

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-129389

(P2014-129389A)

(43) 公開日 平成26年7月10日(2014.7.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A D	4 B 0 6 4
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 A	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	

審査請求 有 請求項の数 9 O L 外国語出願 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-38360 (P2014-38360)	(71) 出願人	506242957
(22) 出願日	平成26年2月28日 (2014.2.28)		アラクロン バイオテック ソシエタッド
(62) 分割の表示	特願2006-505607 (P2006-505607)		リミタダ
原出願日	平成16年5月3日 (2004.5.3)		スペイン国, 50005 ザラゴザ, シー
(31) 優先権主張番号	P200301054		／バルタサル グラシアン 10番地, プ
(32) 優先日	平成15年5月8日 (2003.5.8)	(74) 代理人	ラル ドウチャ
(33) 優先権主張国	スペイン (ES)		100074192
		弁理士	江藤 剛
		(72) 発明者	サラサ バーリオ マニエル
			スペイン国, イー50005 ザラゴザ
			, エントレスエロ, シー／バルタサル グ
			ラシアン 1
		Fターム(参考)	4B064 AG31 BJ12 CC24 CC30 DA01
			4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 CC31
			DD62
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病治療方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】アミロイド沈着物の蓄着により特徴付けられる疾病、特に、アルツハイマー病の予防及び治療方法。

【解決手段】アルツハイマー病を治療するための薬剤を調製するために使用される抗体。より詳しくは、アルツハイマー病を予防及び／又は治療するのに用いる薬剤を調製するためにアミロイドベータペプチド、 $A\beta 40$ 及び $A\beta 42$ の優性変異体のいずれか1つをとくに認識する抗体を使用する使用方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者の脳中のアミロイド沈殿物の蓄積によって特徴付けられる疾病を予防及び／又は治療するための薬剤を調製するためにペプチドベータアミロイド A β 40 及び A β 42 の優性遺伝子変異体をとくに認識することができる抗体を製造するための免疫原として作用するタンパク質に結合されたペプチドを使用するペプチドの使用方法。

【請求項 2】

前記疾病がアルツハイマー病であることを特徴とする請求項 1 に記載のペプチドの使用方法。

【請求項 3】

前記タンパク質がキーホールリンペットタンパク質 (KLH) であることを特徴とする請求項 1 に記載のペプチドの使用方法。

【請求項 4】

前記ペプチドが、

・ SEQ ID No. 1 のペプチド, SEQ ID No. 2 のペプチド, SEQ ID No. 3 のペプチド, SEQ ID No. 4 のペプチド;

・ SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 又は SEQ ID No. 4 の N 末端及び／又は C 末端のアミノ酸の残留物の除去によるショートニング (短縮) から生じるペプチド;

・ SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 又は SEQ ID No. 4 のいずれかのペプチドにタンパク質を結合するのに適するアミノ酸残留物の添加によるレンジスニング (伸張) から生じるペプチド;

からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドの使用方法。

【請求項 5】

前記ペプチドが、

・ SEQ ID No. 1 のペプチド;

・ SEQ ID No. 1 の N 末端及び／又は C 末端のアミノ酸の残留物の除去によるショートニングから生じるペプチド;

・ タンパク質結合に必要なアミノ酸残留物の添加によるレンジスニングから生じるペプチド;

からなる群から選択されることを特徴とする請求項 4 に記載のペプチドの使用方法。

【請求項 6】

前記ペプチドが、

・ SEQ ID No. 2 のペプチド;

・ SEQ ID No. 2 の N 末端及び／又は C 末端のアミノ酸の残留物の除去によるショートニングから生じるペプチド;

・ タンパク質結合に必要なアミノ酸残留物の添加によるレンジスニングから生じるペプチド;

からなる群から選択されることを特徴とする請求項 4 に記載のペプチドの使用方法。

【請求項 7】

前記ペプチドが、

・ SEQ ID No. 3 のペプチド;

・ SEQ ID No. 3 の N 末端及び／又は C 末端のアミノ酸の残留物の除去によるショートニングから生じるペプチド;

・ タンパク質結合に必要なアミノ酸残留物の添加によるレンジスニングからして生じるペプチド;

からなる群から選択されることを特徴とする請求項 4 に記載のペプチドの使用方法。

【請求項 8】

前記ペプチドが、

10

20

30

40

50

- ・ S E Q I D N o . 4 のペプチド；
- ・ S E Q I D N o . 4 の N 末端及び / 又は C 末端のアミノ酸の残留物の除去によるショートニングから生じるペプチド；
- ・ タンパク質結合に必要なアミノ酸残留物の添加によるレンジングから生じるペプチド；

からなる群から選択されることを特徴とする請求項 4 に記載のペプチドの使用方法。

【請求項 9】

患者の脳中のアミロイド沈殿物の蓄積によって特徴付けられる疾病を予防及び / 又は治療するための薬剤を調製するためにベータアミロイドペプチド A β 40 及び A β 42 の優性遺伝子変異体のいずれかをとくに認めることができる抗体又は活性断片又は抗体の誘導体を使用するペプチドの使用方法。

10

【請求項 10】

前記疾病がアルツハイマー病であることを特徴とする請求項 9 に記載のペプチドの使用方法。

【請求項 11】

ペプチド A β の優性遺伝子変異体のいずれかをとくに認めることができる抗体又は活性断片又は抗体の誘導体が N 末端及び / 又は C 末端のアミノ酸の残留物の除去によって任意にショートニングされかつタンパク質結合に適切なアミノ酸残留物の添加により任意にレンジングされた S E Q I D N o . 1 , S E Q I D N o . 2 , S E Q I D N o . 3 又は S E Q I D N o . 4 からなる群から選択されたペプチドから得られることを特徴とする請求項 9 乃至 10 のいずれか 1 項に記載のペプチドの使用方法。

20

【請求項 12】

前記抗体又は活性断片又は抗体の誘導体が、

- ・ S E Q I D N o . 1 のペプチド；
 - ・ S E Q I D N o . 1 の N 末端及び / 又は C 末端のアミノ酸の残留物を除去することから生じるペプチド；
 - ・ タンパク質結合に必要なアミノ酸残留物を前記配列のいずれかに添加させることから生じるペプチド；
- からなる群から選択されるペプチドを有する哺乳動物又は鳥類の免疫処置によって得られることを特徴とする請求項 9 に記載のペプチドの使用方法。

30

【請求項 13】

前記抗体又は活性断片又は抗体の誘導体が、

- ・ S E Q I D N o . 2 のペプチド；
 - ・ S E Q I D N o . 2 の N 末端及び / 又は C 末端のアミノ酸の残留物を除去することから生じるペプチド；
 - ・ タンパク質結合に必要なアミノ酸残留物を前記配列のいずれかに添加させることから生じるペプチド；
- からなる群から選択されるペプチドを有する哺乳動物又は鳥類の免疫処置によって得られることを特徴とする請求項 9 に記載のペプチドの使用方法。

40

【請求項 14】

前記抗体又は活性断片又は抗体の誘導体が、

- ・ S E Q I D N o . 3 のペプチド；
 - ・ S E Q I D N o . 3 の N 末端及び / 又は C 末端のアミノ酸を残留物の除去することから生じるペプチド；
 - ・ タンパク質結合に必要なアミノ酸残留物を前記配列のいずれかに添加させることから生じるペプチド；
- からなる群から選択されるペプチドを有する哺乳動物又は鳥類の免疫処置によって得られることを特徴とする請求項 9 に記載のペプチドの使用方法。

【請求項 15】

前記抗体又は活性断片又は抗体の誘導体が、

50

- ・SEQ ID No. 4 のペプチド；
- ・SEQ ID No. 4 のN末端及び／又はC末端のアミノ酸の残留物を除去することから生じるペプチド；
- ・タンパク質結合に必要なアミノ酸残留物を前記配列のいずれかに添加させることから生じるペプチド；

からなる群から選択されるペプチドを有する哺乳動物又は鳥類の免疫処置によって得られることを特徴とする請求項9に記載のペプチドの使用方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明はアルツハイマー病を含むアミロイド沈着物の存在に関連する疾病を治療及び／又は予防する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病（AD）の存在と関連する生化学現象及び新陳代謝現象についての幾つかの要因が知られている。ADを有する者の脳に観察される2つの構造的かつ組織病理学的変化は神経原繊維の絡み合い（NFT）及びアミロイド沈着物である。神経内（intraneuronal）の神経原繊維の絡み合いは他の神経変性疾病においても存在するが、神経内空間（神経ブラーク）内及び微小血管系（血管ブラーク）に近接するアミロイド沈着物の存在はADの特徴であると思われる。これらについて、神経ブラークは最も共通であると思われる（プライス・ディー・エル氏及び同僚著の医薬開発研究、1985年、第5巻、第59頁乃至第68頁「Price, D. L., and co-workers, Drug Development Research (1985) 5: 59 - 68」）。

20

【0003】

これらのアミロイドブラークの主成分はアミロイドペプチドA β 4と呼ばれている40-42アミノ酸のペプチドである。

【0004】

アミロイドペプチドA β 4はアミロイドペプチドA β 4先駆体タンパク質（ β APP）と呼ばれている細胞膜糖タンパク質からのタンパク質分解から生じるポリペプチドである。アミロイドペプチドのこれらのタンパク質先駆体は695乃至770のアミノ酸からなり、それらのすべては同じ遺伝子によってコード化されている。

30

【0005】

アミロイドペプチドA β 4の2つの主要な変異体が確認されており、それらはそれぞれ40及び42のアミノ酸を含有しているペプチドA β 40及びペプチドA β 42であり、生理学的及び病理学的状態において異なる組織分布を有している。42のアミノ酸の変異体はADを有する患者の脳内に位置しているアミロイドブラークの優性形質である。

【0006】

現在までADに対する可能なワクチンを提供するために種々の考え得る解決案が提案されている。

40

【0007】

ヨーロッパ特許第EP526511号明細書において、予め設けたADを有する患者に対してA β の同種治療の投薬が提案されている。しかしながら、使用される投薬により、血漿（プラズマ）内で循環する内因性A β のレベルは非常に変化するので、治療的な利点は期待されない。

【0008】

シェンク氏等著、ネイチャー、1999年、第400巻、第173頁乃至第177頁「Schenk et al., Nature, 1999; 400: 173 - 177」は、ヒト突然変異体APPを過剰に発現させ、かくしてアミロイドブラーク、神経ジストロフィ及びアストログリオシスの形成を予防するA β 42を有する遺伝子導入マウスPDAP

50

Pの免疫処置を記載している。

【0009】

国際特許出願公開第WO9927944号(シェンク・ディー氏「Schenk, D」)明細書に、Aβ42の患者に対する投与によるADの治療が記載されている。

【0010】

ヨーロッパの4カ国の国及びアメリカ合衆国においてADを抑えるための媒体により診断された360人の患者にアミロイドペプチドAβ42が抗原として使用された第3期(phase III)の臨床実験は何人かの患者に脳炎が発生されたことが報告されたので中断された(スク립・デイリー・オンライン、2002年2月25日、S007455320、ザ・サイエンティスト第16[7]巻、第22号、2002年4月1日「Scrip Daily Online, 25 Feb 2002, S007455320, The Scientist 16[7]: 22, April 1, 2002」)。

10

【0011】

ワクチン(又は予防接種されている動物に自然に存在するタンパク質)として内因性タンパク質を使用する問題はペプチドAβ42の場合であり、生体はAβ42に対してかついままでのところでは未知の生理学的機能を有する小さい断片に対して抗原を作ることによって応答し、我々が記載できる考え得る問題の幾つかのうちには、内因性のタンパク質に対する抗体の発生による考え得る自己免疫病の発育、内因性の抗原を認識するための免疫系の欠陥による免疫応答の発生の困難、及び急性の炎症性応答の考え得る発育がある。

20

【発明の開示】

【0012】

本発明はタンパク質と結合されているAβのC-末端部のペプチドの投与によるアルツハイマー病及び他のアミロイド疾病を治療することを目的とするものであり、本発明の好適な実施の形態において、前記タンパク質はキーホールリンペットヘモシアニン(key hole limpet hemocyanin)である。

【0013】

本発明はアルツハイマー病及び他の関連のアミロイド疾病の予防及び/又は治療用のワクチンに関するものである。

【0014】

本発明の好適な実施の形態によれば、ワクチンはペプチド、タンパク質又は内因性免疫原を使用することに関連する不都合を克服するアルツハイマー病及び他のアミロイド疾病の予防及び/又は治療のために提供することにある。

30

【0015】

アミロイド沈着物によって特徴付けられる他の疾病の例は島状遺伝性症候群、多発性骨髄種、及びクロイツフェルト-ヤコブ病を含む海綿状脳炎である。

【0016】

免疫応答の導入は患者のAβと反応する抗体を誘起するように免疫原が投与される時のように活性にすることができるか、又は患者のAβとそれ自体で反応するように抗体が投与される時のように非活性にすることができる。

【0017】

本発明の目的に関して以下の用語は以下のごとく定義されものとする。

40

【0018】

用語「関連のアミロイド疾病」は1つの器官、局在的アミロイドシス、全体的に拡がった幾つかの器官、系統的アミロイドシスに制限され得るアミロイドの蓄積に関連する疾病を含んでいる。第2アミロイドシスは、慢性感染(例えば、結核のような)又は慢性炎(例えば、慢性間接リウマチ)、家族性地中海熱(FMF)及び血液透析の長期間の治療において患者に見出される他の型の系統的アミロイドシスと関連され得る。局在形状のアミロイドシスはタイプIIの糖尿病及びそれに関連する他のあらゆる疾病、即ちスクラピーを有する神経変性疾病、ウシ型海綿状脳炎、クロイツフェルト-ヤコブ病、アルツハイマー病、大脳アミロイド血管症を包含するが、それらに限定するものではない。

50

【0019】

用語「非活性の免疫処置」は個人についての免疫を付与する意図によりその個人に抗体又はその断片を投与することに関連して使用される。

【0020】

第1実施態様において、本発明はアミロイド沈着物の蓄積によって特徴付けられる疾病を予防及び/又は治療するための薬剤を調製するために免疫原として又は抗体として作用するペプチドを使用するペプチドの使用方法を提供する。その使用方法は患者に存在するアミロイド沈着物のペプチド成分に対する免疫応答の誘導から成っている。前記誘導は免疫原の投与によって活性にするか、又は抗体又は抗体の活性断片若しくは誘導体の投与により非活性にすることができる。

10

【0021】

本発明の好適な実施例において、疾病はアルツハイマー病である。

【0022】

得られる薬剤は疾病の症状を示す者又は無症候性の患者の双方に使用することができる。

【0023】

本発明により、アミロイドブラークの幾つかの成分に向けられる免疫応答を引き起こすことができる組成物はアミロイド沈着物に関連付けられる疾病の治療又は予防に有効である。特に、本発明の態様によれば、ペプチド又はそれから得られた抗体の免疫賦活量が患者に投与される時、個人のアミロイドの進行を防止し、アミロイドの症状を減少し及び/又は沈殿過程を減少することができる。

20

【0024】

本発明の態様によれば、抗体は免疫原としてタンパク質に結合されるペプチドの使用により哺乳動物又は鳥類の免疫処置によって得られる。

【0025】

本発明の好適な実施例によれば、免疫処置に使用される哺乳動物は反芻動物、ウマ科の動物、ウサギ、肉食動物、霊長類、又は抗体のために抽出されるような適量の血清を有する他のあらゆる動物にすることができる。免疫処置に使用される鳥類の中で、我々は、とくに、ガリフォームズ(Galliformes)、アンセリフォームズ(Anseriformes)、及びコロンビフォームズ(Columbiformes)を記載することができるが、それらに限定するものではない。

30

【0026】

本発明の好適な実施例によれば、これは患者の脳内のアミロイド沈着物の蓄積によって特徴付けられる疾病の予防及び/又は治療用の薬剤を調製するためにペプチドベータアミロイドA β 40及びA β 42の優性遺伝子変異体のいずれかを特異的に認識することができる抗体を生成するために免疫原として作用するタンパク質に結合されたペプチドを使用するペプチドの使用方法を提供する。

【0027】

本発明の最も好適な実施例によれば、ペプチドと結合して使用されるタンパク質はキーホールリンペットタンパク質(KLH)である。

40

【0028】

本発明の同様に好適な実施例において、ペプチドは、SEQ ID No. 1のペプチド, SEQ ID No. 2のペプチド, SEQ ID No. 3のペプチド, SEQ ID No. 4のペプチド, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3又はSEQ ID No. 4のN末端及び/又はC末端からアミノ酸残基を除去することによって切断することから生じるペプチド、及びSEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3又はSEQ ID No. 4のいずれかのペプチドに該残基を添加することによる伸張(lengthening)から生じるペプチドからなる群から選択されている。

【0029】

50

他の好適な実施例によれば、ペプチドはSEQ ID No. 1のペプチド、SEQ ID No. 1からN末端及び／又はC末端アミノ酸の残基の除去から生じる配列を有するペプチド、及び前述の配列にタンパク質結合に必要なアミノ酸残基を添加することから生じるペプチドからなる群から選択されている。

【0030】

本発明の他の好適な実施例において、ペプチドはSEQ ID No. 2のペプチド、SEQ ID No. 2からのN末端及び／又はC末端アミノ酸の残基の除去から生じる配列によるペプチド、及び前記配列のいずれかにタンパク質結合に必要なアミノ酸残基を添加することから生じるペプチドからなる群から選択されている。

【0031】

本発明の他の好適な実施例において、ペプチドはSEQ ID No. 3のペプチド、SEQ ID No. 3からN末端及び／又はC末端のアミノ酸の残基の除去から生じる配列を有するペプチド、及び前記配列のいずれかにタンパク質結合に必要なアミノ酸残基を添加することから生じるペプチドからなる群から選択されている。

【0032】

本発明の他の好適な実施例において、ペプチドはSEQ ID No. 4のペプチド、SEQ ID No. 4からN末端及び／又はC末端アミノ酸の残基の除去から生じる配列を有するペプチド、及び前記配列のいずれかにタンパク質結合に必要なアミノ酸残基を添加することから生じるペプチドからなる群から選択されている。

【0033】

本発明の他の実施例によれば、これは患者の脳内のアミロイド沈着物の蓄積によって特徴付けられる疾病の予防及び／又は治療用の薬剤を調製するために、ベータアミロイドペプチドAβ40及びAβ42の優性遺伝子変異体のいずれかを特異的に認識する抗体又は抗体の活性断片若しくは誘導体を使用する使用方法を提供することにある。

【0034】

本発明の他の好適な実施例によれば、ペプチドAβの優性遺伝子変異体のいずれかを特異的に認識することができる抗体又はその活性断片若しくは誘導体はN末端及び／又はC末端からアミノ酸残基の除去によって任意にショートニング (shortened) され、かつタンパク質結合に適切なアミノ酸残基の添加により任意にレンジニング (lengthened) されたSEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4からなる群から選択されたペプチドから得られる。

【0035】

他のより好適な実施例において、抗体又はその活性断片若しくは誘導体は、SEQ ID No. 1のペプチド、SEQ ID No. 1のN末端及び／又はC末端のアミノ酸残基の除去から生じる配列を有するペプチド、及び前記配列のいずれかにタンパク質結合に必要なアミノ酸残基を添加することから生じるペプチドからなる群の中から選択されるペプチドを用いた哺乳動物又は鳥類の免疫処置によって得られる。

【0036】

他のより好適な実施例において、抗体又はその活性断片若しくは誘導体は、SEQ ID No. 2のペプチド、SEQ ID No. 2のN末端及び／又はC末端のアミノ酸の残基の除去から生じる配列を有するペプチド、及び前記配列のいずれかにタンパク質結合に必要なアミノ酸残基に添加することから生じるペプチドからなる群から選択されるペプチドを用いた哺乳動物又は鳥類の免疫処置によって得られる。

【0037】

他のより好適な実施例において、抗体又はその活性断片若しくは誘導体はSEQ ID No. 3のペプチド、SEQ ID No. 3のN末端及び／又はC末端のアミノ酸の残基の除去から生じるペプチド、及び前記配列のいずれかにタンパク質結合に必要なアミノ酸残基を添加することから生じるペプチドからなる群から選択されるペプチドを用いた哺乳動物又は鳥類の免疫処置によって得られる。

【0038】

10

20

30

40

50

他のより好適な実施例において、抗体又はその活性断片若しくは誘導体はSEQ ID No. 4のペプチド、SEQ ID No. 4のN末端及び/又はC末端のアミノ酸の残基の除去から生じるペプチド、及び前記配列のいずれかにタンパク質結合に必要なアミノ酸残基を添加することから生じるペプチドからなる群から選択されるペプチドを用いた哺乳動物又は鳥類の免疫処置によって得られる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0039】

本発明において、アミノ酸はこの分野において認められている単文字コードを使用して以下に指示したように略記されている。

【0040】

A = A l a = アラニン
 C = C y s = システイン
 D = A s p = アスパラギン酸
 E = G l u = グルタミン酸
 F = P h e = フェニルアラニン
 G = G l y = グリシン
 H = H i s = ヒスチジン
 I = I l e = イソロイシン
 K = L y s = リシン
 L = L e u = ロイシン
 M = M e t = メチオニン
 N = A s n = アスパラギン
 P = P r o = プロリン
 Q = G l n = グルタミン
 R = A r g = アルギニン
 S = S e r = セリン
 T = T h r = スレオニン
 V = V a l = バリン
 W = T r p = トリプトファン
 Y = T y r = トリオシン

【0041】

本発明において前述されかつSEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4として確認された配列は以下のアミノ酸配列に対応する。

SEQ ID NO. 1	L V F F A E D V
SEQ ID NO. 2	G L M V G G V V
SEQ ID NO. 3	G L M V G G V V I A
SEQ ID NO. 4	R H D S G Y E V H H Q K

【0042】

前述のペプチドから得られる抗体は以下に示されているコードに対応するコードSAR - 1, SAR - 2, SAR - 3及びSAR - 4が付与されている。

SEQ ID NO. 1	SAR - 2
SEQ ID NO. 2	SAR - 3
SEQ ID NO. 3	SAR - 4
SEQ ID NO. 4	SAR - 1

【0043】

コンピュータ読み取り可能なフォーマット中に本明細書を添付する本発明に記載されたペプチド配列の確認に関する情報は本明細書とともに提出される配列のリストに指示されている。

【0044】

10

20

30

40

50

本発明は以下の実施例によって例示されている。

例 1 多クローン抗体の発生

免疫原として使用された K L H と結合された 4 つのペプチドに対して 4 つの多クローン抗体がニュージーランド産白ウサギにおける免疫処置によって発生された。

【 0 0 4 5 】

各免疫原は各ウサギに 5 回の注入により 2 匹のウサギに注入された。すなわち、P B S に結合の完全なフロイントのアジュバント中に乳化されたペプチド - K L H の最初の皮内注射及び 1 4 日、2 8 日、4 9 日及び 8 0 日でのブースター投与量として、P B S に結合の同じペプチド - K L H であるが、しかし今回は抗体の存在を検出するために 9 0 日放置させた血液で不完全なフロイントのアジュバント中に乳化させたペプチド - K L H の 4 回

10

【 0 0 4 6 】

採血後、血清は分離されかつ脱塩により予備純化され、次いで抗体は 5 m g の対応するペプチドが添加されている 1 . 5 m l の E M D - E p o x y (エポキシ) 活性化材料 (M e r c k) を含んでいるマトリクス中で親和性により純化された。純化された断片は 0 . 1 % B S A (シグマ) にバックされかつ 4 で保管され、そしてグリセロール 2 0 - 5 0 % がクリオプロテクタ (抗凍結剤) として添加され得る。

【 0 0 4 7 】

例 2 A β 用のウエスタン - プロット

1 . 電気泳動

20

小さいペプチドの分離を改善することにより変更された 1 9 9 8 年、ニューヨーク、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ著の、分子バイオロジにける現行のプロトコルに記載されたレムリ方法「The Laemmli method described in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1998, modified by improve the separation of small peptides」が使用された。

【 0 0 4 8 】

使用された装置は B i o - R a d からミニプロテアン (M i n i p r o t e a n) 3 であった。

30

【 0 0 4 9 】

以下の成分と混合された、1 5 % アクリルアミドゲルが使用された。

貯蔵液	分離ゲル (1 5 %)	堆積ゲル
4 0 % アクリルアミド	3 . 7 5 m l	5 0 0 μ l
トリス 3 M , p H = 8 . 4 5	3 . 3 m l	2 5 0 μ l
グリセロール	1 . 0 5 m l	-
水	1 . 9 m l	4 . 2 μ l
S D S 2 0 %	5 0 μ l	1 8 . 6 μ l
A P S 1 0 %	5 0 μ l	2 5 μ l
T E M E D	1 0 μ l	5 μ l

40

【 0 0 5 0 】

1 m g / m l のペプチド A β 4 0 及び 4 2 の最初の貯蔵液が使用された (P B S 中に溶解された) 。必要な容量はサンプルの各々に関してこれらの液から採られかつ S B L T (S B L + トリスベース 2 M) で 2 0 μ l まで作られた。サンプルは次いでペプチドを変性させかつ考え得るプロテアーゼを除去するために 5 分間沸騰された。

【 0 0 5 1 】

キュベットの中心はカソードバッファでかつ外側はアノードバッファで充填され、これらのバッファの組成は以下の通りである。

【 0 0 5 2 】

アノードバッファ

50

24.2 g トリスベース (0.2 M 最終濃度)

H₂O により 1 リットルに希釈

濃縮された塩酸により pH 8.9 の調整

1 ヶ月まで 4℃ で貯蔵

【0053】

カソードバッファ

12.11 g トリスベース (0.1 M 最終濃度)

12.92 g トリシン (0.1 M 最終濃度)

1 g SDS (0.1 % 最終濃度)

H₂O により 1 リットルに希釈

10

pH 調整しない

1 ヶ月まで 4℃ で貯蔵

【0054】

最後に、サンプルは容器、すなわち、20 µl / 容器に負荷された。マーカとして Bio-Rad からのポリペプチド標準カレイドスコープを使用して、移動が低電圧 (30 V) で開始され、かつ次いで電圧は、およそ 1 時間の電気泳動後、100 V に上昇させられた。

【0055】

2. 膜転移 (MEMBRANE TRANSFER)

ゲル中に分離されたタンパク質は電子吸着 (electroblotting) により PVDf 膜に転移された。移転小冊子において、以下が配置された。

20

【0056】

ブラック側 - スポンジ - 3 ホットマンペーパー (又はフィルタペーパー) - ゲル - 膜 - 3 ホットマンペーパー - スポンジ - 透明側。

【0057】

キュベットは次いで電子吸着バッファにより充填された。

グリシン 38 mM

トリスベース 50 mM

メタノール 40 %

【0058】

30

転移は 200 mA で 2 時間行なわれた。転移中に、バッファは磁気攪拌器により攪拌し続けられた。

【0059】

3. 抗体による培養

抗体及び粉末ミルクが PBS - t (PBS + 0.5 % トイーン 20) 内に溶解され、また PBS - T による洗浄をも実施している。

【0060】

転移後、膜の表面は攪拌しながら室温 (RT) で 1 時間粉末ミルクの 5 % 溶液によりブロックされた。

【0061】

40

この後、膜は RT で 2 × 5 分洗浄された。

【0062】

その後、その膜は PBS - T において 1 : 500 に少なくとも希釈された RT で 1 時間最初の抗体 (SAR - 1, SAR - 2, SAR - 3 又は SAR - 4) により培養された。

【0063】

膜は RT で 3 × 10 分洗浄された。次いで、それは第 2 抗体、すなわちヤギアンチウサギ HRP により RT で 1 時間 (すべての場合に、1 : 10,000) 培養された。

【0064】

膜の洗浄は、再度 RT で 3 × 10 分繰り返された。

【0065】

50

4. 発育

最後の洗浄後、その膜はファーマシア (Pharmacia) からの ECL キット + Plus を使用して、化学ルミネセンス (chemoluminescence) キットの溶液により培養された。

【0066】

膜はセロファンで包まれそして 2 重エマルジョンフィルム (アメルシャムからのハイパーフィルム MP) に 30 秒と 2 分の間の異なる時間で露出された。

【0067】

例 3 ヒト脳の組織中の SAR - 1, SAR - 2, SAR - 3 及び SAR - 4 抗体による免疫組織化学

10

組織の部分は以下の工程に続いてパラフィン中に固定された。

- a) 10 % での中性ホルマリン内に固定
- b) 増大するアルコール濃度において連続する工程による脱水
- c) キシロール及びパラフィンを通過その工程は 60 - 62 におけるオープン中で
- d) 4 ミクロンに切断されかつスライド内に取り付けられるパラフィンブロックの実施

【0068】

上記組織部分は次いで以下の溶液を通すことにより脱パラフィン化された。

キシロール	100 %	10 分
キシロール	100 %	10 分
エタノール	100 %	5 分
エタノール	100 %	5 分
エタノール	96 %	5 分
エタノール	90 %	5 分
エタノール	70 %	5 分
PBS		5 分 × 3 回

20

【0069】

その後、それらは以下の方法において処理された。

- a) 換気装置内でかつ攪拌しながら 3 分間 96 % 蟻酸
- b) 水での急速洗浄
- c) PBS 2 × 5 分における洗浄
- d) 70 ml の PBS, 30 ml k エタノール及び 1 ml の H₂O₂ から作られた溶液中で 15 分間の内因性ペルオキシダーゼのブロック
- e) PBS 3 × 5 分における洗浄
- f) PBS / T (PBS 中 0.5 % でのトリトン又はティーン - 20) 3 × 5 分における洗浄
- g) 2 時間 PBS / T における 10 : 100 に希釈されたヤギ血清 (ノーマルヤギ血清) による非特定結合のブロック
- h) 水蒸気室中で 4 °C において夜間中最初の抗体の培養
 - SAR - 1 . . . PBS 中の希釈 1 : 150
 - SAR - 2 . . . PBS 中の希釈 1 : 1500
 - SAR - 3 . . . PBS 中の希釈 1 : 1500
 - SAR - 4 . . . PBS 中の希釈 1 : 2000
- i) PBS / T 3 × 5 分における洗浄
- j) 45 分の間中の PBS 中で 1 : 200 に希釈された第 2 抗体 (アンチウサギヤギ) 中の培養
- k) PBS 4 × 5 分における洗浄
- l) 発育が完了するまでこれらの条件を維持して、暗闇で 45 分間 PBS / T 中で 1 : 100 の希釈においてベクトル・ラブスの ABC (アビディン - ビオチン複合体) の培養
- m) PBS 3 × 5 分における洗浄
- n) ジアミンベンジジン (DAB) 中の発育

30

40

50

【 0 0 7 0 】

時間は立体顕微鏡により経験的に制御された。このため、先ず、洗浄が揺動させながら 10 分間トリス - HCl 0.5 M の溶液中で行なわれ、次いでトリス - HCl 0.05 M 中に希釈されかつ 4 で 0.5 l / ml H_2O_2 が添加されているジアミンペンジディン基板 (DAB) による培養で継続する。反応がいったん完了すると、3 回の洗浄が各回 5 分 4 °C において PBS 中に行なわれ、かつ次いでエタノール中での脱水が 4 分間キシロールを通して、各回 2 分間 70% , 90% 及び 100% で行なわれ、そしてそれらが顕微鏡による観察のためにユーキット (Eukitt) により取り付けられるまで、2 分間さらにキシロールを通した。

【 0 0 7 1 】

配列のリスト

配列の数 : 4

配列 1 についての情報 :

配列の特徴 :

長さ : 8

タイプ : アミノ酸

分子のタイプ : ペプチド

起源 : 化学合成

配列記載

```
SEQ ID NO 1
LeuValPhePheAlaGluAspVal
1 5
```

配列 2 についての情報 :

配列の特徴 :

長さ : 8

タイプ : アミノ酸

分子のタイプ : ペプチド

起源 : 化学合成

配列記載

```
SEQ ID NO 1
GlyLeuMetValGlyGlyValVal
1 5
```

配列 3 についての情報 :

配列の特徴 :

長さ : 10

タイプ : アミノ酸

分子のタイプ : ペプチド

起源 : 化学合成

配列記載

```
SEQ ID NO 1
GlyLeuMetValGlyGlyValValIleAla
1 5 10
```

10

20

30

40

50

配列 4 についての情報：

配列の特徴：

長さ：12

タイプ：アミノ酸

分子のタイプ：ペプチド

起源：化学合成

配列記載

SEQ ID NO 4

ArgHisAspSerGlyTyrGluValHisHisGlnLys
1 5 10

10

【手続補正書】

【提出日】平成26年2月28日(2014.2.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

患者の脳内のアミロイド沈着物の蓄積によって特徴付けられる疾病を予防及び／又は治療するための薬剤を調製するためにペプチドベータアミロイドAβ40及びAβ42の優性遺伝子変異体のいずれかを特異的に認識することができる抗体を製造するための免疫原として作用するタンパク質に結合されたペプチドを使用するペプチドの使用方法において、前記ペプチドが、

SEQ ID No. 2のペプチド、SEQ ID No. 3のペプチド；

及びSEQ ID No. 2又はSEQ ID No. 3のいずれかのペプチドにタンパク質を結合するのに適するアミノ酸残基の添加によるレンジスニング（伸張）から生じるペプチド；

からなる群から選択されることを特徴とするペプチドの使用方法。

【請求項2】

前記疾病がアルツハイマー病であることを特徴とする請求項1に記載のペプチドの使用方法。

【請求項3】

前記タンパク質がキーホールリンペットタンパク質（KLH）であることを特徴とする請求項1に記載のペプチドの使用方法。

【請求項4】

前記ペプチドが、

SEQ ID No. 2のペプチド；

及びタンパク質結合に必要なアミノ酸残基をSEQ ID No. 2に添加するレンジスニングから生じるペプチド；

からなる群から選択されることを特徴とする請求項1乃至3の内いずれか1項に記載のペプチドの使用方法。

【請求項5】

前記ペプチドが、

SEQ ID No. 3のペプチド；

及びタンパク質結合に必要なアミノ酸残基をSEQ ID No. 3に添加するレンジスニングから生じるペプチド；

からなる群から選択されることを特徴とする請求項1乃至3の内いずれか1項に記載のペプチドの使用方法。

【請求項 6】

患者の脳中のアミロイド沈着物の蓄積によって特徴付けられる疾病を予防及び／又は治療するための薬剤を調製するためにベータアミロイドペプチドA β 40及びA β 42の優性遺伝子変異体のいずれかを特異的に認識することができる抗体又はその活性断片の使用方法において、該抗体又はその活性断片が、タンパク質結合に適切なアミノ酸残基の添加により任意にレンジングされたSEQ ID No. 2及びSEQ ID No. 3からなる群から選択されたペプチドから得られることを特徴とする抗体又はその活性断片の使用方法。

【請求項 7】

前記疾病がアルツハイマー病であることを特徴とする請求項 6 に記載の抗体又はその活性断片の使用方法。

【請求項 8】

前記抗体又はその活性断片が、
SEQ ID No. 2のペプチド；
及びタンパク質結合に必要なアミノ酸残基をSEQ ID No. 2に添加させることから生じるペプチド；
からなる群から選択されるペプチドを用いた哺乳動物又は鳥類の免疫処置によって得られることを特徴とする請求項 6 又は 7 に記載の抗体又はその活性断片の使用方法。

【請求項 9】

前記抗体又はその活性断片が、
SEQ ID No. 3のペプチド；
及びタンパク質結合に必要なアミノ酸残基をSEQ ID No. 3に添加させることから生じるペプチド；
からなる群から選択されるペプチドを用いた哺乳動物又は鳥類の免疫処置によって得られることを特徴とする請求項 6 又は 7 に記載の抗体又はその活性断片の使用方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/53

D

F ターム(参考) 4H045 AA10 AA20 AA30 BA40 CA40 DA86 EA31 FA74

ALZHEIMER'S DISEASE TREATMENT METHOD

The present invention relates to a method for treatment and/or prevention of diseases associated with the presence of amyloid deposits, which include Alzheimer's disease.

STATE OF THE ART

Certain facts are known about the biochemical and metabolic phenomena associated with the presence of Alzheimer's Disease (AD). Two structural and histopathological changes observed in the brains of those with AD are neurofibrillar tangles (NFT) and amyloid deposits. Intraneuronal neurofibrillar tangles are also present in other neurodegenerative diseases, but the presence of amyloid deposits both in the intraneuronal spaces (neuritic plaques) and close to the microvasculature (vascular plaques) seems to be characteristic of AD. Of these, neuritic plaques seem to be the most common (Price, D.L., and co-workers, Drug Development Research (1985) 5:59-68).

The main component of these amyloid plaques is a peptide of 40-42 amino acids denominated amyloid peptide A β 4.

The amyloid peptide A β 4 is a polypeptide that originates from proteolysis from membrane glycoproteins denominated amyloid peptide A β 4 precursor proteins (β APP). These proteins, precursors of amyloid peptide, consist of 695 to 770 amino acids, all of them being coded by the same gene.

Two main variants of amyloid peptide A β 4 have been identified, peptide A β 40 and A β 42, containing 40 and 42 amino acids, respectively, which present different tissue distributions in both physiological and pathological conditions. The variant of 42 amino acids is the predominant form in the amyloid plaques located in the brains of patients with AD.

Until present, different possible solutions have been proposed to provide a possible vaccine against AD.

In EP526511, the administration of homeopathic doses of A β to patients with pre-established AD is proposed. However, due to the doses used, the levels of circulating endogenous A β in plasma hardly vary, and so no therapeutic benefit is expected.

5

Schenk et al., (Nature, 1999; 400: 173-177) describe immunization of transgenic mice PDAPP with A β 42, which overexpress human mutant APP, thus preventing the formation of amyloid plaques, neuritic dystrophy and astrogliosis.

10

In WO9927944 (Schenk D.), a treatment for AD is described by administration to a patient of A β 42.

15

A phase III clinical trial in 360 patients diagnosed with medium to moderate AD in 4 European countries and the United States, in which amyloid peptide A β 42 was used as an antigen, was discontinued after encephalitis was reported in some of the patients (Scrip Daily Online, 25 Feb 2002, S007455320, The Scientist 16 [7]: 22, April 1, 2002).

20

The problem of using an endogenous protein as a vaccine (or a protein present naturally in the animal that is being vaccinated), as is the case of peptide A β 42, the organism responds by making antibodies against A β 42 and against smaller fractions that may also have as yet unknown physiological functions, among some of the possible problems we could mention is the possible development of autoimmune diseases due to the generation of antibodies against the endogenous protein, difficulty in the generation of a immune response due to failure of the immune system for recognizing endogenous antigens, and possible development of an acute inflammatory response.

25

30

The present invention is aimed at treatment of Alzheimer's disease and other amyloid diseases by administration of a peptide, of the C-terminus part of A β , conjugated with a protein, which in a preferred embodiment of the present invention said protein is the keyhole limpet hemocyanin.

35

EXPLANATION OF THE INVENTION

The present invention relates to a vaccine for the prevention and/or treatment of Alzheimer's disease and other related amyloid diseases.

5 According to a preferred embodiment of the present invention, a vaccine is provided for the prevention and/or treatment of Alzheimer's disease and other related diseases, which overcomes the disadvantages associated with using peptides, proteins or endogenous immunogens.

10 Examples of other diseases characterized by amyloid deposits are Islandic hereditary syndrome, multiple myeloma, and spongiform encephalitis, including Creutzfeldt-Jakob disease.

15 The introduction of an immune response can be active such as when an immunogen is administered to induce antibodies that react with A β in a patient, or passive, such as when an antibody is administered that reacts by itself with A β in a patient.

For the aims of the present invention, the following terms are defined as follows:

20 The term "related amyloid diseases" includes diseases associated with the accumulation of amyloid which can be restricted to one organ, localized amyloidosis, or spread throughout several organs, systemic amyloidosis. Secondary amyloidosis can be associated with chronic infections (such as, for example, tuberculosis) or chronic inflammation (for example, rheumatoid
25 arthritis), familial Mediterranean fever (FMF) and other types of systemic amyloidosis found in patients in the long-term treatment of hemodialysis. Localized forms of amyloidosis include, but are not limited to, type II diabetes and any other disease related thereto, neurodegenerative diseases with scrapie, bovine spongiform encephalitis, Creutzfeldt-Jakob disease, Alzheimer's
30 disease, cerebral amyloid angiopathy.

The term "passive immunization" is used to relate to the administration of antibodies or fragments thereof to an individual with the intention of conferring
35 immunity on that individual.

In the first aspect, the invention provides the use of either a peptide that acts as an immunogen or as an antibody, in the preparation of a medication for the prevention and/or treatment of a disease characterized by the accumulation of amyloid deposits. Said methods consist of the induction of an immune response
5 against a peptide component of the amyloid deposits in the patient. Said induction could be active through administration of an immunogen or passive through administration of an antibody or an active fragment or derivative of an antibody.

10 In a preferred embodiment of the present invention, the disease is Alzheimer's disease.

The medication obtained can be used both in asymptomatic patients such as those who show symptoms of the disease.

15 In accordance with the presence of the present invention, the compositions able to provoke an immune response directed against certain components of the amyloid plaques are effective for treatment or prevention of diseases related to amyloid deposits. In particular, in accordance with an aspect of the present
20 invention, it is possible to prevent the progress of, reduce the symptoms of and/or reduce the deposition process of amyloid in an individual, when an immunostimulatory dose of a peptide or of an antibody obtained therefrom, is administered to the patient.

25 In accordance with an aspect of the present invention, the antibodies are obtained by immunization of mammals or birds by use of a peptide conjugated to a protein as an immunogen.

30 According to a preferred embodiment of the present invention, the mammals used for immunization can be ruminants, equines, lagomorphs, carnivores, primates, or any other animal that allows adequate quantities of serum to be extracted therefore for antibody. Among the birds used for immunization, we can mention, but in no way limit to, Galliformes, Anseriformes and
35 Columbiformes, among others.

According to a preferred embodiment of the present invention, this provides the use of a peptide conjugated to a protein that acts as an immunogen to produce antibodies able to specifically recognize any of the predominant variants of the beta amyloid peptide A β 40 and A β 42 in the preparation of a medicament for the prevention and/or treatment of a disease characterized by the accumulation of amyloid deposits in the brain of a patient.

According to the most preferred embodiment of the present invention, the protein used for conjugation with the peptide is keyhole limpet protein.

In accordance with an even more preferred embodiment of the present invention, the peptide is selected from a group that consists of the peptide of SEQ ID No 1, the peptide of SEQ ID No 2, the peptide of SEQ ID No 3, the peptide of SEQ ID No 4, the peptides resulting from cutting by elimination of amino acid residues from the N-terminal ends and/or C-terminal ends of SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3 or SEQ ID No 4, and the peptides resulting from lengthening by addition of the residues to any of the peptides of SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3 or SEQ ID No 4.

In accordance with another preferred embodiment, the peptide is selected from a group that comprises peptide SEQ ID No 1, the peptides with a sequence resulting from elimination of residues of N-terminal and/or C-terminal amino acids from SEQ ID No 1 and the peptides resulting from adding to any of the preceding sequences, the residues of amino acids necessary for protein conjugation.

In another preferred embodiment of the present invention, the peptide is selected from among the group made up by the peptide of SEQ ID No 2, the peptides with a sequence resulting from elimination of residues of N-terminal and/or C-terminal amino acids from SEQ ID No 2 and the peptides resulting from the addition to any of the preceding sequences, the residues of amino acids necessary for protein conjugation.

In another preferred embodiment of the present invention, the peptide is selected from among the group made up by the peptide of SEQ ID No 3, the peptides with a sequence resulting from elimination of residues of N-terminal

and/or C-terminal amino acids from SEQ ID No 3 and the peptides resulting from the addition to any of the preceding sequences, the residues of amino acids necessary for protein conjugation.

5 In another preferred embodiment of the present invention, the peptide is selected from among the group made up by the peptide of SEQ ID No 4, the peptides with a sequence resulting from elimination of residues of N-terminal and/or C-terminal amino acids from SEQ ID No 4 and the peptides resulting from the addition to any of the preceding sequences, the residues of amino
10 acids necessary for protein conjugation.

In accordance with another embodiment of the present invention, this provides the use of an antibody or an active fragment or derivative of an antibody that specifically recognizes any of the predominant variants of the beta amyloid
15 peptide, A β 40 and A β 42 in the preparation of a medicament for the prevention and/or treatment of a disease characterized by the accumulation of amyloid deposits in the brain of a patient.

According to a preferred embodiment of the present invention, the antibody or
20 an active fragment or derivative of the antibody that specifically recognizes any of the predominant variants of the peptide A β is obtained from a peptide selected from a group that consists of SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, optionally shortened by elimination of the amino acid residues from the N-terminal and/or C-terminal ends, and optionally lengthened by
25 addition of amino acid residues appropriate for protein conjugation.

In another more preferred embodiment, said antibody or active fragment or antibody derivative is obtained by immunization of mammals or birds with a
30 peptides selected from a group made up of the peptide of SEQ ID No 1, peptides with a sequence resulting from elimination of N-terminal and C-terminal amino acid residues of SEQ ID No 1 and peptides resulting from addition of the residues of amino acids necessary for protein conjugation to any of the preceding sequences.

35 In another more preferred embodiment, said antibody or active fragment or antibody derivative is obtained by immunization of mammals or birds with a

peptides selected from a group made up of the peptide of SEQ ID No 2, peptides with a sequence resulting from elimination of N-terminal and C-terminal amino acid residues of SEQ ID No 2 and peptides resulting from addition of the residues of amino acids necessary for protein conjugation to any
5 of the preceding sequences.

In another more preferred embodiment, said antibody or active fragment or antibody derivative is obtained by immunization of mammals or birds with a peptides selected from a group made up of the peptide of SEQ ID No 3,
10 peptides with a sequence resulting from elimination of N-terminal and C-terminal amino acid residues of SEQ ID No 3 and peptides resulting from addition of the residues of amino acids necessary for protein conjugation to any of the preceding sequences.

15 In another more preferred embodiment, said antibody or active fragment or antibody derivative is obtained by immunization of mammals or birds with a peptides selected from a group made up of the peptide of SEQ ID No 4, peptides with a sequence resulting from elimination of N-terminal and C-terminal amino acid residues of SEQ ID No 4 and peptides resulting from
20 addition of the residues of amino acids necessary for protein conjugation to any of the preceding sequences.

In this application, the amino acids are abbreviated using the single-letter codes accepted in the field, as indicated below:

25

A =	Ala =	alanine
C =	Cys =	cysteine
D =	Asp =	aspartic acid
E =	Glu =	glutamic acid
F =	Phe =	phenylalanine
G =	Gly =	glycine
H =	His =	histidine
I =	Ile =	isoleucine
K =	Lys =	lysine
L =	Leu =	leucine
M =	Met =	methionine

N = Asn = asparagine
P = Pro = proline
Q = Gln = glutamine
R = Arg = arginine
S = Ser = serine
T = Thr = threonine
V = Val = valine
W = Trp = tryptophane
Y = Tyr = tyrosine

The sequences described previously in the present invention, and identified as SEQ ID no 1, SEQ ID no 2, SEQ ID no 3, SEQ ID no 4, correspond to the following amino acid sequences:

5

SEQ ID NO 1	LVFFAEDV
SEQ ID NO 2	GLMVGGVV
SEQ ID NO 3	GLMVGGVVIA
SEQ ID NO 4	RHDSGYEVHHQK

10

The antibodies obtained from the previous peptides are given the codes SAR-1, SAR-2, SAR-3 and SAR-4 corresponding to those that are shown below:

SEQ ID NO 1	SAR-2
SEQ ID NO 2	SAR-3
SEQ ID NO 3	SAR-4
SEQ ID NO 4	SAR-1

15

The information relating to identification of the peptide sequences, described in the present invention, that accompany the present document in a computer-readable format, is indicated in the list of sequences that is presented along with this document.

20

EXAMPLES

25

The present invention is illustrated by means of the following examples.

Example 1. Generation of polyclonal antibodies.

The four polyclonal antibodies against the four peptides conjugated with KLH that were used as immunogen were generated by immunization in New Zealand white rabbits.

Each immunogen was injected into two rabbits, with five injections in each rabbit: the first intradermal injection of the peptide-KLH conjugate in PBS and emulsified in complete Freud adjuvant and four more intramuscular injections, as a booster dose on days 14, 28, 49 and 80, of the same peptide-KLH conjugate in PBS but this time emulsified in incomplete Freud adjuvant, with the blood letting done at 90 days to detect the presence of antibodies.

After collecting blood, the serum was separated and pre-purified by desalination and then the antibodies were purified by affinity in a matrix comprising 1.5 ml of EMD-Epoxy activated material (Merck) to which 5 mg of the corresponding peptide was added. The purified fractions were packed in 0.1% BSA (Sigma) and stored at 4°C, and glycerol 20-50% could be added as a cryoprotector.

Example 2. WESTERN-BLOT for A β

1. Electrophoresis

The Laemmli method was used, described in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1998, modified by improve the separation of small peptides.

The apparatus used was a Miniprotean 3 from Bio-Rad.

A 15% acrylamide gel was used, mixed with the following components:

STOCK SOLUTIONS	SEPARATING GEL (15%)	STACKING GEL
40% acrylamide	3.75 ml	500 μ l
Tris 3 M, pH = 8.45	3.3 ml	250 μ l
Glycerol	1.05 ml	-

Water	1.9 ml	4.2 μ l
SDS 20%	50 μ l	18.6 μ l
APS 10%	50 μ l	25 μ l
TEMED	10 μ l	5 μ l

Initial stock solutions of peptide A β 40 and 42 of 1 mg/ml were used (dissolved in PBS). The volume necessary was taken of these solutions for each one of the samples and made up to 20 μ l with SBLT (SBL + Tris base 2 M). The samples were then boiled for 5 minutes to denature the peptides and eliminate possible proteases.

The center of the cuvette was filled with cathode buffer and the outside with anode buffer, the composition of these buffers being as follows:

10

Anode buffer

24.2 g Tris base (0.2 M final concentration)

Dilute to 1 litre with H₂O

Adjust of pH 8.9 with concentrated HCl

15

Store at 4°C for up to 1 month

Cathode buffer

12.11 g Tris base (0.1 M final concentration)

17.92 g tricine (0.1 M final concentration)

20

1 g SDS (0.1% final concentration)

Dilute to 1 litre with H₂O

Do not adjust pH

Store at 4°C for up to 1 month

25

Finally, the samples were loaded into the wells: 20 μ l/well. Using the Polypeptide Standard Kaleidoscope from Bio-Rad as a marker, migration started at low voltage (30 V), and then the voltage was raised to 100 V, after approximately 1 hour of electrophoresis.

30

2.- MEMBRANE TRANSFER

The proteins separated in the gel were transferred to the PVDF membrane by electroblotting. In the transfer booklets the following were placed

5 Black side –sponge- 3 Whatmann papers (or filter papers) –gel- -membrane- -3 Whatmann papers- -sponge- -transparent side.

The cuvette was then filled with electroblotting buffer:

Glycine 38 mM

10 Tris base 50 mM

Methanol 40%

The transfer was done for 2 hours at 200 mA. During the transfer, the buffer was kept stirring with the magnetic stirrer.

15

3- INCUBATION WITH ANTIBODIES

The antibodies and the powder milk were dissolved in PBS-t (PBS + 0.5% Tween 20), carrying out the washing with PBS-T also.

20

After the transfer, the surface of the membrane was blocked with 5% solution of powder milk for 1 hour with stirring and at room temperature (RT)

After this, the membrane was washed for 2 x 5 minutes at RT.

25

Then, it was incubated with primary antibody (SAR-1, SAR-2, SAR-3 or SAR-4) for 1 hour at RT at least diluted 1:500 in PBS-T.

The membrane was washed: 3 x 10 minutes at RT. Then, it was incubated with secondary antibody: goat anti-rabbit-HRP for 1 hour at RT (1:10,000 in all cases).

30

The washing of the membrane was repeated once again: 3 x 10 minutes at RT.

35

4.- DEVELOPMENT

After the last washing, the membrane was incubated with the solution of the chemoluminescence kit, using the ECL kit+Plus from Pharmacia.

5 The membrane was wrapped in cellophane and exposed to double-emulsion film (Hyperfilm MP from Amersham), for different times of between 30 seconds and 2 minutes.

10 Example 3. Immunohistochemistry with SAR-1, SAR-2, SAR-3 and SAR-4 antibodies in the tissue of human brain.

The sections of tissue were fixed in paraffin following the following steps:

- a) fixation in neutral formol at 10%
- b) dehydration by successive steps in increasing concentrations of alcohol
- c) passes through xylol and paraffin, this latter step in an oven at 60-62°C.
- 15 d) carrying out of paraffin blocks, which were cut to 4 microns and mounted in slides.

The sections were then deparaffinized by passing through the following solutions:

20

Xylol	100%	10 minutes
Xylol	100%	10 minutes
Ethanol	100%	5 minutes
Ethanol	100%	5 minutes
25 Ethanol	96%	5 minutes
Ethanol	90%	5 minutes
Ethanol	70%	5 minutes
PBS		5 minutes x 3 times

30 Afterwards, they were treated in the following way:

- a) 96% formic acid for 3 minutes in a fume cupboard and with stirring
- b) Rapid washing with water
- c) Washing in PBS 2 x 5 minutes
- d) Block of the endogenous peroxidases for 15 minutes in a solution made
- 35 up of 70 ml of PBS, 30 ml of methanol and 1 ml of H₂O₂
- e) Washing in PBS 3 x 5 minutes

- 5 f) Washing in PBS/T (Triton or Tween-20 at 0.5% in PBS) 3 x 5 minutes
 g) Block of the non-specific binding with goat serum (Normal Goat Serum) diluted 10:100 in PBS/T for two hours
 h) Incubation of the primary antibodies all night at 4°C in a moisture chamber:

	Sar-1...	Dilution 1:150 in PBS
	Sar-2...	Dilution 1:1500 in PBS
	Sar-3...	Dilution 1:1500 in PBS
10	Sar-4...	Dilution 1:2000 in PBS

- i) Washing in PBS/T 3 x 5 minutes
 j) Incubation in secondary antibody (anti-rabbit goat) diluted 1:200 in PBS during 45 minutes
 15 k) Washing in PBS 4 x 5 minutes
 l) Incubation of ABC (avidin-biotin complex) of Vector Labs at a dilution of 1:100 in PBS/T for 45 minutes in darkness, keeping these conditions until development was complete
 m) Washing in PBS 3 x 5 minutes
 20 n) Development in diaminobenzidine (DAB)

The time was controlled empirically under a stereoscopic microscope. For this, first, a washing was done in a solution of Tris-HCl 0.5 M for 10 minutes with shaking, to then continue with incubation with a diaminobenzidine substrate (DAB) diluted in Tris-HCl 0.05M and to which is added 0.5 µl/ml of H₂O₂ at 4°C. Once the reaction was finished, three washes were done in PBS at 4°C for 5 minutes each time and then dehydration in ethanol was done at 70%, 90% and 100% for 2 minutes each time, passing through xylol for 4 minutes and a further pass through xylol for 2 minutes; until they were mounted with Eukitt for observation under the microscope.

List of sequences.

NUMBER OF SEQUENCES: 4

INFORMATION ON SEQUENCE 1:

14

CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

LENGTH: 8

TYPE: amino acid

TYPE OF MOLECULE: peptide

5 SOURCE: Chemical synthesis

SEQUENCE DESCRIPTION:

SEQ ID NO 1

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val

10 1 5

INFORMATION ON SEQUENCE 2:

CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

15 LENGTH: 8

TYPE: amino acid

TYPE OF MOLECULE: peptide

SOURCE: Chemical synthesis

SEQUENCE DESCRIPTION:

20

SEQ ID NO 1

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

1 5

25

INFORMATION ON SEQUENCE 3:

CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

LENGTH: 10

TYPE: amino acid

30 TYPE OF MOLECULE: peptide

SOURCE: Chemical synthesis

SEQUENCE DESCRIPTION:

SEQ ID NO 1

35 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

1 5 10

15

INFORMATION ON SEQUENCE 4:

CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

5

LENGTH: 12

TYPE: amino acid

TYPE OF MOLECULE: peptide

SOURCE: Chemical synthesis

SEQUENCE DESCRIPTION:

10

SEQ ID NO 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1

5

10

CLAIMS

1. The use of a peptide conjugated to a protein that acts as a immunogen for the production of antibodies able to specifically recognize any of the predominant variants of the peptide beta amyloid A β 40 and A β 42 in the preparation of a medicament for the prevention and/or treatment of a disease characterized by the accumulation of amyloid deposits in the brain of a patient
2. Use according to the previous claim, characterized in that the disease is Alzheimer's disease
3. Use of according to the previous claim 1, characterized in that the protein is keyhole limpet protein (KLH).
4. Use according to any of the previous claims 1 to 3, characterized in that the peptide is selected from a group that comprises:
 - the peptide of SEQ ID No 1, the peptide of SEQ ID No 2, the peptide of SEQ ID No 3, the peptide of SEQ ID No 4;
 - the peptides resulting from shortening by elimination of the residues of amino acids of the N-terminal and/or C-terminal ends of SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3 or SEQ ID No 4;
 - and the peptides resulting from lengthening by addition of the amino acid resides appropriate for conjugating the protein to any of the peptides of SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3 or SEQ ID No 4.
5. Use according to the previous claim 4, characterized in that the peptide is selected from the group made up of:
 - the peptide of SEQ ID No 1;
 - the peptides resulting from shortening by elimination of the residues of amino acids of the N-terminal and/or C-terminal ends of SEQ ID No 1;
 - and the peptides resulting from lengthening by addition of the amino acid resides necessary for protein conjugation.
6. Use according to the previous claim 4, characterized in that the peptide is selected from the group made up of:
 - the peptide of SEQ ID No 2;

- the peptides resulting from shortening by elimination of the residues of amino acids of the N-terminal and/or C-terminal ends of SEQ ID No 2;
 - and the peptides resulting from lengthening by addition of the amino acid residues necessary for protein conjugation.
- 5
7. Use according to the previous claim 4, characterized in that the peptide is selected from the group made up of:
- the peptide of SEQ ID No 3;
 - the peptides resulting from shortening by elimination of the residues of amino acids of the N-terminal and/or C-terminal ends of SEQ ID No 3;
 - and the peptides resulting from lengthening by addition of the amino acid residues necessary for protein conjugation.
- 10
8. Use according to the previous claim 4, characterized in that the peptide is selected from the group made up of:
- 15
- the peptide of SEQ ID No 4;
 - the peptides resulting from shortening by elimination of the residues of amino acids of the N-terminal and/or C-terminal ends of SEQ ID No 4;
 - and the peptides resulting from lengthening by addition of the amino acid residues necessary for protein conjugation.
- 20
9. Use of an antibody or an active fragment or derivative of an antibody that specifically recognizes any of the predominant variants of the beta amyloid peptide, A β 40 and A β 42, in the preparation of a medicament for the prevention and/or treatment of a disease characterized by the accumulation of amyloid deposits in the brain of a patient.
- 25
10. Use according to the previous claim 9, characterized in that the disease is Alzheimer's disease.
- 30
11. Use according to any of the previous claims 9 to 10, characterized in that the antibody or the active fragment or derivative of the antibody that specifically recognizes any of the predominant variants of the peptide A β is obtained from a peptide selected from a group that consists of SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, optionally shortened by elimination of the amino acid residues from the N-terminal and/or C-terminal ends, and optionally lengthened by addition of the appropriate amino acid residues for protein conjugation.
- 35

12. Use according to claim 9, characterized in that said antibody or active fragment or antibody derivative is obtained by immunization of mammals or birds with a peptide selected from among the group comprised of:

- the peptide of SEQ ID No 1;
- the peptides with a sequence resulting from eliminating the residues of N-terminal and/or C-terminal amino acid of SEQ ID No 1;
- and the peptides resulting from adding any of the preceding sequences, the amino acid residues necessary for protein conjugation.

13. Use according to claim 9, characterized in that said antibody or active fragment or antibody derivative is obtained by immunization of mammals or birds with a peptide selected from among the group comprised of:

- the peptide of SEQ ID No 2;
- the peptides with a sequence resulting from eliminating the residues of N-terminal and/or C-terminal amino acid of SEQ ID No 2;
- and the peptides resulting from adding any of the preceding sequences, the amino acid residues necessary for protein conjugation.

14. Use according to claim 9, characterized in that said antibody or active fragment or antibody derivative is obtained by immunization of mammals or birds with a peptide selected from among the group comprised of:

- the peptide of SEQ ID No 3;
- the peptides with a sequence resulting from eliminating the residues of N-terminal and/or C-terminal amino acid of SEQ ID No 3;
- and the peptides resulting from adding any of the preceding sequences, the amino acid residues necessary for protein conjugation.

15. Use according to claim 9, characterized in that said antibody or active fragment or antibody derivative is obtained by immunization of mammals or birds with a peptide selected from among the group comprised of:

- the peptide of SEQ ID No 4;

19

- the peptides with a sequence resulting from eliminating the residues of N-terminal and/or C-terminal amino acid of SEQ ID No 4;
- and the peptides resulting from adding any of the preceding sequences, the amino acid residues necessary for protein conjugation.

5

20

ABSTRACTS

Alzheimer's disease treatment method

The invention relates to antibodies which are used in the preparation of a medicament for the treatment of Alzheimer's disease. More specifically, the invention relates to the use of an antibody specifically recognizing any one of the predominant variants of the amyloid beta peptide, Ab40 and Ab42, in the preparation of a medicament that is used to prevent and/or treat Alzheimer's disease.

5

10

专利名称(译)	阿尔茨海默病的治疗方法		
公开(公告)号	JP2014129389A	公开(公告)日	2014-07-10
申请号	JP2014038360	申请日	2014-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	ARA的Klong生物技术协会爸爸有限公司田田		
申请(专利权)人(译)	Arakuron生物技术Soshiedaddo Rimitada		
[标]发明人	サラサバーリオマニユエル		
发明人	サラサ バーリオ マニユエル		
IPC分类号	A61K39/395 C07K14/47 C12P21/02 A61P25/28 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/1709 A61K39/395 A61K47/646 A61P25/00 A61P25/28 A61P35/00 A61P37/04 C07K16/18 C07K7/06		
FI分类号	A61K39/395.ZNA.D C07K14/47 C12P21/02.A A61K39/395.N A61P25/28 G01N33/53.D A61K39/395.DZN.A		
F-TERM分类号	4B064/AG31 4B064/BJ12 4B064/CC24 4B064/CC30 4B064/DA01 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA74		
代理人(译)	江藤刚		
优先权	2003001054 2003-05-08 ES		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：预防和治疗以淀粉样蛋白沉积物为特征的疾病，尤其是阿尔茨海默氏病。用于制备治疗阿尔茨海默氏病的药物的抗体。更具体地，一种使用特异性识别淀粉样蛋白 β 肽之一，A β 40和A β 42的显性突变体的抗体的方法，用于制备用于预防和/或治疗阿尔茨海默氏病的药物。
[选择图]无

STOCK SOLUTIONS	SEPARATING GEL (15%)	STACKING GEL
40% acrylamide	3.75 ml	500 μ l
Tris 3 M, pH = 8.45	3.3 ml	250 μ l
Glycerol	1.05 ml	-