

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 538168

(P2002 - 538168A)

(43)公表日 平成14年11月12日(2002.11.12)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 P 25/28		A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 4
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z
33/50		33/50	Z
33/53		33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 36数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 602298(P2000 - 602298)

(86)(22)出願日 平成12年3月1日(2000.3.1)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月3日(2001.9.3)

(86)国際出願番号 PCT/DE00/00693

(87)国際公開番号 W000/51632

(87)国際公開日 平成12年9月8日(2000.9.8)

(31)優先権主張番号 199 09 357.1

(32)優先日 平成11年3月3日(1999.3.3)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 パイロイター, コンラート
ドイツ連邦共和国 ハイデルベルク デー
- 69120 ルードルフ - クレール - シュトラ
ーセ 25

(71)出願人 ムルタウプ, ゲルト
ドイツ連邦共和国 デイルスベルク デー
- 69151 フリッツ フォン ブリーゼン
シュトラーセ 16

(72)発明者 パイロイター, コンラート
ドイツ連邦共和国 ハイデルベルク デー
- 69120 ルードルフ - クレール - シュトラ
ーセ 25

(74)代理人 弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 A P Pの銅結合部位に結合する、および/またはアミロイドA ペプチドの放出に対する阻害効果を発揮する銅アゴニスト

(57)【要約】

本発明は、A P Pの銅結合部位に結合する、および/またはアルツハイマー病の発生に関係するアミロイドA ペプチドの放出に対する阻害効果を発揮する銅アゴニストに関する。本発明はまた、該銅アゴニストを含有する薬物あるいはアルツハイマー病の予防および/または治療のための薬物の製造のための前記銅アゴニストの使用に関する。本発明はさらに、本発明の所望の効果を有する銅アゴニストを同定する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミロイド前駆体タンパク質（APP）の銅結合部位に結合する、および/またはアミロイドAペプチドの放出を低減する、もしくは防ぐことを特徴とする銅アゴニスト。

【請求項2】 二価金属イオン、オリゴペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、ヌクレオチドアナログ、化学物質ライブラリーまたは微生物もしくは植物由来の低分子の天然物質が関連する、請求項1記載の銅アゴニスト。

【請求項3】 任意に製薬学的に許容されうる担体と組み合わせた、請求項1または2記載の銅アゴニストを含有してなる薬剤。

【請求項4】 アルツハイマー病の予防または治療のための薬剤の製造のための、請求項1または2記載の銅アゴニストの使用。

【請求項5】 APPの銅結合部位に結合する、および/またはアミロイドAペプチドの放出に対する阻害効果を発揮する銅アゴニストを同定する方法であって、

(a) APPまたは銅結合部位を有するその断片を上記効果を潜在的に有しうる種々の濃度の化合物と接触させる工程、

(b) Aタンパク質の減少を検出する工程により特徴づけられる方法。

【請求項6】 Aタンパク質の減少が細胞培養系でのELISAまたは免疫沈降により検出される、請求項5記載の方法。

【請求項7】 APPの銅結合部位に結合する、および/またはアミロイドAペプチドの放出に対する阻害効果を発揮する銅アゴニストを同定する方法であって、

(a) APPまたは銅結合部位を有するその断片を、溶解させた、または固定化した物質ライブラリーあるいは微生物および/または植物由来の低分子物質と接触させる工程、

(b) 溶解させた物質ライブラリーまたは液状の低分子物質を用いる場合、APPまたはその該断片に特異的な抗体を用いて前記溶液から競争的または非競争的な銅結合部位/リガンド複合体を免疫沈降させる工程、あるいは固定化した物質

ライブラリーを用いる場合、銅塩の添加により銅結合部位/リガンド複合体からリガンドを放出させる工程、

(c) 前記リガンドを同定する工程、ならびに

(d) APPの銅結合部位への結合後、アミロイドA ペプチドの放出に対する阻害効果を発揮するリガンドを選択する工程〔ここで工程(d)は任意に工程(c)より前に行ないうる〕

により特徴づけられる方法。

【請求項8】 工程(d)が、APP695で安定にトランスフェクトされた哺乳動物細胞と工程(a)~(c)で得られたリガンドとをインキュベーションする工程、およびポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いてアミロイドA ペプチドの産生を測定する工程を含む、請求項7記載の方法。

【請求項9】 工程(d)が、ヒトアミロイドA ペプチドを発現するトランスジェニック動物に工程(a)~(c)で得られたリガンドを投与する工程、CNSまたは血液から試料を集める工程、ならびにポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いてアミロイドA ペプチドの産生を測定する工程を含む、請求項7記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、アミロイド前駆体タンパク質（APP）の銅結合部位に結合する、および/またはアルツハイマー病の進展に係わるアミロイドAペプチドの放出に対し阻害効果を発揮する銅アゴニストに関する。本発明はまた、アルツハイマー病を予防および/または治療するための、これらの銅アゴニストを含む医薬に関する。最後に、本発明は、本発明の目的に関し所望の効果を有する銅アゴニストを同定する方法に関する。

【0002】

老年斑の基本成分であり、かつアルツハイマー病の脳血管アミロイドである、アミロイドペプチド（A₄、A_β）は、その主要なイソ型が695（APP₆₉₅）、751（APP₇₅₁）または770（APP₇₇₀）アミノ酸を含む、より大きな膜結合型アミロイド前駆体タンパク質（APP）から、 α -セクレターゼ（Secretase）および γ -セクレターゼによる連続的なタンパク質切断により形成される〔Hardy, J., Trends Neurosci 20, pp.154-159 (1997)〕。

α -セクレターゼによるA_βドメイン内でのAPPプロセッシングはアミロイド形成を防ぎ、A_β残基17~40/42を含むp3ペプチドの放出に導く（図1）。 γ -セクレターゼまたは α -セクレターゼによるAPPの切断は、細胞外領域に供給されるAPPエクトドメインである可溶性のAPP断片（sAPP_βとsAPP_α）を生ずる。

【0003】

APPの生理学的役割は未知であるが、APPは細胞接着分子および創傷治癒に係わる分子といくつかの特徴を共有する。これは、たとえば、ヘパリン硫酸、コラーゲン、ラミニン、プロテアーゼ類、レクチンおよび金属イオンについてのAPPの結合部位を含む。

【0004】

以前のアルツハイマー病の治療実験では、アミロイドAペプチドの形成は、これまでに未同定の α -セクレターゼまたは γ -セクレターゼをブロックする化合物を投与することによりブロックされた〔Hooper et al., Biochem. J. 321,

pp. 265-279 (1997) }。しかしながら、これらのプロテアーゼの阻害は望まない副作用を生ずる。というのは、これらのプロテアーゼは異なる膜貫通型タンパク質のプロセシングに係わるためである。アルツハイマー病および他の形態の痴呆の治療は、これまで、脳における代謝過程の改善および特定の欠陥性神経伝達物質の置換、またはこの疾患に伴う炎症過程の阻害に向けられてきた。しかしながら、これらの医薬は、異なる形態の痴呆間で区別されず、全ての痴呆に見られうる二次的症候が対象とされる。

【0005】

このように、本発明の技術的課題は、アルツハイマー病を予防または治療するのに有用な産物を提供することである。

【0006】

この技術的課題は、特許請求の範囲に特徴付けられる態様を提供することにより解決された。

【0007】

A P Pは2つの特定位置においてZ n (I I) およびC u (I I) と特異的に相互作用することを見出した。C u (I I) の結合はA P Pの2つのシステインの酸化を生じ、それにより、さらなるシステインの形成が生ずる。このようにして産生される2つの電子の1つは結合した銅(I I) を還元し、銅(I) を形成する。しかしながら、他の電子の運命はこれまでに明らかにされていなかった。

【0008】

ここに、銅(I I) の付加が、哺乳動物細胞において、 β -分泌性代謝経路のA P P産物(s A P P とp 3) の放出の増加および α -分泌性代謝経路の産物(p 3 . 5 とアルツハイマー病に係わるA) の放出の減少に影響することが明らかとなった。このように、アルツハイマー病は、銅アゴニストとして作用する、すなわち、A P Pの銅結合部位に結合しうる、および/またはその生理学的効果を模倣しうる、すなわち、アミロイドA ペプチドの形成を低減しうる、または防ぎうる化合物を投与することにより効果的かつ特異的に予防または治療することができる。A P Pによる銅結合はまた、非常に毒性のあるC u (I) イオンの産生を生ずるので、アゴニスト効果を有するこれらの分子は、A P PのC u (

II) 結合によるダメージから細胞を防ぐというさらなる特徴を含み、従って、銅および過酸化水素により生ずる、反応型の酸素の形成を防ぎうる。

【0009】

このように、本発明の態様は、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) の銅結合部位に結合する、および/またはアミロイドA ペプチドの放出を低減する、もしくは防ぐことを特徴とする銅アゴニストに関する。

【0010】

本明細書において使用される「銅アゴニスト」という用語は、たとえば、APPの銅結合部位に結合しうる、および/またはアミロイドA ペプチドの放出を低減させうる、もしくは防ぎうる、無機化合物または有機化合物などの、任意の物質に関する。好ましい銅アゴニストは、生理学的に高濃度、たとえば、20 ~ 200 mM Mg (II)、好ましくは100 mM Mg (II)、20 ~ 200 mM Ca (II)、好ましくは100 mM Ca (II); 0.05 ~ 20 mM Zn (II)、好ましくは100 μM Zn (II) などにおいてAPP分子における結合部位に関し銅と競争しうる二価の金属イオンである。さらに好ましい銅アゴニストは、主としてそれらの三次元構造を介して銅を模倣し、かつ鍵と鍵穴原理に従って銅結合部位に結合する、オリゴペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖またはヌクレオチドアナログである。好ましい態様では、オリゴペプチドはまた、銅結合部位に相当する配列を含み、従って、それを占める。さらに好ましい銅アゴニストは、購入可能な化学物質ライブラリーから得られる、あるいは新規化合物〔複合化学 (Kombinationschemie)〕または微生物もしくは植物から単離された低分子の天然物質である。これらの化合物はまた、その負の特性を有することなく銅の特性と大きさを模倣し、それらの三次元構造を介して作用する。

【0011】

このように、銅アゴニストとしての効果は、好ましくは、該物質がAPPのCu結合部位に対し特異的かつ銅イオンよりも高い親和性で結合し、または銅結合を担うAPPの配列領域に特異的に結合し、かつその場におけるさらなる銅結合を(立体的に)防ぎ、またはその場から銅イオンを追い立てるという事実に基づ

く。銅アゴニストは、銅の生理学的効果を模倣しうる（銅結合部位について）競争的結合リガンドであり、かつ非競争的結合リガンドである。本発明の意味における銅アゴニストはまた、銅結合部位に結合しないが、たとえば、銅APP複合体に特徴的なAPPの立体配座を安定化する物質であり、すなわち、それらは（直接の銅結合部位以外の）他の結合部位において銅の生理学的効果を模倣しうる。

【0012】

本明細書において使用される「アミロイドA ペプチドの放出を低減する、または防ぐ」という用語は、アルツハイマー病に関して予防または治療効果を得るのに充分であるといえる銅アゴニストの効果に関する。

【0013】

当業者は、当該技術分野において使用される慣用の方法により銅アゴニストとしての前記効果を有する物質を同定し、かつ生産することができる。非天然アゴニスト（たとえば、いわゆるライブラリーとして得られうる小有機化学合成物質）、オリゴヌクレオチド、オリゴペプチドおよびヌクレオチドアナログの場合、合成は当業者に十分に知られた慣用の方法に従ってなされる。アゴニストの可能性のある物質の同定は、たとえば、「BIAコア技術」を用いてアフィニティークロマトグラフィーを介してなされうる。この場合、上記化合物はAPPに対する結合、特に銅結合部位を含むAPPのドメインに対する結合について試験される。その後、同定されたりガンドは細胞培養系においてAPPプロセッシングに対する効果について、たとえば、好適な抗体との競争アッセイにより試験される。さらに、当業者はまた、たとえば、同定されたアゴニストが患者に許容されうるか否かについての、かつ任意に用量-効果曲線を作成する、実施例4と5に記載の方法に類似の慣用の方法により試験しうる。それゆえ、APPの銅結合部位に結合する銅アゴニストの同定および/またはアミロイドA ペプチドの放出に対する阻害効果の発揮についての、本発明の方法は以下の工程を特徴とする：

- (a) APPまたは銅結合部位を保持するその断片と、上記効果を潜在的に有しうる種々の濃度の化合物とを接触させる工程、
- (b) A タンパク質の減少を同定する工程。

【0014】

好ましい態様では、該方法は以下の工程を特徴とする：

(a) APPまたは銅結合部位を保持するその断片と、溶解された、もしくは固定化された物質ライブラリーとを、または微生物および/または植物由来の低分子物質とを接触させる工程、

(b) 溶解された物質ライブラリーもしくは液状の低分子物質を使用した場合、APPもしくはその断片に対し特異的な抗体による該溶液からの銅結合部位/リガンド複合体の免疫沈降、あるいは固定化された物質ライブラリーを使用した場合、銅塩の添加による銅結合部位/リガンド複合体からのリガンドの放出、

(c) リガンドの同定、ならびに

(d) APPの銅結合部位もしくはAPPの他の部位への競争的もしくは非競争的結合により、アミロイドAペプチドの放出に対して阻害効果を発揮するリガンドの選択、なお、工程(d)は任意に工程(c)に先立って行なうことができる。

【0015】

本発明の「リガンド」は、上記プロセスにおいて、APPの銅結合部位もしくは他の部位に結合するあらゆる物質を意味するものと理解すべきである。

【0016】

上記抗体は、たとえば、APPを認識し、かつ免疫沈降に適する、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗血清である。それらは、たとえば、ベーリンガーマンハイム社、ディアノバ(Dianova)社またはシグマ社から購入可能である。APP、APP複合体およびA₄₀(40アミノ酸を有するAのイソ型、図1参照)もしくはA₄₂(42アミノ酸を有するAのイソ型、図1参照)を検出するのに使用可能な、さらに好ましい抗体は、イダ(Ida)ら、J. Biol. Chem. 271, 22908~22914頁(1996)およびワイドマン(Weidemann)ら、Cell 57, 155~162頁(1989)に記載されている。

【0017】

ランダム合成のため、およそのリード物質を形成した有機化合物のコレクショ

ンは物質ライブラリーとして使用される。これらのライブラリーは、〔たとえば、モルフォシス (Morphosys) 社、ミュンヘン、アナリティコン (Analytikon) 社、ベルリンから〕購入可能であり、または化学実験室により協同して調製可能である (たとえば、複合化学による新規化合物)。微生物および植物由来の低分子物質はB I Aコア技術を用いて単離可能である。

【0018】

接触は、溶液において、または固定化A P Pを用いて、もしくはA P Pの断片を用いて行なわれる。形成された複合体を抗体を用いて溶液から沈殿させ、次いで、蛍光、放射能または質量分光法、ガスクロマトグラフィーなどの解析法を用いて検出する。

【0019】

好適なA P P断片は、まず全A P Pへの被検物質の結合を試験し、続いて、全長分子と同等の結合特性を有する、益々より短い断片を試験することにより決定される。

【0020】

工程b)を実施する他の可能性としては、アフィニティークロマトグラフィー、たとえば、B I Aコア、すなわち、A P P分子またはそのリガンドを担体表面に固定化することによるものである。その後、対応分子をこの表面上にインジェクトし、結合が生じた場合、銅塩をインジェクトして、再度結合を崩壊する。このプロセスはバイオセンサー技術により直接追跡することができる。

【0021】

本発明の同定方法の好ましい態様では、工程(d)は、工程(a)~(c)で得られたリガンドとの、ヒトA P P 695で安定的にトランスフェクトした哺乳類細胞のインキュベーション、およびポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体によるアミロイドA ペプチドの産生の測定を含む。この場合、免疫沈降、続くS D Sゲル電気泳動、E L I S Aおよび免疫沈降ウエスタンブロットがアッセイとして考慮される。

【0022】

他の方法として、工程(d)において、工程(a)~(c)で得られたリガン

ドをヒトアミロイドA ペプチドを発現するトランスジェニックマウスに投与するようにして進めるのも可能である。その後、試料をCNSもしくは尾部静脈の血液から集め、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体によりアミロイドA ペプチドの産生を測定する〔たとえば、ディアノバ社、ベーリンガーマンハイム社、シグマ社および自製の抗体 (Ida et al., J. Biol. Chem., 271, pp. 22908-22914, 1996) 〕。この別の方法は、同定されたリガンドのインビボ試験である。ここで、該手法 (使用した方法を含む) は上記細胞培養実験に非常に類似している。細胞培養上清もしくは細胞内で形成されたAPP断片を検出するかわりに、マウスにおいて、これらの断片を血清中で検出する。該検出法は細胞培養実験のものに相当する。

【0023】

本発明はまた、本発明の銅アゴニストを含む医薬に関する。これらの医薬は、任意にさらに製薬学的に許容されうる担体を含む。好適な担体およびかかる医薬の処方当業者には知られている。好適な担体は、たとえば、リン酸緩衝の慣用の塩溶液、水、エマルジョン (たとえば、油/水エマルジョン)、湿潤剤、滅菌溶液などである。該医薬は、経口的にまたは非経口的に投与されうる。非経口的な投与のための方法は、局所、動脈内、筋肉内、皮下、脊髄内、鞘内、脳室内 (intraventriculaere)、静脈内、腹腔内または鼻腔内の投与を含む。好適な投与量は、担当医により決定され、種々の因子、たとえば、患者の年齢、性別および/または体重、疾患の段階、投与の種類などに依存する。

【0024】

このように、本発明はまた、アルツハイマー病の予防または治療のための医薬の製造のための上記銅アゴニストの使用に関する。

【0025】

本発明を、以下の図によりより詳細に説明する：

【0026】

本発明を以下の実施例により説明する。

【0027】

実施例1： 一般的方法

細胞株とトランスフェクション

CHO細胞を、高効率のリン酸カルシウム・トランスフェクション〔チェンら (Chen et al.)、Biotechniques 6, ページ632-638 (1988)〕によってc - myc 標識APP695ベクター〔ペラウスら (Peraus et al.)、J. Neurosci 17, ページ7714-7724 (1997)〕または発現ベクター (pcDNA3) でトランスフェクトした。pSP65 (Invitrogen社) のN - tag - APP 695 DNAを、Sma IまたはEcoRVクローニングサイトを用いて、ベクターpcDNA3 (Invitrogen/ITC Biotechnology, Heidelberg) にクローン化した。トランスフェクション効率は、ウサギ抗c - mycポリクローナル抗体〔18 / 47 ; c - myc配列のアミノ酸配列EQKLISEEDLに対して生じさせたもの ; Eurogentec (Seraing, Belgium) から入手〕によるAPPの免疫沈降および「ECL」検出システム (Amersham, Braunschweig) 中でマウスモノクローナル抗体22C11 (Boehringer Mannheim) を用いる免疫ロットによってチェックした。親のCHO - K1細胞と銅耐性細胞変異体CUR3を、2 mMのL - グルタミン、0.1 mMのプロリン、20 mMのHEPES、および10%のウシ胎仔血清 (Boehringer Ingelheim) を添加した「イーグル」培地 (BME) 中、37 で培養した。基本銅濃度は0.8 μ Mとした。CUR3細胞を200 μ Mの銅を添加した培地中で培養した。

【0028】

代謝標識と免疫沈降

培養皿 (60 mm) の安定トランスフェクトCHO細胞を、メチオニンを含まず、220 μ Ciの〔³⁵S〕メチオニン (Amersham社、Braunschweig) と5%のN₂を加えた2 mlの最小必須培地 (MEM) (Sigma社、Munich) で4時間にわたり処理した。ならし培地 (CM) と細胞を集め、免疫沈降させた。タンパク質濃度を、あらかじめ「バイオラッド (BioRad)」タンパク質アッセイ〔ブラッドフォードら (Bradford et al.)、Anal. Biochem. 72, ページ248-254 (1976)〕により測定しておくか、または放射標識タンパク質を10%のトリクロロ酢酸 (TCA) で沈降させ、取り込まれた〔³⁵S〕メチオニンを測定した (ベックマンLS 6000IC)。細胞を、50 mMのトリス - CH₁ (pH値7.5)、150

mMのNaCl、2mMのEDTA、2%のトリトンX-100、2%のNP40、10 μ g/mlのアプロチニン、および10 μ g/mlのロイペプチンを含む抽出バッファー中で溶解した。細胞残渣を除去するために、溶解物と培地を13,000 \times gで10分間にわたり遠心分離し、培地を、25mMのトリス-HCl (pH値8.5)、1mMのPMSF、10 μ g/mlのアプロチニン、10 μ g/mlのロイペプチン、0.5%のトリトンX-100、および0.5%のNP40に調整した。可溶化させたタンパク質を、100mMのトリス-HCl (pH値7.5)、300mMのNaCl、および4mMのEDTAに1:2の濃度で希釈した。上清を、オーバーヘッド振盪器中でエンドオーバーエンド(end-over-end)回転させながら、APP抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。次いで、一部の実験においては、得られた上清をA₁抗血清を用いて分析した。免疫複合体をタンパク質Aセファロースで取得し、既報〔ワイドマンら(Weidemann et al.)、Cell 57, ページ115-126 (1989)]に従い分析した。

【0029】

抗体と電気泳動

APPの検出のため、組み換えFd-APP770に対するポリクローナルウサギ抗体(A₁APP770のアミノ酸残基18~687に対する抗血清22734/6またはAPPアミノ酸残基18~491に対する抗血清23850/6(図1))は、1:500の濃度で沈殿のために希釈した。当業者に公知の標準法に従って抗血清を研究室で作製した。A₁、p3.5およびA₂は、A₁アミノ酸残基1~40に相当する合成ペプチドに対して産生されたポリクローナル抗体830(1:50希釈; A₁、p3.5およびp3は同様に沈殿された)により認識された(図1)。A₁およびその誘導体を、10~20%トリス-トリシン-ポリアクリルアミドゲルで分離し、APPを7%トリス-グリシン-ポリアクリルアミドゲルまたは7%トリス-トリシン-ポリアクリルアミドゲルを用いて分離した。免疫プロットのために、細胞抽出物および細胞外培地を10%TCAで沈殿させ、アセトンで洗浄し、試料緩衝液に溶解した。電気泳動後、ゲルを〔Simonsら、J. Neurosci 16, 899-908頁(1996)]に記載のようにしてプロセッシングし、「フジ-バス-ホスホルイメージャー(Fu

j i - B a s - P h o s p h o r I m a g e r) 」システムで定量した。そのデータを平均値 + / - 標準偏差として表し、別途記載のない限り、それらは少なくとも2つの別の実験の結果を示す。

【0030】

活性化物質の処理とLDHアッセイ

標識している期間の間、塩化銅または塩化亜鉛（濃度：5 μ M ~ 200 μ M）を培養培地に添加した。D (-) - ペニシラミン (P E N ; S i g m a)、バトクプロイン - ジスルホネート (B C ; A l d r i c h) および 1 , 1 0 - フェナントリン (P E N ; S i g m a) を終濃度 1 0 0 μ M (P E N と B C) または 2 0 0 μ M (P E N) まで培地に添加した。培地中へのラクテートデヒドロゲナーゼ (L D H) 流出により細胞の生存率を測定した (4 1) 。 L D H 流出は、ダルベッコ (D M E M) に基づいて改変した「Eagle」培地中のCHO細胞の70%集密単層の培地において、2時間後および4時間後に酵素活性（単位/リットル）として測定された。

【0031】

実施例2： APP695をコードしたcDNAでトランスフェクトした細胞中でのAPP発現

銅濃度を低減または銅濃度を増大する（0 ~ 200 μ M）APPプロセッシングに対する銅の役割の研究に、親CHO-K1細胞株と銅耐性CUR3細胞株を用いた。CUR3細胞を、APPプロセッシングに対する細胞内の銅の役割を調査するのに用いた。CHO-K1細胞と比べ、CUR3細胞は、より低い細胞内銅濃度を示し、それは「メンケス (M e n k e s) P型ATPアーゼ銅流出ポンプ」（細胞内銅ポンプ/細胞内銅輸送システム）の70倍増加した濃度の結果として銅の増強された流出により引き起こされる。

【0032】

N末端c-mycエピトープを有するAPP695をコードしたcDNA（図1）を用いるCHO-K1とCUR3細胞のトランスフェクション後、ポリクローナルc-myc抗血清を用いる免疫沈降およびモノクローナル抗体22C11を用いる続く免疫プロットによりAPP発現を容易に検出することができた（図

2 a , b)。ポリクローナル c - my c 抗体は、細胞溶解物 (c A P P 6 9 5) とならし培地 (s A P P 6 9 5) で c - my c 標識した相対分子量 1 0 5 k D a の A P P 6 9 5 を免疫沈降した。予想通りに、c - my c - A P P 6 9 5 は、p c D N A 3 でトランスフェクトしただけの細胞の溶解物と培地のいずれにおいても検出することはできなかった。

【0033】

実施例3： 銅濃度を増大する機能としてのA 濃度の減少

銅イオンによるA P P代謝の調節を調べるために、A P P 6 9 5 で安定にトランスフェクトされたC H O細胞を異なる銅濃度下で³⁵S 標識したメチオニンで4時間標識し、A P P (2 2 7 3 4 / 6) を検出する、またはA およびp 3 (7 3 0) を検出するポリクローナル抗体を用いる免疫沈降後、A およびp 3 の、A P P エクトドメイン (Ektodomaene) の分泌を測定した。C U R 3 細胞の細胞溶解物は、未成熟のc A P P 6 9 5 ホロタンパク質 (Holoprotein) に相当する 1 0 5 k D a のバンドを示した (図 3 a)。ならし培地で放出されるA P P 6 9 5 誘導体は、1 0 5 k D a および 9 7 . 5 k D a のバンドとして検出され (図 3 b)、それらはおそらく上のバンドがより高い含有量のシアル酸を有しているという点で異なっている。前記細胞株は、全実験期間中生存率の低下を示さなかった。

【0034】

銅濃度を増大してC U R 3 細胞をインキュベートした場合、A P P ホロタンパク質と可溶性A P P の濃度も有意に増大した。基本培地と比べ、分泌されたタンパク質の一般的な産生が誘導される前に、5 0 μ M C u (II) で最大のs A P P を 2 6 5 % で得た (図 3 c ; 表 1)。 - セクレターゼを用いる切断により産生される分泌性A P P のC 末端相当物であるp 3 の分泌は、培地中 2 0 μ M から 5 0 μ M の間で 2 7 0 % まで増大した (図 3 d ; 表 1)。A P P のA 領域に由来する、放射標識したペプチドの免疫沈降を、A (4 . 5 k D a)、p 3 . 5 (3 . 5 k D a) およびp 3 (3 k D a) を認識するウサギ抗血清 7 3 0 で行った (図 1)。培地中の銅濃度が 5 0 μ M を越える場合、これは一般的なタンパク質代謝に影響を及ぼし、c A P P の割合は、5 5 0 % と著しく高かった (図 3 c

；表1)。それらに対して、A β 濃度は大いに低減され、50 μ Mの銅では基本濃度のわずか20%であり、100 μ Mを越える銅ではA β はCUR3細胞においてほとんど検出できなかった(図3d, e)。これは、p3.5(図3d)についても測定され、それは、p3.5が代替 β -セクレターゼ代謝の産物であるというより初期の観察を追認した。

【0035】

表1：CHO細胞*におけるAPPプロセシングの調節

	sAPP695c	APP695	p3	A β
CUR3 (50 μ M Cu(II))	265	550	270	20
CUR3 (Cu(I)/Cu(II)除去)	77	205	50	100
K1 (10 μ M Cu(II))	475	295	154	20
K1 (Cu(I)/Cu(II)除去)	170	190	171	100

* [%]は標準的な条件と比べた増加/減少。

【0036】

実施例4：銅(I)イオンのバトクプロインとの複合体形成またはペニシラミンによる銅(II)イオンとの複合体形成によるA β ペプチド生成の刺激

以下の調査は、cAPP、sAPPおよび結果としておこる分解産物が銅欠乏で調節されるのかどうかを確認するために行った。銅(II)がAPPの発現とプロセシングに必要であるかどうかを調べるため、銅(II)を銅(II)キレート剤であるD-ペニシラミン(PEN)により除去し、銅(I)を細胞不透過性銅(I)キレート剤であるバトクプロインジスルホン酸により除去した。sAPPとp3の濃度がそれぞれ77%と50%に低減されたのに対して、A β およびp3.5の生成は影響を受けなかったことが示された(図3d, e;表1)。これは、銅(II)-誘導性変化が、銅によるAPP代謝の特異的な調節に基づいていることを示す。

【0037】

実施例5：CHO-K1細胞における内生的に発現されるKPI含有APP751/770イソ型の研究

内生的に発現されたイソ型である、KPIを含有するAPP751/770 (Kunitz型のプロテアーゼ阻害ドメイン、これは選択的スプライシングによりAPP751およびAPP770に導入される)を、CHO-K1細胞において、ポリクローナルAPP抗血清22734を用いる、細胞溶解物およびならし培地由来の〔³⁵S〕メチオニンで標識されたタンパク質の免疫沈降により調べた(図1;図4a, b)。KPI-AAPの分泌は、c-myc APP695のものと同じした(図4)。相対分子量130kDaと105kDaをもつ2つの主なバンドは、それぞれsAPP751/770とsAPP695に相当する。後者も、抗-c-myc抗血清で沈殿することができた。銅濃度を増大させてCHO-K1細胞をインキュベートした場合、APPレベルとp3レベルは有意に増大した(APP:10μM銅で、cAPPは295%、sAPP695は475%、およびsAPP751/770は275%にまで、そして10μM銅でp3は154%にまで;図4a~e;表1)。同時にA_β 産生は、検出限界以下に劇的に減少した(図4d, e)。銅キレート剤の存在下で、sAPP695分泌は170%(図54b, c)、sAPP751/770分泌は190%(図4b, c;表1)およびp3分泌は171%(図4d, e;表1)であった。

【0038】

さらに、CHO-K1細胞(a)およびCHO-CUR3細胞(b)のならし培地から免疫沈降されたsAPP694、p3およびA_βの相対レベルを定量した。その結果を図5に示す。sAPP695(黒四角)の増加は、K1細胞において10μMのCu(II)(a)で、およびCUR3細胞において50μMのCu(II)(b)で最大値に達した;その後、減少した。sAPPレベル(白三角)の変化は、いくぶん低いCu(II)用量で最大レベルに達するp3タンパク質での変化と比べてより遅く発生し、それはおそらくsAPPと比べてより長い半減期によるものである。これらに対し、A_βレベル(黒四角)は、基本レベル以下のCu(II)濃度を有する両方の細胞株において劇的に増大した。最初のデータ点を基本銅濃度(0.8μM Cu(II))で測定した。

【0039】

実施例6: アミロイドA_βペプチドの放出に対して阻害作用を示すAPP銅ア

ゴニストの同定

A P PおよびA P L P 2 (A P PやA P L P 1と同様にA P P遺伝子ファミリーに属するA P Pの相同タンパク質)、A P P N 2 6 2 (A P PのN末端の2 6 2個の残基からなる人工的に製造したC末端短縮型A P P)、およびC末端から個別のドメインずつ連続的に減少されているさらに人工的に製造した型のA P Pの銅結合ペプチド、A P PおよびA P L P 2の銅結合部位保持変異体およびそれらの断片を、様々な濃度のZ n (I I)と接触させた。使用したZ n ²⁺濃度は、1 0 μ M、5 0 μ M、1 0 0 μ M、および2 0 0 μ Mであった。次いで、どのZ n (I I)濃度からA ペプチドの放出が阻害されうるかを調べた。この目的のために下記の実験を行った：

(1) ヒトA P P 6 9 5で安定的にトランスフェクトされたC H O細胞を、上記濃度のZ n (I I) (P B S中に1 0 ~ 2 0 0 μ M)とともにM E M培地中でインキュベートした。銅イオン(P B S中で1 0 ~ 5 0 μ M)を添加したC H O細胞および何も添加していないC H O細胞を対照としてインキュベートした。A (合計)、A 4 0、およびA 4 2の産生量を、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体で定性的および定量的に測定した。A P P、A 、およびp 3を、下記のように³⁵Sメチオニンによる生合成標識に従い検出した。上記のようにしてそれぞれの物質とともにインキュベートした、安定にトランスフェクトしたC H O細胞を、下記のようにして、2 2 0 μ C iの³⁵Sメチオニンとともに4時間にわたりインキュベートした。ならし培地と細胞を集め、溶解タンパク質を免疫沈降に用いた。あらかじめタンパク質濃度をバイオラッド社製タンパク質検出キットを用いて測定しておき、取り込まれた放射能の量をシンチレーション計数法で測定した。細胞を抽出バッファー(5 0 m Mのトリス - H C l、p H 7 . 5、1 5 0 m MのN a C l、2 m MのE D T A、2 %のトリトンX - 1 0 0、2 %のN P 4 0、1 m MのP M S F、1 0 μ g / m lのアプロチニン、および1 0 μ g / m lのロイペプチン)中で溶解させた。細胞細片を1 3 , 0 0 0 × gで1 0 分間にわたり遠心除去し、上清を、2 5 m Mのトリス - H C l、p H 8 . 5、1 m MのP M S F、1 0 μ g / m lのアプロチニン、1 0 μ g / m lのロイペプチン、0 . 5 %のトリトンX - 1 0 0、および0 . 5 %のN P 4 0に調整した。タン

パク質溶液を、100mMのトリス-HCl、pH7.5、300mMのNaCl、および4mMのEDTAで1:2の濃度に希釈した。上清を、上記APPおよびAポリクローナル抗体とともに4で一晩インキュベートし、生じた免疫複合体をタンパク質Aセファロースで単離し、既報〔イダら (Ida et al.)、J. Biol. Chem, 271, pp.22908-22914〕に従い分析した。

【0040】

その結果、A産生量は50μMのZn(II)の濃度から大幅に低下されることが示された。CHO-K1細胞中およびCUR3細胞中のAPP分泌量の減少は50μMを超えるZn(II)濃度で認められ、A産生量が60%減少した場合には、減少はCUR3細胞中で50μMのZn(II)濃度で認められ(K1:20%)、90%減少した場合には、100μMのZn(II)で認められ(K1:30%)、99%減少した場合には、200μMのZn(II)濃度で認められた(K1:60%)。200μMを超えるCa(II)ではA産生量のさらなる減少はなく、この時点で検出限界に達していた。

【0041】

(2)一次ニューロンを、ヒト配列を有するAペプチドを発現するトランスジェニックマウスから単離し、それらのA産生量を、(1)に記載のように測定した。

【0042】

(3)PBS中で上記濃度のZn(II)を、トランスジェニックマウスに対して経口、静脈内、腹腔内、皮下、および皮内投与し〔(2)参照〕、A産生量を、上記(1)で概要を述べたようにしてCNS中および血液中(尾部静脈から採血したもの)で測定した。マウスの尾部静脈から得た血清(150~200μl)を、PBSバッファーを用いて500μlの容量までフィルアップし、5μgのモノクローナル抗体WO-2〔イダら (Ida et al.)、上掲〕と20μlのタンパク質Gセファロース1:1懸濁液とともに、オーバーヘッド振盪器中、4で一晩インキュベートした。次いで、生じた上清を抗APPポリクローナル抗体(22734/6)とともにインキュベートし、免疫複合体を上記(1)の説明に従い分析した。A免疫複合体を、製造業者の指示に従い12%のビス-ト

リシン・ノベックス (Novex) ゲルを用いて分離し、タンパク質をイダラ (Ida et al.) の E C L 法を用いてモノクローナル抗体 WO - 2 とともにニトロセルロース・フィルター (380 mA、4、40 分間) に移した後に、関連分子量範囲を解析した。ここでも、A 産生量の減少は 50 μ M の Zn (II) 濃度から得られうるという結果を得た。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、A₁、p3.5 および p3 へのアミロイド前駆体タンパク質 (APP770) のプロセッシングを示す。

1 文字コード ; 白文字は A₁ 1 ~ 40 / 42 のアミノ酸配列を示す。抗体についてのエピトープのおよその位置を黒棒で配列の下に示す。

【図 2】

図 2 は、c - myc 標識 (getaggtm) APP695 の免疫沈降を示す。

免疫沈降を、野生型 (a、CHO - K1) の溶解物 (myc - APP695) およびならし培地 (myc - sAPP695) から、および銅耐性 CHO 細胞 (b、CHO - CUR3) から、ポリクローナル c - myc 抗体 18 / 47 を用いて行なった。沈殿した試料を、ニトロセルロース膜に移した後、モノクローナル APP 抗体 22C11 によりイムノブロットした。対照 : 培地 (「mock / s」) および溶解物 (「mock / c」) または「mock」トランスフェクト細胞。

【図 3】

図 3 は、慣用の培地 (CM ; 基本培地 - 銅を含む) もしくは指示された濃度の銅を含む培地における銅キレート化剤であるバトクプロイン (Bathocuproin) (BC) および D - ペニシラミン (Penicillamin) (PEN) の存在下での 4 時間のインキュベーションの後における、抗 APP (22734 / 6 ; 細菌で生産した APP による免疫化により得られたウサギ由来のポリクローナル血清、図 1 参照) または抗 A₁ (730 ; 合成により作製した A₁ 40 ペプチドによる免疫化により得られたウサギ由来のポリクローナル血清) による、代謝的に標識した CUR3 細胞の溶解物 (a) からの Ho1o - APP695 の免疫沈降、ならび

に培地 (d) からの可溶性 A P P 6 9 5 (b) および A および p 3 の免疫沈降を示す。

高い銅濃度における二重線 (b) としての s A P P 6 9 5 の出現は、その異なるシアル酸含量に基づく。A バンドのいくぶん上で泳動される断片 (d) は低い銅濃度で生じ、おそらく、 α -セクレターゼおよび β -セクレターゼによる切断により生ずる (図 1 も参照) 。この実験で測定した、c A P P (白三角) 、s A P P (白四角) および全分泌タンパク質 (黒四角) の相対量を、c) において基本培地 - 銅濃度で得られる放射能の割合として定量した ; (e) において、A (白四角) 、p 3 (白三角) および s A P P (黒四角 ; (c) と同じ実験から得られたデータをよりよい比較のために示す) 。データは 3 回の独立の実験からの平均値に相当する。(e) における「 0 」 μ M および「 1 」 μ M 銅は、基本培地 (C M ; 0 . 8 μ M) における、銅 (P E N / B C) および銅の除去のためのインキュベーション条件をいう。

【 図 4 】

図 4 は、慣用の培地 (C M ; 基本培地 - 銅を含む) もしくは指示された濃度の銅を含む培地におけるの銅キレート化剤であるバトクプロイン (Bathocuproin) (B C) および D - ペニシラミン (Penicillamin) (P E N) の存在下での 4 時間のインキュベーションの後における、抗 A P P (2 2 7 3 4 / 6) または抗 A (7 3 0) による、代謝的に標識した K 1 細胞の溶解物 (a) からの H o l o - A P P 6 9 5 の免疫沈降、ならびに培地 (d) からの可溶性 A P P 6 9 5 (b) および A および p 3 の免疫沈降を示す ; 図 3 のようにして定量した。

s A P P 7 5 1 / 7 7 0 の細胞内レベルは C U R 3 細胞内より K 1 細胞内のほうが高く (図 2 参照) 、それはまた、銅濃度に影響され、このように定量された。データは 2 回の独立の実験からの平均値である。この実験で測定した、c A P P (白丸) 、s A P P 6 9 5 (白四角) 、s A P P 7 5 1 / 7 7 0 (白三角) および全分泌タンパク質 (黒四角) の相対量を、c) において定量する。(e) において、A (白四角) 、p 3 (白三角) および s A P P 6 9 5 (黒四角 ; c に示す同じ実験のデータ) 。(e) における「 0 」 μ M および「 1 」 μ M 銅は、基本培地 (C M ; 0 . 8 μ M) における、銅 (P E N / B C) および銅の除去の

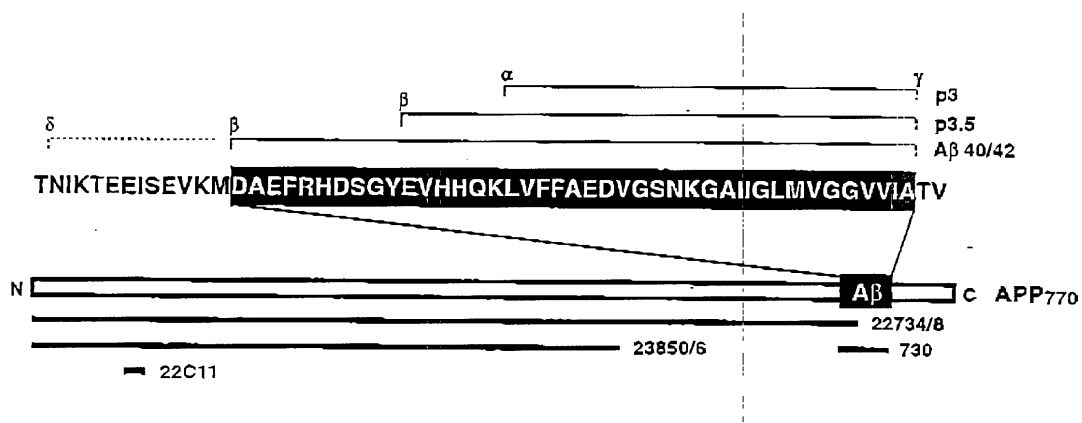
ためのインキュベーション条件をいう。A バンドのいくぶん上で泳動される断片 (d) は低い銅濃度で生じ、おそらく、 β -セクレターゼおよび γ -セクレターゼによる切断により生ずる (図1も参照)。

【図5】

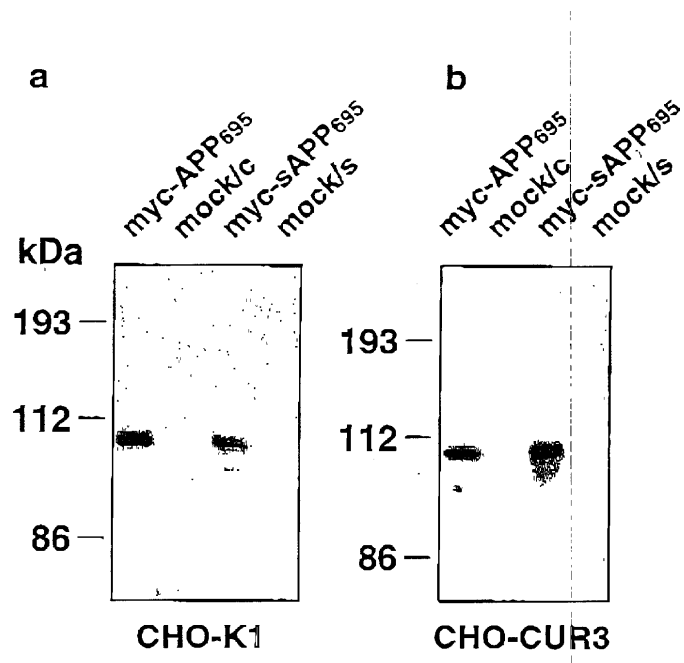
図5は、CHO-K1細胞 (a) とCHO-CUR3細胞 (b) のならし培地から免疫沈降された、sAPP695、p3およびA の相対レベルの定量を示す。

sAPP695 (黒四角) の増加は、K1細胞で10 μ M Cu (II) (a) において、およびCUR3細胞で50 μ M Cu (II) (b) において、最高に達した ; これは続いて減少した。sAPPレベル (白三角) の変化は、いくぶん低いCu (II) 用量で最高に達したp3タンパク質による変化と比較して遅く生じ、これはsAPPと比較して長い半減期によるものと考えられる。それに対し、A レベル (黒四角) は、基本レベル以下のCu (II) 濃度で両細胞株において著しく増加した。最初のデータ点は基本銅濃度 [0.8 μ M Cu (II)] で測定した。

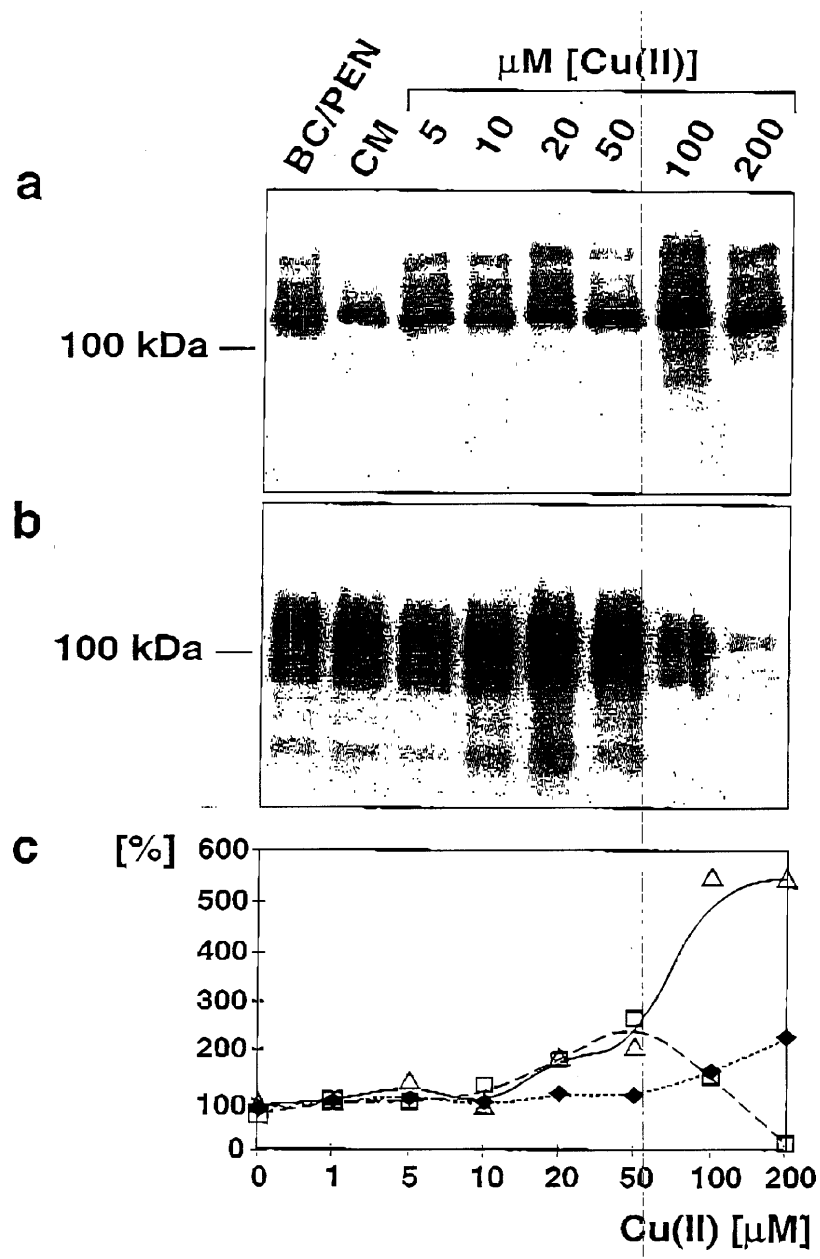
【図1】



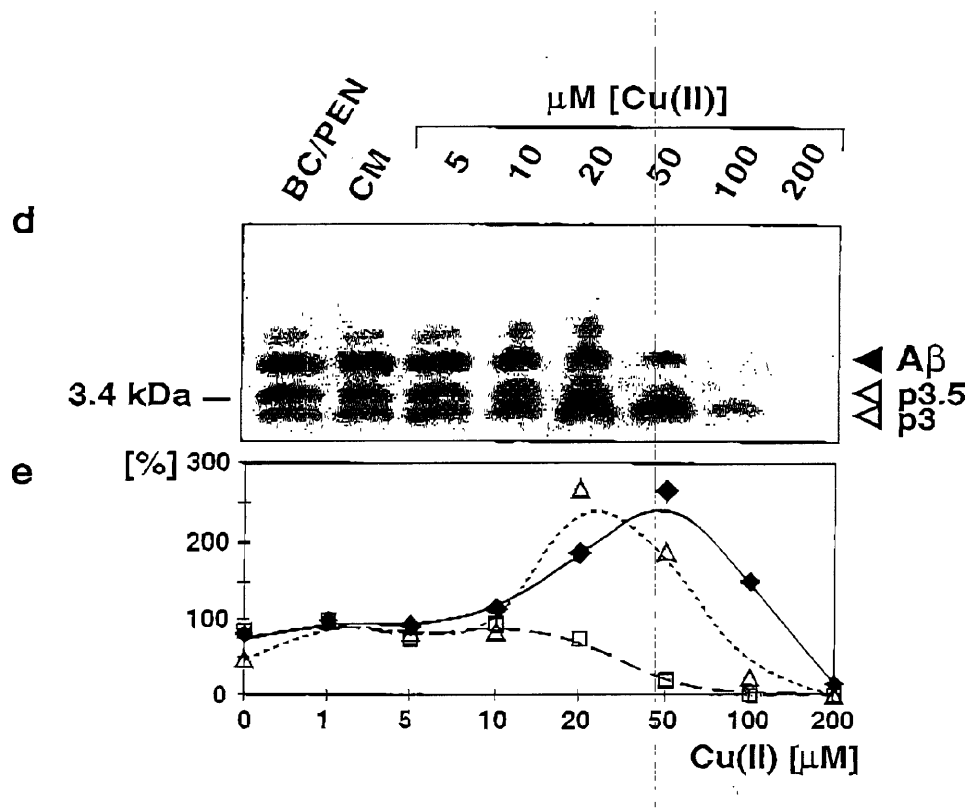
【図2】




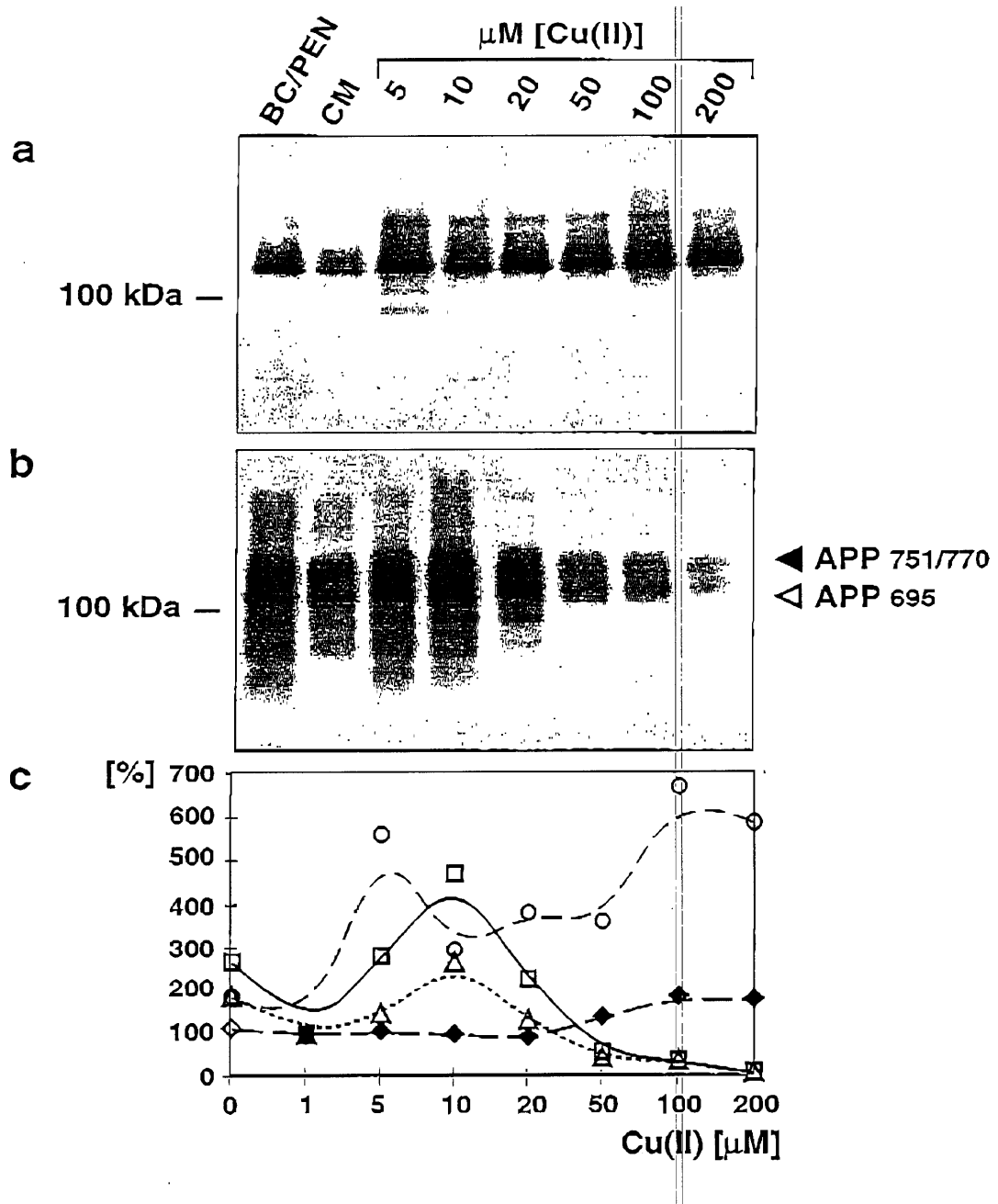
【図3 a - c】



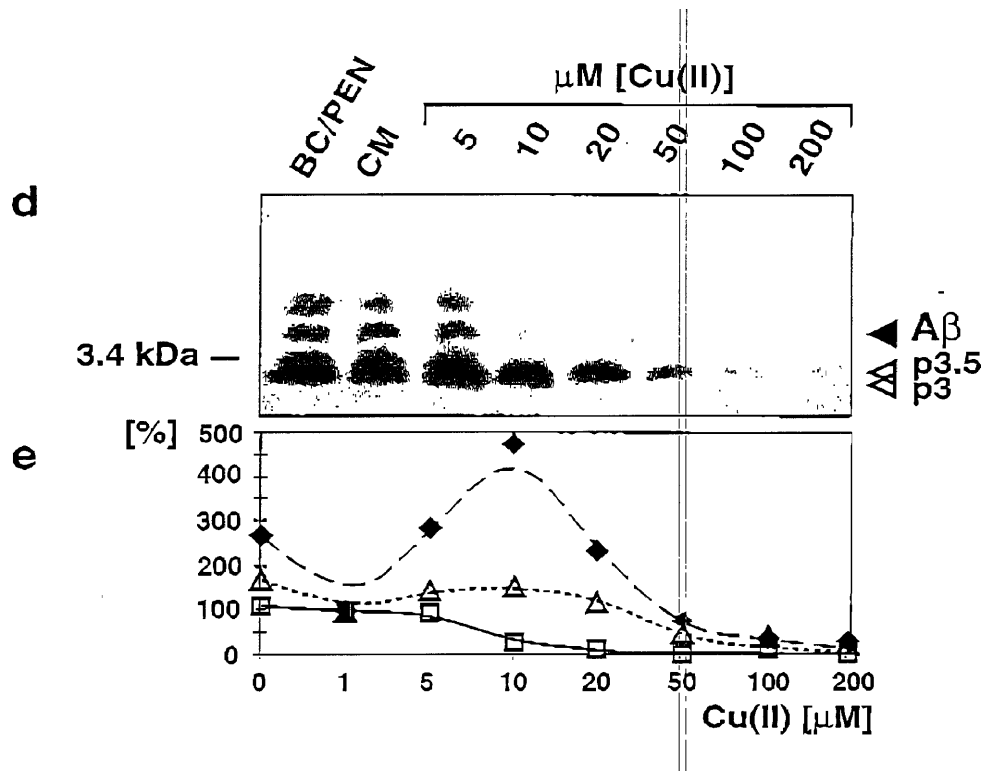
【図3 d・e】



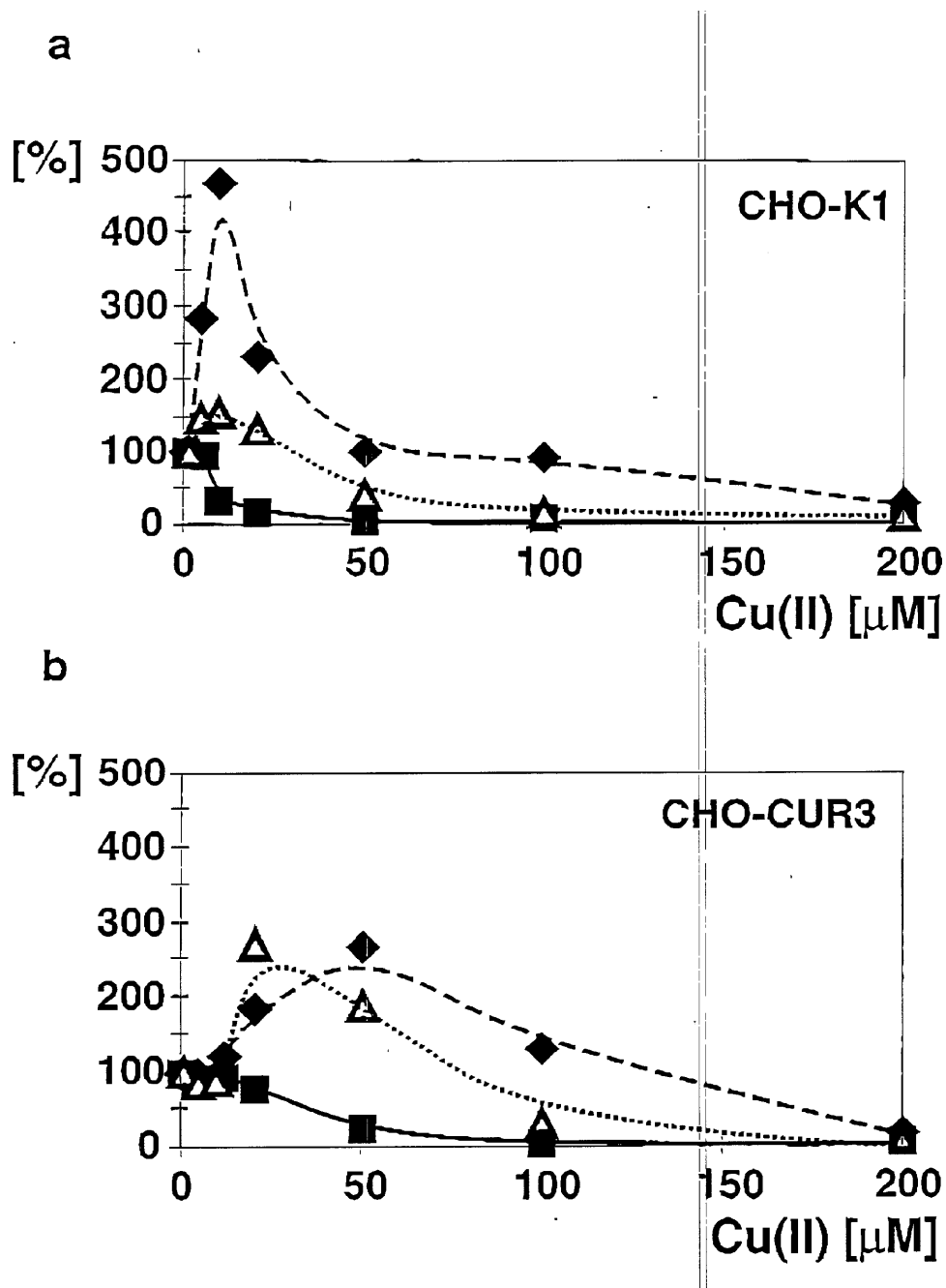
【 4 a - c】



【図4d・e】



【図5】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年5月16日(2001.5.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アミロイド前駆体タンパク質(A β)の銅結合部位に結合する、および/またはアミロイドA β ペプチドの放出を低減する、または防ぐことを特徴とする銅アゴニストのアルツハイマー病の予防または治療のための使用。

【請求項2】 銅アゴニストが二価金属イオン、オリゴペプチド、オリゴヌクレオチド、オリゴ糖、ヌクレオチドアナログ、化学物質ライブラリーまたは微生物もしくは植物由来の低分子の天然物質である、請求項1記載の使用。

【請求項3】 A β の銅結合部位に結合する、および/またはアミロイドA β ペプチドの放出に対する阻害効果を発揮する銅アゴニストを同定する方法であって、

(a) A β または銅結合部位を有するその断片を上記効果を潜在的に有しうる種々の濃度の化合物と接触させる工程、

(b) アミロイドA β ペプチドを発現する哺乳動物においてA β タンパク質の減少を検出する工程

によって特徴づけられる方法。

【請求項4】 A β ペプチドの減少が細胞培養系でのELISAまたは免疫沈降により検出される、請求項5記載の方法。

【請求項5】 A β の銅結合部位に結合する、および/またはアミロイドA β ペプチドの放出に対する阻害効果を発揮する銅アゴニストを同定する方法であって、

(a) A β または銅結合部位を有するその断片を、溶解させた、または固定化

した物質ライブラリーあるいは微生物および/または植物由来の低分子物質と接触させる工程、

(b) 溶解させた物質ライブラリーまたは液状の低分子物質を用いる場合、APPまたはその該断片に特異的な抗体を用いて前記溶液から競争的または非競争的な銅結合部位/リガンド複合体を免疫沈降させる工程、あるいは固定化した物質ライブラリーを用いる場合、銅塩の添加により銅結合部位/リガンド複合体からリガンドを放出させる工程、

(c) 前記リガンドを同定する工程、ならびに

(d) APPの銅結合部位への結合後、アミロイドAペプチドの放出に対する阻害効果を発揮するリガンドを選択する工程、〔ここで工程(d)は任意に工程(c)より前に行ないうる〕

により特徴づけられる方法。

【請求項6】 工程(d)が、APP695で安定にトランスフェクトされた哺乳動物細胞と工程(a)~(c)で得られたリガンドとをインキュベーションする工程、およびポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いてアミロイドAペプチドの産生を測定する工程を含む、請求項5記載の方法。

【請求項7】 工程(d)が、ヒトアミロイドAペプチドを発現するトランスジェニック動物に工程(a)~(c)で得られたリガンドを投与する工程、CNSまたは血液から試料を集める工程、ならびにポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いてアミロイドAペプチドの産生を測定する工程を含む、請求項5記載の方法。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/DE00/00693		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC7. A61K 33/30, 33/34, 33/24, G01N 33/68, A61P 25/00				
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) IPC7. A61K G01N				
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 practical, search terms used) WPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data, MEDLINE				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	WO 93 10459 A (UNIV MELBOURNE) 27 May 1993 (27.05.93) abstract page 21; claims 15-17; examples 3-6 -----	1-4		
X	WO 98 40071 A (GEN HOSPITAL CORP; BUSH ASHLEY I (US); ATWOOD CRAIG S (US); HUANG) 17 September 1998 (17.09.98) pages 41-45; claims 13- 15, 26-29, 31-33; example 6	1-4		
X	Page 52; claims 59, 66, 73, 81, 93; example 3 -----	5-9		
P,X	WO 99 45907 A (GEN HOSPITAL CORP) 16 September 1999 (16.09.99) abstract; claims 16, 21, 25; example 8	1-4		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>			
Date of the actual completion of the international search 29 January 2001 (29.01.01)		Date of mailing of the international search report 8 February 2001 (08.02.01)		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office		Authorized officer		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 00/00693

C. (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HESSE, LARS ET AL: "The beta-A4 amyloid precursor protein binding to copper." FEBS (FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES) LETTERS, (1994) volume 349, No. 1, PP. 109-116., XP000929645 abstract, page 109, column 1; figures 6,7	1-4
X	NOSTRAND: "Zinc(II) selectively enhances the inhibition of coagulation factor XIa by protease Nexin-2/amyloid b protein precursor" THROMBOSIS RESEARCH, volume 78, No. 1, April 1995 (04.1995), pages 43-53 XP000933824, see discussion, abstract; figure 4	1-4
X,P	BORCHARDT T. ET AL: "Differential effects of zinc on amyloid precursor protein (APP) processing in copper resistant variants of cultured chinese hamster ovary cells" CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY, XP000933558 see discussion, abstract, figures 3, 5	1-9
X	LI, Q. X. ET AL: "Proteolytic processing of Alzheimers disease bA4 amyloid precursor protein in human platelets" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, volume 270, No. 23, 9 June 1995 (09.06.95), pages 14140-14147 XP000929730 see discussion, abstract, page 14143, column 2, paragraph 2	1-4
X	RUSSO T. ET AL: "Fe65 and the protein network centered around the cytosolic domain of the Alzheimer's b-amyloid precursor protein" FEBS LETTERS, volume 434, 1998, pages 1-7, XP000929646, abstract, page 3, figure 3	1-4
X	ERMEKOVA K. S. ET AL: "Proteins implicated in Alzheimer disease. The role of Fe65, a new adapter which binds to b-amyloid precursor protein" MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS OF NEURONAL PLASTICITY, volume 10, 1998, pages 161-180, XP000933860, page 170 - page 172; figures 5,6	1-4
E	WO 00 28331 A (DU PONT PHARM CO) 18 May 2000 (18.05.00), abstract, figures 1,19	5-9
X,P	US 5 981 208 A (DREYER ROBERT N ET AL.) 9 November 1999 (09.11.99), abstract, claim 1; example 5	5-9
X,P	WO 99 21886 A (MERCKEN LUC; CZECH CHRISTIAN (FR); PRADIER LAURENT (FR); REBOUL BE) 6 May 1999 (06.05.99) abstract	1-9
X	Page 35, line 20 - page 36, line 6; claims 24, 28, 35; example 6	5-9
X	WO 97 18476 A (UNIV WESTERN AUSTRALIA; RAMSAY HEALTH CARE PTY LTD (AU); MARTINS R) 22 May 1997 (22.05.97), abstract; claims 1, 8, 9; example 1	5-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/DE00/00693

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claim 4 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. Claims Nos.: 1-4
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:

See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

See supplemental sheet

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 fee, 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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/DE00/00693

The International Search Authority has found that this international application contains several (groups of) inventions as follows:

1. Claims: Part 1-4

Metal ion as copper agonist that binds to the amyloid precursor protein (APP) and/or reduces or inhibits the release of amyloid AB peptide. Medicaments containing the copper agonists.

2. Claims: 5-9

Method for identifying a copper agonist that binds to the amyloid precursor protein (APP) and/or reduces or inhibits the release of amyloid AB peptide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/DE00/00693

Continuation of Box I.2

Claims: 1-4

Patent claims 1-4

Patent claims 1-4 relate to an excessively large number of possible compounds, of which only a small proportion is supported by the description as defined by PCT Article 6 and/or can be considered as disclosed in the patent application as defined by PCT Article 5. In the present case, the patent claims lack the necessary support and the patent application lacks the necessary disclosure to such an extent that a meaningful search covering the entire scope of protection sought for appears to be impossible. The patent claims relate to compounds which are characterized by the desired characteristic feature or property, i.e. "copper agonist". Hence, the patent claims encompass all products, etc. having said characteristic or property, whereas the patent application supports only a limited amount of said products as defined by PCT Article 5. In the present case, the patent claims lack the necessary support or the patent application lacks the necessary disclosure to such an extent that a meaningful search covering the entire scope of protection sought for appears to be impossible.

For this reason, the search regarding the first invention was directed towards those parts of the patent claims that appeared to be supported or disclosed as previously defined, namely those parts referring to the utilization of Zn ions as cited in the embodiment examples. Since the other variants included in claim 2 are not sufficiently characterized and the necessary support is lacking, a meaningful search for said variants was not deemed possible.

The applicant's attention is drawn to the fact that patent claims, or parts of patent claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective whether or not the patent claims are amended following receipt of the International Search Report (PCT Art. 19) or whether or not the applicant files new patent claims during any PCT Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International Application No
 PCT/DE 00/00693

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9310459 A	27-05-1993	AU 669493 B	13-06-1996
		AU 2926392 A	15-06-1993
		CA 2123211 A	27-05-1993
		DE 69227380 D	26-11-1998
		DE 69227380 T	08-04-1999
		EP 0613560 A	07-09-1994
		JP 7503316 T	06-04-1995
		US 5705401 A	06-01-1998
WO 9840071 A	17-09-1998	AU 6548498 A	29-09-1998
		EP 1007048 A	14-06-2000
WO 9945907 A	16-09-1999	AU 2998199 A	27-09-1999
		EP 1061923 A	27-12-2000
WO 0028331 A	18-05-2000	AU 1618000 A	29-05-2000
US 5981208 A	09-11-1999	AU 3318793 A	14-10-1993
		CA 2086165 A	10-10-1993
		EP 0564946 A	13-10-1993
		IL 105216 A	16-10-1996
		JP 7051096 A	28-02-1995
		MX 9302021 A	31-08-1994
		NZ 247356 A	27-04-1995
WO 9921886 A	06-05-1999	FR 2770217 A	30-04-1999
		AU 3129500 A	14-12-2000
		BR 9813105 A	15-08-2000
		CN 1277616 T	20-12-2000
		EP 1025121 A	09-08-2000
		NO 20002001 A	17-04-2000
		ZA 9809745 A	04-05-1999
WO 9718476 A	22-05-1997	AU 7486096 A	05-06-1997

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	FI	テ-マコ-ト(参考)
G 0 1 N 33/566 33/577		G 0 1 N 33/566 33/577	B
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW		
(72)発明者	ムルタウブ, ゲルト ドイツ連邦共和国 ディルスベルク デー - 69151 フリッツ フォン プリーゼン シュトラーセ 16		
(72)発明者	マスターズ, コリン, エル. オーストラリア国 ヴィクトリア 3068, クリフトン ヒル, ゴールド シュトラー セ 171		
Fターム(参考)	2G045 AA25 BB20 CA26 DA36 DB13 FB03 FB05 FB06 JA20 4C084 AA17 NA14 ZA16		

专利名称(译)	铜激动剂，结合APP的铜结合位点和/或对淀粉样蛋白Aβ肽的释放发挥抑制作用		
公开(公告)号	JP2002538168A	公开(公告)日	2002-11-12
申请号	JP2000602298	申请日	2000-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	路透社康拉德 Murutaupugeruto		
申请(专利权)人(译)	路透社，康拉德 Murutaupu，格尔德		
[标]发明人	バイロイターコンラート ムルタウプゲルト マスターズコリンエル		
发明人	バイロイター,コンラート ムルタウプ,ゲルト マスターズ,コリン,エル.		
IPC分类号	A61K33/34 A61K33/06 A61K33/30 A61K38/16 A61K39/00 A61P25/28 G01N33/68 A61K45/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	A61K33/06 A61K33/30 A61K38/16 A61P25/00 A61P25/28		
FI分类号	A61K45/00 A61P25/28 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/577.B		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB20 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/DB13 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045/JA20 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA16		
优先权	19909357 1999-03-03 DE		
其他公开文献	JP2002538168A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及对与APP的铜结合位点结合和/或参与阿尔茨海默氏病发展的淀粉样蛋白Aβ肽的释放具有抑制作用的铜激动剂。本发明还涉及铜激动剂在生产含有铜激动剂的药物或用于预防和/或治疗阿尔茨海默氏病的药物中的用途。本发明进一步涉及鉴定具有本发明期望效果的铜激动剂的方法。

