

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5219225号  
(P5219225)

(45) 発行日 平成25年6月26日(2013.6.26)

(24) 登録日 平成25年3月15日(2013.3.15)

(51) Int.Cl. F I  
**A 6 1 K 39/00 (2006.01)** A 6 1 K 39/00 Z N A H  
**A 6 1 P 25/28 (2006.01)** A 6 1 P 25/28

請求項の数 6 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2009-538294 (P2009-538294)	(73) 特許権者	504258527
(86) (22) 出願日	平成20年10月22日(2008.10.22)		国立大学法人 鹿児島大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/069586		鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
(87) 国際公開番号	W02009/054537	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成21年4月30日(2009.4.30)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成22年10月28日(2010.10.28)	(74) 代理人	100096183
(31) 優先権主張番号	特願2007-277638 (P2007-277638)		弁理士 石井 貞次
(32) 優先日	平成19年10月25日(2007.10.25)	(74) 代理人	100118773
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100101904
			弁理士 島村 直己
		(72) 発明者	杉村 和久
			鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人鹿児島大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロイドβペプチドのミミック分子を用いたペプチドワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号16、23、26もしくは27で示されるペプチド、又は該ペプチドと担体との結合物を含有するアミロイド線維化阻害剤。

【請求項2】

配列番号16もしくは23で示されるアミノ酸配列と、次式：

Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg

で示されるTAT配列とからなるペプチド、又は該ペプチドと担体との結合物を含有するアミロイド線維化阻害剤。

【請求項3】

更にアジュバントを含有する請求項1又は2記載のアミロイド線維化阻害剤。

【請求項4】

アルツハイマー病の予防・治療剤である請求項1～3のいずれか1項に記載のアミロイド線維化阻害剤。

【請求項5】

配列番号9、16、23、24、25、26もしくは27で示されるペプチド、又は該ペプチドと担体との結合物からなる免疫原。

【請求項6】

配列番号9、16もしくは23で示されるアミノ酸配列と、次式：

Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg

で示される T A T 配列とからなるペプチド、又は該ペプチドと担体との結合物からなる免疫原。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病の予防・治療剤として有用なペプチドワクチンに関する。

【背景技術】

【0002】

近年、老人人口の増加に伴い、老人性痴呆症の治療に有効な医薬品の開発が強く望まれている。老人性痴呆症の代表的疾患であるアルツハイマー病は、脳の萎縮、老人斑の沈着及び神経原線維変化を特徴とする神経変性疾患で、アミロイド ペプチドの形状変化と、それに伴う線維化による不溶化分子が神経細胞に沈着し、その毒性により神経細胞の死が誘導され、発症する。

10

アミロイド ペプチド(A<sub>β</sub>)はニューロンアミロイド前駆体蛋白質から セクレターゼなどによる切断で生じる分解物で、A<sub>β</sub> 1-40とA<sub>β</sub> 1-42の2種が生成するが、A<sub>β</sub> 1-42の方がより凝集しやすく、疾患及び神経毒性と関連することが報告されている。

アミロイド ペプチドの形状変化及び線維化を阻害できれば、アルツハイマー病の発症を阻止することができる。

国際公開第2005/105998号パンフレットには、A<sub>β</sub> 1-42と特異的に結合し、その線維化反応を阻害する活性を有する一本鎖抗体がアルツハイマー病の予防・治療剤として有用であることが記載されている。

20

しかしながら、抗体は高分子の蛋白質であるため高価であり、生産、精製工程の煩雑化、あるいは安定性の欠如といった問題を有する。

ヒトにおいて、この免疫反応を誘導する手段は、ワクチンを開発することであるが、この免疫抗原として何を使用するかが最も重要な問題点である。

現在アルツハイマー病の予防及び治療のためにペプチドをワクチンとする試みには、正常なアミロイド のアミノ酸配列の一部を抗原として用いるという多数の報告(例えば、国際公開第2006/121656号パンフレット、G. G. Kinney et al., A Novel anti-amyloid beta active vaccine approach for the treatment of Alzheimer's and related disorders Neuro-degenerative Diseases, 4: supplement 1, p. 251, 2007)とアミロイド のミモトープと呼ぶ新規に開発したペプチド配列を抗原として用いる報告(特表2006-515876号公報、M. Mandler et al., The AFFiRis mimotope vaccine: A novel approach for the treatment of AD, Neuro-degenerative Diseases, 4: supplement 1, p. 250, 2007)がある。

30

【発明の開示】

40

【0003】

本発明は、アミロイド ペプチドのミミックペプチドから、異常アミロイド ペプチドに特異的な抗体の産生を誘導するペプチドを見出し、これをワクチン又は免疫原として利用することを目的とする。

本発明の要旨は以下のとおりである。

(1) 次式(I):

Tyr - Gly - Thr - Lys - Pro - Trp - Met (I)

で示されるアミノ酸配列、及び

次式(II):

Leu - Asp - Ile - Phe - Ala - Pro - Ile (II)

50

で示されるアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、アミノ酸残基数8～30のペプチド、又は該ペプチドと担体との結合物を含有する医薬組成物。

(2) 次式(Ia) :

Cys - Tyr - Gly - Thr - Lys - Pro - Trp - Met - Cys

(Ia)

(式中、2つのシステイン残基は架橋されていてもよい。)

で示されるアミノ酸配列、

次式(Ib) :

Ser - Tyr - Gly - Thr - Lys - Pro - Trp - Met - Ser - Gly

(Ib)

10

で示されるアミノ酸配列、及び

次式(IIa) :

Gly - Met - Leu - Asp - Ile - Phe - Ala - Pro - Ile - Arg  
- His - Val (IIa)

で示されるアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、アミノ酸残基数9～30のペプチド、又は該ペプチドと担体との結合物を含有する前記(1)に記載の医薬組成物。

(3) 前記ペプチドが、前記アミノ酸配列と、次式 :

Tyr - Gly - Arg - Lys - Lys - Arg - Arg - Gln - Arg - Arg  
- Arg

20

で示されるTAT配列とを含む、アミノ酸残基数20～30のペプチドである前記(1)又は(2)に記載の医薬組成物。

(4) 更にアジュバントを含有する前記(1)～(3)のいずれかに記載の医薬組成物。

(5) アミロイド線維化阻害剤である前記(1)～(4)のいずれかに記載の医薬組成物。

(6) アルツハイマー病の予防・治療剤である前記(1)～(5)のいずれかに記載の医薬組成物。

(7) 次式(I) :

Tyr - Gly - Thr - Lys - Pro - Trp - Met (I)

で示されるアミノ酸配列、及び

30

次式(II) :

Leu - Asp - Ile - Phe - Ala - Pro - Ile (II)

で示されるアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、アミノ酸残基数8～30のペプチド、又は該ペプチドと担体との結合物からなる免疫原。

(8) 次式(Ia) :

Cys - Tyr - Gly - Thr - Lys - Pro - Trp - Met - Cys

(Ia)

(式中、2つのシステイン残基は架橋されていてもよい。)

で示されるアミノ酸配列、

次式(Ib) :

Ser - Tyr - Gly - Thr - Lys - Pro - Trp - Met - Ser - Gly

(Ib)

40

で示されるアミノ酸配列、及び

次式(IIa) :

Gly - Met - Leu - Asp - Ile - Phe - Ala - Pro - Ile - Arg  
- His - Val (IIa)

で示されるアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、アミノ酸残基数9～30のペプチド、又は該ペプチドと担体との結合物からなる前記(7)に記載の免疫原。

(9) 前記ペプチドが、前記アミノ酸配列と、次式 :

Tyr - Gly - Arg - Lys - Lys - Arg - Arg - Gln - Arg - Arg

50

- A r g

で示されるT A T配列とを含む、アミノ酸残基数20～30のペプチドである前記(7)又は(8)に記載の免疫原。

本発明に用いるペプチドは、

次式(I)：

T y r - G l y - T h r - L y s - P r o - T r p - M e t ( I )

で示されるアミノ酸配列、及び

次式(II)：

L e u - A s p - I l e - P h e - A l a - P r o - I l e ( I I )

で示されるアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、アミノ酸残基数8～30のペプチドである。 10

本発明に用いるペプチドは、前記式(I)で示されるアミノ酸配列と前記式(II)で示されるアミノ酸配列とを含んでいてもよい。

本発明に用いるペプチドとしては、例えば

次式(Ia)：

C y s - T y r - G l y - T h r - L y s - P r o - T r p - M e t - C y s

( I a )

(式中、2つのシステイン残基は架橋されていてもよい。)

で示されるアミノ酸配列、

次式(Ib)：

S e r - T y r - G l y - T h r - L y s - P r o - T r p - M e t - S e r - G l y

( I b )

で示されるアミノ酸配列、及び

次式(IIa)：

G l y - M e t - L e u - A s p - I l e - P h e - A l a - P r o - I l e - A r g  
- H i s - V a l ( I I a )

で示されるアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、アミノ酸残基数9～30のペプチドが挙げられる。

本発明に用いるペプチドにおいて、前記式(I)又は(II)で示されるアミノ酸配列以外のアミノ酸配列は、これらのアミノ酸配列により構成されるペプチドが薬学的に許容されるものであれば特に制限はなく、例えば次式： 30

T y r - G l y - A r g - L y s - L y s - A r g - A r g - G l n - A r g - A r g  
- A r g

で示されるT A T配列、ペプチドの溶解性を高めるアミノ酸配列(例えば、アルギニン、リジン等の塩基性アミノ酸からなる配列)、細胞膜透過性を促進するアミノ酸配列(例えば、レプチン、IGF-1、IGF-2、インスリン、トランスフェリンの部分配列；1) W. M. Pardridge, Vector-mediated drug delivery to the brain, Advanced Drug Delivery Reviews, 36: 299-321, 1999; 2) W. M. Pardridge, Drug and gene targeting to the brain with molecular trojan horses, Nature Reviews | Drug discovery, 1: 131-139, 2002)が挙げられる。 40

本発明に用いるペプチドは、公知の方法によって化学合成することができ、例えばペプチド自動合成装置によって合成することができる。この基本的な合成過程はR. B. Merrifield, Advance in Enzymology 32: 221-296 (1969)に記載の方法を適用できる。この方法は、カルボキシル末端のアミノ酸を樹脂担体に共有結合させておき、-アミノ基の保護基の除去、保護アミノ酸の縮合を順次繰返して、アミノ末端に向けてペプチド鎖を延長させ目的のアミノ酸配列を有するペプチド樹脂を得ることを原理とするものである。

各アミノ酸の縮合や-アミノ基の保護基の除去等は、Boc, Fmoc法を利用して 50

ほぼ同一の条件でなされ、中間体の精製も行わないため、合成に際しては一般に高度な熟練は要求されない。しかもこの方法は迅速であり、種々のペプチドを合成するに際し、非常に便利な方法である。こうして得られた保護ペプチド樹脂を、例えば無水フッ化水素、トリフルオロメタンスルホン酸もしくはトリフルオロ酢酸と種々の添加物の共存下に反応させることにより、ペプチドを樹脂から脱離させることと全保護基の除去を一段階で行うことができる。

樹脂担体としてカルボキシル末端カルボン酸型ペプチド合成用樹脂を用いれば、カルボキシル末端がカルボキシル基であるペプチドを得ることができ、カルボキシル末端アミド型ペプチド合成用樹脂を用いれば、カルボキシル末端カルボン酸がアミド化されたペプチドを得ることができる。

10

得られたペプチド粗製物は、ペプチドを精製する公知の手段で精製することができる。例えば、ゲル濾過、陽イオン交換樹脂もしくは陰イオン交換樹脂を用いるイオン交換クロマトグラフィー、更には疎水クロマトグラフィー、分配吸着クロマトグラフィーなど、種々の原理によるカラムクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーが挙げられる。

本発明に用いるペプチドは、システイン残基の間で架橋されていてもよい。これらの架橋としては、システイン残基間を直接ジスルフィド架橋してもよく、またスペーサーとしてジスルフィド化合物を用いて、スペーサーを介してジスルフィド架橋してもよい。ジスルフィド架橋は、例えばペプチドの希釈水溶液を $K_3[Fe(CN)_6]$ で酸化、又は酸性条件下のヨウ素で酸化することにより形成することができる。

本発明に用いるペプチドは種々の塩の形で得ることができる。その塩としては、例えば無機酸や、蟻酸、酢酸、酒石酸、クエン酸などの有機酸との塩、もしくはナトリウムやアンモニアなどの無機塩基や、トリエチルアミン、エチルアミン、メチルアミンなどの有機塩基との塩が挙げられる。

20

本発明に用いるペプチド(以下「ミミックペプチド」という。)は、免疫原性を増強するため、タンパク質、多糖類、糖タンパク質等の担体と結合させて用いることが好ましい。担体としては、ヒトに免疫原性を有する分子であれば利用できるが、好ましくはそれ自身がヒトに有害でないとともに、この分子に免疫応答が誘導されても、ヒトに副作用が発生しないものを用いる。好ましい担体としては、細菌やウイルス由来の分子、例えば、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、百日咳ワクチン、又はこれらの3種混合ワクチン; BCGワクチン、スカシ貝ヘモシアニン(key hole limpet hemocyanin)、Neisseria meningitidisのouter membrane protein complex(OMPC)、デキストラン、マンノース、マンナン等が挙げられる。また、本発明の組成物を経口投与する場合は、食品のタンパク質成分にミミックペプチドを結合させてもよく、また遺伝子改変によりこのペプチド配列を含む食品タンパク質を作成し、これを食品として食すことにより経口免疫してもよい。

30

担体は、本発明に用いるミミックペプチドのアミノ末端、カルボキシル末端、配列途中のアミノ酸残基のいずれに結合させてもよく、また1分子の担体に複数のミミックペプチドを結合又は重合させてもよい。

ミミックペプチドを担体に結合させる方法としては、特に制限はないが、例えば1)共有結合で直接結合させる、2)クロスリンカーで架橋する(例えば、グルタルアルデヒド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド法、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、ビスジアゾ化ペンジジン法又はN-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法)、3)ピオチンとストレプトアビジン又はアビジンとの結合を利用する等の方法、4)DNA配列として直列に融合するよう配置して遺伝子組換え体として作製する手法が挙げられる。ミミックペプチドのピオチン化はアミノ末端、カルボキシル末端、配列途中のアミノ酸残基のいずれでもよい。ペプチドのアミノ基のピオチン化はアミノ酸誘導体を樹脂上で縮合する通常のHOBt-DCC, HBTu-HOBt方法などで可能である。

40

ミミックペプチド、又はミミックペプチドと担体の結合物は、アジュバントと混合して

50

投与することが好ましい。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の、ヒトワクチンに利用される公知のものを用いることができる。

本発明の医薬組成物は、異常アミロイド ペプチドに特異的な抗体の産生を誘導する作用を有し、ワクチンとしてアルツハイマー病の予防・治療に用いることができる。

本発明の免疫原は、異常アミロイド ペプチドに特異的な抗体の産生を誘導する作用を有し、異常アミロイド ペプチドに特異的な抗体の製造に用いることもできる。

本発明に用いるミミックペプチド、又は該ペプチドと担体との結合物（以下「ワクチン成分」という。）を含有する組成物は、そのまましくは自体公知の薬学的に許容される担体、賦形剤等と混合した医薬組成物として経口又は非経口的（好ましくは皮下、皮内、点鼻）に投与することができる。

10

経口投与のための剤形としては、具体的には錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。かかる剤形は、自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体もしくは賦形剤を含有するものである。例えば錠剤用の担体、賦形剤としては、ラクトース、マルトース、ショ糖、澱粉、ステアリン酸マグネシウム等が挙げられる。また、前記のように食品のタンパク質成分にミミックペプチドを結合させた場合及び遺伝子改変によりこの当該ペプチド配列を含む食品タンパク質を作成した場合は、食品として食すこともできる。

非経口投与のための剤形としては、例えば、注射剤、湿布剤、坐薬、経鼻吸収剤、経肺吸収剤、経皮吸収剤、局所徐放剤等が挙げられる。溶液製剤は自体公知の方法、例えば、ワクチン成分を通常、注射剤に用いられる無菌の水溶液に溶解、更には乳化して、リポソームに包埋させた状態で調製されうる。ペプチドは生体内でペプチダーゼ等による分解を受け易く、また目的の場所への到達性の問題等があることから、ここに述べたリポソームを含む適切なデリバリー法の活用は好ましい使用形態の一つである。ペプチドのデリバリー法の活用については前記リポソームを用いる方法はその一つであるが、これに限られたものではない。固体製剤は、自体公知の方法、例えば、ワクチン成分にマンニトール、トレハロース、ソルビトール、ラクトース、グルコース等を賦形剤として加え、そのまま凍結乾燥することにより調製されうる。更にこれを粉体化して用いることもできる。また、これら粉体をポリ乳酸やグリコール酸等と混合し固体化して用いることもできる。ゲル化剤は、自体公知の方法、例えば、ワクチン成分をグリセリン、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸等の増粘剤や多糖に溶解した状態で調製されうる。

20

30

いずれの製剤においても、安定化剤としてヒト血清アルブミン、ヒト免疫グロブリン、<sub>2</sub>マクログロブリン、アミノ酸等を添加することができ、また分散剤あるいは吸収促進剤としてワクチン成分の活性を損なわない範囲でアルコール、糖アルコール、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤等を添加することができる。また、微量金属や有機酸塩も必要に応じて加えることができる。

本発明の医薬組成物において、免疫原となるミミックペプチドとしての投与量は、当該ペプチドの活性、患者の年齢、体重、疾患の種類又は程度により異なるが、一般には、経口投与では、通常1日0.001~1000mg/kg体重であり、皮下投与、皮内投与又は点鼻投与では、通常1日0.001~1000mg/kg体重である。投与回数は、通常経口投与では1日1~3回、皮下投与、皮内投与又は点鼻投与では1日1~2回である。

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0004】

図1は、B6 s c F v に結合したペプチドファージクローンのELISAの結果を示す図である。

図2は、D1 s c F v に結合した12merペプチドファージクローンのELISAの結果を示す図である。

図3は、D1 s c F v に結合したC7CペプチドファージクローンのELISAの結果

50

果を示す図である。

図4は、ペプチドファージによるA 1 - 4 2ペプチドの線維化阻害実験の結果を示す図である。

図5は、A 1 - 4 2の線維化を阻害するB6 s c F v、B7 s c F v又はD1 s c F vを鋳型として単離したファージクローンの提示するペプチド配列一覧を示す図である。

図6は、ビオチン化したB6又はB7 s c F v結合性配列とTAT配列との融合分子を示す図である。

図7は、TATとB6 - L1の融合ペプチドがB6 s c F vに認識されることを示す図である。

図8は、TATとB6 - L1、B7 - C15及びB7 - S15それぞれとの融合ペプチドのA 1 - 4 2線維化阻害活性の測定結果を示す図である。

図9は、TATとB6 - L1及びB7 - C15それぞれとの融合ペプチドによるA コンホマー(A オリゴマー及びA 線維)の沈降実験の結果を示す図である。

図10は、A ミミックペプチドを免疫したマウスにおける抗A 抗体の誘導実験の結果を示す図である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2007 - 277638の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

以下、製造例及び実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

【0006】

Kaji et al., J. Biochem. 129: 577 - 583 (2001) 及びS. Hashiguchi et al., J. Biochem. 133: 43 - 49 (2003)に従って以下の実験を行った。

1. 材料及び方法

(1) E - tagカラムによるs c F vの精製

A に結合するs c F vを発現させるために、Hashiguchiらの方法(J. Biochem. 133: 43 - 49 (2003))によりs c F vファージクローンを大腸菌株HB2151に感染させた。得られた培地上清からE - tagカラム(Amersham Biosciences)を用いてアミロイド特異的s c F v(B6、B7、D1、F10)を精製した。

B6 s c F v(WO2005/105998のクローンB6)のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号1に、VL鎖のアミノ酸配列を配列番号2に示す。

B7 s c F v(WO2005/105998のクローンB7)のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号3に、VL鎖のアミノ酸配列を配列番号4に示す。

D1 s c F v(WO2005/105998のクローンD1)のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号5に、VL鎖のアミノ酸配列を配列番号6に示す。

F10 s c F v(WO2005/105998のクローンF10)のVH鎖のアミノ酸配列を配列番号7に、VL鎖のアミノ酸配列を配列番号8に示す。

(2) ペプチドファージライブラリー

ファージのgene III蛋白のアミノ末端に12個のランダムなアミノ酸配列を提示したPh.D. - 12ライブラリー(New England Biolabs, MA)及びファージのgene III蛋白のアミノ末端にシステインとシステインの間に7つのアミノ酸配列を含むペプチドを提示するPh.D. - C7Cライブラリー(New England Biolabs, MA)を用いた。

(3) バイオパニング

鋳型となるヒト一本鎖抗体(s c F v: B6、B7、D1又はF10)又はコントロー

10

20

30

40

50

ル s c F v  $1 \mu\text{g} / 100 \mu\text{l} / \text{well}$  ( $0.1 \text{ M NaHCO}_3$  pH 8.6) を Maxisorp plate に 4 で 6 時間コートした。ブロッキング溶液としてそれぞれのウェルを 1st パニングでは 0.5%ゼラチン, 2nd パニングでは 0.25% BSA, 3rd パニングでは 0.5%ゼラチンを用いて 4 で 14 時間ブロックした。12mer 又は C7C ペプチドファージライブラリーをブロッキング溶液で希釈後 ( $1.5 \times 10^{12} \text{ pfu} / 100 \mu\text{l}$ ) 30 分静置後、コントロール s c F v で吸収操作を行った。すなわち、コントロール s c F v をコートしたウェルを 0.2% Tween 20 / PBS (PBST) で 3 回洗浄しファージ溶液を加え室温で 1 時間反応させ、コントロール s c F v と結合しなかったファージ溶液を回収した。このファージ溶液を鑄型とする s c F v をコートしたウェルに加え室温で 1 時間反応させた。0.2% PBST を用いて 10 回洗浄後  $1 \text{ mg} / \text{ml}$  BSA /  $0.1 \text{ M}$  グリシン塩酸 pH 2.2 を  $100 \mu\text{l}$  加え室温で 5 分置くことにより結合したファージを回収し、ただちに  $1 \text{ M}$  トリス塩酸 pH 9.1 を  $15 \mu\text{l}$  加え中和した。回収したファージを大腸菌 ER 2738 に感染させ増幅させ、2, 3 ラウンドのパニングに用いた ( $1.5 \times 10^{12} \text{ pfu} / 100 \mu\text{l}$ )。

10

#### (4) ファージクロンの単離

パニングを 2 回行った後、回収したファージを ER 2738 に感染させ LB / Tet / X-gal plate で培養した。溶菌してできたブランクを再度 ER 2738 に感染させ、ファージクロンを単離した。

#### (5) ELISA

パニングで鑄型とした s c F v 又はコントロール s c F v  $50 \text{ ng} / 40 \mu\text{l} / \text{well}$  ( $0.1 \text{ M NaHCO}_3$  pH 8.6) を ELISA プレートに 4 で 6 時間コートした。0.5%ゼラチンを用いて 4 で 13 時間ブロックした。0.2% PBST を用いてウェルを 3 回洗浄後、単離したペプチドファージクローン溶液 (約  $1.6 \times 10^{11} \text{ virions} / 40 \mu\text{l}$ ) を加え室温で 1 時間反応させた。結合したファージは  $40 \mu\text{l}$  のビオチン化抗 M13 モノクローナル抗体 ( $1000$  倍希釈)、ストレプトアビジンアルカリフォスファターゼ ( $1000$  倍希釈) を反応させた後、基質パラニトロフェニルリン酸を用いて検出した。

20

#### (6) DNA 塩基配列解析

特異性の認められたファージクロンをフェノール/クロロホルム処理して除蛋白した後、エタノール沈殿で DNA を精製し、塩基配列決定の鑄型とした。primer-96 g III ( $1 \text{ pg} / \mu\text{l}$ )  $5' - \text{CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG} - 3'$  (New England Biolabs, MA) を用いて、ランダムなペプチド配列が挿入されている領域の遺伝子増幅を行い、DNA 塩基配列決定を行った。

30

#### (7) ペプチド合成

ペプチドは、一般的な固相ペプチド合成法、Fmoc / HBTu + HOBt 法により合成した。ペプチド B6 - L1, B7 - C15, B7 - S15 のそれぞれに TAT 配列を連結したペプチドを合成した。なお、B7 - C15 については、カルボキシル末端側にグリシンを付加したものに TAT 配列を連結した。ちなみに TAT 配列は脳血管関門を通過する機能をもつペプチド配列である (P. Jarver and Ulo Langel, The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation, DDT, 9: 395 - 401, 2004) である。

40

なお、B6 - L1, B7 - C15, B7 - S15 のそれぞれの配列のアミノ末端側に TAT 配列を融合したものが TAT - B6 - L1, TAT - B7 - C15, TAT - B7 - S15 であり、B6 - L1 の配列のカルボキシル末端側に TAT 配列を融合したものが B6 - L1 - TAT である。このペプチドの結合を検出するためにペプチドのアミノ末端にビオチンが結合しているペプチド配列として合成した。

B6 - L1, B7 - C15, B7 - S15、及びこれらと TAT 配列との融合分子のアミノ酸配列と配列番号との関係は以下のとおりである。



B6-L1 : 配列番号 9 ;

B7-C15 : 配列番号 16

B7-S15 : 配列番号 23

TAT-B6-L1 : 配列番号 24

B6-L1-TAT : 配列番号 25

TAT-B7-C15 : 配列番号 26

TAT-B7-S15 : 配列番号 27

10

#### (8) アミロイド 線維化阻害実験

20 mMリン酸バッファー pH 7.0を用いて40 μMに希釈したA<sub>1-42</sub>ペプチドに合成したペプチド(TAT-B6-L1, B6-L1-TAT, TAT-B7-C15, TAT-B7-S15)を様々な濃度(1.65 nM, 16.5 nM, 33 nM)で加えた。0, 6, 24時間に10 μlのサンプルを回収し11 μMのチオフラビンT(Sigma)/リン酸バッファー90 μlを加えマルチラベルプレートカウンター、Wallac 1420 ARVOSx(Perkin-Elmer; Wellesley, MA)を用い、450 nmの励起光により発生する482 nmの蛍光強度を測定した。

20

(9) A<sub>1-42</sub>線維化阻害ペプチドによるA<sub>1-42</sub>コンホマー(A<sub>1-42</sub>オリゴマー及びA<sub>1-42</sub>線維)の沈降実験

A<sub>1-42</sub>を20 mMリン酸バッファー pH 7.0に40 μMの濃度で溶解し、その1.5時間目に、40 μMに調製したTAT-B6-L1又はTAT-B7-C15ペプチドを液量比(1:1)で加え37℃で1時間反応させた(最終濃度:A<sub>1-42</sub>[20 μM]/合成ペプチド[20 μM])。反応後、免疫沈降前のサンプルを「沈降前」として一部サンプリングし、残りのサンプルを20 μg/μlに調製したM-280ストレプトアビジン-マグネットビーズ(Dynal Biotech, Oslo, Norway)と液量比(1:1)で氷上で1時間反応させた(最終濃度:A<sub>1-42</sub>[10 μM]/合成ペプチド[10 μM]/ビーズ[10 μg/μl])。反応後、マグネットによりビーズを沈降させ上清を「上清」とした。沈降したビーズに回収した上清と等量のPBSを加え「沈殿物」とした。得られた各サンプルを電気泳動し、抗A<sub>1-42</sub>抗体によるWestern blot解析を行った。

30

#### 2. 結果

(1) A<sub>1-42</sub> 特異的s c F vに結合するペプチドファージクローン

(a) B6 s c F vに結合したペプチドファージクローンのELISAの結果を図1に示す。無関係のs c F v(コントロールs c F v)としてFv1E1というA<sub>1-42</sub>の線維化を阻害しない抗体を用いた。ファージライブラリーは12merのアミノ酸配列を提示するPh.D.-12ライブラリー(New England Biolabs, MA)を用いた。実験は前記(5)ELISAで記したとおりに行った。

40

(b) D1 s c F vに結合した12merペプチドファージクローンのELISAの結果を図2に示す。無関係のs c F v(コントロールs c F v)としてMY5RというA<sub>1-42</sub>の線維化を阻害しない抗体を用いた。ファージライブラリーは12merのアミノ酸配列を提示するPh.D.-12ライブラリー(New England Biolabs, MA)を用いた。実験は前記(5)ELISAで記したとおりに行った。

(c) D1 s c F vに結合したC7CペプチドファージクローンのELISAの結果を図3に示す。無関係のs c F v(コントロールs c F v)としてMY5RというA<sub>1-42</sub>の線維化を阻害しない抗体を用いた。ファージライブラリーはシステインとシステインの間に7つのアミノ酸配列を含むペプチドを提示するPh.D.-C7Cライブラリー(New England Biolabs, MA)を用いた。実験は前記(5)ELISAで記

50

したとおりに行った。

(2) B6 結合性ペプチドファージの A 1 - 4 2 線維化阻害活性

B6 結合性ペプチドファージによる A 1 - 4 2 ペプチドの線維化阻害実験の結果を図 4 に示す。A 1 - 4 2 線維化阻害実験は前記 (8) 線維化阻害実験で記したとおりに行った。pepB6-L1 及び pepB6-L10 は、A 1 - 4 2 の線維化を阻害する B6 scFv を鋳型として、それに結合するファージクローンであり、pep1E1-L1, 1-L2, 1-L4, 1-L12 は、A 1 - 4 2 の線維化を阻害しない Fv1E1 scFv (WO2005-105998 段落 0074 ~ 0075 に記載) を鋳型として単離したファージクローンである。ここで用いたファージクローンの濃度は  $3.0 \times 10^{12}$  virions/ml である。

10

(3) A 特異的 scFv のエピトープ (結合性配列)

A 1 - 4 2 の線維化を阻害する B6 scFv、B7 scFv 又は D1 scFv を鋳型として単離したファージクローンの提示するペプチドのアミノ酸配列一覧を図 5 に示す。ファージライブラリーとして Ph.D.-12 ライブラリー (図 5 中 12mer\* と略) 又は Ph.D.-C7C ライブラリー (図 5 中 C7C\* と略) を使用した。pepB7-C15 と pepB6-C2, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C15 及び pepD1-C5, C7, C20 は同一の配列であった。番号の前についている L は 12mer のライブラリーから、C は C7C のライブラリーから単離されたクローンであることを示している。

各ファージクローンの提示するペプチドのアミノ酸配列と配列番号との関係は以下のとおりである。

20

pepB6-L1 : 配列番号 9 ;

pepB6-L10 : 配列番号 10 ;

pepD1-L5, L9 : 配列番号 11 ;

pepD1-L6 : 配列番号 12 ;

pepD1-L7 : 配列番号 13 ;

pepD1-L13 : 配列番号 14 ;

30

pepD1-L20 : 配列番号 15 ;

pepB7-C15 (pepB6-C2, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C15 及び pepD1-C5, C7, C20) : 配列番号

16 ;

pepD1-C2, C13 : 配列番号 17 ;

pepD1-C18 : 配列番号 18 ;

pepD1-C3 : 配列番号 19 ;

40

pepD1-C11 : 配列番号 20 ;

pepD1-C8 : 配列番号 21 ;

pepD1-C10 : 配列番号 22

(4) ビオチン化した B6 又は B7 scFv 結合性配列と TAT 配列との融合分子

ビオチン化した B6 scFv 結合性配列と TAT 配列との融合分子を図 6 に示す。B6-L1, B7-C15, B7-S15 のそれぞれの配列のアミノ末端側に TAT 配列を融合したものが TAT-B6-L1, TAT-B7-C15, TAT-B7-S15 であり、B6-L1 の配列のカルボキシル末端側に TAT 配列を融合したものが B6-L1-

50

TATである。TAT配列は脳血管関門を通過する機能をもつペプチド配列である(P. Jarver and Ulo Langel, The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation, DDT, 9:395-402, 2004)。これらのペプチドのアミノ末端をビオチンで標識し、このペプチドの結合を酵素標識したアビジンを用いて定量を行った。

(5) TATとB6-L1の融合ペプチドはB6-scfvに認識された(図7)。合成ペプチド、TAT-B6-L1あるいはB6-L1-TATを200ng/wellの条件でELISAプレートにコートし、種々の濃度のB6-scfvを添加しその結合活性を検討した。コントロールペプチドとして無関係のペプチド(GSGGSGCYWRS EWGLCG)を用いた。B6-scfvの量依存的な結合反応が確認された。

(6) TATとB6-L1, B7-C15, B7-S15それぞれとの融合ペプチドのA1-42線維化阻害活性

TATとB6-L1, B7-C15, B7-S15それぞれとの融合ペプチドのA1-42線維化阻害活性の測定結果を図8に示す。線維化阻害実験は前記線維化阻害実験で記したとおりに行った。TAT-B6-L1, B6-L1-TAT, TAT-B7-C15, TAT-B7-S15は線維化阻害活性があることが明らかとなった。前記のコントロールペプチドは全く阻害活性を示さなかった。

(7) TAT-B6-L1, TAT-B7-C15ペプチドによるAコンホマー(Aオリゴマー及びA線維)の沈降実験

TAT-B6-L1, TAT-B7-C15ペプチドの沈降実験の結果を図9に示す。A1-42を20mMリン酸バッファーpH7.0に40μMの濃度で溶解し、その1.5時間目にビオチン化TAT-B6-L1又はビオチン化TAT-B7-C15ペプチドを加え結合物をストレプトアビジン-マグネットビーズで沈降させた。沈降前はAオリゴマーやA線維などのバンドが確認できるが、TAT-B6-L1, TAT-B7-C15ペプチドで沈降を行った上清にはAオリゴマーやA線維は確認されず、沈殿物の方で確認できた。この結果からA1-42溶解後1.5時間目に形成されるAオリゴマーやA線維とTAT-B6-L1, TAT-B7-C15ペプチドが結合することが明らかとなった。無関係なコントロールペプチドでは沈降反応は認められなかった(図9には示されていない)。

## 【実施例2】

### 【0007】

#### 1. 材料・方法

##### (1) 抗原調製と免疫

PBSで各濃度に調整したストレプトアビジン(6.6μM)と実施例1の1.(7)「ペプチド合成」で得たビオチン化TAT-B7-C15、ビオチン化TAT-B7-S15又はビオチン化TAT-B6-L1ペプチド(26.4μM)を容量比1:1で混合(全タンパク濃度:500μg/ml)した後、4で一晚反応させストレプトアビジン複合体(SA-Ag)を作製した。アジュバントである水酸化アルミニウムゲル(20mg/ml)とSA-Ag(500μg/ml)を容量比1:1で攪拌しながら混合し、水酸化アルミニウムゲルにSA-Agを吸着させた。8週齢の雌のBALB/cマウスの皮下に水酸化アルミニウムゲル/SA-Ag懸濁液を200μl免疫した(水酸化アルミニウムゲル:2mg, SA-Ag:50μg)。第一回目の免疫をDay0とし、Day15, 30, 60, 90の計5回、同様の操作で免疫を行った。水酸化アルミニウムゲルに線維化Aを混合し免疫したマウスをポジティブコントロールとし、水酸化アルミニウムゲルにPBSを加え、免疫したマウスをネガティブコントロールとした。

##### (2) 血清の採取

Day14, 29, 59, 74, 100にマウスの眼底から血液を採取し、等量のPBSと混合した後、6000rpmで10分間遠心を行い血清成分を採取した(2倍希釈)。

## (3) 血清中の抗 A 抗体の検出

96穴プラスチックプレートに線維化 A 1-42 と可溶性 A 1-42 を加え一晩 4 でコートした (50 ng / 40  $\mu$ l / well)。0.5%ゼラチンで2時間のブロックを行い0.1% Tween 20 / PBS で洗浄後、PBS で200倍に(原液血清に対して)希釈した Day 74 血清を加え室温で1時間反応させた。0.1% Tween 20 / PBS による洗浄を3回行った後、5000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識 - 抗マウス IgG + IgM 抗体を加え、室温で1時間反応させた。0.1% Tween 20 / PBS による洗浄を3回行った後、パラニトロフェニルリン酸 (2 mg / ml) を含む基質溶液を加え、405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。結果は各血清がバックグラウンドである0.5%ゼラチンに対する反応値を差し引いた値で示した。

10

各血清(各実験群)の0.5%ゼラチンへの非特異的な結合活性(405 nm における吸光度; 差し引いた OD 値)を以下に示す。

線維化 A (A) : 0.07 ; TAT - B7 - C15 : 0.035 ; TAT - B6 - L1 : 0.0255 ; TAT - B7 - S15 : 0.058 ; PBS : 0.024 ; none : 0.0165

## 2. 結果

A ミミックペプチドを免疫したマウスにおいて、線維化 A に結合する抗体が誘導されることが確認できた。更に、可溶性 A への結合活性はバックグラウンドレベルであることから、A ミミックペプチドが線維化 A の3次元構造を模倣し、線維化 A に特異的な抗体を誘導することが明らかとなった。これらの結合活性はポジティブコントロールである線維化 A を免疫したマウスと同程度の値であった。結果を図10に示す。

20

図10のx軸方向にはマウスを免疫した分子を示し、y軸は抗体反応の強さ(405 nm における吸光度)を示す。A 1-42 soluble は可溶性 A (正常 A) に対する抗体量、A 1-42 fibril は異常の線維化 A に対する抗体量を示す。破線は水酸化アルミニウムゲル / PBS で免疫した血清成分の各 A への非特異的結合値でバックグラウンドの指標として表示した。

線維化 A で免疫すると、若干可溶性 A にも反応し、線維化 A には強く反応する抗体が産生されている(図10のx軸の A)。他のミミックペプチドによる免疫では、検出される可溶性 A に反応する抗体は、リン酸緩衝液(PBS)のみを投与して産生されてくる非特異的抗体の量以下であり、線維化 A に反応する抗体が、有意に、かつ本物の線維化 A を免疫した時と、ほぼ同程度の抗体を誘導していることがわかる。

30

異常アミロイドは脳内で神経細胞に毒性を発揮し、自殺死(アポトーシス)を誘導するため、アルツハイマー症の主症状の痴呆が発生する。

本発明のミミックペプチドで誘導された抗体は、正常アミロイド分子には反応しないため、正常自己成分に対する免疫反応が起こらないので副作用が発生しないが、異常アミロイドペプチド集合体(アミロイドの線維やオリゴマー、グロブロマー)に結合する。この結果、脳内から病因である異常アミロイド分子が脳内から血中に引き抜かれるとともに、脳内にある貪食細胞のミクログリア細胞にも貪食され、脳内の異常アミロイドが消失する。したがって、このワクチンで誘導された異常アミロイド分子に特異的な抗体は、この殺傷性分子を脳内から排除する。これによりアルツハイマー病の予防、更には治療を達成することができる。

40

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

## 【産業上の利用可能性】

【0008】

本発明によれば、異常アミロイドペプチドに特異的な抗体の産生を誘導するワクチン又は免疫原を提供することができる。

[配列表]

## SEQUENCE LISTING

<110> KAGOSHIMA UNIVERSITY

<120> Peptide vaccine using mimic molecule of amyloid beta peptide

<130> PH-3722-PCT

10

<150> JP 2007-277638

<151> 2007-10-25

<160> 27

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 123

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1                                    5                                    10                                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

                                  20                                    25                                    30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

                                  35                                    40                                    45

Ser Ala Met Ser Gly Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

                                  50                                    55                                    60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Tyr

65                                    70                                    75                                    80

Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

                                  85                                    90                                    95

Ala Lys Asp Gly Arg Phe Arg Asn Arg Arg Ser Asp Gly Phe Asp Thr

                                  100                                    105                                    110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

                                  115                                    120

30

40

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1         5                 10             15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
        20                 25             30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr           10
        35                 40             45
Gly Lys Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
        50                 55             60
Ser Ser Gly Asn Ala Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65         70                 75             80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Thr Ser Gly Asn His
        85                 90             95
Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
        100                105           20
```

<210> 3

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly           30
1         5                 10             15
Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Gly Phe Ser Asn Tyr
        20                 25             30
Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Thr Gly Leu Glu Trp Val
        35                 40             45
Ala Gly Val Asn Gly Gly Gly Gln Asn Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
        50                 55             60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Val Tyr           40
65         70                 75             80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
        85                 90             95
Ala Lys Asp Gly Arg Phe Arg Asn Arg Arg Pro Asp Gly Phe Asp Thr
        100                105             110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                120
```

<210> 4  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Asn	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln					
1				5					10					15						10
Thr	Val	Arg	Ile	Thr	Cys	Gln	Gly	Asp	Thr	Leu	Arg	Asn	Asn	Phe	Pro					
			20					25					30							
Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Phe	Tyr					
		35					40					45								
Gly	Lys	Asp	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser					
	50					55				60										
Arg	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Gln					
65					70					75				80						20
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ser	Arg	Asp	Ser	Gly	Gly	His	His					
			85						90					95						
Leu	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly								
			100					105												

<210> 5  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly					
1				5					10					15						
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Lys	Tyr					
			20					25					30							
Tyr	Met	Ala	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Pro	Glu	Trp	Leu					
		35				40						45								40
Ser	Thr	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Ile	Ile	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val					
	50				55					60										
Arg	Gly	Arg	Phe	Ser	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Gln	Lys	Ser	Leu	Tyr					
65					70					75				80						
Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Pro	Asp	Asp	Ser	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys					
			85					90					95							
Ala	Arg	Glu	Tyr	Phe	Phe	Ser	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu					

100  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

105

110

<210> 6

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 6

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Ile Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala  
 20 25 30  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Gly Lys Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Ile Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Arg Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His  
 85 90 95  
 Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105

20

30

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

40



```

65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Ala Lys Arg Phe Ala Ala Ala Arg Arg Gly Leu Asp Ala Phe
          100         105         110
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115         120         125

```

10

```

<210> 8
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 8
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1          5          10         15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
          20         25         30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
          35         40         45
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
          50         55         60
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65          70         75         80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
          85         90         95
Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
          100        105

```

20

30

```

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

40

```

<220>
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to
human anti amyloid beta peptide antibody

```

```

<400> 9
Gly Met Leu Asp Ile Phe Ala Pro Ile Arg His Val

```

1	5	10	
<210>	10		
<211>	12		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		10
<220>			
<223>	Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human anti-amyloid beta peptide antibody		
<400>	10		
Thr Ser Pro Ile Leu Asp Val Leu Thr Pro Pro Arg			
1	5	10	
			20
<210>	11		
<211>	12		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human anti-amyloid beta peptide antibody		
<400>	11		
Gly Ser Pro Phe Leu Asp Leu Leu Ala Pro Ala Ala			
1	5	10	
			30
<210>	12		
<211>	12		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		40
<220>			
<223>	Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human anti-amyloid beta peptide antibody		
<400>	12		
Ser Ser Ile Ile Asp Ile Leu Leu Pro Pro Ile Tyr			

1	5	10	
<p>&lt;210&gt; 13          &lt;211&gt; 12          &lt;212&gt; PRT          &lt;213&gt; Artificial Sequence</p>			
			10
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to          human antiamyloid beta peptide antibody</p>			
<p>&lt;400&gt; 13          Ser Ile Leu Asp Ile Leu Ser Pro Arg Leu Ala Glu</p>			
1	5	10	
			20
<p>&lt;210&gt; 14          &lt;211&gt; 12          &lt;212&gt; PRT          &lt;213&gt; Artificial Sequence</p>			
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to          human antiamyloid beta peptide antibody</p>			
			30
<p>&lt;400&gt; 14          Gly Asn Thr Leu Leu Asp Thr Leu Val Pro Leu Ile</p>			
1	5	10	
<p>&lt;210&gt; 15          &lt;211&gt; 12          &lt;212&gt; PRT          &lt;213&gt; Artificial Sequence</p>			
			40
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to          human antiamyloid beta peptide antibody</p>			
<p>&lt;400&gt; 15          Asn Pro Leu Asp Phe Tyr Ala Pro Ser Ile Leu Pro</p>			

1	5	10	
<210> 16			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			10
<220>			
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody			
<400> 16			
Cys Tyr Gly Thr Lys Pro Trp Met Cys			
1	5		20
<210> 17			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody			30
<400> 17			
Cys Tyr Gly Thr Glu Pro Trp Met Cys			
1	5		
<210> 18			
<211> 9			
<212> PRT			40
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody			
<400> 18			
Cys Phe Gly His Glu Pro Trp Met Cys			

1	5	
<210> 19		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody		
<400> 19		
Cys Gln Gly His Leu Pro Trp Met Cys		
1	5	20
<210> 20		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody		30
<400> 20		
Cys Phe Gly His Lys Pro Trp Met Cys		
1	5	
<210> 21		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		40
<220>		
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody		
<400> 21		
Cys Phe Gly Arg Leu Pro Trp Met Cys		

1	5	
<210> 22		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody		
<400> 22		
Cys Phe Gly Ser Leu Pro Trp Met Cys		
1	5	20
<210> 23		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody		30
<400> 23		
Ser Tyr Gly Thr Lys Pro Trp Met Ser Gly		
1	5	
<210> 24		
<211> 23		
<212> PRT		40
<213> Artificial		
<220>		
<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody		
<400> 24		

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Met Leu Asp Ile  
1 5 10 15

Phe Ala Pro Ile Arg His Val  
20

10

<210> 25

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to  
human antiamyloid beta peptide antibody

20

<400> 25

Gly Met Leu Asp Ile Phe Ala Pro Ile Arg His Val Tyr Gly Arg Lys  
1 5 10 15

Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
20

30

<210> 26

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to  
human antiamyloid beta peptide antibody

40

<400> 26

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Tyr Gly Thr Lys  
1 5 10 15

Pro Trp Met Cys Gly  
20

<210> 27

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Designed peptide based on the DNA sequence of phage binding to human antiamyloid beta peptide antibody

<400> 27

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Thr Lys  
1                    5                                    10                                    15

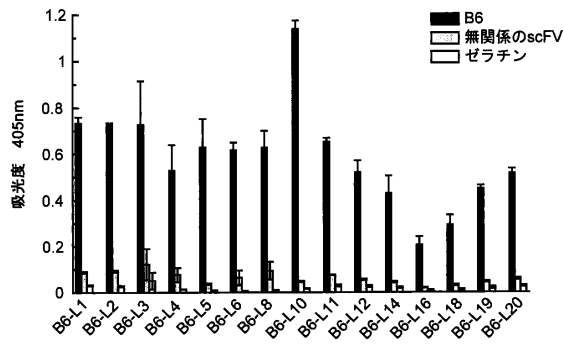
20

Pro Trp Met Ser Gly  
20



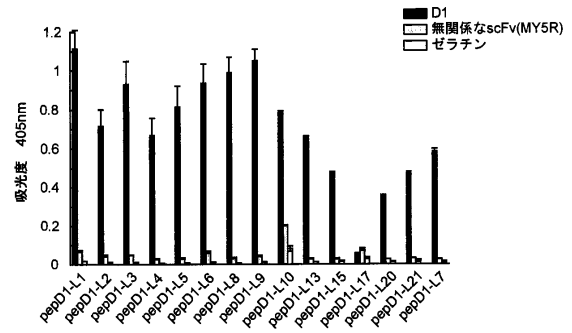
【 図 1 】

図 1



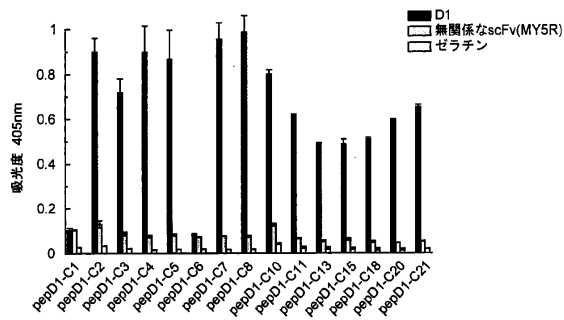
【 図 2 】

図 2



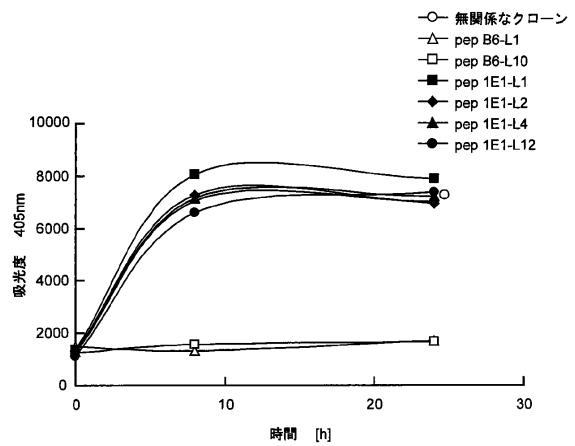
【 図 3 】

図 3



【 図 4 】

図 4



【 図 5 】

ファージクローン名	編型抗体名	ペプチドのアミノ酸配列
pepB6-L1	B6	GMLDIFAPIRHV
pepB6-L10	B6	TSPILLDVLTPPR
pepD1-L1, L8, L15	D1	RVDILNYLSPPPI
pepD1-L5, L9	D1	GSPELDDLAPAA
pepD1-L6	D1	SSIDILLPIIY
pepD1-L7	D1	SILDILSPRLAE
pepD1-L13	D1	GNTLLDITLVPLI
pepD1-L20	D1	NPLDFYAPSIILP
pepD1-L2	D1	SPLFAMLAFAVD
pepB6-C2, C5, C6, C7, C9, C9, C10, C15	B6	CYGTKEPVMC
pepB7-C15	B7	CYGTKEPVMC
pepD1-C2, C13	D1	CYGTKEPVMC
pepD1-C18	D1	CFGHEPVMC
pepD1-C3	D1	CQHLLPVMC
pepD1-C11	D1	CFGHKPVMC
pepD1-C5, C7, C20	D1	CYGTKEPVMC
pepD1-C8	D1	CFGRLPVMC
pepD1-C10	D1	CFGSLPVMC

図 5

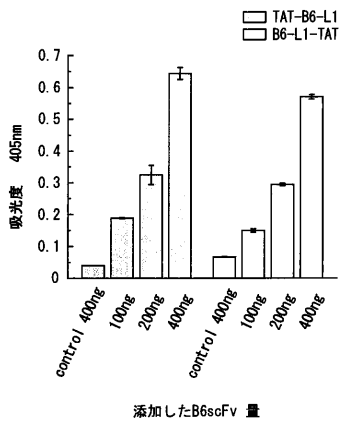
【 図 6 】

図 6

結合配列名	アミノ酸配列
B6-L1	<u>GMLDIFAPIRHV</u>
B7-C15	<u>CYGTKEPVMC</u>
B7-S15	<u>SYGTKEPVMC</u>
TAT	<u>YGRKKRRQRRR</u>
TAT-B6-L1	biotin- <u>YGRKKRRQRRRGMLDIFAPIRHV</u>
B6-L1-TAT	biotin- <u>GMLDIFAPIRHVVYGRKKRRQRRR</u>
TAT-B7-C15	biotin- <u>YGRKKRRQRRRCYGTKEPVMC</u>
TAT-B7-S15	biotin- <u>YGRKKRRQRRRSYGTKEPVMC</u>

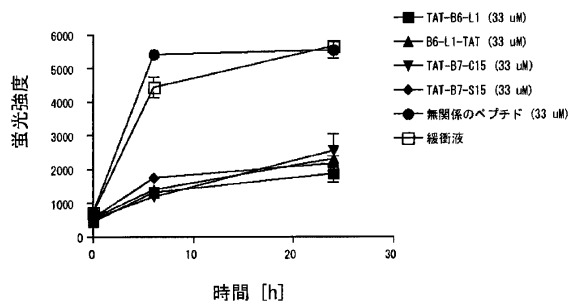
【 図 7 】

図 7



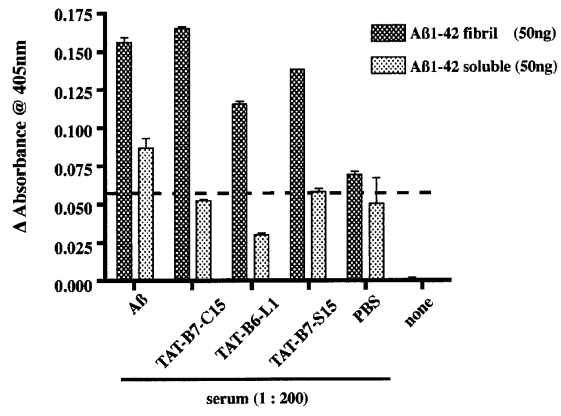
【 図 8 】

図 8



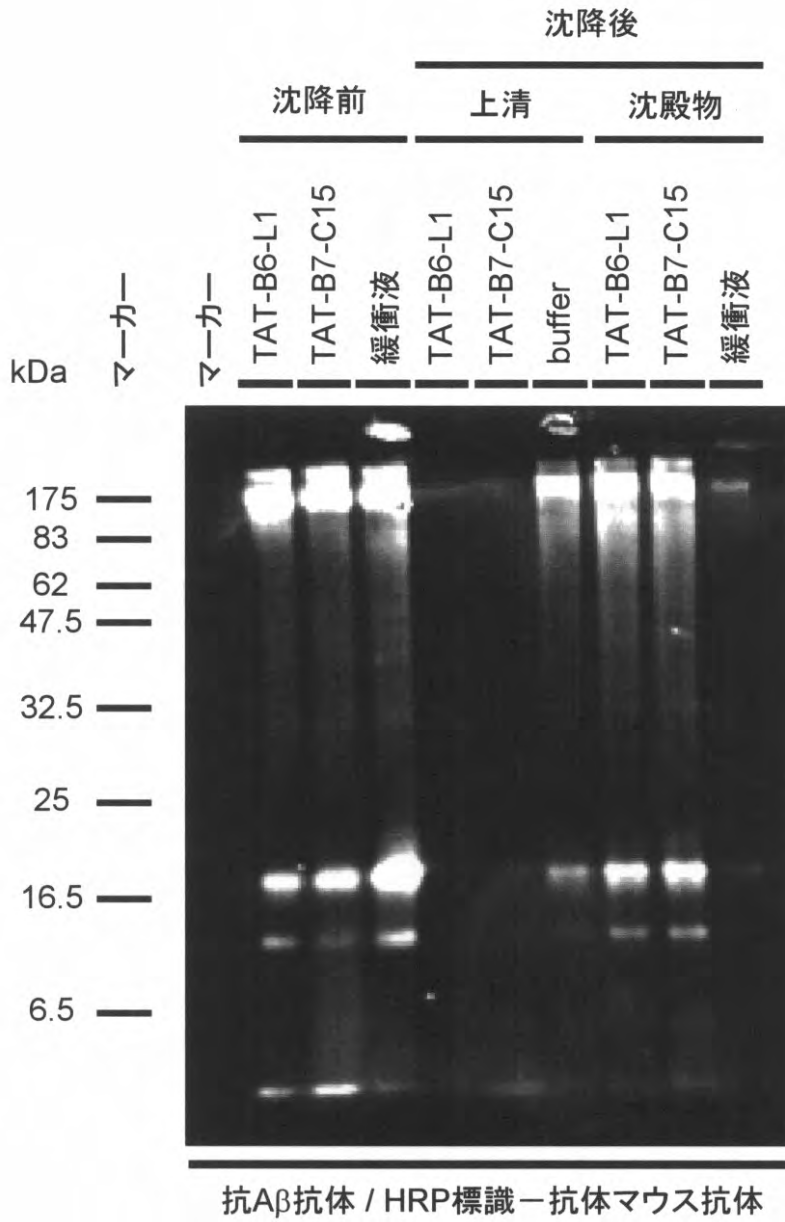
【 10 】

10



【 図 9 】

図 9



---

フロントページの続き

審査官 春田 由香

- (56)参考文献 国際公開第2006/005706(WO,A1)  
国際公開第2006/005707(WO,A1)  
特表2006-515876(JP,A)  
国際公開第2005/105998(WO,A1)  
国際公開第2005/033311(WO,A1)  
特表2004-520261(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

A61K 39/00-44  
REGISTRY(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)  
PubMed  
Cinii  
医学・薬学予稿集全文データベース  
医学中央雑誌WEB