

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-501204

(P2004-501204A)

(43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1.15)

| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------|----------------|-------------|
| A 6 1 K 38/00 | A 6 1 K 37/02 | 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 K 39/395 | A 6 1 K 39/395 | D 4 C 0 8 5 |
| A 6 1 P 21/00 | A 6 1 K 39/395 | N |
| A 6 1 P 25/02 | A 6 1 K 39/395 | U |
| A 6 1 P 25/14 | A 6 1 P 21/00 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 96 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2002-505026 (P2002-505026) | (71) 出願人 | 503004149 |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年6月28日 (2001.6.28) | | プラナ バイオテクノロジー リミテッド |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成14年12月25日 (2002.12.25) | | オーストラリア国、ビクトリア州 320 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/AU2001/000786 | | 5、サウス メルボルン、ドーカス スト |
| (87) 国際公開番号 | W02002/000245 | | リート 100番地、レベル 1 |
| (87) 国際公開日 | 平成14年1月3日 (2002.1.3) | (71) 出願人 | 500117314 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/214, 779 | | ザゼネラル ホスピタル コーポレーシ |
| (32) 優先日 | 平成12年6月28日 (2000.6.28) | | ョン |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | アメリカ合衆国 マサチューセッツ州02 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/242, 177 | | 114、ボストン、フルーツ ストリート |
| (32) 優先日 | 平成12年10月23日 (2000.10.23) | | 55 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (74) 代理人 | 100107685 |
| | | | 弁理士 高橋 健 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経毒オリゴマー

(57) 【要約】

本発明は異常なタンパク質凝集に関連するアルツハイマー病や他の状態の治療又は緩和のための方法及び組成物に関する。本発明は、とりわけ、アルツハイマー病、パーキンソン病、及び白内障の免疫療法のための方法及び組成物に関する。一つの側面で、本発明は酸化的損傷及びチロシン架橋の形成と関連する特異的タンパク質の病的な凝集及び蓄積により特徴付けられる状態を予防し、治療し又は緩和する方法であって、一つ以上のチロシン架橋化合物、そして任意選択的に該化合物と錯体を形成している銅イオンを含むものの免疫化に有効な用量を用いて、このような治療を必要とする被験者を免疫化する工程を含む方法を提供する。または、チロシン架橋化合物に対する受動免疫を使用してもよい。予防用又は治療用の組成物及び診断方法も開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ある状態を予防、治療又は緩和する方法であって、この方法がそのような必要のある被験者を一つ以上のチロシン架橋化合物の免疫化有効用量を用いて免疫化する工程を含むものであり、該状態が酸化的損傷及びチロシン架橋の形成と関連する特異的タンパク質の病的凝集及び蓄積により特徴付けられるものである方法。

【請求項 2】

該特異的タンパク質の病的な凝集形態がチロシン架橋部分を含むものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

該チロシン架橋化合物が該特異的タンパク質の病的な凝集形態の免疫原性部分であるペプチドであり、該ペプチドが該架橋したチロシンの上流又は下流の残基と連結した架橋チロシン部分を含むものである、請求項 2 記載の方法。

10

【請求項 4】

該化合物中のチロシン架橋が銅イオンの存在下での酸化により得られうるものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

該チロシン架橋化合物がジチロシン架橋化合物である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

該チロシン架橋化合物が銅イオンと錯体形成しているものである、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 7】

投与される各用量が僅か $1 \mu\text{M}$ の銅しか含まないことを条件として、銅イオンのジチロシンに対する比が 3 : 1 に等しいかそれ未満である、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

該化合物がそれ自体免疫原性である担体タンパク質に結合されているものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

該担体タンパク質が破傷風トキソイド、キーホール・リンペット・ヘモシアニン、又はアルブミンから成る群より選択されるものである、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

該化合物がアジュバントと一緒に投与されるものである、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 11】

該特異的タンパク質の免疫原性部分が免疫原性である最小部分である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 12】

該状態がアルツハイマー病であり、該特異的タンパク質が A_β であり、そして該チロシン架橋化合物がヒト A₁₋₄₀ 又は A₁₋₄₂ のアミノ酸配列中のチロシン 10 の周りの配列に由来するチロシン架橋ペプチドである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

該チロシン架橋ペプチドがジチロシンを含むものである、請求項 12 記載の方法。

40

【請求項 14】

チロシン架橋ペプチドが銅イオンと錯体を形成しているものである、請求項 12 記載の方法。

【請求項 15】

下記の追加的工程、即ち

病的に凝集している特異的タンパク質中のチロシン架橋の優勢な形態を同定する工程、及び

チロシン架橋の該優勢な形態の一つ以上を含むチロシン架橋化合物を一つ以上合成する工程、

を含む、請求項 1 記載の方法。

50

【請求項 16】

ある状態を予防、治療又は緩和する方法であって、該状態が酸化的損傷と関連する特異的タンパク質の病的な凝集及び蓄積により特徴付けられるものであり、該特異的タンパク質の病的な凝集形態がチロシン架橋を含むものであり、該方法がある抗体又は抗体断片の有効量をこのような治療を必要とする被験者に投与する工程を含むものであり、該抗体又は抗体断片がチロシン架橋化合物に対して形成されるものであり、該化合物が該特異的タンパク質の病的に凝集した形態の免疫原性部分であり且つチロシン架橋を含むものであり、そして該抗体及び抗体断片が該特異的タンパク質の病的に凝集した形態に特異的に結合できるものである方法。

10

【請求項 17】

該抗体がポリクローナル抗体である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

該抗体がヒト起源のものである、請求項 16 記載の方法。

【請求項 19】

該抗体がモノクローナル抗体である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 20】

該抗体がヒト化されたものである、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

該抗体又は抗体断片が該特異的タンパク質の病的に凝集した形態と特異的に反応し、且つ、該特異的タンパク質の非凝集形態とは明確には反応しないものである、請求項 16 記載の方法。

20

【請求項 22】

該化合物中のチロシン架橋が銅イオンの存在下での酸化により得られうるものである、請求項 16 記載の方法。

【請求項 23】

請求項 1 に記載の方法において使用するための予防用又は治療用の組成物であって、薬学的に許容しうる担体と共にチロシン架橋化合物を含むものである組成物

【請求項 24】

該チロシン架橋化合物が銅イオンと錯体を形成しているものである、請求項 23 記載の予防用又は治療用の組成物。

30

【請求項 25】

さらにアジュバントを含む、請求項 23 記載の予防用又は治療用組成物。

【請求項 26】

請求項 16 に記載の方法に使用するための予防用又は治療用組成物であって、該組成物が薬学的に許容しうる担体と共にチロシン架橋化合物に対して形成された抗体又は抗体断片を含むものであり、該化合物が該特異的タンパク質の病的に凝集した形態の免疫原性部分であり且つチロシン架橋を含むものであり、そして該抗体又は抗体断片が該特異的タンパク質の病的に凝集した形態に特異的に結合できるものである組成物。

40

【請求項 27】

酸化的損傷及びチロシン架橋の形成と関連する特異的タンパク質の病的凝集及び蓄積により特徴付けられる状態を診断する方法であって、該状態に罹患している疑いのある被験者から得た生体液の試料を、チロシン架橋を含む分子の存在について検定する工程を含む方法。

【請求項 28】

酸化的損傷及びチロシン架橋の形成と関連する特異的タンパク質の病的凝集及び蓄積により特徴付けられる状態を診断する方法であって、該状態に罹患している疑いのある被験者から得た生体液を、チロシン架橋を含む分子に対して生じた抗体の存在について検定する

50

工程を含む方法。

【請求項 29】

該分子がジチロシンを含むものである、請求項 27 又は請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

該生体液が血液、血漿、血清、脳脊髄液、尿、及び唾液からなる群より選択されるものである、請求項 27 又は請求項 28 記載の方法。

【請求項 31】

該状態がアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、運動ニューロン疾患、白内障、パーキンソン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンティングトン病、レーヴィ小体の形成を伴う痴呆、多系統萎縮症、ハレルポードン-シュパッツ病、及び瀰漫性レーヴィ小体病からなる群より選択されるものである、請求項 1、請求項 16、請求項 27 又は請求項 28 記載の方法。

10

【請求項 32】

該状態がアルツハイマー病又はパーキンソン病である、請求項 1、請求項 16、請求項 27 又は請求項 28 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、アルツハイマー病及び異常なタンパク質の凝集に関連する他の状態の治療又は緩和のための方法及び組成物に関する。具体的には、本発明は、アルツハイマー病、パー

20

【0002】

発明の背景

アルツハイマー病 (AD) に特有のアミロイド病変は、体液中に見られ且つ通常可溶性タンパク質である 39 ~ 43 個のアミノ酸からなるタンパク質であるアミロイド (A) (グレンナー & ウォング、1984) から主に構成される。アミロイドの形成は該病の病因と結びついているため、A の異化の阻害を招く神経化学的変化及び新皮質でのその蓄積を同定することは AD の病因に対する重要な手がかりとなるであろう。

【0003】

AD に関連する基本的な病理学、遺伝学的感受性及び生物学はより明瞭になりつつあるが、該疾病を予防又は治療するのに有効な薬物を開発するための合理的な化学的基礎及び構造的基礎は依然理解しにくい。AD の遺伝学は A の代謝が上に示した該疾病の病因と深く関係していることを示す一方、AD の治療のための薬物はこれまで「認識強化剤 (cognition enhancer)」に重点的に取り組んできた。これらの薬剤は根本的な病気の過程に対処していない。これらの薬物はごく限られた成功しか得られていない。

30

【0004】

AD における狂った神経化学的環境の性質はアミロイド A の翻訳後修飾から一部推定され得る。生体系から抽出された A は正常ではドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 上を見掛け約 4 kD のモノマーとして移動する (ショーヅら、1992)。しかながら、AD に冒された死後脳の標本から抽出された A は、SDS、尿素及びギ酸に耐性のオリゴマーとして SDS-PAGE 上を移動する (マスターズら、1985、ローエルら、1996、チェルニーら、1999)。

40

【0005】

神経炎症性局面及び血管アミロイドから抽出されたこれらの SDS 耐性オリゴマーの、マトリックス支援レーザー脱着イオン化-質量分析 (MALDI-MS) は、共有結合で架橋した二量体及び三量体の A 種の存在を示している (ローエルら、1996)。

【0006】

合成の A₁₋₄₀ 及び A₁₋₄₂ は、SDS-PAGE 上を見掛け単量体として正常に移動するが、インキュベーション時に見掛け上より高分子量の種を形成する (ブルディ

50

ックら, 1992)。この過程は酸化系への暴露により促進される(ディルクスら, 1992、アトウッドら, 1997)。

【0007】

合成されたヒトA β のチロシン残基はペルオキシダーゼで触媒される酸化系により架橋され得るので、チロシン架橋はインビボにおけるA β オリゴマー形成の一機構として提唱されてきた(ガレアッチら, 1999)。ヒトのA β と違って、ラットのA β はチロシン残基が欠如している(アトウッドら, 1997)、それは金属で触媒される酸化的オリゴマー形成に耐性であり、これがおそらくこれらの動物におけるアミロイド沈着の希少性を説明している(ポーガンとピーターズ, 1981)。

【0008】

タンパク質のチロシン架橋は酸化的ストレスの敏感なマーカーである。共有結合の炭素-炭素架橋又は炭素-酸素架橋が一つのチロシン残基及び/又はジチロシン残基の間で形成され、幾つかの安定な蛍光性の反応生成物を生ずる(グロスとシザー, 1959、アマドラ, 1984、ヤコブラ, 1996)。チロシンフリーラジカルの主な反応生成物は、強く蛍光を発するアミノ酸である3,3'-ジチロシン(DT)、3,3',3'-トリチロシン(TT)及びプルチェロシン(pulcherosine)(P)、並びに蛍光を発しないイソジチロシン(iso-DT)である(グロスとシザー, 1959、アマドラ, 1984、ヤコブラ, 1996、ヘインツェら, 1993)。DT及び3-ニトロチロシンのレベルは、AD患者の脳の海馬及び新皮質の領域において正常な脳の同領域と比べて高く、AD患者の脳室の脳脊髄液でも高い(ヘンスレイら, 1998)。

10

20

【0009】

チロシン架橋は、パーキンソン病などの他の神経変性疾患及び α -シヌクレイン原繊維が沈着する他の状態においても重要でありうる。これらは、パーキンソン病自体、レーヴィ小体の形成を伴う痴呆、多系統萎縮症、ハレルボーデン-シュパッツ病、及び瀰漫性レーヴィ小体病を含む。硝化剤への組換え α -シヌクレインの暴露はチロシン残基のニトロ化及びチロシンの酸化を生じてDTを形成し、これは α -シヌクレインの架橋をもたらす安定な凝集体を形成する(サウザら, 2000)。同じ著者は、硝化シヌクレインに対して生じるモノクローナル抗体が種々のシヌクレイノパチーにおいてレーヴィ小体及びグリア細胞の封入体に特異的に結合することも見出した(デュダら, 作成中、サウザら, 2000年で参照された)。

30

【0010】

本発明者らは、ヒトのアミロイドに由来するA β がチロシン架橋を含み且つジチロシン及びトリチロシンの両方の架橋種を含むことをここに見出した。これらの架橋は、例えば合成したヒトA β をペルオキシダーゼ及びH₂O₂と又は銅イオンの存在下でH₂O₂とインキュベートすることによりインビボで再現できる。これらの修飾物はプロテアーゼ耐性である、従って、本発明者らは、H₂O₂及びペルオキシダーゼ又は銅イオンとA β との異常な相互作用により惹起されるADのチロシン架橋が神経毒A β オリゴマーの形成並びにA β の沈着に寄与すると提唱する。故に、全長のA β ではなく、低分子量のチロシン架橋化合物に対する免疫化が、A β の完全体又はその大きな断片で免疫することにより別の方法で誘導されうるであろう自己免疫合併症を誘発する危険性無しに、ADの治療又は

40

【0011】

チロシンを介したタンパク質の共有結合架橋を生じる酸化過程は、特定のタンパク質の病的な凝集及び蓄積により特徴づけられる他の障害にも関連している。従って、これらの状態も本発明の方法による予防又は治療の影響を受けやすいと考えられる。

【0012】

幾つかの先行技術の刊行物が本明細書で引用されるが、この引用がこれらの文献のいずれ

50

もオーストラリア国又は他の何らかの国において一般的常識の一部を形成するということを承認するものではないことは明瞭に理解されるであろう。

【0013】

発明の概要

第一の側面において、本発明はある状態を予防、治療又は緩和する方法であって、該状態が酸化損傷及びチロシン架橋の形成に関連する特定のタンパク質の病的な凝集及び蓄積により特徴づけられるものであり、該方法が、ジチロシン、トリチロシン、テトラチロシン（プルチエロシンとしても知られる）、O-チロシン及びm-チロシンなどの酸化チロシンのオーソログ（orthologues）、ニトロチロシン、及びチロシン架橋を含むペプチド、及び任意選択的に該化合物と錯体形成した銅イオンも含むペプチドから成る群より選択される一つ以上の化合物の免疫に有効な用量を用いて、その必要性のある被験者を免疫化する工程を含むものである方法を提供する。これらの化合物は集合的に本明細書中で「チロシン架橋化合物」と呼ぶ。

10

【0014】

当業者は、免疫に有効な用量の化合物がチロシン架橋化合物に結合できる抗体を誘発するものであることを認識するであろう。このような者は特定のチロシン架橋化合物が抗体を誘発する用量であることを認識するはずである。

【0015】

好ましい一実施態様において、特定のタンパク質の病的な凝集形はチロシン架橋部分を含む。特に好ましい実施態様において、該チロシン架橋化合物は、特定のタンパク質の病的な凝集形の免疫原性の部分であるペプチドであり、該ペプチドは架橋チロシンの上流及び下流で残基と結合した架橋チロシン部分を含む。

20

【0016】

好ましい実施態様において、該チロシン架橋化合物はジチロシン架橋化合物である。

【0017】

投与される個々の用量が僅か1 μ Mの銅しか含まないという条件の下で、ジチロシンの1当量当たり3当量までの銅が使用されうる。

【0018】

任意選択的に、免疫化に使用される該化合物は、破傷風トキソイド、キーホール・リンペット・ヘモシアニン、又はアルブミンなどのそれ自体が免疫原である担体タンパク質に結合させる。また任意選択的に、該化合物は、ミョウバン、モノホスホリル脂質、ムラミルペプチド、QS21などのISCOM、その他のアジュバントとともに投与されうる。当業者は適切な担体及びアジュバントを十分に承知している。

30

【0019】

チロシン架橋を含むペプチドが使用される場合、これは該状態に関連する特定のタンパク質の最小の部分且つ免疫原の部分であることが好ましい。該タンパク質は架橋チロシンの上流及び下流で残基に結合したジチロシン部分により構成される。該状態がアルツハイマー病である場合、チロシン架橋を含むペプチドはヒトのA₁₋₄₀又はA₁₋₄₂のアミノ酸配列におけるチロシン10を囲む配列に由来することが好ましい。

【0020】

本発明の全ての側面において、チロシン架橋を含むペプチドが使用される場合、該チロシン架橋は銅イオンの存在下における酸化により得られうるものであることが好ましい。

40

【0021】

該ペプチドはジチロシンと錯体形成した銅イオンをも含むことがより好ましい。

【0022】

免疫化は、皮下、筋肉内若しくは静脈への注射、粘膜表面への塗布、又は例えば軟膏での局部投与を含む任意の便宜的な経路により投与されうる。

【0023】

投与される化合物の用量は、個々の化合物の性質、患者の体重、年齢及び健康の一般的状態、並びにアジュバントが使用されるか否かに応じて異なる。該用量は0.1 μ gから2

50

00mg、より好ましくは1mgから50mg、最も好ましくは10mgから20mgのDTの範囲にあることが予定される。単回の免疫化が施されうるが、複数回の免疫化、例えば1ヶ月から12ヶ月の間、より好ましくは四ヶ月の間、一週間に一回、が投与されることが好ましい。ブースター系は6ヶ月から12ヶ月後に施されうる。この免疫応答はDT抗体を測定することにより監視され、ELISAなどの任意の簡便な検定系が用いられうる。

【0024】

任意選択的な実施態様において、該方法は、病的に凝集した特定のタンパク質におけるチロシン架橋の主形態を同定する追加の工程、並びにチロシン架橋の一つ以上の主形態を含む一つ以上のチロシン架橋化合物を合成する工程も含む。

10

【0025】

本発明のこの側面の代替的形態において、該免疫化は受動的であってもよい。従って、本発明はある状態を予防、治療又は緩和する方法であって、該状態が酸化的損傷に関連する特定のタンパク質の病的な凝集及び蓄積により特徴づけられるものであり、特定のタンパク質の該病的に凝集した形態がチロシン架橋を含むものであり、該方法が有効量の抗体又は抗体断片をこのような治療の必要がある被験者に投与する工程を含むものであり、該抗体又は抗体断片がチロシン架橋化合物に対して形成されるものであり、該化合物が特定のタンパク質の病的に凝集した形態の免疫原部分であり且つチロシン架橋を含むものであり、

そしてこの抗体又は抗体断片が該特定タンパク質の病的に凝集した形態に特異的に結合できるものである

20

方法を提供する。

【0026】

該抗体はポリクローナルであってもモノクローナルであってもよい。該抗体がポリクローナルである場合、これはヒト起源であることが好ましく、例えば健常個体から得たヒト血清のプールに由来しうる。または、チロシン架橋化合物に対して過免疫化された個体から得られる血清が用いられうる。過免疫化の計画は当分野で知られている。該抗体は任意の簡便な方法により血清から単離されうる。種々の適切な方法が当分野で知られている。該抗体がモノクローナルである場合、これはヒト化されていることが好ましい。F(ab')₂、Fv又はモノクローナルscFvなどの抗体の抗原結合断片が本発明の範囲内であることは明瞭に理解されるであろう。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を生産する方法及び精製する方法、並びにヒト化モノクローナル抗体又はscFv断片の組換え生産方法は当分野で周知である。例えば、ハルローとレーン(1988)、WO90/07861、及びWO92/01047を参照せよ。ヒト化モノクローナル抗体はトランスジェニック哺乳動物でも生産されうる。例えばWO91/10741及びWO93/12227を参照せよ。

30

【0027】

該抗体は該特定のタンパク質の病的に凝集した形態と特異的に反応しそして該タンパク質の非凝集形態とは明確には反応しないことが好ましい。

【0028】

能動免疫化又は受動免疫化のいずれかの後、該患者を臨床的改善について監視する。この改善はわずか一週間以内に始まりうるが、6週目で観察されることがより多く、そして12ヶ月もの間かかることもある。関連状態を患う患者の監視に用いられる標準的な臨床指標が用いられる。主治医は使用に最も適した試験を承知している。

40

【0029】

該治療が予防的なものである場合、該患者は該状態の進行の兆候について監視される。該患者は遺伝連鎖の結果として例えば家族性のアルツハイマー病又はハンティングトン病の危険性がありうる。

【0030】

従って、第二の側面において、本発明は本発明の方法で使用する予防用又は治療用の組成

50

物を提供する。該組成物は、薬学的に許容しうる担体とともにチロシン架橋化合物を含み、任意選択的にアジュバント、及び/又は該化合物と錯体形成した銅イオンをさらに含む。

【0031】

第二の側面の代替実施態様において、本発明は本発明の受動免疫化方法で使用するための予防用又は治療用の組成物を提供する。該組成物は、上で定義したチロシン架橋化合物に対する抗体、又は該チロシン架橋化合物に結合できるその断片を薬学的に許容しうる担体とともに含む。

【0032】

第三の側面において、本発明は、酸化的損傷及びチロシン架橋の形成と関連する特定のタンパク質の病的な凝集及び蓄積により特徴づけられるある状態の診断方法を提供する。この方法は、ジチロシン、トリチロシン、テトラチロシン、O-チロシン及びm-チロシンなどの酸化されたチロシンのオーソログ、ニトロチロシン、及びチロシン架橋を含むペプチドから成る群より選択される化合物の存在について、該状態に罹患している疑いのある被験者から得られた体液の試料を検定する工程を含む。

【0033】

一つの代替的側面において、該方法は、チロシン架橋化合物に対する抗体の存在について、該状態に罹患している疑いのある被験者から得られた体液を検定する工程を含む。

【0034】

該体液は、血液、血漿、血清、脳脊髄液、尿、及び唾液から成る群より選択されることが好ましい。該化合物はジチロシンであることが好ましい。

【0035】

該検定は任意の適切な手段により実施されうるが、チロシン架橋化合物に対する抗体を用いるELISA検定により実施するのが最も簡便である。このような検定は逆にチロシン架橋化合物に対する抗体を検出するために用いられうる。該抗体はモノクローナル抗体、又はモノクローナル抗体の混合物であることが好ましい。または、該検定は325nmの励起波長及び350~500nmの放射波長で蛍光を測定することにより実施されうる。

【0036】

本発明の三側面全てにおいて、該状態は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、運動ニューロン疾患、白内障、パーキンソン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンテイングトン病、レーヴィ小体の形成を伴う痴呆、多系統萎縮症、ハレルボーデン-シュパッツ病、及び瀰漫性レーヴィ小体病、又は白内障から成る群より選択されることが好ましい。

【0037】

該状態はアルツハイマー病又はパーキンソン病であることがより好ましい。

【0038】

この明細書の目的のため、「含む (comprising)」という単語は「含むが限定しない」ことを意味し且つ「含む (comprises)」という単語は対応する意味を有することが明瞭に理解されるであろう。

【0039】

発明の詳細な説明

本発明は下記の非限定的な実施例及び図面のみを参照して詳細に記載する。

本明細書で用いられる略語は下記のとおりである。

| | |
|----------|--------------------|
| A D | アルツハイマー病 |
| D T | 3, 3' - ジチロシン |
| T T | 3, 3', 3' - トリチロシン |
| P | プルチェロシン |
| イソ - D T | イソジチロシン |

【0040】

実験手法

試薬及び A ペプチドの調製

10

20

30

40

50

オリゴマー A は前述したようにヒトの A D に冒された脳のアミロイド斑から抽出した (ローエルら、1996)。精製したアミロイド A をギ酸中で可溶化した後、使用直前に 100 mM の重炭酸アンモニウム (pH 7.5) で 5 回交換しながら透析した。

【0041】

ヒトの A₁₋₄₀、A₁₋₄₂ 及びラットの A₁₋₄₀ を合成し、精製しそして HPLC 分析、アミノ酸分析及びダブリュ・エム・ケック・ファンデーション・バイオテクノロジー・リソース・ラボラトリー (エール大学、ニューヘーブン、コネチカット州) の質量分析により特性を決定した。確認のための研究はクオリティー・コントロール・バイオケミカルズ社 (ホプキントン、マサチューセッツ州) により合成されたペプチドを用いて実施した。

【0042】

個々のペプチドは HPLC による単一のピークとして同定された。合成された A ペプチドは、二重に脱イオン化した水に 0.5 ~ 1.0 mg/mL の濃度で溶解し、3 分間超音波破碎した後、10,000 g で 20 分間遠心分離し、その上清 (A ストック) は実験の日に使用した。A ペプチドストックの濃度は 214 nM での分光学的吸光度により又は前述したように (アトウッドら、1998) ミクロ BCA タンパク質検定 (ピアース社、ロックフォード、イリノイ州) により測定した。

【0043】

使用前に、全ての緩衝液及び金属イオンのストック溶液を 0.22 µm のフィルター (ゲルマン・サイエンスズ、アナーバー、ミシガン州) を通して濾過し粒状物質を取除いた。他の試薬は全て分析等級又はより純粋であった。ホースラディッシュペルオキシダーゼはシグマ化学社 (セントルイス、ミズーリ州) から得た。

【0044】

ジチロシン及びチロシンで架橋した A の調製及び蛍光分析

DT 標準品はホウ酸緩衝液 (50 mM、pH 9.5) で可溶化された L - チロシン (1 mg/mL) を H₂O₂ (5 mM) 及びホースラディッシュペルオキシダーゼ (7.5 µg/mL) とともに 37 °C で 1 日間インキュベートすることにより作製した (アマドラ、1984)。

【0045】

架橋した A はホウ酸緩衝液 (50 mM、pH 9.5) 中で A (50 µM) を H₂O₂ (1 mM) 及びペルオキシダーゼ (7.5 µg/mL) とともに 37 °C で 5 日間インキュベートすることにより作製した。生理的に近い条件の下でこの反応を研究するための別個の実験においては、A₁₋₄₂ をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.4) で 10 nM まで希釈し 1 µM の H₂O₂ 及びペルオキシダーゼ (7.5 µg/mL) と 37 °C で 5 日間インキュベートした。該インキュベーションの後、該試料を凍結乾燥し該ペプチドをウェスタンブロットにより検出され得る濃度範囲にもっていった (下記参照)。

【0046】

反応生成物を高速相 (fast phase) 液体クロマトグラフィー (FPLC) により分離した。過剰のホウ酸塩はクロマトグラフィーの前に 0 の遠心分離によりまず試料から沈殿させた。次に、試料を 0.25 % の TFA の添加により酸性にし、残りの不溶性物質を濾過 (0.22 µm の孔サイズ) により取除いた。試料を 3 mL のリソース RPC カラム (ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン) 上にかき、該カラムを 0.1 % の TFA を含む水で洗浄した。結合種は 0.1 % の TFA を含む 0 ~ 100 % 直線勾配のアセトニトリルで 45 分間以上 1 mL / 分で溶出し、0.5 mL の画分として回収した。画分を乾燥させ、水でもどし、そして蛍光 (励起 330 nm、放射 400 nm) 及び UV 吸光度 (284 nm) によりジチロシンについて検定した。ピークの画分は更に質量分析により特性決定し、ジチロシンを減衰係数 (E_{315 nm} = 8380 M⁻¹ cm⁻¹、マレンシクら、1996) を用いて定量した。

【0047】

溶液はヒタチ F - 4500 分光蛍光光度計を用いて蛍光化合物の存在について分析した。

10

20

30

40

50

D T、T T及びPは特徴的な放射スペクトル (λ_{ex} 325 nm、 λ_{em} 350 ~ 500 nm) を有し、これらはチロシン及びトリプトファン(これらの波長で蛍光を発しない) と全く異なっている。0 ~ 50 μ M間でジチロシン濃度が増加するにつれこの放射範囲で蛍光の直線的増大があった。

【0048】

MALDI - TOF質量分析

SDS耐性であるオリゴマーのヒトアミロイドに由来するA の試料を6NのHClを用いて105 で48時間真空中で加水分解した。この後、試料をハーバード大学の質量分析設備で液体クロマトグラフィーMALDI - TOF質量分析(LC - MS)により分析した。

10

【0049】

質量スペクトルは、C18逆相カラム(2.1 mm x 250 mm)を取り付けたHP1100液体クロマトグラフと接続したLC質量分析計(マイクロマス社、ピバリー、マサチューセッツ州)を用いて得られた。LC - MSは緩衝液A(水 - 0.1%のギ酸(FA))及び緩衝液B(アセトニトリル - 0.1%のFA)の勾配を用いて実施した。該勾配は2%のB(0 ~ 2分)から100%のB(20 ~ 23分)までであった。

【0050】

ウェスタンブロット分析

各反応の分取物(2 ngのペプチド)を15 μ Lの試料緩衝液(4%のSDS、5%の -メルカプトエタノールを含む)中に回収し、95 まで加熱した(5分)。試料をPAGE(トリシゲル、10 ~ 20%; ノベックス、サンディエゴ、カリフォルニア州)にかけ、PVDF膜(バイオラッド・ラボラトリーズ、ハーキュリーズ、カリフォルニア州)に移し、グルタルアルデヒド(1%、v/v)で固定し、牛乳(10%、w/v)でブロッキングした後、抗A モノクローナル抗体4G8(セネテック、メアリーランド・ハイツ、ミシガン州)を用いて4 で一晩精査した。一つの実験において、モノクローナル抗体のW02(エピトープ: 残基5 ~ 8)、G211(エピトープ: 残基35 ~ 42)又はG210(エピトープ: 残基33 ~ 40)が使用された。次に、該ブロットを抗マウスホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)結合体(ピアース、ロックフォード、イリノイ州)と室温で2時間インキュベートし、ECL試薬(アマーシャム、リトル・チャルフォント、英国)又はスーパーシグナル・ウルトラ(ピアース、ロックフォード、イリノイ州)で発色させた。化学発光シグナルはフルオロS画像分析システム(バイオラッド、ハーキュリーズ、カリフォルニア州)を用いて捕捉し、電子画像はマルチアナリスト・ソフトウェア(バイオラッド、ハーキュリーズ、カリフォルニア州)を用いて分析した。分子サイズマーカーはアマシャム社(アーリントン・ハイツ、イリノイ州)から入手した。

20

30

【0051】

実施例1: ペルオキシダーゼで触媒されるA の重合はチロシン架橋の形成を伴う

本発明者らは最初に、ペルオキシダーゼで触媒される酸化状態がA の重合を促進し得るか否かを、H₂O₂及びペルオキシダーゼの存在下又は非存在下で1日間インキュベートしたヒトのA₁₋₄₀、ヒトのA₁₋₄₂、及びラットのA₁₋₄₀(50 μ M)の蛍光を測定することにより試験した。これらの試料の蛍光分析は、図1Aで例示したようにA₁₋₄₀及びA₁₋₄₂を含む試料において蛍光の著しい増大を示した。これらの結果は、1.25 mMの非常に高いペプチド濃度で達せられた合成のヒトA について以前報告された結果(ガレアッチら、1999)に似ている。ヒト - 配列のA ペプチドの挙動と対照的に、図1Aでも示されるように、H₂O₂及びペルオキシダーゼとのインキュベーションの後にラットA₁₋₄₀の蛍光シグナルの増大は観察されなかった。このことは、ラットA はチロシンを欠如している(シヴァースら、1988)ので、該蛍光シグナルがA のチロシン酸化生成物に特異的であることを示唆した。

40

【0052】

これらの反応がA の重合をもたらしたことを確認するため、上述したように処理された

50

A₁₋₄₀ 及び A₁₋₄₂ を SDS-PAGE にかけるウェスタンブロットにより分析した。H₂O₂ 及びペルオキシダーゼとインキュベートしたヒトの合成の A₁₋₄₀ 及び A₁₋₄₂ は両方とも、図 1 B に示されるように未処理の A と比較して見かけ上 SDS 耐性のポリマーの著しい増加を示した。A が H₂O₂ 又はペルオキシダーゼのいずれか単独とインキュベートした場合、重合も蛍光の増大も観察されなかった。

【0053】

実施例 2：重合は生理的条件下で起きる。

H₂O₂ / ペルオキシダーゼで誘導される合成 A の重合が生理的に近い条件下で起きるか否かを決定するため、本発明者らは pH 7.4 の PBS 中で 10 nM の A₁₋₄₂ を 1 μM の H₂O₂ 及びペルオキシダーゼ (7.5 μg/mL) とともにインキュベートした。本発明者らは、図 1 C に示されるように該ペプチドの SDS 耐性が再び誘導されることを観察した。しかしながら、図 1 B で例示したように、より高い濃度の基質を用いることにより生じるオリゴマーより低い見掛け分子量のオリゴマーが生じた。これらの条件下での見掛け A ポリマーの SDS-PAGE 上での移動は、二量体 (8 kD)、三量体 (13 kD)、及び四量体 (17 kD) の形成を示唆した。

10

【0054】

図 2 A 及び図 2 B にそれぞれ示すように、A D に冒された死後の脳組織から精製された A の蛍光分析は、チロシン架橋種に特徴的な分光蛍光のパターンを示した。この精製タンパク質は前述したように SDS-PAGE 上を見掛け上オリゴマーとして移動した (ローエルら, 1996)。

20

【0055】

実施例 3：オリゴマーのチロシン架橋

見かけ上オリゴマーのヒトのアミロイドに由来する A がチロシン架橋されたことを確認するために、試料を加水分解した後、MALDI TOF-MS により分析した。この分析は、図 3 A で例示するように、361 Da (m/z 361、M+H の代表値) に相当するピークを示したことにより、該試料中に DT 又は イソ DT が存在することを確認した。540 Da に相当するより小さなピークも検出され、TT 又は P の存在と一致していた。他の顕著なピークは 247 Da、263 Da、307 Da、309 Da 及び 538 Da で検出され、これらはカルボニル化 (アトウッド、1999) 及び他のアミノ酸架橋など、A のアミノ酸に他の修飾があったことを表している。

30

【0056】

ヒト A の加水分解から得られるより大量の断片も 423 Da 及び 425 Da (3:2 の比) で検出され、DT 又は イソ DT への Cu の結合を示唆している (Cu の質量 = 63 及び 65 Da、約 2:1 の天然同位元素の存在度)。

【0057】

実施例 4：ジチロシンによる銅の結合

423 及び 425 でのピークが Cu への DT の結合によるものであり得るか否かを試験するために、本発明者らは分光分析により DT と Cu²⁺ との相互作用を調べた。ジチロシン (50 μM) をリン酸緩衝液 (50 mM、pH 7.4) で可溶化し、吸光スペクトル (200 - 1000 nm) を SPECTRAMAX プラス (モレキュラー・デバイシーズ) で測定した。谷 (280 nm) 及びピーク (315 nm) は明白であった。次にジチロシンを過濃度の CuNO₃ (0 - 200 μM) 又は NaCl (0 - 200 μM) とインキュベートし、280 nm 及び 315 nm での両吸光度の変化を観察した。

40

【0058】

本発明者らは、DT が過濃度の Cu²⁺ とインキュベートした際に 315 nm におけるその特徴的な吸光ピークが消失し新しい吸光ピークが 280 nm に生じることを見出した。この分光学的変化は 1:1 ~ 2:1 (Cu:DT) の化学量論比で横這いに達した後 3:1 で飽和した。このことは DT が Cu の 3 当量まで結合できることを示唆している。二塩化物の結合も同様な p+2 質量単位増分 (Cl の質量 = 35 Da 及び 37 Da、約 3:1 の天然同位元素の存在比) を生じるが、NaCl とともにインキュベ

50

ートしたDTは分光学的吸光度の変化を誘導しなかった。これらの結果は図3Bに示す。

【0059】

実施例5：A のジチロシン化はその銅結合能を高める。

本発明者らは、ヒトの脳の可溶性画分に見出されたAの一部がジチロシン化により増強された銅結合性を示すと予測した。これが実際に事実であるか否かを試験するため、本発明者らはADに冒された脳の可溶性抽出物の一部を銅で荷電したキレート・セファロースカラムに通した。凍結したAD及び対照の脳(AC)から得られる大脳皮質の灰白質0.5gを3mlの氷冷リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中でホモジナイズした。試料を175000gで1時間遠心分離し、その上清をA内容物の分析用に保持した。10mlの上清を1mg/mlの硫酸銅で荷電したキレート・セファロースカラムにかけた。未結合のタンパク質は0.5MのNaCl(pH8)を含む0.05Mの酢酸Na緩衝液を用いて洗い流した。結合物質を、pH5.5、3及び1の連続的段階を用いて酸性度が通増する段階的勾配で溶出した後、50mMのEDTAで洗浄しカラムから取除いた。溶出物を、徹底的に透析し、2kDaのサイズ分画を用いて遊離の銅及び塩を除去し、凍結乾燥し、並びにSDS-PAGE、ウェスタンブロット及びLC-MS分析にかけた。ESI質量スペクトル(+veイオン)はクアトロイトリプルクオドラポール(マイクロマス)により得た。質量スペクトルは650から1650m/zまでの8秒毎の連続モードで収集した。試料は5mMの酢酸アンモニウム緩衝液に溶解してイオン源に注入した。スロットブロット分析はpH3の溶出物においてWO2の免疫反応性を示さず、更なる溶出がpH1で実施された。このpHで強い免疫反応性が検出され、該透析試料は青色であった。

【0060】

ウェスタンブロット分析は該pH1及びEDTAの画分中にAが存在することを示した。pH3は通常このようなカラムから大部分の銅結合タンパク質を溶出するのに十分であるので、これは銅への非常に高い親和性の結合を示唆している。これらの画分中の物質はオリゴマーのAに極めて富むことが示された。これらの結果は図4で例示される。

【0061】

銀染色(図4A)は実質的な金属親和性に基づく精製(レーン1対レーン2)を証明し、ウェスタンブロット分析は複数の単量体のAに相当するよう見える免疫反応性のバンドを示した(図4B)。図5はAD脳組織から得られる粗抽出物及びIMACで精製した上清抽出物からのLC(上)及びMS(下)のトレースを示す。該IMACで精製した試料のLC及びMSのスペクトルが実質的によりきれいであることは注目に値する。該IMACで精製した試料のLC-MS分析は、銅の存在下又は非存在下における合成ペプチドのLC-MS分析により確認されるように、2個の銅原子をもつA₁₋₄₀を含むA種に相当するシグナルを生じた。典型的な質量スペクトルでの際立ったピークのクラスターは質量が4515.1(A₁₋₄₂)及び4457.9(A₁₋₄₀+2Cu)の親イオンと一致する質量/電荷比を示す。

【0062】

この強く銅に結合するA画分がDTを含むか否かを確認するために、本発明者らはH₂O₂及びホースラディッシュペルオキシダーゼを用いる工程により生成したDTに対して生じるモノクローナル抗体IC3を使用した(カトウら、(1998)、これは姫路工業大学、姫路、日本のカトウ・ヨウジ博士から贈与された)。本発明者らは、ウェスタンブロットで観察されるAのより高分子量のオリゴマーがDTの陽性染色と同一位置に局在化することを見出した。

【0063】

Aを含有する画分はジチロシン部分の存在に特徴的な蛍光放射スペクトルをも示した。この放射はこの修飾により強化された銅の結合について予測される様式で銅の付加により消光した。

【0064】

実施例6：ジチロシン化Aのさらなる特性決定

10

20

30

40

50

D Tに富むA を、更なる特性決定を行なうのに十分な量だけ、ヒトの脳の可溶性画分から単離する。これらの研究には、組織培養での毒性研究、アミノ酸配列決定、金属結合の研究、及びD Tに富むA が増強された電気化学的活性（例えば過酸化水素形成の誘導及び銅の還元）を有するか否かを決定するための実験が含まれる。

【0065】

実施例7：ジチロシンに対する免疫化の効果

本発明者らは野生型マウスにD Tへの免疫応答を生じさせることを試みた。この実験において、該D Tは、実験手法で記載したように、ホウ酸緩衝液中でチロシンを H_2O_2 と混合しそしてこの混合物をホースラディッシュペルオキシダーゼとインキュベートすることにより調製した。

10

【0066】

D Tはグルタルアルデヒドを用い標準的なプロトコルに従って担体タンパク質のキーホール・リンペット・ヘモシアニン(K L H)に結合させた。D T - K L H、K L H単独又は未処理のチロシンのそれぞれの乳濁液をフロイント完全アジュバント中で調製し、二匹の動物それぞれに100mgのD T - K L H又は未反応のチロシン若しくはK L H単独のいずれかを含む接種物を腹腔内に接種した。免疫前の血清はこの時点で採取した。最初の免疫血清は免疫化の10日後に採取した。二回のブースター免疫化をその後2週間に1回の間隔で実施した。血液試料は各接種時及び最終のブーストの一週間後に採取した。

【0067】

E L I S AはD Tに対する免疫応答を検定するために適合された。本発明者らは、D T - K L H又は未反応のチロシンのいずれかで免疫化されたマウスのD Tに対する免疫応答がK L H単独で免疫化されたマウスの応答よりも決して大きくないことを見出した。カトウ博士から得たD Tのモノクローナル抗体I C 3は、正の対照として使用され、この検定でD Tに対する適度な陽性反応を生じた。

20

【0068】

第二の実験において、二匹のウサギを上述した様式でD T - K L Hを免疫化した。これらの動物により生成された血清についてのE L I S Aの結果はD Tに対する適度な免疫応答を証明した。

【0069】

本発明者らは、死後の組織病理学によりアルツハイマー病と診断された四人のヒト患者から得られた個々の血清においてD Tに対する内生抗体の存在を証明することも試みた。これらの血清のD Tに対する免疫反応性はE L I S A又はウェスタンブロットにより観察されなかった。

30

【0070】

さらなる実験反復において、本発明者らは、上述したD T - K L Hに対して生じたマウス又はウサギの抗血清がヒトの脳から抽出されたA の二量体及び高次オリゴマーのD T部分を認識するか否かを調べた。驚くべきことに、血清はいずれもヒトの脳のA におけるD T部分に対する活性を実証しなかった。正の対照のI C 3抗体もこの検定で陰性であった。

【0071】

40

実施例8：免疫原性及び抗体反応性に及ぼすジチロシン部分の生産方法の影響

本発明者らは、予期せぬ免疫応答の欠如がジチロシン部分の抗原性の弱さによるものであるかもしれないと推測した。

【0072】

この仮説を検討するため、本発明者らは二つの異なる方法によりチロシンで架橋した合成のA₁₋₄₀及びA₁₋₄₂を調製した。第一の方法は、上記の実験手法に記載したように、ホウ酸緩衝液中で該A ペプチドをホースラディッシュペルオキシダーゼ及び H_2O_2 とインキュベートする工程を含むものであった。

【0073】

第二の方法では、2.5 μ MのA 溶液を30 μ Mの $CuCl_2$ 及び200 μ Mの H_2O

50

2 を含む二重に脱イオン化した水中で調製し室温で1日間から5日間インキュベートした。

【0074】

架橋したA₁₋₄₀の各種試料をPAGEにかけ、そしてウェスタンブロッティングは該A₁₋₄₀に特異的な抗体WO2又は正の対照である抗DT抗体IC3を用いて実施した。これらのプロットの結果は図6に提示する。

【0075】

該IC3抗体はELISA及びウェスタンプロットの両検定において架橋したA₁₋₄₀中のDTを検出した。その上、ウェスタンプロットでは、該抗体は実施例7で調製されたDT-KLH中のジチロシンの存在を認識した。これらの結果から、A₁₋₄₂はA₁₋₄₀より該ホウ酸塩又は銅の方法のいずれかによってより効率的に架橋されることは明白である。さらに、A₁₋₄₀は銅を含む方法で架橋される場合WO2に対する免疫反応性を失う。このことは該ペプチドが架橋後の抗体結合部位を遮蔽又は妨げるフリーラジカルによる損傷又は修飾に対してより影響され易いことによるものでありうる。

10

【0076】

驚くべきことに、ジチロシンを介するA₁₋₄₀の架橋様式が該架橋を生成するために用いられる反応の種別に依存することがIC3を用いた分染法からも明らかである。該IC3モノクローナル抗体はホウ酸の方法により形成されたDTを検出しなかったが、銅の方法により形成されたDTを検出した。

【0077】

また意外にも、該IC3抗体はA₁₋₄₂よりむしろA₁₋₄₀中のDT架橋を検出した。この様式は該抗A₁₋₄₀抗体のWO2で観察されたものと反対である。

20

【0078】

これらの結果は、DT架橋の誘導方法及び架橋されたポリペプチドの構造が抗体によるDTの認識において決定的な変数であることを証明している。この場合、ジチロシンで架橋されたA₁₋₄₀への二つのアミノ酸残基の付加が抗ジチロシン抗体の結合能に劇的な減少をもたらした。この結果はインビボの状況に外挿され、抗原の選択が生理的に重要な免疫応答を誘発するのに決定的に重要であることを示唆している。

【0079】

実施例9：抗体認識に及ぼすチロシン架橋形態の影響

30

DT接種物は免疫応答を誘発するためには大きな担体タンパク質と結合しなければならないことが予期された。さらに、生じる免疫応答の性質は適切な担体の選択にも部分的に依存するであろう。これを調べるため、本発明者らは種々のDT種について二つの代替的担体、仔牛血清アルブミン(BSA)及びキーホール・リンペット・ヘモシアニン(KLH)を選択した。

【0080】

さらに、免疫認識における異なる形態のジチロシンの役割を調べるため、本発明者らは、DTの多数のオリゴマー及び分枝形態を含む様々な形態のDTを含んだ粗混合物を調製した。この粗混合物のチロシン架橋は上述したホウ酸塩/H₂O₂/ペルオキシダーゼ方法を用いて作成した。得られたDT混合物をチロシン分子の環上及び骨格上の様々な位置に結合をもつ分子を含んでいた。生じた構造の例は図7で説明される。

40

【0081】

次に、該粗混合物を逆相HPLCによりモノ-ジチロシン、ジチロシン、トリチロシン及びポリチロシンを主に含む画分に分けた。

【0082】

オリゴマー構造の二つの重要な特徴は、それらが所望する抗原の多重コピーを提示して免疫原性を改良し該免疫応答を強化できること、並びにそれらが該チロシン残基間の化学結合の代替的形態の提示を許容できることである。

【0083】

インビボでADのA₁₋₄₀への酸化的修飾を含むチロシン架橋の性質を調査するため、本発明

50

者らはチロシンで架橋した A 断片をも調製した。同じ技法を用いて、本発明者らはジチロシンにより架橋された二つ以上の A₉₋₁₆ ペプチド鎖から成る分子を調製した（構造は示していない）。得られる架橋は様々なチロシン架橋の形態のラセミ混合物を表す可能性が最も高い。

【0084】

上述した幾つかの新規な構造は抗 D T モノクローナル I C 3 又は D T - K L H で免疫化したウサギから得た免疫血清（実施例 7 に記載した）を用いてウェスタンブロットで特性決定された。これらの結果は図 8 に提示する。

【0085】

その結果は、B S A に結合する A₉₋₁₆ の二量体が該ウサギ免疫血清と該モノクローナル抗体 I C 3 の両方に免疫反応性があるが、A₉₋₁₆ の三量体は免疫反応性がないことを証明した。

【0086】

K L H の存在は、付加的なチロシン架橋抗原に結合するか否かにかかわらず該ブロット中で該ウサギ免疫血清により認識された。ポリチロシン - B S A 及びポリチロシン - K L H は I C 3 により認識されたが、該ウサギ免疫血清は K L H 単独とポリチロシン - K L H とを識別できなかった。

【0087】

これらの結果から、図 6 に提示するデータから予測されるように、該ウサギの免疫化はジチロシンの一部の形態と反応性があるが他とは無い抗体を誘発したことは明白である。

【0088】

実施例 10：トランスジェニック動物における A の沈着に及ぼすジチロシンの免疫化の効果

トランスジェニックマウスのモデルは、アルツハイマー病（ゲームスら，1995、シャオら，1996）、パーキンソン病（マスリアら，2000）、家族性筋萎縮性側索硬化症（A L S）（ガーニーら，1994）、ハンティングトン病（レディーら，1998）、及びクロイツフェルト - ヤーコブ病（C J D）（テリングら，1994）を含む幾つかの神経障害について利用できる。

【0089】

本発明者らは、アルツハイマー病についてのトランスジェニックモデルの一つである A P P 2 5 7 6 t g マウス（シャオら，1996）も白内障の高い発症率を有することを見出した。これらの動物モデルは本発明の方法を試験するのに適している。

【0090】

A P P 2 5 7 6 系統（シャオら，1996）のトランスジェニックマウスが用いられる。8 月齢から 9 月齢の雌のマウスが選別され治療のための群に分けられる。

【0091】

異なる形態のチロシン架橋を作成するためチロシンで架橋した抗原を種々の技法を用いて調製する。使用する抗原は下記のものを含む。

【0092】

【表 1】

| 抗原 | 担体タンパク質 |
|-------------------------------|---------|
| A β ₉₋₁₆ 二量体 | BSA |
| A β ₉₋₁₆ 三量体 | BSA |
| 粗 A T E E | BSA |
| ポリチロシン | BSA |
| A β 三量体 | KLH |
| 粗 A T E E | KLH |
| ポリチロシン | KLH |

【0093】

10

20

30

40

50

それぞれの免疫化はフロイント完全アジュバントに 25 μ g の抗原を含み、総量 0.5 mL で皮下的に投与される。

【0094】

対照動物はチロシンで架橋した抗原なしに担体タンパク質を受けた。

【0095】

血清の試料は 14 日間隔で採取され、ブースター免疫化は 28 日目に施される。血清試料は、例えばカトウらの ELISA 法を用いて抗 DT 抗体の存在について検定される。高い抗体力価は最終のブースター注射の約 5 週間後までに得られることが予測される。血液中の A のレベルも測定される。

【0096】

一旦高い力価の抗体の存在が確認されれば、マウスを時間間隔で犠牲にし、該免疫化が脳のアミロイド形成を減少させるか否かを決定するためにそして最も効果的な免疫プロトコルを確認するためにそれらの脳を調べる。脳及び血清における可溶性及び不溶性の A のレベルは校正ウェスタンブロットを用いて測定する。該脳中の A 斑の負荷量は免疫組織化学的に調べる。

10

【0097】

各群の他のマウスは標準的な方法に従ってモリス水迷路を用いて認知能力について 8 ヶ月までの期間にわたって試験される。該動物の一般的健康及び安泰感も、自発運動量、敏捷性及び一般的健康の兆候を含む特性の組合わせを主観的に評価する 5 点の整数尺度を用いて盲目化されたオペレータにより毎日測定される。

20

【0098】

実施例 11：ジチロシンに対する抗体を用いた処理の効果

正常なマウスを実施例 7 に記載した一つ以上の免疫原を用いて当分野で周知の標準的手法により過剰免疫化する。該マウスを時間間隔で採血しそれらの血清を上述したように抗 DT について検定する。高い力価の抗体が検出されると、血清を収穫し、該抗体成分を当分野で一般的に利用できる方法を用いて単離し及び/又は濃縮する。

【0099】

これらの抗体を、数日又は数週間のコースにわたって単回投与又は反復投与のいずれかで APP 2576 トランスジェニックマウスの静脈内注射し又は CSF 内に直接注射する。

【0100】

該トランスジェニックマウスを抗ジチロシン抗体で処理した後、時間間隔で犠牲にし、それらの脳を抗体処理が脳のアミロイド形成を減少させるか否かを決定するために調べる。

30

【0101】

実施例 12：チロシン架橋と関連する状態の診断

AD に罹患していると確認された患者及び年齢の適合した対照から得られた血清及び脳脊髄液 (CSF) の試料を上述した蛍光分析を用いてチロシン架橋化合物の存在について検定する。一式の試料において、該試料中のチロシン架橋化合物をまず米国特許第 5972674 号に記載されているようにニトリロ三酢酸に結合した固体支持体の上に該試料を通すことにより濃縮する。

【0102】

同様な検定を ALS、パーキンソン病、及び CJD に罹患している患者から得られた試料を用いて実施する。

40

【0103】

患者はチロシン架橋化合物に対する循環抗体も有することが可能である。そこで代替的検定においては、DT に対するモノクローナル抗体 (カトウら, 1998) を使用する ELISA 検定を用いて血清又は CSF のいずれかの中にあるこのような抗体を調べる。

【0104】

実施例 13：酸化的に修飾された A 中に存在するジチロシンの形態の同定

酸化的に修飾された A 中に存在する DT の優勢形態 (単数又は複数) を同定するために、銅で触媒された A オリゴマーの酵素消化断片を作製し、そして該断片を質量分析によ

50

り分析する。この技法は最近プリオンタンパク質の銅で触媒された酸化的修飾の分析に適用された(レクエナ, ジェイ・アールら, 2001, PNAS 98: 7170-7175)。

【0105】

これにより、実施例11に記載したように、受動免疫化に用いるのに適したモノクローナル抗体を誘発するのに効果的である可能性の最も高い抗原を同定できる。任意の特異性抗原に対して極めて特異的なモノクローナル抗体を作製する方法は当分野でよく知られている。一度該抗原が選択されると、抗原提示の最も有効な手段についての体系的分析が既知の方法を用いて実施される。

【0106】

考察

ADのニューロン損傷は神経炎斑で固定化される不溶性のA β よりむしろ可溶性のA β に関連している(マックリーンら, 1999)。本発明者らはここに、ADに冒された脳から抽出された該神経毒A β オリゴマーがチロシン架橋(DT、イソDT、TT及び/又はPでありうる)を含むことを初めて明らかにした。これらの修飾はA β をペルオキシダーゼ及びH $_2$ O $_2$ とインキュベートすることにより又は銅イオンの存在下でA β を酸化することによりインビトロで模倣できた。これらの修飾は、A β の代謝を妨げるであろうし、ADに見られる神経毒性に寄与しうるし、該病気の神経化学障害の徴候である。

【0107】

DT、T及びP間の炭素-炭素架橋の形成は不可逆的であると考えられ、DTの架橋は6NのHClによる110で24時間の加水分解切断及びプロテアーゼ消化に非常に耐性がある(スメールら, 1995)。病理学的には、タンパク質のDT修飾の異化耐性はリポフスチン形成(カトウら, 1998)及び蛍光性白内障(fluorescent cataract)の形成における β -クリスタリンの架橋(キクガワら, 1991)へのチロシンポリマーの寄与を説明し得るであろう。明らかに、A β のチロシン架橋はその異化を阻害すると予測されるであろう。そこでADにおけるアミロイド斑沈着の進行に重要な段階となりうるであろう。

【0108】

チロシン架橋の形成はチロシン・ラジカルを含む分子が接触するようになることを必要とする。本発明者らの結果は、A β のチロシン残基がペルオキシダーゼ(単数又は複数)に接近可能でなければならないこと且つアミロイドのA β サブユニット間のチロシン残基がある段階で並列しなければならないことを示唆している。

【0109】

H $_2$ O $_2$ はDTの形成に必要とされるので、ADに由来する脳のA β におけるDT修飾の検出はH $_2$ O $_2$ がADの脳で増加していることを暗示する。提唱されたどの機構に拘束されることも望まないが、本発明者らは、脳実質におけるミクログリア細胞の貪食活性化(これはADのアミロイド形成と密接に関連する(シェングら, 1997))がペルオキシダーゼの活性及びH $_2$ O $_2$ に寄与しA β のチロシン架橋を惹起すると考える。活性化されたラットのミクログリアはペルオキシダーゼのレベルを増加させることが観察され(リンデナウら, 1998)、インビトロの実験は培養したラットのミクログリア及びヒトの食細胞の呼吸バーストの呼び水となり及び/又は引金を引くA β の能力を証明した(ヴァン・ムイスヴィンケルら, 1996)。活性化された食細胞はミエロペルオキシダーゼを放出し(ペンバーら, 1983)、該呼吸バーストの間反応性酸素種を形成する。この応答は侵入する病原体又は腫瘍細胞を殺すように設計されている。しかしながら、この環境は周囲のタンパク質や脂質の酸化を促進することも示された(ピウンら, 1999)。同様な微小環境は活性化されたミクログリアの周辺で生成しうる。インビトロにおいて、ミエロペルオキシダーゼ-H $_2$ O $_2$ 系はDT、TT、P及びイソDTなどのチロシン架橋種の合成を促進する(ヤコブら, 1996)。

【0110】

こうして、A β の蓄積に応答したミクログリアの活性化はA β のチロシン架橋を促進しそ

10

20

30

40

50

の消滅を阻害し悪循環に陥りうる。この起こりうる悪循環に寄与して、DT形成のための H_2O_2 の身近な供給源がA自体により形成されうる。何故なら、Aは Cu^{2+} 又は Fe^{2+} の準化学量論的な量の減少を通じて O_2 と反応することにより H_2O_2 を形成するからである(フアング, アトウッドら, 1999、フアング, クアジュングコら, 1999)。従って、Aがヒトのアミロイドから結合した銅とともに無傷で精製されたことは極めて意義深いことである(図3A)。合成の A_{1-42} は 10^{-18} モルの親和性で Cu^{2+} と結合し、銅はADのアミロイドに豊富にあるため(ロヴェルら, 1998)、本発明者らはAがインビボで銅と結合しているかも知れないと推測した。 Cu^{2+} がAを沈降させ(アトウッドら, 1998)、該ペプチドの毒性は Cu^{2+} により増強される(フアングら, 1999)から、アミロイドに由来するAが銅を含むという発見はADの病理生理学にも重要である。 10

【0111】

興味深いことに、ヒトのアミロイドに由来するAの酸加水分解の後にも質量分析の酸性条件下でも同様に、 Cu^{2+} はDTに依然結合したままであった(図3A)。この異常な Cu^{2+} への親和性は該DT修飾により形成されるA上の二次的に生じた高親和性 Cu^{2+} 結合部位の結果でありうるであろう。この強化された Cu^{2+} への親和性の結果として、DT修飾されたAの神経毒性又はその電気化学的活性は無修飾のAと比べて増大されうる。該DT修飾により惹起された二次的な Cu^{2+} の結合はアミロイドへのAの沈殿も強めうるであろう。これは、なぜpH7.4でのキレート剤による処理が死後のADの脳組織から得られる単量体Aの放出よりも高い程度で二量体Aの放出を促進した(ウェスタンプロットにより検定)(チェルニーら, 1999)かを説明する。増大したプロテアーゼ分解への耐性と二次的な金属結合との組み合わせは、ADの病理学に寄与するAのチロシン架橋のとりわけ悪質な結果でありうる。 20

【0112】

PDAPPトランスジェニックマウスは、ヒトの A_{1-42} 形態を過剰生産し、老化につれて広域の脳アミロイド斑の沈着、並びに行動及び認知の不足を示す(ゲームスら, 1995、WO96/40896)。合成 A_{1-42} による成熟したPDAPPマウスの免疫化は結果としてアミロイド斑の数及び強度における著しい減少を生じさせる一方、この抗原で免疫化されたPDAPPマウスはアミロイド斑を発症しない(シェンクラ, 1999及びWO99/27944)。残るアミロイド斑のすぐ近くのスカベンジャーミクログリア細胞があり、そして A_{1-42} に対する抗体が血中に存在するという証拠があるので、 A_{1-42} に対する免疫応答の誘導が成功したことは明らかであった。著者らは、Aによる免疫化がADの予防又は治療に用いられ得るであろうことを示唆した。しかしながら、ヒトの受容者は免疫寛容のため自己タンパク質に対する明確な免疫応答にまで高めることができないのでADの免疫治療は実現可能でありそうにないことが大いに考えられる。シェンクラにより得られた結果は、該脳が適切な刺激を与えられると他の方法で処置しにくいアミロイド沈着を吸収し除去する能力を有しうることを示唆している。しかしながら、有害な自己免疫応答の誘導及び/又は不適切で且つ斑を除去しない応答の誘導の可能性があるため、A自体による免疫化を用いることは望ましくない。本発明の非天然のジチロシン又はジチロシン含有化合物で免疫化することにより、この問題は回避できる。 30 40

【0113】

本発明が明確性及び理解のためにかなり詳細に記載され、一方、本明細書に開示された発明概念の範囲から逸脱することなく、本明細書に記載された実施態様及び方法に対して種々の変更及び改変が為されうることは当業者には明らかであろう。

【0114】

本明細書で引用された引用文献は、下記の頁に列挙され、この引用文献により本明細書にインコーポレートされる。

【0115】

参考文献

1. アマド, アール., アエスクバック, アール., とネウコム, エイチ., (1984) *Methods Enzymol* 107, 377-88. 13.
2. アトウッド, シー. エス., フアング, エックス., モイル, アール. ディー., スカルパ, アール. シー., バカッラ, エヌ. エム. イー., ハートショーン, エム. エイ., ゴールドSTEIN, エル. イー., ロマノ, ディー. エム., タンジ, アール. イー., とブッシュ, エイ. アイ., (1997) *Soc. Neurosci. Abstr.* 23, 1883.
3. アトウッド, シー. エス., モイル, アール. ディー., フアング, エックス., バカッラ, エヌ. エム. イー., スカルパ, アール. シー., ロマノ, ディー. エム., ハートショーン, エム. エイ., タンジ, アール. イー., とブッシュ, エイ. アイ., (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 12817-12826. 10
4. アトウッド, シー. エス., スカルパ, アール. シー., フアング, エックス., ファッラグ, ワイ. ダブリュー., モイル, アール. ディー., クアジユングコ, エム. ピー., タンジ, アール. イー., とブッシュ, エイ. アイ., (1999) *Soc. Neurosci. Abstr.* 24, 546.
5. アトウッド, シー. エス., スカルパ, アール. シー., フアング, エックス., モイル, アール. ディー., ジョーンズ, ダブリュー. ディー., フェアリー, ディー. ピー., タンジ, アール. イー., とブッシュ, エイ. アイ., (2000) *J. Neurochemistry* 75, 1219-1233.
- 【0116】 20
6. ブルディック, ディー., ソレグハン, ピー., クウォン, エム., コスモスキー, ジェイ., クナウアー, エム., ヘンステン, エイ., ヤテス, ジェイ., コットマン, シー., とグレイブ, シー., (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 546-554.
7. ビウン, ジェイ., ヘンダーソン, ジェイ. ピー., ムエラー, ディー. エム., とハイネッケ, ジェイ. ダブリュー., (1999) *Biochemistry* 38 (8), 2590-600.
8. チェルニー, アール. エイ., レッグ, ジェイ. ティー., マクリーン, シー. エイ., フェアリー, ディー., フアング, エックス., アトウッド, シー. エス., ベイレウザー, ケイ., タンジ, アール. イー., マスターズ, シー. エル., とブッシュ, エイ. アイ., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 23223-23228. 30
9. ディルクス, ティー., ディルクス, イー., ハートマン, ティー., マスターズ, シー., とベイレウザー, ケイ., (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 18210-18217.
10. ガレアッチ, エル., ロンチ, ピー., フランセスチ, シー., とギウンタ, エス., (1999) *Amyloid* 6 (1), 7-13.
- 【0117】
11. グレンナー, ジー. ジー., とウォング, シー. ダブリュー., (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885-890. 40
12. グロス, エイ. ジェイ., とシザー, アイ. ダブリュー., (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 1611-1614.
13. シャオ, ケイ., チャップマン, ピー., ニールセン, エス., エックマン, シー., ハリガヤ, ワイ., ヨウンキン, エス., ヤング, エフ., コーール, ジー., *Correlative memory deficits, A elevation, and amyloid plaques in transgenic mice.* (1996) *Science*; 274 (5284): 99-102.
14. ハイネッケ, ジェイ. ダブリュー., リー, ダブリュー., フランシス, ジー. エイ., とゴールドSTEIN, ジェイ. エイ., (1993) *J Clin Invest* 50

91(6), 2866-72。

15. ヘンスレイ, ケイ., マイト, エム.エル., ユー, ゼット., サング, エイチ., マーケスベリー, ダブリュー.アール., とフロイド, アール.エイ., (1998) *J. Neurosci* 18 8126-8132。

【0118】

16. ファング, エックス., クアジュングコ, エム.ピー., アトウッド, シー.エス., ハートショーン, エム.エイ., ティンダル, ジェイ., ハンソン, ジー.アール., ストークス, ケイ.シー., レオポルド, エム., マルトハウプ, ジー., ゴールドステイン, エル.イー., スカルパ, アール.シー., サウンダース, エイ.ジェイ., リム, ジェイ., モイル, アール.ディー., グレイブ, シー., ボウデン, イー.エフ., マスターズ, シー.エル., フェアリー, ディー.ピー., タンジ, アール.イー., とブッシュ, エイ.アイ., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 37111-6。 10

17. ファング, エックス., アトウッド, シー.エス., ハートショーン, エム.エイ., マルトハウプ, ジー., ゴールドステイン, エル.イー., スカルパ, アール.シー., クアジュングコ, エム.ピー., グレイ, ディー.エヌ., リム, ジェイ., モイル, アール.ディー., タンジ, アール.イー., とブッシュ, エイ.アイ., (1999) *Biochemistry* 38, 7609-7616。

18. ヤコブ, ジェイ.エス., シストラ, ディー.ピー., シュー, エフ.エフ., ムザッファー, エス., ムエラー, ディー.エム., ハゼン, エス.エル., とヘイネツケ, ジェイ.ダブリュー., (1996) *J Biol Chem* 271(33), 19950-6。 20

19. カトウ, ワイ., マルヤマ, ダブリュー., ナオイ, エム., ハシズメ, ワイ., とオオサワ, ティー., (1998) *FEBS Letters* 439(3), 231-4。

20. キクガワ, ケイ., カトウ, ティー., ベップ, エム., とハヤサカ, エイ., (1991) *Biochim Biophys Acta* 1096(2), 108-14。

【0119】

21. リンデナウ, ジェイ., ノアック, エイチ., アサヤマ, ケイ., とウルフ, ジー., (1998) *Glia* 24(2), 252-6。 30

22. ロヴェル, エム.エイ., ロバートソン, ジェイ.ディー., ティースダール, ダブリュー.ジェイ., カンプベル, ジェイ.エル., とマーケスベリー, ダブリュー.アール., (1998) *J Neurol Sci* 158(1), 47-52。 15

23. マレンシック, ディー.エイ., スブラウズ, ジェイ.エフ., スワンソン, シー.エイ., とアンダーソン, エス.アール., (1996) *Anal Biochem* 242(2), 202-13。

24. マスターズ, シー.エル., マルトハウプ, ジー., シムズ, ジー., ポットギエサー, ジェイ., マーティンズ, アール.エヌ., とベイレウザー, ケイ., (1985) *The EMBO Journal* 4, 2757-2763。 40

25. マックリーンら., (1999), *ann. Neurol.* 46, 860-866。

【0120】

26. ペンバー, エス.オー., とキンケイド, ジェイ.エム., ジュニア., (1983) *Blood* 61(6), 1116-24。 14。

27. レクエナ, ジェイ.アール., ら., (2001) *PNAS* 98, 7170-7175。

28. ローエル, エイ.イー., チャネイ, エム.オー., クオ, ワイ.エム., ウェブスター, エス.ディー., スタイン, ダブリュー.ピー., ハバーカンブ, エル.ジェ 50

イ., ウッズ, エイ. エス., コッター, アール. ジェイ., ツオイ, ジェイ. エム., クラフト, ジー. エイ., ボンエル, ビー. エス., とエマールリング, エム. アール., (1996) *J Biol Chem* 271(34), 20631-5.

29. セラ, エム. とアーン, アール., (1960) *Biochem J.* 75, 91-102.

30. シェング, ジェイ. ジー., マーク, アール. イー., とグリフィン, ダブリュー. エス., (1997) *Acta Neuropathol (Berl)* 94(1), 1-5.

【0121】

31. シェンク, ディー. ー., (1992) *Nature* 400, 173-177. 10

32. シヴァース, ビー. ディー., ヒルビッチ, シー., マルトハウプ, ジー., サルバウム, エム., バイレウザー, ケイ., とシーブルグ, ビー. エイチ., (1988) *EMBO J.* 7, 1365-1370.

33. ショージ, エム., ゴルデ, ティー. イー., ガイツ, ジェイ., チェウング, ティー. ティー., エスタス, エス., シャッフアー, エル. エム., カイ, エックス. ディー., マッケイ, ディー. エム., テイントナー, アール., フランジオネ, ビー., とヨウンキン, エス. ジー., (1992) *Science* 258, 126-129.

34. スマイル, イー. エイチ., プリザ, ビー., パナゴス, エイ., とベレンフェルド, エル., (1995) *Infect Immun* 63(10), 4078-83. 20

35. サウザ, ジェイ. エム., ギアッソン, ビー. アイ., チェン, キュー., リー, ブイ. エム. ワイ., とイスチロポウロス, (2000) *J. Biol. Chem.*, 295, 18344-18349.

【0122】

36. ヴァン ムイスヴィンケル, エフ. エル., ヴィールフィス, アール., とエイケレンブーム, ビー., (1996) *J. Neurochem.* 66, 2468-2476.

37. ボーガン, ディー. ダブリュー., とピーターズ, エイ., (1981) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 40, 472-487. 30

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ヒトのA₁₋₄₀がペルオキシダーゼ触媒の酸化の後に蛍光及びSDS耐性を生じるが、ラットのA₁₋₄₀は生じないことを示す。ヒトのA₁₋₄₀、ヒトのA₁₋₄₂、又はラットのA₁₋₄₀ (50 μM)は、37°Cで1日間、50 mMのホウ酸塩、pH 9.5 ± H₂O₂ (1 mM) 及びペルオキシダーゼ (7.5 μg/mL) 中でインキュベートした。

(A) 蛍光スペクトル (exc 325, em 350~500)、

(B) SDS-PAGE 上での移動 (4G8を用いるウェスタンブロットによる)、

(C) A₁₋₄₂ (10 nM)を37°Cで5日間 pH 7.4 のリン酸緩衝生理食塩水中でH₂O₂ (1 μM) 及びペルオキシダーゼ (7.5 μg/mL) と共にインキュベートした。その生成物 (レーン2) をSDS-PAGE及びウェスタンブロット (4G8) によりH₂O₂ /ペルオキシダーゼ (レーン1) の非存在下で同条件の下にインキュベートされたペプチドと比較した。 40

【図2】図2は、ヒトのアミロイドに由来するA₁₋₄₀がチロシン架橋オリゴマーを含むことを示す。ヒトのアミロイドに由来するA₁₋₄₀ (20 μM) (ローエルら, 1996) を、純粋なDT標準 (exc 325, em 350~500) と比較して蛍光分光法 (A) 及びウェスタンブロット (4G8) (B) により分析した。

【図3】図3は、ジチロシン及びトリチロシンの架橋がヒトのアミロイドに由来するA₁₋₄₀に存在し且つそれらが銅に結合していることを示す。

(A) ヒトのアミロイドは精製し、加水分解しそしてクロマトグラフ分離後に質量スペクトルを決定した。異なるクロマトグラフ滞留時間 (RT) で溶出する同一試料の分析を反映する二つの個々のスキャンが示される。

(B) 遞増濃度の CuSO_4 又は NaCl の存在下における精製された DT の 280 nm 及び 315 nm での吸光度。

【図 4】図 4 は、可溶性のヒトの A が高い親和性で銅に結合することを示す。

(A) 可溶性の粗抽出物 (1) 及び銅キレートセファロースカラムからの pH 1 での溶出物 (2) の銀染色。

(B) WO2、G211 及び G210 でプローブされた pH 1 での溶出物のウェスタンブロット。

【図 5】図 5 は、ヒトの A が銅に結合することを確認する、LC-MS 分析の結果を示す。

(A) 可溶性の粗抽出物及び IMAC 精製抽出物の LC-MS 分析。

(B) A_{1-42} 及び二つの銅原子が結合した A_{1-40} の質量スペクトル。

該 IMAC 及び LC-MS のデータは脳に由来する A が銅に結合できることを証明する。

【図 6】図 6 は、架橋した A_{1-40} 及び A_{1-42} 中のジチロシンのウェスタンブロットでの検出を示す。

ジチロシン結合を形成させた二つの技法も比較する。

上側のウェスタンブロット (A) は該 WO2 抗体を用いて A の存在を証明する。下側のブロット (B) はモノクローナル抗体 IC3 により認識されるジチロシン結合の存在を証明する。この抗体はホウ酸塩 / H_2O_2 / ホースラディッシュペルオキシダーゼを用いて調製されたジチロシンの形態に対して形成された。

【図 7】図 7 は、潜在的な免疫原として生産されたチロシン架橋の形態の例を示す。これらの構造は、チロシン架橋を含み、且つ通常チロシン架橋ペプチドのチロシン架橋部分の両側に存在する付加的なアミノ酸残基の存在を模倣するためにアセチル化されたカルボキシ末端及びアミノ末端を有する。生じる免疫応答の強度を改良するためにジチロシン抗原の複数のコピーの提示が設計されている。

【図 8】図 8 は、種々のチロシン架橋種におけるジチロシン結合のウェスタンブロットでの検出を示す。該 DT を含む種は BSA に結合したジチロシン架橋 A_{9-16} の二量体又は三量体並びに BSA 又は KLH の担体タンパク質のいずれかに結合した種々のポリ DT 種を含む。上側のウェスタンブロット (A) は、ホウ酸塩 / H_2O_2 / ペルオキシダーゼ技法を用いて調製され且つグルタルアルデヒドを用いて KLH に結合させた DT に対して形成されたポリクローナルのウサギ抗血清に結合できる該試料の能力を証明している (実施例 7 で論じる)。下側のウェスタンブロット (B) は該モノクローナル抗体 IC3 により認識されるジチロシン結合の存在を証明する。この抗体はホウ酸塩 / H_2O_2 / ペルオキシダーゼ技法を用いても調製されたジチロシンの形態に対して形成させた。

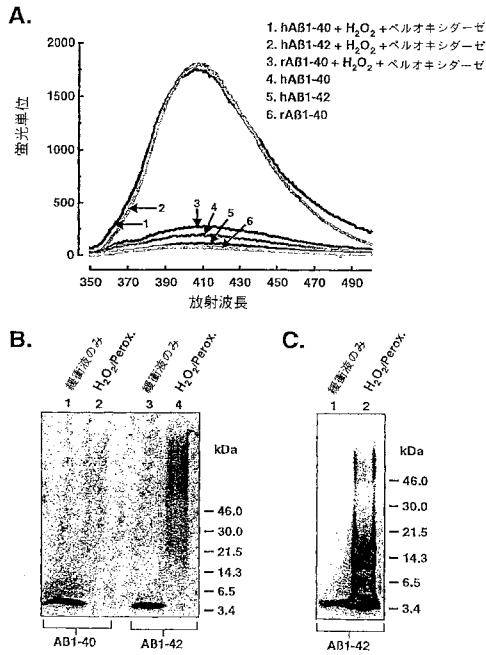
10

20

30

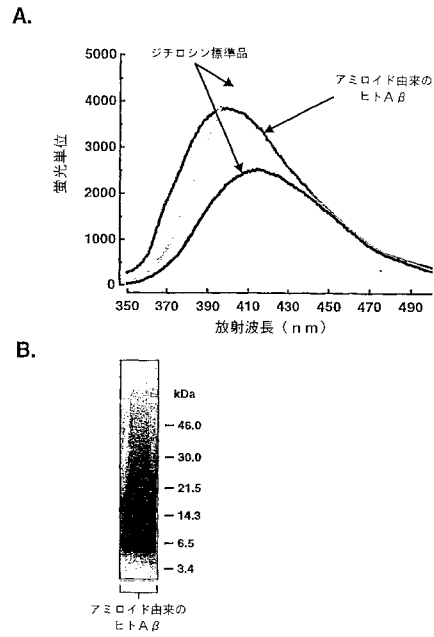
【 図 1 】

Figure 1

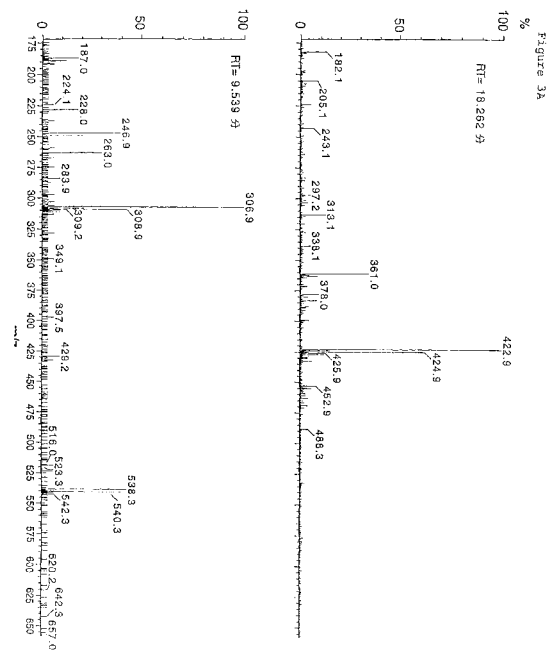


【 図 2 】

Figure 2

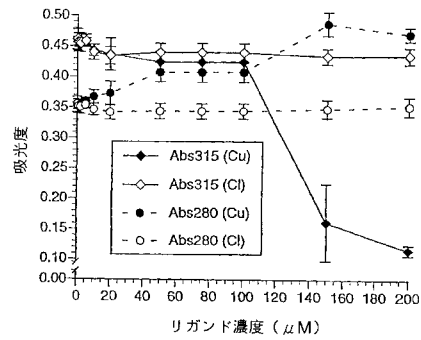


【 図 3 A 】



【 図 3 B 】

Figure 3B



【 図 4 】

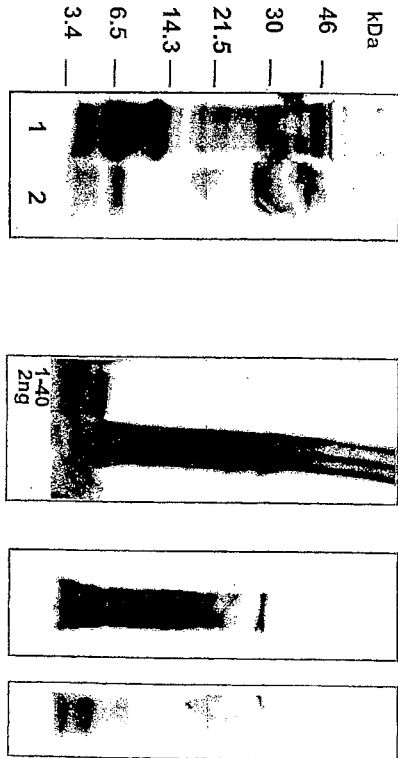


Figure 4
A
B

【 図 5 】

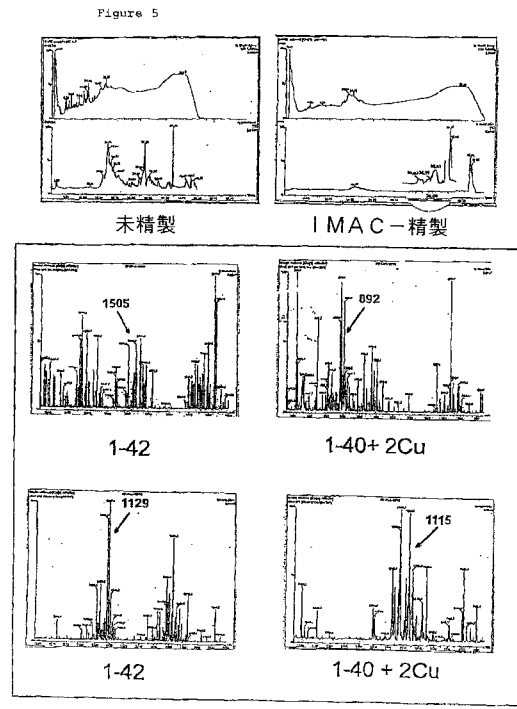
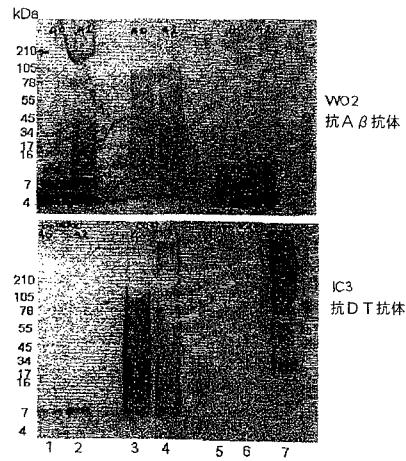


Figure 5
未精製
IMAC-精製

【 図 6 】

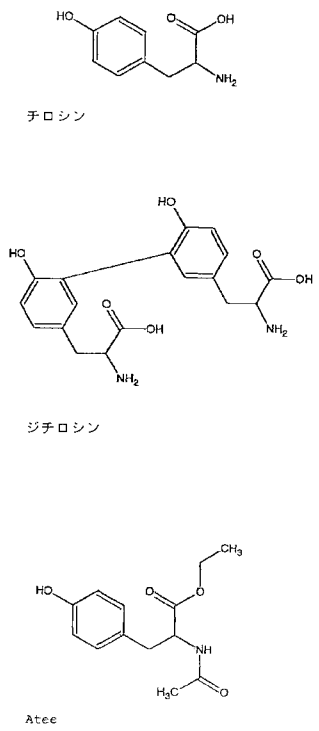
Figure 6



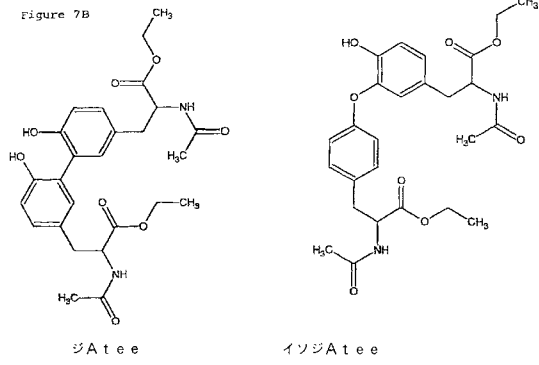
- 1. Aβ 1-40 - ホウ酸架橋
- 2. Aβ 1-42 - ホウ酸架橋
- 3. Aβ 1-40 - 銅架橋
- 4. Aβ 1-42 - 銅架橋
- 5. Aβ 1-40 - 未処理
- 6. Aβ 1-42 - 未処理
- 7. K L H に結合したジチロシン

【 図 7 A 】

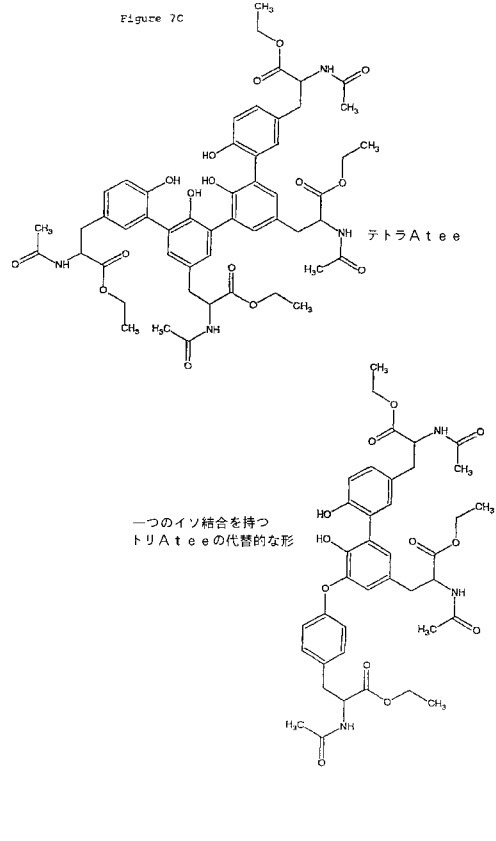
Figure 7A



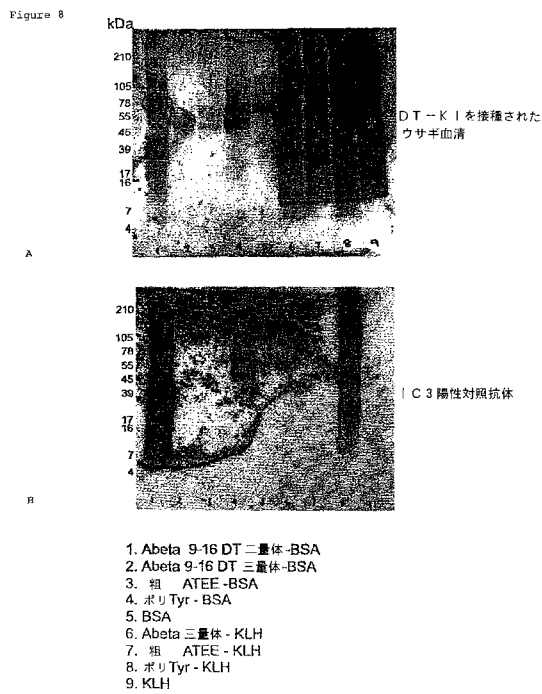
【 図 7 B 】



【 図 7 C 】



【 図 8 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/00245 A1(51) International Patent Classification: A61K 38/16, (74) Agent: GRIFFITH HACK, Level 3, 509 St Kilda Road,
A61P 25/16, 25/28 Melbourne, Victoria 3004 (AU).

(21) International Application Number: PCT/AU01/00786

(22) International Filing Date: 28 June 2001 (28.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/214,779 28 June 2000 (28.06.2000) US
60/242,177 23 October 2000 (23.10.2000) US(71) Applicants (for all designated States except US): PRANA
BIOTECHNOLOGY LIMITED [AU/AU], Level 1, 100
Dorcas Street, South Melbourne, Victoria 3205 (AU). THE
GENERAL HOSPITAL CORPORATION [US/US], 55
Fruit Street, Boston, MA 02114 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Published:
— with international search report

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BUSH, Ashley
[AU/US], 91 Summer Street #3, Somerville, MA 02143
(US). CHERNY, Robert [AU/AU], 33 Davey Avenue,
Brighton East, Victoria 3187 (AU).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/00245 A1

(54) Title: NEUROTOXIC OLIGOMERS

(57) Abstract: This invention relates to methods and compositions for the treatment or alleviation of Alzheimer's disease and of other conditions related to abnormal protein aggregation. In particular, the invention relates to methods and compositions for the immunotherapy of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and cataract. In one aspect the invention provides a method of prophylaxis, treatment or alleviation of a condition characterised by pathological aggregation and accumulation of a specific protein associated with oxidative damage and formation of tyrosine cross-links, comprising the step of immunizing a subject in need of such treatment with an immunizing-effective dose of one or more tyrosine cross-linked compounds, and optionally also comprising copper ions complexed to the compound. Alternatively passive immunization against a tyrosine cross-linked compound may be used. Prophylactic or therapeutic compositions and diagnostic methods are also disclosed and claimed.

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 1 -

NEUROTOXIC OLIGOMERSFIELD OF THE INVENTION

This invention relates to methods and compositions
5 for the treatment or alleviation of Alzheimer's disease and
of other conditions related to abnormal protein
aggregation. In particular, the invention relates to
methods and compositions for the immunotherapy of
Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and cataract.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

The characteristic amyloid lesions of Alzheimer's
disease (AD) are primarily composed of Amyloid β ($A\beta$)
(Glennner & Wong, 1984), a 39-43 amino acid protein which is
15 a normally soluble protein found in biological fluids.
Amyloid formation is linked to the pathogenesis of the
disease, so identifying the neurochemical changes which
lead to the inhibition of $A\beta$ catabolism and its
accumulation in the neocortex would be an important clue to
20 the pathogenesis of AD.

Although the fundamental pathology, genetic
susceptibility and biology associated with AD are becoming
clearer, a rational chemical and structural basis for
developing effective drugs to prevent or cure the disease
25 remains elusive. While the genetics of AD indicate that
the metabolism of $A\beta$ is intimately associated with the
pathogenesis of the disease as indicated above, drugs for
the treatment of AD have so far focused on "cognition
enhancers", which do not address the underlying disease
30 processes. These drugs have met with only limited success.

The nature of the deranged neurochemical environment
in AD can be partly deduced from the post-translational

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 2 -

modifications of amyloid A β . A β extracted from biological systems normally migrates as an apparent ~4 kD monomer on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; (Shoji et al., 1992)); however, A β extracted
5 from specimens of AD-affected post-mortem brain migrates on SDS-PAGE as SDS-, urea- and formic acid-resistant oligomers (Masters et al., 1985; Roher et al., 1996; Cherny et al., 1999).

Matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry (MALDI-MS) of these SDS-resistant oligomers
10 extracted from neuritic plaque and vascular amyloid indicates the presence of covalently cross-linked dimeric and trimeric A β species (Roher et al., 1996).

Synthetic A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ normally migrate as apparent
15 monomers on SDS-PAGE, but form apparent higher molecular weight species upon incubation (Burdick et al., 1992). This process is accelerated by exposure to oxidative systems (Dyrks et al., 1992; Atwood et al., 1997).

Tyrosine cross-linking has been proposed as a
20 mechanism of A β oligomerization *in vivo*, since tyrosine residues in synthetic human A β can be cross-linked by peroxidase-catalyzed oxidation systems (Galeazzi et al., 1999). As Rat A β , unlike human A β , lacks a tyrosine
25 residue (Atwood et al., 1997), it is therefore resistant to metal-catalyzed oxidative oligomerization, and this perhaps explains the rarity of amyloid deposits in these animals (Vaughan and Peters, 1981).

Tyrosine cross-linking in proteins is a sensitive
marker of oxidative stress. Covalent carbon-carbon bridges
30 or carbon-oxygen bridges are formed between single tyrosyl residues and/or dityrosyl residues, resulting in a number of stable, fluorescent reaction products (Gross and Sizer,

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 3 -

1959; Amado et al., 1984, Jacob et al., 1996). The major reaction products of the free tyrosyl radical are the intensely fluorescent amino acids 3,3'-dityrosine (DT), 3,3',3'-trityrosine (TT) and pulcherosine (P), and the non-fluorescent isodityrosine (iso-DT) (Gross and Sizer, 1959; Amado et al., 1984, Jacob et al., 1996; Heinecke et al., 1993). DT and 3-nitrotyrosine levels are elevated in the hippocampus and neocortical regions of brains of patients with AD compared to the same regions of normal brain, and are also elevated in ventricular cerebrospinal fluid in AD patients (Hensley et al., 1998).

Tyrosine cross-linking may also be important in other neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, and other conditions in which α -synuclein fibrils are deposited. These include Parkinson's disease itself, dementia with Lewy body formation, multiple system atrophy, Hallerboden-Spatz disease, and diffuse Lewy body disease. Exposure of recombinant α -synuclein to nitrating agents results in nitration of tyrosine residues as well as oxidation of tyrosine to form DT; this results in cross-linking of α -synuclein to form stable aggregates (Souza et al, 2000). The same authors also found that monoclonal antibodies raised against nitrated synuclein bound specifically to Lewy bodies and to glial cell inclusions in a variety of synucleinopathies (Duda et al., in preparation referred to in Souza et al., 2000).

We have now found that human amyloid-derived A β contains tyrosine cross-links, and includes both dityrosine and trityrosine cross-linked species. These cross-links can be replicated *in vitro*, for example by incubating synthetic human A β with peroxidase and H₂O₂, or with H₂O₂ in the presence of copper ions. These modifications are

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 4 -

protease-resistant, and therefore we propose that tyrosine cross-linkage in AD caused by abnormal interaction of A β with H₂O₂ and peroxidases or copper ions contributes to the formation of neurotoxic A β oligomers, and to the deposition
5 of A β . Immunization against low molecular weight tyrosine cross-linked compounds rather than with whole A β can therefore be used for treatment or prevention of AD, without the risk of provoking autoimmune complications which could otherwise be induced by immunization with
10 intact A β or large fragments thereof. By restricting the target for immunotherapy to an abnormal fragment or portion of the molecule, it may be possible to minimise undesirable interference with the normal function of the molecule, while providing an active therapy against the abnormal
15 molecule. It will be appreciated that either active or passive immunization may be used.

The oxidative processes which give rise to covalent cross-linking of proteins via tyrosine are also associated with other disorders which are characterised by
20 pathological aggregation and accumulation of specific proteins. It is therefore considered that these conditions
" also will be amenable to prevention or treatment by the method of the invention.

It will be clearly understood that, although a number
25 of prior art publications are referred to herein, this reference does not constitute an admission that any of these documents forms part of the common general knowledge in Australia or in any other country.

30 SUMMARY OF THE INVENTION

In a first aspect, the invention provides a method of prophylaxis, treatment or alleviation of a condition, in

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 5 -

which the condition is characterised by pathological aggregation and accumulation of a specific protein associated with oxidative damage and formation of tyrosine cross-links, the method comprising the step of immunizing a
5 subject in need thereof with an immunizing-effective dose of one or more compounds selected from the group consisting of dityrosine, trityrosine, tetratyrosine (also known as pulcherosine), oxidised tyrosine orthologues such as o-tyrosine and m-tyrosine, nitrotyrosine, and peptides
10 comprising tyrosine cross-links, and optionally also comprising copper ions complexed to the compound. These compounds are collectively referred to herein as "tyrosine cross-linked compounds".

A person of ordinary skill in the art will recognise
15 that an immunizing-effective dose of the compound is one which will elicit antibody which is able to bind to a tyrosine cross-linked compound. Such a person will also be able to determine whether a particular tyrosine cross-linked compound elicits an antibody.

20 In a preferred embodiment, the pathologically aggregated form of the specific protein comprises a tyrosine cross-linked moiety. In a particularly preferred embodiment, the tyrosine cross-linked compound is a peptide which is an immunogenic portion of the pathologically
25 aggregated form of the specific protein, the peptide comprising a cross-linked tyrosine moiety linked to residues upstream and downstream of the cross-linked tyrosine.

In a preferred embodiment, the tyrosine cross-linked
30 compound is a dityrosine cross-linked compound.

Up to 3 equivalents of copper per equivalent of dityrosine may be used, provided that each dose administered contains no more than 1 μ M copper.

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 6 -

Optionally the compound used for immunisation is coupled to a carrier protein which is itself immunogenic, such as tetanus toxoid, keyhole limpet haemocyanin, or albumin. Also optionally the compound may be administered
5 together with an adjuvant such as alum, monophosphoryl lipid, a muramyl peptide, an iscom such as QS21 and the like. Persons skilled in the art will be well aware of suitable carriers and adjuvants.

Where a peptide comprising tyrosine cross-links is used, this is preferably a minimal and immunogenic portion of the particular protein associated with the condition, which is constituted by the dityrosine moiety linked to residues upstream and downstream of the cross-linked tyrosine. Where the condition is Alzheimer's disease,
10 preferably the peptide comprising tyrosine cross-links is derived from the sequence surrounding tyrosine 10 in the amino acid sequence of human $A\beta_{1-40}$ or $A\beta_{1-42}$.

In all aspects of the invention, where a peptide comprising tyrosine cross-links is used, it is preferred
20 that the tyrosine cross-links are obtainable by oxidation in the presence of copper ions.

More preferably the peptide also comprises copper ions complexed to dityrosine.

Immunization may be administered by any
25 convenient route, including subcutaneous, intramuscular or intravenous injection, application to mucosal surfaces, or topical administration, for example in an ointment.

The dose of the compound to be administered will vary, depending on the nature of the individual compound,
30 the weight, age and general state of health of the patient, and whether an adjuvant is used. It is contemplated that the dose will be in the region of 0.1 μ g to 200 mg of DT, more preferably 1 to 50 mg, most preferably 10 to 20 mg.

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 7 -

Although a single immunization may be given, preferably multiple immunizations are administered, for example once a week for one to twelve months, more preferably for four months. A booster series may be given after six to twelve months. The immune response is monitored by measuring DT antibodies; any convenient assay system may be used, such as ELISA.

In an optional embodiment, the method also comprises the additional steps of identifying the predominant forms of the tyrosine cross-links in the pathologically aggregated specific protein; and synthesising one or more tyrosine cross-linked compounds comprising one or more of the predominant forms of tyrosine cross-links.

In an alternative form of this aspect of the invention, the immunization may be passive. Thus the invention provides a method of a method of prophylaxis, treatment or alleviation of a condition, in which the condition is characterised by pathological aggregation and accumulation of a specific protein associated with oxidative damage and where the pathologically aggregated form of the specific protein comprises a tyrosine cross-link, the method comprising the step of administering an effective amount of an antibody or an antibody fragment, said antibody or antibody fragment is raised against a tyrosine cross-linked compound, said compound being an immunogenic portion of the pathologically aggregated form of the specific protein and comprising a tyrosine cross-link, and which antibody or antibody fragment is capable of specifically binding the pathologically aggregated form of the specific protein, to a subject in need of such treatment.

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 8 -

The antibody may be polyclonal or monoclonal. Where the antibody is polyclonal, it is preferably of human origin, and may for example be derived from pooled human serum from normal healthy individuals. Alternatively serum
5 from individuals who have been hyperimmunized against a tyrosine cross-linked compound may be used. Protocols for hyperimmunization are known in the art. The antibody may be isolated from serum by any convenient method; a variety of
10 suitable methods is known in the art. Where the antibody is monoclonal, it is preferably humanized. It will be clearly understood that antigen-binding fragments of antibodies, such as F(ab'), F(ab')₂, Fv or monoclonal scFv, are within
15 the scope of the invention. Methods for production and purification of polyclonal and monoclonal antibodies and for recombinant production of humanized monoclonal
antibodies or of scFv fragments are well known in the art. See for example Harlow and Lane (1988); WO90/07861; and
20 WO92/01047. Humanized monoclonal antibodies may also be produced in transgenic mammals; see for example WO91/10741 and WO93/12227.

It is preferred that the antibody reacts specifically with the pathologically aggregated form of the specific protein, and does not react significantly with the unaggregated form of the protein.

25 Following either active or passive immunization, the patient is monitored for clinical improvement, which may commence within as little as one week, but more probably may be observed at six weeks, and may take as long as 12 months. The normal clinical indices which are used in
30 the monitoring of patients with the relevant condition are used. The attending clinician will be aware of the most suitable tests to use.

Where the treatment is prophylactic, the patient

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 9 -

is monitored for signs of development of the condition. The patient may be at risk as a result of genetic linkage, e.g. in familial Alzheimer's disease or Huntington's disease.

5 In a second aspect, therefore, the invention provides a prophylactic or therapeutic composition for use in the method of the invention, comprising a tyrosine cross-linked compound, together with a pharmaceutically acceptable carrier, and optionally further comprising an
10 adjuvant, and/or copper ions complexed to the compound.

In an alternative embodiment of the second aspect, the invention provides a prophylactic or
15 therapeutic composition for use in the passive immunization method of the invention, comprising an antibody directed against a tyrosine cross-linked compound as defined above, or a fragment thereof which is capable of binding to the tyrosine cross-linked compound, together with a pharmaceutically acceptable carrier.

In a third aspect, the invention provides a
20 method of diagnosis of a condition, in which the condition is characterised by pathological aggregation and accumulation of a specific protein associated with oxidative damage and formation of tyrosine cross-links, the method comprising the step of assaying a sample of a
25 biological fluid from a subject suspected of suffering from the condition for the presence of a compound selected from the group consisting of dityrosine, trityrosine, tetratyrosine, oxidised tyrosine orthologues such as o-tyrosine and m-tyrosine, nitrotyrosine, and peptides
30 comprising tyrosine cross-links.

In an alternative aspect, the method comprises the step of assaying a biological fluid from a subject suspected of suffering from the condition for the presence

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 10 -

of antibody directed against a tyrosine cross-linked compound.

Preferably the biological fluid is selected from the group consisting of blood, plasma, serum, cerebrospinal fluid, urine, and saliva. Preferably the compound is dityrosine.

The assay may be performed by any suitable means, but is most conveniently performed by an ELISA assay using antibody directed against tyrosine cross-linked compounds. Such an assay may conversely be used to detect antibody directed against a tyrosine cross-linked compound. Preferably the antibody is a monoclonal antibody, or a mixture of monoclonal antibodies. Alternatively the assay may be performed by measuring fluorescence at an excitation wavelength of 325 nm and an emission wavelength of 350-500 nm.

In all three aspects of this invention, preferably the condition is selected from the group consisting of Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, motoneuron disease, cataract, Parkinson's disease, Creutzfeldt-Jacob disease, Huntington's disease, dementia with Lewy body formation, multiple system atrophy, Hallerboden-Spatz disease, and diffuse Lewy body disease, or cataract.

More preferably the condition is Alzheimer's disease or Parkinson's disease.

For the purposes of this specification it will be clearly understood that the word "comprising" means "including but not limited to", and that the word "comprises" has a corresponding meaning.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows that human A β , but not rat A β ,

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 11 -

develops fluorescence and SDS-resistance following peroxidase-catalyzed oxidation. Human $A\beta_{1-40}$, human $A\beta_{1-42}$, or rat $A\beta_{1-40}$ (50 μM) was incubated in 50 mM borate, pH 9.5 \pm H_2O_2 (1 mM) and peroxidase (7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), for 1 day at 37°C.

- 5 (A) fluorescent spectra (λ_{ex} 325, λ_{em} 350-500);
(B) migration on SDS-PAGE (by Western blot using 4G8);
(C) $A\beta_{1-42}$ (10 nM) was incubated with H_2O_2 (1 μM) and peroxidase (7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 5 days at 37°C in phosphate
10 buffered saline, pH 7.4. The product (lane 2) was compared to peptide incubated under the same conditions in the absence of H_2O_2 /peroxidase (lane 1) by SDS PAGE and Western blot (4G8)

Figure 2 shows that human amyloid-derived $A\beta$ contains
15 tyrosine cross-linked oligomers. Human amyloid-derived $A\beta$ (20 μM) (Roher et al., 1996) was analysed by fluorescence spectroscopy compared to a pure DT standard (λ_{ex} 325, λ_{em} 350-500) (A), and Western blot (4G8) (B).

Figure 3 shows that dityrosine and trityrosine cross-
20 links are present in human amyloid-derived $A\beta$, and that they bind copper.

(A) Human amyloid was purified, hydrolyzed and the mass spectrum determined after chromatographic separation. Two individual scans reflecting analyses of the same sample
25 eluting at different chromatographic retention times (RT) are shown.

(B) Absorbances at 280 nm and 315 nm of purified DT in the presence of increasing concentrations of CuSO_4 or NaCl.

30 Figure 4 shows that soluble human $A\beta$ binds copper with high affinity.

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 12 -

(A) Silver stain of crude soluble extract (1) and pH 1 eluate from the copper-chelating Sepharose column (2).

(B) Western blot of pH 1 eluate probed with WO2, G211 and G210.

5 Figure 5 shows the results of LC-MS analysis, confirming that human A β binds copper.

(A) LC-MS analysis of crude and IMAC purified soluble extracts.

10 (B) Mass spectra of A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₀ with two bound copper atoms.

The IMAC and LC-MS data demonstrate that brain-derived A β can bind copper.

Figure 6 shows the detection of dityrosine in cross-linked A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ in Western blots.

15 Two techniques to create the dityrosine linkages are also compared.

The top Western blot (A) demonstrates the presence of A β using the WO2 antibody. The bottom blot (B) demonstrates the presence of dityrosine linkages recognised by the monoclonal antibody IC3. This antibody was raised against a form of dityrosine prepared using borate/H₂O₂/horseradish peroxidase.

25 Figure 7 shows examples of the forms of tyrosine cross-links produced as potential immunogens. These structures contain tyrosine cross-links and have the carboxy- and amino-termini acetylated to mimic the presence of additional amino acid residues that would normally be present on either side of a tyrosine cross-linked moiety in a tyrosine cross-linked peptide. The presentation of multiple copies of the dityrosine antigen is designed to improve the strength of the immune response generated.

Figure 8 shows the detection of dityrosine bonds in a

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 13 -

variety of tyrosine cross-linked species in Western Blots. The DT-containing species include dityrosine cross-linked A β ₉₋₁₆ dimer or trimer linked to BSA, and various poly-DT species linked to either BSA or KLH carrier proteins. The top Western blot (A) demonstrates the ability of the sample to bind to a polyclonal rabbit antiserum raised against DT which was prepared using the borate/H₂O₂/peroxidase technique and linked to KLH using glutaraldehyde (discussed in Example 7). The bottom Western blot (B) demonstrates the presence of dityrosine linkages recognised by the monoclonal antibody IC3. This antibody was raised against a form of dityrosine also prepared using the borate/H₂O₂/peroxidase technique.

15 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention will now be described in detail by way of reference only to the following non-limiting examples and drawings.

Abbreviations used herein are as follows:

| | |
|--------|---------------------|
| 20 AD | Alzheimer's disease |
| DT | 3,3'-dityrosine |
| TT | 3,3'3'-trityrosine |
| P | pulcherosine |
| iso-DT | isodityrosine |

25

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and A β Peptide Preparation

Oligomeric A β was extracted from amyloid plaques of human AD-affected brains as previously described (Roher et al., 1996). The purified amyloid A β was solubilized in formic acid, and then immediately dialyzed with 5 changes of 100 mM ammonium bicarbonate, pH 7.5 before use.

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 14 -

Human A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ and rat A β ₁₋₄₀ were synthesized, purified and characterized by HPLC analysis, amino acid analysis and mass spectroscopy by W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory (Yale University, New Haven, CT), and corroborative studies were performed using peptide synthesized by Quality Control Biochemicals, Inc. (Hopkinton, MA).

Each peptide was identified as a single peak by HPLC. Synthetic A β peptides were dissolved in doubly deionized water at a concentration of 0.5-1.0 mg/ml, sonicated for 3 min. and then centrifuged for 20 min. at 10 000g and the supernatant (stock A β) used on the day of the experiment. The concentrations of stock A β peptides were determined by spectrophotometric absorbance at 214 nm or by Micro BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL) as previously described (Atwood et al., 1998).

Prior to use, all buffers and stock solutions of metal ions were filtered through a 0.22 μ m filter (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) to remove particulate matter. All other reagents were analytical grade or purer. Horseradish peroxidase was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Preparation and Fluorescence Analysis of Dityrosine and Tyrosine Cross-linked A β

DT standards were generated by incubating L-tyrosine (1 mg/ml) solubilized in borate buffer (50 mM, pH 9.5) with H₂O₂ (5 mM) and horseradish peroxidase (7.5 μ g/ml) for 1 day at 37°C (Amado et al., 1984).

Cross-linked A β was generated by incubating A β (50 μ M) in borate buffer (50 mM, pH 9.5) and with H₂O₂ (1 mM) and peroxidase (7.5 μ g/ml) for 5 days at 37°C. In a

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 15 -

separate experiment to study this reaction under conditions which approached physiological, A β ₁₋₄₂ was diluted to 10 nM in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), and incubated with 1 μ M H₂O₂ and peroxidase (7.5 μ g/ml) for 5 days at 37 °C. Following the incubation, the samples were lyophilized to bring the peptide into a concentration range which could be detected by Western blot (see below).

Reaction products were separated by fast phase liquid chromatography (FPLC). Excess borate was first precipitated from samples prior to chromatography by centrifugation at 0°C. Samples were then acidified by addition of 0.25% TFA and remaining insoluble material removed by filtration (0.22 μ m pore size). Samples were loaded on to a 3 ml Resource RPC column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and the column washed with water containing 0.1% TFA. Bound species were eluted with a 0-100% linear gradient of acetonitrile containing 0.1% TFA at 1 ml/min over 45 min and collected in 0.5 ml fractions. Fractions were dried, reconstituted in water and assayed for dityrosine by fluorescence (excitation 330 nm; emission 400 nm) and UV absorbance (284 nm). Peak fractions were further characterized by mass spectrometry, and dityrosine quantitated using the extinction coefficient ($E_{315 \text{ nm}} = 8380 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Malencik et al., 1996).

Solutions were analyzed for the presence of fluorescent compounds using a Hitachi F-4500 spectrofluorometer. DT, TT and P have characteristic emission spectra ($\lambda_{\text{exc}} 325 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 350\text{-}500 \text{ nm}$), which are quite distinct from those of tyrosine and tryptophan, which do not fluoresce at these wavelengths. There was a linear increase in fluorescence at this emission range with increasing dityrosine concentration between 0-50 μ M.

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 16 -

MALDI-TOF Mass Spectrometry

Samples of SDS-resistant, oligomeric, human amyloid-derived A β were hydrolyzed *in vacuo* with 6N HCl for 48 h at 105 °C. Following this, samples were analyzed by liquid chromatography MALDI-TOF mass spectrometry (LC-MS) at the
5 Harvard University Mass Spectrometry Facility.

Mass spectra were obtained using a LCT mass spectrometer (Micromass Inc, Beverly MA) interfaced with a HP 1100 liquid chromatograph, attached to a C18 reversed-phase column (2.1mm x 250 mm). LC-MS was performed using a
10 gradient of buffer A (water-0.1% formic acid (FA)), and buffer B (acetonitrile-0.1% FA). The gradient was from 2 % B (0- 2 min), to 100 % B (20 - 23 min).

Western Blot Analysis

Aliquots of each reaction (2 ng peptide) were collected into 15 μ l sample buffer (containing 4% SDS, 5 % β -mercaptoethanol) and heated to 95°C (5 min). Samples were run on PAGE (Tricine gels, 10-20%; Novex, San Diego, CA),
20 transferred to PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), fixed with glutaraldehyde (1%, v/v), blocked with milk (10 %, w/v) and then probed with the anti-A β monoclonal antibody 4G8 (Senetek, Maryland Heights, MI) overnight at 4°C. In one experiment the monoclonal
25 antibodies WO2 (epitope:residues 5-8), G211 (epitope:residues 35-42) or G210 (epitope:residues 33-40) were used. The blot was then incubated with anti-mouse horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Pierce, Rockford, IL) for 2 h at room temperature, and developed with ECL
30 reagent (Amersham, Little Chalfont, UK) or Supersignal Ultra (Pierce, Rockford, IL). The chemiluminescent signal was captured using the Fluoro-S Image Analysis System (Bio-

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 17 -

Rad, Hercules, CA) and electronic images analyzed using Multi-Analyst Software (Bio-Rad, Hercules, CA). Molecular size markers were from Amersham (Arlington Heights, IL).

5 Example 1: Peroxidase-catalyzed A β polymerization is accompanied by formation of tyrosine cross-links

We initially tested whether peroxidase-catalyzed oxidative conditions could promote A β polymerization by measuring the fluorescence of human A β ₁₋₄₀, human A β ₁₋₄₂, and rat A β ₁₋₄₀ (50 μ M) incubated with or without H₂O₂ and peroxidase for 1 day. Fluorometric analysis of these samples indicated a marked increase in fluorescence in samples containing A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂, as illustrated in Figure 1A. These results are similar to those previously reported for synthetic human A β , achieved at a much higher peptide concentration, 1.25 mM (Galeazzi et al., 1999). In contrast to the behaviour of the human-sequence A β peptide, no increase in the fluorescence signal of rat A β ₁₋₄₀ was observed after incubation with H₂O₂ and peroxidase, as also shown in Figure 1A. This suggested that the fluorescent signal was specific for tyrosine oxidation products of A β , since rat A β lacks tyrosine (Shivers et al., 1988).

To confirm that these reactions resulted in A β polymerization, A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ treated as described above were run on SDS-PAGE and analyzed by Western blot. Both human synthetic A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ incubated with H₂O₂ and peroxidase displayed marked increases in apparent SDS-resistant polymers compared to untreated A β , as shown in Figure 1B. Neither polymerization nor increased fluorescence was observed when A β was incubated with either

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 18 -

H₂O₂ or peroxidase alone.

Example 2: Polymerization occurs under physiological conditions

5 To determine whether H₂O₂/peroxidase-induced polymerization of synthetic A β occurs under conditions which approached physiological, we also incubated A β ₁₋₄₂ at 10 nM with H₂O₂ at 1 μ M and peroxidase (7.5 μ g/ml) in PBS at pH 7.4. We observed that SDS-resistance of the peptide was 10 again induced, as shown in Figure 1C; however, oligomers of lower apparent molecular weight than those generated by using higher concentrations of substrates were generated, as illustrated in Figure 1B. The migration on SDS-PAGE of the apparent A β polymers under these conditions suggested 15 the formation of dimers (8 kD), trimers (13 kD,) and tetramers (17 kD).

As shown in Figure 2A and Figure 2B respectively, fluorescent analysis of A β purified from AD-affected post-mortem brain tissue revealed the characteristic 20 spectrofluorometric pattern of tyrosine cross-linked species; this purified protein migrated as apparent oligomers on SDS-PAGE, as previously described (Roher et al., 1996).

25 Example 3: Tyrosine cross-linking of oligomers

To confirm that the apparently oligomeric human amyloid-derived A β was tyrosine cross-linked, a sample was hydrolyzed and then analyzed by MALDITOF-MS. This analysis, illustrated in Figure 3A, indicated a peak 30 corresponding to 361 Da (m/z 361, representative of M + H), thereby confirming the existence of DT or iso-DT in the sample. A smaller peak corresponding to 540 Da was also

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 19 -

detected, consistent with the presence of TT or P. Other prominent peaks were detected at 247, 263, 307, 309 and 538 Da; these may represent other modifications to A β amino acids, such as carbonylation (Atwood, 1999) and other amino acid cross-links.

More abundant fragments from the hydrolysis of human A β were also detected at 423 and 425 Da (ratio 3:2), suggestive of Cu binding to DT or iso-DT (Cu mass = 63 & 65 Da, \approx 2:1 natural isotope abundance).

10

Example 4: Binding of copper by dityrosine

In order to test whether the peaks at 423 and 425 could be due to DT binding to Cu, we examined the interaction of Cu²⁺ with DT by spectroscopic analysis.

15 Dityrosine (50 μ M) was solubilized in phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) and the absorbance spectra (200 - 1000 nm) measured on a SPECTRAMax Plus (Molecular Devices). A trough (280 nm) and peak (315 nm) were apparent. Dityrosine was then incubated with increasing concentrations of CuNO₃ 20 (0-200 μ M) or NaCl (0-200 μ M), and changes in absorbance at both 280 nm and 315 nm were monitored.

We found that as DT was incubated with increasing concentrations of Cu²⁺ its characteristic absorbance peak at 315 nm diminished, whereas a new absorbance peak developed 25 at 280 nm. The spectroscopic changes reached a plateau at a stoichiometric ratios between 1:1 - 2:1 (Cu:DT), and then saturated at 3:1, suggesting that DT can bind up to 3 equivalents of Cu. Dichloride binding would also produce a similar p + 2 mass unit increment (Cl mass = 35 and 37 Da, 30 \approx 3:1 natural isotope abundance), but coincubating DT with NaCl induced no spectroscopic absorbance changes. These results are shown in Figure 3B.

Example 5: Dityrosination of A β increases its copper-binding capacity

We predicted that a proportion of the A β found in the soluble fraction of human brain would display enhanced copper binding properties due to dityrosination. To test whether this was in fact the case, we passed a portion of soluble extract of AD-affected brain over a chelating Sepharose column charged with copper. 0.5 g of cerebral cortex grey matter from frozen AD and control brains (AC) was homogenised in 3 ml of ice cold phosphate buffered saline (PBS). Samples were centrifuged at 175 000 g for 1 hour and the supernatant retained for analysis of A β content. 10ml of supernatant was loaded onto a chelating Sepharose column charged with 1mg/ml copper sulphate. Unbound proteins were washed through using a 0.05M Na acetate buffer with 0.5M NaCl at pH 8. The bound material eluted in a stepwise gradient of increasing acidity, using successive steps of pH 5.5, 3 and 1, followed by a wash with 50mM EDTA to strip the column. Eluates were subjected to exhaustive dialysis to remove free copper and salts using a size cutoff of 2 kDa, freeze-dried and subjected to SDS-PAGE, Western blot and LC-MS analyses. ESI mass spectra (+ ve ion) were acquired on a Quatro II triple quadrupole (Micromass). Mass spectra were collected in continuum mode every 8 seconds from 650 to 1650 m/z. Samples were introduced to the ion source in 5mM ammonium acetate buffer. Slot blot analysis showed no WO2 immunoreactivity in the pH3 eluate, and a further elution was performed at pH 1. Strong immunoreactivity was detected at this pH, and the dialysed sample was blue in colour.

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 21 -

Western blot analysis revealed the presence of A β in the pH 1 and EDTA fractions; this suggested very high-affinity binding to copper, since pH 3 is usually sufficient to elute most copper-binding protein from such a column. Material in these fractions was shown to be highly enriched in oligomeric A β . These results are illustrated in Figure 4.

Silver staining (Figure 4A) demonstrated substantial metal affinity-based purification (lane 1 vs. 2), and Western blot analysis displayed immunoreactive bands which appear to correspond to multiples of monomeric A β (Figure 4B). Figure 5 shows LC (top) and MS (bottom) traces from crude and IMAC-purified supernatant extracts from AD brain tissue. It is noticeable that the LC and MS spectra are substantially cleaner for the IMAC purified sample. LC-MS analysis of the IMAC purified sample produced signals corresponding to A β species, including A β ₁₋₄₀ bearing 2 copper atoms, as confirmed by LC-MS analysis of synthetic peptide in the presence or absence of copper. Highlighted peak clusters on representative mass spectra indicate mass/charge ratios consistent with parent ions of masses 4515.1 (A β ₁₋₄₂) and 4457.9 (A β ₁₋₄₀ +2 Cu).

In order to confirm whether this strongly copper-binding A β fraction contained DT, we employed the monoclonal antibody IC3 raised against DT generated by a process using H₂O₂ and horseradish peroxidase (Kato et al. (1998); this was the gift of Dr. Yoji Kato of the Himeji Institute of Technology, Himeji, Japan.). We found that the higher molecular weight oligomers of A β observed on Western blot co-localised with positive staining for DT.

The A β containing fractions also exhibited fluorescence emission spectra characteristic of the

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 22 -

presence of the dityrosine moiety. This emission was quenched by the addition of copper in a fashion predicted for the enhanced copper binding due to this modification.

5 Example 6: Further characterisation of dityrosinated A β

DT-enriched A β is isolated from the soluble fraction of human brain in sufficient quantity to carry out further characterisation. These studies include toxicity studies in tissue culture, amino acid sequencing, metal binding
10 studies, and experiments to determine whether DT-enriched A β has enhanced electrochemical activity, for example induction of hydrogen peroxide formation and copper reduction.

15 Example 7: Effect of immunization against dityrosine

We attempted to raise an immune response to DT in wild-type mice. In this experiment the DT was prepared by mixing tyrosine in borate buffer with H₂O₂, and incubating this mixture with horseradish peroxidase, as described in
20 the Experimental Procedures.

DT was conjugated to the carrier protein Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH) using glutaraldehyde and according to standard protocols. An emulsion of each of DT-KLH, KLH alone or untreated tyrosine was prepared in Freund's
25 complete adjuvant, and two animals each were inoculated intraperitoneally with an inoculum containing 100mg of either DT-KLH, or unreacted tyrosine or KLH alone. Pre-immune serum was taken at this time. The first immune sera were collected 10 days after immunization. Two booster
30 immunizations were given at fortnightly intervals thereafter. Blood samples were taken at each inoculation and at one week following the final boost.

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 23 -

An ELISA was adapted to assay the immune response to DT. We found that the immune responses to DT of the mice which were immunized with either DT-KLH or unreacted tyrosine were never greater than the responses of mice immunized with KLH alone. The DT monoclonal antibody IC3 obtained from Dr. Kato was used as a positive control, and produced a modest positive reaction against DT in this assay.

In a second experiment, two rabbits were immunized with DT-KLH in the manner described above. The ELISA results for sera produced by these animals demonstrated a moderate immune response against DT.

We also attempted to demonstrate the presence of endogenous antibodies to DT in individual sera from four human patients who were diagnosed with Alzheimer's disease by post mortem histopathology. No immunoreactivity against DT was observed in these sera by ELISA or by Western blot.

In a further experimental iteration, we examined whether the mouse or rabbit antisera raised against the DT-KLH described above, recognised DT moieties in the dimeric and higher order oligomers of A β extracted from human brain. Surprisingly, none of the sera demonstrated activity against DT moieties in human brain A β . The positive control antibody IC3 was also negative in this assay.

25

Example 8: Effect of the method of producing dityrosine moieties on immunogenicity and antibody reactivity.

We suspected that the unexpected lack of an immune response might be due to poor antigenicity of the dityrosine moieties.

To investigate this hypothesis, we prepared tyrosine cross-linked synthetic A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ by two different

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 24 -

methods. The first method involved incubation of the A β peptides in borate buffer with horseradish peroxidase and H₂O₂, as described in the Experimental Procedures above.

5 In the second method, a 2.5 μ M solution of A β was prepared in double deionised water containing 30 μ M CuCl₂ and 200 μ M H₂O₂, and incubated for one to five days at room temperature.

Samples of each variety of cross-linked A β were subjected to PAGE, and Western blotting was performed using 10 the A β -specific antibody WO2 or the positive control anti-DT antibody IC3. The results of these blots are presented in Figure 6.

The IC3 antibody detected DT in the cross-linked A β in both ELISA and Western blot assays. In addition, in 15 Western blots the antibody recognised the presence of dityrosine in the DT-KLH produced in Example 7. From these results it appears that A β ₁₋₄₂ is more efficiently cross-linked by either the borate or copper methods than is A β ₁₋₄₀. In addition, A β ₁₋₄₀ loses immunoreactivity to WO2 20 when cross-linked with the method involving copper. This may be due to greater susceptibility of the peptide to free radical damage or the modification, masking or hindering of the antibody binding site after crosslinking.

Surprisingly, it is also evident from the 25 differential staining with IC3 that the pattern of A β cross-linking through dityrosine depends on the different reactions used to produce the crosslinking. The IC3 monoclonal antibody did not detect DT produced by the boric acid method, but did detect DT produced by the copper 30 method.

Also surprisingly, the IC3 antibody detected DT

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 25 -

cross-linking in A β ₁₋₄₀ in preference to A β ₁₋₄₂. This pattern is the inverse of that observed with the anti A β antibody W02.

5 These results demonstrate that the method of inducing DT cross-linking and the structure of the polypeptide being cross-linked are crucial variables in recognition of DT by an antibody. In this case, the addition of two amino acid residues to dityrosine-linked A β ₁₋₄₀ resulted in a dramatic decrease in the ability of an anti-dityrosine antibody to
10 bind. This result may be extrapolated to the *in vivo* situation, suggesting that the selection of antigen is critical to eliciting a physiologically-relevant immune response.

15 Example 9: Effect of the form of tyrosine cross-link on antibody recognition

It was anticipated that a DT inoculum must be conjugated to a large carrier protein to provoke an immune response. Furthermore, the quality of the immune response
20 generated would also be in part dependent upon the selection of an appropriate carrier. To examine this we selected two alternative carriers for various DT species, Bovine Serum Albumin (BSA) and Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH).

25 In addition, to investigate the role of different forms of dityrosine in immuno-recognition, we prepared a crude mixture which contained variety of forms of DT, including numerous oligomers and branched forms of DT. The tyrosine cross-links in this crude mixture were created
30 using the borate/H₂O₂/peroxidase method described above. The resulting DT mixture contained molecules with linkages at a variety of positions on the ring and backbone of the

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 26 -

tyrosine molecule. Examples of the structures produced are illustrated in Figure 7.

The crude mixture was then separated by reverse phase HPLC into fractions which contained predominantly mono-
5 dityrosine, dityrosine, trityrosine and polytyrosine.

Two important characteristics of the oligomeric structures are that they can present multiple copies of desired antigen to improve immunogenicity and enhance the immune response, and that they can allow the presentation
10 of alternative forms of chemical bonds between the tyrosine residues.

To investigate the nature of the tyrosine cross-links which comprise the oxidative modifications to A β *in vivo* in AD, we also prepared tyrosine cross-linked A β fragments.
15 Using the same technique, we prepared molecules consisting of two or more A β_{9-16} peptide chains cross-linked by dityrosine (structures not shown). The resultant cross-links most probably represent a racemic mixture of a variety of forms of tyrosine cross-links.

A number of the novel structures described above were characterised in Western blots using the anti-DT monoclonal IC3 or the immune serum from a rabbit which was immunized with DT-KLH (described in Example 7). These results are presented in Figure 8.

25 The results demonstrated that the dimer but not the trimer of A β_{9-16} linked to BSA was immunoreactive to both the rabbit immune serum and the monoclonal antibody IC3.

The presence of KLH was recognised by the rabbit immune serum in the blots irrespective of whether it was
30 conjugated to an additional tyrosine cross-link antigen. Polytyrosine-BSA and polytyrosine-KLH were recognised by IC3, but the rabbit immune serum could not distinguish

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 27 -

between KLH alone and polytyrosine-KLH.

It is clear from these results that the rabbit immunization elicited an antibody which was reactive with some forms of dityrosine but not others, as predicted from the data presented in Figure 6.

Example 10: Effect of immunization with dityrosine on A β deposits in transgenic animals.

Transgenic mouse models are available for a number of neurological disorders, including Alzheimer's disease (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996); Parkinson's disease (Masliah et al., 2000); familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Gurney et al., 1994); Huntington's disease (Reddy et al., 1998); and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) (Telling et al., 1994).

We have found that one of the transgenic models for Alzheimer's disease, the APP2576 tg mouse (Hsiao et al., 1996) also has a high incidence of cataract. These animal models are suitable for testing the methods of the invention.

Transgenic mice of the Strain APP2576 (Hsiao et al 1996) are used. Eight to nine month old female mice are selected and divided into groups for treatment.

Tyrosine cross-linked antigens are prepared using a variety of techniques to generate different forms of tyrosine cross-links. Antigens used include:

| Antigen | Carrier protein |
|-------------------------|-----------------|
| A β_{2-16} dimer | BSA |
| A β_{2-16} trimer | BSA |
| (crude) A β EE | BSA |
| poly-tyrosine | BSA |
| A β trimer | KLH |
| (crude)A β EE | KLH |
| poly-tyrosine | KLH |

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 28 -

Each immunisation comprises 25µg of antigen in Freund's complete adjuvant, in a total volume of 0.5ml, given subcutaneously.

Control animals received carrier protein without the tyrosine cross-linked antigen.

Samples of serum are taken at 14 day intervals, with booster immunizations given at 28 days. Serum samples are assayed for the presence of anti-DT antibody, using the ELISA method of Kato et al for example. It is expected that high antibody titres are obtained by about five weeks following the final booster injection. The levels of Aβ in the blood are also determined.

Once high titre antibody is present, mice are sacrificed at intervals, and their brains examined to determine whether the immunization decreases brain amyloid formation, and to identify the most effective immunization protocol. The levels of soluble and insoluble Aβ in the brain and serum is determined using calibrated Western blots. The Aβ plaque burden in the brain is examined immunohistochemically.

Other mice in each group are tested over a period of up to eight months for cognitive performance using a Morris water maze according to standard methods. The general health and well being of the animals is also measured every day by a blinded operator using a five point integer scale that subjectively rates a combination of features including motor activity, alertness and general health signs.

Example 11: Effect of treatment with antibodies against dityrosine

Normal mice are hyperimmunized by standard procedures well known in the art with one or more of the immunogens

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 29 -

described in Example 7. The mice are bled at intervals and their sera assayed for anti-DT as described above. Upon detection of high titre antibody, sera are harvested and the antibody component isolated and/or enriched using methods commonly available in the art.

These antibodies are injected intravenously or directly into the CSF of APP2576 transgenic mice, either in a single dose or repeated dosages over a course of days or weeks.

The transgenic mice are sacrificed at intervals following treatment with anti-dityrosine antibodies, and their brains examined to determine whether antibody treatment decreases brain amyloid formation.

Example 12: Diagnosis of conditions associated with tyrosine cross-linking

Samples of sera and cerebrospinal fluid (CSF) from patients confirmed to be suffering from AD and from age-matched controls are assayed for the presence of tyrosine cross-linked compounds using fluorescence analysis as described above. In one set of samples, tyrosine cross-linked compounds in the sample are first enriched by passing the sample over a solid support coupled to nitrilotriacetic acid, as described in U.S. Patent No. 5972674.

Similar assays are performed using samples from patients suffering from ALS, Parkinson's disease, and CJD.

It is possible that patients may also have circulating antibodies directed against tyrosine cross-linked compounds, and so in an alternative assay such antibodies are directed in either sera or CSF using an ELISA assay, employing monoclonal antibodies directed against DT (Kato et al., 1998).

Example 13: Identification of the forms of dityrosine
present in oxidatively-modified A β

In order to identify the predominant form or forms of
5 DT present in oxidatively modified A β , enzymatic digestion
fragments of copper-catalysed A β oligomers are generated,
and the fragments analysed by mass spectrometry. This
technique has recently been applied to the analysis of
copper-catalysed oxidative modifications to the prion
10 protein (Requena, J.R., et al. 2001 PNAS 98: 7170-7175)

This enables the identification of the antigen most
likely to be effective in eliciting monoclonal antibodies
suitable for use in passive immunization, as described in
Example 11. Methods for generating highly specific
15 monoclonal antibodies against any specific antigen are well
known in the art. Once the antigen has been selected, a
systematic analysis of the most effective means of antigen
presentation is carried out using known methods.

20 DISCUSSION

The neuronal damage in AD is associated with soluble
A β rather than insoluble A β which is immobilised in
neuritic plaques (McLean et al., 1999). We have now shown
for the first time that the neurotoxic A β oligomers
25 extracted from AD-affected brains contain tyrosine cross-
links), which may be DT, iso-DT, TT and/or P. These
modifications were emulated *in vitro* by incubating A β with
peroxidase and H₂O₂, or by oxidation of A β in the presence
of copper ions. These modifications could interfere with
30 the metabolism of A β , may contribute to the neurotoxicity
seen in AD, and is indicative of the neurochemical
derangement in the disease.

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 31 -

The formation of the carbon-carbon bridge between DT, T and P is thought to be irreversible; DT cross-links are very resistant to hydrolytic cleavage by 6N HCl at 110°C for 24h, and to protease digestion (Smail et al., 1995).

- 5 Pathologically, the catabolic resistance of DT modifications of proteins could explain the contribution of tyrosine polymers to lipofuscin formation (Kato et al., 1998), and to the cross-linking of α -crystallin in fluorescent cataract formation (Kikugawa et al., 1991).
- 10 Clearly, tyrosine cross-linkage of A β would be expected to inhibit its catabolism, and so may be an important step in the evolution of amyloid plaque deposits in AD.

The formation of tyrosine cross-links necessitates that molecules containing tyrosyl radicals come into contact. Our results suggest that the tyrosine residue of A β must be accessible to peroxidase(s), and that tyrosyl residues between A β subunits of amyloid must, at some stage, be in apposition.

- Since H₂O₂ is required for DT formation, the
- 20 detection of DT modifications in AD-derived brain A β implies that H₂O₂ is elevated in the brain in AD. Without wishing to be bound by any proposed mechanism, we believe that phagocytic activation of the microglial cells in the brain parenchyma, which is closely associated with amyloid
- 25 formation in AD (Sheng et al., 1997), could contribute peroxidase activity and H₂O₂ to cause tyrosine cross-linkage of A β . Activated rat microglia have been observed to have increased peroxidase levels (Lindenau et al., 1998), and *in vitro* experiments have demonstrated the
- 30 capacity of A β to prime and/or trigger the respiratory burst of cultured rat microglia and human phagocytes (Van Muiswinkel et al., 1996). Activated phagocytes release

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 32 -

myeloperoxidase (Pember et al., 1983), and generate reactive oxygen species during the respiratory burst. This response is designed to kill invading pathogens or tumor cells; however, this environment has also been shown to promote the oxidation of surrounding proteins and lipids (Byun et al., 1999). A similar microenvironment may be generated in the vicinity of activated microglia. In vitro, myeloperoxidase-H₂O₂ systems promote the synthesis of tyrosine cross-linked species such as DT, TT, P and isoDT (Jacob et al., 1996).

Thus the activation of microglia in response to A β accumulation may promote tyrosine cross-linkage of the A β , inhibiting its clearance and leading to a vicious cycle. Contributing to this possible vicious cycle, a proximate source of H₂O₂ for DT formation may be generated by A β itself, since A β forms H₂O₂ by reacting with O₂ through the reduction of substoichiometric amounts of Cu²⁺ or Fe²⁺ (Huang, Atwood, et al., 1999; Huang, Cuajungco, et al., 1999). Therefore, it is highly significant that A β was purified intact, together with bound copper, from human amyloid (Fig. 3A). Synthetic A β ₁₋₄₂ binds Cu²⁺ with attomolar affinity, and since copper is enriched in AD amyloid (Lovell et al., 1998), we had suspected that A β might bind copper *in vivo*. The finding that amyloid-derived A β contains copper is also relevant to AD pathophysiology, because Cu²⁺ precipitates A β (Atwood et al., 1998), and the toxicity of the peptide is potentiated by Cu²⁺ (Huang, et al., 1999).

Intriguingly, Cu²⁺ remained bound to DT after acid hydrolysis of the human amyloid-derived A β , as well as under the acidic conditions of the mass spectrometry (Fig.

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 33 -

3A). This unusual affinity for Cu^{2+} could be the result of an adventitious high-affinity Cu^{2+} binding site on $\text{A}\beta$ being formed by the DT modification. As a consequence of this exaggerated affinity for Cu^{2+} , the neurotoxicity of DT-
5 modified $\text{A}\beta$ or its electrochemical activity may be increased compared to non-modified $\text{A}\beta$. Adventitious Cu^{2+} binding caused by the DT modification could also exaggerate the precipitation of $\text{A}\beta$ into amyloid, which would explain why treatment with chelators at pH 7.4 promoted the release
10 of dimeric $\text{A}\beta$ to a greater extent than that of monomeric $\text{A}\beta$ (assayed by Western blot) from post-mortem AD brain tissue (Cherny et al., 1999). The combination of increased proteolytic resistance and adventitious metal binding may be particularly pernicious consequences of the tyrosine
15 cross-linking of $\text{A}\beta$ which contribute to the pathology of AD.

PDAPP transgenic mice overproduce the human form of $\text{A}\beta_{1-42}$ and show extensive cerebral amyloid plaque deposition with aging, as well as behavioural and cognitive deficits
20 (Games et al., 1995; WO96/40896). Immunisation of mature PDAPP mice with synthetic $\text{A}\beta_{1-42}$ results in a striking diminution in the number and intensity of amyloid plaques, while PDAPP mice immunised with this antigen fail to develop amyloid plaques (Schenk et al., 1999 and
25 WO99/27944). It appeared that a successful immune response to $\text{A}\beta_{1-42}$ had been induced, with evidence of scavenging microglial cells in the immediate vicinity of the remnant amyloid plaques, and the presence in blood of antibodies directed against $\text{A}\beta_{1-42}$. The authors suggested that
30 immunization with $\text{A}\beta$ could be used for prevention or treatment of AD. However, it is widely thought that it is unlikely that an immunotherapy for AD is feasible, because

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 34 -

a human recipient would be unable to mount a significant immune response to a self protein because of immunological tolerance. The results obtained by Schenk et al. suggest that the brain may have the capacity to resorb and clear otherwise intractable amyloid deposits, given the appropriate stimulus. However, it is undesirable to use immunisation with A β itself, because of the potential for induction of harmful autoimmune responses, and/or the induction of an inadequate, non plaque-clearing response.

5

10 By immunising with non-native dityrosine or dityrosine-containing compounds according to the present invention, this problem can be avoided.

It will be apparent to the person skilled in the art that while the invention has been described in some detail for the purposes of clarity and understanding, various modifications and alterations to the embodiments and methods described herein may be made without departing from the scope of the inventive concept disclosed in this specification.

15

20 References cited herein are listed on the following pages, and are incorporated herein by this reference.

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 35 -

REFERENCES

- Amado, R., Aeschbach, R., and Neukom, H. (1984)
Methods Enzymol 107, 377-88.13
- 5
- Atwood, C. S., Huang, X., Moir, R. D., Scarpa, R. C.,
Bacarra, N. M. E., Hartshorn, M.A., Goldstein, L. E.,
Romano, D. M., Tanzi, R. E., and Bush, A. I. (1997)
Soc. Neurosci. Abstr. 23, 1883
- 10
- Atwood, C. S., Moir, R. D., Huang, X., Bacarra, N. M. E.,
Scarpa, R. C., Romano, D. M., Hartshorn, M. A., Tanzi, R.
E., and Bush, A. I. (1998) *J.Biol.Chem.* 273,12817-12826
- 15
- Atwood, C. S., Scarpa, R. C., Huang, X., Farrag, Y. W.,
Moir, R. D., Cuajungco, M. P., Tanzi, R. E., and Bush, A.
I. (1999) *Soc. Neurosci. Abstr.* 24, 546
- 20
- Atwood, C. S., Scarpa, R. C., Huang, X., Moir, R. D.,
Jones, W. D., Fairlie, D. P., Tanzi, R. E., and Bush, A. I.
(2000) *J. Neurochemistry* 75, 1219-1233
- 25
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer,
M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C., and Glabe, C.
(1992) *J.Biol.Chem.* 267, 546-554
- 30
- Byun, J., Henderson, J. P., Mueller, D. M., and Heinecke,
J. W. (1999) *Biochemistry* 38(8), 2590-600
- Cherny, R. A., Legg, J. T., McLean, C. A., Fairlie, D.,
Huang, X., Atwood, C. S., Beyreuther, K., Tanzi, R. E.,
Masters, C. L., and Bush, A. I. (1999)
J. Biol. Chem. 274, 23223-23228

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 36 -

- Dyrks, T., Dyrks, E., Hartmann, T., Masters, C., and Beyreuther, K. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 18210-18217
- 5 Galeazzi, L., Ronchi, P., Franceschi, C., and Giunta, S. (1999) *Amyloid* 6(1), 7-13
- Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885-890
- 10 Gross, A. J., and Sizer, I. W. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 1611-1614
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. (1996) *Science*; 274(5284):99-102.
- 15 Heinecke, J. W., Li, W., Francis, G. A., and Goldstein, J. A. (1993) *J Clin Invest* 91(6),2866-72
- Hensley, K., Maidt, M.L., Yu, Z., Sang, H., Markesbery, W.R., and Floyd, R.A. (1998) *J. Neurosci* 18 8126-8132
- 25 Huang, X., Cuajungco, M. P., Atwood, C. S., Hartshorn, M. A., Tyndall, J., Hanson, G. R., Stokes, K. C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L. E., Scarpa, R. C., Saunders, A. J., Lim, J., Moir, R. D., Glabe, C., Bowden, E. F., Masters, C. L., Fairlie, D. P., Tanzi, R. E., and Bush, A. I. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 37111-6
- 30 Huang, X., Atwood, C. S., Hartshorn, M. A., Multhaup, G., Goldstein, L. E., Scarpa, R. C., Cuajungco, M. P., Gray, D.

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 37 -

- N., Lim, J., Moir, R. D., Tanzi, R. E., and Bush, A. I. (1999) *Biochemistry* 38, 7609-7616
- Jacob, J. S., Cistola, D. P., Hsu, F. F., Muzaffar, S.,
5 Mueller, D. M., Hazen, S. L., and Heinecke, J. W. (1996)
J Biol Chem 271(33), 19950-6
- Kato, Y., Maruyama, W., Naoi, M., Hashizume, Y., and Osawa,
T. (1998) *FEBS Letters* 439(3), 231-4
10
- Kikugawa, K., Kato, T., Beppu, M., and Hayasaka, A. (1991)
Biochim Biophys Acta 1096(2), 108-14
- Lindenau, J., Noack, H., Asayama, K., and Wolf, G. (1998)
15 *Glia* 24(2), 252-6
- Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell,
J. L., and Markesbery, W. R. (1998)
J Neurol Sci 158(1), 47-52.15
20
- Malencik, D. A., Sprouse, J. F., Swanson, C. A., and
Anderson, S. R. (1996) *Anal Biochem* 242(2), 202-13
- Masters, C. L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J.,
25 Martins, R. N., and Beyreuther, K. (1985)
The EMBO Journal 4, 2757-2763
- McLean et al.; (1999), *Ann. Neurol.* 46, 860-866.
- 30 Pember, S. O., and Kinkade, J. M., Jr. (1983)
Blood 61(6), 1116-24.14
- Requena, J.R., et al. (2001) *PNAS* 98, 7170-7175)

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 38 -

- Rocher, A. E., Chaney, M. O., Kuo, Y. M., Webster, S. D.,
Stine, W. B., Haverkamp, L. J., Woods, A. S., Cotter, R.
J., Tuohy, J. M., Krafft, G. A., Bonnell, B. S., and
5 Emmerling, M. R. (1996) *J Biol Chem* 271(34), 20631-5
- Sela M. and Arnon, R. (1960) *Biochem J.* 75, 91-102.
- Sheng, J. G., Mrak, R. E., and Griffin, W. S. (1997) *Acta*
10 *Neuropathol (Berl)* 94(1), 1-5
- Schenk, D. et al., (1992) *Nature* 400, 173-177.
- Shivers, B. D., Hilbich, C., Multhaup, G., Salbaum, M.,
15 Beyreuther, K., and Seeburg, P.H. (1988)
EMBO J. 7, 1365-1370
- Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus,
S., Shaffer, L. M., Cai, X.-D., McKay, D. M., Tintner, R.,
20 Frangione, B., and Younkin, S. G. (1992)
Science 258, 126-129
- Smail, E. H., Briza, P., Panagos, A., and Berenfeld, L.
(1995) *Infect Immun* 63(10), 4078-83
25
- Souza, J.M., Giasson, B.I., Chen, Q., Lee, V.M-Y., and
Ischiropoulos (2000) *J. Biol. Chem.*, 295, 18344-18349
- Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., and Eikelenboom, P.
30 (1996) *J. Neurochem.* 66, 2468-2476
- Vaughan, D. W., and Peters, A. (1981)
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 40, 472-487

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 39 -

CLAIMS:

1. A method of prophylaxis, treatment or alleviation of a condition, comprising the step of immunizing a subject in need thereof with an immunizing-effective dose of one or more tyrosine cross-linked compounds, wherein the condition is characterised by pathological aggregation and accumulation of a specific protein associated with oxidative damage and formation of tyrosine cross-links.
2. A method according to claim 1, in which the pathologically aggregated form of the specific protein comprises a tyrosine cross-linked moiety.
3. A method according to claim 2, in which the tyrosine cross-linked compound is a peptide which is an immunogenic portion of the pathologically aggregated form of the specific protein, the peptide comprising a cross-linked tyrosine moiety linked to residues upstream and downstream of the cross-linked tyrosine.
4. A method according to claim 1, in which the tyrosine cross-links in the compound are obtainable by oxidation in the presence of copper ions.
5. A method according to claim 1, in which the tyrosine cross-linked compound is a dityrosine cross-linked compound.
6. A method according to claim 1, in which the tyrosine cross-linked compound is complexed with copper ions.
7. A method according to claim 6, in which the ratio of

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 40 -

copper ions to dityrosine is less than or equal to 3:1, provided that each dose administered contains no more than 1 μM copper.

- 5 8. A method according to claim 1 in which the compound is coupled to a carrier protein which is itself immunogenic.
9. A method according to claim 8 in which the carrier protein is selected from the group consisting of tetanus toxoid, keyhole limpet haemocyanin, and albumin.
10. A method according to claim 1 in which the compound is administered together with an adjuvant.
- 15 11. A method according to claim 3, in which the immunogenic portion of the specific protein is the minimal portion which is immunogenic.
- 20 12. A method according to claim 1, in which the condition is Alzheimer's disease, the specific protein is $\text{A}\beta$, and the tyrosine cross-linked compound is a tyrosine cross-linked peptide derived from the sequence surrounding tyrosine 10 in the amino acid sequence of human $\text{A}\beta_{1-40}$ or $\text{A}\beta_{1-42}$.
- 25 13. A method according to claim 12, in which the tyrosine cross-linked peptide comprises dityrosine.
14. A method according to claim 12 in which the tyrosine cross-linked peptide is complexed with copper ions.
- 30 15. A method according to claim 1, comprising the

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 41 -

additional steps of:

identifying the predominant forms of the tyrosine cross-links in the pathologically aggregated specific protein; and

- 5 synthesising one or more tyrosine cross-linked compounds comprising one or more of the predominant forms of tyrosine cross-links.

16. A method of prophylaxis, treatment or alleviation of
10 a condition, in which the condition is characterised by pathological aggregation and accumulation of a specific protein associated with oxidative damage and where the pathologically aggregated form of the specific protein
15 comprises a tyrosine cross-link, the method comprising the step of administering an effective amount of an antibody or an antibody fragment,

said antibody or antibody fragment is raised against a tyrosine cross-linked compound,

- 20 said compound being an immunogenic portion of the pathologically aggregated form of the specific protein and comprising a tyrosine cross-link ,

and which antibody or antibody fragment is capable of specifically binding the pathologically aggregated form of the specific protein,

- 25 to a subject in need of such treatment.

17. A method according to claim 16, in which the antibody is polyclonal.

- 30 18. A method according to claim 16, in which the antibody is of human origin.

19. A method according to claim 16, in which the antibody

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 42 -

is monoclonal.

20. A method according to claim 19, in which the antibody is humanized.

5

21. A method according to claim 16, in which the antibody or antibody fragment reacts specifically with the pathologically aggregated form of the specific protein, and does not react significantly with the unaggregated form of the specific protein.

10

22. A method according to claim 16, in which the tyrosine cross-links in the compound are obtainable by oxidation in the presence of copper ions.

15

23. A prophylactic or therapeutic composition for use in a method according to claim 1, comprising a tyrosine cross-linked compound, together with a pharmaceutically acceptable carrier.

20

24. A prophylactic or therapeutic composition according to claim 23, in which the tyrosine cross-linked compound is complexed with copper ions.

25

25. A prophylactic or therapeutic composition according to claim 23, further comprising an adjuvant.

26

26. A prophylactic or therapeutic composition for use in a method according to claim 16, the composition comprising an antibody or an antibody fragment raised against a tyrosine cross-linked compound,

30

said compound being an immunogenic portion of the pathologically aggregated form of the specific protein and

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 43 -

comprising a tyrosine cross-link,

and which antibody or antibody fragment is capable of specifically binding the pathologically aggregated form of the specific protein,

5 together with a pharmaceutically acceptable carrier.

27. A method of diagnosis of a condition, in which the condition is characterised by pathological aggregation and accumulation of a specific protein associated with oxidative damage and formation of tyrosine cross-links, comprising the step of assaying a sample of a biological fluid from a subject suspected of suffering from the condition for the presence of a molecule comprising tyrosine cross-links.

10
15

28. A method of diagnosis of a condition characterised by pathological aggregation and accumulation of a specific protein associated with oxidative damage and formation of tyrosine cross-links, comprising the step of assaying a biological fluid from a subject suspected of suffering from the condition for the presence of antibody directed against a molecule comprising tyrosine cross-links.

20

29. A method according to claim 27 or claim 28, in which the molecule comprises dityrosine.

25

30. A method according to claim 27 or claim 28, in which the biological fluid is selected from the group consisting of blood, plasma, serum, cerebrospinal fluid, urine, and saliva.

30

31. A method according to claim 1, claim 16, claim 27 or claim 28, in which the condition is selected from the group

WO 02/00245

PCT/AU01/00786

- 44 -

consisting of Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, motoneuron disease, cataract, Parkinson's disease, Creutzfeldt-Jacob disease, Huntington's disease, dementia with Lewy body formation, multiple system atrophy,
5 Hallerboden-Spatz disease, and diffuse Lewy body disease.

32. A method according to claim 1, claim 16 claim 27 or claim 28, in which the condition is Alzheimer's disease or Parkinson's disease.

10

Figure 1

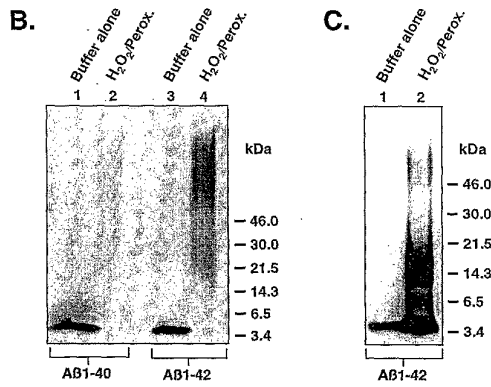
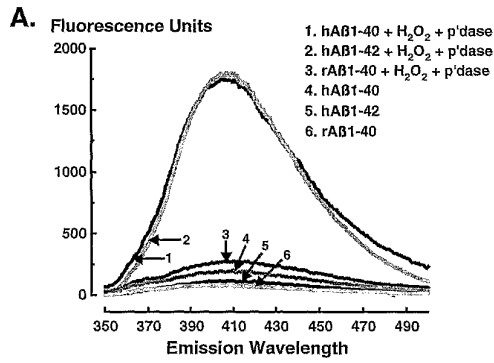
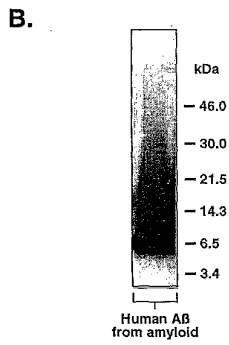
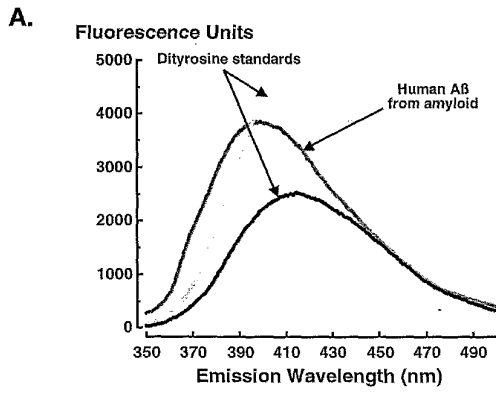
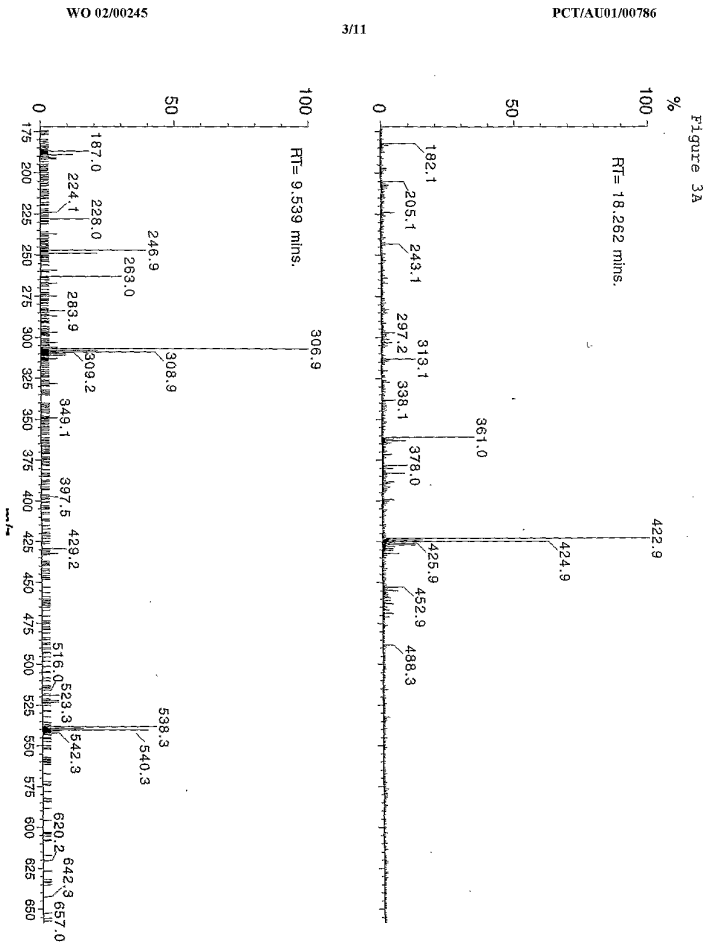


Figure 2



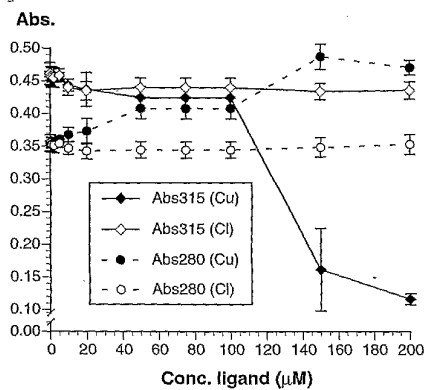


3/11

PCT/AU01/00786

WO 02/00245

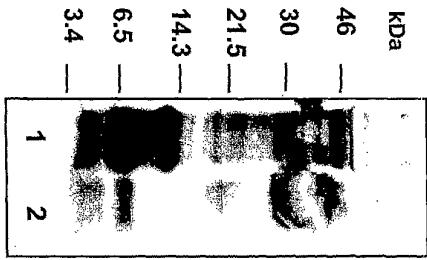
Figure 3B



WO 02/00245

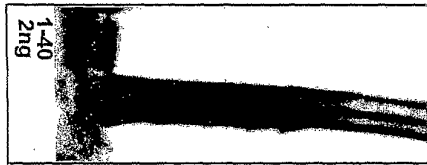
5/11

PCT/AU01/00786



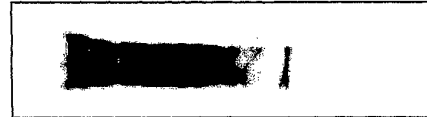
A

Figure 4

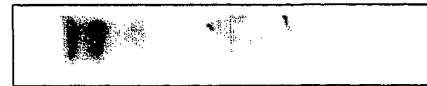


B

WO2

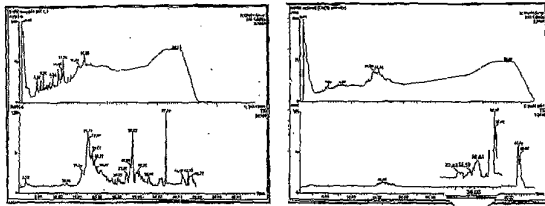


G211



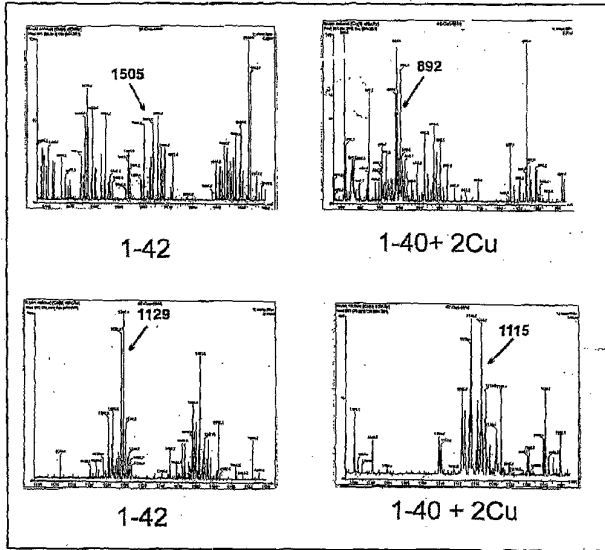
G210

Figure 5



Unpurified

IMAC - purified



1-42

1-40+ 2Cu

1-42

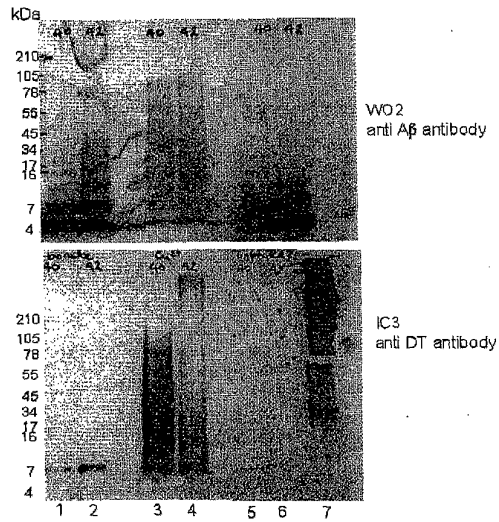
1-40 + 2Cu

WO 02/00245

7/11

PCT/AU01/00786

Figure 6



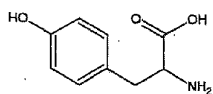
1. Aβ 1-40 - borate crosslinking
2. Aβ 1-42 - borate crosslinking
3. Aβ 1-40 - copper crosslinking
4. Aβ 1-42 - copper crosslinking
5. Aβ 1-40 - untreated
6. Aβ 1-42 - untreated
7. Dityrosine conjugated to KLH

WO 02/00245

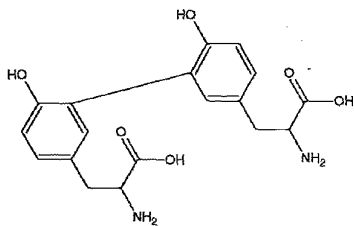
8/11

PCT/AU01/00786

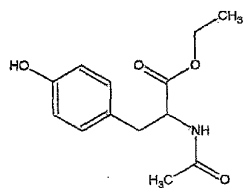
Figure 7A



Tyrosine



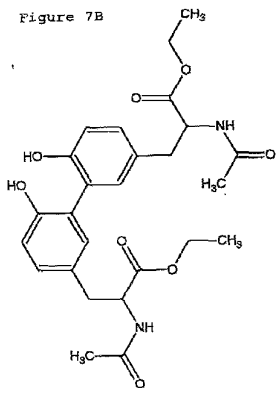
Dityrosine



Atee

WO 02/00245

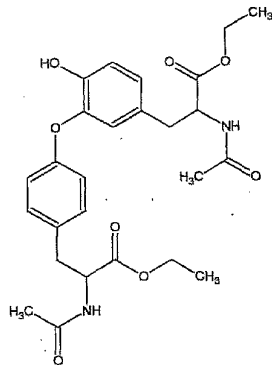
Figure 7B



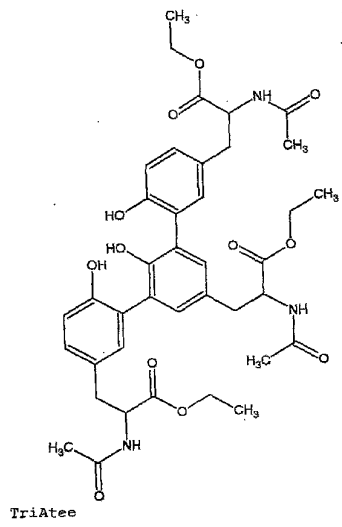
DiAtee

9/11

PCT/AU01/00786



IsoDiAtee

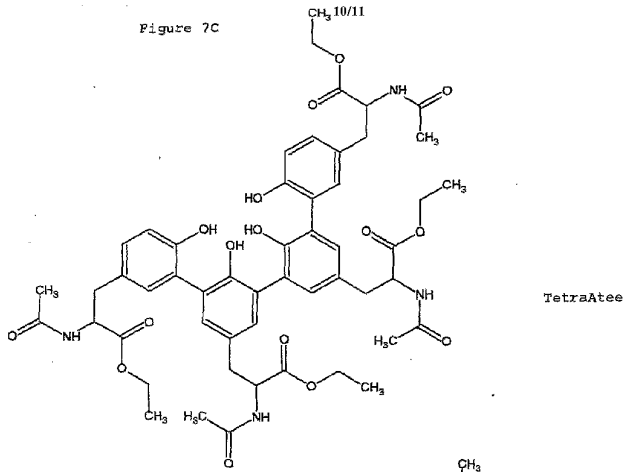


TriAtee

WO 02/00245

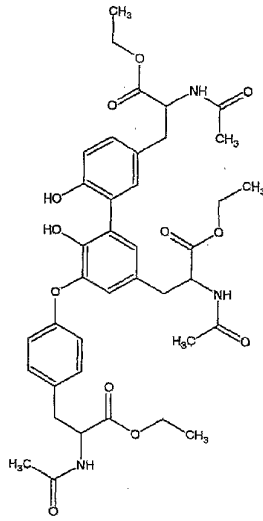
PCT/AU01/00786

Figure 7C



TetraAtee

Alternative form
of TriAtee with
one iso bond

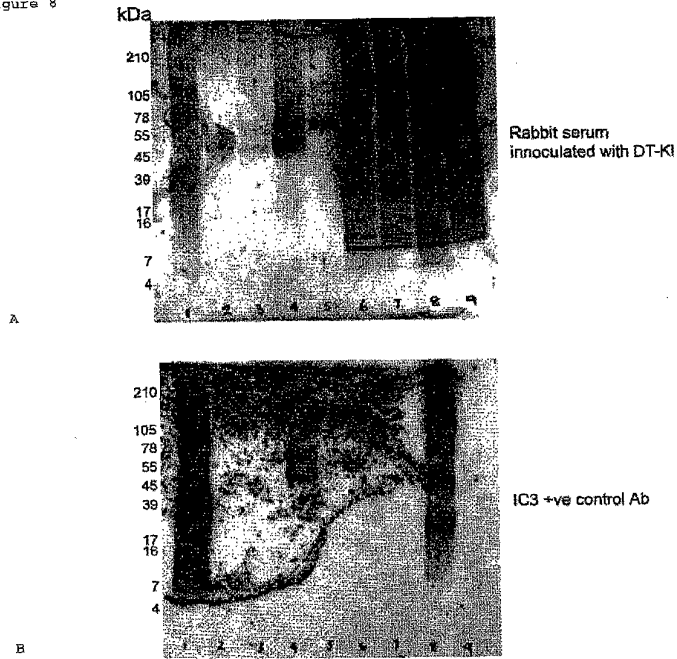


WO 02/00245

11/11

PCT/AU01/00786

Figure 8



1. Abeta 9-16 DT dimer -BSA
2. Abeta 9-16 DT trimer -BSA
3. crude ATEE -BSA
4. polyTyr - BSA
5. BSA
6. Abeta trimer - KLH
7. crude ATEE - KLH
8. polyTyr - KLH
9. KLH

【手続補正書】

【提出日】平成13年12月20日(2001.12.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0058

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0058】

本発明者らは、DTが遞増濃度の Cu^{2+} とインキュベートした際に315 nmにおけるその特徴的な吸光ピークが消失し新しい吸光ピークが280 nmに生じることを見出した。この分光学的変化は1:1~2:1(Cu:DT)の化学量論比で横這いに達した後3:1で飽和した。このことはDTがCuの3当量まで結合できることを示唆している。二塩化物の結合も同様なp+2質量単位増分(Clの質量=35 Da及び37 Da、約3:1の天然同位元素の存在比)を生じるが、NaClとともにインキュベートしたDTは分光学的吸光度の変化を誘導しなかった。これらの結果は図3Cに示す。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ヒトのA₁₋₄₀がペルオキシダーゼ触媒の酸化の後に蛍光及びSDS耐性を生じるが、ラットのA₁₋₄₀は生じないことを示す。ヒトのA₁₋₄₀、ヒトのA₁₋₄₂、又はラットのA₁₋₄₀(50 μM)は、37 °Cで1日間、50 mMのホウ酸塩、pH 9.5 ± H₂O₂(1 mM)及びペルオキシダーゼ(7.5 μg/mL)中でインキュベートした。(A)蛍光スペクトル(λ_{ex} 325、λ_{em} 350~500)、(B)SDS-PAGE上での移動(4G8を用いるウェスタンブロットによる)、(C)A₁₋₄₂(10 nM)を37 °Cで5日間pH 7.4のリン酸緩衝生理食塩水中でH₂O₂(1 μM)及びペルオキシダーゼ(7.5 μg/mL)と共にインキュベートした。その生成物(レーン2)をSDS-PAGE及びウェスタンブロット(4G8)によりH₂O₂/ペルオキシダーゼ(レーン1)の非存在下で同条件の下にインキュベートされたペプチドと比較した。

【図2】図2は、ヒトのアミロイドに由来するA₁₋₄₀がチロシン架橋オリゴマーを含むことを示す。ヒトのアミロイドに由来するA₁₋₄₀(20 μM)(ローエルら, 1996)を、純粋なDT標準(λ_{ex} 325、λ_{em} 350~500)と比較して蛍光分光法(A)及びウェスタンブロット(4G8)(B)により分析した。

【図3】図3は、ジチロシン及びトリチロシンの架橋がヒトのアミロイドに由来するA₁₋₄₀に存在し且つそれらが銅に結合していることを示す。

(A)及び(B) ヒトのアミロイドは精製し、加水分解しそしてクロマトグラフ分離後に質量スペクトルを決定した。異なるクロマトグラフ滞留時間(RT)で溶出する同一試料の分析を反映する二つの個々のスキャンが示される。

(C) 遞増濃度のCuSO₄又はNaClの存在下における精製されたDTの280 nm及び315 nmでの吸光度。

【図4】図4は、可溶性のヒトのA₁₋₄₀が高い親和性で銅に結合することを示す。

(A)可溶性の粗抽出物(1)及び銅キレートセファロースカラムからのpH 1での溶出物(2)の銀染色。

(B)WO₂、G211及びG210でプローブされたpH 1での溶出物のウェスタンブロット。

【図5】図5は、ヒトのA₁₋₄₀が銅に結合することを確認する、LC-MS分析の結果を示す。

粗可溶性抽出物 (5 A) 及び I M A C 精製可溶性抽出物 (5 B) の L C - M S 分析。

A₁₋₄₂ の質量スペクトル (5 C) 及び (5 E) 並びに二つの銅原子が結合した A₁₋₄₀ の質量スペクトル (5 D) 及び (5 F) 。

該 I M A C 及び L C - M S のデータは脳に由来する A₁₋₄₀ が銅に結合できることを証明する。

【図 6】図 6 は、架橋した A₁₋₄₀ 及び A₁₋₄₂ の中のジチロシンのウェスタンブロットでの検出を示す。

ジチロシン結合を形成させるための二つの技法も比較する。

上側のウェスタンブロット (A) は該 W O 2 抗体を用いて A₁₋₄₀ の存在を証明する。下側のブロット (B) はモノクローナル抗体 I C 3 により認識されるジチロシン結合の存在を証明する。この抗体はホウ酸塩 / H₂O₂ / ホースラディッシュペルオキシダーゼを用いて調製されたジチロシンの形態に対して形成された。

レーン 1 A₁₋₄₀ - ホウ酸架橋

レーン 2 A₁₋₄₂ - ホウ酸架橋

レーン 3 A₁₋₄₀ - 銅架橋

レーン 4 A₁₋₄₂ - 銅架橋

レーン 5 A₁₋₄₀ - 未処理

レーン 6 A₁₋₄₂ - 未処理

レーン 7 K L H に結合したジチロシン

【図 7】図 7 は、潜在的な免疫原として生産されたチロシン架橋の形態の例を示す。これらの構造は、チロシン架橋を含み、且つ通常チロシン架橋ペプチドのチロシン架橋部分の両側に存在する付加的なアミノ酸残基の存在を模倣するためにアセチル化されたカルボキシ末端及びアミノ末端を有する。生じる免疫応答の強度を改良するためにジチロシン抗原の複数のコピーの提示が設計されている。

7 A チロシン

7 B ジチロシン

7 C A t e e

7 D D i A t e e (ジ A t e e)

7 E I s o D i A t e e (イソジ A t e e)

7 F T r i A t e e (トリ A t e e)

7 G T e t r a A t e e (テトラ A t e e)

7 H 一つのイソ結合を持つトリ A t e e の代替型

【図 8】図 8 は、種々のチロシン架橋種におけるジチロシン結合のウェスタンブロットでの検出を示す。該 D T を含む種は B S A に結合したジチロシン架橋 A₉₋₁₆ の二量体又は三量体並びに B S A 又は K L H の担体タンパク質のいずれかに結合した種々のポリ D T 種を含む。上側のウェスタンブロット (A) は、ホウ酸塩 / H₂O₂ / ペルオキシダーゼ技法を用いて調製され且つグルタルアルデヒドを用いて K L H に結合させた D T に対して形成されたポリクローナルのウサギ抗血清に結合できる該試料の能力を証明している (実施例 7 で論じる) 。下側のウェスタンブロット (B) は該モノクローナル抗体 I C 3 により認識されるジチロシン結合の存在を証明する。この抗体はホウ酸塩 / H₂O₂ / ペルオキシダーゼ技法を用いても調製されたジチロシンの形態に対して形成させた。

レーン 1 A b e t a 9 - 1 6 D T 二量体 - B S A

レーン 2 A b e t a 9 - 1 6 D T 三量体 - B S A

レーン 3 粗 A t e e - B S A

レーン 4 ポリチロシン - B S A

レーン 5 B S A

レーン 6 A b e t a 三量体 - K L H

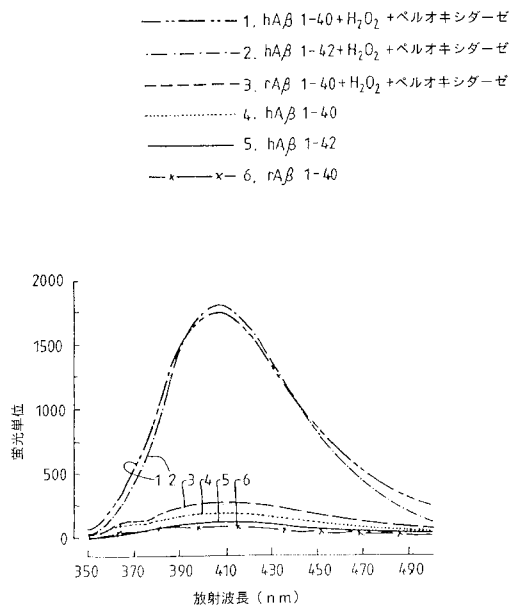
レーン 7 粗 A t e e - K L H

レーン 8 ポリチロシン - K L H

レーン 9 K L H

【手続補正3】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】全図
【補正方法】変更
【補正の内容】

【図1A】



【図1B】

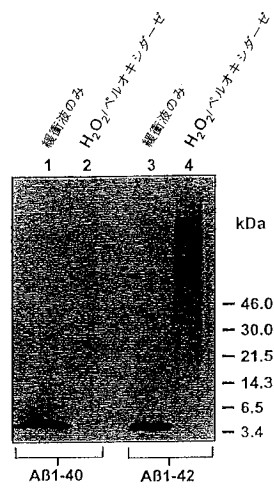


Fig. 1B

【 図 1 C 】

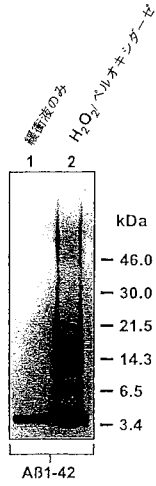


Fig. 1C

【 図 2 A 】

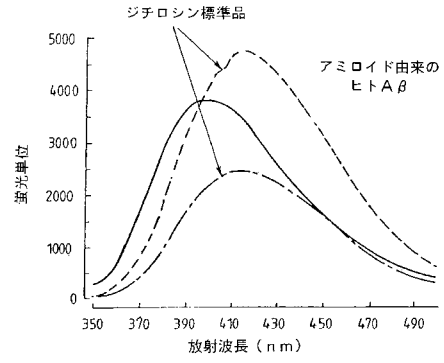


Fig. 2A

【 図 2 B 】

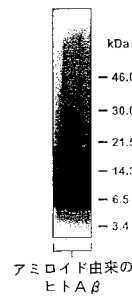


Fig. 2B

【 図 3 A 】

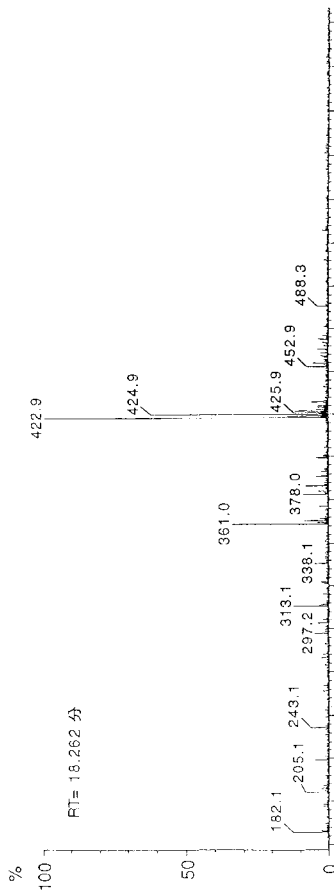


Fig. 3A

【 図 3 B 】

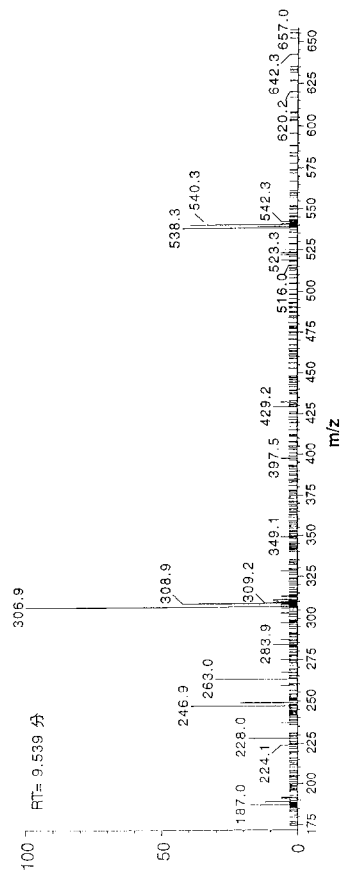


Fig. 3B

【 図 3 C 】

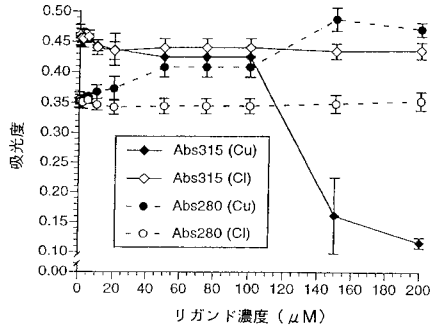


Fig. 3C

【 図 4 】

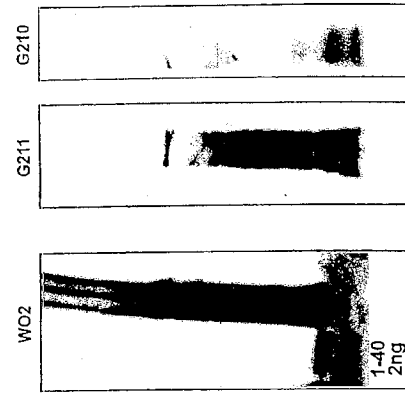
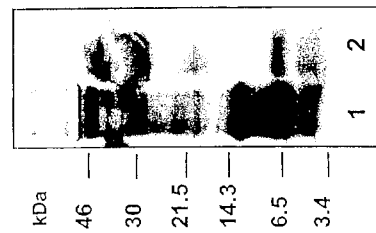
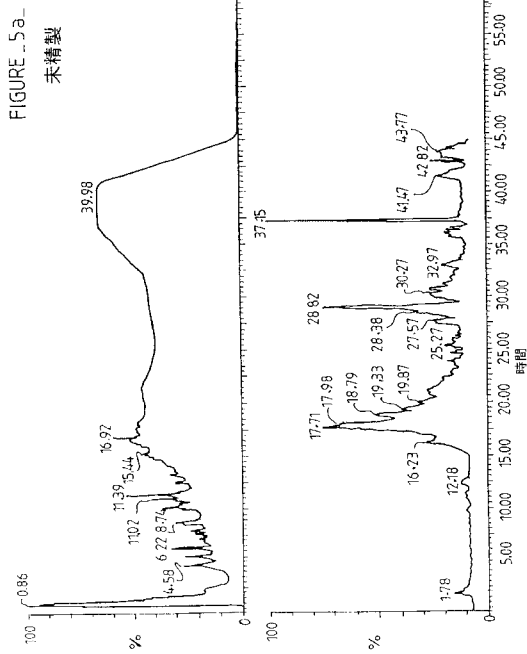


Fig. 4B

Fig. 4A



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】

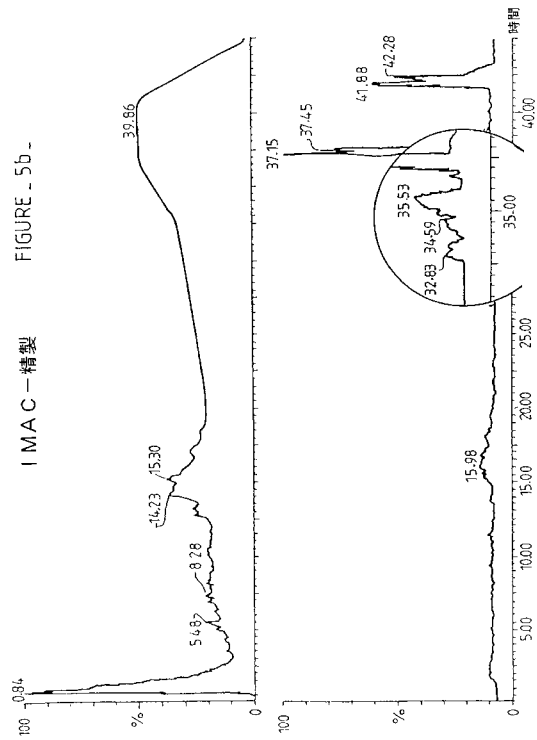
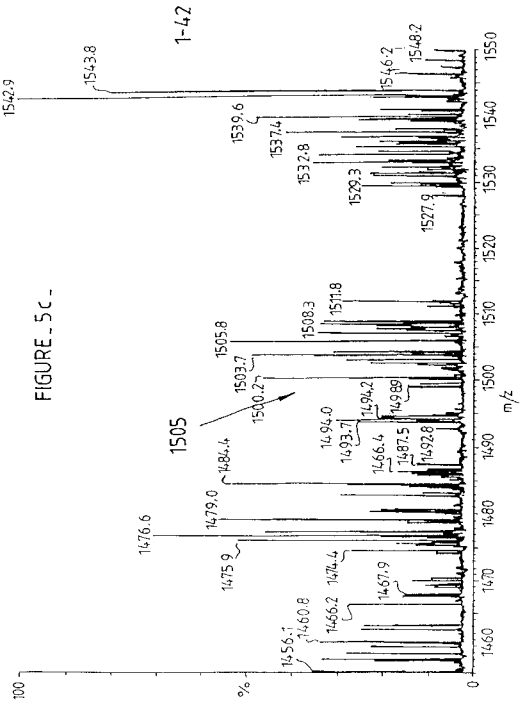


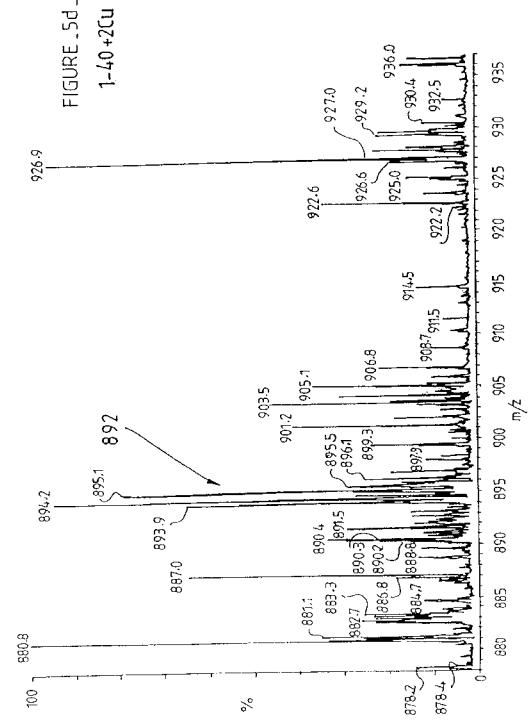
FIGURE 5a-
未精製

IMA C-精製
FIGURE 5b-

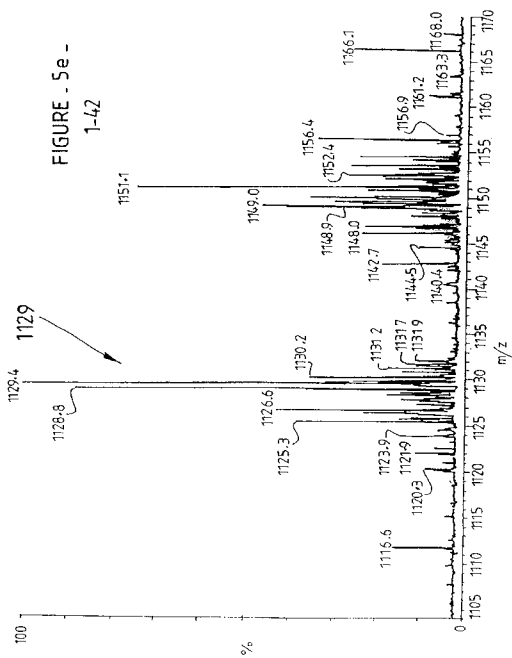
【 5 C 】



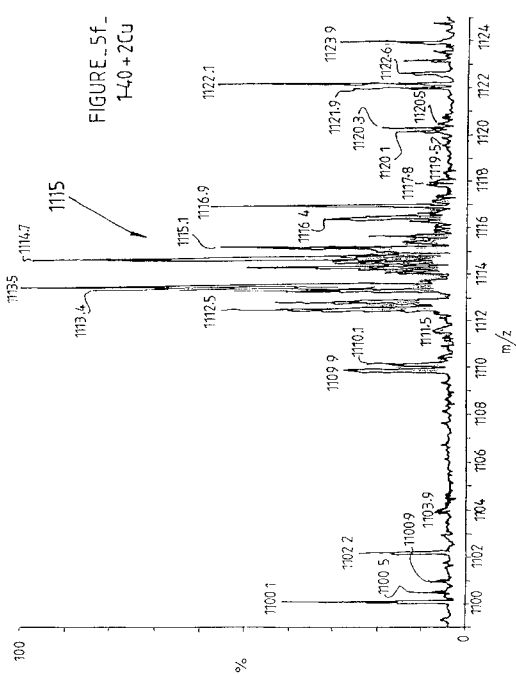
【 5 D 】



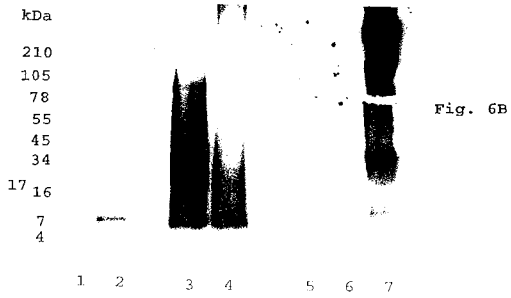
【 5 E 】



【 5 F 】



【 図 6 】



【 図 7 B 】

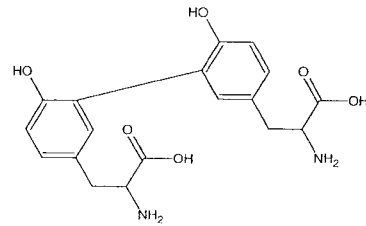


Fig. 7B

【 図 7 C 】

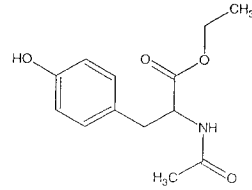


Fig. 7C

【 図 7 A 】

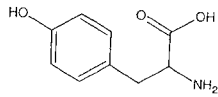


Fig. 7A

【 図 7 D 】

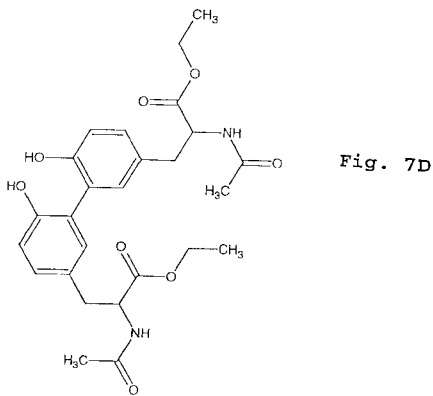


Fig. 7D

【 図 7 F 】

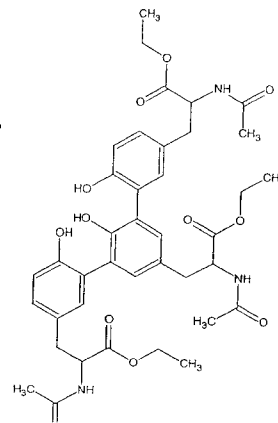


Fig. 7F

【 図 7 E 】

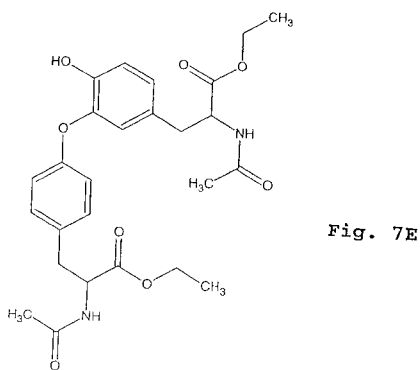
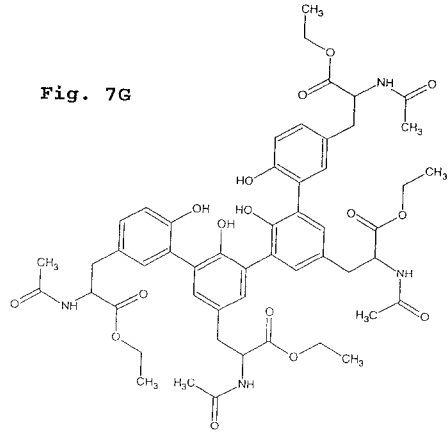


Fig. 7E

【 図 7 G 】



【 図 7 H 】

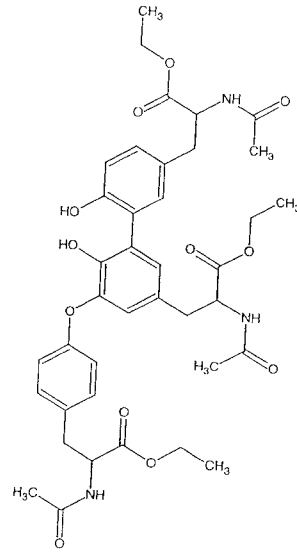


Fig. 7H

【 図 8 】

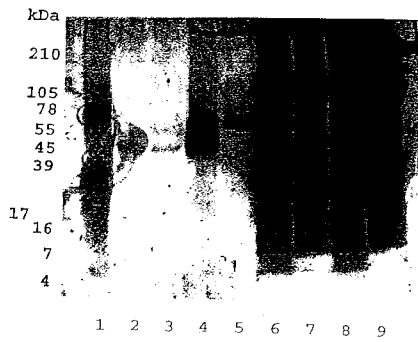


Fig. 8A



Fig. 8B

【手続補正書】

【提出日】平成14年6月24日(2002.6.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ある状態を予防、治療又は緩和する方法であって、この方法がそのような必要のある被験者を一つ以上のチロシン架橋化合物の免疫化有効用量を用いて免疫化する工程を含むものであり、該状態が酸化的損傷及びチロシン架橋の形成と関連する特異的タンパク質の病的凝集及び蓄積により特徴付けられるものである方法。

【請求項2】

該特異的タンパク質の病的な凝集形態がチロシン架橋部分を含むものである、請求項1記載の方法。

【請求項3】

該チロシン架橋化合物が該特異的タンパク質の病的な凝集形態の免疫原性部分であるペプチドであり、該ペプチドが該架橋したチロシンの上流又は下流の残基と連結した架橋チロシン部分を含むものである、請求項2記載の方法。

【請求項4】

該化合物中のチロシン架橋が銅イオンの存在下での酸化により得られうるものである、請求項1記載の方法。

【請求項5】

該チロシン架橋化合物がジチロシン架橋化合物である、請求項1記載の方法。

【請求項6】

該チロシン架橋化合物が銅イオンと錯体形成しているものである、請求項1記載の方法。

【請求項7】

投与される各用量が僅か1 μ Mの銅しか含まないことを条件として、銅イオンのジチロシンに対する比が3:1に等しいかそれ未満である、請求項6記載の方法。

【請求項8】

該化合物がそれ自体免疫原性である担体タンパク質に結合されているものである、請求項1記載の方法。

【請求項9】

該担体タンパク質が破傷風トキソイド、キーホール・リンペット・ヘモシアニン、又はアルブミンから成る群より選択されるものである、請求項8記載の方法。

【請求項10】

該化合物がアジュバントと一緒に投与されるものである、請求項1記載の方法。

【請求項11】

該特異的タンパク質の免疫原性部分が免疫原性である最小部分である、請求項3記載の方法。

【請求項12】

該状態がアルツハイマー病であり、該特異的タンパク質がA₁₋₄₀であり、そして該チロシン架橋化合物がヒトA₁₋₄₀又はA₁₋₄₂のアミノ酸配列中のチロシン10の周りの配列に由来するチロシン架橋ペプチドである、請求項1記載の方法。

【請求項13】

該チロシン架橋ペプチドがジチロシンを含むものである、請求項12記載の方法。

【請求項14】

チロシン架橋ペプチドが銅イオンと錯体を形成しているものである、請求項12記載の方法。

【請求項 15】

下記の追加的工程、即ち

病的に凝集している特異的タンパク質中のチロシン架橋の優勢な形態を同定する工程、及び

チロシン架橋の該優勢な形態の一つ以上を含むチロシン架橋化合物を一つ以上合成する工程、

を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】

ある状態を予防、治療又は緩和する方法であって、該状態が酸化的損傷と関連する特異的タンパク質の病的な凝集及び蓄積により特徴付けられるものであり、該特異的タンパク質の病的な凝集形態がチロシン架橋を含むものであり、該方法がある抗体又は抗体断片の有効量をこのような治療を必要とする被験者に投与する工程を含むものであり、

該抗体又は抗体断片がチロシン架橋化合物に対して形成されるものであり、該化合物が該特異的タンパク質の病的に凝集した形態の免疫原性部分であり且つチロシン架橋を含むものであり、そして

該抗体及び抗体断片が該特異的タンパク質の病的に凝集した形態に特異的に結合できるものである方法。

【請求項 17】

該抗体がポリクローナル抗体である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

該抗体がヒト起源のものである、請求項 16 記載の方法。

【請求項 19】

該抗体がモノクローナル抗体である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 20】

該抗体がヒト化されたものである、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

該抗体又は抗体断片が該特異的タンパク質の病的に凝集した形態と特異的に反応し、且つ、該特異的タンパク質の非凝集形態とは明確には反応しないものである、請求項 16 記載の方法。

【請求項 22】

該化合物中のチロシン架橋が銅イオンの存在下での酸化により得られうるものである、請求項 16 記載の方法。

【請求項 23】

請求項 1 に記載の方法において使用するための予防用又は治療用の組成物であって、薬学的に許容しうる担体と共にチロシン架橋化合物を含むものである組成物

【請求項 24】

該チロシン架橋化合物が銅イオンと錯体を形成しているものである、請求項 23 記載の予防用又は治療用の組成物。

【請求項 25】

さらにアジュバントを含む、請求項 23 記載の予防用又は治療用組成物。

【請求項 26】

請求項 16 に記載の方法に使用するための予防用又は治療用組成物であって、該組成物が薬学的に許容しうる担体と共にチロシン架橋化合物に対して形成された抗体又は抗体断片を含むものであり、

該化合物が該特異的タンパク質の病的に凝集した形態の免疫原性部分であり且つチロシン架橋を含むものであり、そして

該抗体又は抗体断片が該特異的タンパク質の病的に凝集した形態に特異的に結合できるものである組成物。

【請求項 27】

アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、運動ニューロン疾患、クロイツフェルト - ヤー

コブ病、及びハンティングトン病からなる群より選択される状態を診断する方法であって、該状態に罹患している疑いのある被験者から得た生体液の試料を、チロシン架橋を含む分子の存在について検定する工程を含む方法。

【請求項 28】

アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、運動ニューロン疾患、クロイツフェルト-ヤコブ病、及びハンティングトン病からなる群より選択される状態を診断する方法であって、該状態に罹患している疑いのある被験者から得た生体液の試料を、チロシン架橋を含む分子に対して生じた抗体の存在について検定する工程を含む方法。

【請求項 29】

該分子がジチロシンを含むものである、請求項 27 又は請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

該生体液が血液、血漿、血清、脳脊髄液、尿、及び唾液からなる群より選択されるものである、請求項 27 又は請求項 28 記載の方法。

【請求項 31】

該状態がアルツハイマー病である、請求項 1、請求項 16、請求項 27 又は請求項 28 記載の方法。

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/AU01/00786 |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| Int. Cl. ⁷ : A61K 38/16 A61P 25/16, 25/28 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K WITH ELECTRONIC DATABASE SEARCH TERMS AS INDICATED BELOW. | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AU: IPC AS ABOVE | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPAT/MEDLINE: amyloid and tyrosine or alzheimer or parkinson or lewy or cataract or ms or huntington and crosslink | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO-A-99/27944 (Athena Neurosciences Inc) 10 June 1999 -in particular, pages 3, 7, 13, 15, 20, 30, 32, 34, 48 and Examples | 1-3, 5, 8-13, 16-21, 23, 25-32 4, 6, 7, 14, 15, 22, 24 |
| Y | Schenk D et al: "Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse", Nature Vol 400 (1999) pages 173-177 -whole document | 1-3, 5, 8-13, 23, 25, 31-32 4, 6, 7, 14, 15, 16-22, 24, 26-30 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex | | |
| * Special categories of cited documents: | | |
| "A" | document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" |
| "E" | earlier application or patent but published on or after the international filing date | "X" |
| "L" | document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" |
| "O" | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" |
| "P" | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |
| Date of the actual completion of the international search 20 August 2001 | | Date of mailing of the international search report 22 August 2001 |
| Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929 | | Authorized officer JENNIFER FERNANCE Telephone No : (02) 6283 2416 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU01/00786

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | Galeazzi L et al: "In vitro peroxidase oxidation induces stable dimers of β -amyloid (1-42) through dityrosine bridge formation", Amyloid: The Int. J. Exp. and Clin. Invest., 6/1 (1999) pages 7-13 -whole document. | 23, 27-32 |
| Y | | 1-22, 24-26 |
| X | Jacob J et al: "Human Phagocytes Employ the Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide System to Synthesize Dityrosine, Trityrosine, Pulcherosine and Isodityrosine by a Tyrosol Radical-dependant Pathway", J. Bioch. Chem. 271/33 (1996) pages 19950-19956 -whole document | 23, 27-32 |
| Y | | 1-22, 24-26 |
| X | Souza J et al: "Dityrosine cross-linking Promotes Formation of Stable α -Synuclein Polymers", J. Biol. Chem. 275/24 (March 2000) pages 18344-18349 -whole document | 23, 27-32 |
| Y | | 1-22, 24-26 |
| X | McLean C et al: "Soluble Pool of A β Amyloid as a Determinant of Severity of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease", Annals Neurology 46/6 (1999) pages 860-866 -in particular Abstract and page 861 | 23, 26-32 |
| Y | | 1-21, 23-25 |
| Y | Hook C et al: "Cerebrospinal Fluid Levels of Amyloid Precursor Protein and Amyloid β -peptide in Alzheimer's Disease and Major Depresson -Inverse Correlation with Dementia Severity", Eur. Neurol Vol 39 (1998) pages 111-118 -whole document | 23, 26-32 |
| Y | Atwood C et al: "Dramatic Aggregation of Alzheimer A β by Cu(II) is Induced by Conditions Representing Physiological Acidosis", J. Biol. Chem. 273/21 (1998) pages 12817-12826 -whole document | 4, 6, 7, 14, 15, 22, 24 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/AU01/00786

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent Document Cited in Search Report | | Patent Family Member | | | | | |
|--|---------|----------------------|----------|----|----------|----|-----------|
| WO | 9927944 | AU | 17061/99 | BG | 104562 | BR | 9815357 |
| | | EP | 1033996 | HR | 20000443 | HU | 200100627 |
| | | NO | 20002784 | PL | 342649 | | |
| END OF ANNEX | | | | | | | |

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 P 25/16 | A 6 1 P 25/02 | |
| A 6 1 P 25/28 | A 6 1 P 25/14 | |
| A 6 1 P 27/12 | A 6 1 P 25/16 | |
| G 0 1 N 33/53 | A 6 1 P 25/28 | |
| | A 6 1 P 27/12 | |
| | G 0 1 N 33/53 | D |

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ブッシュ, アシュリー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 02143、サマーヴィル、サマー ストリート #3
91 番地

(72) 発明者 チェルニー, ロバート
オーストラリア国、ビクトリア州 3187、ブライトン イースト、ダヴェイ アベニュー 3
3 番地

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA06 AA07 BA02 BA19 CA56 DC50 NA14 ZA022 ZA152
ZA162 ZA202 ZA332 ZA942 ZC022
4C085 AA13 AA14 BB11 CC04 CC13 DD22 DD32 EE01

| | | | |
|-------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 神经毒素低聚物 | | |
| 公开(公告)号 | JP2004501204A | 公开(公告)日 | 2004-01-15 |
| 申请号 | JP2002505026 | 申请日 | 2001-06-28 |
| 申请(专利权)人(译) | 普拉纳生物科技有限公司 总医院集团 | | |
| [标]发明人 | ブッシュアシュリー チェルニーロバート | | |
| 发明人 | ブッシュ,アシュリー チェルニー,ロバート | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61K39/385 A61K39/395 A61K47/48 A61P21/00 A61P25/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/12 C07K16/18 G01N33/68 | | |
| CPC分类号 | A61K38/1709 A61K39/0007 A61K47/64 A61K2039/6081 A61P21/00 A61P25/02 A61P25/14 A61P25 /16 A61P25/28 A61P27/12 C07K16/18 G01N33/6896 | | |
| FI分类号 | A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.U A61P21/00 A61P25/02 A61P25/14 A61P25 /16 A61P25/28 A61P27/12 G01N33/53.D | | |
| F-TERM分类号 | 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA02 4C084/BA19 4C084/CA56 4C084/DC50 4C084 /NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA202 4C084/ZA332 4C084/ZA942 4C084 /ZC022 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC04 4C085/CC13 4C085/DD22 4C085/DD32 4C085/EE01 | | |
| 代理人(译) | 高桥 健 | | |
| 优先权 | 60/214779 2000-06-28 US 60/242177 2000-10-23 US | | |
| 其他公开文献 | JP2004501204A5 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及用于治疗或缓解阿尔茨海默氏病和与异常蛋白质聚集相关的其他病症的方法和组合物。本发明尤其涉及用于阿尔茨海默氏病，帕金森氏病和白内障的免疫治疗的方法和组合物。在一个方面，本发明提供了预防，治疗或缓解以与氧化损伤和酪氨酸交联形成相关的特定蛋白质的病理聚集和积聚为特征的病症的方法，在上述酪氨酸交联化合物中，和任选地与所述化合物一起包括对需要这种治疗的受试者进行免疫的步骤，使用有效免疫包含铜离子的剂量的剂量。或者，可以使用针对酪氨酸交联化合物的被动免疫。还公开了预防或治疗组合物和诊断方法。

| | | |
|--|---|--|
| (19) 日本国特許庁(JP) | (12) 公 告 特 許 公 報 (A) | (11) 特許出願公表番号 特表2004-501 (P2004-5012 (2004-5012 (43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1 |
| (51) Int. Cl. ⁷ A61K 38/00 A61K 39/395 A61P 21/00 A61P 25/02 A61P 25/14 | F I A61K 37/02 A61K 39/395 A61K 39/395 A61K 39/395 A61P 21/00 A61P 21/00 | テーマコード(参考) 4C084 4C085 |
| (21) 出願番号 特願2002-505026 (P2002-505026) (66) (22) 出願日 平成13年6月28日(2001.6.28) (85) 翻訳文提出日 平成14年12月25日(2002.12.25) (86) 国際出願番号 PCT/AI2001/000786 (87) 国際公開番号 W02002/000245 (87) 国際公開日 平成14年1月3日(2002.1.3) (31) 優先権主張番号 60/214,779 (32) 優先日 平成12年6月28日(2000.6.28) (33) 優先権主張国 米国(US) (31) 優先権主張番号 60/242,177 (32) 優先日 平成12年10月23日(2000.10.23) (33) 優先権主張国 米国(US) | (71) 出願人 503004149 プラナ バイオテクノロジー リミテ ド オーストラリア国、ビクトリア州 3 5、サウス メルボルン、ドーカス リート 100番地、レベル 1 (71) 出願人 500117314 ザ ゼネラル ホスピタル コーポーレ ション アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 114、ボストン、フルーツ ストリ 55 (74) 代理人 100107685 弁理士 高橋 健 | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 96 頁) 最終頁に |