

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/108780

発行日 平成27年5月11日 (2015. 5. 11)

(43) 国際公開日 平成25年7月25日 (2013. 7. 25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/00 (2006.01)	C07K 14/00 ZNA	4C084
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06	4H045
C12N 9/99 (2006.01)	C12N 9/99	
A61K 38/55 (2006.01)	A61K 37/64	
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 111	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2013-554307 (P2013-554307)	(71) 出願人	503027931 学校法人同志社 京都府京都市上京区今出川通烏丸東入玄武町601番地
(21) 国際出願番号	PCT/JP2013/050663	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(22) 国際出願日	平成25年1月16日 (2013. 1. 16)	(72) 発明者	井原 康夫 京都府京田辺市多々羅都谷1-3 同志社大学内
(31) 優先権主張番号	特願2012-6687 (P2012-6687)	(72) 発明者	舟本 聡 京都府京田辺市多々羅都谷1-3 同志社大学内
(32) 優先日	平成24年1月17日 (2012. 1. 17)	(72) 発明者	佐々木 亨 東京都目黒区駒場4-6-1 東京大学駒場リサーチキャンパス KOL402 最終頁に続く
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2012-208277 (P2012-208277)		
(32) 優先日	平成24年9月21日 (2012. 9. 21)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

(54) 【発明の名称】 アミロイドβタンパク特異的産生抑制ポリペプチド

(57) 【要約】

本発明の主な目的は、A タンパク質の産生を特異的に阻害し、アルツハイマー病に対する治療及び/又は予防のための薬剤の有効成分となる化合物を開発することである。

このような目的を達成するために配列番号1、13、14、又は22の何れか一つにて示されるアミノ酸配列を有し、CTFのN末端領域に結合するポリペプチド、当該ポリペプチドを含むセクレターゼ活性阻害剤、セクレターゼ活性阻害剤、A タンパク質産生抑制剤、及びアルツハイマー病治療及び/又は予防剤を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1、13、14、又は 22 の何れか 1 つにて示されるアミノ酸配列を有し、 CTF の N 末端領域に結合するポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号 2 ~ 14、及び 22 の何れか 1 つにて示されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号 2 ~ 8、10 ~ 12、14、又は 22 の何れか 1 つにて示されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

(項 1 - 3) 配列番号 3、4、6、10、11、14、又は 22 の何れか 1 つにて示されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載のポリペプチドを含む、セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項 6】

配列番号 3 にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む請求項 5 に記載の、セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載のポリペプチドを含む、セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項 8】

配列番号 6 にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む請求項 7 に記載の、セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載のポリペプチドを含む、A タンパク質産生抑制剤。

【請求項 10】

配列番号 6 にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む請求項 9 に記載の、A タンパク質産生抑制剤。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載のポリペプチドを含む、アルツハイマー病治療及び / 又は予防剤。

【請求項 12】

配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、請求項 11 に記載のアルツハイマー病治療及び / 又は予防剤。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 4 の何れか 1 つに記載のポリペプチドを、アルツハイマー病患者に投与する工程を含む、アルツハイマー病を治療及び / 又は予防する方法。

【請求項 14】

アルツハイマー病の治療及び / 又は予防における使用のための、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 つに記載のポリペプチド。

【請求項 15】

アルツハイマー病を治療及び / 又は予防するための、医薬の製造のための、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 つに記載のポリペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アミロイド タンパク質の産生を特異的に抑制するポリペプチドに関する。

【背景技術】

【0002】

アミロイド タンパク質 (以下、本明細書において A タンパク質と称することがある

10

20

30

40

50

。)は、アルツハイマー病の原因タンパク質の1つとして考えられている。具体的には、このA タンパク質が脳内にて蓄積していることが、アルツハイマー病の病態の1つとして認識されている。このようなA タンパク質が、脳内にて蓄積することによって剛直な繊維状の分子構造を形成し、脳内の神経細胞を死に至らしめることとなり、結果として神経機能が損傷してアルツハイマー病が発症するものと考えられている。

【0003】

A タンパク質は、細胞膜貫通タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質(以下、本明細書にてAPPと称することがある。)が セクレターゼによって切断された細胞膜貫通タンパク質である CTFが、更に セクレターゼにて切断されて細胞膜から遊離し、脳内にて蓄積するものと考えられている。

10

【0004】

セクレターゼにて切断された CTFはA タンパク質と、AICDとに分けられることが知られており、APPが セクレターゼによって切断されることにより、sAPPが遊離することも知られている(図1)。

【0005】

成熟APPを基準にすれば、A タンパク質は653~694番目のアミノ酸残基に該当し、CTFは653~751番目のアミノ酸残基に該当する。また、sAPPは18~652番目のアミノ酸残基に該当し、AICDは701~751番目のアミノ酸残基に該当する。

20

【0006】

以上のことから、セクレターゼの阻害剤はアルツハイマー病の原因タンパク質である、A タンパク質の蓄積を抑制する効果を発揮する剤として考えられていた。

【0007】

ところが、それぞれ膜貫通タンパク質であるPen-2、プレセニリン、ニカストリン、及びAph-1を含む複合体として知られる セクレターゼは、アスパラギン酸プロテアーゼに属し、上述のAPPのみならずAPLP1、APLP2、Notch、Jagged2、Delta1、E-cadherin、N-cadherin、CD44、ErbB4、Nectin1、LRP1等といった膜貫通タンパク質、レセプター等も基質とするプロテアーゼである。

30

【0008】

従って、A タンパク質の産生抑制作用を得るために、L-685,458、DAPT、LY-411,575等といった セクレターゼの活性阻害剤を使用すれば、上述のCTF以外のタンパク質に対する セクレターゼのプロテアーゼとしての酵素活性までもが抑制されてしまい、斯かる阻害剤をそのまま薬剤として用いれば、副作用が生じるといった可能性が危惧されている。

【0009】

例えば、セクレターゼの阻害剤の1つであるLY-411,575は、胸腺を萎縮させることや脾臓における成熟B細胞の細胞数を減少させること等が報告されており、このような阻害剤をそのまま医薬組成物とした場合、免疫等の点で副作用を引き起こす可能性が示唆されている(非特許文献1)。さらに、セクレターゼの酵素活性そのものを低下させると、皮膚の異常、扁平上皮ガン、脾臓の肥大等を引き起こすことも報告されている(非特許文献2)。

40

【0010】

また、A タンパク質の産生機序に鑑みれば、セクレターゼの酵素活性を阻害する化合物も有効であると考えられるが、セクレターゼのノックアウトマウスは、出生数が減少するといった報告があり、アルツハイマー病に対する薬剤としては好ましくない。

【0011】

そして、非ステロイド性抗炎症薬(以下、本明細書でNSAIDsと称することがある。)がA タンパク質の産生抑制剤として有効であるといった知見が存在するが、いくつかの家族性アルツハイマー病(例えば、プレセニリンの変異を有する場合。)には、効果

50

がないことが知られている（非特許文献3）。さらに軽度認知障害やアルツハイマー病患者から分離したセクレターゼは活性が変化しており、A₄₂を低下させるセクレターゼモジュレーターの効果が高いことがわかった（非特許文献4）。

【0012】

また、CTFの細胞外領域であるN末端にFLAGタグを付して発現させた場合、抗FLAG抗体の存在下では、セクレターゼによる分解が見られない（非特許文献5）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Wong, G. T. et al. J. Biol. Chem. 2004; 279: 12876 - 12882

【非特許文献2】Choi, S. H. et al. J. Neurosci. 2007; 27: 13579 - 13580

【非特許文献3】Page, R. M. et al. J. Biol. Chem. 2008; 283: 677 - 683

【非特許文献4】Kakuda, N. et al. EMBO Mol. Med. 2012; 4: 344 - 352

【非特許文献5】Shah, S. et al. Cell. 2005; 122: 435 - 447

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

上述のように、アルツハイマー病の治療及び/又は予防の為に、Aタンパク質の蓄積を阻害する化合物の開発が求められているにもかかわらず、Aタンパク質の産生を特異的に阻害する化合物に関する知見は何ら得られていない。

【0015】

従って、本発明の主な目的は、Aタンパク質の産生を特異的に阻害し、アルツハイマー病に対する治療及び/又は予防の為に薬剤の有効成分となる化合物を開発することである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者は、Aタンパク質の産生を特異的に抑制する化合物を探索するに際して、CTFに対してセクレターゼが酵素反応を起こすことにより、Aタンパク質を産生するところに着目した。ここで、セクレターゼそのものの酵素活性を阻害する観点ではなく、セクレターゼとCTFとの結合を特異的に阻害する観点から、Aタンパク質の産生を特異的に抑制する効果を発揮する化合物の探索を行った。

【0017】

本発明者は、CTFの細胞外ドメインとなるN末端領域に対して特異的に結合するモノクローナル抗体の存在する環境下において、CTFとセクレターゼを反応させたところ、Aタンパク質の産生を顕著に、且つ特異的に阻害する効果を発揮することを見出した。また、セクレターゼのCTF以外の基質に対する酵素活性には殆ど影響を及ぼさないことも見出した。

【0018】

本発明者は、斯かる知見に基づいて鋭意研究を重ねた結果、Aタンパク質の産生を特異的に抑制する効果を発揮する化合物として、特定のアミノ酸配列を有するペプチドが特に顕著な効果を発揮することを見出した。本発明は、以下に示す態様を広く包含するものである。

【0019】

項1 配列番号1、13、14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有し、CTFのN末端領域に結合するポリペプチド。

10

20

30

40

50

【0020】

更に、以下の(項1-1)~(項1-6)に記載した態様の発明が例示される。

(項1-1)配列番号2~14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有する、上記項1に記載のポリペプチド。

(項1-3)配列番号3、4、6、10、11、14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有する、上記項1に記載のポリペプチド。

(項1-4)アミド末端がアセチル化及び/又はカルボキシ末端がアミド化された、上記項1、及び項(1-1)~(1-3)の何れか1つに記載のポリペプチド。

(項1-5)前記CTFのN末端領域が、配列番号15にて示されるアミノ酸配列を有することを特徴とする、上記項1、及び項(1-1)~(1-4)の何れか1つに記載のポリペプチド。

(項1-6)前記結合が、50µM以下のKD値を満たすことを特徴とする上記項1、及び項(1-1)~(1-5)の何れか1つに記載のポリペプチド。

【0021】

項2 上記項1、及び(項1-1)~(項1-6)の何れか1つに記載のポリペプチドを含む、セクレターゼ活性阻害剤。

【0022】

更に、以下の(項2-1)~(項2-3)に記載した態様の発明が例示される。

(項2-1)上記項1、及び(項1-1)~(項1-6)の何れか1つに記載のポリペプチドを含む、CTF特異的セクレターゼ活性阻害剤。

【0023】

(項2-2)配列番号3にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む上記項2に記載の、セクレターゼ活性阻害剤。

【0024】

(項2-3)配列番号3にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む上記項2に記載の、CTF特異的セクレターゼ活性阻害剤。

【0025】

項3 上記項1、及び(項1-1)~(項1-6)の何れか1つに記載のポリペプチドを含む、セクレターゼ活性阻害剤。

【0026】

更に、以下の(項3-1)~(項3-3)に記載した態様の発明が例示される。

(項3-1)上記項1、及び(項1-1)~(項1-6)の何れか1つに記載のポリペプチドを含む、APP特異的セクレターゼ活性阻害剤。

【0027】

(項3-2)配列番号6にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む上記項3に記載の、セクレターゼ活性阻害剤。

【0028】

(項3-3)配列番号6にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む上記項3に記載の、APP特異的セクレターゼ活性阻害剤。

【0029】

項4 上記項1、及び(項1-1)~(項1-6)の何れか1つに記載のポリペプチドを含む、Aタンパク質産生抑制剤。

【0030】

更に、以下の(項4-1)~(項4-3)に記載した態様の発明が例示される。

(項4-1)上記項1、及び(項1-1)~(項1-6)の何れか1つに記載のポリペプチドを含む、Aタンパク質特異的産生抑制剤。

【0031】

(項4-2)配列番号6にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む上記項4に記載の、Aタンパク質産生抑制剤。

【0032】

10

20

30

40

50

(項4-3) 配列番号6にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む上記項4に記載の、A タンパク質特異的産生抑制剤。

【0033】

項5 上記項1、及び(項1-1)~(項1-6)の何れか1つに記載のポリペプチドを含む、アルツハイマー病治療及び/又は予防剤。

【0034】

更に、以下の(項5-1)に記載した態様の発明が例示される。

(項5-1) 配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、上記項5に記載の治療及び/又は予防剤。

【0035】

項6 上記項1、及び(項1-1)~(項1-6)の何れか1つに記載のポリペプチドを、アルツハイマー病患者に投与する工程を含む、アルツハイマー病を治療及び/又は予防する方法。

【0036】

更に、以下の(項6-1)に記載した態様の発明が例示される。

(項6-1) 配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを、アルツハイマー病患者に投与する工程を含む、上記項6に記載の方法。

【0037】

項7 アルツハイマー病の治療及び/又は予防における使用のための、上記項1、及び(項1-1)~(項1-6)の何れか1つに記載のポリペプチド。

【0038】

更に、以下の(項7-1)に記載した態様の発明が例示される。

(項7-1) アルツハイマー病の治療及び/又は予防における使用のための、配列番号6に示されるアミノ酸配列を有する、上記項7に記載のポリペプチド。

【0039】

項8 アルツハイマー病を治療及び/又は予防するための、医薬の製造のための、上記項1、及び(項1-1)~(項1-6)の何れか1つに記載のポリペプチドの使用。

【0040】

更に、以下の(項8-1)に記載した態様の発明が例示される。

(項8-1) アルツハイマー病を治療及び/又は予防するための、医薬の製造のための、配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの、上記項8に記載の、使用。

【0041】

以下に、本発明をより詳細に説明する。

【0042】

本発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学及び分子生物学的技術であれば、Sambrook and Russell, "Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (2001); Ausubel, F.M. et al. "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York等の文献を参照すればよい。

【0043】

ポリペプチド

本発明に係るポリペプチドは、配列番号1、13、14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有する。好ましくは、配列番号2~14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有する。より好ましくは、配列番号2~8、10~12、14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有する。さらに好ましくは、配列番号3、4、6、10、11、14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

なお、上記配列番号 1 にて示されるアミノ酸配列のうち、2 番目、3 番目、4 番目、5 番目、11 番目、12 番目、13 番目、14 番目、16 番目、19 番目、21 番目、22 番目及び 23 番目の位置のアミノ酸残基は、下記の表 1 に示すアミノ酸残基の何れかである。

【 0 0 4 5 】

【表 1】

位置	アミノ酸残基	
2	Asn, Ser, Asp, Gly, His, Val, Leu, Arg, Phe	10
3	Thr, Ile, Leu, Pro, Tyr, Arg	
4	Leu, Arg, Val, Ile, Thr, Phe, Ser	
5	Ile, Val, Ser, Asp, Asn, Thr	
11	Ser, His, Asp, Thr, Phe, Tyr, Ile, Ala	
12	Leu, Gly, Asn, Ser, Thr, Ala, Arg, Tyr	
13	Thr, Asp, Tyr, Ser, Phe, His, Asn	
14	Arg, Leu, Val, Ala, Ile, Ser, Tyr	
16	Phe, Tyr	20
19	Ser, Phe, Tyr	
21	Val, Ile, Ser, Thr, Tyr, Gly, His, Arg	
22	Asp, Asn, His, Pro, Ile, Arg, Ser	
23	Ser, Val, Phe, Asn, Thr, Tyr, His, Ile, Arg, Asp	

【 0 0 4 6 】

なお、配列番号 14 に示されるアミノ酸配列の 3 番目のアミノ酸残基は、L - 4 , 4 ' ビフェニルアラニン残基である。即ち、配列番号 14 にて示されるアミノ酸配列を有する本発明にかかるポリペプチドにおいて、2 番目のグリシンのカルボキシル基と上記 L - 4 , 4 ' ビフェニルアラニンのアミド基がペプチド結合しており、4 番目のバリンのアミド基と上記 L - 4 , 4 ' ビフェニルアラニンのアミド基がペプチド結合している。

【 0 0 4 7 】

同様に、配列番号 22 に示されるアミノ酸配列の 3 番目のアミノ酸残基は、L - 4 , 4 ' ビフェニルアラニン残基である。即ち、配列番号 22 にて示されるアミノ酸配列を有する本発明にかかるポリペプチドにおいて、2 番目のアルギニンのカルボキシル基と上記 L - 4 , 4 ' ビフェニルアラニンのアミド基がペプチド結合しており、4 番目のバリンのアミド基と上記 L - 4 , 4 ' ビフェニルアラニンのアミド基がペプチド結合している。

【 0 0 4 8 】

本発明に係るポリペプチドは、アミド末端がアセチル化されていてもよく、又はカルボキシ末端がアミド化されていてもよい。そして、アミド末端がアセチル化され、且つカルボキシ末端がアミド化されていてもよい。

【 0 0 4 9 】

本発明に係るポリペプチドは、適宜修飾が施されていてもよい。具体的には、ビオチン修飾、蛍光色素修飾、糖鎖修飾、脂質修飾等が挙げられ、これらの何れかに限定されるものではない。

【 0 0 5 0 】

このような修飾箇所は、特に限定されるものではなく、ポリペプチド内部、ポリペプチドの C 末端、又はポリペプチドの N 末端の何れであってもよい。

【 0 0 5 1 】

10

20

30

40

50

これらの修飾方法は、公知の方法を採用すればよく、特に限定されるものではない。

【0052】

本発明に係るポリペプチドは CTFのN末端領域に結合する。CTFとは、APP (例えばNCBIのAccession No Q95241.1等に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質)が、セクレターゼによって切断された産物であるために、CTFのN末端領域に結合するということは、APPに結合するということ同意である。そして、CTFのN末端領域とは、APPからすれば、セクレターゼの切断認識部位付近に該当するものである。

【0053】

また、CTFのN末端領域付近はセクレターゼによっても認識及び切断され、切断後の断片がAタンパク質(例えばNCBIのAccession No 1Z0Q__A、1BA6__A)に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質)として産生されるため、CTFのN末端領域に結合するということは、Aタンパク質に結合するということ同じ意味である。

10

【0054】

本発明に係るポリペプチドが結合する、CTFのN末端領域の具体的なアミノ酸配列は、特に限定はされないが、例えば、配列番号15等にて示されるアミノ酸配列である。また、配列番号15にて示されるアミノ酸の一部であってもよい。なお、本発明におけるCTFのN末端領域とは、必ずしもCTFのN末端に存在するAsp残基を含んでいなくともよい。

20

【0055】

上述したCTFのアミノ酸配列として、具体的にはヒト型のCTFであれば、例えば配列番号20に示すアミノ酸配列が挙げられる。また、マウス型のCTFであれば、例えば配列番号21に示すアミノ酸配列が挙げられる。

【0056】

本発明に係るポリペプチドと、CTFのN末端領域との結合の強さは、特に限定はされないが、例えば解離定数(KD)にて表すとすれば、通常50μM以下程度の範囲を満たすものであり、好ましくは5μM以下程度である。

【0057】

本発明に係るポリペプチドは、種々の溶媒に可溶であり、その具体的な溶媒は特に限定されることはないが、例えば水、PBS、DMSO、DMF等の溶媒が挙げられる。また、これらの溶媒を二種以上組み合わせて用いてもよい。

30

【0058】

本発明に係るポリペプチドは、CTFのN末端領域に結合する。上述のように当該領域は、セクレターゼのCTF切断認識部位付近に該当する領域であることから、セクレターゼの活性阻害剤として有用である。

【0059】

また、本発明に係るポリペプチドは、CTFのN末端領域に結合する。上述のように当該領域は、セクレターゼのAPP切断認識付近に該当する領域であることから、セクレターゼの活性阻害剤として有用である。

40

【0060】

本発明に係るポリペプチドは、公知の方法によって作製することが出来る。具体的には、ペプチド合成機などを用いた化学的な製造方法を採用してもよいし、ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸を宿主細胞に導入して、生化学的な合成方法を採用してもよい。

【0061】

なお、製造した本発明に係るポリペプチドはカラムクロマトグラフィー等の公知の方法を用いて精製すればよい。

【0062】

セクレターゼ活性阻害剤

50

本発明に係る セクレターゼ活性阻害剤は、上述の本発明に係るポリペプチドを含む。上述のポリペプチドの中でも、配列番号 2 ~ 14、又は 22 の何れか 1 つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが好ましい。

【0063】

このような本発明に係る セクレターゼ活性阻害剤に含まれる好ましいポリペプチドの中でも、配列番号 3、4、6、7、10、14、又は 22 の何れか 1 つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが好ましい。

【0064】

さらに、配列番号 3、4、6、10 又は 14 の何れか 1 つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号 3、4、6、又は 14 の何れか 1 つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号 3、4、又は 6 の何れか 1 つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号 3 又は 6 にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの順により好ましく、これらの中でも最も好ましいポリペプチドは、配列番号 3 にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0065】

本発明に係る セクレターゼ活性阻害剤に含まれる本発明に係るポリペプチドは、上述のように CTF の N 末端領域に結合する。本発明に係る セクレターゼ活性阻害剤は、このような現象に基づいて機能を発揮するために、セクレターゼが認識する CTF 以外の他の基質に対する セクレターゼ活性は阻害しない傾向となる。即ち、本発明の セクレターゼは、CTF 特異的 セクレターゼ活性阻害剤とすることが好ましい。

【0066】

「CTF 特異的」とは、セクレターゼ活性阻害剤が セクレターゼの活性を阻害する基質として、CTF とその他の候補基質が同時に存在している場合に、CTF をより活性を阻害する基質として選択する傾向であることを示す。

【0067】

本発明の セクレターゼ活性阻害剤を CTF 特異的 セクレターゼ活性阻害剤とする場合、セクレターゼ活性阻害剤が競合的な阻害活性を示すことが好ましい。

【0068】

本発明に係る セクレターゼ活性阻害剤は、上述の本発明のポリペプチドを含むものであるが、当該ポリペプチド以外に成分を含まず、そのまま セクレターゼ活性阻害剤としてもよい。

【0069】

本発明に係る セクレターゼ活性阻害剤に、本発明に係るポリペプチド以外の他の成分が含有される場合、その具体的な他の成分は、セクレターゼの活性阻害効果を減少させない限り、特に限定されるわけではないが、例えば防腐剤、殺菌剤、安定剤等といった公知の剤が含まれていてもよい。そしてこの場合、本発明に係る セクレターゼ活性阻害剤における本発明に係るポリペプチドの含有割合は、セクレターゼ活性阻害剤に対して通常 0.001 ~ 99.9 重量%程度とすればよい。

【0070】

上述のように、セクレターゼは CTF を基質として認識し、A タンパク質を産生させる。従って、本発明に係る セクレターゼ活性阻害剤に含まれる本発明に係るポリペプチドは、A タンパク質の産生抑制剤としても有用である。

【0071】

セクレターゼ活性阻害剤

本発明に係る セクレターゼ活性阻害剤は、上述の本発明に係るポリペプチドを含む。上述のポリペプチドの中でも、配列番号 2 ~ 14、又は 22 の何れか 1 つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが好ましい。

【0072】

このような本発明に係る セクレターゼ活性阻害剤に含まれる好ましいポリペプチドの中でも、配列番号 3 ~ 8、10 ~ 12、14、又は 22 の何れか 1 つにて示されるアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を有するポリペプチドが好ましい。

【0073】

さらに、配列番号3～8、10、12又は14の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号3～8、12、又は14の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号3～8又は14の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号3～6、8又は14の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号3、4、6、8又は14の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号3、4、6、又は8の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号4、6、又は8の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号4又は6にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの順により好ましく、これらのポリペプチドの中でも最も好ましいのは、配列番号4にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

10

【0074】

本発明に係るセクレターゼ活性阻害剤に含まれる本発明に係るポリペプチドは、上述のようにAPPのセクレターゼの切断認識部位付近に結合する。本発明に係るセクレターゼ活性阻害剤は、このような現象に基づいて機能を発揮するために、セクレターゼが認識するAPP以外の他の基質に対するセクレターゼ活性は阻害しない傾向となる。即ち、本発明のセクレターゼは、APP特異的セクレターゼ活性阻害剤とすることが好ましい。

20

【0075】

「APP特異的」とは、セクレターゼ活性阻害剤がセクレターゼの活性を阻害する基質として、APPとその他の候補基質が同時に存在している場合に、APPをより活性を阻害する基質として選択する傾向であることを示す。

【0076】

本発明のセクレターゼ活性阻害剤をAPP特異的セクレターゼ活性阻害剤とする場合、セクレターゼ活性阻害剤が競合的な阻害活性を示すことが好ましい。

【0077】

本発明に係るセクレターゼ活性阻害剤は、上述の本発明のポリペプチドを含むものであるが、当該ポリペプチド以外に成分を含まず、そのままセクレターゼ活性阻害剤としてもよい。

30

【0078】

本発明に係るセクレターゼ活性阻害剤に、本発明に係るポリペプチド以外の他の成分が含有される場合、その具体的な他の成分は、セクレターゼの活性阻害効果を減少させない限り、特に限定されるわけではないが、例えば防腐剤、殺菌剤、安定剤等といった公知の剤が含まれていてもよい。そしてこの場合、本発明に係るセクレターゼ活性阻害剤における本発明に係るポリペプチドの含有割合は、セクレターゼ活性阻害剤に対して通常0.001～99.9重量%程度とすればよい。

【0079】

上述のように、セクレターゼはAPPを基質として認識してCTFを産生し、産生されたCTFはセクレターゼの働きによって分解されてAタンパク質を産生させる。従って、本発明に係るセクレターゼ活性阻害剤に含まれる本発明に係るポリペプチドは、Aタンパク質の産生抑制剤としても有用である。

40

【0080】

A タンパク質産生抑制剤

本発明に係るAタンパク質産生抑制剤は、上述の本発明に係るポリペプチドを含む。上述のポリペプチドの中でも、配列番号2～14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが好ましい。

【0081】

このような本発明に係るAタンパク質産生抑制剤に含まれる好ましいポリペプチドの中でも、配列番号3、4、6、10、11、14、又は22の何れか1つにて示されるア

50

ミノ酸配列を有するポリペプチドが好ましい。

【0082】

さらに、配列番号3、4、6、10、14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号3、4、6、10、又は14の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号3、4、6、又は14の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号3、4、又は6の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの順により好ましく、これらのポリペプチドの中でも最も好ましいのは、配列番号6にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0083】

本発明に係るAタンパク質産生抑制剤は、上述の本発明のポリペプチドを含むものであるが、当該ポリペプチドは特にCTF特異的セクレターゼ阻害活性作用、及び/又はAPP特異的セクレターゼ活性阻害作用を発揮する。APPがセクレターゼの働きによってCTFを産生し、当該CTFはセクレターゼの働きによってAタンパク質を産生することから、本発明に係るポリペプチドを含むAタンパク質産生抑制剤は、特にAタンパク質を特異的に産生抑制する効果を発揮する。

【0084】

従って、本発明に係るAタンパク質産生抑制剤は、Aタンパク質特異的産生抑制剤とすることが好ましい。

【0085】

「Aタンパク質特異的」とは、本発明に係るAタンパク質産生抑制剤が、他の産生抑制候補物質と共存している場合に、他の物質よりもAタンパク質をより選択的に産生を抑制する傾向であることを示す。

【0086】

本発明に係るAタンパク質産生抑制剤に、本発明に係るポリペプチド以外の他の成分が含有される場合、その具体的な他の成分は、Aタンパク質産生抑制効果を減少させない限り、特に限定されるわけではないが、例えば防腐剤、殺菌剤、安定剤等といった公知の剤が含まれていてもよい。そしてこの場合、本発明に係るAタンパク質産生抑制剤における本発明に係るポリペプチドの含有割合は、Aタンパク質産生抑制剤に対して通常0.001～99.9重量%程度とすればよい。

【0087】

Aタンパク質が産生されて蓄積することは、アルツハイマー病の発症機序の1つであるために、Aタンパク質の産生を抑制することは、アルツハイマー病の予防及び/又は治療に有用である。

【0088】

従って、本発明に係るAタンパク質産生抑制剤に含まれるポリペプチドは、アルツハイマー病の治療及び/又は予防剤としても有用である。

【0089】

以上のことから、上述した本発明に係るポリペプチドは、アルツハイマー病の治療及び/又は予防における使用に好適である。

【0090】

具体的な『アルツハイマー病の治療及び/又は予防における使用』とは、以下の「アルツハイマー病の治療及び/又は予防剤」にて詳述する使用方法を参照すればよい。

【0091】

また、上述した本発明に係るポリペプチドは、アルツハイマー病の治療及び/又は予防するための、医薬の製造のための使用に好適である。

【0092】

具体的な『アルツハイマー病の治療及び/又は予防するための、医薬の製造のための使用』についても、以下の「アルツハイマー病の治療及び/又は予防剤」にて詳述する使用方法を参照すればよい。

10

20

30

40

50

【0093】

アルツハイマー病治療及び／又は予防剤

本発明に係るアルツハイマー病治療及び／又は予防剤は、上述の本発明に係るポリペプチドを含む。上述のポリペプチドの中でも、配列番号2～14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが好ましい。

【0094】

このような本発明に係るアルツハイマー病治療及び／又は予防剤に含まれる好ましいポリペプチドの中でも、配列番号3、4、6、10、11、14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが好ましい。

【0095】

さらに、配列番号3、4、6、10、14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号3、4、6、10、又は14の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号3、4、6、又は14の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号3、4、又は6の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；配列番号3又は6にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの順により好ましく、これらのポリペプチドの中でも最も好ましいのは、配列番号6にて示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

10

【0096】

本発明に係るアルツハイマー病治療及び／または予防剤は、上述の本発明のポリペプチドを含むものであるが、当該ポリペプチドは特にA タンパク質特異的産生抑制作用を発揮することから、本発明に係るアルツハイマー病治療及び／又は予防剤は、副作用を低いといった顕著な効果を発揮する。

20

【0097】

本発明に係るアルツハイマー病の治療及び／又は予防剤に、本発明に係るポリペプチド以外の他の成分が含有される場合、その具体的な他の成分は、アルツハイマー病の治療及び／又は予防効果を減少させない限り、薬学的に許容可能な担体或いは添加物が含まれていてもよい。

【0098】

薬学的に許容可能な担体又は添加物とは、任意の担体、希釈剤、賦形剤、懸濁剤、潤滑剤、アジュバント、媒体、乳化剤、吸収剤、保存剤、界面活性剤、着色剤、香料、或いは甘味料を意味し、これらの中でも公知のものを適宜採用すればよい。

30

【0099】

この場合、本発明に係るアルツハイマー病の治療及び／又は予防剤における本発明に係るポリペプチドの含有割合は、アルツハイマー病の治療及び／又は予防剤に対して通常0.001～99.9重量％程度とすればよい。

【0100】

本発明に係るアルツハイマー病の治療及び／又は予防剤の剤型は、たとえば錠剤、散剤、シロップ剤、ハップ剤、注射剤、点滴剤等が挙げられ、特に限定はされないが、注射剤又は点滴剤とすることが好ましい。このような注射剤や点滴剤は、水性であっても、非水性であっても、懸濁性であっても良い。また、用時調製型の剤型であってもよい。

40

【0101】

本発明に係るアルツハイマー病の治療及び／又は予防剤は、アルツハイマー病に罹患した患者に投与する工程を含む免疫疾患の治療方法における利用可能性を有している。また、アルツハイマー病の病態や症状を発症していないものの、アルツハイマー病の素因を持ち得る患者に投与する工程を含むアルツハイマー病の予防方法における利用可能性も有する。さらに、アルツハイマー病発症前段階の軽度認知障害（例えばMMSE 26点以下等）を呈する者においても利用可能性を有する。

【0102】

本発明のアルツハイマー病患者とは、特に限定はされないが、例えば、記憶障害、見当識障害、学習障害、注意障害、空間認知機能、問題解決能力の障害等といった、徐々に進

50

行する認知障害等の症状を呈する患者であり、その所見として画像診断等で大脳皮質に老人斑（A タンパク質の沈着像）が存在すると診断される患者；びまん性の脳萎縮が存在すると診断される患者；タウタンパク質、A 等の髄液バイオマーカー、血液バイオマーカー等で診断された患者であればよい。

【0103】

本発明に係るアルツハイマー病の治療及び／又は予防剤の投与量並びに投与方法は、対象とする患者の性別、人種、年齢、全身状態、疾患の重篤度等に応じて、0.001～100mg/kg/dayの範囲で適宜設定することができる。

【0104】

本発明に係るアルツハイマー病の治療及び／又は予防剤は、上記の量を一日に一度に投与してもよく、数回に分けて投与してもよい。また、上記疾患に対する治療効果を有する範囲において、投与間隔は、毎日、隔日、毎週、隔週、2～3週毎、毎月、隔月または2～3ヶ月毎でもよい。投与方法は、例えば経口、筋肉内、静脈内、動脈内、くも膜下腔内、皮内、腹腔内、鼻腔内、肺内、眼内、腔内、頸部内、直腸内、皮下等へ投与する方法が挙げられ、特に限定はされない。

10

【0105】

アルツハイマー病の治療及び／又は予防方法

本発明に係るアルツハイマー病の治療及び／又は予防方法は、上述の本発明に係るポリペプチドを、アルツハイマー病患者に投与する工程を含む。

【0106】

具体的な、アルツハイマー病患者、投与方法等については、上記「アルツハイマー病治療及び／又は予防剤」にて詳述したものを参照すればよい。

20

【発明の効果】

【0107】

以下に、本発明に係るポリペプチドが有する効果について列挙する。なお、本発明に係るポリペプチドは、以下の全ての効果を有するポリペプチドに限定されないのは言うまでもない。

【0108】

本発明に係るポリペプチドは、セクレターゼ活性阻害剤、特にCTF特異的セクレターゼ活性阻害剤の有効成分として用いることができる。

30

【0109】

本発明に係るポリペプチドは、セクレターゼ活性阻害剤、特にAPP特異的セクレターゼ活性阻害剤の有効成分として用いることができる。

【0110】

本発明に係るポリペプチドは、A タンパク質産生抑制剤、特にA タンパク質特異的産生抑制剤の有効成分として用いることができる。

【0111】

本発明に係るポリペプチドは、アルツハイマー病治療及び／又は予防剤の有効成分として用いることができる。特にヒト等の個体に投与した場合、副作用が少ないアルツハイマー病治療及び／又は予防剤が提供される。

40

【図面の簡単な説明】

【0112】

【図1】A タンパク質、CTF、APP、sAPP、及びAICDと、セクレターゼ並びにセクレターゼの切断部位を示す模式図。

【図2】本発明に係るポリペプチドの、in vitroにおけるセクレターゼ活性阻害実験結果を示す図。

【図3】本発明に係るポリペプチドの、in vitroにおけるセクレターゼ活性阻害実験結果を示す図。

【図4】本発明に係るポリペプチドの、in vitroにおけるセクレターゼ活性阻害実験結果を示す図。

50

【図5】本発明に係るポリペプチドの、*in vitro*におけるセクレターゼ活性阻害実験結果を示す図。

【図6】本発明に係るポリペプチドの、細胞レベルでのセクレターゼ活性阻害実験、セクレターゼ活性阻害実験、並びにAタンパク質産生抑制実験結果を示す図。

【図7-1】図6に示す実験結果をグラフ化した図。

【図7-2】図6に示す実験結果をグラフ化した図。

【図8】本発明に係るポリペプチドの、細胞レベルでのセクレターゼ活性阻害実験、セクレターゼ活性阻害実験、並びにAタンパク質産生抑制実験結果を示す図。

【図9】本発明に係るポリペプチドを、動物個体に投与した実験結果を示す図。

【図10】本発明に係るポリペプチドの細胞内分布を示す図。(A)は、CHO-K1細胞に対して、本発明に係るビオチン化ポリペプチドを作用させた後に、細胞を固定しTririon X 100処理し、アビジン修飾化Alexa488を作用させた結果を示す。(B)は、APPを過剰発現させたCHO-K1細胞(以下、7WD10細胞)に対して、本発明に係るビオチン化ポリペプチドを作用させた後に、細胞を固定しTririon X 100処理し、アビジン修飾化Alexa488を作用させた結果を示す。(C)は、7WD10細胞に対して、細胞を固定しTririon X 100処理し、アビジン修飾化Alexa488のみを作用させた結果を示す。なお、これらの図中のバーは、50μmを示す。

10

【図11】本発明に係るポリペプチドのマウス型A産生抑制を示す図。(A)は、CHO-K1細胞、Neuro2A細胞(N2A)に対して、本発明にかかるポリペプチドを作用させた際のウエスタンブロッティング像を示す。(B)は、(A)のデータをデンストメトリーで解析した結果を示す。

20

【図12】本発明に係るポリペプチドのマウス腹腔への投与実験結果を示す図。(A-1)及び(A-2)は、腹腔投与後の大脳皮質中におけるAの量を解析したウエスタンブロッティング像を示す。(B)は、(A)のデータをデンストメトリーで解析した結果を示す。(C)は、腹腔投与後の海馬における、本発明に係るポリペプチドの局在を示す組織免疫染色像。図中のバーは、50μmを示す。

【図13】本発明に係るポリペプチドの、Aタンパク質産生抑制実験結果を示す図。

【発明を実施するための形態】

【0113】

30

以下に本発明をより詳細に説明するための実施例を記載する。なお、本発明が以下に示す実施例に記載の内容に限定されないのは言うまでもない。

<実施例>

〔ポリペプチドの作製〕

CTFのN末端領域に該当するポリペプチドである配列番号15にて示されるポリペプチド(Amyloid 1-9)に対して特異的に結合するポリペプチドを、特許文献1に示すポリペプチドスクリーニング技術を用いて同定し、製造した。

【0114】

【表 2】

配列番号	ペプチド名	アミノ酸配列 (N末端→C末端)
2	9-7	MNTLICDCYCSLTRCFCYSCVDS
3	#1	MSIRVDCYCHGDLFCYSCINS
4	#2	MDTVICDCYCDNYVFCYSCSHV
5	#3	MGLISDCYCDSTACFCYSCCTDF
6	#4	MHLVICDCYCTTDICYCYSCPTN
7	#5	MVPVDCYCFLSVFCYSCYIT
8	#6	MLYTSCDCYDAFSCFCYSCGPY
9	#7	MRIFDCDCYCYRDICYCYFCTRH
10	#8	MGRVNCDCYCI GHYCYCYCHNI
11	#9	MPLSICDCYCI STICYCYFCVHR
12	#10	MPTVYDCYCAYNACYCYCRSD
13	6-5	MHHVYDCYCFGPVCYCHSCT
14	S4	FGBTWDYWVYR
22	S2	FRBGWVYTYTV
23	L13	MLICDCYCDPRSCICGSCTLV

※上記のポリペプチドは全てアミノ末端がアセチル化されており、カルボキシ末端はアミド化されている。ペプチド名S4（配列番号14）及びS2（配列番号22）のBはL-4, 4'-ビフェニルアラニン（Bph）残基である。

【0115】

下記に示す実験において、上述の配列番号2～14に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドは全てDMSOに溶かした状態で使用した。

【0116】

上記のペプチド名「#4」の配列番号15に示すアミノ酸配列に対する解離定数（KD）を測定したところ、2.62 μMであった。

【0117】

〔In vitroでの解析〕

実験例1：セクレターゼ活性阻害実験1

図2の(A)に示すようなCTFを含むポリペプチド（C99-FLAG：配列番号16）及びC末端側にFLAGペプチドを有するマウス由来のNotchタンパク質（NCBI Accession No Q01705.2の改変型；配列番号17；以後、Notchとする）を、それぞれ最終濃度が50 nMとなるような溶液を調整した。

【0118】

これらの溶液に、9-7ポリペプチド、6-5ポリペプチド、#1ポリペプチド、#2ポリペプチド、#3ポリペプチド、及び#4ポリペプチドを、それぞれの最終濃度が50 μMとなるように添加し、次いで50 μLのCHAPS可溶性膜画分（セクレターゼ含有画分）と4時間反応させた。反応温度は37 °Cで行った。陰性対照実験として、上記6種類のポリペプチドに代えてDMSOを用いた。

【0119】

反応後の各サンプルを、C99-FLAGを用いたものは、図2の(A)に示すように

C99-FLAGのN末端を特異的に認識するモノクローナル抗体(82E-1)で、ウエスタンブロットを行い、セクレターゼによって分解されることにより産生されるA40タンパク質の量を測定した。一方、Notchを用いたものは、抗FLAGモノクローナル抗体でウエスタンブロットを行い、同じくセクレターゼによって分解されることにより産生されるNICDの量を測定した。結果を図2の(B)及び(C)に示す。

【0120】

図2(B)は、Aタンパク質及びNICDの存在を示すウエスタンブロットティング像である。上記6種類のポリペプチドの存在下では、C99-FLAGはセクレターゼによって殆ど分解されることはないことを示すC99にて示すバンドが示されている。中でも、#4、#2、#1等のポリペプチドが、セクレターゼのCTFに対する切断活性をより阻害することが明らかとなった。

10

【0121】

一方、上記6種類のいずれのポリペプチドも、NICDの存在を示すバンドが示されていることから、セクレターゼのNotchに対する切断活性は阻害していないことも明らかとなった。

【0122】

図2(C)は、Aタンパク質及びNICDを、図2(B)にて示すウエスタンブロットティング像における各バンドの濃さを基に定量化したグラフである。グラフの縦軸はコントロールとして用いたDMSOでの結果を100%とした相対値を示す。上記6種類のポリペプチドの中でも、#1が特にAタンパク質に対するセクレターゼの切断活性を阻害しており、Notchに対する切断活性を阻害していないことが明らかとなった。以上のことから、#1ポリペプチドが、最もCTFに対して選択的にセクレターゼの切断活性を阻害することが示唆される。

20

【0123】

実験例2：セクレターゼ活性阻害実験2

使用するポリペプチドを#1ポリペプチドのみとし、斯かる#1ポリペプチドの添加量を、最終濃度がそれぞれ0.5、1、5、10、20、及び50 μ Mとなるように添加した以外は、上記実験例1と同様の実験を行った。

【0124】

結果を図3の(A)及び(B)に示す。なお、図中にて0 μ Mとあるのは、陰性対照実験として#1ポリペプチドの代わりにDMSOを用いたものである。図3(A)は、Aタンパク質及びNICDの存在を示すウエスタンブロットティング像である。#1ポリペプチドは濃度依存的にCTFに対するセクレターゼの切断活性をより阻害することが明らかとなった。

30

【0125】

一方、#1ポリペプチドはその濃度に係らず、NICDの存在を示すバンドが示されていることから、セクレターゼのNotchに対する切断活性は阻害していないことも明らかとなった。

【0126】

図3(B)は、Aタンパク質及びNICDを、図3(A)にて示すウエスタンブロットティング像における各バンドの濃さを基に定量化したグラフである。グラフの縦軸はコントロールとして用いたDMSOでの結果を100%とした相対値を示す。#1ポリペプチドは濃度依存的に、CTFに対する選択的なセクレターゼ切断活性を阻害することが示唆される。

40

【0127】

実験例3：セクレターゼ活性阻害実験3

使用するポリペプチドをS4ポリペプチドとし、その添加量を最終濃度がそれぞれ1、5、10、20、及び50 μ Mとなるように添加した以外は、上記実験例1と同様の実験を行った。本実験例では50 μ Mとなるように#4ポリペプチドも添加した。

【0128】

50

結果を図4に示す。なお、図中にてcontとあるのは、陰性対照実験としてDMSOを添加したものである。図4は、Aタンパク質及びNICDの存在を示すウエスタンブロットング像である。S4ポリペプチドも、上記#1ポリペプチドと同様に濃度依存的にCTFに対するセクレターゼの切断活性をより阻害することが明らかとなった。

【0129】

一方、S4ポリペプチドも、#1ポリペプチドと同様に、その濃度に係らず、NICDの存在を示すバンドが示されていることから、セクレターゼのNotchに対する切断活性は阻害していないことも明らかとなった。

【0130】

以上のことからS4ポリペプチドも、#1ポリペプチドと同様に、CTFに対して選択的にセクレターゼ切断活性を阻害することが示唆される。

10

【0131】

実験例4：セクレターゼ活性阻害実験1

図5の(A)に示すようなAPPを含むポリペプチド(APP-EQ-FLAG：配列番号18)を、最終濃度が50nMとなるような溶液を調整した。

【0132】

この溶液に、9-7ポリペプチド、6-5ポリペプチド、#1ポリペプチド、#2ポリペプチド、#3ポリペプチド、#4ポリペプチド、#5ポリペプチド、#6ポリペプチド、#7ポリペプチド、#8ポリペプチド、#9ポリペプチド、及び#10ポリペプチドを、それぞれの最終濃度が50μMとなるように添加し、次いで50μLのセクレターゼ(0.02U/μL)と4時間反応させた。反応温度は37°Cで行った。陰性対照実験として、上記12種類のポリペプチドに代えてDMSOを用いた。

20

【0133】

反応後の各サンプルを、図5の(A)に示すようにAPP-EQ-FLAGのN末端を特異的に認識するモノクローナル抗体(82E-1)で、ウエスタンブロットを行い、セクレターゼによって分解されることにより産生されるA33-FLAGタンパク質の量を測定した。

【0134】

結果を図5の(B)に示す。図5(B)は、CTF(A33)の存在を示すウエスタンブロットング像である。上記12種類のポリペプチドのうち、#7を除く11種類のポリペプチドは、APPに対するセクレターゼの切断活性を阻害することが明らかとなった。

30

【0135】

中でも、#2、#4、#6、#1、#3、#5、#10、#8、及び#9のポリペプチドの順により好適に、セクレターゼのAPPに対する切断活性をより阻害することが明らかとなった。

【0136】

実験例5：セクレターゼ活性阻害実験2

使用するポリペプチドをS4及び#4ポリペプチドとし、これらのポリペプチドの添加量を、最終濃度がそれぞれ1、5、10、20、50、及び100μMとなるように添加した以外は、上記実験例4と同様の実験を行った。

40

【0137】

結果を図5(C)に示す。なお、図中にてcontとあるのは、陰性対照実験としてDMSOを添加したものである。

【0138】

S4ポリペプチドは、#4ポリペプチドには劣るもののAPPに対するセクレターゼの切断活性を阻害することが明らかとなった。また、S4ポリペプチドも#4ポリペプチドも、濃度依存的にセクレターゼのAPPに対する切断活性をより阻害することが明らかとなった。

【0139】

50

〔培養細胞での解析〕

実験例 6 : A タンパク質産生抑制実験 1

A P P タンパク質を安定に発現し、且つ、一過的に N o t c h を発現する C H O - K 1 細胞 (7 W D 1 0 細胞) に対して、 # 1、 # 2、及び # 4 ポリペプチドを作用させて、A タンパク質の産生と、 N o t c h タンパク質の切断を確認する実験を行った。

【 0 1 4 0 】

上記細胞の培養液に、上記 3 種類のポリペプチドをそれぞれ最終濃度が 1、5、10、20、並びに 50 μ M となるように添加した。その後、細胞培養液 (M e d i u m) 或いは細胞破碎液 (C e l l l y s a t e) 中に含まれる s A P P、N I C D、C T F (c 9 9)、及び A タンパク質 (細胞溶解液中に存在するものを i n t r a c e l l u l a r A とし、細胞培養液中に存在するものを r e l e a s e d A とする) それぞれ認識する抗体を用いたウエスタンブロッティング法にて確認した。

10

【 0 1 4 1 】

結果を図 6、図 7 - 1、及び図 7 - 2 にて示す。図中にて 1 μ M L 6 8 5 4 5 8 とあるのは、上記 3 種類のポリペプチドに代えて、最終濃度が 1 μ M となるように セクレターゼの阻害剤である L 6 8 5 4 5 8 を添加した実験結果を示す。

【 0 1 4 2 】

図 6 では、 # 1、 # 2、及び # 4 ポリペプチドの何れを添加した場合でも、その添加した最終濃度に依存して、細胞溶解液中に s A P P が存在しなくなることが示されている。このことは、 # 1、 # 2、及び # 4 の全てのポリペプチドが、7 W D 1 0 細胞にて発現している A P P に対して、内在的な セクレターゼによる切断活性を好適に阻害していることを示している。一方で、セクレターゼの阻害剤である L 6 8 5 4 5 8 には、このような現象は見られなかった。

20

【 0 1 4 3 】

また、 # 1、 # 2、及び # 4 ポリペプチドの何れを添加した場合でも、細胞溶解液中の C T F (C 9 9) 並びに A タンパク質が、添加した最終濃度に依存して減少することが示されている。このことから、 # 1、 # 2、及び # 4 の全てのポリペプチドは、7 W D 1 0 細胞にて発現している C T F か、或いは A P P が セクレターゼによって切断された C T F に対して、内在的な セクレターゼによる切断活性を好適に阻害していることを示している。このような C T F (C 9 9) 並びに A タンパク質が減少する現象は、セクレターゼの阻害剤である L 6 8 5 4 5 8 を添加した場合にも見られた。

30

【 0 1 4 4 】

そして、 # 1、 # 2、及び # 4 ポリペプチドの何れを添加した場合でも、細胞培養液中の A タンパク質も、その添加した濃度に依存して減少し、L 6 8 5 4 5 8 を添加した場合も細胞培養液中の A タンパク質が減少することが明らかとなった。

【 0 1 4 5 】

以上のことから、 # 1、 # 2、及び # 4 ポリペプチドの何れも、A P P を過剰発現する細胞において、内在的な セクレターゼ及び セクレターゼによる切断活性を好適に阻害することが明らかとなった。このことは、 # 1、 # 2、及び # 4 の全てのポリペプチドが、細胞レベルにおいて A タンパク質の産生を抑制することを明らかに示している。

40

【 0 1 4 6 】

そして、 # 1、 # 2、及び # 4 の全てのポリペプチドを添加した場合には、その添加した濃度に係らず、細胞溶解液中に N I C D の存在量を減少させないことが明らかに示されている。一方、セクレターゼの阻害剤である L 6 8 5 4 5 8 を添加した場合には、N I C D の量が減少していることも明らかである。

【 0 1 4 7 】

このことは、 # 1、 # 2、及び # 4 ポリペプチドの何れも、細胞レベルにおいて、A P P に対する セクレターゼによる切断活性、並びに C T F に対する セクレターゼの阻害活性を特異的に阻害するものであり、延いては細胞レベルにおいて、A タンパク質の産生を特異的に阻害する活性を有していることを示している。

50

【0148】

図7-1及び図7-2は、細胞溶解液中のsAPP、NICD、及びAタンパク質並びに細胞溶解液中のAタンパク質の量を、図6にて示すウエスタンブロットング像における各バンドの濃さを基にして定量化したグラフである。グラフの縦軸はコントロールとして用いたDMSOでの結果を100%とした相対値を示す。また、グラフ中の「*」並びに「**」は、それぞれAnova, Scheff's post hoc testによって $P < 0.05$ 、並びに $p < 0.001$ の有意差であることを示している。

【0149】

図7-1及び図7-2に示すグラフからも、セクレターゼの阻害剤であるL685458とは異なり、#1、#2、及び#4ポリペプチドの何れも、細胞レベルにおいて、APPに対するセクレターゼによる切断活性、並びにCTFに対するセクレターゼによる切断活性を特異的に阻害するものであり、延いては細胞レベルにおいて、Aタンパク質の産生を特異的に阻害する活性を有していることを示している。

10

【0150】

実験例7：Aタンパク質産生抑制実験2

使用するポリペプチドをS4ポリペプチドのみとし、その添加量を最終濃度が25及び50 μ Mとなるように添加し、使用する細胞をAPPタンパク質を発現し、且つ、一過的にNotch並びにセクレターゼの基質であるシアル酸転移酵素(st6gal)を発現するCHO-K1細胞(7WD10細胞)を用い、更にAタンパク質の産生と、Notchタンパク質の切断を確認に付け加えて、シアル酸転移酵素の切断の確認を行った以外は、上記実験例6と同様の実験を行った。

20

【0151】

結果を図8に示す。S4ポリペプチドを添加した場合、細胞溶解液中のAタンパク質(intracellular A)は減少するが、細胞溶解液中のNICDの量は減少しないことが明らかとなった。このことから、S4ポリペプチドは、細胞レベルにおいてもセクレターゼの阻害活性を有し、延いてはCTFに対するセクレターゼの切断活性を特異的に阻害することを示している。

【0152】

さらに、S4ポリペプチドを添加した場合には、細胞培養液中のsAPPの産生量を減少させるのに対し、細胞培養液中のst6galの産生量は減少させないことが示されている。このことから、S4ポリペプチドは、細胞レベルにおいてもセクレターゼの阻害活性を有し、延いてはAPPに対するセクレターゼの切断活性を特異的に阻害することを示している。

30

【0153】

そして、S4ポリペプチドを添加した場合には、細胞培養液中のAタンパク質(released A)の量を減少させることも明らかに示されている。以上のことから、S4ポリペプチドは、#1、#2、及び#4ポリペプチドと同様に、細胞レベルにおいてもAタンパク質の産生を特異的に阻害する活性を有していることを示している。

【0154】

〔動物への投与〕

40

実験例8：Aタンパク質産生抑制実験

50% DMSOを溶媒とした#4ポリペプチド溶液をC57BL/6マウスに0.2ng/gとなるように投与した。投与は、上記マウスの右側海馬に直接投与した。投与後3時間後、右側海馬を摘出し、TBSと6M塩酸グアニジンにより抽出したAタンパク質の量をサンドウィッチELISA法(製品名：ヒト/ラットアミロイド(40)ELISAキット ワコー免疫化学〔型番294-62501〕；製品名：ヒト/ラットアミロイド(42)ELISAキット ワコー免疫化学〔型番290-62501〕；共に和光純薬)にて測定した。陰性対照実験として、#4ポリペプチドとは逆順のアミノ酸配列を有するポリペプチド(rev#4：配列番号19)を、同一マウスの左側海馬に投与した。

50

【0155】

結果を図9に示す。図9は、マウスから採取したAタンパク質を定量化したグラフである。グラフの縦軸はコントロールとして用いた陰性対照実験としてrev#4ポリペプチド投与した際に採取したでのAタンパク質の量を100%とした相対値を示す。

【0156】

#4ポリペプチドは、マウス個体に投与しても上述の実験例6の結果と同様にAタンパク質の産生を顕著に抑制することが明らかとなった。そして、この結果から#1、#2及びS4ポリペプチドをマウス個体に投与しても、#4ポリペプチドと同様にAタンパク質の産生を顕著に抑制することが期待される。

【0157】

〔培養細胞での解析：その2〕

実験例9：細胞内分布の検討

公知の方法を用いてビオチン修飾化#4ポリペプチドを作製した。これをCHO-K1細胞、及び上述の7WD10細胞に作用させた後に、細胞を固定化し、次いでTriton X-100処理を施した。その後、アビジン修飾されたAlexa488を作用させた。陰性対照として、ビオチン修飾化#4ポリペプチドを作用させず、アビジン修飾されたAlexa488を作用させた実験を行った。結果を図10に示す。内在性のAPPタンパク質を低レベルで発現するCHO-K1細胞では、細胞内において#4ポリペプチドがAPPと結合する事が明らかとなった。また、APPを過剰発現する7WD10細胞では、細胞内のAPPに対しても顕著に結合する事が明らかとなった。

【0158】

これらの結果から、#4ポリペプチドは細胞内に侵入し、細胞表面に露出する前のAPPにも結合する機能を発揮する事が明らかとなった。この事は、結果的にAの産生を抑制する事を示唆している。

【0159】

実験例10：マウス型A産生阻害実験

CHO-K1細胞及びNeuro2A細胞(N2A)の培養液に、#1、#2、及び#4ポリペプチドを最終濃度が20µMとなるように添加した。コントロールとして、最終濃度が20µMとなるようにセクレターゼの阻害剤であるL685458及びDMSOを添加した。

【0160】

その後、細胞培養液中に含まれるAを、これを認識する抗体(抗マウスA抗体)を用いたウエスタンブロッティング法にて確認した。結果を図11に示す。

図中にてLとあるのは、にセクレターゼの阻害剤であるL685458(最終濃度1µM)を示す。#1、#2、及び#4ポリペプチドの何れを添加した場合でも、CHO-K1及びNeuro2A細胞に対しても、Aの培地中での産生量が減少することが示されている。CHO-K1細胞及びNeuro2A細胞の何れも、マウス型のAPPを発現する事から、#1、#2、及び#4の全てのポリペプチドは、マウス型のAタンパク質の産生を抑制することを明らかに示している。

【0161】

〔動物への投与：その2〕

実験例11：マウスの腹腔内への投与

10匹の野生型マウス(C57BL/6N CrSlc、7週齢)の腹腔内に、DMSOに溶解した#4ポリペプチドを150mg/kg投与した。投与は3日連続して行い、4日の後にマウスを安楽死させ、大脳を摘出した。

【0162】

摘出した大脳を公知の方法で溶解し、抗4G8抗体で免疫沈降を行った後に、抗マウスA抗体を用いたウエスタンブロッティングに供した。陰性対照として、DMSOのみを投与した群(10匹)も同様に実験を行った。

【0163】

10

20

30

40

50

また、ウエスタンブロッティングでは、5、10、50、100、及び200 pgのゲッ歯類由来のA を標準物質として実験を行った。結果を図10の(A-1)及び(A-2)に示す。

【0164】

陰性対照(1~5及び6~10)のA を示すバンドと比較して、#4ポリペプチドを腹腔内投与したマウスでは、大脳中のA を示すバンドが減少する事が明らかとなった。また、これらのバンドをデンシトメトリーで定量化した結果を示す図10のBからは、#4ポリペプチドが、優れたA の産生抑制効果を発揮する事も明らかとなった。

【0165】

次いで、公知の方法を用いて作製した、FITC修飾化#4ポリペプチドをマウスの腹腔内に投与した。投与量は150 mg/kgで3日間連続して行い、投与から4日後にマウスを安楽死させ、海馬組織周辺の切片を作製した。陰性対照として、FITC修飾化#4ポリペプチドに変えて、DMSOを投与した。この切片を蛍光顕微鏡解析した結果を図12のCに示す。

【0166】

図中のCA1とは、CA1野と呼ばれる部位であり、ここでは陰性対照と比較して、#4ポリペプチドの存在を示す緑色に染色された部位が確認された。また、図中のDGは歯状回(Dentate Gyrus)と呼ばれる部位であり、ここでも、#4ポリペプチドの存在を示す緑色に染色された部位が確認された。そして、図中のCP LVとは、脈絡叢と呼ばれる脳脊髄液を産生する部位であり、ここで血管において#4ポリペプチドの存在を示す緑色に染色された部位が確認された。

【0167】

実験例12：A タンパク質産生抑制実験3

実験例6と同様に、APPタンパク質を安定に発現し、且つ、一過的にNotchを発現するCHO-K1細胞(7WD10細胞)に対して、#4、L13、S2、及びS4ポリペプチドを作用させて、A タンパク質の産生と、Notchタンパク質の切断を確認する実験を行った。

【0168】

上記細胞の培養液に、上記4種類のポリペプチドを、図に示すように、それぞれ最終濃度が25又は50 μM(#4ポリペプチドについては25 μMのみ)となるように添加した。その後、細胞培養液(Medium)のA タンパク質と細胞破砕液(Cell lysate)中のNICDをそれぞれ認識する抗体を用いたウエスタンブロッティング法にて確認した。

【0169】

結果を図13にて示す。図中にてDMSOとあるのは、ネガティブコントロールの結果を示している。

【0170】

図13では、S2ポリペプチドは、最終濃度を50 μMとして使用した場合に、上述した#4ポリペプチド及びS4ポリペプチドと同程度にA タンパク質の産生を抑制する効果を発揮することを明らかに示している。また、NICDについてはなんら影響を及ぼさなかった。従って、S2ポリペプチドも、A タンパク質の産生を特異的に阻害する活性を有していることを示している。

【0171】

一方で、L13ポリペプチドは、NICDには何ら影響を及ぼさないが、A の産生量を抑制することはできなかった。

【0172】

以上の結果から、本発明に係るポリペプチドは、腹腔内に投与しても脳に到達し、脳内のA の産生を抑制する効果を発揮する事が明らかに示された。また、本発明に係るポリペプチドは、マウス型のA のみならず、ヒト型のA の産生を抑制する事が明らかであるために、ヒトに投与しても、脳内のA の産生を抑制する効果を発揮することも示唆さ

10

20

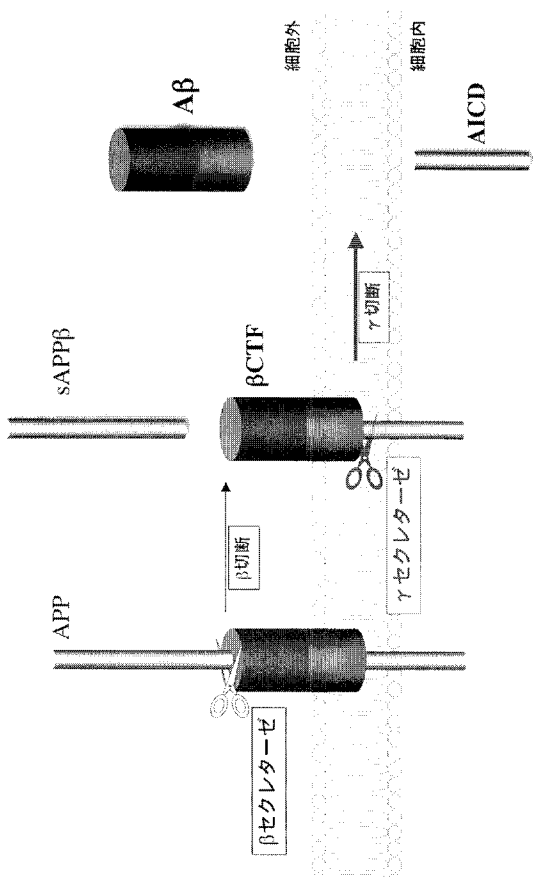
30

40

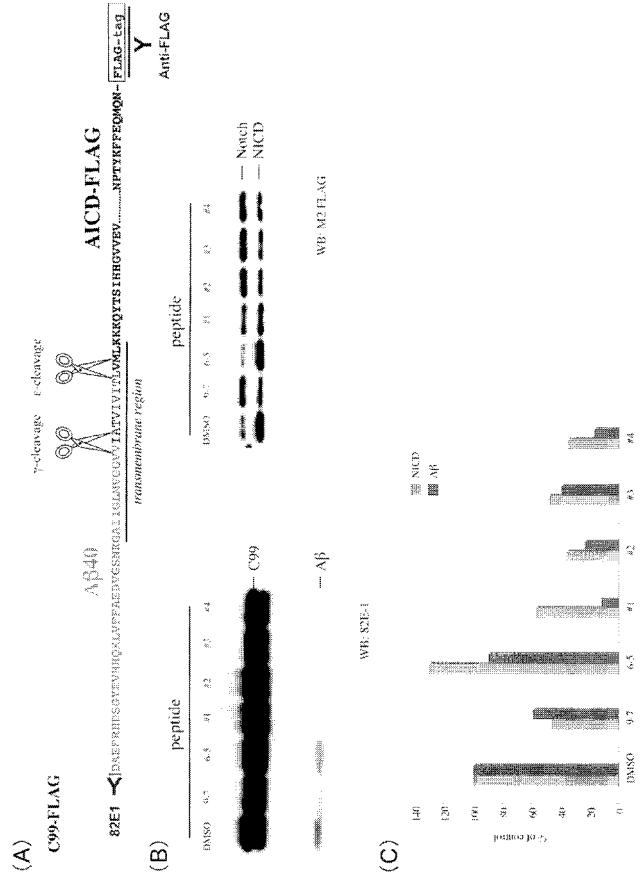
50

れる。

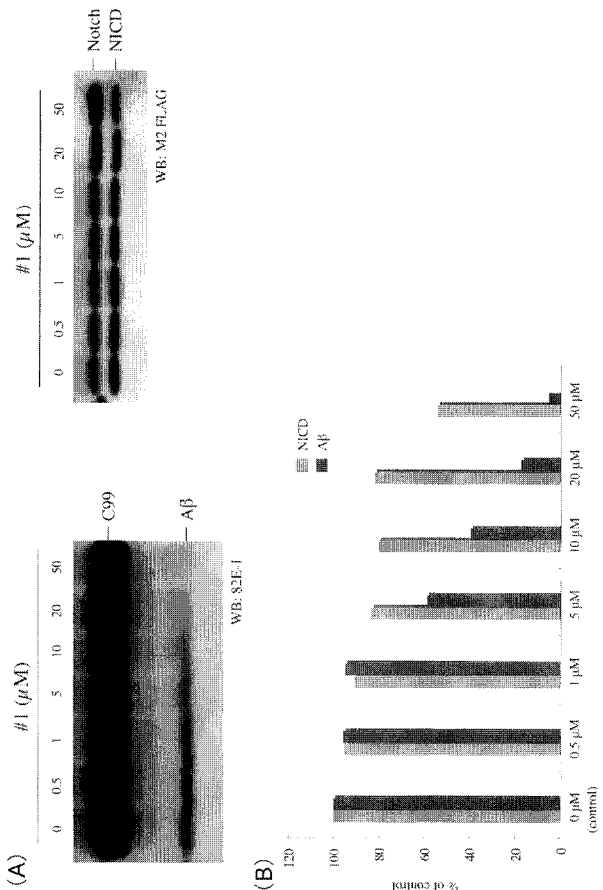
【 図 1 】



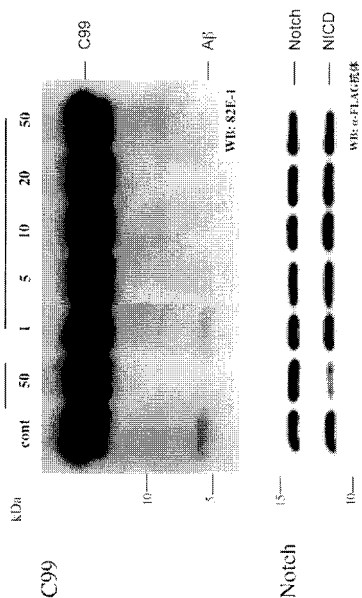
【 図 2 】



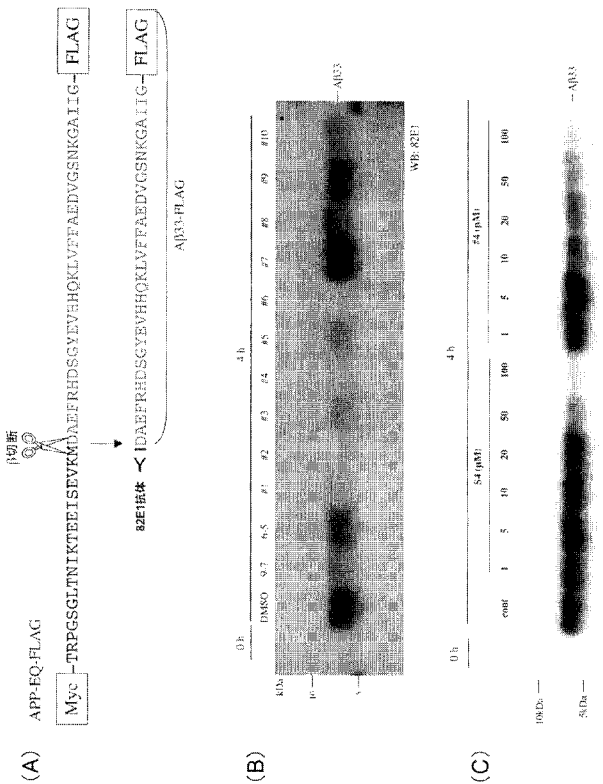
【 3 】



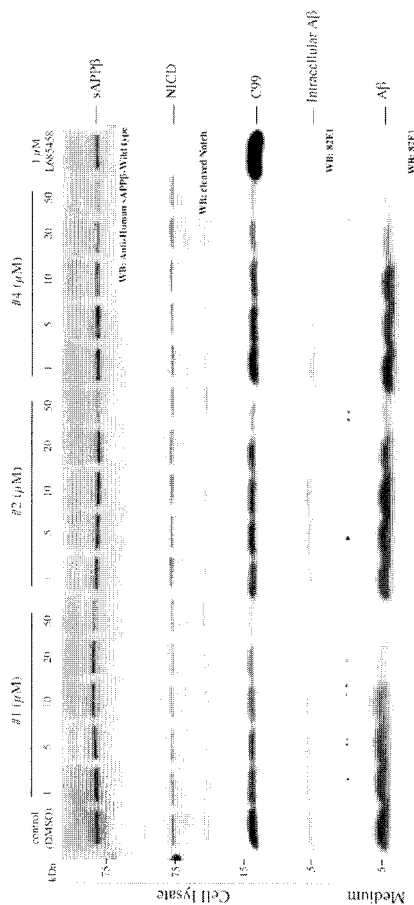
【 4 】



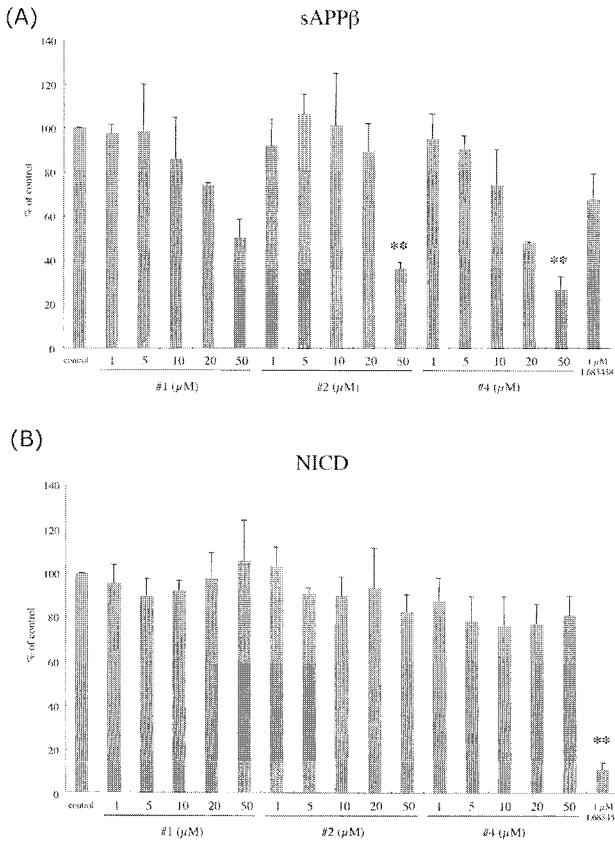
【 5 】



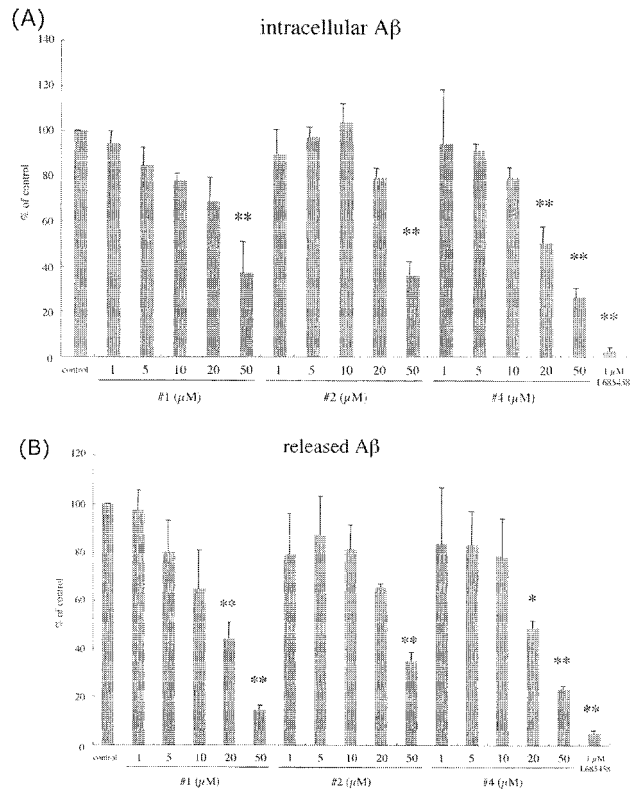
【 6 】



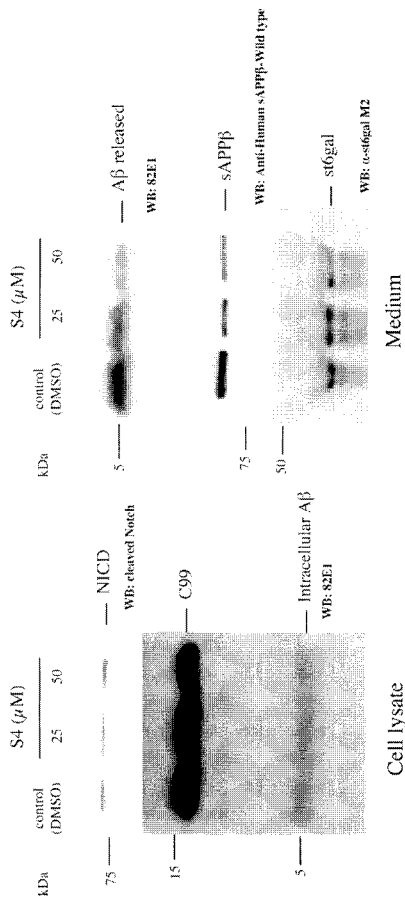
【 図 7 - 1 】



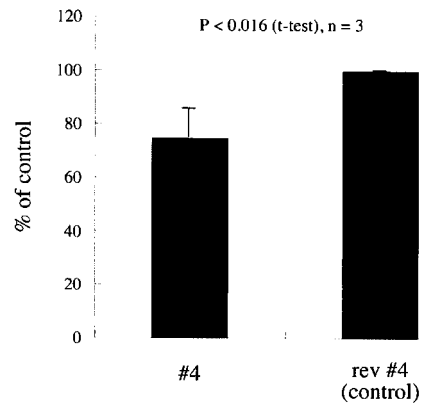
【 図 7 - 2 】



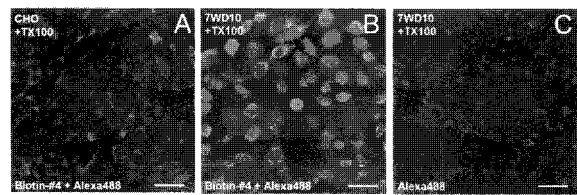
【 図 8 】



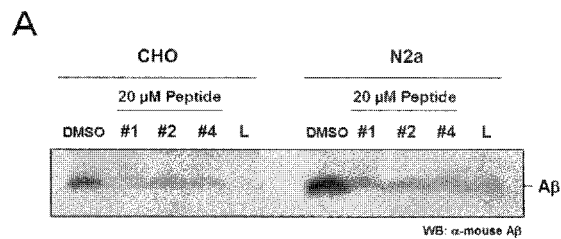
【 図 9 】



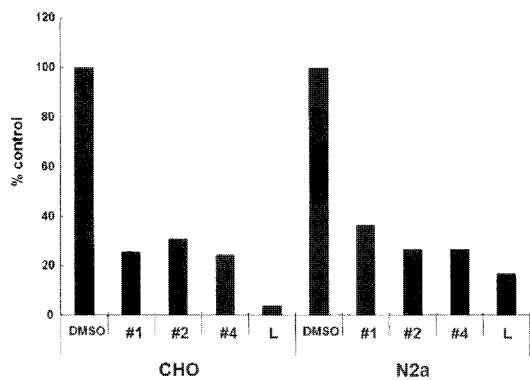
【 図 10 】



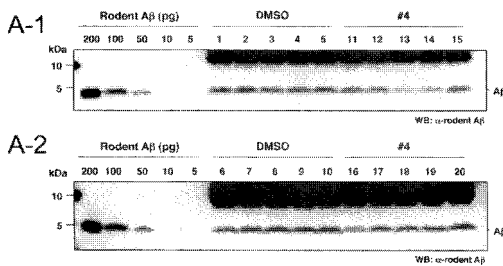
【 1 1 】



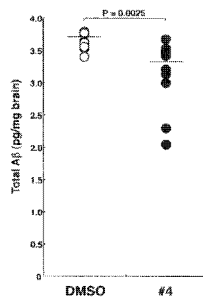
B



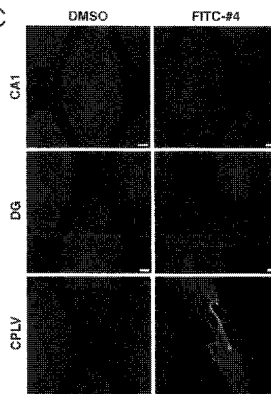
【 1 2 】



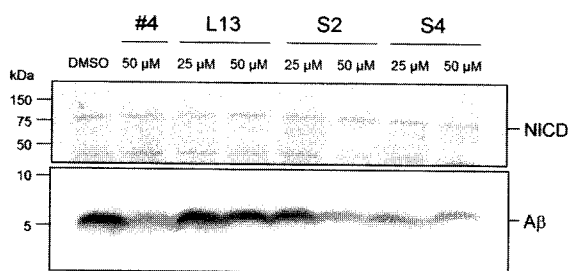
B



C



【 1 3 】



【配列表】

2013108780000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年5月17日(2013.5.17)

【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】

配列番号1、13、14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有し、C
TFのN末端領域に結合するポリペプチド。

【請求項2】

配列番号2～14、及び22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を有する、請求項1
に記載のポリペプチド。

【請求項3】

配列番号2～8、10～12、14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配列を
有する、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】

配列番号3、4、6、10、11、14、又は22の何れか1つにて示されるアミノ酸配
列を有する、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項5】

請求項1～4の何れか1項に記載のポリペプチドを含む、セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項6】

配列番号3～6、及び14の何れか1つにて示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド
を含む、セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項7】

請求項1～4の何れか1項に記載のポリペプチドを含む、セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項8】

配列番号3、4、6、8、又は14にて示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含
む、セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項9】

請求項1～4の何れか1項に記載のポリペプチドを含む、A タンパク質産生抑制剤。

【請求項10】

配列番号3、4、6、14、又は22にて示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを
含む、A タンパク質産生抑制剤。

【請求項11】

請求項1～4の何れか1項に記載のポリペプチドを含む、アルツハイマー病治療及び/又
は予防剤。

【請求項12】

配列番号3、4、6、14、又は22にて示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを
含む、アルツハイマー病治療及び/又は予防剤。

【請求項13】

請求項1～4の何れか1つに記載のポリペプチドを、アルツハイマー病患者に投与する工
程を含む、アルツハイマー病を治療及び/又は予防する方法。

【請求項14】

アルツハイマー病の治療及び/又は予防における使用のための、請求項1～4の何れか1
つに記載のポリペプチド。

【請求項15】

アルツハイマー病を治療及び/又は予防するための、医薬の製造のための、請求項1～4の何れか1つに記載のポリペプチドの使用。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

[図13] 本発明に係るポリペプチドの、Aタンパク質産生抑制実験結果を示す図。発明を実施するための形態

[0113]

以下に本発明をより詳細に説明するための実施例を記載する。なお、本発明が以下に示す実施例に記載の内容に限定されないのは言うまでもない。

<実施例>

〔ポリペプチドの作製〕

CTFのN末端領域に該当するポリペプチドである配列番号15にて示されるポリペプチド(Amyloid 1-9)に対して特異的に結合するポリペプチドを、ポリペプチドスクリーニング技術を用いて同定し、製造した。

[0114]

[表2]

配列番号	ペプチド名	アミノ酸配列 (N末端→C末端)
2	9-7	MNTLICDCYCSLTRCFCYSCVDS
3	#1	MSIRVCDYCHGDLFCYSCINS
4	#2	MDTVICDCYCDNYVCFYSCSHV
5	#3	MGLISDCYCDSTACFCYSC TDF
6	#4	MHLVICDCYCTTDICYCYSC TPN
7	#5	MVPVVCDCYCFLSVCFYSCYIT
8	#6	MLYTSCDCYCDAFSCFCYSCGPY
9	#7	MRIFDCDCYCYRDICYCYFCTR H
10	#8	MGRVNCDCYCI GHYCYCYCHNI
11	#9	MPLSICDCYCI STICYCYFCVHR
12	#10	MPTVYDCYCAYNACYCYCRSD
13	6-5	MHHVYDCYCFGPVCYCHSCT
14	S4	FGBTWDYWVYR
22	S2	FRBGWVYTYTV
23	L13	MLICDCYCDPRSCICGSCTLV

※上記のポリペプチドは全てアミノ末端がアセチル化されており、カルボキシ末端はアミド化されている。ペプチド名S4 (配列番号14) 及びS2 (配列番号22) のBはL-4, 4'ピフェニルアラニン (Bph) 残基である。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 3 0 】

した。投与は3日連続して行い、4日の後にマウスを安楽死させ、大脳を摘出した。

[0 1 6 2]

摘出した大脳を公知の方法で溶解し、抗4G8抗体で免疫沈降を行った後に、抗マウスA抗体を用いたウエスタンブロッティングに供した。陰性対照として、DMSOのみを投与した群(10匹)も同様に実験を行った。

[0 1 6 3]

また、ウエスタンブロッティングでは、5、10、50、100、及び200pgのゲッ歯類由来のAを標準物質として実験を行った。結果を図12の(A-1)及び(A-2)に示す。

[0 1 6 4]

陰性対照(1~5及び6~10)のAを示すバンドと比較して、#4ポリペプチドを腹腔内投与したマウスでは、大脳中のAを示すバンドが減少する事が明らかとなった。また、これらのバンドをデンストメトリーで定量化した結果を示す図12のBからは、#4ポリペプチドが、優れたAの産生抑制効果を発揮する事も明らかとなった。

[0 1 6 5]

次いで、公知の方法を用いて作製した、FITC修飾化#4ポリペプチドをマウスの腹腔内に投与した。投与量は150mg/kgで3日間連続して行い、投与から4日後にマウスを安楽死させ、海馬組織周辺の切片を作製した。陰性対照として、FITC修飾化#4ポリペプチドに変えて、DMSOを投与した。この切片を蛍光顕微鏡解析した結果を図12のCに示す。

[0 1 6 6]

図中のCA1とは、CA1野と呼ばれる部位であり、ここでは陰性対照と比較して、#4ポリペプチドの存在を示す緑色に染色された部位が確認された。また、図中のDGは歯状回(Dentate Gyrus)と呼ばれる部位であり、ここでも、#4ポリペプチドの存在を示す緑色に染色された部位が確認された。そして、図中のCPLVとは、脈絡叢と呼ばれる脳脊髄液を産生する部位であり、ここで血管において#4ポリペプチドの存在を示す緑色に染色された部位が確認された。

[0 1 6 7]

実験例12：A タンパク質産生抑制実験3

実験例6と同様に、APPタンパク質を安定に発現し、且つ、一過的にNotchを発現するCHO-K1細胞(7WD10細胞)に対して、#4、

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2013/050663
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K14/00(2006.01)i, A61K38/55(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K14/00, A61K38/55, A61P25/28, A61P43/00, C07K7/06		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/0176711 A1 (CHAE Chi-Bom), 09 July 2009 (09.07.2009), paragraphs [0013] to [0038] (Family: none)	1-12, 14-15
A	SHAH S., et al., Nicastrin Functions as a gamma-Secretase-Substrate Receptor, Cell, 2005, Vol. 122, pp.435-447	1-12, 14-15
A	WO 2009/068269 A1 (FU BERLIN), 04 June 2009 (04.06.2009), pages 1 to 2 & US 2010/0291596 A1 & EP 2065472 A1 & EP 2222869 A1	1-12, 14-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 February, 2013 (05.02.13)		Date of mailing of the international search report 12 February, 2013 (12.02.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/050663

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.: 13
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 13 pertains to method for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 5 0 6 6 3	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/00(2006.01)i, A61K38/55(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/00, A61K38/55, A61P25/28, A61P43/00, C07K7/06			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CPlus/Biosis/MEDLINE/WPIDS/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
A	US 2009/0176711 A1 (CHAE Chi-Bom) 2009.07.09, 段落【0013】 - 【0038】 (ファミリーなし)	1-12, 14-15	
A	SHAH S., et al., Nicastrin Functions as a gamma-Secretase-Substrate Receptor, Cell, 2005, Vol. 122, pp. 435-447	1-12, 14-15	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 05.02.2013		国際調査報告の発送日 12.02.2013	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高山 敏充	4 B 4 1 5 3
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2013/050663
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2009/068269 A1 (FU BERLIN) 2009.06.04, 第 1-2 頁 & US 2010/0291596 A1 & EP 2065472 A1 & EP 2222869 A1	1-12, 14-15

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 5 0 6 6 3

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 13 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01) A 6 1 P 25/28

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA18 BA44 CA18 CA59 DC32 NA14
 ZA162 ZC202
 4H045 AA10 AA30 BA16 BA17 DA55 EA21 FA71

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。