

(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2010-533478

(P2010-533478A)

(43) 公表日 平成22年10月28日(2010.10.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/37 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/37 Z N A	2 G O 4 5
<b>G O 1 N 33/15 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/15 Z	4 B O 2 4
<b>G O 1 N 33/50 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/50 Z	4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	
<b>C 1 2 Q 1/66 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/66	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-516305 (P2010-516305)	(71) 出願人	399013971
(86) (22) 出願日	平成20年7月14日 (2008.7.14)		エラン ファーマシューティカルズ, イン
(85) 翻訳文提出日	平成22年3月8日 (2010.3.8)		コーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/070012		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(87) 国際公開番号	W02009/012237		80, サウス サンフランシスコ, ゲイト
(87) 国際公開日	平成21年1月22日 (2009.1.22)		ウェイ ブールバード 800
(31) 優先権主張番号	60/949,738	(74) 代理人	100068526
(32) 優先日	平成19年7月13日 (2007.7.13)		弁理士 田村 恭生
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100100158
(31) 優先権主張番号	12/172,978		弁理士 鮫島 睦
(32) 優先日	平成20年7月14日 (2008.7.14)	(74) 代理人	100138900
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新田 昌宏
		(74) 代理人	100076521
			弁理士 坪井 有四郎
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ガンマセクレターゼの阻害剤の基質特異性を同定するための組成物および方法

## (57) 【要約】

本発明はガンマセクレターゼ阻害剤の基質特異性を決定するための、およびガンマセクレターゼの基質特異的（および基質アイソフォーム特異的）な阻害剤を同定するためのアッセイおよび方法を提供する。本発明は、化合物が部位特異的または基質特異的にガンマセクレターゼを阻害するか否かを決定するためのアッセイおよび方法を提供する。本発明は、修飾されたガンマセクレターゼ基質を含んでなる単離されたポリペプチド配列およびそのポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を提供する。さらに、本発明はガンマセクレターゼを阻害する化合物、そのような化合物を含有する医薬組成物、およびそのような化合物を用いたアルツハイマー病の治療方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

化合物が基質特異的にガンマセクレターゼを阻害するか否かを決定するための方法であって、

(a) ガンマ開裂部位を含んでなる第 1 のガンマセクレターゼ基質と、化合物およびガンマセクレターゼとを、ガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

(b) 別途、ガンマ開裂部位を含んでなる第 2 のガンマセクレターゼ基質と、化合物およびガンマセクレターゼとを、ガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

(c) 第 1 の基質および第 2 の基質のガンマ開裂部位でのガンマセクレターゼ活性の量を測定すること；

(d) 工程 (a) でのガンマ開裂部位でのガンマセクレターゼ活性の量と、工程 (b) でのガンマ開裂部位でのガンマセクレターゼ活性の量とを比較し、工程 (a) でのガンマ開裂部位でのガンマセクレターゼ活性の量が、工程 (b) での量と相違する場合、その化合物がガンマセクレターゼを基質特異的に阻害していると決定すること

を含む、方法。

## 【請求項 2】

第 1 のガンマセクレターゼ基質が天然に存在する基質である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

第 1 のガンマセクレターゼ基質が、アミロイド前駆体タンパク質 (A P P)、N o t c h、アミロイド前駆体様タンパク質 (A P L P 2)、チロシナーゼ、C D 4 4、e r b B 4、n - カドヘリン、p 7 5 N T F R および S C N B 2 からなる群から選択される、請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

第 1 のガンマセクレターゼ基質が A P P であり、第 2 のガンマセクレターゼ基質が A P L P 2、N o t c h、e r b B 4、チロシナーゼ、p 7 5 N T F R、S C N B 2、n - カドヘリンまたは C D 4 4 である、請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 5】

第 1 のガンマセクレターゼ基質が、第 1 の膜近傍のドメイン配列 [ J M D 1 ] と膜貫通ドメイン配列 [ T M D 1 ] とを有する第 1 のポリペプチドであり、第 2 のガンマセクレターゼ基質が、第 2 の膜近傍のドメイン配列 [ J M D 2 ] と第 1 のガンマセクレターゼ基質の膜貫通ドメイン配列 [ T M D 1 ] とを有する第 2 のポリペプチドである、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 6】

[ T M D 1 ] は、A P P の膜貫通ドメインであり、[ J M D 1 ] および [ J M D 2 ] は、A P L P 2、N o t c h、e r b B 4、チロシナーゼ、p 7 5 N T F R、S C N B 2、n - カドヘリンおよび C D 4 4 から独立に選択される膜近傍ドメインであり、[ J M D 1 ] と [ J M D 2 ] は同一でない、請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 7】

第 2 のガンマセクレターゼ基質が、式：

[ J M D C 4 ] - X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - [ T M D ] ( 式 I I )

[ 式中、

J M D C 4 は、ガンマセクレターゼ基質の膜近傍ドメイン ( J M D ) 配列のアミノ酸配列を含んでなり、ここで J M D は 4 つの C 末端ペプチドを欠いており；

[ T M D ] は、ガンマセクレターゼ基質の膜貫通ドメイン配列を含んでなり；

X 1、X 2、X 3 および X 4 は、独立して任意のアミノ酸から選択される]

を含んでなる、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 8】

X 1 は S、T、G、P、Q、R、V、L、N、P、A、K、E、I、F、H、W および D から選択され；

X 2 は任意のアミノ酸であり；

10

20

30

40

50

X 3 は S、N、D、P、E、R、T、F、I、K、L、V、G、W、H および A から選択され；

X 4 は任意のアミノ酸である、  
請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

X 1 は S、T、G、P、Q、R、V、L、N、P、A、K、E、I、F、H、W および D から選択され；

X 3 は S、N、D、P、E、R、T、F、I、K、L、V、G、W、H および A から選択され；

X 2 および X 4 は L、I、H、E、V、A、S、T、D、N、P、K、Q および R から選択される、請求項 7 記載の方法。

10

【請求項 10】

X 1 は S、T、G、P、Q、R および D から選択され；

X 2 は任意のアミノ酸であり；

X 3 は S、N、D、P および A から選択され；

X 4 は任意のアミノ酸である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 11】

第 1 のガンマセクレターゼ基質が APP である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 12】

(JMD) は、APLP2、Notch, erbB4、チロシナーゼ、p75NTR、SCNB2、n-カドヘリンおよび CD44 から選択されるガンマセクレターゼ基質の膜近傍ドメイン含んでなる、請求項 7 記載の方法。

20

【請求項 13】

TMD は、APLP2、Notch, erbB4、チロシナーゼ、p75NTR、SCNB2、n-カドヘリンおよび CD44 から選択されるガンマセクレターゼ基質の膜貫通ドメイン含んでなる、請求項 7 記載の方法。

【請求項 14】

化合物が、第 2 のガンマセクレターゼ基質と比較して第 1 のガンマセクレターゼ基質において、ガンマセクレターゼ活性を選択的に阻害するか否かを決定するための方法であって、

30

(a) 第 1 のトランスフェクションされたセルカルチャーと種々の濃度の化合物とをガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

(b) 第 2 のトランスフェクションセルカルチャーと種々の濃度の化合物とをガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

(c) 第 1 および第 2 の種々の化合物濃度でトランスフェクションされたセルカルチャーのそれぞれによって産生した ICD を測定し、第 1 のトランスフェクションされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第 1 の用量応答曲線と、第 2 のトランスフェクションされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第 2 の用量応答曲線とを作成すること；および

(d) 第 1 と第 2 の用量応答曲線を比較すること  
を含んでなり、ここで、

40

第 1 のトランスフェクションされたセルカルチャーは、式 [JMD1] [TMD1] (ここで、[JMD1] は第 1 のガンマセクレターゼ基質に由来する) で示される膜近傍ドメイン配列 (JMD1) と膜貫通ドメイン配列 (TMD1) を含んでなるポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドでトランスフェクションされ、

第 2 のトランスフェクションされたセルカルチャーは、式 [JMD2] [TMD1] (ここで、[JMD2] は第 2 のガンマセクレターゼ基質に由来し、第 1 と第 2 のポリペプチドの TMD1 は同一である) で示される膜近傍ドメイン配列 (JMD2) と膜貫通ドメイン配列 (TMD1) を含んでなる第 2 のポリペプチドをコードする、第 2 のポリヌクレオチドでトランスフェクションされる、

50

方法。

【請求項 15】

第1の用量応答曲線と比較して第2の用量応答曲線における高濃度側へのシフトが、その化合物が第2のガンマセクレターゼ基質と比較して第1のガンマセクレターゼ基質に対して選択的であることを示している、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

第1のガンマセクレターゼ基質が、APP、APLP2、Notch, erbB4、チロシナーゼ、p75NTR、SCNB2、n-カドヘリンまたはCD44からなる群から選択される、請求項14記載の方法。

【請求項 17】

式[ JMD1 ][ TMD1 ]および[ JMD2 ][ TMD1 ]の[ TMD1 ]がAPPの膜貫通ドメインであり、[ JMD1 ]および[ JMD2 ]がそれぞれAPLP2、Notch, erbB4、チロシナーゼ、p75NTR、SCNB2、n-カドヘリンまたはCD44から独立に選択される（ここで[ JMD1 ]と[ JMD2 ]は同一でない）膜近傍配列ドメインである、請求項14記載の方法。

【請求項 18】

活性なガンマセクレターゼが、第1および第2のセルカルチャーによって内因的におよび構造的に産生される、請求項14記載の方法。

【請求項 19】

第1および第2のセルカルチャーの少なくとも1つがHEK293細胞を含んでなる、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

VMLKKKC（配列番号39）に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いてICDを測定する、請求項14記載の方法。

【請求項 21】

化合物が、第2のガンマセクレターゼ基質と比較して、第1のガンマセクレターゼ基質のガンマセクレターゼ活性を選択的に阻害するか否かを決定するための方法であって、

（a）第1のトランスフェクションされたセルカルチャーと種々の濃度の化合物とをガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

（b）第2のトランスフェクションセルカルチャーと種々の濃度の化合物とをガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

（c）種々の化合物濃度でトランスフェクションされた第1および第2のセルカルチャーのそれぞれによって産生したICDを測定し、第1のトランスフェクションされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第1の用量応答曲線と、第2のトランスフェクションされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第2の用量応答曲線とを作成すること；および

（d）第1と第2の用量応答曲線を比較することを含んでなり、ここで、

第1のトランスフェクションされたセルカルチャーは、式II：

[ JMD C4 ] - X1 - X2 - X3 - X4 - [ TMD ]

[ 式中、

JMD C4は、ガンマセクレターゼ基質の膜近傍ドメイン（JMD）配列のアミノ酸配列を含み、ここでJMDは4つのC末端ペプチドを欠いており；

[ TMD ]は、ガンマセクレターゼ基質の膜貫通ドメイン配列を含んでなり；

X1 - X2 - X3 - X4は、独立して任意のアミノ酸から選択される]

を含んでなる第1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドでトランスフェクションされ、

第2のトランスフェクションされたセルカルチャーは、式II：

[ JMD C4 ] - X1 - X2 - X3 - X4 - [ TMD ]

[ 式中、X1 - X2 - X3 - X4は、独立して任意のアミノ酸から選択される ]

10

20

30

40

50

を含んでなる第 2 のポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドでトランスフェクションされる、  
方法。

【請求項 2 2】

X 1 は S、T、G、P、Q、R、V、L、N、P、A、K、E、I、F、H、W および D から選択され；

X 2 は任意のアミノ酸であり；

X 3 は S、N、D、P、E、R、T、F、I、K、L、V、G、W、H および A から選択され；

X 4 は任意のアミノ酸である、請求項 2 1 記載の方法。

10

【請求項 2 3】

X 1 は S、T、G、P、Q、R、V、L、N、P、A、K、E、I、F、H、W および D から選択され；

X 3 は S、N、D、P、E、R、T、F、I、K、L、V、G、W、H および A から選択され；

X 2 および X 4 は L、I、H、E、V、A、S、T、D、N、P、K、Q および R から選択される、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 4】

X 1 は S、T、G、P、Q、R および D から選択され；

X 2 は任意のアミノ酸であり；

X 3 は S、N、D、P および A から選択され；

X 4 は任意のアミノ酸である、請求項 2 1 記載の方法。

20

【請求項 2 5】

第 1 のポリペプチドの X 1 - X 2 - X 3 - X 4 が第 1 のガンマセクレターゼ基質に由来し、第 2 のポリペプチドの X 1 - X 2 - X 3 - X 4 が第 2 のガンマセクレターゼ基質に由来する、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 6】

第 1 の用量応答曲線と比較して、第 2 の用量応答曲線における高濃度側へのシフトは、その化合物が、第 2 のガンマセクレターゼ基質と比較して、第 1 のガンマセクレターゼ基質に対して選択的であることを示している、請求項 2 1 記載の方法。

30

【請求項 2 7】

第 1 および第 2 のポリペプチドの X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は、G L N K、S L S S、G S N K、G S N S、P P A Q、S S N K、G S S K、Q H A R、Q A S R、T T D N、R D S T、D V D R または Q I P E から独立に選択される、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 8】

第 1 および第 2 のポリペプチドの [ T M D ] が配列番号 1 3 を含んでなる、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 9】

第 1 および第 2 のポリペプチドの [ J M D C 4 ] が配列番号 3 ~ 5 および 7 ~ 1 2 から独立に選択される、請求項 2 1 記載の方法。

40

【請求項 3 0】

式 I I で示されるポリペプチドが、以下からなる群から選択される配列を含んでなる請求項 2 1 記載の方法：

( a ) (C99GVP-APLP2)：LEDAEFRHDS GLEEEERESVG PLREDFSLSS GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号16)；

( b ) (C99GVP-NOTCH1)：LEDAEFRHDS GPYKIEAVQS ETVEPPPPAQ GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号17)；

( c ) (C99GVP-SREBP1)：LEDAEFRHDS GAKPEQRPSL HSRGMLDRSR GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号18)；

( d ) (C99APPD4-APLP2)：LEDAEFRHDS GYEVHHQKL V FFAEDVSLSS GAIIGLMVGG VVIATVIVIT 50

LVML (配列番号42);

(e) (C99-APP-(G25S): LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVSSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT  
LVML (配列番号43)

(f) C99-APP-(S26L): LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVGLNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT L  
VML (配列番号44)

(g) C99-APP-(N27S): LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVGSSK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT L  
VML (配列番号45)

(h) C99-APP-(K28S): LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVGSNS GAIIGLMVGG VVIATVIVIT L  
VML (配列番号46)

(i) (C99APP 4-NOTCH1): LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVPPAQ GAIIGLMVGG VVIATVIV  
IT LVML (配列番号100); 10

(j) (C99APP 4-SREBP1): LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVDRSR GAIIGLMVGG VVIATVIV  
IT LVML (配列番号101);

(k) (C99GVP-APLP2-gsnk): LEDAEFRHDS GLEEEERESVG PLREDFGSNK GAIIGLMVGG VVIATVIV  
IT LVML (配列番号19);

(l) (C99GVP-NOTCH1-gsnk): LEDAEFRHDS GPYKIEAVQS ETVEPPGSNK GAIIGLMVGG VVIAT  
VIVIT LVML (配列番号20); および

(m) (C99GVP-SREBP1-gsnk): LEDAEFRHDS GAKPEQRPSL HSRGMLGSNK GAIIGLMVGG VVIAT  
VIVIT LVML (配列番号21)。

#### 【請求項 31】

20

X 2 がセリンであり、X 4 がリジンである、請求項 2 1 記載の方法。

#### 【請求項 32】

X 2 がロイシンであり、X 4 がセリンである、請求項 2 1 記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明は、アルツハイマー病の治療に関する。より具体的には、本発明は、ガンマ ( ) セクレターゼによる A P P 様基質の開裂を、他のガンマセクレターゼの基質と比較して優先的に阻害する化合物を同定するための分析、試薬および方法に関する。

#### 【背景技術】

30

#### 【0002】

脳の アミロイド蓄積は、アルツハイマー病の主な病理学的特徴である。A - ( A ) 型アミロイド前駆体タンパク質 ( A P P ) の生成は、2つのプロテアーゼ、即ちベータ - ( - ) およびガンマ - ( - ) セクレターゼ、による一連の開裂を要する複合的プロセスである (Selkoe, D. J., *Physiol. Rev.* (2001) 81:741-766)。 - セクレターゼは、内腔部分で A P P を開裂して、99 アミノ酸からなるカルボキシル末端 ( C - 末端 ) フラグメント ( C 9 9 / - C T F ) を生じる膜結合型アスパラチルプロテアーゼである。

- C T F / C 9 9 は続いて膜貫通ドメイン ( T M D ) 内の2つの主要な部位 ( および ) でガンマセクレターゼにより開裂され、A および A P P 細胞内ドメイン ( A I C D ) として知られる細胞内フラグメントを生じる (Sinha, S., et al., *Nature* (1999) 402 :537-540; Vassar, R., et al., *Science* (1999) 286:735-741; Yan, R., et al., *Nature* (1999) 402:533-537; Lin, X., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, (2000) 97:1456 -1460)。これら、 および 開裂は、それぞれ、膜貫通ドメイン ( T M D ) の真ん中付近、および細胞質面の付近で起きる。いくつかの実験的証拠により、ガンマセクレターゼ基質 (特に A P P および N o t c h ) のガンマセクレターゼ開裂が、ガンマでの開裂に先だってイプシロンでの開裂により順次に起きることが示されている。さらに、イプシロン部位の開裂が、ガンマ開裂と独立しているが、ガンマ部位の開裂は、先行するイプシロン開裂の後で起き、それに依存していることが確認されている (Zhao, G., et al., *J. Biol. Chem.*, (2004) ; 279:50647-50; Qi-Takahara, Y., et al., *J. Neurosci.*, (2005) ; 25:436-45)。あるいは、A P P の セクレターゼ依存的プロセッシングにより、同様の

40

50

開裂を受け得る短い - C T F / C 8 3 フラグメントを生じる (Selkoe, D. J., *Physiol. Rev.* (2001) 81:741-766)。ガンマセクレターゼはまた、N o t c h、C D 4 4 および数多くの他の I 型膜貫通タンパク質を開裂することが知られている (De Strooper B., *Neuron* (2003) 38:9-12)。膜貫通ドメイン内の開裂部位付近のガンマセクレターゼ依存開裂に必要とされるアミノ酸配列は、特定の配列の認識よりも基質の細胞外ドメインのサイズに依存しており、比較的寛大であるようである (Struhl, G., and Adachi, A., *Molecular Cell* (2000) 6:625-636)。N o t c h プロセッシングは A P P のそれと類似しており、それぞれ T M D の中央付近および細胞質側の単分子層 (cytoplasmic leaflet) 付近に位置する 2 つのホモローガスなガンマセクレターゼ開裂部位 S 4 および S 3 を有している (Hartmann, D., et al., *J. Mol. Neurosci.* (2001) 17:171-181; Okochi, M., et al., *EMBO J.* (2002) 21:5408-5416)。N o t c h および N o t c h 細胞内ドメイン (N I C D) は 2 つの開裂産物であり、後者は重要な転写活性化因子である (Mumm, J. S., and Kopan, R., *Dev. Biol.* (2000) 228:151-165)。N o t c h シグナル伝達および関連するプロセスにおける重要なエレメントには、4 つの N o t c h 膜貫通レセプターアイソフォーム (N o t c h 1 - 4)、2 つの N o t c h 膜貫通りガンド (D e l t a および J a g g e d) およびガンマセクレターゼがある。ガンマセクレターゼの他の多くの基質は、A P P の および 開裂部位や N o t c h の S 4 および S 3 開裂部位に類似して、2 以上の膜内 (即ち T M D 内) 開裂部位を有することが知られている。

10

#### 【 0 0 0 3 】

ガンマセクレターゼは、少なくとも 4 つの異なる膜タンパク質 (プレセニリン (PS)、ニカストリン、Aph-1 および Pen-2) からなるマルチサブユニットのアスパラチルプロテアーゼである (De Strooper B., *Neuron* (2003) 38:9-12)。P S は、ホロ酵素の触媒サブユニットと考えられ、基質の開裂に必須の 2 つの保存された膜内アスパラギン酸残基を含む (Wolfe, M.S., et al., *Nature* (1999) 398:513-517; Kimberly, W.T., et al., *J. Biol. Chem.* (2000) 275:3173-3178)。ガンマセクレターゼが認識しその基質を開裂する詳細なメカニズムは、1 つには、これらのタンパク質分解イベントが脂質二重層の膜の疎水的环境内で起こるということもあって、未だ分かっていない。

20

#### 【 0 0 0 4 】

同一の (または非常に類似した) ガンマセクレターゼ酵素活性は A P P、N o t c h および他の基質のプロセッシングに関与していると考えられる。ガンマセクレターゼは、その膜貫通ドメイン内の数多くの I 型の 1 つの膜にまたがるタンパク質基質を開裂し、時として調節された膜内タンパク質開裂 (R I P) と称される。多くのガンマセクレターゼ基質が、様々な生理学的プロセスや疾患プロセスに関与している。多くの場合、これらの基質の核でのシグナル伝達活性は、ガンマセクレターゼプロセッシング、次いで、核転座、続いて遊離した細胞内ドメイン (I C D) による遺伝子活性化に依存する。N o t c h プロセッシングの阻害 (S 3 / イプシロン部位) は、非選択的ガンマセクレターゼ基質阻害剤の主要な望ましくない効果である。このように、いずれか特定のガンマセクレターゼ基質についてのガンマセクレターゼ活性の阻害に関して選択性 (N o t c h と比較して A P P) を有するガンマセクレターゼ阻害剤の同定および開発は、効果的且つ十分な耐性を有するガンマセクレターゼ阻害剤の開発の成功のための重要な目標である。

30

40

#### 【 0 0 0 5 】

任意の与えられたガンマセクレターゼ基質に対するガンマセクレターゼ活性を減少させる (例えば他のガンマセクレターゼ基質に有意に影響を及ぼすことなしに A 産生が減少する等) 1 つの可能性のある方法は、ガンマセクレターゼ活性を、他の基質 (例えば A P P および N o t c h) のイプシロン開裂部位と比較してガンマ開裂部位にて優先的に阻害するガンマセクレターゼの阻害剤を同定することである。任意の与えられたガンマセクレターゼ基質に対するガンマセクレターゼ活性を減少させる (例えば他のガンマセクレターゼ基質に有意に影響を及ぼすことなしに A 産生が減少する等) 別の可能性のある方法は、その基質に対する特異的な (例えば N o t c h よりも A P P に対して特異的な) 阻害剤であるガンマセクレターゼの阻害剤を同定することである。そのような阻害剤の同定は、

50

基質分子のガンマセクレターゼプロセッシングに関連する様々な状態（例えば癌またはAD）の治療において使用するための更なる治療候補を提供するであろうし、それら阻害剤が示す有害な副作用はより少ないであろう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明者は、本明細書において、基質特異的にガンマセクレターゼを阻害する化合物を同定するための組成物および方法、並びにAPPのイプシロン開裂部位での開裂と比較して、および他のガンマセクレターゼ基質の開裂と比較して、APPのガンマセクレターゼ開裂部位で優先的に開裂を阻害する化合物を同定するための方法を提供する。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

一態様では、本発明は、化合物が基質特異的にガンマセクレターゼを阻害するか否かを決定するための方法に関する。本方法は、

（a）ガンマ開裂部位を含んでなる第1のガンマセクレターゼ基質と、該化合物およびガンマセクレターゼとを、ガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

（b）別途、ガンマ開裂部位を含んでなる第2のガンマセクレターゼ基質と、該化合物およびガンマセクレターゼとを、ガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

（c）第1の基質および第2の基質のガンマ開裂部位でのガンマセクレターゼ活性の量を測定すること；

20

（d）工程（a）でのガンマ開裂部位でのガンマセクレターゼ活性の量と、工程（b）でのガンマ開裂部位でのガンマセクレターゼ活性の量とを比較し、工程（a）でのガンマ開裂部位でのガンマセクレターゼ活性の量が、工程（b）での量と相違する場合、その化合物がガンマセクレターゼを基質特異的に阻害していると決定することを含む。

【0008】

本発明の様々な態様において、第1のガンマセクレターゼ基質は天然に存在する基質である（例えば、アミロイド前駆体タンパク質（APP）、Notch、アミロイド前駆体様タンパク質（APLP2）、チロシナーゼ、CD44、erbB4、n-カドヘリン、p75NTRおよびSCNB2等）。

30

【0009】

本発明の方法はまた、第1の膜近傍のドメイン配列[JMD1]と膜貫通ドメイン配列[TMD1]とを有する第1のポリペプチドである第1のガンマセクレターゼ基質、および第2の膜近傍のドメイン配列[JMD2]と第1のガンマセクレターゼ基質の膜貫通ドメイン配列[TMD1]とを有する第2のポリペプチドである第1のガンマセクレターゼ基質を含む。例えば、[TMD1]は、APPの膜貫通ドメインであり、[JMD1]および[JMD2]は、APLP2、Notch、erbB4、チロシナーゼ、p75NTR、SCNB2、n-カドヘリンおよびCD44から独立に選択される（ここで[JMD1]および[JMD2]は同一でない）。

40

【0010】

本発明の方法はさらに、式：

[JMD C4] - X1 - X2 - X3 - X4 - [TMD]（式II）

【式中、

JMD C4は、ガンマセクレターゼ基質の膜近傍ドメイン（JMD）配列のアミノ酸配列を含み、ここでJMDは4つのC末端ペプチドを欠いており；

[TMD]は、ガンマセクレターゼ基質の膜貫通ドメイン配列を含んでなり；

X1、X2、X3およびX4は、独立して任意のアミノ酸から選択されるを含む第2のガンマセクレターゼ基質を含む。

【0011】

50



具体的な態様では、X 1 は S、T、G、P、Q、R、V、L、N、P、A、K、E、I、F、H、W および D から選択され；X 2 は任意のアミノ酸であり；X 3 は S、N、D、P、E、R、T、F、I、K、L、V、G、W、H および A から選択され；X 4 は任意のアミノ酸である。

#### 【0012】

具体的な態様では、X 1 は S、T、G、P、Q、R、V、L、N、P、A、K、E、I、F、H、W および D から選択され；X 3 は S、N、D、P、E、R、T、F、I、K、L、V、G、W、H および A から選択され；X 2 および X 4 は L、I、H、E、V、A、S、T、D、N、P、K、Q および R から選択される。

#### 【0013】

具体的な態様では、X 1 は S、T、G、P、Q、R および D から選択され；X 2 は任意のアミノ酸であり；X 3 は S、N、D、P および A から選択され；X 4 は任意のアミノ酸である。

#### 【0014】

具体的な態様では、(JMD) は、APLP2、Notch, erbB4、チロシナーゼ、p75NTR、SCNB2、n - カドヘリンおよび CD44 のうち 1 つのガンマセクレターゼ基質の膜近傍ドメインを有し、TMD は APLP2、Notch, erbB4、チロシナーゼ、p75NTR、SCNB2、n - カドヘリンおよび CD44 のうち 1 つの膜貫通ドメインを有する。

#### 【0015】

本発明の更なる態様は、化合物が、第 2 のガンマセクレターゼ基質と比較して第 1 のガンマセクレターゼ基質において、ガンマセクレターゼ活性を選択的に阻害するか否かを決定するための方法を包含する。本方法は、

(a) 第 1 のトランスフェクションされたセルカルチャーと種々の濃度の該化合物とをガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

(b) 第 2 のトランスフェクションセルカルチャーと種々の濃度の該化合物とをガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

(c) 第 1 および第 2 の種々の化合物濃度でトランスフェクションされたセルカルチャーのそれぞれによって産生した ICD を測定し、第 1 のトランスフェクションされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第 1 の用量応答曲線と、第 2 のトランスフェクションされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第 2 の用量応答曲線とを作成すること；および

(d) 第 1 と第 2 の用量応答曲線を比較することを含んでなる。

#### 【0016】

この態様では、第 1 のトランスフェクションされたセルカルチャーは、式 [JMD1] [TMD1] (ここで、[JMD1] は第 1 のガンマセクレターゼ基質に由来する) で示される膜近傍ドメイン配列 (JMD1) と膜貫通ドメイン配列 (TMD1) を有する第 1 のポリペプチドをコードする、第 1 のポリヌクレオチドでトランスフェクションし、第 2 のトランスフェクションされたセルカルチャーは、式 [JMD2] [TMD1] (ここで、[JMD2] は第 2 のガンマセクレターゼ基質に由来し、第 1 と第 2 のポリペプチドの TMD1 は同一である) で示される膜近傍ドメイン配列 (JMD2) と膜貫通ドメイン配列 (TMD1) を有する第 2 のポリペプチドをコードする、第 2 のポリヌクレオチドでトランスフェクションする。

#### 【0017】

また、この態様では、第 1 の用量応答曲線と比較して、第 2 の用量応答曲線における高濃度側へのシフトは、その化合物が、第 2 のガンマセクレターゼ基質と比較して、第 1 のガンマセクレターゼ基質に対して選択的であることを示している。

#### 【0018】

この態様の様々な態様において、第 1 のガンマセクレターゼ基質は、APLP2、No

10

20

30

40

50

t c h , e r b B 4、チロシナーゼ、p 7 5 N T F R、S C N B 2、n - カドヘリンまたは C D 4 4 である。従って、式 [ J M D 1 ] [ T M D 1 ] および [ J M D 2 ] [ T M D 1 ] の [ T M D 1 ] は、A P P の膜貫通ドメインであり、[ J M D 1 ] および [ J M D 2 ] はそれぞれ A P L P 2、N o t c h , e r b B 4、チロシナーゼ、p 7 5 N T F R、S C N B 2、n - カドヘリンまたは C D 4 4 から選択される（ここで [ J M D 1 ] と [ J M D 2 ] は同一でない）膜近傍配列ドメインである。

#### 【 0 0 1 9 】

本発明のセルカルチャーアッセイの様々な態様において、活性なガンマセクレターゼは、セルカルチャーによって内因的におよび構造的に産生される。セルカルチャーとしては、例えば H E K 2 9 3 細胞が挙げられる。I C D は、V M L K K K C（配列番号 3 9）に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いて測定することができる。

10

#### 【 0 0 2 0 】

更なる態様では、本発明は、化合物が、第 2 のガンマセクレターゼ基質と比較して、第 1 のガンマセクレターゼ基質のガンマセクレターゼ活性を選択的に阻害するか否かを決定するための方法を包含する。本方法は、

（ a ）第 1 のトランスフェクションされたセルカルチャーと種々の濃度の該化合物とをガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

（ b ）第 2 のトランスフェクションセルカルチャーと種々の濃度の該化合物とをガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

（ c ）種々の化合物濃度でトランスフェクションされた第 1 および第 2 のセルカルチャーのそれぞれによって産生した I C D を測定し、第 1 のトランスフェクションされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第 1 の用量応答曲線と、第 2 のトランスフェクションされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第 2 の用量応答曲線とを作成すること；および

20

（ d ）第 1 と第 2 の用量応答曲線を比較することを含む。

#### 【 0 0 2 1 】

この方法では、第 1 のトランスフェクションされたセルカルチャーは、式 I I :

[ J M D C 4 ] - X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - [ T M D ]

[ 式中、

J M D C 4 は、ガンマセクレターゼ基質の膜近傍ドメイン（ J M D ）配列のアミノ酸配列を含み、ここで J M D は 4 つの C 末端ペプチドを欠いており；

[ T M D ] は、ガンマセクレターゼ基質の膜貫通ドメイン配列を含んでなり；

X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は、独立して任意のアミノ酸から選択される]

を含んでなる第 1 のポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドでトランスフェクションし、

第 2 のトランスフェクションされたセルカルチャーは、式 I I :

[ J M D C 4 ] - X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - [ T M D ]

[ 式中、[ T M D 1 ] および [ J M D C 4 ] は前記と同意義であり、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は、独立して任意のアミノ酸から選択される]

40

を含んでなる第 2 のポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドでトランスフェクションする。

#### 【 0 0 2 2 】

具体的な態様では、X 1 は S、T、G、P、Q、R、V、L、N、P、A、K、E、I、F、H、W および D から選択され；X 2 は任意のアミノ酸であり；X 3 は S、N、D、P、E、R、T、F、I、K、L、V、G、W、H および A から選択され；X 4 は任意のアミノ酸である。

#### 【 0 0 2 3 】

具体的な態様では、X 1 は S、T、G、P、Q、R、V、L、N、P、A、K、E、I、F、H、W および D から選択され；X 3 は S、N、D、P、E、R、T、F、I、K、

50

L、V、G、W、HおよびAから選択され；X 2およびX 4はL、I、H、E、V、A、S、T、D、N、P、K、QおよびRから選択される。

【0024】

具体的な態様では、X 1はS、T、G、P、Q、RおよびDから選択され；X 2は任意のアミノ酸であり；X 3はS、N、D、PおよびAから選択され；X 4は任意のアミノ酸である。

【0025】

この態様の一態様では、第1のポリペプチドのX 1 - X 2 - X 3 - X 4は第1のガンマセクレターゼ基質に由来し、第2のポリペプチドのX 1 - X 2 - X 3 - X 4は第2のガンマセクレターゼ基質に由来する。

【0026】

この方法の一態様では、第1の用量応答曲線と比較して、第2の用量応答曲線における高濃度側へのシフトは、その化合物が、第2のガンマセクレターゼ基質と比較して、第1のガンマセクレターゼ基質に対して選択的であることを示している。

【0027】

具体的な態様では、第1および第2のポリペプチドのX 1 - X 2 - X 3 - X 4は、独立してGLNK、SLSS、GSNK、GSNS、PPAQ、SSNK、GSSK、QHAR、QASR、TTDN、RDS T、DVDRまたはQIPEから選択される。第1および第2のポリペプチドの[ TMD ]は、配列番号13を含み得る。第1および第2のポリペプチドの[ JMD C 4 ]は、配列番号3～5および7～12から独立に選択することができる。

【0028】

具体的な例として、式IIで示されるポリペプチドは、以下の配列のいずれかを包含する：

( e ) (C99GVP-APLP2): LEDAEFRHDS GLEEEERESVG PLREDFSLSS GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号16)；

( f ) (C99GVP-NOTCH1): LEDAEFRHDS GPYKIEAVQS ETVEPPPPAQ GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号17)；

( g ) (C99GVP-SREBP1): LEDAEFRHDS GAKPEQRPSL HSRGMLDRSR GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号18)；

( h ) (C99APPD4-APLP2): LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVSLSS GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号42)；

( i ) (C99-APP-(G25S): LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVSSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号43)

( j ) C99-APP-(S26L): LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVGLNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号44)

( k ) C99-APP-(N27S): LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVGSSK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号45)

( l ) C99-APP-(K28S): LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVGSNS GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号46)

( m ) (C99APP 4-NOTCH1): LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVPPAQ GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号100)；

( n ) (C99APP 4-SREBP1): LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVDRSR GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号101)；

( o ) (C99GVP-APLP2-gsnk): LEDAEFRHDS GLEEEERESVG PLREDFGSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号19)；

( p ) (C99GVP-NOTCH1-gsnk): LEDAEFRHDS GPYKIEAVQS ETVEPPGSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号20)；および

( q ) (C99GVP-SREBP1-gsnk): LEDAEFRHDS GAKPEQRPSL HSRGMLGSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号21)。

## 【 0 0 2 9 】

具体的な態様では、X 2 はセリンであり X 4 はリジンであるか、または X 2 はロイシンであり X 4 はセリンである。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 3 0 】

【 図 1 - 1 】 A P P および N o t c h E でのガンマおよびイプシロン開裂の模式図である。( A ) A P P C 9 9 における - セクレターゼ、 - セクレターゼおよび - セクレターゼ部位。 N o t c h E、 S 4 および S 3 における対応する - セクレターゼ部位の全体での位置。 Figure 1 A はまた、ガンマセクレターゼ阻害剤の A P P / A > N o t c h / N I C D 選択性についての可能性のある機構モデル；基質の N 末端の長さ；基質の一次配列を示す。

10

【 図 1 - 2 】 A P P および N o t c h E でのガンマおよびイプシロン開裂の模式図である。( B ) A P P C 9 9 におけるメジャー（太い矢印）およびマイナー（細い矢印）ガンマセクレターゼ および 開裂部位、並びに N o t c h E における対応する S 4 および S 3 - セクレターゼ部位。

## 【 0 0 3 1 】

【 図 2 】 ガンマセクレターゼにより生じた A 4 0 に対する点変異の効果。膜貫通ドメインに隣接する G S N K 残基における A P P 膜近傍ドメイン内でのいくつかの点変異（ S 2 6 L および K 2 8 S ）は、ガンマセクレターゼにより生じた A 4 0 の量に対して効果を有する。上のグラフは、コントロール（ H E K ）のみの細胞；野生型 A P P （ A P P - W T ）； S 2 6 L 突然変異（ A P P - S 2 6 L ）；および K 2 8 S 突然変異（ A P P - K 2 8 S ）においてガンマセクレターゼにより生じた A 4 0 の量を示す。下の図は、各突然変異体のガンマ基質の発現が野生型の発現レベルに標準化されることを示している。

20

## 【 0 0 3 2 】

【 図 3 】 A および A I C D E L I S A および A I C D ルシフェラーゼ活性化を示したアッセイの模式図である。上段は、 A P P における - 、 - および - セクレターゼ（ および ）開裂部位一般的な配置と J M D の位置を示し；中段は、 G V P インサートを組み込んだ C 9 9 - G V P アミノ酸配列の一般的な配置を示し、 - セクレターゼ開裂によって生じる A および A I C D （ G V P インサートを伴う）フラグメントを示し、 A および A I C D E L I S A によるそれらの検出を示す。下段は、 G V P トランス活性化ドメインを含んでなる A I C D フラグメントが如何にして結合し、フェラーゼレポーター遺伝子系を活性化するかを示している。

30

## 【 0 0 3 3 】

【 図 4 】 様々な J M D スワップドメインおよび点変異の非限定的なキメラ配列のいくつかを示す。これらの配列は、さらに N 末端の LEDAEFRHDSG 配列（配列番号 3 7 ）および C 末端 - VHHQKL VFFA EDVGSNKGAI IGLMVGGVVI ATIVIVITLVM LKKK\*QYTSIH HGVVEVDAAV TPEERHLSK M QQNGYENPTY KFFEQQMN 配列（配列番号 3 8 ）を含んでなり、配列番号 3 8 の任意の点にて付加あるいは挿入した G V P 配列の C 末端を有する。ある特定の非限定的な構築物は G V P 配列を配列番号 3 8 の \* と示した点で挿入する。

40

## 【 0 0 3 4 】

【 図 5 - 1 】 キメラ基質分子の開裂プロファイル。( A ) C 9 9 G V P の - セクレターゼ依存プロセッシングおよび A I C D 産生を測定するルシフェラーゼレポーターアッセイの模式図。 T M D 領域内の 2 つのタンパク質開裂部位（ および ）（黒矢印）、（ L E ）シグナルペプチドの開裂部位（白矢印）を示す。

【 図 5 - 2 】 キメラ基質分子の開裂プロファイル。( B ) A I C D - G V P （黒の矢頭）が - セクレターゼ依存的に C 9 9 G V P から生じることを示している、抗体 2 H 3、抗 V P 1 6、抗 A P P、または抗 A I C D n e o - エピトープ抗体（ 2 2 B 1 1 等）を用いたウェスタンブロット。白の矢頭は C 9 9 G V P の N 末端欠失体である C 8 3 G V P を示す。 H E K トランスフェクション細胞は、阻害剤で処理しない（レーン 1、2）、 - セクレターゼ阻害剤 L - 6 8 5、4 5 8 で処理（ 2 4 h r ）した（レーン 3（ 1 μ M ））、レ

50

ーン4 (20  $\mu$ M)) またはDAPTで処理した(レーン5 (1  $\mu$ M)、レーン6 (20  $\mu$ M))。

【図5 - 3】キメラ基質分子の開裂プロファイル。(C)ガンマセクレターゼ阻害剤は、AICD - GVP (C99 - GVPから生じた)によるルシフェラーゼレポータートランス活性化を用量依存的にブロックする。HEK293細胞におけるL - 685, 458およびDAPTはルシフェラーゼレポーターでトランスフェクションした。データを3回の独立した実験の平均(+/-SD)ルミネセンス単位で示す。\*  $p < 0.01$  対レポーターのみ(コントロール)、\*\*  $p < 0.05$  対C99GVPトランスフェクション細胞(阻害剤なし)。

【図5 - 4】キメラ基質分子の開裂プロファイル。(D)阻害剤は分泌されたA<sub>40</sub>をブロックしている。細胞からの培地をDMSO、L - 685, 458 (5  $\mu$ M)またはDAPT (5  $\mu$ M)で処理し、サンドウェッチELISAを用いてA<sub>40</sub>(斜線)およびA<sub>42</sub>(空白)について分析した。補足/検出抗体ペアを2G3/2H3および21F12/2H3とした。出たは3回の実験の平均+/-SDである。同じ培地中の全分泌A<sub>40</sub>(下段)を免疫沈降し、を用いる2H3抗体を用いるウェスタンブロットにより分析した。\*  $p < 0.01$  対DMSO処理C99GVPトランスフェクト体のA<sub>40</sub>、\*\*  $p < 0.01$  対同一グループからのA<sub>42</sub>。

【図5 - 5】キメラ基質分子の開裂プロファイル。(E)阻害剤は、C99GVPおよび天然の基質と同等のA<sub>40</sub>効力を示している。APPまたはC99GVPのいずれかでトランスフェクトした細胞をL - 685, 458(左)またはDAPT(右)の段階希釈で処理し、ELISAで分析した(DMSO処理のコントロールに対する百分率で示す)。算出されたIC<sub>50</sub>値を表として各グラフに挿入した。

【図5 - 6】キメラ基質分子の開裂プロファイル。(F)トランスフェクトしたCOS-7細胞におけるC99GVPおよびAICD - GVPの細胞内分布:(N)DMSO処理した細胞に存在する核染色はDAPT (5  $\mu$ M)の添加後に消失し、C99GVP発現がより明瞭に認められた(右下)。

【0035】

【図6 - 1】C99 - GVPは生理学的な開裂を受け、JMDキメラの作用を受ける機能的なガンマセクレターゼ基質である。(A)C99GVPおよびいくつかのJMDキメラの模式図およびアミノ酸配列(TMD内に および 開裂部位、A<sub>40</sub>免疫ベースの検出および分析に用いられる抗体により認識されるエピトープを含む)(配列番号16、17、18)。

【図6 - 2】C99 - GVPは生理学的な開裂を受け、JMDキメラの作用を受ける機能的なガンマセクレターゼ基質である。(B)DMSOまたはDAPT (5  $\mu$ M)で処理した一時的にトランスフェクトしたHEK細胞由来の細胞リゼートの2H3(上段)および抗APP(中段)抗体を用いたイムノブロット。下段は、細胞溶解の前に、同じサンプルから集めた調整済培地のイムノブロットを示す。

【図6 - 3】C99 - GVPは生理学的な開裂を受け、JMDキメラの作用を受ける機能的なガンマセクレターゼ基質である。(C)JMDキメラおよびレポーター活性。トランスフェクション後48時間での、DMSO(グレー)またはDAPT (5  $\mu$ M、黒)で処理した細胞のルシフェラーゼ分析。データをDMSO処理したC99GVPコントロールに対する百分率で示す。

【図6 - 4】C99 - GVPは生理学的な開裂を受け、JMDキメラの作用を受ける機能的なガンマセクレターゼ基質である。(D)JMDキメラおよび分泌されたA<sub>40</sub>に対する効果。ルシフェラーゼ分析からの調整済培地のELISA分析(データはDMSO処理したC99GVPコントロールに対する百分率で示す)。

【図6 - 5】C99 - GVPは生理学的な開裂を受け、JMDキメラの作用を受ける機能的なガンマセクレターゼ基質である。(E)JMDキメラおよび分泌されたA<sub>42</sub>に対する効果。ルシフェラーゼ分析からの調整済培地のELISA分析(データはDMSO処理したC99GVPコントロールに対する百分率で示す)。

10

20

30

40

50

【図6-6】C99-GVPは生理学的な開裂を受け、JMDキメラの作用を受ける機能的なガンマセクレターゼ基質である。(F)JMDキメラはガンマセクレターゼとの総合作用を阻害していない。PS-1またはAPPのN末端フラグメントに対する抗体を用いたトランスフェクトしたHEK細胞からの細胞リゼートのイムノプロットは、C99GVPおよびJMDキメラがPS-1と同様の結合を示している。黒の矢頭はAICD-GVPフラグメントを示す。

【図6-7】C99-GVPは生理学的な開裂を受け、JMDキメラの作用を受ける機能的なガンマセクレターゼ基質である。(G)COS-7細胞におけるJMDキメラの細胞内分布はDAPT処理により消失する核染色(N)を示している。DAPT処理した細胞のJMDキメラの均一な発現プロファイル。

10

【0036】

【図7-1】C99-GVP膜近傍ドメインスワップが分泌されたA およびAICD産生に個別的に影響を及ぼす。(A)分泌されたA 40に対する -セクレターゼの効果。DMSO(グレー)または40μMのTAPE-1(黒)で処理した細胞からの調整済培地を集め、A 40に特異的なELISAにより分析した。データをC99GVPコントロールで処理したTAPE-1の百分率で示した。\*, p<0.01、\*\*, p<0.05。

【図7-2】C99-GVP膜近傍ドメインスワップが分泌されたA およびAICD産生に個別的に影響を及ぼす。(B)分泌されたA 40に対するA 分解酵素阻害剤の効果。DMSO(グレー)または40μMホスホラミドン+1mg/mLバシトラシン(チェックのバー)をA 40に特異的なELISAで分析した。データはC99GVPコントロールで処理した阻害物質の百分率で示した；\*, p<0.01。

20

【図7-3】C99-GVP膜近傍ドメインスワップが分泌されたA およびAICD産生に個別的に影響を及ぼす。(C)C99GVPまたはC99GVP-APLP2でトランスフェクトしたHEK細胞における長いA 種の細胞内蓄積を示す：合成A ペプチド標準(レーン1)、細胞リゼート(レーン2, 4)、調整済培地(レーン3, 5)、C99GVP-APLP2から得られたA 'ペプチド標準(レーンMTI-MMP6)。

【0037】

【図8-1】APP JMDにおけるGSNKモチーフは、ガンマセクレターゼ開裂において役割を果たしている。(A)APPからGSNKモチーフを保持する修飾JMDキメラ基質の発現プロファイル。配列のアライメント(配列番号15、19、20および21)に、JMD領域(上段)における配列との相違を強調して示す。中段は、DMSOおよびDAPT(5μM)で処理したトランスフェクトしたHEK細胞からの細胞リゼートの2H3抗体イムノプロットを示す。下段は、同じ細胞リゼートのAPP抗体イムノプロットを示す。白の矢頭は基質に由来するC83GVP様フラグメントを示す。

30

【図8-2】APP JMDにおけるGSNKモチーフは、ガンマセクレターゼ開裂において役割を果たしている。(B)JMDキメラは、DMSO(グレー)またはDAPT(5μM、黒)での処理後の48時間での細胞におけるAICD-GVPフラグメントにより媒介されるルシフェラーゼレポータートランス活性化を示す。データは、DMSO処理したC99GVPコントロールと比較した活性の百分率で示す。

40

【図8-3】APP JMDにおけるGSNKモチーフは、ガンマセクレターゼ開裂において役割を果たしている。(C)JMDキメラは正常なA 分泌を示す。2H3抗体を用いたDMSO処理した細胞からの調整済培地のウェスタンプロット(下段)は、合成A 40ペプチド標準を用いた密度測定により定量し、C99GVPコントロールの百分率で示した。

【図8-4】APP JMDにおけるGSNKモチーフは、ガンマセクレターゼ開裂において役割を果たしている。(D)JMDキメラは正常なA 40分泌を示している。DMSO(グレー)またはDAPT(黒)処理した細胞から集めた調整済培地のA 40ELISA分析。データはDMSO処理したC99GVPコントロールの百分率として示す。

【0038】

50

【図 9 - 1】効果的なガンマ開裂に關与する膜近傍残基のマッピング。(A) 点変異を有する C 9 9 G V P 配列のアライメント (置換残基を下線で表示) (配列番号 1 5、4 2、4 3、4 4、4 5、4 6) についての G S N K モチーフにおける点変異を含む新しい突然変異基質の発現プロファイル。D M S O または D A P T (5  $\mu$  M) で処理したトランスフェクトした H E K 細胞からの細胞リゼートの細胞リゼートの 2 H 3 抗体 (中段) または抗 A P P 抗体 (下段) を用いたイムノプロット。白い矢頭は基質に由来する C 8 3 G V P 様フラグメントを示す。

【図 9 - 2】効果的なガンマ開裂に關与する膜近傍残基のマッピング。(B) D M S O で処理した細胞からの調整済培地の免疫沈降およびウェスタンブロット (2 H 3 抗体)。上のグラフは密度測定による定量を示し、C 9 9 G V P コントロールに対する百分率で示す。

10

【図 9 - 3】効果的なガンマ開裂に關与する膜近傍残基のマッピング。(C) D M S O 処理 (グレー) または D A P T 処理した細胞からの調整済培地の A 4 0 E L I S A 分析 (C 9 9 G V P コントロールに対する百分率で示す)。

【図 9 - 4】効果的なガンマ開裂に關与する膜近傍残基のマッピング。(D) D M S O (グレー) または D A P T (5  $\mu$  M、黒) で処理した細胞のルシフェラーゼシグナル (トランスフェクション後 4 8 時間) は、突然変異が A I C D - G V P 介在のレポータートランス活性化における変化を誘導しないことを示している。データは D M S O 処理した C 9 9 G V P コントロールに対する百分率で示す。

20

【0 0 3 9】

【図 1 0】A I C D サンドウィッチ E L I S A から作成した標準曲線を、合成 A I C D 標準 (A I C D<sub>1-6</sub> + C y s (配列番号 3 9)、スパーサー、および A I C D<sub>36-48</sub> (配列番号 3 8) を用いて示す。また、A I C D<sub>50</sub> ネイティブ標準配列を示す (配列番号 4 1)。

【0 0 4 0】

【図 1 1 - 1】A および A I C D の非選択的阻害剤による同時阻害。(A) A E L I S A ; (B) A I C D E L I S A 。

【図 1 1 - 2】(C) ガンマ阻害剤の濃度の増大に伴い、A I C D - D D 阻害およびキメラ C T F の安定化を示す、抗 A P P C 末端抗体 (Sigma) を用いたイムノプロット。

【図 1 1 - 3】(D) 他のガンマセクレターゼ阻害剤 D A P T および L - 6 8 5 , 4 5 8 (Merck) と比較した、非選択的な、公開された化合物 (Elan's 44989 および 46719) の A P P 対 選択性。

30

【0 0 4 1】

【図 1 2】A および A I C D の E L A N スルホンアミドによる同時阻害 (A P P / A > N o t c h / N I C D 選択的ガンマセクレターゼ阻害剤) ; (A) A - E L I S A ; (B) A I C D E L I S A 。これらの化合物は、他のガンマ基質 (N o t c h 等) と比較して A P P に対する選択性を有するガンマセクレターゼ阻害剤のクラスを形成する。E L I S A の結果は、阻害剤が A P P におけるガンマおよびイプシロン部位で作用することを示している。

【0 0 4 2】

【図 1 3 - 1】選択的または非選択的阻害剤によるキメラ C 9 9 - G V P からの A I C D 産生の阻害。(A) 野生型 C 9 9 (A P P) およびキメラ J M D スワップ、C 9 9 - A P L P 2 および C 9 9 - N o t c h による選択的および非選択的阻害剤についての A I C D E L I S A ;

40

【図 1 3 - 2】選択的または非選択的阻害剤によるキメラ C 9 9 - G V P からの A I C D 産生の阻害。(B) A P P キメラ J M D 基質 (それぞれ、A P L P 2 : 4 2 . 2 および 2 6 . 2 ; N o t c h ; 3 3 . 6 および 1 5 . 9) と比較した、ネイティブ A P P 基質についての阻害剤化合物 4 7 5 5 1 6 および 4 7 7 8 9 9 の選択性を示す (A) のデータのまとめ。

【0 0 4 3】

【図 1 4 - 1】キメラ J M C C 9 9 G V P 基質からの A I C D 産生の阻害についての選

50

択的および非選択的化合物の相対的効力。(A) 様々なC99 - GVP構築物(A PP (配列番号47); A P L P 2 (配列番号48); N o t c h (配列番号49); N o t c h - G N S K (配列番号50); S L S S (配列番号51))に対する選択的化合物475516によるA I C D阻害のI C<sub>50</sub>(2回の能動応答実験のI C<sub>50</sub>の平均)をW T A P P J M DによるC99 - GVPについてのI C<sub>50</sub>に対して標準化した(エラーバーはI C<sub>50</sub>の反復測定にもとづくC Vを示す)。(B) 様々な構築物に対する非選択的化合物44989によるA I C D阻害のI C<sub>50</sub>(1回の測定)をW T A P P J M DによるC99 - GVPについてのI C<sub>50</sub>に対して標準化した。(C) 様々な構築物に対する化合物475516によるA I C D阻害のI C<sub>50</sub>値(2回の能動応答実験のプールデータからの単一のI C<sub>50</sub>)をW T A P P J M DによるC99 - GVPについてのI C<sub>50</sub>に対して標準化した。

10

【図14 - 2】(D) 選択的スルホンアミド阻害剤およびC99キメラ基質配列を用いたA I C Dのガンマセクレターゼ産生の阻害: 野生型(C99 GVP - A P P); C99 GVP - N o t c h; C99 GVP - A P P 4 - S L S S; C99 GVP - N o t c h 4 - G S N K。ネイティブA P P J M D領域の保持または膜貫通領域のN末端に隣接して存在するG S N K配列は、選択的阻害剤化合物480271および48970の存在下でガンマセクレターゼにより産生したガンマセクレターゼA I C Dの比率を減少させる。

【0044】

【図15】A I C D neo - エピトープに対するM A b 22B11の選択性を過剰のA I C D neo - エピトープペプチドの能力によって示し、E L I S A分析実験における結合について濃度依存的に競合するが、開裂部位にまたがるペプチドおよびタンパク質は競合しない。また、これらのデータは、A I C D neo - エピトープに対する結合に関する22B11のK dが約5 μ Mであることを示唆している。

20

【0045】

【図16】A I C D E L I S Aは細胞リゼートにおけるA I C Dを検出する。補足のためにA I C D neo - エピトープモノクローナル22B11を用いたサンドウィッチE L I S Aは、増大する量のA P P基質を発現するH E K 293細胞からの抽出物においてガンマセクレターゼ産生A I C D - D Dの増大する量を検出する(F a s - A P P - D D c D N Aの一時的トランスフェクトの増大する濃度から)。

【0046】

30

【図17】ベースライン、様々な異なる基質に由来するJ M D構築物でトランスフェクトした、およびガンマセクレターゼ阻害剤処理なしでの、H E K 293細胞からの細胞リゼートにおける様々なガンマセクレターゼ開裂産物の非阻害レベル。構築物は、C99 - N o t c h、C99 - E r b B 4; C99 - A P L P 2; C99 - p 75 N T F R; C99 - N - カドヘリン; C99 - S C N B 2; C99 - チロシナーゼ; およびコントロールの非トランスフェクト細胞を含む。データは、C99 - A P P - G V P構築物開裂産物について、生成物(I C D、A b e t a 40、A b e t a 42およびC99)の量に標準化して示している。即ち、C99 - A P P構築物についてのすべての開裂産物を100%とし、試験した他の基質からの生成物を、C99 - A P P構築物からのそれぞれの産物に対して相対的に示す。

40

【0047】

【図18】様々なJ M D構築物からのI C Dの阻害についての選択的対非選択的阻害剤の相対的な効力。構築物は、C99 - A P P; C99 - N o t c h、C99 - E r b B 4; C99 - A P L P 2; C99 - p 75 N T F R; C99 - S C N B 2; およびC99 - チロシナーゼを含む。データは、C99 - A P PからのA I C D産生の阻害についてのE C<sub>50</sub>値について標準化して示す。即ち様々な基質に対する化合物が相対的に「x倍」選択的であることを示す。

【0048】

【図19】A P P J M D領域のG S N Kアミノ酸配列でのアミノ酸突然変異誘発に応じて変化する、非選択的ジベンゾカプロラクトン(E L N - 44989)および選択的なス

50



ルホンアミド (E L N - 4 7 5 5 1 6 および E L N - 4 8 1 0 9 0 ) ガンマセクレターゼ阻害剤の効力の効果。A P L P 2 の J M D からの対応するアミノ酸並びに C 9 9 - A P P - G V P における完全な 4 つのアミノ酸置換を一連の点変異として挿入した。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 9 】

本発明は、単一のモジュラー構築物を用いる、既知のまたは想定されるガンマセクレターゼの基質におけるガンマセクレターゼにより媒介される開裂をモニターするための便利で簡便なシステムを提供する。本発明の様々な側面は、ガンマセクレターゼ開裂に関する阻害剤の効力についての基質の同一性と構造の変化の効果をモニターするためのポータブルなシステムを提供する。このシステムにおいて基質間の効力の比較は様々な基質および基質の変異体において阻害剤の選択性を推定するために用いることができる。

10

【 0 0 5 0 】

本明細書に記載の分析は、モジュラー、シングル - フォーマットの分析システムであり、ガンマセクレターゼ阻害化合物の基質選択性を測定する。この分析は、複数のガンマセクレターゼ基質に対するガンマ阻害剤の効力、そしてそれら基質間の選択性の測定を可能にするので、任意の所望の基質選択性のプロファイルを有するガンマセクレターゼ阻害剤を発見するのに用いることができる。例えば、このアッセイを用い、A 産生を阻害し N o t c h の生理学的プロセッシングを調節しない、A P P 選択的化合物を同定することによってアルツハイマー病の治療に有用な化合物を発見することができる。

20

【 0 0 5 1 】

同様に、研究により、様々なヒトの癌 ( T 細胞急性リンパ性白血病、乳癌、前立腺および膵臓ならびに C N S 新生物を含む ) は、異常に高アイソフォーム特異的な N o t c h シグナリングが関与し得、N o t c h アイソフォーム特異的ガンマセクレターゼ基質阻害剤は治療上の利点を有することを示唆している。N o t c h が、自己免疫、増殖性及び炎症疾患を含む様々な末端器官 ( end organ ) の疾患に関与するという証拠もある ( Arumugam T hiruma, et al., Nat. Med., (2006) 12(6): 621-3; Barsky Sanford, H., et al., FASEB J. (2007); Juryneczyk, M., et al. (2005) J. Neuroimmunol., 170(1-2): 3-10; Kogoshi, H., et al., Oncology Reports (2007) 18(1): 77-80; Liu, H., et al., Br. Cancer Res. and Treatment (2006); Meng Raymond, D., et al. (2006) Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting; Nefedova, Y., et al., Blood (2008) 111(4): 2220-9; Setoeuchi, T., et al., J. Bone and Min. Res. (2007); Sun, Y, et al., Br. Cancer Res. and Treatment (2006); Teachey David, T., et al., Blood (2008) 111(2): 705-14; van Es Johan, H. and H. Clevers, Trends Molec. Med. (2005) 11(11): 496-502; Zhang, P., et al. (2006) Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting)。N o t c h 依存の癌や自己免疫の理解が急速に進んでおり、N o t c h の特定のアイソフォームが問題となる個々の疾患に重要であることが示唆されている：例えば、T 細胞白血病 ( Vacca, et al., EMBO J. (2006) 25(5): 1000-8; Bellavia, D., et al., EMBO J. (2007) 26(6): 1670-80) (Ellisen, L.W., et al., Cell (1991) 66: 649-661; Nickoloff, B.J., et al., Oncogene (2003) 22: 6539-6608) および E A E (Juryneczyk, M.A., et al., J Immunol (2008) 180(4): 2634-40) ) 。

30

40

従って、これらの N o t c h 依存の癌 ( 及び自己免疫疾患等の他の状態 ) に関して、本明細書に記載したアッセイ及び方法は、特定の N o t c h アイソフォームに関して選択的で、疾患に関連しない他の N o t c h アイソフォームの正常なプロセッシングは阻害しないガンマセクレターゼ阻害剤を同定するのに用いることができる。従って、本明細書に記載のアッセイ及び方法は、アルツハイマー病、癌及び自己免疫疾患が挙げられるがこれに限定されない、何らかの疾患に関与する特定のガンマセクレターゼ基質に対してアイソフォーム選択性を示す化合物を同定するのに用いることができる。

【 0 0 5 2 】

当業者は、本明細書に記載の方法及びアッセイが、任意の現在知られているまたはこの

50

先同定されるガンマセクレターゼ基質に対して好ましい阻害プロファイルを有する化合物を同定するために有利に用いることができることを認識する。

【0053】

一つには、本発明は、ADを処置するためのガンマセクレターゼ阻害剤を発見における大きな挑戦の一つに関する。例えば、APPプロセッシング(Aを生じる)に加えて、ガンマセクレターゼはいまや、他の多くの基質をプロセッシングすることが認識されている。ひとつの主な他の基質はNotchである。ガンマセクレターゼ阻害剤の臨床錠の開発は、これらの化合物が、APPからのA産生の阻害と同等の効力でNorchのプロセッシングを阻害するという事実によって制約を受けている。これらの非限定的ガンマセクレターゼ基質阻害剤によるNotchプロセッシングの阻害は、前臨床安全性モデルにおいて(例えば、ラット及びイヌ)機構的な毒性をもたらすことが知られている(主に消化管)。さらに、ガンマセクレターゼは知られている拡大を続ける一連の基質(それに属するものはガンマセクレターゼによるその開裂がAPPのそれと同等の効力で阻害されれば、機構的な毒性として現れ得る)をプロセッシングすることが示されている。

10

20

30

40

50

【0054】

本発明以前、APP開裂の調節に関する他の既知のガンマセクレターゼ基質の任意のものに対する任意のガンマセクレターゼモジュレーターを選択性の研究は、実験下で各基質の発現を必要とする骨の折れる集中的な一連のステップを必要とし、その上、その基質の開裂を定量する分析法をそれぞれ別個に開発し用いること、異なる条件下で行い、異なる開裂産物の検出を必要とするものであった。本発明は存在する課題を解決するものであり、a)ガンマセクレターゼモジュレーターを選択性を、類似性の高い基質と共通の計測値で単一のアッセイフォーマットで調べること(2種類鋸となるタイプのアッセイから得られた開裂産物の測定を行い比較する代わりに)、およびb)APPに加えてガンマセクレターゼの他の基質を容易に同定し、そのプロセッシングが明かにAPP選択的化合物によって調節され得ることを含む。

【0055】

本発明は、別の-セクレターゼ基質と比較して、特定の-セクレターゼ基質に対する-セクレターゼ活性を優先的に調節する化合物の同定に用いる方法を提供する。いくつかの方法は、例えば異なるガンマセクレターゼ基質の膜近傍ドメイン(JMD)またはアミノ酸配列に修飾を有するJMDを有するAPPアナログの、膜貫通ドメイン(TMD)を有するガンマセクレターゼ基質を用いるアッセイにおいて化合物のスクリーニングを必要とする。基質としては、細胞内ドメインにおけるその基質の安定性のためおよびガンマセクレターゼによる基質の開裂からもたらされる様々な開裂産物を検出するのに用いることができる部分を提供するための、さらに他の様々なポリペプチド配列が挙げられる。従って、基質のJMDが様々なガンマセクレターゼ基質に由来する可変のJMDを有するユニバーサルな基質を提供する。可変のJMDを有する単一の基質を用いて、ガンマセクレターゼモジュレーターの効力を決定することができ、JMDがそこからコピーまたは由来している天然の基質に対するモジュレーターの効力と関連づけることができる。従って、本発明は、天然の基質に対して阻害剤をテストする必要なしに、様々なガンマセクレターゼ基質に対するガンマセクレターゼモジュレーターの選択性を評価する方法を提供する。

【0056】

本発明はさらに、他のガンマセクレターゼ基質と比較して、基質のガンマ( )またはイプシロン( )開裂部位のいずれかで特定のガンマセクレターゼ基質に対するガンマセクレターゼ活性を優先的に調節する化合物を同定するのに用いられる方法を提供する。本アッセイは、ガンマセクレターゼ開裂産物を検出する既知の方法を利用することができる。さらに、本発明は開裂産物(例えばICD)の検出のためのモノクローナル抗体を提供する。本発明はさらに、ある特定のクラスのガンマセクレターゼ阻害剤が別のガンマセクレターゼ基質と比較して増大したまたは減少した阻害効力を有する、ガンマセクレターゼ基質を同定するための方法を提供する。いくつかの方法は、Notch基質S3ノ-開

裂部位の開裂と比較して - 開裂部位での A P P 基質の - セクレターゼ開裂を優先的に調節する化合物を同定のために用いることができる。

【 0 0 5 7 】

本発明についてさらに記載する前に、用語について定義する。本明細書に用いられるように、単数形の「 a 」、「 an 」および「 t h e 」は、特に明示しないかぎりには複数形を包含する。

【 0 0 5 8 】

用語「ガンマセクレターゼ基質」、「 - セクレターゼ基質」および「ガンマセクレターゼの基質」は、本明細書においていずれも同語に交換可能に用いられ、ガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で、マルチユニットプロテアーゼ、即ちガンマセクレターゼによりプロセッシングされる（即ち、開裂 / タンパク質分解される）タンパク質またはポリペプチドを意味する。ガンマセクレターゼのいくつかの非限定的な例としては、本明細書に記載のもの、例えばアミロイド前駆体タンパク質（ A P P ）、 N o t c h 、アミロイド前駆体様タンパク質（ A P L P 2 ）、チロシナーゼ、 C D 4 4 、 e r b B 4 、 n - カドヘリンおよび S C N B 2 等が挙げられる。ガンマセクレターゼ基質はまた、既知のガンマセクレターゼ基質の任意のアイソタイプ（アイソフォーム）、例えば N o t c h 1 、 N o t c h 2 、 N o t c h 3 および N o t c h 4 等、を包含する。さらに、ガンマセクレターゼ基質はヒトの配列に限定されないが、マウス、ラット、モルモット、霊長類等を含む他の哺乳動物由来の基質（オルソログ）も包含する。「基質分子」なる語は、ガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で、マルチユニットプロテアーゼ、即ちガンマセクレターゼによりプロセッシングされ得る（即ち、開裂 / タンパク質分解される）、合成、キメラ、および / または組換えポリペプチドを意味する。「天然に存在するガンマセクレターゼ基質」または「ネイティブな基質」とは、アミロイド前駆体タンパク質（ A P P ）、 N o t c h 、アミロイド前駆体様タンパク質（ A P L P 2 ）、チロシナーゼ、 C D 4 4 、 e r b B 4 、 n - カドヘリンまたは S C N B 2 、または他の非キメラ、そのアイソフォームを含むガンマセクレターゼ基質として作用する天然に存在するポリペプチド、から誘導される非キメラのペプチドを意味する。天然に存在するガンマセクレターゼの一例は、 A P P に由来する J M D および T M D を含んでなるポリペプチドである。天然に存在するガンマセクレターゼ基質を含む、いくつかのガンマセクレターゼ基質および基質分子は、膜貫通タンパク質またはポリペプチドとして内因的または組換えにより細胞内で発現させることができる。

【 0 0 5 9 】

本明細書に用いられる、「ガンマセクレターゼ活性が可能な条件」は、 i n v i t r o または i n v i v o で（例えば、細胞ベースのアッセイ）で、本発明の基質分子をコードする c D N A の発現が可能で、正常な発現、外因的に発現した基質分子の突然変異および取引が可能な条件下でガンマセクレターゼ酵素を含んでなる状態を言う。そのような条件は、ガンマセクレターゼ活性が通常それが発現する細胞内に存在する、典型的な培養条件を含む、培地での細胞の増殖が可能な条件を含む。そのような条件の特定の非限定的な例を本明細書の実施例の項に記載するが、 1 0 % ウシ胎児血清および 5 0 ユニット / m L のペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した高グルコース D M E M 中のセルカルチャーが挙げられる（ 3 7 ° C 、 5 % C O 2 ）。細胞増殖および i n v i t r o バッファー系を可能にする他の具体的な条件は当業者に知られている。当業者はまた、ガンマセクレターゼは、数多くの条件下でおよび様々な細胞のタイプにおいて安定で活性であり、数多くの発現系 / ベクターを用いて発現させることができることを理解している。従って、様々な発現ベクター / 宿主を含ませて本発明のキメラガンマセクレターゼ基質をコードするポリヌクレオチド分子を発現させることができる。これらの系は、組換えバクテリオファージ、プラスミド、コスミド D N A 発現ベクターでトランスフェクトしたバクテリア等の微生物、酵母発現ベクターでトランスフェクトされた酵母、ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）でトランスフェクトされた昆虫細胞、ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス C a M V 、タバコモザイクウイルス T M V ）でトランスフェクトされたまたはバクテリア発現ベクター（例えば、 T i または p B R 3 2 2 プ

ラスミド)でトランスフェクトされた植物細胞または動物細胞系が挙げられるがこれに限定されない。組換えタンパク質生成に有用な哺乳動物細胞としては、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞系、COS細胞(COS-7等)、W138、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562、および293細胞が挙げられるがこれに限定されない。

#### 【0060】

従って、本発明の方法およびアミノ酸配列は、ガンマセクレターゼ活性を可能にするまたはアミノ酸配列の発現を可能にする、任意の発現系を用い、および任意の細胞のタイプにおいて、予め形成し作製することができる。当業者は、HEK-293細胞やCOS細胞を含む本明細書に記載された非限定的な例のような、そのような細胞のタイプを同定することができる。

10

#### 【0061】

本明細書に用いられる用語「ベータペプチド」または「 $\beta$ -ペプチド」は、ガンマ開裂部位で、ガンマセクレターゼ基質の開裂から生じるN末端産物を意味する。例えば、AおよびNotch1は、それぞれ基質APPおよびNotch1のガンマセクレターゼ開裂から生じるベータペプチドである。

#### 【0062】

「細胞内ドメイン」、「細胞内ドメインペプチド」、「細胞内ドメインフラグメント」または「ICD」は、ガンマ( $\gamma$ )またはイプシロン( $\epsilon$ )部位でのガンマセクレターゼ基質の開裂から生じるC末端産物を意味する。典型的には、ICDは、最も細胞質に近接した部位( $\epsilon$ 部位等)での開裂から生じるが、膜貫通ドメイン(TMD)内の2つのガンマセクレターゼ開裂部位を欠くいくつかの基質に対する $\gamma$ 部位での開裂であってもよい。例えば、AICDおよびNICDは、それぞれ、APPおよびNotch1の $\gamma$ /S3部位でのガンマセクレターゼ開裂から生じる細胞内ドメインペプチドである。

20

#### 【0063】

「ガンマ」、「および「イプシロン」なる語は、本明細書において一般に、ガンマセクレターゼ基質の特定の開裂部位に関して用いられる。これらの用語は、ガンマ部位での開裂が $\beta$ ペプチドのC末端を生じ(例えばA<sub>40</sub>またはA<sub>42</sub>)、イプシロン部位での開裂が細胞内ドメインペプチドのN末端を生じる(例えば、AICD、NICD等)、ガンマセクレターゼが基質において作用するTMD内の2つの別個の開裂部位を意味する。また、イプシロン開裂非存在下でのガンマ部位での開裂はICDおよびA様ペプチドを生じる。

30

#### 【0064】

「C99GVP」は、膜貫通ドメインの末端から3アミノ酸残基C末端側にGal4-VP16 DNA結合/トランス活性化ドメインがインフレームで挿入された、 $\beta$ -セクレターゼによるAPPの開裂から生じる99アミノ酸のC末端フラグメントのポリペプチド配列を意味する。このタイプのポリペプチドの例としては、Karlstrom, H., et al., J. Biol. Chem., (March 1, 2002); 277(9):6763-6766に記載されているような配列が挙げられるがこれに限定されない。

#### 【0065】

「膜貫通ドメイン」、「膜貫通領域」または「TMD」は、細胞膜の脂質二重層内に位置するガンマセクレターゼ基質の領域を意味する。一般にTMDは疎水性であり、荷電残基によりN末端とC末端で結合している。本明細書において用いられる、いくつかのガンマセクレターゼ基質(例えば、APPおよびNotch)の膜貫通ドメインは、ガンマセクレターゼが基質を開裂する両部位(即ち、ガンマおよびS3/イプシロン開裂部位)を含む。TMDのN末端は、基質の膜近傍ドメインのC末端に隣接する。例えば、APPのJMDのC末端は配列番号1のだいたい28番目の残基に位置し、APPのTMDのN末端は配列番号1のだいたい29番目の残基に位置する。膜貫通ドメイン(TMD)を含むタイプIの内在性膜タンパク(ここで「タイプI」は細胞質/内腔側に位置するC末端により特徴付けられる)は、典型的には疎水性で荷電残基を含まない、しばしばヘリックス

40

50

スの、膜を貫通するまたは膜に「またがって」いる、ポリペプチドの部分である。TMDは平均して長さが約20アミノ酸であり、ハイドロパシー解析アルゴリズムやX線回折等が挙げられるがこれに限定されない他の様々な実験技術を含む、当業者に知られている方法により、計算で予測することができる。TMDはしばしば、一方または両側で、疎水性で荷電した残基に結合しているかまたは「挟まれ」ている。本発明の特定の態様では、基質のJMDは、TMDの細胞外側のN末端側(TMDのN末端側)に、15~20残基、通常約19残基、の長さで延びている。TMDは、ポリクロールまたはモノクロール抗体のような特定の結合物質に特異的に結合するアミノ酸配列を含んでなることができる。

#### 【0066】

本明細書において用いられる「膜近傍ドメイン」または「JMD」は、膜貫通領域のN末端側の直ぐ隣に位置するガンマセクレターゼ基質の領域を意味する。膜近傍ドメインは、典型的には約15~約30アミノ酸残基、通常約19~約25アミノ酸、の長さである。本明細書に用いられる「JMDC4」は、膜貫通ドメイン(TMD)のN末端の直ぐ隣に隣接して位置する4つのC末端ペプチドを欠くJMDを意味する。

#### 【0067】

本明細書において用いられる「AGBP<sup>1</sup>」および「AGBP<sup>2</sup>」は、特定の結合ペアの部分であるエピトープまたは共有結合により結合した部分を意味する。そのような配列の例としては、抗体によって認識されるA配列を有する内部またはネオ-エピトープのいずれか、抗体によって認識される少なくとも10~15残基のAPP C末端内のエピトープ、抗体によって認識されるAICDneo-エピトープ(イプシロン部位でのガンマセクレターゼ開裂によって生じる)および基質のN末端またはC末端のいずれかのエピトープタグ(HA-タグ、myc-タグ等が挙げられるがこれに限定されない)が挙げられる。

#### 【0068】

本明細書において用いられる「Sig」は、特定の細胞または細胞外の場所に結合するポリペプチドのトランスポートおよび/またはトランスロケーションを指示する機能を有する一般的なアミノ酸シグナル配列を意味する。そのようなシグナル配列は当分野でよく知られている(例えば、Devillers-Thierry A, et al., "Homology in amino-terminal sequence of precursors to pancreatic secretory proteins" Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 Dec;72(12):5016-5020を参照)。

#### 【0069】

一態様では、本発明は、化合物が基質特異的にガンマセクレターゼを阻害するか否かを測定するための方法及びアッセイを提供する。本方法は、ガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で、ガンマ開裂部位を有する2種以上のガンマセクレターゼ基質を、ガンマセクレターゼおよびガンマセクレターゼ活性を調節する1以上の化合物と接触させることを含む。接触工程は、細胞ベースのアッセイ等のin vivoの条件を含むことができ、あるいはin vitroで行うこともできる。適当な時間の後、各基質についてのガンマ開裂部位でのガンマセクレターゼの量を測定する。活性を比較して化合物が基質特異的に活性を阻害するか否か決定することができる。例えば、ある一つの基質についての活性の量がもう一つの基質についての活性と異なる場合、その化合物はガンマセクレターゼを基質特異的に阻害すると決定することができる。

#### 【0070】

本発明のこの態様において、1以上のガンマセクレターゼ基質は天然に存在する基質であってよい(例えば、アミロイド前駆体タンパク質(APP)、Notch、アミロイド前駆体様タンパク質APLP2、チロシナーゼ、CD44、erbB4、n-カドヘリン、p75 NTFRおよびSCNB2から選択されるガンマセクレターゼ基質)。例えば、第1のガンマセクレターゼ基質はAPPであり、第2のガンマセクレターゼ基質はAPLP2、Notch、erbB4、チロシナーゼ、p75 NTFR、SCNB2、n-カドヘリンまたはCD44である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 1 】

別の態様では、1以上のガンマセクレターゼ基質は同じ膜貫通ドメイン[ T M D ]を有するが、異なる膜近傍ドメイン[ J M D ]を有する。例えば、第1のガンマセクレターゼ基質は式[ T M D 1 ][ J M D 1 ](式中、[ J M D 1 ]は第1の膜近傍ドメイン配列を含んでなり[ T M D 1 ]は膜貫通ドメインを含む)を含む第1のポリペプチドであり、第2のガンマセクレターゼ基質は式[ J M D 2 ][ T M D 1 ](式中、[ J M D 2 ]は第2の膜近傍ドメイン配列を含んでなり[ T M D 1 ]は前記と同意義)を含む第2のポリペプチドであり、ここで膜近傍ドメイン配列及び膜貫通ドメイン配列は本明細書において定義したとおり(現在知られている他のガンマセクレターゼ基質の任意の膜近傍ドメイン及び膜貫通ドメインを含む(例えば、Beel and Sanders Cell. Mol. Life Sci. (2008) 65:13 11-1334参照)である。一態様では、[ T M D 1 ]はA P Pの膜貫通ドメインであり、[ J M D 1 ]および[ J M D 2 ]はそれぞれ独立にA P L P 2、N o t c h、e r b B 4、チロシナーゼ、p 7 5 N T F R、S C N B 2、n - カドヘリンおよびC D 4 4、ならびに可能性のある/推定されるガンマセクレターゼ基質から選択され、[ J M D 1 ]と[ J M D 2 ]は同一の配列ではない。本発明の更なる態様では、同じT M Dと異なるJ M Dを有する更なる基質を用いてガンマセクレターゼ調節化合物の基質選択性を比較することができる。

10

## 【 0 0 7 2 】

本発明の更なる態様では、第2のガンマセクレターゼ基質には式I I :

20

[ J M D C 4 ] - X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - [ T M D ]

[ 式中、

J M D C 4は、ガンマセクレターゼ基質の膜近傍ドメイン( J M D )配列のアミノ酸配列を含み、ここでJ M Dは4つのC末端ペプチドを欠いており；

[ T M D ]は、ガンマセクレターゼ基質の膜貫通ドメイン配列を含んでなり；

X 1、X 2、X 3およびX 4は、独立して任意のアミノ酸から選択される]

で示されるペプチドを含む。

## 【 0 0 7 3 】

具体的な態様では、X 1はS、T、G、P、Q、R、V、L、N、P、A、K、E、I、F、H、WおよびDから選択され；X 2は任意のアミノ酸であり；X 3はS、N、D、P、E、R、T、F、I、K、L、V、G、W、HおよびAから選択され；X 4は任意のアミノ酸である。

30

## 【 0 0 7 4 】

具体的な態様では、X 1はS、T、G、P、Q、R、V、L、N、P、A、K、E、I、F、H、WおよびDから選択され；X 3はS、N、D、P、E、R、T、F、I、K、L、V、G、W、HおよびAから選択され；X 2およびX 4はL、I、H、E、V、A、S、T、D、N、P、K、QおよびRから選択される。

## 【 0 0 7 5 】

具体的な態様では、X 1はS、T、G、P、Q、RおよびDから選択され；X 2は任意のアミノ酸であり；X 3はS、N、D、PおよびAから選択され；X 4は任意のアミノ酸である。

40

## 【 0 0 7 6 】

一態様では、本発明の方法またはアッセイは、2以上のトランスフェクションセルカルチャーを種々の濃度でガンマセクレターゼ調節活性を有する1以上の化合物と接触させた後、種々の化合物濃度でトランスフェクションセルカルチャーにおいてガンマセクレターゼ開裂により生じたI C Dの量を測定することを含む。セルカルチャーはそれぞれ、ガンマセクレターゼ基質をコードするポリヌクレオチドでトランスフェクションする。トランスフェクションセルカルチャーそれぞれについての化合物の効果の用量応答曲線を決定し比較する。例えば、第1のトランスフェクションセルカルチャーは第1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトされ、第2のトランスフェクションセルカルチャーは第2のポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドでトランスフェク

50

トされ、各ポリペプチドは式 I I :

[ J M D C 4 ] - X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - [ T M D ]

[ 式中、

[ J M D C 4 ]、[ T M D ] および X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は本明細書において定義したとおりであり、式 I I は第 1 及び第 2 のポリペプチドの両方が同じ配列であると定義しない。この方法において、第 1 の用量応答曲線と比較して、第 2 の用量応答曲線における高濃度側へのシフトは、その化合物が、第 2 のガンマセクレターゼ基質と比較して、第 1 のガンマセクレターゼ基質に対して選択的（またはその逆）であることを示している。

【 0 0 7 7 】

本発明の態様の方法及びアッセイは、当業者が認識するであろう幅広い有用性を有する。ガンマセクレターゼ阻害剤化合物（または候補阻害剤化合物）とガンマセクレターゼ基質の任意の組合せまたは置換を用いて、任意の化合物の選択性プロファイル、またはガンマセクレターゼ阻害剤化合物の任意のシリーズ、任意のガンマセクレターゼ基質に対する選択性を、1 以上のガンマセクレターゼ基質に対して決定することができる。同様に、本方法およびアッセイを用いて一連の（多数の）阻害剤化合物から 2 つ（またはそれ以上）のガンマセクレターゼ基質間で最良の選択性を有する阻害剤化合物を同定することができる。例えば、本方法またはアッセイが 2 つの異なるガンマセクレターゼ基質（S B T 1 および S B T 2）を含む場合、それらの基質をいくつかの濃度の一連の阻害剤化合物（例えば、10 種類の阻害剤化合物、C M P 1、C M P 2、C M P 3 等）と接触させ、一連のようよう応答曲線を作成し、2（またはそれ以上）の基質のそれぞれについて分析することができる。各基質に対する各化合物についての  $IC_{50}$  値を決定し、 $IC_{50}$  値の比（即ち、[ S B T 1 についての C M P 1 の  $IC_{50}$  ] : [ S B T 2 についての C M P 1 の  $IC_{50}$  ]）として示すことができる。この比選択性を用いて、どの阻害剤化合物が最良（最悪）の選択性を有するかを決定し、アッセイにおいて用いた基質に対する選択性について化合物をランク付けすることができる。

【 0 0 7 8 】

一態様において、本発明はガンマセクレターゼに対する基質分子を提供する。この基質分子は、ある一つのガンマセクレターゼ基質（例えば A P P）に由来する T M D と第 2 の基質（例えば N o t c h）に由来する J M D 含むキメラポリペプチド配列を含んでいてもよい。いくつかの基質分子においては、J M D の C 末端が T M D の N 末端に結合している。基質の T M D 内のガンマおよび / またはイプシロン開裂部位の開裂についてのガンマセクレターゼ活性は、基質の J M D を交換することによって調節することができる。そのような 1 つの基質分子は式 I :

J M D ( 1 ) - T M D ( 2 ) ( 式 I )

[ 式中、J M D ( 1 ) は第 1 のガンマセクレターゼ基質の J M D であり、J M D ( 2 ) は第 2 のガンマセクレターゼ基質の T M D である ]

で示される。

【 0 0 7 9 】

いくつかのキメラポリペプチドは、ガンマセクレターゼ基質（例えば A P P）に由来する T M D と、同じ基質または第 2 の基質（例えば N o t c h）に由来する J M D を含み、天然の J M D 配列の 4 個の C 末端アミノ酸の 1 以上が修飾されている。キメラ基質の T M D におけるガンマまたはイプシロン部位の開裂について、4 個の C 末端アミノ酸の修飾によりガンマセクレターゼの活性を調節し得ることが見出された。

【 0 0 8 0 】

そのようなひとつのキメラポリペプチドは式 I I :

[ J M D C 4 ] - X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - [ T M D ] ( 式 I I )

[ 式中、

J M D C 4 は、ガンマセクレターゼ基質の膜近傍ドメイン ( J M D ) 配列のアミノ酸配列を含み、ここで J M D は 4 つの C 末端ペプチドを欠いており ;

[ T M D ] は、ガンマセクレターゼ基質の膜貫通ドメイン配列を含んでなり ;

X 1、X 2、X 3 および X 4 は、独立して任意のアミノ酸から選択され、  
但し、

[ J M D C 4 ] の J M D が A P P の J M D である場合、[ T M D ] は A P P の膜貫通ドメイン配列を含んでなり、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は G - S - N - K ではなく；

[ J M D C 4 ] の J M D が A P L P 2 の J M D である場合、[ T M D ] は A P L P 2 の膜貫通ドメイン配列を含んでなり、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は S - L - S - S ではなく；

[ J M D C 4 ] の J M D が N o t c h 1 の J M D である場合、[ T M D ] は N o t c h 1 の膜貫通ドメイン配列を含んでなり、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は P - P - A - Q ではなく；

[ J M D C 4 ] の J M D が e r b B 4 の J M D である場合、[ T M D ] は e r b B 4 の膜貫通ドメイン配列を含んでなり、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は Q - H - A - R ではなく；

[ J M D C 4 ] の J M D がチロシナーゼの J M D である場合、[ T M D ] はチロシナーゼの膜貫通ドメイン配列を含んでなり、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は Q - A - S - R ではなく；

[ J M D C 4 ] の J M D が p 7 5 N T F R の J M D である場合、[ T M D ] は p 7 5 N T F R の膜貫通ドメイン配列を含んでなり、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は Q - A - S - R ではなく；

[ J M D C 4 ] の J M D が S C N B 2 の J M D である場合、[ T M D ] は S C N B 2 の膜貫通ドメイン配列を含んでなり、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は R - D - S - T ではなく；

[ J M D C 4 ] の J M D が n - カドヘリンの J M D である場合、[ T M D ] は n - カドヘリンの膜貫通ドメイン配列を含んでなり、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は D - V - D - R ではなく；

[ J M D C 4 ] の J M D が C D 4 4 の J M D である場合、[ T M D ] は C D 4 4 の膜貫通ドメイン配列を含んでなり、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は Q - I - P - E ではない]で示することができる。

#### 【 0 0 8 1 】

ある特定の 4 個の C 末端アミノ酸 ( X 1 - X 4 ) は、ガンマセクレターゼが特定の開裂部位または特定の基質配列に対して有する選択性または開裂効率の決定において大きな役割を果たしうる。従って、当業者に知られている常套技術を用いて、これら特定の配列について最適なアミノ酸を同定することができる一連の突然変異誘発実験を設計することができる。例えば、X 2 および X 4 はガンマセクレターゼの基質特異性において役割を果たしうる (例えば Figure 2 参照)。従って、特定のネイティブな J M D を選択し、これらが X 2 および X 4 に対応する残基を除いてすべての残基がネイティブの配列と一致しているが、残基 X 2 および X 4 が 2 0 個の天然アミノ酸を用いて変更されている一連のアミノ酸突然変異体を作製することができる。ガンマセクレターゼ活性を測定するアッセイを用い、ガンマセクレターゼ活性における最も大きな変化を示すものについて、得られた突然変異体配列をスクリーニングすることができる。本発明の特定の態様において、X 2 および X 4 は、L、I、H、E、V、A、S、T、D、N、P、K、Q および R から選択される。

#### 【 0 0 8 2 】

同様に、突然変異誘発実験を用いて、X 2 および X 4 では最適なアミノ酸残基のまま含んでなるが、他の残基が天然の 2 0 個のアミノ酸を用いて突然変異が導入された、一連のキメラ基質を作成することができる。同じタイプのスクリーニングアッセイを利用すれば、任意の与えられたガンマセクレターゼ阻害剤に対する選択性および / またはガンマセクレターゼ選択性がさらに最適化される突然変異キメラ基質の同定が可能である。

#### 【 0 0 8 3 】

式 I および I I のポリペプチドは、ポリペプチドの N 末端または C 末端のいずれかまた

10

20

30

40

50



はその両方に共有結合により連結した更なるアミノ酸配列を含みうる。あるポリペプチドはTMD部分のC末端に結合した更なるアミノ酸配列を含んでなり、この更なるアミノ酸配列はガンマセクレターゼ基質に由来する細胞内ドメイン(ICD)配列の少なくとも一部を含んでなる。例えば、ICD配列は、APPのICD(AICD)、Notch1のICD(NICD)、APLP2の、チロシナーゼの、CD44の、erbB4の、SCNB2の、n-カドヘリンの、p75NTRのICD等から選択される。

#### 【0084】

いくつかのポリペプチドにおいて、TMDのC末端での配列は、ある特定のレポーター遺伝子をトランス活性化するために用いることができる更なるアミノ酸配列を含み、特異的な結合物質によって認識され得る配列または部分を提供し、および/またはICD配列の増大した安定化をもたらす。一例では、この更なるアミノ酸配列はGVP配列を含む(例えば配列番号2)。更なる配列は、そのような特性がICDの検出に必要とされる場合(例えばICDを認識する抗体の結合)には、ICDのGVP配列が免疫原性に影響を及ぼさない限りにおいて、ICD配列の中、後、前に挿入することができる。別法として、GVP配列はICDを検出するための手段を提供する。例えば、GVPは、Gal4-ルシフェラーゼ制御発現プラスミドからの発現変化を測定することにより、ルシフェラーゼアッセイにおいて検出することができるレポーターシステムのメンバーである。

#### 【0085】

式IおよびIIのポリペプチドは、JMDのN末端に共有結合により連結した更なるアミノ酸配列を含むことができ、この更なるアミノ酸配列は特異的な結合物質により認識され得る配列または部分である。JMD(1)またはJMD C4のN末端の配列は、ポリペプチドの細胞内または細胞外の位置への輸送を指示し、(ガンマセクレターゼと接触し得る場所で)ガンマセクレターゼ基質の細胞膜内へのおよび細胞膜越えての挿入を指示することができるシグナルペプチドを含むことができる。例えば、JMD(1)またはJMD C4のN末端に共有結合により結合した更なるアミノ酸配列は、APP、Notch1、APLP2、チロシナーゼ、CD44、erbB4、p75 NTR、n-カドヘリン、SCNB2等から選択されるガンマセクレターゼ基質のN末端配列を含むことができる。シグナル配列は、ペプチダーゼ、プロテイナーゼまたはペプチド結合(例えばL(Ieu)-E(glu)-配列)を開裂させる他の酵素による部位特異的な開裂を指示するアミノ酸配列等のリンカーを介して、ガンマセクレターゼ基質のN末端配列に結合することができる。

#### 【0086】

更なるペプチドは式IIIおよび式IV:

[Sig] - LE - [AGBP<sup>1</sup>] - JMD(1) - TMD(2) - [AGBP<sup>2</sup>] (式III)

[Sig] - LE - [AGBP<sup>1</sup>] - [JMD C4] - X1 - X2 - X3 - X4 - [TMD] [AGBP<sup>2</sup>] (式IV)

で示すことができる。

#### 【0087】

式IIIおよびIVにおいて、JMD(1)、JMD(2)、JMD C4、TMDは式IおよびIIについて上記で定義したとおりである。さらに、

[Sig]は任意事項であり、基質を適当な細胞膜内または細胞膜を越えて挿入するためのポリペプチドの輸送を指示するシグナルペプチドを含み;

LEはジペプチドLeu-Gluであって任意事項であり;

[AGBP<sup>1</sup>]は抗原アミノ酸配列を含み、好ましくはAPP、Notch1、APLP2、チロシナーゼ、CD44、erbB4、p75 NTR、n-カドヘリンおよびSCNB2に由来する様ペプチドの配列に由来するものであり;

[AGBP<sup>2</sup>]は、ガンマセクレターゼ基質の細胞内ドメイン(ICD)配列を含み、ICD配列は第2の抗原アミノ酸配列を含んでなり、特異的な結合物質に対する少なくとも1つの特異的な結合決定因子を有し、場合によりGVP等の安定化配列またはレポーター

10

20

30

40

50

配列を含んでいてもよく；

X 1 は S、G、P、Q、R および D から選択され；

X 2 は L、S、P、T、V、D、A、I および R から選択され；

X 3 は S、N、D、P および A から選択され；

X 4 は K、S、Q、N、T、E および R から選択される。

#### 【0088】

式 I V において、[ J M D C 4 ] は、Y E V H H Q K L V F F A E D V ( 配列番号 3 ) ; L E E E R E S V G P L R E D F ( A P L P 2、配列番号 4 ) ; P Y K I E A V Q S E T V E P P ( N O T C H 1、配列番号 5 ) ; H D C I Y Y P W T G H S T L P ( e r b B 4、配列番号 7 ; ( N M \_ 0 0 1 0 4 2 5 9 9 ) ) ; S D P D S F Q D Y I K S Y L E ( チロシナーゼ、配列番号 8 ; ( N M \_ 0 0 0 3 7 2 ) ) ; V T T V M G S S P V V T R G ( p 7 5 N T F R、配列番号 9 ; ( N M \_ 0 0 2 5 0 7 . 1 ) ) ; H G K I H L Q V L M E E P P E ( S C N B 2、配列番号 10 ; ( N M \_ 0 0 4 5 8 8 ) ) ; L R V K V C Q C D S N G D C T ( n - カドヘリン、配列番号 11 ( N M \_ 0 0 1 7 9 2 ) ) ; および Q E G G A N T T S G P I R T P ( C D 4 4、配列番号 12 ; ( N M \_ 0 0 0 6 1 0 ) ) から選択される。

10

#### 【0089】

さらに、TMD ( 2 ) または [ TMD ] は、例えば APP の TMD の非限定的な例 : G A I I G L M V G G V V I A T V I V I T L V M L ( 配列番号 13 ) のように、任意のガンマセクレターゼ基質の膜貫通領域を含むことができる。式 I I I および I の両方において、配列の J M D 部分は TMD を含む天然の基質の J M D と同一ではない。従って、式 I に関連する但書は式 I I I にも当てはまる。

20

#### 【0090】

いくつかのポリペプチドにおいて、式 I I I および I V の [ A G B P <sup>1</sup> ] は、APP、Notch 1、APLP 2、チロシナーゼ、CD 44、erb B 4、SCNB 2、p 75 NTF R、n - カドヘリン等から選択されるガンマセクレターゼ基質の N 末端配列を含む。[ A G B P <sup>1</sup> ] を含む配列はしばしば便宜上ガンマセクレターゼ基質の N 末端に由来するか一部であり、[ A G B P <sup>1</sup> ] はさらに特定の結合アッセイ (例えば ELISA) 等の既知の方法による検出及び定量を可能にする配列を提供することができる。従って、いくつかのポリペプチドでは、[ A G B P <sup>1</sup> ] は配列 D A E F R H D S G ( A N 末端エピトープ ) ( 配列番号 14 ) を含んでなる。

30

#### 【0091】

いくつかのポリペプチドにおいて、式 I I I および I V の [ A G B P <sup>2</sup> ] は、APP ( A I C D )、Notch 1 ( N I C D )、APLP 2、チロシナーゼ、CD 44、erb B 4、SCNB 2、p 75 NTF R、n - カドヘリン等から選択されるガンマセクレターゼ基質に由来する細胞内ドメイン ( I C D ) 配列の少なくとも一部を含む (例えば、[ A G B P <sup>2</sup> ] は配列番号 38 のアミノ酸配列 ( A I C D ) を含んでなる)。

#### 【0092】

式 I V の L E - [ A G B P <sup>1</sup> ] - [ J M D C 4 ] - X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - [ T M D ] の配列のいくつかの非限定的な例としては以下のものが挙げられる：

40

( a ) ( C 9 9 G V P - A P L P 2 ) : L E D A E F R H D S G L E E E R E S V G P L R E D F S L S S G A I I G L M V G G V V I A T V I V I T L V M L ( 配列番号 16 ) ;

( b ) ( C 9 9 G V P - N O T C H 1 ) : L E D A E F R H D S G P Y K I E A V Q S E T V E P P P P A Q G A I I G L M V G G V V I A T V I V I T L V M L ( 配列番号 17 ) ;

( c ) ( C 9 9 G V P - S R E B P 1 ) : L E D A E F R H D S G A K P E Q R P S L H S R G M L D R S R G A I I G L M V G G V V I A T V I V I T L V M L ( 配列番号 18 ) ;

( d ) ( C 9 9 A P P 4 - A P L P 2 ) : L E D A E F R H D S G Y E V H H Q K L

50

V FFAEDVSLSS GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号42) ;

(e) (C99-APP-(G25S)) : LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV  
FFAEDVSSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号43)

(f) C99-APP-(S26L) : LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV  
FFAEDVGLNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号44)

(g) C99-APP-(N27S) : LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV  
FFAEDVGS SK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号45)

(h) C99-APP-(K28S) : LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV  
FFAEDVGS NS GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号46)

(i) (C99APP 4-NOTCH1) : LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV  
FFAEDVPPAQ GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号100) ;

(j) (C99APP 4-SREBP1) : LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV  
FFAEDVDRSR GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号101) ;

(k) (C99GVP-APLP2-gsnk) : LEDAEFRHDS GLEEEER  
ESVG PLREDFGS NK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号19) ;

(l) (C99GVP-NOTCH1-gsnk) : LEDAEFRHDS GPYKIE  
AVQS ETVEPPGS NK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号20) ; および

(m) (C99GVP-SREBP1-gsnk) : LEDAEFRHDS GAKPE  
QRPSL HSRGMLGS NK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配列番号21)。

#### 【0093】

いくつかのポリペプチドにおいて、GVPは、配列KLLSSIEQAC DICRL  
KKLKC SKEKPKCAKC LKNNWECRYS PKTKRSPLTR A  
HLTEVESRL ERLEQLFLLI FPREDLDMIL KMDSLQDI  
KA LLTGLFVQDN VNKDAVTDR L ASVETDMPLT LRQH  
RISATS SSEESSNKGQ RQLTVSGIPG DLAPPTDVSL  
GDELHLDGED VAMAHADALD DFDLDMLGDG DSPGPGF  
TPH DSAPYGALDM ADFEFEQMFT DALGIDEYGG (配列番号2) を含む。いくつかのポリペプチドにおいて、GVP配列は、配列の所望の機能、例えばシグナル配列のトランス活性化、認識または結合部分の提供、および/またはガンマセクレターゼ開裂により生じるペプチドフラグメントに対する安定性の増大を保持する限りにおいて、保存的なアミノ酸置換、アミノ酸の挿入及び欠失、C末端および/またはN末端トランシェーション等の任意の常套的な分子生物学的技術により修飾することができる。従って、本発明は、上記のGVP配列と機能的に等価なもの(配列番号2と約80%~約100%同一な配列(即ち配列番号2と約80、85、90、95、96、97、98または99%同一である配列)を含む)を包含する。

#### 【0094】

式I~IVで示されるガンマセクレターゼ基質は、基質に対するガンマセクレターゼの活性を測定するアッセイにおいて用いることができる。いくつかのアッセイは、工程(a)ガンマセクレターゼ活性を可能にする条件下(例えば、細胞を試験化合物と接触させることにより、細胞がそのようなポリペプチドを発現し、ガンマセクレターゼを組換え的に

10

20

30

40

50

または内因的に発現する)で、式Ⅰ～Ⅳのポリペプチド配列をガンマセクレターゼと接触させる。あるいは、外因的なガンマセクレターゼ、例えば可溶性ガンマセクレターゼ、を細胞ベースのアッセイに加えても良い。一連のアッセイにおいて、式Ⅰ～ⅣのJMD部分は本明細書に記載したように交換することができる。例えば、式Ⅰおよび式Ⅲを用いて、APP由来のTMDを含むキメラ基質においてNotch由来のJMDを用いることができる(またはその逆も可)。次いで、式Ⅲ及び式Ⅳを用いて、このキメラ基質のJMDの最後の4つの残基を修飾して異なる基質とすることができる。単一のアッセイフォーマットを用いて、種々の基質に対するガンマセクレターゼ活性の量を測定することができる。

#### 【0095】

いくつかの方法は、キメラJMD基質配列が基質アミノ酸配列をコードするcDNAでトランスフェクトされた細胞において発現する細胞ベースのアッセイを含む。例えば、いくつかの方法は、化合物がガンマセクレターゼ活性を、第2のガンマセクレターゼ基質と比較して第1のガンマセクレターゼ基質について選択的に阻害するか否かを測定することを含んでなり：

- (a) 第1のトランスフェクトされたセルカルチャーをガンマセクレターゼ活性を可能にする条件下で種々の濃度の化合物と接触させること；
- (b) 第2のトランスフェクトされたセルカルチャーをガンマセクレターゼ活性を可能にする条件下で種々の濃度の化合物と接触させること；
- (c) 種々の化合物濃度のそれぞれについて第1及び第2のトランスフェクトされたセルカルチャーによりそれぞれ産生したAICDを測定して、第1のトランスフェクトされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第1の用量応答曲線と第2のトランスフェクトされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第1の用量応答曲線を作成すること；および
- (d) 第1と第2の用量応答曲線を比較すること

(ここで、第1のトランスフェクトされたセルカルチャーは、式Ⅰ～Ⅳのいずれかの膜近傍ドメイン配列(JMD1)と膜貫通ドメイン配列(TMD1)を含んでなる第1のポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチドでトランスフェクションし、JMD1は第1のガンマセクレターゼ基質に由来し、第2のトランスフェクトされたセルカルチャーは、膜近傍ドメイン配列(JMD2)と膜貫通ドメイン配列(TMD1)を含んでなる第2のポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドでトランスフェクションし、JMD2は第2のガンマセクレターゼ基質に由来し、第1および第2のポリペプチドのTMD1は同じである)

ことを含んでなる。第1の用量応答曲線と比較して、第2の用量応答曲線が高濃度側へシフトしている場合(本明細書中の実施例参照)、その化合物が、第2のガンマセクレターゼ基質と比較して、第1のガンマセクレターゼ基質に対して選択的であることを示している。本明細書において一般的に用いられるように、任意の与えられた阻害剤化合物についての「用量応答曲線のシフト」は、試験したガンマセクレターゼ基質に応じて化合物のIC<sub>50</sub>値が増大または減少したことを意味している。基質1を発現する細胞1および基質2を発現する細胞2(等)についてのIC<sub>50</sub>値は、様々な容易に利用可能なコンピュータソフトウェアプログラム(例えば、GraphPad PRISM, MS Excel, SigmaPlot等)を使用しまたは使用することなく、当業者が阻害剤の用量応答曲線から計算することができる。

#### 【0096】

いくつかの方法は、APP由来の配列を含んでなる第1のガンマセクレターゼ基質、およびAPLP2、Notch、erbB4、チロシナーゼ、p75<sup>NTR</sup>、SCNB2、n-カドヘリンまたはCD44に由来する配列を含んでなる第2のガンマセクレターゼ基質を含んでなる。他の方法は、APP由来の膜貫通ドメイン配列を含んでなる[TMD1]を含んでなる第1のガンマセクレターゼ基質を含んでなり；[JMD1]と[JMD2]配列は、APLP2、Notch、erbB4、チロシナーゼ、p75<sup>NTR</sup>、SCNB2、n-カドヘリンまたはCD44から選択される膜近傍ドメイン配列を含んでなり、[JMD1]と[JMD2]は同一ではない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 7 】

ガンマセクレターゼは、当業者に知られている任意の標準的な技術（例えば、ガンマセクレターゼをコードするポリヌクレオチドによる細胞のトランスフェクション、エレクトロポレーション、またはバイラルベクターデリバリー）によってセルカルチャーに添加することができる。他の態様では、本方法は、第 1 の及び第 2 のセルカルチャーにより内因的に及び構成的に産生した活性なガンマセクレターゼを含んでなる。

## 【 0 0 9 8 】

化合物が第 2 のガンマセクレターゼ基質と比較して第 1 のガンマセクレターゼ基質においてガンマセクレターゼ活性を選択的に阻害するか否かを決定する別の方法は、

( a ) 第 1 のトランスフェクトしたセルカルチャーと種々の濃度の化合物を、ガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

( b ) 第 2 のトランスフェクトしたセルカルチャーと種々の濃度の化合物を、ガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

( c ) 種々の化合物濃度でトランスフェクションした第 1 および第 2 のセルカルチャーのそれぞれによって産生した A I C D を測定し、第 1 のトランスフェクションされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第 1 の用量応答曲線と、第 2 のトランスフェクションされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第 2 の用量応答曲線を作成すること；および

( d ) 第 1 と第 2 の用量応答曲線を比較すること

( ここで、

第 1 のトランスフェクトしたセルカルチャーは、式 [ J M D ] [ T M D ] ( 式中、J M D 及び T M D は第 1 のガンマセクレターゼ基質に由来する ) を含んでなる第 1 のポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドでトランスフェクションされ、

第 2 のトランスフェクトしたセルカルチャーは、式 I I :

[ J M D C 4 ] - X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - [ T M D ]

( 式中、[ J M D C 4 ] および [ T M D ] は本明細書において定義したとおりであり、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は第 2 のガンマセクレターゼ基質に由来する )

を含んでなるポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドでトランスフェクションされ、第 1 の用量応答曲線と比較して、第 2 の用量応答曲線における高濃度側へのシフトは、その化合物が、第 2 のガンマセクレターゼ基質と比較して、第 1 のガンマセクレターゼ基質に対して選択的であることを示す )

を含んでなる。

## 【 0 0 9 9 】

いくつかの方法において、第 1 のガンマセクレターゼ基質は A P P 由来であり、第 2 のガンマセクレターゼ基質は A P L P 2、N o t c h、e r b B 4、チロシナーゼ、p 7 5 N T F R、S C N B 2、n - カドヘリンまたは C D 4 4 に由来する。

## 【 0 1 0 0 】

化合物が、第 2 のガンマセクレターゼ基質と比較して、第 1 のガンマセクレターゼ基質についてガンマセクレターゼ活性を選択的に阻害するか否かを決定するためのいくつかの方法は、

( a ) 第 1 のトランスフェクトしたセルカルチャーと種々の濃度の化合物を、ガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

( b ) 第 2 のトランスフェクトしたセルカルチャーと種々の濃度の化合物を、ガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；

( c ) 種々の化合物濃度でトランスフェクションした第 1 および第 2 のセルカルチャーのそれぞれによって産生した A I C D を測定し、第 1 のトランスフェクションされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第 1 の用量応答曲線と、第 2 のトランスフェクションされたセルカルチャーに対する化合物の効果の第 2 の用量応答曲線を作成すること；および

( d ) 第 1 と第 2 の用量応答曲線を比較すること

( ここで、

第 1 のトランスフェクトしたセルカルチャーは、式 I I :

10

20

30

40

50

[ J M D C 4 ] - X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - [ T M D ]

( 式中、[ J M D C 4 ] および [ T M D ] は式 I I について上記で定義したとおりであり、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は任意のアミノ酸から独立に選択される ) を含んでなる第 1 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドでトランスフェクションされ、

第 2 のトランスフェクトしたセルカルチャーは、式 I I :

[ J M D C 4 ] - X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - [ T M D ]

( 式中、[ T M D ] および [ J M D C 4 ] は上記で定義したとおりであり、X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は任意のアミノ酸から独立に選択される ) を含んでなる第 2 のポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドでトランスフェクションされ、

第 1 の用量応答曲線と比較して、第 2 の用量応答曲線における高濃度側へのシフトは、その化合物が、第 2 のガンマセクレターゼ基質と比較して、第 1 のガンマセクレターゼ基質に対して選択的であることを示す )

を含んでなる。

【 0 1 0 1 】

特定の態様において、X 1 は S、T、G、P、Q、R、V、L、N、P、A、K、E、I、F、H、W および D から選択され ; X 2 は任意のアミノ酸であり ; X 3 は S、N、D、P、E、R、T、F、I、K、L、V、G、W、H および A から選択され ; X 4 は任意のアミノ酸である。

【 0 1 0 2 】

特定の態様では、X 1 は S、T、G、P、Q、R、V、L、N、P、A、K、E、I、F、H、W および D から選択され ; X 3 は S、N、D、P、E、R、T、F、I、K、L、V、G、W、H および A から選択され ; X 2 および X 4 は L、I、H、E、V、A、S、T、D、N、P、K、Q および R から選択される。

【 0 1 0 3 】

特定の態様では、X 1 は S、T、G、P、Q、R および D から選択され ; X 2 は任意のアミノ酸であり ; X 3 は S、N、D、P および A から選択され ; X 4 は任意のアミノ酸である。

【 0 1 0 4 】

この態様の一態様では、第 1 のポリペプチドの X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は第 1 のガンマセクレターゼ基質に由来し、第 2 のポリペプチドの X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は第 2 のガンマセクレターゼ基質に由来する。

【 0 1 0 5 】

そのような方法のいくつかにおいて、第 1 および第 2 のポリペプチドの X 1 - X 2 - X 3 - X 4 は、独立して G L N K、S L S S、G S N K、G S N S、P P A Q、S S N K、G S S K、Q H A R、Q A S R、T T D N、R D S T、D V D R、Q I P E または D R S R から選択され、同じ配列ではない。いくつかの方法において、第 1 および第 2 のポリペプチドの [ T M D ] は、配列番号 1 3 を含んでなる。いくつかの方法において、第 1 および第 2 のポリペプチドの [ J M D C 4 ] は、配列番号 3 ~ 1 2 のいずれかから独立に選択することができる。

【 0 1 0 6 】

他のそのような方法において、[ J M D C 4 ] - X 1 - X 2 - X 3 - X 4 - [ T M D ] は、以下からなる群 :

( a ) ( C 9 9 G V P - A P L P 2 ) : L E D A E F R H D S G L E E E R E S V G  
P L R E D F S L S S G A I I G L M V G G V V I A T V I V I T L V M L ( 配列  
番号 1 6 ) ;

( b ) ( C 9 9 G V P - N O T C H 1 ) : L E D A E F R H D S G P Y K I E A V Q S  
E T V E P P P P A Q G A I I G L M V G G V V I A T V I V I T L V M L ( 配  
列番号 1 7 ) ;

( c ) ( C 9 9 G V P - S R E B P 1 ) : L E D A E F R H D S G A K P E Q R P S L  
H S R G M L D R S R G A I I G L M V G G V V I A T V I V I T L V M L ( 配

10

20

30

40

50

列番号 18) ;

(d) (C99APP 4 - APLP2) : LEDAEFRHDS GYEVHHQKL  
V FFAEDVSLSS GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配  
列番号 42) ;

(e) (C99 - APP - (G25S) : LEDAEFRHDS GYEVHHQKL  
V FFAEDVSSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配  
列番号 43)

(f) C99 - APP - (S26L) : LEDAEFRHDS GYEVHHQKL  
V FFAEDVGLNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配  
列番号 44)

(g) C99 - APP - (N27S) : LEDAEFRHDS GYEVHHQKL  
V FFAEDVGSSK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配  
列番号 45)

(h) C99 - APP - (K28S) : LEDAEFRHDS GYEVHHQKL  
V FFAEDVGSNS GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML (配  
列番号 46)

(i) (C99APP 4 - NOTCH1) : LEDAEFRHDS GYEVHHQK  
L V FFAEDVPPAQ GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML  
(配列番号 100) ;

(j) (C99APP 4 - SREBP1) : LEDAEFRHDS GYEVHHQK  
L V FFAEDVDRSR GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML  
(配列番号 101) ;

(k) (C99GVP - APLP2 - gsnk) : LEDAEFRHDS GLEEE  
R ESVG PLREDFGSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LV  
ML (配列番号 19) ;

(l) (C99GVP - NOTCH1 - gsnk) : LEDAEFRHDS GPYK  
I EAVQS ETVEPPGSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT L  
VML (配列番号 20) ; および

(m) (C99GVP - SREBP1 - gsnk) : LEDAEFRHDS GAKP  
E QRPSL HSRGMLGSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT L  
VML (配列番号 21)

から選択される。

#### 【0107】

同様のアッセイを用いて、ガンマセクレターゼの活性に対する種々の候補ガンマセクレターゼ阻害剤化合物の効果を種々のガンマセクレターゼ基質について決定することができる。これらのアッセイは、(a) 式 I I I および I V のポリペプチド配列をガンマセクレターゼおよびガンマセクレターゼ阻害剤とガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；および (b) ポリペプチドのガンマセクレターゼ基質開裂の阻害に関する化合物の効力を工程 (a) で生じた AGBP<sup>1</sup> または AGBP<sup>2</sup> を測定することによって決定することを含む。これらのアッセイを用いて、式 I I I および式 I V のガンマまたはイ  
ブシロン開裂部位のいずれかでのガンマセクレターゼ活性を阻害するそれらの能力につ  
いて化合物をスクリーニングすることができる。

#### 【0108】

種々のガンマセクレターゼ阻害剤の効力を測定するために、天然の基質に対するガンマセクレターゼの開裂を阻害する能力を、式 I ~ I V の一以上の開裂を阻害する化合物の能力と比較することができる。このアッセイは、天然に存在するガンマセクレターゼ基質、天然に存在する基質に由来するその天然に存在する JMD および TMD を有するそのフラグメントを、ガンマセクレターゼおよび候補ガンマセクレターゼ阻害剤化合物と、ガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；および次いで接触工程によって生じた ICD の量を測定することによってガンマセクレターゼ配列開裂の阻害に関する化合物

10

20

30

40

50

の効力を決定すること、を含む。天然に存在するガンマセクレターゼ基質またはそのフラグメントは、ガンマセクレターゼ基質がそこで開裂する両方の部位（ および ）および場合により他の開裂部位を含んでなる。

【 0 1 0 9 】

いくつかの方法は、式 I ~ I V のポリペプチドのガンマおよびイプシロン開裂の阻害に関する化合物の効力を比較することによって、候補ガンマセクレターゼ阻害剤化合物の選択性を同定および / または決定することを含む。他の方法は、本発明のポリペプチドおよび天然に存在する配列またはそのフラグメントにおける I C D を産生するガンマセクレターゼ開裂の阻害に関する化合物の効力を比較することによって、特定のガンマセクレターゼ基質についての候補ガンマセクレターゼ阻害剤化合物の選択性を同定および / または決定することを含む。上記のとおり、天然に存在する配列またはそのフラグメントは、ガンマセクレターゼが基質配列を開裂するガンマおよびイプシロン部位の両方を含んでなる。

10

【 0 1 1 0 】

本発明の方法およびアッセイは、他のガンマ基質（ N o t c h 等 ）と比較して A P P に選択的なガンマセクレターゼ阻害剤の同定に有用である。本発明の方法及びアッセイは約 0.01 p M ~ 100 μ M、0.01 n M ~ 10 μ M、0.01 n M ~ 1 μ M、0.05 n M ~ 100 n M、0.07 n M ~ 10 n M、0.09 n M ~ 1 n M、0.1 n M ~ 0.5 n M の範囲の I C<sub>50</sub> 値を有するガンマ阻害剤を同定するために用いることができる。候補化合物は、第 1 のガンマセクレターゼ基質からの I C D 産生の候補化合物による阻害効力の差が、第 2 のガンマセクレターゼ基質に由来する I C D 産生と比較して少なくとも約 1 0 倍の差がある場合に選択的であると言える。ガンマセクレターゼの好ましい阻害剤は、A P P 由来のガンマセクレターゼ基質を少なくとも約 0.05 n M 以下の I C<sub>50</sub> で阻害し、A P P 由来のそのような基質を N o t c h 由来のガンマセクレターゼ基質の阻害についての I C<sub>50</sub> と比較して少なくとも 1 0 分の 1 未満の I C<sub>50</sub> で阻害する化合物を包含する。即ち、好ましい阻害剤は、A P P に対する阻害活性が少なくとも約 0.05 n M 以下の I C<sub>50</sub> であり、N o t c h の I C<sub>50</sub> が少なくとも 0 . 5 n M 以上である化合物を包含する。

20

【 0 1 1 1 】

いくつかの方法は、（ a ）式 I ~ I V のポリペプチド、および別途、天然に存在するガンマセクレターゼ基質配列（例えば同じガンマセクレターゼ基質に由来する J M D 及び T M D を含むポリペプチド）；（ b ）（ a ）のポリペプチドとガンマセクレターゼ阻害に対して選択的な候補化合物をガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；（ c ）工程（ b ）での接触により生じた I C D の量を測定すること；および（ d ）候補化合物の選択性を決定すること（ここで、候補化合物は、配列番号 1 のポリペプチドについての工程（ c ）の I C D 産生の阻害の効力が、天然に存在するガンマセクレターゼ基質配列から測定された I C D のレベルから増大または減少しているとき選択的であると決定される）を含んでなる。いくつかの方法では、天然に存在するガンマセクレターゼ基質配列は A P P 由来の J M D および T M D を含んでなる。

30

【 0 1 1 2 】

一般に、測定工程（ c ）は、ガンマセクレターゼによって産生した I C D の量を検出するのに効果的である任意の方法を用いることができる。例えば、レポーター遺伝子を G V P 配列により活性化し、ガンマセクレターゼ開裂によって生じた I C D の量をモニターすることができる。このアッセイでは、通常 I C D とベータペプチドの両方を検出するための特異的な結合物質を用いることができる。この態様では、測定工程（ c ）は、I C D を I C D に対する選択的な結合物質と接触させることを含んでなる。いくつかの方法では、測定工程（ c ）は I C D を、I C D の 2 つの異なるエピトープに対する特異的な 2 つの結合物質（例えば、サンドウィッチ E L I S A アッセイに用いられる 2 つの抗体）と接触させることを含んでなる。測定工程（ c ）は、レポーター分子および / またはレポーター遺伝子（例えばルシフェラーゼレポーターシステム）を含んでなることができる。

40

【 0 1 1 3 】

I C D フラグメントは、例えば、A P P、N o t c h 1、A P L P 2、e r b B 4、チ

50



ロシナーゼ、p75 N T F R、S C N B 2、n - カドヘリン、C D 4 4 等の任意の - セクレターゼ基質、ならびに少なくとも1つのガンマセクレターゼ開裂部位をその膜貫通領域内に有する任意の他の膜貫通タンパク質に由来する。

#### 【0114】

いくつかの方法において、特異的な結合物質は、I C Dに対する抗体（例えば、A P P - I C D ( A I C D ) または N o t c h - I C D ( N I C D ) に特異的に結合するモノクローナル抗体）を含む。I C D またはそのフラグメントに対して抗体を生じさせ、このアッセイについて用いることができる。抗原性ペプチドに対するいくつかのポリクローナル A I C D ネオエピトープ抗体（ポリクローナル # 66104）が記載されている（Kimberly, W .T., et al., Biochemistry; (2003); 42(1):137-144）。A I C D に特異的に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を作成するための抗原性ペプチドは、アミノ酸配列 VMLKKKC（配列番号 39）を有する。この特定の配列は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体（例えば、本明細書に記載のモノクローナル抗体 22B11）の両方を生じさせるのに用いることができる。従って、本発明は、アミノ酸配列 VMLKKKC（配列番号 39）に対して生じ特異的に結合するモノクローナル抗体を含む、抗体（例えば 22B11 抗体）を提供する。いくつかの方法において、特異的な結合物質は、配列番号 39 のアミノ酸配列に対して生じ特異的に結合する抗体（例えば 22B11 抗体）を含んでなる。

10

#### 【0115】

本方法は、同定または同定されていないガンマセクレターゼ阻害剤化合物の効力、活性、特異性および選択性の測定に有用である。本方法は、基質における構造決定因子が、阻害活性および / または選択性に関与しているか否かを決定するのに有用である。同様に、本方法は、決定するのに有用である。ある特定の阻害剤が、特定のガンマセクレターゼ開裂部位の阻害（例えば、または、S2 または S3 等）を介して主として作用するか否かを決定するのに有用である。本方法はまた、JMD がある特定のガンマセクレターゼ阻害剤についての効力および選択性の付与に関与するか否かを決定するのにも有用である。

20

#### 【0116】

従って、本発明はさらに、ガンマセクレターゼによるガンマセクレターゼ基質の開裂を阻害するためのガンマセクレターゼ阻害剤の効力を測定するための方法を提供し、該方法は：

(a) 式 I ~ I V のポリペプチドをガンマセクレターゼおよびガンマセクレターゼ阻害剤とガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；および (b) ガンマセクレターゼ活性の量を測定すること、を含んでなる。例えば、本発明は、化合物が、 - セクレターゼを部位特異的にまたは基質特異的に阻害するか否かを決定するための方法であって：(a) 式 I ~ I V のポリペプチド配列を提供すること；(b) 別途、天然に存在する - セクレターゼ基質または単一の天然に存在する基質に由来する天然に存在する T M D 及び J M D を含むその断片に由来するポリペプチドを提供すること；(c) (a) と (b) のポリペプチドを化合物とガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で接触させること；(d) それぞれのポリペプチドについて (c) の接触工程で得られたガンマセクレターゼ活性の量を測定すること；及び (e) 工程 (d) で得られた結果を比較し、その化合物が、天然に存在するガンマセクレターゼ基質と比較して、式 I ~ I V のポリペプチドの - 部位でのガンマセクレターゼに対する増大または減少した阻害効力を有するとき、その化合物がガンマセクレターゼを部位特異的または基質特異的に阻害していると決定すること、を含んでなる。

30

40

#### 【0117】

いくつかの方法において、式 I ~ I V のポリペプチドからの 2 つの部位のいずれかにおいて開裂産物の阻害に関する効力が、その化合物の存在下で同じ基質の他の 2 つの部位と比較して一桁増大または減少する場合、その化合物はガンマセクレターゼの部位特異的阻害剤である。他の方法において、その化合物の存在下で式 I ~ I V のポリペプチドに由来する同じ部位（例えば、 - および / または - 部位）の阻害の効力が、2 つの異なる基

50

質（JMD 1 が基質 1 に由来し、JMD 2 が基質 2 に由来するような）と比較したときに一桁以上増大または減少している場合、その化合物は、ガンマセクレターゼの基質特異的阻害剤である。

【0118】

本発明は、ガンマセクレターゼ基質に対するガンマセクレターゼの活性を調節するための方法であって、ガンマセクレターゼ基質の膜貫通領域のすぐ隣の 4 つのアミノ酸残基で、ガンマセクレターゼ基質のアミノ酸配列に修飾を導入することを含んでなる。ガンマセクレターゼ基質配列について上記したように、ある特定の 4 つの C 末端アミノ酸（X 1 ~ X 4）は、ガンマセクレターゼが特定の基質配列に対して有する特異性の決定において大きな役割を担いうる。即ち、当分野で既知の常套技術を用いて、これら特定の配列に対して最適のアミノ酸を同定することができる一連の突然変異導入実験を設計することができる（例えば、X 2 及び X 4）。従って、特定のネイティブな JMD を選択し、X 2 および X 4 に対応するものを除きすべての残基がネイティブのままであり、X 2 及び X 4 が 20 個の天然に存在するアミノ酸を用いて変更されている、一連のアミノ酸変異体を作製することができる。ガンマセクレターゼ活性を測定するアッセイは、生じた突然変異配列を、ガンマセクレターゼ活性において最も大きい変化を示すものについてスクリーニングするのに用いることができる。修正は、G、N、T、S、V、H、K、L、I、P、A、Q、D、E および R からなる群から選択される 4 つのアミノ酸による 4 つのアミノ酸残基の置換を含んでなるものであってよい。修飾は、配列 G S N K、S L S S、P P A Q、D R S R、Q H A R、Q A S R、T T D N、R D S T、D V D R および Q I P E から選択される配列による 4 つのアミノ酸残基の置換を含んでなるものであってよい。

10

20

【0119】

さらに、ガンマセクレターゼ基質におけるガンマおよび / またはイプシロン開裂部位でガンマセクレターゼ活性を調節する方法であって、ガンマセクレターゼ基質の膜近傍領域のアミノ酸配列に、

(a) G S N K（ガンマセクレターゼ基質が A P P でないとき）；S L S S（ガンマセクレターゼ基質が A P L P 2 でないとき）、P P A Q（ガンマセクレターゼ基質が N o t c h 1 でないとき）、Q H A R（ガンマセクレターゼ基質が e r b B 4 でないとき）、Q A S R（ガンマセクレターゼ基質がチロシナーゼでないとき）、T T D N（ガンマセクレターゼ基質が p 7 5 N T F R でないとき）、R D S T（ガンマセクレターゼ基質が S C N B 2 でないとき）、D V D R（ガンマセクレターゼ基質が n - カドヘリンでないとき）および Q I P E（ガンマセクレターゼ基質が C D 4 4 でないとき）を含んでなるアミノ酸配列の挿入；および

30

(b) 膜貫通領域の N 末端のすぐ隣の 4 つのアミノ酸の、G S N K、S L S S、P P A Q、Q H A R、Q A S R、T T D N、R D S T、D V D R、Q I P E および D R S R からなる群から選択される配列による置換（但し、ガンマセクレターゼ基質が A P P であるとき G S N K は選択されない、ガンマセクレターゼ基質が A P L P 2 であるとき S L S S は選択されない、ガンマセクレターゼ基質が N o t c h 1 であるとき P P A Q は選択されない、ガンマセクレターゼ基質が e r b B 4 であるとき Q H A R は選択されない、ガンマセクレターゼ基質がチロシナーゼであるとき Q A S R は選択されない、ガンマセクレターゼ基質が p 7 5 N T F R であるとき T T D N は選択されない、ガンマセクレターゼ基質が S C N B 2 であるとき R D S T は選択されない、ガンマセクレターゼ基質が n - カドヘリンであるとき D V D R は選択されない、およびガンマセクレターゼ基質が C D 4 4 であるとき Q I P E は選択されない）

40

から選択される修飾を導入することを含んでなる方法が提供される。

【0120】

さらに、ガンマセクレターゼ基質に対する、ガンマセクレターゼ特異性を調節する方法であって、ガンマセクレターゼ基質の膜近傍領域のアミノ酸配列に、

(a) G S N K を含んでなるアミノ酸配列の挿入（ガンマセクレターゼ基質が A P P でないとき）；S L S S（ガンマセクレターゼ基質が A P L P 2 でないとき）、P P A Q（ガ

50

ンマセクレターゼ基質が N o t c h 1 でないとき)を含んでなるアミノ酸配列の挿入; 及び

(b) 膜貫通領域の N 末端のすぐ隣の 4 つのアミノ酸の、G S N K、S L S S、P P A Q、Q H A R、Q A S R、T T D N、R D S T、D V D R、Q I P E および D R S R からなる群から選択される配列による置換(但し、ガンマセクレターゼ基質が A P P であるとき G N S K は選択されない、ガンマセクレターゼ基質が A P L P 2 であるとき S L S S は選択されない、ガンマセクレターゼ基質が N o t c h 1 であるとき P P A Q は選択されない、ガンマセクレターゼ基質が e r b B 4 であるとき Q H A R は選択されない、ガンマセクレターゼ基質がチロシナーゼであるとき Q A S R は選択されない、ガンマセクレターゼ基質が p 7 5 N T F R であるとき T T D N は選択されない、ガンマセクレターゼ基質が S C N B 2 であるとき R D S T は選択されない、ガンマセクレターゼ基質が n - カドヘリンであるとき D V D R は選択されない、およびガンマセクレターゼ基質が C D 4 4 であるとき Q I P E は選択されない)

から選択される修飾を導入することを含んでなる方法が提供される。

#### 【0121】

基質が式 I I または I V のいずれかで示される場合、X 2 および X 4 の残基のみを修飾される一方、残基 X 1 および X 3 は天然に存在する J M D 配列に由来するものである(例えば、これに限定されないが、配列番号 4 4 および 4 6 に開示されるもの)。

#### 【0122】

さらに、ガンマセクレターゼ基質に対するガンマセクレターゼ阻害剤の選択性を推定する方法であって、ガンマセクレターゼのアミノ酸配列を分析すること; J M D 領域におけるガンマセクレターゼ基質のアミノ酸配列を他のガンマセクレターゼ基質のアミノ酸配列と比較すること; およびガンマセクレターゼ基質に対するガンマセクレターゼ阻害剤の選択性が、それが他のガンマセクレターゼ基質と共通する配列相同性または同一性の程度における変化によってどの程度影響を受けるかを決定すること、を含んでなる方法を提供する。

#### 【0123】

さらに、式 I ~ I V のいずれかのポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列(例えば、配列番号 1 ~ 5 1 および 9 1 ~ 1 0 1 のいずれかを含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列)を提供する。

#### 【0124】

本発明は、式 I ~ I V のいずれかのポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる、ベクター、組換え細胞、およびトランスジェニック非ヒト動物、または組換え天然型ガンマセクレターゼ基質またはそのフラグメント(例えば、配列番号 1、3 ~ 1 2、1 5 ~ 3 6、4 2 ~ 5 1、9 4 ~ 1 0 1 のポリペプチド配列を含んでなる、組換え細胞およびトランスジェニック非ヒト動物)を提供する。

#### 【0125】

ポリペプチドのアミノ酸配列が決まっていれば、当業者は、ポリヌクレオチド配列を作製し、周知の遺伝子コードと種々の生物及び発現系にとって最適化されたコドンを用いて、種々のタイプの細胞における発現と発現系について、そのような配列を最適化することが可能である。

#### 【0126】

化合物、組成物及び処置方法

他の態様では、本発明は、基質または部位特異的にガンマセクレターゼを阻害する化合物、そのような化合物を含有する医薬組成物、そのような化合物を用いるアルツハイマー病の処置方法、およびそのような化合物を用いるガンマセクレターゼの阻害方法を提供する。

#### 【0127】

即ち、本発明は、ガンマセクレターゼを部位特異的に阻害する化合物を提供する。本発明のいくつかの化合物は、ガンマセクレターゼ基質のガンマ開裂部位でのガンマセクレ

10

20

30

40

50

ーゼ活性を優先的に阻害する。本発明のいくつかの化合物は、ガンマセクレターゼ基質のイプシロン開裂部位でのガンマセクレターゼ活性を優先的に阻害する。

【0128】

ガンマセクレターゼ基質のガンマまたはイプシロン開裂部位のいずれかでのガンマセクレターゼ活性を阻害する化合物は、

(a) 式 I ~ IV のポリペプチド配列を提供すること；(b) 別途、天然に存在するガンマセクレターゼ基質に由来するポリペプチド配列を提供すること；(c) (a) と (b) のポリペプチドをガンマセクレターゼ活性が可能な条件下で化合物と接触させること；(d) それぞれのポリペプチドについて (c) の接触工程で得られたガンマおよびイプシロン開裂部位でのガンマセクレターゼ活性の量を測定すること；(e) (b) の接触工程で得られたガンマおよびイプシロン開裂部位でのガンマセクレターゼ活性の量を測定すること；および (f) 工程 (d) および (b) で得られた結果を比較し、その化合物が、ガンマセクレターゼを部位特異的または基質特異的に阻害していることを決定すること、による本発明のアッセイ方法によって同定される。

10

【0129】

ガンマ開裂部位の化合物阻害活性について計算された  $EC_{50}$  値が、同じ基質内の、または他の数多く鋸となるガンマセクレターゼ基質の、イプシロン開裂部位での化合物阻害活性について計算された  $EC_{50}$  よりも小さいとき、化合物はガンマセクレターゼ基質のガンマ開裂部位でガンマセクレターゼ活性を選択的に阻害する。与えられた部位（例えば、その基質（またはその基質の JMD を含んでなる配列）のイプシロン開裂部位）での化合物阻害活性について計算された  $EC_{50}$  値が、数多くの異なるガンマセクレターゼ基質（同じ JMD 配列を含まない）の同等の部位（例えばイプシロン開裂部位）での化合物阻害活性について計算された  $EC_{50}$  値よりも小さい場合、化合物はガンマセクレターゼの基質特異的な阻害剤である。いくつかの化合物はスルホンアミド官能基を含んでなる。

20

【0130】

さらに、アミロイド前駆体タンパク質 (APP)、Notch、アミロイド前駆体タンパク質様タンパク質 (APLP2)、チロシナーゼ、CD44、erbB4、p75 NTR、n-カドヘリンおよび SCNB2 から選択される第1のガンマセクレターゼ基質の開裂を、APP、Notch、APLP2、SREBP1、チロシナーゼ、CD44、erbB4、p75 NTR、n-カドヘリンおよび SCNB2 から選択される少なくとも1つの異なるガンマセクレターゼ基質と比較して、選択的に阻害する、本明細書に記載の方法によって同定することができる化合物を提供する。いくつかの化合物は、Notch、APLP2、チロシナーゼ、CD44、erbB4、p75 NTR、n-カドヘリンおよび SCNB2 から選択される少なくとも1つのガンマセクレターゼ基質と比較して APP の開裂を選択的に阻害する。いくつかの化合物は、Notch および APLP2 から選択される少なくとも1つのガンマセクレターゼ基質と比較して APP の開裂を選択的に阻害する。

30

【0131】

本発明は、製薬的に許容し得る塩、ピークル、担体、希釈剤および/またはアジュバントと共に、上記の化合物を含んでなる組成物を提供する。

40

【0132】

化合物は、経口、非経口 (IV、IM、デポ-IM、SQ および デポ SQ)、舌下、鼻内 (吸入)、髄腔内、局所または直腸投与することができる。当業者に知られている投与形態は本発明の化合物のデリバリーに適している。

【0133】

治療上有効量の本発明化合物を含有する組成物を提供する。本化合物は、好ましくは、経口投与のための錠剤、カプセル、またはエリキシル、または非経口投与のための滅菌溶液または懸濁液等の適当な医薬調製物に製剤化する。典型的には、上記の化合物を当業者に周知の技術および手順を利用して医薬組成物に製剤化する。

【0134】

50

約 1 ~ 5 0 0 m g の本発明の化合物または化合物の混合物をまたは生理学的に許容し得る塩またはエステルを、生理学的に許容し得るピークル、担体、賦形剤、結合剤、保存剤、安定化剤、香料等と調合して、薬務上許容されている単位投与形態とすることができる。これら組成物または調製物における活性成分の量は、表示した範囲の適切な用量が得られるような量である。組成物は単位投与形態に好ましく製剤化され、各用量に約 2 ~ 約 1 0 0 m g、より好ましくは 1 0 ~ 3 0 m g の活性成分を含有する。「単位投与形態」は、ヒトの患者または他の動物のための統一された用量として適当な物理的に分離した単位を意味し、各単位は所望の治療効果をもたらすよう計算された、予め決められた量の活性成分を、適当な製薬的な賦形剤とともに含有する。

【 0 1 3 5 】

10

組成物を調製するために、1 以上の本発明化合物を適当な製薬的に許容し得る担体と混合する。化合物を混合または添加した後に得られる混合物は、溶液、懸濁液、エマルジョン等であってよい。リポソーム懸濁液もまた、製薬的に許容し得る担体として適している。これらは、当業者に知られている方法にしたがって製造することができる。得られた混合物の形態は、意図する投与の形式、化合物の選択した担体またはピークルにおける溶解性を含む、数多くのファクターに依存する。有効な濃度は、その疾患、障害または処置される状態の少なくとも 1 つの症状を緩和または改善するのに十分な濃度であり、経験的に決定してもよい。

【 0 1 3 6 】

本明細書に記載の化合物の投与に適した製薬的な担体またはピークルとしては、具体的な投与形式に適する当業者に知られている任意の担体が含まれる。さらに、活性物質は、所望の作用に害を及ぼさないまたは別の作用を有する他の活性物質と混合することができる。本化合物は単独の製薬的活性成分として組成物に製剤化してもよいし、あるいは他の活性成分と組み合わせても良い。

20

【 0 1 3 7 】

化合物が有効な製剤にするに溶解性が不十分であるとき、可溶化の方法を用いることができる。そのような方法は知られており、ジメチルスルホキシド ( D M S O ) 等の共溶媒の使用や T w e e n ( 登録商標 ) 等の界面活性剤の使用、および炭酸水素ナトリウム水溶液中での溶解挙げられるがこれに限定されない。塩またはプロドラッグ等の化合物の誘導体もまた、有効な医薬組成物の製剤化に使用できる。

30

【 0 1 3 8 】

化合物の濃度は、投与の際に、その化合物が投与される障害の少なくとも 1 つの症状を緩和または改善する量のデリバリーに有効である。典型的には、組成物は単一用量での投与用に製剤化する。

【 0 1 3 9 】

本発明の化合物は、例えば持続放出型の製剤またはコーティングのように、身体からの急速な排出から保護する担体を用いて調製することができる。そのような担体としては、放出制御製剤が挙げられる ( 例えば、マイクロカプセル化デリバリーシステムが挙げられるがこれに限定されない ) 。活性化合物は、処置する患者に対する望ましくない副作用なしに治療上有効な効果を発揮するのに十分な量で、製薬的に許容し得る担体内に入れられる。治療上有効な濃度は、処置する障害に関する、公知の *i n v i t r o* および *i n v i v o* モデル系で化合物を試験することにより実験的に決定してよい。

40

【 0 1 4 0 】

本発明の化合物及び組成物は、複数または単一用量の容器内に包装することができる。包装された化合物及び組成物は、例えば使用時に組合せ可能なコンポーネントを含む、キットとして提供することができる。例えば凍結乾燥状態の阻害剤化合物と適当な希釈液を、使用前に混合するための別々のコンポーネントとして提供することができる。キットには、阻害剤化合物と同時に投与のための第 2 の治療剤を含むことができる。本阻害剤および第 2 の治療剤は、別々のコンポーネントパーツとして提供してもよい。キットは、それぞれ 1 以上の単一用量の本発明化合物を入れている複数の容器を含んでいてもよい。この容

50

器は、好ましくは所望の投与形式に適合させ、例えば、経口投与のための錠剤、ゲル、カプセル、徐放カプセル等、非経口投与用のデポー、充填済注射器、アンプル、バイアル等；及び局所投与用のパッチ、メディパッド（medipad）、クリーム等が挙げられるがこれに限定されない。

【0141】

医薬組成物中の活性化合物の濃度は、活性化合物の吸収、不活性化および排泄率、投与スケジュール、および投与量、ならびに当業者に知られている他の因子に依存する。

【0142】

活性成分は1回で投与してもよく、または少ない用量でいくつかに分割し間隔をおいて投与することもできる。正確な用量および処置の期間は、処置する疾患に応じて変化するものであり、試験プロトコルを用いてまたは *in vivo* または *in vitro* の試験データから推定することにより、実験的に決定することができると当業者は理解している。濃度および投与量の値は、軽減される状態の重篤度によっても変化し得る。また、具体的な患者についての投与レジメは、その人における必要性和、その組成物を投与するまたはその投与を監督する人の専門的判断にしたがって時間をかけて調整すべきであること、そして、本明細書に記載した濃度の範囲は、単に経験的なものであり本発明の組成物の範囲または実施の限定を意図するものではないと理解される。

10

【0143】

経口投与を所望する場合は、胃の酸性の環境から化合物を保護する組成物として提供すべきである。例えば、組成物を、胃で統合性を維持し腸内で活性化合物を放出する腸溶コーティングを用いて製剤化することができる。組成物はさらに、制酸剤または他のそのような成分と組み合わせて製剤化することもできる。

20

【0144】

経口組成物は一般に不活性な希釈剤または食用の担体を含み、錠剤に圧縮するかゼラチンカプセル内に入れることができる。経口での治療的投与を目的として、活性化合物を添加剤で取り込ませて錠剤、カプセルまたはトローチの形態で用いることができる。製薬的に適した結合剤及びアジュバント材料を組成物の一部として入れることができる。

【0145】

錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ等は、類似した性質の以下の成分が挙げられるがこれに限定されない任意のものを含有することができる：トラガカントガム、アカシア、コーススターチ、またはゼラチン等の結合剤；微晶性セルロース、デンプンまたはラクトース等の賦形剤；アルギン酸及びコーンスターチ等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤；二酸化ケイ素コロイド等の滑剤（*gildant*）；スクロースまたはサッカリン等の甘味料；およびペパーミント、サリチル酸メチルまたはフルーツフレーバー等の香料。

30

【0146】

単位投与形態がカプセルである場合、上記のタイプの材料に加えて、油脂等の液体の担体を含むことができる。さらに、単位投与形態は、単位投与形態の物理的な形態を修飾する、他の種々の材料を含むことができる（例えば、糖や他の腸溶剤のコーティング）。化合物はまた、エリキシル、懸濁剤、シロップ、ウェハー、チューイングガム等の一成分として投与することもできる。シロップには、活性成分に加え、甘味料としてスクロース、特定の保存料、染料および着色料、および香料を含有することができる。

40

【0147】

活性物質はさらに、所望の作用に害を及ぼさないまたは所望の作用を補う他の活性物質と混合することができる。

【0148】

非経口、経皮、舌下または局所適用に用いる液体または懸濁液は、以下の成分の任意のものを含有することができる：滅菌希釈剤（注射用水、生理食塩水、固定油、天然の植物油（ゴマ油、ココナツ油、ピーナツ油等）、または合成脂質ピークル（オレイン酸エチル等）、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒等）；抗微生物剤（ベンジルアルコールおよびメチルパラベン等）；抗酸化剤（アス

50

コルビン酸、亜硫酸水素ナトリウム等)；キレート剤(エチレンジアミン四酢酸(EDTA)等)；緩衝剤(酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩等)；および浸透圧調節剤(塩化ナトリウムおよびデキストリン等)。非経口用調製物は、ガラス、プラスチックまたは他の適当な材料できた、アンプル、使い捨て注射器または複数用量のバイアルに入れることができる。緩衝剤、保存料、抗酸化剤等は必要に応じて入れることができる。

【0149】

静脈内注射の場合、適当な担体としては、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)およびグルコース、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールおよびその混合物等の増粘剤や可溶化剤を含有する溶液が挙げられる。組織標的化したりポソームを含むリポソーム懸濁液もまた、製薬的に許容し得る担体として適している。これらは、例えば、米国特許第4,522,811に記載されているように、当分野で公知の方法にしたがって製造することができる。

10

【0150】

活性化化合物は、例えば持続放出型の製剤またはコーティングのように、身体からの急速な排出から保護する担体を用いて調製することができる。そのような担体としては、放出制御製剤(例えば、インプラント、マイクロカプセル化デリバリーシステム、生分解性、生体適合性ポリマー(コラーゲン、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、ポリオルトエステル、ポリ乳酸等)が挙げられるがこれに限定されない)が挙げられる。そのような製剤の調製方法は当業者に知られている。

20

【0151】

本発明の化合物は経腸的にまたは非経口的に投与することができる。経口投与の場合、本発明の化合物を、当業者に知られている経口投与の通常の投与形態で投与することができる。これらの投与形態としては、錠剤及びカプセルの通常の固形単位投与形態ならびに液体の投与形態(溶液、懸濁液、およびエリキシル等)が挙げられる。固形の投与形態を用いる場合、投与が必要な本発明の化合物の投与が1日1回または2回ですむよう徐放性のタイプの形態になっているのが好ましい。

【0152】

経口投与形態を患者に1日に1、2、3または4回投与する。本発明の化合物を1日に3回以下、より好ましくは1日1回または2回投与するのが好ましい。従って、本発明の化合物は、経口投与形態で投与することが好ましい。どのような経口投与形態を用いるにしても、本発明の化合物を胃の酸性環境から保護するように設計することが好ましい。腸溶コーティングされた錠剤は当業者にはよく知られている。さらに、各々コーティングにより井酸から保護された小さな球を封入したカプセルもまた当業者にはよく知られている。

30

【0153】

上記のとおり、不斉炭素原子が存在するか否かによって、本発明の化合物は異性体の混合物、ラセミ体または純粋な異性体として存在し得る。

【0154】

化合物の塩は好ましくは製薬的に許容し得るものであるかまたは非毒性である。合成及び精製の目的上、製薬的には許容されない塩を使用することも可能である。

40

【0155】

本組成物は、当分野で知られているアルツハイマー病の処置に有効な更なる薬剤を含有し得る。

【0156】

また、本発明のアッセイ法により同定された化合物またはその塩の有効量を患者に投与することを含んでなる、そのような処置を必要とする患者における、アミロイドベータペプチドの蓄積に関連する疾患(例えば、アルツハイマー病または軽度認知障害)の処置および/または予防の方法を提供する。いくつかの方法は、アルツハイマー病の発症または進行の予防、遅延または遅らせるのに役立ち得る。いくつかの方法において、患者はアルツハイマー病と診断されている。好ましいそのような方法において、患者はヒトである。

50

## 【 0 1 5 7 】

同様に、本発明は、本発明のアッセイ法により同定された化合物またはその塩の有効量を患者に投与することを含んでなる、そのような処置を必要とする患者における N o t c h シグナル伝達の活性化に関連する疾患（例えば、癌および自己免疫疾患等）の処置および／または予防の方法を提供する。いくつかの方法は、癌または自己免疫疾患の発症または進行の予防、遅延または遅らせるのに役立ち得る。いくつかの方法において、患者は癌または自己免疫疾患と診断されている。好ましいそのような方法において、患者はヒトである。

## 【 0 1 5 8 】

本処置方法は、治療上有効量：経口投与では約 0 . 1 m g / 日 ~ 約 1 0 0 0 m g / 日；非経口投与、舌下、鼻内、鞘内投与では約 0 . 5 m g / 日 ~ 約 1 0 0 m g / 日；デポー投与およびインプラントでは約 0 . 5 m g / 日 ~ 約 5 0 m g / 日；局所投与では約 0 . 5 m g / 日 ~ 約 2 0 0 m g / 日；直腸投与では約 0 . 5 m g / 日 ~ 約 5 0 0 m g / 日を用いる。

10

## 【 0 1 5 9 】

経口投与の治療上有効な量は、約 1 m g / 日 ~ 約 1 0 0 m g / 日、好ましくは m g / 日 ~ 約 5 0 m g / 日；であり非経口投与では約 5 m g / 日 ~ 約 5 0 m g / 日であろう。

## 【 0 1 6 0 】

本発明はさらに、特定の基質に対するガンマセクレターゼ活性または細胞内の基質の特定の開裂部位に対するガンマセクレターゼ活性を選択的に阻害する方法であって、細胞を、ガンマセクレターゼを選択的に阻害するのに有効な本発明のアッセイにより同定された化合物と接触させることを含んでなる、方法を提供する。いくつかの方法は、阻害するガンマセクレターゼ活性を、通常の活性と比較して約 3 ~ 5 倍阻害する。さらに好ましくは、本方法は、通常の活性と比較して、ガンマセクレターゼ活性を約 5 倍 ~ 1 0 倍、さらに好ましくは約 1 0 倍 ~ 約 1 5 倍、さらに好ましくは約 1 5 倍 ~ 約 2 0 倍阻害する。さらに好ましくは、本方法は、ガンマセクレターゼ活性を約 2 0 倍超阻害する。細胞は例えば、ヒト細胞等の哺乳類細胞であり得る。いくつかの方法では、細胞は単離された哺乳類細胞、好ましくは単離されたヒト細胞である。

20

## 【 0 1 6 1 】

与えられたガンマセクレターゼ基質のガンマまたはイプシロン開裂部位のいずれかでガンマセクレターゼを選択的に阻害する方法は、この基質に対するガンマまたはイプシロン開裂部位のいずれかでガンマセクレターゼの活性に関連する疾患または障害を有する患者を処置するのに用いることができる。いくつかの方法において、患者は、与えられたガンマセクレターゼ基質のガンマまたはイプシロン開裂部位のいずれか一方または他方でのガンマセクレターゼ活性に関連する疾患または障害の臨床的徴候を示している。いくつかの疾患または障害は、イプシロン開裂部位でのガンマセクレターゼ活性ではなく、ガンマ開裂部位でのガンマセクレターゼ活性に関連する。本方法において有用な化合物は本発明のアッセイにより、ガンマセクレターゼ基質のまたはガンマセクレターゼ基質のガンマセクレターゼ開裂部位の選択的な阻害剤として同定されるので、ガンマセクレターゼに関連する障害または疾患を処置する方法は、他のガンマセクレターゼ基質または他の開裂部位でのガンマセクレターゼ活性に有害な作用を及ぼすことなく処置することができる（例えば、N o t c h シグナル伝達、またはガンマセクレターゼ基質のイプシロン開裂部位での開裂）。

30

40

## 【 0 1 6 2 】

本発明の方法及びアッセイは、細胞内のベータペプチド及び I C D の量を決定することができる当分野で知られている任意のタイプのアッセイを用いることができる。一態様では、アッセイは任意のタイプの結合アッセイ、好ましくは免疫学的結合アッセイである。そのような免疫学的結合アッセイは当分野で周知である（Asai, ed., Methods in Cell Biology, Vol. 37, Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc., New York (1993) 参照）。免疫学的結合アッセイは、典型的に補足剤を用いて分析物標的抗原に特異的に

50



結合させしばしば固定化させる。補足剤は分析物に特異的に結合する部分であってよい。補足剤は、A に特異的に結合する抗体またはそのフラグメント（例えば、A の40個のアミノ酸残基に存在するエピトープに特異的に結合する抗体またはそのフラグメント）であってよい。そのような抗体またはそのフラグメントのいくつかは、A の最初の23アミノ酸残基（即ちA 1 - 23）に存在するエピトープに特異的に結合する。いくつかの抗体またはそのフラグメント（例えば、ガンマセクレターゼ基質から生じるICDペプチドのエピトープに特異的に結合する抗体またはそのフラグメント）はガンマセクレターゼ基質でガンマセクレターゼによる開裂により生じるフラグメントのエピトープに特異的に結合する。これら剤のいくつかは商業的に入手可能であり（APP C末端抗体 Sigma Aldrich Cat. #A8717）、そのような剤のいくつかは標準的な免疫原技術を用いて作製することができる（例えば、ハイブリドーマ、抗血清、ポリクローナル抗体産生）。

10

#### 【0163】

免疫学的結合アッセイでは、補足剤と抗原によって形成された結合複合体の存在を示す標識剤がよく用いられる。標識剤は結合複合体を含んでなる分子の1つであってよい；即ち複合体は特異的な結合剤または標識された抗特異的結合剤抗体で標識することができる。あるいは、標識剤は、複合体に結合する第3の分子、一般には別の抗体、であってよい。標識剤は、例えば、標識を有する抗特異的結合剤抗体であってよい。結合複合体に特異的な第2の抗体は標識を欠いていても良いが、その第2の抗体がそのメンバーである抗体の種に特異的な第4の分子によって結合させることができる。例えば、第2の抗体はビオチン等の検出可能な部分で修飾した後、酵素標識ストレプトアビジン等の第4の分子で結合することができる。プロテインAまたはプロテインG等の、免疫グロブリン定常領域に特異的に結合することが可能な他のタンパク質もまた標識剤として使用することができる。これらの結合タンパク質は、連鎖球菌の細胞壁の通常の抗生物質であり、様々な種に由来する免疫グロブリン定常領域と強力な非免疫原性の反応性を示す（一般に、Akerstrom, J Immunol, 135:2589-2542 (1985); and Chaubert, Mod Pathol, 10:585-591 (1997)を参照）。標識剤は、A の最初の23アミノ酸残基（A 1 - 23）に特異的に結合する抗体またはその断片を含んでなることができる。いくつかのそのような抗体またはその断片はA の最初の7アミノ酸残基（即ちA 1 - 7）に存在するエピトープに特異的に結合し、そのような抗体またはその断片のいくつかはA の最初の5アミノ酸（即ちA 1 - 5）に存在するエピトープに特異的に結合する。

20

30

#### 【0164】

アッセイにおいて、インキュベーションおよび/または洗浄工程は、試薬の混合後にそれぞれ必要であるかもしれない。インキュベーション工程は約5秒～数時間であり、好ましくは約5分～約24時間である。しかしながら、インキュベーション時間はアッセイの形式、分析物、溶液の体積、濃度等に依存する。アッセイは、ある温度範囲で行うことができるが、通常は室温でアッセイを行う。

#### 【0165】

部位特異的または基質特異的なガンマセクレターゼ介在の開裂の阻害を示すアッセイは、ガンマセクレターゼ基質の任意の既知の形態（数多くのAPP形態を含む）を用いることができ、非限定的例として、695アミノ酸の「ノーマルな」アイソタイプ（Kang et al., 1987, Nature 325:733-6に記載）、770アミノ酸のアイソタイプ（Kitaguchi et al., 1981, Nature 331:530-532に記載）、および種々の変異体（スウェーデン変異(KM670-1NL) (APP<sub>swe</sub>)、ロンドン変異(V7176F)等）が挙げられる。既知の変異体としては、例えば、米国特許第5766846、さらにHardy, 1992, Nature Genet. 1:233-234を参照。さらなる有用な基質は、2塩基アミノ酸変異、例えばW000 / 17369に開示のAPP - KK、APP - KKのフラグメントおよびガンマセクレターゼ開裂部位を含有する合成ペプチド、野生型(WT)または変異体（例えばAPP<sub>swe</sub>）（米国特許第5,441,870号、同第5,605,811号、同第5,721,130号、同第6,018,024号、同第5,604,102号、同第5,612,486号、同第5,850,003号および、同第6,245,964号に記載）が挙げられる。

40

#### 【0166】

50

免疫学的結合アッセイは、非競合的タイプのアッセイであってよい。これらのアッセイは、補足した分析物の量を直接測定する。例えば、1つの好ましい「サンドウィッチ」アッセイでは、それが固定化される固体の基質に補足剤（抗体）を直接結合させることができる。これらの固定化された抗体は、次いで、試験サンプル中に存在する抗体を捕捉（に結合）する。このように捕捉されたタンパク質を次いで標識剤（標識を有する第2の抗体等）に結合させる。別の企図する「サンドウィッチ」アッセイでは、第2の抗体は標識を欠いているが、その第2の抗体が由来する種の抗体に特異的な標識抗体によって結合することができる。第2の抗体はまた、ストレプトアビジン等の第3の標識された分子が特異的に結合することができる、ビオチン等の検出可能な部分で修飾されていてもよい（本明細書の一部を構成する、Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Ch 14, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1988)参照）。 10

#### 【0167】

免疫学的な結合アッセイは競合的タイプのアッセイであってよい。サンプルに存在する分析物の量を、サンプルに存在する分析物によって捕捉剤から置換または競合により離れた添加分析物の量を測定することにより直接測定する。1つの好ましい競合結合アッセイにおいて、既知量の分析物（通常、標識された）をサンプルに加えた後、サンプルを抗体（捕捉剤）と接触させる。抗体に結合した標識された分析物の量は、サンプルに存在する分析物の濃度に反比例する（前掲のHarlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Ch 14, pp. 579-583参照）。 20

#### 【0168】

別の企図する競合結合アッセイでは、抗体を固体の基質に固定化する。抗体に結合させるタンパク質の量は、タンパク質/抗体複合体に存在するタンパク質の量を測定するか、または残存する複合体を形成しなかったタンパク質の量を測定することにより決定することができる。タンパク質の量は、標識したタンパク質を提供することにより検出することができる（前掲のHarlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Ch 14参照）。 30

#### 【0169】

さらなる企図する競合結合アッセイでは、ハプテン阻害を用いる。ここで、既知の分析物は固体の基質に固定化する。既知量の抗体をサンプルに加え、サンプルを固定化された抗体と接触させる。固定化された分析物に結合した抗体の量はサンプルに存在する分析物の量に反比例する。固定化された抗体の量は、抗体の固定化されたフラクションまたは溶液中に残っているフラクションのいずれかを検出することによって検出することができる。検出は、その抗体が標識される場所に対するものか、上記の抗体に特異的に結合する標識部分を次いで添加することによる間接的なものである。 40

#### 【0170】

本競合結合アッセイは、本発明の特異的な結合剤によって認識されるタンパク質または酵素複合体が所望のタンパク質であり交差反応する分子でないこと、または抗体が抗原に特異的であって関連しない抗原に結合しないものであるかどうかを、当業者が決定できる交差反応性の決定に用いることができる。このタイプのアッセイでは、抗原を固体の支持体に固定化し、未知のタンパク質混合物を、特異的な結合剤が固定化されたタンパク質と競合するアッセイに添加する。競合する分子はまた、その抗原と無関係な1以上の抗原に結合する。固定化された抗原に対する特異的な結合剤抗体の結合と競合するタンパク質の能力は、固体の支持体に固定化された同じタンパク質による結合と比較し、タンパク質混合物の交差反応性を決定する。 50

#### 【0171】

ベータおよびICDペプチドを検出するための、ベータ-およびICD-特異的抗体の使用を必要としない他の非免疫学的技術も利用することができる。例えば、2次元のゲル電気泳動を用いて、サンプル流体中に存在する密接に関連した可溶性タンパク質を分離することができる。ベータおよび/またはICDポリペプチド（例えばA）の多くのフラグメントと交差反応する抗体を用い、ゲルでの正確な位置に基づいて同定される特定のペプチドの存在についてゲルをプローブすることができる。培養細胞の場合、細胞のタンバ 50

ク質を代謝的に標識し、場合により最初の分離工程として免疫沈降を用い、S D S - ポリアミドゲル電気泳動により分離することができる。

【0172】

本発明はさらに、サンプル中の A および / または I C D の存在を検出または定量するためのウェスタンブロット法を提供する。この方法は、通常、サンプルタンパク質を分子量および、ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター、または誘導体化したナイロンフィルター等の適当な固体の支持体へのタンパク質の輸送に基づいてゲル電気泳動により分離することを含んでなる。サンプルを、A および / または I C D と特異的に結合する抗体またはそのフラグメントとインキュベーションし、生じた複合体を検出する。これらの抗体は直接標識化するか、あるいはその抗体と特異的に結合する標識抗体を用いて検出することができる。

10

【0173】

結合試薬

本発明の方法は、ベータペプチドに対する特異的な結合剤（例えば A ベータに対する抗体等）を含んでなる。本方法が A に対する少なくとも 2 つの抗体を含んでなる場合、好ましくは、一方の抗体は「捕捉」分子として、他方の抗体は検出または「標識」分子として作用する。ある特定の態様では、捕捉抗体は A のエピトープを認識することができ、例えば補足抗体は、好ましくは、アミノ酸 1 - 28 内のエピトープを認識する。

【0174】

A P P 開裂の生成物の特性は、例えば、Pirttila et al., 1999, Neuro. Lett. 249:21-4, and in U.S. Patent No. 5,612,486 に記載されるような種々の抗体を用いるイムノアッセイにより測定することができる。A を検出するのに有用な抗体としては、例えば、A ペプチドのアミノ酸 1 - 16 のエピトープを特異的に認識するモノクローナル抗体 6 E 10、それぞれヒト A 1 - 40 及び 1 - 42 に特異的である抗体 162 および 164 (New York State Institute for Basic Research, Staten Island, NY) ; および米国特許第 5593846 号に記載されているような、ベータアミロイドペプチドの連結領域、残基 16 と 17 の間の部位を認識する抗体が挙げられる。A P P の残基 591 ~ 596 の合成ペプチドに対する抗体およびスウェーデン変異の残基 590 ~ 596 に対して生じた S W 192 抗体もまた、A P P およびその開裂産物のイムノアッセイにおいて有用である（米国特許第 5604102 号および同第 5721130 号に記載されているように）。

20

30

従って、A、I C D、T M D および C 末端領域等のガンマセクレターゼ基質の領域に特異的な抗体は、(A P P に関して) アミノ酸 4 ~ 7 (A)、アミノ酸残基 13 ~ 28 からなる連結領域、アミノ酸 33 ~ 40 (A<sub>40</sub> に特異的)、アミノ酸 30 ~ 42 (A<sub>42</sub> に特異的)、アミノ酸 50 ~ 55 (A I C D N 末端) および A P P の C 末端部分等の所望の標的エピトープを含んでなる適当な抗原またはハプテンに対して製造することができる。便宜上、合成ペプチドは、適当な免疫原と組み合わせた慣用の固相法により製造することができ、慣用の方法により抗血清またはモノクローナル抗体の製造に用いることができる。適当なペプチドハプテンは、通常、A 内に少なくとも 5 つの連結した残基を含んでなり、6 以上の残基を含んでいてもよい。

【0175】

40

合成ポリペプチドハプテンは、アミノ酸が伸張鎖に順次付加される、周知の Merrifield 固相合成法により製造することができる (Merrifield, J. Am. Chem. Soc., (1963); 85: 2149-2156)。アミノ酸配列は、当分野で知られているおよび / または本明細書で具体的に記載されている I C D の配列または既知のガンマセクレターゼ基質の N 末端フラグメントに基づきうる。

【0176】

ポリペプチドハプテンの十分量が得られたら、本明細書の一部を構成する Hudson and Hay, Practical Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Chapter 1.3, 1980 に一般的に記載されるような、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、または他の適当なタンパク質担体等の、適当な免疫原担体に連結することができる。

50

有用である免疫原担体の例は、C D 3 抗体である (Boehringer-Mannheim, Clone No. 145-2C11)。

【 0 1 7 7 】

十分量の免疫原が得られたら、所望のエピトープにと抗的な抗体を *in vitro* または *in vivo* の方法によって製造することができる。*in vitro* の方法ではリンパ球を免疫原に暴露するが、*in vivo* の方法は免疫原を適当な脊椎動物宿主へ注入することが必要である。適当な脊椎動物宿主は、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、山羊等を含む非ヒト動物である。予め決められた計画にしたがって動物に免疫原を注射し、改善された力価と選択性を有する連続的出血でその動物を周期的に出血させる。注射は筋肉内、腹腔内、皮下等により行うことができ、不完全フロイントアジュバント等のアジュバントを用いることができる。

10

【 0 1 7 8 】

所望であれば、所望の特異性を有する抗体を産生することが可能な不死化細胞系を調製することによりモノクローナル抗体を得ることができる。そのような不死化細胞系は様々な方法で製造することができる。便宜上、マウス等の小さな脊椎動物を、記載した方法により所望の免疫原で超免疫する。次いで、この脊椎動物を屠殺し (通常最後の免疫後数日後)、脾細胞を取り出し、その脾細胞を不死化する。不死化のやりかたは重要ではない。本発明において有用なモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature 256:495 (1975) 記載のハイブリドーマ法; ヒト B 細胞ハイブリドーマ法 (Kosbor et al., Immunol Today 4:72 (1983); Cote et al., Proc Natl Acad Sci (USA) 80: 2026-2030 (1983); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987)) および EBV - ハイブリドーマ法 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, New York N.Y., pp 77-96, (1985) によって作製することができる。

20

【 0 1 7 9 】

ハイブリドーマ法を用いる場合、ミエローマ細胞系を用いることができる。ハイブリドーマ産生融合法のいて用いるのに適したそのような細胞系は、好ましくは非抗体産生であり、高い融合効率と、所望の融合細胞 (ハイブリドーマ) のみの増殖をサポートする特定の選択培地で増殖可能な酵素欠損を有する。例えば、マウス融合において用いられる細胞系は、Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NS0/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 および S194/5XX0 Bul; ラット融合に用いられる細胞系は R210.R CY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F および 4B210 である。細胞融合に有用な他の細胞系は U-266, GM 1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 および UC729-6 である。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマおよび他の細胞系は、本発明の新規の組成物であると考えられる。

30

【 0 1 8 0 】

ファージディスプレイ法もまた、任意の種のモノクローナル抗体の産生に用いることができる。好ましくは、この方法は、完全なヒトのモノクローナル抗体の作製に用いられ、単一の Fab または Fv 抗体フラグメントをコードするポリヌクレオチドがファージ粒子の表面に発現する (Hoogenboom et al., J Mol Biol 227: 381 (1991); Marks et al., J Mol Biol 222: 581 (1991); さらに 米国特許第 5,885,793 号も参照)。各ファージは本明細書に記載の結合アッセイを用いて「スクリーニング」して A および / または I C D に対して親和性を有する抗体フラグメントを同定することができる。従って、これらのプロセスは、抗体フラグメントレパートリーの線状バクテリオファージの表面でのディスプレイおよび A および / または I C D に対するそれらの結合によるファージの選択を介する免疫選択を模擬するものである。1つのそのような手順は、そのような方法論を用いて、M P L - および m s k - 受容体に対する高い親和性と機能的なアゴニスト抗体フラグメントの単離を記載する P C T 出願 PCT/US98/17364 (出願人 Adams ら) に記載されている。このアプローチでは、既に記載されているように (Mullinax et al., Proc Natl Acad Sci (USA) 87: 8095-8099 (1990))、末梢血リンパ球由来の天然の再配列したヒト V 遺伝子をクローニングすることによって、ヒト抗体遺伝子の完全なレパートリーを作成することが

40

50

できる。モノクローナル抗体作製の具体的方法は、本明細書の一部を構成するAntibodies : A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988に記載されている。

#### 【0181】

モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体（抗血清）に加え、本発明の検出法は、F(a b)、F<sub>v</sub>、V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>および他のフラグメント等の抗体フラグメントを使用することができる。但し、ポリクローナル抗体の使用において、モノ特異的な抗体産生をもたらすために、標的エピトープに対する抗血清を吸着させる必要があり得る。また、現在特許文献および科学文献において十分に記載されているように、組換え的に産生した抗体（免疫グロブリン）およびその変異体を用いることも可能である。例えば、本明細書の一部を構成する、EPO 8430268.0; EPO 85102665.8; EPO 85305604.2; PCT/GB 85/00392; EPO 85115311.4; PCT/US86/002269および特願85239543を参照。さらに、記載したように調製した抗体の結合特異性を模擬する他の組換えタンパク質を調製することも可能である。

#### 【0182】

本発明について用いることができる細胞のタイプとしては、天然に存在するものか人工的に構築されたものに関わらず、配列番号1を含んでなるガンマセクレターゼ基質を発現し、ガンマセクレターゼ活性を可能にする、任意のタイプの細胞が挙げられる。非限定的な例としては、実施例に記載されてものを含む、本明細書に記載された細胞のタイプが挙げられる。既知のまたは本明細書に記載の方法を用いて、当業者は、配列番号1を含んでなるポリペプチドを含んでなるガンマセクレターゼ基質および野生型ガンマセクレターゼ基質をコードするcDNAで、逐次にまたは同時に形質転換/トランスフェクトすることができる。組換え核酸法、遺伝子操作（即ちノックアウト株の作成）、および細胞形質転換/トランスフェクションの任意の知られている方法、ならびに本明細書において詳細に記載した方法を用いることができる。

#### 【0183】

組換えDNA分子、タンパク質および抗体産生、ならびに組織カルチャーおよび細胞形質転換、に関して標準的な方法を用いることができる。例えば、Sambrook, et al.（以下）またはCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994)を参照。酵素反応および増殖方法は、典型的には、製造元の取扱説明書にしたがって、またはSambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989))に記載されているような当業者が共通して認識しているような慣用の手順を用いて、あるいは本明細書に記載されているように行う。特に記載しない限り、実験方法、および分析化学の方法、合成有機化学、ならびに医化学および製薬化学に関連して用いる本明細書に記載の用語は、当分野において周知で一般に用いられているものである。標準的な技術を、化学合成、化学分析、医薬調製物、製剤および送達および患者の処置に用いることができる。

#### 【0184】

見出しのセクションは単に構成上の目的で本明細書で用いられているのであって、記載した発明を何ら限定するものではないと解釈される。すべての文献は本明細書の一部を構成するものと解釈される。

#### 【0185】

以下の実施例は、本発明の特定の態様の単なる説明であって、特許請求の範囲で定義される本発明を限定するものであると解釈されない。

#### 【実施例】

#### 【0186】

##### 一般的技術

##### JMDキメラ基質のプラスミド構築

既に記載されているSPA4CT-LE構築物(Dyrks, et al., FEBS Lett., 1992; 309: 20-24)に類似するpcDNA3.1-C99プラスミドを標準的なPCR法により作製した。APPシグナルペ

プチドを、ジペプチドロイシン - グルタミン酸 ( L E ) リンカーを介して、C 9 9 フラグメントの N 末端に融合した。pcDNA3.1-C99GVP構築物の作製に用いた方法論は既に記載されている方法と同様のものである ( Karlstrom, H., et al., J. Biol. Chem., 2002; 277 : 6763-6766 ) ( Figure 3 参照 )。簡潔には、A s c I 部位を、C 9 9 のトリプルリジン ( K ) 膜アンカーをコードするヌクレオチドの 3 ' の隣に導入し、そこで G V P コード配列が次いでインフレーム ( C 9 9 のリジン膜アンカー配列の C 末端側へ ) で挿入される。膜近傍ガンマセクレターゼ基質キメラのシリーズを作製するために、C 9 9 G V P における 1 9 残基の内腔膜近傍ドメイン ( A P P <sub>695</sub> のアミノ酸残基 6 0 6 ~ 6 2 5 に対応 ) をコードするヌクレオチドを、それぞれ C99GVP-APLP2, C99GVP-Notch1 および C99GVP-SREBP1 の構築物を生じる、ヒト A P L P - 2 ( アミノ酸 6 7 4 ~ 6 9 3 )、N o t c h 1 ( アミ

10

10

20

ノ酸 1 7 1 6 ~ 1 7 3 4 )、S R E B P 1 ( アミノ酸 6 4 6 9 ~ 6 4 8 7 ) の対応する領域をコードするヌクレオチド配列で置換する。3 つのキメラすべてを、2 対の重複プライマーを用いる 2 ステージの P C R 法を用いて構築した ( プライマーに一覧は Table I を参照 )。これらのキメラ基質のキャラクタリゼーションを行い、ガンマセクレターゼ基質としての活性、次いで A および A I C D の産生と分泌を調べた ( Figure 6 ~ 7 )。A P P のプレ T M D G S N K モチーフを保持するキメラ ( C 9 9 G V P - A P L P 2 \* または C 9 9 G V P - A P L P 2 - G S N K、C 9 9 G V P - N o t c h 1 \* または C 9 9 G V P - N o t c h - G S N K、および C 9 9 G V P - S R E B P 1 \* または C 9 9 G V P - S R E B P 1 - G S N K と表示する ) を同様にして、異なる組のプライマーについて作製した。

【 0 1 8 7 】

抗体 :

A P P の C 末端の最後の 2 0 アミノ酸に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗 F 1 a g を販売元から購入し ( Sigma Cat. # A8717 および F1804 )、ウェスタンブロットにそれぞれ 1 : 2 0 0 0 0 および 1 : 2 0 0 0 の希釈率で使用した。V P 1 6 に対するモノクローナル抗体 ( Santa Cruz Biotechnology Cat. # sc-1728, Santa Cruz, CA ) をウェスタンブロットに 1 : 5 0 0 の希釈率で用いた。モノクローナル抗体、2 H 3 ( A 4 - 7 に特異的 )、2 G 3 ( A 3 3 - 4 0 に特異的 )、および 2 1 F 1 2 ( A 3 0 - 4 2 に特異的 ) を、既に記載されているように ( Johnson-Wood, K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997; 94: 1550-1555 ) に実験室内で作製した。ポリクローナルおよびモノクローナル [ 2 2 B 1 1 ] A I C D n e o - エピトープ抗体を VMLKKKC ( 配列番号 3 9 ) に対して惹起した。E L I S A によるモノクローナル [ 2 2 B 1 1 ] 抗体のキャラクタリゼーションは、抗体が抗原ペプチドに用量応答的に結合することを示した。[ 2 2 B 1 1 ] 抗体は、インタクトな A P P - 開裂部位 ( T V I V I T L V M L K K K Q T Y T S、配列番号 9 1 ) とともに抗原ペプチドを含むペプチドと交差反応しない。インタクトな - 開裂部位 ( 即ち、開裂部位にまたがり、開裂によって n e o - エピトープを欠く ) は、[ 2 2 B 1 1 ] 抗体と抗原ペプチドとの間の結合に干渉しない ( Figure 1 5 および Figure 1 6 )。

【 0 1 8 8 】

セルカルチャーおよび一時的トランスフェクション

ヒト 293 ( H E K 2 9 3 ) 細胞 ( A T C C ) を、1 0 % ウシ胎児血清 ( Hyclone, SV 300 14.03 ) およびペニシリン 5 0 ユニット / m L およびストレプトマイシンを添加した、高グルコースのダルベッコ修飾 E a g l e 培地 ( DMEM, Gibco/Invitrogen より入手, Cat # 11960 ) 中で培養した ( 3 7 ° C、5 %、C O <sub>2</sub> )。細胞は継代数 3 0 未満のものを

10

20

30

40

50

いた。シード時点の細胞の生存率は、Vi-Cellアナライザー (Beckman-Coulter) を用いて測定したところ95%を超えていた。プレート上の細胞は、標準的な組織カルチャー倒立顕微鏡で判断したところ、実験のすべてのフェーズで終止細胞密度が95%を超えていた。トランスフェクションはすべて、6ウェルの組織カルチャープレート(Costar)に細胞数 $5 \times 10^6$ にて実施した。以下の3つのプラスミド:pG5E1B-luc, 200 ng (R. Maurer, OHSUより寄贈); pCMV--gal, 100 ng (R. Maurer, OHSUより寄贈); C99GVPまたは種々のキメラ構築物, 200~400ngを各ウェルに共に加えた。FuGENE6試薬(Roche Cat. # 11-814443001)を、接着細胞の一時的トランスフェクションについて製造元のプロトコルにしたがって用いた。トランスフェクションから16時間後に、トランスフェクトされた細胞を、12ウェル( $2 \times 10^6$ 細胞)および/または96ウェルのプレート( $5 \times 10^4$ 細胞)(Coster)に再度シードし、新鮮な培地を、ガンマセクレターゼ基質の有りまたは無しで添加した。分析のため、細胞および馴化培地をトランスフェクションから48時間後に回収した。

10

#### 【0189】

トランスフェクトしたHEK細胞の阻害剤処理

遷移状態アナログガンマセクレターゼ阻害剤L685458 (Sigma) およびペプチド模倣阻害剤DAPT (Dovey, H.F., et al., J Neurochem., 2001; 76:173-181)をDM SOに溶解し、20 mMストックとした。同様に、スルホンアミド阻害剤の数多くのElanシリーズを本明細書に記載したように作製し使用した (Figure 11~14 参照)。阻害剤をセルカルチャー (例えばHEK) に示した終濃度で添加し、処理した細胞をトランスフェクションから48時間後に回収した。メタロプロテイナーゼ阻害剤TAPI-I (Calbiochem)を終濃度40  $\mu$ Mで用いた。A 分解酵素阻害剤、バシトラシンおよびホスホラミドンそれぞれ終濃度1 mg / mLおよび40  $\mu$ Mで用いた。阻害実験はすべて3重で少なくとも3回行った。

20

#### 【0190】

基質およびAICDのウェスタンブロット検出

一時的トランスフェクションから48時間後に、12または6ウェルの組織カルチャープレートにて培養したHEK細胞を、冷却したTBSで洗浄し、プロテアーゼ阻害剤カクテル (SigmaAldrich Cat.# P8340)を添加した1 mLの溶解バッファー (TBS中、0.1% SDS、0.5%デオキシコール酸および1% NP-40)中でホモジナイズした。サンプルはすべて4にて1時間可溶化させ、14000  $\times$  gで30分間遠心して清澄化した。上清のアリコートにLaemmliサンプルバッファー中で5分間煮沸し、10~20%Tris-トリシンSDS-PAGE (Invitrogen)で分離した。ゲルを適当な抗体を用いてウェスタンブロットに付し、Supersignal West Pico化学発光基質(Pierce Cat. # 34080)で可視化した。実験はすべて少なくとも3回行った。

30

#### 【0191】

免疫染色

野生型または一時的にトランスフェクトしたCOS-7細胞をPBS中2%パラホルムアルデヒドにより室温で20分間固定化し、次いでPBS中0.2%のTriton X-100で10分間透過処理した。C99GVPおよび変異体基質ならびにAICD-GVPを、サンプルを、ポリクローナル抗VP16で2時間およびローダミン結合ロバ抗ヤギ2次抗体 (Jackson Laboratory Cat. # 705-165-003)で1時間、順次インキュベーションすることにより検出した。染料はすべてBio-Rad MRC 1024ES共焦点顕微鏡 (Bio-Rad)で可視化し、付属のCCDカメラで撮影した。

40

#### 【0192】

ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

ルシフェラーゼレポーターアッセイをトランスフェクションから48時間後に行った。96ウェルプレート (BD Biosciences) にシードした細胞をPBSで1回洗浄し、1ウェルあたりレポーター溶解バッファー (Promega) 20  $\mu$ L中に回収した。100  $\mu$ Lの発光基質 (Promega)を添加した後、ルシフェラーゼ活性をMicroLumatPlusマイクロプレート照度

50

計 (Berthold Technologies) で測定した。 - ガラクトシダーゼ発光基質 (BD Biosciences) を用い、同様にして - ガラクトシダーゼ活性を測定した。トランスフェクション効率およびトランスフェクションの一般的な効果の対照として、2 つ一組のプレートにて - ガラクトシダーゼ活性を測定することによりルシフェラーゼ活性を標準化した。実験はすべて3重行い、少なくとも3回繰り返した。

#### 【0193】

##### A の免疫沈降 (IP) およびウェスタンブロット検出

馴化培地または細胞リゼート中の総 A ペプチドを、2 H 3 抗体 4  $\mu$ g を用い、4 にて一晚免疫沈降した後、50% プロテイン G - セファロース (GE Healthcare) スラリー 50  $\mu$ L と1時間インキュベーションし、同じ溶解バッファーで3回洗浄した (ウェスタンブロットの項で記載したように)。タンパク質を、70 にて5分間加熱することにより、Laemmli サンプルバッファーに固相免疫沈降から溶出させ、10~20% Tris-トリシン SDS-PAGE または修飾 Tris-トリシン / 8 M 尿素ゲル (Qi-Takahara, Y., et al., J Neurosci. (2005; 25, 436-445)) で分離した。マイクロセルロースメンブレン (Invitrogen) 上に移した後、メンブレンを PBS 中 98 に5分間加熱し、2 H 3 抗体で免疫染色し、Super-signal West Pico 化学発光基質で可視化した (Pierce)。各実験は少なくとも3回反復した。

#### 【0194】

##### 22B11 モノクローナル抗体の作製手順: ペプチドのコンジュゲーション

ヒツジ抗マウス IgG (Jackson ImmunoResearch) とカップリングさせた 22B11 に対する免疫原は (NH<sub>2</sub>) - VMLKKK - C\* ((NH<sub>2</sub>)-VMLKKK が、APP TMD のイプシロン開裂により生じる neo-エピトープであり、Cys (C\*) が癌に対するペプチドのカップリングを促進に関する人工的に追加したアミノ酸である) とした (Anaspec, San Jose, CA の受注による合成により入手)。ペプチドを以下の方法によりカップリングした。ヒツジ抗マウス IgG 10 mg を、10 mM ホウ酸バッファー (pH 8.5) に対し一晚透析した。次いで、透析した抗体を 2 mL に濃縮した。10 mg のスルホ E M C S (Molecular Sciences) を 1 mL の脱イオン水に溶解した。40 モル濃度の過剰量のスルホ E M C S を、ヒツジ抗マウス IgG に滴加した後 10 分間攪拌した。活性化したヒツジ抗マウスを、0.1 M の P O<sub>4</sub> 5 mM E D T A (pH 6.5) で平衡化した Pierce 10 mL presto カラムで脱塩した。抗体を含むフラクションをプールし、A280 および減衰係数として 1.4 を用いて約 1 mg/mL に希釈した。40 モル濃度過剰のペプチドを 10 mM の P O<sub>4</sub> (pH 8.0) 20 mL に希釈した。希釈したペプチドをそれぞれ 10 mg のヒツジ抗マウス抗体に加え、室温にて4時間振盪した。次いで、このコンジュゲーションを 10 mL 未満に濃縮し、バッファーの交換および過剰のペプチドの除去を数回行いながら PBS に対して透析した。次いで、サンプルを 0.22  $\mu$  フィルターにより滅菌し、1 mg ずつのアリコートとし、-20 で凍結した。Pierce の BCA タンパク質アッセイを用い、コンジュゲートの濃度を、ウマ IgG 標準曲線を用いて濃度を測定した。コンジュゲートを、カップリングしたペプチドの、活性化したヒツジ抗マウスの上での分子量シフトにより測定した。

#### 【0195】

##### 免疫化およびスクリーニングプロトコル

抗体 22B11 を A/J マウス (Jackson Laboratories) を、C 末端のネイティブな配列に付加した人工のシステイン (C\*) を介してヒツジ抗マウス (Jackson ImmunoResearch) とカップリングさせた (NH<sub>2</sub>)-VMLKKKC (配列番号 39) および連結剤スルホ E M C S (Molecular Sciences) で免疫化することにより作製した。0、14、28 日目に動物に注射し、35 日目に力価を測定した。最も高い力価のマウスを、Kohler および Milstein の修飾を用いて融合し、得られた陽性のものをペプチド VMLKKKC (配列番号 39) に対する反応性、および領域、特に、TVIVITLVMLKKKQYTS (配列番号 91) または MBP-C125 (マルトース結合タンパク質に融合した APP C125 (ここで、APP C125 は ADRGLTTRPG SGLTNIKTEE I SEVKMDAEF RHDSGYEVHH QKL VFFAEDV GSNKGAI IGL MVGGVVIATV IVITLVMLKK KQYTSIHHGV VEVD



AAVTPE ERHLSKMQQN GYENPTYKFF EQMQN (配列番号92)である))にまたがるペプチドに対する反応性の欠如に関してスクリーニングした。

#### 【0196】

ハイブリドーマ融合および増殖に用いた物質は以下のとおり：ポリエチレングリコール 4000 (PEG4000) 50% w/v (75 mM HEPES中) (Roche Cat #783 641より入手)；高グルコースDulbecco修飾 Eagle培地 (グルタミンなし) (DME, Gibco/Invitrogen, Cat #11960より入手)；ウシ胎児血清 (FBS, Hyclone, SV 30014.03より入手)；1M HEPES (Gibco, Cat #15630より入手)；Elan Media Facilityにて調製した10 mM ヒポキサンチン(Sigma)；Elan Media Facilityにて調製した0.17 M NH<sub>4</sub>Cl (Sigma Tissue Culture Grade Reagents)；SP2/0 AG14細胞 (American Type Cell Collection)およびElan Hybridoma Facilityにて再クローンした；アザセリン(Sigma Tissue Culture Grade Reagents, Cat #A1164-5MG)；コンフルエント SP2/0 (自家回収)より得た50 mL 培地；組換えIL6 (Roche, Cat #1 444 581より入手)；96ウェル組織カルチャープレート(Corningより入手)。

10

#### 【0197】

##### 融合プロトコル

マウスをCO<sub>2</sub>による昏睡により屠殺した後、頸椎脱臼して70%エタノールで数分間浸漬した。脾臓を無菌で取り出し、5 mLの増殖培地 (DME 高グルコース (グルタミンなし) 20% FBS、10<sup>-4</sup>M ヒポキサンチン、15 mM HEPES および 2 mM グルタミン) に置いた。

#### 【0198】

単細胞懸濁液を得られるまで、2つのすりガラススライドの間で脾臓細胞を解離させた。次いで、脾臓細胞懸濁液を15 mLの試験管に移し、4の設定 (500 × g) でIEC臨床遠心にて5～10分間遠心することによりペレット化した。

20

#### 【0199】

細胞ペレットを、4の0.17 M NH<sub>4</sub>Cl 7 mLで再懸濁し、破片の大きな凝集物を3～5分間静置させた。融合物から破片を分離させ、赤血球細胞を溶解した。単細胞懸濁液をピペットにより破片ペレットからピペットでとり、50 mLの試験管に移し、増殖培地を加えて50 mLとし、細胞数を計測した後ペレット化した。

#### 【0200】

SP2/0 Ag14は中期～後期対数期に存在する。SP2/0細胞数を血球計で計測し、十分量のSP2/0を取り出し、上記のとおり遠降させて1 SP2/0～4脾細胞を得た。sp2/0からの培地を選択培地のため保存する。SP2/0細胞はDMEに再懸濁し、脾細胞を加える。DMEを加えて容量50 mLとし、細胞混合物を4の設定で10分間遠心する。

30

#### 【0201】

振り混ぜて細胞ペレットを軟らかくした。振盪しながら、1 mLのPEG 4000を細胞ペレットに加えた。細胞を攪拌し、1、2分間PEG 4000を細胞に接触させた。25 mLのDMEを細胞/PEG混合物に加え、室温で1分間インキュベーションする。25 mLの増殖培地を加え、室温で1分間インキュベーションする。次いで細胞を4の設定で10分間遠心し、選択培地に懸濁する (45 mL SP2/0 馴化培地、0.45 mL 2 mM グルタミン、0.45 mL 10<sup>-2</sup> M ヒポキサンチン、200 ug アザセリン、2 mL FBS、100 U/mL IL6、100 mLの増殖培地)。融合物を15の96ウェル組織カルチャー処理プレートに50 μL/ウェルでプレATINGする。

40

#### 【0202】

融合の翌日、50 μLの増殖培地を各ウェルに加える。融合から3～5日後に培地の半量を吸引し、新鮮な増殖培地100 μLと交換する。融合から7日後、ウェルの50%以上にハイブリドーマが観察される。融合から6～8日後、100 μLの培地を添加する。融合から10～12日後、スクリーニングを行う。

#### 【0203】

実施例1：APP細胞内ドメイン (AICD) に対する抗体の産生

AICDポリクローナル抗体：2種類のAICDポリクローナル抗体を商業的な供給元

50

からカスタム合成により得た (Anaspec, San Jose, CA)。ポリクローナル抗体はいずれも免疫化ペプチドVMLKKKC (配列番号39) に対して陽性の力価を示した。抗体は、固定化した免疫化ペプチドに対してアフィニティー精製した。抗体の特異性をウェスタンブロットおよびELISAベースの解析により確認した。アフィニティー精製したAICD駆血清はAICDを認識したが、キメラ - および - C末端フラグメントまたはホロタンパク質は認識せず、このAICD抗血清は開裂したAICDフラグメントに特異的であることを示した。

#### 【0204】

AICDモノクローナル抗体：モノクローナル抗体を、AICDアミノ酸配列のN末端部分に対して合成した。この技術は免疫原ペプチドVMLKKKC (SEQ ID NO:39) に対するよう  
10  
に行った。Kimberly, et al., Biochemistry 42(1):137-144 (2003)参照。得られたモノクローナル抗体 [22B11] は、ガンマセクレターゼ開裂により生じたAICDフラグメントのN末端領域に対し特異的な結合を示す (上記; Figure 15 およびFigure 16 )

#### 【0205】

実施例2：A ELISA

異なるA を定量するのに用いたELISAは、上記のおよび本明細書の一部を構成するJohnson-Wood, K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1997; 94: 1550-1555に記載の標準的な技術を用いて行った。サンプル中のA 40およびA 42ペプチドを、それぞれ、2G3または21F12抗体でコーティングしたプレートにて捕捉し、  
20  
ピオチン化2H3抗体で検出した。ストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲート (Roche) から生じた蛍光シグナルを、CytoFlourマイクロプレートリーダー (Applied Biosystems) で測定した。合成A 40またはA 42ペプチド (Anaspec) を用いて標準曲線 (Figure 10) を作成した。すべての実験は3回行った。

#### 【0206】

実施例3：APPのICD (AICD) の定量検出

上記のAICDポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかによる細胞リゼートの捕捉およびAPPのC末端に対する抗体による表示 (例えば、13G8、自家調製) に基づくAICDサンドウィッチELISAを確立した。あるいは、ルシフェラーゼベースのレポーターアッセイを用いてAICDの存在を検出し、定量し、それらの数を既知  
30  
または可能性のあるガンマセクレターゼ阻害剤化合物の阻害効力を関連付けることができる。

#### 【0207】

合成AICD ELISA標準

AICDペプチドとAPP C末端ペプチド (APP681-693; C-GYENP TYKFF EQM, SEQ ID NO:93) を、1, 11 - ビス - マレイミドテトラエチレングリコール (Pierce) で架橋することにより、AICD標準を合成した。合成AICD標準を逆相HPLCにより、LC質量分析により純度 > 80%まで精製した (データ示さず)。標準の全量および濃度を、重量、純度および計算された分子量に基づき決定した。標準をさらに質量分析および逆相HPLCならびにサンドウィッチELISAにおけるバックグラウンドに対する陽性シ  
40  
グナルによる化学的キャラクタリゼーションに基づいて確認した。(Figure 10)。あるいは、完全長、ネイティブ配列AICDペプチド、(配列番号41) : VMLKKKQYTS IHHGVVEVDA AVTPEERHLS KMQQNGYENP TYKFFEQMQN, (Calbiochem Cat. # 171545 #) を標準として用いた。

#### 【0208】

AICDに対するmAbを用いるAICD ELISA：標準曲線

上記のとおり作製し精製したモノクローナル抗体 [22B11] を、4 にて48時間、コーティングバッファー (一リン酸ナトリウム・2H<sub>2</sub>O 0.23g/L、リン酸二ナトリウム・7H<sub>2</sub>O 26.2g/L、アジ化ナトリウム 1g/L、1L q.s. 滅菌精製水), pH 8.0) 中10μg/mLを100μLでThermolon 4HBX 96ウェルプレートにコーティングした。インキュベシ  
50

ヨンの後、バッファー溶液をウェルから除去し破棄した。各ウェルに0.25%のブロッキングバッファー(25g/L結晶性スクロース、10.8g/Lリン酸二ナトリウム・7H<sub>2</sub>O、1g/Lリン酸一ナトリウム・1H<sub>2</sub>O、8.33mL/Lヒト血清アルブミン30%溶液、アジ化ナトリウム0.5g/L、1Lq.s.滅菌精製水、pH7.4)200μLを4に overnight 添加した。このインキュベーションの後、ブロッキングバッファーをウェルから除去し、排気した。減圧下で、overnight プレートチャンバー内に傾けて置き、ウェルを完全に乾燥させた。APPCのC末端領域に特異的な抗APPウサギポリクローナル抗体(「抗APP Cter」)をSigmaAldrich (Cat. #A8717)より購入し、標準的方法を用いてビオチン化した。この修飾抗体を検出抗体として用いた。ストレプトアビジンコンジュゲートアルカリホスファターゼ(GE Healthcare (旧Amersham) Cat. #RPN-1234)を自家調製した蛍光基質A(31.2g/L 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、30~33mL/L 6NHCl、0.03g/L 4-メチルウンベリフェリルホスフェート、q.s. 1L 上質水)とともにレポーティングシステムとして用いた。蛍光プレートリーダー(Cytofluor 4000 またはMolecular Devices SpectraMax GeminiEM)を用いて96ウェルプレートにおけるシグナルを測定した。APP由来ペプチドCTF50(HPLCによる純度 $\geq$ 95%)をCalbiochem (Cat. #171545)から購入した。(VMLKKKQYTS IHHGVVEVDA AVTPEERHLS KMQQNGYENP TYKFFEQMQN, (SEQ ID NO.41)を有する)。このペプチドは免疫沈降し、ELISAプレート上でmAb[22B11]により捕捉し、それぞれ、ウェスタンブロットで抗APP Cterウサギポリクローナル抗体およびELISAアッセイにより検出した。HEK293細胞リゼートおよび精製したAICDペプチドでスパイクした対照の「スパイクおよびリカバリー」実験は標準曲線におけるシフトは示さず、アッセイにおいて検出し得るバックグラウンドも生じなかった。サンプルと標準をカゼイン希釈液(8g/L NaCl、0.144g/L リン酸二ナトリウム、0.2g/L リン酸一カリウム、0.2g/L KCl、カゼイン2.5g/L、q.s. 1L 上質水、NaOH (必要量を加えてpH8.6に調整)に希釈し、プレートに結合させた。

#### 【0209】

##### ポリクローナル抗体AICD ELISA

HEK293細胞を標準的に条件下、約90%コンフルエントまで増殖した。細胞を回収し、計数し、次いで、PDL-コーティング60mmディッシュに培地5mL中 $2 \times 10^6$ 細胞/ディッシュにプレーティングした。細胞を約4時間ディッシュに定着させた。種々の構築物の細胞へのトランスフェクションは、Lipofectamine 2000<sup>TM</sup> (LF2K)(Invitrogen)を用い標準的な技術を用いて行った。簡潔には、2μgのプラスミドDNAおよび4μLのLF2KをOpti-MEM (Gibco)の別々の150μLアリコートに希釈し、10~15分間静止させた。次いで2つのアリコートを混合し、約20分でDNA:脂質複合体を形成させた。次いで、300μL DNA:脂質複合体を、3mLの新鮮な培地中、細胞に加え、overnight インキュベーションした。可能性のあるまたは既知のガンマセクレターゼ阻害剤化合物を細胞に投与するために、トランスフェクトした細胞を回収し、200,000細胞/ウェルにてPDL-コート24ウェルプレートに再プレーティングし、プレートに約4時間定着させた。細胞を洗浄し、500μLの新鮮な培地を加えた。阻害剤化合物を、DMSO中10x濃度のストック溶液からの細胞に加え、細胞とovernight インキュベーションさせた(約18時間)。インキュベーションの後、馴化培地(CM)を細胞から回収し、手短に遠心し、A ELISAを用いた分析のために保存した。細胞をPBSで1回洗浄した後、150μLの溶解バッファー(PBS+0.5% NP40 + Complete<sup>TM</sup> 阻害剤(Roche))を各ウェル添加した。プレートを4で15分間インキュベーションし、回収したリゼートを15000xgにて10分間遠心することにより回収した。タンパク質測定とAICD ELISAのために上清を保存した。典型的なタンパク質収量は約0.45mg/mLである。

#### 【0210】

##### ルシフェラーゼアッセイ

HEK細胞におけるAICD-GVP産生を確認後、上流活性化配列(UAS)Gal4応答エレメントを含むルシフェラーゼレポーター遺伝子をトランス活性化する能力を試

験した。レポーター遺伝子単独でトランスフェクトした細胞からはシグナルは検出されなかったが、GVPの活性な形態を同時発現している場合は強いトランス活性化を生じ、このレポーターアッセイの選択性を確認した。GVP対照のシグナルと比較可能な強いシグナルがC99GVPで同時トランスフェクトした細胞についても観察された (Figure 5 C)。ガンマセクレターゼ阻害剤処理は、C99GVPトランスフェクト体のみににおいてルシフェラーゼ活性の用量依存的減少を生じ (Figure 5 C)、C99GVP誘導レポータートランス活性化がガンマセクレターゼ依存であることを示した。ウェスタンブロットにより測定したところ同じ処理でAICD産生は完全に消失したが、残存するルシフェラーゼ活性は、過剰のガンマセクレターゼ阻害剤の存在下で維持された (Figure 5 B)。この矛盾は、顕著な感受性および非線形シグナルアウトプットから生じ得る (Karlstrom, H., et al., J. Biol. Chem., 1997; 277:6763-6766; Cao, X., and Sudhof, T.C., J. Biol. Chem., 2004; 279: 24601-611) が、他のプロテアーゼによるC99GVP細胞質尾部の非特異的な開裂に起因するものではないようである。

10

#### 【0211】

次に、C99GVPからA産生を特徴付けた。野生型のHEK細胞およびmockトランスフェクションコントロールは小さなAを馴化培地に分泌した (Figure 5 D、レーン1)。対照的に、IP/ウェスタンブロット (Figure 5 D) およびA40およびA42種をそれぞれ検出するELISA (Figure 1 D、上段) で測定されるように、C99GVPの一時的発現は強いA産生につながった。これまでの報告と一致して、A40 ( $210.8 \pm 19.2 \text{ pM}$ ) は主要な分泌種であるが、A42 ( $39.1 \pm 6.4 \text{ pM}$ ) は全Aの小さいフラクション ( $15.7 \pm 2.5\%$ ) にすぎない (Figure 5 D)。セクレターゼ阻害剤処理によりA分泌は完全に消失した (Figure 5 D)。最後に、我々は、C99GVPまたは野生型APPのいずれかを基質として用い、2つの阻害剤のA低減効力を比較した。ELISAにより測定されるように、2つの基質についての各IC<sub>50</sub>値は、本質的に同じである (Figure 5 E)。

20

#### 【0212】

実施例4：ガンマセクレターゼ基質特異性を決定するアッセイ

ガンマセクレターゼ基質の膜近傍ドメイン (JMD) がガンマセクレターゼ阻害剤化合物のある特定のタイプの選択性の介在または調節に関与しているか否かを試験する実験をいくつか行った。1つの実験では、APP-C99GVPのJMDを非APP基質由来のものに置換した場合、ネイティブのJMDを有するAPP-C99-GVPに対して、これらキメラ基質からのAICD産生の阻害についての用量応答曲線が右にシフトするかどうかを試験した。キメラ基質を上記に一般的に記載したとおりに調製し、ガンマセクレターゼ活性のアッセイを上記のプロトコル (即ち、細胞 (HEK) をトランスフェクトし上記のとおり培養した) を用いて行った。阻害剤の存在下で、C99GVP-Notch、C99GVP-APLP2およびC99GVP-APPを発現する細胞中のガンマセクレターゼ活性を、ELISAおよびモノクローナル抗体22B11を用いて測定した。Figure 14 Aおよび14 Bにおける結果から、選択的なスルホンアミドガンマ阻害剤475516および477899は、ネイティブの (APP) JMDを有するC99GVPに対して、C99GVP-NotchおよびC99GVP-APLP2でトランスフェクトした細胞におけるAICD阻害効力の減少を示すことが認められた。非選択的化合物44989および318611はC99GVP-NotchおよびC99GVP-APLP2での効力およびシフトは示さなかった。従って、基質の開裂に関する化合物475516および477899の選択性は、非APP JMDの存在によって影響を受けた。

30

40

#### 【0213】

上記の発見を反復および展開するためにさらなる実験を行った。簡潔には、細胞 (293) を、示されたC99GVP構築物 (ネイティブおよびキメラ) で一時的にトランスフェクトした後、AICD産生の阻害の濃度依存性をELN-44989およびELN-475516で解析した。AICDの阻害の濃度依存性のこの実験から得られた結果をFigure 13にまとめる。Figure 13 Aは、種々の構築物に対する化合物475516、449

50

89、477899、318611によるAICD阻害についてのEC<sub>50</sub>値(2回の濃度応答実験から得られた平均のEC<sub>50</sub>値)を示す。WT APP JMDを有するC99GVVPについてのIC<sub>50</sub>に対して標準化した(エラーバーはIC<sub>50</sub>の反復測定に基づくCV)。データは、非APP JMD領域を含むキメラC99GVVP NotchおよびAPLP2構築物を発現する細胞における選択的な阻害剤475516および477899の力価における明かな右シフトを示している。

#### 【0214】

これらの結果は、APP JMDと比較して、選択的な阻害剤では、APLP2およびNotch JMDを有するC99GVVPキメラからのAICD産生は右にシフトした阻害を示している(Figure 13A~B)が、非選択的阻害剤ではそうでないことを示している。

別の実験では、AICD阻害の右へのシフトは、APP 'GSNK'モチーフを保持するNotch JMD構築物を有するC99GVVP構築物(C99GVVP - Notch 4 - GSNK)を用いて部分的に逆転すると思われる(Figure 14D)。同様の実験において、C99GVVPのAPP JMDへSLSS残基(APLP2のJMD由来)だけの置換(C99GVVP - APP 4 - SLSS)は、選択的な化合物475516の阻害の効力を、完全なAPLP2 JMDキメラのIC<sub>50</sub>と同程度のIC<sub>50</sub>に減少させる(Figure 14Aおよび14Cの「SLSS」)。

#### 【0215】

他のC99GVVP - JMDキメラ基質

上記の一般的なプロトコルを用いて、C99GVVP-P75-NTR、C99GVVP-N-カドヘリン、C99GVVP-ErbB4、C99GVVP-SCNB2およびC99GVVP-チロシナーゼを含む、更なるシリーズのC99GVVP

JMDキメラを作製した。これらのキメラ、ならびにC99GVVP-NotchおよびC99GVVP-APLP2構築物をコードする構築物を、HEK293細胞にトランスフェクトした。簡潔には、細胞を、 $3.75 \times 10^6$ 細胞/ディッシュで10cmディッシュに撒いた。1日おいた後、4:1Fugene:cDNAの割合( $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ )でFugene-6試薬を用いて、細胞を $12.5 \mu\text{g}/10\text{cm}$ ディッシュのC99GVVPプラスミドcDNAでトランスフェクトした。翌日、細胞を31700細胞/ウェルにてポリ-D-リジンコートした96ウェルプレートに撒いた。次の日、0.4%DMSO(C<sub>f</sub>)、 $100 \mu\text{L}/96$ ウェルプレートを含む培地中、細胞を化合物で処理した。細胞を一晩処理し、プレートを遠心した。細胞を、Mg<sup>2+</sup>およびCa<sup>2+</sup>を含むPBSで1回洗浄し、ロッカープラットフォームにて4℃にて1時間溶解バッファー(1% TritonX100, 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA + 完全なプロテアーゼ阻害剤カクテル)25mL中で溶解した。卓上遠心機で2100rpmにてプレートを遠心した(約1000×g、10分間、室温)。上清(20μL)をポリプロピレン保存プレートに移し、ドライアイスで乾燥後-80℃で保存した。上清を保存プレート上で希釈し、ELISAの時点でカゼイン希釈液(1:6~1:15)で希釈した。混合後、12ウェルピペットを用い、各ウェルから100μLを22B11コートしたELISAプレートに移した。32~2000pg/mL AICDの標準曲線を各プレートについて作成した。プレートを4℃にて一晩インキュベーションしてAICDを結合させた。翌日、プレートをカゼイン希釈液中0.25μg/mLの終濃度のビオチニル化Sigma抗APP C末端抗体中で1時間インキュベーションしたTTBS(0.05% Tween-20を添加したTTBS)で4回洗浄した。プレートを洗浄(上記のとおり)し、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ(Roche)(カゼイン希釈液中1:1000希釈)中、室温で1時間インキュベーションした。プレートを再度洗浄し、蛍光基質A中、室温で30分間インキュベーションした。プレートをSpectraMax GeminiEMプレートリーダーを用いて読み取り、データをSoftMax Proソフトウェアを用いて解析した。6ウェルプレートに行う実験については、細胞を $0.625 \times 10^6$ 細胞/ウェルで撒き、2.1μgのcDNA/ウェルを用いて同じ方法でトランスフェクトした。各6ウェルプレートの細胞を溶解バッファ-1.25mL中で溶解した。

#### 【0216】

上記の A I C D E L I S A アッセイを用いて、細胞リゼートを解析し、トランスフェクトされた細胞におけるこれらの J M D キメラがガンマセクレターゼ開裂産物に対して有する基底レベル効果を測定した。Figure 17 参照。Figure 17 に示したデータを C 9 9 G V P - G V P 構築物での生成物量に対して標準化した（数値はすべて C 9 9 G V P - G V P 開裂産物の百分率として示している）。

#### 【0217】

選択的ガンマセクレターゼ阻害剤に対する C 9 9 G V P - J M D キメラ基質の効果

さらに、アッセイを上記の種々のキメラ C 9 9 G V P - J M D 構築物（異なる基質に由来する J M D ドメインを有する）を用いて行い、ある特定のスルホンアミドベースの選択的ガンマセクレターゼ阻害剤化合物が基質 J M D の同一性に基づくかを調べた。非選択的ジベンゾカプロラクタムコントロール化合物、E L N - 4 4 9 8 9 および 2 つの選択的なスルホンアミド阻害剤化合物 E L N - 4 7 5 5 1 6 および E L N - 4 8 1 0 9 0 を用いて、種々の J M D 構築物がガンマセクレターゼ基質選択性に対して有する効果を調べた。各化合物についての結果を Figure 18 にまとめる。結果は、E C<sub>50</sub> 値が、C 9 9 - A P P - G V P 構築物での E C<sub>50</sub> 値の「～倍」で示す。非選択的化合物 E L N - 4 4 9 8 9 は、基質における変化がガンマセクレターゼに対する化合物の阻害効力に対して殆ど影響がないことを示している。しかしながら、選択的スルホンアミド化合物 E L N - 4 7 5 5 1 6 および E L N - 4 8 1 0 9 0 についての結果は、異なる J M D C 9 9 - G V P 基質構築物が、ガンマセクレターゼに対するそれら化合物の E C<sub>50</sub> 値に対して有意の影響を有することを示しており、チロシナーゼ J M D 構築物が最も影響が大きい。従って、スルホンアミド化合物 E L N - 4 7 5 5 1 6 および E L N - 4 8 1 0 9 0 は、異なる基質 J M D 構築物の間で基質特異性を示し、チロシナーゼ J M D 構築物について E D<sub>50</sub> 選択性の最も大きな増大が観察された。

#### 【0218】

実施例 5：ガンマ開裂および A 産生における G S N K モチーフの役割

一つには膜内の開裂部位に物理的に近いことから、我々は T M D の直ぐ前のある特定の残基を評価した。C 9 9 G V P ならびに完全長の A P P において、T M D の N 末端側の 4 つのアミノ酸は、グリシン - セリン - アスパラギン - リジン（G S N K）である。A 産生における J M D のこの 4 つのアミノ酸領域の役割を、新しいキメラの組（即ち、それぞれ C99GVP-APLP2-gsnk, C99GVP-Notch1-gsnk および C99GVP-SREBP1-gsnk と称する、あるいはアスタリスクで示される（例えば C99GVP-Notch1\*））においてこの 4 ペプチドモチーフを保持することによって調べた（例えば、Figure 8 A 上段参照）。これら新しいキメラの発現プロファイルは、C 9 9 G V P コントロールと同等であった（Figure 8 A、下段参照）。さらに、A I C D 産生（Figure 8 A、最下段）、ならびに A I C D - G V P 介在のレポータートランス活性化（Figure 8 B）について変化はほとんど観察されなかった。しかしながら、それらの「ネイティブ」J M D スワップ前分子（predecessor）に対する顕著な対比において、G S N K 含有 C 9 9 G V P - A P L P 2 \* および C 9 9 G V P - N o t c h 1 \* キメラは C 9 9 G V P コントロールと区別できない強い A 産生を示した（Figure 8 C および 8 D）。示したように、C 9 9 G V P - S R E B P 1 \* キメラはまた、正常な A 分泌を保っていた（Figure 8 C および 8 D）。これらの結果は、明らかにガンマ開裂および A 産生における G S N K モチーフの役割を示している。この発見をさらに確認するため、別の変異体 C 9 9 G V P - S L S S（G S N K モチーフが、A P L P 2 に由来する対応するセリン - ロイシン - セリン - セリン（S L S S）配列で置換された）を作製した（Figure 9 A、上段）。この変異体は、A の分泌における顕著な（約 97%）減少をもたらした（Figure 9 B および 9 C）が A I C D 産生（Figure 9 A、最下段）およびレポータートランス活性化（Figure 9 D）における変化はほとんどみられなかった。これらの知見は、元の膜近傍キメラから得られたデータからも示されるように、A P P 内腔膜近傍ドメインにおけるかすかな変更でも、ガンマ開裂における大きな変化につながることを示している。

#### 【0219】

実施例 6 : ガンマ開裂および A $\beta$  産生に対する G S N K モチーフ内残基の突然変異の影響  
 さらに、G S N K モチーフ内の個々のアミノ酸の寄与を、4つのアミノ酸残基のそれぞれを対応する A P L P 2 の残基で変異を導入することにより調べた (Figure 9 A、上段)。点変異、即ち C99GVP-G25S, S26L, N27S および K28S は、H E K 細胞において同等に発現する (Figure 9 A 下段)。また、それらのそれぞれの A I C D 産生 (Figure 9 A 下段) およびシグナル伝達活性 (Figure 9 D) における変化はほとんどみとめられず、ここでも同等の  $\gamma$ -開裂を示した。しかしながら、分泌された A $\beta$  における実質的な減少は、C99GVP-S26L および C99GVP-K28S 変異体の両方について観察された。S 2 6 L 変異は、総 A $\beta$  で  $65.7 \pm 8.5\%$  の減少および A $\beta$  4 0 で  $52.7 \pm 2.3\%$  の減少をもたらした (Figure 9 B および Figure 9 C) が、K 2 8 S の置換は、いずれの測定においても、さらにより大きな実質的な減少 (約 90%) をもたらした (Figure 9 B および Figure 9 C)。対照的に他の 2 つの変異体、G 2 5 S および N 2 7 S には、分泌 A $\beta$  に対する明かな影響は認められなかった (Figure 9 B および Figure 9 C)。その上、これらのデータは L y s - 2 8 および S e r - 2 6 が、A P P 内腔膜近傍ドメインにおける 2 つの好ましい残基であり、 $\gamma$ -開裂を選択的に阻害し、 $\alpha$ -開裂を阻害しない置換であることを示している。

#### 【0220】

さらに別の実験において、H E K - 2 9 3 細胞への一時的トランスフェクション (Figure 1 9 参照) して、A P P の G S N K モチーフ (上記) に導入した同じ 4 つの「A P L P 2」変異は、スルホンアミドガンマセクレターゼ阻害剤化合物の効力に対する効果を示した。非選択的コントロール化合物、E L N - 44989 および 2 つの選択的阻害剤化合物、E L N - 475516 および E L N - 481090 を用いて、阻害剤化合物の基質特異性に対する各点変異の効果を調べた。典型的な細胞ベースのガンマセクレターゼアッセイ反応条件を用いて (例えば、本明細書に記載したような)、A P P の J M D への A P L P 2 由来の S L S S モチーフの置換の導入は、選択的な化合物の阻害効力に対する大きな効果を、A P L P 2 単独の J M D で観察されるよりももたらした。非選択的化合物 44989 の効力は、A P P の J M D への S L S S の置換によつては影響を受けなかった ( $< 2 \times$ )。上記した先の観察結果と一致して、2 つのそれぞれの点変異構築物は、選択的阻害剤の効力を、A P L P 2 J M D で観察される程度まで低減した (即ち、A P P - A P L P 2 J M D 構築物全体として小さい効果)。S 2 6 L および K 2 8 S 変異体は、C 9 9 - G V P - A P P と比較して E C<sub>50</sub> 値を、4 つのアミノ酸配列を置換した構築物 (A P P の G S N K 配列について A P L P 2 由来の S L S S) での約半分程度を増大した (Figure 1 9)。

#### 【0221】

実施例 7 : イブシロンに対するガンマでの開裂の選択性

「非選択的」ガンマセクレターゼ阻害剤による Fas-APPsw-DD 細胞 (Fas-APPsw-DD はスウェーデン F A D 由来の A P P の C 末端の 1 2 5 アミノ酸と F A S 由来の 2 0 2 - 3 1 9 の死ドメイン残基に融合した F a s 細胞外ドメインを発現するキメラタンパク質である; Genbank M67454) の処理は、A $\beta$  および A I C D 産生両方の同時の阻害をもたらした (Figure 5 および Figure 6 および Table 1 I に示したデータ; いくつかのデータは表示せず)。この場合の「非選択的」なる語は、N o t c h シグナル伝達に対して細胞 A $\beta$  (または GammaNotch に対して GammaAPP) についての選択性の欠如を意味する。既に公開された、非選択的なガンマセクレターゼ阻害剤および Elan スルホンアミドガンマセクレターゼ阻害剤のいくつか細胞の A $\beta$  および A I C D 阻害曲線を Figure 1 1 および Figure 1 2 にそれぞれ示す。Figure 1 1 は、DAPT, 44989, 46719 および Merck 阻害剤化合物 L-685,458 についての A $\beta$  および A I C D I C<sub>50</sub> を示し、式  $\gamma$  / 選択性 = I C<sub>50</sub> A I C D / I C<sub>50</sub> A $\beta$  を用いて計算した  $\gamma$  / 選択性の解析を示す。A $\beta$  産生は、Fas-APPsw-DD トランスフェクトされた 2 9 3 細胞において阻害され、効力は一般に過去のデータとよく一致していた。特に、A $\beta$  産生 I C<sub>50</sub> は、これらの実験 (Figure 1 1 ~ 1 2) では、過去のデータと比較して 0.83 倍 ~ 4.9 倍、平均して 3.0 倍高かった (過去のデータに対して I C<sub>50</sub> が 100 倍低かった 44989 を除く)。この実験系の強みは、この分析の 2 つの「評価項目」(  $\gamma$ -開裂 および  $\alpha$ -開裂についての I C<sub>50</sub> 値) は 1 つの細胞 (および基質) から得られ

10

20

30

40

50

るため、化合物の絶対的な効力と絶対的な濃度は重要でないということである。計算された非選択的化合物の / 選択性 (Figure 11 および Table I) は、DAPT, 44989, 46719 および Merck 化合物についてそれぞれ、0.7、1.1、1.8 および 1.9 である。これらの値は、実際には正常値から意味がある差異があってはならない。特定のスルホンアミドについて、計算された / 選択性は 2.2~5.8 の範囲 (Figure 14) であったが、これらの化合物について細胞の選択性 ( $EC_{50}$  NotchSig /  $EC_{50}$  A ) はおよそ 15~65 の範囲であった (Figure 14)。5 つのスルホンアミドのうちの 4 つが 2.2~2.7 の A P P / 選択性を示したが、ELN-343673 の / 選択性は 5.8 である。これらのスルホンアミドは平均して ELN-46719 および他の非選択的阻害剤よりも 1.5~3.8 倍高い選択性を示している。即ち、このデータはこれらのスルホンアミドが、( 開裂に対して ) A P P 開裂についてそれほど選択的ではないようであることを示している。

10

#### 【0222】

実施例 8 : A P P および 開裂に対する阻害剤の効果の同時測定

上記の基質およびアッセイを用いて、ガンマセクレターゼ基質の異なる開裂部位 (例えば、A P P および 開裂) に対する同時のガンマセクレターゼ阻害効果を測定した。このようなアッセイは通常 2 つのパートからなる: 1) 同じ培養細胞から同時に産生される および 開裂産物の測定に適当な本発明の基質 (例えば、A および A I C D) を発現する培養細胞の阻害剤処理; および 2) 両方の開裂産物のレベルを定量的に測定する方法。本発明のガンマセクレターゼ基質は、基質の開裂の異なる部位から生じた 2 つの検出可能なガンマセクレターゼ開裂産物を生じることが可能である (「A 様」ペプチドおよび I C D ペプチド)。I C D の検出に、上記のサンドウィッチ E L I S A を用いる。常套的な E L I S A を用いて馴化培地中の A を定量する。この方法の有用性は、選択性の値が、ある 1 つの実験から得られた 2 つの値の比から得られるということである (例えば、2 つのアッセイについて同時の細胞および化合物処理)。結果として、選択性の値は、化合物希釈の実験間の変動および誤差には感受性がより低くなると予想される。

20

#### 【0223】

A P P / を用いるアッセイ法

細胞: H E K 293 細胞を約 90 % コンフルエントまで標準状態で培養した。細胞を回収し、細胞数を計数した後、P D L - コートした 60 mm ディッシュに、培地 5 mL 中  $2 \times 10^6$  細胞 / ディッシュで播種し、ディッシュを約 4 時間放置した。上記に記載のとおり Lipofect amine 2000<sup>TM</sup> (LF2K) (Invitrogen) で標準的な方法を用いて細胞をトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を処理し、阻害剤化合物を加え、E L I S A アッセイのために上記のとおり細胞をすべて回収した。

30

#### 【0224】

上記の開示は本発明の特定の具体的態様を強調するものであって、添付の請求の範囲に記載したとおり、それと等価な修飾または変更のすべてが本発明の精神および範囲内にあることを理解すべきものである。

#### 【0225】



【表 1】

Table 1: JMDキメラ構築物において用いられるプライマー配列

プライマーID	プライマー配列	配列番号
C99-GVP-F1	cggctcgggc gctggaggat gcagaattcc gacatgactc aggatatgaa gttcatcatc	52
C99-GVP-F2	tggcactgct cctgctggcc gcctggacgg ctcgggcgct ggaggatgca g	53
C99-GVP-F3	caccaccatg ctgcccgggt tggcactgct cctgctggcc gcctggac	54
APP-GVP-R	gcggccgcct agttctgcat ctgctcaaag aac	55
APLP-F	ccgtgggccc actgcgggag gacttcagtc tgagtagcgg tgcaatcatt ggactcatgg	56
APLP-R	tcccgcagtg ggcccacgga ttcccgtctt	57

【表 2】

プライマーID	プライマー配列	配列番号
Notch-F	tccctcgagtc ctgagtcacg tcggaattc	58
	tgcagagtga gaccgtggag ccgccccgc	
Notch-R	cgccgcaggg tgcaatcatt ggactcatgg	59
	tccacgggtct cactctgcac ggctcgcac	
SREBP-F	ttgtagggtc ctgagtcacg tcggaattc	60
	cgtctctgca cagccggggc atgctggacc	
SREBP-R	gctcccgcgg tgcaatcatt ggactcatgg	61
	ccccggctgt gcagagacgg ccgctgctct	
p75NTR_R	ggctttgctc ctgagtcacg tcggaattc	62
	cgggtcacca cgggctggga gctgcccac	
p75NTR_F	actgtgggtca ctctcgagtc atgtcggaat tct	63
	gcagctccca gcccggtgtg acccgaggca	
nCad_R	ccaccgacaa cgggtgcaatc attggactca tggt	64
	cagtccccgt tggagtcaca ctggcaaacc ttcacgcgca	
nCad_F	gtcctgagtc atgtcggaat tctgc	65
	ttgccagtgt gactccaacg gggactgcac	
erbB4_R	agatgtggac aggggtgcaa tcattggact catggt	66
	taaagtggaa tggcccgctc atgggtagta aatgcagtca	
erbB4_F	tgtcctgagt catgtcggaat ttctgc	67
	taccatgga cggggccattc cactttacca	
Tyr_R	caacatgcta gaggtgcaat cattggactc atggt	68
	gttccaaata ggacttaatg tagtcttgaa	
Tyr_F	aagagtctgg gtctgatcct gagtcatgtc	69
	ggaattctgc	
SCN2B_R	cttttcaaga ctacattaag tcctatttgg	70
	aacaagcgag tcgggggtgca atcattggac tcatggt	
SCN2B_F	agggggctct tccatgagga cctgcagatg	71
	gatcttgcca tgtcctgagt catgtcggaat ttctgc	
RHD/AAA-F	ctgcagggtc tcatggaaga gccccctgag	72
	cgggactcca cgggtgcaat cattggactc atggt	
RHD/AAA-R	cgggcgctgg aggatgcaga attcgcagct	73
	gcctcaggat atgaagttca tcac	
HHQK/AAQA-F	gatgatgaac ttcatatcct gaggcagctg	74
	cgaattctgc atcctccagc gcccg	
HHQK/AAQA-R	gttgctgctc aagcattggt gttctttgca	75
	gaagatgtgg gtcc	
	gaacaccaat gcttgagcag caacttcata	
	tcctgagtc tgctcggaatt ctgcatcc	

10

20

30

40

【表 3】

プライマー-ID	プライマー配列	配列番号
ED/AA-F	ggtgttcttt gcagcagctg tgggttcaaa caaaggtgc	76
ED/AA-R	gcacctttgt ttgaaccac agctgctgca aagaacacc	77
APLP (GSNK)-F	cogtgggccc actgcgggag gacttcggtt caaacaaagg tgcaatcatt ggactcatg	78
Notch (GSNK)-F	tgcagagtga gaccgtggag ccgcccgggtt caaacaaagg tgcaatcatt ggactcatgg	79
SREBP (GSNK)-F	cgtctctgca cagccggggc atgctgggtt caaacaaagg tgcaatcatt ggactcatgg	80
C99-SLSS-F	agaagatgtg agtctgagta gcggtgcaat cattggactc atggtgggc	81
C99-SLSS-R	tgcaccgcta ctcagactca catcttctgc aaagaacacc aatttttgat gatgaac	82
C99-G/S-F	ggtgttcttt gcagaagatg tgagttcaaa caaaggtgca atcattgg	83
C99-G/S-R	ccaatgattg cacctttggt tgaactcaca tcttctgcaa agaacacc	84
C99-S/L-F	ggtgttcttt gcagaagatg tgggtttaa caaaggtgca atcattggac	85
C99-S/L-R	gtccaatgat tgcaccttg tttaaacc ca catcttctgc aaagaacacc	86
C99-N/S-F	ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaag caaaggtgca atcattggac tc	87
C99-N/S-R	gagtccaatg attgcacctt tgcttgaacc cacatcttct gcaaagaaca cc	88
C99-K/S-F	ggtgttcttt gcagaagatg tgggttcaaa ctcaggtgca atcattggac tcatgg	89
C99-K/S-R	ccatgagtcc aatgattgca cctgagtttg aaccacatc ttctgcaaag aacacc	90

10

20

30

40

【表 4】

Table II: アミノ酸配列

配列番号	配列	表示
1	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKG IIGLMVGGVV IATVIVITLV MLKKKQYTSI HHGVVEVDAA VTPEERHLSK MQQNGYENPT YKFFEOMQN	APP-C99
2	KLLSSIEQAC DICRLKKLKC SKEKPKCAKC LKNNWECRYSPKTKRSPLTR AHLTEVESRL ERLEQLFLLI FPREDLDMIL KMDSLQDIKA LLTGFLFVQDN VNKDAVTDRL ASVETDMPLT LRQHRISATS SSEESSNKGQ RQLTVSGIPG DLAPPTDVSL GDELHLDGED VAMAHADALD DFDLMLGDG DSPGPGFTPH DSAPYGALDM ADFEFEQMFT DALGIDEYGG	GVP
3	YEVHHQKLVF FAEDV	JMDΔ4-APP
4	LEEERESVGP LREDF	JMDΔ4-APLP2
5	PYKIEAVQSE TVEPP	JMDΔ4-Notch
6	AKPEQRPSLH SRGML	JMDΔ4-SREBP
7	HDCIYYPWTG HSTLP	JMDΔ4-erbB4
8	SDPDSFQDYI KSYLE	JMDΔ4-チロシナーゼ
9	VTTVMGSSPV VTRG	JMDΔ4-p75 NTFR
10	HGKIHLQVLM EEPPE	JMDΔ4-SCNB2
11	LRVKVCQCDs NGDCT	JMDΔ4-n-カドヘリン
12	QEGGANTTSG PIRTP	JMDΔ4-CD44
13	GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML	TMD:APP
14	DAEFRHDSG	A-beta
15	LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVGSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML	JMD+TMD: C99-APP
16	LE DAEFRHDSG LEEERESVGPLREDFSLSS GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML	JMD+TMD: C99-APLP2
17	LE DAEFRHDSG PYKIEAVQSETVEPPPPAQ GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML	JMD+TMD: C99-Notch
18	LE DAEFRHDSG AKPEQRPSLHSRGMLDRSR GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML	JMD+TMD: C99-SREBP
19	LE DAEFRHDSG LEEERESVGPLREDFGSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML	JMD+TMD: C99-APLP2- GSNK

10

20

30

40

【表 5】

配列番号	配列	表示
20	LE DAEFRHDSG PYKIEAVQSETVEPPGSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML	JMD+TMD: C99-Notch- GSNK
21	LE DAEFRHDSG AKPEQRPSLH SRGMLGSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML	JMD+TMD: C99-SREBP- GSNK
22	GYEVHHQKLV FFAEDGSNK	JMD: APP
23	LEEEERESVGP LREDFSLSS	JMD: APLP2
24	PYKIEAVQSE TVEPPPPAQ	JMD: Notch
25	AKPEQRPSLH SRGMLDRSR	JMD: SREBP
26	VTTVMGSSPV VTRGTTDN	JMD: p75 NTFR
27	LRVKVCQCDs NGDC TDVDR	JMD: n-カドヘリン
28	HGKIHLQVLM EEPERDST	JMD: SCNB2
29	SDPDSFQDYI KSYLEQASR	JMD: チロシナーゼ
30	QEGGANTTSG PIRTPQIPE	JMD: CD44
31	LEEEERESVGP LREDFGSNK	JMD: C99-APLP2-GSNK
32	PYKIEAVQSE TVEPPGSNK	JMD: C99-Notch-GSNK
33	AKPEQRPSLH SRGMLGSNK	JMD: C99-SREBP-GSNK
34	GYEVHHQKLV FFAEDSLSS	JMD: C99-APP-SLSS (APLP2)
35	GYEVHHQKLV FFAEDDRSR	JMD: C99-APP-DRSR ( SREBP)
36	GYEVHHQKLV FFAEDPPAQ	JMD: C99-APP-PPAQ ( Notch)
37	LEDAEFRHDS G	A-beta + LE
38	VHHQKL VFFA EDVGSNKGAI IGLMVGGVVI ATVIVITLVM LKKKQYTSIH HGVVEVDAV TPEERHLSKM QQNGYENPTY KFFEQMQN	APP-C-末端部分
39	VMLKKKC	A b 産生のための免疫原 ペプチド(ポリクローナル ならびにmAb 22B11)
40	GYENPTYKFF EQM	
41	VMLKKKQYTS IHGVEVDA AVTPEERHLS KMQQNGYENP TYKFFEQMQN	AICD(1-50)
42	LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVSLSS GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML	LE+JMD+TMD: C99-APP Δ4-APLP2

10

20

30

40

【表 6】

配列番号	配列	表示
43	LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVSSNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML	LE+JMD+TMD: C99-APP (G25S)
44	LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVGLNK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML	LE+JMD+TMD: C99-APP (S26L)
45	LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVGSSK GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML	LE+JMD+TMD: C99-APP (N27S)
46	LEDAEFRHDS GYEVHHQKLV FFAEDVGSNS GAIIGLMVGG VVIATVIVIT LVML	LE+JMD+TMD: C99-APP (K28S)
47	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV IATVIVITLV MLKKKKLLSS IEQACDICRL KKLKCSKEKP KCAKCLKNNW ECRYSPKTKR SPLTRAHLTE VESRLERLEQ LFLLLIFPRED LDMILKMDSL QDIKALLTGL FVQDNVNKDA VTDRLASVET DMPLTLRQHR ISATSSSEES SNKGQRQLTV SGIPGDLAPP TDVSLGDELH LDGEDVAMAH ADALDDFDLD MLGDGDSPPG GFTPHDSAPY GALDMADFEF EQMFTDALGI DEYGGQYTSI HHGVVEVDAA VTPEERHLSK MQQNGYENPT YKFFEQMQN	C99-GVP (APP)
48	DAEFRHDSGL EEERESVGPL REDFSLSSGA IIGLMVGGVV IATVIVITLV MLKKKKLLSS IEQACDICRL KKLKCSKEKP KCAKCLKNNW ECRYSPKTKR SPLTRAHLTE VESRLERLEQ LFLLLIFPRED LDMILKMDSL QDIKALLTGL FVQDNVNKDA VTDRLASVET DMPLTLRQHR ISATSSSEES SNKGQRQLTV SGIPGDLAPP TDVSLGDELH LDGEDVAMAH ADALDDFDLD MLGDGDSPPG GFTPHDSAPY GALDMADFEF EQMFTDALGI DEYGGQYTSI HHGVVEVDAA VTPEERHLSK MQQNGYENPT YKFFEQMQN	C99-GVP (APLP2)

10

20

30

40

【表 7】

配列番号	配列	表示
49	DAEFRHDSGP YKIEAVQSET VEPPPPAQGA IIGLMVGGVV IATVIVITLV MLKKKKLLSS IEQACDICRL KKLKCSKEKP KCAKCLKNNW ECRYSPKTKR SPLTRAHLTE VESRLERLEQ LFLLIFPRED LDMILKMDSL QDIKALLTGL FVQDNVNKDA VTDRLASVET DMPLTLRQHR ISATSSSEES SNKGQRQLTV SGIPGDLAPP TDVSLGDELH LDGEDVAMAH ADALDDFDLD MLGDGDSPPG GFTPHDSAPY GALDMADFEF EQMFTDALG IDEYGGQYTSI HHGVVEVDAA VTPEERHLSK MQQNGYENPT YKFFEQMQN	C99-GVP (Notch)
50	DAEFRHDSGP YKIEAVQSET VEPPGSNKG IIGLMVGGVV IATVIVITLV MLKKKKLLSS IEQACDICRL KKLKCSKEKP KCAKCLKNNW ECRYSPKTKR SPLTRAHLTE VESRLERLEQ LFLLIFPRED LDMILKMDSL QDIKALLTGL FVQDNVNKDA VTDRLASVET DMPLTLRQHR ISATSSSEES SNKGQRQLTV SGIPGDLAPP TDVSLGDELH LDGEDVAMAH ADALDDFDLD MLGDGDSPPG GFTPHDSAPY GALDMADFEF EQMFTDALGI DEYGGQYTSI HHGVVEVDAA VTPEERHLSK MQQNGYENPT YKFFEQMQN	C99-GVP (Notch-GSNK)
51	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVSLSSGA IIGLMVGGVV IATVIVITLV MLKKKKLLSS IEQACDICRL KKLKCSKEKP KCAKCLKNNW ECRYSPKTKR SPLTRAHLTE VESRLERLEQ LFLLIFPRED LDMILKMDSL QDIKALLTGL FVQDNVNKDA VTDRLASVET DMPLTLRQHR ISATSSSEES SNKGQRQLTV SGIPGDLAPP TDVSLGDELH LDGEDVAMAH ADALDDFDLD MLGDGDSPPG GFTPHDSAPY GALDMADFEF EQMFTDALGI DEYGGQYTSI HHGVVEVDAA VTPEERHLSK MQQNGYENPT YKFFEQMQN	C99-GVP (APP4-SLSS)
52-90	Table I プライマー	ヌクレオチドプライマー
91	TVIVITLVML KKKQTYTS (スパンニングペプチド)	スパンニングペプチド
92	ADRLTTRPG SGLTNIKTEE ISEVKMDAEF RHDSGYEVHH QKLVFFAEDV GSNKGAIIGL MVGGVVIATV IVITLVMLKK KQYTSIHHGV VEVDAAVTPE ERHLSKMQQN GYENPTYKFF EQMQN	APP-C-末端 125 フラグメント

10

20

30

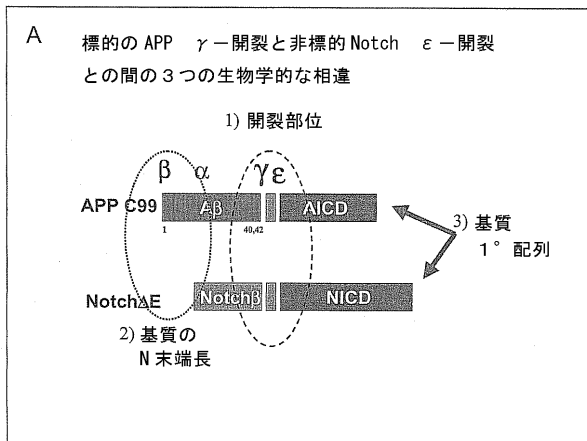
40

【表 8】

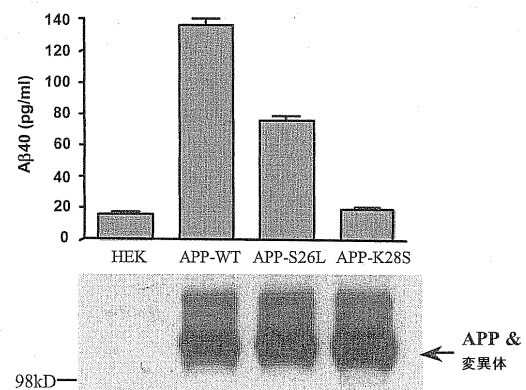
配列番号	配列	表示
93	CGYENP TYKFF EQM	
94	QHAR	X1-X4 (erbB4)
95	QASR	X1-X4 (チロシナーゼ)
96	TTDN	X1-X4 (p75 NTFR)
97	RDST	X1-X4 (SCNB2)
98	DVDR	X1-X4 (n-カドヘリン)
99	QIPE	X1-X4 (CD44)
100	PPAQ	X1-X4 (Notch)
101	DRSR	X1-X4 (SREBP)
102	SLSS	X1-X4 (APLP2)
103	GSNK	X1-X4 (APP)

10

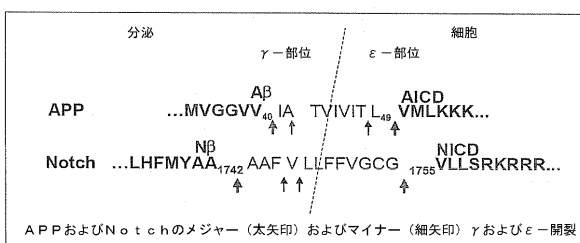
【図 1 - 1】

Figure 1A: APPおよびNotchでの $\gamma$ および $\epsilon$ 開裂の模式図

【図 2】

Figure 2:  $\gamma$ -セクレターゼによるA $\beta$ 40に対する点変異の効果

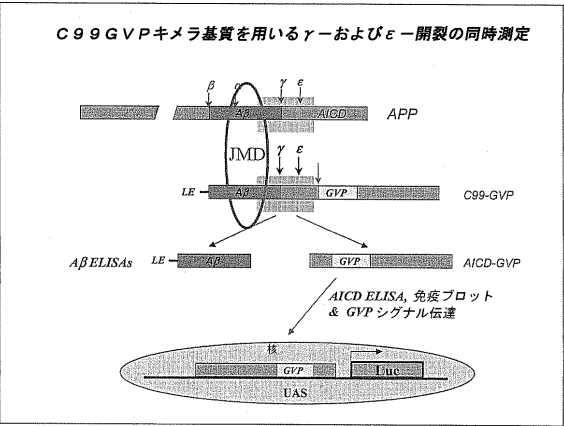
【図 1 - 2】

Figure 1B: APPおよびNotchでの $\gamma$ および $\epsilon$ 開裂の模式図



【 図 3 】

Figure 3: AβおよびAICD ELISAおよびAICDシフェラーゼアッセイの模式図



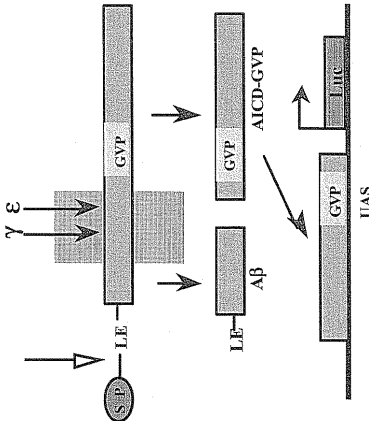
【 図 4 】

Figure 4: 種々のJMDスワップドメインおよび点変異のキメラ配列

表示	配列	配列番号
(C99GVP) :	GYEVHOKLVFFAEDGSNK	22
(C99GVP-APLP2) :	LEERESVGPIRHDPSLSS	23
(C99GVP-NOTCH1) :	PKLEAVQSEIVPPPPAQ	24
(C99GVP-SREBP1) :	AKPEQPSLHSGMLDRSR	25
(C99GVP-p7SNTFR) :	VTVMGSSPVVIRGTIDN-	26
(C99GVP-nCadherin) :	LKRVQCDSNGDCTDVR	27
(C99GVP-erbB4) :	HGKHLQVLMEEPFRDST	28
(C99GVP-tyrosinase) :	SDPDSFDYLYKYLEQASR	29
(C99GVP-CD44) :	QEGGANTSGPIPTQIPE	30
(C99GVP-APLP2-gsnk) :	LEERESVGPIRHDPSLSS	31
(C99GVP-NOTCH1-gsnk) :	PKLEAVQSEIVPPPPAQ	32
(C99GVP-SREBP1-gsnk) :	AKPEQPSLHSGMLDRSR	33
(C99GVP-slss) :	GYEVHOKLVFFAEDGSNK	34
(C99GVP-drsr) :	GYEVHOKLVFFAEDDRSR	35
(C99GVP-ppaq) :	GYEVHOKLVFFAEDPPAQ	36

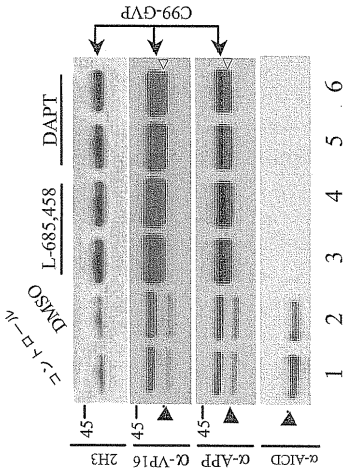
【 図 5 - 1 】

Figure 5A: JMD キメラ基質の開裂プロファイル



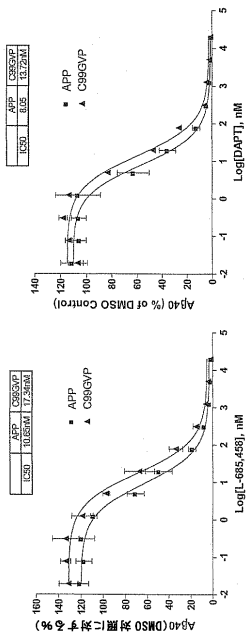
【 図 5 - 2 】

Figure 5B: JMD キメラ基質の開裂プロファイル



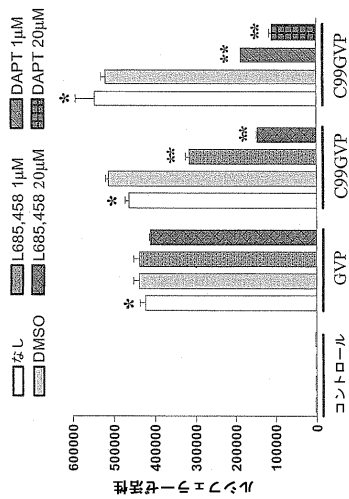
【 図 5 - 5 】

Figure 5E: JMD キメラ基質の開裂プロファイル



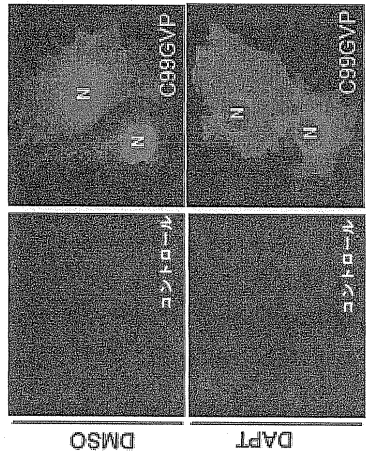
【 図 5 - 3 】

Figure 5C: JMD キメラ基質の開裂プロファイル



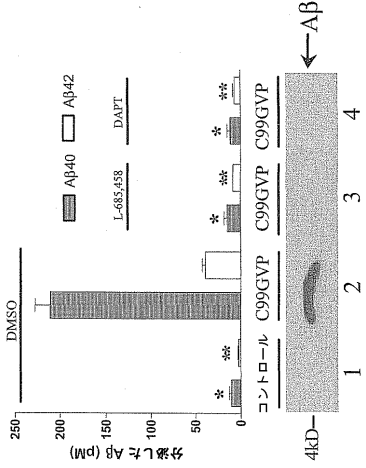
【 図 5 - 6 】

Figure 5F: JMD キメラ基質の開裂プロファイル



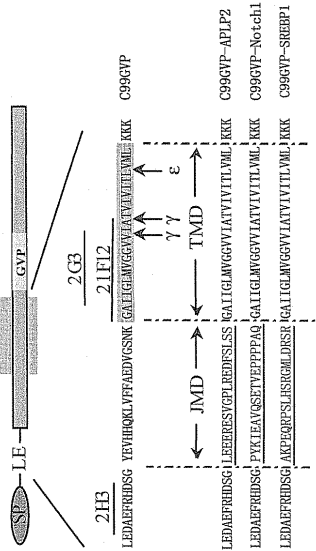
【 図 5 - 4 】

Figure 5D: JMD キメラ基質の開裂プロファイル



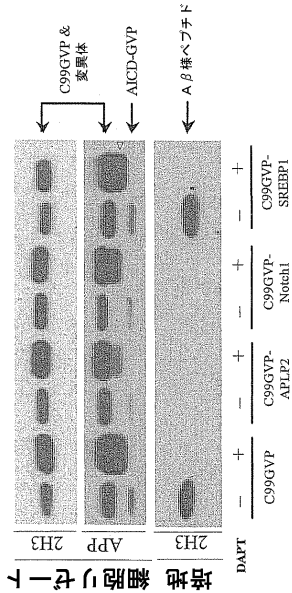
【 図 6 - 1 】

Figure 6A : C99GVPはγ-セクレターゼに対する基質である  
およびJMDキメラの効果



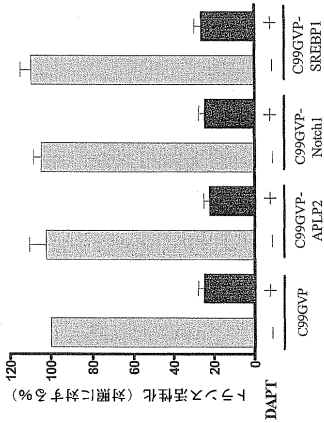
【 図 6 - 2 】

Figure 6B : C99GVPはγ-セクレターゼに対する基質である  
およびJMDキメラの効果



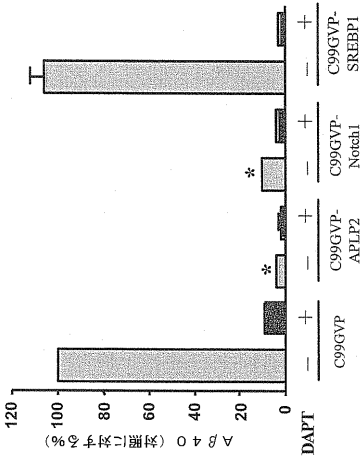
【 図 6 - 3 】

Figure 6C : C99GVPはγ-セクレターゼに対する基質である  
およびJMDキメラの効果



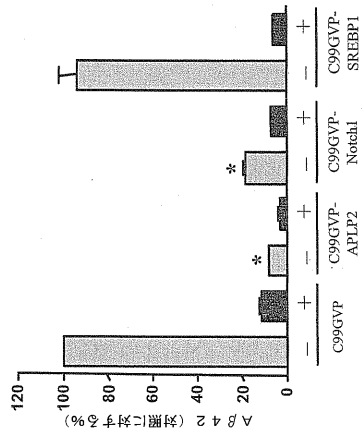
【 図 6 - 4 】

Figure 6D : C99GVPはγ-セクレターゼに対する基質である  
およびJMDキメラの効果



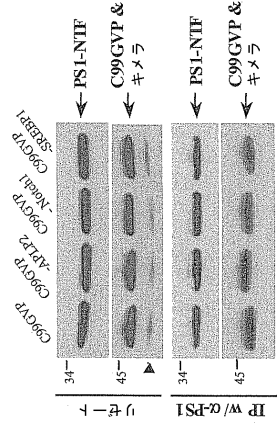
【 図 6 - 5 】

Figure 6E : C99GVPはγ-セクレターゼに対する基質である  
およびJMDキメラの効果



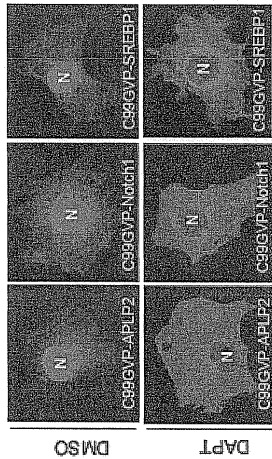
【 図 6 - 6 】

Figure 6F : C99GVPはγ-セクレターゼに対する基質である  
およびJMDキメラの効果



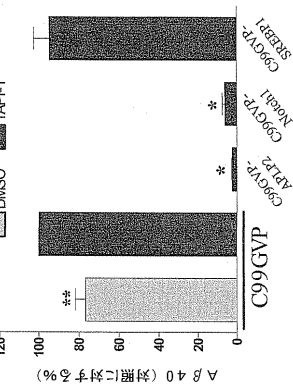
【 図 6 - 7 】

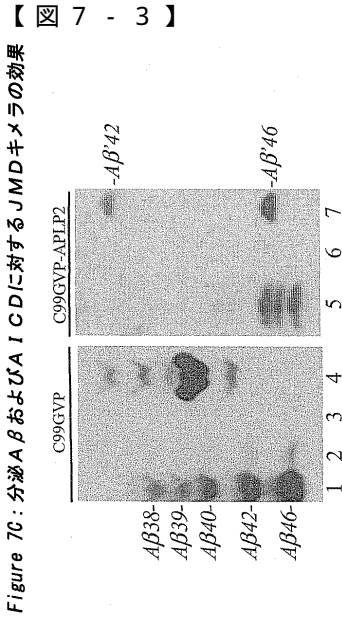
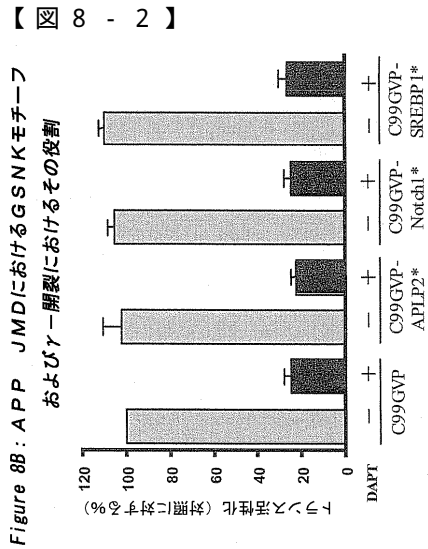
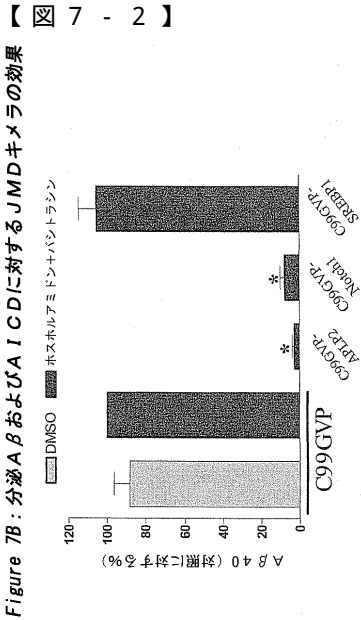
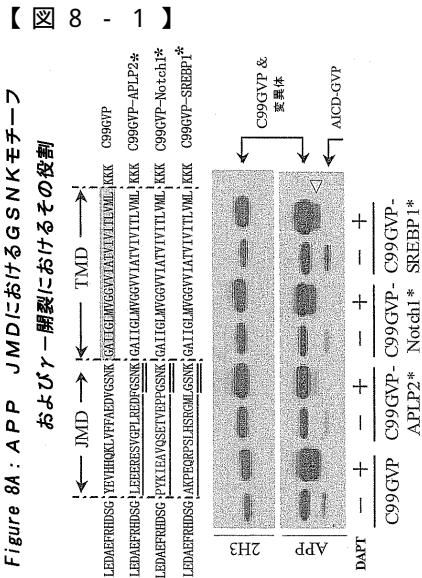
Figure 6G : C99GVPはγ-セクレターゼに対する基質である  
およびJMDキメラの効果



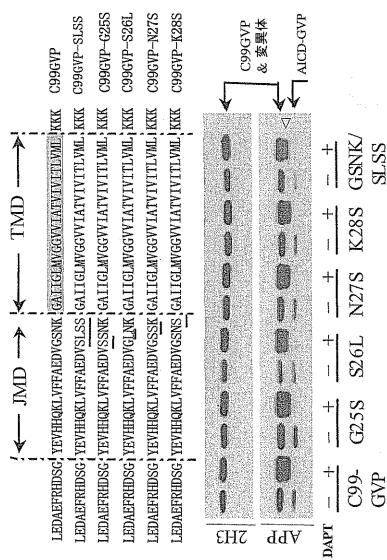
【 図 7 - 1 】

Figure 7A : 分泌AβおよびAICDに対するJMDキメラの効果

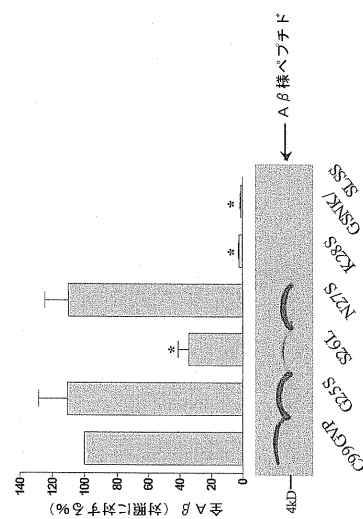




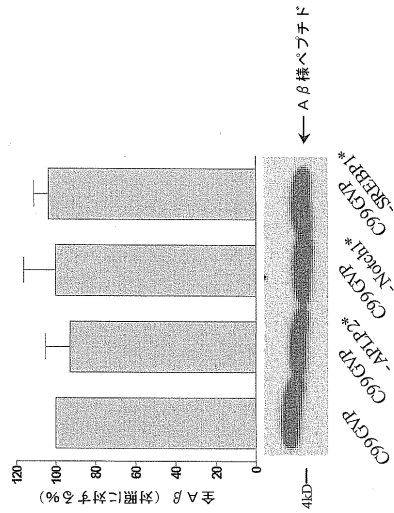
【図 9 - 1】  
Figure 9A: 効果的なγ-開裂に重要なJMD残基のマッピング



【図 9 - 2】  
Figure 9B: 効果的なγ-開裂に重要なJMD残基のマッピング



【図 8 - 3】  
Figure 8C: APP JMDにおけるGSNKモチーフおよびγ-開裂におけるその役割



【図 8 - 4】  
Figure 8D: APP JMDにおけるGSNKモチーフおよびγ-開裂におけるその役割

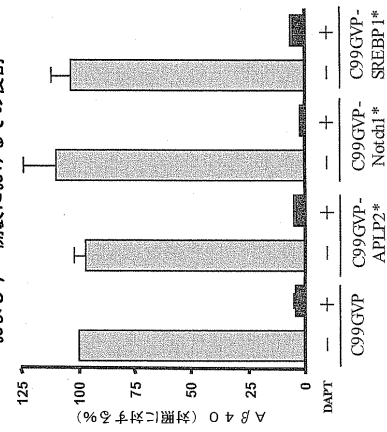


Figure 10: AICDサンドウィッチELISAの標準曲線および標準

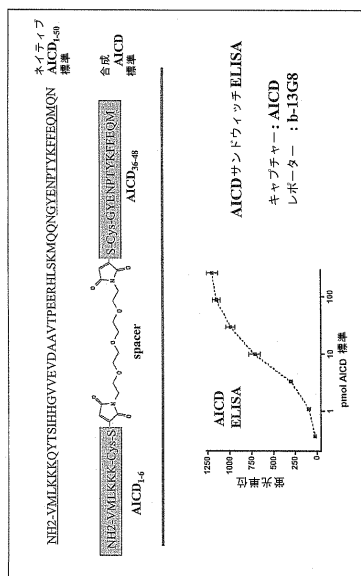


Figure 90: 効果的な $\gamma$ -開裂に重要なJMD残基のマッピング

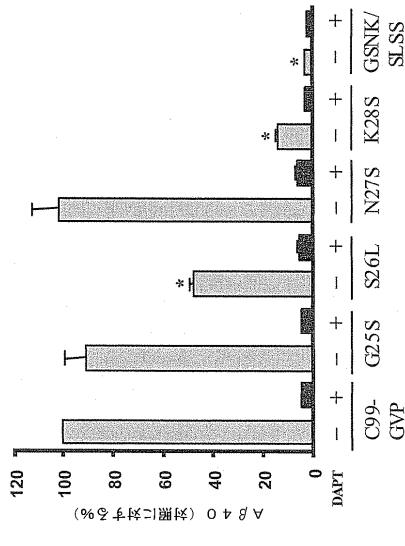


Figure 11A&B: 非特異的阻害剤による $\gamma$ -セクレターゼ

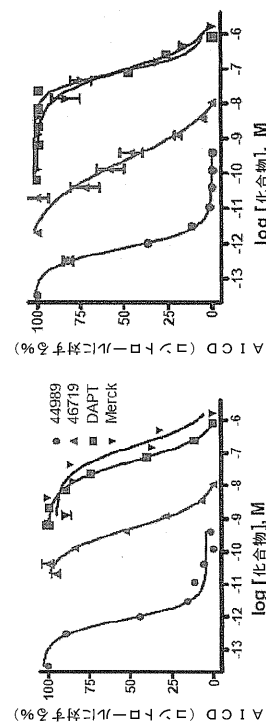


Figure 90: 効果的な $\gamma$ -開裂に重要なJMD残基のマッピング

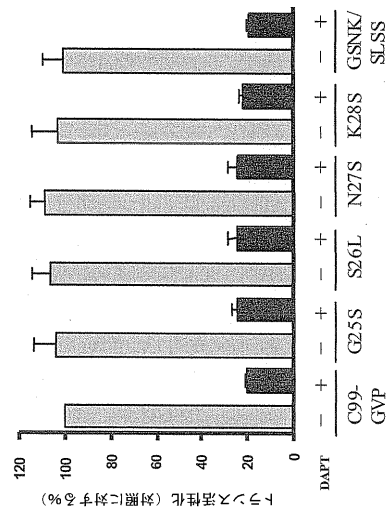


Figure 12: スルホンアミド阻害剤によるガンマセクレターゼ  
γ-およびε-部位開裂活性の阻害

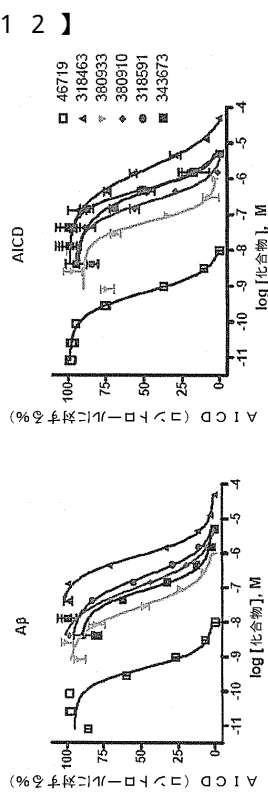


Figure 11C: 非特異的阻害剤によるγ-セクレターゼ  
γ-およびε-部位開裂活性の阻害

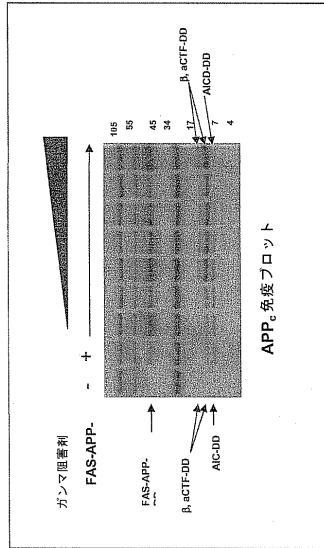


Figure 13A: 選択的阻害剤を用いるJMDキメラC99GVP基からのAICD産生の阻害

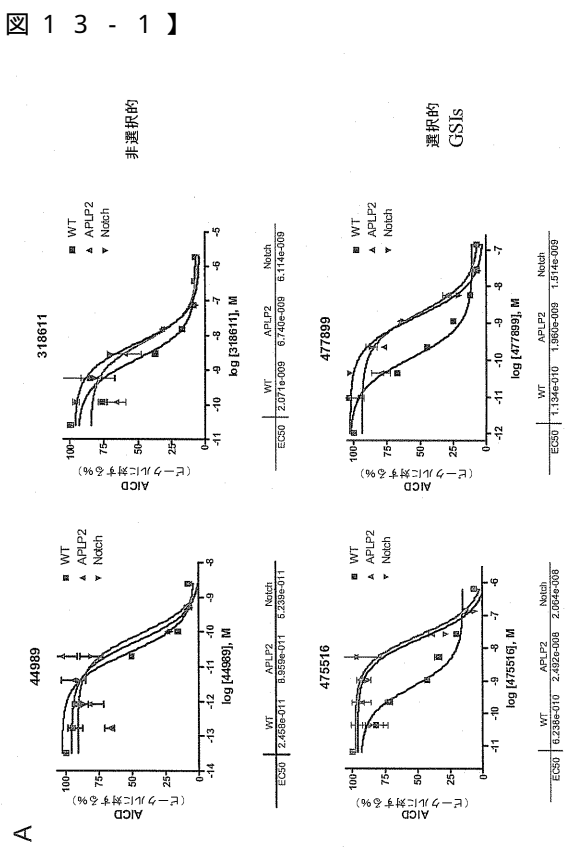
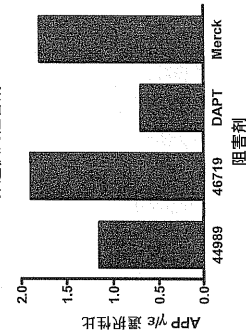


Figure 11D: 非特異的阻害剤によるγ-セクレターゼ  
γ-およびε-部位開裂活性の阻害  
非選択的阻害剤





【図 1 4 - 2】

Figure 14D : 選択的阻害剤を用いるJMDキメラC99GVVP基質からのAICD産生の阻害

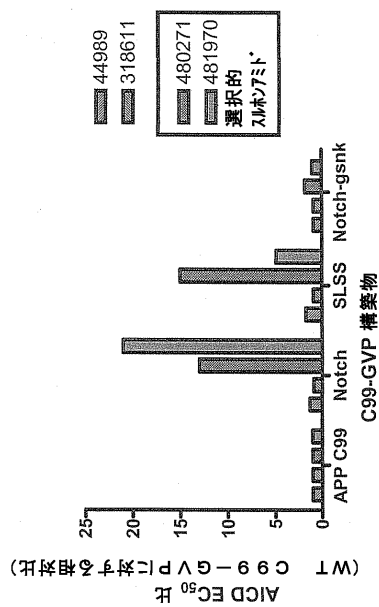
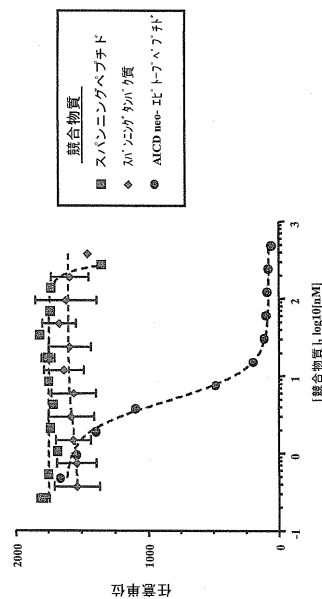


Figure 13B : 選択的阻害剤を用いるJMDキメラC99GVVP基質からのAICD産生の阻害

阻害剤	阻害効力に対する基質/JMDの効果 (およびAICDに対する1/選択性)			
	APP	Notch	APP	Notch
44989	0.04 nM	0.6 nM (15x)	0.025 nM	0.09 nM (4x)
318611	15 nM	223 nM (15x)	2.1 nM	6.7 nM (3x)
475516	10 nM	879 nM (88x)	0.62 nM	25.0 nM (40x)
477899	0.6 nM	55 nM (92x)	0.11 nM	2.0 nM (17x)

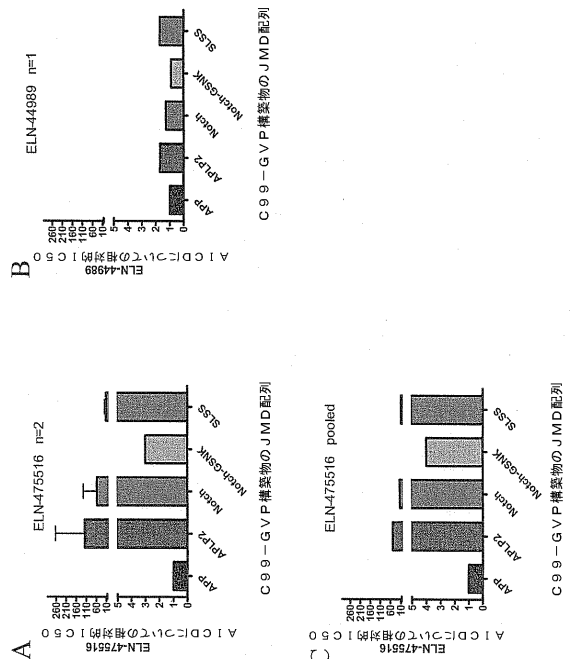
【図 1 5】

Figure 15: ELISAアッセイにおけるAICD neo-EiトープについてのMA b 22B11の選択性



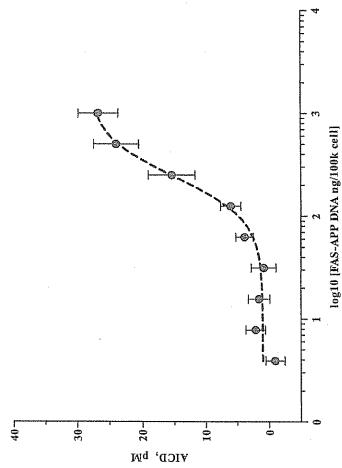
【図 1 4 - 1】

Figure 14 : 種々のJMDを有する種々のキメラC99GVVP基質からのAICDの阻害の相対的効力



## 【図 16】

Figure 16: MAb 22B11を用いるAICD ELISA曲線は、細胞リゼートにおいて15~20倍高いAICDの量を検出する



## 【配列表】

2010533478000001.xml

## 【手続補正書】

【提出日】平成22年3月8日(2010.3.8)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【配列表】

2010533478000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2008/070012

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/573 C12N9/64		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PETIT A ET AL: "NEW PROTEASE INHIBITORS PREVENT GAMMA-SECRETASE-MEDIATED PRODUCTION OF ABETA40/42 WITHOUT AFFECTING NOTCH CLEAVAGE" NATURE CELL BIOLOGY, MACMILLAN PUBLISHERS, GB, vol. 3, no. 5, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 507-511, XP001015215 ISSN: 1465-7392 page 508, right column, second full paragraph Methods	1-4, 7-13, 21-25, 27, 28, 31, 32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 September 2008		09/10/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Mauhin, Viviane

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2008/070012

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FRAERING PATRICK C ET AL: "gamma-Secretase substrate selectivity can be modulated directly via interaction with a nucleotide-binding site" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 280, no. 51, December 2005 (2005-12), pages 41987-41996, XP002496342 ISSN: 0021-9258 Last full paragraph of introductory part MATERIALS AND METHODS: Purification of gamma-Secretase and in Vitro gamma-Secretase Assays</p>	<p>1-4, 7-13, 21-25, 27,28, 31,32</p>
A	<p>WO 03/008635 A (BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA [DE]; DORNER-CIOSSEK CORNELIA [DE]; FUCHS) 30 January 2003 (2003-01-30)</p>	
A	<p>WO 2007/058987 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; BURTON CATHERINE [US]; ALBRIGHT CHARLES) 24 May 2007 (2007-05-24)</p>	
P,X	<p>REN ZHAO ET AL: "Amyloid beta-protein precursor juxtamembrane domain regulates specificity of gamma-secretase-dependent cleavages" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 282, no. 48, November 2007 (2007-11), pages 35350-35360, XP002496343 ISSN: 0021-9258 the whole document</p>	<p>1-32</p>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2008/070012

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03008635	A	30-01-2003	CA 2452832 A1 DE 10131899 A1 EP 1407043 A2 JP 2004535206 T MX PA03011898 A	30-01-2003 27-02-2003 14-04-2004 25-11-2004 26-03-2004
WO 2007058987	A	24-05-2007	EP 1952146 A1	06-08-2008

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(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, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, 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, IS, 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, 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

(74)代理人 100162684

弁理士 呉 英燦

(72)発明者 ポール・アイ・シャピロ

アメリカ合衆国 9 4 0 1 9 カリフォルニア州ハーフ・ムーン・ベイ、ミラダ・ロード 6 2 3 番

(72)発明者 グリクバル・エス・バシ

アメリカ合衆国 9 4 3 0 3 カリフォルニア州パロ・アルト、ローズ・アベニュー 5 1 4 番

(72)発明者 レン・ジャオ

アメリカ合衆国 9 4 0 1 9 カリフォルニア州サン・マテオ、アパートメント 1 1 1、ノース・エル・カミノ・レアル 5 2 5 番

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA20 FB01 FB03

4B024 AA11 BA80 CA05 DA03 EA04 GA11 HA11

4B063 QA18 QQ08 QQ36 QQ79 QR16 QR48 QR77 QS33 QX01