

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レヴィー小体病 (LBD) を処置するのに有用な薬理活性を有する薬剤をスクリーニングする方法であって、

該薬剤をリン酸化 シヌクレインまたはそのリン酸化断片と接触させる工程であって、該断片はインタクトな シヌクレインの少なくとも 100 個連続するアミノ酸の存在およびインタクトな シヌクレインの C 末端の 1 番目から 23 番目の連続するアミノ酸の欠損を特徴とする、工程、

該 シヌクレインまたは シヌクレイン断片の凝集の速度もしくは程度を測定する工程であって、該薬剤を用いない対照との比較による凝集の速度もしくは程度の減少によって該薬剤が薬理活性を有することが示される、工程を含む、方法。

10

【請求項 2】

前記薬剤は、インタクトな シヌクレイン、または配列番号 1 にしたがって番号付けされた SN1 - 133 もしくは SN1 - 135 と接触させる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

請求項 1 記載の方法であって、前記 シヌクレインの断片が 1 番目から X 番目であり、X は 130 番目 ~ 139 番目である、方法。

【請求項 4】

前記突然変異が A53T 突然変異である、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

請求項 1 の方法であって、さらに、LBD を有するヒトもしくは LBD の動物モデルにおいて試行を行って該薬剤が該 LBD の症状を治療もしくは阻止するかどうかを明らかにすることを含む、方法。

【請求項 6】

レヴィー小体病 (LBD) を処置するために有用な薬理的活性を有する薬剤をスクリーニングする方法であって、

該薬剤と シヌクレインの断片とを接触させる工程であって、該断片は配列番号 1 にしたがって番号付けされた残基を有する SN1 - 115、SN1 - 133 または SN1 - 135 である、工程、

30

該 シヌクレインまたは シヌクレイン断片の凝集の速度または程度を決定する工程であって、該薬剤を欠く対照と比較して、凝集の速度または程度の低下は、該薬剤が薬理的活性を有することを示す、工程、を含む、方法。

【請求項 7】

前記 シヌクレイン断片が、遺伝性 LDB に関連する突然変異を有する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記突然変異が A53T 突然変異である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

LBD を有するヒトまたは LBD の動物モデルでの試行を実施して、LBD の症状を処置または抑制するか否かを決定する工程をさらに包含する、請求項 6 に記載の方法。

40

【請求項 10】

LBD の処置に有用な薬理活性を有する薬剤をスクリーニングする方法であって

シヌクレインを発現し、該 シヌクレインを断片にプロセッシングする細胞を薬剤と接触させる工程であって、該断片は、配列番号 1 にしたがって番号付けされた SN1 - 115、SN1 - 133 または SN1 - 135 である、工程、

該細胞内の該断片のレベルを該薬剤の非存在下の同じ細胞種内のベースラインレベルとの比較で測定する工程であって、該ベースラインに対し断片レベルが減少することにより該薬剤に LBD の処置に有用な薬理活性があることを示す、工程、

50

を含む、方法。

【請求項 1 1】

前記 シヌクレインの断片が遺伝性 L D B に関連する突然変異を有する、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記突然変異が A 5 3 T 突然変異である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

L B D を有するヒトまたは L B D の動物モデルにおいて試行を実施して、L B D の症状を処置または抑制するか否かを決定する工程をさらに含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記レヴィー小体病が、パーキンソン病もしくは瀰漫性レヴィー小体病 (D L B D) である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

L B D の処置に有用な薬理活性を有する薬剤をスクリーニングする方法であって

シヌクレインの断片を発現する導入遺伝子を有するトランスジェニック動物を接触させる工程であって、該断片は、配列番号 1 にしたがって番号付けされた S N 1 - 1 1 5、S N 1 - 1 3 3 または S N 1 - 1 3 5 である、工程、

該薬剤非存在下の同様なトランスジェニック動物の脳内の凝集型の該断片のベースラインレベルとの比較で該トランスジェニック動物の脳内の凝集型の該断片のレベルを測定する工程であって、該ベースラインに対する該凝集型断片レベルの減少によって該薬剤に L B D の処置に有用な薬理活性があることを示す、工程、

【請求項 1 6】

前記 シヌクレインの断片が遺伝性 L B D と関連する突然変異を有する、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記突然変異が A 5 3 T 突然変異である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記トランスジェニック動物がマウスである、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記トランスジェニック動物がショウジョウバエである、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 0】

さらに、L B D を有するヒトもしくは L B D の動物モデルにおいて試行を行って前記薬剤が前記 L B D の症状を治療もしくは阻止するかどうかを明らかにすることを含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 L B D がパーキンソン病もしくは D L B D である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

L B D の処置に有用な薬理活性を有する薬剤をスクリーニングする方法であって

シヌクレインを発現する導入遺伝子を有し、該 シヌクレインを断片にプロセッシングするトランスジェニック動物を薬剤と接触させる工程であって、該断片は配列番号 1 にしたがって番号付けされた S N 1 - 1 1 5、S N 1 - 1 3 3 または S N 1 - 1 3 5 である、工程、

該薬剤非存在下のベースラインレベルとの比較で神経細胞内の該断片のレベルを測定する工程であって、このベースラインに対する上記断片のレベルの減少によってこの薬剤に L B D の処置に有用な薬理活性があることを示す、工程、

【請求項 2 3】

前記 シヌクレインの断片が遺伝性 L B D と関連する突然変異を有する、請求項 2 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 24】
前記突然変異が A53T 突然変異である、請求項 23 に記載の方法。
- 【請求項 25】
前記トランスジェニック動物がマウスである、請求項 22 に記載の方法。
- 【請求項 26】
前記トランスジェニック動物がショウジョウバエである、請求項 22 に記載の方法。
- 【請求項 27】
さらに、LBD を有するヒトもしくは LBD の動物モデルにおいて試行を行って該薬剤が該 LBD の症状を治療もしくは阻止するかどうかを明らかにすることを含む、請求項 22 に記載の方法。 10
- 【請求項 28】
前記 LBD がパーキンソン病もしくは DLBD である、請求項 27 に記載の方法。
- 【請求項 29】
シヌクレインの断片をコードする核酸セグメントに作動可能に結合したプロモータを含む導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック動物であって、
該断片は配列番号 1 にしたがって番号付けされた SN1 - 115、SN1 - 133 または SN1 - 135 であり、
該トランスジェニック動物に該断片を発現させることにより該動物が LBD の少なくとも 1 つの特徴を発症しやすくさせ、任意の動物または細胞をスクリーニングすることを特徴とする 20
トランスジェニック動物。
- 【請求項 30】
前記プロモータが PDGF プロモータである、請求項 29 に記載のトランスジェニック動物。
- 【請求項 31】
前記少なくとも 1 つの特徴が運動機能の障害である、請求項 29 に記載のトランスジェニック動物。
- 【請求項 32】
前記少なくとも 1 つの特徴が認識機能の障害である、請求項 29 に記載のトランスジェニック動物。 30
- 【請求項 33】
マウスである、請求項 29 に記載のトランスジェニック動物。
- 【請求項 34】
ショウジョウバエである、請求項 29 に記載のトランスジェニック動物。
- 【請求項 35】
患者において LBD の存在もしくは LBD に対する感受性を検出する方法であって
体液中のシヌクレインの断片を検出する工程であって、該断片は配列番号 1 にしたがって番号付けされた SN1 - 115、SN1 - 133 または SN1 - 135 である、工程
、
健常者のベースラインレベルよりもレベルが高いことにより、LBD の存在もしくは L 40
BD に対する感受性を示すこと、
を含む、方法。
- 【請求項 36】
シヌクレインの断片に特異的に結合する抗体であって、該断片が配列番号 1 にしたがって番号付けされた SN1 - 115、SN116 - 140、SN1 - 133、SN1 - 135、SN134 - 140 または SN136 - 140 であり、完全長のシヌクレインには特異的な結合を示さない、抗体。
- 【請求項 37】
ヒト抗体である請求項 36 の抗体。
- 【請求項 38】 50

ヒト化抗体である請求項 36 の抗体。

【請求項 39】

モノクローナル抗体である請求項 36 の抗体。

【請求項 40】

ヒト・アイソタイプ I g G 1 を有する請求項 36 の抗体。

【請求項 41】

12C6 または 7G8 と示される請求項 36 の抗体。

【請求項 42】

LBD の存在もしくは LBD に対する感受性を診断する方法であって、
配列番号 1 にしたがって番号付けされた SN1 - 115、SN1 - 133 または SN1 - 135 と特異的に結合するが、完全長の シヌクレインには特異的な結合を示さない抗体を患者に投与する工程、

該患者における該抗体の結合レベルを測定する工程であって、健常者のベースラインレベルに対する結合レベルの上昇によって該 LBD の存在もしくは該 LBD に対する感受性を示す、工程、
を含む、方法。

【請求項 43】

LBD に罹患しているか罹患する危険性のある患者に対してリン酸化 シヌクレインまたは シヌクレインのリン酸化断片の有効な療法を施行し、該断片がインタクトな シヌクレインの少なくとも 100 個連続するアミノ酸の存在およびインタクトな シヌクレインの C 末端の 1 ~ 11 個連続するアミノ酸の欠損を特徴とし、これにより該 LBD を治療もしくは予防すること

を含む LBD の治療もしくは予防方法。

【請求項 44】

前記 シヌクレインの断片が SN1 - 133 または SN1 - 135 である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記断片に対する抗体を含む免疫応答を増強するアジュバントを投与する工程をさらに含む、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 46】

前記断片は融合タンパク質を形成するキャリアに結合させるものとし、該キャリアは該断片に対する抗体を含む免疫反応を増強する、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 47】

LBD の処置または予防を達成する方法であって、

LBD に罹患しているか、またはその危険性がある患者に、シヌクレインの断片の有効なレジメンを施す工程を含み、

該断片は、配列番号 1 にしたがって番号付けされた SN1 - 115、SN1 - 133 または SN1 - 135 であるか、あるいは一つの該断片の C 末端から少なくとも 5 個連続する残基を含む SN1 - 115、SN1 - 133 または SN1 - 135 のうちの任意の部分断片であり、

そして該工程によって LBD の処置または予防を達成する、
方法。

【請求項 48】

LBD の処置または予防を達成する方法であって、

LBD に罹患しているか、またはその危険性がある患者に、シヌクレインの断片に特異的な抗体の有効なレジメンを施す工程を含み、

該抗体は、配列番号 1 にしたがって番号付けされた残基を含み、かつインタクトな シヌクレインには結合せず、

該断片は、SN1 - 115、SN1 - 133 または SN1 - 135 であり、

該工程によって、該抗体が、該疾患の予防もしくは治療をもたらす、

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 49】

インタクトな シヌクレインを切断して断片を生じさせるプロテアーゼを精製する方法であって、該断片は配列番号 1 にしたがって番号付けされた残基を含む S N 1 - 1 1 5、S N 1 - 1 3 3 または S N 1 - 1 3 5 であり、

該方法は、

該プロテアーゼの阻害剤を特定する工程、

該阻害剤を該プロテアーゼを含む細胞抽出物もしくは組織抽出物と接触させることにより該プロテアーゼを該阻害剤に結合させる工程、ならびに

該阻害剤から該プロテアーゼを遊離させる工程

を含む、方法。

10

【請求項 50】

請求項 49 に記載の方法であって、該阻害剤はインタクトな シヌクレインの 1 2 9 - 1 3 9 または 1 1 1 - 1 1 9 の位置の少なくとも 5 残基からなる連続したセグメントを含む シヌクレインのペプチドである、方法。

【請求項 51】

前記残基の少なくとも 1 つが遷移状態アナログである、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 52】

1 2 C 6 または 7 G 8 と示されるモノクローナル抗体、またはそのキメラ形態もしくはヒト化形態。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

本出願は、2005年7月29日に提出された米国出願第 11 / 194, 115 号 (これは、2004年10月19日に提出された米国出願第 10 / 969, 335 号 (これは、2004年5月19日に提出された米国出願第 10 / 850, 570 号の一部継続である) の一部継続である) の一部継続であり、米国特許法 § 119 (e) の下、2003年5月19日に提出された米国出願第 60 / 471, 929 号の利益を主張する (これらの各々は、その全体において参考として援用される)。2004年10月19日に提出された米国出願第 10 / 969, 335 号はまた、2004年5月19日に提出された P C T / U S 0 4 0 1 / 1 5 8 3 6 (これは W O 0 5 / 0 1 3 8 8 9 として公開された) の一部継続であり、米国特許法 § 119 (e) の下、2003年5月19日に提出された米国出願第 60 / 471, 929 号の利益を主張する (各々、その全体において参考として援用される)。

30

【背景技術】

【0002】

(背景)

レヴィー小体病 (L B D) の特徴は、ドーパミン作動系の変性、運動性変調、認知障害、およびレヴィー小体の形成である。(非特許文献 1)。L B D としては、パーキンソン病、瀰漫性レヴィー小体病 (D L B D)、レヴィー小体型アルツハイマー病 (L B V)、および P D とアルツハイマー病 (A D) との併発ならびに多系統萎縮症 (M S A) として識別される症候群が挙げられる。レヴィー小体痴呆 (D L B) というのは、L B D についての用語法の相違を調整するために作られた用語である。L B を有する疾患は、依然として、高齢者における運動性疾患および認識力低下に共通する原因となっている。(非特許文献 2)。この疾患への罹患率は増加し続けており、深刻な公衆衛生問題を生じているが、今日まで、こうした疾患に対して認可された治療法はない。(非特許文献 3)。L B D の原因については意見の分かれるところであり、各種の神経毒および遺伝的的感受性要因などのさまざまな要因が役割を果たしていると提唱されている。

40

【0003】

50

A D、P DおよびD L B Dは高齢者において最も一般的に見出される神経変性疾患である。最近の疫学的研究によれば、アルツハイマー病患者の約30%がP Dをも有することから、A DとP Dの間には密接な臨床的関係のあることが明らかとなった。従って、A D患者は、その他の高齢者に比し、P Dを併発する可能性がより高い。さらに、痴呆症になるP D患者は、通常、典型的なA Dをすでに発症している。いずれの神経変性疾患も特定の脳領域および細胞集団に好発し、明確な病理学的特徴を示すが、P D、A DおよびD L B Dも共通の病理学的特徴を共有している。家族性A D、ダウン症候群もしくは散発型A Dの患者は、扁桃体にL Bを形成するが、これはP Dの典型的な神経病理学的特徴である。さらに、各疾患は、神経の変性、神経間シナプス結合および最終的な細胞死、神経伝達物質の枯渇、ならびにその前駆体が正常な中枢神経系の機能に關与する折り畳み構造のタンパク質の異常な蓄積を伴う。A D、P DおよびD L B Dの間の關連については生化学的研究によって裏付けられている。

10

【0004】

近年、L B Dの病因の理解に関して新たな可能性が浮上した。具体的には、いくつかの研究によって、(1)シナプスタンパク質 シヌクレインがL B内に蓄積すること(非特許文献4;非特許文献5)、(2)シヌクレイン遺伝子の突然変異体が稀な家族型パーキンソン病に伴って単離されること(非特許文献6)、ならびに(3)トランスジェニックマウス(非特許文献7)およびショウジョウバエ(非特許文献8)におけるその過剰発現によってP Dのいくつかの病理学的側面が再現されることから、シヌクレインはP Dの病因に中心的な役割を果たしていることが分かった。従って、脳内のシヌクレインの蓄積がヒト、マウス、ハエといった多様な種において同様な形態学および神経学的変化を伴うという事実から、この分子がP D進行の一因となっていることが示唆される。

20

【0005】

A Dの典型的な病理学的特徴である神経炎性班は、基本的に、アミロイド前駆タンパク質(A P P)のアミノ酸蛋白分解性産物であるアミロイド・ベータ(A)タンパク質、およびシヌクレインのアミノ酸35個の蛋白分解性断片であるN A Cからなる。A およびN A Cはいずれも、それぞれの完全長タンパク質の蛋白分解性断片としてアミロイド班中に初めて確認され、これらの完全長c D N Aが同定され、クローニングされた。(非特許文献9;非特許文献10;非特許文献11)。

【0006】

シヌクレインは、 - および - シヌクレインならびにシノレチンなどのタンパク質の大きなファミリーの一部である。シヌクレインは、シナプスと関係がある正常な状態において発現され、神経可塑性、学習および記憶において役割を果たしていると考えられている。シヌクレインの凝集を増強するヒト(h)シヌクレインの突然変異が確認されており(A l a 3 0 P r o および A l a 5 3 T h r)、稀なタイプの常染色体優性型P Dと關連付けられている。こうした突然変異がシヌクレインの凝集傾向を強化するメカニズムについては知られていない。

30

【非特許文献1】Mc Keithら, Clinical and pathological diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Report of the DLB International Workshop. Neurology (1996年) 47: p 1113 - 24

40

【非特許文献2】Galaskoら, Clinical-neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias. Arch. Neurol. (1994年) 51: p 888 - 95

【非特許文献3】Tannerら, Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes. Curr. Opin. Neurol. (2000年) 13: p 427 - 30

【非特許文献4】Spillantiniら, Nature (1997年) 388: p 839 - 40; Takedaら, J. Pathol. (1998年) 152: p 367 - 7

50

2

【非特許文献5】Wakabayashi, Neurosci. Lett. (1997年) 239: p 45 - 8

【非特許文献6】Kruger, Nature Gen. (1998年) 18: p 106 - 8; Polymeropoulos, Science (1997年) 276: p 2045 - 7

【非特許文献7】Masliah, Science (2000年) 287: p 1265 - 9

【非特許文献8】Feany, Nature (2000年) 404: p 394 - 8

【非特許文献9】Iwai A., Biochim. Biophys. Acta (2000年) 1502: p 95 - 109

【非特許文献10】Masliah, AM J Pathol (1996年) 148: p 201 - 10

【非特許文献11】Ueda, Proc. Natl. Acad. Sci USA (1993年) 90: p 11282 - 6

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(特許請求の範囲に記載されている発明の要旨)

本発明は、レヴィー小体病(LBD)の処置に有用な薬理活性を有する薬剤をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、薬剤と、インタクトな(すなわち、全長) シヌクレインの少なくとも100個連続するアミノ酸の存在およびインタクトな シヌクレインのC末端の1番目から23番目の連続するアミノ酸の欠損を特徴とする シヌクレインの断片とを接触させること、およびこの シヌクレインの断片の凝集の速度もしくは程度を測定することを含み、上記薬剤を用いない対照との比較による凝集速度もしくは程度の減少によって、この薬剤が薬理活性を有することが示される。

【0008】

この断片は、任意選択的に、配列番号1にしたがって番号付けされた残基を有するインタクトな シヌクレインの残基115および残基125内の残基のC末端を有する。好ましい断片としては、シヌクレインSN1-115、SN1-116、SN1-117、SN1-118、SN1-119、SN1-120、SN1-121、SN1-122、SN1-123、SN1-124およびSN1-125が挙げられる。SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN1-133およびSN1-135が特に好ましい。の1番目から119番目、1番目から120番目、1番目から121番目、1番目から122番目、1番目から123番目、1番目から124番目、および1番目から125番目が挙げられる。任意選択的に、この シヌクレインの断片は、Xを130~139番目とした場合、1番目からX番目である。この シヌクレインの断片は、任意選択的に、A53T突然変異などの遺伝性LBDと関連する突然変異を有する。任意選択的に、上記方法は、上記薬剤がLBDの症状を治療もしくは抑制するかどうかを調べるためにLBDを有するヒトもしくはLBDの動物モデルにおいて試験を行う別の工程を含む。

【0009】

本発明は、レヴィー小体病(LBD)を処置するために有用な薬理的活性を有する因子をスクリーニングする方法をさらに提供する。この方法は、この因子とリン酸化 シヌクレインまたはそのリン酸化断片(この断片は、インタクトな シヌクレインの少なくとも100個連続するアミノ酸およびインタクトな シヌクレインのC末端からの1~11個連続するアミノ酸の欠失の存在を特徴とする)とを接触させる工程、ならびに、シヌクレインまたは シヌクレイン断片の凝集の速度または程度を決定する(ここで、この因子を欠く対照と比較して、凝集の速度または程度の低下は、この因子が薬理的活性を有することを示す)工程を包含する。必要に応じて、この因子は、インタクトな シヌクレインまたは、配列番号1にしたがって番号付けされたSN1-133もしくはSN1-1

10

20

30

40

50

35と接触させられる。必要に応じて、インタクトな シヌクレインまたは シヌクレイン断片は、遺伝性LDBに関連する突然変異を有する。必要に応じて、この突然変異は、A53T突然変異である。必要に応じて、この方法は、LBDを有するヒトまたはLBDの動物モデルでの試行を実施して、LBDの症状を処置または抑制するか否かを決定する工程をさらに包含する。

【0010】

さらに、本発明は、LBD（例えば、パーキンソン病もしくはDLBD）の処置に有用な薬理活性について薬剤をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、シヌクレインを発現し、このシヌクレインを断片にプロセッシングする細胞を薬剤と接触させることを含む。この断片の特徴は、インタクトなシヌクレインの少なくとも100個連続するアミノ酸が存在し、インタクトなシヌクレインのC末端の1番目から25番目の連続するアミノ酸が欠損することである。次いで、上記細胞内の上記断片のレベルを上記薬剤非存在下の同じ細胞種内のベースラインレベルとの比較で測定し、このベースラインに対し断片レベルが減少することによりこの薬剤にLBDの処置に有用な薬理活性があることが示される。このシヌクレインの断片は、任意選択的に、インタクトなシヌクレインの115番目～125番目の残基にC末端を有する。好ましい断片は、シヌクレインのSN1-115、SN1-116、SN1-117、SN1-118、SN1-119、SN1-120、SN1-121、SN1-122、SN1-123、SN1-124およびSN1-125である。SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN1-133およびSN1-135が特に好ましい。シヌクレインの1番目から119番目、1番目から120番目、1番目から121番目、1番目から122番目、1番目から123番目、1番目から124番目、および1番目から125番目である。任意選択的に、このシヌクレインの断片は、Xを130～139番目とした場合、1番目からX番目である。このシヌクレインの断片は、任意選択的に、A53T突然変異などの遺伝性LBDと関連する突然変異を有する。上記細胞は、ヒト細胞、神経細胞もしくはドーパミン作動性細胞または非ドーパミン作動性細胞とすることができる。任意選択的に、この細胞はPC12細胞もしくはSy5Y細胞である。任意選択的に、この方法は、上記薬剤がLBDの症状を治療もしくは抑制するかどうかを調べるためにLBDを有するヒトもしくはLBDの動物モデルにおいて試験を行う工程を含む。

10

20

【0011】

さらに、本発明は、LBD（例えば、パーキンソン病もしくはDLBD）の処置に有用な薬理活性を有する薬剤をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、インタクトなシヌクレインの少なくとも100個連続するアミノ酸が存在し、インタクトなシヌクレインのC末端の1番目から25番目の連続するアミノ酸が欠損することを特徴とするシヌクレインの断片を発現するトランスジェニック動物を接触させること、および上記薬剤非存在下の同様のトランスジェニック動物の脳内の凝集型の上記断片のベースラインレベルとの比較で上記トランスジェニック動物の脳内の凝集型上記断片のレベルを測定することを含み、このベースラインに対する上記凝集型断片レベルの減少によってこの薬剤にLBDの処置に有用な薬理活性があることが示される。このシヌクレインの断片は、任意選択的に、インタクトなシヌクレインの115番目～125番目の残基にC末端を有する。好ましい断片としては、シヌクレインのSN1-115、SN1-116、SN1-117、SN1-118、SN1-119、SN1-120、SN1-121、SN1-122、SN1-123、SN1-124およびSN1-125が挙げられる。SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN1-133およびSN1-135が特に好ましい。任意選択的に、このシヌクレインの断片は、Xを119～139番目とした場合、1番目からX番目である。このシヌクレインの断片は、任意選択的に、A53T突然変異などの遺伝性LBDと関連する突然変異を有する。上記トランスジェニック動物は、任意選択的に、げっ歯類である。また、このトランスジェニック動物は、ショウジョウバエとすることもできる。任意選択的に、この方法は、上記薬剤がLBDの症状を治療もしくは抑制するかどうかを調べるためにLBDを有するヒトもしくはLBDの動物モデル

30

40

50

において試験を行うこと含む。

【0012】

さらに、本発明は、LBD（例えば、パーキンソン病もしくはDLBD）の処置に有用な薬理活性について薬剤をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、薬剤と、シヌクレインを発現し、シヌクレインを断片にプロセッシングするトランスジェニック動物とを接触させること（この断片は、インタクトなシヌクレインの少なくとも100個連続するアミノ酸が存在し、インタクトなシヌクレインのC末端の1番目から25番目の連続するアミノ酸が欠損することを特徴とする）、および上記薬剤非存在下のベースラインレベルとの比較で神経細胞内の上記断片のレベルを測定することを含み、このベースラインに対する上記断片のレベルの減少によってこの薬剤にLBDの処置に有用な薬理活性があることが示される。このシヌクレインの断片は、任意選択的に、インタクトなシヌクレインの115番目～125番目の残基にC末端を有する。好ましい断片としては、シヌクレインのSN1-115、SN1-116、SN1-117、SN1-118、SN1-119、SN1-120、SN1-121、SN1-122、SN1-123、SN1-124およびSN1-125が挙げられる。SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN133およびSN135が特に好ましい。任意選択的に、このシヌクレインの断片は、Xを130～139番目とした場合、1番目からX番目である。このシヌクレインの断片は、任意選択的に、A53T突然変異などの遺伝性LBDと関連する突然変異を有する。上記トランスジェニック動物は、任意選択的に、げっ歯類、マウスもしくはショウジョウバエである。任意選択的に、この方法は、上記薬剤がLBDの症状を治療もしくは抑制するかどうかを調べるためにLBDを有するヒトもしくはLBDの動物モデルにおいて試験を行う工程を含む。

10

20

【0013】

さらに、本発明は、インタクトなシヌクレインの少なくとも100個連続するアミノ酸が存在し、インタクトなシヌクレインのC末端の1番目から25番目の連続するアミノ酸が欠損することを特徴とするシヌクレインの断片をコードする核酸セグメントに作動可能なように結合したプロモータを含む導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック動物であって、このトランスジェニック動物に上記断片を発現させることによりこの動物がLBDの少なくとも1つの特徴を発症しやすくなることを特徴とするトランスジェニック動物を提供する。このシヌクレインの断片は、任意選択的に、SN1-115、SN1-116、SN1-117、SN1-118、SN1-119、SN1-120、SN1-121、SN1-122、SN1-123、SN1-124、およびSN1-125からなる群より選ばれる。SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN133およびSN135が特に好ましい。任意選択的に、このシヌクレインの断片は、Xを130～139番目とした場合、1番目からX番目である。上記プロモータは、任意選択的に、PDGFプロモータである。任意選択的に、少なくとも1つの特徴は運動機能の障害である。任意選択的に、上記トランスジェニック動物の少なくとも1つの特徴は、認識機能障害である。上記トランスジェニック動物は、任意選択的に、げっ歯類、マウスもしくはショウジョウバエである。

30

【0014】

さらに、本発明は、患者においてLBDの存在もしくはLBDに対する感受性を検出する方法を提供する。この方法は、インタクトなシヌクレインの少なくとも100個連続するアミノ酸が存在し、インタクトなシヌクレインのC末端の1番目から25番目の連続するアミノ酸が欠損することを特徴とする、脳脊髄液中のシヌクレインの断片を検出することを含む。健常者のベースラインレベルと比較してのレベルの変化（通常は増加）は、LBDの存在もしくはLBDに対する感受性が示される。

40

【0015】

さらに、本発明は、インタクトなシヌクレインの少なくとも100個連続するアミノ酸が存在し、インタクトなシヌクレインのC末端の1番目から25番目の連続するアミノ酸が欠損することを特徴とするシヌクレインの断片と特異的に結合するが、完全長の

50

シヌクレインには特異的な結合を示さない抗体を提供する。好ましい断片としては、シヌクレインのSN1-115、SN1-116、SN1-117、SN1-118、SN1-119、SN1-120、SN1-121、SN1-122、SN1-123、SN1-124、およびSN1-125が挙げられる。SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN133およびSN135が特に好ましい。任意選択的に、この断片は、Xを130~139番目とした場合、1番目からX番目である。上記抗体は、任意選択的に、ヒト抗体、ヒト化抗体もしくはキメラ抗体である。任意選択的に、この抗体はモノクローナルである。任意選択的に、この抗体はヒト・アイソタイプIgG1を有する。

【0016】

さらに、本発明は、LBDの存在もしくはLBDに対する感受性を診断する方法を提供する。この方法は、115番目~135番目の残基に遊離C末端を有するシヌクレインの断片と特異的に結合するが、完全長のシヌクレインには特異的な結合を示さない抗体を患者に投与すること、およびこの患者におけるこの抗体の結合のレベルを測定することを含み、健常者のベースラインレベルに対する結合レベルの上昇によって上記LBDの存在もしくはLBDに対する感受性が示される。好ましくは、この抗体は、SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN133およびSN135からなる群より選択される断片の遊離のC末端に特異的に結合する。

【0017】

さらに、本発明は、LBDに罹患しているか罹患する危険性のある患者に対して、インタクトなシヌクレインの少なくとも100個連続するアミノ酸が存在し、インタクトなシヌクレインのC末端の1番目から25番目の連続するアミノ酸が欠損することを特徴とするシヌクレイン断片の有効な療法を施行し、これにより上記LBDを治療もしくは予防することを含む、LBDの治療もしくは予防方法を提供する。このシヌクレインの断片は、任意選択的に、シヌクレインのSN1-115、SN1-116、SN1-117、SN1-118、SN1-119、SN1-120、SN1-121、SN1-122、SN1-123、SN1-124、およびSN1-125である。SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN133およびSN135が特に好ましい。任意選択的に、この断片は、Xを130~139番目とした場合、1番目からX番目である。さらに、この方法は、任意選択的に、この断片に対する抗体を含む免疫反応を増強するアジュバントを投与することを含む。任意選択的に、上記断片は、この断片に対する抗体を含む免疫反応を増強する、融合タンパク質を形成するキャリアに結合される。

【0018】

さらに、本発明は、LBDを治療もしくは予防する方法を提供する。この方法は、LBDに罹患しているか罹患する危険性のある患者に対して、シヌクレインのSN1-115、SN1-116、SN1-117、SN1-118、SN1-119、SN1-120、SN1-121、SN1-122、SN1-123、SN1-124、およびSN1-125および1番目からX番目からなり、Xを130~139番目とする群から選ばれたシヌクレインの断片に特異的に結合するが、インタクトなシヌクレインには結合しない抗体の有効な療法を施行することを含み、それによって、この抗体が上記疾患の予防もしくは治療をもたらす。SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN133およびSN135が特に好ましい。

【0019】

本発明は、LBDの処置または予防を達成する方法をさらに提供する。この方法は、LBDに罹患しているか、またはその危険性がある患者に、リン酸化シヌクレインまたはシヌクレインのリン酸化断片(この断片は、インタクトなシヌクレインの少なくとも100個連続するアミノ酸およびインタクトなシヌクレインのC末端からの1~10個連続するアミノ酸の欠失の存在によって特徴付けられる)の有効なレジメンを施し、それによってLBDの処置または予防を達成する工程を包含する。必要に応じて、この断片は、SN1-133またはSN1-135である。必要に応じて、この方法は、この断片に対する抗体を含む免疫応答を増強するアジュバントを投与する工程をさらに包含する。必

10

20

30

40

50

要に応じて、この断片は、融合タンパク質を形成するキャリアに連結される。このキャリアは、この断片に対する抗体を含む免疫応答を増強する。

【0020】

さらに、本発明は、インタクトな シヌクレインを切断して、インタクトな シヌクレインの少なくとも100個連続するアミノ酸が存在し、インタクトな シヌクレインのC末端の1番目から25番目の連続するアミノ酸が欠損することを特徴とする断片を生じさせるプロテアーゼを単離する方法をさらに提供する。SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN133およびSN135が特に好ましい。この方法は、プロテアーゼの阻害剤を特定すること、この阻害剤をこのプロテアーゼを含む細胞抽出物もしくは組織抽出物と接触させることによりこのプロテアーゼをこの阻害剤に結合させること、およびこの阻害剤からこのプロテアーゼを遊離させることを含む。任意選択的に、上記阻害剤は、インタクトな シヌクレインの111番目~130番目の間の位置の少なくとも5残基および最大20残基からなる連続したセグメントを含む シヌクレインのペプチドである。あるいは、このペプチドは、129位と139位との間のインタクトな シヌクレインのうち、少なくとも5個の残基を含む阻害剤である。任意選択的に、このペプチドは、118番目~122番目の位置のうちの少なくとも5残基からなる連続したセグメントを含む。必要に応じて、このペプチドは、114位および117位との間の少なくとも4個の残基の連続するセグメントを含む。任意選択的に、これらの残基の少なくとも1つは遷移状態アナログである。

10

【0021】

さらに、本発明は、 シヌクレインの109番目から120番目までの残基内のエピトープに特異的に結合するモノクロナール抗体を提供する。このモノクロナール抗体は、任意選択的に、キメラ型、ヒト化型もしくはヒト型である。

20

【0022】

さらに、本発明は、 シヌクレインの115番目から123番目までの残基内のエピトープに特異的に結合するモノクロナール抗体を提供する。

【0023】

さらに、本発明は、 シヌクレインの43番目から51番目および58番目から65番目の残基内の非連続的エピトープに特異的に結合するモノクロナール抗体を提供する。この抗体は、任意選択的に、キメラ型、ヒト化型もしくはヒト型である。

30

【0024】

さらに、本発明は、遊離C末端を有する独立した完全長の シヌクレインに特異的に結合し、C末端が別のポリペプチドに結合している シヌクレインを含む融合タンパク質に特異的な結合を示さない末端特異的モノクロナール抗体を提供する。この抗体は、任意選択的に、キメラ型、ヒト化型もしくはヒト型である。

【0025】

さらに、本発明は、患者においてレヴィー小体病の存在もしくはレヴィー小体病に対する感受性を検出する方法を提供する。この方法は、患者の脳からの試料において シヌクレインの129位でリン酸化された シヌクレインのレベル、または125番目の位置がリン酸化もしくはニトロ化された シヌクレインのレベルを測定することを含み、健常者集団の平均レベルに対するレベルの上昇によって上記患者がレヴィー小体病を有するかこれに罹患性であることが示される。本発明は、患者の脳由来のサンプルにおいて、ユビキチン化された シヌクレインのレベルを決定することにより、患者におけるレヴィー小体病の存在またはそれに対する感受性を検出する他の方法を提供し、ここで、健常者集団の平均レベルと比較して、増大したレベルは、その患者がレヴィー小体病を有しているか、またはそれに感受性であることを示す。必要に応じて、リン酸化 シヌクレインおよびユビキチン化 シヌクレインの両方のレベルを検出することができる。

40

【0026】

(定義)

「薬剤」という用語は、薬理活性を有するか、薬理活性を有する可能性のある化合物を

50

記述するのに用いている。薬剤としては、既知の薬物である化合物、薬理活性が確認されているが、さらに治療上の評価が行われている化合物、および薬理活性についてスクリーニングされることになっているコレクションおよびライブラリを構成する物質である化合物が挙げられる。

【0027】

「薬理」活性とは、薬剤が疾患の予防もしくは治療に有用であるか、有用である可能性を有することを示すスクリーニング系において、ある薬剤が活性を示すことを意味する。このスクリーニング系はインビトロ系、細胞系、動物系もしくはヒト系とすることができる。薬剤は、疾患の処置における実際的な予防もしくは治療的有用性を立証するにはさらに試験を必要とする可能性があるにしても、薬理活性を有すると評することができる。

10

【0028】

ゲル電気泳動を用いた分子量測定との関連で、「約」という用語は、同一条件下でその方法を繰り返した際に実験誤差によると思われる分子量の標準偏差の存在を意味している。シヌクレインの一部の断片についての12kDaという分子量測定値は、トリシン緩衝液を用いた測定に適用される。

【0029】

「特異的に結合する」という語句は、タンパク質およびその他の生体物質の不均一な集団の存在下で前記タンパク質の存在を決定する結合反応のことを意味する。従って、所定の条件下において、特定のリガンドは特定のタンパク質に選択的に結合するが、試料中に存在する他のタンパク質とは有意な量で結合しない。多くの場合、タンパク質に特異的に結合する抗体のような分子の結合定数は、少なくとも 10^6 M^{-1} もしくは 10^7 M^{-1} 、好ましくは $10^8 \text{ M}^{-1} \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、より好ましくは約 $10^{10} \text{ M}^{-1} \sim 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 以上である。種々のイムノアッセイ方式を用いて特定のタンパク質に対し特異的な免疫反応性を示す抗体を選定することができる。例えば、タンパク質に対し特異的な免疫反応性を示すモノクローナル抗体を選定するのに固相ELISAイムノアッセイ法が日常的に用いられている。特異的な免疫反応性を測定するのに用いることができるイムノアッセイ方式および条件の解説については、例えば、Harlow, Lane (1988年) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications、ニューヨークを参照されたい。

20

【0030】

配列の比較においては、通常、1つの配列を試験配列と比較する対照配列として用いる。配列比較アルゴリズムを用いる際には、試験および対照配列をコンピュータに入力し、必要な場合、部分配列座標を指定し、次に、配列アルゴリズム・プログラム・パラメータを指定する。次いで、指定したプログラム・パラメータに基づいて、配列比較アルゴリズムにより、対照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントが算出される。

30

【0031】

比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith, Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2: p482 (1981年)の局所ホモロジーアルゴリズム、Needleman, Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48: p443 (1970年)のホモロジー・アラインメント・アルゴリズム、Pearson, Lipman, *Pro. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 85: p2444 (1988年)の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実施(Wisconsin Genetics Software Package)、ジェネティクス・コンピュータ・グループ(Genetics Computer Group)、575サイエンス(Science) Dr.、マジソン(Madison)、WIのGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)、もしくは目視検査(visual inspection)(一般的には、Ausubelらの上記文献参照)によって行うことができる。

40

【0032】

配列同一性パーセントおよび配列類似性を測定するのに適したアルゴリズムの別の例は

50

、Altschulら、J. Mol. Biol., 215: p 403 - 410 (1990年)に記載されているBLASTアルゴリズムである。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、全米バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)から公開されている。このアルゴリズムは、先ず、データベース配列中の同じ長さの文字列とアラインメントさせた時にある正值の閾値スコアTにマッチするかこれを満たす検索配列中の長さWの短い文字列を特定することによって高相同性スコア(high scoring)配列対(HSP)を同定する。Tは、近傍文字列スコア閾値(Altschulら、上記文献)と呼ばれる。これらの初期の近傍文字列ヒットは、これらを含むより長いHSPを見出す検索を開始するためのシードとなる。次いで、これらの文字列ヒットは、累積アラインメント・スコアが増加し得る限り、各配列に沿って両方向に延長される。ヌクレオチド配列の場合、累積スコアは、パラメータM(一对の一致残基のスコア値(reward); 常に>0)およびN(不一致残基のペナルティ値; 常に<0)を用いて算出する。アミノ酸配列の場合、スコアリング・マトリクスを用いて累積スコアを算出する。文字列ヒットの各方向への延長は、以下の場合、即ち、上記累積アラインメント・スコアがその最大到達値から数量Xだけ減少した場合、この累積スコアが1つ以上のネガティブ・スコア残基アラインメントの蓄積によりゼロ以下になった場合、もしくはどちらの配列においても末端に到達した場合に停止する。ある核酸もしくはポリペプチドが本発明の範囲内にあるかどうかを確認するためには、BLASTプログラムのデフォルト・パラメータが適している。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列の場合)は、デフォルトとして、文字列長さ(W)11、期待値(E)10、M=5、N=4および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列の場合、BLASTNプログラムは、デフォルトとして、文字列長さ(W)3、期待値(E)10およびBLOSUM62スコアリング・マトリクスを用いる。TBLASTNプログラム(ヌクレオチド配列の蛋白配列を使用)は、デフォルトとして、文字列長さ(W)3、期待値(E)10およびBLOSUM62スコアリング・マトリクスを用いる。(Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: p 10915 (1989年)参照)。

10

20

【0033】

配列同一性パーセントを算出することに加えて、BLASTアルゴリズムは2つの配列間の類似性の統計的な解析を行う(例えば、Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: p 5873 - 5787 (1993年)参照)。BLASTアルゴリズムにより得られる類似性の1つの指標は、2つのヌクレオチドもしくはアミノ酸配列間の一致が偶然生じる確率の指標となる最小合計確率(P(N))である。例えば、試験核酸と対照核酸との比較における最小合計確率が約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合、この核酸は対照配列と類似していると考えられる。

30

【0034】

アミノ酸置換を保存的もしくは非保存的なものとして分類するために、アミノ酸を以下のようにグループ分けする: グループI(疎水性側鎖): ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile; グループII(中性親水性側鎖): cys、ser、thr; グループIII(酸性側鎖): asp、glu; グループIV(塩基性側鎖): asn、gln、his、lys、arg; グループV(鎖配向に影響する残基): gly、pro; およびグループVI(芳香族側鎖): trp、tyr、phe。保存的置換は同じクラスのアミノ酸間の置換を伴う。非保存的置換は、これらのクラスの中の1つのアミノ酸を別のクラスのアミノ酸と交換することを成す。

40

【0035】

通常、本発明の治療剤は好ましくない夾雑物を実質的に含まない。このことは、薬剤が、妨害タンパク質および夾雑物を実質的に含まないばかりでなく、通常、少なくとも約50% w/w(重量/重量)の純度であることを意味する。場合によっては、こうした薬剤

50

の純度は、少なくとも約 80% w/w、より好ましくは少なくとも 90% もしくは約 95% w/w である。しかしながら、従来のタンパク質精製法を用いると、少なくとも 99% w/w の均一なペプチドを得ることができる。

【0036】

「抗体」もしくは「免疫グロブリン」という用語は、インタクトな抗体およびその結合性断片を含めて用いている。通常、断片は、それが由来するインタクトな抗体と、個々の重鎖、軽鎖 Fab、Fab' F(ab')₂、Fabc および Fv を含む抗原断片への特異的結合に対して競合する。断片は、組換え DNA 法、もしくはインタクトな免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的切断によって作製することができる。また、「抗体」という用語は、他のタンパク質とともに融合タンパク質に化学的に結合体化しているか、もしくはこうした融合タンパク質として発現される 1 種以上の免疫グロブリン鎖を含む。また、「抗体」という用語は、二重特異性抗体を含む。二重特異性もしくは二官能性抗体は、2 種の重/軽鎖対および 2 種の結合部位を有する人工的なハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合もしくは Fab' 断片間の結合を含む種々の方法によって作製することができる。例えば、Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79: p315-321 (1990年); Kostelyel et al., J. Immunol., 148: p1547-1553 (1992年) を参照されたい。

10

【0037】

「アジュバント」という用語は、抗原と共に投与すると、その抗原に対する免疫反応を増強するが、単独で投与してもその抗原に対する免疫反応を生じない化合物のことを意味する。アジュバントは、リンパ球動員、B および/または T 細胞の賦活ならびにマクロファージの賦活を含むいくつかのメカニズムによって免疫反応を増強し得る。

20

【0038】

「患者」という用語は、予防的もしくは治療的処置を受けるヒトおよび他の哺乳動物の対象を含む。

【0039】

抗体間の競合は、試験対象の免疫グロブリンが対照抗体の シヌクレインなどの共通の抗原への特異的結合を阻害するようなアッセイ法を用いて測定される。数多くのタイプの競合的結合アッセイ法が知られており、このようなものとしては、例えば、固相直接もしくは間接ラジオイムノアッセイ (RIA)、固相直接もしくは間接酵素イムノアッセイ (EIA)、サンドイッチ競合アッセイ (Stahlis, Methods in Enzymology, 9: p242-253 (1983年) 参照); 固相直接ピオチン-アビジン EIA (Kirkland, J. Immunol., 137: p3614-3619 (1986年) 参照); 固相直接標識化アッセイ、固相直接標識化サンドイッチ・アッセイ (Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press (1988年) 参照); I-125 標識を使用する固相直接標識 RIA (Morel, Molec. Immunol., 25(1): p7-15 (1988年) 参照); 固相直接ピオチン-アビジン EIA (Cheung, Virology 176: p546-552 (1990年) 参照); および直接標識化 RIA (Moldenhauer, Scand. J. Immunol., 32: p77-82 (1990年)) がある。通常、このようなアッセイ法では、固相面に結合させた精製抗原もしくはこれらの両方を有する細胞、非標識試験免疫グロブリン、および標識対照免疫グロブリンを用いる。競合的阻害は、この試験免疫グロブリンの存在下に固相面もしくは細胞に結合した標識の量を定量することにより測定する。通常、試験免疫グロブリンは過剰に存在する。競合アッセイによって特定される抗体 (競合抗体) としては、対照抗体と同じエピトープに結合する抗体、およびこの対照抗体が結合したエピトープに、立体障害を生じるのに十分近接した近傍エピトープに結合する抗体が挙げられる。通常、競合抗体は、過剰に存在させた場合、対照抗体の共通抗原への特異的結合を少なくとも 50% もしくは 75% 阻害する。

30

40

50

【0040】

エピトープの座標は近似である（±2アミノ酸）。エピトープ内の全てのアミノ酸が結合に必ずしも必要な訳ではない。

【0041】

記載された1つ以上の要素を「含む（comprising）」組成物もしくは方法には、特に記載されていない他の要素を含めることができる。例えば、シヌクレイン・ペプチドを含む組成物は、単離されたシヌクレイン・ペプチドと、より大きなポリペプチド配列の構成成分としてのシヌクレイン・ペプチドとの両方を包含する。

【0042】

特に文脈から明らかでない限り、本発明の実施態様、構成要素、工程もしくは構成は全て、任意の他のものとの組み合わせで用いることができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0043】

（発明の詳細な説明）

（I. 概要）

本発明は、部分的に、レヴィー小体病（LBD）患者およびそのトランスジェニック動物モデルにおいてシヌクレインの新規断片を特定することを前提としている。こうした疾患の特徴は、シヌクレインの凝集である。その断片は完全長のシヌクレインがC末端で切断されたものである。一部の断片は、トリシン緩衝液を用いるSDSゲル電気泳動で測定した分子量が約12kDa（SN1-119に対応する）、12.5kDa（SN1-122に対応する）、13.5kDa（この断片は、LBDを有する患者でのみ見出される）および15kDa（おそらく、SN1-133またはSN1-135に対応する）であり、天然型シヌクレインのC末端から少なくとも10個連続したアミノ酸が切断されたものであるという特徴を有する。切断部位は、天然のヒトシヌクレインの115番目残基の後および126番目残基の前に生じることが好ましい。特に好ましい切断部位は、残基115および116、119および120の間、残基122および123の間、残基132および133の間ならびに残基135および136の間である。これらのシヌクレイン断片の特定には、例えば、創薬、診断、治療、トランスジェニック動物などにおいていくつかの用途がある。

20

【0044】

本発明はさらに、対照と比較して、シヌクレイン病原性疾患（synucleinopathic disease）を有する患者において、リン酸化シヌクレインの分配が可溶性の細胞質画分よりも微粒子状のもの（particulate）（レヴィー小体が富化された画分）に多いという結果を部分的に前提としている。リン酸化は、シヌクレインの129位に生じる。機構を理解することは本発明の実施に必要とされないが、シヌクレインのリン酸化は、それに続く切断形態（すなわち、残基132および133の間ならびに残基135および136の間の切断）へのプロセッシングおよびシヌクレインの凝集を駆動することが提唱されている。本発明は、シヌクレイン病原性疾患を有する患者からの不溶性画分において、少量のシヌクレインが、6位、10位、12位、21位、23位、32位および34位のリジン残基でユビキチン化されることをさらに示す。ユビキチン化は、タンパク質の分解において一定の役割を有することが公知である（例えば、Cierchanover, EMBO J. 17, 7151-7160 (1998)を参照のこと）。ユビキチン化はまた、シヌクレインを凝集しやすくさせ、そしてプロテオソームからリソソームへのその細胞内経路（intracellular path）を変更する。したがって、ユビキチン化は、シヌクレインの分解を増大させ得、かつその凝集を促進し得る。それゆえ、ユビキチン化の調節は、シヌクレイン病原性疾患を処置することにおいて有用であり得る。

30

40

【0045】

本発明は、LBDの処置に有用な活性について薬剤をスクリーニングするための数種の方法を提供する。一部の方法では、本発明の新規断片を生じる切断反応を阻害する薬剤が

50

特定される。他の方法では、この切断反応の産物の凝集を阻害する薬剤が特定される。このような阻害剤はLBDの処置に有用である。また、上記切断反応の阻害剤は、この切断反応に關与するプロテアーゼのアフィニティー精製にも有用である。

【0046】

また、本発明は、上述の シヌクレインの断片を発現するトランスジェニック動物モデルおよび細胞を提供する。このトランスジェニック動物モデルおよび細胞には、上記断片の凝集体を含有するレヴィー小体を含むレヴィー小体病の特徴を形成する性質がある。この動物モデルおよび細胞は上記のスクリーニング方法に利用することができる。

【0047】

さらに、本発明は、 シヌクレインの断片に特異的に結合するが、インタクトな シヌクレイン自体には特異的な結合を示さない末端特異的な抗体を提供する。こうした抗体は、 シヌクレイン凝集体のインビトロ・イメージング用に、および処置の方法にも有用である。また、新規な シヌクレイン断片は、処置の方法に、必要であれば、アジュバントとの併用で、用いることができる。

10

【0048】

(I I . シヌクレイン断片)

ヒト シヌクレインは以下のアミノ酸配列を有するアミノ酸140個のペプチドである

:

M D V F M K G L S K A K E G V V A A A E K T K Q G V A E A A G K T K E G V
L Y V G S K T K E G V V H G V A T V A E K T K E Q V T N V G G A V V T G
V T A V A Q K T V E G A G S I A A A T G F V K K D Q L G K N E E G A P Q E
G I L E D M P V D P D N E A Y E M P S E E G Y Q D Y E P E A

20

(配列番号1)

(Uedaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993年) 90: p 11282-6; ジェンバンク (GenBank) アセション番号: P37840)。このタンパク質は、認識される3つのドメイン、即ち、1から61番目のアミノ酸をカバーするKTK E繰返し配列ドメイン (repeat domain)、約60番目から95番目のアミノ酸に及ぶNAC (非アミロイド成分) ドメイン、および約98番目から140番目のアミノ酸に及ぶC末端酸性ドメインを有する。

【0049】

本発明の一部の新規断片は、C末端から少なくとも10個連続したアミノ酸、好ましくは少なくとも15個連続したアミノ酸、任意選択的に20、22、23もしくは25個までのアミノ酸が切断されたものである。これらの断片は、全体もしくはほぼ全体 (即ち、上記欠損部以外の シヌクレインからの少なくとも100個連続する残基) を含む。また、一部の断片は、1から4番目、1から6番目、1から10番目、1から12番目の欠損など、N末端から20個までの比較的短いアミノ酸配列が切断されたものである。一部の断片は1から23番目、1から38番目もしくは1から45番目残基のN末端欠損を有する。好ましい断片は、SN1-115、SN1-116、1-117、SN1-118、SN1-119、SNI-120、SN1-121、SN1-122、SN1-123、SN1-124、SN1-125、SN1-126、SN1-127、SN1-128、SN1-129およびSNI-130である。特に好ましい断片は、SN1-115、SN1-119、SN1-120、SN1-121、SN1-122、SN1-123、SN1-124およびSN1-125である。特に好ましい断片は、SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN1-133およびSN1-135である。切断反応は、115番目~116番目のアミノ酸残基間または118番目~136番目のアミノ酸残基間、例えば、特に、119番目と120番目の残基、または122番目と123番目の残基、または133番目と134番目の残基、または135番目と136番目の残基の間のペプチド結合で行われることが好ましい。

30

40

【0050】

切断に起因するC末端断片もまた本発明に包含され、以下に記載される方法に使用され

50

得る。これらの断片としては、SN116-140、SN117-140、SN118-140、SN119-140、SN119-140、SN120-140、SN121-140、SN122-140、SN123-140、SN124-140、SN125-140、SN126-140、SN1-127-140、SN128-140、SN129-140、SN130-140およびSN131-140が挙げられる。好ましい断片は、SN116-140、SN120-140、SN123-140、SN134-140およびSN136-140である。

【0051】

本発明の他の断片としては、(SDS電気泳動で測定して)約6~7kDaもしくは50~80個のアミノ酸のシヌクレインN末端断片が挙げられる。本発明の別の断片としては、インタクトなシヌクレインのC末端から1~10個のアミノ酸を欠くシヌクレインのN末端断片、即ち、Xを130~139とした場合のSN1-Xが挙げられる。一部の断片は、抗体ELADW43(遊離N末端)および5C12(111-118)への特異的結合、ならびに8A5(遊離C末端)、LB509(115-123)およびELADW47(115-122)への特異的結合の欠如を特徴とする。一部の断片は、ELADW43(インタクトなN末端)および5C12(111-118)、LB509(115-123)およびELADW47(115-122)への特異的結合、ならびに8A5(遊離C末端)への特異的結合の欠損を特徴とする。一部の断片は、ELADW43(遊離N末端)と5C12(111-118)、LB509(115-122)とELADW47(118-123)および8A5(遊離C末端)への特異的結合、ならびにELADW43(遊離N末端)への特異的結合の欠損を特徴とする。

10

20

【0052】

一部の断片もしくは完全長のシヌクレインは、シヌクレインの125番目または129番目の位置を占めるチロシン残基がリン酸化もしくはニトロ化されたものである。また、125番目のアミノ酸セリンを保持している断片、もしくは完全長のシヌクレインは、この位置でリン酸化されていてもよい。125番目の位置のリン酸化もしくはニトロ化または129番目の位置のリン酸化に関し、患者において健常者集団の平均に対する増強が検出されることがレヴィー小体病の指標となる。検出は、125番目の位置がリン酸化もしくはニトロ化されたシヌクレインに特異的な抗体を用いて行うことができる。レベルは、健常者集団の平均プラス1標準偏差より大きい場合、増大していると見なされる。

30

【0053】

本発明はまた、上記のユビキチン化部位のうち少なくとも1つを含む、シヌクレインの最大5個または10個連続する残基の単離されたペプチドも提供する。これらのペプチドは、ユビキチン化のための全長シヌクレインの部位と競合させるために使用され得るか、または全長シヌクレインのユビキチン化をブロックする抗体を生成するための免疫原として使用され得る。

【0054】

本発明の断片は、以前に報告されたアルツハイマー病アミロイドの非A成分(NAC)とは異なる。この断片は、少なくとも28個のアミノ酸残基(60番目から87番目までの残基)および、任意に35個のアミノ酸残基(61番目から95番目までの残基)から成る。Iwairā, Biochemistry 34: p10139-10145; Jensenら, Biochem. J. 310(Pt1): p91-94(1995年); ジェンバンク・アセッション番号S56746を参照されたい。

40

【0055】

文脈から別に明らかとはならない限り、シヌクレインもしくはその断片に言及する場合、前記の天然のヒト型アミノ酸配列もしくはその断片、ならびに対立遺伝子、種および誘発による変異体(例えば、E83Q、A90V、A76T)などのアナログを含む。上記のアナログと天然ヒト型アミノ酸配列とが最大限にアラインメントされている場合、このアナログのアミノ酸にはこのヒト型アミノ酸配列の対応するアミノ酸と同じ番号が付与

50

される。通常、アナログは、多くの場合、保存的置換によって、1箇所、もしくは2箇所、または数箇所の位置で天然ペプチドと異なる。一部の天然の対立遺伝子による変異体は、遺伝性LBDと遺伝的な関連がある。用語「対立遺伝子変異体 (allelic variant)」は、同種の異なる個体の遺伝子間の変異およびその遺伝子によりコードされるタンパク質の対応する変異を指すために使用される。対立遺伝子変異体としては、E46K、A30PおよびA53T (最初の文字は、配列番号1におけるアミノ酸を示し、数字は、配列番号1におけるコドンの位置であり、そして二番目の文字は対立遺伝子変異体におけるアミノ酸である) が挙げられる。アナログは、対立遺伝子変異体の任意の組み合わせを含むことができる。A53T変異は、この突然変異のない健常者のリン酸化の基準に比し、この突然変異を有する者ではシヌクレインの129番目の位置においてリン酸化レベルの上昇を伴う。アナログは、天然ペプチドと少なくとも80もしくは90%の配列同一性を示す。また、一部のアナログは、非天然型アミノ酸を、または1箇所、もしくは2箇所、または数箇所の位置のNもしくはC末端アミノ酸が修飾されたものを含む。例えば、天然型のグルタミン酸残基はイソ-アスパラギン酸で置換されることがある。非天然型アミノ酸の例としては、D-, 2置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、4-ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタミン酸、イプシロン-N, N, N-, トリメチルリジン、イプシロン-N-アセチルリジン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、オメガ-N-メチルアルギニン、-アラニン、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、チロキシン、-アミノ酪酸、ホモセリン、シトルリンおよびイソアスパラギン酸が挙げられる。通常、アナログは、天然ヒト型シヌクレインに対するポリクロナール抗体集団に特異的に結合する。そして、天然ヒトシヌクレインの特定の断片についてのアナログの各々の末端はまた、天然の断片のそれぞれの末端に末端特異的であるモノクローナル抗体に特異的に結合する。また、本発明は、D-アミノ酸でシヌクレインの大部分もしくは全ての位置の対応する天然L-アミノ酸を置換させることができるD-ペプチドを提供する。形態SNx-yで示される断片は、アミノ酸Xで始まり、アミノ酸Yで終わり、そしてXおよびYの間の各々のアミノ酸を含む、シヌクレインの断片を意味する。このような断片は、異種ポリペプチドに連結され得る (必ずしもそうである必要は無い) が、ヒトシヌクレインの他のアミノ酸には連結され得ず、それゆえ、この断片は、Xより前で始まるか、Yの後まで続く。上記のように初期設定のパラメータを使用して、この断片が配列番号1と最大限に整列される場合、この断片の残基は配列番号1にしたがって番号付けされる。

【0056】

シヌクレイン、その断片およびアナログは、固相ペプチド合成法もしくは組換え発現法によって合成することができ、または自然源から入手することができる。自動ペプチド合成機が、アプライド・バイオシステムズ社 (フォスター・シティ、カリフォルニア) などの数多くの製造業者から市販されている。組換え発現法では大腸菌などの細菌、酵母、昆虫細胞もしくは哺乳動物細胞を用いることができる。組換え発現の方法については、Sambrookら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (C.S.H.P. Press, NY, 第2版、1989年) に記載されている。

【0057】

(III. レヴィー小体病)

レヴィー小体病 (LBD) の特徴は、ドーパミン作動系の変性、運動性変調、認知障害、およびレヴィー小体 (LB) の形成である。(McKeithら, *Clinical and pathological diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Report of the DLB International Workshop, Neurology* (1996年) 47: p1113-24)。レヴィー小体は神経細胞に見出される球状のタンパク質沈着物である。これが脳内に存在すると、アセチルコリン、ドーパミンなどの化学的メッセンジ

ヤーの作用が遮断されて脳の正常な機能が妨げられる。レヴィー小体病としては、(特発性パーキンソン病(PD)を含む)パーキンソン病、レヴィー小体を有する痴呆(DLB)としても知られる瀰漫性レヴィー小体病(DLBD)、アルツハイマー病とパーキンソン病との併発、および多系統萎縮症(MSA)が挙げられる。DLBDは、アルツハイマーおよびパーキンソン病の症状を共有する。DLBDは、主にレヴィー小体の存在部位においてパーキンソン病と異なる。DLBDではレヴィー小体は主として皮質に形成される。パーキンソン病ではこれは主として黒質に形成される。他のレヴィー小体病としては、自律神経失調症、レヴィー小体性燕下困難、偶発性LBD、遺伝性LBD(例えば、シヌクレイン遺伝子PARK3およびPARK4の突然変異)ならびに多系統萎縮症(例えば、オリブ橋小脳萎縮症、線条体黒質変性症およびシャイ・ドレーガー症候群)が挙げられる。

【0058】

(IV. トランスジェニック動物および細胞)

本発明は、上述のC末端切断型シヌクレインをコードしている核酸セグメントを含む導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック動物を提供する。好ましい切断形態は、SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN1-133およびSN1-135である。この導入遺伝子はこのトランスジェニック動物の体細胞および生殖系細胞の全体もしくは実質上全体に存在することが好ましい。上記C末端切断型シヌクレインをコードしている核酸セグメントは、この切断型シヌクレインがこの動物の神経細胞内で発現されることを可能にする1つ以上の調節性セグメントに作動可能なように結合させる。ラット神経特異的エノラーゼ・プロモータ、ヒト・ α -アクチン遺伝子プロモータ、ヒト血小板由来成長因子B(PDGF-B)鎖遺伝子プロモータ、ラット・ナトリウム・チャンネル遺伝子プロモータ、マウス・ミエリン塩基性タンパク質遺伝子プロモータ、ヒト銅-亜鉛スーパーオキシド・ジスムターゼ遺伝子プロモータ、哺乳動物POU-ドメイン調節遺伝子プロモータなどのプロモータを使用することができる。これらのうち、PDGFプロモータが特に適している。任意選択的に、誘導性プロモータを使用する。亜鉛などの重金属をマウスの水もしくは餌に加えることにより調節することができるマウス・メタロチオン・プロモータが適している。このようなトランスジェニック動物は、完全長のシヌクレインを有するトランスジェニック動物の作製のために(Masliahら, AM J Pathol (1996年) 148: p 201-10およびFeanyら, Nature (2000年) 404: p 394-8)により報告され、もしくは(突然変異型APPを有するトランスジェニック動物の作製に関する)米国特許第5,811,633号に開示されたのと同じ一般的な方法によって作製することができる。任意選択的に、切断型シヌクレインタンパク質を発現する導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、アルツハイマー病モデルなどの他の神経性疾患モデルと交配させることができる。例えば、切断型シヌクレインタンパク質を発現する導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、例えば、Gamesら, Nature 373: p 523 (1995年); McConegogueら、米国特許第5,612,486号; Hsiaoら, Science 274: p 99 (1996年); Staufenbielら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: p 13287-13292 (1997年); Sturchler-Pierratら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: p 13287-13292 (1997年); Borcheltら, Neuron 19: p 939-945 (1997年)に記載されている導入遺伝子により発現されるFAD突然変異を含むAPPを有するトランスジェニック動物と交配させることができる。このような交配を実施する方法については、例えば、完全長のシヌクレインを発現するトランスジェニックマウスとGamesらによるPDAPPマウスとの交配を報告しているMasliahら, PNAS USA 98: p 12245-12250 (2001年)に記載がある。本発明のトランスジェニック動物は、好ましくは、マウス、ラットなどの齧歯動物、もしくはショウジョウバエなどの昆虫である。トランスジェニック動物は、生殖細胞系段階で導入遺伝子を導入することにより作製され得、この場合、トランスジェニック動物

10

20

30

40

50

の全てまたは実質的に全ての細胞（体細胞突然変異を介しての稀な損失を除いて）は、そのゲノムに組み込まれた導入遺伝子を含む。導入遺伝子は、細胞または動物への微量注入（microinjection）、核移入（nuclear transfer）またはウイルス感染によって導入され得る。レンチウイルスは、後者に特に適している。あるいは、導入遺伝子は、動物の脳へのウイルス感染によって導入され得る。このような導入遺伝子は、レシピエント動物（recipient animal）の生殖細胞系の一部ではないが、疾患の原因となる脳の領域（例えば、黒質）に標的化され得る。このような動物モデルは、脳細胞のゲノムにシヌクレインを取り込み、シヌクレイン病原性疾患の少なくとも1つの特徴を発症し易くなる。レンチウイルスは、シヌクレイン導入遺伝子をそのように脳に導入するために、適切なピヒクルを提供する（Brain Pathology 13, 364 - 372 (2003); Bjorklund, Trends Neurosci. 26, 386 - 92 (2003), Lothariusら、J. Biol. Chem. 277, 38884 - 94 (2002), Zhouら、Brain Research 866, 33 - 43 (2000)を参照のこと）。

10

【0059】

動物モデルで切断型シヌクレインを発現させることにより、レヴィー小体病の少なくとも1つの特徴を形成する性質を付与された動物が得られる。このような特徴としては、シヌクレインの細胞内沈着物の量の増加、レヴィー小体形成の増大、ならびに同種の正常な非トランスジェニック動物と比較した場合の認識および運動機能の障害が挙げられる。このようなトランスジェニック動物は、レヴィー小体病の処置における薬理活性について薬剤をスクリーニングするのに有用である。

20

【0060】

また、本発明は、凝集した切断型シヌクレインを含む封入体を構成する切断型シヌクレインで形質転換した細胞を提供する。この形質転換細胞は、GT1-7神経細胞（Hsuehら、Am. J. Pathol. 157: p401 - 410 (2000年)）、PC12細胞、SY5Y神経芽腫細胞などの神経細胞であることが好ましい。また、PEAK細胞も使用することができる。これらの細胞はヒト細胞であることが好ましい。この切断型発現の発現を確実にする1つ以上の調節性配列に作動可能なように結合させた切断型シヌクレインをコードしているセグメントを含むベクターをこれらの細胞内に形質導入する。形質導入した細胞を用いることにより、シヌクレイン封入体を除去する活性について薬剤をスクリーニングすることができる。

30

【0061】

（V.スクリーニング方法）

本発明は、LBDの処置に有用な薬理活性を有する薬剤を特定するためのいくつかのスクリーニング方法を提供する。この方法は、インビトロで、または細胞もしくはトランスジェニック動物を用いて実施することができるスクリーニング、および活性の指標としての種々のパラメータを調べるスクリーニングを含む。これらのスクリーニングにおいて活性を有すると判定された薬剤は、LBDの動物モデルによる二次スクリーニングもしくは臨床試験において再度試験することにより、こうした疾患の行動上その他の症状に対する活性を測定することができる。

40

【0062】

（1.インビトロ）

インビトロ・アッセイは、切断型シヌクレイン（特に、SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN1-133およびSN1-135）の凝集に対する薬剤の阻害能を調べるために行う。シヌクレインのインビトロ凝集を分析するための基本方式については、完全長のシヌクレインに関するものではあるが、（Wood, J. Biol. Chem. 274: p19509 - 19512 (1999年)）に記載がある。切断断片は、アッセイを行うためにリン酸化され得る。このアッセイは、全長のリン酸化シヌクレインを使用しても実行され得る。リン酸化は、好ましくは129位である。シヌクレインは、セリンキナーゼを使用してインビトロでリン酸化され得る。本発明の方法では、

50

このアッセイを試験すべき薬剤の存在下で実施する。薬剤存在下の シヌクレイン凝集の速度もしくは程度を測定して、薬剤を用いない同時的もしくはヒストリカルな対照における シヌクレイン凝集の速度もしくは程度と比較する。対照に対して薬剤存在下の凝集の速度もしくは程度が低下した場合、これによってこの薬剤に切断型 シヌクレインの凝集を阻害する活性があることが明らかになる。この活性は、レヴィー小体病を治療もしくは予防するのに有用となる可能性がある。

【0063】

(2. 細胞によるアッセイ)

細胞による一部のアッセイは、上述の切断型 シヌクレイン（特に、SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN1-133およびSN1-135）をコードしている核酸を用いて、また、任意選択的にAla30ProもしくはAla53Thrなどの遺伝的変種を用いて形質導入した細胞で実施する。細胞はまた、パーキンソン病に関連する他の遺伝子（例えば、ロイシンリッチリピートキナーゼ（leucine rich repeat kinase）PARK8）に突然変異を有し得る。このような細胞を試験対象の薬剤と接触させ、この切断型 シヌクレインの凝集の程度の速度を測定する。次いで、シヌクレインの凝集の程度の速度を、薬剤の非存在下に同様に形質導入した対照細胞と比較する。凝集は、免疫組織化学的分析、光学顕微鏡の使用、沈降、もしくはゲル分析によってモニターすることができる。ゲル分析を用いると、二量体、三量体もしくはそれ以上のオリゴマーの形成、および高レベルのオリゴマー形成によるシヌクレインのゲルへの侵入不能性を検知することができる。対照に対して試験薬剤存在下の凝集の速度もしくは程度が低下した場合、これによって薬剤が切断型 シヌクレインの凝集を阻害する薬理活性を有することが明らかになる。この活性は、レヴィー小体病を治療もしくは予防するのに有用となる可能性がある。

10

20

30

40

【0064】

細胞による他のアッセイは、完全長の シヌクレイン、および任意選択的にAla30ProもしくはAla53Thrなどの遺伝的変種をコードしている核酸を用いて形質導入した細胞で実施する。細胞はまた、パーキンソン病に関連する他の遺伝子（例えば、ロイシンリッチリピートキナーゼであるPARK8）に突然変異を有し得る。類似のアッセイを、シヌクレインを天然発現する細胞に実行することもできる。このような細胞を試験対象の薬剤と接触させ、切断型 シヌクレイン（特に、SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN1-133およびSN1-135）および/またはリン酸化型もしくはニトロ化型シヌクレインの形成の速度もしくは程度を測定する。こうした型の存在は、シヌクレインに対する1種以上の抗体を用いるウェスタン・ブロッティングによって検出することができる。末端特異的抗体（即ち、切断型には結合するが、完全長のシヌクレインには結合しない抗体）はこの分析に特に有用である。また、種々のエピトープ特異性を有する抗体のコレクションを用いることもできる。例えば、切断型 シヌクレインの存在は、インタクトな シヌクレインの115番目～125番目または118番目～135番目のアミノ酸（特に、SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN1-133、およびSN1-135）によってほぼ規定されるアミノ酸セグメントのエピトープN末端を認識する抗体を用いてプロットした時にバンドが認められること、およびこの領域のエピトープC末端を認識する抗体でプロットした時にバンドが認められないことによって明らかにすることができる。薬剤の存在下における切断型 シヌクレインおよび/またはリン酸化型もしくはニトロ化型の形成の速度もしくは程度は、薬剤非存在下の同様な対照細胞と比較する。対照に対して試験薬剤存在下の切断型 シヌクレイン形成の速度もしくは程度が低下した場合、これによって、薬剤が シヌクレインの切断型へのプロセッシングを阻害する薬理活性を有することが明らかになる。この活性は、LBDを治療もしくは予防するのに有用である。

【0065】

(3. トランスジェニック動物によるアッセイ)

トランスジェニック動物は、上述の切断型 シヌクレイン（特に、SN1-115、S

50

N 1 - 1 1 9、S N 1 - 1 2 2、S N 1 - 1 3 3 または S N 1 - 1 3 5)、および任意選択的に A 1 a 3 0 P r o もしくは A 1 a 5 3 T h r などの遺伝的変種を発現する導入遺伝子を有する。トランスジェニック動物はまた、パーキンソン病に関連する他の遺伝子(例えば、ロイシンリッチリピートキナーゼである P A R K 8)に突然変異を保持し得る。このような動物を試験対象の薬剤と接触させ、この切断型 シヌクレインの凝集の程度の速度を、同時的もしくはヒストリカルな対照との比較で測定する。この対照は、通常、上記薬剤に接触させなかった同種の同様なトランスジェニック動物である。トランスジェニック動物における シヌクレインの凝集は、実施例で説明したように、ウエスタン・ブロッティングもしくは免疫組織化学によってモニターすることができる。あるいは、もしくはさらに、このようなトランスジェニック動物における薬剤の活性は、実施例で説明したように、運動もしくは認識上の特徴などの行動上の特徴から測定することができる。このようなアッセイでは、薬剤の薬理活性は、薬剤に接触させなかった同様な対照トランスジェニック動物と比較した場合の運動もしくは認識上の特徴の改善(即ち、このような特徴の障害の低減)によって示される。

10

【0066】

別のアッセイは、完全長型 シヌクレイン、および任意選択的に A 1 a 3 0 P r o もしくは A 1 a 5 3 T h r、またはパーキンソン病に関連する他の遺伝子(例えば、ロイシンリッチリピートキナーゼである P A R K 8)における突然変異などの遺伝的変種を発現する導入遺伝子を有するトランスジェニック動物を用いて実施する。類似のアッセイを、内因性 シヌクレインを発現する非トランスジェニック動物に実行することができる。このような動物を試験対象の薬剤と接触させ、切断型 シヌクレイン(特に、S N 1 - 1 1 5、S N 1 - 1 1 9、S N 1 - 1 2 2、S N 1 - 1 3 3 または S N 1 - 1 3 5)、および任意選択的に A 1 a 3 0 P r o もしくは A 1 a 5 3 T h r などの遺伝的変種についてこれらの出現の速度もしくは程度を検出する。このような型は、(細胞によるアッセイに対して述べたように)適切な抗 シヌクレイン抗体を用いたウエスタン・ブロッティングもしくは免疫組織化学的分析によって検出することができる。切断型 シヌクレインおよび/またはリン酸化もしくはニトロ化型の出現の速度の程度は、薬剤に接触させなかった同様なトランスジェニック動物に相当する同時的もしくはヒストリカルな対照におけるそのような型の出現の速度もしくは程度と比較する。対照に対して試験薬剤に接触させた動物における切断型 シヌクレイン出現の速度もしくは程度が低下した場合、これによって、薬剤が完全長の シヌクレインの切断型へのプロセッシングを阻害する薬理活性を有することが明らかになる。

20

30

【0067】

(4.スクリーニング対象の薬剤)

スクリーニング対象の薬剤としては、シヌクレインに対する抗体、シヌクレインのペプチド、L B D の処置において活性を有することが知られ、もしくは考えられる薬物、天然物、およびコンビナトリアル・ライブラリが挙げられる。好ましいシヌクレインのペプチドは、シヌクレインの 1 1 4 番目から 1 1 7 番目、1 1 7 番目から 1 2 6 番目、1 1 8 番目から 1 2 5 番目、1 1 7 番目から 1 2 0 番目、1 2 0 番目から 1 2 4 番目、1 3 0 番目から 1 3 6 番目、1 3 2 番目から 1 3 8 番目、1 3 1 番目から 1 3 5 番目、1 3 2 番目から 1 3 4 番目、1 3 3 番目から 1 3 7 番目、1 3 4 番目から 1 3 6 番目までのアミノ酸を含む 3 0、2 5、2 0、1 0、5 もしくはそれ以下の個数のアミノ酸から成る比較的短いペプチドである。任意選択的に、C 末端切断型 シヌクレインを生じさせる切断部位のすぐ N 末端側のアミノ酸、例えば、シヌクレインの残基 1 1 5 - 1 1 6 の間、残基 1 1 9 - 1 2 0 の間、残基 1 2 2 - 1 2 3 の間、残基 1 3 3 - 1 3 4 の間および残基 1 3 5 - 1 3 6 の間を、この切断部位を挟む 2 つのアミノ酸間に加水分解されない結合を形成する遷移状態アナログ・アミノ酸で置換する。アナログの例としては、スタチン、ヒドロキシエチレン、ヒドロキシエタノールアミン、A H P P A、A C H P A およびこれらの誘導体などの遷移状態アナログがある。また、天然型 シヌクレインの 1 つ以上のアミノ酸を他の天然型アミノ酸で置換することもできる。

40

50

【0068】

また、スクリーニング対象の天然物は、国立がんセンター研究所天然物リポジトリ (National Cancer Institute's Natural Product Repository) (ベセズダ、MD) から入手することもできる。また、ペプチドその他の化合物のランダム・ライブラリを適合性についてスクリーニングすることもできる。コンビナトリアル・ライブラリは、段階的方法で合成することができる多くの種類の化合物について作製することができる。このような化合物としては、ポリペプチド、 α -ターン類似物質、多糖類、リン脂質、ホルモン、プロスタグランジン、ステロイド、芳香族化合物、複素環式化合物、ベンゾジアゼピン、オリゴマー-N-置換グリシン、およびオリゴカルバメートが挙げられる。これらの化合物の大きなコンビナトリアル・ライブラリは、アフィマックス社の国際公開第95/12608号、アフィマックス社の国際公開第93/06121号、コロンビア大学の国際公開第94/08051号、ファーマコペア社の国際公開第95/35503号およびスクリップス社 (Scrrips) の国際公開第95/30642号 (これらのいずれも、本明細書において参考として援用される) に開示されているコード化ライブラリ合成 (ESL) 法によって構築することができる。また、ペプチド・ライブラリは、ファージ・ディスプレイ法によって作製することもできる。例えば、Devlinの国際公開第91/18980号を参照されたい。コンビナトリアル・ライブラリおよび他の化合物は、最初に、これらのシヌクレインへの結合能を測定することによって適合性をスクリーニングすることができる。

10

【0069】

(VI. 毒性アッセイ)

これらのスクリーニング・アッセイに開示されているのと類似の方法を用いて、既存の薬物、食品、環境有害物質および他の化合物がシヌクレインのプロセッシング、リン酸化もしくは凝集の促進を介して毒性作用を発現するかどうかを調べることができる。このようなアッセイは上記スクリーニング・アッセイと同様に行うことができる。毒性作用は、上記スクリーニング・アッセイにおける薬理活性とは逆の結果で示される。

20

【0070】

(VII. プロテアーゼの単離)

完全長シヌクレインの本発明の切断型へのプロセッシングは、プロテアーゼを用いて行う。このプロテアーゼは、上述のスクリーニング法によって特定される阻害剤を用いて精製することができる。好ましい阻害剤は、切断部位 (例えば、残基115-116の間、残基119-120の間、残基122-123の間、残基133-134の間および残基135-136の間) に対してN末端側の残基を遷移状態アナログで置換した114-117、111-126、113-126、113-119、117-121または120-125、または130-136、132-138、131-135、133-134、133-137、または135-136の残基を含む、例えば、配列番号1に由来する最大20個連続するアミノ酸のシヌクレインのペプチドである。このような阻害剤をアフィニティー精製試薬として用いることによって脳細胞の抽出物から上記プロテアーゼを精製する。この細胞は、正常者の死体もしくはLBD病に罹患していた者の死体から入手することができる。プロテアーゼのレベルは後者で高いものであり得る。このプロテアーゼは、シヌクレイン基質にこれを作用させ、切断産物の形成をモニターすることによってアッセイすることができる。以下に記載される末端特異的抗体は、切断産物を検出するために有用である。この基質は、例えば、上述の天然のヒト型シヌクレイン、切断部位の両側から挟む残基を有するその断片、もしくは突然変異が遺伝型LBDと関連するその突然変異型とすることができる。任意選択的に、こうした基質のC末端を固相に、N末端を標識に固定化することができる。基質が切断されると、この標識が液相に遊離する。この液相は固相から容易に分離されるので、標識の量を蛋白分解活性の指標として測定することができる。

30

40

【0071】

(VII. 末端特異的抗体)

50

本発明は末端特異的抗体を提供する。この抗体は、(C末端)切断型 シヌクレイン、好ましくはSN1-115、SN1-116、SN1-117、SN1-118、SN1-119、1-120、1-121、1-122、1-123、1-124、1-125もしくは1-126からなる群から選ばれる型に特異的に結合するが、完全長のシヌクレインには特異的な結合を示さない。好ましい抗体は、SN1-115、SN1-119、SN1-122、SN1-133およびSN1-135に対して末端特異的である。このような抗体は、シヌクレイン沈着物のインビトロでのイメージングに、および治療剤として(下記参照)、ならびに上述のスクリーニング方法においてシヌクレインの蛋白分解性切断で生じる切断産物を検出するのに有用である。また、対応するC末端側断片、例えば、116-140、117-140、118-140、119-140、120-140、121-140、122-140、123-140、124-140、125-140、126-140、134-140および136-140に対する末端特異的抗体を提供する。好ましい断片は、116-140、120-140、123-140、134-140および136-140である。こうした末端特異的抗体は、これらの断片のN末端を認識することによって、完全長のシヌクレインには特異的な結合を示すことなく、上記断片に特異的に結合する。

10

【0072】

好ましい末端特異的抗体は、SN1-119のC末端に特異的なELADW-101(ポリクローナル)および12C6(モノクローナル)、ならびにSN1-122のC末端に特異的なELADW-105(ポリクローナル)および7G8(モノクローナル)である。このモノクローナル抗体は、従来の方法により生成されたハイブリドーマによって発現されるマウスモノクローナル抗体である。

20

【0073】

このような抗体は、実験動物をシヌクレインもしくはその断片で免疫して抗体を生じさせ、得られた抗体をスクリーニングして所望の結合活性を有するものを特定することにより作製することができる。任意選択的に、免疫は、本発明の切断断片のC末端を含む20個未満(通常、7または8アミノ酸)のアミノ酸からなる比較的短いペプチド(例えば、SN99-118、SN106-115、もしくはSN110-119、SN113-122、SN126-133、SN128-135)を用いて行うことができる。任意選択的に、こうした短いペプチドは、免疫反応の誘発を促進するキャリアに結合させる。例えば、ペプチドCGGDMPVD(配列番号10、これは、CGGリンカーを有するアミノ酸SN115-119に対応する)は、抗体(例えば、ELADW-101および12C6)を生成するために有用であり、そしてペプチドCGGVDPDN(配列番号10、これは、CGGリンカーを有するアミノ酸118-122に対応する)は、抗体ELADW-105および7G8を生成するために有用である。

30

【0074】

任意選択的に、標識断片もしくは固定化断片への特異的な結合は、非標識の完全長シヌクレインと競合させる形で行うことができる。任意選択的に、抗体の大きなライブラリは、ファージ・ディスプレイ法を用いて同時にスクリーニングすることができる。

【0075】

非ヒト、例えば、マウス、モルモット、霊長類、ウサギもしくはラットのモノクローナル抗体は、(あらゆる目的で引用により本明細書に組み込まれている)Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSP NY, 1988年)に記載されている方法で作製することができる。実験動物の免疫には、完全フロインドアジュバントと、これに続いて不完全アジュバントを用いることが好ましい。通常、ウサギもしくはモルモットはポリクローナル抗体の作製に用いられる。一般に、モノクローナル抗体の作製にはマウスを用いる。結合は、例えば、ウェスタン・ブロットもしくはELISAによって評価することができる。抗体のエピトープは、この抗体に特異的に結合する最小の断片によって規定される。あるいは、エピトープ特異性は、試験抗体および対照抗体がシヌクレインへの結合に対して競合する競合アッセイによ

40

50

って調べることができる。試験抗体および対照抗体が競合する場合、これらは同じエピトープ、もしくは1つの抗体の結合がもう一方の抗体の結合を妨げるのに十分互いに近接したエピトープに結合する。

【0076】

キメラ抗体およびヒト化抗体は、キメラ抗体もしくはヒト化抗体の作製の出発原料となるマウスその他の非ヒト抗体と同一もしくは同様の結合特異性および結合親和性を有する。キメラ抗体は、その軽鎖および重鎖の遺伝子が、異なる種に由来する免疫グロブリン遺伝子セグメントから、通常遺伝子操作によって構築された抗体である。例えば、マウス・モノクロナール抗体からのこうした遺伝子の可変(V)セグメントを、ヒトのIgG1、IgG4などの定常(C)セグメントに結合させることができる。ヒト・アイソタイプIgG1が好ましい。一部の方法として、この抗体のアイソタイプはヒトIgG1である。また、一部の方法として、IgM抗体を用いることもできる。従って、代表的なキメラ抗体は、マウス抗体のVドメイン即ち抗原結合ドメインとヒト抗体のCドメイン即ちエフェクタ・ドメインとから成るハイブリッド抗体である。

10

【0077】

ヒト化抗体は、実質的にヒト抗体(アクセプター抗体と呼ばれる)からの可変領域フレームワーク残基、および実質的にマウス抗体(ドナー免疫グロブリンと呼ばれる)からの相補性決定領域を有する。QueenらのProc. Natl. Acad. Sci. USA 86: p 10029 - 10033 (1989年)、国際公開第90/07861号、米国特許第5,693,762号、米国特許第5,693,761号、米国特許第5,585,089号、米国特許第5,530,101号、およびWinterの米国特許第5,225,539号(これらのいずれも、あらゆる目的のため全文引用により本明細書に組み込まれている)を参照されたい。また、定常領域は、存在する場合、実質的にもしくは完全にヒト免疫グロブリン由来のものとする。ヒト可変ドメインは、通常、フレームワーク配列が上記CDRの由来するマウス可変領域ドメインと高度の配列同一性を示すヒト抗体から選ばれる。重鎖および軽鎖の可変領域フレームワーク残基は、同一もしくは異なるヒト抗体配列に由来するものとする。ヒト抗体の配列は、天然型ヒト抗体の配列もしくは数種のヒト抗体のコンセンサス配列とすることができる。Carterらの国際公開第92/22653号を参照されたい。上記ヒト可変領域フレームワーク残基から特定のアミノ酸を選び、CDRの立体構造および/または抗原への結合に対して及ぼし得る影響に基づいて置換する。このような及ぼし得る影響についての研究は、モデル化、特定の位置のアミノ酸の特性の検討、または特定アミノ酸の置換もしくは突然変異の影響についての経験的観察によって行われる。

20

30

【0078】

シヌクレインに対するヒト抗体は、以下に説明する種々の方法により形成される。特定のマウス抗体と同じエピトープ特異性を有する一部のヒト抗体は、競合結合実験もしくは別の方法により選定する。ヒト抗体を得る方法としては、Oestbergら, Hybridoma 2: p 361 - 367 (1983年); Oestbergの米国特許第4,634,664号; およびEnglemanらの米国特許第4,634,666号(これらはいずれも、あらゆる目的で全文引用により本明細書に組み込まれている)に記載されているトリオーマ法、例えば、Lonbergらの国際公開第93/1222号、米国特許第5,877,397号、米国特許第5,874,299号、米国特許第5,814,318号、米国特許第5,789,650号、米国特許第5,770,429号、米国特許第5,661,016号、米国特許第5,633,425号、米国特許第5,625,126号、米国特許第5,569,825号、米国特許第5,545,806号、Nature 148: p 1547 - 1553 (1994年)、Nature Biotechnology 14: p 826 (1996年)、Kucherlapatiの国際公開第91/10741号(これらはいずれも、あらゆる目的で全文引用により本明細書に組み込まれている)に記載されているような、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の少なくとも1つのセグメントをコードしている導入遺伝子を有する非ヒト遺伝子導入哺乳動物の使用、

40

50

ならびにファージ・ディスプレイ法（例えば、Dowerらの国際公開第91/17271号およびMcCaffertyらの国際公開第92/01047号、米国特許第5,877,218号、米国特許第5,871,907号、米国特許第5,858,657号、米国特許第5,837,242号、米国特許第5,733,743号および米国特許第5,565,332号（これらはいずれも、あらゆる目的で全文引用により本明細書に組み込まれている））が挙げられる。

【0079】

キメラ抗体、ヒト化抗体もしくはヒト抗体の重鎖および軽鎖の可変領域は、ヒト定常領域の少なくとも一部分に結合させることができる。定常領域の選択は、一部、抗体依存性補体および/または細胞媒介毒性が所望されるかどうかによって決まる。例えば、アイソタイプIgG1およびIgG3は補体活性を有するが、アイソタイプIgG2およびIgG4は有しない。また、アイソタイプの選択は、脳内への抗体の通過に影響することがある。ヒト・アイソタイプIgG1が好ましい。軽鎖定常領域はラムダ型もしくはカッパ型とすることができる。抗体は、2本の軽鎖および2本の重鎖を含む四量体として、もしくは別々の重鎖、軽鎖として、またはFab、Fab'、F(ab')₂およびFvとして、あるいは重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインをスペーサを介して結合させた一本鎖抗体として、発現させることができる。

10

【0080】

また、別の実施態様として、シヌクレインの109番目から120番目の残基内もしくは115番目から122番目の残基内のエピトープまたは43番目から51番目の残基および58番目から65番目の残基内の不連続なエピトープに特異的に結合し、あるいはシヌクレインのC末端に対して末端特異的である、ヒト化型、キメラ型およびヒト型などのモノクローナル抗体を提供する。シヌクレインのC末端に対する末端特異的抗体は、遊離タンパク質としてシヌクレインに特異的に結合することができるが、シヌクレインのC末端が別のペプチドと結合しているような融合タンパク質の構成成分としてのシヌクレインには特異的に結合できないという性質によって、識別することができる。これらの抗体は、治療活性についてスクリーニングすることができ、肯定的な結果が得られれば、治療法に用いることができる。また、こうした抗体は、前述のように、シヌクレインの断片を検出するのにも用いることができる。

20

【0081】

(IX. 診断剤)

本発明は患者においてLBをインビボでイメージングする方法を提供する。このような方法は、PDのレビー小体病もしくはこれに対する感受性を診断し、またはこれらの診断を確認するのに有用である。例えば、この方法は痴呆の症状を示す患者において用いることができる。この患者がLBを有する場合、患者はレビー小体病に罹患していると考えられる。また、この方法は、無症候性の患者においても用いることができる。異常なアミロイド沈着が存在すると、将来症候性疾患に罹患しやすいことが分かる。また、この方法は、以前にレビー小体病と診断された患者において疾患の進行および/または治療に対する反応をモニターするのに有用である。

30

【0082】

この方法は、患者の体内でシヌクレインに結合する上記のような末端特異的抗体を投与し、次いで結合した後にこの抗体を検出することによって行うことができる。所望であれば、除去反応は、Fabなどの、完全長の定常領域を欠く抗体断片を用いることにより回避することができる。一部の方法では、同一の抗体に治療剤および診断試薬としての両方の機能を持たせることができる。

40

【0083】

診断上の画像化(diagnostic imaging)は、リン酸化シヌクレインに特異的な抗体を使用して実行され得る(例えば、同時係属出願第10/984,192号に記載される、11A5(リン酸特異的(phosphor-specific))モノクローナルまたは5C12モノクローナル(シヌクレインのリン酸化形態および非

50

リン酸化形態に結合する))。 シヌクレインの沈着物に伴うリン酸化 シヌクレインの存在は、シヌクレイン病原性疾患またはそれへの感受性の指標である。ユビキチン化 シヌクレインの存在もまた疾患のマーカーである。これらは、2工程アッセイを使用して検出され得る。この2工程アッセイにおいて、シヌクレインは、シヌクレインに対する第一の抗体により沈殿し、そしてユビキチン化 シヌクレインの量がユビキチンに対する抗体を使用して検出される。

【0084】

診断試薬は、患者の体内に静注することにより、または頭蓋内注射によってかもしくはドリルで穴をあけた頭蓋骨から直接脳内に投与することができる。試薬の投与量は治療方法の場合と同じ範囲内とする必要がある。通常、この試薬は標識するが、一部の方法では、シヌクレインに対して親和性を有する一次試薬は標識せず、二次標識試薬を用いて一次試薬に結合させる。標識の選択は検出方法によって決まる。例えば、蛍光標識は光学的検出に適している。常磁性標識の使用は外科的処置を必要としない断層撮影法による検出に適している。また、放射活性標識はPETもしくはSPECTを用いて検出することができる。

10

【0085】

診断は、標識された部位の数、大きさおよび/または強度を対応するベースラインレベルと比較することにより行う。このベースラインレベルは非罹患集団の平均のレベルとすることができる。また、ベースラインレベルは同一患者で測定した以前のレベルとすることもできる。例えば、処置を始める前の患者においてベースラインレベルを測定し、その後の測定値をこのベースラインレベルと比較することができる。ベースラインに対するレベルの減少は、処置に対する好反応を示唆するものである。

20

【0086】

また、末端特異的抗体は、切断型 シヌクレインが脳脊髄液または他の体組織もしくは体液に存在するかどうかを調べるのに有用である。この型が、非罹患個体集団の正常レベルに対し、患者において顕著に変化したレベル(通常、より高いレベル)(即ち、平均プラス1標準偏差より高いか、または低いレベル)で存在することは、LBDに罹患しているか罹患性があることを示すものである。

【0087】

(X. 処置方法)

本発明は、レヴィー小体病に罹患しているか、罹患する危険性を有する患者においてこの疾患を予防もしくは治療するいくつかの方法を提供する。治療剤としては、上述の切断型 シヌクレイン(特に、SN1-115、SN-1-119、SN1-122、SN1-133およびSN1-135)および抗体を誘導するのに有効なその断片、上記のような末端特異的抗体、ならびに上述のような、切断型 シヌクレイン断片の凝集もしくはシヌクレインの蛋白分解性プロセッシングに対する阻害剤が挙げられる。必要に応じて、この断片は、129位において特にリン酸化される。他の因子としては、全長のリン酸化シヌクレイン(好ましくは、129位での)、シヌクレインのリン酸化を阻害する因子、ユビキチン化もしくは別の方法によりリン酸化 シヌクレインの除去を促進する因子、またはユビキチン化を促進もしくは阻害する因子が挙げられる。LBDに罹患しているか、罹患する危険性を有する患者に薬剤を投与する一般的な方法については、あらゆる目的で、記載されている全ての引用文献を含む全文引用により本明細書に組み込まれている同時係属出願の2002年11月1日提出の米国特許出願第60/423,012号、ならびに2000年6月1日提出の国際特許出願第PCT/US00/15239号および2003年10月31日提出の国際特許出願第PCT/US03/34527号に開示されている。

30

40

【0088】

治療の対象となる患者としては、現在LBDの症状を示している患者ばかりでなく、LBDに罹患する危険性を有するが、症状は出ていない者も含まれる。従って、本方法は、LBDについて知られている遺伝的危険性を有する者に予防的に施行することができる。

50

このような者としては、本疾患に罹患したことのある血縁者を有する者、および遺伝マーカーもしくは生化学的マーカーの解析によって危険性が明らかにされている者が挙げられる。PDに対する危険性の遺伝マーカーとしては、シヌクレイン遺伝子もしくはパーキン(Parkin)遺伝子、UCHL1遺伝子、およびCYP2D6遺伝子の突然変異；特に、シヌクレイン遺伝子の30番目および53番目の位置の突然変異が挙げられる。現在パーキンソン病に罹患している者は、安静時振戦、筋固縮、運動緩徐および姿勢の不安定を含む臨床症状によって見分けることができる。

【0089】

一部の方法として、上記患者は、レヴィー小体を特徴とする疾患以外のどんなアミロイド生成性疾患の臨床症状もしくは危険性要因も有さない者である。一部の方法として、上記患者は、細胞外アミロイド沈着を特徴とするどんな疾患の臨床症状もしくは危険性要因も有さない者である。一部の方法として、上記患者は、Aペプチドのアミロイド沈着を特徴とする疾患を有さない者である。一部の方法として、上記患者は、アルツハイマー病の臨床症状および危険性要因を有さない者である。一部の方法として、上記患者は、アルツハイマー病とレヴィー小体とを特徴とする疾患とを併発している者である。一部の方法として、上記患者は、アルツハイマー病とパーキンソン病とを併発している者である。

10

【0090】

無症候性の患者では、任意の年齢(例えば、10歳、20歳、30歳)で処置を開始することができる。しかしながら、通常、患者が40歳、50歳、60歳もしくは70歳に到達するまで処置を開始する必要はない。一般的には、処置は、ある期間にわたって多回投与することを必要とする。処置は、治療剤(例えば、切断型シヌクレイン・ペプチド)に対する抗体または活性化T細胞応答もしくは活性化B細胞反応を長い期間をかけてアッセイすることによりモニターすることができる。反応が低下した場合には、追加抗原投与が必要となる。

20

【0091】

予防的な適用では、医薬用組成物もしくは薬剤を、LBDに罹りやすいか、それとも罹る危険性のある患者に対して、その危険性を除去もしくは低下させ、その重症度を軽減し、あるいは(この疾患の生理学的、生化学的、組織学的および/または行動上の症状、その合併症ならびにこの疾患の進行中に発現する中間的な病理学的表現型を含む)この疾患の発現を遅らせるのに十分なこの組成物もしくは薬剤の投与量および投与頻度を含む治療法において投与する。治療的な適用では、組成物もしくは薬剤を、そのような疾患が疑われるか、すでに罹患している患者に対して、その合併症およびこの疾患の進行中に発現する中間的な病理学的表現型を含むこの疾患の(生理学的、生化学的、組織学的および/または行動上の)症状を治すか、少なくとも部分的に抑えるのに十分なこの組成物の投与量および投与頻度を含む治療法において投与する。治療的処置もしくは予防的処置を遂行するのに適切な量は、治療的有効用量もしくは予防的有効用量と定義される。治療的処置もしくは予防的処置を遂行するのに適切な量および投与頻度の組み合わせは、治療的有効療法もしくは予防的有効療法と定義される。治療的有効療法および予防的有効療法のいずれにおいても、薬剤は、通常、十分な免疫反応が達成されるまで数回投与で投与する。一般には、免疫反応をモニターし、免疫反応が減弱し始める場合には投薬を繰り返す。

30

40

【0092】

一部の方法では、薬剤の投与によりシヌクレインの細胞内凝集レベルが低下する。一部の方法では、薬剤の投与によりC末端切断型シヌクレインのレベルが低下する。一部の方法では、薬剤の投与により、パーキンソン病の場合の運動機能もしくは認識機能のようなLBDの臨床症状が改善する。一部の方法では、薬剤投与後、時々、シヌクレインの細胞内凝集レベルの低下もしくは疾患の臨床症状の改善をモニターする。

【0093】

上述の状態の処置に対する本発明の組成物の有効用量は、多くの種々の要因、例えば、投与手段、標的部位、患者の生理的状态、患者がヒトか動物か、他の投与薬剤、および処置が予防的なものか治療的なものかによって異なる。通常、患者はヒトであるが、遺伝子

50

導入哺乳動物を含む非ヒト哺乳動物も処置することができる。処置用量は、安全性および有効性を最適化するために用量決定する必要がある。

【0094】

一部の方法では、この薬剤は、シヌクレインの切断断片、もしくはシヌクレインに対する抗体を誘導することができるシヌクレイン断片である。このような断片の量は、アジュバントも投与するかどうかによって決まり、アジュバントを用いない場合には用量を上げる必要がある。ヒトへの投与の場合、断片の投与量は、患者1人当たり1 μg から500 μg までとし、より普通には、1回の注射当たり5 μg から500 μg とすることがある。時として、1回の注射当たり1 mg ~ 2 mg の比較的高用量を用いる。一般には、ヒトへの注射1回当たり約10 μg 、約20 μg 、約50 μg もしくは約100 μg を用いる。また、断片の質量は、断片全体の質量に対する断片内の免疫原性エピトープの質量比によって決まる。通常、断片の1マイクログラムにつき 10^{-3} ~ 10^{-5} マイクロモルの免疫原性エピトープを用いる。注射のタイミングは、1日1回から1年に1回、さらには10年に1回と大きく変えることができる。ある用量の免疫原を投与する所定の日の投与量は、1 μg /患者より多く、アジュバントも投与する場合には、通常10 μg /患者より多いが、アジュバントを用いない場合は、通常100 μg /患者より多い。一般的な治療法は、免疫後、6週間間隔などの時間間隔でブースタ注射を行うことから成る。別の治療法は、免疫後、1ヶ月、2ヶ月および12ヶ月後にブースタ注射を行うことから成る。別の治療法は、生涯にわたって2ヶ月毎の注射を必要とする。あるいは、ブースタ注射は、免疫反応のモニタリングによって必要とされる場合、不定期に行うことができる。

10

20

【0095】

また、シヌクレインの切断断片は、シヌクレインの切断断片の発現を確実にするための1つ以上の調節性エレメントに動作可能なように結合させたこの断片をコードする核酸の形で投与することもできる。免疫原をコードする核酸の用量は、患者1人当たり約10 ng ~ 約1 g 、約100 ng ~ 約100 mg 、約1 μg ~ 約10 mg もしくは約30 μg ~ 約300 μg のDNAである。感染性ウイルス・ベクターの用量は、1投与量当たり10ビリオン~100ビリオンもしくはそれ以上とする。

【0096】

一部の方法は末端特異的抗体を用いた受動免疫を含む。このような方法では、投与量は宿主体重1 kg 当たり約0.0001 mg ~ 約100 mg 、より普通には約0.01 mg ~ 約5 mg である。例えば、投与量を1 mg / kg 体重もしくは10 mg / kg 体重または1 mg / kg ~ 10 mg / kg の範囲内、即ち、70 kg の体重の患者の場合、それぞれ、70 mg もしくは700 mg または70 mg ~ 700 mg の範囲内とすることができる。例示的な処置療法は、2週間毎に1回もしくは1ヶ月に1回もしくは3~6ヶ月に1回投与するものである。一部の方法では、種々の結合特異性を有する2種以上のモノクローナル抗体を、各抗体の投与量が示した範囲内に収まるようにして、同時投与する。通常、抗体は複数回にわたって投与する。個々の投薬間の間隔は1週間、1ヶ月もしくは1年とすることができる。また、間隔は、患者におけるシヌクレインに対する抗体の血中濃度の測定によって必要とされる場合、不定期とすることができる。一部の方法では血漿中抗体濃度が1~1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、一部の方法では25~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように投与量を調節する。あるいは、抗体は、徐放性製剤として投与することができるが、この場合、投与頻度を下げる必要がある。投与量および投与頻度は患者体内における抗体の半減期によって異なる。一般に、ヒト型抗体は最も長い半減期を示し、これにヒト化抗体、キメラ抗体および非ヒト抗体が続く。投与量および投与頻度は、処置が予防的なものが治療的なものかによっても異なることがある。予防的な適用では、比較的低用量を長期間比較的低頻度の間隔で投与する。一部の患者では、その後の生涯にわたって処置を継続する。治療的適用では、疾患の進行が低減するか停止するまで、好ましくは患者が疾患の症状の部分的もしくは完全な寛解を示すまで、比較的低間隔で比較的高用量を投与することが必要な場合がある。その後は、この患者に予防療法を施行することが

30

40

50

できる。

【0097】

治療剤は、予防的処置および/または治療的処置において、非経口的、局所的、経静脈的、経口的、経皮的、経動脈的、経頭蓋内の、経髄腔内の、経腹腔内の、経鼻腔内のもしくは経筋肉内的な手段によって投与することができる。免疫原の最も一般的な投与経路は皮下であるが、他の経路も同様に有効である。次に最も一般的な投与経路は筋肉内注射である。このタイプの注射は、最も一般的には、腕もしくは脚筋において行われている。一部の方法として、薬剤を、沈着物が蓄積している特定の組織に直接注射（例えば、頭蓋内注射）する。抗体の投与には筋肉内注射もしくは静脈内注射が好ましい。一部の方法として、特定の治療用抗体を頭蓋内に直接注射する。一部の方法として、抗体を徐放組成物もしくは徐放デバイス、例えば、メディパッド（Medipad）（登録商標）デバイスとして投与する。シヌクレインのプロテアーゼによるプロセッシングを阻害することによって作用する小分子は、この小分子が治療効力もしくは予防効果を示すのに十分に血液脳関門を通過する場合には静脈内に、そうでない場合は頭蓋内に直接投与することができる。

10

【0098】

本発明の薬剤は、任意選択的に、LBDの処置において少なくともある程度有効な他の薬剤と組み合わせて投与することができる。また、本発明の薬剤は、血液脳関門に対する本発明の薬剤の通過を促進する他の薬剤と併用して投与することもできる。

【0099】

免疫原性因子はアジュバントとの組み合わせで投与することがある。種々のアジュバントをシヌクレインなどのペプチドと組み合わせるにより免疫反応を誘発することができる。好ましいアジュバントは、免疫原に固有の反応を増強するが、この反応の質的な形態に影響するその免疫原の立体構造変化を引き起こさない。好ましいアジュバントとしては、水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウム、3De-O-アシル化モノホスホリルリピドA（MPL（登録商標））（英国特許第2220211号（RIBIイムノケム・リサーチ社（ImmunoChem Research Inc.）、ハミルトン、モンタナ州、現在コリクサ（Corixa）社の一部）参照）が挙げられる。ステイミュロン（Stimulon）（登録商標）QS-21は、南アメリカに存在するバラ科キラヤ（学名Quillaja Saponaria Molina）の木の樹皮から単離されたトリテルペン・グリコシドもしくはサポニンである（Kensilら、Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach（Powel & Newman編、Plenum Press、NY、1995年）；米国特許第5,057,540号（アキラ・バイオフィーマシューティカルズ社（Aquila Biopharmaceuticals）、フレーミングハム、MA）参照）。他のアジュバントには、（スクアレン、ピーナッツ油などの）水中油エマルジョンがあり、任意選択的に、モノホスホリルリピドA（Stouteら、N. Engl. J. Med. 336: p 86-91（1997年）、ブルロニック・ポリマー、マイコバクテリア死菌などの免疫賦活剤と組み合わせる。別のアジュバントにはCpG（国際公開第98/40100号）がある。あるいは、シヌクレインをアジュバントに結合させることができる。しかしながら、このような結合によって、シヌクレインの立体構造がこれに対する免疫反応の性質に影響を与えるような変化を実質的に生じてはならない。アジュバントは、有効な薬剤を含む治療用組成物の構成成分として投与ことができ、あるいは治療剤の投与の前、もしくは投与と同時に、または投与後に別々に投与することができる。

20

30

40

【0100】

好ましい種類のアジュバントは、水酸化アラム、リン酸アラム、硫酸アラムなどのアルミニウム塩（アラム）である。このようなアジュバントは、MPLもしくは3-DMP、QS-21、ポリグルタミン酸、ポリリジンなどの重合体アミノ酸もしくは単量体アミノ酸のような他の特定の免疫賦活剤と併用するか併用しないで用いることができる。別の種

50

類のアジュバントは水中油エマルジョン製剤である。このようなアジュバントは、ムラミルペプチド（例えば、N - アセチルムラミル - L - スレオニル - D - イソグルタミン（*thr* - MDP）、N - アセチル - ノルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン（*nor* - MDP）、N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン - L - アラニン - 2 - （1' - 2' ジバルミトイル - *sn* - グリセロ - 3 - ヒドロキシホスホリルオキシ） - エチルアミン（MTP - PE）、N - アセチルグルコサミル - N - アセチルムラミル - L - Ala - D - イソグル - L - Ala - ジバルミトキシプロピルアミド（DTP - DPP）テラミドTM）その他の細菌細胞壁成分のような他の特定の免疫賦活剤と併用するか併用しないで用いることができる。水中油エマルジョンとしては、（a）モデル110Yマイクロフルイダイザー（マイクロフルイディクス社（Microfluidics））、ニュートン、MA）などのマイクロフルイダイザーを用いて1ミクロン未満の粒子に処方された、（任意選択的に種々の量のMTP - PEを含む）5%スクアレン、0.5%ツウィーン80および0.5%スパン85を含むMF59（国際公開第90/14837号）、（b）1ミクロン未満のエマルジョンにマイクロ流体化するか旋回流を与えてより大きなサイズの粒子エマルジョンとした、10%スクアレン、0.4%ツウィーン80、5%プルロニック・ブロック・ポリマーL121および*thr* - MDPを含むSAF、ならびに（c）2%スクアレンと、0.2%ツウィーン80と、モノホスホリルリピドA（MPL）、トレハロースジミコレート、（TDM）、細胞壁骨格（CWS）、好ましくはMPL + CWS（デトックス（Detox）（登録商標））からなる群から選ばれる1種以上の細菌細胞壁成分とを含む、リビ（Ribi）（登録商標）アジュバント・システム（RAS）（リビ・イムノケム社（Ribi Immunochem）、ハミルトン、MT）が挙げられる。

【0101】

別の種類の好ましいアジュバントは、スティミュロン（Stimulon）（登録商標）（QS - 21、アキラ社（Aquila）、フレーミングハム、MA）などのサポニン系アジュバント、もしくはこれらから作製したISCOM（免疫賦活複合体）、ISCOMATRIXなどの粒子である。他のアジュバントとしては、RC - 529、GM - CSFならびに完全フロインドアジュバント（CFA）およびフロイント不完全アジュバント（IFA）が挙げられる。別のアジュバントとしては、インターロイキン（例えば、IL - 1、IL - 2、IL - 4、IL - 6、IL - 12、IL13およびIL - 15）、マクロファージ・コロニー刺激因子（M - CSF）、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子（GM - CSF）、腫瘍壊死因子（TNF）などのサイトカインが挙げられる。別の種類のアジュバントは、免疫調節剤もしくはアジュバントとしての、糖残基がアミノ酸で置換されているN - グリコシルアミド、N - グリコシルウレアおよびN - グリコシルカルバメートを含む、糖脂質アナログである（米国特許第4,855,283号参照）。また、熱ショックタンパク質、例えば、HSP70およびHSP90もアジュバントとして用いることができる。

【0102】

アジュバントは、シヌクレイン断片と一緒に、単一組成物として投与することができる、あるいはシヌクレイン断片投与の前、もしくはこれと同時に、またはこれの後に投与することができる。シヌクレイン断片およびアジュバントは、同一バイアルに包装して供給ことができ、もしくは別々のバイアルに包装して使用前に混合することができる。通常、シヌクレイン断片およびアジュバントは、目的とする治療用途を表示するラベルと共に包装する。シヌクレイン断片およびアジュバントが別々に包装される場合には、この包装に、使用前に混合することについての使用説明書を添付するのが普通である。アジュバントおよび/またはキャリアの選択は、このアジュバントを含む免疫原製剤の安定性、投与経路、投与スケジュールおよび接種対象の種に対するアジュバントの効力によって決まり、ヒトにおいて医薬用として許容可能なアジュバントは、関係する規制機関によってヒトへの投与が承認されているか承認されるものである。例えば、完全フロインドアジュバントはヒトへの投与に適切ではない。アラム、MPLおよびQS - 21が好ま

しい。任意選択的に、2種以上の別種のアジュバントを同時に用いることができる。好ましい組み合わせとしては、アラムとMPL、ミョウバンとQS-21、MPLとQS-21、MPLもしくはRC-529とGM-CSF、およびアラムとQS-21とMPLが挙げられる。また、任意選択的にアラム、QS-21およびMPLならびにこれらの全ての組み合わせのうちいずれかと併用して、フロイント不完全アジュバントを使用することができる(Changら, *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: p173-186 (1998年))。

【0103】

多くの場合、本発明の薬剤は、有効な治療剤および各種の他の医薬用として許容可能な成分を含む医薬用組成物として投与する。Remington's Pharmaceutical Science (第15版、Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania)、1980年)を参照されたい。好ましい形態は、所望の投与様式および治療用途によって決まる。また、この組成物は、所望の製剤に応じて、動物もしくはヒトへの投与用の医薬用組成物を処方するための一般的な賦形剤と定義される、医薬用として許容可能で毒性のないキャリアもしくは希釈剤を含むことができる。この希釈剤は、その組み合わせの生物活性に影響を与えないように選択する。このような希釈剤の例としては、蒸留水、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、ブドウ糖液、およびハンス液がある。さらに、この医薬用組成物もしくは製剤は、他のキャリア、アジュバント、もしくは毒性がなく治療用ではない非免疫原性の安定化剤なども含むことができる。

10

20

【0104】

また、医薬用組成物は、タンパク質、キトサンなどの多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸および(ラテックス官能化セファロス(latex functionalized Sepharose)(登録商標)、アガロース、セルロースなどの)コポリマー、アミノ酸重合体、アミノ酸共重合体、ならびに(油滴、リボソームなどの)脂質凝集物などの、大きくてゆっくりと代謝される高分子を含むこともできる。さらに、こうしたキャリアは、免疫賦活剤(即ち、アジュバント)として機能させることができる。

【0105】

非経口投与の場合、本発明の薬剤は、水、油、生理食塩水、グリセロール、エタノールなどの滅菌液とすることができる医薬用キャリアを含む生理的に許容可能な希釈剤を用いたこの物質の溶液もしくは懸濁液として、注射可能な用量を投与することができる。さらに、湿潤剤、乳化剤、界面活性剤、pH緩衝剤などの補助剤を組成物に加えることができる。医薬用組成物の他の成分としては、石油、動物、植物もしくは合成由来の成分、例えば、ピーナッツ油、大豆油および鉱油がある。一般に、プロピレングリコール、ポリエチレン・グリコールなどのグリコール類が、特に注射用溶液には好ましい液体キャリアである。抗体は、有効成分の持続放出を可能にするように処方することができるデポー注射剤もしくは植込み製剤の形で投与することができる。例示的な組成物は、50mMのL-ヒスチジンおよび150mMのNaClからなり、HClでpH6.0に調整した水性緩衝液に配合したモノクロナール抗体を5mg/mL含む。通常、非経口投与用の組成物は、実質的に無菌で、実質的に等張であり、FDAもしくは同様な機関のGMP条件下に製造される。

30

40

【0106】

通常、組成物は溶液もしくは懸濁液の形の注射剤として調製するが、注射に先立って液体賦形剤に溶解もしくは懸濁するのに適した固形物として調製することもできる。また、この製剤は、上述のアジュバント効果を増強するために、リボソームもしくはポリラクチド、ポリグリコリド、コポリマーなどの微粒子を用いて乳化もしくは封入することもできる(Langer, *Science* 249: p1527 (1990年)およびHanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28: p97-119 (1997年)参照)。本発明の薬剤は、有効成分の持続放出もしくはパルス放出を可能にするように処方することができるデポー注射剤もしくは植込み製剤の形で投与す

50

ることができる。

【0107】

他の投与様式に適した別の製剤としては、経口用、鼻腔内用および呼吸器用 (pulmonary) の製剤、坐剤ならびに経皮投与剤 (transdermal application) が挙げられる。坐剤の場合、結合剤およびキャリアとしては、例えば、ポリアルキレン・グリコールもしくはトリグリセリドが挙げられ、このような坐剤は、本有効成分を 0.5% ~ 10%、好ましくは 1% ~ 2% 含む混合物から作製することができる。経口用製剤は、医薬品グレードのマニトール、乳糖、でんぷん、ステアリン酸マグネシウム、サッカリン・ナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの賦形剤を含む。この組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放製剤もしくは散剤の形をとり、有効成分を 10% ~ 95%、好ましくは 25% ~ 70% 含む。

10

【0108】

局所に適用すると、経皮的に、もしくは皮内から送達させることができる。本剤をコレラトキシンまたはその無毒化誘導体もしくはサブユニットあるいは他の同様な細菌毒素と同時投与することにより局所投与を容易にすることができる (Glennら, Nature 391: p 851 (1998年))。同時投与は、これらの成分を混合物として、または化学的架橋結合もしくは融合タンパク質としての発現により得られる結合分子として用いることにより、達成することができる。あるいは、スキン・パス (skin patch) もしくはトランスフェロソームを用いて経皮的送達を達成することができる (Paulら, Eur. J. Immunol.) 25: p 3521-24 (1995年); Cevcら, Biochem. Biophys. Acta 1368: p 201-15 (1998年))。

20

【実施例】

【0109】

(1. トランスジェニック動物における切断型 シヌクレインの検出)

PDFGプロモータに動作可能なように結合させたインタクトな シヌクレインをコードする核酸を有する、6週齢、3ヶ月齢および12ヶ月齢のトランスジェニックマウスを用いて検討した。これらのマウスを安楽死させて、4匹 (雄2匹/雌2匹) からの皮質および海馬組織をプールした。この組織をTBS (250mM NaCl) 中でホモジナイズした後、150,000xgで15分間遠心した。次いで、得られたペレットを1%トリトンX-100により30分間4で抽出し、これを上記のようにして遠心した。次に、得られたペレットを1%SDSにより30分間25で抽出し、これを上記と同様に遠心した。最後に、このペレットを8M尿素/1%SDSで抽出した。この方法によって、以下の説明でトリス抽出物、トリトン抽出物、SDS抽出物および尿素抽出物と呼ぶ4種の抽出物が得られた。

30

【0110】

図1Aおよび図1Bは、抗体ELADW-47を用いた、トランスジェニックマウスおよび対照動物からの抽出物のウェスタン・プロットを示す。この抗体は、SN115-122内のエピトープに結合する (が、何がしかの結合を生じるのに必ずしもその全てのアミノ酸を必要とする訳ではない) ポリクロナール抗体である。この抗体は、ヒト型 シヌクレインを選択的に結合するだけでなく、程度はより少ないがマウス型にも結合する。図1Aおよび図1Bは、対照マウスおよびトランスジェニックマウスにおける14kDaのシヌクレインのバンドを示す。このバンドは対照よりもトランスジェニックマウスで強い。各種の抽出物では、トリトン抽出物のバンドが最も強い。この抽出物は、膜結合シヌクレインおよび恐らくレヴィー小体様封入体を可溶性にしている。(対照ではなく) トランスジェニックマウスについてのトリス抽出および特にトリトン抽出では、トリシン緩衝液中で約12kDaのバンドが現れる。これは切断型シヌクレインである。このバンドの分子量は、約115個~約120個のアミノ酸の長さに相当する。

40

【0111】

図2は、図1Aおよび図1Bと同じ抗体を用いて、3ヶ月齢と12ヶ月齢のマウスで切

50

断型 シヌクレインのレベルを比較したウェスタン・プロットを示す。この図から、この切断型は3ヶ月齢のマウスでより強く現れることが分かる。この場合も、対照マウスでは切断型は現れない。このようにトランスジェニックマウスの発育の初期段階で切断型 シヌクレインがより強く現れることから、切断型 シヌクレインはレヴィー小体病の病因の初期段階で役割を果たしていることが分かる。

【0112】

図3Aおよび図3Bは、12C1と呼ばれる別の抗体(43番目から51番目および58番目から65番目のアミノ酸のエピトープに結合するモノクローナル抗体IgG1k)を用いたウェスタン・プロットを示す。この抗体は、43番目から51番目および58番目から65番目までのアミノ酸を含むエピトープにおいてマウス型およびヒト型のシヌクレインと等しく結合する。図3は、上記トランスジェニックマウスのトリトン抽出物における12kDaの切断バンドを示す。対照マウスのトリトン抽出物では同じバンドが、ずっとぼんやりと現れる。従って、シヌクレインの切断型へのプロセッシングは正常マウスおよびトランスジェニックマウスのいずれにおいても生じるが、後者の方がより強く生じる。このようにトランスジェニックマウスにおいてプロセッシングの程度がより強いのは、ヒト型シヌクレインを直接プロセッシングすることによると考えられ、もしくは非トランスジェニックマウスで余り使われていない経路に沿ってマウス型シヌクレインを追いやるヒト型シヌクレインの存在による考えられる。

10

【0113】

図4は、図3と同じ抗体を用いた別のウェスタン・プロットを示す。このゲルでは、分子量約6kDaもしくは約7kDaの別の2つのバンドが現れている。7kDaのバンドは対照マウスよりもトランスジェニックマウスにおいて強く現れる。6kDaのバンドは、トランスジェニックマウスにおいてのみ、その上、3ヶ月サンプルにおいてのみ現れる。この6kDaもしくは7kDaのバンドは、長さ約50~80個のアミノ酸の、より短いシヌクレインN末端断片を示すものである。

20

【0114】

図5A、図5B、図5C、図5Dおよび図5Eは、4種の抗体を用いたウェスタン・プロットおよびこれらの抗体の結合部位のエピトープマップを示す。ELADW-44は、ヒト型シヌクレインにのみ結合する(即ち、マウス型には結合しない)ポリクローナル抗体である。これは103番目から105番目のアミノ酸のエピトープに結合する。ELADW-47は、ヒト型に選択的に結合するだけでなく、マウス型にも結合するポリクローナル抗体である。これは115番目から122番目のアミノ酸のエピトープに結合する。ELADW-48は、ヒト型およびマウス型に等しく結合するポリクローナル抗体である。これは131番目から140番目のアミノ酸のエピトープに結合する。8A5は、ヒト型およびマウス型に等しく結合するモノクローナル抗体である。これはシヌクレインのC末端に結合する。図5A~図5Eから、以上の4種の抗体のうち、ELADW-47のみが切断型シヌクレインを示す12kDaのバンドを生じたことが分かる。ELADW-48がこのバンドを生じなかったという結果は、切断部位のマッピングを行うのに助けになる。ELADW-47は結合し、ELADW-48は結合しなかったので、切断部位は、ELADW-47エピトープのN末端およびELADW-48エピトープのC末端アミノ酸に隣接している。さらに、ELADW-47エピトープの一部のアミノ酸が存在することにより結合が可能となるはずであり、ELADW-48エピトープの一部のアミノ酸が存在しないことにより結合が妨げられるはずであるので、切断部位は、さらに、ほぼ118番目から135番目のアミノ酸の範囲内の領域に限定される。このデータを切断断片のサイズ(約115アミノ酸~約120アミノ酸)と考え合わせると、考えられる切断部位は、118番目~121番目のアミノ酸あたりである。C末端抗体8A5による結合が見られないことは、この切断部位と整合する。しかしながら、抗体ELADW-44による結合が見られないことについては、さらに解説を要する。切断により生じる切断型ヒト・シヌクレインが、異なる立体構造をELADW-44の結合を妨げるインタクトなシヌクレインに適合させるのであれば、このように切断が見られないことの説明がつく。

30

40

50

一方、正常マウスよりもトランスジェニックマウスでより大きな程度に存在する切断型シヌクレインは、マウス・シヌクレイン型である。この場合、トランスジェニックマウスで切断型の量が多いのは、対照マウスの状況と比べて切断型シヌクレインを生じるプロセッシング経路に沿ってより多くのマウス・シヌクレインを追いやるヒト・シヌクレインの存在によるものと思われる。

【0115】

(2-DLB D患者の脳内の切断型シヌクレインの検出)

この実施例では、LB内のシヌクレイン種をDLBD脳の残りの可溶性タンパク質フラクションおよび粒状タンパク質フラクションと比較する。LBおよび可溶性タンパク質は、単一のDLBD患者の皮質から調製した(Jensenら, J. Biol. Chem. 275: p 21500 - 21507 (2000年)参照)。組織は、トリス/スクロース(0.32mM)/EDTA(5mM)およびプロテアーゼ阻害剤緩衝液中でホモジナイズした。得られたホモジネートを1000xgで遠心した。上清をさらに150,000xgで遠心した。この遠心による上清を用いてタンパク質のトリス可溶性フラクションを調製した。1000xgの遠心で得られたペレットは再懸濁し、これを用いてレヴィー小体フラクションを調製した。レヴィー小体は、抗シヌクレイン抗体を担持させた磁性ビーズを用いる免疫沈降法によって精製した。次いで、得られた沈降物を7M尿素2Mチオ尿素/4%CHAPSで抽出した。未抽出の材料を尿素/チオ尿素/CHAPSで再抽出した。次いで、この工程による抽出物と前回の抽出物とをプールし、2D PAGEおよびイムノブロットにより分析した。未抽出の残渣を、さらに90%ギ酸で抽出した。得られた抽出物は、ギ酸9%にまで希釈して保存した。次いで、この抽出物をSDS PAGEおよびRP-HPLCにより分析した。この最終抽出物にシヌクレインがほとんど見出されなかったか、または全く見出されなかった。存在したものは、尿素/チオ尿素/CHAPSによって抽出された材料に類似し、尿素/チオ尿素/CHAPSが包括的な抽出を与えることを示した。

10

20

30

40

50

【0116】

シヌクレイン種は2-Dゲルで分離し、ウェスタン・プロットで検出した。全ての2Dウェスタンプロットは、より酸性のタンパク質を左に、より塩基性のタンパク質を右に示す。その結果、LBおよび可溶性脳フラクションのいずれにも、リン酸化型および切断型の種を含む複数のシヌクレイン種が存在した。切断は、シヌクレインのほぼ118番目~125番目のアミノ酸のC末端に主に認められた。また、C末端近くで切断された別の大きな断片も認められた。-シヌクレインおよび-シヌクレインは、上記可溶性フラクション中には存在しているにもかかわらず、LB中には検出されなかった。このLB試料中のシヌクレインは、別のC末端切断部位を有する点、および全体的に切断型シヌクレイン種が可溶性蛋白フラクションに比し、LB内に濃縮されている点で、この可溶性フラクション中のものと異なっていた。さらに、分子量が約25kDa~約35kDaである、より大きい複数のシヌクレイン種がLB試料にのみ検出された。これらは、本発明者らおよびその他(Tofarisら, J. Biol. Chem. 278(45): 44405 - 44411, 2003)によって同定される、ユビキチン化された種を含む。C末端切断断片は、実施例1のトランスジェニックマウスで認められたのと同じサイズであり、疾患の原因としての役割が示唆された。

【0117】

図6A、図6Bおよび図6Cは、種々の抗体でプローブし、2-Dゲル電気泳動の対象として、ウェスタン・プロットにかけた、トリトン抽出物を示す。チャートの左の方にみられるダーク・スポットは完全長のシヌクレインを示す。最も注目すべき特徴は、8A5のチャートにはみられないSyn-1のチャートの4つのスポットである。これら4つのスポットは、C末端アミノ酸の欠如のため8A5抗体を結合することができない切断型シヌクレインである。これらの切断は、SN1-118~SN1-125の型にほぼ相当する。完全長シヌクレインのスポットの下および近傍にはいくつかの別のスポットがみられる。この完全長スポットの下のスポットは、C末端からの小さな切断(即ち

、Xを130～139とした場合のシヌクレイン1-X)を示すものと思われる。なぜなら、これらは、リン酸化S129に対する抗体と反応するが、8A5とは反応しないからである。完全長スポット近傍の右側スポットは(ELADW43を用いたプロットにこのスポットがないため)N末端からの小さな欠損を示す。

【0118】

図7A、図7B、図7Cおよび図7Dは、別の抗体を用いたプロットを示す。5C12(111-118)の場合、4つのスポットが認められる。ELADW47(115-122)の場合、これらのスポットのうちの2つが認められ、LB509(115-123)の場合、これら全てのスポットがみられなかった。これらのスポットは、分子量においても、ニトロ化、リン酸化などの翻訳後修飾の有無においても互いに異なると思われる。全長シヌクレインと比較して、これらの断片の塩基性pHへのシフトは、酸性C末端配列の一部を除去したと矛盾しない。これらの結果から、切断部位はシヌクレインのほぼ120番目から125番目のアミノ酸の範囲内に決まる。また、注目すべきは、いくつかのスポットが、修飾されていないシヌクレインのスポットよりもわずかに下(分子量がより小さい)もしくは左側(pHがより低い)に出ていることである。これらは、恐らく、主要なスポットに比し、N末端の受けた切断の程度が小さい、および/又は翻訳後に受けた修飾が異なる、シヌクレインの型を示すものと考えられる。可溶性タンパク質のプロット中のELADW43および8A5により視覚化された数個のスポットがシヌクレイン(特に、全長より左かつやや上方の目立つスポット)であることに留意すること。

10

【0119】

図8は、ウェスタン・ブロッティングに用いる抗体が結合するエピトープに関する切断部位の概要を示す。

20

【0120】

図9A、図9Bは、トリス可溶性タンパク質とレヴィー小体からの抽出タンパク質とを2D電気泳動およびウェスタン・ブロッティングにより比較したものである。左側のトリス・プロットには、(恐らくアミノ酸1番目から120番目～1番目から125番目の範囲にある)切断型シヌクレインを表す、より低分子量の4つのスポットが示されている。これらは、完全長シヌクレインを表すスポットに比し、強度が比較的低い。レヴィー小体からのタンパク質のプロットでは、1番目から120番目～1番目から125番目の範囲の切断型シヌクレインを表すより多くのスポットが示されている。しかしながら、これらは、完全長シヌクレインを表すスポットに比し、強度が高い。また、明らかなことは、2つのスポットが、完全長シヌクレインより速いが、このプロットの下部に集まっているスポットよりも遅い移動を示すことである。これらのスポットは、Xを130～139番目のアミノ酸とした場合の1-Xの範囲の切断を表すものと考えられる。上記のように、これらのスポットは、リン酸化S129に対する抗体とは反応するが、8A5とは反応しない。

30

【0121】

図10A、図10B、図10C、図10Dは、各種C末端抗体で再プローブした(reprobed)レヴィー小体からのタンパク質の免疫プロットを示す。Syn-1(91-96)および5C12(111-118)の場合、全てのスポットが現れる。ELADW47の場合、Syn-1プロットおよび5C12プロットにおいて最も速い速度で最も底部の(basic)位置を移動するスポットは見当たらない。LB509プロットでは、トリス可溶性サンプル中のスポットに対応する12kDのスポットが見当たらないが、ぼんやりとしている。しかし、これらの直上のスポットの列(「列3」)は依然として反応する。ELADW47およびLB509のプロットに特定のスポットが存在しないが、強度が低いことから、これらのスポットは、切断型シヌクレインを示すものであり、切断がほぼ120番目～125番目のアミノ酸で生じることと符合していることが分かる。

40

【0122】

(3. トランスジェニック動物における凝集シヌクレインの検出)

トランスジェニック動物を安楽死させ、脳を摘出して神経化学的および神経病理学的な

50

検討を行う。簡単に言えば、右半分の脳を凍結し、ホモジナイズして凝集ヒト・シヌクレインおよび非凝集ヒト・シヌクレインの免疫反応性をウェスタン・ブロットにより測定する(Masliahら, Science (2000年) 287: p 1265)。左半分の脳は、4%パラホルムアルデヒドで固定し、ピプラトームで連続切片を作製して免疫細胞化学および超微細構造分析を行う。

【0123】

脳切片を、ヒト・シヌクレインに対するウサギ・ポリクロナール抗体(1:500)で免疫染色する。4で一夜インキュベーションした後、切片を、ビオチニル化抗ウサギ二次抗体、次いでアビジンD-ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ(HRP)複合体(1:200、ABCエリート、ベクター社(Vector))とインキュベートする。反応を、0.001% H₂O₂を含む50mMのトリス-HCl(pH7.4)に溶かした0.1%の3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩(DAB)を用いて視覚化し、次いで、切片をエンタランを用いてスライド上に封入する。免疫反応性のレベルは、クウォンティメット(Quantimet)570Cを用いるオプティカル・デンシトメトリーにより半定量的に評価する。また、この切片を画像解析により調べて、シヌクレインの免疫反応性封入体の数を測定し、この信頼できるシヌクレイン凝集の測定値を抗凝集効果の有用な指標として用いる(Masliahら, Science (2000年) 287: p 1265)。

10

【0124】

神経変性のパターンの解析は、シナプトフィジンおよび微小管関連蛋白2(MAP2)に対して二重免疫標識し、LSCMで視覚化したピプラトーム切片を用い、海馬、前頭皮質、側頭皮質および基底核のシナプスおよび樹状突起の密度を分析することによって達成する。神経変性の別の解析は、これまでに報告されている方法(Masliahら(2000年))により尾状核被殻(caudoputamen)および黒質(SN)のチロシン水酸化酵素(TH)の免疫反応性を測定することによって達成する。切片はLSCMによって画像化されることになり、個々の各画像は、直線範囲内にピクセル強度を示すTH-免疫反応性末端が含まれるように、相互作用的に閾値によって処理される。スケールはピクセル:μm比で求めるように設定する。次いで、この情報を利用してTH-免疫反応性末端によって覆われる神経網の面積%を算出する。また、この同じ切片を用いてSN内のTHニューロンの数を計測する。

20

30

【0125】

(4. LBD患者におけるシヌクレインの分析)

シヌクレインのどの種が疾患組織内に濃縮され、もしくは疾患組織に特有であるかを明らかにするために、多系統萎縮症(MSA)の患者および家族性パーキンソン病突然変異(A53T; Contursi家系)の患者からの脳サンプルについて検討した。MSAおよびContursi脳の粒状フラクシオンを、それぞれ、50mMトリス、140mM NaCl、および1%トリトン中で脳組織をホモジナイズすることによって調製した。年齢をマッチングした対照患者(「正常者」)についても疾患脳と全く同様に処理した。サンプルは、1-Dゲルのウェスタンブロットを用い、次いで下記のようにELISAによって、さらに、2-Dゲルを用いて分析した。この分析は粒状フラクシオンの一部について行い、残りは遠心した。得られた上清についても分析し、ペレットは7M尿素で抽出した。この抽出による上清は分析した。得られたペレットは、さらに7M尿素/1%SDSで抽出し、その上清を分析した。全シヌクレインを検出し、もしくは129番目の位置がリン酸化されたシヌクレインを特異的に検出する抗体を用いたウェスタン・ブロットの結果を図11Aおよび11Bに示した。

40

【0126】

このシヌクレインの分画は、対照脳に対して、Contursi脳の粒子状画分は異なっていた。正常脳の粒子状画分中のシヌクレインの大部分は、トリス緩衝スクロース液を用いホモジナイズした後、可溶性であったが、Contursi脳のシヌクレインのほぼ全てで、可溶化するのに尿素およびSDSを必要とし、この患者では大量のレヴィー小体

50

の存在が示唆された。Contursi患者のシヌクレインは、ser129リン酸化の量が対照患者と際立って異なっていた。対照患者（左の軌跡）ではごく少量のリン酸化シヌクレインが検出されたのに対して、Contursi患者（右の軌跡）では、ウェスタン・プロットを用いた比較によって極めて大量のリン酸化シヌクレインが認められた。従って、Contursi脳はシヌクレインの不溶性は、シヌクレインのser129におけるリン酸化の大きな増大と関連付けられた。また、Contursi患者のシヌクレインは、C末端切断の分布が正常脳の場合と異なっていた。C末端切断型シヌクレインは、対照およびContursi粒状脳フラクシオンのいずれにおいても認められたが、検出可能な全ての切断断片は、Contursi患者では高度に不溶性（尿素/SDS抽出物）であったのに対し、対照患者の脳では可溶性（トリス緩衝スクロース液）であった。Contursi患者のLB濃縮フラクシオンにおけるC末端切断型シヌクレインの濃縮は、DLBD LBにおいてC末端切断型シヌクレインが濃縮されているとの本発明者らの知見と一致している。また、MSA脳もホスホ（ser129）シヌクレインが濃縮していたことから、LBでもみられたC末端切断および多くのリン酸化その他の酸性修飾の存在が明らかとなった。また、DLBD患者の脳では、非疾患対照に比し、高レベルのホスホ（ser129）が認められた。

10

【0127】

（5．LC-MS/MSによるDLBD脳からの切断型シヌクレイン種の同定）

シヌクレインの富化されたプールを生成するために、DLBD脳の尿素/チオ尿素/CHAPSによる可溶化粒子状画分をまず陰イオン交換クロマトグラフィにより精製した。生じた画分をウェスタンプロットにより分析し、切断型シヌクレイン、全長シヌクレイン、またはリン酸化シヌクレインに富んだ粗プールに分離した。切断型のプールをアフィニティークロマトグラフィ（セファロースに結合体化された5C12抗体）によりさらに精製した。次に、個々の画分を、キャピラリーHPLCにより別個に濃縮および分離した。

20

【0128】

次に、一つの画分（C6と示される）に由来する3つの主要なピークをトリプシンで消化し、LC-MS/MSによって分析し、サンプル中に存在するタンパク質の正体および組成を決定した。ピーク1を分析して、アミノ酸1-97に及ぶ配列の範囲を有するシヌクレインを同定した。この配列の範囲はリジン残基（これはトリプシン切断部位である）を有するC末端で終わるので、さらなる下流のペプチドが存在し得る。

30

【0129】

画分C6に由来するピーク2を分析し、これが11位-97位由来のシヌクレイン配列を含むことが見出された。さらに、トリプシンによる（tryptic）断片がN末端にもC末端にも存在しないので、この種の正確な組成は決定することができない。また、この画分に存在するタンパク質の大多数がシヌクレインではなく、このシヌクレインプールとともに同時に精製されたミエリン塩基性タンパク質の形態である。

【0130】

ピーク3の分析により、2つの異なるシヌクレイン種を同定した。これらは、両方とも位置1のアミノ酸で始まり、一方は位置119Dで終わり、他方は位置122Nで終わった。C末端のトリプシンによるペプチドを検出するために設計されたデータベース探索を使用して、これらの切断形態の両方を同定した。切断型のC末端ペプチド断片を列挙するデータベース探索結果が、それらの各々の抽出イオンクロマトグラム（extracted ion chromatogram）（図12および図13）とともに以下に示される（表1）。図12および図13は、ベースラインと比較した場合の、これらのペプチドについての前駆体の（断片化されていない）イオンシグナル強度を示す。

40

【0131】

【表 1】

表 1: 画分-C6 ピーク3Iに関するデータベース探索結果

参照 スキャン	配列	MH+	電荷	XCorr	
#2 α シヌクレイン (C122) 2690 - 2694 (配列番号 : 2)	DQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDN.	2710.22	2	4.53	
2344 - 2679 (配列番号 : 3)	KDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDN.	2838.31	3	2.38	
#3 α シヌクレイン (C119) 2675 (配列番号 : 4)	KDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVD.	2512.19	2	1.94	10

この探索により、122N切断型 (truncation) を二回同定し、122N種に関して2つの異なるトリプシンによる配列を見出した。このうちの一方のペプチドは、N末端リジン残基の誤った (missed) トリプシンによる切断の結果であった。また、122N変体の最初に列挙された配列に関するXcorr (すなわち、相互相関スコア) は極めて高い。3つのさらなる切断形態SN1-115、SN1-133およびSN1-35はまた、DLBD脳にも見出された。TurboSequest質量スペクトル分析ソフトウェア (ThermoElectron, Incから許可を得た) により生成された理論上のスペクトルに対して、切断型C末端シヌクレインペプチドに由来するMS/MSペプチド断片化スペクトルとをマッチさせることにより、切断型を同定した。両方の形態は、Ser129がリン酸化されていた。Xcorr値が大きければ大きいほど、このマッチの信頼度が高くなり、このデータをより支持する。

【0132】

図14A~Fは、対照と比較した、DLB患者P48およびP52ならびにMSA患者P2に由来するレヴィー小体調製物 (上記のように調製した) (厳密にいうと、MSA調製物はグリア皮質性封入体 (glial cortical inclusion) を含む) の抽出物の2Dゲル免疫プロットを示す。プローブは、全シヌクレインに対する抗体である。識別番号 (A/1、U/1など) は、異なる日に調製され、そして種々の皮質領域を使用した異なるレヴィー小体調製物をいう。罹患した患者由来の種々の調製物を図14A、B、C、EおよびFに示す。対照を図14Dに示す。DLBからの調製物と比較して、MSA調製物中にシヌクレインの改変が一貫して存在しなかった。この2つの病理学はともに議論される。大半の調製物は、全長シヌクレインモノマーよりも上方に移動する付加物の同一の群を有するが、各々の群の相対的な量は変動する。16kDおよび12kDの間のC末端切断型 (C-truncated) シヌクレインは、第1の列中の全長から、第4の列中の12kD断片まで及ぶ4つの列にグループ化され得る。種々の切断型の相対的な量は変動する。P52U/2およびP28U/1は、検出可能なDLB特異的な列3を有さなかった。P48は、非常にわずかなC末端切断型物質を有し、その列3スポットはかろうじて眼に見える (しかし存在する)、列4は、可溶性タンパク質のうちで最も強度が低い。図15Bは、P52U/2レヴィー小体調製物の2D免疫プロットをELLADW101により再プローブ (reprobing) した結果を示す。モノクローナルSyn-1による同一のプロットの先のプローブ (probe) を、比較のため左に示す (図15A)。3つの星印は、これらの2のプローブが互いに重なるスポットを示す。P28U/1プロットもまた再プローブし、同一の結果を得た。ポリクローナル抗体ELLADW101 (Asp119末端に指向する) は、切断型の種である12kDの第4の列における最も目立つ3つのスポットと特異的に反応する。複数のスポットは、種々の形態のSN1-119が残りの配列の電荷の改変 (例えば、リン酸化) によって相違することを示す。

【0133】

正常な個体およびDLBD患者由来の浮遊した (Free-floating) 皮質性

脳切片を、初期エピトープ (neo-epitope) 特異的抗体 ELADW-101 でプローブした。結果を図 16 A および B (罹患した脳) ならびに図 17 A および B (対照) に示す。A および B とラベルされ囲まれた領域は、右のパネルで拡大して示される。代表的な LB および LN を矢印で標識する。シナプスの微かな染色のみが正常な脳に見られる。初期エピトープ特異的抗体 12C6 を使用して、同一の実験を行った。結果を図 18 A および B に示す。A および B とラベルされ囲まれた領域は、右のパネルで拡大して示される。代表的な LB および LN を矢印で標識する。パネル B において、矢印は、12C6 による顆粒状細胞質の染色を示す。この染色は、正常な脳では見られない。これらの結果は、切断型 シヌクレイン断片 SN1-119 がレヴィー小体病を有する患者で富化されることを示す。

10

【0134】

(5. トランスジェニック動物における行動上の分析)

マウスの自発運動について、以前に報告された方法 (マスリアほか (Masliahら) (2000年)) により、回転棒 (サンディエゴ・インストルメンツ、サンディエゴ、CA) を用いて 2 日間検討する。1 日目に、5 つのトライアルについてマウスを訓練する。即ち、1 つ目は 10 rpm、2 つ目は 20 rpm、3 ~ 5 つ目は 40 rpm でのトライアルとする。2 日目に、各 40 rpm の 7 回のトライアルについてマウスを試験する。マウスを円筒上に一匹ずつ置き、回転速度を 240 秒間かけて 0 rpm から 40 rpm まで増加させる。マウスがその棒上に留まっている時間の長さ (落下潜時) を記録し、これを運動機能の指標として用いる。

20

【0135】

マウスの認識能力について、モリス水迷路 (Morris Water maze) (Morris, Learn Motiv. 12: p239-260 (1981年)) を用いて試験する。この方法では、水を満たし、水面直下に逃避台を沈めてある円形プールにマウスを入れる。この台に目で見ることのできる印を付けておくことによって、マウスが近位の目に見える手掛かりの方に泳いでいくことによってこの印を見つけることができるようにしてある。あるいは、この台の位置を分からせる型にはまった手掛かりを設けない、この試験のもっと複雑なタイプをマウスに施行する。このタイプでは、マウスは、遠くの目に見える手掛かりとの関連で台の位置を学習する必要がある。マウスが水中に留まっている時間の長さは認識能力に反比例する。

30

6. 細胞株を用いた凝集 シヌクレイン断片の分析

上述の シヌクレイン、マウス・シヌクレインの切断断片を発現する pCR3.1-T 発現ベクター (インビトロジェン社 (Invitrogen)、カールズバッド、CA) を用いて GT1-7 神経細胞 (Hsueh, Am. J. Pathol. 157: p401-410 (2000年)) をトランスフェクトし、発現ベクター単独でトランスフェクトした細胞と比較する。ベクター単独でトランスフェクトした細胞は線維芽球様の外観を有するが、シヌクレインでトランスフェクトした細胞は丸みを帯び、光学顕微鏡および共焦点型走査顕微鏡で見ることのできる細胞表面の封入体を有する。トランスフェクトした GT1-7 細胞を用いることによってシヌクレイン封入体を除去する活性について薬剤をスクリーニングすることができる。

40

【0136】

以上の実施例は単に例示的なものであり、本発明を限定するものではない。従って、他の変形形態がありうることは当業者には容易に理解されよう。本発明の範囲は、これにより付与される全ての特許の特許請求の範囲によってカバーされる。従って、本発明の範囲は、上記の説明を参照するのではなく、特許付与される特許請求の範囲をその均等物の全範囲と共に参照して決定されるべきである。本出願において引用した全ての刊行物、参考文献および特許文献は、個々の刊行物もしくは特許文献がそれぞれ、そのようにして個別に示されている場合と同程度に、あらゆる目的で全文引用により本明細書に組み込まれている。

50

【図面の簡単な説明】

【 0 1 3 7 】

【図 1】図 1 A および図 1 B は、S N 1 1 5 ~ 1 2 2 内のエピトープに結合するポリクロナール抗体を用いた、トランスジェニックマウス (B) および対照 (A) の皮質および海馬からの各種抽出物のウエスタン・プロットを示す。

【図 2】図 2 は、図 1 A および図 1 B と同じ抗体を用い、3ヶ月齢および12ヶ月齢マウスの皮質および海馬のトリトン - X 1 0 0 抽出物においてシヌクレインの切断型の濃度を比較したウエスタン・プロットを示す。

【図 3】図 3 A および図 3 B は、1 2 C 1 と称する別の抗体 (4 3 ~ 5 1 番目および 5 8 ~ 6 5 番目アミノ酸のエピトープに結合するモノクロナール抗体) を用いた、高齢対照 (A) との比較における3ヶ月齢トランスジェニックマウス (B) の脳からのトリトン抽出物のウエスタン・プロットを示す。

【図 4】図 4 は、図 3 と同じ抗体を用いた、3ヶ月齢および12ヶ月齢トランスジェニックマウスの脳からのトリトン抽出物による別のウエスタン・プロットを示す。

【図 5 A】図 5 A、図 5 B、図 5 C、図 5 D および図 5 E は、トランスジェニックマウスの脳からの各種抽出物に対する4種の抗体を用いたウエスタン・プロット (図 5 B、図 5 C、図 5 D、図 5 E) およびこれらの抗体の結合部位のエピトープマップ (図 5 A) を示す。

【図 5 B】図 5 A、図 5 B、図 5 C、図 5 D および図 5 E は、トランスジェニックマウスの脳からの各種抽出物に対する4種の抗体を用いたウエスタン・プロット (図 5 B、図 5 C、図 5 D、図 5 E) およびこれらの抗体の結合部位のエピトープマップ (図 5 A) を示す。

【図 5 C】図 5 A、図 5 B、図 5 C、図 5 D および図 5 E は、トランスジェニックマウスの脳からの各種抽出物に対する4種の抗体を用いたウエスタン・プロット (図 5 B、図 5 C、図 5 D、図 5 E) およびこれらの抗体の結合部位のエピトープマップ (図 5 A) を示す。

【図 5 D】図 5 A、図 5 B、図 5 C、図 5 D および図 5 E は、トランスジェニックマウスの脳からの各種抽出物に対する4種の抗体を用いたウエスタン・プロット (図 5 B、図 5 C、図 5 D、図 5 E) およびこれらの抗体の結合部位のエピトープマップ (図 5 A) を示す。

【図 5 E】図 5 A、図 5 B、図 5 C、図 5 D および図 5 E は、トランスジェニックマウスの脳からの各種抽出物に対する4種の抗体を用いたウエスタン・プロット (図 5 B、図 5 C、図 5 D、図 5 E) およびこれらの抗体の結合部位のエピトープマップ (図 5 A) を示す。

【図 6】図 6 A、図 6 B および図 6 C は、3種の抗体 (図 6 A、図 6 B、図 6 C) でプローブし、2 - Dゲル電気泳動の対象とし、ウエスタン・プロットにかけたレヴィー小体病患者の脳のトリトン抽出物を示す。この書面中の全ての2 Dゲルでは、酸性タンパク質が左に、より塩基性のタンパク質が右に示される。

【図 7】図 7 A、図 7 B、図 7 C および図 7 D は、別の特異性を有する4種の抗体 (図 7 A、図 7 B、図 7 C、図 7 D) を用いた、レヴィー小体病患者脳のトリトン抽出物の別のプロットを示す。

【図 8】図 8 は、ウエスタン・プロットに用いる抗体が結合するエピトープに対する切断部位の概要を示す。

【図 9】図 9 A、図 9 B は、トリス可溶性タンパク質 (A) とレヴィー小体からの抽出タンパク質 (B) とを2 D電気泳動およびウエスタン・プロットにより比較したものである。

【図 1 0】図 1 0 A、図 1 0 B、図 1 0 C、図 1 0 D は、各種 C 末端抗体で再プローブ (r e p r o b e d) したレヴィー小体からのタンパク質の免疫プロットを示す。

【図 1 1】図 1 1 A および B は、シヌクレイン全体を認識する抗体 (A) もしくはリン - 1 2 9 シヌクレインに特異的な抗体 (B) でプローブした健常者および C o n t u r s i 患者の各種抽出物のウエスタン・プロットを示す。

10

20

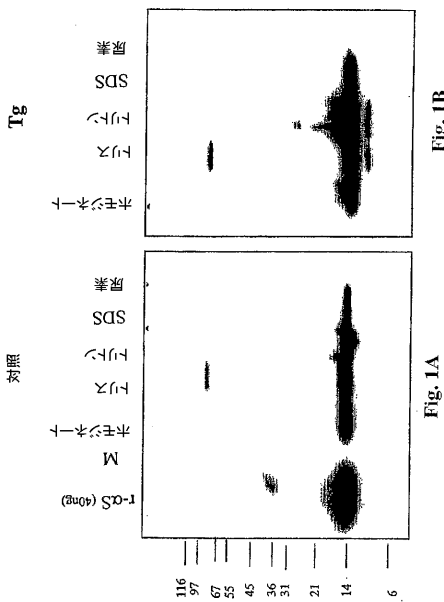
30

40

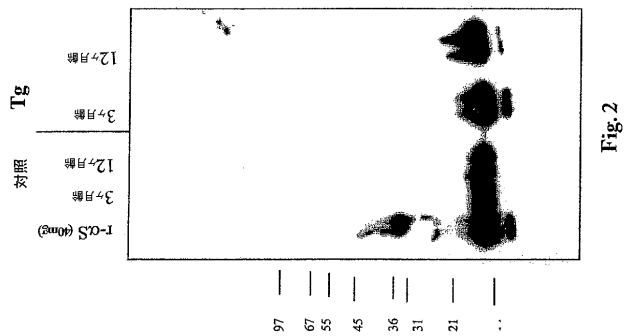
50

【図12】SN1-122のC末端ペプチドの抽出イオンクロマトグラム。
 【図13】SN1-119のC末端ペプチドの抽出イオンクロマトグラム。
 【図14】図14A、B、C、D、EおよびF。全シヌクレインを認識する抗体による2D免疫プロット。ダッシュは、C末端切断型(C-truncated)シヌクレイン種の4つの列(row)の位置を示す。図14A、B、C、EおよびFは異なる患者からの異なる調製物を示し、図14Dは対照である。
 【図15】図15A、B：全シヌクレインに対する抗体(A)とSN1-119に末端特異的なELADW101(B)とを比較する、2D免疫プロット。星印は、両方の抗体と反応するスポットを示す。これらのスポットは、SN1-119として同定される。
 【図16】図16AおよびBは、それぞれ、SN1-119末端特異的ポリクローナル抗体ELADW-101によるレヴィー小体および神経障害の標識を示す。
 【図17】図17AおよびBは、ELADW-101で染色した正常な個体由来の対照である。
 【図18】図18AおよびBは、SN1-119末端特異的モノクローナル抗体12C6で染色したDLBD患者由来の脳切片である。

【図1】



【図2】



【 図 3 】

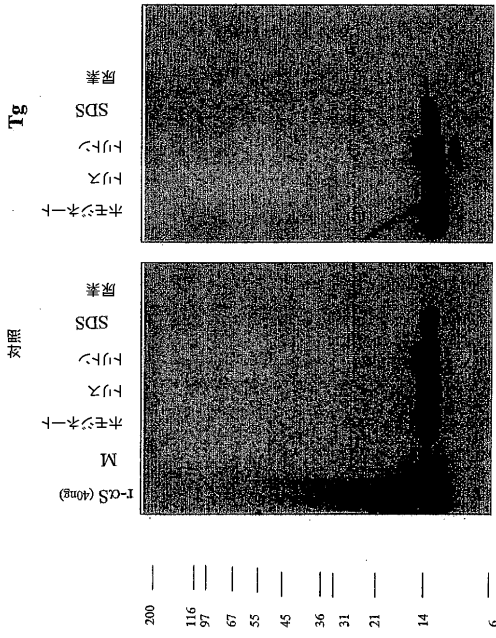


Fig.3B

Fig.3A

【 図 4 】

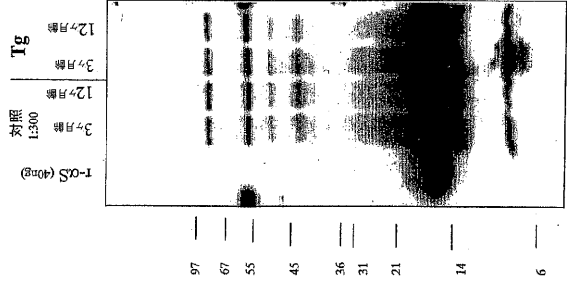
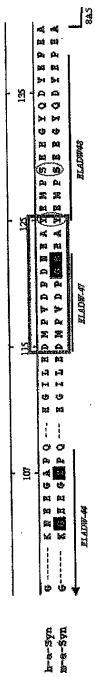


Fig.4

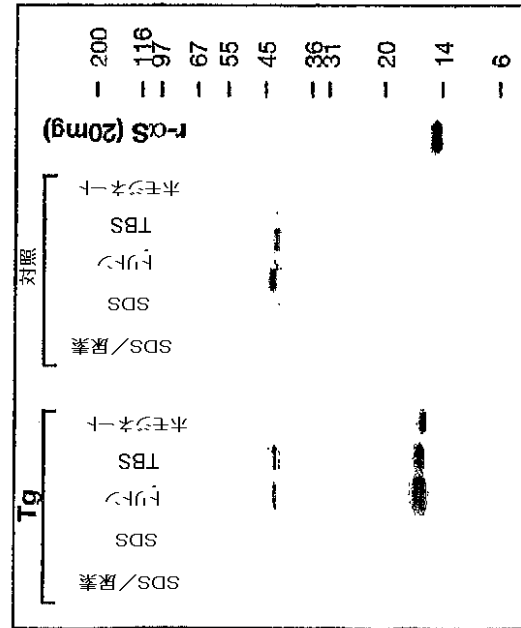
【 図 5 A 】

Fig.5A

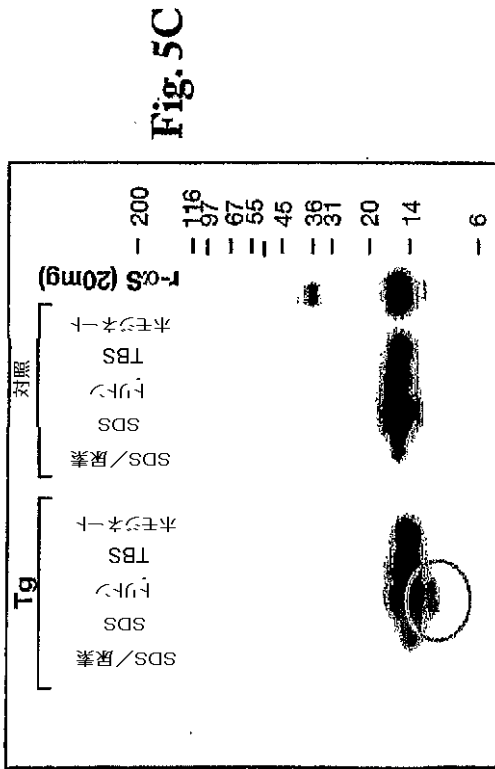


【 図 5 B 】

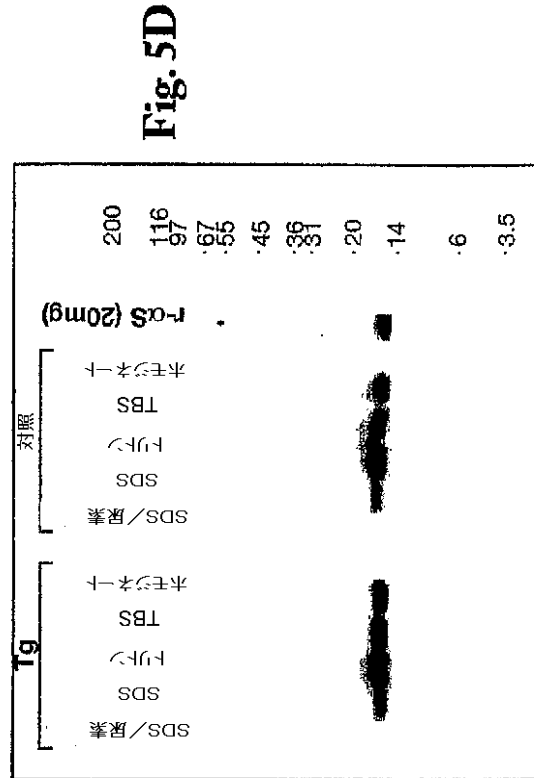
Fig.5B



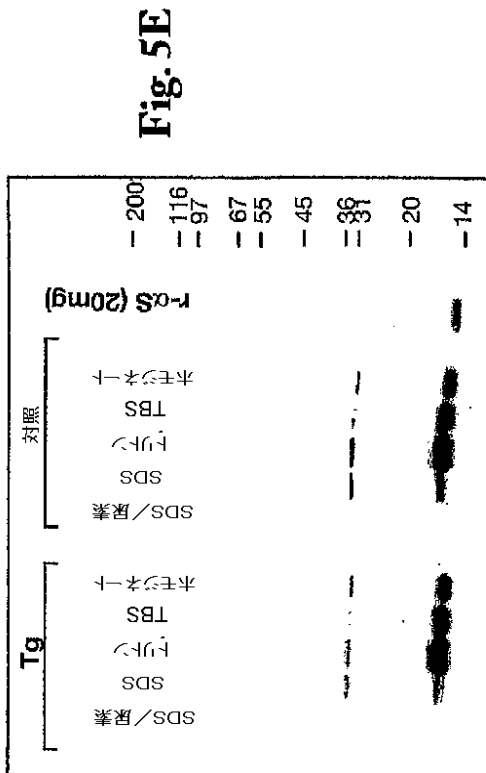
【 図 5 C 】



【 図 5 D 】



【 図 5 E 】



【 図 6 A 】

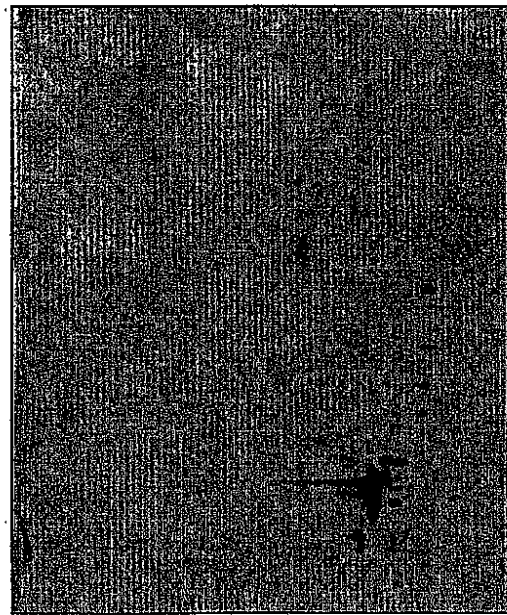


Fig. 6A

【 図 6 B 】

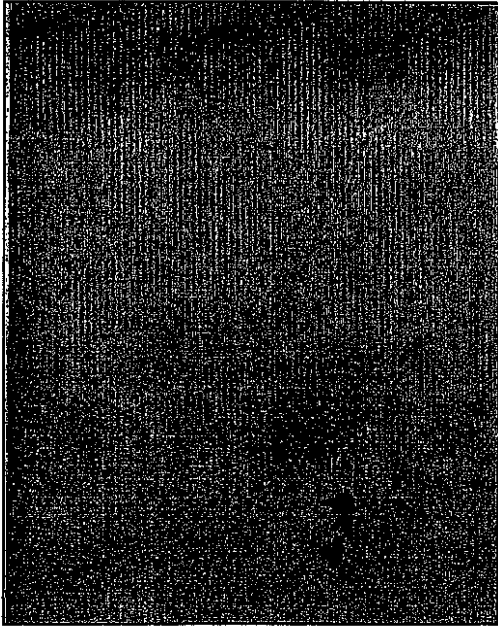


Fig. 6B

【 図 6 C 】

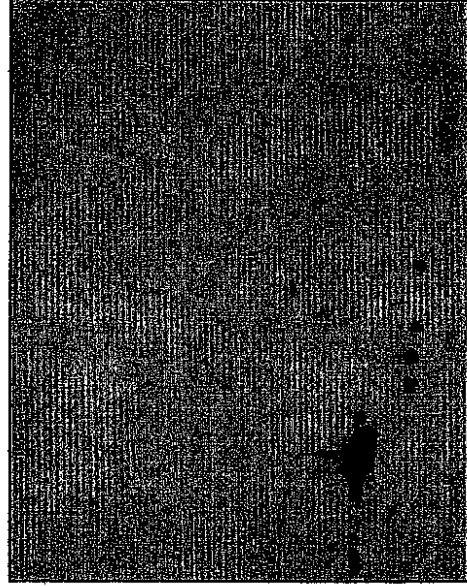


Fig. 6C

【 図 7 A 】

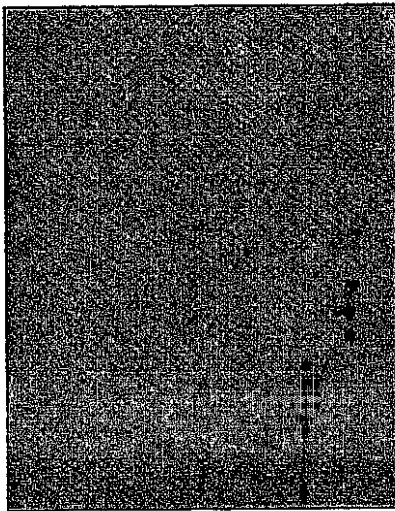


Fig. 7A

【 図 7 B 】

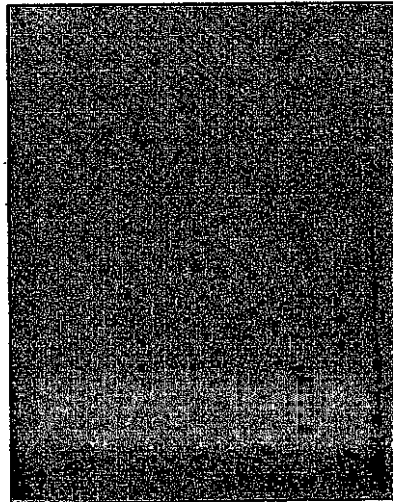


Fig. 7B

【 図 7 C 】

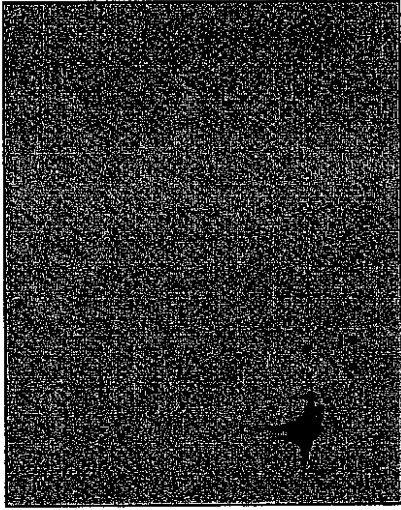


Fig. 7C

【 図 7 D 】

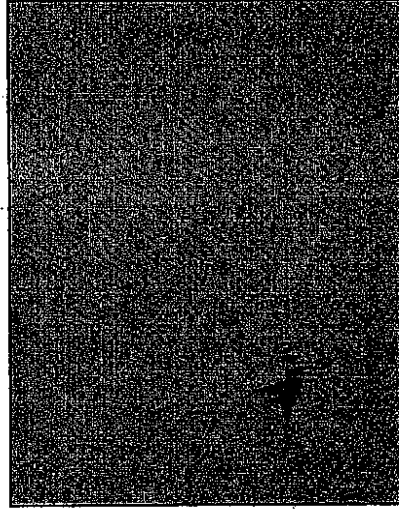


Fig. 7D

【 図 8 】

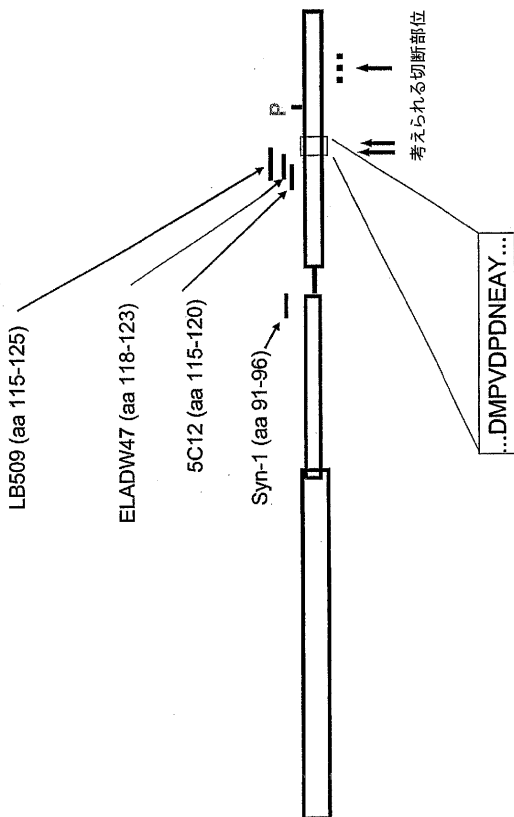


Fig. 8

【 図 9 A 】

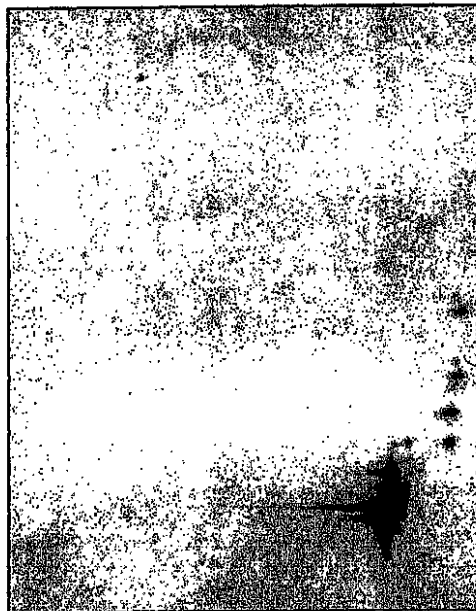


Fig. 9A

【 図 9 B 】

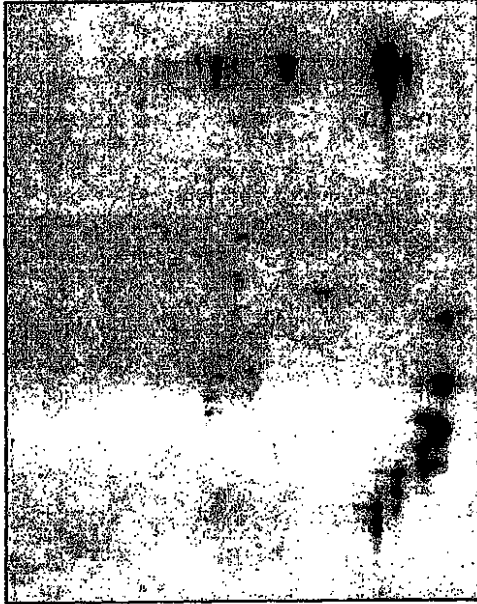


Fig. 9B

【 図 1 0 A 】

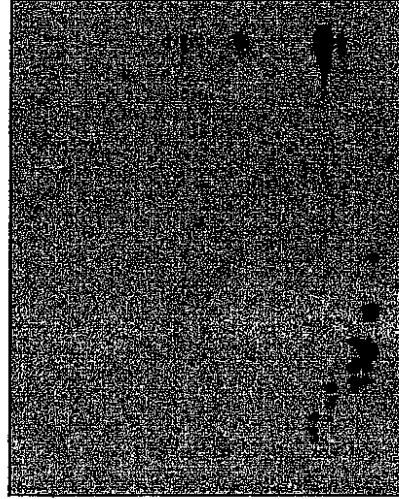


Fig. 10A

【 図 1 0 B 】

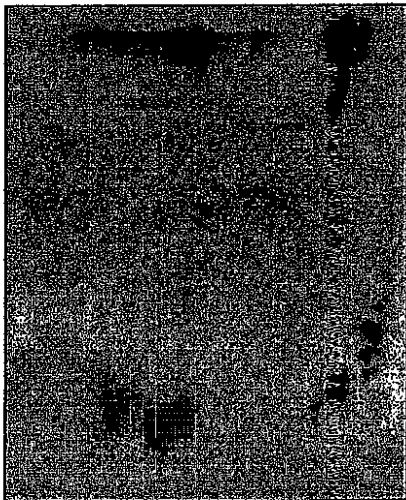


Fig. 10B

【 図 1 0 C 】

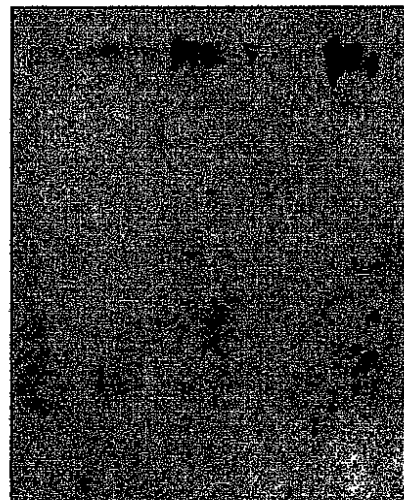


Fig. 10C

【 図 1 0 D 】

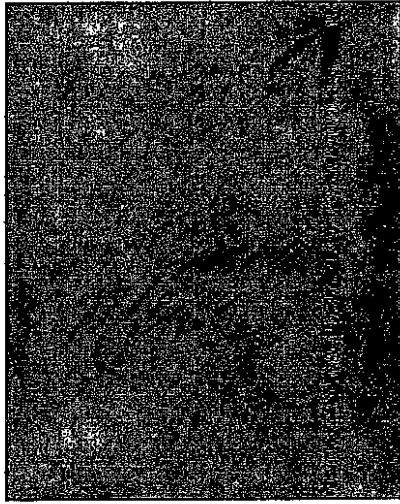


Fig. 10D

【 図 1 2 】

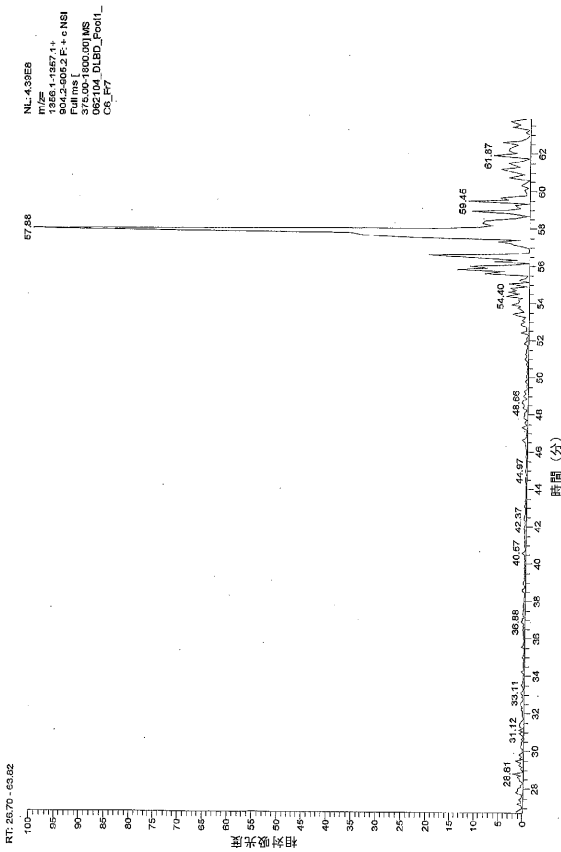


Figure 12

【 図 1 1 】

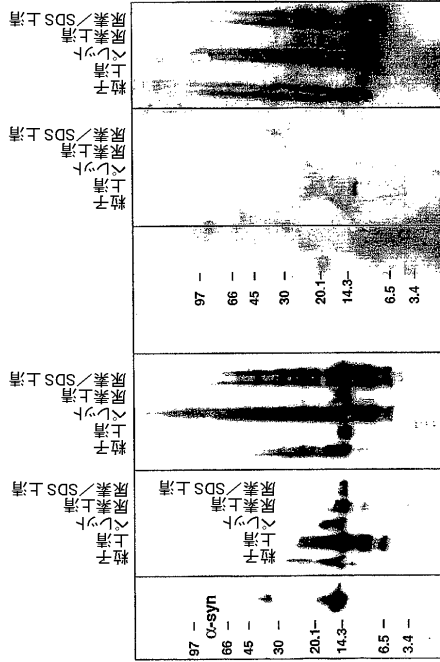


Fig. 11B

Fig. 11A

【 図 1 3 】

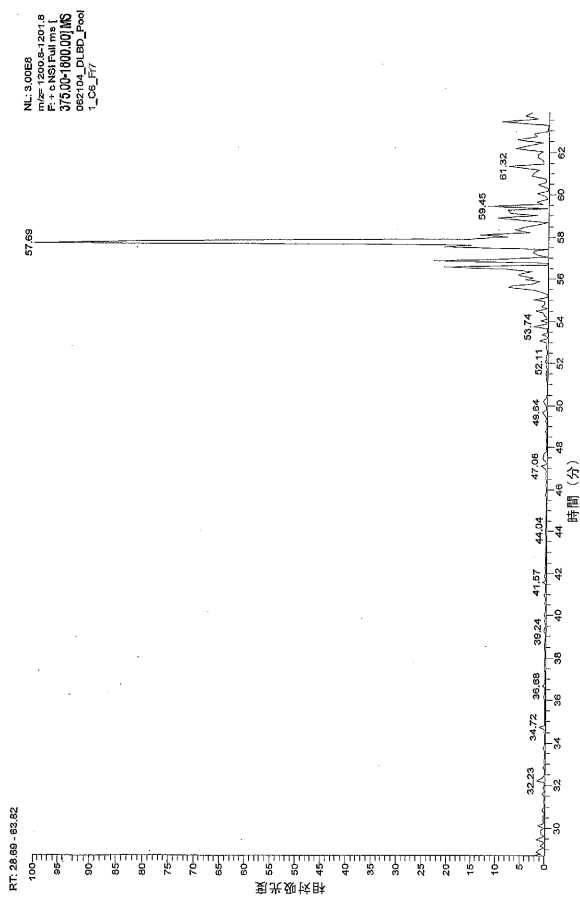
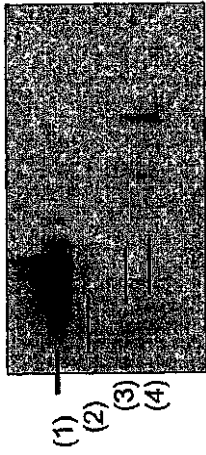


Figure 13

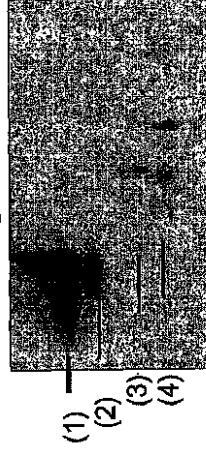
【 図 1 4 A 】

Figure 14A



【 図 1 4 B 】

Figure 14B



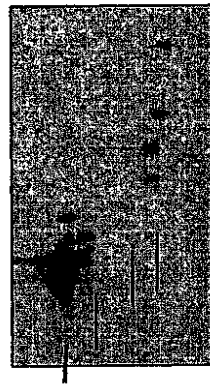
【 図 1 4 C 】

Figure 14C



【 図 1 4 D 】

Figure 14D



【 図 1 4 E 】

Figure 14E



【 図 1 4 F 】



Figure 14F

【 図 1 5 A 】



Figure 15A

【 図 1 5 B 】



Figure 15B

【 図 1 6 A 】

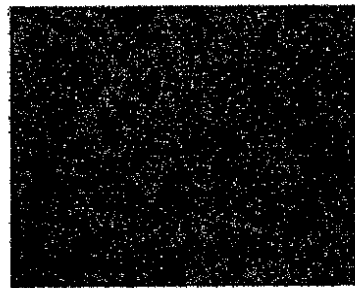


Fig. 16A

【図 16 B】

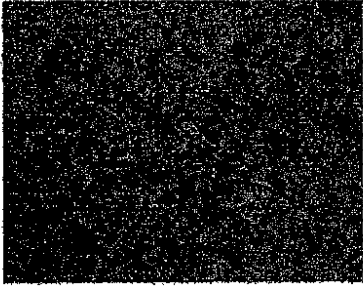


Fig. 16B

【図 17 B】

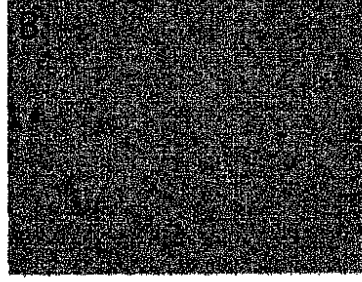


Fig. 17B

【図 17 A】

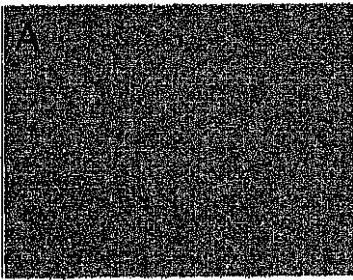


Fig. 17A

【図 18 A】

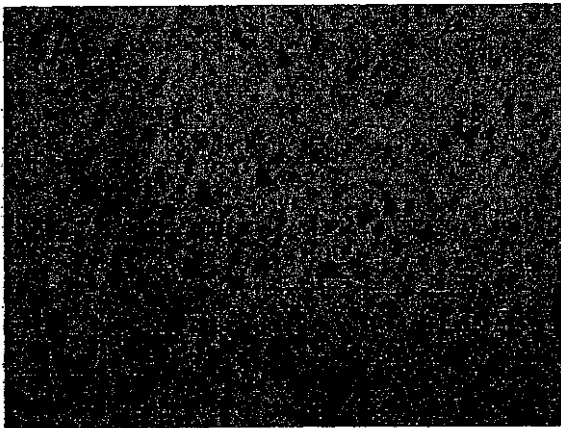


Fig. 18A

【図 18 B】

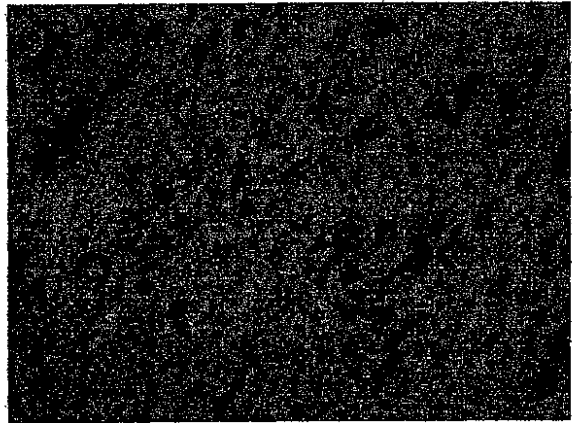


Fig. 18B

【配列表】

2008517928000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成19年7月13日(2007.7.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2008517928000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/37875
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A61K 49/00(2006.01);A01N 61/00(2006.01),37/18(2006.01);A61K 31/00(2006.01),38/00(2006.01);G01N 33/00(2006.01);A01K 67/00(2006.01),67/033(2006.01) USPC: 424/9.1;514/1,2;800/3,9,12 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/9.1; 514/1,2; 800/3,9,12 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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TSIM, K.W. et al., Monoclonal antibodies specific for the different subunits of asymmetric acetylcholinesterase from chick muscle. J. Neurochem. July 1988, Vol. 51, No. 1, pages 95-104, see abstract	52
X	HAMBURGER, A.W., et al., Isolation and characterization of monoclonal antibodies reactive with endothelial cells. Tissue Cell. 1985, Vol. 17, No. 4, pages 451-459, abstract	52
X	US 6,780,971 B2 (Wolozin et al) 24 August 2004 (24.08.2004), column 17, lines 53-62	1, 4
A	TAKAHASHI, M. Phosphorylation of alpha-synuclein characteristic of synucleinopathy lesions is recapitulated in alpha-synuclein transgenic Drosophila. Neuroscience Letters. 2003, Vol. 336, pages 155-158.	1-52
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 07 June 2006 (07.06.2006)		Date of mailing of the international search report 20 JUL 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer <i>Vedrao Bell-Harrige</i> Raim Shukla, Ph.D. Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/37875

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OKOCHI, M. Constitutive Phosphorylation of the Parkinson's Disease Associated alpha-Synuclein. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> . January 2000, Vol 275. No. 1, pages 390-397.	1-52
A	KIM, T.D. et al. Structural Changes in alpha-Synuclein Affect its Chaperone-like Activity In Vitro. <i>Protein Science</i> . 2000, Vol 9. pages 2489-2496	1-52
A	HOYER, W. et al., Dependence of alpha-Synuclein Aggregate Morphology on Solution Conditions. <i>J. Mol. Biol.</i> 2002, Vol 322, pages 383-393.	1-52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/37875

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
Google, EAST, STN
search terms: alpha-synuclein, phosphorylated, 1-115, 1-133, 1-135, 12C6, 7G8

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/46	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 0 7 K	16/46	
A 0 1 K 67/027	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 N 9/50	(2006.01)	A 0 1 K	67/027	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	9/50	
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
		C 1 2 P	21/08	

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 チルコート, タミー ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 6, サンフランシスコ, マゼラン アベニュー 1 8 7

(72)発明者 ゴールドシュタイン, ジェイソン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, バーリングゲーム, エル カミノ レアル 1 4 2 0 ナンバー 1

(72)発明者 アンダーソン, ジョン ピー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 5, サンフランシスコ, リヨン ストリート 1 3 2 3 - エー

(72)発明者 ウォーカー, ドナルド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 2 3, プレザント ヒル, モズデン レーン 3 3

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA40 CB17 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 CA10

DA02 EA04 FA02 FA10 GA05 GA11 GA18 HA03 HA08 HA15

4B050 CC10 DD11 FF14C FF14E LL03

4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ79 QR33 QR41 QR48 QR59 QR69 QR77

QS05 QS12 QS16 QS24 QS28 QS32 QS36 QX02

4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13

4C084 AA02 AA17 BA01 BA08 BA16 BA17 BA18 BA19 BA21 CA18

CA53 DC02 DC32 NA14 ZA15 ZA16 ZC20

4C085 AA13 AA14 AA16 AA38 BB11 BB36 CC02 CC05 CC21 DD62

EE01 EE06 FF02 FF03 FF12 FF13 FF14 FF17 FF18 FF20

4H045 AA11 AA30 AA50 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA21 EA50

FA72 FA74 GA26