(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3552112号
(P3552112)
(45)発行日　平成16年8月11日(2004.8.11)　(24)登録日　平成16年5月14日(2004.5.14)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
G01N 33/53	G01N	33/53	D
C07K 16/18	G01N	33/53	S
C12P 21/08	C07K	16/18	
// C12N 15/02	C12P	21/08	ZNA
	C12N	15/00	C

請求項の数 19　(全 25 頁)

(21)出願番号　特願平7-512686
(86)(22)出願日　平成6年10月17日(1994.10.17)
(65)公表番号　特表平9-508196
(43)公表日　平成9年8月19日(1997.8.19)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/011782
(87)国際公開番号　WO1995/011994
(87)国際公開日　平成7年5月4日(1995.5.4)
審査請求日　平成13年10月17日(2001.10.17)
(31)優先権主張番号　08/143,697
(32)優先日　平成5年10月27日(1993.10.27)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　399013971
エラン　ファーマシューティカルズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，サウス　サンフランシスコ，ゲイトウェイ　ブールバード　８００
(73)特許権者　502072400
エリ　リリー　アンド　カンパニー
アメリカ合衆国　インディアナ　４６２８５　インディアナポリス，リリー　コーポレート　センター（番地なし）
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100086276
弁理士　吉田　維夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】β－アミロイド・ペプチド生産インヒビターについてのスクリーニング方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

β－アミロイド前駆体タンパク質（βAPP）のインビボプロセシングのモニタリング方法であって、ヒトβAPPのSwedish突然変異を発現するように形質転換された動物からの試料中のβAPPのSwedish変異体のアミノ末端断片（ATF－βAPP）であってLeu^{596}とAsp^{597}の間で解裂されているものの存在を特異的に検出することを含んで成る方法。

【請求項２】

ATF－βAPPの存在が、ATF－βAPPのカルボキシ末端におけるエピトープであって、アミノ酸Ser－Glu－Val－Asn－Leu（式中、Leuがカルボキシ末端アミノ酸である）を含んで成るものに特異的な結合性物質と、試料との反応により検出される、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記結合物質が、アミノ酸配列:Ser－Glu－Val－Asn－Leuのペプチドに対して生じたモノクローナル抗体である、請求項２に記載の方法。

【請求項４】

前記試料が、脳脊髄液及び脳ホモジェネートから成る群から選ばれる、請求項１に記載の方法。

【請求項５】

前記動物がマウスである、請求項１に記載の方法。

【請求項６】

化合物がβ－アミロイドペプチドの生産を阻害するか否かと決定するための方法であって

：
ヒトβ－アミロイド前駆体タンパク質（βAPP）のSwedish突然変異を発現するように形質転換された動物にテスト化合物を投与し；
この動物により生産されたLeu^{596}とAsp^{597}の間で解裂したβAPPのSwedish変異体のアミノ末端断片（ATF－βAPP）の量を特異的に検出し；そして
そのテスト化合物の非存在中で作られたSwedish変異体ATF－βAPPの対照量とSwedish変異体のATF－βAPPの検出量とを比較する、
ことを含んで成る方法。
【請求項７】
前記ATF－βAPPの存在を、ATF－βAPPのカルボキシ末端におけるエピトープであって、アミノ酸Ser－Glu－Val－Asn－Leu（式中、Leuがカルボキシ末端アミノ酸である）を含んで成るものに特異的な結合性物質と、試料との反応により検出する、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記結合性物質が、アミノ酸配列:Ser－Glu－Val－Asn－Leuのペプチドに対して生じた抗体である、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記試料が、脳脊髄液及び脳ホモジェネートから成る群から選ばれる、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
前記動物がマウスである、請求項６に記載の方法。
【請求項１１】
ATF－βAPPの対照量が、テスト化合物を受容する同一動物において計測される、請求項６に記載の方法。
【請求項１２】
ATF－βAPPの対照量が、ヒトβAPPのSwedish突然変異を発現する複数のテスト動物から測定された平均値である、請求項６に記載の方法。
【請求項１３】
生物学的試料中のβ－アミロイド前駆体タンパク質（βAPP）のSwedish突然変異のアミノ末端断片を検出する方法であって：
ATF－βAPPのカルボキシ末端におけるエピトープであって、アミノ酸Ser－Glu－Val－Asn－Leu（式中、Leuがカルボキシ末端アミノ酸である）を含んで成るものに特異的に結合する結合性物質に、上記試料を晒し；そして
上記物質と上記アミノ－末端断片との間の結合を検出する、
ことを含んで成る方法。
【請求項１４】
前記結合性物質が抗体である、請求項13に記載の方法。
【請求項１５】
前記抗体が、アミノ酸Ser－Glu－Val－Asn－Leu（式中、Leuがカルボキシ末端アミノ酸である）のペプチドに対して生じたものである、請求項14に記載の方法。
【請求項１６】
前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項15に記載の方法。
【請求項１７】
ATF－βAPPのカルボキシ末端におけるエピトープであって、アミノ酸Ser－Glu－Val－Asn－Leu（式中、Leuがカルボキシ末端アミノ酸である）を含んで成るものに特異的な抗体。
【請求項１８】
アミノ酸Ser－Glu－Val－Asn－Leu（式中、Leuがカルボキシ末端アミノ酸である）のペプチドに対して生じた、請求項17に記載の抗体。
【請求項１９】
前記抗体がモノクローナルである、請求項18に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】
発明の背景
発明の分野
本発明は、一般に、β－アミロイド前駆体タンパク質のプロセシングをモニタリングするための方法及び組成物に関する。より特に、本発明は、アルツハイマー病の治療に対する応答の診断、予後、及びモニタリングのための、並びにアルツハイマー病の治療のための潜在的医薬のスクリーニング及び評価のための、上記方法及び組成物の使用に関する。
アルツハイマー病は、アルツハイマー病患者の脳内に、特に記憶及び認識に関係する上記領域内に存在する多数のアミロイド斑及び神経細繊維のもつれ（neurofibrillary tangles）（難溶性タンパク質凝集物）の存在を特徴とする。過去において、これらの斑及びもつれがアルツハイマー病の原因であるのか又は結果であるのかについての重大な科学的討論があったけれども、最近の発見は、アミロイド斑が原因性前駆体又は要因であることを示す。特に、β－アミロイド・ペプチド、上記アミロイド斑の主要成分、の生産が、アミロイド前駆体タンパク質、正常にプロセスされるときそのβ－アミロイド・ペプチドを作り出さないであろうタンパク質をコードする遺伝子における突然変異から生じることができるということが発見された。今日、β－アミロイド前駆体タンパク質の正常な（非－病的）プロセシングがそのタンパク質のアミノ酸16と17の間で解裂する推定“α－セレクターゼ（α－sercetase）”による解裂を介して生じると信じられている。さらに、病的プロセシングがその前駆体タンパク質内のβ－アミロイド・ペプチドのアミノ末端において推定“β－セクレターゼ（β－secretase）”を介して生じると信じられている。
家族性、初期開始アルツハイマー病を引き起こすアミロイド前駆体タンパク質遺伝子における突然変異の同定は、アミロイド代謝がこの病気の下にある病因過程における中心的な事件であるという最も強力な証拠である。４つの報告された病気誘発性突然変異は、その770イソ形態（isoform）に関して、バリン^{717}～イソロイシン（valine^{717} to isoleucine）（Goate et al.（1991）Nature 349:704－709）、バリン^{717}～グリシン（Chariter Harlan et al.（1991）Nature 353:844－846、バリン^{727}～フェニルアラニン（Murrell et al.（1991）Science 254:97－99）、並びにその695イソ形態に関して、Swedish突然変異といわれる２突然変異リシン^{595}－メチオニン^{596}～アスパラギン^{595}～ロイシン^{596}（Mullan et al.（1992）Nature Genet 1:345－347）を含む。その上、β－アミロイド・ペプチドは、脳ニューロンに対して毒性である傾向があり、そしてニューロン細胞の死がこの疾患に関連する。
従って、アミロイド前駆体タンパク質の細胞プロセシングをモニターする能力は、アルツハイマー病の診断、予後、及び治療的監視において有意な価値をもつであろう。特に、容易に得られる患者サンプル、例えば血清、脳脊髄液（CSF）、その他の中の検出可能な診断マーカーをスクリーニングし、そして評価するための最小の侵入性手順を同定することが望ましいであろう。多数のアルツハイマー病のための潜在的診断マーカーが提案されてきた。本発明にとって特に重要なものは、カルボキシ末端断片（例えば、β－アミロイド・ペプチド自体及びその断片）、及びアミノ末端断片（例えば、特定の25KD,105KD、及び125KD断片）を含む、上記アミロイド前駆タンパク質の特定断片である。今までのところ、提案されたマーカーのいずれも、アルツハイマー病の生前の診断又はモニタリングのために信頼できるものでないことが証明されている。
従って、アルツハイマー病のための追加の及び他の診断マーカーを同定することが望ましいであろう。このようなマーカーは、それ自体及び／又は他の診断マーカー及び手順と共に有用であるはずである。好ましくは、診断マーカーは、最小の侵入性診断手順が使用されることができるように、体液、例えば、CSF、血液、血漿、血清、尿、組織その他の中で検出されるであろう。
本発明にとってさらに重要なものは、β－アミロイド斑の生成を阻止し又は防止する能力についての候補薬物についてのスクリーニングのためのインビトロ及びインビボ・システム及び方法である。β－アミロイド・ペプチドへのアミロイド前駆タンパク質の変換を阻止し又は防止する能力についてのテスト化合物についてのスクリーニングのための方法及

びシステムを提供することが望ましいであろう。特に、上記テスト化合物が変換を導く代謝系路を妨害し又は中段することができる場合、このような変換に関係することが発見された代謝系路に、このような方法及びシステムの基礎を置くことが望ましいであろう。このような方法及びシステムは、迅速、経済的、そしてひじょうに多くのテスト化合物のスクリーニングに好適であるはずである。

背景技術の説明

β－アミロイド・ペプチド（A4,βAP,Aβ又はＡβＰともいう；米国特許第4,666,829号及びGlenner and Wong（1984）Bicohem.Biophys.Res.Commun.120:1131－1135を参照のこと）は、695,751、及び770アミノ酸の異なったスプライス形態において発現されるβ－アミロイド前駆体タンパク質（β－amyloid procursor protein（βAPP）から誘導される。Kang et al.（1987）Nature 325;773－776;Ponte et al.（1988）Nature 331:525－527;及びKitaguchi et al.（1988）Nature 331;530－532を参照のこと。アミロイド前駆体タンパク質の正常なプロセシングは、β－アミロイド・ペプチド配列の残りのタンパク質を保持する細胞外ドメインの構成的分泌をもたらす、トランスメングラン・ドメイン付近でのAsp^{597}がKang et al.（1987）；前掲中の残基１であるvAP領域として番号付けされるとき）残基Lys^{16}とLeu^{17}の間の部位におけるタンパク分解性解裂を含む（Esch et al.（1990）Science 248:1122－1124）。この経路は、種の間で広く保存され、そして多くの細胞型において存在するようである。Weidemann et al.（1989）Cell 57:115－126及びOltersdorf et al.（1990）J.Biol.Chem.365:4492－4497を参照のこと。この正常な経路は、β－アミロイド・ペプチドに対応する前駆体タンパク質の領域内で解裂し、これ故、明らかにその形成を除外する。βAPPの他の構成的に分泌される形態であってEsch et al.前掲により記載されたその形態に対してカルボキシ末端にあるβAP配列のより大きなものを含むものが記載されている（Robakis et al.Soc.Neurosci.October 26,1993,Abstract No.15.4,Anaheim,CA.）。

Golde et al.（1992）Science 255:728－730は、アミロイド前駆体タンパク質の１シリーズの欠失変異体を調製し、そしてβ－アミロイド・ペプチド領域内の単一解裂部位を観察した。この観察に基づいて、β－アミロイド・ペプチド形成が分泌経路に関係しないことと仮定された。Estus et al.（1992）Science 255:726－728は、脳細胞内にあるアミロイド前駆体タンパク質の２つの最も大きなカルボキシ末端タンパク質分解断片がβ－アミロイド・ペプチド領域全体を含むことを教示している。

PCT出願WO92/00521は、患者の脳脊髄液中のアミロイド前駆体タンパク質の特定の25KD,105KD、及び125KD可溶性誘導体の量の計測に基づいて、アルツハイマー病を評価する方法について記載している。WO92/00521の図３は、アミロイド前駆体タンパク質の解裂がβ－アミロイド・ペプチドのアミノ末端に隣接して生じて可溶性アミノ末端断片を作り出すことができるが、このような解裂の証拠又は討議がその出願において提示されている。Kennedy et al.（1992）Neurodegeneration 1:59－64は、分泌されたβAPPの形態であって、βAPの最初の15残基に対する抗体との反応性の欠如及びβAPPの527－540残基に対する抗体とのその反応性を特徴としたものについてのデータを提供する。βAPP形態の解裂部位又はそのカルボキシ末端の同一性を示唆する直接の証拠は全く提供されていない。PCT出願WO91/16628は、プロテアーゼnexin－２又はアミロイド前駆体タンパク質に対する抗体を使用するアミロイド前駆体タンパク質及びその断片の検出に基づく病気の診断方法について記載している。

最近の報告は、可溶性β－アミロイド・ペプチドは、健康な細胞により培養基中に（Haas et al.（1992）Nature 359:322－325）並びにヒト及び動物CSF中に（Seubert et al.（1992）Nature 359:325－327）に作り出される。

Palmert et al.（1989）Biochem.Biophys.Res.Comm.165:182－188は、βAPPについての３つの可能性のある解裂メカニズムについて記載し、そしてβAPP解裂がβAPPの可溶性誘導体の生産においてメチオニン^{596}において生じないという証拠を提供する。米国特許第5,200,339号は、βAPPアミノ末端付近の部位においてβAPPを解裂することができると推定される特定のタンパク質分解因子（単数又は複数）の存在について検討する。

発明の要約

β－セレクターゼ解裂から生じるβ－アミロイド前駆体タンパク質（βAPP）のアミノ末端断片を検出し、そしてモニタリングする方法及び組成物を提供する。以下ATF－βAPPという生じた断片は生物学的サンプル中で検出されることができ、そして動物モデルにおけるβAPPのプロセシングをモニタリングするために有用である。特に、本発明は、ATF－βAPPの存在がヒトβAPPのSwedish突然変異を発現するように形質転換された動物からの試料中で検出され、そしてそのATF－βAPPがその695アミノ酸イソ形態において、Kang,et al.,前掲の番号付けに基づき、LEU^{596}とASP^{597}との間のβAPPから解裂されている場合に、インビボにおけるβAPPプロセシングのモニタリングを提供する。このSwedish突然変異は、βAPPの野生型695イソ形態に存在するLYS^{595}－MET^{596}についてのASN^{595}－LEU^{596}置換から生じる。

βAPP遺伝子のヒトSwedish突然変異を発現する動物モデルは、そのアミノ末端断片中に特に多産の生産体である。すなわち、非－ヒト動物モデルは、その内因性βAPP又は野生型ヒトβAPPのいずれの解裂よりも高い頻度でヒトSwedish突然変異を解裂することができる。さらに、ヒトβAPPのSwedish突然変異の細胞内プロセシングが、そのβAPP遺伝子の他のヒト突然変異により生産されるよりも高いATF－βAPPの生産をもたらすと信じられている。従って、βAPPのSwedish突然変異を発現する、トランスジェニック動物系、例えばトランスジェニック・マウスは、β－セレクターゼ活性・βAPPプロセシングの見かけの病因形態の結果としてのβAPPの解裂を阻害し又は調節するその能力について、テスト化合物をスクリーニングし、そしてβAPPの細胞内プロセシングをモニタリングするためのモデルとして特に好適である。

本発明の好ましい態様においては、βAPPのSwedish突然変異のβ－セレクターゼ解裂により作られるATF－βAPPは、そのエピトープがカルボキシ末端残基（LEU^{596}）及び好ましくはATF－βAPPのカルボキシ末端に存在する５つのアミノ酸残基を含んで成るような、ATF－βAPPのカルボキシ末端に又は付近に存在するエピトープに特異的に結合する結合性物質により検出される。結合性物質、例えばＣ－末端エピトープに対する抗体の間の結合は、ATF－βAPPのSwedish形態の高く特異的な検出を提供する。好ましい抗体は、そのSwedish βAPPのβ－セレクターゼ解裂に晒される上記５残基カルボキシ末端を含んで成るペプチドに対して作られる。

本発明の他の好ましい態様においては、β－アミロイド生産インヒビターは、上述のようにトランスジェニック動物モデルにおいて同定されることができる。これらの動物は、テスト化合物（単数又は複数）に晒され、そしてこれらの化合物であってATF－βAPPの生産に、通常、減少により、影響を及ぼすものが、βAP－関連症状の治療のための医薬としてのさらなるテストについての候補であると考えられる。

本発明のさらに他の態様においては、Swedish βAPPのアミノ末端断片に特異的な抗体が提供される。たぶん、これらの抗体は、Swedish ATF－βAPPのアミノ末端残基を含んで成るペプチドに対して作られ、そしてこれらの抗体はポリクローナル又はモノクローナルであることができる。

【図面の簡単な説明】

図1Aと1Bは、それぞれ、正常なβAPPの各種イソ形態とATF－βAPPの対応イソ形態について図示する。

図2A,2B、と2Cは、ヒト胎児脳細胞培養のならし培地から得られた材料の化学発光ゲル・パターンである。各ゲルのレーン1,2、と３は、それぞれ、非処理ならし培地、β－アミロイド・ペプチド残基１－16内のエピトープを認識する抗体との反応により消耗されたならし培地、及びこの抗体により除去された材料を表す。パネルA,B,Cは、それぞれ、以下のプローブを表す：（β－アミロイド・ペプチド領域に対してアミノ末端にあるβAPP±の位置を認識する）抗－５抗体、（βAPPからのβAPの解裂により晒されたＣ－末端メチオニン内に終わる合成ペプチドに対して作られた）抗体92、及び抗体10D5（残基１－16内のβAPのエピトープを認識するモノクローナル抗体）。

図３は、ヒト要部CSFを調べることにより得られた化学発光ゲル・パターンである。このC

SFを、ATF－βAPPのＣ－末端の変化を提示するさまざまなペプチドにより前インキュベートされた又は単独の（レーン１）のいずれかの92抗体によりプローブした。有意な競合（結合における減少）がＣ－末端メチオニンに終るペプチドを用いて観察された（レーン3,4,6、と７）。これらのペプチドは、以下のようなものであった：レーン１、添加された競合ペプチドなし；レーン2,GSGLTNIKTEEISEVK;レーン3,YSGLTNIKTEEISEVKM;レーン4,ISEVKM;レーン5,EISEVKMD;レーン6,CISEVEM;レーン7,YISEVKM。分子量（MW）＝（キロダルトンにおいて示した）分子質量マーカー。

図４は、各種セルラインからのならし培地の免疫沈降により得られた電気泳動ゲル・パターンを表すオートラジオグラムである。ヒト胎児脳カルチャーにより分泌され、そして抗体92により免疫沈降された材料（矢印のあるレーン11）は、（矢印のあるレーン10）抗体6C6により沈降された材料よりも明らかに小さい。抗体6C6は、βAPの残基１－16内のエピトープを認識する。

図５は、正常とSwedish βAPPの両方をコードするcDNAによりトランスフェクトされたヒト923セルラインからのならし培地の免疫沈降により得られた電気泳動ゲル・パターンを表すオートラジオグラムである。Swedishトランスフェクト細胞により分泌されたATF－βAPP材料の量（レーン11と12）は、正常なβAPPトランスフェクト体により作られたもの（レーン９と10）よりも定性的に大きい。

図６は、ATF－βAPPのSwedish突然変異に対して生じたモノクローナル抗体（以下、Swedish 192抗体という）の特異性を示す免疫ブロットである。

図7Aは、プラスミド$pNSEAPP_{sw}\Delta３'$のマップである。

図7Bは、プラスミド$pNSEAPP_{sw}$のマップである。

図８は、βAPP断片の存在のためにプローブされたトランスジェニック及び非－トランスジェニック（対照）マウス脳ホモジェネートの可溶性画分のウェスタン・ブロットである。

図９は、Swedish 192抗体がα－セレクター部位において解裂したβAPPの断片と交差反応しないことを立証するトランスジェニック及び非－トランスジェニック（対照）マウスからの脳ホモジェネートのウェスタン・ブロットである。

特定の態様の説明

本発明は、その前駆体タンパク質からの無傷のβ－アミロイド・ペプチド（βAP）の解裂から生じるβ－アミロイド前駆体タンパク質（βAPP）の新規の分泌断片の同定から生じる。この新規の分泌断片は、このような解裂の後に残るβAPPのアミノ末端部分を含んで成り、そして以下、βAPPのアミノ－末端断片形態（ATF－βAPP）という。ATF－βAPPは、βAPPのための他の分泌プロセシング経路であって正常（非疾患）細胞内にも存在するものの生成物であると信じられている。しかしながら、この他の分泌経路は患者における疾患細胞内のβAPの生産において不可欠な事件に責任を負うことができ、そしてATF－βAPPの異常な生産が、βAP斑に関連する疾患、特にAlzheimer's病とDown's症候群に関連することができることもさらに信じられている。従って、本発明は、生物学的サンプル中のATF－βAPPの検出及び計測に基づくβAPPの細胞プロセシングをモニタリングするための方法及び組成物を提供する。

ATF－βAPPは、そのβAP領域に直に隣接して横たわり、そして正常βAPPについては、（以下に述べるように、その695イソ形態内でメチオニン^{596}として番号付けされた）カルボキシ末端メチオニンを含む、βAPPの特定残基を含んで成るペプチドに対して生じた抗体への特異的結合により同定され、かつ、認識される。これらのペプチドは、通常、残基^{596}までで、かつ、これを含む少なくとも５つの連続した残基を含むであろうし、そして上記のような抗体の特定の生産方法を以下に記載する。

ここで、図1Aと1Bを見ると、βAPPは、それぞれ、695,751、と770アミノ酸を含んで成る３つのイソ形態内にある。695イソ形態は、ニューロン細胞において最も一般的であり、751と770イソ形態は、695イソ形態上の残基289での挿入から生じる（695イソ形態の全ての番号付けはKang et al.（1987）Nature 325:733－736に従うであろう。）ATF－βAPPは、明らかに、695イソ形態の596と597残基の間にある、β－アミロイド・ペプチド（βAP）

領域のアミノ－末端のアミノ末端側の５つの残基に又はその内にあるさまざまなβAPPイソ形態のタンパク質分解解裂から生じる。このような解裂は、Ｃ－末端残基の露出をもたらし、これは通常、メチオニン^{596}、リシン^{595}又はロイシン^{596}であり、より普通には、図1B中にMET^{596}とLEU^{596}として示されるメチオニン^{596}又はロイシン^{596}であるであろう。LEU^{596}の露出は、以下、より詳細に記載するように、ヒトと動物モデルの両方におけるヒトβAPPのSwedish突然変異のβ－セレクターゼで解裂により生じる。もちろん、そのＣ－末端残基が、そのATF－βAPPが異なるβAPPイソ形態から得られるとき、異なる番号をもつであろうことが理解されるであろう。特に、Ｃ－末端メチオニンは、751と770βAPPイソ形態において、それぞれ、MET^{652}とMET^{671}であろうし、そしてＣ－末端ロイシンはLEU^{651}とLEU^{670}であろう。以下、本明細書中、及びクレーム中に使用するとき、メチオニン^{596}、リシン^{595}、とロイシン^{596}は、一般的に、βAPPの全ての他のイソ形態又は変異体内の対応の残基をいう。目下、ATF－βAPPのＮ－末端残基は、（そのβAP領域内で解裂する分泌形態におけるβAPPのアミノ末端のプロセシングに基づき）全イソ形態においてLEU^{18}であると信じられている。

本発明に従えば、ATF－βAPPは、インビトロのサンプル、例えば、培養細胞からのならし培地、並びに患者及び動物モデル・サンプル、典型的にはCSF、血液、血清、血漿、尿、組織その他を含む、さまざまな生物学的サンプル中で検出及び／又は計測されることができる。検出及び計測は、サンプル中にあるであろう他のβ－APP断片からATF－βAPPを区別することができるいずれかの技術により達成されることができる。便利には、ATF－βAPPに特徴的なエピトープに結合し、そして他のβAPP断片との交差反応性を実質的にもたない、抗体、抗体断片、又は他の等価な特異的結合性物質を利用する免疫学的検出技術を使用することができる。特に使用されるものは、βAP領域のβ－セレクターゼ解裂に晒されるATF－βAPPのＣ－末端残基、例えばメチオニン^{596}、ロイシン^{596}又はリシン^{595}を含んで成るエピトープに結合する、抗体又は他の結合性物質である。このようなＣ－末端－特異的抗体がATF－βAPPと関連βAPP断片の間を区別することができることが発見されている。あるいは、免疫学的検出技術は、慣用技術を使用して、単離され、かつ、精製されたATF－βAPPに基づくことができる。Ｃ－末端残基－特異的抗体と精製及び単離ATF－βAPPの両方の調製について以下に記載する。特に好適な検出技術は、ELISA、ウェスタン・ブロッティング、ラジオイムノアッセイその他を含む。

ATF－βAPP特異的抗体及び／又は競合抗原の使用を必要としないATF－βAPPの使用のための他の技術を使用することもできる。例えば、２次元ゲル電気泳動、βAPPの密に関連した可溶性断片を分離するために使用することができる。これらの断片の多く又は全てと交差反応性の抗体を、次に、ATF－βAPPの存在をそのゲル上のその正確な位置に基づいて同定しながら、そのゲルをプローブするために使用することができる。例えば、βAPのアミノ末端領域を含む分泌βAPP種をATF－βAPPを単離するためにサンプルから免疫学的に取り出すことができ（図2A、レーン２及び図５、レーン11と12参照）、次にこれを先に討議したようにいくつかの方法のいずれかにより検出することができる。

野生型ATF－βAPPに特徴的なエピトープに特異的な抗体を、上記メチオニン残基を含むＣ－末端ATF－βAPP配列を含んで成る好適な抗原又はハプテンに対して調製することができる。ATF－βAPPのSwedish突然変異に特徴的なエピトープに特異的な抗体を、596位におけるロイシン残基を含むＣ－末端ATF－βAPP配列を含んで成る好適な抗原又はハプテンに対して調製することができる。便利には、合成ペプチドを、慣用の固相技術により調製し、好適な免疫原に結合し、そして慣用技術により抗血清又はモノクローナル抗体を調製するために使用することができる。１の好適な合成ペプチドは、βAPのアミノ末端側直近に位置し、そして実験セクション中に詳細に記載するように免疫原に結合し、そして特異的抗体を調製するために使用することができる、ATF－βAPPの６つの残基（ISEVKM）から成る。他の好適なペプチド・ハプテンは、通常、βAPのアミノ－末端側直近のβAPP内の少なくとも５つの連続残基を含んで成るであろうし、そして、６以上の残基を含むことができる（但し、16アミノ－末端残基を含むペプチドが、より特異性の低い抗血清を作り出すことが発見された。）。正常ATF－βAPPのカルボキシ末端25残基は、（１文字アミノ酸命令

法を使用して）以下のものである：

DRGLT TRPGSGLTNI KTEEISEVKM

576 586 596 。

βAPPのSwedish突然変異のカルボキシ末端25残基は以下のものである：

DRGLT TRPGSGLTNI KTEEISEVNL

576 586 596 。

合成ポリペプチド・ハプテンは、アミノ酸が順次成長鎖に付加される、よく知られたMerrifield固相合成技術（Merrifield（1963）J.Am.Chem.Soc.85:2149－2156）により作られることができる。このアミノ酸配列は、上述のATF－βAPPの配列に基づくことができ、又は天然又は遺伝子操作された突然変異体配列を使用することができる。例えば、Swedish突然変異体を真似るペプチドは、リシン^{595}－メチオニン^{596}について置換されたアスパラギン^{595}－ロイシン^{596}をもつであろうし、そして他の置換はメチオニン^{596}についてのロイシン^{596}置換だけを含むことができるであろう。好ましいペプチドは、Swedish ATF－βAPPのカルボミシ末端の５つのアミノ酸:sEVNLを含んで成る。

一旦、十分な量のポリペプチド・ハプテンが得られれば、それを、好適な免疫原性担体、例えば血清アルブミン、Keyhole limpetヘモシアニン、又は他の好適なタンパク質担体であって、概してHudson and Hay,Practical Immunology,Blackwell Scientific Pablications,Oxford,Chapter 1.3,1980（この開示を引用により本明細書中に取り込む。）中に記載されているようなものに結合することができる。

一旦、十分な量の免疫原が得られれば、ATF－βAPPからのβAPの解裂の間に晒されたＣ－末端残基に特異的な抗体を、インビトロ又はインビボ技術により作ることができる。インビトロ技術は、上記免疫原へのリンパ球の暴露を含み、一方、インビボ技術は、好適な脊椎動物宿主内への免疫原の注射を必要とする。好適な脊椎動物宿主は、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギその他を含む非ヒトである。免疫原は、所定のスケジュールに従って上記動物に注射され、そしてこれらの動物は、タイター及び特異性が改良された連続的な採血により周期的に採血される。上記注射は、筋中、腹腔内、皮下その他で行われることができ、そしてアジュバント、例えば不完全Freund'sアジュバントが使用されるであろう。

適宜、モノクローナル抗体を所望の特異性をもつ抗体を産生することができる不死化セルラインを作出することにより得ることができる。このような不死化セルラインは、様々な方法で作られることができる。便利には、小脊椎動物、例えばマウスを先に記載した方法により所望の免疫原を用いて免疫感作する。次にこの脊椎動物を、通常、最後の免疫感作から数日後に殺し、その脾臓を取り出し、そしてその脾臓細胞を不死化する。不死化のやり方は臨界的ではない。現在、最も一般的な技術は、Kohler and Milstein（1975）Nature 256:495－497により最初に記載されたような、ミエローマ細胞融合パートナーとの融合である。他の技術は、EBV形質転換、裸のDNA、例えばコンコジーン、レトロウイルス等による形質転換、又はそのセルラインの安定的な維持及びモノクローナル抗体の生産を提供するいずれかの他の方法を含む。モノクローナル抗体の産生のための特別な技術は、Antibodios:A Laboratory Manual,Harlow and Lane,eds.,Cold Spring Harbor Laboratory,1988（この開示全体を引用により本明細書中に取り込む。）中に記載されている。

モノクローナル抗体とポリクローナル抗体（抗血清）に加えて、本発明の検出技術は、抗体断片、例えばＦ（ab），F_V,V_L,V_H、及び他の断片を使用することもできるであろう。現在、特許及び科学文献中によく記載されているように、組換えにより製造された抗体（免疫グロブリン）及びそれらの変種を使用することもできる。例えば、EPO 8430268.0;EPO 85102665.8;EPO 85305604.2;PCT/GB 85/00392;EPO 85115311.4;PCT/US 86/002269;及び日本国出願85239543（これらの開示を引用により本明細書中に取り込む。）を参照のこと。先に記載したように調製された抗体の結合特異性を真似るであろう他の組換えタンパク質を調製することもできるであろう。

本発明はさらに、通常、実質的な純粋な形態で得られる。単離され、かつ、精製されたATF－βAPPを含んで成る。“実質的に純粋な”とは、タンパク質及び汚染物を実質的含まない少なくとも50w/w（重量／重量）％以上の純度を意味する。好ましくは、ATF－βAPPは、50w/w以上、好ましくは80w/w%以上の純度で単離又は合成されるであろう。ATF－βAPPは、慣用のタンパク質精製技術により天然源から精製されることができ、少なくとも約50w/w%の純度の均一組成物が、慣用の免疫アフィニティー分離技術を使用して上述のように調製された抗体の使用により精製される。好適な天然出発材料は、ATF－βAPP－生産セルラインからのならし培地、例えば胎児脳細胞カルチャーその他を含む。あるいは、ATF－βAPPは、ヒト宿主から得られた生物学的サンプル、例えばCSF、血清その他から単離されることができる。好適なタンパク質精製技術は、Methods in Enzynoucgy,Vol.182,Deutcher,ed.,Academic Press,Inc.,San Diego,1990（この開示を引用により本明細書中に取り込む。）中に記載されている。

上述のように調製された抗体及び精製ATF－βAPPを、β－アミロイド関連疾患のモニタリング及び医薬スクリーニングのために生物学的サンプル、特に患者サンプル及び動物試料中で、そしてβAPPの細胞内プロセシングのモニタリングのための細胞カルチャーからのならし培地中で、ATF－βAPPを検出のための様々な免疫学的技術において使用することができる。好適な免疫学的技術は、イムノアセッセイ、例えばELISA、ウェスタン・ブロット分析その他を含む。多くの特異的免疫学的検出技術をHarlow and Lane、前掲中に記載する。

患者サンプル中のATF－βAPPの検出は、アルツハイマー病及びβ－アミロイド斑沈着に関連する他の疾患、例えばDown's症候群の診断及びモニタリングのために使用されることができる。好適な患者サンプルは、CSF、血液、血清、血漿、尿、組織その他を含む。この疾患の存在は、一般的には、正常個体、すなわちアルツハイマー病又は他のβ－アミロイド関連疾患を患わない個体におけるそれらの値と比べたとき、ATF－βAPPの上昇レベル、又は、ATF－βAPPの量対他の分泌βAPP断片（すなわち、βAP領域に対してカルボキシ末端で又はその内で解裂したこれらのβAPP断片）の量の上昇した比に、関連するであろう。ATF－βAPPの量は、APPの他の種、すなわち、イソ形態（例えば、695,751又は770）及び／又はそのカルボキシ末端によりさらに定められる形態（例えば、Esch et al、により記載された部位において及び／又はそれに対してカルボキシ末端で切断された形態）のいずれか、の量と比較されることができる。開始診断手術に加えて、ATF－βAPPのレベルを、上記疾患の進行を追跡し、そして治療の効果を有効に追跡するために、モニターすることができる。ATF－βAPPのレベルは、有効な治療養生法を用いて減少されることが予想されるであろう。

好適な細胞培養からのならし培地中のATF－βAPPのインビトロ・モニタリングを医薬スクリーニングのために使用することができる。ならし培地中へのATF－βAPPの分泌をもたらす条件下で細胞を培養し、そしてテスト化合物にそれらの細胞を晒すことにより、ATF－βAPP分泌に対するこれらのテスト化合物の効果を観察することができる。ATF－βAPPの量を減少させることができるテスト化合物がβAP形成の阻害剤としてのテストについての候補であるであろうということが予想されるであろう。好適なセルラインは、ヒト及び動物のセルライン、例えば293ヒト腎セルライン、ヒト神経膠セルライン、ヒトHeLa細胞、始原内皮細胞（例えばHUVEc細胞）、始原ヒト線維芽細胞又はリンパ芽細胞（βAPP突然変異をもつ患者から得られた内因性細胞を含む）、始原ヒト混合脳細胞（ニューロン、星状細胞及び神経膠を含む）、チャイニーズ・ハムスター卵巣（CHO）細胞、その他を含む。ATF－βAPPのレベル又は比を優先的に増加させるセルラインは本発明において特に有用であろう。

同様に、アルツハイマー病の動物モデルにおけるATF－βAPPのインビトロ・モニタリング、例えば、WO91/19810（この開示を引用により本明細書中に取り込む。）中に開示されたマウス・モデルも（通常、インビトロ・スクリーニングにより先に同定された化合物のテストについて）治療効果についてテスト化合物をスクリーンするために使用することができる。これらのテスト化合物を、上記動物に投与し、そしてATF－βAPPのレベル又はATF

－βAPP対他のβAPP断片の比を観察する。ATF－βAPPのレベルを減少し、又はATF－βAPP対他のβAPP断片の比を減少させるような化合物がさらなる評価についての候補であると考えられるであろう。

βAPPのβ－セレクターゼ解裂に特に好ましい動物モデルは、上記のようにβAPP遺伝子Swedish突然変異を発現するトランスジェニック動物である。このようなトランスジェニック動物、特にトランスジェニック・マウスは、本発明に係る方法に従って検出されることができるATF－βAPPの高い量を作り出すことが発見された。特に、βAPPのSwedish突然変異が、動物において発現された野生型ヒトβAPPよりも通常、少なくとも２倍高いであろうATF－βAPPの量を作り出すことが発見された。通常、生産は、かなり高く、典型的には少なくとも２倍高いであろう。ATF－βAPP生産のこのように上昇されたレベルにより、異なる条件下でβ－セレクターゼ活性をモニタリングすることがかなり容易にされる。特に、β－セレクターゼ活性を阻害し（そしてこれ故βAPP生産を阻害する）ことについての医薬又は他の療法のスクリーニングは、ヒトβAPPのSwedish突然変異を発現する動物モデルにおいてかなり単純化される。

β－セレクターゼ阻害活性についての医薬のスクリーニングについての動物モデルの使用は、上記のような、インビトロ細胞培養スクリーニング技術が行われた後に、しばしば行われるであろう。インビトロ・スクリーニングにおいて有望な医薬を、次に、テスト動物、例えばテスト・マウスであって、ヒトβAPPのSwedish突然変異を発現し、かつ、トランスジェニックであるものに投与することができる。βAPPのSwedish型を発現するトランスジェニック・マウスを作り出す特別の技術を、以下、実験セクション中に記載する。SwedishヒトβAPPを発現する他のトランスジェニック動物であって、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギその他を含むものの作出が容易に達成されることができることが理解されるであろう。

テスト動物におけるATF－βAPP生産に対するテスト化合物の効果は、テスト動物からのさまざまな試料中で計測されることができる。この実験セクションにおいて、脳ホモジェネート中のATF－βAPPの検出を詳細に記載する。脳ホモジェネート中のATF－βAPPの検出は例示的であるが、必ずしも好ましくない。いくつかの場合には、他の試料、例えば脳脊髄液、血液その他であって動物を殺さずにそのテスト動物から得られることができるものの中でATF－βAPPを計測することが有利であろう。

全ケースにおいて、テスト化合物の非存在下でそのテスト動物のATF－βAPP生産のレベルに特徴的な対照値を得ることが必要であろう。動物が殺される場合には、ヒトβAPPのSwedish突然変異体を発現するようにトランスジェニックに修飾されているが、ATF－βAPPの生産のレベルに影響を及ぼすことが予想されるいずれかのテスト化合物又はいずれかの他の物質の投与を受容していない他のテスト動物からの平均又は典型的な値に上記対象値が基づくことが必要であろう。一旦、このような対照レベルが測定されると、テスト化合物は、平均対照値からの偏差がそのテスト化合物がその動物におけるβ－セレクターゼ活性に対する効果をもつことを示す場合に、追加のテスト動物に投与されることができる。陽性と考えられる。すなわち、アルツハイマー病又は他のβ－アミロイド関連症状の治療に有益であるようなテスト物質は、ATF－βAPP生産のレベルを、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも50%、そして最も好ましくは少なくとも80%程減少させることができるものであろう。

テスト化合物は、細胞又は動物の生命活性を実質的に妨害せずにそのテスト動物に投与され又はその細胞カルチャーに添加されることができるいずれかの分子、化合物、又は他の物質であることができる。好適なテスト化合物は、分子、生物学的ポリマー、例えばポリペプチド、多糖類、ポリヌクレオチドその他であることができる。これらのテスト化合物は、典型的には、約1nM～1mMの、通常、約10μM～1mMのレンジ内の濃度で培養基に投与されるであろう。これらのテスト化合物は、典型的には、1ng/kg～10mg/kg、通常10μg/kg～1mg/kgの投与量において投与されるであろう。

ATF－βAPPの分泌又は動物生産を阻害することができるテスト化合物は、動物及びヒトにおけるβ－アミロイド生産を遮断する能力のさらなる決定についての候補と考えられる。

分泌又は生産の阻害は、βAPのアミノ末端におけるβAPPの解裂が少なくとも部分的に遮断され、β－アミロイド・ペプチドへの変換に利用できるプロセシング中間体の量を減少させる傾向をもつことを示す。

本発明は、さらに、細胞内でβ－アミロイド生産を阻害する方法であって、上記の方法により選択された化合物をこれらの細胞に投与することを含む方法を含んで成る。これらの化合物は、培養細胞によるβAP生産を阻害するために細胞カルチャーに添加されることができる。これらの化合物は、アルツハイマー病及び他のβAP－関連疾患に関連するアミロイド斑の沈着を阻害するために患者に投与されることもできる。

本発明は、上記の方法により選択された化合物を取り込み、そして医薬として許容される担体を含む医薬組成物をさらに含んで成る。このような医薬組成物は、本発明に係る方法により同定された少なくとも１の化合物の治療又は予防量を含まなければならない。医薬として許容される担体は、意図された宿主に化合物をデリバリーするのに好適な、いずれかの相溶性の、非毒性物質であることができる。滅菌水、アルコール、脂肪、ワックス、及び不活性固体を担体として使用することができる。医薬として許容されるアジュバンド、緩衝化剤、分散剤その他をこの医薬組成物中に取り込むこともできる。活性剤を取り込む医薬条件の調製は、医学及び科学文献中によく記載されている。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Company,Easton,Pennsylvania,16th Ed.,1982（この開示を引用により本明細書中に取り込む。）を参照のこと。

先に記載した医薬組成物は、非経口、表在局所的、及び経口投与の両方を含む、宿主への全身投与に好適である。医薬組成物は、経口、すなわち皮下、筋中、又は静脈内に投与されることができる。従って、本発明は、宿主への投与のための組成物であって、上記のように、許容される担体中の同定化合物の医薬許容溶液を含んで成るものを提供する。

しばしば、脳に直接的に又は間接的に上記医薬組成物を導入することが望ましく又は必要であろう。直接的技術は通常、血液脳関門をバイパスするための、宿主脳室系内へのドラッグ・デリバリー・カテーテルの置換を含む。一般に好ましい間接的技術は、脳溶性医薬への親水性医薬の変換による医薬潜伏（latentiation）を提供するための組成物の配合を含む。潜伏は一般的に、その医薬により大きな脂溶性を付与し、そして血液脳関門を横切る輸送を受け易くするために、その医薬上に存在するヒドロキシル、カルボキシル、及び第一アミン基をブロッキングすることにより達成される。あるいは、親水性医薬のデリバリーは、過渡的に血液脳関門を開けることができる高張溶液の動脈内輸注により強化されることができる。

医薬担体中の化合物の濃度は、広く、すなわち、約0.1重量％未満～約20重量％以上の医薬組成物において変化することができる。筋中注射のために典型的な医薬組成物は、例えば１～4m▲l▼の滅菌緩衝水及び１μｇ～1mgの本発明に係る方法により同定された化合物を含むように調製されるであろう。静脈内輸注のために典型的な組成物は、100～500m▲l▼の滅菌Ringer's溶液及び約１～100mgの化合物を含むように調製されることができるであろう。

本発明に係る医薬組成物は、βAPの沈着に関連する疾患、例えばアルツハイマー病、Down's症候群の予防及び／又は治療のために投与されることができる。治療用途においては、医薬組成物は、既に疾患を患った宿主に投与される。医薬組成物は、βAP斑のさらなる沈着を阻害するのに十分な量で投与されるであろう。これを達成するのに適切な量は、“治療的有効投与量”として定義される。このような有効投与量は、その疾患の程度、その宿主のサイズ、その他に依存するであろうが、一般的には、宿主の体重１キログラム当り約0.01μｇ～10mgの化合物のレンジにあり、0.1μｇ～1mg/kgの投与量がより一般的には使用される。

予防用途のためには、本発明に係る医薬組成物は、βAP疾患に感受性のあるそのような疾患を既に患ってはいない宿主に投与される。このような宿主は、医学文献中に記載されるように、遺伝子スクリーニング及び臨床分析により同定されることができる。医薬組成物は、ひじょうに初期の段階においてβAP斑の沈着を阻止又は妨害することができるのであろうし、好ましくは、β－アミロイド疾患の初期段階さえも妨害するであろう。予防的に

有効な投与量という、上記予防的処置に必要な化合物の量は、一般的、治療的処置のために先に記載したものと同じである。
以下の実施例を、限定のためでなく、説明のために提供する。
実験
材料及び方法
1.抗体及びアフィニティー・マトリックス調製
モノクローナル抗体6C6を、免疫原としてウサギ血清アルブミンに結合したβAP残基１～28を含む合成ペプチドを使用して抗体10D5（Hyman et al.（1992）J.Neuropath.Exp.Neurol.51:76）と同じやり方で、作り、そしてスクリーニングした。10D5と6C6の両方が、βAP配列の最初の16アミノ酸内のエピトープを認識する。6C6は、免疫沈降において10D5よりもより効率的であり、そして捕獲抗体として使用された。6C6樹脂を調製するために、4m▲l▼のAffigel▲R▼10（Bio－Rad Laboratories,Hercules,CA）を、冷水により洗浄し、そして3m▲l▼の6C6（PBS（2.7mM KCl,1.5mM KH_2PO_4,8.1mM Ma_2HPO_4,137mM NaCl,pH7.5）中12.5mg/m▲l▼ 0.5M NaCl）と併合した。
上記カップリングを、穏やかに振とうしながら４℃において一夜進行させた。400μ▲l▼の1M Tris,pH8.0を次に添加し、そして振とうを40分間続けた。次にこの樹脂を使用前にTTBS（137mM NaCl,5mM KCl,25mM Tris,0.5%Tween▲R▼20,pH7.5）により十分に洗浄した。抗体7H5はHyman et al.（1992）、前掲中にも記載されている。抗－５抗体は、βAPP 444－592（Oldersdorf et al.（1989）前掲、及び（1990）前掲に対して作られた。
抗体（抗体92という）を、（Kang et al.（1987）前掲中で番号付けされたような）βAPPの残基591－596を含む合成ペプチドに対して作った。このペプチド（Ｎ－アシル－CISEVKM）を、免疫原を作るためにスルホ－マレイミド・ベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド・エステルにより活性化されたウサギ血清アルブミンに結合した。抗血清を、標準的な方法論によりウサギにおける免疫原に対して作った。各々の接種の間に、ウサギは、約10部位における0.1m▲l▼の皮下注射において５μｇの免疫原を受容した（50μg/ブースト）。同一ペプチドを、IgG画分からの抗体のアフィニティー精製のためにSulfo－link™ゲル（Pierce Chemical Co.,Rockford,IL）に結合した。
上記抗体92調製のより詳細な説明は以下のようなものである。ウサギ血清アルブミン（12.3mg）を、０℃において20分間1.25m▲l▼の0.05M KH_2PO_4,pH7.0中のスルホ－マレイミド・ベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド・エステル13mgとインキュベートした。次にこの混合物を、直ちに、ホスフェート・バッファーにより平衡化したSephadex G－10の１×75cmカラム上でのゲル濾過に供した。排除用量中のタンパク質溶出液をプールし、そして直ちに、標準的な自動化された固相方法論により合成されたＮ－アセチル－CISEVKMペプチド30mgと併合した。
上記カップリング反応（20m▲l▼容量）を一夜進行させ、そしてその後、抗体生成のための商業施設に送った。その注射プロトコールは、等容量のFreund's完全アジュバント中に抗原を乳化させ、そして全部で、約10部位における0.1m▲l▼アリコート中の抗原50μｇを皮下注射することであった。その後３週間毎に、ブースター注射を同一プロトコールにより与えた。但し、Freund's不完全アジュバントを乳化剤として使用した。ウサギから各注射の１週間後に採血し、そしてその血清をELISAにおけるペプチドに対する反応によるタイターについて調べた。IgGを、50%（NH_4）$_2SO_4$（２倍）による沈殿により陽性反応血清から精製し、そしてPBSに対して透析した。Ｎ－アセチル－CISEVKMペプチドを、そのペプチド特異的抗体を精製するためのアフィニティー樹脂を生成するために製造者の推奨を使用してSulfo－link™ゲル（Pierce Chemical Co.,Rockford,IL）に結合した。このIgG画分を上記カラムに適用し、そしてPBSによる非特異的結合材料の洗浄後に、抗体を0.1MグリシンpH2.5 0.5M NaClにより溶出し、そして次に凍結乾燥前にPBSに対して透析した。
Swedish 192抗体を、Swedish βAPP配列の残基590－596から成る合成ペプチドに対して作った。このβAPPに加えて、２つのグリシンとシステインをスペーサー及びリンカーとして付加して以下の配列:CGGEISEVNLを得た。このペプチドを、商業的に入手可能なマレイ

ミド活性化カチオン化ウシ血清アルブミン（Pierce Imject Supercarrier Immune Modulator、以下cBSAという。）に結合した。抗血清を抗体92のために先に記載した注射スケジュールに従って作った。
一般的に、cBSAを10mg/m▲l▼の濃度まで脱イオン水中で再懸濁させた。等ミリグラム量のペプチドを上記担体に添加し、そして室温において４時間混合した。次に結合物を、カルシウム及びマグネシウムを含まないDulbecco'sホスフェードバッファー生理食塩水に対して十分に透析した。
この結合物を６％Novex前注入Tris－グリシン・ゲル上で出発cBSAを比較した。首尾より結合がより高い分子量への可視性シフトにより示された。
2.ヒト胎児脳細胞培養
胎児神経組織試料を12～14週齢の胎児死体から得た。脳皮質のサンプルをHank's Balance Saline Solution（HBSS）により２回濯いだ。皮質組織（２～３グラム）を10m▲l▼の冷HBSS中に入れ、それに1mgのDNase（Sigma Chemical Col.,St.Louis,MO D3427）を添加した。Pulliam et al.（1984）J.Virol.Met.9:301により記載されたように、Nitexナイロン・スクリーンを通して粉砕懸濁液を濾過した。
これらの細胞を遠心分離により収穫し、そしてニューロン培地（10％胎児ウシ血清、１％グルコース、1mMピルビン酸Na、1mMグルタミン、20mM KClにより強化されたMEM）中に懸濁された。ポリエチレンイミン・コート100mm皿に、8m▲l▼のニューロン培地中の1.5×10^7細胞を接種した。この培地を１週間に２回交換した。本試験における全てのカルチャーをインビトロにおいて少なくとも30日間培養した。無血清増殖条件のために、カルチャーを、所定培地（５μg/m▲l▼ウシ・インスリン;0.1mg/m▲l▼ヒト・トランスフェリン;0.1mg/m▲l▼ BSA画分V;0.062μg/m▲l▼プロゲステロン;1.6μg/m▲l▼プトレシン（putrescine）;0.039μg/m▲l▼亜セレン酸ナトリウム;0.042μg/m▲l▼チロキシン；及び0.033μg/m▲l▼トリヨード－Ｌ－サイロニンを補ったDMEM）内に移し、そして３日後に、その上清を収穫した。
これらの細胞からのならし培地（10μ▲l▼）を収穫した。EDTA（5mM）、ロイペプチン（leupeptin）（10μg/m▲l▼）、及びTris－HCl（20mM,pH8.0）を上記最終濃度において各10m▲l▼サンプルに添加し、そしてそのサンプルを４℃において20分間30,000×ｇにおいて回転させた。得られた上清を２つの等アリコートに分け、6C6樹脂をそれらのアリコートの中の１（約5mg/m▲l▼の結合6C6を含む200μ▲l▼の樹脂）に添加した。両アリコートを４℃において６時間緩やかに混合し、この樹脂をペレット化し、そして第２の200μ▲l▼アリコートの樹脂を添加した。これらのサンプルを４℃において一夜さらに混合した。上記併合樹脂をTTBSにより２回洗浄し、次に0.1Mグリシン、0.1M NaCl,pH2.8の1m▲l▼アリコートにより２回簡単に抽出した。
上記樹脂から抽出された材料、その樹脂により消耗された培地、及びその出発培地を１時間０℃において10％TCA（トリクロロ酢酸）により別々に沈殿させ、それらのペレットをアセトンで洗浄し、そして次に還元条件下150μ▲l▼のSDS－PAGEサンプル・バッファー中に再懸濁させ、そして沸騰させた。各々のサンプル（25μ▲l▼）を10－20％トリシン（tricine）ゲル（Novex）を使用してSDS－PAGEに供した。これらのタンパク質を40Vにおいて一夜ProBlot PVDF膜に移した。免疫反応性タンパク質の可視化は、AMPPD基質についての製造者の指示に従ってTROPIX化学発光システムを使用した。使用した１次抗体濃度は：抗5,0.1μg/m▲l▼;92,2μg/m▲l▼;10D5,2μg/m▲l▼であった。
3.ヒト293細胞の培養
ヒト293細胞（ATCC No.CRL－1573）をAPP（Selkoe et al.（1988）Prov.Natl.Acad.Sic.USA 85:7341）を過剰発現するように修飾した。細胞を使用前に、10cm皿内で集密下まで増殖させた。代謝標識付け及び免疫沈降を本質的にOltersdorf et al.（1989）Nature 341:144及び（1990）J.Biol.Chem.265:4492中に先に記載されたように行った。要するに、標識付けを10cm皿内で行った。これらの細胞をメチオニン不含培地中で洗浄し、0.5nCi^{35}S－メチオニンを補った2m▲l▼のメチオニン不含培地中で20分間インキュベートし、全培地（full medium）中で洗浄し、そして3m▲l▼の全培地中で２時間チェースした。ならし

培地を集め、そしてプロテインA Sepharose▲R▼（Pharmacia,Piscatamy,NJ）による前吸収前10分間3000×ｇにおいて清澄化した。免疫沈降をサンプル当り1.5mgプロテインA Sepharose▲R▼を用いて行った。抗体抗－５をサンプル当り２μｇにおいて使用し;6C6,7H5及び92をサンプル当り10μｇにおいて使用した。5mgのウサギ抗マウスIgGを6C6と7H5と共に、そして対照サンプル中で使用した。沈殿物をTBS（137mM NaCl,5mM KCl,25mM Tris,pH7.5,0.1%NP40,5mM EDTA,1mM PMSF,10μg/m▲l▼ロイペプチン）中で４回洗浄した。SDS－PEGEを５％Laemmliゲル上で行った。

4.Swedish突然変異によりトランスフェクトされたヒト293細胞の培養

製造者（Boehringer Maunheium）により記載されたようなDOTAP仲介トランスフェクションを使用して正常ヒトβAPP又はSwedish突然変異変異体βAPPのいずれかを発現するプラスミド・ベクターにより、ヒト腎293細胞の６ウェル・トレー内の２連ウェルを過渡的にトランスフェクトした。40時間後、これらの細胞を10%胎児子ウシ血清を含むメチオニン不含DME中に入れ、そして20分後、それらを200μci/m▲l▼^{35}S－メチオニンにより35分間標識付けした。次にこれらの細胞を10%胎児子ウシ血清を含む通常DMEに培地中に戻し、そしてさらに2.5時間インキュベートした。この培地をこれらの細胞から集め、そして15分間1000×ｇにおいて回転させて全細胞を除去した。上清を半分に分け、そして半分を標準的な方法により抗－５抗体により免疫沈降させた。他の半分を、アガロース結合した6C6抗体により一夜インキュベートし、そしてその6C6アガロースに結合した材料を遠心分離により分離した。残りの材料を次に抗－５抗体により免疫沈降させた。全抗－５免疫沈降物（α５＋）、6C6結合沈降物（6C6＋）及び6C6非反応性抗－５反応性免疫沈降物（6C6－,α５＋）を５％Laemmliゲル上で走らせ、そして免疫反応性タンパク質をオートラジオグラフィーにより可視化した。

5.Swedish 192抗体の特異性

Swedish βAPPタンパク質を過剰発現するように安定してトランスフェクトされた293腎細胞からのならし培地を集めた。１ミリリッター・アリコートを、100μ▲l▼の固定化6C6－アフィニティー樹脂（上記参照）又は100μ▲l▼のヘパリン・アガロース（Sigma）のいずれかに添加した。6C6樹脂との反応は４℃において５時間であった；ヘパリン－アガロースを４℃において30分間反応させた。インキュベーション後、これらの樹脂をTTBSにより洗浄し、そして次に２×SDS－PAGEサンプル・バッファー100μ▲l▼を各サンプルに添加し、これらのサンプルを沸騰させ（５分間）、そして短時間遠心分離した。20μ▲l▼のサンプルを６％SDS－ポリアクリルアミド・ゲル上にロードし、そして電気泳動した。これらのタンパク質を上記のようにProBlot▲R▼膜に移した。これらのサンプルを以下の抗体:6C6（上記）、Swedish 192（上記）、又は8E5（695形態の番号付けを使用した。アミノ酸444－592の領域内のβAPPのエピトープを認識するモノクローナル抗体）によりプローブした。全抗体を上記免疫ブロットのブロービングの間２μg/m▲l▼において使用した。免疫反応性材料の可視化は、製造者の推奨に従ってAmersham ECL▲R▼システムを使用して達成された。ブロッキングと抗体希釈をTTBS中５％脱脂乾燥乳（Carnation）を使用して行った。

6.トランスジェニック・マウス

トランスジェニック・マウスを図７に示すプラスミド（NSEAPP$_{SW}$とNESAPP$_{SW}\Delta_{3'}$）を使用して生成した。これらのプラスミドは、Swedish突然変異（695形態の595と596位におけるKM～NL）を含むβAPPの751形態を含む。神経特異的エノラーゼ・プロモーターは発現を駆動し、そしてスプライス配列を提供する。ラットNSEプロモーターとスプライス配列はpNSE 6（Okayama and Berg（1982）Mol.Cell.Biol.2:161－170）から得られた。このベクターは、ベクターpSP65（Promega）のBamH I部位におけるクローン化された（上流Bgl II部位から出発し、そして第２イントロン内のBgl II部位に継がる）ラットNSEプロモーター領域の4.2kb Bgl II断片を含む。上記プロモーターの５′－末端におけるベクター誘導×ba I部位はそのプロモーターの５′末端を定め、そして上記第２イントロン内に含まれたNSE翻訳開始ATGはβAPP開始ATGに融合された。

NSEAPP$_{sw}$は、その遺伝子の３′領域内のSV40からのスプライス配列をも含む。このスプラ

イス配列は、Okayama/Bergベクターpl1から誘導され、そしてその後期16sと19sメッセージ・スプライス配列（Forss－Petter et al.（1990）Neutron 5:187－197）の融合物である。ポリアデュレーションはSV40配列により提供される。
これらのプラスミド配列を取り込むトランスジェニック・マウスは、標準的な技術を使用して作出された。上記発現カセットを含むNot I断片を精製し、C57B1/DBAハイブリッド・マウスから得られた卵に注射した。これらの卵を偽妊娠マウス内に移動し、そして子を、PCR、スロット・ブロット及びサザン分析により尾DNA内のプラスミド配列の存在についてスクリーニングした。このように作出された創始者マウス（founder mice）をそれらのF1トランスジェニック子孫の分析によりヒトβAPPの発現についてスクリーニングした。このF1動物からの脳を、ハンド・ホールド・ホモジェナイザー（polytron PT122B,Kinematica AG）を用いてSDSバッファー（２％SDS,20mM Tris pH8.0、150mM NaCl,10mM EDTA）又はNP－40バッファー（１％NP40,50mM Tris pH7.5,10mM EDTA、及び５－10μg/m▲l▼ロイペプチン、２－４μg/m▲l▼ペプスタチンA、５－10μg/m▲l▼アプロチエン、及び１－2mM PMSFを含むプロテアーゼ阻害剤のカクテル）中のいずれかで、ホモジェナイズした。このSDS溶解物をウェスタン分析のためにゲル上に直接的にロードした。NP40ホモジェネートをBeckman超遠心分離機（Tl 100.3ローター）内で10分間55,000rpmにおいて回転させ、そしてこれらの上清をウェスタン分析のためにゲル上にロードした。ウェスタン分析をヒト特異的βAPPを検出するために、抗－５（0.4μg/m▲l▼）又は8E5（５μg/m▲l▼）抗体のいずれかを使用して標準的な手順により行った。比較的高レベルのβAPPを発現するような系列をさらなる分析のために選んだ。これは、系列Hiblary 14,Chelsea 32とChelsea 58を含んでいた。ここに記載する実験を、野生型動物とトランスジーン含有動物を交配させ、そしてそのトランスジーンの存在についてその子孫をスクリーニングすることにより誘導された上記系列のヘテロ接合動物について行った。同様に、選ばれた多数の系列からのホモ接合動物を使用することができる。

実験図面の説明

図2:ヒト混合脳細胞培養からのならし培地中の切段βAPPの立証
サンプル１はカルチャーからのならし培地であり；サンプル２は6C6－反応性βAPPが減少された培地であり；そしてサンプル３は6C6樹脂から抽出された材料である。パネルAは、βAPP配列444－592（Oltersdorf et al.（1988）前掲、及び（1990）前掲）に対して生じた抗－５抗体によりプローブされた。パネルBは、材料及び方法セクション中に記載された。抗体92によりプローブされた。パネルCは、材料及び方法セクション中に記載されたような、βAP残基１－16内でエピトープを認識するモノクローナル抗体、10D5によりプローブされた。C2とC3内で観察された低分子量バンドはC1内で見られ、そして6C6樹脂から誘導され、そして１次抗体から独立してヤギ－抗－マウスIgGアルカリ性ホスファターゼ結合体により認識された（データを示さず）。

図3:92抗体の特異性
75歳の男性から得られたヒト要部CSF試料の１ミリリッターを10倍濃度を行うために10％TCAにより沈降させ、そして図２に記載したように処理した。但し、そのゲル・ウェルは4cmスロットであった。この92抗体を、緩やかに混合しながら４℃において10時間、各々約60μMの濃度において様々な潜在的に競合するペプチドの存在中0.5μ▲l▼のTTBS中6.7μg/m▲l▼に希釈した。次にこの抗体を、CSF－誘導材料のブロットのストリップとのインキュベーション前に１％ゼラチン/TTBS中で８倍に希釈し、そして図２に記載したように処理した。これらの競合ペプチドは以下のものであった：レーン１、競合ペプチドの添加なし；レーン2,GSGLTNIKTEEISEVK:レーン3,YSGLTNIKTEEISEVKM;レーン4,ISEVKM;レーン5,EISEVKMD;レーン6,CISEVKM;レーン7,YISEVKM。MW＝（キダルトンにおいて示す）分子質量マーカー。

図4:セルラインにおける異なるC－末端に対する抗体により検出された免疫沈降及び１次ヒト胎児脳カルチャーにおけるAPPの分泌形態の分子質量不均質性
抗体：抗－5:レーン3,6,9;6C6（βAPペプチド残基１－16に対して向けられたもの）：レーン4,7,10;抗体92（APPアミノ酸591～596に対するもの）：レーン5,8,11;7H5（APP－KPI

に対するもの）：レーン12。細胞：左パネル（レーン１と３－５）:APP695により安定してトランスフェクトされた293細胞；中央パネル（レーン２と６－８）:APP751により安定してトランスフェクトされた293細胞；右パネル（レーン９－13）：ヒト胎児脳カルチャー。対照：レーン1,2、と13:ウサギ抗マウスIgG抗体。矢印：抗体6C6と92により認識されたAPPの分泌形態の間の分子質量差異の例。SDS－PAGEを５％Laemmliゲル上で行った。MW＝（キロダルトンにおいて示す）分子質量マーカー。

図5:Swedish突然変異によりトランスフェクトされたヒト293細胞からのならし培地中の切断βAPPの立証

図５は、正常とSwedish形態の両方についての２連トランスフェクションからの結果を示す。レーン１－４はα５＋であり；レーン５－８は6C6＋であり；そしてレーン９－12は6C6－，α５＋サンプルである。レーン1,2,5,6,9及び10は正常βAPPからのものであり、レーン3,4,7,8,11及び12はSwedish βAPPからのものである。このSwedish突然変異は、増加されたATF－αAPPPの生産をもたらす。なぜならば、レーン11と12がレーン９と10よりもより多くのATF－βAPP材料を含むからである。

図6:Swedish 192抗体特異性を立証する免疫ブロット

図６は、Swedish 192抗体の特異性を立証する免疫ブロットを示す。レーン1,3,5はヘパリン・アガロースから溶出された材料を含む。レーン2,4,6は6C6樹脂から溶出された材料を含む。レーン１と２は抗体8E5によりプローブされ；レーン３と４はSwedish 192抗体によりプローブされ；レーン５と６は抗体6C6によりプローブされた。

図7Aと7B;プラスミド・マップ

図7Aと7Bは、それぞれ、pNSEAPP$_{SW}\Delta_3$，とpNSEAPP$_{SW}$のプラスミド地図であり、これを上述のようにトランシジェニック・マウスを作出するために使用する。

図8:ウェスタン・ブロット

図８は、Swedish 192抗体と反応性の分泌βAPP断片の存在についてプローブさたトランスズェニック及び対照動物脳の可溶性画分のウェスタン・ブロットである。レーン1:分子量マーカー；レーン2:非－トランスジェニック系列；レーン3:トランスジェニック系列。

図9:ウェスタン・ブロット

図９は、抗体8E5（パネルＡ）とSwedish 192抗体（パネルＢ）によりプローブされた6C6抗体－反応性βAPP形態が減少されたトランスジェニック（＋）と非－トランスジェニック（－）動物からの脳モホジェネートのウェスタン・ブロットである。

結果

残基７－16内のβAPのエピトープを認識するモノクローナル抗体6C6を、各種サンプルから特定のβAPPを免疫－消耗させるために使用した。モノクローナル抗体6C6を（上記のような）樹脂に結合し、そして上記のようにヒト胎児脳細胞カルチャーからのならし培地と共にインキュベートした。見て分かるように（図２、レーンC2）この樹脂は、その細胞培養のならし培地からのβAP1－６を含むβAPPを有効に除去する。しかしながら、実質的なβAPP免疫反応性は、βAP領域に対してＮ－末端にあるエピトープに対して向けられた抗－５抗体により検出されるように、上記樹脂により捕獲されない（図２、レーンA2）。βAPPのこの明らかに新規な形態を特徴付けるために、我々は、（上述のような）βAPP残基591－596を含む合成ペプチドに対して抗体を作った。この抗体（92という。）は、上記樹脂により捕獲されないβAPPの種を認識するが（図２、レーンB2）、驚ろくべきことに、βAP7－16配列を含むβAPPの分泌形態とは反応しない（レンーB3）ことが発見された。この交差反応性の欠如についての説明は、92抗体が、残基596に対応するカルボキシ末端メチオニンを含むβAPP内のエピトープを認識するということであるようである。従って、我々は、92により生成された免疫反応性をブロックする様々な合成ペプチドの能力について調べた。図３に見られるように、メチオニン596の等価物で終わるβAPP配列－ベースのペプチドは、92の反応を実質的にブロックし、一方、それらのカルボキシ末端において１アミノ酸長いか又は短いペプチドが競合において比較的無効である。ペプチド競合の同一パターンが、細胞培養上清（データを示さず）及びCSF中で観察された。一連のパルス－チェース実験は、抗体92免疫沈降性材料の検出可能量がβAPPの695又は751イソ形態の

いずれかを過剰発現する293細胞により作り出される。（図４、レーン５と８）。ヒト胎児脳細胞カルチャーに対する同様の実験は、92免疫沈降性材料が、低パーセンテージ（５％）SDS－PAGEにより6C6反応性βAPPから分割されることができることを示す（図４、レーン９－11）。胎児脳細胞カルチャーにおいては、Kunitzプロテアーゼ阻害性ドメイン（KPI）－含有βAPP形態の他のプロセシングはほとんど明らかでない。但し、かすかな同時移動するバンドが抗体92と抗－KPI抗体7H5免疫沈降により観察される（レーン11,12）。混合脳カルチャー中の抗体92と6C6沈殿性材料を溶解する能力は、少なくとも一部、293細胞における状況に比較したときに作られた対応形態のほとんど等量に依る。Estus et al.（1992）、前掲は、他の組織と比較した場合、ヒト脳が、サイズに基づく、βAPaアミノ末端で又は付近で始まるようである比較的高い量の潜在的にアミロイド形成性のカルボキシ末端断片を含むことを観察した。

抗体92と6C6沈殿性βAPP材料の外観の一時的な一致は、分泌後に生じる第２タンパク質分解事件の傾向に対して反対の議論をする。特に、より長いチェース時間が、92と6C6反応性種（データを示ず）の比における顕著な変更をもたらさないからである。これらの種の免疫交差反応性の完全な欠如と対になる、SDS－PAGEによる分泌形態の解析は、さらに、他の分泌経路の存在を立証する。他の解裂部位は、β－セクレターゼ部位といわれ、βAP内で生じるEsch et al.（1990）前掲により記載された解裂から明確なものとして、解裂がそのβAPに対してアミノ末端で生じるということを強調する。

図６、レーン４中に見られるように、Swedish 192抗体は、より多くの全βAPPがレーン３に比べてレーン４中に存在するという事実にも拘らずβAPPの6C6反応性形態をはっきりと認識しない（レーン１と２を比較のこと。）。部分的βAP配列（6C6－反応性）を含むβAPP形態と反応性の欠如は、βAPのアミノ末端において又は付近で解裂したβAPPを認識するが、これはβAPPがこの領域の後に延びるときではないということを示唆する。

上記用途、動物モデルとしてこのアプローチを立証するために、トランスジェニック動物脳の可溶性画分を、分泌されたβAPPの“92"形態の存在のためにプローブした（図８）。この形態は、βAPの生産の副生成物として作られ、そして培養細胞内でのこの形態の生産の阻害は、βAPのＮ－末端、β－セクレターゼにより解裂された部位の解裂の阻害を伴う。

トランスジェニック（Swedish Hillary 14）又は非トランスジェニック・マウスからの脳は、上記のプロテアーゼ・インヒビター・カクテルと共に50mM Tris 10mM EDTA中でホモジェナイズされ、そして上記のように10分間55Krpmにおいて遠心分離した。上清を、β－セレクターゼにより作られたβAPPの分泌形態とだけ反応するSwedish“192"抗体を使用するウェスタン・ブロットにより分析した。ウェスタン分析のために、タンパク質を（Novexからの）$6Y_0$ SDS PAGEゲル上で分離し、そして次に標準的な技術によりimmobilon Pに移した。このフィルターを、標準的な技術を使用して２μg/m▲l▼のSwedish“192"抗体とインキュベートし、そしてその結合抗体をAmersham ECLキットを使用して可視化した。図８、レーン３に示すように、トランスジェニック動物からの上清中に強く検出可能な“192"反応性材料が在った。非－トランスジェニック動物脳ホモジェネートは、トランスジェニック動物に特異的な材料よりもそのゲル上の移動性において僅かに速い小量の免疫反応性材料を含んでいた（レーン１）。この材料は、たぶんβAPPとは関係しない。なぜなら、それが、他のβAPP抗体（例えば、抗－５）とハイブリダイズしないからである。

組織培養システム内では、Swedish 192抗体は、βAP配列の中央にある17位におけるα－セレクターゼ部位において解裂する分泌βAPPと交差反応しない。これがマウス・モデルにおいても本当であることを証明するために、脳ホモジェネートを、βAPの最初の16アミノ酸に特異的であり、そしてそれ故、α－セクタレーゼ解裂分泌βAPP断片のアミノ末端断片と反応するが、より短いβ－セクレターゼ解裂分泌βAPP断片と反応しない。6C6抗体に結合した樹脂を使用してα－セクレターゼ－解裂βAPP形態を減少させる。樹脂は、製造者（Sterogene）により記載されるように懸濁液中で結合されたActigel－ALSを使用して作られた。過剰の樹脂抗体を、振とうしながら４℃において３時間の最初のインキュベーションの間、上記トランスジーンを含むか又は含まないかのいずれかの動物からの脳ホ

モジェネートと共にインキュベートし、そして結合及び非結合材料を１分間14,000rpmにおける遠心分離により分離した。この上清を再び、４℃において16時間、過剰の6C6結合樹脂とインキュベートし、そして再び非結合材料を分離するために遠心分離した。この最初のインキュベーションの間に結合した材料及び6C6結合樹脂に結合しなかった材料を8E5とSwedish 192抗体を使用するウェスタン・ブロットにより分析した（図９）。
トランスジェニック（＋）又は非－トランスジェニック（－）マウスからのホモジェネートを8E5（パネルＡ）又はSwedish 192（パネルＢ）によりプローブした。レーン１は全ホモジェネートをいい、レーン２は6C6樹脂に結合しなかった画分（すなわち、βAPPのα－セレクターゼ解裂断片を減少されたもの）をいい、そしてレーン３は、6C6結合樹脂に結合した画分（すなわ、βAPPのα－セクレターゼ解裂断片を保持するもの）をいう。抗－５抗体に対するその反応性により同定された結合βAPPのいずれも、Swedish 192抗体と交差反応しなかった。抗－５に対する反応性により同定された非結合材料は、Swedish 192抗体と反応した。
従って、本発明は、βAP及び関連断片へのβAPPのプロセシングを顕出させるための生きた動物モデルを提供し、そしてさらにβ－セクレターゼ活性のインヒビター及び／又はβ－セクレターゼ活性を調節する医薬についてのスクリーニングのための便利なシステムを提供する。
本発明の理解の明確さを目的として詳細に記載してきたが、特定の修正を添付クレームの範囲内で行うことができることは自明であろう。
配列　表
（１）一般情報：
（ｉ）出願人:ATHENA NEUROSCIENCES,INC.
（ii）発明の名称：ベーターアミロイド・ペプチド生産インヒビターについてのスクリーニング方法
（iii）配列の数:12
（iv）あて名：
（Ａ）名あて人:Townsend and Townsend Khourie and Crew
（Ｂ）街:One Market Plaza,Steuart Tower,Ste.2000
（Ｃ）市:San Francisco
（Ｄ）州:California
（Ｅ）国:USA
（Ｆ）郵便番号:94105
（ｖ）コンピューター読込み形態：
（Ａ）媒体タイプ：フロッピー・ディスク
（Ｂ）コンピューター:IBM PC互換性
（Ｃ）オペレーティング・システム:PC－DOS/MS－DOS
（Ｄ）ソフトウェア:PatentIn Release ＃1.0,Version ＃1.25
（vi）先の出願データ：
（Ａ）出願番号:US 08/143,697
（Ｂ）出願日:1993年10月27日
（Ｃ）分類：
（vii）先の出願データ：
（Ａ）出願番号:US 07/965,971
（Ｂ）出願日:1992年10月26日
（viii）先の出願データ：
（Ａ）出願番号:US 07/868,949
（Ｂ）出願日:1992年４月15日
（ix）アトーニー／エージェント情報：
（Ａ）氏名:Heslin,James M.
（Ｂ）登録番号:29,541

（Ｃ）参照／書類番号:15270－４－2PC
（ｘ）遠距離通信情報：
（Ａ）電話:415－326－2400
（Ｂ）ファックス:415－326－2422
（２）配列番号:1についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ:16アミノ酸
（Ｂ）タイプ：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子タイプ：ペプチド
（xi）配列番号:1

Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys
1 5 10 15

（２）配列番号:2についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ:17アミノ酸
（Ｂ）タイプ：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子タイプ：ペプチド
（xi）配列番号:2

Tyr Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys
1 5 10 15

Met

（２）配列番号:3についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ:6アミノ酸
（Ｂ）タイプ：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子タイプ：ペプチド
（xi）配列番号:3

Ile Ser Glu Val Lys Met
1 5

（２）配列番号:4についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ:8アミノ酸
（Ｂ）タイプ：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子タイプ：ペプチド
（xi）配列番号:4

Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
1 5

（２）配列番号:5についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ:7アミノ酸
（Ｂ）タイプ：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子タイプ：ペプチド
（xi）配列番号:5

Cys Ile Ser Glu Val Lys Met
1 5

（２）配列番号:6についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ:7アミノ酸
（Ｂ）タイプ：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子タイプ：ペプチド
（xi）配列番号:6

Tyr Ile Ser Glu Val Lys Met
1 5

（２）配列番号:7についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ:5アミノ酸
（Ｂ）タイプ：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子タイプ：ペプチド
（xi）配列番号:7

Asp Arg Gly Leu Thr
1 5

（２）配列番号:8についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ:10アミノ酸
（Ｂ）タイプ：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子タイプ：ペプチド
（xi）配列番号:8

Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile
1 5 10

（２）配列番号:9についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ:10アミノ酸
（Ｂ）タイプ：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子タイプ：ペプチド
（xi）配列番号:9
Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met
1 5 10

（２）配列番号:10についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ:10アミノ酸
（Ｂ）タイプ：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子タイプ：ペプチド
（xi）配列番号:10
Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Asn Leu
1 5 10

（２）配列番号:11についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ:5アミノ酸
（Ｂ）タイプ：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子タイプ：ペプチド
（xi）配列番号:11
Ser Glu Val Asn Leu
1 5

（２）配列番号:12についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ:9アミノ酸
（Ｂ）タイプ：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数:1本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子タイプ：ペプチド
（xi）配列番号:12
Cys Gly Gly Glu Ile Ser Val Asn Leu
1 5

【図１Ｂ】

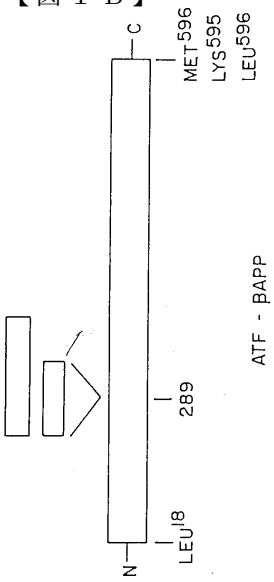


FIG. IB.

【図２Ａ】

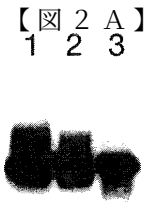


FIG. 2A.

【図６】

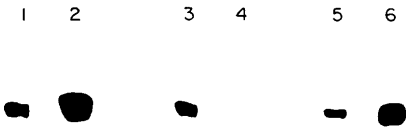


FIG. 6.

【図１Ａ】

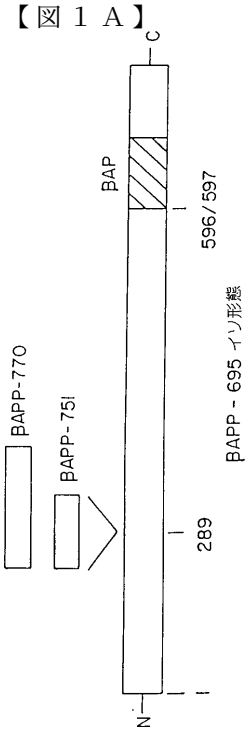


FIG. IA.

【図２Ｂ】



FIG. 2B.

【図２Ｃ】
1 2 3



FIG. 2C.

【図３】

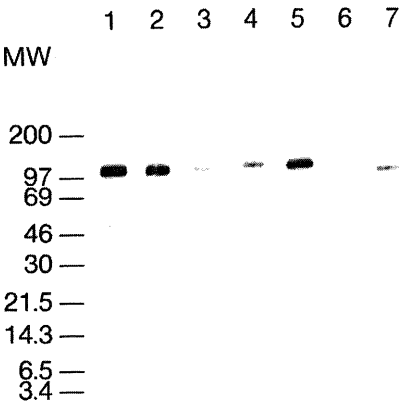


FIG. 3.

【図８】
FIG. 8



【図４】

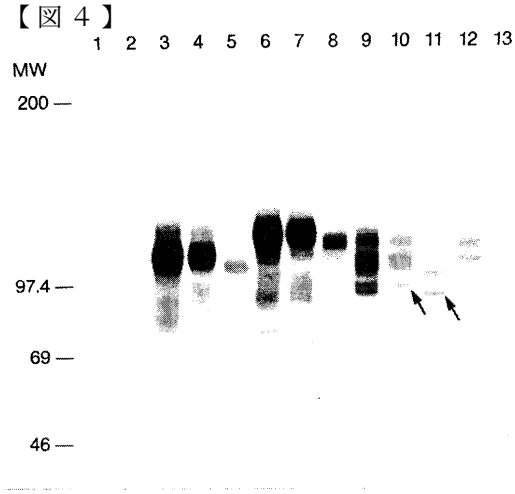
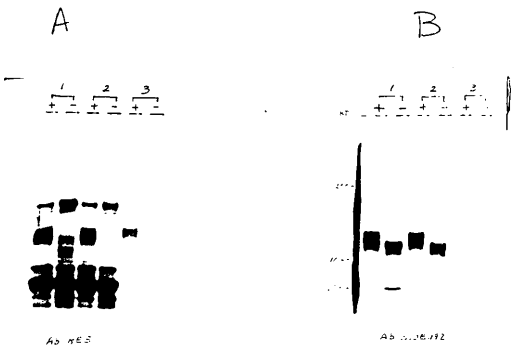


FIG. 4.

【図９】

FIG. 9



【図５】

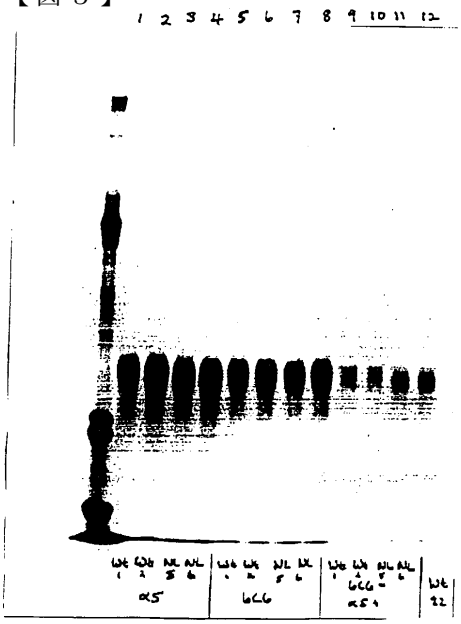


FIG. 5

【図７Ａ】

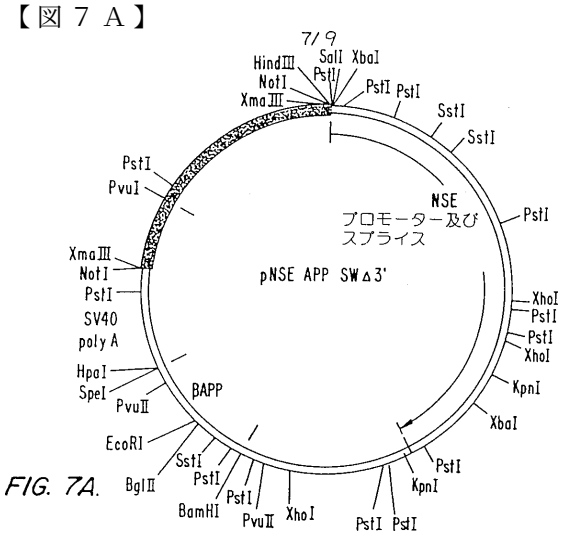


FIG. 7A.

【図７Ｂ】

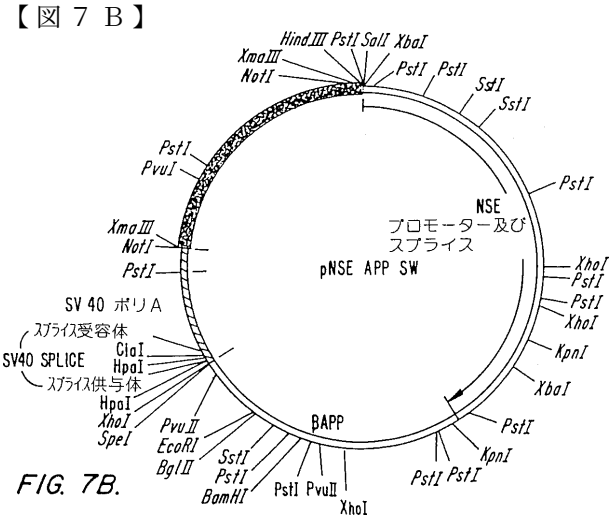


FIG. 7B.

フロントページの続き

(74)代理人 100082898
弁理士 西山 雅也
(72)発明者 シューベルト, ピーター エー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９４０８０, サウス サンフランシスコ, ノースウッド ドライブ ２２２
(72)発明者 シェンク, デール ビー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９４０４４, パシフィカ, シャープ パーク ロード ６０５
(72)発明者 マコンローグ, リサ シー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９４１２７, サンフランシスコ, ジュアニタ ウェイ ２８２
(72)発明者 シンハ, スカント
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９４１２７, サンフランシスコ, ジュニペロ シェラ ブールバード ８０８
(72)発明者 ツァオ, ジュン
アメリカ合衆国, カリフォルニア ９２０３７, ラ ジョラ, デザート ビュー ドライブ ５８５１

審査官 亀田 宏之

(56)参考文献 国際公開第９１／０１９８１０（WO, Ａ１）
NATURE GENETICS, １９９２年, VOL.1, 345-347

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
G01N 33/53
C07K 16/18
C12P 21/08
C12N 15/02