

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7065516号

(P7065516)

(45)発行日 令和4年5月12日(2022.5.12)

(24)登録日 令和4年4月28日(2022.4.28)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 7/64 (2006.01)

C 0 7 K 7/64

Z N A

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

C 0 7 K 16/18

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

請求項の数 25 (全83頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-522707(P2018-522707)

(86)(22)出願日 平成28年11月9日(2016.11.9)

(65)公表番号 特表2019-507580(P2019-507580
A)

(43)公表日 平成31年3月22日(2019.3.22)

(86)国際出願番号 PCT/CA2016/051300

(87)国際公開番号 WO2017/079831

(87)国際公開日 平成29年5月18日(2017.5.18)

審査請求日 令和1年11月7日(2019.11.7)

(31)優先権主張番号 62/253,044

(32)優先日 平成27年11月9日(2015.11.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/331,925

(32)優先日 平成28年5月4日(2016.5.4)

最終頁に続く

(73)特許権者 300066874

ザ・ユニバーシティ・オブ・ブリティッ

シュ・コロンビア

カナダ国 V 6 T 1 Z 3 プリティッシュ

コロンビア、バンクーバー、アグロノミ

ー ロード 1 0 3 - 6 1 9 0、ユニバー

シティ・インダストリー リエゾン オフ

イス

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アミロイドベータのN末端エピトープおよびそれに対する立体配座選択的抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

H D S G (配列番号1)の配列からなるAベータペプチドおよびリンカーからなる、環状化合物であって、

前記リンカーが、前記AベータペプチドのN末端残基および前記AベータのC末端残基と共有結合しているアミノ酸G C GまたはC G Cからなる、

環状化合物。

【請求項2】

配列番号2の配列からなる、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

請求項1または2に記載の環状化合物を含む、免疫原。

【請求項4】

前記化合物が、担体タンパク質または免疫原性増強物質と結合している、請求項3に記載の免疫原。

【請求項5】

前記担体タンパク質がウシ血清アルブミン(B S A)である、または前記免疫原性増強物質がキーホールキーホールリンペットヘモシアニン(K L H)である、請求項4に記載の免疫原。

【請求項6】

Aベータモノマーおよび/またはAベータ線維よりもAベータオリゴマーと選択的に結合

する抗体であって、配列番号 17 の配列を有する C D R - H 1 と配列番号 18 の配列を有する C D R - H 2 と配列番号 19 の配列を有する C D R - H 3 とを含む重鎖可変領域、および配列番号 20 の配列を有する C D R - L 1 と配列番号 21 の配列を有する C D R - L 2 と配列番号 22 の配列を有する C D R - L 3 とを含む軽鎖可変領域を含む、抗体。

【請求項 7】

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、あるいはヒト化抗体である、請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 8】

F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v、d s F v、d s - s c F v、二量体、ナノボディ、ミニボディ、ダイアボディおよびその多量体から選択される抗体結合フラグメントである、請求項 6 または 7 に記載の抗体。

10

【請求項 9】

前記抗体は、(i) 配列番号 24 で示されるアミノ酸配列；または (i i) 配列番号 24 と少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、その C D R の配列が配列番号 17、18 および 19 で示される、アミノ酸配列；を含む重鎖可変領域を含む、および/または

前記抗体は、(i) 配列番号 26 で示されるアミノ酸配列；または (i i) 配列番号 26 と少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、その C D R の配列が配列番号 20、21 および 22 で示される、アミノ酸配列；を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体。

20

【請求項 10】

前記重鎖可変領域は、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列を含む、もしくはこれよりなる、および/または

前記軽鎖可変領域は、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を含む、もしくはこれよりなる、

請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体と、検出可能な標識または細胞毒性物質と、を含むイムノコンジュゲート。

【請求項 12】

30

前記検出可能な標識は、陽電子放出放射性核種を含む、請求項 11 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 13】

請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体または請求項 11 もしくは 12 に記載のタンパク質性イムノコンジュゲートをコードする、核酸分子。

【請求項 14】

ベクターに含まれている、請求項 13 に記載の核酸分子。

【請求項 15】

請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体を発現する、細胞。

【請求項 16】

40

ハイブリドーマまたは C H O 細胞である、請求項 15 に記載の細胞。

【請求項 17】

請求項 1 または 2 に記載の化合物、請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の免疫原、請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 11 もしくは 12 に記載のイムノコンジュゲート、請求項 13 もしくは 14 に記載の核酸または請求項 15 もしくは 16 に記載の細胞を含む、組成物。

【請求項 18】

アジュバントをさらに含む、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

請求項 1 または 2 に記載の化合物、請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の免疫原、請求項

50

１７もしくは１８に記載の組成物、請求項６～１０のいずれか１項に記載の抗体、または請求項１１もしくは１２に記載のイムノコンジュゲート、請求項１３もしくは１４に記載の核酸分子、前記核酸分子を含むベクターまたは請求項１５もしくは１６に記載の細胞を含む、キット。

【請求項２０】

請求項６～１０のいずれか１項に記載の抗体を作製する方法であって、

請求項１または２に記載の環状化合物、請求項３～５のいずれか１項に記載の免疫原、または前記環状化合物もしくは前記免疫原を含む組成物、をヒト以外の対象に投与することと、

投与する前記環状化合物もしくは前記免疫原および／またはＡベータオリゴマーに対して特異的または選択的である抗体および／または抗体を発現する細胞を単離することと、を含む方法。

10

【請求項２１】

生体試料がＡベータを含むかどうかを判定する方法であって、

a．前記生体試料を、請求項６～１０のいずれか１項に記載の抗体または請求項１１もしくは１２に記載のイムノコンジュゲートと接触させること、および

b．抗体複合体の存在を検出すること；

を含む方法。

【請求項２２】

Ａベータオリゴマーの伝播の阻害に使用するための、あるいはＡＤおよび／または他のＡベータアミロイド関連疾患を有する対象の治療に使用するための、１）請求項６～１２のいずれか１項に記載の抗体またはイムノコンジュゲート、あるいは前記抗体またはイムノコンジュゲートを含む医薬組成物；２）請求項３～５のいずれか１項に記載の免疫原、または前記免疫原を含む医薬組成物；あるいは３）１）の抗体または２）の免疫原をコードする核酸または前記核酸を含むベクター。

20

【請求項２３】

治療される対象由来の生体試料が、請求項６～１０のいずれか１項に記載の抗体を用いてＡベータの有無またはレベルに関して評価されている、請求項２２に記載の抗体、イムノコンジュゲート、免疫原、医薬組成物、核酸またはベクター。

【請求項２４】

脳またはＣＮＳの他の部分に直接投与される、請求項２２または２３に記載の抗体、イムノコンジュゲート、免疫原、医薬組成物、核酸またはベクター。

30

【請求項２５】

投与する前記環状化合物もしくは前記免疫原および／またはＡベータオリゴマーに対して特異的または選択的である抗体は、前記Ａベータペプチドを含む直鎖状ペプチドと結合しない、もしくはほとんど結合しない、および／または斑と結合しない、もしくはほとんど結合しない、請求項２０に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

40

（関連出願）

これは２０１５年１１月９日に出願された米国特許出願第６２／２５３０４４号、２０１６年５月４日に出願された米国特許出願第６２／３３１，９２５号、２０１６年７月２２日に出願された米国特許出願第６２／３６５，６３４号および２０１６年９月１２日に出願された米国特許出願第６２／３９３，６１５号の優先権の利益を主張するＰＣＴ出願であり、上記の出願はそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

（分野）

本開示は、Ｎ末端アミロイドベータ（ＡベータまたはＡ）エピトープおよびそれに対する抗体、より具体的には、例えばＡベータオリゴマー内で選択的に接触可能な立体配座Ａ

50

ベータエピトープおよび関連する抗体組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

(背景)

36~43アミノ酸のペプチドとして存在するアミロイドベータ(Aベータ)は、酵素であるセクレターゼおよびセクレターゼによってアミロイド前駆体タンパク質(APP)から放出される産物である。アルツハイマー病(AD)患者では、Aベータは可溶性モノマー、不溶性線維および可溶性オリゴマーの形で存在し得る。モノマー型のAベータは、主として不定形のポリペプチド鎖として存在する。線維型のAベータは、よく株と呼ばれる様々な形態に凝集することができる。これらの構造のうちのいくつかは固体NMRにより決定されている。

10

【0004】

例えば、原子分解三次元構造データの結晶学的データベースであるタンパク質データバンク(PDB)では、3回対称性のA構造(PDBエントリー2M4J)、A-40モノマーの2回対称性構造(PDBエントリー2LMN)およびA-42モノマーの一本鎖平行in-register構造(PDBエントリー2MXU)を含めたいくつかの線維の株の構造が入手可能である。

【0005】

2M4Jの構造はLuら[8]に報告されており、2MXUの構造はXiaoら[9]に報告されている。2LMNの構造はPetkovaら[10]に報告されている。

20

【0006】

Aベータオリゴマーは、培養した細胞系およびニューロンを死滅させ、脳スライス培養物および動物生体において記憶を促進し長期増強(LTP)と呼ばれる極めて重要なシナプス活性を遮断することが示されている。

【0007】

これまでにオリゴマーの構造は決定されていない。さらに、NMRおよびその他の証拠から、オリゴマーが単一の明確に定められた構造ではなく、規則性に乏しく立体配座的に可塑性で順応性のある構造アンサンブルの形で存在することがわかっている。さらに、毒性オリゴマー種の濃度はモノマーまたは線維の濃度よりはるかに低い(推定値には幅があるが、約1000分の1またはそれ以下である)ため、この標的は捉えどころのないものとなっている。

30

【0008】

Aベータと結合する抗体が記載されている。

【0009】

米国特許第7,780,963号の抗ADDL抗体は、Aベータ由来拡散性リガンドの多次元立体配座を区別して認識する抗体に関するものである。

【0010】

米国特許第9,176,151号には、患者の生体試料中のAオリゴマーを検出するための選択的抗Aオリゴマー抗体、キットおよび対の抗Aオリゴマー抗体を用いる免疫測定法が記載されている。

40

【0011】

「Anti-amyloid beta antibodies and their use」と題する国際公開第2003070760号は、A-4ペプチドの2つの領域を特異的に認識することが可能な抗体分子であって、第一の領域がアミノ酸配列AEFRHDSGYまたはそのフラグメントを含み、第二の領域がアミノ酸配列VHHQKLVEFAEDVGまたはそのフラグメントを含む抗体分子に関するものである。

【0012】

「Humanized amyloid beta antibodies for use in improving cognition」と題する国際公開第2006066089号は、ベータアミロイドによる疾患の治療のための改善された薬剤および方法、特に、

50

A ペプチドと特異的に結合しアミロイド原性障害（例えば、AD）による斑の量を減少させる効果のあるモノクローナル抗体12A11の同定および特徴付けに関するものである。

【0013】

「Antibodies against amyloid beta 4 with glycosylated in the variable region」と題する国際公開第2007068429号は、少なくとも1つの抗原結合部位が重鎖（VH）の可変領域にグリコシル化アスパラギン（Asn）を含むことを特徴とする精製抗体分子調製物に関するものである。

【0014】

Yuraは、PADREまたは毒素由来担体タンパク質と融合した六価の折畳み型A₁₋₁₅（6A₁₅）について記載している。Wangら（2016）は、この抗体の末梢投与により老年性アルツハイマー病のトランスジェニック動物モデルのアルツハイマー病様病態および認知低下が軽減されることを報告している[11]、[12]。

【0015】

Aベータのモノマーもしくは線維またはモノマーと線維の両方よりもAベータオリゴマーと優先的または選択的に結合する抗体が望ましい。

【発明の概要】

【0016】

本明細書には、残基HDSG（配列番号1）を含むおよび／またはこれよりなるAベータのエピトープ、より具体的には立体配座エピトープまたは関連エピトープならびに前記エピトープと特異的かつ／または選択的に結合する抗体が記載される。エピトープは、オリゴマー種をモノマーおよび／または線維のものから区別する立体配座のAベータのオリゴマー種において選択的に露出され得る。

【0017】

一態様は、環状化合物、好ましくは、HDSと最大6個のAベータの連続する残基とを含むAベータペプチドと、リンカーとを含み、リンカーが、AベータペプチドのN末端残基およびAベータのC末端残基と共有結合している、環状化合物を含む。

【0018】

一実施形態では、Aベータペプチドは、任意選択でHDSG（配列番号1）、HDSGY（配列番号4）、HDSGYE（配列番号11）、RHDSGY（配列番号13）、RHDSG（配列番号5）、RHDS（配列番号6）およびDSGY（配列番号14）から選択される、配列番号1～16のいずれか1つの配列を有するペプチドから選択される。

【0019】

別の実施形態では、環状化合物は環状ペプチドである。

【0020】

別の実施形態では、本明細書に記載される環状化合物は、i) 対応する直鎖状化合物におけるDまたはSと比較して、化合物中のDおよび／またはSの曲率の少なくとも10%、少なくとも20%または少なくとも30%の増大；ii) H、DおよびSから選択される少なくとも1つの残基であって、前記残基の少なくとも1つの二面角が、対応する直鎖状化合物における対応する二面角と比較して少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度または少なくとも80度異なる残基；iii) 対応する直鎖状化合物における対応する二面角と比較して少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度または少なくとも80度異なるDのO-C-C-C二面角；ならびに／あるいはiv) エントロピーによって測定され、対応する直鎖状化合物と比較して少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%強く拘束されたHおよび／またはDの立体配座を含む。

【0021】

別の実施形態では、Aベータペプチドは、HDSG（配列番号1）、HDSGY（配列番

10

20

30

40

50

号 4) および R H D S G (配列番号 5) から選択される。

【 0 0 2 2 】

別の実施形態では、化合物は、検出可能な標識をさらに含む。

【 0 0 2 3 】

別の実施形態では、リンカーは、1 ~ 8 個のアミノ酸および / またはこれと同等に機能する分子および / または 1 つもしくは複数の官能化可能な部分を含む、あるいはこれよりなる。

【 0 0 2 4 】

別の実施形態では、リンカーのアミノ酸が A および G から選択され、かつ / または官能化可能な部分が C である。

【 0 0 2 5 】

別の実施形態では、リンカーは、アミノ酸 G C G もしくは C G C を含む、またはこれよりなる。

【 0 0 2 6 】

別の実施形態では、リンカーは P E G 分子を含む。

【 0 0 2 7 】

別の実施形態では、環状化合物は、図 1 1 B に示される構造から選択される。

【 0 0 2 8 】

一態様は、本明細書に記載される環状化合物を含む、免疫原を含む。

【 0 0 2 9 】

一実施形態では、化合物は、担体タンパク質または免疫原性増強物質と結合している。

【 0 0 3 0 】

別の実施形態では、担体タンパク質がウシ血清アルブミン (B S A) である、または免疫原性増強物質がキーホールキーホールリンペットヘモシアニン (k e y h o l e K e y h o l e L i m p e t H a e m o c y a n i n (K L H)) である。

【 0 0 3 1 】

一態様は、本明細書に記載される化合物または本明細書に記載される免疫原を含む、組成物を含む。

【 0 0 3 2 】

一実施形態では、本明細書に記載される組成物を構成する免疫原は、アジュバントをさらに含む。

【 0 0 3 3 】

別の実施形態では、アジュバントはリン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウムである。

【 0 0 3 4 】

一態様は、任意選択で配列番号 1 ~ 1 6 のいずれか 1 つで示される配列 H D S G (配列番号 1) または関連エピトープ配列を有する A ベータペプチドと特異的に結合する、単離された抗体を含む。

【 0 0 3 5 】

一実施形態では、抗体は、A ベータ上のエピトープと特異的に結合し、エピトープは、抗体との結合に主として関与する少なくとも 2 個の連続するアミノ酸残基を含み、少なくとも 2 個の連続するアミノ酸は、H D S 内に組み込まれた D S である、または少なくとも 2 個の連続するアミノ酸は、H D S 内に組み込まれた H D である。

【 0 0 3 6 】

別の実施形態では、エピトープは、H D S、D S G、H D S G (配列番号 1)、H D S G Y (配列番号 4)、H D S G Y E (配列番号 1 1)、R H D S G Y (配列番号 1 3)、R H D S G (配列番号 5)、R H D S (配列番号 6) および D S G Y (配列番号 1 4) を含む、またはこれよりなる。

【 0 0 3 7 】

別の実施形態では、抗体は環状化合物内、任意選択で、本明細書に記載される環状化合物内、好ましくは配列番号 2 または 1 2 で示される配列を有する環状ペプチド内で提示され

10

20

30

40

50

る H D S G (配列番号 1) または関連エピトープペプチドと特異的または選択的に結合する、立体配座に特異的かつ / または選択的な抗体である。

【 0 0 3 8 】

別の実施形態では、抗体は、A ベータモノマーおよび / または A ベータ線維よりも A ベータオリゴマーと選択的に結合する。

【 0 0 3 9 】

別の実施形態では、A ベータオリゴマーに対する選択性は、A ベータモノマーおよび / または A ベータ線維の少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 30 倍、少なくとも 40 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍、少なくとも 500 倍、少なくとも 1000 倍選択的である。

10

【 0 0 4 0 】

別の実施形態では、抗体は、配列 H D S G (配列番号 1) または関連エピトープを含む直鎖状ペプチドと特異的かつおよび / または選択的に結合することがなく、任意選択で、直鎖状ペプチドの配列は、抗体を生じさせるのに使用する環状化合物の直鎖型、任意選択で配列番号 2 または 1 2 で示される配列を有する直鎖状ペプチドである。

【 0 0 4 1 】

別の実施形態では、抗体は、i n s i t u で A ベータモノマー斑および / または A ベータ線維斑に結合しない、またはほとんど結合しない。

【 0 0 4 2 】

別の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。

20

【 0 0 4 3 】

別の実施形態では、抗体はヒト化抗体である。

【 0 0 4 4 】

別の実施形態では、抗体は、F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v、d s F v、d s - s c F v、二量体、ナノボディ、ミニボディ、ダイアボディおよびその多量体から選択される抗体結合フラグメントである。

【 0 0 4 5 】

別の実施形態は、任意選択で融合している軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含み、重鎖可変領域は、相補性決定領域 C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 を含み、軽鎖可変領域は、相補性決定領域 C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 を含み、前記 C D R のアミノ酸配列は以下の配列を含む：

30

【 表 1 】

CDR-H1	GYTFTSYW	(配列番号17)
CDR-H2	IDPSDSQT	(配列番号18)
CDR-H3	SRGGY	(配列番号19)
CDR-L1	QDINNY	(配列番号20)
CDR-L2	YTS	(配列番号21)
CDR-L3	LQYDNLWT	(配列番号22)

40

【 0 0 4 6 】

別の実施形態では、抗体は、i) 配列番号 2 4 で示されるアミノ酸配列；i i) 配列番号 2 4 と少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 % もしくは少なくとも 90 % の配列同一性を有し、C D R の配列が配列番号 1 7、1 8 および 1 9 で示される、アミノ酸配列；または i i i) 保存的に置換されたアミノ酸配列 i) を含む重鎖可変領域を含む。

【 0 0 4 7 】

別の実施形態では、抗体は、i) 配列番号 2 6 で示されるアミノ酸配列；i i) 配列番号 2 6 と少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 % もしくは少なくとも 90 % の配列同一性を有し、C D R の配列が配列番号 2 0、2 1 および 2

50

2で示される、アミノ酸配列；またはi i i) 保存的に置換されたi) のアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域を含む。

【0048】

別の実施形態では、重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号23で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされ；かつ/あるいは、抗体が、配列番号25で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされる軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。

【0049】

別の実施形態では、重鎖可変領域が、配列番号24で示されるアミノ酸配列を含む、もしくはこれよりなり、かつ/または、軽鎖可変領域が、配列番号26で示されるアミノ酸配列を含む、もしくはこれよりなる。

10

【0050】

別の実施形態では、抗体は、ヒトAベータとの結合に関して、表10に記載されるCDR配列を含む抗体と競合する。

【0051】

一実施形態では、本明細書に記載される環状化合物または免疫原を用いて抗体を調製する。

【0052】

一態様は、本明細書に記載される抗体と、検出可能な標識または細胞毒性物質とを含む、イムノコンジュゲートを含む。

【0053】

一実施形態では、検出可能な標識は、任意選択でPET撮像などの対象の撮像に使用する、陽電子放出放射性核種を含む。

20

【0054】

一態様は、任意選択で希釈剤とともに、本明細書に記載される抗体または本明細書に記載されるイムノコンジュゲートを含む。

【0055】

一態様は、本明細書に記載される化合物もしくは免疫原のタンパク質性部分、本明細書に記載される抗体または本明細書に記載されるタンパク質性イムノコンジュゲートをコードする、核酸分子を含む。

【0056】

一態様は、本明細書に記載されるベクターを含む。

30

【0057】

一態様は、本明細書に記載される抗体を発現する細胞を含み、任意選択で、細胞は、ベクターを含むハイブリドーマである。

【0058】

一態様は、本明細書に記載されるキット、本明細書に記載される免疫原、本明細書に記載される抗体、本明細書に記載されるイムノコンジュゲート、本明細書に記載される核酸分子、本明細書に記載されるベクターまたは本明細書に記載される細胞を含む。

【0059】

一態様は、本明細書に記載される抗体を作製する方法であって、本明細書に記載される化合物もしくは免疫原または前記化合物もしくは免疫原を含む組成物を対象に投与することと、投与する化合物もしくは免疫原および/またはAベータオリゴマーに特異的または選択的であり、任意選択で、Aベータペプチドを含む直鎖状ペプチドと結合しない、もしくはほとんど結合せず、かつ/または斑と結合しない、もしくはほとんど結合しない、抗体および/または抗体を発現する細胞を単離することを含む、方法を含む。

40

【0060】

一態様は、生体試料がAベータを含むかどうかを判定する方法であって、

a. 生体試料と、本明細書に記載される抗体または本明細書に記載されるイムノコンジュゲートとを接触させること；および

b. 何らかの抗体複合体の存在を検出すること

50

を含む、方法を含む。

【0061】

一実施形態では、本明細書に記載される、生体試料がAベータオリゴマーを含有するかどうかを判定する方法であって、

a. 抗体：Aベータオリゴマー複合体の形成が可能な条件下で、試料と、Aベータオリゴマーに特異的かつ/または選択的な本明細書に記載される抗体または本明細書に記載されるイムノコンジュゲートとを接触させること；および

b. 何らかの複合体の存在を検出すること

を含み、

検出可能な複合体の存在により、試料がAベータオリゴマーを含有し得ることが示される、方法。

10

【0062】

別の実施形態では、複合体の量を測定する。

【0063】

別の実施形態では、試料は、脳組織もしくはその抽出物、全血、血漿、血清および/またはCSFを含む。

【0064】

別の実施形態では、試料はヒト試料である。

【0065】

別の実施形態では、試料を対照、任意選択で以前の試料と比較する。

20

【0066】

別の実施形態では、SPRによりAベータのレベルを検出する。

【0067】

一態様は、対象のAベータのレベルを測定する方法であって、ADを有するリスクもしくは疑いがある、またはADを有する対象に、本明細書に記載される抗体を含み、抗体が検出可能な標識とコンジュゲートされているイムノコンジュゲートを投与すること；および標識を検出すること、任意選択で標識を定量的に検出することを含む、方法を含む。

【0068】

一実施形態では、標識は陽電子放出放射性核種である。

【0069】

30

一態様は、対象に免疫応答を誘導する方法であって、本明細書に記載される化合物もしくは化合物の組合せ、任意選択で、HDSG（配列番号1）もしくは関連エピトープペプチド配列を含む環状化合物、免疫原および/または前記化合物もしくは前記免疫原を含む組成物を対象に投与すること；ならびに任意選択で、投与した化合物または免疫原中のAベータペプチドと特異的または選択的に結合する細胞および/または抗体を単離することを含む、方法を含む。

【0070】

一態様は、Aベータオリゴマー伝播を阻害する方法であって、有効量の本明細書に記載されるAベータオリゴマーに特異的または選択的な抗体またはイムノコンジュゲートを、Aベータを発現する細胞もしくは組織と接触させる、または必要とする対象に投与して、Aベータの凝集および/またはオリゴマー伝播を阻害することを含む、方法を含む。

40

【0071】

一態様は、ADおよび/またはその他のAベータアミロイド関連疾患を治療する方法であって、必要とする対象にi) 有効量の本明細書に記載される抗体またはイムノコンジュゲート、任意選択で、Aベータオリゴマーに特異的もしくは選択的な抗体または前記抗体を含む医薬組成物を投与すること；2) HDSG（配列番号1）もしくは関連エピトープ配列を含む単離環状化合物または免疫原または前記環状化合物を含む医薬組成物あるいは3) 1の抗体または2の免疫原をコードする核酸または核酸を含むベクターを、必要とする対象に投与することを含む、方法を含む。

【0072】

50

一実施形態では、本明細書に記載される抗体を用いて、治療する対象由来の生体試料を A ベータの有無またはレベルに関して評価する。

【0073】

一実施形態では、2 つ以上の抗体または免疫原を投与する。

【0074】

一実施形態では、抗体、イムノコンジュゲート、免疫原、組成物または核酸もしくはベクターを脳または CNS の他の部分に直接投与する。

【0075】

一実施形態では、組成物は、薬学的に許容される希釈剤または担体と混合した化合物または免疫原を含む、医薬組成物である。

【0076】

一態様は、配列番号 1 ~ 16 で示される配列のいずれか 1 つの配列よりなる A ベータペプチドを含む、単離ペプチドを含む。

【0077】

一実施形態では、単離ペプチドは、リンカーを含み、リンカーが A ベータペプチドの N 末端残基および / または A ベータの C 末端残基と共有結合している、環状ペプチドである。

【0078】

一実施形態では、単離環状ペプチドは検出可能な標識を含む。

【0079】

一態様は、本明細書に記載される単離ペプチドをコードする核酸配列を含む。

【0080】

一態様は、本明細書に記載される抗体を発現するハイブリドーマを含む。

【0081】

以下の詳細な説明から本開示のその他の特徴と利点が明らかになるであろう。ただし、この詳細な説明から本開示の趣旨および範囲内に含まれる様々な変更および改変が当業者に明らかになることから、詳細な説明および具体例は、本開示の好ましい実施形態を示すと同時に、単に説明を目的として記載されるものであることが理解されるべきである。

【0082】

これより本開示の実施形態を図面と関連させて説明する。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図 1】集団座標法により求めた配列の関数としての露出の可能性を示す図である。

【図 2】曲率を残基インデックスの関数として示す図である。環状ペプチド C G H D S G G (配列番号 2) の平衡アンサンプルの平均曲率 (薄灰色の実線) が直鎖状ペプチドの曲率 (濃灰色の実線) および線維での様々なモノマーの曲率 (点線) とともに示されている。

【図 3 - 1】H 6 の側鎖重原子の二面角分布である。残基 H 6 の模式図が挿入図に示されており; 二面角を取る対応する結合には他の結合より濃い色が与えられており、二面角を定める 4 つの原子がそれより薄い灰色で示されている。直鎖状ペプチド、環状ペプチドおよび (2 M 4 J) 線維アンサンプルの全 3 種の二面角分布のピーク値に対応する角が表 1 に記載されている。表 1 にはピーク値間の差も記載されている。線維では、線維アンサンプルの二面角分布が P D B 構造内の A ベータ 4 2 鎖全 9 本にわたっているため、観察される二面角分布は全体的に、構造 2 M 4 J から取ったいずれの単一鎖の分布より広いものとなっている。

【図 3 - 2】H 6 の側鎖重原子の二面角分布である。残基 H 6 の模式図が挿入図に示されており; 二面角を取る対応する結合には他の結合より濃い色が与えられており、二面角を定める 4 つの原子がそれより薄い灰色で示されている。直鎖状ペプチド、環状ペプチドおよび (2 M 4 J) 線維アンサンプルの全 3 種の二面角分布のピーク値に対応する角が表 1 に記載されている。表 1 にはピーク値間の差も記載されている。線維では、線維アンサンプルの二面角分布が P D B 構造内の A ベータ 4 2 鎖全 9 本にわたっているため、観察される二面角分布は全体的に、構造 2 M 4 J から取ったいずれの単一鎖の分布より広いものと

10

20

30

40

50

なっている。

【図 4】残基 D 7 の側鎖重原子を含む角 $O - C - C - C$ の二面角分布である。D 7 の模式図が挿入図に示されており；二面角を取る対応する結合には他の結合より濃い色が与えられている。数値は表 1 に記載されている。

【図 5】S 8 の側鎖重原子を含む角の二面角分布である。S 8 の模式図が挿入図に示されており；二面角を取る対応する結合には他の結合より濃い色が与えられている。数値は表 1 に記載されている。

【図 6 - 1】最上段のパネル (A)：線維でのエントロピーと比較した直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドの側鎖エントロピーの変化を残基 H、D および S それぞれに対してプロットしたもの。(B) 上から 2 段目のパネル：H 6 の個々の二面角のエントロピー。例えば、 $CA - CB - CG - ND$ 1 は線維ペプチドまたは直鎖状ペプチドよりエントロピーが大幅に低く、このことは、図 3 においてこの特定の二面角の二面角分布の方がピークが鋭いことからわかることに注目されたい。

【図 6 - 2】(C) 下から 2 段目のパネル：D 7 の個々の二面角のエントロピー。(D) 最下段のパネル：S 8 の個々の二面角のエントロピー。

【図 7 - 1】直鎖型および環状型の両方のペプチド $CGHDSSGG$ (配列番号 2) の残基 H、D、S および G の平衡主鎖ラマチャンドラン角を線維 2 M 4 J における残基 H、D、S および G の主鎖ラマチャンドラン角とともに示す図である。

【図 7 - 2】直鎖型および環状型の両方のペプチド $CGHDSSGG$ (配列番号 2) の残基 H、D、S および G の平衡主鎖ラマチャンドラン角を線維 2 M 4 J における残基 H、D、S および G の主鎖ラマチャンドラン角とともに示す図である。

【図 8】A ベータ 4 2 ペプチドの溶解度対残基インデックスを示す図である。HDSG (配列番号 1) の値はそれぞれ +1.1、+0.14、+1.2 および +0.30 である。

【図 9 - 1】溶媒接触表面積 (SASA)、重み付け SASA、 $((s_i - \langle s \rangle) / s) \cdot SASA_i$ 、および $((s_i - \langle s \rangle) / s) \cdot SASA_i - (((s_i - \langle s \rangle) / s) \cdot SASA_i)$ 線維のプロットである。

【図 9 - 2】溶媒接触表面積 (SASA)、重み付け SASA、 $((s_i - \langle s \rangle) / s) \cdot SASA_i$ 、および $((s_i - \langle s \rangle) / s) \cdot SASA_i - (((s_i - \langle s \rangle) / s) \cdot SASA_i)$ 線維のプロットである。

【図 10 - 1】直鎖状ペプチドアンサンブルの最も大きい 3 つのクラスターの重心に対する平均二乗偏差 (RMSD) の値に関する別個の図である。各点は、直鎖状ペプチドアンサンブル、環状ペプチドアンサンブルまたは線維平衡アンサンブルから取った所与の立体配座に対応する。

【図 10 - 2】直鎖状ペプチドアンサンブルの最も大きい 3 つのクラスターの重心に対する平均二乗偏差 (RMSD) の値に関する別個の図である。各点は、直鎖状ペプチドアンサンブル、環状ペプチドアンサンブルまたは線維平衡アンサンブルから取った所与の立体配座に対応する。

【図 11 A】側鎖の配向が見えるようにリコリスで表示した環状ペプチド構造 $CGHDSSGG$ (配列番号 2) の 2 つの図である。薄灰色に着色した立体配座は、図 10 に関して上に記載した最も大きいクラスターの重心であり、環状ペプチドの典型的な立体配座を最もよく表している。直鎖状ペプチドの最も可能性の高い二面角に近い二面角を有する直鎖状立体配座には黒色の側鎖が与えられており；直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドに好ましい傾向のある様々な二面角を示すため、この直鎖状ペプチドの側鎖を環状ペプチドに重ね合わせてある。

【図 11 B】環状のペプチド結合を有する環状ペプチド、G 残基と C 残基の間に PEG2 リンカーを有する環状ペプチドおよび C 残基と H 残基の間に PEG2 リンカーを有する環状ペプチドを含めた HDSG (配列番号 1) を含む環状ペプチドの略図である。

【図 12 - 1】平均二乗偏差 (RMSD) によるクラスタリングプロットであり；軸は図 10 と同じく、直鎖状ペプチドアンサンブルの最も大きい 3 つのクラスターの重心に再度対応する。

10

20

30

40

50

【図 1 2 - 2】平均二乗偏差 (R M S D) によるクラスタリングプロットであり；軸は図 1 0 と同じく、直鎖状ペプチドアンサンプルの最も大きい 3 つのクラスターの重心に再度対応する。

【図 1 3】抗体の表面プラズモン共鳴 (S P R) 直接結合アッセイを示す図であり、パネル A は環状ペプチドおよび直鎖状ペプチドに対するもの、パネル B は A ベータオリゴマーおよび A ベータモノマーに対するものである。

【図 1 4】組織培養上清由来のクローンに関する E L I S A および S P R 直接結合アッセイを用いた一次スクリーニングを示す図である。プロットは、m A b 結合を S P R 直接結合アッセイと E L I S A とで比較したものである。

【図 1 5】選択したクローンの環状ペプチド (構造化ペプチド：丸)、直鎖状ペプチド (非構造化ペプチド、四角)、A ベータモノマー (上向きの三角形) および A ベータオリゴマー (下向きの三角形) に対する S P R 直接結合アッセイを示す図である。アスタリスクは、対照目的で未構造化直鎖状ペプチドに対して反応性のクローンを示している。

【図 1 6】6 E 1 0 陽性対照抗体 (A) およびシクロ (C G H D S G G) (配列番号 2) (B) に対して生じさせた抗体 (3 0 3 - 2 5 - 1 B 4) を用いた死体 A D 脳の斑の免疫組織化学染色を示す図である。

【図 1 7】選択し精製した抗体に関する S P R 間接 (捕捉) 結合アッセイを用いた二次スクリーニングを示す図である。A ベータオリゴマーの捕捉抗体に対する S P R 結合応答から A ベータモノマーの捕捉抗体に対する結合応答を差し引いたもの (丸)；A D 患者からプールした可溶性脳抽出物の捕捉抗体に対する S P R 結合応答から、非 A D 対照からプールした脳抽出物の捕捉抗体に対する結合応答を差し引いたもの (三角)；A D 患者からプールした脳脊髄液 (C S F) の捕捉抗体に対する S P R 結合応答から、非 A D 対照からプールした C S F の捕捉抗体に対する結合応答を差し引いたもの (四角)。

【図 1 8 - 1】A ベータオリゴマーに対する抗体結合の検証を示す図である。様々な濃度の市販の調製済みの安定な A ベータオリゴマーと固定化抗体との結合に関する S P R センサグラムおよび結合応答プロット。パネル A は陽性対照 m A b 6 E 1 0 の結果を示し、パネル B は陰性アイソタイプ対照での結果を示し、パネル C はシクロ (C G H D S G G) (配列番号 2) に対して生じさせた抗体での結果を示している。パネル D は、H D S G (配列番号 1) を含む環状ペプチドに対して生じさせたいくつかの抗体クローンと、濃度 1 マイクロモルの A ベータオリゴマーとの結合をプロットしたものである。

【図 1 8 - 2】A ベータオリゴマーに対する抗体結合の検証を示す図である。様々な濃度の市販の調製済みの安定な A ベータオリゴマーと固定化抗体との結合に関する S P R センサグラムおよび結合応答プロット。パネル A は陽性対照 m A b 6 E 1 0 の結果を示し、パネル B は陰性アイソタイプ対照での結果を示し、パネル C はシクロ (C G H D S G G) (配列番号 2) に対して生じさせた抗体での結果を示している。パネル D は、H D S G (配列番号 1) を含む環状ペプチドに対して生じさせたいくつかの抗体クローンと、濃度 1 マイクロモルの A ベータオリゴマーとの結合をプロットしたものである。

【図 1 8 - 3】A ベータオリゴマーに対する抗体結合の検証を示す図である。様々な濃度の市販の調製済みの安定な A ベータオリゴマーと固定化抗体との結合に関する S P R センサグラムおよび結合応答プロット。パネル A は陽性対照 m A b 6 E 1 0 の結果を示し、パネル B は陰性アイソタイプ対照での結果を示し、パネル C はシクロ (C G H D S G G) (配列番号 2) に対して生じさせた抗体での結果を示している。パネル D は、H D S G (配列番号 1) を含む環状ペプチドに対して生じさせたいくつかの抗体クローンと、濃度 1 マイクロモルの A ベータオリゴマーとの結合をプロットしたものである。

【図 1 8 - 4】A ベータオリゴマーに対する抗体結合の検証を示す図である。様々な濃度の市販の調製済みの安定な A ベータオリゴマーと固定化抗体との結合に関する S P R センサグラムおよび結合応答プロット。パネル A は陽性対照 m A b 6 E 1 0 の結果を示し、パネル B は陰性アイソタイプ対照での結果を示し、パネル C はシクロ (C G H D S G G) (配列番号 2) に対して生じさせた抗体での結果を示している。パネル D は、H D S G (配列番号 1) を含む環状ペプチドに対して生じさせたいくつかの抗体クローンと、濃度 1

10

20

30

40

50

マイクロモルの A ベータオリゴマーとの結合をプロットしたものである。

【図 19】HDSG (配列番号 1) を含む環状ペプチドを用いて生じさせた代表的な抗体の存在下または不在下における *in vivo* での A ベータ凝集伝播のプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0084】

表 1 に、環状ペプチドと他の種との間に分布の有意な差がみられる二面角の二面角分布のピーク値を示す。

【0085】

表 2 に、ラマチャンドラン主鎖ファイ / プサイ角分布のピーク値を示す。

【0086】

表 3 に、最大の立体配座クラスターの重心立体配座である環状ペプチドおよび直鎖状ペプチドアンサンブルから得た最大のクラスターの重心立体配座のラマチャンドラン主鎖二面角および側鎖二面角を示す。

【0087】

表 4 は、環状アンサンブル、直鎖状アンサンブルおよび 2 M 4 J 線維アンサンブルの各残基の平均曲率値の表である。

【0088】

表 5 に、選択した抗体の結合特性を示す。

【0089】

表 6 に、選択した抗体の結合特性のまとめを示す。

【0090】

表 7 に、シクロ (CGHDSGG) (配列番号 2) に対して生じさせた抗体のオリゴマー結合 - モノマー結合を記載する。

【0091】

表 8 に、ホルマリン固定組織で試験した抗体の特性を記載する。

【0092】

表 9 は例示的毒性試験である。

【0093】

表 10 に CDR 配列を記載する。

【0094】

表 11 に重鎖および軽鎖の可変配列を記載する。

【0095】

表 12 は、A ベータエピトープ配列およびリンカーを有する選択配列の表である。

【0096】

表 13 に A ベータ 1 ~ 4 2 ヒトポリペプチド配列全体を記載する。

【0097】

(本開示の詳細な説明)

本明細書には、アルツハイマー病に関連するオリゴマー種を含めた A ベータの毒性オリゴマー種内で優先的に接触可能なエピトープを標的とし得る抗体、免疫療法組成物および方法が提供される。A ベータのオリゴマー種内での抗体結合に特異的かつ / または選択的に接触可能であり得る A ベータの領域が特定された。

【0098】

本明細書で示されるように、モノマーおよび / または線維上に存在しない、またはわずかに存在する A ベータペプチド上の標的を特定することにより、オリゴマー特異的抗体またはオリゴマー選択的抗体の作製を達成した。オリゴマー特異的エピトープは、モノマーまたは線維の対応するセグメントと一次配列が異なっている必要はないが、オリゴマーにおいて立体配座的に際立ったものであり得る。つまり、これらは、オリゴマー内で、主鎖および / または側鎖の配向の点でモノマーおよび / または線維にはみられない (または好ましくない) と考えられる際立った立体配座を示す。

【0099】

10

20

30

40

50

直鎖状ペプチド領域に対して生じさせた抗体は、オリゴマーに選択的でないものであり得、したがって、モノマー斑またはAベータ斑にも結合し得る。

【0100】

本明細書に記載されるように、オリゴマー型のAベータに選択的になり得る抗体を開発するため、本発明者らは、線維において破壊されやすく、オリゴマーの表面に露出し得るAベータ配列の領域を特定することを目指した。

【0101】

実施例に記載されるように、本発明者らは、線維において破壊されやすいことが明らかになった領域を特定した。本発明者らは、その特定された標的を含む環状化合物が直鎖状アンサンプルまたは線維アンサンプルに対して別の立体配座の基準、例えば、より高い曲率、より大きい露出表面積、別の二面角分布および/または平均二乗偏差(RMSD)によるアライメントが容易ではないことなどを満たすようこれを設計した。

10

【0102】

標的領域を含む環状ペプチドを用いて、同じ配列の直鎖状ペプチド(例えば、対応する直鎖状配列)と比較して環状ペプチドと優先的に結合する抗体を生じさせることができた。実験結果が記載されており、合成モノマーと比較して合成オリゴマーと選択的に結合し、対照CSFよりもAD患者のCSFと優先的に結合し、かつ/または対照の可溶性脳抽出物よりもAD患者の可溶性脳抽出物と優先的に結合する、エピトープ特異的かつ立体配座選択的な抗体が特定される。さらに、AD脳組織の染色では、斑との結合を全くまたはほとんど示さない抗体が特定され、*in vitro*試験では、抗体がAオリゴマーの伝播および凝集を阻害することがわかった。

20

【0103】

I. 定義

本明細書で使用される「Aベータ(A-beta)」という用語は、代替的に「アミロイドベータ」、「アミロイド」、Aベータ(A-beta)、Aベータ(A-beta)または「A」と呼ばれ得る。アミロイドベータは、36~43個のアミノ酸よりなるペプチドであり、あらゆる種のあらゆる野生型および変異型、特にヒトAベータを包含する。Aベータ40は40アミノ酸型を指し、Aベータ42は42アミノ酸型を指すなど。ヒト野生型Aベータ42のアミノ酸配列は配列番号3で示されるものである。

【0104】

本明細書で使用される「Aベータモノマー」という用語は、Aベータ(例えば、1~40、1~42、1~43)ペプチドの個々のサブユニット型のいずれかを指す。

30

【0105】

本明細書で使用される「Aベータオリゴマー」という用語は、本明細書では、複数(例えば、少なくとも2つ)のAベータモノマーが非共有結合によって、約100個未満またはより通常には約50個未満のモノマーからなり、立体配座に柔軟性があり、部分的に規則的である三次元の小球に凝集したAベータサブユニットのいずれか複数のものを指す。例えば、オリゴマーは、3個、4個、5個またはそれ以上のモノマーを含み得る。本明細書で使用される「Aベータオリゴマー」という用語は、合成Aベータオリゴマーおよび/または天然Aベータオリゴマーの両方を包含する。「天然Aベータオリゴマー」は、*in vivo*で、例えばADを有する対象の脳およびCSF内で形成されるAベータオリゴマーを指す。

40

【0106】

本明細書で使用される「Aベータ線維」という用語は、電子顕微鏡下で線維構造を示す個々のAベータペプチドが非共有結合により会合した集合体を含む分子構造を指す。線維構造は通常、「クロスベータ」構造であり、理論上、多量体の大きさに上限はなく、線維は数千個または何千個ものモノマーを含み得る。線維は数千個単位で凝集し、ADに特徴的な主な病理学的形態の1つである老人斑を形成し得る。

【0107】

「HDSG」という用語は、配列番号1で示されるヒスチジン、アスパラギン酸、セリン

50

およびグリシンというアミノ酸配列を意味する。これと同様に、D S G、D S G G (配列番号 3)、H D S G Y E (配列番号 11)、H D S G Y (配列番号 4)、R H D S G (配列番号 5)、R H D S (配列番号 6) は、1 文字アミノ酸コードによって識別されるアミノ酸配列を指す。文脈によっては、アミノ酸配列と記載される場合、それは A ベータまたは単離ペプチド内の配列、例えば環状化合物のアミノ酸配列などを指すことがある。

【0108】

本明細書で使用される「直鎖状化合物、モノマーおよび/または線維内でアミノ酸残基 (例えば、H、D、S および/または G) によって占められるものとは別の立体配座」という用語は、溶媒露出度、エントロピー、曲率 (例えば、ペプチド H D S G (配列番号 1) の場合と、例えば実施例に記載される環状ペプチドの場合との比較)、R M S D 構造アライメントおよび 1 つもしくは複数の主鎖二面角または側鎖二面角から選択される 1 つまたは複数の立体配座特性が、例えば、P D B、2 M 4 J、2 M X U、2 L M N または 2 L M P ならびに図 1 ~ 12 および/または表に示される状況、A ベータモノマー構造および/または A ベータ線維構造で H、D および/または S を含む A ベータ直鎖状化合物と比較して、その残基の前記特性が異なることを意味する。例えば、図 2 および表 4 は、環状ペプチドアンサンプルの H D S G (配列番号 1) の曲率が、線維立体配座のアンサンプルでの H D S G (配列番号 1) の曲率より有意に大きいことを示している。このことは、D 7、S 8 および G 9 で特に明白である。さらに、D 7 および S 8 では、環状ペプチドアンサンプルでの曲率は、直鎖状ペプチドアンサンプルでの曲率より大幅に大きい。このことは、立体配座選択性が特に残基 D 7 および S 8 によって付与され得ることを示している。図 3 の最後の 2 つのパネルは、環状ペプチドアンサンプルでは H 6 の角 (N - C A - C B - C G) および (C - C A - C B - C G) の二面角分布が確かに重なっているが、直鎖状ペプチドおよび線維のアンサンプルで最も頻度の高い角ではない (N - C A - C B - C G の確率は直鎖状および線維でそれぞれ 36% および 13% であり、C - C A - C B - C G の確率は直鎖状および線維でそれぞれ 36% および 13% である) ことを示している。図 4 の最後のパネルは、残基 D 7 の側鎖に関する角 (O - C - C A - C B) の二面角分布が、モノマーまたは線維と比較して別の立体配座の分布を反映していることを示している。図 5 は、残基 S 8 の側鎖に関する角 (N - C A - C B - O G)、(C - C A - C B - O G) および (O - C - C A - C B) の二面角分布が、モノマーまたは線維と比較して別の立体配座の分布を反映していることを示している。これと同様に、別の立体配座は、比較立体配座より弱くまたは強く「拘束された」ものであり得る。例えば、図 6 は、H 6 は、環状ペプチドでは線維またはモノマーの場合より強く拘束されていることを示している。残基 D 7 は、環状ペプチドアンサンプルではモノマーの場合より強く拘束されているが、線維の場合より弱く拘束されている。残基 S 8 は、環状ペプチドアンサンプルでは線維の場合より弱く拘束されており、同じくモノマーの場合よりわずかに弱く拘束されている。図 7 は、環状ペプチドの主鎖のラマチャンドラン二面角の分布が、残基 D 7 および S 8 に関してモノマーまたは線維の分布と大幅に異なっていることを示している。図 8 は、残基 H D S G (配列番号 1) が、A ベータペプチドでみられる平均溶解度よりも溶解度が大きいことを示しており、このことから、立体配座のオリゴマーアンサンプルではこれらの残基が露出している可能性があることがわかる。図 9 は、残基 H D S G (配列番号 1) の溶媒接触表面積 S A S A が線維と比較して増大していること、および溶解度による重み付けを実施した場合、環状ペプチドアンサンプルではいずれの残基も重み付け S A S A が線維のものより増大しており、残基 S 8 は線維より重み付け S A S A が大幅に増大していることを示している。図 10 は、H D S G (配列番号 1) の環状ペプチド平衡構造が直鎖状ペプチドまたは線維内の対応する配列の平衡構造とは異なる方法でクラスター化し、直鎖状および線維のアンサンプルは明確に分化しないことを示している。

【0109】

「アミノ酸」という用語は、天然のアミノ酸および修飾された L - アミノ酸をすべて包含する。アミノ酸の原子は様々な同位体を含み得る。例えば、アミノ酸は、水素に代わるジユウテリウム、窒素 14 に代わる窒素 15 および炭素 12 に代わる炭素 13 ならびにその

10

20

30

40

50

他の同様の变化を含み得る。

【0110】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、ベニヤ化 (veneer) 抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体ならびに例えば一本鎖 Fab フラグメント、Fab' 2 フラグメントまたは一本鎖 Fv フラグメントを含めた上記の抗体のフラグメントを包含するものとする。抗体は、組換え供給源由来のものおよび/またはウサギ、ラマ、サメなどの動物で産生されたものであり得る。また、トランスジェニック動物で産生され得る、もしくは生化学技術を用いて作製され得る、またはファージライブラリーなどのライブラリーから単離され得るヒト抗体も包含される。ヒト化抗体またはその他のキメラ抗体は、1種類または2種類以上のアイソタイプもしくはクラスまたは種由来の配列を含み得る。

10

【0111】

「単離された抗体」という語句は、in vivo または in vitro で産生され、抗体を産生した供給源、例えば、動物、ハイブリドーマまたはその他の細胞系 (抗体を産生する組換え昆虫、酵母または細菌細胞など) から取り出された抗体を指す。単離された抗体は任意選択で「精製」されており、これは少なくとも 80%、85%、90%、95%、98% または 99% の純度であることを意味する。

【0112】

本明細書で使用される「結合フラグメント」という用語は、抗体または抗体鎖の一部または一部分であって、インタクトの抗体もしくは抗体鎖または完全な抗体もしくは抗体鎖より少ないアミノ酸残基を含み、抗原と結合する、またはインタクトの抗体と競合するものを指す。例示的結合フラグメントとしては、特に限定されないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ナノボディ、ミニボディ、ダイアボディおよびその多量体が挙げられる。フラグメントは、インタクトの抗体もしくは抗体鎖または完全な抗体もしくは抗体鎖の化学処理または酵素処理によって得ることができる。フラグメントは、組換え手段によっても得ることができる。例えば、抗体をペプシンで処理することにより F(ab')₂ フラグメントを作製することができる。得られた F(ab')₂ フラグメントにジスルフィド架橋を還元する処理を実施して、Fab' フラグメントを作製することができる。パパイン消化により Fab フラグメントの形成を引き起こすことができる。また、組換え発現技術により Fab、Fab' および F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体フラグメントならびにその他のフラグメントを構築することもできる。

20

30

【0113】

当該技術分野で認識されている「IMGT 番号付け」または「ImMunoGeneTics データベース番号付け」という用語は、抗体またはその抗原結合部分の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の他のアミノ酸残基より可変性のある (すなわち、超可変性の) アミノ酸残基を番号付けするシステムを指す。

【0114】

ある抗体が HDSG (配列番号 1) などのエピトープと特異的に結合すると記載される場合、それは、その抗体が特定の残基またはその一部、例えば HDSG の少なくとも 2 つの残基を含むペプチドと最小限の親和性で特異的に結合し、例えばアイソタイプ対照抗体より大きい無関係な配列にも無関係な配列の空間定位にも結合しないことを意味する。このような抗体は必ずしも HDSG (配列番号 1) の各残基と接触するわけではなく、前記エピトープ内のあらゆる単一のアミノ酸置換またはアミノ酸欠失が、必ずしも結合親和性に大きな影響を及ぼし、かつ/または同程度の影響を及ぼすというわけではない。

40

【0115】

ある抗体がエピトープ、例えば HDSG (配列番号 1) などの立体配座エピトープなどと選択的に結合すると記載される場合、それは、その抗体が特定の残基またはその一部を含む 1 つまたは複数の特定の立体配座に、別の立体配座の前記残基と結合する場合より大きい親和性で優先的に結合することを意味する。例えば、ある抗体が対応する直鎖状ペプチ

50

ドよりもHDSGまたは関連エピトープを含むシクロペプチドと選択的に結合すると記載される場合、その抗体は、直鎖状ペプチドと結合する場合の少なくとも2倍の親和性でそのシクロペプチドと結合する。

【0116】

本明細書で使用される「立体配座エピトープ」という用語は、アミノ酸配列が特定の三次元構造を有し、対応する直鎖状ペプチド中に存在しない、または存在する可能性が低い三次元構造の少なくとも一面がコグネイト抗体によって特異的かつ／または選択的に認識される、エピトープを指す。エピトープ、例えばHDSG（配列番号1）は、オリゴマーAベータの分子表面に一部もしくは全部が露出しているもの、およびモノマー斑Aベータもしくは線維斑Aベータでは一部もしくは全部が抗体に認識されにくいものであり得る。立体配座特異的エピトープと特異的かつ／または選択的に結合する抗体は、その立体配座特異的／選択的エピトープの1つまたは複数のアミノ酸の空間的配置を認識する。例えば、HDSG（配列番号1）立体配座エピトープは、抗体によって特異的かつ／または選択的に、例えば直鎖状HDSG（配列番号1）と比較して少なくとも2倍、3倍、5倍、10倍、50倍、100倍、250倍、500倍もしくは1000倍またはそれ以上選択的に認識される、HDSG（配列番号1）のエピトープを指す。

【0117】

本明細書で使用される「関連エピトープ」という用語は、抗原性であるHDSG（配列番号1）の少なくとも2つの残基および／またはAベータのHDSG（配列番号1）の少なくとも2つの残基のN末端側もしくはC末端側のいずれかに1つもしくは2つのアミノ酸残基を含む配列を意味する。例えば、本明細書では、HDSG（配列番号1）、HDSGY（配列番号4）およびRHDSG（配列番号5）がAベータ線維において不規則になりやすい領域として特定されたことが示される。したがって、HDSGY（配列番号4）およびRHDSG（配列番号5）は関連エピトープである。さらに、モデル化により、特に残基D7およびS8は環状化合物において対応する直鎖状配列と比較して差がみられることが明らかになっており、したがって、DS、HDS、DSG、DSGY（配列番号13）およびRHDS（配列番号6）は関連エピトープである。例示的関連エピトープとしては、表12に記載されるAベータ配列が挙げられる。

【0118】

本明細書でアミノ酸配列内のアミノ酸もしくはその側鎖（例えば、HDSG（配列番号1）のHもしくはD）またはより大きいポリペプチド内のアミノ酸配列に関して使用される「拘束された立体配座」という用語は、アミノ酸二面角の回転運動性が対応する直鎖状ペプチド配列または配列もしくはより大きいポリペプチドよりも低下し、それにより、許容される立体配座の数が少なくなっていることを意味する。このことは、例えば、側鎖二面角自由度のアンサンブルのエントロピー減少を見出すことによって定量化することが可能であり、H、DおよびSについては図6にプロットされている。例えば、配列内の側鎖の立体配座自由度が直鎖状ペプチドより低ければ、エントロピーが減少することになる。このような立体配座の制約があれば、この抗原に対して特異的に生じた抗体の立体配座選択性が増大するものと思われる。本明細書で使用される「より拘束された立体配座」という用語は、1つまたは複数の二面角の二面角分布（許容される二面角のアンサンブル）が、例えば、アミノ酸、例えばHおよび／またはDのエントロピーによる判定（例えば、立体配座の拘束が強いほどエントロピーが低くなる）で、比較立体配座より少なくとも10%強く拘束されていることを意味する。具体的には、より拘束された環状立体配座のアンサンブル全体のHDSの直鎖状ペプチドにおけるエントロピーに対する平均エントロピー変化、S（環状）-S（直鎖状）は、拘束されていない立体配座アンサンブルから、例えば量が平均で10%超、20%超、30%超または40%超減少しており、直鎖状ペプチドのS（直鎖状）-S（線維）/[平均（S（直鎖状）+S（線維））]は、H6が約81.7%のエントロピー減少、D7が49.8%のエントロピー減少、S8が-8.83%のエントロピー減少（負の数は環状ペプチドの方が直鎖状ペプチドよりS8のエントロピーが大きいことを示す）である。

【 0 1 1 9 】

本明細書で抗体に関して使用される「斑との結合が全くまたはほとんどみられない」または「斑と結合しない、またはほとんど結合しない」という用語は、抗体が（例えば、*insitu*の）免疫組織化学法で典型的な斑の染色形態を示さず、染色のレベルが、IgG陰性の（例えば、無関係な）アイソタイプ対照でみられるレベルと同等である、またはその2倍以下であることを意味する。

【 0 1 2 0 】

「単離ペプチド」という用語は、例えば組換え技術または合成技術によって作製され、ペプチドを作製した組換え細胞または残存ペプチド合成反応物などの供給源から取り出されたペプチドを指す。単離ペプチドは、任意選択で「精製」されており、これは少なくとも

10

【 0 1 2 1 】

本明細書で使用される「検出可能な標識」という用語は、本明細書に記載されるペプチドまたは化合物内に付加または導入することができるペプチド配列（*myc*タグ、HAタグ、V5タグまたはNEタグなど）、蛍光タンパク質などの部分であって、直接的または間接的に検出可能なシグナルを発生することが可能な部分を指す。例えば、標識は、（例えば、PET撮像に使用する）放射線不透過性の陽電子放出放射性核種もしくは放射性同位元素、例えば ^3H 、 ^{13}N 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I など；蛍光化合物（フルオロフォア）もしくは化学発光化合物（発色団）、例えばフルオレセインイソチオシアナート、ローダミンもしくはルシフェリンなど；酵素、例えばアルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼもしくは西洋ワサビペルオキシダーゼなど；造影剤；または金属イオンであり得る。検出可能な標識はまた、例えば二次抗体を用いて間接的に検出可能なものであり得る。

20

【 0 1 2 2 】

通常使用される「エピトープ」という用語は、抗体によって特異的に認識される抗原の抗体結合部位、通常、ポリペプチドセグメントを意味する。本明細書で使用される「エピトープ」はまた、記載される集団座標法を用いてAベータ上で特定され得るアミノ酸配列またはその一部を指すこともある。例えば、特定された標的領域HDSG（配列番号1）を含む環状化合物に対応する単離ペプチドに対して作製した抗体は、前記エピトープ配列の一部または全部を認識する。エピトープが抗体による結合に接触可能な場合、それは本明細書において「接触可能な」ものである。

30

【 0 1 2 3 】

本明細書で使用される「より高い親和性」という用語は、抗体Xが標的Zより強く（ K_{on} ）かつ/または小さい解離定数（ K_{off} ）で標的Yと結合する場合の相対的抗体結合度を指し、この文脈では、抗体Xは標的Yに対して標的Zより高い親和性を有する。これと同様に、本明細書の「より低い親和性」という用語は、抗体Xが標的Zより弱くかつ/または大きい解離定数で標的Yと結合する場合の抗体結合度を指し、この文脈では、抗体Xは標的Yに対して標的Zより低い親和性を有する。抗体とその標的抗原との間の結合の親和性は $K_A = 1 / K_D$ で表すことができ、式中、 $K_D = k_{on} / k_{off}$ である。 k_{on} および k_{off} の値は、表面プラズモン共鳴技術を用いて、例えばMolecular Affinity Screening System (MASS-1) (Sierra Sensors社、ハンブルク、ドイツ)を用いて測定することができる。環状化合物、例えば任意選択の環状ペプチド中に提示される立体配座に選択的な抗体は、環状化合物（例えば、環状ペプチド）に対する親和性が直鎖状形態の対応する配列（例えば、非環化配列）より大きい。

40

【 0 1 2 4 】

同じく本明細書で使用される「免疫原性」という用語は、抗体の産生を誘発し、免疫原の免疫原性部分に対するT細胞およびその他の反応性免疫細胞を活性化する物質を指す。

【 0 1 2 5 】

50

環状化合物に関する「対応する直鎖状化合物」という用語は、環状化合物と同じ配列もしくは化学的部分を含む、またはこれよりなるが、直鎖状（すなわち、非環状）形態であり、例えば溶液中でみられ得る直鎖状ペプチドの特性を有する、化合物、任意選択で直鎖状ペプチドを指す。例えば、対応する直鎖状化合物は、環化されていない合成ペプチドであり得る。

【0126】

ある抗体に関して本明細書で使用される「特異的に結合する」は、その抗体がエピトープ配列を認識し、最小限の親和性でその標的抗原と結合することを意味する。例えば、多価抗体は、その標的と少なくとも $1 \text{ e} - 6$ 、少なくとも $1 \text{ e} - 7$ 、少なくとも $1 \text{ e} - 8$ 、少なくとも $1 \text{ e} - 9$ または少なくとも $1 \text{ e} - 10$ の K_D で結合する。少なくとも $1 \text{ e} - 8$ より高い親和性が好ましいものであり得る。可変ドメインを1つ含む Fab フラグメントなどの抗原結合フラグメントは、非フラグメント化抗体との多価相互作用の10倍または100倍低い親和性でその標的と結合する。

10

【0127】

ある形態のAベータ（例えば、線維、モノマーまたはオリゴマー）または環状化合物と選択的に結合する抗体に関して本明細書で使用される「選択的に結合する」という用語は、その抗体が上記の形態と少なくとも2倍、少なくとも3倍または少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも250倍、少なくとも500倍もしくは少なくとも1000倍またはそれ以上の親和性で結合することを意味する。したがって、特定の立体配座（例えば、オリゴマー）に対してより選択的な抗体は、別の形態のペプチドおよび/または直鎖状ペプチドの少なくとも2倍などの親和性で特定の形態のAベータと優先的に結合する。

20

【0128】

本明細書で使用される「リンカー」という用語は、HDSG（配列番号1）エピトープペプチドを含むペプチドと共有結合して、任意選択でHDSG（配列番号1）ペプチドのN末端およびC末端と結合して、環状化合物を生じさせることができる化学的部分を指す。リンカーは、スペーサーおよび/または1つもしくは複数の官能化可能な部分を含み得る。リンカーは、官能化可能な部分を介して担体タンパク質またはキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）などの免疫原強化物質と結合することができる。

【0129】

本明細書で使用される「スペーサー」という用語は、ペプチドのN末端およびC末端と直接的または間接的に共有結合して、長さがペプチド自体より長い環状化合物を生じさせることができる、好ましくは非免疫原性または低免疫原性の任意の化学的部分を意味し、例えば、スペーサーは、HDSG（配列番号1）よりなるペプチドのN末端およびC末端と結合して、主鎖の長さがHDSG（配列番号1）配列自体より長い環状化合物を生じさせることができる。つまり、（例えば、3アミノ酸残基の）スペーサーを有するペプチドが環化されると、スペーサーのないペプチドより大きい閉環が生じる。スペーサーとしては、特に限定されないが、グリピート、アリピートまたはPEGリピートなどの部分、例えばGHDSG（配列番号7）、GHDSGG（配列番号8）、GGHDSGG（配列番号9）、GHDSGGG（配列番号10）などが挙げられる。スペーサーは、1つもしくは複数のシステイン（C）残基などの1つもしくは複数の官能化部分を含む、またはこれと結合しているものであり得、官能化部分はスペーサー内に散在している、またはスペーサーの一端または両端と共有結合しているものであり得る。C残基などの官能化可能な部分がスペーサーの1つまたは複数の末端と共有結合している場合、スペーサーはペプチドと間接的に共有結合している。スペーサーはまた、ビオチン分子がアミノ酸残基内に導入されている場合のように、スペーサー残基内に官能化可能な部分を含み得る。

30

40

【0130】

本明細書で使用される「官能化可能な部分」という用語は、「官能基」を有する化学物質を指し、本明細書で使用される「官能基」は、別の原子団または単一原子（いわゆる「相補性官能基」）と反応して、2つの原子団または原子の間で化学的相互作用を形成する、

50

原子団または単一原子を指す。システインの場合、官能基は、反応してジスルフィド結合を形成することができる - SH であり得る。したがって、リンカーは、例えば C C C であり得る。別の原子団との反応は、共有結合または例えば、 K_d が約 $1 \text{ e} - 14$ になり得る。バイオチン - ストレプトアビジン結合の場合のような強い非共有結合であり得る。本明細書で使用される強い非共有結合は、 K_d が少なくとも $1 \text{ e} - 9$ 、少なくとも $1 \text{ e} - 10$ 、少なくとも $1 \text{ e} - 11$ 、少なくとも $1 \text{ e} - 12$ 、少なくとも $1 \text{ e} - 13$ または少なくとも $1 \text{ e} - 14$ の相互作用を意味する。

【0131】

タンパク質および/またはその他の物質を免疫原性に役立つ、または *in vitro* 研究のプロブとして作用するよう環状化合物に機能化（例えば、結合）させ得る。この目的には、反応すること（例えば、共有結合または共有結合ではない強い結合を形成すること）が可能な任意の官能化可能な部分を使用し得る。ある特定の実施形態では、官能化可能な部分は、目的のタンパク質上にある対形成していないシステインと反応してジスルフィド結合を形成するシステイン残基であり、目的のタンパク質は、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）などの免疫原性増強物質または *in vitro* 免疫プロットもしくは免疫組織化学アッセイに使用するウシ血清アルブミン（BSA）などの担体タンパク質であり得る。

【0132】

本明細書で使用される「～と反応する」という用語は一般に、電子の流れまたは静電荷の移動が起こることにより化学的相互作用が形成されることを意味する。

【0133】

本明細書で使用される「動物」または「対象」という用語は、任意選択でヒトを含む、または含まない哺乳動物を含めた動物界のあらゆるメンバーを包含する。

【0134】

本明細書で使用される「保存的アミノ酸置換」とは、タンパク質の所望の特性を打ち消すことなく、あるアミノ酸残基が別のアミノ酸残基に置き換わるアミノ酸置換のことである。適切な保存的アミノ酸置換は、疎水性、極性および R 鎖長が互いに類似したアミノ酸同士を置き換えることにより実施することができる。保存的アミノ酸置換の例としては以下のものが挙げられる。

【0135】

【表 2】

保存的置換	
アミノ酸のタイプ	置換可能なアミノ酸
親水性	Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr
スルフィドリル	Cys
脂肪族	Val, Ile, Leu, Met
塩基性	Lys, Arg, His
芳香族	Phe, Tyr, Trp

【0136】

本明細書で使用される「配列同一性」という用語は、2つのポリペプチド配列または2つの核酸配列の間の配列同一性のパーセンテージを指す。2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列のパーセント同一性を決定するには、配列を最適な比較目的で整列させる（例えば、第二のアミノ酸配列または核酸配列との最適アライメントのために第一のアミノ酸配列または核酸配列の配列内にギャップを導入することができる）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第一の配列内のある位置が第二の配列内の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合、その分子は上記の位置において同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、その配列が共有する同一位置の数の関数である（すなわち、% 同一性 =

同一の重複位置の数 / 位置の総数 $\times 100\%$)。一実施形態では、2つの配列は同じ長さである。2つの配列間のパーセント同一性の決定はまた、数学的アルゴリズムを用いて実施することができる。2つの配列の比較に用いられる数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例には、KarlinおよびAltschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 5873 - 5877で改変されたKarlinおよびAltschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87: 2264 - 2268のアルゴリズムがある。Altschulら, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラムにはそのようなアルゴリズムが組み込まれている。NBLASTヌクレオチドプログラムパラメータを例えばスコア = 100、ワード長 = 12に設定してBLASTヌクレオチド検索を実施し、本願の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。XBLASTプログラムパラメータを例えばスコア = 50、ワード長 = 3に設定してBLASTタンパク質検索を実施し、本明細書に記載されるタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的でギャップ付きアライメントを得るには、Altschulら, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402に記載されているGapped BLASTを用いることができる。あるいは、PSI-BLASTを用いて、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施することができる(同文献)。BLASTプログラム、Gapped BLASTプログラムおよびPSI-BLASTプログラムを用いる場合、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)の初期パラメータを用いることができる(例えば、NCBIのウェブサイトを参照されたい)。配列の比較に用いられる数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例には、MyersおよびMiller, 1988, CABIOS 4: 11 - 17のアルゴリズムがある。GCG配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)には、そのようなアルゴリズムが組み込まれている。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを用いる場合、PAM120加重残基表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を用いることができる。ギャップを許容するかしないかを問わず、上記のものと類似した技術を用いて2つの配列間のパーセント同一性を決定することができる。パーセント同一性を算出する際には通常、完全一致のみをカウントする。

【0137】

抗体に関しては、抗体配列をIMGTまたはその他のもの(例えば、Kabab番号付けの慣例)により最大限に整列させたとき、パーセンテージ配列同一性を決定することができる。アライメント後、対象抗体領域(例えば、重鎖または軽鎖の全成熟可変領域)を参照抗体の同じ領域と比較している場合、対象抗体領域と参照抗体領域の間のパーセンテージ配列同一性は、ギャップをカウントせず、対象抗体領域および参照抗体領域の両方で同じアミノ酸によって占められている位置の数を、整列させた2つの領域の位置の総数で除したものに100を乗じてパーセンテージに変換したものである。

【0138】

本明細書で使用される「核酸配列」という用語は、天然の塩基、糖および糖間(主鎖)結合よりなるヌクレオシドモノマーまたはヌクレオチドモノマーの配列を指す。この用語はまた、非天然のモノマーまたはその一部分を含む修飾または置換された配列を包含する。本願の核酸配列は、デオキシリボ核酸配列(DNA)またはリボ核酸配列(RNA)であり得、アデニン、グアニン、シトシン、チミジンおよびウラシルを含めた天然の塩基を包含し得る。配列はまた、修飾塩基を含み得る。このような修飾塩基の例としては、アザおよびデアザアデニン、グアニン、シトシン、ミジンおよびウラシル; ならびにキサンチンおよびヒポキサンチンが挙げられる。核酸は二本鎖または一本鎖であり得、センス鎖またはアンチセンス鎖を表す。さらに、「核酸」という用語は、相補的核酸配列およびコドン最適化等価物または同義コドン等価物を包含する。本明細書で使用される「単離核酸配列」という用語は、組換えDNA技術により作製された場合は実質的に細胞物質も培地も含まない核酸、あるいは化学的に合成された場合は化学的前駆体またはその他の化学物質を

指す。単離核酸はまた、その核酸が由来する核酸に天然の状態で隣接する配列（すなわち、核酸の 5' 側および 3' 側に位置する配列）を実質的に含まない。

【0139】

「作動可能に連結されている」は、核酸の発現が可能ないようにその核酸が制御配列を連結されていることを意味するものとする。適切な制御配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳動物または昆虫の遺伝子を含めた様々な供給源に由来するものであり得る。適切な制御配列の選択は、選択する宿主細胞によって決まり、当業者により容易に達成され得る。このような制御配列の例としては、転写プロモーターおよび転写エンハンサーまたは RNA ポリメラーゼ結合配列、翻訳開始シグナルを含めたりボソーム結合配列が挙げられる。さらに、選択する宿主細胞および用いるベクターに応じてその他の配列、例えば複製起点、追加の DNA 制限部位、エンハンサーおよび転写の誘導性を付与する配列などを発現ベクター内に組み込み得る。

10

【0140】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、核酸分子を例えば、原核細胞および/または真核細胞内に導入し、かつ/あるいはゲノム内に組み込むことを可能にする前記核酸分子の任意の中間運搬体を含み、プラスミド、ファージミド、バクテリオファージまたはウイルスベクター、例えばレトロウイルス系ベクター、アデノ関連ウイルスベクターなどがこれに包含される。本明細書で使用される「プラスミド」という用語は一般に、通常は環状 DNA 二本鎖であり、染色体 DNA とは独立して複製することができる、染色体外遺伝物質の構築物を指す。

20

【0141】

「少なくとも中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、溶液中の 2 つの相補的核酸分子の間の選択的ハイブリダイゼーションを促進する条件を選択することを意味する。ハイブリダイゼーションは核酸配列分子の全部または一部に起こり得る。ハイブリダイズする部分は通常、少なくとも 15（例えば、20、25、30、40 または 50）ヌクレオチドの長さである。当業者には、核酸の二本鎖またはハイブリッドの安定性が、ナトリウム含有緩衝液中でのナトリウムイオン濃度と温度の関数である T_m ($T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\% (G + C) - 600 / l)$ またはこれと類似した方程式) によって決まることが認識されよう。したがって、ハイブリッドの安定性を決定する洗浄条件のパラメータはナトリウムイオン濃度および温度である。既知の核酸分子に類似しているが同一ではない分子を特定するには、1% のミスマッチにより T_m が約 1 低下するものと考えられ、例えば、同一性が 95% を上回る核酸分子を探索するのであれば、最終洗浄温度は約 5 低下することになる。当業者は、これらの考慮事項に基づき、適切なハイブリダイゼーション条件を容易に選択することが可能であろう。好ましい実施形態では、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を選択する。例として、以下の条件を用いてストリンジェントなハイブリダイゼーションを実施し得る：上の方程式に基づき、 T_m を -5 とし、5 × 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC) / 5 × デンハルト溶液 / 1.0% SDS で、ハイブリダイゼーションを実施し、次いで、60 にて 0.2 × SSC / 0.1% SDS で洗浄する。中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、42、3 × SSC での洗浄段階が含まれる。ただし、上のものに代わる緩衝液、塩および温度を用いても同等のストリンジェンシーが達成されることが理解される。ハイブリダイゼーション条件に関するさらなる指針については、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 2002 および Sambrook, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 にみることができる。

30

40

【0142】

本明細書で使用され、当該技術分野でも十分に理解されている「治療すること」または「治療」という用語は、臨床結果を含めた有益な結果または所望の結果を得る方法を意味す

50

る。有益な臨床結果または所望の臨床結果としては、特に限定されないが、検出可能なものであるか検出不可能なものであるかを問わず、1つまたは複数の症状または病態の軽減または改善、疾患の程度の減少、疾患の状態の安定化（すなわち、悪化しないこと）、疾患の拡散の予防、疾患進行の遅延または緩徐化、病状の改善または緩和、疾患再発の減少および寛解（部分寛解または完全寛解を問わない）が挙げられる。「治療すること」および「治療」はまた、治療を受けない場合に予想される生存期間と比較して生存期間が長くなることを意味し得る。本明細書で使用される「治療すること」および「治療」はまた、予防的治療を包含する。例えば、初期段階のADを有する対象を本明細書に記載される化合物、抗体、免疫原、核酸または組成物で治療して進行を予防することができる。

【0143】

本明細書で使用される「投与される」という用語は、細胞または対象への治療有効量の開示の化合物または組成物の投与を意味する。

【0144】

本明細書で使用される「有効量」という語句は、所望の結果を得るのに必要な投与回数および期間で効果が得られる量を意味する。対象に投与する場合、有効量は対象の病状、年齢、性別、体重などの因子に応じて異なり得る。最適な治療反応を得るために投与レジメンを調整し得る。

【0145】

「薬学的に許容される」という用語は、担体、希釈剤または補形剤が、製剤の他の成分と適合性があり、その被投与者に対して実質的に有害でないことを意味する。

【0146】

1つまたは複数の記載される要素を「含む（comprisingまたはincluding）」組成物または方法は、具体的に記載されていない他の要素を含み得る。例えば、抗体を「含む（compriseまたはinclude）」組成物は、抗体を単独で、または他の成分とともに含有し得る。

【0147】

本開示の範囲を理解するにあたっては、本明細書で使用される「～よりなる」という用語またはその派生語は、記載される特徴、要素、成分、グループ、整数および/または段階の存在を明記し、また他の記載されていない特徴、要素、成分、グループ、整数および/または段階の存在を排除する、オープンエンドな用語であるものとする。

【0148】

本明細書で端点により数値範囲が記載されている場合、その範囲内に含まれる数および端数がいずれも含まれる（例えば、1～5には、1、1.5、2、2.75、3、3.90、4および5が含まれる）。また、数およびその端数はすべて「約」という用語によって修飾されるものと考えられることを理解するべきである。さらに、「a」、「an」および「the」は、内容からそうでないことが明らかでない限り、複数形の指示対象を包含することを理解するべきである。「約」という用語は、言及されている数のプラスまたはマイナス0.1～50%、5～50%または10～40%、好ましくは10～20%、より好ましくは10%または15%を意味する。

【0149】

さらに、当業者であれば理解するように、特定のセクションに記載される定義および実施形態は、本明細書に記載される他の実施形態のうちそれらが適しているものに適用可能であるものとする。例えば、以下の節では、本発明の様々な態様がさらに詳細に定義される。そのように定義された各態様は、そうでないことが明記されない限り、1つまたは複数の他の任意の態様と組み合わせ得る。特に、好ましいまたは有利であると示されている任意の特徴と、好ましいまたは有利であると示されている他の任意の特徴とを組み合わせ得る。

【0150】

冠詞の単数形である「a」、「an」および「the」は、文脈上そうでないことが明らかでない限り、複数の指示物を包含する。例えば、「化合物（a compound）」

10

20

30

40

50

または「少なくとも1つの化合物」という用語は、複数の化合物をその混合物も含め包含し得る。

【0151】

II. エピトープおよび結合タンパク質

本発明者らは、Aベータのアミノ酸残基6～9にAベータの「エピトープ領域」HDSG（配列番号1）を特定した。本発明者らはさらに、そのエピトープ領域が立体配座エピトープであり得る、またはこれを含み得ることおよびHDSG（配列番号1）がAベータのオリゴマー種での抗体結合に選択的に接触可能であり得ることを明らかにした。

【0152】

理論に束縛されることを望むものではないが、線維は、オリゴマー化を触媒する傾向のある相互作用部位を示し得る。このことは、正常な個体には存在しない選択的な線維表面が露出され、Aベータモノマーとの異常な相互作用を起こすことが可能である場合にのみ起こり得る。低pH、炎症時に存在するオスモライトまたは酸化的損傷などの環境変化が線維の破壊を誘発し、より安定性の低い領域の露出を引き起こし得ると考えられる。その結果、これらの低安定性領域を予測し、そのような予測を用いて、上記の領域を標的とする抗体を合理的に設計することに関心が持たれている。線維内で破壊される可能性のある領域はまた、オリゴマー種内で露出する領域の有力な候補となり得る。

【0153】

不規則になりやすい隣接するタンパク質領域を予測するためのコンピュータに基づくシステムおよび方法が、2015年11月9日に出版され全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第62/253044号「Systems and methods for predicting misfolded protein epitopes by collective coordinate biasing」に記載されている。実施例に記載されるように、この方法をAベータに適用し、本明細書で示されるように、Aベータオリゴマーにおいて特異的または選択的により接触可能なエピトープを特定した。

【0154】

実施例に記載されるように、環状ペプチドであるシクロ（CGHDSGG）（配列番号2）は、モノマー種および/または線維種と比較したオリゴマーのHDSG（配列番号1）エピトープの立体配座の差を1つまたは複数捕捉し得る。例えば、環状7量体シクロ（CGHDSGG）（配列番号2）の溶媒接触表面積、曲率、RMSD構造アライメントならびにいくつかのアミノ酸および二面角の二面角分布の差は、モノマーおよび/または線維と実質的に異なっていることが明らかになり、環状ペプチドが直線状エピトープとは異なる立体配座エピトープをもたらすことが示唆された。シクロ（CGHDSGG）（配列番号2）を含む免疫原を使用して生じさせた抗体は、直鎖状CGHDSGG（配列番号2）よりも選択的にシクロ（CGHDSGG）（配列番号2）と結合し、単量体のAベータ斑およびAベータ線維斑と比較して合成および/または天然のオリゴマーAベータ種と選択的に結合した。さらに、シクロ（CGHDSGG）に対して生じさせた抗体によりAベータ凝集のin vitroでの伝播を阻害することができた。

【0155】

II. HDSG（配列番号1）「エピトープ」化合物

したがって、本開示は、アミノ酸HDSG（配列番号1）またはその一部よりなるAベータのエピトープを特定するものであり、HDSG（配列番号1）はAベータのアミノ酸残基6～9に対応する。実施例で示されるように、エピトープHDSG（配列番号1）、HDSGY（配列番号4）およびRHDSG（配列番号5）（本明細書でまとめて「HDSGおよび関連エピトープ」と呼ばれるエピトープに包含される）がAベータ線維で不規則になりやすい領域として特定された。残基HDSG（配列番号1）は集団座標法を用いた2つの予測に現れたものであり、このエピトープの隣接残基であるR5およびY10はそれぞれ、1つの予測にみられたものである。

【0156】

一態様は、H D S G（配列番号 1）、関連エピトープの配列および／または上記のいずれかのものの一部を含む、あるいはこれよりなる単離 A ベータペプチドを含む、化合物を含む。

【 0 1 5 7 】

一実施形態では、A ベータペプチドは、H D S G（配列番号 1）、H D S G Y（配列番号 4）もしくは R H D S G（配列番号 5）を含む、またはこれよりなるアミノ酸配列から選択される。一実施形態では、A ベータペプチドは、表 1 2 のいずれか 1 つのエピトープに記載される A ベータペプチドの配列を有する。一実施形態では、化合物は、配列番号 2、配列番号 2、2 8 および 2 9 のいずれかで示される配列を含む。

【 0 1 5 8 】

一実施形態では、化合物はシクロペプチドなどの環状化合物である。シクロペプチドおよび環状ペプチドという用語は、本明細書では互換的に使用される。

【 0 1 5 9 】

いくつかの実施形態では、H D S G（配列番号 1）（またはその一部）を含む A ベータペプチドは、H D S G（配列番号 1）（またはその一部）の N 末端および／または C 末端に、A ベータ内に存在する追加の残基を 1 個、2 個または 3 個含んでよく、例えば、A ベータペプチドは、N 末端側に残基を 1 個含み、R H D S G（配列番号 5）となり得る。例えば配列番号 3 の A ベータ配列に示されるように、A ベータの H D S G（配列番号 1）の N 末端側の 3 個のアミノ酸は E F R であり、H D S G（配列番号 1）の C 末端側の 3 個のアミノ酸は Y E V である。A ベータペプチドを含む化合物が環化されている実施形態では、A ベータペプチドは、8 個の A ベータ残基、7 個の A ベータ残基もしくは 6 個の A ベータ残基である、またはこれを最長とする残基である。一実施形態では、A ベータペプチドは、5 個の A ベータ残基である、またはこれを最長とする残基である。例えば、A ベータペプチドが 6 個のアミノ酸である場合、それはアミノ酸配列 R H D S G Y（配列番号 1 3）、H D S G Y E（配列番号 1 1）、D S G Y E V（配列番号 1 5）もしくは F R H D S G（配列番号 1 6）を含む、またはこれよりなるものであり得る。

【 0 1 6 0 】

一実施形態では、化合物はリンカーをさらに含む。リンカーは、スペーサーおよび／または 1 つもしくは複数の官能化可能な部分を含む。リンカーは、例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個もしくは 8 個のアミノ酸および／またはポリエチレングリコール（P E G）部分などの同等に機能する分子ならびに／あるいはその組合せを含み得る。

一実施形態では、スペーサーアミノ酸は、非免疫原性または低免疫原性のアミノ酸残基、例えば G および A などから選択され、例えば、スペーサーは、G G G、G A G、G（P E G）G、P E G - P E G - G G などであり得る。1 つまたは複数の官能化可能な部分、例えば官能基を有するアミノ酸は、例えば、化合物と、作用物質もしくは検出可能な標識、B S A などの担体または K L H などの免疫原性増強物質とを結合させるために含まれ得る。

【 0 1 6 1 】

一実施形態では、リンカーは、G C - P E G、P E G - G C、G C G または P E G - C - P E G を含む。

【 0 1 6 2 】

一実施形態では、リンカーは、2、3、4、5、6、7 個または 8 個のアミノ酸を含む。

【 0 1 6 3 】

H D S G（配列番号 1）またはその一部を含む A ベータペプチドが、A ベータにみられ H D S G（配列番号 1）の N 末端側および／または C 末端側にある追加の残基を 1 個、2 個または 3 個含む実施形態では、リンカーは、A ベータ残基の N 末端および／または C 末端と共有結合している（例えば、ペプチドが R H D S G（配列番号 5）である場合、リンカーは R 残基および G 残基と共有結合している）。これと同様に、A ベータペプチドが H D S G（配列番号 1）である場合、リンカーは残基 H および G と共有結合し、A ベータペプチドが H D S G Y（配列番号 4）である場合、リンカーは残基 H および Y と共有結合している。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 4 】

化合物（またはリンカーもタンパク質性である化合物）のタンパク質性部分は、タンパク質化学でよく知られている固相合成または均質溶液中での合成などの技術を用いる化学合成により調製し得る。

【 0 1 6 5 】

上記のように、化合物は環状化合物であり得る。本明細書で「環状ペプチド」と記載される場合、それは（例えば、リンカーが1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個または8個のアミノ酸である）完全にタンパク質性の化合物を指す。実施例で決定され環状ペプチドについて記載される特性を、非アミノ酸リンカー分子を含む他の化合物（例えば、他の環状化合物）に組み込み得ることが理解される。「シクロペプチド」および「環状ペプチド」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

10

【 0 1 6 6 】

したがって、一態様では、ペプチドHDSG（配列番号1）（またはDSGなどの上記ペプチドの一部）とリンカーとを含み、リンカーが、HDSG（配列番号1）を含むペプチド（例えば、ペプチドがHDSG（配列番号1）よりなる場合、H残基およびG残基）と直接的または間接的に共有結合している、環状化合物が提供される。環状化合物内では、例えば、少なくともH、Dおよび/またはSが、対応する直鎖状ペプチド、任意選択で、より拘束された立体配座でのH、Dおよび/またはSとは別の立体配座にある。

【 0 1 6 7 】

一実施形態では、環状化合物は、HDSG（配列番号1）と最大6個のAベータ残基（例えば、HDSG（配列番号1）のN末端および/またはC末端の1個または2個のアミノ酸）とを含むAベータペプチドと、リンカーとを含み、リンカーが、AベータペプチドのペプチドN末端残基およびC末端残基と直接的または間接的に共有結合している。環状化合物内では、例えば、少なくともDが対応する直鎖状ペプチド内でのDとは別の立体配座にある、または少なくともSが対応する直鎖状ペプチド内でのSとは別の立体配座にあり、任意選択で、少なくともHまたは少なくともDが、含む対応する直鎖状ペプチド内で占められる立体配座より拘束された立体配座にある。

20

【 0 1 6 8 】

環状化合物を環化前に、Aベータペプチド、任意選択でHDSG（配列番号1）または関連エピトープを含むペプチドのN末端またはC末端と共有結合したリンカーを有する、直鎖状分子として合成することができる。あるいは、環化前に、リンカーの一部をN末端と共有結合させ、一部をC末端と共有結合させる。いずれの場合も、直鎖状化合物を例えば頭-尾環化（例えば、アミド結合環化）で環化する。

30

【 0 1 6 9 】

一実施形態では、環状化合物は、HDSG（配列番号1）を含む、またはこれよりなるAベータペプチドと、リンカーとを含み、リンカーが、ペプチドのN末端およびC末端（例えば、ペプチドがHDSG（配列番号1）よりなる場合、H残基およびG残基）と結合している。一実施形態では、少なくともH、Dおよび/またはSが環状化合物内で、HDSG（配列番号1）を含む直鎖状化合物（例えば、直鎖状ペプチド）内でH、Dおよび/またはSによって占められるものとは別の立体配座にある。

40

【 0 1 7 0 】

Aベータ配列を含む直鎖状ペプチドは直鎖状化合物に含まれ得る。HDSG（配列番号1）を含む直鎖状化合物または直鎖状ペプチドは、一実施形態では、対応する直鎖状ペプチドである。別の実施形態では、直鎖状ペプチドは、例えば、Aベータ残基1~35またはそれより小さいAベータ残基1~20、2~20、3~20、1~15、3~15、3~12などの部分を含む直鎖状ペプチドを含めた、HDSG（配列番号1）を含む任意の長さのAベータペプチドである。直鎖状ペプチドはまた、いくつかの実施形態では完全長のAベータペプチドであり得る。

【 0 1 7 1 】

一実施形態では、少なくともH、Dおよび/またはSが環状化合物内で、モノマーおよび

50

／または線維内で残基、任意選択でHおよび／またはDによって占められるものとは別の立体配座にある。

【0172】

一実施形態では、少なくともD、Sおよび／またはHが環状化合物内で、モノマーおよび／または線維内で残基、任意選択でDおよび／またはSによって占められるものとは別の立体配座にある。

【0173】

一実施形態では、別の立体配座は拘束された立体配座である。

【0174】

一実施形態では、少なくともHは任意選択で、単独で、または少なくともDと組み合わせ、HDSG（配列番号1）を含む直鎖状ペプチドにおいて占められる立体配座より拘束された立体配座にある。

【0175】

一実施形態では、Hならびに／あるいはDおよび／またはSのうちの1つまたは複数のものと組み合わせ、Hの立体配座は、別の立体配座、任意選択でより拘束された立体配座の化合物に含まれる。

【0176】

図6に示されるように、残基HおよびDは、環状化合物内では直鎖状ペプチド内に存在する立体配座アンサンブルより拘束された立体配座にある。この図から、Hに関しては約81.7%のエントロピー減少があり、Dに関しては約49.8%のエントロピー減少があることがわかる。一実施形態では、環状化合物は、残基Hおよび／またはDのエントロピー減少により定量化したとき、対応する直鎖状化合物より少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%または少なくとも40%拘束された立体配座Hおよび／またはDを有する。

【0177】

例えば、別の立体配座は、残基Hおよび／またはDおよび／またはSに、ならびに任意選択で直鎖状ペプチドおよび／または線維におけるペプチドの二面角と異なるDおよび／またはSに、1つあるいは複数の異なる二面角を含み得る。

【0178】

図4に示されるように、環状ペプチドのD7の二面角分布は、直鎖状ペプチドまたは線維における残基と比較して大幅に異なる。一実施形態では、環状化合物は、直鎖状ペプチドおよび／または線維において対応する二面角と少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度、少なくとも80度、少なくとも90度、少なくとも100度、少なくとも110度、少なくとも120度、少なくとも130度または少なくとも140度異なるO-C-C-C（O-C-C-A-CBとも呼ばれる）二面角を含む、Dを含む。例えば、表1から、シミュレートした直鎖状ペプチド、環状ペプチドおよび線維では、この二面角の差は、環状と直鎖状との間では約160度であり、環状と線維との間では約195度であることがわかる。したがって、一実施形態では、環状化合物は、線維において対応する二面角と少なくとも140度異なる、少なくとも150度異なる、少なくとも160度異なる、少なくとも170度異なるO-C-C-C（O-C-C-A-CBとも呼ばれる）二面角を含む、Dを含む。

【0179】

表1からまた、例えば残基H、DおよびSのものを含めた他の角の二面角分布に差があることが確認される。

【0180】

したがって、一実施形態では、環状化合物は、H、DおよびSから選択されるAペータペプチド残基を含み、少なくとも1つの二面角が、直鎖状化合物において対応する二面角と少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度、少なくとも80度、少なくとも90度、少なくとも100度、少なくとも110度、少なくとも120度、少なくとも130度または少なくとも140度異なる。

【0181】

一実施形態では、環状化合物は、環状化合物と直鎖状ペプチドとの間で最小の平均側鎖 / 主鎖二面角差を含む。例えば、表3に挙げる重心立体配座について、環状ペプチドと直鎖状ペプチドとの間の平均側鎖 / 主鎖二面角差は、H : 28.5度、D : 133度、S : 129度、G : 13度であることが示されている。環状と線維との間でこれに対応する数は、H : 51度、D : 103度、S : 114度、G : 73度である。

【0182】

したがって、一実施形態では、環状化合物は、直鎖状ペプチドと比較して少なくとも、Hについては少なくとも20度；Dおよび/またはSについては少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度、少なくとも80度、少なくとも90度、少なくとも100度、少なくとも110度もしくは少なくとも120度；および/またはGについては少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度もしくは少なくとも60度の平均側鎖差を含む。

10

【0183】

角の差は、例えば正または負、(+)または(-)であり得る。

【0184】

別の立体配座は別の主鎖配向を含み得る。例えば、環状エピトープが抗体に対して露出する主鎖配向は、直鎖型または線維型と比較して異なるものである。

【0185】

図7は、配列CGHSGGGよりなる直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドの両方ならびにPDB 2M4Jの初期条件を用いた平衡化線維構造におけるHDSG(配列番号1)の残基H6、D7、S8およびG9について、平衡シミュレーションでサンプリングしたファイ角およびブサイ角をプロットしたものである。図7から、環状ペプチドの主鎖二面角(ラムチャンドランファイ/ブサイ角)の分布が、直鎖状ペプチドまたは線維構造2M4JにおけるAベータペプチドHDSG(配列番号1)についてサンプリングしたラムチャンドラン角の分布とは特に残基D7およびS8で異なることがわかる。表2に、主鎖ファイ/ブサイ角の分布のピーク値の差を記載する。同様に、表3は、主鎖ファイ/ファイ角および重心構造の差(図10にプロットする)を示している。例えば、表3に二面角が記載されている最大の直鎖状クラスターおよび最大の線維クラスターの重心立体配座について、環状ペプチドと直鎖状ペプチドとの間の平均主鎖ラムチャンドラン角差(、デルタ)は、HDSG(配列番号1) : (-3.0、-1.1)度、(72.6、164.1)度 : (67.8、195.1)度、(-38.8、13.4)度となり；環状ペプチドと線維ペプチドとの間の平均主鎖ラムチャンドラン角差(、デルタ)は、(-53.7、29.7)度、(4.7、-154.5)度、(86.5、129)度、(127、-163.8)度となる。

20

30

【0186】

したがって、一実施形態では、環状化合物は、主鎖ファイ/ブサイ角が、対応する直鎖状ペプチドまたは線維PDB構造におけるものと比較して少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度、少なくとも80度異なる、少なくとも90度、少なくとも100度、少なくとも110度、少なくとも120度、少なくとも130度、少なくとも140度、少なくとも150度、少なくとも160度、少なくとも170度または少なくとも180度である少なくとも1個の残基を有する、Aベータペプチドを含む。

40

【0187】

別の立体配座はまた、対応する直鎖状ペプチドおよび/またはAベータ線維と比較して、アミノ酸を中心とする曲率またはHDSG(配列番号1)もしくは関連エピトープを含む環状化合物の曲率の増大を含み得る。

【0188】

一実施形態では、別の立体配座HDSG(配列番号1)は、直鎖状HDSG(配列番号1)と比較して増大した曲率を有する。実施例に示されるように、環状化合物の主鎖のD7

50

および S 8 の位置における曲率は、実施例 2 に記載されるように、直鎖状ペプチドまたは線維におけるペプチド (図 2) の上記の位置における曲率と比較して増大している。

【 0 1 8 9 】

シクロ (C G H D S G G) (配列番号 2)、直鎖状 C G H D S G G (配列番号 2) および線維における H D S G (配列番号 1) の H、D、S、G の曲率の値が決定されており、これを実施例 2 に記載する。

【 0 1 9 0 】

したがって、化合物は、別の立体配座の D および / または S の曲率が、対応する直鎖状ペプチドまたは線維における D 7 もしくは S 8 と比較して少なくとも 0 . 1 ラジアン、0 . 2 ラジアン、0 . 3 ラジアンまたはそれ以上増大している、A ベータペプチドを含む。

10

【 0 1 9 1 】

一実施形態では、H D、D S、S G、H D S、D S G および / または H D S G (配列番号 1) は、例えば直鎖状ペプチドおよび / または線維などの非オリゴマー立体配座でこれら残基によって占められるものと比較して、別の立体配座にある。

【 0 1 9 2 】

さらに、環状ペプチドでは、側鎖のエントロピーが直鎖状ペプチドと比較して減少しており、側鎖が直鎖状ペプチドよりも構造化された立体配座になっている。

【 0 1 9 3 】

本明細書で示されるように、環状化合物の曲率は、直鎖状ペプチドのものまたは線維におけるペプチドに対するものとは異なるいくつかのアミノ酸に関するものである (図 2)。例えば、対応する直鎖状ペプチドと比較した環状化合物 C G H D S G G (配列番号 2) における D 7 の曲率が増大している。

20

【 0 1 9 4 】

したがって、一実施形態では、環状化合物の D および / または S の曲率は、対応する直鎖状化合物と比較して少なくとも 1 0 %、少なくとも 2 0 % または少なくとも 3 0 % 増大している。

【 0 1 9 5 】

また、残基 H および / または D および / または S の二面角のうち 1 つまたは複数のものは、直鎖状ペプチドまたは線維におけるペプチドの二面角と大幅に異なる傾向があることが示されている。これらのアミノ酸では、溶媒接触表面積 (S A S A) を溶解度により重み付けすると、残基 S 8 がより強調される。H 6 の側鎖のエントロピーは、環状ペプチドの方が直鎖状ペプチド、さらには線維よりも減少しており、この残基には制約されたポーズを有する傾向があることを示している。

30

【 0 1 9 6 】

同様の变化を示す環状化合物も包含される。

【 0 1 9 7 】

H D S G (配列番号 1) または関連エピトープを含むペプチドを含む、いくつかの実施形態の環状化合物は、A ベータの H D S G (配列番号 1) または関連エピトープのすぐ上流および / または下流に 1 個、2 個、3 個またはそれ以上の残基を含み得る。このような場合、A ベータ配列の対応する残基の末端の N 末端および C 末端にスペーサーが共有結合している。

40

【 0 1 9 8 】

いくつかの実施形態では、リンカーまたはスペーサーは、A ベータペプチドの N 末端残基および C 末端残基と間接的に結合している。

【 0 1 9 9 】

一実施形態では、環状化合物は図 1 1 B に示される化合物である。

【 0 2 0 0 】

環化ペプチドを作製する方法は当該技術分野で公知であり、S S 環化またはアミド環化 (頭 - 尾環化または主鎖環化) がこれに含まれる。実施例 3 に方法をさらに記載する。例えば、N 末端および C 末端に「 C 」残基を有するペプチド、例えば C G H D S G G C (配列

50

番号 2) を S S 環化により反応させて、環状ペプチドを得ることができる。

【 0 2 0 1 】

実施例 2 に記載されるように、図 1 1 B の環状化合物について、特定された立体配座エピトープとの関連性を評価した。H D S G (配列番号 1) ペプチドを含む環状化合物は、例えば、1 つまたは複数の立体配座的特徴に選択的な抗体を生じさせるのに使用することができる。

【 0 2 0 2 】

本明細書に記載されるエピトープ H D S G (配列番号 1) および / またはその一部は、A ベータに含まれる A ベータのミスフォールドされた伝播性の株における潜在的な標的となり得、その立体配座エピトープを認識する抗体は、例えば、そのような伝播性の株の検出に有用であり得る。

10

【 0 2 0 3 】

別の態様では、直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドを含めた本明細書に記載される A ベータペプチド配列を含む、単離ペプチドも提供される。直鎖状ペプチドは、例えば、それと結合しない抗体の選択に使用することができる。単離ペプチドは、本明細書に記載されるリンカー配列を含み得る。リンカーは、C G H D S G G (配列番号 2) 直鎖状ペプチドでは、N 末端または C 末端と共有結合していても、あるいは一部が N 末端と結合し、一部が C 末端と結合していてもよい。環状ペプチドでは、リンカーは C 末端および N 末端と直接的または間接的に結合している。

20

【 0 2 0 4 】

別の態様は、本明細書に記載される化合物、任意選択で環状化合物を含む、免疫原を含む。免疫原はまた、例えば H D S 、 D S G もしくは H D S G (配列番号 1) またはほかの A ベータ配列を含み得る。H D S 、 D S G もしくは H D S G (配列番号 1) または関連エピトープ配列のすぐ上流および / または下流 (すなわち、N 末端側および / または C 末端側) にはアミノ酸が存在し得る。このような免疫原に対して生じさせた抗体を、例えば、H D S G (配列番号 1) または関連エピトープを含むシクロペプチドとの結合に関して選択することができる。

【 0 2 0 5 】

免疫原を対象への投与のために適切に調製または製剤化され、例えば、免疫原は無菌のものまたは精製されたものであり得る。

30

【 0 2 0 6 】

一実施形態では、免疫原は、H D S G または関連エピトープを含む環状ペプチドである。

【 0 2 0 7 】

一実施形態では、免疫原は、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H) または M A P 抗原などの免疫原性増強物質を含む。免疫原性増強物質は、アミド結合などを介して直接、またはリンカーの官能化可能な部分を介して間接的に、化合物と結合してよい。(例えば、環状化合物内の A ベータペプチドが 6 アミノ酸残基であり) リンカーが単一のアミノ酸残基である場合、リンカーは官能化可能な部分 (例えば、システイン残基) であり得る。

【 0 2 0 8 】

免疫原は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる L a t e e f ら (2 0 0 7) に記載されている方法を用いて、拘束されたエピトープペプチドを含む環状化合物と、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H) などの免疫原性増強物質またはウシ血清アルブミン (B S A) などの担体とをコンジュゲートすることにより作製することができる。一実施形態では、実施例 3 または 4 に記載される方法を用いる。

40

【 0 2 0 9 】

さらなる態様は、本明細書に記載される化合物または免疫原のタンパク質性部分をコードする単離核酸分子である。

【 0 2 1 0 】

実施形態では、核酸分子は、配列番号 1 ~ 1 6 で示されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを

50

コードする。

【0211】

一実施形態では、核酸分子は、HDSG（配列番号1）または関連エピトープおよび任意選択で、本明細書に記載されるリンカーをコードする。

【0212】

さらなる態様は、前記核酸を含むベクターである。適切なベクターについては本明細書の他の箇所に記載する。

【0213】

III. 抗体、細胞および核酸

上記の化合物および特に環状化合物を用いて、Aベータ内のDS、HDSもしくはHDSG（配列番号1）（例えば、残基6～7、6～8もしくは6～9）と特異的に結合する抗体および/またはAベータの種、例えばAベータのオリゴマー種のDS、HDSVもしくはHDSG（配列番号1）の特定の立体配座を認識する抗体を生じさせることができる。これと同様に、例えばRHDSG（配列番号5）、HDSGY（配列番号4）、HDSG（配列番号1）および/または本明細書に記載されるその他の関連エピトープ配列を含む環状化合物を用いて、HDSG（配列番号1）などおよび/またはその特定の立体配座エピトープと特異的に結合する抗体を生じさせることができる。本明細書で示されるように、シクロ（CGHDSGG）（配列番号2）に対する抗体を生じさせ、この抗体は、直鎖状CGHDSGG（配列番号2）よりもシクロ（CGHDSGG）（配列番号2）と特異的かつ/または選択的に結合した。

【0214】

したがって、一態様は、例えば配列番号1～16のいずれか1つで示される配列HDSG（配列番号1）または関連エピトープ配列を有するAベータペプチドと特異的に結合する、抗体（その結合フラグメントを含む）を含む。

【0215】

一実施形態では、Aベータペプチドは環状ペプチド内に含まれており、抗体は、環状化合物内で提示されるAベータに対して特異的または選択的なものである。

【0216】

一実施形態では、抗体は環状化合物のAベータペプチドと特別かつ/または選択的に結合し、Aベータは、配列番号1～16のいずれか1つで示される配列を有する。

【0217】

一実施形態では、環状化合物は環状ペプチドである。一実施形態では、環状ペプチド内のAベータペプチドは配列番号1～16のいずれか1つである。さらなる実施形態では、環状ペプチドは配列番号2、12、28または29で示される配列を有する。

【0218】

実施例に記載されるように、実施例に記載されるアッセイを用いて、1つまたは複数の特性を有する抗体を選択することができる。

【0219】

一実施形態では、抗体は、配列HDSG（配列番号1）を含む直鎖状ペプチドとは結合せず、任意選択で、直鎖状ペプチドの配列は、抗体を生じさせるために使用され任意選択で配列番号2、12、28または29で示される環状配列の直鎖型である。

【0220】

一実施形態では、抗体は、Aベータペプチドを含む対応する直鎖状化合物よりも環状化合物内で提示されるAベータペプチドに対して選択的である。

【0221】

一実施形態では、抗体はAベータ上のエピトープと特異的に結合し、エピトープは、HDSG（配列番号1）またはその関連エピトープを含む、またはこれよりなる。

【0222】

一実施形態では、Aベータ上で抗体により特異的または選択的に認識されるエピトープは、立体配座エピトープである。

10

20

30

40

50

【0223】

一実施形態では、抗体は単離されている。

【0224】

一実施形態では、抗体は外来抗体である。

【0225】

実施例に記載されるように、環状化合物内のH、Dおよび/またはSは、モノマー型および/または線維型の対応する直鎖状ペプチドとは異なるAベータの立体配座で主として接触可能である、または露出し得る。

【0226】

したがって、さらなる態様は、Aベータ上のエピトープと特異的に結合する抗体であり、ここでは、エピトープは、抗体との結合に主として関与する少なくとも1個のアミノ酸残基を含む、またはこれよりなるものであり、その少なくとも1個のアミノ酸は、配列HDSG（配列番号1）内に組み込まれたH、DまたはSである。一実施形態では、エピトープは、抗体との結合に主として関与する少なくとも2個の連続するアミノ酸残基を含む、またはこれよりなるものであり、その少なくとも2個の連続するアミノ酸は、HDSG（配列番号1）内に組み込まれたHD、DSまたはSGである。

10

【0227】

別の実施形態では、エピトープはHDSG（配列番号1）または関連エピトープよりなる。

【0228】

一実施形態では、抗体は立体配座選択的抗体である。一実施形態では、抗体は、対応する直鎖状配列よりも本明細書に記載されるエピトープペプチド配列を含む環状化合物と選択的に結合する。例えば、特定のエピトープ立体配座と結合する抗体は、立体配座特異的抗体と呼ぶことができる。このような抗体は、本明細書に記載される方法を用いて選択することができる。立体配座選択的抗体は、特定のAベータ種または関連種（例えば、二量体、三量体およびその他のオリゴマー種）のグループを区別して認識することが可能であり、ある種または種のグループに対して別の種（例えば、モノマー種または線維種）より高い親和性を有し得る。

20

【0229】

一実施形態では、抗体は単量体Aベータと特異的に結合しない。一実施形態では、抗体は、例えばADの脳組織において*in situ*で、Aベータ老人斑と特異的に結合しない。

30

【0230】

別の実施形態では、抗体は、天然または合成のオリゴマーAベータより単量体Aベータと選択的に結合することはない。

【0231】

例えば、抗体は、H、DおよびSから選択され、環状化合物における少なくとも1つの二面角が、直鎖状化合物において対応する二面角と少なくとも30度、少なくとも40度、少なくとも50度、少なくとも60度、少なくとも70度、少なくとも80度、少なくとも90度、少なくとも100度、少なくとも110度、少なくとも120度、少なくとも130度または少なくとも140度異なる残基を含む、環状化合物と特異的に結合し得る。

【0232】

一実施形態では、抗体は、対応する配列などのHDSG（配列番号1）を含む直鎖状ペプチドよりも、環状化合物内にありHDSG（配列番号1）またはその一部を含むAベータペプチドと選択的に結合する。例えば、一実施形態では、抗体は、環状立体配座のHDSG（配列番号1）と選択的に結合し、例えばELISAまたは任意選択で本明細書に記載される方法によって測定される、環状立体配座のHDSG（配列番号1）に対する選択性（例えば、結合親和性）が、直鎖状ペプチド内のHDSG（配列番号1）の少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍である。

40

【0233】

50

一実施形態では、環状化合物は、シクロ(CGHDSGG)(配列番号2)または配列番号12、28もしくは29で示される配列を有する環状化合物である。

【0234】

一実施形態では、抗体は、環状化合物内のAベータペプチドおよび/またはオリゴマーAベータと選択的に結合する。一実施形態では、選択性は、環状化合物内のAベータペプチドおよび/またはAベータオリゴマーに対して、Aベータモノマーおよび/またはAベータ線維から選択されるAベータ種ならびに/あるいは対応する直鎖状ペプチドを含む化合物の少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍選択的である。

10

【0235】

一実施形態では、抗体はAベータ線維斑(老人斑とも呼ばれる)染色を示さない。斑染色がみられないことは、Aベータ特異的抗体である6E10および4G8(BioLegend社、サンディエゴ、カリフォルニア州)または2C8(Enzo Life Sciences社、ファーマーグデール、ニューヨーク州)などの陽性対照ならびにアイソタイプ対照と比較することにより評価することができる。本明細書に記載される抗体は、その抗体が典型的な斑形態染色を示さず、染色のレベルがIgG陰性アイソタイプ対照でみられるレベルの2倍と同等またはそれ以下である場合、Aベータ線維斑染色を示さない、またはほとんど示さないことになる。尺度は、例えば、アイソタイプ対照での染色レベルを1に設定し、6E10での染色レベルを10に設定することができる。抗体は、そのような尺度で染色レベルが2以下である場合、Aベータ線維斑染色を示さないことになる。実施形態では、抗体は、例えば上記の尺度で、最小限のAベータ線維斑染色を示し、そのレベルのスコアは少なくとも3程度または3未満である。

20

【0236】

一実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。

【0237】

モノクローナル抗体を作製するには、本明細書に記載される免疫原で免疫感作した対象から抗体産生細胞(Bリンパ球)を回収し、標準的な体細胞融合法によりミエロマ細胞と融合し、それにより上記の細胞を不死化してハイブリドーマ細胞を得ることができる。このような技術は当該技術分野で周知である(例えば、KohlerおよびMilsteinにより最初に開発されたハイブリドーマ技術(Nature 256:495-497(1975))ならびにその他の技術、例えばヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら, Immunol. Today 4:72(1983))、ヒトモノクローナル抗体を作製するEBVハイブリドーマ技術(Coleら, Methods Enzymol, 121:140-67(1986))およびコンビナトリアル抗体ライブラリーのスクリーニング(Huseら, Science 246:1275-1281(1989)など)。本明細書に記載されるエピトープ配列と特異的に反応する抗体の産生に関してハイブリドーマ細胞を免疫学的にスクリーニングし、モノクローナル抗体を単離することができる。

30

【0238】

特定の抗原または分子に対して反応性の特異的抗体または抗体フラグメントはまた、細胞表面成分とともに細菌内で発現する免疫グロブリン遺伝子またはその一部をコードする発現ライブラリーをスクリーニングすることにより作製し得る。例えば、ファージ発現ライブラリーを用いて、完全Fabフラグメント、VH領域およびFV領域を細菌内で発現させることができる(例えば、Wardら, Nature 41:544-546(1989); Huseら, Science 246:1275-1281(1989); および McCaffertyら, Nature 348:552-554(1990)を参照されたい)。

40

【0239】

一実施形態では、抗体はヒト化抗体である。

【0240】

50

非ヒト種からの抗体のヒト化については文献に十分に記載されている。例えば、欧州特許第0239400号(B1)ならびにCarterおよびMerchant 1997(全体が参照により本明細書に組み込まれるCurr Opin Biotechnol 8, 449-454, 1997)を参照されたい。ヒト化抗体はまた、商業的に容易に入手できる(例えば、イギリス、ミドルセックス、トゥイッケナム、ホーリーロード2番のScotgen Limited社)。

【0241】

ヒト化型のげっ歯類抗体は、CDR移植(Riechmannら, Nature, 332: 323-327, 1988)によって容易に作製される。この方法では、げっ歯類モノクローナル抗体の抗原結合部位を含む6つのCDRループと、対応するヒトフレームワーク領域とを結合させる。CDR移植では、フレームワーク領域のアミノ酸が抗原認識に影響を及ぼし得ることから、親和性が低下した抗体が得られることが多い(FooteおよびWinter, J Mol Biol, 224: 487-499, 1992)。抗体の親和性を維持するには多くの場合、部位特異的変異誘発またはその他の組換え技術により特定のフレームワーク残基を置き換える必要があり、コンピュータによる抗原結合部位のモデル化を援用することもある(Cora, J Immunol, 152: 2968-2976, 1994)。

10

【0242】

ヒト化型の抗体は任意選択で、リサーフィニング(resurfacing)(Pedersenら, J Mol Biol, 235: 959-973, 1994)によって得られる。この方法ではげっ歯類抗体の表面残基のみをヒト化する。

20

【0243】

特定の抗原に特異的なヒト抗体は、ファージディスプレイ戦略(Jespersenら, Bio/Technology, 12: 899-903, 1994)によって特定され得る。1つの方法では、特異的抗原に対するげっ歯類抗体の重鎖をクローン化し、ヒト軽鎖のレパートリーと対にして、繊維状ファージ上にFabフラグメントとして提示させる。抗原との結合によりファージを選択する。次いで、選択されたヒト軽鎖をヒト重鎖のレパートリーと対にしてファージ上に提示させ、再び抗原との結合によりファージを選択する。その結果は、特定の抗原に特異的なヒト抗体Fabフラグメントとなる。別の方法では、メンバーがその外表面に様々なヒト抗体フラグメント(FabまたはFv)を提示するファージのライブラリーを作製する(Dowerら, 国際公開第91/17271号およびMcCaffertyら, 国際公開第92/01047号)。特異的抗原に対するアフィニティー濃縮により所望の特異性を有する抗体を提示するファージを選択する。いずれかの方法で特定されたヒトFabフラグメントまたはヒトFvフラグメントをクローン化して、哺乳動物細胞でヒト抗体として発現させ得る。

30

【0244】

ヒト抗体は任意選択で、トランスジェニック動物から得られる(米国特許第6,150,584号;同第6,114,598号;および同第5,770,429号)。この方法では、キメラマウスまたは生殖系列変異体マウスの重鎖連結領域(JH)遺伝子を欠失させる。次いで、そのような変異体マウスにヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイを導入する。次いで、得られたトランスジェニックマウスは抗原曝露時にヒト抗体の全レパートリーを作製することが可能になる。

40

【0245】

ヒト化抗体は通常、Fab、Fab'F(ab')₂、Fd、Fvおよび単ドメイン抗体フラグメントなどの抗原結合フラグメントまたは重鎖と軽鎖がスパーサーにより連結された一本鎖抗体として作製される。また、ヒト抗体またはヒト化抗体はモノマー型またはポリマー型で存在し得る。ヒト化抗体は任意選択で、1本の非ヒト鎖と1本のヒト化鎖(すなわち、1本のヒト化重鎖または軽鎖)とを含む。

【0246】

ヒト化抗体またはヒト抗体を含めた抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAまたはIg

50

Eを含めた任意のクラスの免疫グロブリン；ならびにI g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4を含めた任意のアイソタイプから選択される。キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体は、1つまたは2つ以上のアイソタイプまたはクラスに由来する配列を含み得る。

【0247】

さらに、本明細書に記載されるエピトープに特異的な抗体は、抗体ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることにより容易に単離される。例えば、任意選択で、本明細書に開示されるエピトープに対応するペプチドを含む環状化合物を用いることにより抗体ファージライブラリーをスクリーニングして、立体配座特異的な抗体に特異的な抗体フラグメントを特定する。任意選択で、特定された抗体フラグメントを用いて、本明細書に記載される様々な実施形態に有用な様々な組換え抗体を作製する。抗体ファージディスプレイライブラリーは、例えばX o m a社（パークレー、カリフォルニア州）から市販されている。抗体ファージライブラリーをスクリーニングする方法は当該技術分野で周知である。

10

【0248】

さらなる態様は、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含み、重鎖可変領域が相補性決定領域CDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含み、軽鎖可変領域が相補性決定領域CDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含み、前記CDRのアミノ酸配列が、以下に記載する配列を含む、抗体および/またはその結合フラグメントである。

【0249】

【表3】

20

CDR-H1	GYTFTSYW	配列番号17
CDR-H2	IDPSDSQT	配列番号18
CDR-H3	SRGGY	配列番号19
CDR-L1	QDINNY	配列番号20
CDR-L2	YTS	配列番号21
CDR-L3	LQYDNLWT	配列番号22

【0250】

一実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。一実施形態では、抗体はキメラ抗体、例えば表10に記載されるCDR配列を含むヒト化抗体などである。

30

【0251】

別の実施形態では、任意選択で一本鎖抗体において、表10のCDRと軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含む、抗体も提供される。

【0252】

さらに別の態様では、抗体は、i)配列番号24で示されるアミノ酸配列；ii)配列番号24と少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%の配列同一性を有し、CDR配列が配列番号17、18および19で示される、アミノ酸配列またはiii)保存的に置換されたアミノ酸配列i)を含む、重鎖可変領域を含む。別の態様では、抗体は、i)配列番号26で示されるアミノ酸配列、ii)配列番号26と少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%もしくは少なくとも90%の配列同一性を有し、CDR配列が配列番号20、21および22で示される、アミノ酸配列またはiii)保存的に置換されたi)のアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域を含む。別の実施形態では、重鎖可変領域アミノ酸配列が、配列番号23で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重最適化型によってコードされている。別の実施形態では、抗体は、配列番号25で示されるヌクレオチド配列またはそのコドン縮重型もしくはコドン最適化型によってコードされる軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、重鎖可変領域は配列番号24で示されるアミノ酸配列を含む。

40

【0253】

50

別の態様は、表 10 に記載される C D R 配列を有する抗体と同じエピトープと特異的に結合する抗体である。

【 0 2 5 4 】

別の態様は、ヒト A ベータとの結合に関して、表 10 に記載される C D R 配列を含む抗体と競合する、抗体を含む。

【 0 2 5 5 】

抗体間の競合は、例えば、被験抗体が参照抗体と共通の抗原との特異的結合を阻害する能力を評価するアッセイを用いて判定することができる。競合結合アッセイで測定したとき、過剰の被験抗体（例えば、少なくとも 2 倍、5 倍、10 倍または 20 倍）が参照抗体の結合を少なくとも 50 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % または少なくとも 95 % 阻害する場合、被験抗体は参照抗体と競合することになる。

10

【 0 2 5 6 】

さらなる態様は、治療剤、検出可能な標識または細胞毒性物質とコンジュゲートした抗体である。一実施形態では、検出可能な標識は陽電子放出放射性核種である。陽電子放出放射性核種は、例えば P E T 撮像で使用され得る。

【 0 2 5 7 】

さらなる態様は、本明細書に記載される抗体および / またはその結合フラグメントとオリゴマー A ベータとを含む、抗体複合体に関する。

【 0 2 5 8 】

さらなる態様は、本明細書に記載される抗体またはその一部をコードする、単離核酸である。

20

【 0 2 5 9 】

また、重鎖または軽鎖をコードする、例えば、本明細書に記載される C D R - H 1 領域、C D R - H 2 領域および / または C D R - H 3 領域を含む重鎖をコードする、あるいは本明細書に記載される C D R - L 1 領域、C D R - L 2 領域および / または C D R - L 3 領域を含む軽鎖をコードする、核酸も提供される。

【 0 2 6 0 】

本開示はまた、本明細書に開示される抗体および / またはその結合フラグメントをコードする核酸配列のバリエーションを提供する。例えば、バリエーションとしては、本明細書に開示される抗体および / またはその結合フラグメントをコードする核酸配列と少なくとも中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列またはコドン縮重配列もしくはコドン最適化配列が挙げられる。別の実施形態では、バリエーション核酸配列は、配列番号 24 および 26 をコードする核酸配列と少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、最も好ましくは少なくとも 80 %、さらにより好ましくは少なくとも 90 %、さらに最も好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性を有する。

30

【 0 2 6 1 】

一実施形態では、核酸は単離核酸である。

【 0 2 6 2 】

別の態様は、本明細書に開示される核酸を含む発現カセットまたはベクターである。一実施形態では、ベクターは単離ベクターである。

40

【 0 2 6 3 】

ベクターは、抗体および / またはその結合フラグメントの作製あるいは本明細書に記載されるペプチド配列の発現に適したベクターを含めた任意のベクターであり得る。

【 0 2 6 4 】

既知の方法で、タンパク質を確実に発現させる適切な発現ベクター内に核酸分子を組み込み得る。考え得る発現ベクターとしては、特に限定されないが、コスミド、プラスミドまたは改変ウイルス（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）が挙げられる。ベクターは使用する宿主細胞と適合性のあるものであるべきである。発現ベクターは「宿主細胞の形質転換に適した」ものであり、これは、その発現ベ

50

クターが、本明細書に記載されるエピトープまたは抗体に対応するペプチドをコードする核酸分子を含んでいることを意味する。

【0265】

一実施形態では、ベクターは、遺伝子治療により例えば一本鎖抗体を発現させるのに適したものである。ベクターは、例えば神経特異的プロモーターなどを用いて、神経組織での特異的発現に適合させることができる。一実施形態では、ベクターは、IRESを含み、軽鎖可変領域および重鎖可変領域の発現を可能にする。このようなベクターは、*in vivo*で抗体を送達するのに用いることができる。

【0266】

適切な制御配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳動物または昆虫の遺伝子を含めた様々な供給源に由来するものであり得る。

【0267】

このような制御配列の例としては、転写プロモーターおよび転写エンハンサーまたはRNAポリメラーゼ結合配列、翻訳開始シグナルを含めたりボソーム結合配列が挙げられる。さらに、選択する宿主細胞および用いるベクターに応じてその他の配列、例えば複製起点、追加のDNA制限部位、エンハンサーおよび転写の誘導性を付与する配列などを発現ベクター内に組み込み得る。

【0268】

一実施形態では、制御配列は、神経組織および/または細胞での発現を指令する、または増大させる。

【0269】

一実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。

【0270】

組換え発現ベクターはまた、本明細書に記載される抗体またはエピトープペプチドを発現させるためにベクターにより形質転換、感染または形質移入した宿主細胞の選択を容易にするマーカー遺伝子を含み得る。

【0271】

組換え発現ベクターはまた、組換えペプチドの発現または安定性を増大させる；組換えペプチドの溶解度を増大させる；ならびに例えば本明細書に記載されるタグおよび標識を含めたアフィニティー精製のリガンドとして作用することにより標的組換えペプチドの精製を補助する融合部分（すなわち、「融合タンパク質」）をコードする、発現カセットを含み得る。さらに、標的組換えタンパク質にタンパク質分解切断部位を付加して、融合タンパク質精製後に融合部分から組換えタンパク質を分離させ得る。典型的な融合発現ベクターとしては、pGEX（Amrad社、メルボルン、オーストラリア）、pMAL（New England Biolabs社、ビバリー、マサチューセッツ州）およびpRIT5（Pharmacia社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）が挙げられ、これらは組換えタンパク質にそれぞれグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトース結合タンパク質またはプロテインAを融合させるものである。

【0272】

例えばニューロンおよび神経組織内に*in vitro*および*in vivo*の両方で遺伝子を導入するシステムとしては、ウイルス、中でもとりわけ単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）およびレンチウイルスを含めたレトロウイルスに基づくベクターが挙げられる。これに代わる遺伝子送達の方法としては、裸のプラスミドDNAおよびリボソーム-DNA複合体の使用が挙げられる。別の方法には、DNAをポリカチオン濃縮して脂質に封入し、脳内遺伝子送達により脳内に導入する、AAVプラスミドの使用（Leonera, 米国特許出願公開第2002076394号）がある。

【0273】

したがって、別の態様では、本明細書に記載される化合物、免疫原、核酸、ベクターおよび抗体をリボソーム、ナノ粒子およびウイルスタンパク質粒子などの小胞で製剤化し、例えば、本明細書に記載される抗体、化合物、免疫原および核酸を送達し得る。特に、ポリ

10

20

30

40

50

マーソームを含めた合成ポリマー小胞を用いて抗体を投与することができる。

【0274】

別の態様では、本明細書に記載される抗体を発現する、または本明細書に開示されるベクターを含む細胞、任意選択で単離細胞および/または組換え細胞も提供される。

【0275】

組換え細胞は、ポリペプチドの産生に適した、例えば抗体および/またはその結合フラグメントの産生に適した任意の細胞を用いて作製することができる。例えば、核酸（例えば、ベクター）を細胞内に導入するには、用いるベクターに応じて、細胞に形質移入し得る、細胞を形質転換し得る、または細胞に感染させ得る。

【0276】

適切な宿主細胞としては、多種多様な原核宿主細胞および真核宿主細胞が挙げられる。例えば、本明細書に記載されるタンパク質を大腸菌（*E. coli*）などの細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルスを用いる）、酵母細胞または哺乳動物細胞で発現させ得る。

【0277】

一実施形態では、細胞は、酵母細胞、植物細胞、蠕虫細胞、昆虫細胞、鳥類細胞、魚類細胞、爬虫類細胞および哺乳動物細胞から選択される真核細胞である。

【0278】

別の実施形態では、哺乳動物細胞は、ミエローマ細胞、脾臓細胞またはハイブリドーマ細胞である。

【0279】

一実施形態では、細胞は神経細胞である。

【0280】

抗体またはペプチドを発現させるのに適した酵母宿主細胞および真菌宿主細胞としては、特に限定されないが、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）、ピキア（*Pichia*）属またはクリベロミセス（*Kluyveromyces*）属およびアスペルギルス（*Aspergillus*）属の様々な種が挙げられる。酵母（*S. cerevisiae*）で発現させるためのベクターの例としては、pYepSec1、pMFa、pJRY88およびpYES2（Invitrogen社、サンディエゴ、カリフォルニア州）が挙げられる。酵母および真菌を形質転換させるプロトコルは当業者に周知である。

【0281】

適切であり得る哺乳動物細胞としては、特にCOS（例えば、ATCC番号CRL1650または1651）、BHK（例えば、ATCC番号CRL6281）、CHO（ATCC番号CCL61）、HeLa（例えば、ATCC番号CCL2）、293（ATCC番号1573）およびNS-1細胞が挙げられる。哺乳動物細胞での発現を指令するのに適した発現ベクターは一般に、プロモーター（例えば、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびサルウイルス40などのウイルス材料由来のもの）ならびにその他の転写制御配列および翻訳制御配列を含む。哺乳動物発現ベクターの例としては、pCDM8およびpMT2PCが挙げられる。

【0282】

さらなる態様は、本明細書に記載されるエピトープに特異的な抗体を産生するハイブリドーマである。

【0283】

IV. 組成物

さらなる態様は、本明細書に記載される化合物、免疫原、核酸、ベクターまたは抗体を含む組成物である。

【0284】

一実施形態では、組成物は希釈剤を含む。

【0285】

核酸に適した希釈剤としては、特に限定されないが、水、生理食塩水およびエタノールが

10

20

30

40

50

挙げられる。

【0286】

抗体もしくはそのフラグメントを含めたポリペプチドおよび/または細胞に適した希釈剤としては、特に限定されないが、生理食塩水、pH緩衝溶液およびグリセロール溶液あるいはポリペプチドおよび/または細胞を凍結させるのに適した他の溶液が挙げられる。

【0287】

一実施形態では、組成物は、本明細書に開示されるペプチド、免疫原、抗体、核酸またはベクターのいずれかを含み、任意選択で薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物である。

【0288】

本明細書に記載される組成物は、対象に投与することができる薬学的に許容される組成物を調製する既知の方法それ自体により、任意選択でワクチンとして、有効量の活性物質が薬学的に許容される溶媒との混合物の形で組み合わせるように調製することができる。

【0289】

医薬組成物としては、特に限定されないが、凍結乾燥粉末剤または水性もしくは非水性の無菌注射用液剤もしくは無菌注射用懸濁剤が挙げられ、これらは、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および組成物を目的とする被投与者の組織または血液に実質的に適合させる溶質をさらに含有し得る。このような組成物中に記載の存在し得るその他の成分としては、例えば水、界面活性剤(Tweenなど)、アルコール、ポリオール、グリセリンおよび植物油が挙げられる。無菌粉末剤、顆粒剤、錠剤または濃縮した液剤もしくは懸濁剤から即時注射液剤および即時注射懸濁剤を調製し得る。組成物は、例えば、特に限定されないが、患者に投与する前に滅菌水または生理食塩水で再構築する凍結乾燥粉末として供給され得る。

【0290】

医薬組成物は薬学的に許容される担体を含み得る。適切な薬学的に許容される担体としては、実質的に化学的に不活性で無毒性であり医薬組成物の生物活性の効果に干渉しない組成物を含む。適切な医薬担体の例としては、特に限定されないが、水、生理食塩水、グリセロール溶液、エタノール、N-(1(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、ジオレシルホスファチジル-エタノールアミン(dirole syl phosphotidyl-ethanolamine)(DOPE)およびリポソームが挙げられる。このような組成物は、患者に直接投与する形態になるように、治療有効量の化合物を適量の担体とともに含有するべきである。

【0291】

組成物は薬学的に許容される塩の形態であり得、このような塩としては、特に限定されないが、遊離アミノ基を用いて形成される塩、例えば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するなどおよび遊離カルボキシル基を用いて形成される塩、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアルニノエタノール(2-ethylarnino ethanol)、ヒスチジン、プロカインなどに由来するなどが挙げられる。

【0292】

本明細書に記載される化合物または免疫原を含む実施形態では、組成物はアジュバントを含む。

【0293】

使用し得るアジュバントとしては例えば、通常、ワクチンとして使用される死菌または弱毒菌の成分である、内因性アジュバント(リポ多糖など)が挙げられる。外因性アジュバントには、通常、抗原と非共有結合し、宿主免疫応答を増強するよう製剤化される、免疫調節物質がある。水酸化アルミニウム、硫酸アルミニウムおよびリン酸アルミニウム(一般にミョウバンと総称される)はアジュバントとして日常的に使用される。様々な外因性アジュバントが免疫原に対する強力な免疫応答を引き起こし得る。このようなものとしては、サポニン、例えばStimulon(QS21、Aquila社、ウスター、マサチ

10

20

30

40

50

ューセッツ州)またはそれから生成されるISCOMおよび(免疫刺激複合体)および膜タンパク質抗原と複合体を形成したISCOMATRIX(免疫刺激複合体)などの粒子など、プルロニックポリマーと鉱油、死滅マイコバクテリアと鉱油、フロイント完全アジュバント、ムラミルジペプチド(MDP)およびリボ多糖などの細菌生成物ならびにリピドAおよびリボソームが挙げられる。

【0294】

一実施形態では、アジュバントは水酸化アルミニウムである。別の実施形態では、アジュバントはリン酸アルミニウムである。水中油型乳剤としては、スクアレン;ラッカセイ油;MF59(国際公開第90/14387号);SAF(Syntex Laboratories社、パロアルト、カリフォルニア州);およびRibi(商標)(Ribi Immunochem社、ハミルトン、モンタナ州)が挙げられる。水中油型乳剤は、免疫刺激物質、例えばムラミルジペプチド(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)、-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'ジパルミトイル-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-アセチルグルクサミニル-N-アセチルムラミル-L-Al-D-イソグル-L-Ala-ジパルミトキシプロピルアミド(N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxypropylamide)(DTP-DPP)、theramide(商標))またはその他の細菌細胞壁成分とともに使用し得る。

【0295】

アジュバントを単一組成物として免疫原とともに投与し得る。あるいは、アジュバントを免疫原投与の前に、免疫原投与と同時に、かつ/または免疫原投与の後に投与し得る。

【0296】

アジュバントは一般に、リン酸緩衝生理食塩水に溶かした0.05~1.0パーセント溶液として使用される。アジュバントは免疫原の免疫原性を増強するが、アジュバント自体は必ずしも免疫原性であるわけではない。アジュバントは、投与部位付近に免疫原を局所的に保持することによって作用し、免疫系細胞への免疫原の緩徐で持続的な放出を促進するデポとしての効果をもたらす。アジュバントはまた、免疫原デポに免疫系細胞を誘引し、そのような細胞を刺激して免疫応答を誘発し得る。したがって、諸実施形態は、アジュバントをさらに含む組成物を包含し得る。

【0297】

非経口免疫感作のためのアジュバントとしては、アルミニウム化合物(水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムおよびヒドロキシリン酸アルミニウム)が挙げられる。標準的プロトコルに従って、抗原をアルミニウム化合物とともに沈殿させる、またはアルミニウム化合物上に吸着させることができる。RIBI(Immunochem社、ハミルトン、モンタナ州)などのその他のアジュバントも非経口投与に使用することができる。

【0298】

粘膜免疫感作のためのアジュバントとしては、細菌毒素(例えば、コレラ毒素(CT)、大腸菌(E.coli)易熱性毒素(LT)、ディフィシル菌(Clostridium difficile)毒素Aおよび百日咳毒素(PT)またはその組合せ、サブユニット、トキシドもしくは変異体)が挙げられる。例えば、天然のコレラ毒素サブユニットB(CTB)の精製調製物が有用であり得る。上記のいずれかの毒素のフラグメント、ホモログ、誘導体および融合物も、アジュバント活性を保持している限り適切なものである。好ましくは、毒性が低下した変異体を使用する。適切な変異体については、(例えば、国際公開第95/17211号(Arg-7-Lys CT変異体)、国際公開第96/6627号(Arg-192-Gly LT変異体)および国際公開第95/34323号(Arg-9-LysおよびGlu-129-Gly PT変異体)に)既に記載されている。方法および組成物に使用し得る追加のLT変異体としては、例えば、Ser-63

- L y s 変異体、A l a - 6 9 - G l y 変異体、G l u - 1 1 0 - A s p 変異体および G l u - 1 1 2 - A s p 変異体が挙げられる。その他のアジュバント（様々な供給源（例えば、大腸菌（E . c o l i ）、サルモネラ・ミネソタ（S a l m o n e l l a m i n n e s o t a ）、サルモネラ・チフィムリウム（S a l m o n e l l a t y p h i m u r i u m もしくはシゲラ・フレックスネリ（S h i g e l l a f l e x n e r i ））の細菌モノホスホリルリピド A（M P L A）、サポニンまたはポリラクチドグリコリド（P L G A）マイクロスフェアなど）も粘膜投与に使用することができる。

【0299】

その他のアジュバントとしては、インターロイキンなどのサイトカイン、例えば I L - 1、I L - 2 および I L - 1 2、ケモカイン、例えば C X C L 1 0 および C C L 5、マクロファージ刺激因子ならびに / あるいは腫瘍壊死因子が挙げられる。使用し得るその他のアジュバントとしては、C p G オリゴヌクレオチド（D a v i s . C u r r T o p M i c r o b i o l I m m u n o l . , 2 4 7 : 1 7 1 - 1 8 3 , 2 0 0 0 ）が挙げられる。

10

【0300】

水中油型乳剤としては、スクアレン；ラッカセイ油；M F 5 9（国際公開第 9 0 / 1 4 3 8 7 号）；S A F（S y n t e x L a b o r a t o r i e s 社、パロアルト、カリフォルニア州）；および R i b i（商標）（R i b i I m m u n o c h e m 社、ハミルトン、モンタナ州）が挙げられる。水中油型乳剤は、免疫刺激物質、例えばムラミルペプチド（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（t h r - M D P）、- アセチル - ノルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン（n o r - M D P）、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 - s n - グリセロ - 3 - ヒドロキシホスホリルオキシ） - エチルアミン（M T P - P E）、N - アセチルグルクサミニル - N - アセチルムラミル - L - A l - D - イソグル - L - A l a - ジバルミトキシプロピルアミド（N - a c e t y l g l u c s a m i n y l - N - a c e t y l m u r a m y l - L - A l - D - i s o g l u - L - A l a - d i p a l m i t o x y p r o p y l a m i d e）（D T P - D P P）、t h e r a m i d e（商標））またはその他の細菌細胞壁成分とともに使用され得る。

20

【0301】

粘膜免疫感作および非経口免疫感作の両方に有用なアジュバントとしては、ポリホスファゼン（例えば、国際公開第 9 5 / 2 4 1 5 号）、D C - c h o l（3 b - （N - （N' , N' - ジメチルアミノメタン） - カルバモイル）コレステロール（例えば、米国特許第 5 , 2 8 3 , 1 8 5 号および国際公開第 9 6 / 1 4 8 3 1）号および Q S - 2 1（例えば、国際公開第 8 8 / 9 3 3 6 号）が挙げられる。

30

【0302】

アジュバントを免疫原と結合させて投与し得る。例えば、免疫原を含むペプチドの立体配座の変化が免疫原に対する免疫応答の性質に影響を及ぼさないように、パルミチン酸などの脂質を 1 つまたは複数のペプチドと直接結合させ得る。

【0303】

一実施形態では、組成物は本明細書に記載される抗体を含む。別の実施形態では、組成物は、本明細書に記載される抗体と希釈剤とを含む。一実施形態では、組成物は無菌組成物である。

40

【0304】

V. キット

さらなる態様は、無菌バイアルなどのバイアルあるいはその他の筐体に入った本明細書に記載される i) 抗体および / またはその結合フラグメント、i i) 核酸、i i i) ペプチドまたは免疫原、i v) 組成物あるいは v) 組換え細胞と、任意選択で参照物質および / またはキットの使用のための説明書とを含む、キットに関する。

【0305】

一実施形態では、キットは、収集バイアル、標準緩衝液および検出試薬のうちの 1 つまたは複数のものをさらに含む。

50

【 0 3 0 6 】

V I . 方法

本明細書に記載される化合物、免疫原および抗体を作製および使用する方法が含まれる。

【 0 3 0 7 】

特に、H D S G (配列番号 1) または関連エピトープの立体配座エピトープに特異的かつ / または選択的な抗体を作製する方法であって、対象、任意選択で非ヒト対象に本明細書に記載されるエピトープ配列を含み立体配座的に制約のある化合物、任意選択で H D S G (配列番号 1) または関連エピトープを含む環状化合物を投与することと、環状化合物と特異的または選択的に結合し、任意選択で、i) 合成および / または天然のオリゴマーと特異的または選択的に結合し、かつ / あるいは i n s i t u 組織試料で老人斑との結合が全くもしくはほとんどみられない、または対応する直鎖状ペプチドとの結合が全くもしくはほとんどない、抗体産生細胞あるいは抗体を単離することを含む、方法が提供される。環状化合物は、例えば、本明細書に記載される環状化合物を含む、本明細書に記載されるいずれかの「エピトープ」を含み得る。

10

【 0 3 0 8 】

一実施形態では、この方法は、例えば本明細書に記載される方法を用いて、モノクローナル抗体を作製するためのものである。

【 0 3 0 9 】

一実施形態では、この方法は、例えば本明細書に記載される方法を用いて、ヒト化抗体を作製するためのものである。

20

【 0 3 1 0 】

一実施形態では、本明細書に記載される環状化合物、任意選択で環状ペプチドを用いて抗体を作製する。

【 0 3 1 1 】

環状化合物を用いて作製する抗体は、本明細書および実施例に記載される通りに選択される。一実施形態では、この方法は、任意選択で本明細書に記載される方法を用いて、直鎖状ペプチドよりも環状ペプチドと特異的または選択的に結合し、エピトープ配列に特異的であり、オリゴマーと特異的に結合し、かつ / あるいは i n s i t u の斑および / または対応する直鎖状ペプチドと結合しない、またはほとんど結合しない抗体を単離することを含む。

30

【 0 3 1 2 】

さらなる態様では、生体試料が A ベータを含むかどうかを検出する方法であって、生体試料と本明細書に記載される抗体とを接触させることと、何らかの抗体複合体の存在を検出することとを含む、方法が提供される。一実施形態では、この方法は、生体試料が、少なくとも H、D および / または S が非オリゴマー立体配座の H、D および / または S によって占められるものとは別の立体配座にある、A ベータを含むかどうかを検出するためのものである。

【 0 3 1 3 】

一実施形態では、この方法は、生体試料がオリゴマー A ベータを含むかどうかを検出するためのものである。

40

【 0 3 1 4 】

一実施形態では、この方法は、

a . 抗体 : A ベータオリゴマー複合体の形成が可能な条件下で、生体試料と、本明細書の A ベータオリゴマーに特異的かつ / または選択的な本明細書に記載される抗体とを接触させること ; および

b . 何らかの複合体の存在を検出すること
を含み、

検出可能な複合体の存在により、試料が A ベータオリゴマーを含有し得ることが示される。

【 0 3 1 5 】

一実施形態では、形成された複合体のレベルを、適切な I g 対照または無関係な抗体など

50

の被験抗体と比較する。

【0316】

一実施形態では、検出を定量化し、生成した複合体の量を測定する。測定は、例えば標準物質に対して相対的なものであり得る。

【0317】

一実施形態では、測定された量を対照と比較する。

【0318】

別の実施形態では、この方法は、

(a) 抗体 - 抗原複合体の生成が可能な条件下で、前記対象の生体試料と本明細書に記載される抗体とを接触させること；

(b) 被験試料中の抗体 - 抗原複合体の量を測定すること；および

(c) 被験試料中の抗体 - 抗原複合体の量と対照とを比較すること

を含み、

対照と比較して生体試料中に抗体 - 抗原複合体が検出されることにより、試料がAベータを含むことが示される。

【0319】

対照は、試料対照（例えば、ADを有さない対象または軽度、中等度もしくは進行型といった特定の型のADを有する対象に由来するもの）または対象のAベータオリゴマーレベルの変化をモニターするための同じ対象由来の以前の試料であり得る。

【0320】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体を使用する。

【0321】

一実施形態では、抗体は、HDSG（配列番号1）または関連立体配座エピトープを含むAベータの立体配座を特異的かつ/または選択的に認識し、生体試料中に抗体抗原複合体が検出されることにより、試料がAベータオリゴマーを含むことが示される。

【0322】

一実施形態では、試料は生体試料である。一実施形態では、試料は、脳組織もしくはその抽出物および/またはCSFを含む。一実施形態では、試料は、全血、血漿または血清を含む。一実施形態では、試料はヒト対象から採取されるものである。一実施形態では、対象は、ADが疑われる、ADのリスクがある、またはADを有する。

【0323】

本明細書に記載される抗体を用いてAベータ：抗体複合体を検出し、それにより生体試料中にHDSG（配列番号1）もしくは関連立体配座エピトープを含むAベータおよび/またはAベータオリゴマーが存在するかどうかを判定するには、フローサイトメトリー、免疫ブロット、ELISAおよび免疫沈降とそれに続くSDS-PAGEなどのイムノアッセイならびに免疫細胞化学を含めたいくつかの方法を用いることができる。

【0324】

実施例に記載されるように、表面プラズモン共鳴技術を用いて立体配座特異的結合を評価することができる。抗体を標識する、または複合体の抗体に特異的な検出可能に標識した二次抗体を用いる場合、その標識を検出することができる。一般に用いられる試薬としては、蛍光発光抗体およびHRP標識抗体が挙げられる。定量的方法では、発生したシグナルの量を標準物質または対照との比較により測定することができる。測定はまた、相対的なものであり得る。

【0325】

さらなる態様は、対象または組織中のAベータのレベルを測定する、またはそのようなAベータを撮像する方法であって、任意選択で、測定または撮像するAベータがオリゴマーAベータである、方法を含む。一実施形態では、この方法は、ADを有するリスクがある、ADを有することが疑われる、またはADを有する対象に検出可能な標識とコンジュゲートした抗体を投与すること；および標識を検出すること、任意選択で標識を定量的に検出することを含む。標識は、一実施形態では、例えばPET撮像に使用することができる

10

20

30

40

50

陽電子放出放射性核種である。

【0326】

さらなる態様は、対象に免疫応答を誘導する方法であって、対象に本明細書に記載される化合物、任意選択で、HDSG（配列番号1）もしくは関連エピトープペプチド配列を含む環状化合物、免疫原および/または前記化合物もしくは前記免疫原を含む組成物を投与すること；ならびに任意選択で、投与した化合物または免疫原中のAベータペプチドと特異的または選択的に結合する細胞および/または抗体を単離することを含む、方法を含む。一実施形態では、組成物は、薬学的に許容される希釈剤または担体と混合した化合物または免疫原を含む、医薬組成物である。

【0327】

一実施形態では、対象はげっ歯類などの非ヒト対象である。作製された抗体産生細胞は、一実施形態ではハイブリドーマ細胞系を作製するために使用する。

【0328】

一実施形態では、投与する免疫原は、図11Bに示される化合物を含む。

【0329】

本明細書では、シクロ（CGHDSGG）に対して生じさせた抗体が、Aベータオリゴマーと特異的かつ/または選択的に結合し、Aベータ斑染色を示さないことが示される。オリゴマーAベータ種は、ADにおいて毒性のある伝播性の種であると考えられる。さらに、図19に示されるように、シクロ（CGHDSGG）（配列番号2）を用いて生じさせ、オリゴマーに特異的な抗体は、Aベータの凝集およびAベータオリゴマーの伝播を阻害した。したがって、Aベータオリゴマーの伝播を阻害する方法であって、有効量の本明細書に記載されるAベータオリゴマーに特異的または選択的な抗体を、Aベータを発現する細胞もしくは組織と接触させる、または必要とする対象に投与して、Aベータの凝集および/またはオリゴマーの伝播を阻害することを含む、方法も提供される。実施例10に記載されるように、*in vitro*でアッセイをモニターすることができる。

【0330】

抗体はまた、ADおよび/またはその他のAベータアミロイド関連疾患の治療に有用であり得る。例えば、レビー小体型認知症のバリエーションおよび封入体筋炎（筋肉疾患の1つ）では、それぞれ脳および筋肉にADと類似した斑がみられ、脳アミロイド血管症に關する凝集体にもAベータが形成され得る。さらに、神経変性疾患（パーキンソン病および前頭側頭型認知症を含む）の「混合型」病態は、明らかなADの臨床症候群がなくてもAD病態の特徴が観察されることでわかる。上記のように、シクロ（CGHDSGG）（配列番号2）に対して生じさせた抗体は、ADの毒素原性のAベータ種であると考えられるオリゴマーAベータと結合し、毒素原性Aベータオリゴマーの形成を阻害する。

【0331】

したがって、さらなる態様は、ADおよび/またはその他のAベータアミロイド関連疾患を治療する方法であって、必要とする対象に1）有効量の本明細書に記載される抗体、任意選択で、前記抗体を含むAベータオリゴマー特異的もしくはAベータオリゴマー選択的組成物または医薬組成物を投与すること；あるいは2）必要とする対象にHDSG（配列番号1）もしくは関連エピトープ配列を含む単離環状化合物、免疫原または前記環状化合物を含む医薬組成物を投与することを含む、方法である。

【0332】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体を用いて、治療する対象由来の生体試料をAベータの有無またはレベルに関して評価する。一実施形態では、検出可能なAベータレベル（例えば、*in vitro*で測定される、または撮像により測定されるAベータ抗体複合体）を有する対象を抗体で治療する。

【0333】

抗体および免疫原を例えば、本明細書に記載される医薬組成物に含ませ、例えば小胞に製剤化して送達を改善することができる。

【0334】

10

20

30

40

50

HDSG（配列番号1）を標的とする1つまたは複数の抗体および／または関連抗体を組み合わせて投与することができる。さらに、本明細書に開示される抗体をベータセクレターゼ阻害剤またはコリンエステラーゼ阻害剤などの1つまたは複数の他の治療剤とともに投与することができる。

【0335】

一実施形態では、抗体は、任意選択でAベータオリゴマーと特異的または選択的に結合する、立体配座特異的／選択的抗体である。

【0336】

また、ADを標的とする組成物、抗体、単離ペプチド、免疫原および核酸の使用が提供される。

【0337】

本明細書に記載される組成物、化合物、抗体、単離ペプチド、免疫原および核酸、ペクターなどを、例えば、非経口投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、頭蓋内投与、脳室内投与、髄腔内投与、眼窩内、点眼、脊髄内投与、槽内投与、腹腔内投与、鼻腔内投与、エアゾール投与または経口投与により投与することができる。

【0338】

ある特定の実施形態では、医薬組成物を全身投与する。

【0339】

他の実施形態では、医薬組成物を脳またはCNSの他の部分に直接投与する。例えば、このような方法は、埋込み型カテーテルおよびポンプの使用を含み、これらはカテーテルを通して注入部位に所定用量を放出するものである。当業者であればさらに、理解されよう。カテーテルは、それを可視化して脳内の所望の投与部位または注入部位に隣接する位置に配置することが可能な外科技術により埋め込まれ得る。このような技術は、参照により本明細書に組み込まれるElsberryらの米国特許第5,814,014号「Techniques of Treating Neurodegenerative Disorders by Brain Infusion」に記載されている。また、米国特許出願公開第20060129126号（KaplitteおよびDuring,「Infusion device and method for infusing material into the brain of a patient」）に記載されているもの方法などの方法が企図される。脳およびCNSの他の部分に薬物を送達する装置が市販されている（例えば、SynchroMed（登録商標）EL Infusion System; Medtronic社、ミネアポリス、ミネソタ州）。

【0340】

別の実施形態では、血液脳関門を通過する受容体介在型輸送が可能になるよう投与する化合物を修飾するなどの方法を用いて、医薬組成物を脳に投与する。

【0341】

他の実施形態では、本明細書に記載される組成物、化合物、抗体、単離ペプチド、免疫原および核酸と、血液脳関門を通過する輸送を促進することが知られている生物学的に活性な分子との共投与が企図される。

【0342】

また、ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物、化合物、抗体、単離ペプチド、免疫原および核酸を血液脳関門を通過させて投与する方法、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7012061号「Method for increasing the permeability of the blood brain barrier」に記載されている、血液脳関門の透過性を一時的に増大させることを目的とする方法などが企図される。

【0343】

当業者には、本明細書に記載される組成物、化合物、抗体、単離ペプチド、免疫原および核酸を脳に直接投与する、または血液脳関門を通過させて投与するのに適切な様々な方法が理解され、本明細書に記載される製品を安全に投与するためにこれらの方法を修正する

10

20

30

40

50

ことが可能であろう。

【0344】

上の開示は本願を全体的に説明するものである。以下の具体例を参照することにより、さらに十全な理解することができる。これらの例は単に説明を目的として記載されるものであって、本願の範囲を限定することを意図するものではない。状況によって好都合であることが示唆される、または好都合である場合、形態の変更および均等物による置換が企図される。本明細書では特定の用語が使用されているが、このような用語は説明的な意味を意図するものであって、限定を目的とするものではない。

【0345】

以下の非限定的な例は本開示を例示するものである。

10

【0346】

(実施例)

実施例1

集団座標予測

ミスフォールドされたエピトープを予測する方法は、2015年11月9日に出願され参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第62/253044号、「System s and methods for predicting misfolded protein epitopes by collective coordinate biasing」に記載されている「集団座標バイアス」によって得られる。そこに記載されているように、この方法は、あるタンパク質（またはペプチド凝集体）にグローバル座標のバイアスをかけて、そのタンパク質（またはペプチド凝集体）をミスフォールドさせた後、部分的に構造化されていないタンパク質（またはペプチド凝集体）のフォールドされない可能性が最も高いアンフォールド領域を予測する、分子動力学に基づくシミュレーションを用いるものである。バイアスシミュレーションを実施し、各残基インデックスに対応する（検討するタンパク質の初期構造のものと比較した）溶媒接触表面積（SASA）。SASAはH₂Oが接触可能な表面積を表す。SASAの（検討するタンパク質の初期構造のものと比較した）正の変化は、関連する残基インデックスの領域におけるアンフォールドを示すと考え得る。この方法をそれぞれが独自の形態を有する3種類のAベータ株、すなわち、3回対称性構造（またはモノマー）（PDBエントリー2M4J）のA - 40ペプチド、2回対称性構造（PDBエントリー2LMN）のA - 40モノマーおよび一本鎖平行in-register（例えば、一本の鎖の残基が近接する鎖の同じ残基と相互作用するベータシートが反復したもの）構造（PDBエントリー2MXU）のA - 42モノマーに適用した。

20

30

【0347】

米国特許出願第62/253044号に記載されている集団座標法ならびにK. Vannommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. VorobyovおよびA. D. Mackerell. Charmm general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the charmm all-atom additive biological force fields. Journal of Computational Chemistry, 31(4):671-690, 2010;ならびにP. Bjelkmar, P. Larsson, M. A. Cuendet, B. HessおよびE. Lindahl. Implementation of the CHARMM force field in GROMACS: analysis of protein stability effects from correlation maps, virtual interaction sites, and water models. J. Chem. Theo. Comp., 6:459-466, 2010に記載されているCHARMM力場パラメータ（ともに参照により本明細書に組み込まれる）をTIP3P水とともに用いて、各初期構造に対するシミュレーションを

40

50

実施した。

【0348】

この方法を用いて予測されたエピトープを実施例2に記載する。

【0349】

実施例2

I. 集団座標予測

エピトープHDSG（配列番号1）は実施例1に記載した集団座標法から予測される2M4J株由来のエピトープとして現れる。いくつかの他の線維の株では、この領域は不規則な状態であり、このためPDBエントリーの構造をもたない。例えば、2LMNではHDSが構造化されておらず、このため、これらの残基の座標はPDB構造に存在せず、2LMPではHDSがPDBに構造化されておらず、2MXUではHDSG（配列番号1）がPDBに構造化されていない。予測されたエピトープを示す対応する図が図1である。線維構造2M4Jに関しては、HDSG（配列番号1）を左右から挟む2つの配列、RHDSG（配列番号5）およびHDSGY（配列番号4）が予測され；残基R5およびY10はそれぞれ1つの予測から現れるが、残基HDSG（配列番号1）は2つの予測から現れ、このため、これら2つの予測の間の推定コンセンサス配列として扱った。

【0350】

II. 立体配座特異的エピトープ

本明細書に記載され、図1に示されるように、HDSG（配列番号1）エピトープは、線維PDB構造2M4Jに変性ストレスを加えたときの予測として現れる。HDSGY（配列番号4）およびRHDSG（配列番号5）も予測される。

【0351】

A は、ガンマセクレターゼによるアミロイド前駆体タンパク質（APP）の切断により生じる長さ36～43アミノ酸のペプチドである。AD患者では、モノマー、不溶性線維および不溶性オリゴマーの複数の立体配座として存在する。A 線維はAD患者の脳にみられる老人斑の主成分である。

【0352】

モノマー型では、A は非構造化ポリペプチド鎖として存在する。線維型では、A は異なる形態に凝集することができ、これらは多くの場合、株と呼ばれる。上記の構造のうちいくつかのものは固体NMRにより決定されたものであり、一部の線維構造は*in vitro*試験で得られたものであり、それ以外は、AD患者から採取したアミロイド斑を用いて線維を播種することにより得られたものである。

【0353】

オリゴマーは、毒性のある伝播性のペプチド種であることが示唆されている。

【0354】

オリゴマー特異的抗体を作製するための必要条件の1つが、モノマー立体配座または線維立体配座には存在しない、またはあまり有利ではないA ペプチド上の標的の特定である。これらのオリゴマー特異的エピトープは、モノマーまたは線維の対応するセグメントと一次配列が異なるわけではないが、オリゴマーにおいて立体配座が異なるものとなる。つまり、これらは、モノマーにも線維にも存在しない独特の立体配座でオリゴマー中に存在することになる。

【0355】

これまでにオリゴマーの構造は決定されておらず、さらに、NMRの証拠から、オリゴマーが単一の明確に定められた構造ではなく、規則性に乏しく立体配座的に可塑性で順応性のある構造アンサンブルの形で存在することが示されている。さらに、オリゴマー種の濃度はモノマーまたは線維のものよりもはるかに低い（推定値には幅があるが、約1000分の1またはそれ以下である）ため、この標的は捉えどころのないものとなっている。

【0356】

一次配列（例えば、直鎖状配列）の連続する鎖または線維構造に対する抗体は、その効果を制限する問題点をいくつか抱え得る。直鎖状ペプチド領域に対して生じさせた抗体は、

10

20

30

40

50

オリゴマーに対して選択的ではない傾向があり、このため、モノマーとも結合する。モノマーの濃度は実質的にオリゴマーの濃度より高いため、そのような抗体治療剤は「標的に対する注意散漫」という問題を抱えることがあり、オリゴマー種を選択的に標的とし除去するのではなく、むしろ主としてモノマーと結合し、機能的 A の除去を促進する。アミロイド封入体に対して生じさせた抗体は主として線維と結合し、その結果、血管原性浮腫および/または微小出血を表すと考えられるシグナル変化を含めたアミロイド関連画像異常 (ARIA) が生じた。

【0357】

オリゴマー型の A に選択的な抗体を開発するため、線維内で破壊され得る領域を特定した。理論に拘束されるのを望むわけではないが、線維における破壊がオリゴマーの表面に露出するのではないかという仮説を立てた。しかし、オリゴマー上では、これらの配列領域は、モノマーおよび/または線維のものとは異なる立体配座で露出し得る。例えば、表面にあるとき、それらは線維またはモノマーにみられる対応する量より曲率が高く、露出表面積が大きく、それとは異なる二面角分布を示すターン領域の形で露出し得る。

【0358】

HDSG (配列番号 1) を含む環状化合物を本明細書に記載し、図 11B に示す。この環状化合物は、曲率が高く、露出表面積が大きく、別の二面角分布という上記の基準を 1 つまたは複数満たすよう設計したものである。

【0359】

線維内の破壊されやすい領域を特定することの潜在的有益性の 1 つは、それにより線維がモノマーからオリゴマーの核を形成する触媒基質としての役割を果たし得る二次的な核形成過程に関与する領域が特定され得ることである [3]。側鎖が露出した線維の領域の方が付近のモノマーとの異常な相互作用に関与してモノマーの付着を促進する可能性が高いと思われ、次いで、このように付着したモノマーは、線維の表面またはその付近で効率的に増大する濃度という環境に曝され、それによりオリゴマーを含めた多量体凝集体を形成する可能性が高くなるものと思われる。A の露出領域を有する加齢線維または損傷線維は毒性オリゴマーの産生を増大させ得るものであり、線維上のこれらの不規則な領域に対する抗体は、このような伝播機序を阻止するのに効果的であるものと思われる。

【0360】

III. 環状ペプチドの曲率

環状ペプチド CGHDSGG (配列番号 2) の曲率プロファイルにより環状 HDSG (配列番号 1) と直鎖状ペプチドまたは線維が区別される。曲率プロファイルを図 2 に示す。位置 6 のヒスチジン残基は直鎖状ペプチドまたは線維よりも曲率が小さい。直鎖状ペプチドは、環状ペプチドまたは線維により検討した立体配座と比較して曲がる傾向がある。一方、アスパラギン酸残基 D7 およびセリン残基 S8 は、環状ペプチド内での曲率が、直鎖状ペプチドまたは線維内でのこれらの残基の曲率と比較して高い。環状ペプチド内でのグリシン残基 (G) は、曲率が線維内での曲率より若干高いが、直鎖状ペプチド内での曲率より若干低い。以上の結果は、環状ペプチドに対する抗体が、モノマーまたは線維のものとは異なる立体配座アンサンブルを示す種に対して選択性を示す可能性があることを示している。

【0361】

本明細書で考察する曲率のプロットおよび二面角分布に関しては、Charmm27 を用いる陽溶媒 (TIP3P) での平衡シミュレーションからデータを得る。各アンサンブルのシミュレーション時間および立体配置数は以下の通りである。環状ペプチドアンサンブル: シミュレーション時間 10 ナノ秒、1001 のフレームを含む; 直鎖状ペプチドアンサンブル: シミュレーション時間 10 ナノ秒、1001 のフレームを含む; 2M4J アンサンブル: 680 ピコ秒、69 のフレームを含む。

【0362】

環状エピトープの曲率は直鎖状ペプチドまたは線維とプロファイルが異なるため、これらの残基を含むオリゴマー上のアミノ酸の対応する伸縮振動は線維またはモノマーのもの

10

20

30

40

50

は異なる主鎖配向を有するのでないかと予想される。しかし、曲率の大きさは非物理学的なものであると思われ、環状ペプチドを特徴付ける曲率の数値は線維のいくつかの位置で得られる。

【 0 3 6 3 】

残基 H、D、S および G の曲率の数値を表 4 に記載する。直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドはともに H D S G (配列番号 1) の曲率が線維内でのこれらの残基の曲率より一般的に大きい、線維全体での曲率より有意に大きいというわけではないことに留意されたい。このことは、主として、線維構造 2 M 4 J では H D S G (配列番号 1) が比較的伸長したベータ鎖立体配座にあることに起因し、環状ペプチドまたは直鎖状ペプチドに対して生じさせた抗体が、線維に対して立体配座的に選択的であり得る、すなわち、線維に対して低い親和性を有し得ることを示唆している。

10

【 0 3 6 4 】

IV. 二面角分布

オリゴマー選択的エピトープを特定するためのさらなるコンピュータ支援が、オリゴマー内の露出エピトープの代わりである環状ペプチドの側鎖二面角分布ならびに主鎖二面角のラムチャンドラン および 分布の両方によって得られ、これらの分布は、多数の角について線維またはモノマーの対応する分布とは実質的に異なる。

【 0 3 6 5 】

残基 H、D および S の側鎖二面角分布を検討した。H 6 の C - C - C - C 二面角および N - C - C - C 二面角の分布には、環状ペプチドのものとモノマーまたは線維のものとで差がみられる (図 3)。直鎖状ペプチドが、環状ペプチドの二面角のほぼ全体 (9 0 %) の範囲内にある二面角を占める確率は、上記 2 つの二面角とも 3 6 % であり、線維におけるペプチドが、環状ペプチドの二面角のほぼ全体 (9 0 %) の範囲内にある二面角を占める確率は、上記 2 つの二面角ともわずかに 1 3 % である。その他の二面角の対応する確率は、線維またはモノマーのアンサンブルの約 3 0 % 以上である。あるいは、以下の説明および図では、C A、C a または C を用いて C アルファ原子を記載し、C B、C b および C などについても同様に記載する。

20

【 0 3 6 6 】

D 7 に関する二面角分布を図 4 に示す。D 7 の二面角に関して、直鎖状ペプチドが、環状ペプチドの二面角のほぼ全体 (9 0 %) の範囲内にある二面角を占める確率は以下の通りである：

30

C - C A - C B - C G : 1 2 %

N - C A - C B - C G : 1 9 %

O - C - C A - C B : 1 5 %。

【 0 3 6 7 】

D 7 の二面角に関して、線維におけるペプチドが、環状ペプチドの二面角のほぼ全体 (9 0 %) の範囲内にある二面角を占める確率は以下の通りである：

C - C A - C B - C G : 3 0 %

N - C A - C B - C G : 4 9 %

O - C - C A - C B : 6 %

40

【 0 3 6 8 】

S 8 に関する二面角分布を図 5 に示す。二面角分布は、環状立体配座アンサンブルでの二面角が実質的に異なっており、次いで、これらが直鎖状または線維のアンサンブルにあることがわかる。S 8 の二面角に関して、直鎖状ペプチドが、環状ペプチドの二面角のほぼ全体 (9 0 %) の範囲内にある二面角を占める確率は以下の通りである：

C - C A - C B - O G : 9 2 % (このことは実質的に重なり合っていることを示しているが、図 5 からわかるように、図 5 で重なり合っているピークの重みは実質的に異なっており、好ましい二面角が依然として異なり得ることを示している)

N - C A - C B - O G : 8 4 % (この二面角についても上の C - C A - C B - O G と同じことが言える)

50

O - C - C A - C B : 19 %。

【0369】

S8の二面角に関して、線維におけるペプチドが、環状ペプチドの二面角のほぼ全体（90 %）の範囲内にある二面角を占める確率は以下の通りである：

C - C A - C B - O G : 30 %

N - C A - C B - O G : 28 %

O - C - C A - C B : 25 %。

【0370】

上の側鎖二面角分布の解析によれば、7Dおよび8Sが直鎖状ペプチドおよび線維のアンサンプルとの相違が最も大きい残基である。7Dおよび/または8Sは、立体配座選択性を付与するエピトープ上の重要な残基であり得る。

【0371】

図3～5に示されるデータに基づき、環状ペプチド種とそれ以外の種との間に分布の有意差がみられる二面角について二面角分布のピーク値を表1に挙げる。表1の列1は、検討した具体的な二面角であり、列2は、直鎖状ペプチドCGHDSGG（配列番号2）におけるその角の二面角分布のピーク値であり、列3は、環状ペプチドCGHDSGG（配列番号2）におけるその角の二面角分布のピーク値であり、列4は、直鎖状ペプチドと環状ペプチドの二面角分布のピーク値の差であり、列5は、線維構造2M4JにおけるペプチドHDSG（配列番号1）の二面角分布のピーク値である。

【0372】

【表4】

表1：二面角分布のピーク値

二面角	直鎖状	環状	差(直鎖状-環状)	線維
6H:O-C-CA-CB	-57.5、97.5	107.5	-165、-10	97.5
6H:CA-CB-CG-CD2	-107.5、97.5	-82.5	-25、180	-107.5
6H:CA-CB-CG-ND1	77.5、-72.5	102.5	-25、-175	77.5、-77.5
6H:N-CA-CB-CG	-67.5、67.5、180	-62.5	-5、130、-117.5	67.5、180
6H:C-CA-CB-CG	62.5、-57.5、180	-57.5	120、0、-122.5	-57.5、180
7D:C-CA-CB-CG	-77.5、72.5、172.5	172.5	97.5、-100、0	72.5、-77.5、180
7D:N-CA-CB-CG	57.5、-62.5、-162.5	-62.5	120、0、-100	-62.5、52.5
7D:O-C-CA-CB	102.5	-97.5	-160	97.5
8S:N-CA-CB-OG	-172.5	-62.5	-110	62.5
8S:C-CA-CB-OG	67.5	180、62.5	-112.5、5	-72.5、67.5
8S:O-C-CA-CB	82.5	-102.5	-175	117.5

【0373】

V. 側鎖のエントロピー

残基の側鎖のエントロピーは、

【数1】

$$S/k_B = - \sum_i \int d\phi_i p(\phi_i) \ln p(\phi_i).$$

から概算され得る。

式中、総和は特定の残基の側鎖の全二面角であり、 $p(\phi_i)$ は上で解析した二面角分布である。

【0374】

線維のエントロピーに対する環状ペプチドアンサンブルの残基エントロピーの増分のプロットを図6に示す。H6のエントロピーは直鎖状および線維と比較して減少しており、このことは、H6がより拘束されたポーズであることを示している。これと同様に、直鎖状ペプチドまたは環状ペプチドのS8のエントロピーは線維よりごくわずかに大きい。D7のエントロピーはモノマーより減少しているが、線維に比べて増大している。

【0375】

残基側鎖部分のエントロピーの詳細な分析

H、DおよびSのそれぞれの側鎖の各二面角のエントロピーを検討した。H6、D7およびS8の二面角のエントロピーを図6にプロットする。H、DおよびSのいくつかの二面角のエントロピーが線維と比較して減少しており、このことは、線維モノマーまたは直鎖状モノマーとは異なる傾向がある立体配座においてそれらの角のポーズが制約されることを示している。

【0376】

環状ペプチドは全般的に直鎖状ペプチドより強固であり、特にH6についてそのことが言える。さらに、残基H6は線維立体配座より環状ペプチドの方が強固である。このことは、特にH6周辺に明確に定められた抗原プロファイルが存在し得ることを示唆している。しかし、このプロファイルは直鎖状アンサンブルおよび線維アンサンブルと確かに重なり合っている。つまり、これらのアンサンブルがH6の分布の上位90%以内に入る確率は以下の通りである：環状 - 直鎖状アンサンブルおよび環状 - 線維アンサンブルでのC - CA - CB - CG、N - CA - CB - CG、CA - CB - CG - ND1、CB - CG - ND1 - CE1およびO - C - CA - CBはそれぞれ(36%、36%、36%、35%、33%)および(13%、13%、30%、34%、65%)。環状ペプチドの側鎖立体配座のエントロピーが低いことから、選択性を付与するのに役立つ可能性のある明確に定められた立体配座のポーズが裏付けられる。

【0377】

VI. ラマチャンドラン角

エピトープが抗体に対して露出する主鎖配向は、ペプチドが直鎖状型であるか、環状型であるか、または繊維型であるかによって異なる。この相違は、直鎖ペプチドおよび環状ペプチドの両方の残基H、D、S、Gについて、主鎖に沿ってラマチャンドラン角φおよびψ(またはφおよびψ)をプロットすることにより定量化することができる。配列CGHDSGG(配列番号2)よりなる直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドの両方ならびに線維構造2M4JにおけるHDSG(配列番号1)の残基H6、D7、S8およびG9について平衡シミュレーションでサンプリングしたφ角およびψ角を図7にプロットする。図7から、残基D7およびS8のBB二面角に関して、環状ペプチドの主鎖二面角分布は、直鎖状ペプチドまたは線維構造2M4JにおけるペプチドHDSG(配列番号1)についてサンプリングした二面角の分布との差が最も大きいことがわかる。

【0378】

具体例として、残基D7に関して、図7は環状ペプチドが(φ、ψ) = (−65.9°、−44.5°)でピーク値(最も可能性が高い値)となるラマチャンドランφ、ψ角の分布を示している。直鎖状ペプチドは、これらの最も可能性が高い値が(φ、ψ) = (−153°、165°)および(−66°、143°)(ピークが2つ存在する)であり、線維構造2M4Jは、これらの最も可能性が高い値が(φ、ψ) = (−60°、143°)および(−150°、143°)である。このピーク二面角値の実質的な差は、環状エピトープ立体配座に対して選択した抗体が直鎖状エピトープおよび線維エピトープに対して低い親和性を有する可能性があることを示している。

【0379】

H6、D7、S8およびG9に関するラマチャンドラン主鎖φ、ψ分布のピーク値(最も

10

20

30

40

50

可能性が高い値)を表2に示す。表2の第1列には、検討した残基が記載されており、この残基は括弧内に示される2つの角ファイおよびプサイを示す。第2列には、直鎖状ペプチドCGHDSGG(配列番号2)におけるHDSG(配列番号1)のラマチャンドランファイ/プサイ角のピーク値が示されており、第3列には、環状ペプチドCGHDSGG(配列番号2)におけるHDSG(配列番号1)のラマチャンドランファイ/プサイ角のピーク値が示されており、最終列には、線維構造2M4JにおけるHDSG(配列番号1)のラマチャンドランファイ/プサイ角のピーク値が示されている。図7を参照されたい。H6に関しては、主鎖ラマチャンドラン角が全3種の間で極めて類似している。D7に関しては、環状アンサンプルの点と重なり合う直鎖状アンサンプルおよび線維アンサンプルの点が少数みられる。環状アンサンプルの点の90%を取り囲む楕円を考えると、直鎖状アンサンプルの約16%のみがこの楕円の内側に入り、線維アンサンプルの約10%のみがこの包の内側に入る。H6に関する類似した測定値について、対応する数は、直鎖状アンサンプルが27%、線維アンサンプルが32%である。S8に関しては、環状アンサンプルの点の90%を取り囲む最も小さい凸包に直鎖状アンサンプルおよび線維アンサンプルの37%および15%がそれぞれ含まれる。G9に関しては、90%凸包は点の90%を含む2つの凸包に最もよく分割される。これらの包に含まれる点の割合は、直鎖状アンサンプルのものが79%、線維アンサンプルのものが11%である。

【0380】

【表5】

表2. 主鎖ファイ/プサイ角の分布のピーク値

主鎖ファイ/プサイ角の分布のピーク値	直鎖状	環状	線維
H6、(ファイ、プサイ)	(-98.5,0) (-77.2,-43.3) (-162.8,157.4)	(-164.6,157.9)	(-147.5,150) (-85,150)
D7:(ファイ、プサイ)	(-153,165) (-66,143.4)	(-65.9,-44.5)	(-60.5,143.5) (-149.5,143.5)
S8:(ファイ、プサイ)	(-66.2,144) (-158.3,151.1)	(-70.5,-50)	(-156,174) (-156,12) (-66.5,-48)
G9:(ファイ、プサイ)	(85.9,7)(86.1,-7)	(-114.3,-14.6)	(77.5,0) (77.5,158) (-62.3,158)

【0381】

VII. 予測エピトープ配列の溶解度および抗原性

CamSol予測スキーム[4]によるAベータ42の残基の溶解度を図8に示す。残基H6~G9が縦の線により示されている。

【0382】

残基の溶解度が高いほどオリゴマーの表面で出会う可能性が高い。残基*i*の相対溶解度係数 σ_i は

【数2】

$$\sigma_i = \frac{s_i - s_{ave}}{\delta s}$$

のように導入され、式中、 s_i は残基*i*の溶解度であり、 s_{ave} は42残基Aベータペプチドの平均溶解度であり、上に記載される s は、42残基Aベータペプチドの溶解

度の標準偏差である。

【 0 3 8 3 】

正の溶解度は、残基が溶媒に露出しやすく抗体に接触可能なものである可能性が高いことを示し、この尺度での A ベータ 4 2 の 1 ~ 4 2 の全残基の平均溶解度は - 0 . 3 9 である。構造に関する情報がそれ以上存在しない場合、この領域の溶解度の増大は、それが埋没しているのではなく溶媒に露出している可能性があることを示している。したがって、候補オリゴマーのアンサンブルでは、この領域は平均よりも露出しやすい傾向があると思われる。C a m S o l 法 [4] は、アミノ酸の疎水性、中性 p H での残基の静電荷、ヘリックス傾向および鎖傾向を含めた特定の物理化学的特性の線形結合を用いるものであり、この線形結合は、隣接残基の作用の主要因である 7 残基のウィンドウにわたってなめらかになる。溶解度スコアを無次元数 (A . U . または A U) として算出し、ランダムなポリペプチドで平均値 0 および標準偏差 1 のプロファイルが得られるように溶解度プロファイルの尺度を変更する。その結果、溶解度スコアが - 1 より小さいアミノ酸は、溶解性に乏しくタンパク質の溶解度に負の影響を及ぼすものと見なされ、1 より大きいスコアは、溶解性が高く全体の溶解度に積極的に寄与する領域を表す。

10

【 0 3 8 4 】

図 9 に、溶媒接触表面積 (S A S A)、各残基の溶解度係数により重み付けした S A S A、 $s_i \cdot S A S A_i$ および $s_i \cdot S A S A_i$ から線維での値を減じたもの、すなわち、モノマーペプチドおよび環状ペプチドでのこの量の線維に対する増分 $s_i \cdot S A S A_i$ をプロットする。ここでは、 s_i は図 8 から取り上げた残基 i の溶解度であり、 $\langle s \rangle$ は A ベータの 4 2 残基全体の平均溶解度、 $\langle s \rangle = - 0 . 3 9$ であり、

20

【 数 3 】

$$\delta s = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{42} (s_i - \langle s \rangle)^2}$$

は A の 4 2 残基全体の溶解度の標準偏差である。S A S A 対残基インデックスのプロットは、全立体配座において、残基が N 末端の方向に向かって、より抗体が接触可能な表面を提示する傾向があることを示している。明確に定められていない状況において所与の残基が溶媒に表面を露出する可能性の尺度を示す溶解度により重み付けした場合、環状ペプチドアンサンブルでは残基 H 6 と S 8 に差がみられない。S A S A を上記のように溶解度により重み付けし、次いで対応する線維の値を減じて残基に対する値を示した場合、残基 S 8 は環状ペプチドで最も露出し溶解性の高いものとして現れる。この解析から、このペプチドでは残基 S 8 および H 6 が潜在的に結合に特に重要なものであるものとして強調される。

30

【 0 3 8 5 】

環状ペプチドおよび直鎖状ペプチドの S A S A は同程度であり、ともに線維での S A S A より大きい。

【 0 3 8 6 】

溶解度による重み付けによって、線維構造での H D S G (配列番号 1) の立体配座と比較して露出および抗体結合への接触可能性が異なる可能性が最も高い残基 S 8 が得られる。

40

【 0 3 8 7 】

V I I I . 環状ペプチド立体配座のアンサンブルは直鎖状立体配座または線維立体配座のアンサンブルとは異なる方法でクラスター化する

立体配座間に標準的な構造アライメントの測定基準を用い、次いでクラスタリング解析を実施することにより、配列 H D S G (配列番号 1) が環状ペプチドにおいて直鎖状ペプチドとは異なる立体配座を提示するという決定的証拠を確認することができる。直鎖状ペプチドおよび環状ペプチドの C G H D S G G (配列番号 2) ならびに P D B I D 2 M 4 J に対応する 3 回対称性構造の完全長線維について立体配座の平衡アンサンブルを得る。これらのアンサンブルから残基 H D S G (配列番号 1) に関する立体配座のスナップショット

50

トを収集し、次いで、直鎖状ペプチドアンサンプルの最も大きい3つのクラスターの重心を構造的に整列させ、平均二乗偏差 (RMSD) を記録する。ここでは、最大クラスターアルゴリズム (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/maxcluster>) によりクラスタリングを実施する。図10に、直鎖状アンサンプル、環状アンサンプルおよび線維アンサンプルの3つの対応するRMSD値を三次元散布図としてプロットする。

【0388】

濃い丸で示される環状ペプチドアンサンプルは、灰色の十字で示される直鎖状ペプチドまたは灰色の逆三角で示される線維アンサンプルとは立体配座的に異なっている。図10の上部のプロットは、環状ペプチドは線維によって示される立体配座と異なっているが、直鎖状ペプチドはそうではないことを示している。このことは、環状ペプチドに対して生じさせた抗体が立体配座に選択的であり、線維またはモノマーとは優先的に結合しないものであり得るが、モノマーに対して生じさせた抗体は依然として線維と結合し得ることを示している。したがって、理論に拘束されるのを望むわけではないが、環状ペプチドをオリゴマーの模倣物として使用すれば、その模倣体に対して生じさせた抗体がモノマーまたは線維と結合する可能性は低いと思われる。

【0389】

図10から、3つのアンサンプルが互いに異なる方法でクラスター化することは明らかである。特に、環状ペプチド構造のアンサンプルは直鎖状アンサンプルまたは線維アンサンプルとは異なっており、このことは、環状ペプチドエピトープに特異的な抗体が直鎖状アンサンプルまたは線維アンサンプル内で提示される立体配座に対して低い親和性を有する可能性があることを示している。

【0390】

図11Aに、環状ペプチドの構造アンサンプルの最大のクラスターの重心を構成する代表的なスナップショットの図を2つ示す。図11Aにはさらに、直鎖状ペプチドアンサンプルのうち直鎖状ペプチドアンサンプルの二面角分布のピーク付近に二面角を有する代表的な立体配座について示した側鎖配向を環状ペプチドに重ね合わせて黒色で示し、それらの配向の差を明確にした。上で考察した二面角の差に基づけば、残基D7およびこれより若干程度は低い残基S8が異なる方法で露出する可能性がある。

【0391】

図12は、平均二乗偏差 (RMSD) による一連のクラスタリングプロットであり、軸は、図10と同じく直鎖状ペプチドアンサンプルの最も大きい3つのクラスターの重心に対応する。

【0392】

各点は、環状ペプチドまたはPDB ID 2LMN、2MXUおよび2LMPの線維平衡アンサンプルの様々な「株」から取り上げた所与の立体配座に対応する。濃い丸で示される環状ペプチドアンサンプルは、いずれの線維アンサンプルとも立体配座的に異なっている。これらの線維はいずれも不規則なN末端の程度にばらつきがあるため、線維アンサンプルは直鎖状アンサンプルをある程度再現している。このことは、環状ペプチドに対して生じさせた抗体が立体配座に選択的であり、Aベータの複数の株の線維立体配座と結合しない可能性を示している。

【0393】

図10から取り上げたクラスター重心環状ペプチド立体配座ならびに直鎖状ペプチドアンサンプルおよび線維アンサンプルの対応する重心立体配座に関して実施したラマチャンドラン主鎖二面角および側鎖二面角の値を表3に挙げる。ここでは、平衡線維アンサンプルの最大クラスターの重心立体配座も取り上げる。環状立体配座と直鎖状立体配座との間および環状立体配座と線維立体配座との間の対応する二面角の差も記載する。本明細書に記載されるように、この表の二面角の大部分に有意な差がみられる。

【0394】

10

20

30

40

50

【表 6】

表 3：図 10 にプロットした最も大きい立体配座クラスターの重心である環状ペプチド立
体配座および同じく図 10 にプロットした直鎖状アンサンブルおよび線維アンサンブルの
最も大きい立体配座クラスター重心について示したラマチャンドラン主鎖二面角および側
鎖二面角の表。

	環状	直鎖状	2m4j	環状 - 直鎖状	環状-2m4j
Rama-6 H	(-137.5, 154.4)	(-134.5, 155.5)	(-83.8,124.7)	(-3.0,-1.1)	(-53.7,29.7)
Rama-7 D	(-75.2,- 26.4)	(-147.8, 137.7)	(-79.9,128.1)	(72.6,164.1)	(4.7,-154.5)
Rama-8 S	(-73.5,- 50.8)	(-141.3,144.3)	(-160.0,-179.8)	(67.8,195.1)	(86.5,129)
Rama-9 G	(-123.6, 10.3)	(-84.8,-3.1)	(109.4,174.1)	(-38.8,13.4)	(127,-163.8)
6H:O-C- CA-CB	103.2	100.4	65.9	2.8	37.3
6H:C-CA -CB-CG	-68.9	48.9	57.2	-117.8	-126.1
6H: N-CA-C B-CG	54.9	178.3	-177.8	-123.4	-127.3
6H: CA-CB-C G-ND1	93.4	58.2	65.8	35.2	27.6
6H:CA-C B-CG-C D2	-100.3	-127.6	-108.3	27.3	8
6H:CD2 -CG-ND 1-CE1	170.3	-0.1	-6.23	170.4	176.53
6H: CB-CG- ND1-CE 1	1.62	175	178.8	-173.38	-177.18
6H: NE2-CE 1-ND1- CG	-0.45	0.2	8.22	-0.65	-8.67
6H: NE2-CD 2-CG-N D1	-2.12	0	2.58	-2.12	-4.7
6H: NE2-CD 2-CG-CB	-169.6	-174.5	177.2	4.9	13.2
6H: ND1-CE 1-NE2-C	-0.85	-0.25	-7.06	-0.6	6.21

10

20

30

40

50

D2					
6H: CG-CD2 -NE2-C E1	1.8	0.16	2.36	1.64	-0.56
7D:O-C- CA-CB	-94.9	87.9	68.9	177.2	-163.8
7D: C-CA-CB -CG	176.3	-51.2	-180	-132.5	-3.6
7D: N-CA-C B-CG	-63.3	63.3	-60.9	-126.6	-2.4
7D: CA-CB-C G-OD2	-33.8	113.3	149.6	-147.1	176.6
7D: CA-CB-C G-OD1	131.6	-70.8	-37.3	-157.6	168.9
8S: N-CA-C B-OG	-46.7	-163.2	-164	116.5	117.3
8S: C-CA-CB -OG	-170.5	76.4	69.2	95.1	120.3
8S: O-C-CA- CB	-109.7	84.1	125.8	166.2	124.5

10

20

30

【 0 3 9 5 】

【表 7】

表 4：環状アンサンブル、直鎖状アンサンブルおよび 2 M 4 J 線維アンサンブルの各残基の平均曲率値の表。曲率対残基インデックスが図 2 にプロットされている。

曲率	直鎖状	環状	2 M 4 J
6H	1.19	0.781	1.01
7D	0.99	1.41	1.03
8S	0.95	1.36	0.93
9G	1.40	1.31	0.86

40

【 0 3 9 6 】

実施例 3

立体配座拘束エピトープを含む環状化合物構築

シクロ (C G H D S G G) (配列番号 2) などの H D S G (配列番号 1) を含むペプチドは頭 - 尾環化することができる。

【 0 3 9 7 】

F m o c ベースの固相ペプチド合成などの既知の方法を単独で、または他の方法と組み合わせて用い、H D S G (配列番号 1) と、好ましくは 2 個、3 個もしくは 4 個のアミノ酸

50

および/またはPEG単位を含むリンカーとを含む、直鎖状ペプチドを合成することができる。例えばHamley(2014)[6]およびRobertsら(2012)[7](それぞれ参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているカップリング化学を用いて、PEG分子をN末端のアミン基に結合させることができる。直鎖状ペプチド化合物は、1)ペプチド+リンカーのアミノ末端とカルボキシ末端を共有結合させてペプチド結合を形成させること(例えば、主鎖の環化)、2)ペプチド+リンカー内のアミノ末端もしくはカルボキシ末端と側鎖を共有結合させること、または3)ペプチド+リンカー内の2つの側鎖を共有結合させることにより環化され得る。

【0398】

環状化合物内の結合は、すべて通常のペプチド結合であっても(ホモデティック環状ペプチド)、あるいはエステル結合、エーテル結合、アミド結合もしくはジスルフィド結合などの他のタイプの結合を含んでも(ヘテロデティック環状ペプチド)よい。

10

【0399】

ペプチドをN末端もしくはC末端またはペプチドの内側にある、例えばシステインおよびホモシステインを含めたチオール含有残基またはメルカプタン含有残基の酸化により環化させ得る。例えば、ペプチドに隣接する2つのシステイン残基を酸化させてジスルフィド結合を形成させ得る。用い得る酸化試薬としては、例えば、酸素(空気)、ジメチルスルホキシド、酸化グルタチオン、シスチン、塩化銅(II)、フェリシアン化カリウム、トリフルオロ酢酸タリウム(III)またはその他の酸化試薬、例えば当業者に公知であり当業者に公知の方法とともに使用し得る酸化試薬などが挙げられる。

20

【0400】

米国特許出願公開第2009/0215172号、米国特許出願公開第2010/0240865号、米国特許出願公開第2010/0137559号には環状ペプチド合成に関連する方法および組成物が記載されており、米国特許第7,569,541には環化の様々な方法が記載されている。国際公開第01/92466号およびAndreuら,1994,Methods in Molecular Biology 35:91-169にはその他の例が記載されている。

【0401】

より具体的には、システイン残基が隣接し、かつ/または挿入されているスペーサーを含むリンカーを付加することにより、HDSG(配列番号1)エピトープを含む環状ペプチドを構築することができる。ペプチドのN末端およびC末端に付加した非天然システイン残基の間でジスルフィド結合を形成させることにより、ペプチドを環状立体配座に構築することができる。また、N末端とC末端のアミノ酸の間でペプチド結合を形成させること(例えば、頭-尾環化)により、それを環状化合物に合成することができる。

30

【0402】

ペプチド合成を標準的な製造方法に従いCPC Scientific社(サニーベール、カリフォルニア州、米国)で実施する。

【0403】

例えば、HDSG(配列番号1)を含むペプチドのN末端およびC末端に付加したシステイン残基間のジスルフィド結合を用いて、拘束された環状立体配座の立体配座エピトープHDSG(配列番号1)を含むシクロ(CHDSGC)(配列番号12)環状ペプチドを構築することができる。2つの非天然システイン残基のうち1つをGHDSG(配列番号7)のC末端に、1つをN末端に付加した。この2つのシステインを制御された条件下で酸化してジスルフィド架橋を形成させる、または頭部と尾部を反応させてペプチド結合を生じさせる。

40

【0404】

上記の通り、AベータオリゴマーのHDSG(配列番号1)のアミノ酸側変化の立体配座および配向を模倣するように環状ペプチドの構造を設計した。

【0405】

シクロ(CHHDSGG)(配列番号2)

50

以下の方法（CPC Scientific社、サニーベール、カリフォルニア州）を用いてシクロ（CGHDSGG）（配列番号2）を合成した。標準的な従来のFmocベースの固相ペプチド合成により、保護された直鎖状ペプチドを2-クロロトリチルクロリド樹脂上で合成し、次いで、30%HFIP/DCMを用いて樹脂から切断した。低濃度のEDC・HCl/HOBt/DIEAのDMF溶液を用いることにより、保護された直鎖状ペプチドに対応する保護された環状ペプチドに環化した。保護された環状ペプチドをTFAにより脱保護して粗環状ペプチドを得、粗ペプチドをRP HPLCにより精製し、凍結乾燥後、純粋な環状ペプチドを得た。

【0406】

直鎖状ペプチドCGHDSGG（配列番号2）のアミド縮合によりシクロ（CGHDSGG）（配列番号2）を調製することができる。

10

【0407】

直鎖状化合物C-PEG2-HDSGG（配列番号28）のアミド縮合によりシクロ（C-PEG2-HDSGG）を調製することができる。

【0408】

直鎖状（CGHDSGG）を調製した（CPC Scientific社、サニーベール、カリフォルニア州）。標準的な従来のFmocベースの固相ペプチド合成により、保護された直鎖状ペプチドをFmoc-Gly-Wang樹脂上で合成し、次いで、保護されたペプチドをTFAにより切断して粗ペプチドを得、粗ペプチドをRP HPLCにより精製し、凍結乾燥後、純粋なペプチドを得、これを用いてBSAをコンジュゲートした。

20

【0409】

免疫原構築

環状化合物シクロ（CGHDSGG）（配列番号2）を上記の通りに合成し、次いでBSAおよび/またはKLHとコンジュゲートした（CPC Scientific社、サニーベール、カリフォルニア州）。PBS緩衝液に溶かしたSMCCによりBSAまたはKLHを再活性化し、次いで、純粋なペプチドをPBS緩衝液に溶かした溶液をコンジュゲーション混合物に加え、コンジュゲーション混合物を室温（RT）で2時間攪拌した。次いで、コンジュゲーション混合物を透析後に凍結乾燥させて、コンジュゲーション産物を得た。

【0410】

30

実施例4

抗体の作製および選択

立体配座拘束化合物、任意選択で環状化合物、例えばシクロ（CGHDSGG）（配列番号2）ペプチドなどのHDSG（配列番号1）を含む環状ペプチドなどとキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）とを結合させる。カナダ動物管理協会により承認されたプロトコルに従ったマウスモノクローナル抗体作製（ImmunoPrecise Antibodies社（ビクトリア、ブリティッシュコロンビア州、カナダ））のためにシクロペプチドを送る。BSAと結合した、抗体の作製に使用する立体配座ペプチドまたは関連ペプチド、例えばシクロ（CGHDSGG）（配列番号2）ペプチドを用いて、マウス血清をスクリーニングする。

40

【0411】

実施例6にさらに記載するように、シクロ（CGHDSGG）（配列番号2）を含む免疫原を用いてハイブリドーマを作製した。ELISAおよびSPRにより、本明細書に記載される直鎖状（未構造化）ペプチドよりもシクロ（CGHDSGG）（配列番号2）ペプチドと優先的に結合するハイブリドーマ上清をスクリーニングした。陽性IgG分泌クローンを大規模生産およびプロテインGを用いるさらなる精製に供する。

【0412】

実施例5

斑/線維との結合の有無の評価

新鮮な凍結ヒト脳切片または10%ホルマリンで固定した後の凍結ヒト脳切片で免疫組織

50

化学を実施することができる。過酸化水素の0.5%メタノール溶液を20分間用いて、内因性ペルオキシダーゼ活性を失活させることができる。pH6.0のクエン酸ナトリウムおよび25分間の蒸気加熱を用いて抗原回復を達成することができ、次いで室温(RT)で30分間冷却する。TBS中で5~7分間安定化させた後、切片を70%ギ酸によりRTで15分間処理し、次いでTBSで3×15分間洗浄する。加湿チャンバ内で無血清タンパク質ブロッキング試薬(Dako Canada社、ミシサガ、オンタリオ州、カナダ)と1時間インキュベートすることにより非特異的染色をブロックする。

【0413】

免疫染色には、本明細書に記載される抗体、陽性対照の6E10(1μg/ml)およびアイソタイプ対照のIgG1、IgG2aおよびIgG2b(1μg/ml、Abcam社)を一次抗体として用いる。切片を4で一晩インキュベートし、TBS-Tで3×5分間洗浄する。西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートした抗マウスIgG(1:1000、ECL社)を切片に添加し、45分間インキュベートし、次いでTBS-Tで3×5分間洗浄する。DAB発色試薬(Vector Laboratories社、バーリントン、オンタリオ州、カナダ)を加え、バックグラウンド染色に対して所望の標的レベルに達したとき、切片を蒸留水でリンスする。切片をマイヤーのヘマトキシリンで対比染色し、脱水し、カバーガラスをかけた。スライドを光学顕微鏡(Zeiss Axiovert 200M、Carl Zeiss Canada社、トロント、オンタリオ州、カナダ)下で検査し、Leica社のDC300デジタルカメラおよびソフトウェア(Leica Microsystems Canada社、リッチモンドヒル、オンタリオ州)を用いて代表的な画像を50倍、200倍および400倍の倍率で記録する。

【0414】

実施例6

方法および材料

免疫原

米国カリフォルニア州サニーベールのCPC Scientific社で環状ペプチドおよび直鎖状ペプチドを作製した。トリフルオロ酢酸対イオンプロトコルを用いてペプチドをKLH(免疫感作用)およびBSA(スクリーニング用)とコンジュゲートした。ペプチドを脱塩し、MSおよびHPLCにより確認し、純度95%であると判断された。ペプチドをIPA社に発送し、マウスを用いたモノクローナル抗体の作製に使用した。

【0415】

抗体

キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)と結合したシクロ(CGHDSSGG)(配列番号2)に対するハイブリドーマおよびモノクローナル抗体をいくつか作製した。

【0416】

50日齢の雌BALB/cマウス(Charles River Laboratories社、ケベック州)を免疫感作した。抗原を含有するアジュバントは含有しない一連の皮下水性注射剤を19日間にわたって投与した。環状ペプチド-KLHの0.5mg/ml無菌生理食塩水溶液の注射によりマウスを1匹当たり100μgのペプチドで免疫感作した。マウスをLab Products社の換気ラックシステムで飼育した。第19日、マウス全4匹を安楽死させ、ハイブリドーマ細胞系の作製用にリンパ球を回収した。

【0417】

融合/ハイブリドーマの発育

リンパ球を単離し、ポリエチレングリコール(PEG1500)の存在下でマウスSP2/0ミエローマ細胞と融合させた。融合した細胞をHAT選択を用いて培養した。この方法では、半固形メチルセルロース系HAT選択培地を用いてハイブリドーマ選択とクローン化とを1つの段階に組み合わせる。半固形培地上で単一細胞由来のハイブリドーマが増殖してモノクローナルコロニーを形成した。融合事象から10日後、得られたハイブリドーマクローンを96ウェル組織培養プレートに移し、中期対数増殖期に達するまで(5日)HT含有培地で増殖させた。

10

20

30

40

50

【 0 4 1 8 】

ハイブリドーマの解析（スクリーニング）

ハイブリドーマの組織培養上清を間接 E L I S A によりスクリーニング抗原（環状ペプチド - B S A ）（一次スクリーニング）で試験し、ヤギ抗 I g G / I g M （ H & L ） - H R P 二次抗体を用いて I g G 抗体および I g M 抗体の両方について探索し、T M B 基質で発色させた。このアッセイで 0 . 2 O D 超であったクローンを次の試験ラウンドに進めた。陽性培養物をスクリーニング抗原で再試験して分泌を確認し、無関係の抗原（ヒトトランスフェリン）で再試験して非特異的 m A b を除去し、偽陽性を除外した。抗体捕捉 E L I S A により目的とする全クローンにアイソタイピングを実施して、それらが I g G アイソタイプであるのか、または I g M アイソタイプであるのかを判定した。また、目的とする全クローンを間接 E L I S A により他の環状ペプチド - B S A コンジュゲートおよび直鎖状ペプチド - B S A コンジュゲートで試験して、交差反応性を評価した。

10

【 0 4 1 9 】

B S A とコンジュゲートしたシクロ（ C G H D S G G ）（配列番号 2 ）を用いた間接 E L I S A により、マウスハイブリドーマ抗体をスクリーニングした。

【 0 4 2 0 】

E L I S A 抗体スクリーニング

簡潔に述べれば、E L I S A プレートを 4 の炭酸塩コーティング緩衝液（p H 9 . 6 ）O / N 中 0 . 1 u g / ウェルのシクロ（ C G H D S G G ）（配列番号 2 ）コンジュゲート B S A 1 0 0 u L / ウェルでコートし、脱脂粉乳の 3 % P B S 溶液を用いて室温で 1 時間ブロックした。一次抗体：3 7 で振盪しながら 1 時間インキュベートした 1 0 0 u L / ウェルのハイブリドーマ上清。二次抗体：3 7 で 1 時間振盪した P B S - T w e e n 中 1 : 1 0 , 0 0 0 の 1 0 0 u L / ウェルのヤギ抗マウス I g G / I g M （ H + L ） - H R P 。全洗浄段階を P B S - T w e e n で 3 0 分間実施した。基質 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン（T M B ）を 5 0 u L / ウェルに加え、暗所で発色させ、等体積の 1 M H C l で停止させた。

20

【 0 4 2 1 】

さらなる試験のため陽性クローンを選択した。マウスハイブリドーマの陽性クローンを間接 E L I S A により、シクロ（ C G H D S G G ）（配列番号 2 ）コンジュゲート B S A およびヒトトランスフェリン（H T ）に対する反応性について試験した。プレートを 1 ）4 の炭酸塩コーティング緩衝液（p H 9 . 6 ）O / N 中 0 . 1 u g / ウェルのシクロ（ C G H D S G G ）コンジュゲート B S A （配列番号 2 ）1 0 0 u L / ウェル；または 2 ）3 7 の d H 2 O O / N 中 0 . 2 5 u g / ウェルの H T 抗原 5 0 u L / ウェルでコートした。一次抗体：3 7 で振盪しながら 1 時間インキュベートした 1 0 0 u L / ウェルのハイブリドーマ上清。二次抗体：3 7 で 1 時間振盪した P B S - T w e e n 中 1 0 0 u L / ウェルの 1 : 1 0 , 0 0 0 ヤギ抗マウス I g G / I g M （ H + L ） - H R P 。全洗浄段階を P B S - T w e e n で 3 0 分間実施した。基質 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン（T M B ）を 5 0 u L / ウェルに加え、暗所で発色させ、等体積の 1 M H C l で停止させた。

30

【 0 4 2 2 】

E L I S A によるシクロ C G H D S G G （配列番号 2 ）化合物と直鎖状 C G H D S G G （配列番号 2 ）化合物の選択性

E L I S A プレートを 1 ）4 の炭酸塩コーティング緩衝液（p H 9 . 6 ）O / N 中 0 . 1 u g / ウェルのシクロ（ C G H D S G G ）コンジュゲート B S A （配列番号 2 ）1 0 0 u L / ウェル；2 ）4 の炭酸塩コーティング緩衝液（p H 9 . 6 ）O / N 中 0 . 1 u g / ウェルの直鎖状 C G H D S G G コンジュゲート B S A （配列番号 2 ）1 0 0 u L / ウェル；または 3 ）4 の炭酸塩コーティング緩衝液（p H 9 . 6 ）O / N 中 0 . 1 u g / ウェルの陰性ペプチド 1 0 0 u L / ウェルでコートした。一次抗体：3 7 で振盪しながら 1 時間インキュベートした 1 0 0 u L / ウェルのハイブリドーマ上清。二次抗体：3 7 で 1 時間振盪した P B S - T w e e n 中 1 0 0 u L / ウェルの 1 : 1 0 , 0 0 0 ヤギ抗

40

50

マウス IgG / IgM (H + L) - HRP。全洗浄段階を PBS - Tween で 30 分間実施した。基質 TMB を 50 μ L / ウェルで加え、暗所で発色させ、等体積の 1 M HCl で停止させた。

【0423】

アイソタイピング

抗体捕捉実験を用いてハイブリドーマ抗体にアイソタイピングを実施した。捕捉プレートに pH 9.6 の炭酸塩コーティング緩衝液中、4 で一晩、100 μ L / ウェルの 1 : 10,000 ヤギ抗マウス IgG / IgM (H & L) 抗体でコートした。ブロッキング段階は用いなかった。一次抗体 (ハイブリドーマ上清) を加えた (100 μ g / mL)。二次抗体 : 37 で 1 時間振盪した PBS - Tween 中 100 μ L / ウェルの 1 : 5,000 ヤギ抗マウス IgG - HRP または 1 : 10,000 ヤギ抗マウス IgM μ - HRP。全洗浄段階を PBS - Tween で 30 分間実施した。基質 TMB を 50 μ L / ウェルで加え、暗所で発色させ、等体積の 1 M HCl で停止させた。

【0424】

SPR 結合アッセイ - 一次および二次スクリーニング

抗体と A ベータモノマーおよび A ベータオリゴマーとの結合に関する SPR 解析

A ベータモノマーおよび A ベータオリゴマーの調製 組換え A ベータ 40 および A ベータ 42 ペプチド (California Peptide 社、ソルトレイクシティ、ユタ州、米国) を氷冷ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) に溶かした。一晩蒸発させることにより HFIP を除去し、Speed Vac 遠心機で乾燥させた。モノマーの調製には、ペプチド薄膜を DMSO で戻して 5 mM とし、dH₂O でさらに 100 μ M に希釈し、直ちに使用した。5 mM の DMSO ペプチド溶液を無フェノールレッド F12 培地 (Life Technologies 社、バーリントン、オンタリオ州、カナダ) で希釈して最終濃度 100 μ M とすることによりオリゴマーを調製し、4 で 24 時間 ~ 7 日間インキュベートした。

【0425】

SPR 解析 高強度レーザー光および高速光学式走査を用いて結合相互作用をリアルタイムでモニターする分析用バイオセンサーである Molecular Affinity Screening System (MASS-1) (Sierra Sensors 社、ハンブルク、ドイツ) を用いて、全 SPR 測定を実施した。SPR 直接結合アッセイを用いて組織培養上清の一次スクリーニングを実施し、このアッセイでは、High Amine Capacity (HAC) センサーチップ (Sierra Sensors 社、ハンブルク、ドイツ) の個々のフローセル上に BSA コンジュゲートペプチド、A ベータ 42 モノマーおよび A ベータ 42 オリゴマーを共有結合で固定化し、表面に抗体を流した。二次スクリーニングでは、プロテイン G で精製した mAb を SPR 間接 (捕捉) 結合アッセイを用いて解析し、このアッセイでは、プロテイン A 誘導体化センサーチップ (Xantec Bioanalytics 社、デュッセルドルフ、ドイツデュッセルドルフ、ドイツ) 上に抗体を捕捉し、表面に A ベータ 40 モノマー、A ベータ 42 オリゴマー、可溶性脳抽出物および脳脊髄液を流した。SPR 直接結合アッセイで、HAC センサーチップの個々のフローセル上に A ベータ 42 モノマーおよび A ベータ 42 オリゴマーを共有結合で固定化し、精製 mAb を流すことにより抗体の特異性を検証した。

【0426】

可溶性脳抽出物および CSF 試料の SPR 解析

可溶性脳抽出物および CSF の調製 UBC Alzheimer's and Related Disorders Clinic で評価した患者からヒトの脳組織および CSF を採取した。推定 AD の臨床診断は NINCDS - AD RDA 基準 [5] に基づくものである。腰椎穿刺後 1 時間以内に CSF をポリプロピレンチューブに収集し、処理し、100 μ L ポリプロピレンバイアルに等分し、-80 で保管する。

【0427】

ホモジナイゼーション : ヒト脳組織試料の重量を測定し、次いで、脳組織の最終濃度が 2

10

20

30

40

50

0% (w/v) になるよう一定量の新鮮な氷冷 TBS (カナダケベック州ラヴァルの Roche Diagnostics 社の無 EDTA プロテアーゼインヒビターカクテルを添加したもの) に浸漬した。この緩衝液中で機械的プローブホモジナイザーを用いて組織をホモジナイズ (間に 30 秒の停止を挟んで 3 × 30 秒のパルス、いずれも氷上で実施) する。次いで、TBS 中でホモジナイズした試料を超遠心分離にかける (70,000 × g で 90 分)。上清を収集し、等分し、-80℃ で保管する。BCA タンパク質アッセイ (Pierce Biotechnology 社、ロックフォード、イリノイ州、米国) を用いて TBS ホモジネートのタンパク質濃度を求める。

【0428】

SPR 解析 AD 患者 4 例および同年齢の対照 4 例の脳抽出物ならびに AD 患者 9 例および同年齢の対照 9 例の CSF 試料をプールし解析した。プロテイン A 誘導体化センサーチップの別個のフローセル上に精製 mAb を捕捉し、表面に希釈試料を 180 秒間注入し、次いで、緩衝液で 120 秒間解離を実施し、表面を再生した。マウス対照 IgG 参照の表面結合およびアッセイ緩衝液の減算により結合応答を二重参照し、異なる試料のグループを比較した。

10

【0429】

A ベータモノマーとの結合の有無の評価

組織培養上清の一次スクリーニングでは、A ベータ 42 モノマーおよび A ベータ 42 オリゴマーを直接結合アッセイに用いた。二次スクリーニングでは、A ベータ 40 モノマーおよび A ベータ 42 オリゴマー、可溶性脳抽出物および CSF 試料を間接 (捕捉) 結合アッセイに用いた。

20

【0430】

一次スクリーニング

コグネイト環状ペプチドに対する抗体の結合の有無について組織培養上清をスクリーニングした。各試料を希釈し、固定化したペプチドおよび BSA 参照の表面に 120 秒間、二重反復で注入し、次いで、300 秒間の解離相にのみランニング緩衝液を注入した。解析サイクル毎に、センサーチップ表面を再生した。BSA 参照表面およびブランクランニング緩衝液注入から結合を減算することによりセンサグラムを二重参照し、解離相の結合応答報告点を収集した。

【0431】

30

オリゴマー結合アッセイ

次の合成 A ベータ 42 オリゴマーを上記の通りに作製および固定化し、抗体結合応答を解析した。A ベータ 42 オリゴマーに対する抗体結合応答を環状に対する結合応答と比較した。

【0432】

A ベータオリゴマーとの結合の検証。

A ベータ 42 オリゴマー結合をさらに検証および確認するため、抗体を共有結合で固定化し、次いで、市販の調製済みの安定な A ベータ 42 オリゴマー (SynAging 社、ヴァンドゥーヴル＝レ＝ナンシー、フランス) を表面に注入した。

【0433】

40

結果

ELISA 試験では、ハイブリドーマクローンの大部分がシクロペプチドと結合することがわかった。

【0434】

次のクローンをシクロ CGHDSGG (配列番号 2) 化合物および直鎖状 CGHDSGG (配列番号 2) 化合物に対する結合選択性について ELISA により試験した。複数のクローンが直鎖状 CGHDSGG コンジュゲート BSA (配列番号 2) よりも優先的にシクロ (CGHDSGG) コンジュゲート BSA (配列番号 2) と結合した。

【0435】

アイソタイピングでは、クローンの大部分が IgG1 クローン、IgG2a クローンおよ

50

び I g G 3 クローンを含めた I g G であることがわかった。I g M クローンおよび I g A クローンも複数同定されたが、それ以上追究しなかった。

【 0 4 3 6 】

表面プラズモン共鳴を用いた直接結合解析を実施して、配列番号 2 の環状ペプチドと結合する組織培養上清中の抗体についてスクリーニングした。

【 0 4 3 7 】

図 1 4 は、直接結合アッセイの結果および E L I S A の結果をプロットしたものであり、直接結合の結果と E L I S A の結果との間に相関があることを示している。

【 0 4 3 8 】

上記の通りに調製した環状ペプチド、直鎖状ペプチド、A ベータ 1 ~ 4 2 モノマーおよび A ベータ 1 ~ 4 2 オリゴマーとの結合能についてクローンを再試験した。上記の S P R を用いて結合アッセイを実施した（直接結合アッセイ）。表 5 に示すように、実施した結合アッセイに基づきクローンをいくつか選択した。

【 0 4 3 9 】

選択したクローンは I g G m A b であった。一次スクリーニングの負の数は結合がみられなかった（例えば、アイソタイプ対照未満であった）ことを示している。

【 0 4 4 0 】

【表 8】

表 5

303

	環 状 ペ プ チ ド (RU)	直 鎖 状 ペ プ チ ド (RU)	Aβ42 モ ノ マ ー (RU)	Aβ42 オリゴ マー (RU)
1B4	136.2	-0.1	56.5	109
2B10	171.9	-6.5	-4.1	69.8
3C2	74.9	-2.9	1.9	116.2
3C5	790.4	795.2	7.8	59
5E10	1334.9	35.7	8.2	60.2
6F1	23.4	-8.7	-11.6	77.9
8B2	310.1	7.6	-2.9	49.4
8E7	386.1	-4.2	-25.1	54.2
9E5	253.5	-3.9	-20.1	50.8
10B9	17	-1.5	-23.2	61.9
10B10	235.2	-4.6	-40.8	45.8
10G2	397.6	-0.7	61	109.8
11F10	148.8	-1.5	8.9	66.9

【 0 4 4 1 】

E L I S A プレスクリーニング

ハイブリドーマ上清の E L I S A プレスクリーニングにより、直鎖状ペプチドと比較して環状ペプチドとの結合の増大を示すクローンを特定した。そのクローンの一部は K L H - エピトープリンカーペプチドに対して反応性であった。これらはさらなる検討から除外した。本明細書に記載されるアイソタイプング法を用いて、クローンの大部分が I g G アイソタイプであることが明らかになった。

【 0 4 4 2 】

表面プラズモン共鳴により測定する直接結合 - 一次スクリーニング

表面プラズモン共鳴を用いて、抗体クローンを含有する組織培養上清を環状ペプチド、直鎖状ペプチド、A ベータオリゴマーおよび A ベータモノマーとの直接結合について試験した。

【 0 4 4 3 】

一次スクリーニングの結果を図 1 3 に示す。パネル A は環状ペプチドおよび直鎖状ペプチ

ドとの結合を示している。パネル B は A ベータオリゴマーおよび A ベータモノマーとの結合を示している。環状ペプチドに対しては、いくつかのクローンが反応性の増大を示し、直鎖状ペプチドに対しては、いずれのクローンも反応性が最小限であるか、または反応性を全く示さない。全体的に A ベータオリゴマー結合に対する選択性がみられる。モノマー反応性は、大部分のエピトープおよび大部分のクローンがほぼ 0 または 0 未満である。

【0444】

図 15 に、選択したクローンの結合プロファイルを比較して示す。表面プラズモン共鳴を用いて、環状ペプチド（構造化）、直鎖状ペプチド（非構造化）、A ベータモノマーおよび A ベータオリゴマーにおける特定のエピトープに対する直接結合について各クローンを評価する。アスタリスクで示される対照には、非構造化エピトープ（例えば、直鎖状エピトープ）に対して優先的に反応性を示すクローンを選択した。

10

【0445】

実施例 7

二次スクリーニング

免疫組織化学

固定も抗原回復も実施していない凍結ヒト脳切片に免疫組織化学を実施した。加湿チャンバ内で無血清タンパク質ブロッキング試薬（Dako Canada 社、ミシサガ、オンタリオ州、カナダ）と 1 時間インキュベートすることにより非特異的結合をブロックした。免疫染色には以下の一次抗体を使用した：マウスモノクローナルアイソタイプ対照 IgG 1、IgG 2a および IgG 2b ならびに抗アミロイド β E10（以上、Biolegend 社から購入）ならびにシクロペプチドに対して反応性を示す選択した精製クローン。いずれの抗体も $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で使用した。切片を室温で 1 時間インキュベートし、TBS-T で 3×5 分間洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートした抗マウス IgG（1:1000、ECL 社）を切片に添加し、45 分間インキュベートし、次いで TBS-T で 3×5 分間洗浄した。DAB 発色試薬（Vector Laboratories 社、バーリントン、オンタリオ州、カナダ）を加え、バックグランド染色に対して所望の標的レベルに達したとき、切片を蒸留水でリンスした。切片をマイヤーのヘマトキシリンで対比染色し、脱水し、カバーガラスをかけた。スライドを光学顕微鏡（Zeiss Axiovert 200M、Carl Zeiss Canada 社、トロント、オンタリオ州、カナダ）下で検査し、Leica 社の DC300 デジタルカメラおよびソフトウェア（Leica Microsystems Canada 社、リッチモンドヒル、オンタリオ州）を用いて代表的な画像を 20 倍および 40 倍の倍率で記録した。Adobe Photoshop で Levels Auto Correction を用いて画像を最適化した。

20

30

【0446】

CSF および脳抽出物

UBC の Clinical Research Ethics Board（C04-0595）から承認を受け、メリーランド大学の Brain and Tissue Bank からヒト脳組織を入手した。UBC Hospital Clinic for Alzheimer's and Related Disorders で評価した患者から CSF を採取した。この試験は UBC の Clinical Research Ethics Board により承認を受けたものであり、CSF 試料を収集する前に参加者または法律上の近親者から書面による同意を得た。推定 AD の臨床診断は NINCDS-ADRD 基準に基づくものとした。腰椎穿刺後 1 時間以内に CSF をポリプロピレンチューブに収集し、処理し、 $100 \mu\text{L}$ ポリプロピレンバイアルに等分し、 -80°C で保管した。

40

【0447】

ホモジナイゼーション：ヒト脳組織試料の重量を測定し、次いで、脳組織の最終濃度が 20%（w/v）になるよう一定量の新鮮な氷冷 TBS および Roche Diagnostics 社（ラヴェル、ケベック州、カナダ）の無 EDTA プロテアーゼインヒビターカクテルに浸漬した。この緩衝液中で機械的プローブホモジナイザーを用いて組織をホモジ

50

ナイズ（間に30秒の停止を挟んで3×30秒のパルス、いずれも氷上で実施）した。次いで、TBS中でホモジナイズした試料を超遠心分離にかけた（70,000×gで90分）。上清を収集し、等分し、-80℃で保管した。BCAタンパク質アッセイ（Pierce Biotechnology社、ロックフォード、イリノイ州、米国）を用いてTBSホモジネートのタンパク質濃度を求めた。

【0448】

CSF：ADを有するドナー9例およびADを有さないドナー9例からCSFをプールした。精製IgGを全抗体とも30マイクログラム/mlの濃度で用いて、試料をSPRにより解析した。マウスIgGを抗体対照として使用し、いずれの実験も少なくとも2回反復した。

【0449】

抗体6E10を用いてCSFおよび脳抽出物での陽性結合を確認した。

【0450】

SPR解析：AD患者の脳抽出物4例および同年齢の対照の脳抽出物4例をプールし解析した。TBS中でホモジナイズした脳試料には前頭皮質のブロードマン第9野が含まれていた。いずれの実験も、高強度レーザー光および高速光学式走査を用いて結合相互作用をリアルタイムでモニターする分析用バイオセンサーである、実施例6に記載のMolecular Affinity Screening System (MASS-1) (Sierra Sensors社、ハンブルク、ドイツ)を用いて実施した。本明細書に記載されるシクロペプチドに対して作製した精製抗体をプロテインA誘導体化センサーチップの別個のフローセル上に捕捉し、表面に希釈試料を180秒間注入し、次いで、緩衝液で120秒間解離を実施し、表面を再生した。マウス対照IgG参照の表面結合およびアッセイ緩衝液の減算により結合応答を二重参照し、異なる試料のグループを比較した。

【0451】

結果

CSF脳抽出物および免疫組織化学

いくつかのクローンをCSF、可溶性脳抽出物中でのAβとの結合能について試験し、死体AD脳の組織試料を表6に示す。表6では陽性度がプラス印の数により示されている。

【0452】

表6および表7は、選択したクローンが本明細書に記載されるSPRによる測定でモノマーよりもオリゴマーに対して結合選択性を有することのデータとなる。

【0453】

表6にはIHCの結果もまとめてあり、ここでは、「+/-」は、アイソタイプ対照と類似した染色またはアイソタイプ対照と異なる染色であるが明確な斑形態はみられないことを表す。

【0454】

6E10抗体でみられる陽性斑染色と比較して、クローン25-1B4では新鮮な凍結切片上に斑染色がみられない例を図16に示す。

【0455】

HDSG（配列番号1）を含むシクロペプチドに対して生じさせた抗体が、モノマーよりもAβオリゴマーと優先的に結合し、AD患者の脳抽出物および/またはCSF中のAβとも優先的に結合することを図17に示す。

【0456】

表6、7ならびに図16および17に示されるように、HDSG（配列番号1）を含むシクロペプチドに対して生じさせた抗体は、脳抽出物および/またはCSF中のAβと結合したが、SPRではモノマーとあまり結合せず、IHCによる斑線維とあまり結合しなかった。

【0457】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 6：結合特性のまとめ

表 6					
	クローン 番号	オリゴマー ／モノマー	CSF AD/非 AD	脳抽出物 AD/非 AD	IHC - 斑 染 色
シ ク ロ (CGHDSGG) (配列番号 2)	25 (1B4)	+++	+++	+	-
	28 (3C5)	+	-	++	+
	26	++	-	++	-
	30	+	-	++	N/A

* スコアリングは同じ試料カテゴリーで他のクローンに対して相対的なものである。

【0458】

【表 10】

表 7. モノマー結合を減算した A ベータオリゴマー結合 RU 値

被験クローン	303-3C5
RU	227.7

【0459】

実施例 8

合成オリゴマー結合

共有結合で固定化した抗体との結合について市販の調製済み合成アミロイドベータオリゴマー（SynAging 社、ヴァンドゥーヴル＝レ＝ナンシー）の連続 2 倍希釈物（7.8 nM ~ 2000 nM）を試験した。対照抗体 mAb 6E10 の結果を図 18A に示し、マウス対照 IgG の結果を図 18B に示す。シクロ（CGHDSGG）（配列番号 2）に対して生じさせた抗体を用いた結果を図 18C に示す。

【0460】

実施例 9

ホルマリン固定組織での免疫組織化学

シクロ（CGHDSGG）（配列番号 2）に対して生じさせた抗体を用いてヒト脳組織を評価した。患者はそれまでに、（i）老人斑および神経原線維濃縮体を示すビルショウスキー銀法、（ii）アミロイドを示すコンゴレッドならびに（iii）濃縮体を示し老人斑が「神経突起性」であることを確認するタウ免疫組織化学法の 3 部よりなる方法でアルツハイマー病であることが特徴付けられ診断されていた。この組織を用いて、選択したモノクローナル抗体クローンの斑反応性を試験した。脳組織を 10% 緩衝ホルマリンで数日間固定し、Sakura VIP 組織処理装置でパラフィン処理した。組織切片にマイクロ波による抗原回復（AR）を実施するか、または実施せずに、1 μg/ml の抗体で探索した。陽性対照として、汎アミロイドベータ反応性抗体 6E10 を、選択した抗体クローンと同時に含めた。抗体を抗体希釈剤（Ventana 社）で希釈し、OptiVi

ew DAB (Ventana社)で発色させた。Ventana Benchmark XT IHC染色装置で染色を実施した。Olympus BX45顕微鏡で画像を取得した。画像は神経病理学の専門知識を有する専門の病理学者が盲検的に解析した。

【0461】

下の表8に示されるように、固定組織を用いると、被験抗体は抗原回復の有無を問わず、老人斑アミロイドの特異的染色が陰性であった。陽性対照には6E10を用いた。

【0462】

【表11】

表8

エピトープ	被験抗体	老人斑アミロイドの特異的染色による有力な証拠	
		AR無し	AR有り
303	25	陰性	陰性
	28	陰性	陰性
	6E10	強い陽性	強い陽性
陽性対照			

10

【0463】

実施例10

オリゴマー伝播の阻害

チオフラビンT (ThT) 結合アッセイを用いてアミロイドベータ (A β) 凝集の伝播に対する抗体の効果を検討することにより、その生物学的機能を*in vitro*で試験した。A β 凝集は、予め形成された小さいA β オリゴマーの核によって誘導され、この核を介して伝播し、単量体A β から可溶性オリゴマー、次いで不溶性線維への全過程には同時に、ベータシート形成の増大が伴う。このことはベンゾチアゾール塩のThTによってモニターすることができ、ThTがベータシートに富む構造に結合すると、その励起および発光の最大値がそれぞれ385nmから450nmおよび445nmから482nmに遷移し、それにより蛍光が増大する。簡潔に述べれば、A β 1~42 (Bachem Americas社、トーランス、カリフォルニア州)を可溶化し、超音波処理し、トリス-EDTA緩衝液 (pH7.4)で希釈し、黒色の96ウェルマイクロタイタープレート (Greiner Bio-One社、モンロー、ノースカロライナ州)のウェルに加え、これに等体積のシクロペプチドに対する抗体または無関係のマウスIgG抗体アイソタイプ対照を加え、A β 1~42ペプチドと抗体のモル比を1:5とした。ThTを加え、プレートを室温で24時間インキュベートし、1時間毎にWallac Victor 3 v1420 Multilabel Counter (PerkinElmer社、ウォルサム、マサチューセッツ州)を用いてThT蛍光を測定し記録した。全ウェルからバックグラウンド緩衝液の蛍光読取り値を減算し、さらに、対応するウェルから抗体単独のウェルの読取り値を減算した。

20

30

【0464】

図19に示されるように、ThT蛍光によりモニターしたA β 42凝集は、蛍光が最小である最初の遅滞期、蛍光が急激に増大する対数期および最後にA β 分子種が平衡状態になり蛍光の増大がみられないプラトー期を特徴とするS字形を示した。A β 42と無関係のマウス抗体との共インキュベーションでは、凝集過程に対する有意な効果が全くみられなかった。これに対し、A β 42と被験抗体との共インキュベーションでは、凝集過程のいずれの期も阻害された。図19には抗体クローン25 (1B4; IgG2aアイソタイプ)で得られた結果が示されている。ThT凝集アッセイは、ADの病理発生に極めて重要なA β 伝播およびモノマー、オリゴマー、前原線維および線維からのA β 凝集の*in vivo*の生物物理学的/生化学的段階を模倣するものであることから、シクロCGHDSGGに対して生じさせた抗体はこの過程を完全に打ち消す可能性を秘めている。IgG2aを用いて実施したアイソタイプ対照では阻害はみられなかった。

40

【0465】

50

実施例 1 1

アルツハイマー病の免疫療法に最適なプロファイルの達成：毒性 A ベータオリゴマーに特異的な抗体の合理的作製

目的：毒性アミロイド オリゴマー（A β O）に特異的な抗体を作製すること

背景：現時点での証拠から、A β O の伝播性プリオン様株は、モノマーおよび線維とは対照的に、ニューロンに対して優先的に毒性を示し、アルツハイマー病（AD）のタウ病態を誘発することが示唆される。さらに、臨床試験では、用量制限有害作用が A β 線維認識と関係があることがわかっている。これらの観察結果から、安全性および有効性のためには毒性 A β O の特異的な中和が望ましいものであり得ることが示唆される。

【0466】

設計 / 方法：本明細書に記載されるように、標準力場による分子動力学を用いて Protein Data Base に蓄積されている A β 線維の原子レベルの構造を攪乱するコンピュータシミュレーションを用いた。新生前原線維またはオリゴマーではわずかに安定な領域が露出する可能性が高いという仮説を立てた。オリゴマーにおいて提示される場合とモノマーまたは線維において提示される場合の抗原性プロファイルの差を定量化するクラスタリング解析、曲率、溶媒への露出、溶解度、二面角分布およびラマチャンドラン角分布をすべて用いて予測エピトープの立体配座特性を特徴付けた。局所的な A β O 立体配座を模倣し得る環状フォーマットで候補ペプチドエピトープを合成し、担体タンパク質とコンジュゲートし、マウスでのモノクローナル抗体作製に用いた。精製した抗体を SPR および免疫組織化学によりスクリーニングした。

【0467】

結果：

コグネイト構造化ペプチドおよび合成 A β O を認識することが可能であり、非構造化ペプチド、リンカーペプチドまたは A β モノマーとはほとんどまたは全く結合しないことに基づき、5 種類の予測エピトープに対する IgG クローンを 66 種類選択し精製した。さらなるスクリーニングにより、対照と比較して AD 患者の CSF および脳抽出物中の天然の可溶性 A β O と優先的に結合する抗体を特定した。AD 脳の免疫組織化学的解析により、斑と反応しない抗体クローンを選択することができた。

【0468】

結論：コンピュータにより特定した A β O エピトープにより、天然の AD A β O と選択的に結合しモノマーにも線維にも有意な交差反応性を示さないという所望の標的プロファイルを有する抗体を作製することができた。

【0469】

実施例 1 2

毒性阻害アッセイ

シクロペプチドに対して生じさせた抗体による A ベータ 42 オリゴマーの毒性の阻害をラット一次皮質ニューロンアッセイで試験することができる。

【0470】

抗体および対照 IgG をそれぞれ 2 mg / mL などの濃度に調節する。様々なモル比の A ベータオリゴマーと抗体を溶媒対照、A ベータオリゴマー単独および神経保護ペプチドのヒューマニン（HNG）などの陽性対照とともに試験する。

【0471】

例示的設定を表 9 に示す。

【0472】

室温で 10 分間ブレインキュベートした後、体積を培地で 840 マイクロリットルに調節する。この溶液を 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートする。次いで、溶液を一次皮質ニューロンに直接添加し、細胞を 24 時間インキュベートする。MTT 試験を用いて細胞生存率を求めることができる。

【0473】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 9

AβO/AB モル比	AβO (μL)	AβO (μM)	AB (μM)	AB (μL)	培地 (μL)	最終体 積 (μL)
5/1	1.68	4.2	0.84	12.73	185.6	200
1/1	1.68	4.2	4.20	63.64	134.7	200
1/2	1.68	4.2	8.4	127.27	71.1	200

10

AβO希釈標準溶液：2.2mg/mL-500μM

対照溶媒：オリゴマー緩衝液1.68μL+PBS 127.3μL+培地711μL

対照AβO：AβO 1.68μL+PBS 127.3μL+培地711μL

対照HNG：AβO 1.68μL+HNG 8.4μL（最終100nM）+PBS 127.3μL+培地702.6μL

【0 4 7 4】

この試験は、実施例 1 に記載した集団座標法により予測された他のエピトープを含む他のシクロペプチドに対して生じさせた他の抗体を用いて実施したものである。これらの他のエピトープで A ベータオリゴマー毒性の阻害が観察された。シクロ (C G H D S G G) (配列番号 2) に対して生じさせた抗体を試験する。

20

【0 4 7 5】

実施例 1 3

i n v i v o 毒性阻害アッセイ

シクロペプチドに対して生じさせた抗体による A ベータ 4 2 オリゴマーの毒性の阻害をマウス行動試験で i n v i v o で試験することができる。

【0 4 7 6】

マウスの脳室内 (I C V) に注射する前に、抗体およびアイソタイプ対照をそれぞれ A ベータ 4 2 オリゴマーと 2 以上の様々なモル比で予め混合する。対照群には、溶媒単独を注射するマウス、オリゴマー単独を注射するマウス、抗体単独を注射するマウスおよび神経保護ペプチドのヒューマニンなどの陽性対照を注射するマウスを含める。あるいは、抗体をオリゴマーの I C V 注射前、注射時および / または注射後に全身投与してもよい。オリゴマーの I C V 注射から約 4 ~ 7 日後に開始して、マウス空間認識試験 (S R T)、Y 迷路試験、モーリス水迷路モデルおよび新奇物体認識モデル (N O R) などの学習および記憶に関する行動試験で認知を評価する。

30

【0 4 7 7】

マウス空間認識試験 (S R T) は、海馬機能の尺度である地理的記憶を評価するものである (S y n A g i n g 社)。このモデルでは 2 チャンバの装置を使用し、この装置のチャンバは形状、模様および色が異なっている (すなわち、地理的差)。チャンバは透明な P l e x i g l a s s 製の廊下で繋がっている。最初に個々のマウスを探索期の 5 分間、一方のチャンバにのみアクセスできる装置の中に入れておく。次いで、マウスをホームケージに 3 0 分間戻し、「選択」期の 5 分間、再び装置の中に入れ、その間、マウスは両方のチャンバにアクセスできる。正常な認知機能を有するマウスは前回探索したチャンバを記憶しており、新規なチャンバで費やす時間の方が長い。D I = (T N - T F) / (T N + T F) で識別指数 (D I) を算出し、式中、T N は新規なチャンバで費やした時間の量であり、T F は馴染みのあるチャンバで費やす時間の量である。毒性 A ベータオリゴマーにより D I の低下が起こるが、ヒューマニン陽性対照により一部レスキューされ得る。I C V 注射後の様々な時間におけるこの試験の成績を用いて、シクロペプチドに対して生じさせた抗体が A ベータオリゴマー毒性を i n v i v o で阻害する可能性を評価することが

40

50

できる。

【0478】

Y迷路試験 (SynAging社) は、主として前頭前皮質 (作業記憶) および海馬 (空間構成要素) が仲介する空間作業記憶の試験である。マウスが2本の腕を探索することができるY字形の迷路の中にマウスを置く。短期記憶が無傷なマウスは連続試行で交互に2本の腕に行く。毒性AベータオリゴマーをICV注射したマウスは認知に障害がみられ、ランダム値50% (これに対し正常個体は約70%) 付近の交互のランダム行動を示す。この障害は、コリンエステラーゼ阻害剤ドネペジル (Aricept) またはヒューマニンによりそれぞれ部分的または全面的に正常に戻る。この試験により、被験抗体のAベータオリゴマー毒性に対する防御活性に関してまた別のin vivo評価ができる。

10

【0479】

モリス水迷路はまた別の広く認められている認知モデルであり、主として海馬機能に依存する空間学習および長期地理的記憶を検討するものである (SynAging社)。マウスを複数回の試行で、不透明な水面の下に隠したプラットフォームを見つけるよう訓練する。プラットフォームの位置の想起に関するマウスの学習成績は、視覚的な手掛かりおよび記録したビデオに基づく。マウスを水に放ってからプラットフォームを見つけるまでの時間は着実に短縮され、これをマウスの学習速度とし、複数日にわたって測定する。認知が正常なマウスでは、プラットフォームを見つけるのに必要な時間が連日短縮される (学習)。長期記憶の解析には、訓練後に試験を複数日反復する。つまり、プラットフォームを取り去り、以前のプラットフォームの位置の上を横切る回数または最初に横切るまでの時間を長期記憶を評価する尺度として用いる。毒性AベータオリゴマーをICV注射したマウスは、学習および長期記憶の両方に欠陥がみられ、被験抗体の防御活性を評価するためのモデルとなる。

20

【0480】

新奇物体認識 (NOR) モデルは、新奇な物体を既知の物体より有意に長い時間をかけて調べるといってげっ歯類の正常な行動を利用するものであり、この行動は主として嗅周皮質機能に依存する (SynAging社)。習得試行でマウスまたはラットに2つの同一の物体を探索させる。短時間の試行間隔の後、一方の物体を新奇な物体に置き換える。動物を活動領域に戻し、各物体を能動的に探索して費やした時間を記録する。正常なげっ歯類は馴染みのある物体を思い出し、新奇な物体の方の探索に有意に長い時間を費やす。これに対し、Aベータオリゴマー処置したげっ歯類は明確な認知障害を示し、「馴染みのある」物体と「新奇な」物体の両方の探索に同程度の時間を費やす。これは、既知の臨床認知機能改善薬 (例えば、ドネペジル) により一時的に正常に戻ることができる。NOR試験を縦断研究で複数回実施して、被験抗体の認知に対する潜在的な有益性を評価することができる。

30

【0481】

行動試験に加え、脳組織を収集し、シナプスマーカー (PSD95、SNAP25、シナプトフィジン) および炎症マーカー (IL-1ベータ) のレベルを解析することができる。オリゴマーのICV注射から約14日後にマウスを殺し、生理食塩水を灌流する。海馬を収集し、急速凍結し、解析まで-80で保管する。ホモジナイズした試料のタンパク質濃度をBCAにより求める。ELISAキット (Cloud-Clone社、米国) を用いてシナプスマーカーの濃度を求める。シナプスマーカーは通常、Aベータオリゴマーを注射したマウスで25~30%減少し、ヒューマニン陽性対照により90~100%に回復する。IL-1ベータ炎症性マーカーの濃度は、Aベータオリゴマーを注射したマウスで約3倍になり、この増大はヒューマニンによって大幅に抑えられる。これらのアッセイは、被験抗体の防御活性に関する分子レベルでのまた別の尺度となる。

40

【0482】

実施例14

in vivo伝播阻害アッセイ

Aベータ毒性オリゴマーのin vivoの伝播およびそれに関連する病態を様々なアル

50

ツハイマー病（ＡＤ）げっ歯類モデルで研究することができる。例えば、ヒトＡＰＰのトランスジェニックマウス（例えば、ＡＰＰ２３マウス）またはヒトＡＰＰとＰＳＥＮ１のトランスジェニックマウス（ＡＰＰＰＳ１マウス）は高レベルのＡベータを発現し、加齢とともに炎症および神経損傷を伴うアミロイド沈着が徐々にみられるようになる。オリゴマー含有脳抽出物の脳内接種によりこの過程を大幅に加速させることができる（１３、１４）。これらのモデルは、脳内または全身に投与した被験抗体によるＡベータオリゴマー伝播の阻害を研究するためのシステムとなる。

【０４８３】

実施例１５

ＣＤＲシーケンシング

ＩｇＧ２Ａ重鎖とカッパ軽鎖とを有することが明らかになったクローン２５（３０３－２５）を重鎖および軽鎖のＣＤＲおよび可変領域に選択した。

【０４８４】

５'ＲＡＣＥならびに適切なマウス免疫グロブリンの重鎖（ＩｇＧ１／ＩｇＧ３／ＩｇＧ２Ａ）および軽鎖（カッパ）の可変領域配列を増幅する遺伝子特異的逆方向プライマーを用いてＲＴ－ＰＣＲを実施した。

【０４８５】

シーケンシング用に特異的バンドを切り取ってｐＣＲ－Ｂｌｕｎｔ　ＩＩ－ＴＯＰＯベクターにクローン化し、構築物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）に形質転換した。

【０４８６】

各鎖について少なくとも８種類のクローンを選定し、シーケンシングの前に増幅領域の有無についてＰＣＲでスクリーニングした。選択したＰＣＲ陽性クローンにシーケンシングを実施した。

【０４８７】

ＣＤＲ配列を表１０に記載する。重鎖および軽鎖の可変部分のコンセンサスＤＮＡ配列およびタンパク質配列を表１１に記載する。

【０４８８】

【表１３】

表１０

鎖	ＣＤＲ	配列	配列番号
重鎖	ＣＤＲ-H1	GYTFTSYW	17
	ＣＤＲ-H2	IDPSDSQT	18
	ＣＤＲ-H3	SRGGY	19
軽鎖	ＣＤＲ-L1	QDINNY	20
	ＣＤＲ-L2	YTS	21
	ＣＤＲ-L3	LQYDNLWT	22

【０４８９】

10

20

30

40

50

【表 14】

表 11

可変領域のコンセンサスDNA配列および翻訳タンパク質配列。相補性決定領域（CDR）にはIMTG/LIGM-DBに従って下線が施されている。

アイソタイプ	コンセンサス DNA 配列	タンパク質配列
IgG2a 配列番号 23、24	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGC AACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAACTGC AGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCT TCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCT <u>GGCTACAC</u> <u>CTTCACCAGCTACTGGAT</u> GAACTGGGTGAAGCAGA GGCCTGGACAAGGCCTTGAATGGATTGGTATG <u>ATT</u> <u>GATCCTTCAGACAGTCAA</u> ACTCACTACAATCAAAT GTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAAT CCTCCAGCACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTG ACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT <u>TCAAG</u> <u>AGGGGGCTAC</u> TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAG TCTCCTCA	MGWSCIIILFLVA TATGVHSQVQLQ QPGAELVRPGAS VKLSCKAS <u>GYTF</u> <u>TSYWMNWVKQRP</u> GQGLEWIGM <u>IDP</u> <u>SDSQ</u> THYNQMFK DKATLTVDKSSS TAYLQLSSLTSE DSAVYYC <u>SRGGY</u> WGQGTTLTVSS
カッパ 配列番号 25、26	ATGAGACCGTCTATTCAGTTCCTGGGGCTCTTGTT GTTCTGGCTTCATGGTGCTCAGTGTGACATCCAGA TGACACAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTCTG GGAGGCAAAGTCACCATCACTTGCAAGGCAAGC <u>CA</u> <u>AGACATTAACA</u> ACTATATAGCTTGGTACCAACACA AGCCTGGAAAAGGTCCTAGGCAGCTCATATAT <u>TAC</u> <u>ACATCT</u> ACATTGCAGCCAGGCATCCCATCAAGGTT CAGTGGAAAGTGGGTCTGGGAGAGATTATTCCTTCA CCATCAGCGACCTGGAGCCTGAAGATATTGCAACT TATTATTGT <u>CTACAGTATGATAATCTGTGGACG</u> TT CGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	MRPSIQFLGLLL FWLHGAQCDIQM TQSPSSLSASLG GKVTITCKAS <u>QD</u> <u>INNY</u> IAWYQHQP GKGPRQLIY <u>YTS</u> TLQPGIPSRFSG SGSGRDYSFTIS DLEPEDIATYYC <u>LQYDNLWT</u> FGGG TKLEIK

【0490】

10

20

30

40

50

【表 1 5】

表 1 2. A ベータ「エピトープ」配列およびリンカーを有する選択した A ベータ配列

HDSG (配列番号1)

CGHDSGG、シクロ(CGHDSGG) (配列番号2)

HDSGY (配列番号4)

RHDSG (配列番号5)

RHDS (配列番号6)

GHDSG (配列番号7)

GHDSGG (配列番号8)

GGHDSGG (配列番号9)

GHDSGGG (配列番号10)

HDSGYE (配列番号11)

CGHDSGGC (配列番号12)

RHDSGY (配列番号13)

DSGY (配列番号14)

DSGYEV (配列番号15)

FRHDSG (配列番号16)

シクロ(CGHDSG-PEG2);CGHDSG-PEG2 (配列番号27)

シクロ(C-PEG2-HDSGG);C-PEG2-HDSGG (配列番号28)

10

20

【0 4 9 1】

【表 1 6】

表 1 3

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (配列番号3)

【0 4 9 2】

ここまで、現時点で好ましい例であると考えるものに関して本願を記載してきたが、本願は本開示の例に限定されないことを理解するべきである。これとは逆に、本願は、添付の請求項の趣旨および範囲に含まれる様々な改変および同等の構成を包含するものとする。

【0 4 9 3】

刊行物、特許および特許出願はいずれも、個々の刊行物、特許または特許出願が具体的かつ個別にその全体が参照により組み込まれることが明記された場合と同じように、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。特に、例えば表またはその他の箇所に記載されるアクセッション番号および/またはバイオマーカー配列(例えば、タンパク質および/または核酸)を含めた本明細書に記載される各アクセッション番号に関連する配列は、その全体が参照により組み込まれる。

30

【0 4 9 4】

請求項の範囲は、好ましい実施形態および実施例によって限定されるべきではなく、記載全体と一致する最も広い解釈がなされるべきである。

【0 4 9 5】

(本明細書で参照される参考文献の引用)

[1] Gabriela A.N. Crespi, Stefan J. Hermans, Michael W. Parker, and Luke A. Miles. Molecular basis for mid-region amyloid-b capture by leading Alzheimer's disease immunotherapies SCIENTIFIC REPORTS | 5:9649, 2015 | DOI:10.1038/srep09649

[2] Vincent J. Hilser and Ernesto Freire. Structure-based calculation of the equilibrium folding pathway of proteins. correlati

40

50

on with hydrogen exchange protection factors. *J. Mol. Biol.*, 262:756-772, 1996. The COR EX approach.

[3] Samuel I. A. Cohen, Sara Linse, Leila M. Lusheshi, Erik Hellstrand, Duncan A. White, Luke Rajah, Daniel E. Otzen, Michele Vendruscolo, Christopher M. Dobson, and Tuomas P. J. Knowles. Proliferation of amyloid-42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(24):9758-9763, 2013.

10

[4] Pietro Sormanni, Francesco A. Aprile, and Michele Vendruscolo. The camsol method of rational design of protein mutants with enhanced solubility. *Journal of Molecular Biology*, 427(2):478-490, 2015.

[5] Deborah Blacker, MD, ScD; Marilyn S. Albert, PhD; Susan S. Bassett, PhD; Rodney C. P. Go, PhD; Lindy E. Harrell, MD, PhD; Marshai F. Folstein, MD Reliability and Validity of NINCDS-AD RDA Criteria for Alzheimer's Disease The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Arch Neurol.* 1994;51(12):1198-1204. doi:10.1001/archneur.1994.00540240042014.

20

[6] Hamley, I. W. PEG-Peptide Conjugates 2014;15, 1543-1559; dx.doi.org/10.1021/bm500246w

[7] Roberts, MJ et al Chemistry for peptide and protein PEGylation 64:116-127.

30

[8] J. X. Lu, W. Qiang, W. M. Yau, C. D. Schwieters, S. C. Meredith, R. Tycko, MOLECULAR STRUCTURE OF BETA-AMYLOID FIBRILS IN ALZHEIMER'S DISEASE BRAIN TISSUE. *CELL Vol. 154* p. 1257 (2013)

[9] Y. Xiao, B. MA, D. McElheny, S. Parthasarathy, F. Long, M. Hoshi, R. Nussinov, Y. Ishii, A BETA(1-42) FIBRIL STRUCTURE ILLUMINATES SELF-RECOGNITION AND REPLICATION OF AMYLOID IN ALZHEIMER'S DISEASE. *NAT. STRUCT. MOL. BIOL. Vol. 22* p. 499 (2015).

40

[10] A. Petkova, W. Yau, R. Tycko EXPERIMENTAL CONSTRAINTS ON QUATERNARY STRUCTURE IN ALZHEIMER'S BETA-AMYLOID FIBRILS *BIOCHEMISTRY V. 45* 498 2006.

[11] Yu YZ, Wang WB, Chao A, Chang Q, Liu S, Zhao M, et al. Strikingly reduced amyloid burden and improved behavioral performance in Alzheimer's disease mice immunized with recombinant chimeric vaccines by hexavalent foldable A₁₋₁₅ fused to toxin-derived ca

50

carrier proteins. J Alzheimers Dis 2014; 41: 243 - 60.

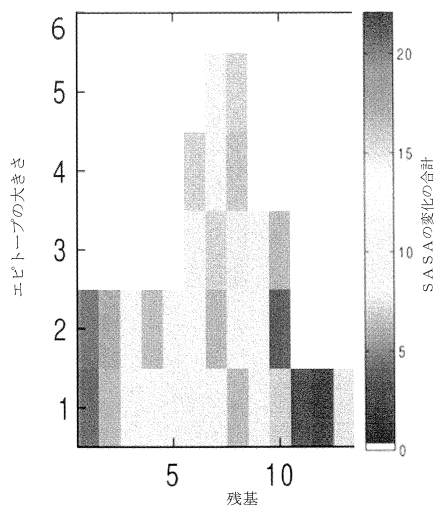
[12] Wang, HC; Yu, YZ; Liu, S; Zhao, M and Q Xu, P
peripherally administered sera antibodies
recognizing amyloid-beta oligomers mitiga
te Alzheimer's disease-like pathology and
cognitive decline in aged 3xTg-AD mice, Va
ccine 2016.

[13] Franziska Langer, Yvonne S Eisele, Sara
h K Frittschi, Matthias Staufenbiel, Lary C
Walker, Mathias Jucker (2011) Soluble A{beta}
Seeds Are Potent Inducers of Cerebral{be
ta}-Amyloid Deposition. J Neurosci 31: 41.1
4488 - 14495 Oct.

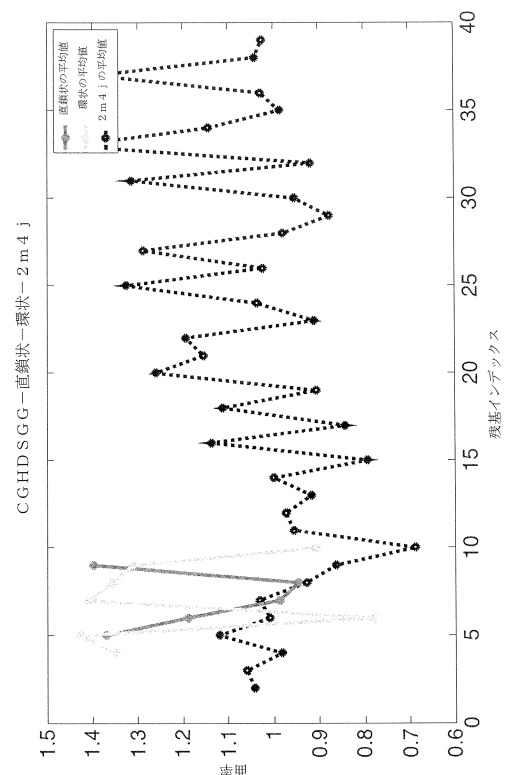
[14] Sarah K Frittschi, Franziska Langer, Ste
phan A Kaeser, Luis F Maia, Erik Portelius,
Dorothea Pinotsi, Clemens F Kaminski, David
T Winkler, Walter Maetzler, Kathy Keyvani, P
hilipp Spitzer, Jens Wiltfang, Gabriele S K
aminski Schierle, Henrik Zetterberg, Matthi
as Staufenbiel, Mathias Jucker (2014) Highly
potent soluble amyloid- seeds in human Al
zheimer brain but not cerebrospinal fluid
. Brain: a journal of neurology 137: Pt 11.2
909 - 2915 Nov.

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

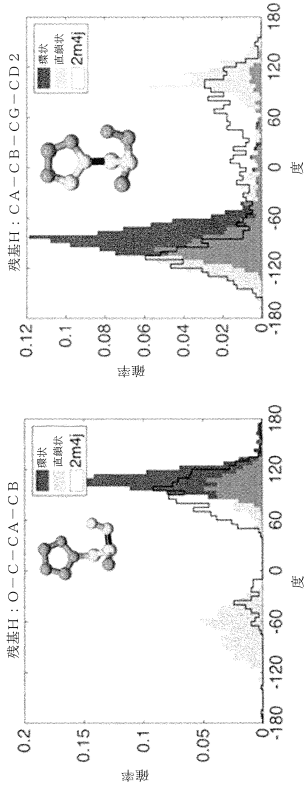
20

30

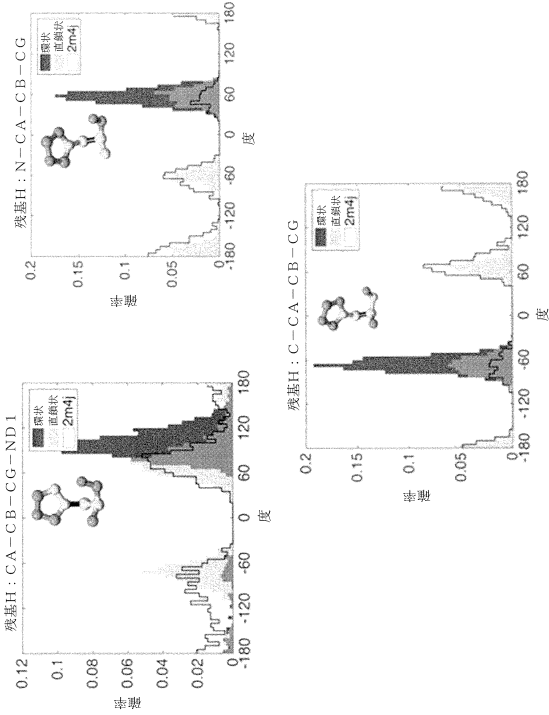
40

50

【図 3 - 1】



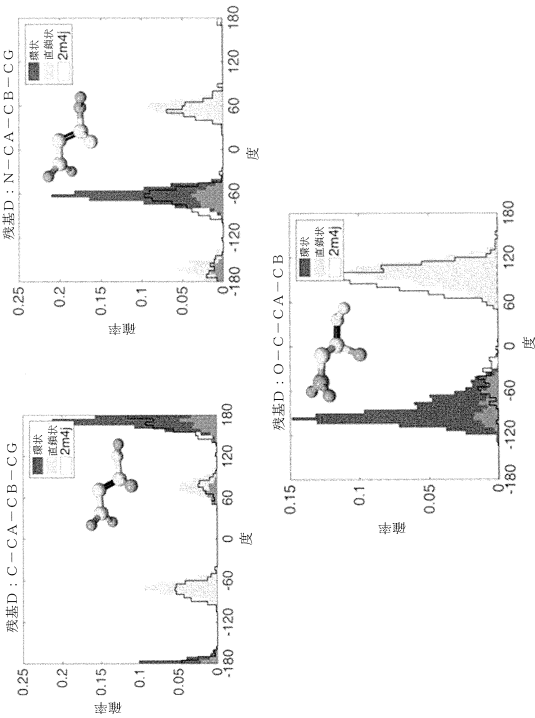
【図 3 - 2】



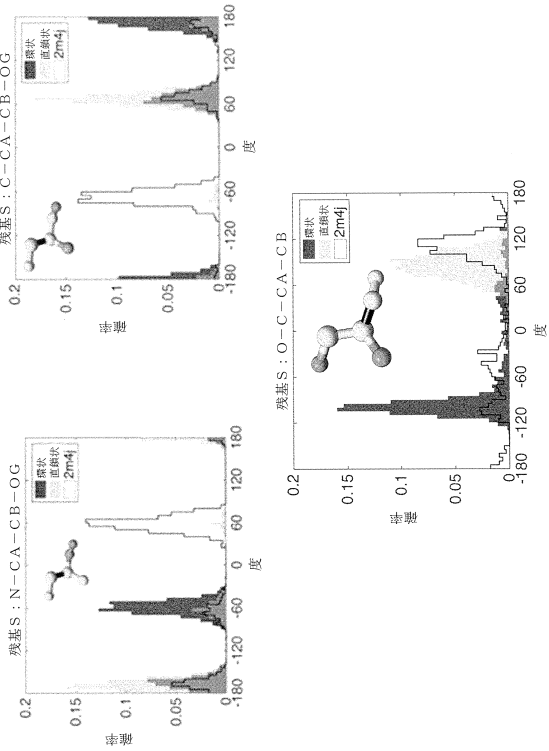
10

20

【図 4】



【図 5】

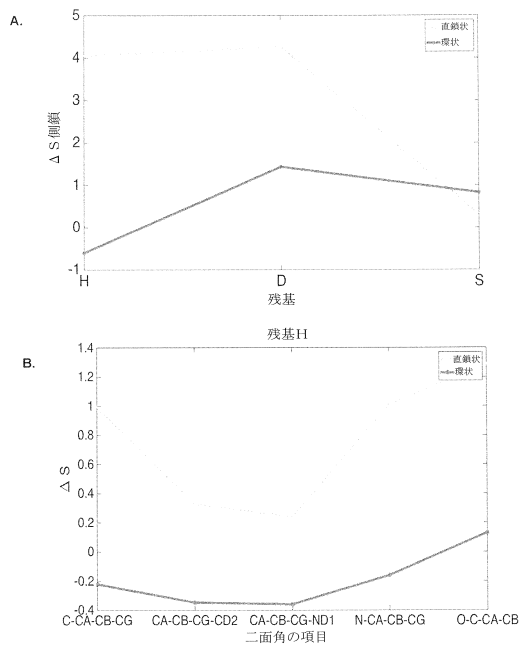


30

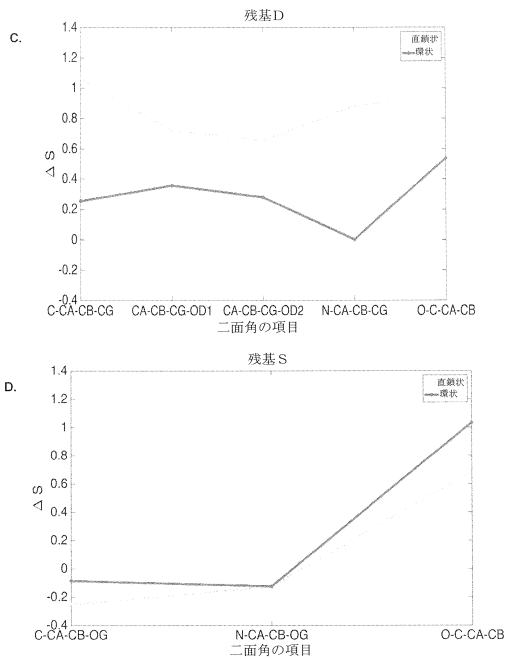
40

50

【図 6 - 1】



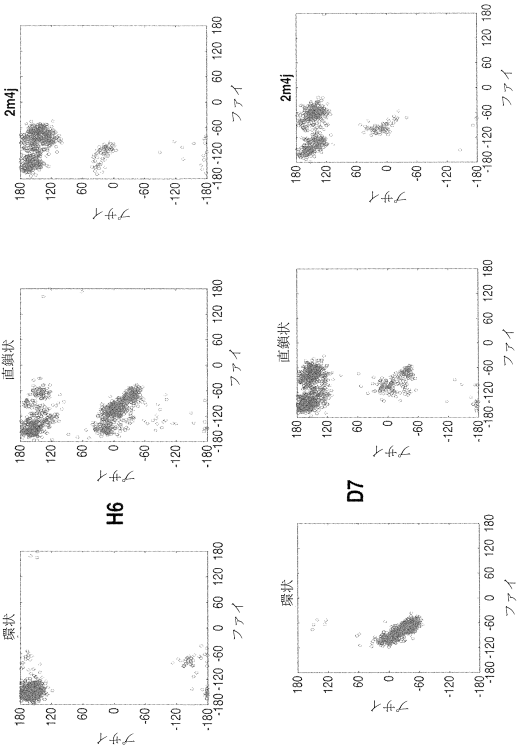
【図 6 - 2】



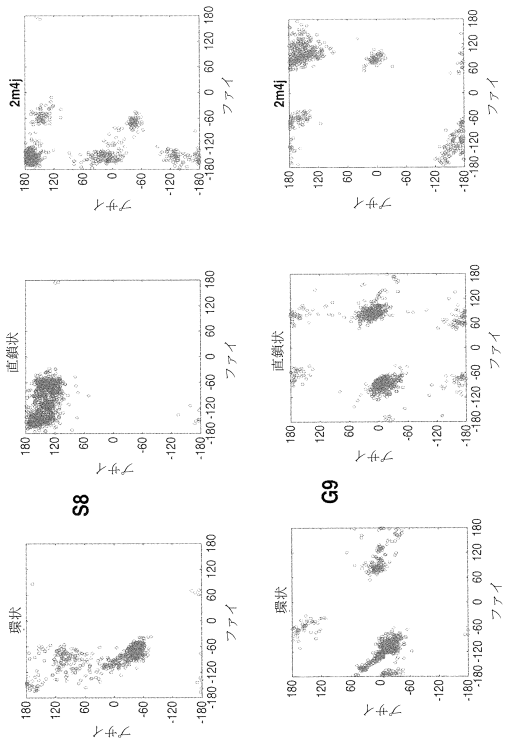
10

20

【図 7 - 1】



【図 7 - 2】

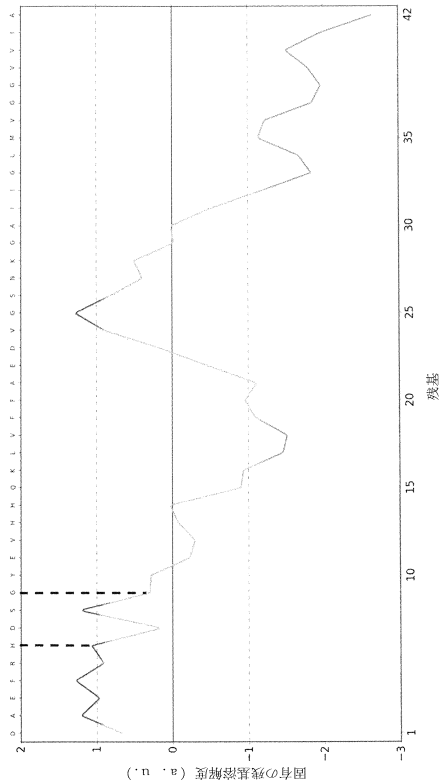


30

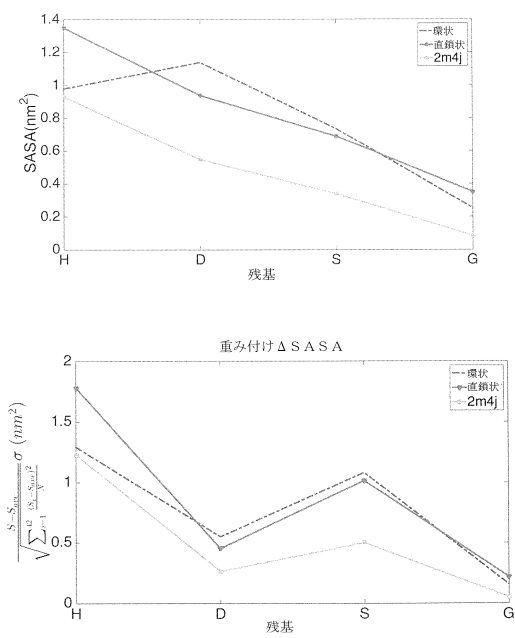
40

50

【図 8】



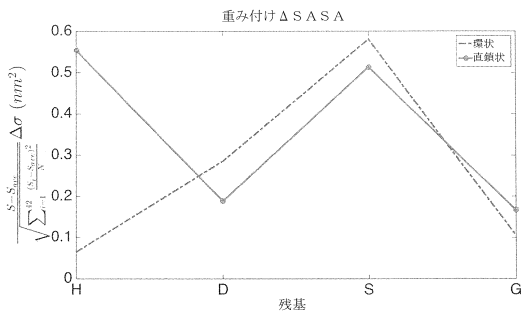
【図 9 - 1】



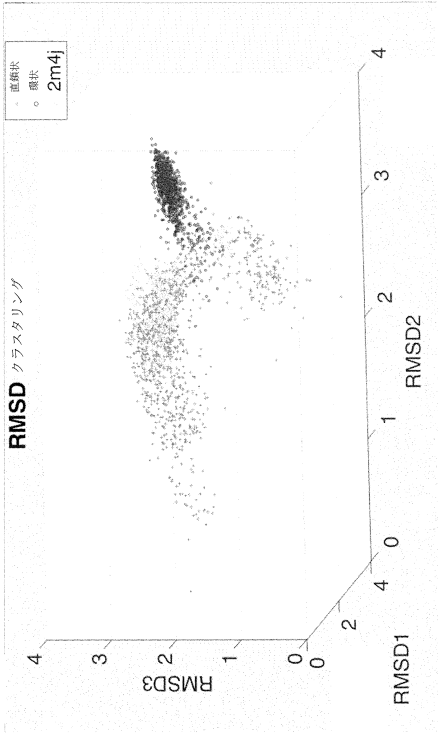
10

20

【図 9 - 2】



【図 10 - 1】

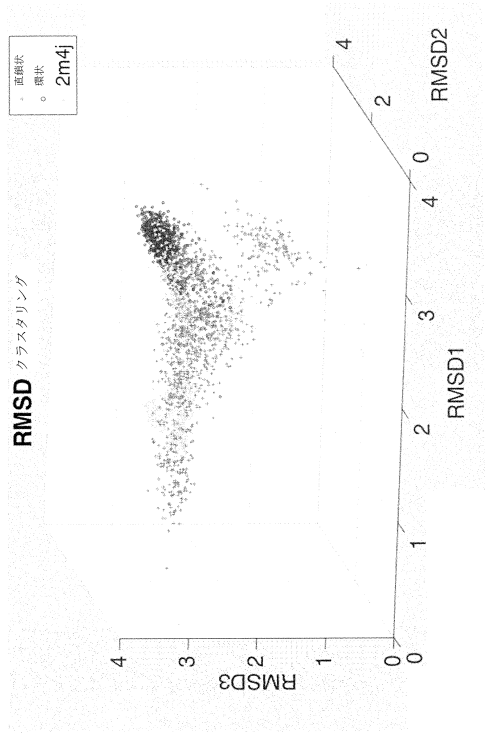


30

40

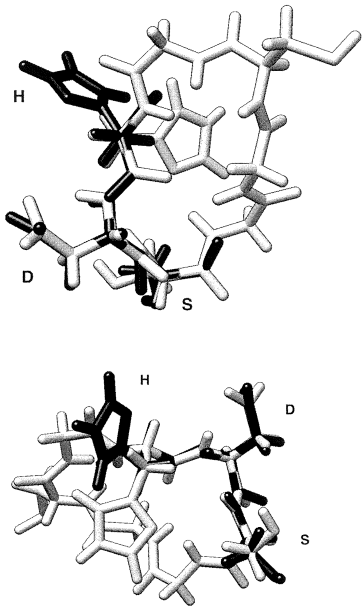
50

【図 1 0 - 2】



【図 1 1 A】

直鎖状ペプチド（黒）と環状ペプチド（薄灰）を重ね合わせた側鎖配向の2つ図

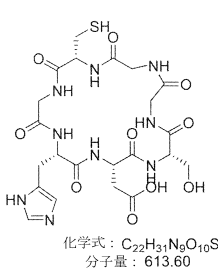


10

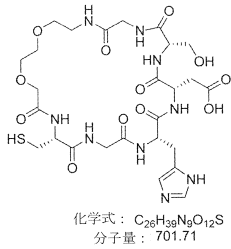
20

【図 1 1 B】

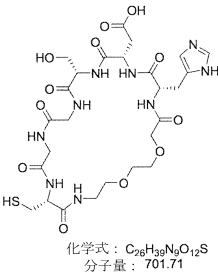
シクロ (CGHDSGG)



シクロ (CGHDSG-PEG 2)

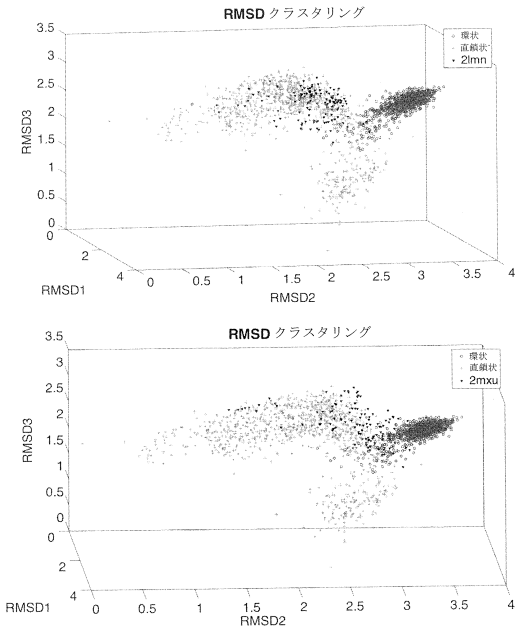


シクロ (C-PEG 2-HDSGG)



【図 1 2 - 1】

環状ペプチドアンサンブルと他の株の線維モデルのクラスタリング

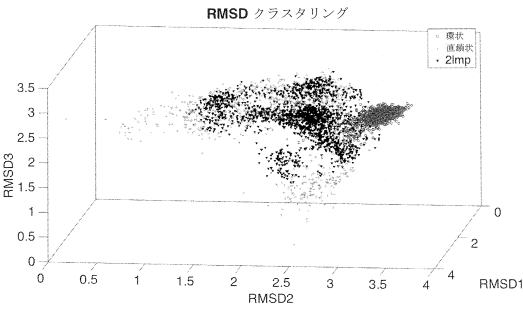


30

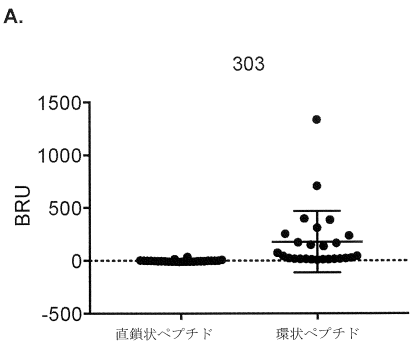
40

50

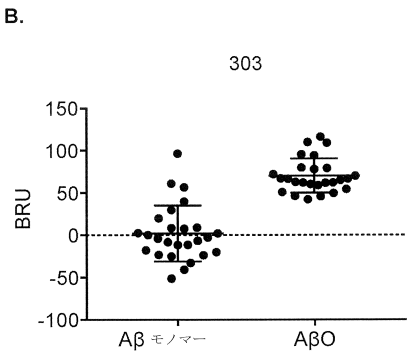
【図 1 2 - 2】



【図 1 3】

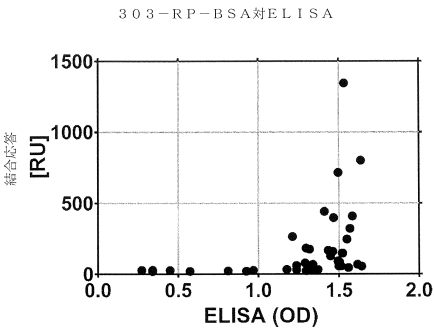


10

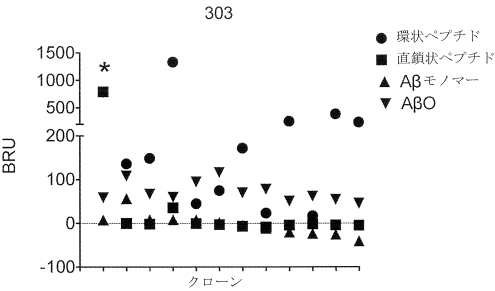


20

【図 1 4】



【図 1 5】

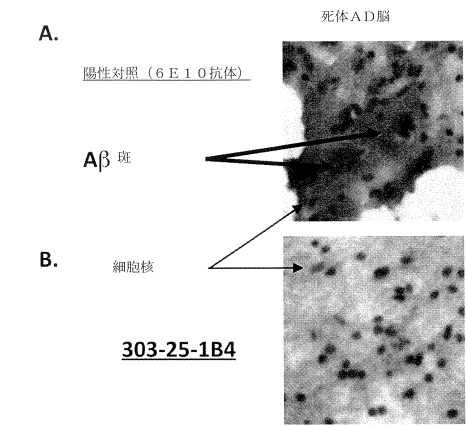


30

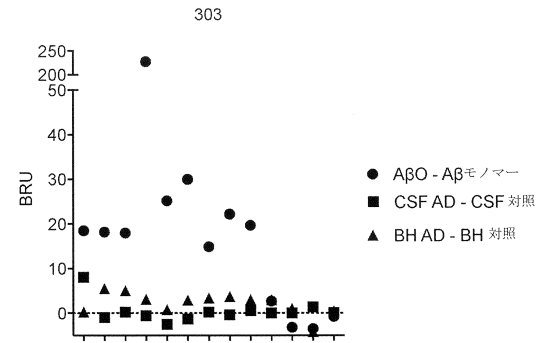
40

50

【図 1 6】

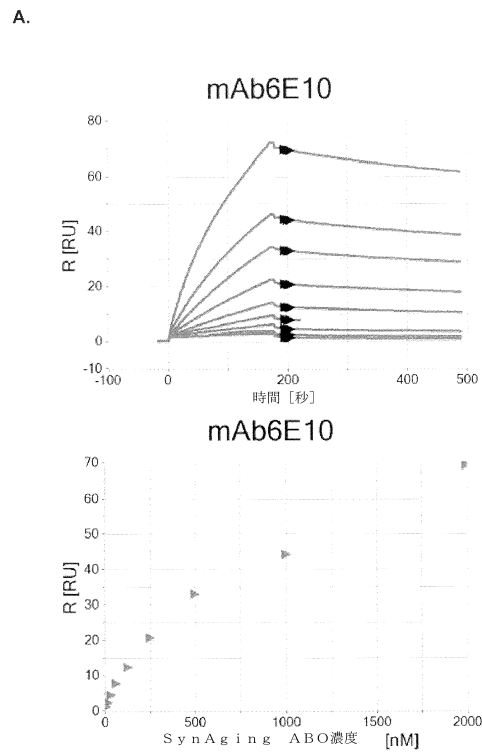


【図 1 7】

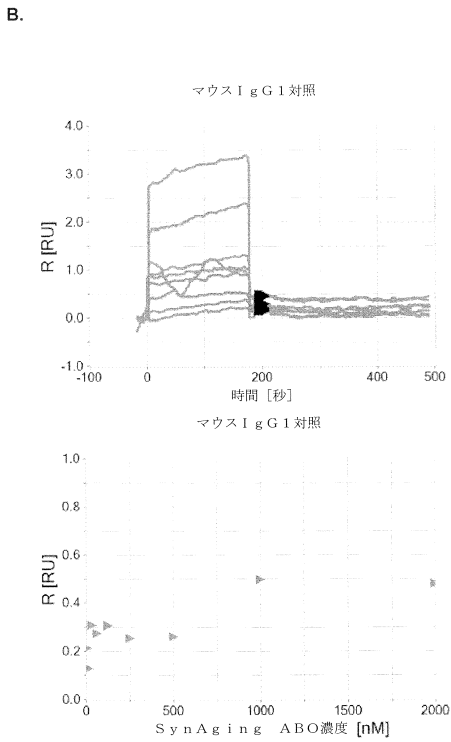


10

【図 1 8 - 1】



【図 1 8 - 2】



20

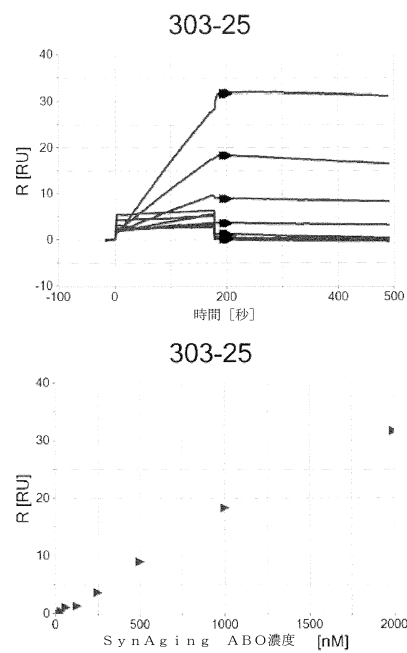
30

40

50

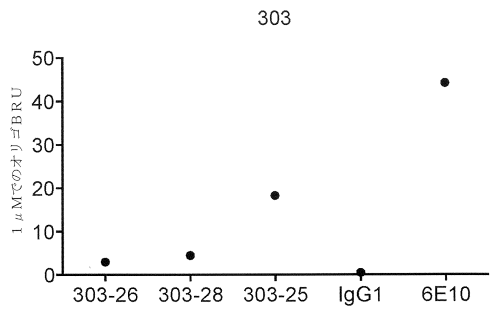
【図 1 8 - 3】

C.



【図 1 8 - 4】

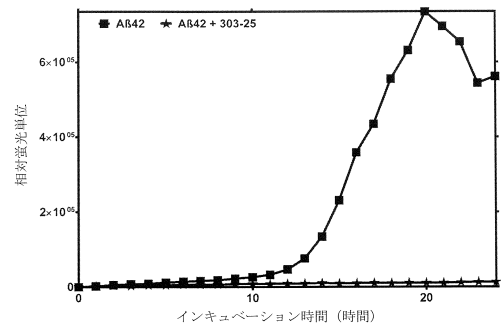
D.



10

20

【図 1 9】



30

【配列表】

[0007065516000001.app](#)

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/365,634

(32)優先日 平成28年7月22日(2016.7.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/393,615

(32)優先日 平成28年9月12日(2016.9.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 キャッシュマン, ニール アール.

カナダ国, プリティッシュ コロンビア州, ブイ6エス 1エム8, バンクーバー, 3793 ウェスト キング エドワード アベニュー

(72)発明者 プロトキン, スティーブン エス.

カナダ国, プリティッシュ コロンビア州, ブイ5ゼット 1シー3, バンクーバー, #408-908 ダブリュー. 7番 アベニュー

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 欧州特許出願公開第01676859(E P, A1)

特表2011-522841(J P, A)

国際公開第2011/106885(WO, A1)

The Journal of the Alzheimer's Association, 2014, p. P326

The Journal of Neuroscience, 2010, Vol. 30, No. 31, pp. 10369-10379

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

CAplus/REGISTRY(STN)

UniProt/GeneSeq