16-35) -アミドオリゴマー (3aa)

実施例 3k に記載の手順を用いて、(22C、29C) A β (16-35) -アミドペプチド (1aa) をオリゴマー化に供することにより、オリゴマーが得られる。

【0433】

ab) (F20->FA19501、L17C、L34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3ab)

実施例 3k に記載の手順を用いて、(F20->FA19501、L17C、L34C) N-Met A β (1-42) ペプチド (1ab) をオリゴマー化に供することにより、オリゴマーが得られる。

【0434】

10

20

30

40

50

a c) (22C、29C) A β (20-35) オリゴマー (3 a c)

実施例 3 k に記載の手順を用いて、(22C、29C) A β (20-35) ペプチド (1 a c) をオリゴマー化に供することにより、オリゴマーが得られる。

【0435】

a d) (22C、29C) A β (20-42) オリゴマー (3 a d)

実施例 3 k に記載の手順を用いて、(22C、29C) A β (20-42) ペプチド (1 a d) をオリゴマー化に供することにより、オリゴマーが得られる。

【0436】

a e) (17C、22C、29C、34C) A β (20-42) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3 a e)

実施例 3 k に記載の手順を用いて、(17C、22C、29C、34C) A β (20-42) N-Met A β (1-42) ペプチド (1 a e) をオリゴマー化に供することにより、オリゴマーが得られる。

【0437】

a f) (K28G29->FA12401、L17C、L34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3 a f)

実施例 3 k に記載の手順を用いて、(K28G29->FA12401、L17C、L34C) N-Met A β (1-42) ペプチド (1 a f) をオリゴマー化に供することにより、オリゴマーが得られる。

【0438】

[実施例 4]

リンケージ形成

【0439】

a) ジスルフィド安定化 (14C、37C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 a)

実施例 3 a の (14C、37C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3 a) 1 ml を解凍し、2 L の 5 mM の NaH₂PO₄、35 mM の NaCl、pH 7.4 に対して、室温で 2 時間、2 回、透析管中で透析した。続いて、透析液を除去し、タンパク質濃度を、Bio-Rad タンパク質アッセイ、BioRad、Cat. no. : 500-0006 によって決定した。

【0440】

b) ジスルフィド安定化 (15C、36C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 b)

実施例 3 b の (15C、36C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3 b) を、実施例 4 a に記載の手順を用いて、酸化に供した。

【0441】

c) ジスルフィド安定化 (16C、35C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 c)

実施例 3 c の (16C、35C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3 c) を、実施例 4 a に記載の手順を用いて、酸化に供した。

【0442】

d) ジスルフィド安定化 (17C、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 d)

実施例 3 d の (17C、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3 d) を、実施例 4 a に記載の手順を用いて、酸化に供した。

【0443】

e) ジスルフィド安定化 (18C、33C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 e)

実施例 3 e の (18C、33C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3 e) を、実施例 4 a に記載の手順を用いて、酸化に供した。

10

20

30

40

50

【0444】

f) ジスルフィド安定化 (19C、32C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4f)

実施例3fの(19C、32C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3f) を、実施例4aに記載の手順を用いて、酸化に供した。

【0445】

g) ジスルフィド安定化 (20C、31C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4g)

実施例3gの(20C、31C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3g) を、実施例4aに記載の手順を用いて、酸化に供した。

10

【0446】

h) ジスルフィド安定化 (21C、30C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4h)

実施例3hの(21C、30C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3h) を、実施例4aに記載の手順を用いて、酸化に供した。

【0447】

i) ジスルフィド安定化 (22C、29C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4i)

実施例3iの(22C、29C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3i) を、実施例4aに記載の手順を用いて、酸化に供した。

20

【0448】

j) A β (1-42) グロブロマー (4j)

実施例3jのA β (1-42) 野生型グロブロマー (Bachem H-1368) (3j) を、実施例4aに記載の手順を用いて、酸化に供した。

【0449】

k) ジスルフィド安定化 (17C、34C) A β (12-42) オリゴマー (4k)

(17C、34C) A β (12-42) オリゴマー (3k) を、3倍の水で希釈し、3500MWCO透析膜を使用して、0.05% SDSを用いて1/4強度のPBSに対して、室温で一晩、透析した。透析を、翌朝、4℃で2時間、1Lの新鮮な緩衝液に対して続けた。

30

【0450】

次いで、試料をAmicon攪拌セル中で、YM10膜を用いて濃縮した。試料は、10kDaのカットオフした膜により、Millipore UltraMax遠心濃縮器を用いて、濃縮することもできる。

【0451】

l) (17C (ACM)、34C (ACM)) A β (16-35) オリゴマー (4l)

(17C (ACM)、34C (ACM)) A β (16-35) オリゴマー (3l) は、システイン架橋を形成しない。

【0452】

m) A β (16-35) -アミドオリゴマー (4m)

40

A β (16-35) -アミドオリゴマー (3m) は、架橋結合を形成しない。

【0453】

n) 架橋結合した (17K、34K) A β (16-35) -アミドオリゴマー (4n)

2つのアミノ基を架橋結合させるための適した状態に、(17K、34K) A β (16-35) -アミドオリゴマー (3n) を供することにより、生成物が得られる。

【0454】

o) [(17C、34C) A β (16-35) -アミド、環状] オリゴマー (4o)

[(17C、34C) A β (16-35) -アミド、環状] オリゴマー (3o) は、すでにリンケージを含む。

【0455】

50

p) ジスルフィド安定化 (17C、34C) A β (16-35) - アミドオリゴマー (4p)

D T Tを除去し、実施例4kに記載のように、ジスルフィド形成をもたらすために、(17C、34C) A β (16-35) - アミドオリゴマー (3p) を、透析に供した。

【0456】

q) 架橋結合した (17K、34K) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4q)

2つのアミノ基を架橋結合させるための適した状態に、(17K、34K) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3q) を供することにより、生成物が得られる。

【0457】

r) ジスルフィド安定化 (17KC、34C) A β (13-42) オリゴマー (4r)

D T Tを除去し、実施例4kに記載のように、ジスルフィド形成をもたらすために、(17KC、34C) A β (13-42) オリゴマー (3r) を、透析に供した。

【0458】

s) ジスルフィド安定化 (17C、34C) A β (16-42) オリゴマー (4s)

D T Tを除去し、実施例4kに記載のように、ジスルフィド形成をもたらすために、(17C、34C) A β (16-42) オリゴマー (3s) を、透析に供した。

【0459】

t) (17C (ACM)、34C (ACM)、35M (S-オキシド)) A β (16-35) - アミドオリゴマー (4t)

(17C (ACM)、34C (ACM)、35M (S-オキシド)) A β (16-35) - アミドオリゴマー (3t) は、システイン架橋を形成しない。

【0460】

u) (17C (ACM)、34C (ACM)) A β (16-35) - アミドオリゴマー (4u)

(17C (ACM)、34C (ACM)) A β (16-35) - アミドオリゴマー (3u) は、システイン架橋を形成しない。

【0461】

v) EDC/NHS結合型 (17K、34E) A β (16-35) オリゴマー (4v)

実施例4xの手順に、(17K、34E) A β (16-35) オリゴマー (3v) を供することにより、生成物が得られる。

【0462】

w1) SMCC結合型 (17K、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4w1)

0.05% SDS (2.37mMのペプチド) 中の実施例3wの (17K、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3w) を、11mMのスルホSMCC (Pierce cat # 22622、無水DMSO中の100mMの保存物から供給された。) と、室温で1時間、架橋結合した。100mM、pH8の無水保存液由来の10mMのエタノールアミンを添加することによって、反応を終了させた。2000Da MWのカットオフした膜により、Slide-A-Lyzerを用いて、5mMのNaPO₄、35mMのNaCl、0.05% SDS、pH7.4に対する透析によって、過剰な試薬および反応生成物を除去した。最終濃度を、BCAタンパク質アッセイ (Pierce) を用いて決定した。

【0463】

w2) MBS結合型 (17K、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4w2)

0.05% SDS (2.47mMのペプチド) 中の実施例3wの (17K、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3w) を、12mMのスルホMBS (Pierce cat # 22312、無水DMSO中の100mMの保存物から供給された。) と、室温で1時間、架橋結合した。100mM、pH8の保存水溶液由来の10mMのエタノールアミンを添加することによって、反応を終了させた。2000Da MWのカット

10

20

30

40

50

オフした膜により、Slide-A-Lyzerを用いて、5mMのNaPO₄、35mMのNaCl、0.05%SDS、pH7.4に対する透析によって、過剰な試薬および反応生成物を除去した。最終濃度を、BCAタンパク質アッセイ(Pierce)を用いて決定した。

【0464】

w3) S I A B結合型(17K、34C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー(4w3)

0.05%SDS(2.47mMのペプチド)中の実施例3wの(17K、34C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー(3w)を、12mMのスルホS I A B(Pierce cat #22327、無水DMSO中の100mMの保存物から供給された。)と、室温で1時間、架橋結合した。100mM、pH8の無水保存液由来の10mMのエタノールアミンを添加することによって、反応を終了させた。2000Da MWのカットオフした膜により、Slide-A-Lyzerを用いて、5mMのNaPO₄、35mMのNaCl、0.05%SDS、pH7.4に対する透析によって、過剰な試薬および反応生成物を除去した。最終濃度を、BCAタンパク質アッセイ(Pierce)を用いて決定した。

10

【0465】

x) EDC/NHS結合型(17K、34E) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー(4x)

0.05%SDS(2.14mMのペプチド)中の実施例3xの(17K、34E) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー(3x)を、20mMのEDC(Pierce cat #22980、100mMの無水保存物から供給された。)および50mMのスルホNHS(Pierce cat #24520、100mMの無水保存物から供給された。)を用いて、室温で1時間、架橋結合した。2000Da MWのカットオフした膜により、Slide-A-Lyzerを用いて、5mMのNaPO₄、35mMのNaCl、0.05%SDS、pH7.4に対する透析によって、過剰な試薬および反応生成物を除去した。最終濃度を、BCAタンパク質アッセイ(Pierce)を用いて決定した。

20

【0466】

y) ジスルフィド安定化(17C、34C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー(4y)

D T Tを除去し、実施例4kに記載のように、ジスルフィド形成をもたらすために、(17C、34C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー(3y)を、透析に供した。

30

【0467】

z) [(E22C*、G29C*) Aβ(16-35)-アミド、環化]オリゴマー(4z)

[(22C*、29C*) Aβ(16-35)-アミド、環化]オリゴマー(3z)は、すでにリンケージを含む。

【0468】

aa) ジスルフィド安定化(22C、29C) Aβ(16-35)-アミドオリゴマー(4aa)

D T Tを除去し、実施例4kに記載のように、ジスルフィド形成をもたらすために、(22C、29C) Aβ(16-35)-アミドオリゴマー(3aa)を透析に供することにより、生成物が得られる。

40

【0469】

ab) ジスルフィド安定化(F20->FA19501、17C、34C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー(4ab)

D T Tを除去し、実施例4kに記載のように、ジスルフィド形成をもたらすために、(F20->FA19501、L17C、L34C) N-Met Aβ(1-42)オリゴマー(3ab)を透析に供することにより、生成物が得られる。

【0470】

50

a c) ジスルフィド安定化 (22 C、29 C) A β (20-35) オリゴマー (4 a c)
D T Tを除去し、実施例 4 k に記載のように、ジスルフィド形成をもたらすために、(22 C、29 C) A β (20-35) オリゴマー (3 a c) を透析に供することにより、生成物が得られる。

【0471】

a d) ジスルフィド安定化 (22 C、29 C) A β (20-42) オリゴマー (3 a d)
D T Tを除去し、実施例 4 k に記載のように、ジスルフィド形成をもたらすために、(22 C、29 C) A β (20-42) オリゴマー (3 a d) を透析に供することにより、生成物が得られる。

【0472】

a e) ジスルフィド安定化 (17 C、22 C、29 C、34 C) A β (20-42) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 a e)

D T Tを除去し、実施例 4 k に記載のように、ジスルフィド形成をもたらすために、17 C、22 C、29 C、34 C) A β (20-42) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3 a e) を透析に供することにより、生成物が得られる。

a f) ジスルフィド安定化 (K28G29>FA12401、17 C、34 C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 a f)

D T Tを除去し、実施例 4 k に記載のように、ジスルフィド形成をもたらすために、(K28G29>FA12401、17 C、34 C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (3 a f) を透析に供することにより、生成物が得られる。

【0473】

[実施例 5]

サーモリシントランケーション

【0474】

a) ジスルフィド安定化 (14 C、37 C) N-Met A β (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 a)

実施例 4 a のジスルフィド安定化 (14 C、37 C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 a) 0.5 ml を、1/91 サーモリシン w/w (Roche、Cat. no. : 161586) で添加した。サーモリシンを、(新鮮に調製した) H₂O 中で 1 mg/ml の濃度で溶解した。試料を、30 °C で 20 時間、振盪下で温置した。次いで、水中の pH 7.4 の 10 mM の EDTA 溶液 2.5 μ l を添加し、試料を室温で 5 分間振盪した。試料を、続いて 10 % 強度 SDS 溶液 5 μ l で 0.1 % の SDS 含有量に調整した。試料を室温で 10 分間振盪した。続いて、試料を、0.4 ml の 30 kDa の Ultrafree-MC チューブ (Amicon、Cat. no. : UFC3LTK00) により、およそ 20 μ l に濃縮した。濃縮物を、0.2 ml の緩衝液 (5 mM の NaH₂PO₄、35 mM の NaCl、pH 7.4) と混合し、再び 30 kDa の Ultrafree-MC チューブ (Amicon、Cat. no. : UFC3LTK00) を用いて 20 μ l に濃縮した。次いで濃縮物を、0.38 ml の緩衝液 (5 mM の NaH₂PO₄、35 mM の NaCl、pH 7.4) で最終体積 0.4 ml に調整した。続いて試料を、10 % 強度 SDS 溶液 2 μ l で 0.05 % の SDS 含有量に調整し、さらに使用するまで -30 °C で保存した。

【0475】

b) ジスルフィド安定化 (15 C、36 C) N-Met A β (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 b)

実施例 4 b のジスルフィド安定化 (15 C、36 C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 b) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0476】

c) ジスルフィド安定化 (16 C、35 C) N-Met A β (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 c)

10

20

30

40

50

実施例 4 c のジスルフィド安定化 (16 C、35 C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 c) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0477】

d) ジスルフィド安定化 (17 C、34 C) N-Met A β (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 d)

実施例 4 d のジスルフィド安定化 (17 C、34 C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 d) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0478】

e) ジスルフィド安定化 (18 C、33 C) N-Met A β (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 e)

実施例 4 e のジスルフィド安定化 (18 C、33 C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 e) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0479】

f) ジスルフィド安定化 (19 C、32 C) N-Met A β (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 f)

実施例 4 f のジスルフィド安定化 (19 C、32 C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 f) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0480】

g) ジスルフィド安定化 (20 C、31 C) N-Met A β (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 g)

実施例 4 g のジスルフィド安定化 (20 C、31 C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 g) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0481】

h) ジスルフィド安定化 (21 C、30 C) N-Met A β (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 h)

実施例 4 h のジスルフィド安定化 (21 C、30 C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 h) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0482】

i) ジスルフィド安定化 (22 C、29 C) N-Met A β (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 i)

実施例 4 i のジスルフィド安定化 (22 C、29 C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (4 i) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0483】

j) A β (1-42) グロブロマーのサーモリシントランケーション (5 j)

実施例 4 j の A β (1-42) 野生型グロブロマー (Bachem H-1368) (4 j) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0484】

k) ジスルフィド安定化 (17 C、34 C) A β (12-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 k)

実施例 4 k のジスルフィド安定化 (17 C、34 C) A β (12-42) オリゴマー (4 k) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0485】

l) (17 C (ACM)、34 C (ACM)) A β (16-35) オリゴマーのサーモリ

10

20

30

40

50

シントランケーション (5 l)

(17C (ACM)、34C (ACM)) Aβ (16-35) オリゴマー (3 l) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0486】

m) Aβ (16-35) - アミドオリゴマーのサーモリシントランケーション (5 m)

実施例 3 m の Aβ (16-35) - アミドオリゴマー (3 m) を実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0487】

n) (17K、34K) Aβ (16-35) - アミドオリゴマーのサーモリシントランケーション (5 n)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、(17K、34K) Aβ (16-35) - アミドオリゴマー (3 n) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

【0488】

o) [(17C、34C) Aβ (16-35) - アミド、環状] オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 o)

実施例 3 o の [(17C、34C) Aβ (16-35) - アミド、環状] オリゴマー (3 o) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0489】

p) ジスルフィド安定化 (17C、34C) Aβ (16-35) - アミドオリゴマーのサーモリシントランケーション (5 p)

実施例 4 p のジスルフィド安定化 (17C、34C) Aβ (16-35) - アミドオリゴマー (4 p) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0490】

q) (17K、34K) N-Met Aβ (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 q)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、(17K、34K) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (3 q) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

【0491】

r) ジスルフィド安定化 (17KC、34C) Aβ (13-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 r)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、実施例 4 r のジスルフィド安定化 (17KC、34C) Aβ (13-42) オリゴマー (4 r) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

【0492】

s) ジスルフィド安定化 (17C、34C) Aβ (16-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 s)

実施例 4 s のジスルフィド安定化 (17C、34C) Aβ (16-42) オリゴマー (4 s) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0493】

t) (17C (ACM)、34C (ACM)、35M (S-オキシド)) Aβ (16-35) - アミドオリゴマーのサーモリシントランケーション (53 t)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、(17C (ACM)、34C (ACM)、35M (S-オキシド)) Aβ (16-35) - アミドオリゴマー (3 t) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

【0494】

u) (17C (ACM)、34C (ACM)) Aβ (16-35) - アミドオリゴマーのサーモリシントランケーション (5 u)

10

20

30

40

50

実施例 5 a に記載の手順を用いて、(17C (ACM)、34C (ACM)) Aβ (16-35) - アミドオリゴマー (3u) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

【0495】

v) (17K、34E) Aβ (16-35) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5v)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、(17K、34E) Aβ (16-35) オリゴマー (3v) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

【0496】

w1) SMC C 結合型 (17K、34C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5w)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、SMC C 結合型 (17K、34C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (4w1) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

【0497】

w2) MBS 結合型 (17K、34C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5w)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、MBS 結合型 (17K、34C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (4w2) にサーモリシントランケーションを供することにより、生成物が得られる。

【0498】

w3) STAB 結合型 (17K、34C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5w)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、STAB 結合型 (17K、34C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (4w3) にサーモリシントランケーションを供することにより、生成物が得られる。

【0499】

x) EDC/NHS 結合型 (17K、34E) N-Met Aβ (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5x)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、EDC/NHS 結合型 (17K、34E) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (4x) にサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

【0500】

y) ジスルフィド安定化 (17C、34C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5y)

実施例 4 y のジスルフィド安定化 (17C、34C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (4y) を、実施例 5 a に記載の手順を用いて、サーモリシントランケーションに供した。

【0501】

z) [(22C*、29C*) Aβ (16-35) - アミド、環化] オリゴマーのサーモリシントランケーション (5z)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、[(22C*、29C*) Aβ (16-35) - アミド、環化] オリゴマー (3z) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

【0502】

aa) ジスルフィド安定化 (22C、29C) Aβ (16-35) アミドオリゴマーのサーモリシントランケーション (5aa)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、ジスルフィド安定化 (22C、29C) Aβ (16-35) - アミドオリゴマー 22C、29C) Aβ (16-35) - アミドオリゴマー (4aa) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

10

20

30

40

50

【0503】

a b) ジスルフィド安定化 (F 2 0 → F A 1 9 5 0 1、1 7 C、3 4 C) N-M e t A β (1-4 2) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 a b)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、ジスルフィド安定化 (F 2 0 → F A 1 9 5 0 1、1 7 C、3 4 C) N-M e t A β (1-4 2) オリゴマー (4 a b) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

【0504】

a c) ジスルフィド安定化 (2 2 C、2 9 C) A β (2 0-3 5) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 a c)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、ジスルフィド安定化 (2 2 C、2 9 C) A β (2 0-3 5) オリゴマー (4 a c) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

10

【0505】

a d) ジスルフィド安定化 (2 2 C、2 9 C) A β (2 0-4 2) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 a d)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、ジスルフィド安定化 (2 2 C、2 9 C) A β (2 0-4 2) オリゴマー (4 a d) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

【0506】

a e) ジスルフィド安定化 (1 7 C、2 2 C、2 9 C、3 4 C) A β (2 0-4 2) N-M e t A β (1-4 2) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 a e)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、ジスルフィド安定化 (1 7 C、2 2 C、2 9 C、3 4 C) A β (2 0-4 2) N-M e t A β (1-4 2) オリゴマー (4 a e) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

20

【0507】

a f) ジスルフィド安定化 (K 2 8 G 2 9 → F A 1 2 4 0 1、1 7 C、3 4 C) N-M e t A β (1-4 2) オリゴマーのサーモリシントランケーション (5 a f)

実施例 5 a に記載の手順を用いて、ジスルフィド安定化 (K 2 8 G 2 9 → F A 1 2 4 0 1、1 7 C、3 4 C) N-M e t A β (1-4 2) オリゴマー (4 a f) をサーモリシントランケーションに供することにより、生成物が得られる。

30

【0508】

生物物理的および生化学的特性評価

【0509】

[実施例 7]

S D S P A G E 解析

【0510】

a) (1 7 C、3 4 C) N-M e t A β (1-4 2) オリゴマーの S D S-P A G E (1 0-2 0 % トリシングル)

2 × トリシンサンプル緩衝液 (I n v i t r o g e n、C a t # L C 1 6 7 6) およびトリシンランニング緩衝液 (I n v i t r o g e n、C a t # L C 1 6 7 5) を採用して、S D S-P A G E を、1 0-2 0 % トリシングル、1. 0 mm、1 5 穴 (I n v i t r o g e n、C a t # E C 6 6 2 5 5) を用いて実行した。試料を、等量のサンプル緩衝液と混合し、加熱なしにロードした。一定の電位 1 2 5 V を用いて、1 0 0 分間周囲温度でゲルを展開した。展開後、メタノール酢酸ベースの C o o m a s s i e R-2 5 0 染色 (水中、0. 1 % C o o m a s s i e B r i l l i a n t B l u e R 2 5 0、3 0 % メタノール、1 0 % 酢酸) を用いて、ゲルを染色し、3 0 % メタノール / 1 0 % 酢酸 / 水を用いて脱染した。使用した標準物質: ミオシン (2 1 0 k D a)、ホスホリラーゼ (9 8 k D a)、B S A (7 8 k D a)、グルタミン酸脱水素酵素 (5 5 k D a)、アルコール脱水素酵素 (4 5 k D a)、炭酸脱水酵素 (3 4 k D a)、ミオグロビンレッド (1 7 k D a)、リゾチーム (1 6 k D a)、アプロチニン (7 k D a) およびインスリン (4 k

40

50

Da) からなる SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standards (Invitrogen、Cat#LC5925)。

【0511】

実施例 2 a) からの (17C、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー (2 a) は、典型的な A β グロブロマーのバンドパターンを示した (図 2 A)。

【0512】

b) (xC、yC) N-Met-A β (1-42) オリゴマーの SDS-PAGE (4-20% トリス/グリシンゲル)

SDS-PAGE を、以下のパラメータを用いて実行した。

SDS サンプル緩衝液：

- SDS 0.3 g
- 4 mL の 1 M の トリス/HCl pH 6.8
- グリセロール 8 mL
- エタノール中の 1% ブロムフェノールブルー 70 μ L
- H₂O を 50 mL まで添加

ランニング緩衝液：

- トリス 7.5 g
- グリシン 36 g
- SDS 2.5 g
- H₂O を 2.5 L まで添加

SDS-PAGE ゲルシステム：

- 4-20% トリス/グリシンゲル：(Invitrogen Inc.、Cat. no. : EC60255 BOX)

サーモリシン消化の前および後に、(xC、yC) N-Met-A β (1-42) オリゴマー 10 μ L または A β (1-42) グロブロマー調製物を、SDS サンプル緩衝液 10 μ L に添加した。生じた試料 20 μ L を、4-20% トリス/グリシンゲル上にロードした (Invitrogen Inc.、Cat. no. : EC60255 BOX)。SDS-PAGE を、一定の電流 25 mA で伝導した。

【0513】

Coomassie 染色：

染色溶液：

- メタノール 2500 mL
- 酢酸 500 mL
- 5 g の Coomassie Brilliant Blue R250、Fa. Bio-Rad、Cat. no. 161-0400
- H₂O 2000 mL

脱染溶液：

- メタノール 875 mL
- 酢酸 250 mL
- H₂O 3925 mL

電気泳動に続いて、ゲルを、ロッキングプラットホーム上の振盪下で、室温で 30 分間、染色溶液中で温置した。染色後、ゲルのバックグラウンドを、脱染溶液中、室温で一晩、脱染した。

【0514】

実施例 4 a) からの (14C、37C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例 5 a) からのサーモリシントランケートした (14C、37C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例 4 b) からの (15C、36C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例 5 b) からのサーモリシントランケートした (15C、36C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例 4 c) からの (16C、35C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例 5 c) からのサーモリシントランケートした (16C

10

20

30

40

50

、35C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例4dからの(17C、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例5dからのサーモリシントランケートした(17C、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例4eからの(18C、33C) N-Met A β (1-42) オリゴマーおよび実施例5eからのサーモリシントランケートした(18C、33C) N-Met A β (1-42) オリゴマー(図2B)ならびに実施例4fからの(19C、32C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例5fからのサーモリシントランケートした(19C、32C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例4gからの(20C、31C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例5gからのサーモリシントランケートした(20C、31C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例4hからの(21C、30C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例5hからのサーモリシントランケートした(21C、30C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例3iからの(22C、29C) N-Met A β (1-42) オリゴマー、実施例5hからのサーモリシントランケートした(22C、29C) N-Met A β (1-42) オリゴマー(図2C)は、A β (1-42) グロブロマーまたはA β (1-42) サーモリシントランケートしたグロブロマーの典型的なA β グロブロマーのバンドパターンを示した((YC、YC) N-Met A β (1-42) オリゴマーおよびサーモリシントランケートした(YC、YC) N-Met A β (1-42) オリゴマーの実行で、バンドの高さのいくつかの明確なシフトがあるが。)

10

【0515】

20

さらに、実施例3xからの(17K、34E) N-Met A β (1-42) オリゴマー(0.2% SDS)、実施例3xからの(17K、34E) N-Met A β (1-42) オリゴマー(0.05% SDS)、実施例3uからの(17C (ACM)、34C (ACM)) A β (16-35) オリゴマー(0.2% SDS)、実施例3uからの(17C (ACM)、34C (ACM)) A β (16-35) オリゴマー(0.05% SDS)、実施例3wからの(17K、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー(0.2% SDS)、実施例3wからの(17K、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー(0.05% SDS)、実施例3sからの(17C、34C) A β (16-42) オリゴマー(0.2% SDS)、実施例3sからの(17C、34C) A β (16-42) オリゴマー(0.05% SDS)、実施例3rからの(17KC、34C) A β (13-42) オリゴマー(0.2% SDS) および実施例3rからの(17KC、34C) A β (13-42) オリゴマー(0.05% SDS) (図2D)は、N-Met A β (1-42) グロブロマーの典型的なA β グロブロマーのバンドパターンを示した。

30

【0516】

[実施例8]

直接的ELISA

【0517】

原線維および遊離ペプチドよりA β (1-42) グロブロマー形態に対して>1000倍の選択性である抗体を用いることによって、実施例2aからの(17C、34C) N-Met A β (1-42) オリゴマー(2a)の免疫応答性を、さらに特性評価した(モノクローナル抗体5F7)。

40

【0518】

材料：マイクロタイタープレートは、Nunc Immuno Plate、Maxi-Sorb Surface、平底、(カタログ#439454)であった。コンジュゲート(2次抗体)は、Donkey抗マウスHRPOコンジュゲート、Jackson Immuno Research、(カタログ#715-035-150)であった。HRPO基質は、3,3',5'5'-テトラメチルベンジジン液体基質(TMB)、Sigma、(カタログ#T4444)であった。Non-fat Dry Milk(NFDM)は、BioRadから得た(カタログ#170-6404)。全ての他の化学薬品は、従来の供給源から得た。

50

【0519】

緩衝液および溶液：PBST緩衝液：SigmaPBSは、0.05%Tween20を用いて作製した。0.5%BSAによるPBSTは、PBST100mL中でBSA0.5mgを溶解することによって作製した。ブロッキング溶液は、PBST中で3%NFDMであった。コンジュゲート希釈液は、PBST中で1%NFDMであった。コーティング緩衝液は、100mMのNaHCO₃ pH8.2であった。HRPO停止溶液は、2MのH₂SO₄であった。

【0520】

プレートのコーティング：試験するAβグロブロマーを、コーティング緩衝液中で1.0μg/mLに希釈した。100μLを、コートする各穴に添加した。プレートをシーリングフィルムで密封し、4℃で一晩放置した。

10

【0521】

プレートのブロッキング：コーティング溶液を、穴から除去した。各々の穴を、必要に応じてPBST150μLで2-3X洗浄した。ブロッキング溶液300μLを添加した（PBST中で3%NFDM）。プレートを、プレートシーリングフィルムで覆い、攪拌しながら室温で約2時間温置した。

【0522】

1次抗体：ブロッキング溶液を、穴から除去した。各々の穴を、必要に応じてPBST150μLで2-3X洗浄した。1次抗体溶液100μLを添加した。完全長N-Met Aβ（1-42）グロブロマーに関して、0.04から100μg/mLの抗体5F7の溶液を使用した。抗体を、0.5%BSAによるPBSTを用いて希釈した。プレートを、プレートシーリングフィルムで覆い、攪拌しながら室温で約2から3時間温置した。

20

【0523】

2次抗体（HRPOコンジュゲート）：1次抗体溶液を穴から除去した。各々の穴を、PBST150μLで2-3X洗浄した。1%NFDMによりPBST中で1:5000に希釈した2次抗体（HRPOコンジュゲート）溶液200μLを添加した。プレートを、プレートシーリングフィルムで覆い、攪拌しながら室温で約1時間温置した。

【0524】

基質の発現：コンジュゲート溶液を穴から除去した。各々の穴を、PBST200μLで2-3X洗浄した。HRPO基質溶液100μLを、各穴に添加した。色を観察下で発現できるようにした。色は青に変わった。反応は通常、室温で5-10分中に終わった。停止溶液50μLを、各穴に添加した。青色は黄色に変わった。停止溶液を添加して30分以内に、マイクロタイタープレートリーダーを用いて、450nmでの吸光度を読み取った。

30

【0525】

グロブロマー特異的モノクローナル抗体5F7とN-Met Aβ（1-42）グロブロマー、および（L17C、L34C）N-Met Aβ（1-42）変異オリゴマーと5F7との結合は、ほとんど同一であり（図3A）、（L17C、L34C）N-Met Aβ（1-42）変異オリゴマーは、グロブロマー特異的エピトープをさらに表すことが示された。

40

【0526】

グロブロマー特異的mAb 5F7と、実施例4yからのジスルフィド安定化（L17C、34C）N-Met Aβ（1-42）オリゴマーvs. 実施例5yからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Bに示す。

【0527】

グロブロマー特異的mAb 7C6と、実施例4yからのジスルフィド安定化（L17C、34C）N-Met Aβ（1-42）オリゴマーvs. 実施例5yからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Cに示す。

50

【0528】

グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清5599と、実施例4yからのジスルフィド安定化(17C、34C)N-Met A β (1-42)オリゴマーvs. 実施例5yからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Dに示す。

【0529】

グロブロマー特異的mAb 5F7と、実施例4pからのジスルフィド安定化(17C、34C)A β (16-35)オリゴマーvs. 実施例5pからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Eに示す。

10

【0530】

グロブロマー特異的mAb 7C6と、実施例4pからのジスルフィド安定化(17C、34C)A β (16-35)オリゴマーvs. 実施例5pからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Fに示す。

【0531】

グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清5599と、実施例4pからのジスルフィド安定化(17C、34C)A β (16-35)オリゴマーvs. 実施例5pからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Gに示す。

20

【0532】

グロブロマー特異的mAb 5F7と、実施例4mからのA β (16-35)オリゴマーvs. 実施例5mからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Hに示す。

【0533】

グロブロマー特異的mAb 7C6と、実施例4mからのA β (16-35)オリゴマーvs. 実施例5mからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Iに示す。

30

【0534】

グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清5599と、実施例4mからのA β (16-35)オリゴマーvs. 実施例5mからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Jに示す。

【0535】

グロブロマー特異的mAb 5F7と、実施例4lからの(17C(ACM)、34C(ACM))A β (16-35)オリゴマーvs. 実施例5lからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Kに示す。

40

【0536】

グロブロマー特異的mAb 7C6と、実施例4lからの(17C(ACM)、34C(ACM))A β (16-35)オリゴマーvs. 実施例5lからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Lに示す。

【0537】

グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清5599と、実施例4lからの(17C(ACM)、34C(ACM))A β (16-35)オリゴマーvs. 実施例5lからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーと

50

の見かけの結合親和性を比較する、直接的 E L I S A の比較結果を図 3 M に示す。

【0538】

グロブロマー特異的 m A b 5 F 7 と、実施例 4 o からの（オリゴマー形成前に環化した）ジスルフィド安定化（17 C、34 C）A β（16-35）オリゴマー v s．実施例 5 o からのサーモリシンによる酵素的切断によって残基 20 でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的 E L I S A の比較結果を図 3 N に示す。

【0539】

グロブロマー特異的 m A b 7 C 6 と、実施例 4 o からの（オリゴマー形成前に環化した）ジスルフィド安定化（17 C、34 C）A β（16-35）オリゴマー v s．実施例 5 o からのサーモリシンによる酵素的切断によって残基 20 でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的 E L I S A の比較結果を図 3 O に示す。

【0540】

グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清 5599 と、実施例 4 o からの（オリゴマー形成前に環化した）ジスルフィド安定化（17 C、34 C）A β（16-35）オリゴマー v s．実施例 5 o からのサーモリシンによる酵素的切断によって残基 20 でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的 E L I S A の比較結果を図 3 P に示す。

【0541】

グロブロマー特異的 m A b 5 F 7 と、実施例 4 o からの（オリゴマー形成前に環化した）ジスルフィド安定化（17 C、34 C）A β（16-35）オリゴマー v s．実施例 4 s、4 p および 4 y からの（全てオリゴマー形成後に環化した）ジスルフィド安定化（17 C、34 C）A β（16-42）、（17 C、34 C）A β（16-35）および（17 C、34 C）N-M e t A β（1-42）オリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的 E L I S A の比較結果を図 3 Q に示す。

【0542】

グロブロマー特異的 m A b 5 F 7 と、実施例 5 o からの（オリゴマー形成前に環化した）サーモリシントランケートしたジスルフィド安定化（17 C、34 C）A β（16-35）オリゴマー v s．実施例 5 s、5 p および 5 y からの（全てオリゴマー形成後に環化した）サーモリシントランケートしたジスルフィド安定化（17 C、34 C）A β（16-42）、（17 C、34 C）A β（16-35）および（17 C、34 C）N-M e t A β（1-42）オリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的 E L I S A の比較結果を図 3 R に示す。

【0543】

グロブロマー特異的 m A b 5 F 7 と、実施例 4 s からのジスルフィド安定化（17 C、34 C）A β（16-42）オリゴマー v s．実施例 5 s からのサーモリシンによる酵素的切断によって残基 20 でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的 E L I S A の比較結果を図 3 S に示す。

【0544】

グロブロマー特異的 m A b 7 C 6 と、実施例 4 s からのジスルフィド安定化（17 C、34 C）A β（16-42）オリゴマー v s．実施例 5 s からのサーモリシンによる酵素的切断によって残基 20 でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的 E L I S A の比較結果を図 3 T に示す。

【0545】

グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清 5599 と、実施例 4 s からのジスルフィド安定化（17 C、34 C）A β（16-42）オリゴマー v s．実施例 5 s からのサーモリシンによる酵素的切断によって残基 20 でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的 E L I S A の比較結果を図 3 U に示す。

【0546】

10

20

30

40

50

グロブロマー特異的mAb 5F7と、実施例4kからのジスルフィド安定化(17C、34C)Aβ(12-42)オリゴマーvs. 実施例5kからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Vに示す。

【0547】

グロブロマー特異的mAb 7C6と、実施例4kからのジスルフィド安定化(17C、34C)Aβ(12-42)オリゴマーvs. 実施例5kからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Wに示す。

【0548】

グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清5599と、実施例4kからのジスルフィド安定化(17C、34C)Aβ(12-42)オリゴマーvs. 実施例5kからのサーモリシンによる酵素的切断によって残基20でランケートした同じオリゴマーとの見かけの結合親和性を比較する、直接的ELISAの比較結果を図3Xに示す。

【0549】

グロブロマー特異的mAb 5F7と、実施例4rからのジスルフィド安定化(17KC、34C)Aβ(13-42)オリゴマーとの見かけの結合親和性の直接的ELISA結果を、図3Yに示す。

【0550】

グロブロマー特異的mAb 7C6と、実施例4rからのジスルフィド安定化(17KC、34C)Aβ(13-42)オリゴマーとの見かけの結合親和性の直接的ELISA結果を、図3Zに示す。

【0551】

グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清5599と、実施例4rからのジスルフィド安定化(17KC、34C)Aβ(13-42)オリゴマーとの見かけの結合親和性の直接的ELISA結果を、図3AAに示す。

【0552】

図13は、(A)グロブロマー特異的モノクローナル抗体5F7、(B)グロブロマー特異的モノクローナル抗体7C6および(C)グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清5599に対する、実施例3wからの架橋なしの(17K、34C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマーと、実施例4yからのジスルフィド安定化(17C、34C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマーの、直接的ELISA応答の比較を示す。

【0553】

図14は、(A)グロブロマー特異的モノクローナル抗体5F7、(B)グロブロマー特異的モノクローナル抗体7C6および(C)グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清5599に対する、実施例3wからの架橋なしの(17K、34C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマーと、サーモリシントランケーションの前(実施例4w1)および後(実施例5w1)にSMCCで架橋した(17K、34C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマーの、直接的ELISA応答の比較(A)を示す。

【0554】

図15は、(A)グロブロマー特異的モノクローナル抗体5F7、(B)グロブロマー特異的モノクローナル抗体7C6および(C)グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清5599に対する、実施例3wからの架橋なしの(17K、34C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマーと、サーモリシントランケーションの前(実施例4w2)および後(実施例5w2)にMBSで架橋した(17K、34C)N-Met Aβ(1-42)オリゴマーの、直接的ELISA応答の比較(A)を示す。

【0555】

図16は、(A)グロブロマー特異的モノクローナル抗体5F7、(B)グロブロマー特異的モノクローナル抗体7C6および(C)グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清5599に対する、実施例3wからの架橋なしの(17K、34C)N-Met

10

20

30

40

50

A β (1-42) オリゴマーと、サーモリシントランケーションの前 (実施例 4 w 3) および後 (実施例 5 w 3) に S I A B で架橋した (17 K、34 C) N-Met A β (1-42) オリゴマーの、直接的 E l i s a 応答の比較 (A) を示す。

【0556】

図 17 は、(A) グロブロマー特異的モノクローナル抗体 5 F 7、(B) グロブロマー特異的モノクローナル抗体 7 C 6 および (C) グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清 5599 に対する、架橋なしの実施例 3 x からの (17 K、34 E) N-Met A β (1-42) オリゴマーと、実施例 3 y からのジスルフィド安定化 (17 C、34 C) N-Met A β (1-42) オリゴマーの、直接的 E l i s a 応答の比較 (A) を示す。

10

【0557】

図 18 は、(A) グロブロマー特異的モノクローナル抗体 5 F 7、(B) グロブロマー特異的モノクローナル抗体 7 C 6 および (C) グロブロマー特異的ウサギポリクローナル抗血清 5599 に対する、架橋なしの (17 K、34 C) N-Met A β (1-42) オリゴマーと、サーモリシントランケーションの前および後に E D C / N H S で架橋した (17 K、34 C) N-Met A β (1-42) オリゴマーの、直接的 E l i s a 応答の比較 (A) を示す。

【0558】

いくつかの結果が得られた：

(17 C、34 C) A β (16-42) ペプチド (実施例 3 s) は、期待したジスルフィド結合の両方を含み (図 4 E & F)、グロブロマーエピトープを表す (図 3 S-3 U) オリゴマー (実施例 4 s) を形成することが示された。サーモリシンによるトランケーションにおいて (実施例 5 s)、グロブロマー特異的抗体への親和性の期待した上昇が観察された (図 3 S-3 U)。

20

【0559】

(17 C、34 C) A β (12-42) ペプチド (実施例 3 k) は、期待したジスルフィド結合の両方を含み (図 4 G & H)、グロブロマーエピトープを表す (図 3 V-3 X) オリゴマー (実施例 4 k) を形成することが示された。サーモリシンによるトランケーションにおいて (実施例 5 k)、グロブロマー特異的抗体への親和性の期待した上昇が観察された (図 3 V-3 X)。

30

【0560】

(17 C、34 C) A β (16-35) ペプチド (実施例 3 o) は、期待したジスルフィド結合の両方を含み (図 4 C & D)、グロブロマーエピトープを表す (図 3 E-3 G) オリゴマー (実施例 4 o) を形成することが示された。サーモリシンによるトランケーションにおいて (実施例 5 o)、グロブロマー特異的抗体への親和性の期待した上昇が観察された (図 3 E-3 G)。しかし、c y s 残基の欠如 (w t A β (16-35)、実施例 3 m) または c y s 残基の-SHの A C M 保護 ((17 C A C M / 34 C A C M) A β (16-35)、実施例 3 l) のいずれかにより、ジスルフィドリンケージの形成を妨げられる A β (16-35) ペプチドは、グロブロマーエピトープを表すオリゴマーを形成できなかった (図 3 H-3 M)。

40

【0561】

位置 17 にリシンおよび位置 34 にシステインを導入することによって、さまざまなヘテロ二官能性架橋結合試薬を、これらの 2 つの残基の側鎖間の架橋に採用でき、これには、スルホ-S M C C、スルホ-M B S およびスルホ-S I A B が挙げられる。例えば、(17 K、34 C) N-Met A β (1-42) ペプチド (実施例 3 w) は、グロブロマーエピトープを表すオリゴマーを形成することができる (図 13 A-13 C)。さらに、これらのオリゴマーは、スルホ-S M C C (実施例 4 w 1)、スルホ-M B S (実施例 4 w 2) およびスルホ-S I A B (実施例 4 w 3) を用いて架橋結合に供することができ、所望の分子内の共有結合性架橋結合を形成することができる (図 12 A-12 C)。これらの架橋結合した A β オリゴマーは、さらに、グロブロマー特異的抗体に対する適切な反応

50

性を表す（それぞれ図 1 4 A-1 4 C、1 5 A-1 5 C および 1 6 A-1 C）。その上、これらの A β オリゴマーを、サーモリシントランケーションに供することができ（実施例 4 w 1、4 w 2 & 4 w 3）、グロブロマー特異的抗体への親和性の期待した上昇が生じる（図 1 4 A-1 4 C、1 5 A-1 5 C および 1 6 A-1 6 C）。

【0 5 6 2】

位置 1 7 にリシンおよび位置 3 4 にグルタミン酸を導入することによって、さまざまな架橋結合戦略を、これらの 2 つの残基の側鎖間の架橋に採用でき、これには、E D C に続きスルホ-N H S を用いた反応によるグルタミン酸側鎖の活性化が挙げられる。この活性化した側鎖は、続いて位置 1 7 に導入したリシン残基の一級アミンと反応することができる。例えば、(1 7 K、3 4 C) N-M e t A β (1-4 2) ペプチド（実施例 3 w）は、グロブロマーエピトープを表すオリゴマーを形成することができる（図 1 7 A-1 7 C）。さらに、これらのオリゴマーは、E D C およびスルホ-N H S を用いて架橋結合に供することができ、分子内の共有結合性架橋結合が生じる（図 1 2 D）。これらの架橋結合した A β オリゴマーは、さらに、グロブロマー特異的抗体に対する適切な反応性を表す（図 1 8 A-1 8 C）。その上、これらの A β オリゴマーを、サーモリシントランケーションに供することができ（実施例 4 x）、グロブロマー特異的抗体への親和性の期待した上昇が生じる（図 1 8 A-1 8 C）。

【0 5 6 3】

[実施例 9]

質量分析

【0 5 6 4】

実施例 2 a からの (1 7 C、3 4 C) N-M e t A N-M e t A β (1-4 2) オリゴマー (2 a) の質量分析により、実施例 1 a の (L 1 7 C、L 3 4 C) N-M e t A β (1-4 2) 変異ペプチド (1 a) を有するオリゴマーの形成が、2 つの C y s 残基間のペプチド内ジスルフィド結合の効率的な形成を導くことが確認された（図 4 A）。質量は、およそ 4 6 2 2 D a、すなわち 1 つのジスルフィド結合を形成した (L 1 7 C、L 3 4 C) N-M e t A β (1-4 2) 変異ペプチドに関して期待した質量に集中した。共有結合の二量体ペプチドのサインは、質量スペクトルにおいて観察されなかった。ジチオスレイトール (D T T) により還元した後、質量は、1 つのジスルフィド結合をもたない (L 1 7 C、L 3 4 C) N-M e t A β (1-4 2) 変異ペプチドに関して期待したように、およそ 4 6 2 4 D a に集中し、アイソトピックデコンボリューションで観察された各質量は、ジスルフィド結合の還元から期待したように、2 つの D a を得る（図 4 B）。

【0 5 6 5】

実施例 3 p からの (1 7 C、3 4 C) A β (1 6-3 5) オリゴマー (3 p) の質量分析により、実施例 1 p の (1 7 C、3 4 C) A β (1 6-3 5) ペプチド (1 p) を有するオリゴマーの形成が、2 つの C y s 残基間のペプチド内ジスルフィド結合の効率的な形成を導くことが確認された（図 4 C）。質量は、およそ 2 0 8 5 D a、すなわち 1 つのジスルフィド結合を形成した (1 7 C、3 4 C) A β (1 6-3 5) ペプチドに関して期待した質量に集中した。共有結合の二量体ペプチドのサインは、質量スペクトルにおいて観察されなかった。ジチオスレイトール (D T T) により還元した後、質量は、1 つのジスルフィド結合をもたない (1 7 C、3 4 C) A β (1 6-3 5) ペプチドに関して期待したように、およそ 2 0 8 6 D a に集中し、アイソトピックデコンボリューションで観察された各質量は、ジスルフィド結合の還元から期待したように、1 つから 2 つの D a を得る（図 4 D）。

【0 5 6 6】

実施例 3 s からの (1 7 C、3 4 C) A β (1 6-4 2) オリゴマー (3 s) の質量分析により、実施例 1 s の (1 7 C、3 4 C) A β (1 6-4 2) ペプチド (1 s) を有するオリゴマーの形成が、2 つの C y s 残基間のペプチド内ジスルフィド結合の効率的な形成を導くことが確認された（図 4 E）。質量は、およそ 2 6 8 3 D a、すなわち 1 つのジ

スルフィド結合を形成した(17C、34C)Aβ(16-35)ペプチドに関して期待した質量に集中した。共有結合の二量体ペプチドのサインは、質量スペクトルにおいて観察されなかった。ジチオスレイトール(DTT)により還元した後、質量は、1つのジスルフィド結合をもたない(17C、34C)Aβ(16-42)ペプチドに関して期待したように、およそ2684Daに集中し、アイソトピックデコンボリューションで観察された各質量は、ジスルフィド結合の還元から期待したように、1つから2つのDaを得る(図4F)。

【0567】

実施例3kからの(17C、34C)Aβ(12-42)オリゴマー(3k)の質量分析により、実施例1kの(17C、34C)Aβ(12-42)ペプチド(1k)を有するオリゴマーの形成が、2つのCys残基間のペプチド内ジスルフィド結合の効率的な形成を導くことが確認された(図4G)。共有結合の二量体ペプチドのサインは、質量スペクトルにおいて観察されなかった。ジチオスレイトール(DTT)により還元した後、質量は、1つのジスルフィド結合をもたない(17C、34C)Aβ(12-42)ペプチドに関して期待したように、およそ3186Daに集中し、アイソトピックデコンボリューションで観察された各質量は、ジスルフィド結合の還元から期待したように、1つから2つのDaを得る(図4H)。

【0568】

実施例3rからの(17KC、34C)Aβ(13-42)オリゴマー(3r)の質量分析(ESI)により、実施例1rの(17KC、34C)Aβ(13-42)ペプチド(1r)を有するオリゴマーの形成が、2つのCys残基間のペプチド内ジスルフィド結合の効率的な形成を導くことが確認された(図4I)。共有結合の二量体ペプチドの相当量が、質量スペクトルにおいて観察されたが(データは示さない)、所望の分子間ジスルフィド結合は明らかである。ジチオスレイトール(DTT)により還元した後、質量は、1つのジスルフィド結合をもたない(17KC、34C)Aβ(13-42)ペプチドに関して期待したように、およそ3215Daに集中し、アイソトピックデコンボリューションで観察された各質量は、ジスルフィド結合の還元から期待したように、1つから2つのDaを得る(図4J)。

【0569】

SELDI-MSによって検出したような、サーモリシン消化の前(実施例4a-4j)および後(実施例5a-5j)の(xC、yC)N-Met Aβ(1-42)オリゴマーのペプチド質量を、図6に示す。

【0570】

実施例4w1からの、ヘテロ二官能性架橋結合試薬スルホ-SMCCによる架橋結合反応後の(17K、34C)N-Met Aβ(1-42)ペプチドで作製したオリゴマーの質量スペクトル(ESI)を、図12Aに示す。優勢の種が、所望の生成物のようである。

【0571】

実施例4w2からの、ヘテロ二官能性架橋結合試薬スルホ-MBSによる架橋結合反応後の(17K、34C)N-Met Aβ(1-42)ペプチドで作製したグロブローマーの質量スペクトル(MALDI)を、図12Bに示す。所望の架橋結合が形成された証拠があるが(4852Da)、MBSの添加に続くマレイミドの加水分解(4869Da)、2つのMBS付加物の添加に続く加水分解(5088Da)および反応しなかったペプチド(4652Da)に相当する質量も観察される。

【0572】

実施例4w3からの、ヘテロ二官能性架橋結合試薬スルホ-SIABによる架橋結合反応後の(17K、34C)N-Met Aβ(1-42)ペプチドで作製したグロブローマーの質量スペクトル(ESI)を、図12Cに示す。矢印は、所望の架橋結合が形成した後の期待される質量を示す(mw=4810Da)。

【0573】

実施例 4 x からの、ヘテロ二官能性架橋結合試薬 EDC および NHS による架橋結合反応後の (17K、34E) N-Met Aβ (1-42) ペプチドで作製したグロブロマーの質量スペクトル (MALDI) を、図 12D に示す。矢印は、2つの架橋結合 (mw = 4637Da) および 3つの架橋結合 (mw = 4620Da) が形成されたことを示唆する質量を示す。

【0574】

[実施例 10]

流体力学的解析

【0575】

サファイアウィンドウを用いて、試料を標準的な 2つのセクターのセルにロードした。全試料を、4孔または8孔のローターのいずれかを使用して試験した。

10

【0576】

条件は次のようにした：温度：20℃、ローター速度：42,000rpm、干渉データを集め、半径のステップサイズ 0.003cm を用いて連続モードで 280nm での吸光度データを集めた。1つのデータ点を、ステップごとに集めた (シグナルの平均化はない)。典型的には、200スキャン以下を、9時間以内の経過にわたって集めた。

【0577】

連続的 S 分布解析 (C(s) 解析) を、Sedfit v8.9 (P. Schuck (2000年)、「Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling」、Biophysical Journal 78:1606-1619 頁) で実行するように行い、試料の全体の不均一性を理解した。半径および時間の両方に依存しないノイズを適合させ、最大エントロピーアルゴリズムを用いて、データから除去した。

20

【0578】

沈降速度実験により、N-Met Aβ (1-42) グロブロマーおよび実施例 2 a からの (L17C、L34C) N-Met Aβ (1-42) 変異オリゴマー (2a) の両方は、均一なオリゴマーを形成することが示された (図 5A)。しかし、(L17C、L34C) N-Met Aβ (1-42) 変異オリゴマーは、よりよい流体力学的特性を表した。

30

【0579】

沈降速度実験により、N-Met Aβ (1-42) トランケートしたグロブロマーおよび実施例 5 y からのサーモリシントランケートした (L17C、L34C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー (5y) の両方が、均一なオリゴマーを形成することも示された (図 5B および C)。しかし、サーモリシントランケートした (L17C、L34C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマーは、よりよい流体力学的特性を表した。

【0580】

N-Met (17C/34C) Aβ (1-42) オリゴマー (実施例 4 y) におけるジスルフィド結合の導入により、5mM の NaPO₄、35mM の NaCl、pH 7.4 中で、wt N-Met Aβ (1-42) オリゴマーと比べて、さらに凝集が安定化する (図 5A)。さらに、ジスルフィド安定化 (17C/34C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマーは、wt N-Met Aβ (1-42) オリゴマーと比べて、サーモリシンによる残基 20 でのトランケーション後 (実施例 5 y)、より高い流体力学的均一性を顕著に維持する。これは、0.05% SDS の存在 (図 5B) および非存在 (図 5C) の両方で明らかである。実際に、wt N-Met Aβ (1-42) オリゴマーのサーモリシン処理後、0.05% SDS の非存在においてあまりに不均一で試験できない調製となる (データは示していない)。

40

【0581】

[実施例 11]

50

サーモリシントランケートした (x C、y C) N-Me t A β (1-42) オリゴマーのヨードアセトアミドアルキル化および S E L D I-M S 解析。

【0582】

A：アルキル化に用いた、サーモリシントランケートした (x C、y C) N-Me t A β (1-42) オリゴマーおよび N-Me t A β (1-42) グロブローマー：

次のサーモリシントランケートしたオリゴマーおよびグロブローマーを、ヨードアセトアミドアルキル化に供した。

- 1) 実施例 5 a のサーモリシントランケートした (14 C、37 C) N-Me t A β (1-42) オリゴマー
- 2) 実施例 5 b のサーモリシントランケートした (15 C、36 C) N-Me t A β (1-42) オリゴマー
- 3) 実施例 5 c のサーモリシントランケートした (16 C、35 C) N-Me t A β (1-42) オリゴマー
- 4) 実施例 5 d のサーモリシントランケートした (17 C、34 C) N-Me t A β (1-42) オリゴマー
- 5) 実施例 5 e のサーモリシントランケートした (18 C、33 C) N-Me t A β (1-42) オリゴマー
- 6) 実施例 5 f のサーモリシントランケートした (19 C、32 C) N-Me t A β (1-42) オリゴマー
- 7) 実施例 5 g のサーモリシントランケートした (20 C、31 C) N-Me t A β (1-42) オリゴマー
- 8) 実施例 5 h のサーモリシントランケートした (21 C、30 C) N-Me t A β (1-42) オリゴマー
- 9) 実施例 5 i のサーモリシントランケートした (22 C、29 C) N-Me t A β (1-42) オリゴマー
- 10) 実施例 5 j の A β (1-42) サーモリシントランケートしたグロブローマー

【0583】

B：ヨードアセトアミドアルキル化

B1：対照試料

- ーサーモリシントランケートしたオリゴマーまたはグロブローマー 2.5 μ l を、(5分ヘリウム通気した) 5 μ l の 50 mM の T r i s / H C l、1 mM の E D T A、pH 8.6 を用いて希釈した。
- ー37℃で20分温置
- ーH₂O 2 μ l を添加した。
- ー室温で1時間温置
- ー115 μ l の 50% C H₃ C N、0.5% T F A を添加した。

【0584】

B2：試料のヨードアセトアミドアルキル化

- ーサーモリシントランケートしたオリゴマーまたはグロブローマー 2.5 μ l を、(ヘリウム通気した) 5 μ l の 50 mM の T r i s / H C l、1 mM の E D T A、pH 8.6 を用いて希釈した。
- ー37℃で20分温置
- ーH₂O 中の 2 μ l の 100 mM のヨードアセトアミド (S i g m a ; C a t . n o . 11149) 溶液を添加した。
- ー室温で1時間温置
- ー115 μ l の 50% C H₃ C N、0.5% T F A を添加した。

【0585】

B3：D T T 還元続く試料のヨードアセトアミドアルキル化

- ーサーモリシントランケートしたオリゴマーまたはグロブローマー 2.5 μ l を、(ヘリウム通気した) 5 μ l の 50 mM の T r i s / H C l、1 mM の E D T A、2 mM の D T T

、pH 8.6を用いて希釈した。

－37℃で20分温置

－H₂O中の2μlの100mMのヨードアセトアミド（Sigma；Cat. no. 11149）溶液を添加した。

－室温で1時間温置

－115μlの50%CH₃CN、0.5%TFAを添加した。

【0586】

C：免疫沈降したAβ（20-42）ペプチドの表面増強レーザー脱離イオン化質量分析（SELDI-MS）定量化

－試料2μlを、H4タンパク質チップアレイ（BioRad；Cat. no. C573-0028）上にスポットした。

－スポットを、温かい恒温槽プレート上で乾かすようにした。

－CHCA溶液：

CHCA 5mgを、アセトニトリル150μL+1%TFA 150μL中で溶解し、保存液にし、-20℃で保存した。

保存液の内10μLを、アセトニトリル20μLおよび1%TFA 20μLで希釈し、作用CHCA溶液にした。

作用CHCA溶液2μLを、スポット上につけた。

－スポットを、温かい恒温槽プレート上で乾かすようにし、SELDI-MS（表面増強レーザー脱離イオン化質量分析；BioRad、Protein chip SELDIシステムエンタープライズ版）によって解析した。

条件：質量の範囲：800から10000Da；フォーカス質量：2220Da；マトリックス減衰：500Da；サンプリングレート：400MHz；加温ショット：エネルギー1100nJで2；データショット：エネルギー1000nジュールで10；3から1の分割

解析：それぞれの二重アルキル化（2xCM）、アルキル化（1xCM）または非アルキル化（0xCM）ペプチドの質量ピークのピーク強度を検出した。

【0587】

結果を図7に示す。

【0588】

還元剤としてのDTTの非存在において、システインと別のシステインで、-SH基が共有結合のS-S架橋を形成すれば、ヨードアセトアミドは、システインの-SH基をアルキル化することができない。したがって、SELDI-MSによって解析した、サーモリシン処理後の（xC、yC）N-Met-Aβ（1-42）オリゴマーの（図7の0xCMによって示されるような）ヨードアセトアミドアルキル化反応の非存在により、S-S形成が（xC、yC）N-Met-Aβ（1-42）オリゴマーにおいて起きたことが示される。ヨードアセトアミドアルキル化反応が、原理的に起き得ることを、DTTを用いて還元条件下で検証し、S-Sが破壊され、遊離-SH基が発生し、これによりヨードアセトアミドアルキル化が受け入れられることがわかった（図7）。

【0589】

[実施例12]

サーモリシントランケーションの前および後の（xC、yC）N-Met Aβ（1-42）オリゴマーおよびAβ（1-42）グロブロマーのドットプロット解析

【0590】

方法：

ドットプロットのためのAβ標準

1. 実施例4aの（14C、37C）N-Met Aβ（1-42）オリゴマー

2. 実施例5aのサーモリシントランケートした（14C、37C）N-Met Aβ（1-42）オリゴマー

3. 実施例4bの（15C、36C）N-Met Aβ（1-42）オリゴマー

4. 実施例 5 b のサーモリシントランケートした (15 C、36 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー
5. 実施例 4 c の (16 C、35 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー
6. 実施例 5 c のサーモリシントランケートした (16 C、35 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー
7. 実施例 4 d の (17 C、34 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー
8. 実施例 5 d のサーモリシントランケートした (17 C、34 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー
9. 実施例 4 e の (18 C、33 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー
10. 実施例 5 e のサーモリシントランケートした (18 C、33 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー 10
11. 実施例 4 f の (19 C、32 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー
12. 実施例 5 f のサーモリシントランケートした (19 C、32 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー
13. 実施例 4 g の (20 C、31 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー
14. 実施例 5 g のサーモリシントランケートした (20 C、31 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー
15. 実施例 4 h の (21 C、30 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー
16. 実施例 5 h のサーモリシントランケートした (21 C、30 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー 20
17. 実施例 4 i の (22 C、29 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー
18. 実施例 5 i のサーモリシントランケートした (22 C、29 C) N-Met Aβ (1-42) オリゴマー
19. 実施例 4 j の Aβ (1-42) グロブロマー
20. 実施例 5 j の Aβ (1-42) サーモリシントランケートした グロブロマー

【0591】

ドットプロットのための材料：

Aβ 標準：

20 mM の NaH_2SO_4 、140 mM の NaCl 、pH 7.4 + 0.2 mg/ml の BSA 中でのカラム 1-20 での Aβ 抗原の連続的希釈 30

- 1) 10 μmol/μl
- 2) 1 μmol/μl
- 3) 0.1 μmol/μl
- 4) 0.01 μmol/μl
- 5) 0.001 μmol/μl

【0592】

ニトロセルロース：

Trans-Blot Transfer 溶媒、純粋なニトロセルロースメンブレン (0.45 μm)；BioRad

【0593】

抗マウス AP：

AP 326 A (Chemicon)

【0594】

抗ウサギ AP：

AP 304 A (Chemicon)

【0595】

検出試薬：

NBT/BCIP Tablet (Roche)

【0596】

ウシ血清アルブミン (BSA)：

11926 Serva

【0597】

ブロッキング試薬：

TBS中の5%低脂肪乳

【0598】

緩衝溶液：

TBS

25mMのTris/HCl－緩衝液pH7.5

+150mMのNaCl

TTBS

25mMのTris/HCl－緩衝液pH7.5

+150mMのNaCl

+0.05%Tween20

PBS+0.2mg/mlのBSA

20mMのNaH₂PO₄緩衝液pH7.4

+140mMのNaCl

+0.2mg/mlのBSA

【0599】

抗体溶液I：

ウサギ血清試料またはマウスモノクローナル抗体のいずれかを、抗体溶液Iとして使用し、次のように調製した：

－ウサギ血清試料（TBS中の1%低脂肪乳20ml中で1：200に希釈した。）

－マウスモノクローナル抗体（TBS中の1%低脂肪乳20ml中で0.2μg/mlに希釈した。）

【0600】

抗体溶液II：

抗体溶液Iがウサギ血清試料であった場合、抗体溶液IIは、抗ウサギAPであった。抗体溶液Iがマウスモノクローナル抗体であった場合、抗体溶液IIは、抗マウスAPであった。

抗体溶液IIを次のように調製した：

－抗マウスAP：TBS中の1%低脂肪乳中で1：5000に希釈

－抗ウサギAP：TBS中の1%低脂肪乳中で1：5000に希釈

【0601】

ドットプロットの手順：

1) 異なる各Aβ基準1μl（それらの5回連続希釈中で）を、互いにおよそ1cm離れているニトロセルロースメンブレン上にドットした。

2) Aβ基準のドットを、室温（RT）で少なくとも10分間、空気でニトロセルロースメンブレン上で乾かすようにした（＝ドットプロット）。

3) ブロッキング：

ドットプロットを、RTで1.5時間、TBS中で5%低脂肪乳30mlを用いて温置した。

4) 洗浄：

ブロッキング溶液を捨て、ドットプロットを、RTで10分間、TTBS20mlを用いて振盪下で温置した。

5) 抗体溶液I：

洗浄緩衝液を捨て、ドットプロットを、RTで2時間、抗体溶液Iを用いて温置した。

6) 洗浄：

抗体溶液Iを捨て、ドットプロットを、RTで10分間、TTBS20mlを用いて振盪下で温置した。洗浄溶液を捨て、ドットプロットを、RTで10分間TTBS20mlを用いて振盪下で温置した。洗浄溶液を捨て、ドットプロットを、RTで10分間、TBS

10

20

30

40

50

20 ml を用いて振盪下で温置した。

7) 抗体溶液 I I :

洗浄緩衝液を捨て、ドットブロットを、RT で 1 時間、抗体溶液 I I を用いて温置した。

8) 洗浄 :

抗体溶液 I I を捨て、ドットブロットを、RT で 10 分間、TTBS 20 ml を用いて振盪下で温置した。洗浄溶液を捨て、ドットブロットを、RT で 10 分間、TTBS 20 ml を用いて振盪下で温置した。洗浄溶液を捨て、ドットブロットを、RT で 10 分間、TTBS 20 ml を用いて振盪下で温置した。

9) 発現 :

洗浄溶液を捨てた。1 タブレットの NBT / BCIP を、 H_2O 20 ml 中で溶解し、ドットブロットを、この溶液を用いて 4 分間温置した。 H_2O を用いる強力な洗浄によって、発現を停止させた。

10

【0602】

結果を図 8 に示す。

【0603】

サーモリシントランケートした (x C、y C) N-Met-A β (1-42) オリゴマーは、A β (1-42) サーモリシントランケートしたグロブロマーと、A β グロブロマー特異的抗体 7C6 およびポリクローナルウサギ血清 5599 による同程度の認識を示す。例外は、サーモリシントランケートした (15 C、36 C) N-Met-A β (1-42) オリゴマーであり、これはポリクローナルウサギ血清 5599 によってのみ認識される。これは、サーモリシントランケートした (15 C、36 C) N-Met-A β (1-42) オリゴマーにおいて位置 36 でのシステイン変異のためであり得、これにより 7C6 の A β グロブロマーエピトープ認識が妨げられる可能性がある。その上、抗体 7C6 およびポリクローナルウサギ血清 5599 は、A β (1-42) グロブロマーと同程度の、サーモリシン処理なしの (x C、y C) N-Met-A β (1-42) オリゴマーを検出しない。留意すべきは、ポリクローナルウサギ血清 5599 は、一般に、ドットした全ペプチドに関して高いバックグラウンド反応を示し、これは A β グロブロマーエピトープの特異的な認識に起因し得ないということである (図 8)。

20

【0604】

[実施例 13]

30

SELDI-MS 解析による (17 C、34 C) A β (16-35) オリゴマーのヨードアセトアミドアルキル化

【0605】

A : アルキル化に使用した (17 C、34 C) A β (16-35) オリゴマー :

実施例 4 p の (17 C、34 C) A β (16-35) オリゴマー (4 p) を使用した。

【0606】

B : ヨードアセトアミドアルキル化

B1 : ヨードアセトアミドアルキル化なしの対照試料

— オリゴマー 2.5 μ l を、(5 分ヘリウム通気した) 50 μ l の 100 mM の Tris / HCl、1 mM の EDTA、pH 8.6 を用いて希釈した。

40

— 37 °C で 20 分温置

— H_2O 20 μ l を添加した。

— 室温で 6 時間温置

— 試料 1 μ l を、49 μ l の 50 % CH_3CN 、0.5 % TFA 中で希釈した。

B2 : 試料のヨードアセトアミドアルキル化

— オリゴマー 2.5 μ l を、(5 分ヘリウム通気した) 50 μ l の 100 mM の Tris / HCl、1 mM の EDTA、pH 8.6 を用いて希釈した。

— 37 °C で 20 分温置

— H_2O 中の 20 μ l の 100 mM のヨードアセトアミド (Sigma ; Cat. no. 11149) 溶液を添加した。

50

－室温で6時間温置

－試料1 μ lを、49 μ lの50%CH₃CN、0.5%TFA中で希釈した。

B3：DTT還元続く試料のヨードアセトアミドアルキル化

－オリゴマー2.5 μ lを、(ヘリウム通気した)50 μ lの100mMのTris/HCl、1mMのEDTA、2mMのDTT、pH8.6を用いて希釈した。

－37℃で20分温置

－H₂O中の20 μ lの100mMのヨードアセトアミド(Sigma; Cat. no. 11149)溶液を添加した。

－室温で6時間温置

－試料1 μ lを、49 μ lの50%CH₃CN、0.5%TFA中で希釈した。

10

【0607】

C：オリゴマーの表面増強レーザー脱離イオン化質量分析(SELDI-MS)定量化

－試料B1およびB2およびB3の試料2 μ Lを、H4タンパク質チップアレイ(BioRad; Cat. no. C573-0028)上に個々にスポットした。

－スポットを、温かい恒温槽プレート上で乾かすようにした。

－CHCA溶液：

CHCA 5mgを、アセトニトリル150 μ L + 1%TFA 150 μ L中で溶解し、保存液にし、-20℃で保存した。

保存液の内10 μ Lを、アセトニトリル20 μ Lおよび1%TFA 20 μ Lで希釈し、作用CHCA溶液にした。

20

作用CHCA溶液2 μ Lを、スポット上につけた。

－スポットを、温かい恒温槽プレート上で乾かすようにし、SELDI-MS(表面増強レーザー脱離イオン化質量分析; BioRad、Protein chip SELDIシステムエンタープライズ版)によって解析した。

条件：質量の範囲：800から10000Da；フォーカス質量：2220Da；マトリックス減衰：500Da；サンプリングレート：400MHz；加温ショット：エネルギー1100nJで2；データショット：エネルギー1000nジュールで10；2から1の分割

解析：それぞれの二重アルキル化(2xCM)、アルキル化(1xCM)または非アルキル化(0xCM)オリゴマーの質量ピークのピーク強度を検出した。

30

【0608】

結果を図9に示す。

【0609】

還元剤としてのDTTの非存在において、システインと別のシステインで、-SH基が共有結合のS-S架橋を形成すれば、ヨードアセトアミドは、システインの-SH基をアルキル化することができない。したがって、SELDIによって解析したように、(17C、34C)A β (16-35)オリゴマーのヨードアセトアミドアルキル化反応の非存在により、S-S形成が(17C、34C)A β (16-35)オリゴマーにおいて起きたことが示される。ヨードアセトアミドアルキル化反応が、原理的に起き得ることを、DTTを用いて還元条件下で検証し、S-Sが破壊され、遊離-SH基が発生し、これによりヨードアセトアミドアルキル化が受け入れられることがわかった(図9)。

40

【0610】

[実施例14]

SELDI-MS検出による免疫沈降を用いたA β グロブリン特異的抗体による(17C、34C)A β (16-35)オリゴマーの認識

【0611】

A：モノクローナルマウス抗体によるダイナビーズの活性化

－ダイナビーズの保存懸濁液(ダイナビーズM-280ヒツジ抗マウスIgG、Invitrogen; Cat. no. : 112.02)を、起泡を防ぐように注意深く振盪した。

50

- －1 mLを無菌的に除去し、1.5 mLの反応小瓶に移した。
- －ダイナビーズを、1 mLの免疫沈降（IP）洗浄緩衝液（IP洗浄緩衝液：PBS（20 mMの NaH_2PO_4 、140 mMの NaCl 、pH 7.4）、0.1% BSA）を用いて、5分で3回洗浄した。洗浄手順の間、上澄みを注意深く除去する一方、ダイナビーズを、磁気分離スタンド（MSS）により反応小瓶の端に固定した。
- －洗浄したダイナビーズを、PBS 1 mL、0.1% BSA中で $\text{A}\beta$ 抗体40 μg とともに温置した。
- －4℃で振盪下において一晩、温置することによって、活性化を行った。
- －活性化したダイナビーズを、IP洗浄緩衝液（PBS（20 mMの NaH_2PO_4 、140 mMの NaCl 、pH 7.4）、0.1% BSA）1 mLを用いて、（再びMSSを用いて）30分で4回洗浄した。
- －活性化したダイナビーズを、ボルテックスしたPBS 1 mL、0.1% BSA、0.02% Na-Azide で再懸濁し、簡単に遠心分離した。
- －抗体活性化したダイナビーズを、さらに使用するまで、4℃で保存した。

【0612】

B：免疫沈降に使用した試料の調製：

1：ヨードアセトアミドアルキル化なしの（17C、34C） $\text{A}\beta$ （16－35）オリゴマー

- －実施例4pの（17C、34C） $\text{A}\beta$ （16－35）オリゴマー（4p）2.5 μl を、（5分ヘリウム通気した）50 μl の100 mMの Tris/HCl 、1 mMのEDTA、pH 8.6で希釈した。

－37℃で20分温置

－ H_2O 20 μl を添加した。

－室温で6時間温置

－Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Units Plus Float、3500 MWCO（Thermo Scientific、#69558）中で5 mMの NaH_2PO_4 、35 mMの NaCl 、pH 7.4に対して一晩の透析

2：DTTおよびヨードアセトアミドアルキル化による（17C、34C） $\text{A}\beta$ （16－35）オリゴマー

- －実施例4pの（17C、34C） $\text{A}\beta$ （16－35）オリゴマー（4p）2.5 μl を、（ヘリウム通気した）50 μl の100 mMの Tris/HCl 、1 mMのEDTA、2 mMのDTT、pH 8.6で希釈した。

－37℃で20分温置

－ H_2O 中の20 μl の100 mMのヨードアセトアミド（Sigma；Cat. no.：11149）溶液を添加した。

－室温で6時間温置

－Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Units Plus Float、3500 MWCO（Thermo Scientific、#69558）中で5 mMの NaH_2PO_4 、35 mMの NaCl 、pH 7.4に対して一晩の透析

【0613】

C：免疫沈降（IP）

- －（17C、34C） $\text{A}\beta$ （16－35）オリゴマー試料B1およびB2を、20 mMの NaH_2PO_4 、140 mMの NaCl ；0.05% Tween 20、pH 7.4 + 0.1% BSAを用いて、最終濃度1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで希釈した。

一次のリストの各抗体活性化ダイナビーズ25 μL を、希釈した試料0.1 mLとともに温置した：

10F11－ダイナビーズ

7C6－ダイナビーズ

IgG2a－ダイナビーズ（IPバックグラウンドに対するアイソタイプ対照として使用した。）

10

20

30

40

50

I g G 2 b - ダイナビーズ (I P バックグラウンドに対するアイソタイプ対照として使用した。)

ー 6 ° C で振盪下における 1 8 時間の温置によって、免疫沈降を行った。

ー ダイナビーズを M S S に固定した。

ー 上澄みを注意深く除去し、捨てた。

ー ダイナビーズを次のように洗浄した：

5 0 0 μ L の 2 0 m M の N a H ₂ P O ₄ 、 1 4 0 m M の N a C l 、 p H 7 . 4 + 0 . 1 % B S A を用いて 5 分 で 2 回 ；

5 0 0 μ L の 2 m M の N a H ₂ P O ₄ 、 1 4 m M の N a C l 、 p H 7 . 4 を用いて 3 分 で 1 回 ；

重要：洗浄緩衝液の最後の除去の後、反応小瓶を遠心分離し、M S S 中に戻し、残っている液体の液滴を注意深く除去した；

H ₂ O 中の 1 0 μ L の 5 0 % C H ₃ C N 、 0 . 5 % T F A を、反応小瓶に添加し、ボルテックスした；

反応小瓶を、振盪下において R T で 1 0 分温置した；

ダイナビーズを M S S に固定した；

免疫沈降し、溶出した A β 種を含む上澄みを、注意深く取り除いた (= I P - 溶出物) 。

【 0 6 1 4 】

D : 免疫沈降した (1 7 C 、 3 4 C) A β (1 6 - 3 5) オリゴマーの表面増強レーザー脱離イオン化質量分析 (S E L D I - M S) 定量化

ー I P - 溶出物 2 μ L を、H 4 P r o t e i n C h i p A r r a y (B i o R a d ; C a t . n o . C 5 7 3 - 0 0 2 8) 上にスポットした。

ー スポットを温かい恒温槽プレート上で乾かすようにした。

ー C H C A 溶液：

C H C A 5 m g を、アセトニトリル 1 5 0 μ L + 1 % T F A 1 5 0 μ L 中で溶解し、保存液にし、- 2 0 ° C で保存した。

保存液の内 1 0 μ L を、アセトニトリル 2 0 μ L および 1 % T F A 2 0 μ L で希釈し、作用 C H C A 溶液にした。

作用 C H C A 溶液 2 μ L を、スポット上につけた。

ー スポットを、温かい恒温槽プレート上で乾かすようにし、S E L D I - M S (表面増強レーザー脱離イオン化質量分析 ; B i o R a d 、 P r o t e i n c h i p S E L D I システムエンタープライズ版) によって解析した。

条件：質量の範囲：8 0 0 から 1 0 0 0 0 D a ; フォーカス質量：2 2 2 0 D a ; マトリックス減衰：5 0 0 D a ; サンプリングレート：4 0 0 M H z ; 加温ショット：エネルギー 1 3 5 0 n j で 2 ; データショット：エネルギー 1 3 0 0 n ジュールで 1 0 ; 2 から 1 の分割

解析：それぞれの A β (1 6 - 3 5) ペプチドの質量ピークのピーク強度を定量化した。

【 0 6 1 5 】

結果を図 1 0 A および 1 0 B に示す。

【 0 6 1 6 】

(1 7 C 、 3 4 C) A β (1 6 - 3 5) オリゴマーは、A β グロブロマーエピトープ特異的抗体 7 C 6 および 1 0 F 1 1 によって認識される。免疫沈降の間の非特異的バックグラウンドレベルを、S E L D I - M S 解析において顕著に低いシグナル強度を示す、アイソタイプの対照抗体 I g G 2 a および I g G 2 b によって制御した (図 1 0 A) 。システム S - S 共有結合が、D T T によって遊離 - S H に還元され、続くヨードアセトアミド反応が遊離 - S H で行われれば、続く I P により、1 つまたは 2 つのアルキル化 - S H 基 (1 x または 2 x C M) を有する (1 7 C 、 3 4 C) A β (1 6 - 3 5) ペプチドが、7 C 6 または 1 0 F 1 1 によってもはや認識されないとき、(1 7 C 、 3 4 C) A β (1 6

10

20

30

40

50

ー 35) オリゴマーの立体構造は破壊されたことが明らかになった。不十分な D T T 還元、および／または無傷のシステイン S-S 共有結合 (O x C M) を有する非アルキル化 (17 C、34 C) A β (16-35) オリゴマーを維持するヨードアセトアミド反応による時のみ、免疫沈降した。結論として、(17 C、34 C) A β (16-35) オリゴマーは、A β グロブローマーエピトープを含むが、直鎖化された (17 C、34 C) A β (16-35) ペプチドは含まなかった。

【0617】

参考実施例

組換え N-M e t A β (1-42) ペプチド

クローニングおよび発現：アミロイドベータペプチドをコードする配列を、p E T 29 ベクターを用いて大腸菌 (E. c o l i) においてクローン化し、発現した。発現したペプチドは、その N 末端メチオニン残基を完全に保持し、(アミロイド前駆体タンパク質、A P P 内由来の) 位置 0 から位置 42 のアミロイド β の天然配列を示す。ペプチドを、大腸菌 B L 21 (D E 3) 細胞を用いて発現した。培養液 O D_{600nm} が 0.45 に到達するまで、細胞を 30℃ で増殖させ、次いで A β の発現を、1 mM の I P T G の添加によって誘導し、フラスコを 41℃ のオービタルシェーカーに移した。誘導して 3 時間後、細胞を収集した。不溶性画分では、C o m a s s i e s t a i n e d S D S タンパク質ゲル上で可視化したとき、期待した大きさの産物が得られた。

【0618】

組換えで発現した A β の精製。単離した全試料に関する出発物質は、大腸菌細胞培養液の収集から得た、-80℃ で凍結した細胞ペーストであった。凍結細胞ペーストを、4℃ で 5-10 倍の量の溶解緩衝液 (100 mM トリス最終 p H 7.5) に添加した。B e n z o n a s e (E M D B i o s c i e n c e s、M a d i s o n、W I) を、濃度 0.1 μ l / m l の細胞ライセートに添加し、ペレットが一様に再懸濁するまで攪拌した (45-60 分)。細胞溶解を、M-110 L マイクロフルイダイザー (M i c r o f l u i d i c s、N e w t o n、P A) を用いて行った。15℃ で溶解した物質を、4℃ で 30 分間、J L A 16.25 ローター (B e c k m a n I n s t r u m e n t s、P a l o A l t o、C A) 中で 23000 $\times$ G でスピンした。p H 7.5 から 7.8 の冷たい 50 mM のトリス緩衝液を添加することによって、物質を 3 回洗浄し、次いで再懸濁したペレットをホモジナイズし、J L A 16.25 ローター中で 23000 $\times$ G でスピンした。これを続いて水洗浄してトリス緩衝液を除去した。ペレットを、0.1% トリフルオロ酢酸を含む水に再懸濁させた。再懸濁した試料をシェルフローズンし、凍結乾燥器上に置いた。

【0619】

凍結乾燥した物質 10-20 g を、37℃ の D M S O に添加し、組織ホモジナイザーを用いてホモジナイズし、1 時間攪拌し、次いで一晩そのままにした。次いで、試料を J L A 16.25 ローター中において 23000 $\times$ G で、2 つの 250 mL のナルゲンボトル中で、25℃ で 30 分間、スピンした。D M S O の上澄みをデカントし、別の D M S O 50 mL を各ボトルに添加し、ホモジナイズし、スピンし、次いでこの D M S O をデカントし、また保存した。ペレットを捨てた。

【0620】

D M S O 抽出物を、約 1.5 L を保持するのに十分な、6000-8000 カットオフ透析膜 (S p e c t r u m L a b o r a t o r i e s、R a n c h o D o m i n g u e z、C A) 中に注意深く注いだ。それを、10 mL の濃縮したアンモニア (0.1% v / v) を添加した 15% アセトニトリル 10 L に対して透析した。これにより、ベンチ上で 4 時間、透析することができた。定期的に、濃い D M S O を再分配し、透析工程を加速させるように、透析膜を取り外した。4 時間の終わりに、膜を、新鮮に変えた緩衝液 10 L 中に置き、もう 2 時間、工程を続けた。透析の終わりに、試料を除去し、25℃ で 30 分間、23000 $\times$ G で遠心分離した。試料を、2 L のシリンダーに移し、0.1% アンモニア水を用いて、総体積 2000 m l の量まで 2 倍希釈した。

【0621】

2. 2 X 25 cm (95 mL) ステンレスカラムを、15-20 ミクロン、300 A、Polymer Labs (Amherst, MA) からの PLPRS 逆相樹脂を用いてハンドパックした。それに、75%アセトニトリル+0.1%アンモニア、(75%B)からの1サイクルを通して、10%Bに平衡化した。カラムを、Pharmacia P500 pump (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) に接続し、ペプチド溶液1400 mLを、室温で約16.7時間以上、ベンチ上で一晩、カラムを通して汲み出した。翌朝、カラムを、約250 mLの10%Bで、P500ポンプにより洗浄し、次いでBeckman HPLC (Palo Alto, CA) に接続した。280 nmでの吸光度が基準線に来るまで洗浄を10%Bを用いて続け、次いで、勾配は200分以上、10%Bから30%Bまで起した(0.1%勾配)。フルスケールの吸光度を、1吸光度単位および流率5 mL/分で維持した。物質を、約10 mLの約50個の画分中にハンド採取した。各画分100 μ Lを、Speed Vac上に置いて乾かし、1 X 試料緩衝液100 μ Lをチューブに添加した。物質を、Amicon (Millipore Inc, Billerica, CA) 上の3500カットオフ膜上で濃縮し、細胞を攪拌し、約350から50 mLに濃縮し、次いでそれを凍結乾燥して一晩乾かした。

10

【0622】

産生された精製A β ペプチドは、4645から4648 Daの観察質量を示した。これは、採用したDNA発現配列から期待したような、N末端メチオニンの存在と一致した。

20

【0623】

参考実施例

【0624】

参考実施例1

A β (1-42) グロブロマー

A β (1-42) 合成ペプチド (H-1368, Bachem, Bubendorf, Switzerland) を、100%1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) 中で6 mg/mLで懸濁し、37°Cで1.5時間、振盪下において完全な可溶化のために温置した。HFIPは、水素結合ブレーカーとして働き、前から存在するA β ペプチドの構造上の不均一性を排除するために使用する。HFIPを、Speed Vac中の蒸発によって除去し、A β (1-42) を、ジメチルスルホキシド中において濃度5 mMで再懸濁し、20秒間、超音波処理した。HFIPで前処理したA β (1-42) を、リン酸緩衝食塩水 (PBS) (20 mMのNaH₂PO₄、140 mMのNaCl、pH 7.4) 中で400 μ Mに希釈し、1/10体積の2%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) (H₂O中) を添加した (最終濃度0.2% SDS)。37°Cで6時間温置により、16/20-kDaのA β (1-42) グロブロマー中間体が生じた。3倍のH₂Oを用いたさらなる希釈および37°Cで18時間の温置によって、38/48-kDa A β (1-42) グロブロマーを生成した。3000 gで20分間遠心分離した後、試料を、限外濾過によって濃縮し (30-kDaカットオフ)、5 mMのNaH₂PO₄、35 mMのNaCl、pH 7.4に対して透析し、10000 gで10分間遠心分離し、38/48-kDaのA β (1-42) グロブロマーを含む上澄みを取り除いた。

30

40

【0625】

参考実施例2

N-Met A β (1-42) グロブロマー

2つの1.6 mLのEppitube (2 x 500 μ L部分) (Eppendorf Northamerica, Westbury, NY) 中の、6 mgのヒトアミロイド β (1-42) ペプチド (Bachem Biosciences, King of Prussia, PA) または組換えN-Met A β (1-42) ペプチド+2 X 500 μ LのHFIP (ヘキサフルオロイソプロパノール) (6 mg/mL懸濁液) を、37°Cで1.5時間振盪し、Speed Vac中で1.5時間乾かし、次いで各DMSO 132 μ

50

Lの2アリコートにおいて再懸濁し、20秒間、水浴中で両方とも超音波処理し、プレートアジテーター上で10分間穏やかに振盪し、 -20°C で保管した。 $690\mu\text{L}$ の 20mM の NaPO_4 ； 140mM の NaCl ； $\text{pH}7.4$ 緩衝液を、 15mL のFalconチューブ中に満たし、DMSO中の 5mM のアミロイド $60\mu\text{L}$ の保存懸濁液（アミロイド $400\mu\text{M}$ ）、次いで水中の 2% SDS $75\mu\text{l}$ （ 0.2% SDS）を添加した。混合物を、 37°C で6–8時間温置し、水 $2475\mu\text{L}$ （水で4倍希釈）を、最終体積 3.3mL まで添加した。混合物を、 37°C で18–20時間温置し、 $3000\times G$ で10分遠心分離し、最後に上澄みを、 30kDa のCentriprep（Millipore Inc、Billerica、CA）によって、 1mL に濃縮した。試料を、 $12-15\text{kDa}$ のカットオフ透析チューブにおいて、 4°C で、PBS/4（PBS＝リン酸緩衝食塩水、 1mM の KCl 、 154mM の NaCl 、 4mM のリン酸、 $\text{pH}7.4$ ；PBS/4＝蒸留水により1から4に希釈したPBS、最終 $\text{pH}7.4$ ）中で、一晚透析した。濃縮物を、Eppendorfチューブ（クリアペレット）中で $10,000\times G$ で10分間、遠心分離し、 $250\mu\text{L}$ で分注し、 -20°C で凍結した。

10

【0626】

参考実施例3

 $\text{A}\beta$ （20–42）グロブロマー

参考実施例3の $\text{A}\beta$ （1–42）グロブロマーの調製物 1.59mL を、水中で、 38mL の緩衝液（ 50mM のMES/NaOH、 $\text{pH}7.4$ ）および $200\mu\text{l}$ の $1\text{mg}/\text{mL}$ のサーモリシン溶液（Roche）と混合した。反応混合物を、RTで20時間攪拌した。次いで水中で、 100mM のEDTA溶液 $80\mu\text{l}$ 、 $\text{pH}7.4$ を添加し、混合物を、さらに、 1% 強度SDS溶液 $400\mu\text{l}$ で、SDS含有量 0.01% に調整した。反応混合物を、 15mL の 30kDa のCentriprepチューブにより、およそ 1mL に濃縮した。濃縮物を、緩衝液（ 50mM のMES/NaOH、 0.02% SDS、 $\text{pH}7.4$ ） 9mL と混合し、再び 1mL に濃縮した。濃縮物を、透析チューブ中で16時間、 1l の緩衝液（ 5mM のリン酸ナトリウム、 35mM の NaCl ）に対して 6°C で透析した。透析物を、水中で、 2% 強度SDS溶液によりSDS含有量 0.1% に調整した。試料を、 10000g で10分間遠心分離し、 $\text{A}\beta$ （20–42）グロブロマーの上澄みを取り除いた。

20

【0627】

参考実施例4

 $\text{A}\beta$ （12–42）グロブロマー

参考実施例3の $\text{A}\beta$ （1–42）グロブロマーの調製物 2mL を、水中で、 38mL の緩衝液（ 5mM のリン酸ナトリウム、 35mM の塩化ナトリウム、 $\text{pH}7.4$ ）および $150\mu\text{l}$ の $1\text{mg}/\text{mL}$ のGlucエンドプロテアーゼ（Roche）と混合した。反応混合物を、RTで6時間攪拌し、さらに水中の $150\mu\text{l}$ の $1\text{mg}/\text{mL}$ のGlucエンドプロテアーゼ（Roche）を続けて添加した。反応混合物を、RTでもう16時間攪拌し、続いて 5M のDIFP溶液 $8\mu\text{l}$ を添加した。反応混合物を、 15mL の 30kDa のCentriprepチューブにより、およそ 1mL に濃縮した。濃縮物を、 9mL の緩衝液（ 5mM のリン酸ナトリウム、 35mM の塩化ナトリウム、 $\text{pH}7.4$ ）と混合し、再び 1mL に濃縮した。濃縮物を、透析チューブ中で16時間、 1l の緩衝液（ 5mM のリン酸ナトリウム、 35mM の NaCl ）に対して 6°C で透析した。透析物を、水中で、 1% 強度SDS溶液により、SDS含有量 0.1% に調整した。試料を、 10000g で10分間、遠心分離し、 $\text{A}\beta$ （12–42）グロブロマーの上澄みを取り除いた。

40

【0628】

参考実施例5

 $\text{A}\beta$ （1–40）モノマー（ 0.1% NaOH）

1mg の $\text{A}\beta$ （1–40）（Bachem Inc.、cat. no. H-1194）を、（新鮮に調製した） H_2O 中で、 0.1% NaOH $232.6\mu\text{l}$ 中で溶解し（ $=4.3\text{mg}/\text{mL}=1\text{nmol}/1\mu\text{l}$ ）、すぐに室温で30秒間振盪し、クリアな溶液を

50

得た。試料を、さらに使うために -20°C で保存した。

【0629】

参考実施例6

A β (1-42) モノマー (0.1% NaOH)

1 mg の A β (1-42) (Sachem Inc.、cat. no. H-1368) を、(新鮮に調製した) H_2O 中で、0.1% NaOH 222.2 μl 中で溶解し ($= 4.5 \text{ mg/ml} = 1 \text{ nmol/l} / 1 \mu\text{l}$)、すぐに室温で30秒間振盪し、クリアな溶液を得た。試料を、さらに使うために -20°C で保存した。

【0630】

参考実施例7

A β 原線維

1 mg の A β (1-42) (Sachem Inc. カタログNr. : H-1368) を、500 μl アリコート0.1% NH_4OH (Eppendorf チューブ) 中で溶解し、試料を室温で1分間攪拌した。試料を10000 $\times g$ で5分間遠心分離し、上澄みを取り除いた。新鮮に調整したこのA β (1-42) 溶液100 μl を、300 μl の20 mM の NaH_2PO_4 ; 140 mM の NaCl 、pH 7.4 を用いて中和した。pH を、1% HCl により pH 7.4 に調整した。試料を、 37°C で24時間温置し、遠心分離した (10000 $\times g$ で10分)。上澄みを捨て、原線維ペレットを、400 μl の20 mM の NaH_2PO_4 、140 mM の NaCl 、pH 7.4 で2回洗浄し、次いで最後に、1分間のボルテックスによって、400 μl の20 mM の NaH_2PO_4 ; 140 mM の NaCl 、pH 7.4 により再懸濁した。

【0631】

参考実施例8

sAPP α

Sigma から供給された (cat. no. S9564 ; 20 mM の NaH_2PO_4 ; 140 mM の NaCl ; pH 7.4 中で25 μg)。sAPP α を、20 mM の NaH_2PO_4 、140 mM の NaCl 、pH 7.4、0.2 mg/ml の BSA を用いて0.1 mg/ml ($= 1 \mu\text{mol} / \mu\text{l}$) に希釈した。

【0632】

参考実施例9

ポリクローナル抗血清 5599

ポリクローナル抗血清 5599 を、WO 2004/067561、実施例 25a、血清 a1 5600 に記載のポリクローナル抗血清 5600 のようにして入手し、例外として、5600 LPH コンジュゲートした A β (20-42) グロブロマーの代わりに A β (20-42) グロブロマーを使用した。

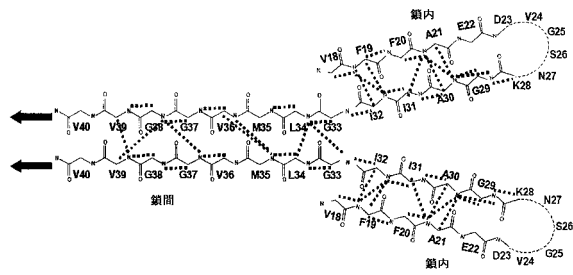
10

20

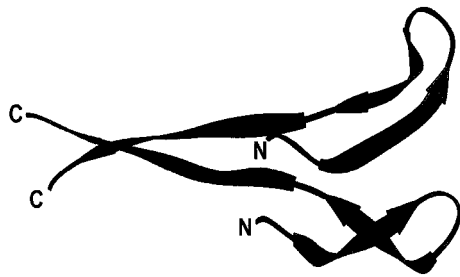
30

【図 1 - 1】

FIG. 1



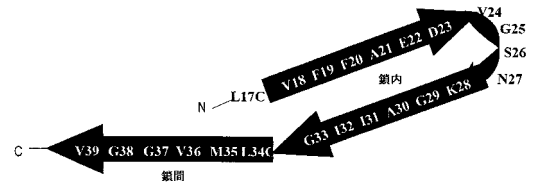
A



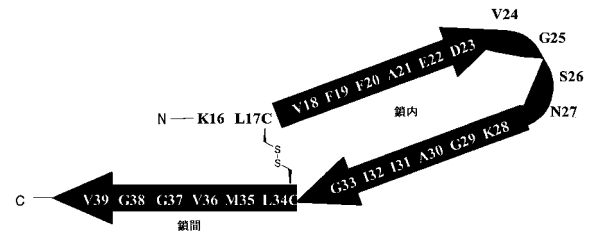
MDAEFSDSG YEVRHQKLVF FAEDVGSNKG AIIGLMVGGV VIA wt
MDAEFSDSG YEVRHQKLVF FAEDVGSNKG AIIGCMVGGV VIA L17C, L34C

B

【図 1 - 2】



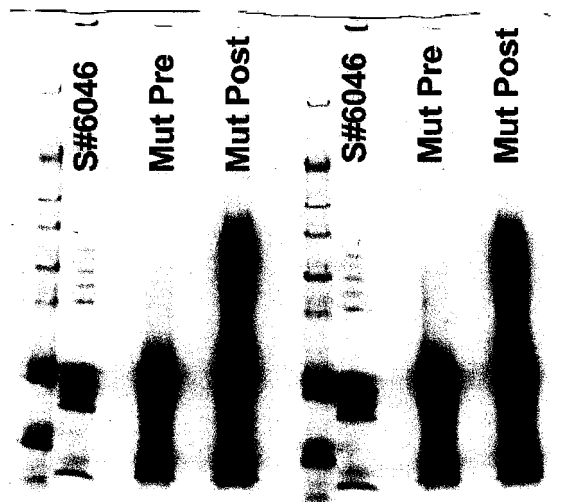
C



D

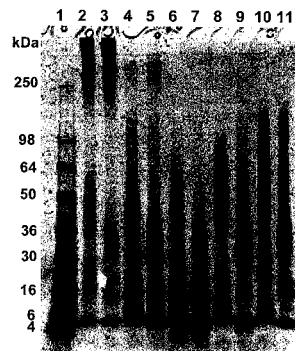
【図 2 - 1】

FIG. 2

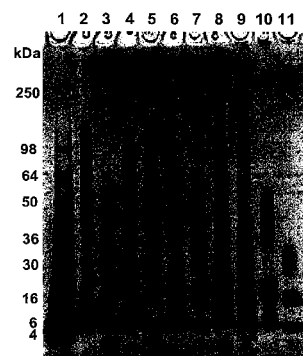


A

【図 2 - 2】

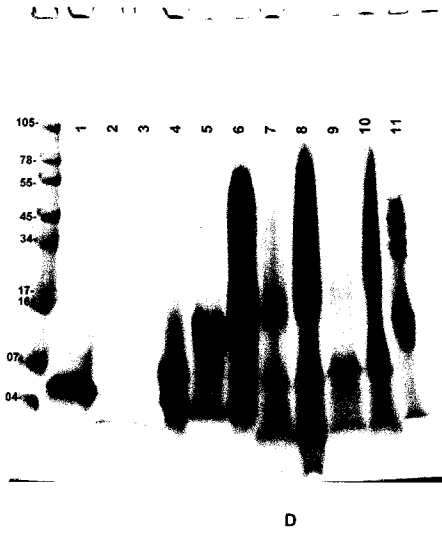


B



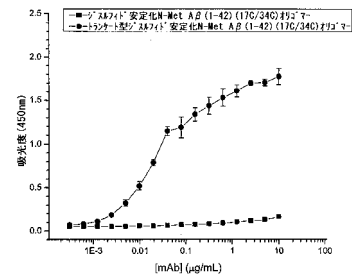
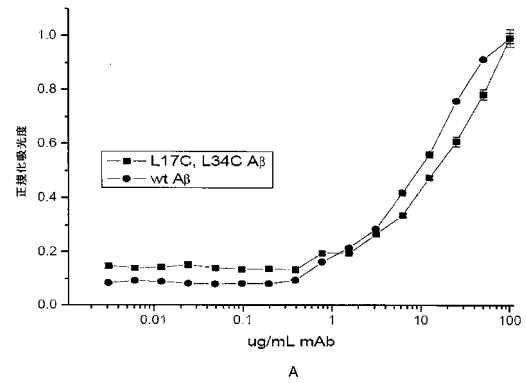
C

【図 2 - 3】

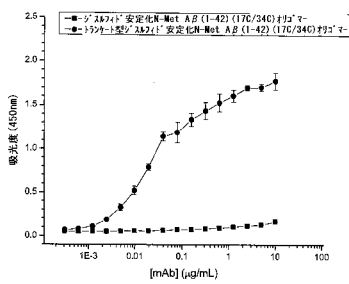


【図 3 - 1】

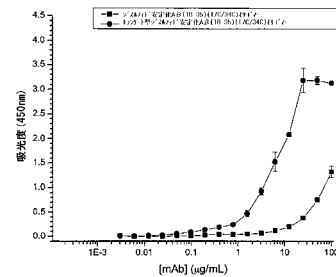
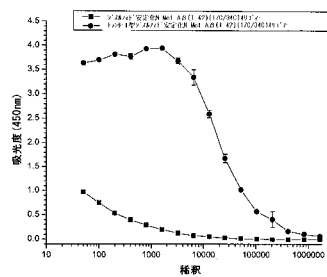
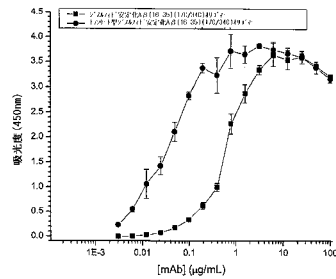
FIG. 3



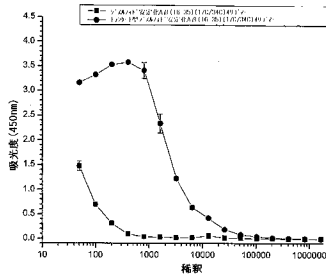
【図 3 - 2】



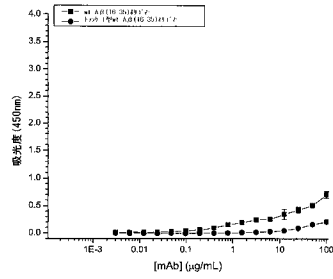
【図 3 - 3】



【図 3-4】

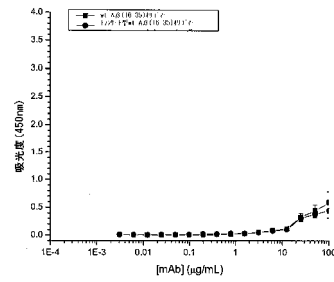


G



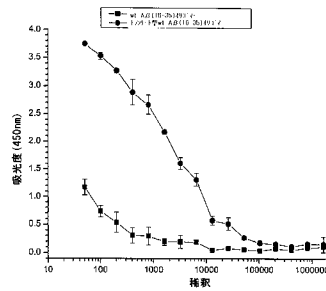
H

【図 3-5】

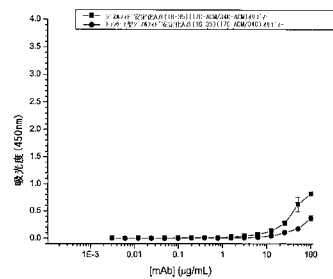


I

【図 3-6】

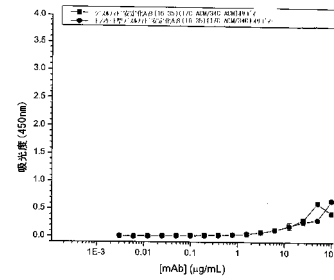


J

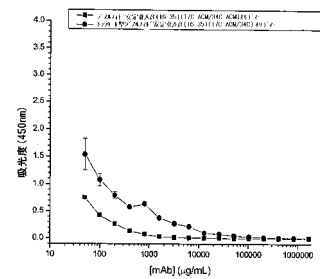


K

【図 3-7】

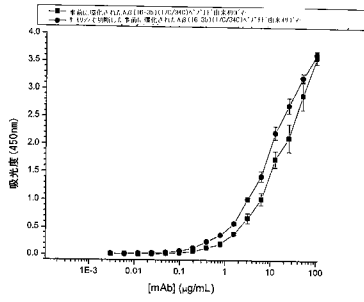


L

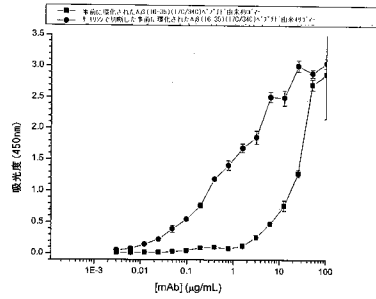


M

【図 3-8】

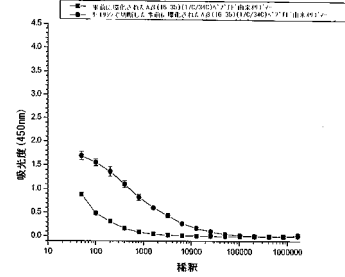


N

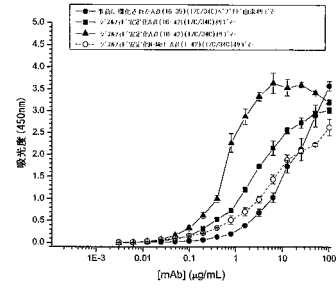


O

【図 3-9】

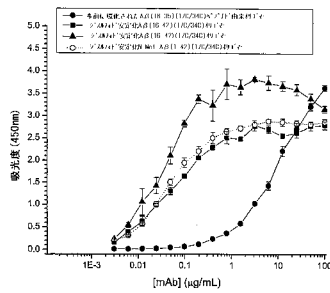


P

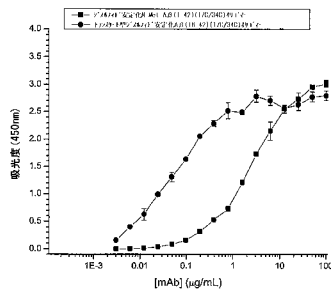


Q

【図 3-10】

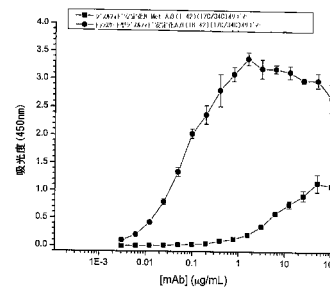


R

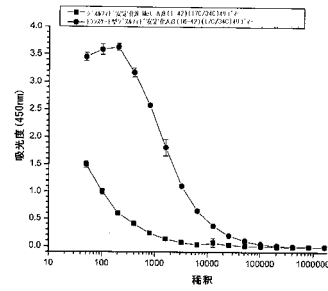


S

【図 3-11】



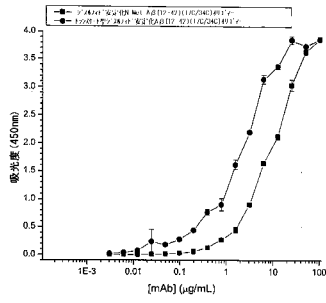
T



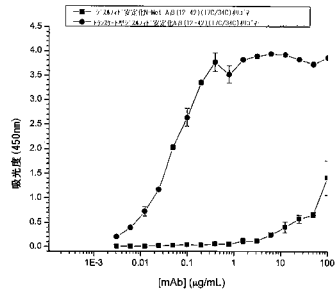
U

#2593A
5599
+/- Trunc

【図 3-12】

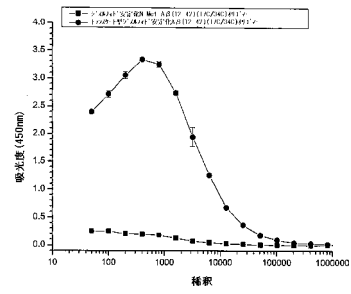


V

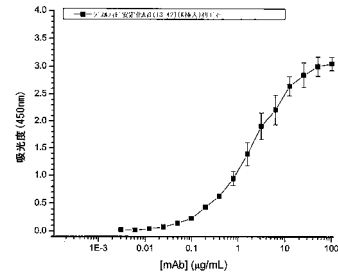


W

【図 3-13】

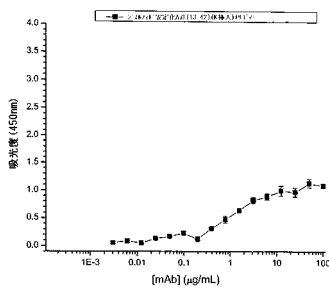


X

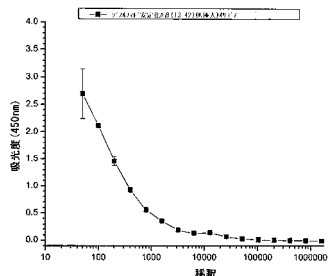


Y

【図 3-14】



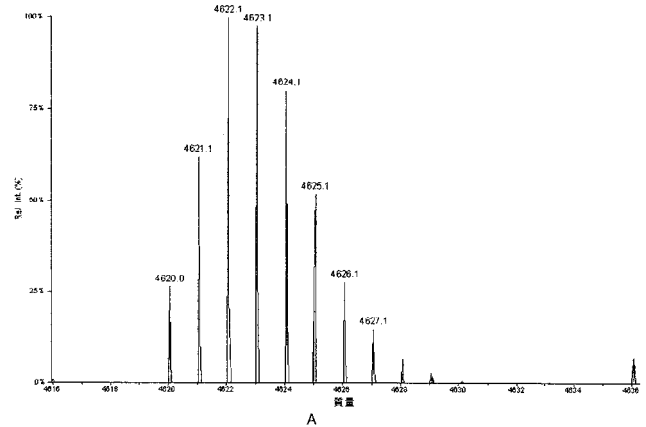
Z



AA

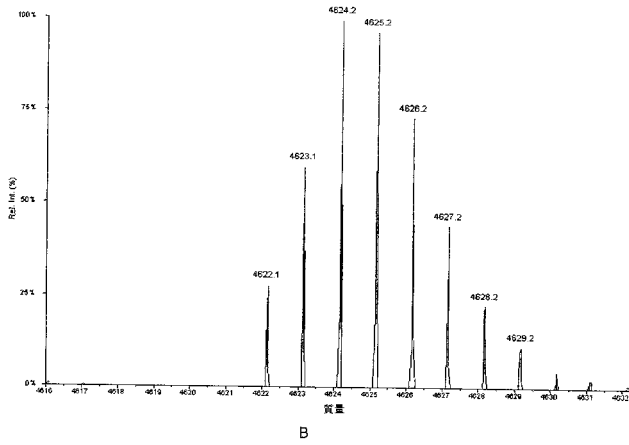
【図 4-1】

FIG. 4

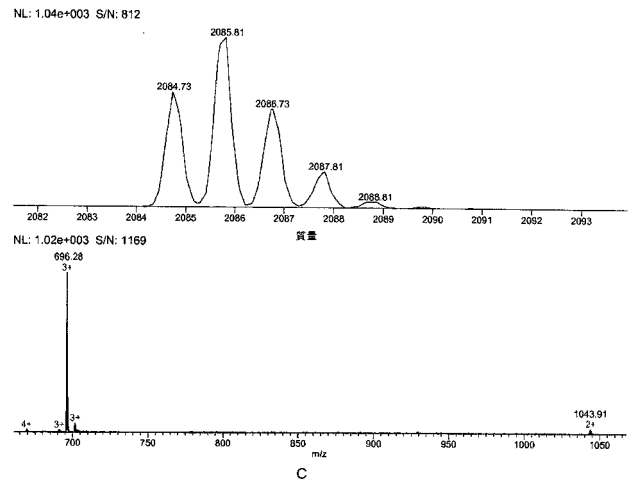


A

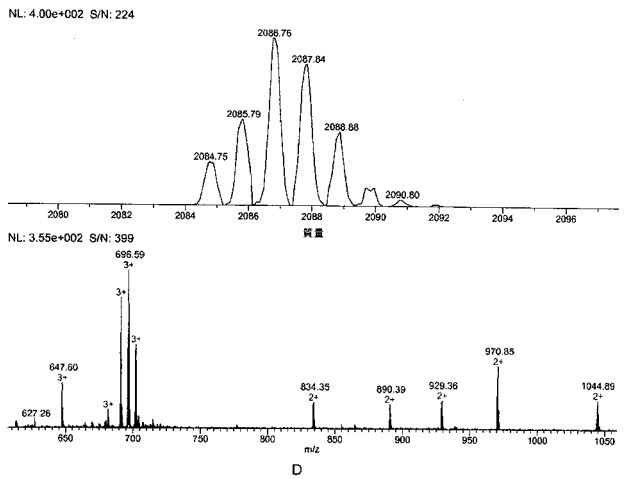
【図 4 - 2】



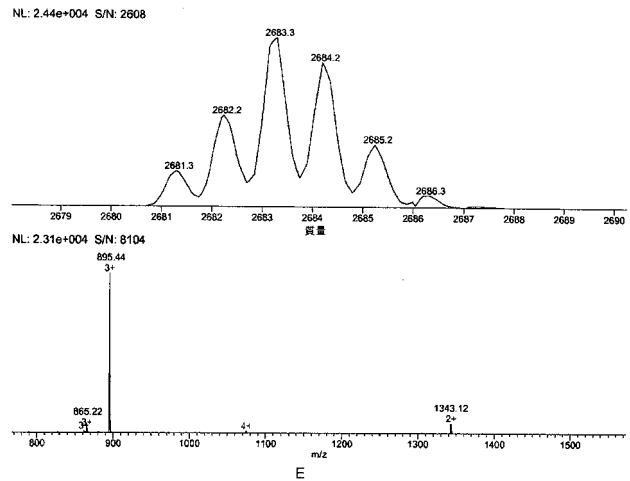
【図 4 - 3】



【図 4 - 4】

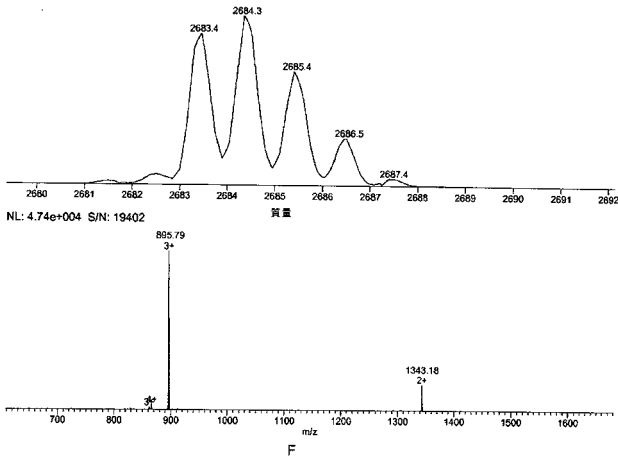


【図 4 - 5】



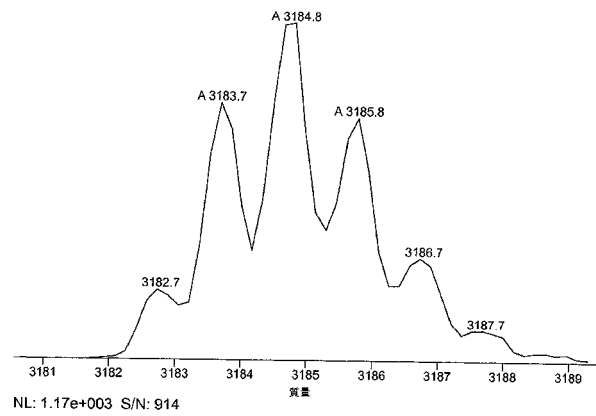
【図 4-6】

NL: 5.47e+004 S/N: 8427



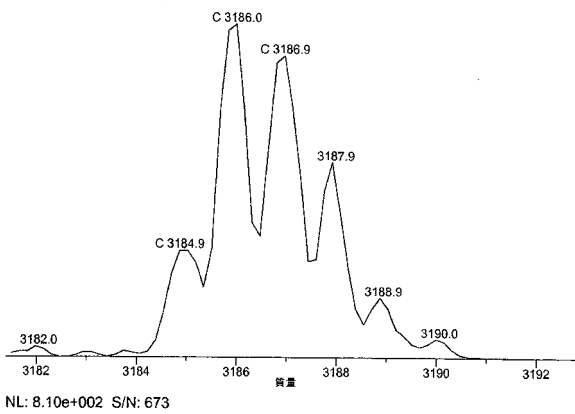
【図 4-7】

NL: 1.12e+003 S/N: 657



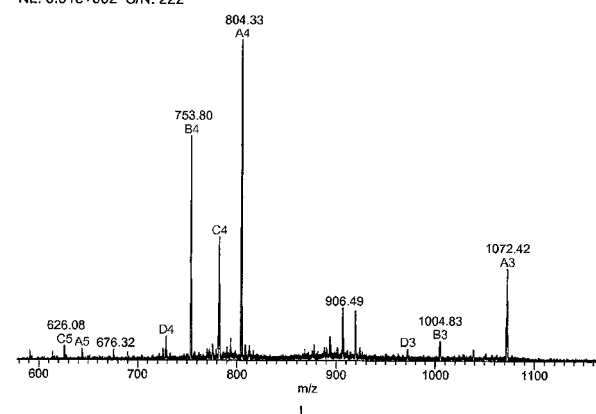
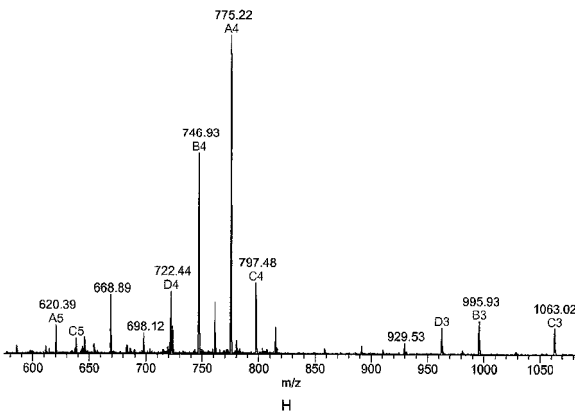
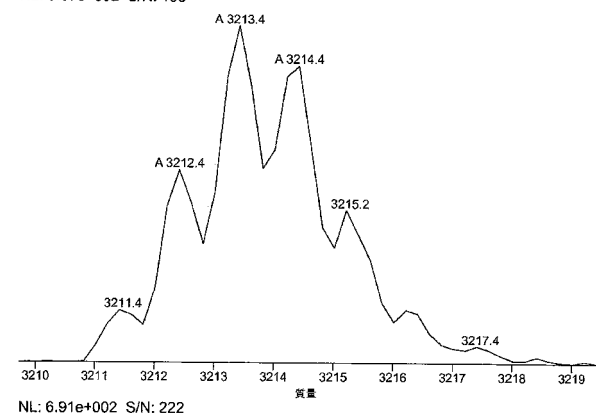
【図 4-8】

NL: 2.60e+002 S/N: 122

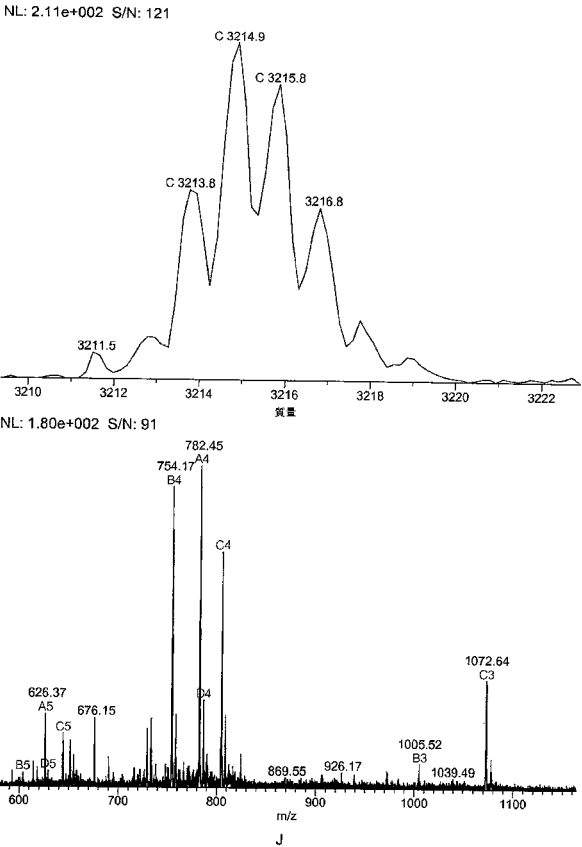


【図 4-9】

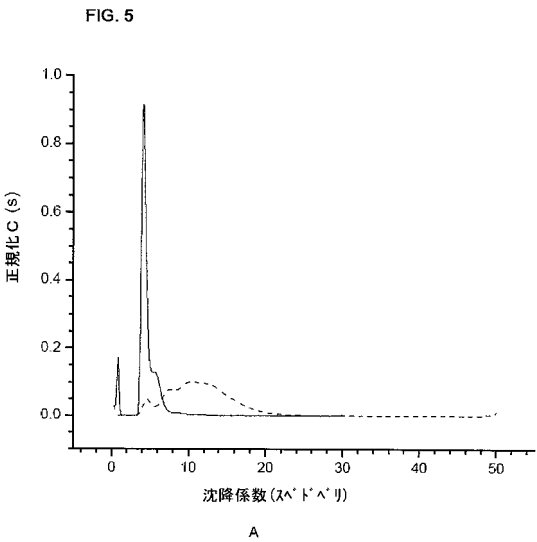
NL: 8.37e+002 S/N: 199



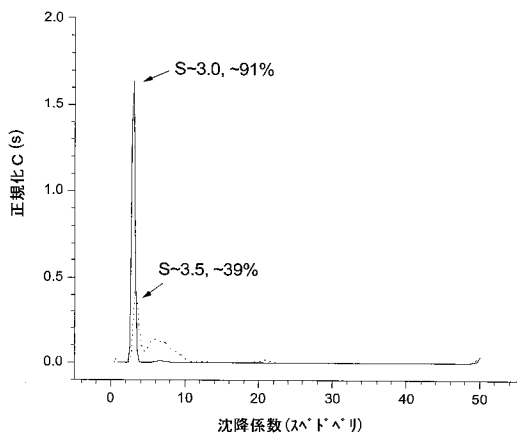
【図 4 - 10】



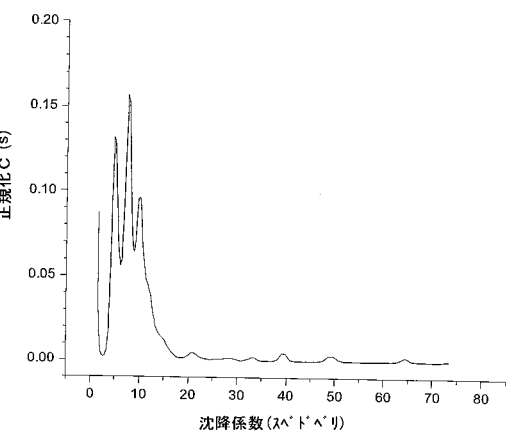
【図 5 - 1】



【図 5 - 2】



【図 5 - 3】



【図 6】

FIG. 6

試料名	測定条件	測定結果	測定結果	測定結果
140.370 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4597	4597	4597
150.360 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
160.350 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4592	4592	4592
170.340 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4595	4595	4595
180.330 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4596	4596	4596
190.320 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4591	4591	4591
200.310 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4591	4591	4591
210.300 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4591	4591	4591
220.290 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4595	4595	4595
230.280 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
240.270 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
250.260 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
260.250 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
270.240 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
280.230 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
290.220 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
300.210 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
310.200 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
320.190 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
330.180 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
340.170 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
350.160 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
360.150 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
370.140 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
380.130 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
390.120 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
400.110 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
410.100 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
420.090 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
430.080 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
440.070 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
450.060 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
460.050 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
470.040 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
480.030 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
490.020 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594
500.010 N-Me-A(1)-42	N DAEFR HDSOY EVNHQ KLFFF AEDVO SHRGA IIGDM VOGVV IA	4594	4594	4594

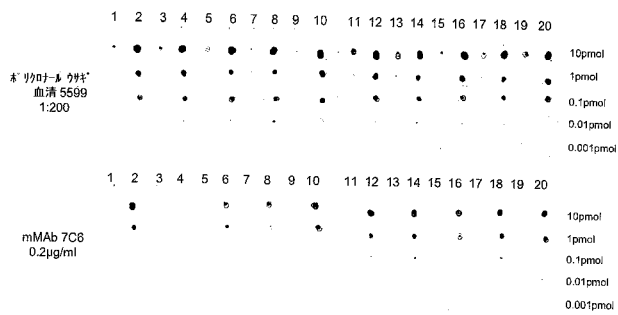
【図 7】

FIG. 7

名称	x CM	E-HMGE [g/mol]	結合・解離定数					
			1 x CM (10 ³ M)			2 x CM (10 ³ M)		
			0 x CM	1 x CM	2 x CM	0 x CM	1 x CM	2 x CM
(14C, 37C) N-Met-AB(1-42) 10 ³ M	AB 5-17 AB 5-18 AB 5-20 AB 20-42	nd nd nd 2287	nd nd nd nd	nd nd 2025 2324	nd nd nd nd	nd nd nd nd	1665 1779 2025 2324	nd nd nd nd
(15C, 36C) N-Met-AB(1-42) 10 ³ M	AB 20-42	2324	nd	2281	nd	nd	2281	nd
(16C, 35C) N-Met-AB(1-42) 10 ³ M	AB 20-42	nd	nd	2249	nd	nd	2249	nd
(17C, 34C) N-Met-AB(1-42) 10 ³ M	AB 20-42 AB 12-42	2209 3187	nd 3187	2267 nd	nd nd	nd nd	2267 3304	nd nd
(18C, 33C) N-Met-AB(1-42) 10 ³ M	AB 20-42 AB 4-42	2265 4248	nd 4299	2323 nd	nd nd	nd nd	2323 nd	nd nd
(19C, 32C) N-Met-AB(1-42) 10 ³ M	AB 20-42 AB 17-42 AB 12-42 AB 4-42	2209 2523 3153 4145	nd 2523 3153 4145	2286 nd nd nd	nd nd nd nd	nd nd nd nd	2286 2639 3279 4263	nd nd nd nd
(20C, 31C) N-Met-AB(1-42) 10 ³ M	AB 20-42 AB 19-42 AB 17-42 AB 12-42 AB 4-42	2163 2311 2523 3152 4145	2163 2311 2523 3152 4145	nd nd nd nd nd	nd nd nd nd nd	nd 2311 2523 3152 4145	nd nd 2639 3288 4281	nd 2426 2639 3288 4281
(21C, 30C) N-Met-AB(1-42) 10 ³ M	AB 20-42 AB 12-42	2282 3153	2282 3153	nd nd	nd nd	2282 nd	nd 3279	2398 3279
(22C, 29C) N-Met-AB(1-42) 10 ³ M	AB 20-42	2236	2236	nd	nd	2236	nd	2354
AB(1-42) 10 ³ M	AB 20-42	2220	2220	nd	nd	2220	nd	nd

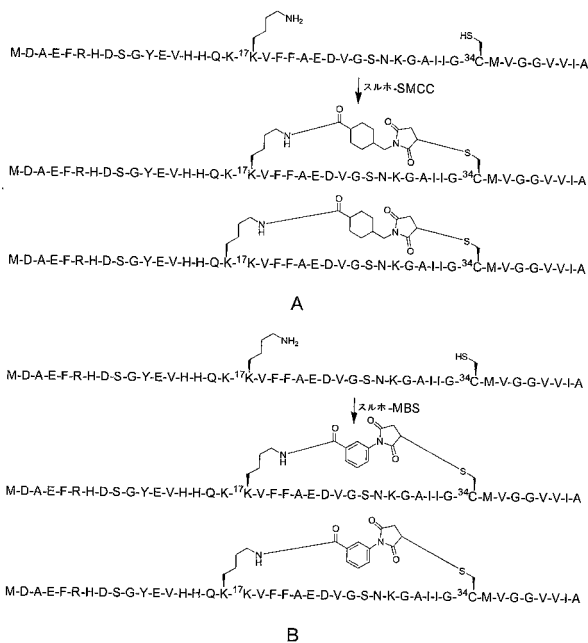
【図 8】

FIG. 8



【図 11-1】

FIG. 11



【図 9】

FIG. 9

名称	x CM	非7C6特異性 [g/mol]	7C6特異性 [g/mol]	30 ³ 7C6特異性 [g/mol]	30 ³ 7C6特異性 [g/mol]	DDT/30 ³ 7C6特異性 [g/mol]	30 ³ 7C6特異性 [g/mol]
(17C,34C) AB(16-35) oligomer	0 1 2	2087 nd nd	1911 nd nd	2087 2144 2203	1201 321 36	2087 2144 2203	601 287 728

【図 10】

FIG. 10

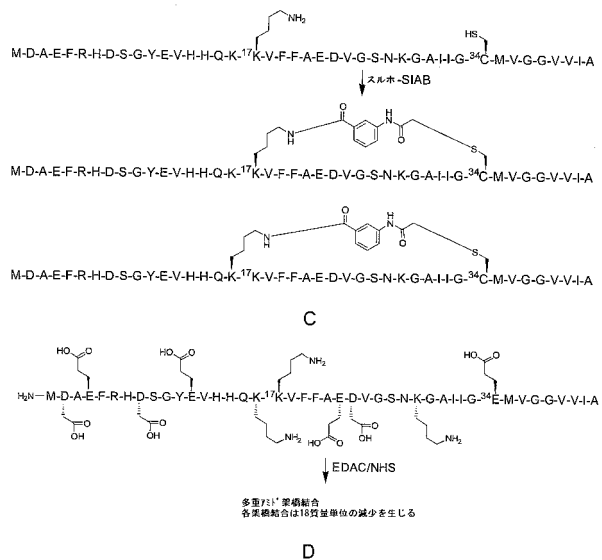
名称	免疫液	[g/mol]	7C6特異性
(17C,34C) AB(16-35) 10 ³ M	10F11	2087	659
(17C,34C) AB(16-35) 10 ³ M	7C6	2087	659
(17C,34C) AB(16-35) 10 ³ M	IgG2a	2087	150
(17C,34C) AB(16-35) 10 ³ M	IgG2b	2087	210

A

名称	免疫液	x CM	[g/mol]	7C6特異性
(17C,34C) AB(16-35) 10 ³ M	10F11	0 1 2	2087 2143 nd	62 0 nd
(17C,34C) AB(16-35) 10 ³ M	7C6	0 1 2	2087 2144 nd	58 4 nd
(17C,34C) AB(16-35) 10 ³ M	IgG2a	0 1 2	2087 nd nd	22 nd nd
(17C,34C) AB(16-35) 10 ³ M	IgG2b	0 1 2	2087 nd nd	8 nd nd

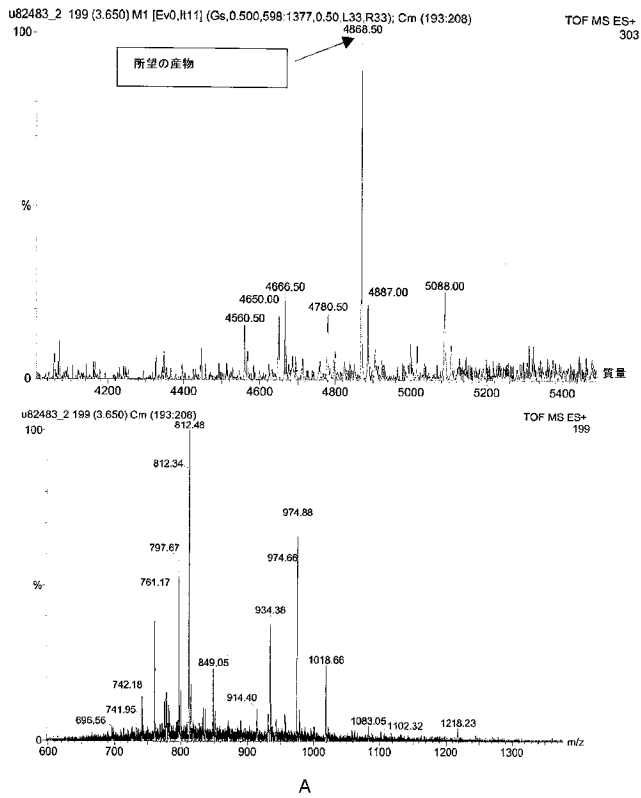
B

【図 11-2】

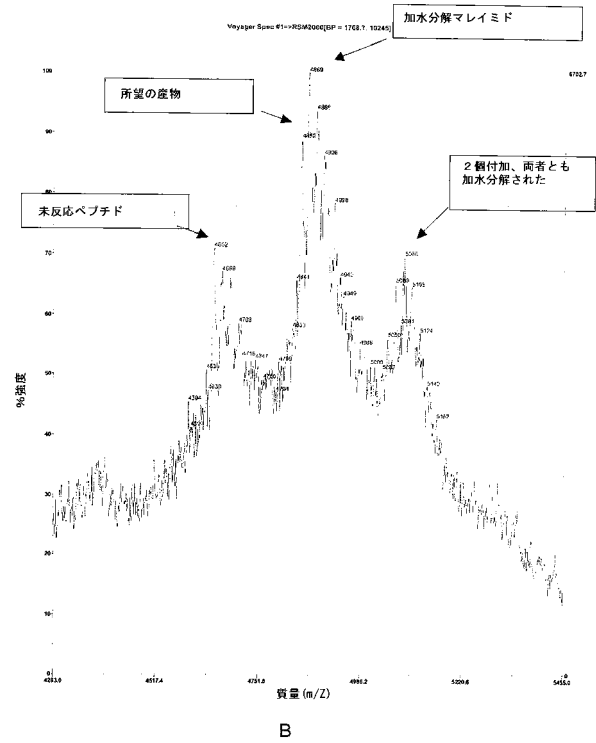


【図 12-1】

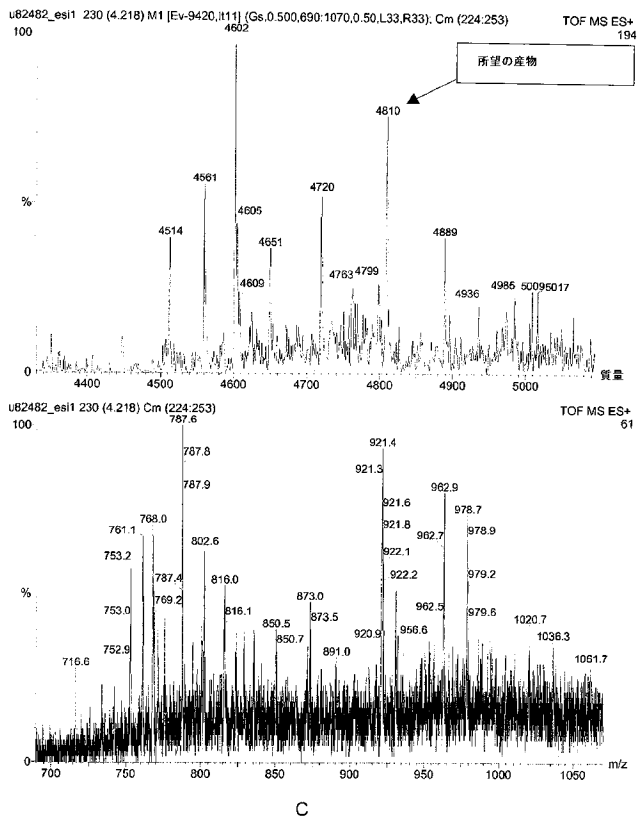
FIG. 12



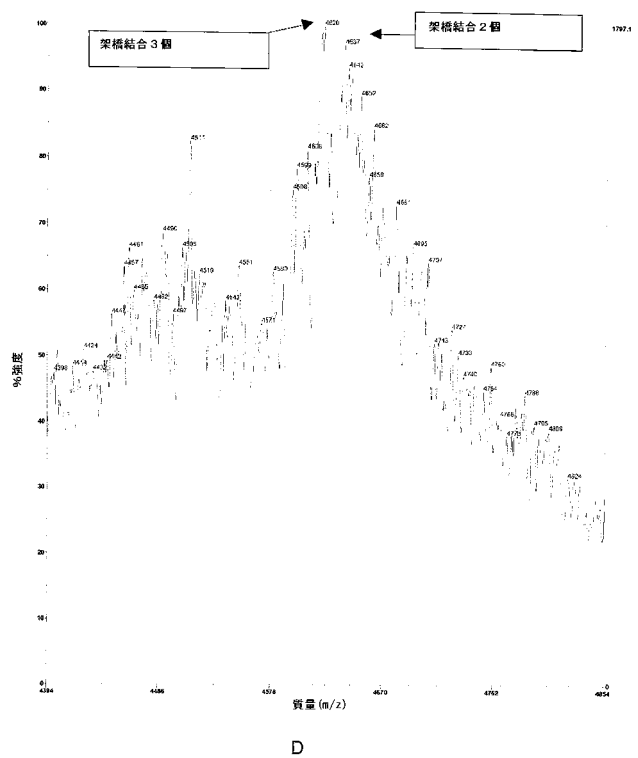
【図 12-2】



【図 12-3】

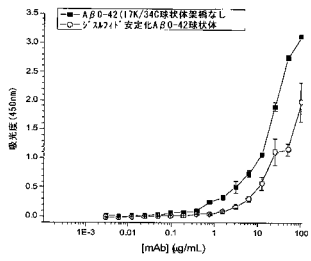
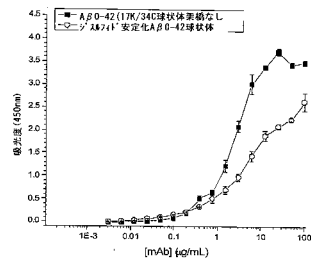


【図 12-4】



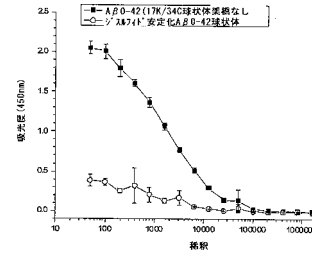
【図 13-1】

FIG. 13



B

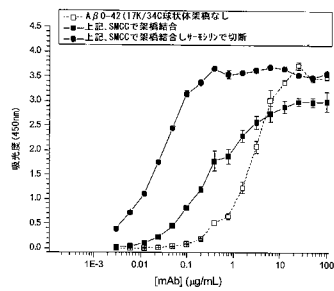
【図 13-2】



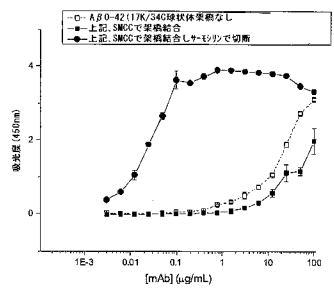
C

【図 14-1】

FIG. 14

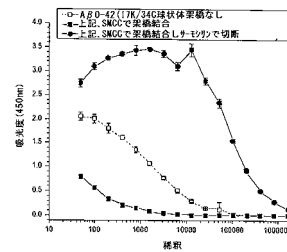


A



B

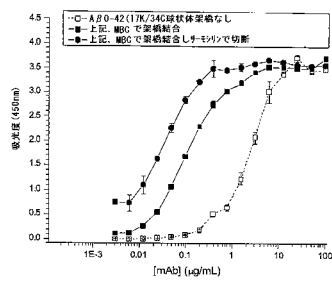
【図 14-2】



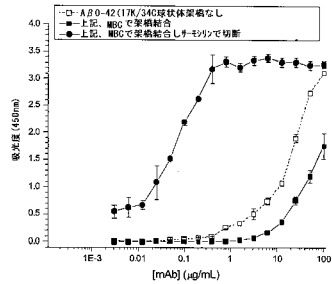
C

【図 15-1】

FIG. 15

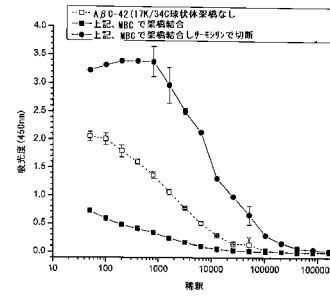


A



B

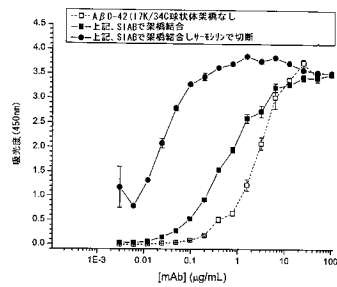
【図 15-2】



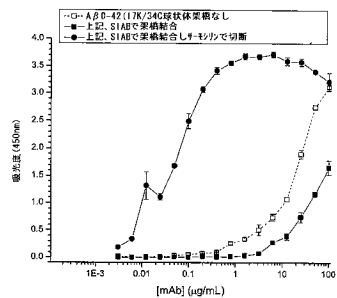
C

【図 16-1】

FIG. 16

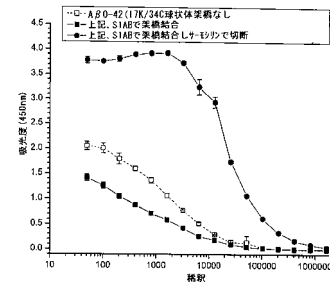


A



B

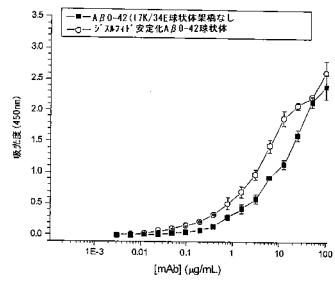
【図 16-2】



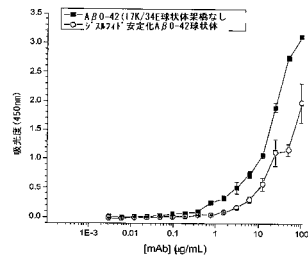
C

【図 17-1】

FIG. 17

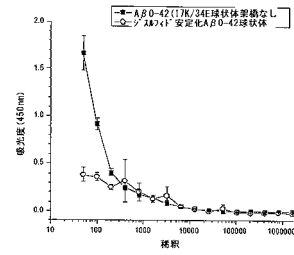


A



B

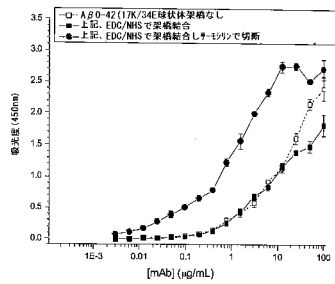
【図 17-2】



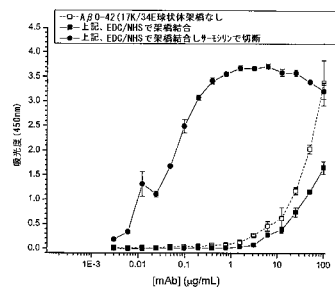
C

【図 18-1】

FIG. 18

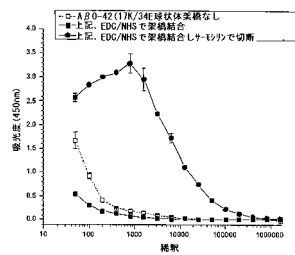


A



B

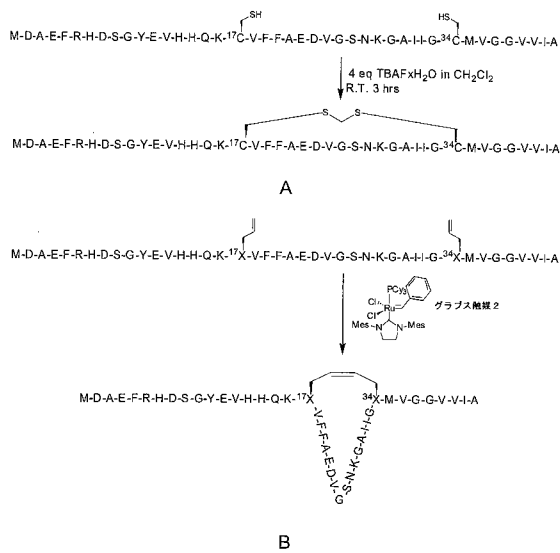
【図 18-2】



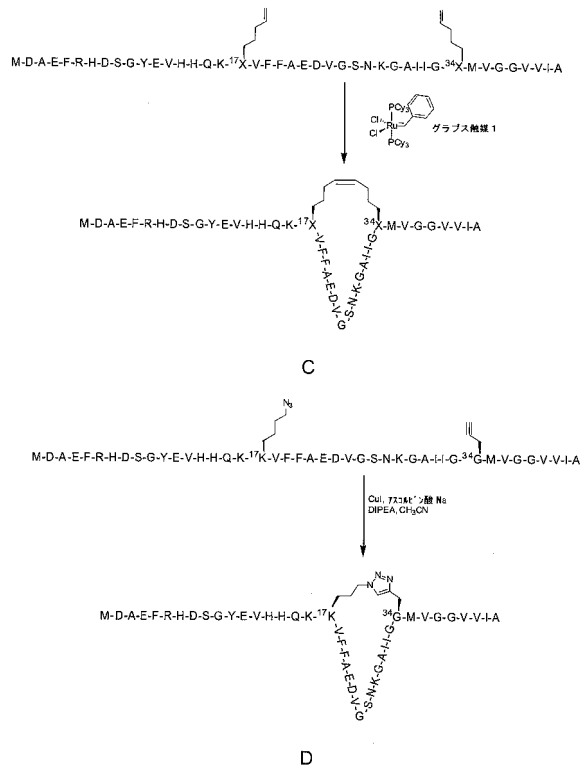
C

【図 19 - 1】

FIG. 19



【図 19 - 2】



【配列表】

2011529084000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2009/051721
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C07K 14/47(2006.01)i, C07K 16/18(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i</i>		
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) IPC7 C07K 14/435, A61K 48/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched N.A.		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKIPASS, WPI, USPTO, PAJ, PubMed, INSPECT "cyclic, globular, Amyloid β -Peptide, antiparallel, secondary structure, etc."		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Liping Yu, et al., (Published online: 13 Feb 2009) "Structural Characterization of a Soluble Amyloid β -Peptide Oligomer" Biochemistry, vol.48(9):1870-1877, DOI: 10.1021/bi802046n - see the whole document [cited in the application]	1-3
X	US 2004-0116337 A1 (Kapurniotu, A., et al., DE) 17 Jun 2004 - see [0014] ~ [0016]; [0021] ~ [0024]; Fig.3; claims 1-4 - [cited in the application]	1-3
X	US 2008-0107649 A1 (Zurbriggen, R., et al., CH) 08 May 2008 - see [0009]; [0015] ~ [0020]; [0024]; claims	1-3
A	US 2007-0213512 A1 (Krafft, GA., et al., US) 13 Sep 2007 - see abstract; Sequence listing on pages 23 ~ 43	1-3
A	US 2002-0132758 A1 (Shell, JW., et al., US) 19 Sep 2002 - see the whole document	1-3
☒ 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 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 15 MARCH 2010 (15.03.2010)		Date of mailing of the international search report 16 MARCH 2010 (16.03.2010)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer SHIN, Weon Hye Telephone No. 82-42-481-5591 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/051721

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007-0098721 A1 (Hillen, H., et al., DE) 03 May 2007 - see the whole document	
A	WO 2006-094724 A2 (Abbott GMBH & CO. KG, DE) 14 Sep 2006 - see the whole document	
		1-3
		1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2009/051721

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004-0116337 A1	17.06.2004	AT 307143 T	15.11.2005
		AU 2002-229677 A8	24.07.2002
		CA 2433687 A1	18.07.2002
		DE 10101430 A1	01.08.2002
		DE 10101430 B4	02.10.2008
		DK 1353948 T3	27.02.2006
		EP 1353948 A2	22.10.2003
		EP 1353948 B1	19.10.2005
		ES 2250509 T3	16.04.2006
		JP 2004-526693 T	02.09.2004
		JP 2004-526693 A	02.09.2004
		US 07342091 B2	11.03.2008
		US 2008-0146508 A1	19.06.2008
		WO 2002-055552 A2	18.07.2002
US 2008-0107649 A1	08.05.2008	AU 2005-321495 A1	06.07.2006
		CA 2592690 A1	06.07.2006
		EP 1831251 A1	12.09.2007
		EP 1676859 A1	05.07.2006
		WO 2006-069718 A1	06.07.2006
US 2007-0213512 A1	13.09.2007	AU 2005-244013 A1	24.11.2005
		CA 2566619 A1	24.11.2005
		EP 1755644 A2	28.02.2007
		JP 2008-500286 A	10.01.2008
		US 2008-0306074 A1	11.12.2008
		US 2008-0176252 A1	24.07.2008
		WO 2005-110056 A2	24.11.2005
		WO 2005-110056 A3	24.11.2005
US 2002-0132758 A1	19.09.2002	AU 2002-247017 A8	30.07.2002
		CA 2434850 A1	25.07.2002
		EP 1354209 A2	22.10.2003
		WO 0205-7796A3	27.03.2003
		WO 2002-057796 A2	25.07.2002
		WO 2002-057796 A3	25.07.2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2009/051721

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007-0098721 A1	03.05.2007	AU 2004-207075 A1	12.08.2004
		PI 0407084 A	24.01.2006
		CA 2514582 A1	12.08.2004
		CN 1768076 A	03.05.2006
		DE 10303974 A1	05.08.2004
		EP 1594891 A1	16.11.2005
		JP 2007-524574 T	30.08.2007
		JP 2007-524574 A	30.08.2007
		KR 10-2005-0103483 A	31.10.2005
		KR 10-2009-0019911 A	25.02.2009
		PA 05007964 A	20.09.2005
		NZ 541453 A	29.02.2008
		WO 2004-067561 A1	12.08.2004
WO 2006-094724 A2	14.09.2006	AU 2006-320392 A1	07.06.2007
		AU 2006-319358 A1	07.06.2007
		AU 2006-222193 A1	14.09.2006
		CA 2599792 A1	14.09.2006
		CA 2637472 A1	07.06.2007
		CA 2631195 A1	07.06.2007
		CN 101506236 A	12.08.2009
		CN 101528770 A	09.09.2009
		CN 101365717 A	11.02.2009
		CN 101432302 A	13.05.2009
		EP 1963363 A2	03.09.2008
		EP 1954718 A2	13.08.2008
		EP 1861422 A2	05.12.2007
		EP 1976877 A2	08.10.2008
		JP 2008-531635 A	14.08.2008
		JP 2009-517057 A	30.04.2009
		JP 2009-518010 A	07.05.2009
		JP 2009-519012 A	14.05.2009
		KR 10-2008-0021585 A	07.03.2008
		KR 10-2008-0090407 A	08.10.2008
		KR 10-2008-0090408 A	08.10.2008
		MX 2007010687 A	28.01.2008
		TW 200700432 A	01.01.2007
		US 2009-0035295 A1	05.02.2009
		WO 2007-064917 A2	07.06.2007
		WO 2007-064972 A2	07.06.2007
		WO 2007-062852 A2	07.06.2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/051721

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.: 7,11,15
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:

The subject matters of claims 7,11,15 are so unclear and indefinite that no meaningful search could be made because these claims are in reference to the multiple dependent claims 6,10,13 which are not drafted in accordance with the second and the third sentence of Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: 4-6,8-10,12-14,16-20
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:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest 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.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D

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

(72)発明者 バルクホルン, シュテファン
 ドイツ国、6 8 1 6 1・マンハイム、ベルリナー・シュトラッセ・3 0
 (72)発明者 ヒレン, ハイנטツ
 ドイツ国、6 7 4 5 4・ハスロツホ、マツクス・プランクーシュトラッセ・1 7
 (72)発明者 エダルジ, ロヒントン
 アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 8 3、ワズワース、ピー・オー・ボックス・1 5 3
 (72)発明者 バレット, レオ
 アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 4 6、レイク・ビラ、ピー・オー・ボックス・9 8 1
 (72)発明者 リチャードソン, ポール
 アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 4 8、リバティビル、バージニア・1 7 2 4
 (72)発明者 ユイ, リーピン
 アメリカ合衆国、アイオワ・5 2 2 4 5、アイオワ・シテイ、エバーサル・レイン・7 6
 (72)発明者 オレイニチャク, エドワード
 アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 3 0、グレイズレイク、ローリー・コート・5 0 6
 (72)発明者 ハーラン, ジョン
 アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 4 7、レイク・チューリツヒ、ポーツリー・レイン・6 8 9
 (72)発明者 ホルツマン, トーマス
 アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 4 8、リバティビル、タマラック・レイン・1 1 1 2
 Fターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA08 BA19 CA53 CA59 NA14 ZA162
 4C085 AA03 BB11 CC31 CC32 DD62 EE01 GG01
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA19 CA45 EA31 EA50 FA20

【要約の続き】

するためおよびアミロイドーシスを診断するための使用などの作用物質の使用も記載している。