

(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2011-513440

(P2011-513440A)

(43) 公表日 平成23年4月28日(2011.4.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C07K 7/06 ZNA	4C084
<b>A61K 38/00 (2006.01)</b>	A61K 37/02	4H045
<b>A61P 25/28 (2006.01)</b>	A61P 25/28	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2010-550011 (P2010-550011)  
 (86) (22) 出願日 平成20年3月13日 (2008. 3. 13)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年9月13日 (2010. 9. 13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2008/000497  
 (87) 国際公開番号 W02009/111906  
 (87) 国際公開日 平成21年9月17日 (2009. 9. 17)

(71) 出願人 510246390  
 天津医科大学  
 中国天津市和平区▲氣▼象台路2 2号生理  
 教研室  
 (71) 出願人 510247216  
 王 威  
 中国天津市南▲開▼区迎水道9号1 1-1  
 -4 0 2  
 (74) 代理人 100115255  
 弁理士 辻丸 光一郎  
 (74) 代理人 100129137  
 弁理士 中山 ゆみ  
 (74) 代理人 100146064  
 弁理士 吉田 玲子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の予防および/または治療用βシート破壊ペプチド

(57) 【要約】

A 14 - 23と相同配列を有する アミロイドペプチド(A 1 - 42)に結合する シート破壊ペプチドを提供する。 シート破壊ペプチドは、アルツハイマー病の予防および/または治療用の薬剤の製造に使用できる。

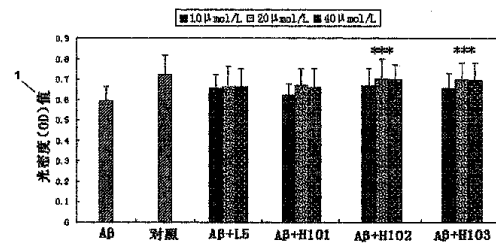


图 6 / FIG. 6

1 OPTICAL DENSITY (OD) VALUE  
 2 CONTROL

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アミノ酸配列

His-X1-X2-Leu-X3-Phe-Phe-X4-Glu-Asp

を含むポリペプチドであって、

X 1 は、リジン残基 ( L y s、 K ) またはグルタミン残基 ( G l n、 Q ) であり、

X 2 は、リジン残基 ( L y s、 K ) またはグルタミン残基 ( G l n、 Q ) であり、

X 3 は、バリン残基 ( V a l、 V ) またはプロリン残基 ( P r o、 P ) であり、

X 4 は、アラニン残基 ( A l a、 A ) またはグルタミン酸残基 ( G l u、 G ) であり、

アミノ酸配列

His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp(配列番号：3)

を含まないポリペプチド。

## 【請求項 2】

前記ポリペプチドが、アミノ酸配列

His-X1-X2-Leu-X3-Phe-Phe-X4-Glu-Asp

を有し、

X 1 は、リジン残基 ( L y s、 K ) またはグルタミン残基 ( G l n、 Q ) であり、

X 2 は、リジン残基 ( L y s、 K ) またはグルタミン残基 ( G l n、 Q ) であり、

X 3 は、バリン残基 ( V a l、 V ) またはプロリン残基 ( P r o、 P ) であり、

X 4 は、アラニン残基 ( A l a、 A ) またはグルタミン酸残基 ( G l u、 G ) であり、

アミノ酸配列

His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp(配列番号：3)

を有さない

請求項 1 記載のポリペプチド。

## 【請求項 3】

前記ポリペプチドが、

His-Lys-Gln-Leu-Val-Phe-Phe-Glu-Glu-Asp(配列番号：1) および

His-Lys-Gln-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu-Glu-Asp(配列番号：2)

の群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 2 記載のポリペプチド。

## 【請求項 4】

アルツハイマー病の予防および/または治療用の薬剤の製造における、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のポリペプチドの使用。

## 【請求項 5】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の 1 種類以上のポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

## 【請求項 6】

被検者に請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のポリペプチドを有効量投与することを含むアルツハイマー病の予防および/または治療方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ポリペプチドおよびそれらの使用に関する。特に、本発明は、アルツハイマー病の予防および/または治療に使用できるタイプのシート破壊ペプチドおよびアルツハイマー病の予防および/または治療におけるそれらの使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

老年性認知症とも呼ばれるアルツハイマー病 ( A D ) は、神経変性疾患の一種である。それは、潜在的発症と進行性病理を示し、総合的な認識機能障害および人格変化といった典型的な臨床的特徴を伴う。A D 患者は、過去および最近の記憶の機能障害に続いて、進行性知能低下、失語、推論能力の喪失、および運動障害を起こす。この疾患は、患者およ

10

20

30

40

50

びその家族の生活の質(クオリティ・オブ・ライフ)に深刻な影響を及ぼし、また、患者の家族および社会に大きな負担を課す。

【0003】

高齢化が加速するにつれ、老人性疾患は、人間の健康に影響を及ぼす重大な問題となってきた。AD、癌、および心臓・脳血管の発作は、高齢者の死亡率の3つの主要原因である。ADは、21世紀の人間の健康における第4の危険因子(リスクファクター)になるであろうと考えられている。世界保健機構(WHO)によると、ADは、21世紀の5つの主要疾患の1つである。中国は、1999年に高齢化社会に入った。2004年末までに60歳以上の高齢者は1億4300万人となり、それは総人口の10.97%を占める。この数字は、2014年までに2億人に、2026年までに3億人に、2037年までに4億人以上になると予測されている。高齢者の人口は、2051年に最大となり、3億人~4億人の規模で推移するとみられる。高齢者人口の増加は、アルツハイマー病の発生率の増加につながる。現在、ヨーロッパ、日本、および米国において、80歳以上の人の20%以上がこの疾患を患っていると報告されている。世界中で、5000万人以上の65歳以上の人々が、様々な種類の認知症を患っている。

10

【0004】

ADの主な病変には、アミロイドペプチド(A または A と略される)の析出によって細胞間に広範囲に形成される老人斑(SP)、神経細胞における過リン酸化タウタンパク質による神経原線維変化(NT)、および広範囲ニューロン消失といった特徴がある。A の神経毒性が様々な病因に共通する原因であると、多くの証拠が示している。そのため、A を標的とした予防および/または治療の取り組みが、近年のAD研究の焦点となってきた。

20

【0005】

A は、アミロイド前駆体タンパク質(APP)の代謝産物である。通常の条件下では、APPは、セクレターゼの酵素触媒反応の下、可溶性sAPPを生成する。sAPPは、細胞内のカルシウム濃度を下げ、シナプス可塑性を調整し、シナプス成長を促進し、ニューロンを保護する機能を持つ。これは、A を生成しないAPP処理の主要経路である。他の経路において、APPは、セクレターゼの酵素触媒反応の下、sAPPおよびC99を生成する。その後、C99は、セクレターゼの酵素触媒反応の下、Aペプチドを遊離させる。セクレターゼによるC99の加水分解は、アラニン713およびトレオニン714間の酵素的切断がA<sub>1-42</sub>を生成し、バリン711およびイソロイシン712間の酵素的切断がA<sub>1-40</sub>を生成するという不均一プロセスである(非特許文献1)。A<sub>1-42</sub>は、全Aタンパク質の約10%を占め、A<sub>1-40</sub>は、全Aタンパク質の90%を占める。しかしながら、A<sub>1-42</sub>は凝集しやすく、凝集したA<sub>1-42</sub>は、老人斑の基本成分を構成する。

30

【0006】

A<sub>1-42</sub>ペプチドの一次構造を以下に示す(配列番号:4):

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-			
1	5	10	15
Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-			
16	20	25	30
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala			
31	35	40	42

40

【0007】

A<sub>1-42</sub>のC末端上の10個のアミノ酸残基(残基33~42)および残基17~21は疎水性が高く、A<sub>1-42</sub>の疎水性領域を構成し;アミノ酸残基9~21もシート高次構造を形成するかもしれないが、アミノ酸残基28~42はシート高次構造を形成する可能性がより高い。シート高次構造は、A<sub>1-42</sub>ペプチドの凝集を促す。実験の結果は、C末端の3つの残基Val<sup>40</sup>、Ile<sup>41</sup>、Ala<sup>42</sup>が、シート高次構造を安定させ、シートの形成を促す事を示す。A<sub>1-42</sub>ペプチドのN末端は親

50

水性を有し、異なる溶液の条件に応じて、らせん、ランダムらせん、またはシートの高次構造を形成できる。シート高次構造は、A<sub>β</sub>ペプチドの凝集を促し、A<sub>β</sub>ペプチドの凝集はその疎水性領域間の相互作用に起因する事が示されてきた。Sotoら（非特許文献2）が、A<sub>β</sub>ペプチドの疎水性領域に隣接するアミノ酸残基をプロリンで置き換えたところ、得られた小ペプチドはシート高次構造を形成せずにA<sub>β</sub>ペプチドに結合し、A<sub>β</sub>ペプチドをそのランダムらせん状の高次構造に保ち、その凝集を抑制した。また、A<sub>β</sub>ペプチドの疎水性領域の1つであるペントペプチドA<sub>16-20</sub>（Lys-Leu-Val-Phe-Phe）は、A<sub>β</sub>ペプチドに結合でき、それによって凝集を防ぐことも示されてきた。アラニンによって1つずつ置換する事によって、Lys<sup>16</sup>、Leu<sup>17</sup>、およびPhe<sup>20</sup>が、この工程において重要な役割を果たす事が分かった。これは、A<sub>16-20</sub>残基が、A<sub>β</sub>ペプチドの凝集において、隣接する2つのA<sub>β</sub>ペプチドが互いに結合するための区分を構成する事を示している。A<sub>β</sub>の高次構造がその凝集特性に大きく影響を及ぼす事が示されてきた。すなわち、主要な二次構造がらせんの場合、凝集は遅くなるが、主要な二次構造がシートの場合、凝集はより速くなる。

10

#### 【0008】

一定の条件の下では、高シートの疎水性領域の露頭はA<sub>β</sub>の凝集およびオリゴマーの形成を導き、最終的にはニューロンの細胞間隙に析出される不溶性物質の形成を導く。これによって、神経毒性および脳のグリア細胞の活性の増大が起こり、アミロイド斑と一緒に形成する可能性のある炎症性メディエータおよび補体を産生する恐れがある。

20

#### 【0009】

モノマーの疎水性電荷の増大はA<sub>β</sub>凝集の主要原因の1つである。A<sub>1-40</sub>と比べて、A<sub>1-42</sub>は残基を2つ多く有するため、A<sub>β</sub>の疎水性が高まって凝集しやすくなるだけでなく、凝集の安定性も向上して速い段階でそれらをアミロイド斑に選択的に析出する。A<sub>1-42</sub>は、可溶性A<sub>β</sub>からオリゴマー、ファイバー、および斑（ブラク）を形成する工程の初期因子である事がある（非特許文献3）。

#### 【0010】

Jarrettらは、A<sub>1-42</sub>が「種子」として機能してA<sub>β</sub>の析出を開始すると推測した。他のモノマーは、それから徐々に核のまわりに集まって、ペプチド鎖を伸展して原線維を形成し（伸長）、原線維はさらに広がって最終的に斑を形成した（非特許文献4）。

30

#### 【0011】

A<sub>β</sub>の凝集と析出および老人斑の形成、ならびにそれに伴うニューロンのダメージは、ADの病理学的機構の中核を構成すると考えられている。そのため、A<sub>β</sub>ペプチドの凝集を抑制し、A<sub>β</sub>ペプチドの分解と排除を促進する事は、ADの予防および/または治療の根本的な手段といえるかもしれない。

#### 【0012】

A<sub>β</sub>の形成の低減、A<sub>β</sub>の排除の促進、A<sub>β</sub>の凝集の防止または反転、およびA<sub>β</sub>の毒性の抑制等の側面が、A<sub>β</sub>用の薬剤の開発における最近の研究の焦点となっている。ワシントン大学医学部の研究者達は、ADマウスが、脳内のアミロイド斑を排除した後にそれらの脳細胞機能を驚くほど回復させることができた事を発見したが、それは、A<sub>β</sub>を標的としている薬剤の有望な将来性を示す。A<sub>β</sub>に対する様々な薬剤の中で、シートブロッカーに研究者の注目が集まっている。

40

#### 【0013】

シートブロッカーは大きく分けて2種類ある。

#### 【0014】

(1) 低分子量のアミノ糖タンパク質(グリコサミノグリカン:GAGs)がアミロイド斑を安定させ斑の分解を抑制できるという認識に基づいて、カナダのNeurochem社はGAG誘導体を設計および合成した。生体内(in vivo)実験で、そのような低分子量GAG類似体が、血漿及び脳内のアミロイドレベルを著しく下げ、A<sub>β</sub>凝集を抑制する事を示した為、それはADの治療に使用する事ができる。そのような低分子量GAG

50

G類似体の1つはAlz h e m e dとして設計され、臨床試験の第3段階まできている。

【0015】

(2) Ch a c o nらは、線維性A $\beta$ を腹腔内注射する事によってラットに行動障害を誘発させ、その後、5つのアミノ酸残基から成るシートの破壊ペプチド(5アミノ酸シート破壊ペプチド:i A b e t a 5 p)のニューロンに対する保護効果を評価した。その結果、i A b e t a 5 pはA $\beta$ 原線維の形成を抑制できるだけでなく、A $\beta$ 原線維を分解できる事が分った(非特許文献5)。i A b e t a 5 pの薬剤は臨床試験の第3段階まできている。

【0016】

技術的には、アミロイド(A $\beta_{1-42}$ )のモノマーに特異的に結合し、その標準空間的構造を安定させ、シートの形成を抑制し、可溶性アミロイドオリゴマーおよびアミロイド斑の形成を防止する事ができる新たな作用性薬剤の必要性が残っている。前述の薬剤は、A $\beta$ ペプチドの凝集を抑制し、A $\beta$ ペプチドの分解および排除を促進できなければならない、それゆえADの予防および/または治療に使用可能である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 2001, 81 (2): 741-766

【非特許文献2】Soto C, Kindy MS, Baumann M, et al., Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*1996, 226(3): 672-680

【非特許文献3】Younkin, S.G. 1995. Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 37: 287-288.; Matsuoka Y, Saito M, Lafrançois T, et al. Noval therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to  $\beta$ -amyloid[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(1): 1-5

【非特許文献4】Jarrett JT, Lansbury PT Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*. 1993, (6): 1055-1058

【非特許文献5】Chacon MA, Barria MI, Soto C, et al., Beta-sheet breaker peptide prevents beta-induced spatial memory impairments with partial reduction of amyloid deposits. *Mol. Psychiatry*. 2004, 9(10): 953-61

【発明の概要】

【0018】

本発明の目的の1つは、アミロイド(A $\beta_{1-42}$ )のモノマーに特異的に結合し、その標準空間的構造を安定させ、シートの形成を抑制し、可溶性アミロイドオリゴマーおよびアミロイド斑の形成を防止する事ができるポリペプチド提供する事である。また、前記ポリペプチドはA $\beta$ 原線維を分解できてもよい。前記ポリペプチドは、シート破壊ペプチドとも言われる。

【0019】

驚くべきことに、本発明の発明者らは、下記のアミノ酸配列を含むポリペプチドが、前述の目的を達成する事を見出した。

His-X1-X2-Leu-X3-Phe-Phe-X4-Glu-Aspにおいて、

X1は、リジン残基(Lys、K)またはグルタミン残基(Gln、Q)であり、

X2は、リジン残基(Lys、K)またはグルタミン残基(Gln、Q)であり、

X3は、バリン残基(Val、V)またはプロリン残基(Pro、P)であり、

X4は、アラニン残基(Ala、A)またはグルタミン酸残基(Glu、G)である。

【0020】

従って、本発明の第1の態様は、前述のアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する事

10

20

30

40

50

である。

【0021】

前記ポリペプチドは、アミロイド ( $A_{1-42}$ ) のモノマーに特異的に結合し、その標準空間的構造を安定させ、そのシートの形成を抑制し、可溶性アミロイドオリゴマーおよびアミロイド斑の形成を防止し、 $A_{1-42}$  原線維を分解できるため、ADの予防および/または治療に使用可能である。

【0022】

それゆえ、本発明の第2の態様は、ADの予防および/または治療用の薬剤の製造における、本発明のポリペプチドの使用を提供する事である。

【0023】

本発明の第3の態様は、本発明の1種類以上のポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する事である。

【0024】

本発明の第4の態様は、被検者に本発明のポリペプチドを有効量投与する事を含む、被検者のADの予防および/または治療方法を提供する事である。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1は、本発明のポリペプチドを調製するための方法の一例の工程および調製した生産物の試験結果を表す。図1Aは、本発明のポリペプチドH101を合成および精製するための方法の一例の基本工程を表す。図1Bは、H101のクロマトグラフィー結果を表す。図1Cは、H101の質量スペクトル結果を表す。

【図2】図2は、 $A_{1-42}$  ペプチドの凝集および原線維の形成のチオフラビンT蛍光分析の結果を表し、 $A_{1-42}$  凝集による蛍光強度における本発明のポリペプチドの効果を実証する。所定の濃度の $A_{1-42}$  ペプチドと本発明のペプチドH101、H102、またはH103、またはビタミンE (VE) もしくはL5を、37°Cで24時間インキュベートし、ThT蛍光強度を測定した。n = 5、 $A_{1-42}$  のグループと比較し、\*はP < 0.05を示す。

【図3】図3は、H102およびビタミンEによる $A_{1-42}$  の原線維形成の抑制の容量依存曲線を表す。それぞれ10  $\mu\text{mol/L}$ 、20  $\mu\text{mol/L}$ 、44.30  $\mu\text{mol/L}$ 、および100  $\mu\text{mol/L}$  の濃度のH102またはビタミンEを11.07  $\mu\text{mol/L}$  の $A_{1-42}$  ペプチドと37°Cで24時間インキュベートし、ThT蛍光強度を測定した。n = 5。

【図4】図4は、H102およびビタミンEによる $A_{1-42}$  の原線維形成の抑制の時間依存曲線を表す。44.30  $\mu\text{mol/L}$  の濃度のH102またはビタミンEを11.07  $\mu\text{mol/L}$  の $A_{1-42}$  ペプチドと37°Cでインキュベートし、12時間後、1日後、3日後、5日後、および7日後の時点でのThT蛍光強度を測定した。n = 5。

【図5】図5は、44.30  $\mu\text{mol/L}$  の異なるペプチドを11.07  $\mu\text{mol/L}$  の $A_{1-42}$  ペプチドと37°Cで5日間インキュベートした後の $A_{1-42}$  の原線維形成の電子顕微鏡法の結果を表す。図5Aは、 $A_{1-42}$  単独の5日間のインキュベーションによって得られた前記電子顕微鏡法の結果を表す。拡大率 = 35000倍。図5Bは、 $A_{1-42}$  単独の5日間のインキュベーションによって得られた前記電子顕微鏡法の結果を表す。拡大率 = 50000倍。図5Cは、 $A_{1-42}$  とL5ペプチドの5日間のインキュベーションによって得られた前記電子顕微鏡法の結果を表す。拡大率 = 35000倍。図5Dは、 $A_{1-42}$  とH101ペプチドの5日間のインキュベーションによって得られた前記電子顕微鏡法の結果を表す。拡大率 = 35000倍。図5Eは、 $A_{1-42}$  とH102ペプチドの5日間のインキュベーションによって得られた前記電子顕微鏡法の結果を表す。拡大率 = 35000倍。図5Fは、 $A_{1-42}$  とH103ペプチドの5日間のインキュベーションによって得られた前記電子顕微鏡法の結果を表す。拡大率 = 35000倍。

【図6】図6は、5  $\mu\text{mol/L}$  の $A_{1-42}$  ペプチドと72時間インキュベートした

10

20

30

40

50

ヒト神経芽細胞腫細胞SH-SY5Yの生存率に対する異なる濃度(10 μmol/L、20 μmol/L、および40 μmol/L)の各種ペプチドの効果を表す。n = 12、A<sub>1-42</sub>のグループと比較し、\*はP < 0.05を示す。

【図7】図7は、抗APP N末端抗体および抗A抗体を使用して、各種グループのマウスの海馬CA1領域におけるニューロンの切片を免疫組織化学染色した結果を表す。拡大率 = 400倍。図7Aは、抗APP N末端抗体を使用した、コントロールグループのマウスの免疫組織化学染色の結果を表す。図7Bは、抗A抗体を使用した、コントロールグループのマウスの免疫組織化学染色の結果を表す。図7Cは、抗APP N末端抗体を使用した、モデルグループのマウスの免疫組織化学染色の結果を表す。図7Dは、抗A抗体を使用した、モデルグループのマウスの免疫組織化学染色の結果を表す。図7Eは、抗APP N末端抗体を使用した、注射したグループのマウスの免疫組織化学染色の結果を表す。図7Fは、抗A抗体を使用した、注射したグループのマウスの免疫組織化学染色の結果を表す。

10

【図8】図8は、各種グループのマウスの側頭皮質および海馬をコンゴレッド染色した結果を表す。拡大率 = 400倍。図8Aは、コントロールグループのマウスの側頭皮質のコンゴレッド染色の結果を表す。図8Bは、コントロールグループのマウスの海馬のコンゴレッド染色の結果を表す。図8Cは、モデルグループのマウスの側頭皮質のコンゴレッド染色の結果を表す。図8Dは、モデルグループのマウスの海馬のコンゴレッド染色の結果を表す。図8Eは、注射したグループのマウスの側頭皮質のコンゴレッド染色の結果を表す。図8Fは、注射したグループのマウスの海馬のコンゴレッド染色の結果を表す。

20

【発明を実施するための形態】

【0026】

発明の詳細な説明

ここで、一連のポリペプチドのアミノ酸配列を開示する。アミノ酸残基が一文字または三文字で表わされる配列は、ポリペプチドのアミノ酸配列を、そのN末端(アミノ末端)からC末端(カルボキシ末端)まで示すという事が、当業者によって認識されている。例えば、ポリペプチドが“His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp”または“HQQLVFFAED”と示されている場合、このポリペプチドの配列は“N末端-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-C末端”、すなわち、“N末端-HQQLVFFAED-C末端”である事を意味する。

30

【0027】

本発明の第1の態様は、アミノ酸配列

His-X1-X2-Leu-X3-Phe-Phe-X4-Glu-Asp

を含むポリペプチドであって、

X1は、リジン残基(Lys、K)またはグルタミン残基(Gln、Q)であり、

X2は、リジン残基(Lys、K)またはグルタミン残基(Gln、Q)であり、

X3は、バリン残基(Val、V)またはプロリン残基(Pro、P)であり、

X4は、アラニン残基(Ala、A)またはグルタミン酸残基(Glu、G)であるポリペプチドを提供する事である。

40

【0028】

本発明のポリペプチドは、前述のアミノ酸配列を含んでもよく、実質的に前述のアミノ酸配列からなってもよく、あるいは、前述のアミノ酸配列からなってもよい。

【0029】

本発明の一実施形態において、本発明においてH101として設計される下記の配列を有するポリペプチドを提供する。

H101: His-Lys-Gln-Leu-Val-Phe-Phe-Glu-Glu-Asp(HKQLVFFEED)(配列番号:1)

。

【0030】

本発明の別の実施形態において、本発明においてH102として設計される下記の配列

50

を有するポリペプチドを提供する。

H 1 0 2: His-Lys-Gln-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu-Glu-Asp(HKQLPFFEED) (配列番号: 2)

【0031】

本発明の別の実施形態において、本発明においてH 1 0 3として設計される下記の配列を有するポリペプチドを提供する。

H 1 0 3: His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp(HQKLVFFAED) (配列番号: 3)

【0032】

一連のポリペプチドのアミノ酸配列を開示する。様々な修飾が本発明のポリペプチドになされ得るのは明らかである。前記修飾としては、制限されないが、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリンまたはトレオニン残基上のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジンの側鎖上のo-アミノ基のメチル化、N末端アミノのアセチル化が挙げられ、場合によっては、C末端カルボキシルのアミド化も挙げられる。当然の事ながら、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列に基づいてこれらの修飾を行う事は当業者にとって明らかであり、前記開示したアミノ酸配列を含むこれら修飾ポリペプチドは、本発明の範囲に包含される。

【0033】

本発明のこれらのポリペプチドは、シート破壊ペプチドとして機能する事ができる。本発明のポリペプチドは、アミロイド(A<sub>1-42</sub>)のモノマーに特異的に結合し、その標準空間的構造を安定させ、シートの形成を抑制し、可溶性アミロイドオリゴマーおよびアミロイド斑の形成を防止し、A<sub>β</sub>原線維を分解できるため、ADの予防および/または治療用の薬剤として使用可能である。

【0034】

それゆえ、本発明の他の態様は、ADの予防および/または治療用の薬剤の製造における、本発明のポリペプチドの使用を提供する事である。

【0035】

ここで使用される、「予防する」、「予防すること」、または「予防」という語は、被検者が疾患を患うリスクを軽減する事、または、疾患や関連症状の発症の時期を遅らせる事をいう。ここで使用される、「治療する」、「治療すること」、または「治療」という語は、必ずしも全治する事だけでなく、基礎疾患の症状を改善する事および/または前記症状を誘発し得る1種類以上の基礎細胞性、生理学的、または生化学的な原因またはメカニズムを低減する事をいう。当然の事ながら、ここでいう「改善する」は、病気の状態に関し、疾患の生理学的状態だけでなく分子パターンにも言及される。

【0036】

また、本発明の1種類以上のポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【0037】

ここで使用される「薬学的に許容される担体」という語は、生物学的に、または、他の側面において、いかなる好ましくない影響も起こさない物質をいう。すなわち、前記物質は、本発明のポリペプチドと共に被検者に投与でき、いかなる生理学的に好ましくない影響も起こさず、前記医薬組成物の他の成分と好ましくない相互作用も起こさない。有効成分の分解や被検者の副作用を最小限にするように前記担体を選択しなければならない事は、当業者にとって明白でありよく知られている。

【0038】

通常、本発明の医薬組成物は、少なくとも1つの本発明のポリペプチドおよび1種類以上の薬学的に許容される担体を含む。好適な担体としては、制限されないが、抗酸化剤、保存剤、着色剤、香料および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、充填剤、膨張性薬剤、緩衝剤、媒体、増量剤、賦形剤、および/または補助薬が挙げられる。例えば、好適な担体としては、生理食塩水、クエン酸塩緩衝剤、または人工脳脊髄液(CSF)、および従

10

20

30

40

50



来の非経口組成物に添加される場合があるその他の物質でもよい。担体は、例えば、中性緩衝生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水である。当業者であれば、本発明の前記組成物および投薬形態において使用できる、様々な緩衝剤を容易に決定することができる。代表的な緩衝剤としては、制限されないが、薬学的に許容される弱酸、弱塩基、またはそれらの組み合わせが挙げられる。前記緩衝成分は、好ましくは、リン酸、酒石酸、乳酸、コハク酸、クエン酸、酢酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、およびグルタミン酸などの水溶性物質、およびそれらの塩である。

#### 【0039】

前記担体における一次溶媒は、自然界において水性であっても非水性であってもよい。また、前記担体は、pH、透過性、粘性、透明性、色調および滅菌性、安定性、溶解率、または製剤の匂いを向上または保持するために使用する事ができる、その他の薬学的に許容される賦形剤であってもよい。本発明の医薬組成物は、更に、本発明のポリペプチドの放出率を向上または保持するために使用する事ができる他の薬学的に許容される担体を有する事ができる。そのような担体は、徐放性製剤を調製する事に熟練した者にとって既知である。

10

#### 【0040】

本発明の医薬組成物が製剤される時、それらは、溶液、懸濁液、ゲル、エマルション、固体、または脱水または凍結乾燥粉末の形で滅菌管に保存する事ができる。これらの製剤は、すぐに使用できる形、使用前にもどされる凍結乾燥粉末の形、または使用前に薄められる溶液の形で保存されてもよい。本発明の医薬組成物は、使用前は2~8で保存し、単回投与分を滅菌管の形で提供する事が好ましい。本発明の医薬組成物は、投与に先立って、前述のクエン酸塩緩衝剤のような好適な滅菌緩衝剤によって希釈できる。

20

#### 【0041】

被検者に本発明のポリペプチドを有効量投与する事を含む、被検者のADの予防および/または治療方法も提供する。

#### 【0042】

ここで使用される「有効量」という語は、使用される化合物の、疾患または関連症状の発症を防止、または疾患または状態の1つ以上の病因または症状を改善するのに有効な量をいう。前記改善とは、軽減または好転する場合も含み、必ずしも排除する事ではない。本発明のポリペプチドの予防および/または治療有効量は、個体や使用するポリペプチドに応じて変化させなければならない。使用するポリペプチドの予防および/または治療有効量は、固体の年齢、体形、体重、および状態等の多くの因子に応じて変化させなければならない。特定の被検者に対する本発明のポリペプチドの予防および/または治療有効量の決定は、当業者の知識の範囲内である。

30

#### 【0043】

本発明のポリペプチドまたは予防/治療方法がAD被検者に適用されると、被検者の脳組織におけるA蓄積の抑制、アミロイド斑の数および面積の低減、およびAD症状の好転といった有意な効果が見られる。例えば、それらは、活動性および注意力を向上させて反応時間を短縮し、発音、表情、姿勢、匂い、セクシュアリティ、性機能、および情動状態を向上させ、幸福な感情を引き起こすのに使用できる。本発明の他の実施形態において、本発明のポリペプチドは、AD患者に認識促進剤として適切に投与する事ができるため、特に認知症によってダメージを受けた学習能力が向上、または、認知機能低下および/または認知症が抑制される。

40

#### 【0044】

##### 本発明のポリペプチドの調製

本発明のポリペプチドは、当業者に知られているポリペプチドの調製方法によって調製する事ができる。

#### 【0045】

本発明のポリペプチドは、化学合成によって合成する事ができる。ポリペプチドの合成は溶液の中で行う事ができる。あるいは、固相合成を用いる事もできる。ポリペプチドの

50

固相合成方法としては、Fmoc固相合成およびtBoc固相合成が挙げられる。通常、ポリペプチドの合成方法は、ポリペプチドのC末端（カルボキシル末端）からN末端（アミノ末端）まで行われる。

【0046】

本発明の一実施形態において、本発明のポリペプチドは、Fmoc固相合成によって合成され、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって精製される。図1は、本発明のポリペプチドH101を調製および精製する本実施例の基本工程の一例ならびに調製したポリペプチドの試験結果を表す。本実施例において、ポリペプチドは、生産物精製の困難が大きく低減されるように、固相ポリペプチド合成機を用いて合成カラム上で合成される。副反応を最小限にするために、合成カラムおよび添加したアミノ酸の側鎖は保護される。C末端は遊離しており、反応前に活性化しなければならない。本発明のポリペプチドは、Fmoc固相合成によって合成され、調製用の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）カラムによって精製された後、質量分析（MS）によって同定することができる。当然の事ながら、本発明の全種類のポリペプチドは、前述の実施形態と同様に調製、精製、および同定することができる。

10

【0047】

本発明のポリペプチドは、組換え遺伝子操作によっても作成することができる。すなわち、本発明のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを、当技術分野で既知の方法を用いて、合成し、好適な宿主細胞に変換することができる。そして、変換したポリヌクレオチドを発現し、発現した生産物を精製または処理して本発明のポリペプチドを得ることができる。

20

【実施例】

【0048】

当業者が本発明をよりよく理解できるように、下記の実施例によって本発明を更に説明する。これらの実施例は例示であって、本発明を制限するものではない。関連する数値（例えば数や温度）の精度を保つための努力がなされてきた。しかし、当然の事ながら、誤差や偏差は起こり得る。他に指定のない限り、部数は重量部であり、温度は外気温または摂氏で表わされる温度であり、圧力は気圧と同等または近い圧力である。

【0049】

実施例1：本発明のポリペプチドの調製

30

本実施例において、本発明のポリペプチドH101を、まずFmocまたはtBu固相合成によって合成した。H101の配列は以下の通りである。

His-Lys-Gln-Leu-Val-Phe-Phe-Glu-Glu-Asp（配列番号：1）

【0050】

本実施例で使用される合成方法において、Fmoc-Asp(OtBu)-Wang Resin (0.37 mmol/g)、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-His(trt)-OH、Fmoc-Gln(trt)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、およびFmoc-Phe-OHを出発物質として使用した。

40

【0051】

本実施例で用いられる合成方法および精製方法の基本工程を図1Aに示す。

【0052】

図1Aに示される実施形態で使用されるTFA剤の製剤は[TFA：H<sub>2</sub>O：エチレンメルカプタン：フェノールが92.5：2.5：2.5：2.5（v/v）で混合]である。

【0053】

調製したペプチドの粗生成物をHPLCによって精製し、純度が95%より高い最終産物を産生した。HPLCの結果を図1Bに示す。

【0054】

上述のように調製および精製したポリペプチドH101を、質量分析（MS）によって

50

同定し、配列決定した。質量分析の結果を図1Cに示す。同定および配列決定の結果は、前述の方法で調製したポリペプチドが予測された配列および分子量を有する事を示した。

【0055】

そして、以下に記載の本発明のポリペプチドを、前述の方法と同様にして調製した。

H102: His-Lys-Gln-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu-Glu-Asp (配列番号: 2)

H103: His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp (配列番号: 3)

【0056】

これらのポリペプチドの配列決定および同定の結果は、本実施例に記載の合成方法および精製方法が、本発明の各種ポリペプチドに好適である事を証明している。前述の方法で調製したポリペプチドは、予測された配列および分子量を有する。また、前述の精製方法によって得られたポリペプチド産物の純度は95%より高い事もある。

10

【0057】

実施例2: アミロイドタンパク質に対する本発明のポリペプチドの効果

材料および方法

【0058】

1: 試薬

A<sub>1-42</sub> (純度 > 98%)、ビタミンE、チオフラビンT (ThT)、チアゾリルブルー (MTT)、およびジメチル・スルホキシド (DMSO) は、すべて、Sigma-Aldrich社製である。MEM培地、ウシ胎仔血清 (FBS)、およびトリプシンは、すべて、Gibco-BRL社製である。本発明のポリペプチドH101、H102、およびH103は、実施例1に記載のように調製した。また、ペントペプチドLeu-Pro-Phe-Phe-Aspは、実施例1と同様にして調製した。このペントペプチドは、Soto-Jaraらによって発明され、ここでL5として設計されるシート破壊ペプチドiAbeta5と同じ配列を有する。ペントペプチドL5を、本実施例および以下の実施例において、コントロールとして使用した。これらのポリペプチドは、全て、GL Biochem社 (上海) によって合成し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって精製し、純度 > 95%で質量分析 (MS) によって同定した。

20

【0059】

2. チオフラビンT (ThT) 蛍光分析および電子顕微鏡法

ThT蛍光強度がA凝集の程度を反映する事ができるため、チオフラビンT (ThT) 蛍光分析が、A凝集を分析するために用いられた。ビタミンE (VE) が、A凝集および原線維形成を効果的に抑制する事ができたとの報告があったため、ビタミンEを、この研究における陽性のコントロールとして使用した。A<sub>1-42</sub>凍結乾燥粉末を、50 mmol/LのPBS (pH 7.4) の中で製剤し、22.15 μmol/Lの濃度の溶液を得た。前記4種類のポリペプチド (H101、H102、H103、およびL5) も50 mmol/LのPBS (pH 7.4) で製剤し、88.61 μmol/Lの濃度の溶液を得た。ビタミンEを、0.2%のTween-80を含むPBSの中で製剤し、88.61 μmol/Lの濃度のエマルジョンを得た。実験において、最終濃度がそれぞれ11.07 μmol/Lおよび44.30 μmol/Lとなるように、A<sub>1-42</sub>ペプチドの溶液を、各ポリペプチドの溶液と等容積で混合した。A<sub>1-42</sub>ペプチドの溶液を、ビタミンEエマルジョンと等容積で混合し、陽性コントロールとして使用した。そして、A<sub>1-42</sub>を単独で含む溶液を陰性コントロールとして使用した。各溶液を37で24時間インキュベートし、其々から10 μlを取り出して3.0 μmol/LのThTリン酸緩衝液990 μlに加えた。ThT蛍光強度は、励起波長453 nmおよび発光波長478 ~ 486 nmで測定した。

30

40

【0060】

3. A<sub>1-42</sub>に対する本発明のポリペプチドの容量効果および時間効果の関係

ポリペプチドH102を前述のPBSの中で製剤して一連の濃度を得た。そして、前記溶液に、11.07 μmol/Lの濃度になるまでA<sub>1-42</sub>を加えた。A<sub>1-42</sub>に対する本発明のポリペプチドの容量効果関係を判定するために、得られた溶液を、37

50

で24時間インキュベートし、サンプルを取得してThT蛍光強度を測定した。44.30  $\mu\text{mol/L}$ のH102と11.07  $\mu\text{mol/L}$ のA<sub>1-42</sub>を含む溶液、または44.30  $\mu\text{mol/L}$ のビタミンEと11.07  $\mu\text{mol/L}$ のA<sub>1-42</sub>を含む溶液を、それぞれ37℃でインキュベートした。A<sub>1-42</sub>に対する各種ポリペプチドの時間効果関係を判定するために、サンプルを取得して、インキュベーションの12時間後(12h)、1日後(1d)、3日後(3d)、5日後(5d)、および7日後(7d)のThT蛍光強度を測定した。一方、A<sub>1-42</sub>ペプチドを単独で含む溶液をインキュベートし、陰性コントロールとして使用した。

#### 【0061】

##### 4. 電子顕微鏡法

原線維形成を更に調査するために、44.30  $\mu\text{mol/L}$ の各種ポリペプチドと11.07  $\mu\text{mol/L}$ のA<sub>1-42</sub>を含む溶液を、それぞれ37℃で5日間インキュベートした。サンプル5  $\mu\text{l}$ を各グループから取り出して、カーボン支持膜を張った300メッシュの脱イオン銅線網に滴下し、室温で15分間静置した。前記サンプルを、2%の酢酸ウラニルを用いて暗所で2分間ネガティブ染色した。乾燥後、前記サンプルを、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。一方、A<sub>1-42</sub>ペプチドを単独で含む溶液を5日間インキュベートし、陰性コントロールとして使用した。

#### 【0062】

##### 5. 細胞毒性試験

首都医科大学のXuanwu病院から入手し、37℃の5%CO<sub>2</sub>の恒温器において、従来の方法によってMEM培地(10%(v/v)のウシ胎仔血清が補充されている)で培養した、一般的な株化細胞であるヒト神経芽細胞腫SH-SY5Yを、毒性試験において使用した。株化細胞を、5日に1回継代培養した。SH-SY5Y細胞が対数期において安定して成長すると、前記細胞を、培地200  $\mu\text{l}$ がウェル毎に添加された1.0  $\times 10^4$  / mlの密度の96ウェルプレート(Costar社製)に接種した。24時間後、前記培地を無血清培地と交換し、5  $\mu\text{mol/L}$ の濃度となるまでA<sub>1-42</sub>を加えた。前記ウェルを、いくつかのグループに分類した。前述の4種のポリペプチド(H101、H102、H103、およびL5)を、各グループの培地に、それぞれ、10  $\mu\text{mol/L}$ 、20  $\mu\text{mol/L}$ 、および40  $\mu\text{mol/L}$ の濃度となるように加えた。A<sub>1-42</sub>およびポリペプチドを加えずに無血清培地を単独で加えた細胞グループを陽性コントロールとして使用し、前述のポリペプチドを加えずにA<sub>1-42</sub>ペプチドを加えた細胞グループを陰性コントロールとして使用した。前記ポリペプチドの添加の72時間後、各ウェルに、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド(MTT)(5 mg/ml)を20  $\mu\text{l}$ 加え、プレートを37℃で4時間インキュベートした。その後、最初の培地を処分し、各ウェルにDMSOを200  $\mu\text{l}$ 加えた。プレートを10分間静置してから1分間振動させ、ホルマザン粒子を完全に溶解した。その後、492 nmにおける光学濃度(OD)を、自動マイクロプレートリーダーを用いて測定した。

#### 【0063】

##### 6. 統計分析

2グループ間のデータ比較にはt検定法を用い、3グループ以上のデータ比較にはF検定法を用いた。

#### 【0064】

##### 結果

1. A<sub>1-42</sub>凝集および原線維形成に対する各種試験済みのポリペプチドの抑制作用

ThT蛍光分析を用いて、A<sub>1-42</sub>凝集および原線維形成に対する各種ポリペプチドおよびビタミンEの効果を評価した。PBS溶液中のA<sub>1-42</sub>単体が、極めて高い蛍光強度を生じる事ができた事は、A<sub>1-42</sub>が自己凝集してA<sub>1-42</sub>原線維を形成できる事を示す。試験ポリペプチドまたはビタミンEを含まず、A<sub>1-42</sub>を単独で含む陰性

10

20

30

40

50

コントロール溶液から得られる蛍光強度を、100%に規準化した。A<sub>1-42</sub>凝集および原線維形成に対する各種試験済みのポリペプチドの抑制率を計算した(%)。結果を表1に示す。(ここで、表1に示すデータは、器材システムそのものによって生じたバックグラウンド蛍光を差し引いてある)

【0065】

【表1】

A $\beta$ 凝集に対する各種ポリペプチドの抑制作用 (%)

試験済みポリペプチド	L5	H101	H102	H103	ビタミンE
抑制率 (%)	25.74	24.79	27.84	14.91	24.85

10

【0066】

表1に示すように、H102は、A<sub>1-42</sub>凝集に対して最も高い抑制作用を示し、次いで、L5、ビタミンE、H101、H103となった。

【0067】

表1に示す結果を、図2に示すヒストグラムにプロットした。

【0068】

図2に示すように、H102はA<sub>1-42</sub>凝集および原線維形成を著しく抑制することができ、また、ビタミンEも、A<sub>1-42</sub>とインキュベートされると、A<sub>1-42</sub>凝集および原線維形成を著しく抑制することができる。しかしながら、ビタミンEの効果はH102よりも低い。

20

【0069】

2. A<sub>1-42</sub>に対する本発明のポリペプチドの容量効果関係

図3は、さまざまな濃度のH102またはビタミンEと11.07  $\mu\text{mol/L}$ のA<sub>1-42</sub>ペプチドをインキュベート(37°Cで24時間)して得られたThT蛍光分析の結果を表す。図3に示すように、A<sub>1-42</sub>原線維形成に対するH102およびビタミンEの効果は用量依存し、全ての濃度においてH102の抑制率はビタミンEを上回った。また、H102およびビタミンEのもっとも効果的な濃度は約20  $\mu\text{mol/L}$ である。

【0070】

3. A<sub>1-42</sub>に対する本発明のポリペプチドの時間効果関係

図4は、H102またはビタミンEと11.07  $\mu\text{mol/L}$ のA<sub>1-42</sub>ペプチドをさまざまな期間インキュベートして得られたThT蛍光分析の結果を表す。図4に示すように、11.07  $\mu\text{mol/L}$ のA<sub>1-42</sub>ペプチドを単独でインキュベートした場合、得られる蛍光強度は最初の24時間は低く、3日目に急増し、その後はほぼ横ばいである。H102およびビタミンEのグループから得られる蛍光強度は、各時点で著しく低く、最も効果的な結果はH102処理したグループにみられる。曲線の変化は、蛍光強度がピークの半分に達するT<sub>1/2</sub>時点に特徴づけられ、A<sub>1-42</sub>単独のグループのT<sub>1/2</sub>は3日目に現れ、H102およびビタミンEのグループのT<sub>1/2</sub>は4日目と遅れる。

30

【0071】

4. 電子顕微鏡法の結果

図5は、44.30  $\mu\text{mol/L}$ の各種ペプチドを、それぞれ11.07  $\mu\text{mol/L}$ のA<sub>1-42</sub>ペプチドと37°Cで5日間インキュベートして得られたA<sub>1-42</sub>ペプチド原線維形成の電子顕微鏡法の結果を表す。図示のように、A<sub>1-42</sub>を単独で5日間インキュベートした場合、直径約8~10 nm且つ長さ約0.5~5  $\mu\text{m}$ の大量のA<sub>1-42</sub>原線維が形成される。前記原線維は、枝を有し、ネットワーク状に織り込まれてさえいるブリックタイプ結晶に凝集され、凝集状態で少量の非晶構造が点在している(図5Aおよび図5B。コントロールグループ)。A<sub>1-42</sub>をL5と5日間インキュベートした場合、形成されるA<sub>1-42</sub>原線維はより細くなり、直径は約4~8 nmで長さは0.3~5  $\mu\text{m}$ となる。前記原線維はネットワーク状に織り込まれ、凝集状態で極少量の非晶構造が点在している(図

40

50

5 C)。A を H 1 0 1 と 5 日間インキュベートした場合、形成される A 原線維の直径は約 5 ~ 8 nm で長さは 0 . 5 ~ 5 μ m となる。前記原線維は枝を有するネットワーク状に織り込まれ、凝集状態で極少量の非晶構造が点在している (図 5 D)。A を H 1 0 2 と 5 日間インキュベートした場合、形成される A 原線維はより少なく且つより細くなり、直径は約 3 ~ 6 nm で長さは 0 . 3 ~ 3 μ m となる。前記原線維はネットワーク状に織り込まれ、凝集状態で極少量の非晶構造が点在している (図 5 E)。A を H 1 0 3 と 5 日間インキュベートした場合、直径約 5 ~ 8 nm 且つ長さ約 0 . 5 ~ 5 μ m の A 原線維が形成される。前記原線維はブリックタイプの結晶体に凝集され、ネットワーク状に織り込まれ、凝集状態で少量の非晶構造が点在している (図 5 F)。

#### 【 0 0 7 2 】

5 . S H - S Y 5 Y 細胞の生存率に対する本発明のポリペプチドの効果

図 6 は、5 μ m o l / L の A<sub>1-42</sub> ペプチドと 7 2 時間インキュベートしたヒト神経芽細胞腫細胞 S H - S Y 5 Y の生存率に対する異なる濃度 ( 1 0 μ m o l / L 、 2 0 μ m o l / L 、 および 4 0 μ m o l / L ) の各種ペプチドの効果を表す。n = 1 2 、 A<sub>1-42</sub> のグループと比較し、\* は P < 0 . 0 5 を示す。

#### 【 0 0 7 3 】

図 6 に示すように、A<sub>1-42</sub> と 7 2 時間インキュベートした後、S H - S Y 5 Y 細胞の生存率は減少する。A<sub>1-42</sub> を含有する培養液に異なる濃度 ( 1 0 μ m o l / L 、 2 0 μ m o l / L 、 および 4 0 μ m o l / L ) の 4 種類のペプチドを添加すると、細胞の生存率は向上し、その効果は用量依存性がある。これらの結果は、細胞の生存率の向上には H 1 0 2 が最も効果的であり、その最良の濃度が 2 0 μ m o l / L である事を証明している。

#### 【 0 0 7 4 】

実施例 3 : A P P 遺伝子導入マウスの脳における アミロイド ( A ) および アミロイド前駆体タンパク質 ( A P P ) の遺伝子発現に対する H 1 0 2 の効果

材料および方法

#### 【 0 0 7 5 】

実験動物

9 ヶ月の A P P 6 9 5 遺伝子導入マウス 3 0 匹と、遺伝的背景および月齢が適合する C 5 7 B L / 6 J マウス 1 0 匹を、中国医学科学院の北京協和医学院の実験動物研究センターから調達した。

#### 【 0 0 7 6 】

試薬

抗 A<sub>1-42</sub> 抗体を C h e m i c o n 社 ( 米国 ) から調達した。抗 A P P 抗体、すぐに使用できる S A B C 免疫組織化学染色キット、D B A 発色キット、およびコンゴレッドを W u h a n B o s t e r B i o l o g i c a l T e c h n o l o g y 社から調達した。他の試薬としては、分析用純度を有する従来試薬を用いた。ポリペプチド H 1 0 2 は、実施例 1 に記載のように合成、精製、および同定され、本実験で使用するために生理食塩水中で 4 0 μ m o l / L に製剤された。

#### 【 0 0 7 7 】

動物のグループ分けおよびモデルの作成

A P P 6 9 5 遺伝子導入マウス 3 0 匹を、1 5 匹のモデルグループと 1 5 匹のポリペプチド注射グループに無作為に分類した。C 5 7 B L / 6 J マウス 1 0 匹を通常のコントロールグループとして用いた。ポリペプチド注射グループでは、前記動物は、毎回、4 0 μ m o l / L の H 1 0 2 を含む生理食塩水 3 μ l を脳室内注入された。コントロールグループとモデルグループでは、前記動物は、毎回、生理食塩水 3 μ l を脳室内注入された。前記注射は 1 0 日間毎日行われた。全ての動物は、天津医科大学の実験動物研究センターの S P F マウスルームで同条件の下で保管された。

#### 【 0 0 7 8 】

前記動物に、投与量 4 0 0 m g / K g の 1 0 % の抱水クロールを用いて、腹腔内麻酔

10

20

30

40

50

した。前記動物を、脳定位固定枠に固定して毛を切った。A n e r d i a nで消毒した後、頭部正中線に沿って皮膚を約1 cm切開した。骨マークを露出させるように骨膜をはがした。プレグマとラムダが同じ高さになるように、マウスの皿頭を調製した。G e o r g e ' s b r a i n s t e r e o t a c t i c a t l a sに従って、針を入れるための1 mmの開口部を頭蓋骨の側脳室 ( P <sub>0</sub> . . 5 8、R <sub>1</sub>、H <sub>1</sub> . . 5 ) に形成した。手術後2日目から注射を開始した。小動物用の脳定位固定装置を用い、ポリペプチド溶液または生理食塩水3 μ lを、微量注入器によってゆっくりと着実に側脳室に注入した。注入終了時に、針をその位置に1分間置いた後、ゆっくりと引き抜いた。注射した箇所を圧迫止血した。前記注射は10日間毎日行われた。

#### 【0079】

マウスの海馬のパラフィン切片の作成

各グループの動物に10日間脳室内注入した後、投与量4 mL / Kgの0.1 kg / Lの抱水クロラルを用いて、腹腔内麻酔した。左心室を介して迅速な挿管を行った。一方、右心房を切開し、生理食塩水を迅速に注入した。肝臓が白くなった場合は、代わりに40 g / Lのパラホルムアルデヒドを、マウスの四肢が硬化するまで、最初は早く、その後はゆっくりと注入した。脳を取り出し、30%のショ糖を含むパラホルムアルデヒド溶液に迅速に入れ、2~4日間固定した。脳組織が沈み込んだ後、パラフィンに包埋した。マウスの脳を矢状面にそってスライスした。海馬CA1領域が露出すると、引き続きスライスし、10切片毎に1回サンプルを取り出した。各マウスについて、各抗体用に5 μ mの厚みの切片を3つずつ取り出した。

#### 【0080】

免疫組織化学染色

免疫組織化学検査キットの説明書に従って、A およびA P Pに対して免疫組織化学染色を行った。第一抗体の希釈度は、それぞれ、1 : 100および1 : 200、第二抗体の希釈度は、1 : 100とした。染色した切片を、400倍の拡大率で観察および撮像した。

#### 【0081】

マウス脳切片のコンゴレッド染色

パラフィンに包埋した切片を、水・エタノール混合物に浸漬し、脱脂した(グラジエント:エタノール・水 水)。脱脂した切片を、10%のパラホルムアルデヒド溶液に15分間浸漬し、コンゴレッド染色溶液に15分間直接浸漬した。その後、前記切片を水で4分間洗浄し、ヘマトキシリン溶液に2分間浸漬し、水で洗浄し、そして0.5%の塩酸エタノール溶液に浸漬して分化した。前記切片を、青色を示すまで水で完全に洗浄し、エタノールで脱水した。その後、キシレンで透明にし、中性のガムで固定した。最終的に、染色した切片を、400倍の拡大率で観察および撮像した。

#### 【0082】

結果

1. 抗A P P N末端抗体および抗A 抗体による免疫組織化学染色

図7は、抗A P P N末端抗体および抗A 抗体により、各グループの動物の海馬CA1ニューロンの切片を免疫組織化学染色した結果を表す。

#### 【0083】

図7に示すように、抗A P P N末端抗体および抗A 抗体による免疫組織化学染色の結果は以下の事を示す。(1)コントロールグループの海馬CA1ニューロンの染色は、陰性または弱陽性である(図7Aおよび図7B)。(2)コントロールグループと比較して、モデルグループのサンプルの陽性細胞の数は多く、発現は増加し、染色はより濃い(図7Cおよび図7D)。(3)モデルグループと比較して、ポリペプチド注射グループの陽性細胞の数は少なく、発現は減少し、染色は薄い(図7Eおよび図7F)。

#### 【0084】

2. コンゴレッド染色

マウスの脳の病理切片をコンゴレッドで染色し、マウスの側頭皮質および海馬におけ

10

20

30

40

50

るアミロイド斑の状態を観察した。結果を図 8 に示す。

【 0 0 8 5 】

図 8 は以下の事を示す。( 1 ) コントロールグループのマウスの側頭皮質 ( 図 8 A ) および海馬 ( 図 8 B ) には陽性アミロイド斑は観察されない。( 2 ) モデルグループのマウスの側頭皮質 ( 図 8 C ) および海馬 ( 図 8 D ) には大小の薄赤色のクランピングアミロイド斑が観察され、そのうちのほとんどは円形または楕円形で不均等分布され、大体がニューロンで囲まれている。( 3 ) ポリペプチド注射グループのマウスの側頭皮質 ( 図 8 E ) および海馬 ( 図 8 F ) にも、いくつかのクランピングアミロイド斑が観察されるが、その数はモデルグループよりも明らかに少ない。

【 0 0 8 6 】

結論

免疫組織化学染色は、モデルマウスの脳 C A 1 領域における A<sub>1-42</sub> 陽性細胞の量が、通常のコントロールグループよりもはるかに多い事を示す。ところが、H 1 0 2 ポリペプチド注射グループにおける A<sub>1-42</sub> 陽性細胞の量は、モデルグループよりもはるかに少ない。そのため、H 1 0 2 が、A 凝集を抑制し、生体内における A の毒性を低減する事ができると推測される。さらに、コンゴレッド染色は、アミロイド斑が遺伝子導入マウスの脳においてはっきりと形成され、通常のコントロールマウスには形成されないが、H 1 0 2 ポリペプチド注射マウスに形成されるアミロイド斑は、遺伝子導入グループよりも少なく、面積も小さい事を示す。これらの結果は、H 1 0 2 が A の発生を低減し、その凝集を抑制することができる事を裏付ける。

【 0 0 8 7 】

本発明において様々な文献を引用しているが、本発明が関係する最先端技術を詳細に記述するために、その全てをここに本明細書の一部を構成するものとして援用する。

【 0 0 8 8 】

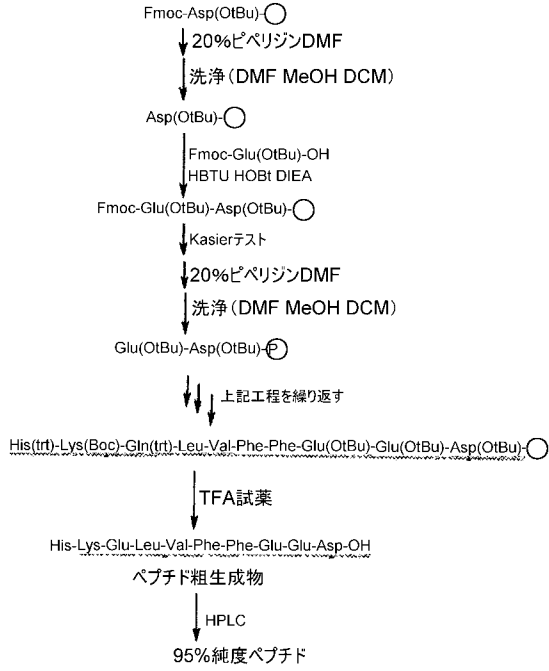
本発明の様々な改良および変更が、本発明の範囲および精神から逸脱することなく実施できることは、当業者にとって明らかである。本発明の他の実施形態は、ここに開示される記載と実施例を考慮する事により、当業者にとって明らかである。ここに開示される記載および実施例はあくまで例示であって、本発明の実際の範囲および精神は添付の請求項によって決定される。

10

20



【 図 1 A 】



【 図 1 B 】

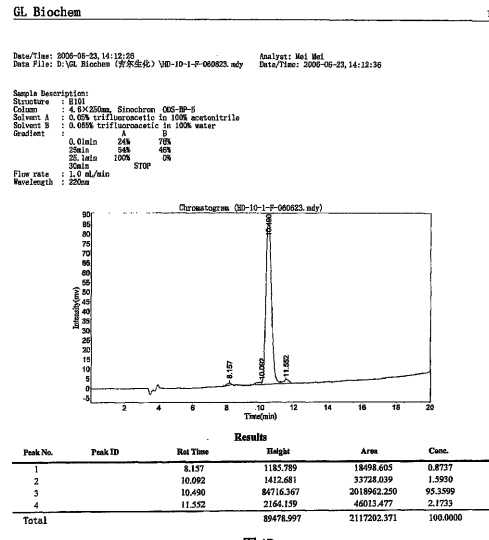


図 1B

【 図 1 C 】

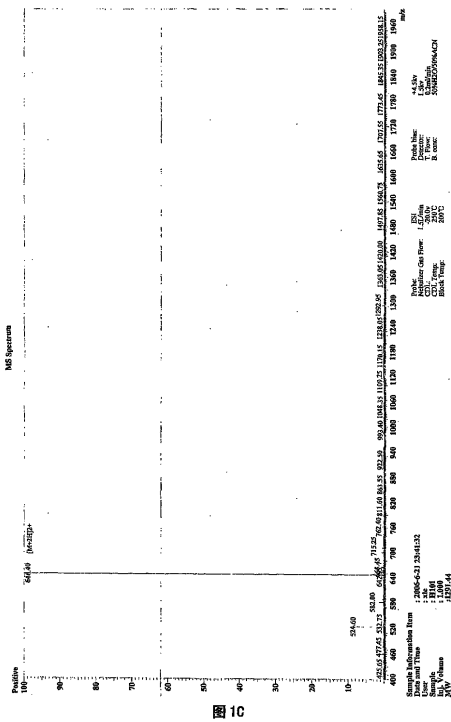
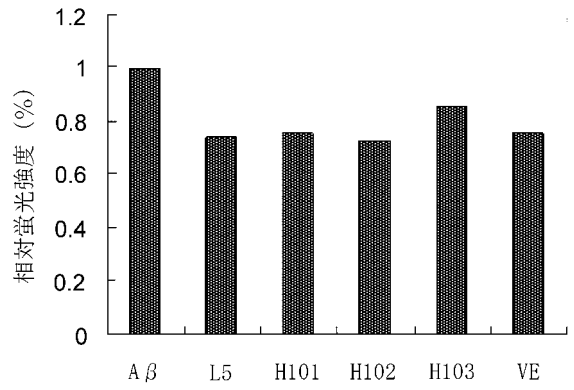
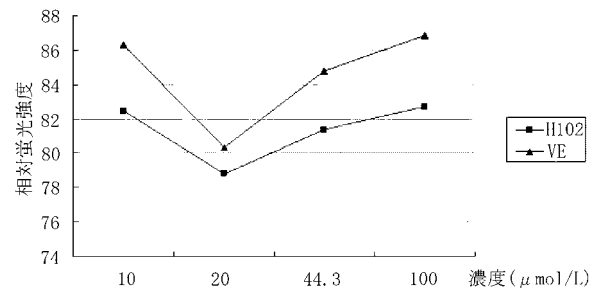


図 1C

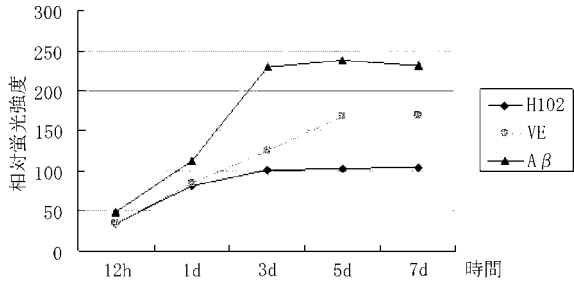
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 A 】

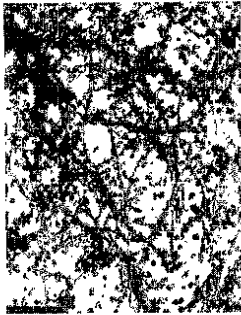


图 5A

【 図 5 B 】

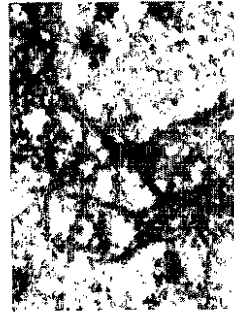


图 5B

【 図 5 C 】

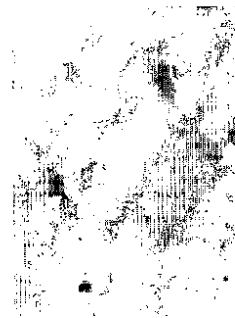


图 5C

【 図 5 D 】

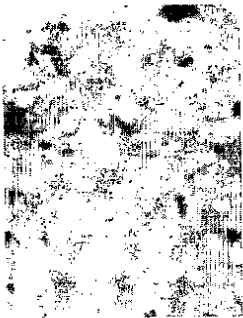


图 5D

【 図 5 F 】



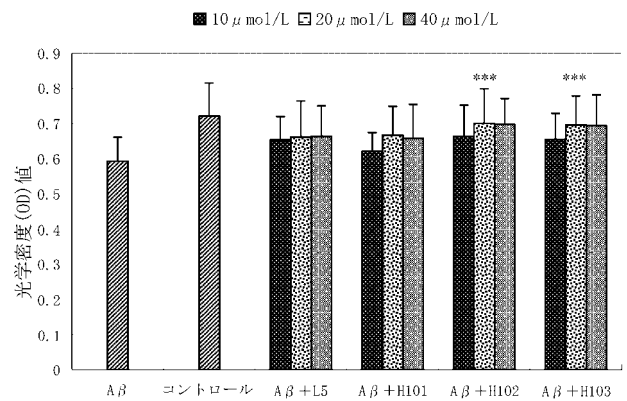
图 5F

【 図 5 E 】



图 5E

【 図 6 】



【图 7 A】

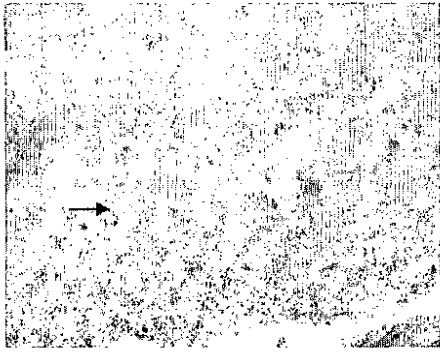


图 7A

【图 7 B】

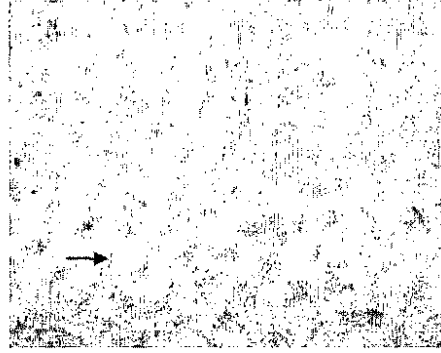


图 7B

【图 7 C】

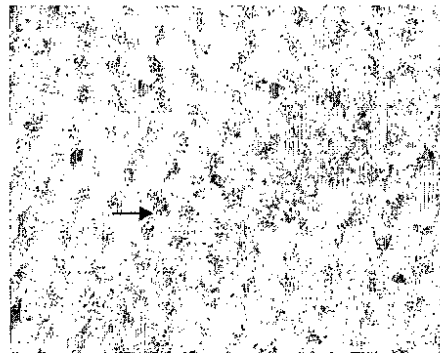


图 7C

【图 7 D】

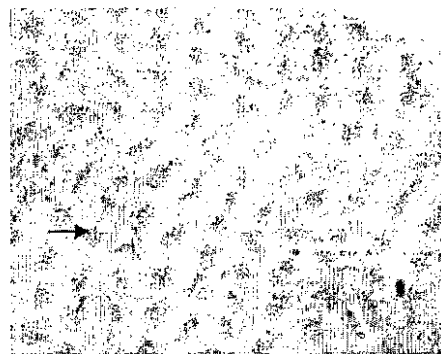


图 7D

【图 7 E】

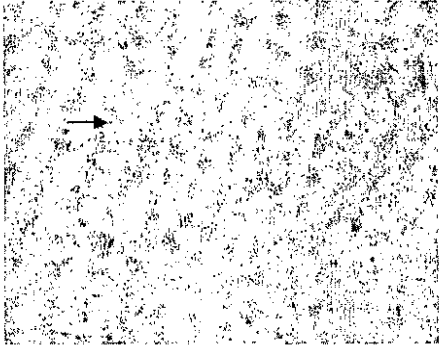


图 7E

【图 7 F】

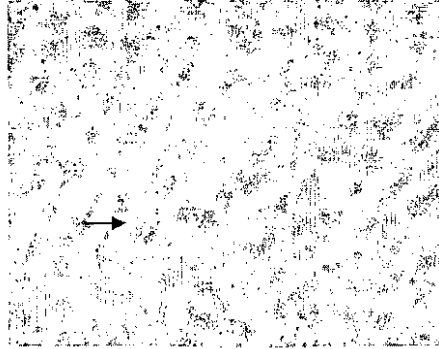


图 7F

【图 8 A】

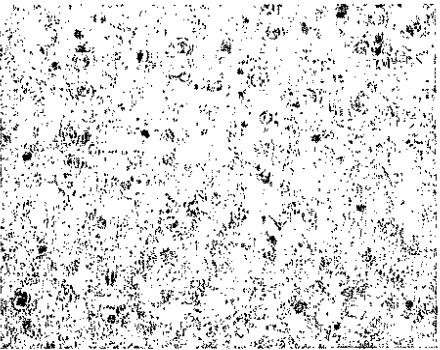


图 8A

【图 8 B】

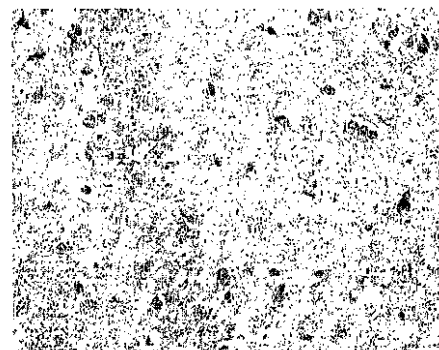


图 8B

【 图 8 C 】

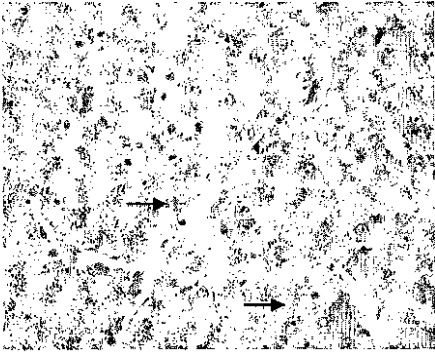


图 8C

【 图 8 D 】

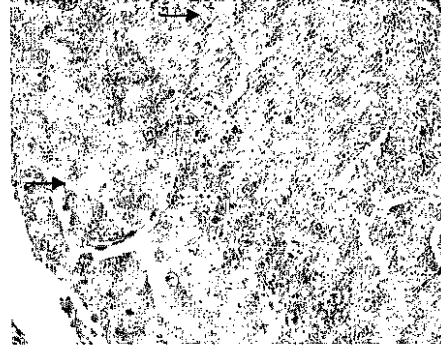


图 8D

【 图 8 E 】

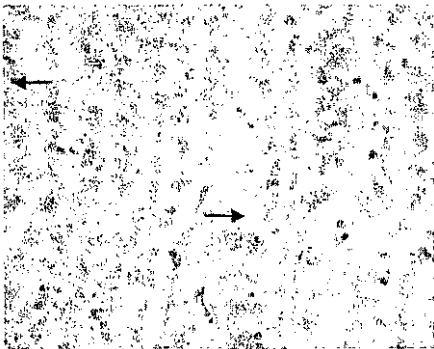


图 8E

【 图 8 F 】

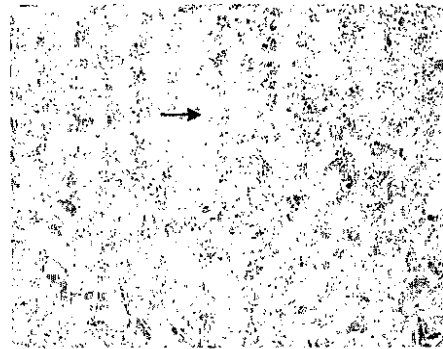


图 8F

## 【配列表】

201151344000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成23年1月17日(2011.1.17)

## 【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】

アミノ酸配列

His-X1-X2-Leu-X3-Phe-Phe-X4-Glu-Asp

を含むポリペプチドであって、

X1は、リジン残基(Lys、K)またはグルタミン残基(Gln、Q)であり、

X2は、リジン残基(Lys、K)またはグルタミン残基(Gln、Q)であり、

X3は、バリン残基(Val、V)またはプロリン残基(Pro、P)であり、

X4は、アラニン残基(Ala、A)またはグルタミン酸残基(Glu、G)であり、

アミノ酸配列

His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp(配列番号：3)

を含まないポリペプチド。

【請求項2】

前記ポリペプチドが、アミノ酸配列

His-X1-X2-Leu-X3-Phe-Phe-X4-Glu-Asp

を有し、

X1は、リジン残基(Lys、K)またはグルタミン残基(Gln、Q)であり、

X2は、リジン残基(Lys、K)またはグルタミン残基(Gln、Q)であり、

X3は、バリン残基(Val、V)またはプロリン残基(Pro、P)であり、

X4は、アラニン残基(Ala、A)またはグルタミン酸残基(Glu、G)であり、

アミノ酸配列

His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp(配列番号：3)

を有さない

請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】

前記ポリペプチドが、

His-Lys-Gln-Leu-Val-Phe-Phe-Glu-Glu-Asp(配列番号：1)および

His-Lys-Gln-Leu-Pro-Phe-Phe-Glu-Glu-Asp(配列番号：2)

の群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項2記載のポリペプチド。

【請求項4】

アルツハイマー病の予防および/または治療用の薬剤の製造における、請求項1から3のいずれか一項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項5】

請求項1から3のいずれか一項に記載の1種類以上のポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

## 【 国际调查报告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/CN2008/000497
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>See Extra Sheet</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C07K; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNPAT; CNKI; WPI; PAJ; EPODOC; ISI Web of Knowledge; ELSEVIER; EMBASE and keywords: amyloid, Alzheimer, inhibit, prevent, HQKLVFFAED, HKQLPFFFEED, HKQLVFFFEED, KLVFF and the like;		
EBI-EMBL: SEQ ID Nos: 1-3, H[KQ][KQ]L[VP]FF[AG]ED		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US6905686B1 (ATHENA NEUROSCIENCES INC ETAL) 14 Jun. 2005 (14.06.2005) see abstract, column 6, lines 5-21, column 10, lines 1-41, column 20, lines 15-56 of the description, figures 19-20 and claim 10	1-5
<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” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
“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” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family	
“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 01 Dec. 2008 (01.12.2008)	Date of mailing of the international search report <b>25 Dec. 2008 (25.12.2008)</b>	
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer <b>ZHOU, Xia</b> Telephone No. (86-10)62411098	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2008/000497

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TIERNBERG L. O. et al., a molecular model of Alzheimer amyloid $\beta$ -peptide fibril formation, <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , April 20, 1999, vol.274, No.18, pages 12619-12625, see abstract and figure 4	1-3
X	US6582945B1 (BOSTON BIOMEDICAL RES INST) 24 Jun. 2003 (24.06.2003), see abstract, SEQ ID NO:3 and 5	1-5
A	US6022859A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 08 Feb. 2000 (08.02.2000), see abstract and table 1	1-5
A	AUSTEN B. M. et al., designing peptide inhibitors for oligomerization and toxicity of Alzheimer's $\beta$ -amyloid peptide, <i>Biochemistry</i> , February 19, 2008, vol. 47, pages 1984-1992, see the whole text	1-5



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2008/000497

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 6

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 6 is directed to methods for treatment of the human or animal body.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2008/000497

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US6905686B1	14.06.2005	WO9927944A1	10.06.1999
		AU1706199A	16.06.1999
		ZA9810932A	29.09.1999
		EP1033996A1	13.09.2000
		NO20002784A	31.07.2000
		BRPI9815357A	24.10.2000
		CZ20001706A3	15.11.2000
		CN1281366A	24.01.2001
		HU0100627A2	28.06.2001
		KR20010032635A	25.04.2001
		JP2002502802T	29.01.2002
		MXPA00005426A	01.02.2002
		US6710226B1	23.03.2004
		US2004081657A1	29.04.2004
		US6743427B1	01.06.2004
		US6750324B1	15.06.2004
		US6761888B1	13.07.2004
		US2004157779A1	12.08.2004
		AU2003203740A1	12.06.2003
		US2004166119A1	26.08.2004
		US2004170641A1	02.09.2004
		US2004175394A1	09.09.2004
		US6787138B1	07.09.2004
		US6787139B1	07.09.2004
		US6787140B1	07.09.2004
		US6787143B1	07.09.2004
		US6787144B1	07.09.2004
		US6787523B1	07.09.2004
US6787637B1	07.09.2004		
US6808712B2	26.10.2004		

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2007)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2008/000497

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		US2004219146A1	04.11.2004
		US6818218B2	16.11.2004
		US2004228865A1	18.11.2004
		US2004247590A1	09.12.2004
		US2004247591A1	09.12.2004
		US2004265301A1	30.12.2004
		US2004265308A1	30.12.2004
		US2005019328A1	27.01.2005
		US2005019330A1	27.01.2005
		US2005019343A1	27.01.2005
		US2005013815A1	20.01.2005
		US2005031629A1	10.02.2005
		NZ504569A	28.01.2005
		US2005037026A1	17.02.2005
		US2005048049A1	03.03.2005
		US2005053614A1	10.03.2005
		US6866849B2	15.03.2005
		US6866850B2	15.03.2005
		US2005059591A1	17.03.2005
		US2005059802A1	17.03.2005
		US2005123544A1	09.06.2005
		SG111083A1	30.05.2005
		US2005142132A1	30.06.2005
		US2005158304A1	21.07.2005
		US2005163788A1	28.07.2005
		US2005191292A1	01.09.2005
		US2005191314A1	01.09.2005
		US6946135B2	20.09.2005
		US6962707B2	08.11.2005
		US2005249727A1	10.11.2005

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2007)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2008/000497

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		US2005255122A1	17.11.2005
		US6972127B2	06.12.2005
		US6982084B2	03.01.2006
		US2006029611A1	09.02.2006
		US2006034858A1	16.02.2006
		US7014855B2	21.03.2006
		JP2006077030A	23.03.2006
		JP2006131639A	25.05.2006
		US2006121038A9	08.06.2006
		EP1679080A2	12.07.2006
		EP1690547A1	16.08.2006
		TW239847B1	21.09.2005
		ES2262460T1	01.12.2006
		AU2006202899A1	27.07.2006
		ES2263408T1	16.12.2006
		US2008096818A1	24.04.2008
		CN101116746A	06.02.2008
		CN100374151C	12.03.2008
		EP1033996B1	25.06.2008
		INDEL200800484A	16.05.2008
		DE69839647E	07.08.2008
		US2008227718A1	18.09.2008
		US2008227719A1	18.09.2008
US6582945B1	24.06.2003	WO0077178A1	21.12.2000
		AU5742100A	02.01.2001
		US2002102261A1	01.08.2002
		US2002136718A1	26.09.2002
		JP2003506321T	18.02.2003
		US2003235897A1	25.12.2003

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2008/000497

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		EP1409654A1	21.04.2004
		US6872554B2	29.03.2005
		AU780474B2	24.03.2005
		AU2005201687A1	12.05.2005
		US2005147613A1	07.07.2005
		US2006228371A1	12.10.2006
		AU2005201687B2	28.09.2006
		EP1409654B1	20.08.2008
		US7413884B2	19.08.2008
US6022859A	08.02.2000	None	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2008/000497

Continuation of: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/47 (2006.01) i

A61K38/17 (2006.01) i

A61P25/28 (2006.01) i

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2008/000497
<b>A. 主题的分类</b>		
见附加页		
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
<b>B. 检索领域</b>		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C07K; A61K; A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNPAT; CNKI 和关键词: $\beta$ 淀粉样肽, 阿尔茨海默, 阻断, 抑制等;		
WPI; PAJ; EPODOC; ISI Web of Knowledge; ELSEVIER; EMBASE 和关键词: amyloid, Alzheimer, inhibit, prevent, HQKLVFFAED, HKQLPFFED, HKQLVFFED, KLVFF 等;		
EBI-EMBL: SEQ ID Nos: 1-3, H[KQ][KQ][L][VP]FF[AG]ED		
<b>C. 相关文件</b>		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US6905686B1(ATHENA NEUROSCIENCES INC ETAL) 14.6 月 2005 (14.06.2005) 摘要, 说明书第 6 栏第 5-21 行, 第 10 栏第 1-41 行, 第 20 栏 第 15-56 行, 附图 19-20 和权利要求 10	1-5
X	TIERNBERG L. O. et al., a molecular model of Alzheimer amyloid $\beta$ -peptide fibril formation, The Journal of Biological Chemistry, 4 月 20 日, 1999, 第 274 卷, 第 18 期, 第 12619-12625 页, 见摘要和图 4	1-3
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 01.12 月 2008 (01.12.2008)		国际检索报告邮寄日期 25.12 月 2008 (25.12.2008)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 周霞 电话号码: (86-10) 62411098

## 国际检索报告

国际申请号 <b>PCT/CN2008/000497</b>
-----------------------------------

C(续). 相关文件		
类型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US6582945B1 (BOSTON BIOMEDICAL RES INST) 24.6 月 2003 (24.06.2003), 见摘要, SEQ ID NO:3 和 5	1-5
A	US6022859A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 08. 2 月 2000 (08.02.2000), 见摘要和表 1	1-5
A	AUSTEN B. M. et al., designing peptide inhibitors for oligomerization and toxicity of Alzheimer's $\beta$ -amyloid peptide, Biochemistry, 2 月 19 日, 2008, 第 47 卷, 第 1984-1992 页, 见全文	1-5



## 国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2008/000497
----------------------------

**第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)**

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1.  权利要求: 6

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:

**权利要求 6 涉及对人体或动物体的治疗方法。**

2.  权利要求:

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,

具体地说:

3.  权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

**第III栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)**

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1.  由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2.  由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3.  由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求:

4.  申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明:  申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 缴纳了异议费。

申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未缴纳异议费。

缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告 关于同族专利的信息		国际申请号 PCT/CN2008/000497	
检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US6905686B1	14.06.2005	WO9927944A1	10.06.1999
		AU1706199A	16.06.1999
		ZA9810932A	29.09.1999
		EP1033996A1	13.09.2000
		NO20002784A	31.07.2000
		BRPI9815357A	24.10.2000
		CZ20001706A3	15.11.2000
		CN1281366A	24.01.2001
		HU0100627A2	28.06.2001
		KR20010032635A	25.04.2001
		JP2002502802T	29.01.2002
		MXPA00005426A	01.02.2002
		US6710226B1	23.03.2004
		US2004081657A1	29.04.2004
		US6743427B1	01.06.2004
		US6750324B1	15.06.2004
		US6761888B1	13.07.2004
		US2004157779A1	12.08.2004
		AU2003203740A1	12.06.2003
		US2004166119A1	26.08.2004
		US2004170641A1	02.09.2004
		US2004175394A1	09.09.2004
		US6787138B1	07.09.2004
		US6787139B1	07.09.2004
		US6787140B1	07.09.2004
		US6787143B1	07.09.2004
		US6787144B1	07.09.2004
		US6787523B1	07.09.2004
		US6787637B1	07.09.2004
		US6808712B2	26.10.2004
		US2004219146A1	04.11.2004
		US6818218B2	16.11.2004
		US2004228865A1	18.11.2004
US2004247590A1	09.12.2004		
US2004247591A1	09.12.2004		
US2004265301A1	30.12.2004		
US2004265308A1	30.12.2004		

国际检索报告 关于同族专利的信息		国际申请号 PCT/CN2008/000497	
检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
		US2005019328A1	27.01.2005
		US2005019330A1	27.01.2005
		US2005019343A1	27.01.2005
		US2005013815A1	20.01.2005
		US2005031629A1	10.02.2005
		NZ504569A	28.01.2005
		US2005037026A1	17.02.2005
		US2005048049A1	03.03.2005
		US2005053614A1	10.03.2005
		US6866849B2	15.03.2005
		US6866850B2	15.03.2005
		US2005059591A1	17.03.2005
		US2005059802A1	17.03.2005
		US2005123544A1	09.06.2005
		SG111083A1	30.05.2005
		US2005142132A1	30.06.2005
		US2005158304A1	21.07.2005
		US2005163788A1	28.07.2005
		US2005191292A1	01.09.2005
		US2005191314A1	01.09.2005
		US6946135B2	20.09.2005
		US6962707B2	08.11.2005
		US2005249727A1	10.11.2005
		US2005255122A1	17.11.2005
		US6972127B2	06.12.2005
		US6982084B2	03.01.2006
		US2006029611A1	09.02.2006
		US2006034858A1	16.02.2006
		US7014855B2	21.03.2006
		JP2006077030A	23.03.2006
		JP2006131639A	25.05.2006
		US2006121038A9	08.06.2006
		EP1679080A2	12.07.2006
		EP1690547A1	16.08.2006
		TW239847B1	21.09.2005
		ES2262460T1	01.12.2006
		AU2006202899A1	27.07.2006
		ES2263408T1	16.12.2006

国际检索报告 关于同族专利的信息		国际申请号 PCT/CN2008/000497	
检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
		US2008096818A1	24.04.2008
		CN101116746A	06.02.2008
		CN100374151C	12.03.2008
		EP1033996B1	25.06.2008
		INDEL200800484A	16.05.2008
		DE69839647E	07.08.2008
		US2008227718A1	18.09.2008
		US2008227719A1	18.09.2008
US6582945B1	24.06.2003	WO0077178A1	21.12.2000
		AU5742100A	02.01.2001
		US2002102261A1	01.08.2002
		US2002136718A1	26.09.2002
		JP2003506321T	18.02.2003
		US2003235897A1	25.12.2003
		EP1409654A1	21.04.2004
		US6872554B2	29.03.2005
		AU780474B2	24.03.2005
		AU2005201687A1	12.05.2005
		US2005147613A1	07.07.2005
		US2006228371A1	12.10.2006
		AU2005201687B2	28.09.2006
		EP1409654B1	20.08.2008
		US7413884B2	19.08.2008
US6022859A	08.02.2000	无	

国际检索报告

国际申请号  
**PCT/CN2008/000497**

续: A. 主题的分类

C07K14/47 (2006.01) i

A61K38/17 (2006.01) i

A61P25/28 (2006.01) i

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100154081

弁理士 伊佐治 創

(72)発明者 徐 淑 梅

中国天津市和平区 気 象台路22号生理教研室

(72)発明者 周 根 尧

中国天津市和平区 馬 場 道59号平安大 家 B座19-A

(72)発明者 王 威

中国天津市南 開 区迎水道9号11-1-402

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA17 CA59 NA14 ZA161 ZA162

4H045 AA10 AA20 AA30 BA15 EA21 FA33 GA21