



特 許 証  
(CERTIFICATE OF PATENT)

特許第 3 5 1 2 8 1 5 号  
(PATENT NUMBER)

発明の名称(TITLE OF THE INVENTION)

アミロイドベータタンパク質 (球状アッセンブリーおよびその使用)

特許権者(PATENTEE)

アメリカ合衆国, イリノイ 60208, エバンストン, クラーク ストリート  
633

国籍 アメリカ合衆国  
ノースウエスタン ユニバーシテイ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 90089, ロサンゼルス, ユニバーシテイ  
パーク

国籍 アメリカ合衆国  
ユニバーシテイ オブ サザン カリフォルニア

発明者(INVENTOR)

クラフト, グラント エー.

クレイン, ウィリアム エル.

クロミー, ブレット エー.

その他別紙記載

出願番号(APPLICATION NUMBER) 平成10年特許願第533262号

出願年月日(FILING DATE) 平成10年 2月 5日(February 5, 1998)

この発明は、特許するものと確定し、特許原簿に登録されたことを証する。  
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE JAPAN PATENT OFFICE.)

平成16年 1月16日(January 16, 2004)

特許庁長官(COMMISSIONER, JAPAN PATENT OFFICE)

今井康夫



# 特許証

(CERTIFICATE OF PATENT)

(続葉 1)

特許第3512815号(PATENT NUMBER)

平成10年特許願第533262号(APPLICATION NUMBER)

発明者(INVENTOR)

ランバート, メアリー ビー.

フィンチ, ケーレブ イー.

モーガン, トッド

ウォールス, パット

ロゾフスキー, イリーナ

パーロー, アン

[以下余白]

(45)発行日 平成16年3月31日(2004.3.31)

(24)登録日 平成16年1月16日(2004.1.16)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	
C 0 7 K	14/47	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N 33/15	Z
	33/50	33/50	Z
	33/68	33/68	

請求項の数44(全 29 頁)

(21)出願番号 特願平10-533282

(86) (22)出願日 平成10年2月5日(1998.2.5)

(65)公表番号 特表2001-501972(P2001-501972A)

(43)公表日 平成13年2月13日(2001.2.13)

(86)国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 0 2 4 2 6

(87)国際公開番号 W O 9 8 / 0 3 3 8 1 5

(87)国際公開日 平成10年8月6日(1998.8.6)

審査請求日 平成11年8月12日(1999.8.12)

(31)優先権主張番号 0 8 / 7 9 6 , 0 8 9

(32)優先日 平成9年2月5日(1997.2.5)

(33)優先権主張国 米国 ( U S )

(73)特許権者 999999999  
ノースウエスタン ユニバーシティ  
アメリカ合衆国, イリノイ 60208, エ  
バンストン, クラーク ストリート  
633

(73)特許権者 999999999  
ユニバーシティ オブ サザン カリフ  
ォルニア  
アメリカ合衆国, カリフォルニア  
90089, ロサンゼルス, ユニバーシティ  
パーク

(74)代理人 999999999  
弁理士 石田 敬 (外4名)

審査官 鈴木 恵理子

最終頁に続く

(64) 【発明の名称】 アミロイドベータタンパク質 (球状アッセムブリーおよびその使用)

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 3-12のアミロイドβタンパク質を含んで成り、神経毒性を示す、単離された可溶性の非原線維性アミロイドβタンパク質集合体であって、このアミロイドβタンパク質がβ1-42タンパク質である前記集合体。

【請求項2】 前記集合体が三量体、四量体、五量体および六量体から成る群から選択される集合体を含んで成る請求項1に記載の集合体。

【請求項3】 非変形ゲル電気泳動により測定した場合には、前記集合体が約26kD~約28kDの分子量を有する請求項1または2に記載の集合体。

【請求項4】 15%SDS-ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動により測定した場合には、前記集合体が約22kD~約24kD、または約18kD~約19kDの分子量を有する請求項

2

1-3のいずれか1項に記載の集合体。

【請求項5】 原子間力顕微鏡により測定した場合には、前記集合体が約4.7nm~約6.2nmの寸法の球状体を含んで成る請求項1-3のいずれか1項に記載の集合体。

【請求項6】 原子間力顕微鏡により測定した場合には、前記集合体が約4.9nm~約5.4nmの寸法の球状体を含んで成る請求項1~4のいずれか1項に記載の集合体。

【請求項7】 原子間力顕微鏡により測定した場合には、前記集合体が約5.7nm~約6.2nmの寸法の球状体を含んで成る請求項1~5のいずれか1項に記載の集合体。

【請求項8】 原子間力顕微鏡により測定した場合には、前記集合体の約40%~約75%が、約4.9nm~約5.4nm、及び約5.7nm~約6.2nmの寸法の球状体を含んで成る請求項1~5のいずれか1項に記載の集合体。

【請求項9】 請求項1~8のいずれか1項に記載の集合

体の効果の検定方法において、

- (a) ヒトを除く動物の海馬に前記集合体を投与し；
- (b) 電気的刺激を適用し；そして
- (c) 細胞体スパイク振幅を経時的に測定することにより、長期増強反応を測定する；

工程を含んで成る方法。

【請求項10】前記動物の長期増強反応が、電気的刺激の適用に先立って集合体の代りに食塩水を投与する点を除き同様にして処置された別の動物の長期増強反応と比較される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の被験物質中での検出方法において、

- (a) 前記被験物質を $\beta$ -アミロイド特異的抗体と接触させ；そして
- (b) 前記抗体の前記集合体との結合を検出する；

工程を含んで成る方法。

【請求項12】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の被験物質中での検出方法において、

- (a) 前記被験物質を血清飢餓化神経芽細胞腫細胞と接触させ；そして
- (b) 前記被験物質と接触されなかった神経芽細胞腫細胞に対する前記細胞の形態学的知見を比較することにより、前記接触された細胞における形態学的変化を測定する；

工程を含んで成る方法。

【請求項13】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の被験物質中での検出方法において、

- (a) 前記被験物質を脳薄片培養物と接触させ；そして
- (b) 前記被験物質と接触されなかった脳薄片培養物に対して比較した場合の脳細胞死を測定する；

工程を含んで成る方法。

【請求項14】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の被験物質中での検出方法において、

- (a) 前記被験物質を神経芽細胞腫細胞と接触させ；そして
- (b) 前記被験物質と接触されなかった神経芽細胞腫細胞におけるFynキナーゼ活性に対して前記接触された細胞中のFynキナーゼ活性を比較することにより、Fynキナーゼ活性の増大を測定する；

工程を含んで成る方法。

【請求項15】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の被験物質中での検出方法において、

- (a) 前記被験物質を一次星状膠細胞の培養物と接触させ；そして
- (b) 前記被験物質と接触されなかった一次星状膠細胞の培養と比較した場合の前記接触された星状膠細胞の活性化を測定する；

工程を含んで成る方法。

【請求項16】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の被験物質中での検出方法において、

- (a) 前記被験物質を一次星状膠細胞と接触させ；そして

(b) 前記被験物質と接触されなかった一次星状膠細胞の培養中の対応するmRNAレベルに対して前記接触された星状膠細胞中の前記mRNAレベルを比較することにより、インターロイキン-1、誘導性酸化一酸化窒素シンターゼ、ApoE、ApoJおよび $\alpha$ 1-アンチキモトリプシンから成る群から選択されるタンパク質に対するmRNAの増大を前記星状膠細胞で測定する；

10 工程を含んで成る方法。

【請求項17】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の作用を調節する化合物の同定方法において、

- (a) ヒトを除く動物の海馬に食塩水または被験化合物を投与し；
- (b) 電気的刺激を適用し；
- (c) 細胞体スパイク振幅を経時的に測定することにより長期増強反応を測定し；そして

(d) 食塩水を投与された動物の長期増強反応を、被験化合物を投与された動物の長期増強反応と比較する；

20 工程を含んで成る方法。

【請求項18】前記食塩水または被験化合物の投与の前に、同時に、またはその後に、前記海馬に集合体を投与することをさらに含んで成る請求項17記載の方法。

【請求項19】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の神経毒性を阻止する化合物の同定方法であって、

- (a) 前記被験化合物との接触の存在下または非存在下で、ニューロン細胞の別々の培養物を前記集合体と接触させ；

(b) 各培養物中の生存細胞の割合を測定し；そして

30 (c) 各培養物中の生存細胞の割合を比較する；

工程を含んで成り、被験化合物の非存在下で集合体と接触させた培養物中の生存細胞と比較して、被験化合物の存在下で集合体と接触させた前記培養物中の生存細胞の割合が増大した場合に、その被験化合物を集合体の神経毒性を阻止する化合物として同定することを特徴とする方法。

【請求項20】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物の同定方法において、

- 40 (a) 前記被験物質との接触の存在下または非存在下で、ニューロン細胞の別々の培養物を前記集合体と接触させ；

(b) 前記集合体と結合する蛍光性の試薬を添加し；

(c) 蛍光標示式細胞分類法により前記各々の細胞培養物を分析し；そして

(d) 培養物の蛍光を比較する；

工程を含んで成り、被験化合物の非存在下で集合体と接触させた培養物の蛍光と比較して、被験化合物の存在下

50 で集合体と接触させた培養物の蛍光が低減する場合に、その被験化合物を集合体細胞表面タンパク質への結合を

阻止する化合物として同定することの特徴とする方法。

【請求項21】請求項1～8のいずれかに記載の集合体の細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物の同定方法において、

(a) 蛍光試薬と結合し得る結合成分を含んで成る標識された集合体を、アミロイドβタンパク質から生成せしめ；

(b) 前記被験化合物との接触の存在下または非存在下で、ニューロン細胞の別々の培養物を前記標識された集合体と接触させ；

(c) 前記集合体と結合し得る蛍光試薬を添加し；

(d) 蛍光標示式細胞分類法により前記別々の細胞培養物を分析し；そして

(e) 培養物の蛍光を比較する；

工程を含んで成り、被験化合物の非存在下で集合体と接触させた培養物の蛍光と比較して、被験化合物の存在下で集合体と接触させた培養物の蛍光が低減する場合には、その被験化合物を、集合体の細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物として同定することの特徴とする方法。

【請求項22】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の生成または細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物の同定方法において、

(a) 前記被験化合物と混合されているかまたはされていないアミロイドβタンパク質の別々の試料を調製し；

(b) 前記別々の試料中に前記集合体を形成し；

(c) ニューロン細胞の別々の培養物を前記別々の試料と接触させ；

(d) 前記集合体と結合する蛍光性の試薬を添加し；

(e) 蛍光標示式細胞分類法により前記別々の細胞培養物を分析し；そして

(f) 培養物の蛍光を比較する；

工程を含んで成り、被験化合物の非存在下で集合体と接触させた培養物の蛍光と比較して、被験化合物の存在下で集合体と接触させた培養物の蛍光が低減する場合には、その被験化合物を、集合体の形成または細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物として同定することの特徴とする方法。

【請求項23】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の生成または細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物の同定方法において、

(a) 前記被験化合物と混合されているかまたはされていないアミロイドβタンパク質の別々の試料を調製し；

(b) 前記別々の各試料中に、該別々の試料のそれぞれにおいて蛍光試薬と結合し得る結合成分を含んで成る標識された集合体を形成し；

(c) ニューロン細胞の別々の培養物を前記別々の試料と接触させ；

(d) 前記集合体と結合し得る蛍光試薬を添加し；

(e) 蛍光標示式細胞分類法により前記別々の細胞培養

物を分析し；そして

(f) 培養物の蛍光を比較する；

工程を含んで成り、被験化合物の非存在下で集合体と接触させた培養物の蛍光と比較して、被験化合物の存在下で集合体と接触させた培養物の蛍光が低減する場合には、その被験化合物を、集合体の形成または細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物として同定することの特徴とする方法。

【請求項24】前記培養物の蛍光がさらに、集合体の形成に先立って前記被験化合物を添加するかまたは添加しない代わりに、集合体の形成後に前記被験化合物を添加するかまたは添加しない点を除き同様にして処理された培養物の蛍光と比較され、

前記集合体の生成に先立って前記化合物が添加される場合にのみ、被験化合物の非存在下で集合体と接触させた培養物の蛍光と比較して、被験化合物の存在下で集合体と接触させた培養物の蛍光が低減する場合には、その被験化合物を集合体の生成を阻止する化合物として同定し、集合体の生成の前又は後に前記化合物が添加される場合には、被験化合物の非存在下で集合体と接触させた培養物の蛍光と比較して、被験化合物の存在下で集合体と接触させた培養物の蛍光が低減する場合には、その被験化合物を集合体の細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物として同定する、請求項22または23に記載の方法。

【請求項25】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の細胞表面タンパク質への結合の検出方法において、

(a) アミロイドβタンパク質から前記集合体を形成し；

(b) ニューロン細胞の培養物を前記集合体と接触させて；

(c) 前記集合体と結合する抗体であって結合成分を含むものを添加し；

(d) 非結合抗体を洗い落とし；

(e) 前記結合成分により、前記集合体に結合される前記抗体に酵素を結合せしめ；

(f) 前記酵素により切断されて変色を生じさせる無色基質を付加し；そして

(g) 前記集合体の細胞表面タンパク質への結合の測定として前記の変色検定する；

工程を含んで成る方法。

【請求項26】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の生成または細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物の同定方法において、

(a) 前記被験化合物と混合されているまたはされていないアミロイドβタンパク質の別々の試料を調製し；

(b) 前記別々の試料中に、前記集合体を形成し；

(c) ニューロン細胞の別々の培養物を前記別々の試料と接触させ；

(d) 前記集合体と結合する抗体であって結合成分を含

有するものを添加し；

(e) 非結合抗体を洗い落とし；

(f) 前記結合成分により、前記集合体に結合される前記抗体に酵素を結合せしめ；

(g) 前記酵素により切断されて変色を生じさせる無色基質を付加し；そして

(h) 前記別々の試料の各々により生成される変色を比較する；

工程を含んで成り、被験化合物の非存在下で集合体と接触させた培養物と比較して、被験化合物の存在下で集合体と接触させた培養物の蛍光が低減する場合には、その被験化合物を、集合体の形成または細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物として同定することを特徴とする方法。

【請求項27】前記培養物により生成された変色がさらに、集合体の形成に先立って前記被験化合物を添加するかまたは付加しない代わりに、集合体の形成後に前記被験化合物を添加するかまたは添加しない点を除き同様にして処理された培養物により生成された変色と比較され、

前記集合体の生成に先立って前記化合物が添加される場合にのみ、被験化合物の非存在下で集合体と接触した培養物の変色と比較して、被験化合物の存在下で集合体と接触させた培養物の変色が低減する場合には、その被験化合物を集合体の生成を阻止する化合物として同定し、集合体の生成の前又は後に前記化合物が添加される場合に、被験化合物の非存在下で集合体と接触させた培養物の変色と比較して、被験化合物の存在下で集合体と接触させた培養物の変色が低減する場合には、その被験化合物を集合体の細胞表面タンパク質への結合を阻止する化合物として同定する、請求項26に記載の方法。

【請求項28】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の生成を阻止する化合物の同定方法において、

(a) 前記被験化合物と混合されているかまたはされていないアミロイドβタンパク質の別々の試料を調製し；

(b) 前記別々の試料中に前記集合体を形成し；

(c) 電気泳動、免疫認識および原子間力顕微鏡から成る群から選択される方法を用いて、集合体が前記別々の試料中に形成されたか否かを測定し；そして

(d) 前記別々の試料中の前記集合体の形成を比較する；

工程を含んで成り、被験化合物の非存在下で集合体試料と比較して、試料中で被験化合物の存在下で集合体の生成が低減される場合には、その被験化合物を集合体の形成を阻止する化合物として同定することを特徴とする方法。

【請求項29】請求項1～8のいずれか1項に記載の単離された可溶性の球状の非原線維性アミロイドβ集合体の製造方法において、

(a) 前記集合体を形成し得る単量体アミロイドβタン

パク質の溶液を生成し；

(b) 前記タンパク質溶液を適切な培地中に希釈して約5nM～約500μMの最終濃度とし；

(c) 約4℃で工程(b)から得られた培地を約4℃にて約2～約48時間インキュベートし；

(d) 約4℃で約14,000gで前記溶液を遠心分離し；

(e) 前記アミロイドβ集合体を含有するものとして、前記遠心分離から得られた上清を回収する；

工程を含んで成る方法。

10 【請求項30】工程(b)からの培地を約4℃にてクルステリンの存在下でインキュベートする、請求項29に記載の方法。

【請求項31】請求項29または30により調製されたタンパク質集合体。

【請求項32】神経細胞の長期増強反応を変えるための請求項1～8のいずれかの単離されたタンパク質集合体の使用であって、前記細胞を前記集合体と接触させる(ヒト細胞生体内での接触を除く)ことを含んで成る使用。

20 【請求項33】ヒトを除く動物の学習または記憶を変えるための請求項1～8のいずれか1項に記載のタンパク質集合体の使用であって、前記集合体を前記動物に投与することを含んで成る使用。

【請求項34】神経細胞の形態学的変化を引き起こすための請求項1～8のいずれか1項に記載のタンパク質集合体の使用であって、前記細胞を前記集合体と生体外で接触させることを含んで成る使用。

【請求項35】前記形態学的変化が殺細胞、Fynキナーゼ活性変化、Fynキナーゼ細胞下局在化の変化並びにインターロイキン-1、誘導性酸化一酸化窒素シンターゼ、ApoE、ApoJおよびα1-アンチキモトリプシンを含めたタンパク質に関するmRNAレベルの変化から成る群から選択される作用を含む請求項34に記載の使用。

【請求項36】星状膠細胞活性化を引き起こす請求項1～8のいずれか1項に記載のタンパク質集合体の使用であって、前記星状膠細胞を前記オリゴマー構造体と生体外で接触させることを含んで成る使用。

【請求項37】オリゴヌクレオチド構造体の神経毒性を阻止する被験化合物を同定するための請求項1～8のいずれか1項に記載のタンパク質集合体の使用であって、神経細胞を前記集合体および前記被験化合物と生体外で接触させることを含んで成る使用。

【請求項38】集合体の細胞表面タンパク質への結合を阻止する被験化合物を同定するための請求項1～8のいずれか1項に記載のタンパク質集合体の使用であって、神経細胞を前記集合体および前記被験化合物と生体外で接触させることを含んで成る使用。

【請求項39】集合体の生成を阻止する被験化合物を同定するための請求項1～8のいずれか1項に記載のタンパク質集合体であって、前記集合体を生成するためのイ

ンキューベーション中に、アミロイド $\beta$ タンパク質を前記被験化合物と生体外で接触させることを含んで成る使用。

【請求項40】請求項1～8のいずれか1項に記載の集合体の効果によりADDL誘発性異常ニューロンシグナリングから神経細胞を防護するための方法であって、ADDL誘発性異常ニューロンシグナリングを導くタンパク質集合体の活性を阻止する化合物と接触させる（ヒトの細胞を生体内で処理する場合を除く）ことを含んで成る方法。

【請求項41】請求項1～8のいずれか1項に記載のタンパク質集合体の被験物質中での検出方法において、

(a) 前記被験物質を神経細胞と生体外で接触させ；そして

(b) 前記細胞がADDL誘発性異常ニューロンシグナリングを示すか否かを決定する；

工程を含んで成る方法。

【請求項42】神経細胞のADDL誘発性異常ニューロンシグナリングを引き起こす請求項1～8のいずれか1項に記載のタンパク質集合体の使用であって、前記細胞を前記集合体と生体外で接触させることを含んで成る使用。

【請求項43】請求項1～8のいずれか1項に記載のタンパク質集合体の効果による学習または記憶の低減から動物を保護するための医薬の製造のための、前記集合体の使用。

【請求項44】請求項1～8のいずれか1項に記載のタンパク質集合体の効果による学習または記憶の低減を動物において逆転させるための医薬の製造のための、前記集合体の使用。

【発明の詳細な説明】

発明の技術分野

本発明は、アミロイドベータ由来痴呆リガンド (ADDL) である物質の新規の組成物に関する。ADDLは、特定の細胞過程を活性化し得る可溶性球状非原繊維オリゴマー構造に組み立てられるアミロイド $\beta$ ペプチドを含んで成る。本発明は、ADDLの生成、存在、受容体タンパク質結合および細胞活性の検定方法も提供する。本発明は、ADDLの生成または活性を阻止する化合物、およびこのような化合物の同定方法も記載する。ADDLの生成および活性は特に、学習および記憶に関連する。したがって、ADDL生成または活性の調節は、本発明にしたがって、学習および記憶障害、ならびにADDLの作用によるその他の疾患、傷害または症状の治療に用い得る。

発明の背景

アルツハイマー病は、例えば神経原繊維もつれ、神経炎症プラーク、ニューロン萎縮、樹状突起剪定およびニューロン死を含めた異なる病状を特徴とする進行性神経変性疾患である。歴史的展望から、アルツハイマー病の明確な診断は、特定の病理的特質、即ち死んだまたは死にかけてのニューロンの虚脱化細胞骨格を表す神経炎繊維もつれ、そして種々のタンパク質、脂質、炭水化物およ

び塩化合物の細胞外沈着物であり、その主要タンパク質成分がアミロイド $\beta$ として既知の39-43残基ペプチドである神経炎性プラークの同定に、常に頼ってきた。

しかしながら、疾病衝撃の見地から、それは、アルツハイマー病における病状発現、即ち記憶の損失、認識機能の侵食、ならびに人格および行動の有意の変化であり、これらが最も有意である。これらの病状変化の根元にあるのは、神経細胞を機能不全にし、そして最後には変性させ、死なせる特定の細胞メカニズムである。これらの細胞メカニズムは疑いなく、防護のかなりのレベルに様々に影響を及ぼし、あるいは寄与および増悪作用を発揮する背景環境内で働く。結果は非常に広範な年齢/発生数分布曲線であり、特定の原因を示す集団試験からの糸口はほとんどない。

分子遺伝学は、家族性アルツハイマー病の明瞭は臨床像が明らかになりつつある研究の一分野を示す。以下で詳細に説明するように、アルツハイマー病を引き起こす最終的一般経路はアミロイド $\beta$ 1-42（ならびにアミロイド $\beta$ 1-43）の産生増大であるということが、3つの異なるタンパク質、即ちAPPならびにプレセニン1および2における突然変異を同定する研究から、目下明らかであり、これは、これらの異なる家族性AD突然変異のすべてで起きる。これは、本明細書に記載した本発明の中心目標であるADDLのみがこのより長い形態のアミロイドから安定した存在として生成し、より一般的な短い形態のA $\beta$ 1-40からは生成しないために、特に注目し値する。

アルツハイマー病におけるアミロイド $\beta$

1984年に、GlennertとWongは、アルツハイマー病に関連した脳血管性アミロイドの単離および同定に成功した (Glennert et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120, 85-89, 1984a)。その後、アミロイド $\beta$ として現在知られている同じ39-43残基ペプチドが、アルツハイマー病神経炎性プラークの主要タンパク質成分として同定された (Glennert et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 1131-1135, 1984b; Masters et al., *EMBO J.*, 4, 2757-2764, 1985a; Masters et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 4245-4249, 1985b)。これが、それまでは神経解剖学および神経病理学的説明によってのみ特定化されていた疾患であるアルツハイマー病に、別々の分子が結びつけられた最初である。アミロイド $\beta$ は、ダウン症候群個体におけるプラーク成分としても同定され (Glennert et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 1131-1135, 1984b; Masters et al., *EMBO J.*, 4, 2757-2764, 1985a; Masters et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 4245-4249, 1985b)、それをコードする遺伝子が第21染色体上に存在する、という示唆をもたらした。1987年までに、多数のグループがアミロイド $\beta$ 配列情報および分子遺伝学的技法を用いてその示唆を確認し、アミロイド前駆体タンパク質に対する遺伝子を同定した (Kang et al., *Nature*, 32

5,733,1987;Tanzi et al.,*Science*,235,880-884,1987)。

APP遺伝子は、区別的に多数のAPPにスプライシングされる大型の多エキソン遺伝子である (Selkoe,*Annual Review of Neuroscience*,Cowan (Ed.),17,ix+623p,489-517,1994で再検討されている)。タンパク質は、その1又はそれより多くがアミロイドβを生成し得るいくつかの経路によりプロセッシングされることが現在分かっている大型の膜貫通タンパク質である。APPプロセッシングの初期研究はアミロイド生成が正常過程ではないと示唆した (Esch et al.,*Science*,248,1122-1124,1990; Sisodia et al.,*Science*,248,492-495,1990) が、しかし培養細胞ならびに血清および脳脊髄液の分析のその後の研究は、アミロイドβ生成が多数の種類細胞で正常過程として起きるが、その生成は主要な全体的経路を表し得ない、ということを示した。

家族性アルツハイマー病の早期開始に苦しめられた個体からのDNAの重要な遺伝学的研究は、単一遺伝子、即ちこの同一APP遺伝子における突然変異がこの非常に重症形態の疾患の原因となったことを明らかにした。興味深いことに、Val 717での3つの異なる単一残基置換、アミロイドβ 1-42C末端の下流の4つの残基 (Goate et al.,*Nature*,349,704-6,1991;Chartier-Harlin et al.,*Nature*,353,844-6,1991;Murrell et al.,*Science*,254,97-9,1991およびスウェーデンの家族の早期開始家族性アルツハイマー病に関連したアミロイドβ N末端のすぐ上流の2つの残基突然変異 (670-671) を含めた、APP遺伝子におけるいくつかの異なる突然変異 (Mullan et al.,*Nature Genetics* 1,345-347,1992) が見出された。スウェーデン突然変異体APP遺伝子のcDNAをコードするベクターを細胞株にトランスフェクトして、APPプロセッシングを評価したところ、野生型APPの場合と比較して、6-8倍のアミロイドが生成されるということが判明した (Citron et al.,*Nature*,360,672-674,1992;Cai et al.,*Science*,259,514-516,1993)。生来のヒト脳プロテアーゼ活性を含有する脳組織抽出物は、スウェーデン突然変異を包含する蛍光原性オクタペプチド基質を、野生型配列を基礎にした対応する基質より100倍以上速くプロセッシングし得る、ということも実証された (Ladror et al.,*J. Biol. Chem.*,269,18422-8,1994)。これらの結果は、スウェーデン突然変異が早発性家族性アルツハイマー病を引き起こすメカニズムがアミロイドβの実質的過剰産生を伴う、ということを示唆する。717突然変異体APPでトランスフェクトした細胞におけるアミロイド産生についての同様の試験も実施されたが、しかし産生されたアミロイドβのレベルは野生型APPにより産生されたレベルと異ならなかった。これは、アミロイドβ産生以外の何かがこれらの突然変異の病原であるというメカニズム的推測をもたらした。APP717突然変異体と、Younkinおよび共同研究者によるスウ

エーデン突然変異体APP (Suzuki et al.,*Science*,264,1336-1340,1994) のプロセッシングのより類似した評価は、この遺伝的アルツハイマー病症例の臨床像の一般化を提供した。この研究では、アミロイドβ産生の総レベルが評価されただけでなく、産生された特定の長さのアミロイドβペプチドも分析された。結果は、総アミロイドβレベルは変わらなかったとしても、717突然変異がアミロイドβ 4-42対アミロイドβ 1-40 (生理学的条件下で高可溶性のペプチド) の比を2:1以上にすることを確証した。それぞれ第14染色体 (Sherrington et al.,*Nature*,375,754-758,1995) および第1染色体 (Lewy-Lahad et al.,*Science*,269,970-973,1995) 上に存在する遺伝子で近年発見されたプレセニリン1および2家族性アルツハイマー病突然変異も、アミロイドβ 1-42の有意の過剰産生に結びつけられた (Mann et al.,*Annals of Neurology*,40,149-56,1996;Schuener et al.,*Nature Medicine*,2,864-70,1996)。これらの知見に基づいて、これらの明瞭に異なる家族性アルツハイマー病突然変異により媒介される病原性過程は、アミロイドβ 1-42のより高レベルの産生である、と思われる。これは、最も容易に集合し (Synder et al.,*Biophys. J.*,67,1216-28,1994)、アミロイドβの集合を接種して神経炎症性プラークを形成する (Roher et al.,*Neurochem.*,61,1916-1926,1993;Tamaoka et al.,*Biochem. Biophys. Res. Commun.*,205,834-842,1994) アミロイドの形態であり、そして、本明細書に記載したように、「ADDL」と呼ばれる安定でより高水準のアッセムブリーを予想外に生成する形態である。

アルツハイマー病における非アミロイドプラーク成分アミロイドβは総タンパク質の70%以上を構成する、プラークの主要タンパク質成分である。しかしながら、α1-アンチキモトリプシン (ACT)、ヘパリンスルフェートプロテオグリカン (HSPG)、アポリポタンパク質EおよびJ、ブチリルコリンエステラーゼ (BChE)、S-100Bおよびいくつかの補体成分を含めた種々のその他の成分も存在する。アルツハイマー病の開始および進行におけるこれらの成分の重要性は確定されていないがしかし、本疾患におけるアポEアイソフォームの関与は、Rosesと同僚 (Strittmatter et al.,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,90,1977-81,1993) の遺伝学的研究により確定されており、彼等は、アポリポタンパク質E遺伝子、即ちアポE4の多形性が、大きい一組の後期開始家族性アルツハイマー病症例におけるアルツハイマー病の早期開始と相関する、ということを発見した。その後の研究は、アポE4を有する個体の群がアルツハイマー病の有意に大きい危険性を有し、そしてアルツハイマー病の開始がアポE4に関する遺伝子量にほぼ平行する、ということを確認した。メカニズムレベルでは、アミロイドβに対してアポE4は、アルツハイマー病のより後期の開始に関連するアイソフォームであるアポE3またはアポE2よりも低い親

和性で結合する、ということが研究から明示された。これらのアイソフォームは、アミロイド $\beta$  1-42沈殿物のより有効なクリアランスにより防護作用を発揮し得る、ということが示唆された (Ladu et al., J. Biol. Chem., 269, 23403-23406, 1994; Ladu et al., J. Biol. Chem., 270, 9039-42, 1995)。

その他のプラーク成分の役割は明らかではないが、しかし近年の研究 (Oda et al., Exptl. Neurology, 136, 22-31, 1995) は、アポJ (クラステリン) がin vitroで集合化アミロイド $\beta$  1-42の毒性を有意に増強し得る、ということを示した。HSPGは、ラット脳に注入されると、アミロイド $\beta$  1-40の毒性を増強する、ということも報告されている (Snow et al., Soc. Neurosci. Abs. tr., 18, 1465, 1992)。Wright等 (Ann. Neurol., 34, 373-384, 1993) は、アルツハイマー病の脳からのアミロイドプラークは有意レベルのBChEを含有するが、一方、初老性非痴呆性個体からのアミロイドプラークは含有しない、ということを実証した。急性期炎症タンパク質ACTもアルツハイマー病脳中で上向き調節され、そしてアミロイド $\beta$ のN末端16残基と関連することが知られている (Ma et al., Nature, 372, 92-94, 1994) は、ACTはアミロイド $\beta$  1-42の集合を増強し得る、と報告しており、これらの筆者等は、集合増強がその神経毒性に關与する、と推測している。

#### アミロイド $\beta$ 細胞性反応およびin vivo症状

アルツハイマー病の特質であるプラークおよびもつれ (tangle) 以外に、ニューロンと随伴するグリア細胞の両方において、一連の細胞性反応が誘発されていたことは明らかである。生化学的レベルでは、タウプロテインの高リン酸化は明白で、それはキナーゼ/ホスファターゼ平衡と同様に起因する。転写レベルでは、種々の遺伝子が活性化されて、脳には通常は存在しないか、または低レベルでのみ存在するある範囲のタンパク質を産生する。炎症過程が活性化された、という有意の証拠も存在する。特に、タウリン酸化は、分化SH-SY5Y細胞中の集合化アミロイド $\beta$  1-42により誘発されることが実証されており (Lambert et al., J. Neurosci. Res., 39, 377-384, 1994)、この結果は、Busciglio等 (Neuron, 14, 879-88, 1995) によるさらに最近の報告で確認されたが、この場合、アミロイド $\beta$ が培養一次ラット海馬ニューロンにおけるタウリン酸化を活性化した。アルツハイマー病における原繊維アミロイド $\beta$ および神経変性

アミロイド $\beta$  1-42がアルツハイマー病を引き起こすメカニズムは明らかにされていないが、しかし文献には200以上ものアミロイド $\beta$ 神経毒性が含まれており、その多くが近年総説されている (例えば、Yankner et al., Neuron, 16, 921-32, 1996; Iversen et al., Biochemical Journal, 311, 1-16, 1995)。合意された見解は、アミロイド $\beta$ が毒性であるために、それは原繊維構造に集

合するに違いない、というものである (Pike et al., J. Neurosci., 13, 1676-87, 1993)。単量体アミロイドのみを含有する溶液は、培養中のニューロンに有害な影響を及ぼさないことが繰り返し実証されてきた。さらに、研究は、円二色性および電子顕微鏡のような技術を用いて、アミロイド $\beta$ シート含有原繊維と毒性の時機および程度とを相関させた (Simmons et al., Molecular Pharmacology, 45, 373-9, 1994)。ある研究は、アミロイド $\beta$ は、それが有毒であるために、原繊維形態で存在するに違いない、ということを明確に推断した (Lorenzo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 12243-12247, 1994)。アミロイドの構造および活性に関するこの合意にもかかわらず、アミロイド毒性に關与する発表済みの実験的研究 (Brining, Neurobiology of Aging, 18, 581-589, 1997) の再現可能性、ならびに同一化学組成物であっても、アミロイドの異なるバッチを用いて得られる、または同一バッチでさえ、わずかに異なる方法で取り扱って得られる活性の広範な変動性 (May et al., Neurobiology of Aging, 13, 1676-87, 1993) の問題が引き続き存在する。これは、その活性に關与するアミロイド $\beta$ の正確な構造に関する問題を提起している。

本発明は、従来技術における問題を克服しようとしている。したがって、予期せぬことに神経毒性であるアミロイド $\beta$ ペプチドの可溶性小球形非原繊維性オリゴマー構造 (ADDL) に集合された物質の新規の組成物を提供することが、本発明の目的である。本発明のこれらのそしてその他の目的および利点、ならびにさらに別の本発明の特徴は、以下の説明から明らかになる。

#### 図面の簡単な説明

30 図1は、電気泳動中のADDLを示す濃度計走査銀染色ポリアクリルアミドゲルのコンピューター処理画像であり、第一バンドは約30kDに対応し、低濃度バンドは約17kDに対応しており、原繊維または集合体の証拠は認められない。

40 図2は、電気泳動中のADDLを示す濃度計走査クーマシー染色SDS-ポリアクリルアミドゲルのコンピューター処理画像であり、第一バンド (上部二重線) は約17~約22kDのサイズに対応し、別のバンド (下部暗色バンド) は高濃度4kDモノマーの存在を示し、これはおそらくは分解生成物であると思われる。レーン：第一レーン：分子サイズマーカー；第二レーン：ADDL調整物；第三レーン：より重い負荷のADDL。

図3は、ADDL含有「分画3」 (Superdex 75ゲル濾過カラム上で分別) のAFM分析のコンピューター処理画像を示す。

50 図4は、クラステリン (レーンA) またはコールドF12増地 (レーンB) を用いた同時インキュベーションにより調整したADDL、ならびにクラステリンを用いて同時インキュベーションし、それをCentricon 10kDカットオフ膜に通し (レーンC) またはCentricon 10kDカットオ

15

フ膜に保持され(レーンD)で調製されたADDLの濃度計走査クーマシー染色SDS-ポリアクリルアミドゲル勾配ゲルである:MW 分子サイズマーカー。

図5は、ADDL調製物で処置したマウスからの脳薄片に関してアミロイド $\beta$  1-42濃度(nM)対死細胞%として測定したADDL濃度のグラフである。

図6は、ADDLに曝露されなかった対照PC12細胞(「Cont.」)、クラスチリン単独に曝露されたPC12細胞(「Apo J」)、単量体A $\beta$ に曝露されたPC12細胞(「A $\beta$ 」)クラスチリンと凝集したアミロイド $\beta$ に曝露されて、1日経過したPC12細胞(「A $\beta$ :ApoJ」)に関する%MTT減少を示す棒グラフである。

図7は、ADDLに曝露されなかったB103細胞(陰影のないピーク)および蛍光標識化ADDLに結合したB103細胞(影付きピーク)に関する蛍光強度(0~170)対結果(0~300)を示すFACScanである。

図8は、ADDLに曝露されなかった海馬細胞(陰影のないピーク、「-ADDL」)および蛍光標識化ADDLに結合した海馬細胞(影付きピーク、「+ADDL」)に関する蛍光強度(0~170)対結果(0~300)を示すFACScanである。

図9は、B103細胞のトリプシン処理により放出されたペプチドに曝露されなかった(「-」)か、または同時曝露された(「+」)B103細胞に関する%最大ADDL結合またはADDL喚起性死の棒グラフである。

図10は、ADDL調製物で処置したマウスからの脳薄片に関する相対的ADDL濃度対%死細胞のグラフである。相対濃度を確定するために、10 $\mu$ M A $\beta$ タンパク質の初期濃度を用いて、最高データ点(ポイント「16」)でADDLを生成し、その後これを1/2(ポイント「8」)、1/4(ポイント「4」)等に希釈した。

図11は、ADDL結合ELISA検定で得られた光学密度を示す棒グラフである。この場合、B103細胞をADDLおよび6E10抗体と同時にインキュベート(「細胞、ADDL、6E10」の棒)し、B103細胞をADDLと同時にインキュベート(「細胞、ADDL」の棒)し、B103細胞を6E10抗体と同時にインキュベート(「細胞、6E10」の棒)し、B103細胞単独でインキュベートし(「細胞」の棒)、6E10抗体を単独でインキュベート(「6E10」の棒)し、または希釈物の光学密度(「ブランク」の棒)を読み取った。

図12は、ADDLで処置しない(「培地」)か、またはADDLと接触させた(「ADDL」)fyn+/+(野生型、「Fyn+」)、斜交陰影棒)またはfyn-/- (ノックアウト、「Fyn-」、中黒棒)マウスにおける%死細胞の棒グラフである。

図13は、ADDL(●)またはA $\beta$ 17-42(◇)を用いて星状細胞をインキュベートして得られたA $\beta$ 濃度( $\mu$ M)対活性化グリア(数)のグラフである。

図14は、ADDL未処置対照マウス(▲)またはADDL処置マウス(■)に関する時間(分)対%ペースライン細胞

16

体スパイク振幅のグラフである。

図15は、ADDLに曝露されなかった対照ラット海馬薄片(◆)対ADDLに曝露されたラット海馬薄片(■)に関する時間(分)対平均スパイク振幅のグラフである。

本発明の要約

本発明は、アミロイドベータ由来痴呆リガンドまたはアミロイドベータ由来拡散性リガンド(ADDL)と呼ばれる物質の新規の組成物を包含する。ADDLは、特定の細胞過程を活性化し得る可溶性非原繊維性オリゴマー構造に組み立てられるアミロイド $\beta$ ペプチドから成る。本発明の別の局面は、ADDLの生成、存在、受容体タンパク質結合および細胞活性の検定方法から成る。本発明は、ADDLの生成および/または活性を調節する(増大または低減する)化合物の検定方法および同定方法も包含する。このような化合物は、ADDLの作用による疾患、障害または症状の治療に用い得る。

発明の詳細な説明

アミロイド $\beta$ の神経毒性試料は、原繊維構造が存在するだけでなく、予期せぬことに、神経毒性に関与すると思われるいくつかの小球状タンパク質構造が存在する、ということが発見された。新規の方法を用いて、主にこれらの可溶性球状タンパク質アッセムブリーを含有し、原繊維構造を含有しない試料が、本明細書中に記載したように生成された。種々の方法により調製される異種試料では、遠心分離による大型原繊維形態のアミロイド $\beta$ の除去は、上清分画中のアミロイド $\beta$ のこれらの可溶性球状アッセムブリーを除去しない。これらの上清分画は、文献条件下で集合された非分別化アミロイド $\beta$ 試料より有意に高い神経毒を示す。これらの新規の、そして予想外の神経毒性可溶性球状形態を、本明細書中ではアミロイド $\beta$ 由来痴呆リガンドまたはアミロイド $\beta$ 由来拡散性リガンド(ADDL)と呼ぶ。3週間以上、標準文献条件(例えば、Pike et al., J. Neurosci., 13, 1676-1687, 1993)下で「時間を経た」アミロイド $\beta$ の試料は、これらの試料がADDLをほとんどまたは全く含有せずに主要原繊維構造を含有する場合でも、それらの神経毒性を損失する。球状ADDLが神経毒性であるというこの発見は、有毒形態のアミロイド $\beta$ を構成するのは原繊維構造であると、最近考えられているため(Lorenzo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 12243-12247, 1994; Howlett et al., Neurodegen. 4, 23-32, 1995)、特に意外である。

ADDLは、in vitroで生成され得る。単量体アミロイド $\beta$  1-42(または本明細書中にさらに記載されているようなその他の適切なアミロイド $\beta$ )を含有する溶液(例えば、DMSO溶液)が冷組織培地(例えば、F12細胞培地)中で希釈される場合には、約4℃で約2~約48時間インキュベートさせて、4℃で14,000gで約10分間、遠心分離すると、上清分画は、例えばニューロン細胞および脳薄片培地中で、高神経毒性である小型の可溶性オリゴマー小球を含有する。ADDLは、ある種の適切な薬

剤、例えばクラスチリン (ApoJ) としても知られている老人性プラークタンパク質) を用いてアミロイド $\beta$ と同時インキュベートすることによっても生成され得る。

このような上清分画の原子間力顕微鏡分析 (AFM) は、分画中に存在する多数の異なるサイズの小球を明示する。これらの小球は、約4.7nm~約6.2nmの範囲内である。この範囲内に入る小球の異なる種が存在し得る。即ち、高さ面のわずかな変異は、分析時に雲母表面に特定の種がどのように収容されるかに起因する。しかしながら、このわずかな変異にもかかわらず、主に2つのサイズ、即ち約4.7nm~約5.4nmと約5.7nm~約6.2nmが、典型的試料中のオリゴマー構造の約50%を構成する、と考えられる。約5.3nm~約5.7nmの寸法を有する異なるサイズ種の小球も存在し得る。AFMでの約4.7nm~約6.2nmの寸法の小球は、五量体および六量体形態のオリゴマーアミロイド $\beta$ タンパク質を包含すると思われる。約4.2nm~約4.7nmのAFMサイズ小球は、A $\beta$ 四量体に対応すると考えられる。約3.4nm~約4.0nmのサイズ小球は、三量体に対応すると思われる。約2.8nm~約3.4nmのサイズ小球は、二量体に対応する (Rohrer et al., J. Biol. Chem., 271, 20631-20635, 1996)。A $\beta$ モノマーAFMサイズは、約0.8nmから約1.8~2.0nmまでの範囲である。単量体および二量体アミロイド $\beta$ は、ニューロン細胞培養中、または器型脳薄片培養中では神経毒性でない。

したがって、本発明は、好ましくは少なくとも約3~約12個のアミロイド $\beta$ タンパク質を含んで成り、望ましくは少なくとも約3~約6個のアミロイド $\beta$ タンパク質を含んで成る単離可溶性非原繊維性アミロイド $\beta$ タンパク質アッセンブリー (即ちADDL) を提供する。特に、本発明は、アッセンブリーが、好ましくは、三量体、四量体、五量体および六量体からなる群から選択されるオリゴマー形態を含んで成る単離アミロイド $\beta$ タンパク質アッセンブリーを提供する。タンパク質アッセンブリーは、最適には、神経毒性活性を示す。高次構造のアミロイド $\beta$ タンパク質は、アミロイド $\beta$  1-42からだけでなく、可溶性非原繊維性アミロイド $\beta$ タンパク質アッセンブリーを安定に生成し得るあらゆるアミロイド $\beta$ タンパク質からも生成され得る。特に、アミロイド $\beta$  1-43も用い得る。位置1にビオチン (biotin) を有するアミロイド $\beta$  1-42も用い得る。N末端にシステインを有するアミロイド $\beta$  (例えば、 $\beta$  1-42または $\beta$  1-43) も用い得る。同様に、アミノ末端で切除されたA $\beta$  (例えば、特に、A $\beta$  1-42またはA $\beta$  1-43のアミノ酸残基1-8の配列の1つ又はそれ以上、全部までを失った)、またはカルボキシル末端に1または2つの余分のアミノ酸残基を有するA $\beta$  (例えば、A $\beta$  1-42または1-43) を用い得る。対照してみると、アミロイド $\beta$  1-40は、有毒であり得ないADDL様構造を一時的に生成し得るが、しかし、おそらくはタンパク質の短縮化性のために、これらの構造は安定でなく、そし

て水性溶液として単離され得ず、このことが、安定様式でこのような高次アッセンブリーを形成するその能力を制限する。

望ましくは、本発明の単離されたアミロイド $\beta$ タンパク質アッセンブリーは、原子間力顕微鏡で測定した場合に約4.7nm~約6.2nmの寸法の小球を包含する。さらに、好ましくは単離されたアミロイド $\beta$ タンパク質アッセンブリーは、原子間力顕微鏡で測定した場合に、約4.9nm~約5.4nm、または約5.7nm~約6.2nmの寸法の小球を包含する。特に、好ましくは本発明の単離されたアミロイド $\beta$ タンパク質アッセンブリーは、アッセンブリーの約30%~約82%、さらに好ましくは約40%~約75%が主に2つのサイズの小球、即ち原子間力顕微鏡で測定した場合に約4.9nm~約5.4nmと約5.7nm~約6.2nmのサイズの小球を包含する。しかしながら、タンパク質アッセンブリーが約5.3~約5.7nmのAFMサイズ小球を包含するの望ましい。

非変性剤ゲル電気泳動により、ADDLに対応するバンドは、約26kD~約28kDで泳動する。変性条件下 (例えば、15% SDS-ポリアクリルアミドゲル上) では、ADDLは、約22kD~約24kDで泳動するバンドを含み、そして約18~約19kDで泳動するバンドも含み得る。したがって、本発明は、好ましくは、非変性剤ゲル電気泳動で測定した場合に約26kD~約28kDの分子量を有する単離アミロイド $\beta$ タンパク質アッセンブリー (即ちADDL) を提供する。本発明は、好ましくは、15% SDS-ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動により測定した場合に約22kD~約24kDまたは約18~約19kDの分子量に対応するバンドとして泳動する単離アミロイド $\beta$ タンパク質アッセンブリー (即ちADDL) を提供する。

本発明はさらに、単離された可溶性非原繊維性アミロイド $\beta$ タンパク質アッセンブリーの製造方法を提供する。この方法はさらに任意に、

- (a) 単量体アミロイド $\beta$ タンパク質の溶液を生成し;
  - (b) タンパク質溶液を適切な培地中に希釈し;
  - (c) 約4℃で工程 (b) から得られた培地をインキュベートし;
  - (d) 約4℃で約14,000gで培地を遠心分離し;
  - (e) アミロイド $\beta$ タンパク質アッセンブリーを含有する場合は遠心分離から得られた上清を回収する;
- 工程を含んで成る。この方法の工程 (c) では、溶液は、望ましくは約2時間~約48時間、特に約12時間~約48時間、さらに好ましくは約24時間~約48時間、インキュベートされる。本方法の工程 (d) では、遠心分離は、好ましくは約5分間~約1時間、特に約5分間~約30分間、最適には約10分間、実施される。しかしながら、一般的には、これは、あらゆる発生期の原繊維またはプロトフィブリル構造を除去するためのまさに予告測定であり、そしてADDL調製の長期安定性が問題でない場合には特に、必要でない。

A $\beta$ タンパク質を工程(b)で希釈して、望ましくは最終濃度を約5nM~約500 $\mu$ M、特に約5 $\mu$ M~約300 $\mu$ Mの範囲、特に約100 $\mu$ Mとする。A $\beta$ タンパク質溶液が工程(b)においてその中で希釈される「適切な培地」は、好ましくは、ADDL生成を、促進しないならば、支持するあらゆる培地である。特に、F12培地(市販されており、ならびに実験室で容易に処方される)が、本発明のこの方法に用いるのに好ましい。同様に、「代用F12培地」も、望ましくは用い得る。代用F12培地は、市販されている、または実験室で処方されるF12培地とは異なる。本発明によれば、代用F12培地は、好ましくは以下の成分を包含する;N,N-ジメチルグリシン、D-グルコース、塩化カルシウム、硫酸銅五水和物、硫酸鉄(II)七水和物、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、重炭酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウムおよび硫酸亜鉛七水和物。

特に、本発明の合成F12培地は、任意に以下の物質を包含する:N,N-ジメチルグリシン(約600~約850mg/L)、D-グルコース(約1.0~約3.0g/L)、塩化カルシウム(約20~約40mg/L)、硫酸銅五水和物(約15~約40mg/L)、硫酸鉄(II)七水和物(約0.4~約1.2mg/L)、塩化カリウム(約160~約280mg/L)、塩化マグネシウム(約40~約75mg/L)、塩化ナトリウム(約6.0~約9.0g/L)、重炭酸ナトリウム(約0.75~約1.4g/L)、リン酸水素二ナトリウム(約120~約160mg/L)および硫酸亜鉛七水和物(約0.7~約1.1mg/L)。最適には、本発明の合成F12培地は以下を包含する:N,N-ジメチルグリシン(約766mg/L)、D-グルコース(約1.802g/L)、塩化カルシウム(約33mg/L)、硫酸銅五水和物(約25mg/L)、硫酸鉄(II)七水和物(約0.8mg/L)、塩化カリウム(約223mg/L)、塩化マグネシウム(約57mg/L)、塩化ナトリウム(約7.6g/L)、重炭酸ナトリウム(約1.18g/L)、リン酸水素二ナトリウム(約142mg/L)および硫酸亜鉛七水和物(約0.9mg/L)。さらに、代用F12培地のpHは、例えば、0.1M水酸化ナトリウムを用いて、望ましくは約7.0~約8.5、好ましくは約8.0のpHに調整される。

前記の方法は、さらに望ましくは、適切な薬剤、例えばクラステリンの存在下で、緩徐沈降タンパク質アッセムブリを形成することにより実行し得る。これは、例えば工程(c)にクラステリンを付加することにより成され、そして以下の実施例に記載される。

10%ピオチニル化アミロイド $\beta$  1-42(または他の適切なピオチニル化アミロイド $\beta$ タンパク質)の混入によりADDLが調製される場合、それらは神経細胞を用いた、そして、例えば蛍光アビジン複合体による標識化を用いる蛍光標示式細胞分取(FACS)器で実行される受容体結合検定に利用可能である。あるいは、アミロイド $\beta$ タンパク質中にピオチン混入する代わりに、ADDLを結合して蛍光的標識化分子を生成し得る、そしてすでに

光標識化複合体の一部である、別の試薬を用い得る。例えば、タンパク質アッセムブリは、アミロイドタンパク質が別の結合部分を含むように形成され得る。ここで、「結合部分」とは、本明細書中では、試薬を結合して蛍光的標識化合物または複合体を生成するために用い得る分子(例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ポリリシン等)を包含する。タンパク質アッセムブリが結合する「蛍光試薬」はそれ自身が直接蛍光を発する必要はないが、しかし代わりに、別の薬剤との結合により蛍光発光を可能にするだけである。例えば、タンパク質アッセムブリと結合する蛍光試薬は $\beta$ アミロイド特異的抗体(例えば6E10)を包含し、蛍光は蛍光二次抗体の使用に世って発生される。

他の実験とともに、ラットCNS B103細胞のFACSスクリーン分析を、ADDLインキュベーションを用いない場合と用いた場合とで、実施した。これらのそしてさらに別の試験の結果は、細胞表面との結合は飽和可能であり、トリプシンによる短時間処理は、細胞表面のサブセットを選択的に除去し、ADDLの結合を排除する、ということを確認する。トリプシンを用いた短時間処理によりB103細胞の表面から切断可能なタンパク質は、B103細胞または培養一次ラット海馬ニューロンとのADDL結合も防止し得る。これらの結果はすべて、ADDLが特定の細胞表面受容体を介して作用し、そしてADDLにより媒介される早期事象(即ち殺細胞前事象)がADDLの生成および活性(受容体結合を含む)を阻止する化合物により有益に制御され得る(例えば、治療または研究のために)、ということをサポートする。

したがって、本発明は、ADDLの受容体結合を調節する(即ち促進するかまたは阻止する)化合物を同定するための方法を提供する。この方法は、好ましくは以下の工程からなる:

- (a) 試験物質との接触の存在下または非存在下で、ニューロン細胞の別々の培養物をタンパク質アッセムブリと接触させ;
- (b) タンパク質アッセムブリと結合する、蛍光性である試薬を付加し;
- (c) 蛍光標示式細胞分類により別々の細胞培養物を分析し;
- (d) 培養物の蛍光を比較し、被験化合物の非存在下でタンパク質アッセムブリと接触させた対応する培養と比較して、タンパク質アッセムブリの受容体結合を阻止する化合物を培養の蛍光低減を引き起こすものと同定し、そして受容体結合を促進する化合物を培養の蛍光増大を引き起こすものとして同定する。培養物の蛍光を比較する。あるいは、タンパク質複合体にそこにおよびそれ自体結合する蛍光物質を添加する代わりに、望ましくはタンパク質アッセムブリが、蛍光試薬を結合し得る結合部分を含有するように調製されたアミロイド $\beta$  1-42タンパク質(または別のアミロイド $\beta$ )から形成さ

れるように、本方法が実行される。

同様に、タンパク質アッセンプリーの形成または受容体結合を調節する（即ち、促進または阻止する）化合物を同定するための方法であって、以下の工程から成る方法を用い得る：

(a) 被験化合物と混合された、またはされていないアミロイドβの別々の試料を調製し；

(b) 別々の試料中にタンパク質アッセンプリーを形成し；

(c) ニューロン細胞の別々の培養を別々の試料と接触させ；

(d) タンパク質アッセンプリーと結合する、蛍光性である試薬を付加し；

(e) 蛍光標式細胞分類により別々の細胞培養を分析し；

(f) 培養物の蛍光を比較し、被験化合物の非存在下でタンパク質アッセンプリーと接触させた対応する培養と比較して、タンパク質アッセンプリーの形成または受容体結合を阻止する化合物を培養の蛍光低減を引き起こすものと同定し、そしてタンパク質アッセンプリーの形成または受容体結合を促進する化合物を培養の蛍光増大を引き起こすものとして同定される。さらに、タンパク質複合体におよびそれ自体結合することができる蛍光試薬を付加する代わりに、望ましくは、タンパク質アッセンプリーが、蛍光試薬を結合し得る結合部分を包含するように調製されたアミロイドβタンパク質から形成されるように、本方法は実行され得る。

さらに任意には、同一様式で、但しタンパク質アッセンプリーの形成前に被験化合物を付加するかまたは付加しないで、被験化合物をタンパク質アッセンプリーの形成後に付加するかまたは付加せず、培養物の蛍光を処理した培養物の蛍光と比較する。この状況では、化合物がタンパク質アッセンプリー前に付加される場合にのみ、被験化合物の非存在下でタンパク質アッセンプリーと接触させた対応する培養物と比較して、タンパク質アッセンプリーの形成を阻止する化合物が培養の蛍光低減を引き起こすものとして同定され、そしてタンパク質アッセンプリーの形成を促進する化合物が培養の蛍光増大を引き起こすものとして同定される。

これに対して、化合物がタンパク質アッセンプリーの前または後に付加される場合、被験化合物の非存在下でタンパク質アッセンプリーと接触させた対応する培養物と比較して、タンパク質アッセンプリーの受容体結合を阻止する化合物が、培養の蛍光低減を引き起こすものとして同定され、そしてタンパク質アッセンプリーの受容体結合を促進する化合物が、培養の蛍光増大を引き起こすものとして同定される。

同様の様式で、細胞ベースの検定、特に細胞ベースの酵素結合免疫吸着剤検定 (ELISA) を、本発明にしたがって用いてADDL結合活性を査定するために使用し得る。

特に、本方法は、細胞表面受容体のタンパク質アッセンプリーの結合を検出するために用い得る。この方法は、好ましくは以下の工程から成る：

(a) アミロイドβタンパク質からタンパク質アッセンプリーを形成し；

(b) ニューロン細胞の培養物をタンパク質アッセンプリーと接触させて；

(c) 前記のタンパク質アッセンプリーと結合する（複合体形成成分（例えばビオチンまたはその他の適切な薬剤）を含めた）抗体（例えば6E10）を付加し；

(d) 非結合抗体を洗い落とし；

(e) 前記の複合体形成成分により、前記のタンパク質アッセンプリーに結合される前記の抗体に酵素（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ）を結合せしめ；

(f) 前記の酵素により切断される無色基質（例えばABTS）を付加して変色を生じさせ；そして

(g) 前記のタンパク質アッセンプリーの受容体結合の測定と同様に、前記の変色（例えば分光測光的に）または変色の速度を確定する。前記のように、抗体はADDLを検出し得る任意の抗体（例えば、アミロイドβ上の曝露部位に向けられる抗体）であり、そして抗体複合体形成成分は検出の手段と結合し得る任意の薬剤（例えば、酵素）である。酵素は、検出の手段（例えば、基質の切断による変色）を提供する任意の成分（例えば、おそらくはタンパク質以外のものでも）であることができ、さらに別の成分（例えば二次抗体）により、タンパク質アッセンプリーに結合される抗体に結合され得る（例えば、共有または非共有）。さらに、好ましくは本発明により、検定実施前に、細胞を固体基体（例えば、組織培養プラスチック）に附着させる。望ましくは、工程（b）は、ADDLが細胞と結合し得るように、前記と同様に実施すべきであることは、言うまでもない。同様に、好ましくは工程（c）は、抗体をADDLに結合させるのに十分な時間（例えば約10分間～約2時間、望ましくは約30分間）、そして適切な条件（例えばほぼ室温で、好ましくは静かに攪拌しながら）下で、実行すべきである。さらに、適切な遮断剤を用いて、当業者に既知のような適切な遮断工程を実行して、抗体のあらゆる非特異的結合を低減し得る。ELISAは当業者によく知られており、当業界で既知のように検定に対する修正を成し得る。

検定はまた、望ましくは、タンパク質アッセンプリーの形成または受容体結合を調節する（即ち促進または阻止する）化合物を同定するために実行し得る。この方法では、被験化合物に関する前記の検定と同様に、被験化合物は、細胞をADDLと接触させる前に、ADDL調製物に付加される。したがって、この検定は、タンパク質アッセンプリーの形成を調節する化合物を検出するために用い得る（例えば、前記と同様に）。さらに、被験化合物は、細胞を接触させる前に（しかしADDL生成の後に）ADDL調製物に、あるいはADDLと接触する前に細胞に添加さ