

PT



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-34176

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: "PROTEÍNA VARIANTE AMILOIDE"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL: A01K 67/027 A61K 38/00

71. SOLICITANTE: MORI HIROSHI

DOMICILIO: OSAKA, JAPÓN

74. APODERADO: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
T.P.No.20.281

22. BOGOTA, D.C., 04 de Abril de 2007

06-09-2007

✓

PETITORIO

000001

**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 07-034176- -00000-0000

Fec: 2007-04-04 14:55:38 , Dep. 2020 NUECREACIONES

Tra. 11 PATENTE/II

Evs: 379 FASENACIONALI

Act: 411 PRESENTACION

Folios: 132

radicación

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒ X

Capítulo I

☐

Capítulo II

②

SOLICITANTE

(71)

Nombre MORI HIROSHI

Dirección 1-3-45 301 Nakamichi Higashinari ku Osaka-shi Osaka, Japón

Nacionalidad o Domicilio Osaka, Japón

Lugar de Constitución

Teléfono

Fax

E Mail

IDENTIFICACION

C C

☐

NIT

☐

C E

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección Avenida 82 No 10-62 Piso 6

Teléfono 634 1500

Fax: 376 2211

E Mail office bogota@bakemet.com

IDENTIFICACION

C C

☒ X

NIT

☐

C E

☐

Otro

☐

Cual

Número

79 143.366 de

Usaquén

TP 20 281

④

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre MORI Hiroshi TOMIYAMA Takami y SHIMADA, Hiroyuki

Dirección 1-3-45-301 Nakamichi Higashinari ku Osaka shi Osaka, Japón 2-3-20-201 Shiroyamada Sakai-shi Osaka, Japón y 6-12 32-604, Takadono, Asahi ku, Osaka shi Osaka, Japón, respectivamente

Nacionalidad o Domicilio Japoneses

⑤ PCT (85)

Solicitud Internacional No PCT/JP2005/018896

Fecha 06-OCT-05

Publicación Internacional No WO2006/038729

Fecha 13 ABR-06

⑥ Título (54)

PROTEÍNA VARIANTE AMILOIDE

⑦

Clasificación Internacional (51)

A01K 67/027 A61K 31/7088 A61K 38/00 A61K 39/395 A61K 45/00 A61K 48/00 A61P 25/28 A61P 43/00 C07K 14/47 C07K 16/18 C07K 7/06 C07K 7/08 C12N 15/09 C12N 5/10 C12Q 1/02 G01N 33/15 G01N 33/50 G01N 33/68

⑧

Prioridad

SI

☒ X

NO

☐**(33) País de Origen**

JP

(32) Fecha

06-OCT-04

(31) Número de Solicitud

2004 294292

⑨

Comprobante de pago No 07 19696**Fecha** 08-MAR-07

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario ver reverso de esta página

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. 00002
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del invento al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del control de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Foto final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patentes o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros: Extractos y Reporte de búsqueda internacional.

11

FIGURA CARACTERISTICA

12

Solicitó la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.568 de Usaquén

T.P. 25.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

00003

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 19,696
FECHA : MARZO 8 DE 2007

Rad: 07-034176- -00000-0000
Fec. 2007-04-04 14:55:38 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE/IT
E:6 378 FASENACIONALI
Apt 411 PRESENTACION Folios 132

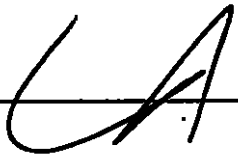
***** CONSIGNACION *****

REQUISITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54689077	08/03/2007	83,306,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	482,000.00

SOM: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

DESCRIPTION

000000

Variant Amyloid Protein

5

Technical Field

This invention relates to a variant amyloid protein existing in familial Alzheimer's disease patients as well as to utilization and
10 development of such variant amyloid protein.

Background Art

15 An amyloid protein is a type of tissue lesion that is observed in cerebral tissue of not only patients with Alzheimer's disease and Down's syndrome but also subjects with normal aged. The amyloid protein consists of 40 to 42 or 43 amino acids rich in hydrophobic amino acid and can be produced by hydrolytic cleavage of an amyloid precursor
20 protein (hereinafter referred to as APP) which is a precursor thereof. APP consists of 695, 751, or 770 amino acids, which is a type-1 membrane protein with the single membrane domain, and has its amino terminal outside the cell. The difference in number of amino acids depends on the presence or absence of a protease inhibitor active site of
25 a so-called Kunitz-type in the extracellular region.

A main component of neuron is APP consisting of 695 amino acids (hereinafter referred to as APP695). In turn, APP consisting of 770 amino acids (hereinafter referred to as APP770 of which cDNA base
30 sequence and amino acid sequence are shown as SEQ ID NO 3) includes

cytoplasmic fragment of APP. According to conventional findings, it has been considered that the second stage cleavage occurs at the gamma (γ) position which is the carboxyl terminal of the amyloid protein (between Val at position 711 and Ile at position 712, between Ala at position 713 and Thr at position 714, or between Thr at position 714 and Val at position 715 of APP770 of SEQ ID NO 3); however, it has recently been reported that the second stage cleavage occurs at the epsilon (ϵ) position (between Thr at position 719 and Leu at position 720 or between Leu at position 720 and Val at position 721 of APP770 of SEQ ID NO 3) which is near the cytoplasm and downstream from the amino acid residue 5 by 10 amino acids (in the carboxyl terminal direction).

The intracerebral neuron lesion of the Alzheimer's disease occurs in advance of clinical abnormal symptoms such as disorientation, memory decline, amnesia, decline in intellect, and behavior disorder. The neuron lesion includes amyloid protein deposition, neural fibril alteration, and cell dropout, and the amyloid protein deposition is the initial pathological reaction.

It is considered that the amyloid hypothesis, in which the amyloid protein production and deposition are hypothesized to be the causes of the Alzheimer's disease, is important to understand the progress of the Alzheimer's disease, and one of the grounds for the importance is found in familial Alzheimer's disease study.

Concept that the γ secretase is a gene product of presenilin 1 (Non-Patent Document 3) and presenilin 2 (Non-Patent Documents 4 and 5) present in chromosome 14, which have been discovered to be responsible genes for early onset familial Alzheimer's disease, has widely been accepted; however, this concept has not been completed.

cytoplasmic fragment of APP. According to conventional findings, it has been considered that the second stage cleavage occurs at the gamma (γ) position which is the carboxyl terminal of the amyloid protein (between Val at position 711 and Ile at position 712, between Ala at position 713 and Thr at position 714, or between Thr at position 714 and Val at position 715 of APP770 of SEQ ID NO 3); however, it has recently been reported that the second stage cleavage occurs at the epsilon (ϵ) position (between Thr at position 719 and Leu at position 720 or between Leu at position 720 and Val at position 721 of APP770 of SEQ ID NO 3) which is near the cytoplasm and downstream from the amino acid residue 5 by 10 amino acids (in the carboxyl terminal direction).

The intracerebral neuron lesion of the Alzheimer's disease occurs in advance of clinical abnormal symptoms such as disorientation, memory decline, amnesia, decline in intellect, and behavior disorder. The neuron lesion includes amyloid protein deposition, neural fibril alteration, and cell dropout, and the amyloid protein deposition is the initial pathological reaction.

It is considered that the amyloid hypothesis, in which the amyloid protein production and deposition are hypothesized to be the causes of the Alzheimer's disease, is important to understand the progress of the Alzheimer's disease, and one of the grounds for the importance is found in familial Alzheimer's disease study.

Concept that the γ secretase is a gene product of presenilin 1 (Non-Patent Document 3) and presenilin 2 (Non-Patent Documents 4 and 5) present in chromosome 14, which have been discovered to be responsible genes for early onset familial Alzheimer's disease, has widely been accepted; however, this concept has not been completed.

Since APP is also a responsible gene for the early onset familial Alzheimer's disease (Non-Patent Document 6), it is demonstrated that plural factors are involved in etiology of the Alzheimer's disease which is a type of dementia.

As described in the foregoing, the amyloid protein consists of two components. One of them is the shorter amyloid protein component (hereinafter referred to as A β 1-40) starting from asparaginic acid to terminate at valin at position 40, and the other is the longer amyloid protein component which consists of 42 or 43 amino acids starting from asparaginic acid (same as A β 1-40 consisting of 40 amino acids) and is longer than A β 1-40 by amino acids of two or three residues to terminate at Ala at position 42 or Thr at position 43 (hereinafter referred to as A β 1-42 or A β 1-43, or collectively A β 1-42/43). In the longer components, A β 1-42 is higher in hydrophobic property and more insoluble. A fiber-like amyloid fibril having a diameter of 5 to 6 nm is formed of the longer component and the shorter component wherein the longer component serves as a nucleus and the shorter component is attached to the nucleus.

It has been demonstrated that production of A β 1-42/43 which is the longer amyloid protein is increased when a gene variant is present in presenilin 1 or presenilin 2. It is considered that the longer amyloid protein component which is considered to be a determinant of a threshold value for amyloid protein polymerization is formed in large quantity due to this variant effect, thereby accelerating the etiologic reaction.

Many mutation variants have been identified in APP, and typical

variants are generally classified into Sweden variant (Met670Asn, Lys671Leu in accordance with the amino acid numbering of APP770; the same applies to the following variants) preceding the amino terminal of the amyloid protein, Dutch variant (Glu693Gln), London variant (Val717Ile), and Australia variant (Leu723Pro). Production of the two amyloid protein components are increased in Sweden variant, and only the production of A β 1-42/43 is increased in London variant and Australia variant. Significance of Dutch variant is in the middle of discussion, and the conclusion has not been made yet.

10

E4 is known as a risk factor allele of apolipoprotein E. It has been proved statistically that the onset of Alzheimer's disease is set ahead by 8 to 10 years in the case where only one of chromosome alleles is E4 or by 16 to 20 years in the case where both of chromosome alleles are E4 (Non-Patent Document 7).

15

It is considered that the activity inhibition of β secretase and γ secretase suppresses the amyloid protein production and can be used as a therapeutic drug for stopping or delaying the progress of Alzheimer's disease. An α secretase reaction occurs in addition to the β secretase reaction in the first stage of hydrolysis of APP, and the γ secretase reaction occurs in the second stages of the α secretase reaction and the β secretase reaction; therefore, a wider spectral effect of the γ secretase reaction is expected.

25

Though an ultimate conclusion for identification of the γ secretase has not been obtained yet, it has been proved that presenilin 1 has the important role. According to experiments of animals and experiments in cultured cells from which the action of presenilin 1 is inactivated, it is reported that abnormalities in cerebral nerve generation, spine formation,

30

or lymph cell generation are caused. That is, presenilin 1 has various effects other than the amyloid protein.

It is necessary to consider that the nonspecific activity
 5 suppression of the γ secretase can induce a severe adverse reaction such as induction of malignant transformation (Non-Patent Document 8). In turn, it has been suggested that non-steroidal anti-inflammatory drugs epidemiologically have an anti-dementia effect, and it has been proved that the non-steroidal anti-inflammatory drugs selectively inhibit the
 10 productions of $A\beta$ 1-42/43 (Non-Patent Documents 9 and 10) and have a function of Rho kinase (Non-Patent Document 11), thereby becoming an important anti-dementia drug candidate. However, concentrations in usage and the like still require examination.

15 Though the vaccine therapy (Non-Patent Document 12) using a synthetic peptide $A\beta$ 1-42 as an antigen has been studied as a promising treatment method, an adverse reaction of causing a severe encephalitis has been pointed out as a side-effect (Non-Patent Document 13). In relation to the vaccine therapy, the indirect vaccine therapy or the
 20 indirect immunotherapy using an anti-amyloid antibody (Non-Patent Document 14) has attracted attention, but they require further examination from clinical point of view. It has been pointed out that the adverse effect of the vaccine therapy can be reduced by changing the antigen position of the amyloid protein used as the antigen to the amino
 25 terminal of the $A\beta$ 4-10, inducing the IgG2b isotype antigen, intestine immunization through oral administration, or the like, but such methods have not been confirmed as ameliorative measures.

List of Non-Patent Documents

1. Yankner, B.A. et al., Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. (1989) Science. 245(4916): 417-20.
2. Yankner, B.A., Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. (1990) Science. 1990 250(4978): 279-82.
3. Sherrington, R. et al., Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. (1995) Nature, 375(6534), 754-760.
- 10 4. Levy-Lahad, E. et al., Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. (1995) Science, 269(5226), 973-977.
- 5 5. Rogacy, E.I. et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. (1995) Nature 376(6543), 775-778.
- 15 6. Goate, A. et al., Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. (1991) Nature, 349(6311), 704-6.
7. Corder, E.H. et al., Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. (1993) Science. 261(5123): 921-3.
- 20 8. Hardy, J. and Israel, A. Alzheimer's disease. In search of gamma-secretase. (1999) Nature. 398(6727), 466-7.
9. Lim, G.P. et al., Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. (2000) J 25 Neurosci 20:5709-14.
10. Weggen, S. et al., A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. (2001) Nature 414:212-6.
11. Zhou, Y. et al., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic A β 42 by inhibiting Rho. (2003) Science 302:1215-7.
- 30 12. Schenk, D., et al. Immunization with amyloid b-attenuates

Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. (1999) Nature. 400, 173-6.

13. Nicoll, J.A.R. et al., Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- peptide: a case report. (2003) Nature Med. 9:

5 448-452.

14. DeMattos et al. (2002) Science 295: 2264-7.; Pfeifer, M. et al. Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy. (2002) Science 298: 1379-.

10

Disclosure of the Invention

This invention has been accomplished in view of the above-described problems of the conventional technologies, and an object thereof is to provide a novel amyloid protein (human variant amyloid protein) useful as an antigen molecule and the like for improving the vaccine therapy.

Another object of this invention is to provide a diagnostic measure for amyloid diseases by using the above variant amyloid protein and gene materials encoding the variant amyloid protein and a material for the diagnostic measure.

Still another object of this invention is to provide a method for screening a therapeutic agent component effective for the amyloid diseases based on production mechanism of the variant amyloid protein.

Yet another object of this invention is to provide an anti-amyloid disease drug using the variant amyloid protein or the gene material thereof.

This invention provides the following inventions for solving the above-described problems.

5 A first invention is a variant amyloid protein, which, in SEQ ID NO. 2, consists of the amino acid sequence of:

(1) 39 amino acids with deletion of Glu at 618th in the sequence from 597th to 636th;

10 (2) 41 amino acids with deletion of Glu at 618th in the sequence from 597th to 638th;

(3) 42 amino acids with deletion of Glu at position 618th in the sequence from 597th to 639th;

(4) 39 amino acids with deletion of Ala at 617th in the sequence from 597th to 636th;

15 (5) 41 amino acids with deletion of Ala at 617th in the sequence from 597th to 638th;

(6) 42 amino acids with deletion of Ala at 617th in the sequence from 597th to 639th;

20 (7) 39 amino acids with deletion of Asp at 619th in the sequence from 597th to 636th;

(8) 41 amino acids with deletion of Asp at 619th in the sequence from 597th to 638th; or

(9) 42 amino acids with deletion of Asp at 619th in the sequence from 597th to 639th.

25

More specifically, the variant amyloid protein of the first invention is a protein with deletion of Glu at 22nd, Ala at 21st, or Asp at 23rd in the normal (wildtype) amyloid protein consisting of 40, 42, or 43 amino acids (A β 1-40, A β 1-42, A β 1-43). In the following description, the
30 variant amyloid proteins consisting of the amino acid sequences (1) to (9)

are sometimes referred to as follows: (1) A β 1-40 (Δ 22E), (2) A β 1-42 (Δ 22E), (3) A β 1-43 (Δ 22E), (4) A β 1-40 (Δ 21A), (5) A β 1-42 (Δ 21A), (6) A β 1-43 (Δ 21A), (7) A β 1-40 (Δ 23D), (8) A β 1-42 (Δ 23D), (9) A β 1-43 (Δ 23D).

5 Note that the variant amyloid proteins (A β 1-40 (Δ 22E), A β 1-42 (Δ 22E), A β 1-43 (Δ 22E)) are deletion variant amyloid proteins that the inventors isolated and identified from familial Alzheimer's disease patients. The variant amyloid proteins of the amino acid sequences (4) to (9) are presumed with high probability to have a function similar to
10 the variant amyloid proteins of the amino acid sequences (1) to (3). More specifically, by an analysis of structure of a normal type or wildtype amyloid protein with the use of an existing protein structure prediction program (for example, a protein second structure prediction program included in Chou-Fasman 2nd Structure Prediction Program: GENETXY
15 version 8.1.8, product of GENETXY Co., Tokyo), it is confirmed that two α helices shed by an irregular coil structure at about the 7th amino acid exist in the 1st to 25th amino acids and that a β structure exists in a region from the 30th amino acid to the carboxyl terminal. That is, the structure of the normal or wildtype amyloid protein is " α helix - α helix -
20 β structure". In turn, by analyses of Dutch variant (Glu693Gln) which is the known variant amyloid protein and the variant amyloid proteins (A β 1-40 (Δ 22E), A β 1-42 (Δ 22E), A β 1-43 (Δ 22E)) of this invention consisting of the amino acid sequences (1) to (3) in the same manner as described above, it is confirmed that a structure of these variant amyloid
25 proteins is " α helix - β structure - β structure". Therefore, the variant amyloid proteins of this invention are characterized by having the structure of " α helix - β structure - β structure", and the variant amyloid protein (Δ 21A or Δ 23D) from which the amino acid residue (Ala or Asp) preceding or following Glu at position 22 is deleted has the structure of
30 " α helix - β structure - β structure". This fact is apparently different

from the fact that a structure of a variant amyloid protein from which an amino acid secondarily preceding or following Glu at position 22 (Phe and Val) has the structure "α helix - α helix - β structure) same as that of the normal (wildtype) amyloid protein.

5

Note that the variant amyloid protein of the first invention includes proteins from which one or more amino acid residues at the N-terminal or C-terminal are deleted insofar as their characteristic activities (for example, toxicity and agglutinating property lower than those of the wildtype amyloid protein) are not inactivated.

10

As described in the foregoing, the variant amyloid protein of the first invention includes the natural variant amyloid proteins Aβ1-40 (Δ22E), Aβ1-42 (Δ22E), and Aβ1-43 (Δ22E) existing in familial Alzheimer's disease patients and the non-natural variant amyloid proteins Aβ1-40 (Δ21A), Aβ1-42 (Δ21A), Aβ1-43 (Δ21A), Aβ1-40 (Δ23D), Aβ1-42 (Δ23D), and Aβ1-43 (Δ23D) having the function identical to that of the natural proteins. Also, as used herein, the wording "non-natural" means that the protein has not been isolated and identified from a patient, and there is a chance that existence of a natural amyloid protein from which Ala at position 21 or Asp at position 23 is deleted will be confirmed through examination of a good number of patients.

15

A second invention is a peptide which is a part of the human variant amyloid protein of the first invention, comprising 5 to 28 amino acids preceding and following the deleted amino acid residue in SEQ ID NO 2.

25

A third invention is a human gene (hereinafter referred to as variant APP gene or deletion variant APP gene in some cases) encoding a

30

variant amyloid precursor protein for the human variant amyloid protein of the first invention.

5 A fourth invention is an mRNA, which is a transcription product of the human gene of the third invention.

A fifth invention is a cDNA synthesized from the mRNA of the fourth invention, which consists of the base sequence of SEQ ID NO 1 with deletion of bases at 1852nd to 1854th.

10

A sixth invention is an antibody specifically recognizing the human variant amyloid protein of the first invention.

15 A seventh invention is an antibody prepared by using an oligomer of the human variant amyloid protein of the first invention as an antigen and specifically recognizing an oligomeric amyloid protein.

20 An eighth invention is a diagnostic method of amyloid diseases, which comprises detecting an existence of the human amyloid protein of the first invention.

A ninth invention is a diagnostic method of amyloid diseases, which comprises detecting an existence of the human gene of the third invention or the mRNA of the fourth invention.

25

A tenth invention is a cell expressing the human gene of the third invention.

30 An eleventh invention is a non-human animal having in vivo the variant amyloid protein of the first invention, and a tissue and a cell

derived from the non-human animal.

A twelfth invention is a method for screening a therapeutic agent component for the amyloid diseases, which comprises contacting the cell
 5 of the tenth invention or the non-human animal, the tissue, or the cell derived from the non-human animal of the eleventh invention with a test substance, and measuring behavior and activity of a human variant amyloid protein in the cell or the tissue.

10 A thirteenth invention is an anti-amyloid disease drug containing the variant amyloid protein of the first invention.

A fourteenth invention is an anti-amyloid disease drug containing the peptide of the second invention.

15

A fifteenth invention is an anti-amyloid disease drug containing the cDNA of the fifth invention.

A sixteenth invention is an anti-amyloid disease drug containing
 20 the antibody of the sixth invention or the seventh invention.

In this invention, it is possible to compare the deletion variant APP gene and a fragment thereof with the conventional wildtype APP or the reported familial variant APP. As a result, it is expected that new
 25 molecular mechanism, action, and effect contributing to clarification of metabolism of amyloid protein will help to elucidate the pathology.

Also, in this invention, it is possible to use a novel gene and animal using the deletion variant APP gene and the fragment thereof for
 30 a screening of novel drug and compound.

Also, in this invention, use of 39 amino acids comprising the deletion variant full-length amyloid protein A β 1-40 (Δ 22E), A β 1-40 (Δ 21A), or A β 1-40 (Δ 23D), 41 amino acids comprising the deletion variant full-length amyloid protein A β 1-42 (Δ 22E), A β 1-42 (Δ 21A), or A β 1-42 (Δ 23D), or 42 amino acids comprising the deletion variant full-length amyloid protein A β 1-43 (Δ 22E), A β 1-43 (Δ 21A), or A β 1-43 (Δ 23D) is advantageous for comparing a deletion variant effect thereof with the information of the reported wildtype amyloid protein.

Also, in this invention, pathology of dementia is expected to be induced since the variant has been identified in familial Alzheimer's disease patients, and it is assumed that the portion of A β 29-40 inside the membrane or the cDNA or the peptide having a partial sequence from which A β 29-42/43 is excluded is used in order to emphasize on a variant effect. Also, it is possible to conceive a modified matter obtained by inducing a change in hydrophilic property through modification of dissociated group for the purpose of improving cerebral blood vessel barrier or molecular stability.

The variant amyloid protein or the modified matter thereof is a degeneration product of the deletion variant APP, and a considerably reduced protein agglutinating property thereof which had not been known was confirmed.

As used herein, each of "protein" and "peptide" means a molecule consisting of plural amino acid residues which are bounded by peptide binding.

Further, as used herein, "amyloid disease" means diseases, such as Alzheimer's disease and Down's syndrome, in which the amyloid

protein participates directly or indirectly as etiology or with which such
participation is suspected and diseases in which the amyloid protein is
observed in neuron lesion. As used herein, "diagnosis" means a
judgment whether or not an examinee suffers from the amyloid disease, a
5 judgment whether or not there is a risk of suffering from the amyloid
disease in future, and a judgment whether or not there is a risk of
recurrence of the amyloid disease after treatment. Also, the diagnosis
includes a measurement of a degree of each of the amyloid disease and
the risk.

00019

10

Other terms and conceptions in this invention will be defined in
detail in description of embodiments and examples. Note that the terms
are in accordance with IUPAC-IUB Commission on Biochemical
Nomenclature or based on meanings of the terms used idiomatically in
15 the art. Also, various technologies used for practicing the invention
other than the technologies whose sources are named herein are
practicable by person skilled in the art without fail based on known
publications and the like. For example, the technologies in the field of
the biogenetics and the molecular biology are practicable by the methods
20 disclosed in or the methods disclosed in publications cited in J.
Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A laboratory
manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring
Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed.,
Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University
25 Press (1995); Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular
Biology, John Wiley & Sons, New York, N. Y., 1995; Nihon Seikagakukai
ed., "Zoku Seikagaku Jikken Koza 1, Idenai Kenkyuho II", Tokyo Kagaku
Dojin (1986); Nihon Seikagakukai ed., "Shin Seikagaku Jikken Koza 2,
Kakusan III (Kumikae DNA Gijutsu)", Tokyo Kagaku Dojin (1992); R. Wu
30 ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic

Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology" Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology" Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987); and the like or by methods substantially the same as those described above and modified methods thereof.

10

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a result of mass analysis of a variant amyloid protein secreted from a variant amyloid precursor protein.

15

Fig. 2 is a result of a dot test conducted for evaluating antigenicity of variant amyloid protein.

20

Fig. 3 is a result of a dot test conducted for evaluating antigenicity of the variant amyloid protein on the variant amyloid protein and a wildtype amyloid protein.

25

Fig. 4 is a result of immune precipitation conducted for evaluating specificity of an anti-variant amyloid protein antibody.

30

Fig. 5 is a result of immunocytochemistry with the anti-variant amyloid protein antibody.

Fig. 6 is a result of a fluorescent immune tissue double staining conducted for examining a relationship between a variant amyloid protein using the anti-variant amyloid protein antibody and a

neuroimmune reaction.

Best Mode for Carrying out the Invention

5

It is possible to isolate and generate a variant amyloid proteins of this invention as a natural protein A β 1-40 (Δ 22E), A β 1-42 (Δ 22E), or A β 1-43 (Δ 22E) from a cell of a familial Alzheimer's disease patient, for example. It is possible to obtain non-natural variant amyloid proteins

10 A β 1-40 (Δ 21A), A β 1-42 (Δ 21A), A β 1-43 (Δ 21A), A β 1-40 (Δ 23D), A β 1-42 (Δ 23D), and A β 1-43 (Δ 23D) also by a known peptide synthesizing method. Since materials for the synthesis and methods used in steps performed in the synthesis are well known, person skilled in the art can produce the desired variant amyloid protein as required by appropriately

15 performing synthesis, isolation, purification, and the like. Also, it is possible to produce the variant amyloid proteins of this invention by a gene recombinant technology using known hosts such as E. coli, yeast, bacillus subtilis, an insect cell, an animal cell, and a plant cell. A chemical synthesis may be conducted in accordance with Examples

20 described later in this specification, for example, but it is possible to employ any method insofar as a desired gene and peptide or a compound thereof are obtained by the method. For example, it is possible to combine well-known methods such as the reaction for producing Boc (t-butyloxycarbonyl), the DMSO oxidization, the alkali reaction, the acid

25 reaction, the epoxidation reaction, the silica gel column chromatography, the alkylation reaction, the saponification reaction, the heating reaction, the decarboxylation reaction, the condensation reaction, the reverse phase high performance liquid chromatography, and the like. Also, there may be performed a method wherein the amino acid residues

30 constituting the variant amyloid protein are sequentially reacted to

evaluate efficiency and reaction product purity as required. Further, the synthesized peptide may be altered at an ordinary temperature, a high temperature, by freezing and thawing, or the like for a desired period of time. More specifically, the method may be performed in accordance with Merrifield, R. B. J. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of tetrapeptide. J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154, 1963; Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach. Chan, W. C. and White, P. D., Oxford University Press, 2000.

The variant amyloid proteins of this invention may include a modification for promoting synthesis and purification, modification for promoting physical and chemical stability, modification for activating stability and instability to in vivo metabolism, conditioning, and the like, and control modification for causing an increase and a reduction in transorgan delivery efficiency including cerebral blood vessel barrier transit. Examples of the control modification include a sequence consisting of 11 amino acids of Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg (SEQ ID NO 4) (Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S. F. In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse, Science 285: 1569-1572). By including the control sequence which is linked by the peptide binding at the N-terminal, it is possible to facilitate transit of the variant amyloid protein through the blood cerebral barrier to reach a target site of brain at an improved efficiency.

Other examples of the modification of the variant amyloid proteins of this invention include transfer RNA-mediated addition of amino acid to protein, such as acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, flavin covalent binding, covalent binding of hem portion, covalent binding of nucleotide or nucleotide derivative, covalent binding

of lipid or lipid derivative, covalent binding of phosphatidylinositol, crosslinking, cyclization, disulfide binding, demethylation, crosslinking covalent binding formation, cystine formation, pyrogultamate formation, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, protein hydrolysis processing, phosphorylation, prenylation, racemization, lipid binding, sulfation, selenoylation, and arginylation; ubiquitination; and the like.

Further, it is technically easy to add, change, and convert a structure for the purpose of facilitating detection or purification of the variant amyloid protein of this invention or the antibody prepared by using the variant amyloid protein as an immunogen or for the purpose of adding another function, and such products are encompassed by the scope of this invention. Further, an immune globulin Fc fragment such as FLAG-tag, β galactosidase, alkaliphosphatase, and IgG and products such as GFP obtained by a biogenetical method are encompassed by the scope of this invention as the modification addition.

It is possible to create the antibody of the sixth invention by selecting the variant amyloid protein of this invention, its modified matter, or its degenerated matter (partial peptide or the like) and by using the selected matter as an antigen. The partial peptide comprises 20 or less amino acid residues, preferably lesser amino acid residues such as 5 amino acid residues, for example. The antigens may be used in combination for creating the antibody. The antigen is not necessarily the variant amyloid protein of this invention, the modified matter, or the degenerated matter as it is and may be a protein having a primary sequence near the deletion variant site of the variant APP exposed to outside the conformation.

Also, in order to create the antibody immunospecific to the variant amyloid protein of this invention, it is preferable to use a compound containing the above-described amino acid sequence of the structure near the deletion variant. Such antibodies are not particularly limited insofar as they are bounded immunologically to the site or recognize the site. The binding or capability of the recognition of the antibody is decided based on a known antigen antibody reaction. As used herein, "immunospecific" means that affinity to the compound is substantially larger than that to the related proteins or compounds in the art.

Production of the antibody is practiced by performing immune induction having humoral response or cellular response to the antigen by using, as the antigen, the variant amyloid protein of this invention, the modified matter thereof, or the degeneration matter thereof alone or in a state of being bounded to a carrier in the presence or absence of an adjuvant.

It is possible to create the antibody of the seventh invention by creating an oligomer from a peptide obtained by organic synthesis of the variant amyloid protein and then using the oligomeric variant amyloid protein as the antigen. This antibody has novel and useful characteristics that it does not recognize both of variant and wildtype monomeric amyloid proteins such as fibrillary amyloid protein forming senile plaque but specifically recognizes the oligomeric wildtype and variant amyloid proteins.

More specifically, creation of the antibody is implemented by immunizing a mouse by injecting a suspension of the amyloid protein

with Freund complete adjuvant, followed by injecting a suspension of the amyloid protein with Freund incomplete adjuvant after a month, and then repeating the same immunization operation after 7 days. Also, it is possible to create the antibody by immunity induction through immune stimulation of a lymph cell or a precursor cell thereof under the cultural condition. The carrier is not particularly limited insofar as it does not cause adverse effect on the host, and examples thereof include, but not limited to, a cellulose, a normal saline, buffering normal saline, dextrose, water, glycerol, ethanol, polymerized amino acid, albumin, a mixture thereof, and the like. As the animal to be immunized, a mouse, a rat, a rabbit, a goat, a horse, a cow, and the like are suitably used. A polyclonal antibody is obtainable as a serum by a known method or by an antibody recovery method from the serum. A preferable method may be an immune affinity chromatography.

15

Production of a monoclonal antibody is performed in such a manner that a tissue (of spleen or lymph node, for example) or a cultured cell containing antibody activity is recovered from the immunity-induced animal, and then introducing a transformant into a known permanently proliferative cell (myeloma strain such as P3X63Ag8, for example). For example, a hybridoma created from the antibody producing cell and the permanently proliferative cell is subjected to cloning, and then a hybridoma producing the antibody specifically recognizing the variant amyloid protein according to this invention is selected to collect the antibody from a culture medium of the hybridoma. Practical examples include the methods disclosed in the hybridoma method (Kohler G. and Milstein C. (1975) Nature 256, 495-497, the trioma method (Kozbor et al. Immunology Today (1983) 4:72), and the EBV method (Cole et al. Monoclonal antibodies and cancer therapy, Alan R. Liss, Inc., (1985): 77-96), and various other methods.

30

It is possible to use the antibody for identification, detection, and quantification of the variant amyloid proteins of this invention or for preparation and purification of the variant amyloid proteins through the affinity chromatography and the like. It is possible to modify the antibody into a human antibody by employing a known method.

More specifically, the antibody showing activity of increasing the activity of the variant amyloid protein of this invention among specific antibodies of the variant amyloid proteins of this invention is useful as a calibrator for a compound to be subjected to screening of an amyloid protein generation inhibitory drug or as screening means. Examples of assays using the antibodies for the variant amyloid proteins of this invention include the radioimmunoassay, the competitive binding assay, the high performance liquid chromatography, the western blot analysis, the ELISA assay, and a combination thereof.

The eighth invention and the ninth invention are amyloid disease diagnostic methods characterized by measurement of an expression product of the human variant amyloid protein gene of the first invention. That is, the variant amyloid protein of this invention is a causative protein isolated and identified from the patient with familial Alzheimer's disease, and it is possible to diagnose the amyloid diseases such as the Alzheimer's disease through measurement of abundance of the variant amyloid protein. Further, in the case where the variant amyloid protein of this invention is administered exogenously, it is possible to measure abundance thereof.

In the case where an mRNA is the expression product, it is possible to conduct the measurement by performing quantitative probe

hybridization or by using a micro array. As a hybridization method using a standard DNA probe, it is possible to employ the allele-specific oligonucleotide probe method, the oligonucleotide ligation assay, the invader method, and like known methods. Also, it is possible to measure the mRNA amount by a quantitative RT-PCR using an mRNA isolated from an examinee as a template.

Further, in the case where the variant amyloid protein is the gene expression product, it is preferable to use the antibody of the sixth invention. Particularly, use of a labeled antibody makes it possible to achieve detection with convenience and high accuracy. An enzyme, radioisotope, or a fluorochrome may be used for the labeling. The enzyme is not particularly limited insofar as it satisfies conditions such as having a large turnover number, being stable when bounded to the antibody, and specifically staining the matrix, and those ordinarily used for EIA, such as peroxidase, β -galactosidase, alkaliphosphatase, glucose oxidase, acetylcholinesterase, glucose-6-phosphorylated dehydrogenase, and the like may be used as the enzyme. Also, an enzyme inhibitor, coenzyme, and the like may be used. Binding of the enzyme to the antibody may be performed by employing a known method using a crosslinking agent such as a maleimide compound or the like. As the matrix, a known substance may be used depending on the type of the enzyme to be used. For example, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine is used in the case of using peroxidase as the enzyme, or, paranitrophenol or the like is used in the case of using alkaliphosphatase as the enzyme. As the radioisotope, those used in ordinary RIA, such as ^{125}I and ^3H , may be used. As the fluorochrome, those used in ordinary fluorescent antibody methods, such as fluorescence isothiocyanate (FITC) and tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) may be used. In the case of using the enzyme, a matrix capable of coloring by degeneration

through an enzymatic effect is added; enzyme activity is determined by optically measuring a degeneration amount of the matrix; the enzyme activity is converted into a bounded antibody amount; and an antibody amount is calculated through comparison with a standard value. In the case of using the radioisotope, a radiation amount generated from the radioactive isotope is measured by a scintillation counter or the like. In the case of using the fluorochrome, an amount of fluorescence is measured by using a measurement device combined with a fluorescence microscope. Also, it is possible to perform the measurement by using a flow cytometer. Further, a sandwich method (the ELISA method when an enzyme is used for labeling) using a primary antibody and a labeled secondary antibody may preferably be used.

Hereinafter, the cell of the tenth invention and the animal of the eleventh invention will be described. It is possible to create the animal or the cell by a method of injecting the variant amyloid protein solution to an animal, a method of administering a substance obtained by a metal colloid and the variant amyloid protein to an animal, a method of introducing the variant APP gene of the second invention or the cDNA thereof into an animal or a cell in accordance with a gene therapy using a retrovirus vector or an adenovirus vector, a calcium phosphate method, a method of using a liposome or a red blood cell ghost, an electroporation method, a method of introducing the variant amyloid protein or the peptide thereof into a cell by a microinjection method using a glass pipette, and the like.

Further, it is possible to create the animal and the cell in accordance with a known transgenic animal creation method (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77; 7380-7384, 1980, for example). More specifically, it is possible to create a desired transgenic animal by introducing the

variant APP gene of the second invention into a totipotency cell of a non-human animal (preferably a mouse or a rat) to generate a solid matter from the cell and then selecting the solid matter in which the variant APP gene is incorporated into a genome of a somatic cell. As the method of gene introduction into the totipotency cell, a physical injection of an exogenous gene DNA (microinjection method) is optimal in view of a production efficiency of the solid transgenic animal and a transfer efficiency of the introduced gene to the next generation. A fertilized egg into which the gene was injected is transplanted in a fallopian tube of a foster parent, and then an animal born as an individual is brought up beside the foster parent, followed by extraction of a DNA from a part of the body (tip of tail or the like). After that, southern blot analysis or a PCR assay is performed so as to confirm existence of an exogenous gene in the extracted DNA. A primary heterozygous animal in which the exogenous gene is introduced into one of diploid chromosomes is obtained as described above, and it is possible to obtain a homozygous animal by mating the heterozygous animals. The transgenic animal of this invention includes the primary heterozygous animal, the homozygous animal obtained by mating the heterozygous animals, descendants thereof, and embryos thereof.

The twelfth invention is the method for probing a therapeutic agent component for the amyloid diseases using the cell or the animal. More specifically, a candidate substance is brought into contact with the animal or the cell, and an amount of an expression product (mRNA or variant amyloid protein) of a variant APP gene expressing in the animal tissue (central nervous system tissue) in the cell by the methods same as those of the diagnostic methods of the eighth and ninth inventions. The candidate substance capable of reducing the expression product amount is used as the therapeutic agent component. Also, a substance

influencing on the activity of the variant amyloid protein expressing in the cell or the animal tissue is determined as the therapeutic agent component.

5 The candidate substance to be used for the screening method includes an organic or inorganic compound (particularly low molecular compound), a protein, a peptide, and the like, for example. Of these substances, functions and structures may be known or unknown. Also, combinatorial chemical library is effective means as a candidate
 10 substance group for specifying the desired substance efficiently. The combinatorial chemical library is a collection of chemical compositions generated by combining various chemical building blocks of reagents and the like by a chemical synthesis or a biological synthesis. For example, a linear combinatorial chemical library such as a peptide library is
 15 formed by combining a set of building blocks (amino acids) with a length of a given compound (the size of the peptide) by all possible methods. It is possible to synthesize various chemical compositions through the combinatorial mixing of chemical building blocks. For example, systematic combinatorial mixing of 100 commutative chemical building
 20 blocks results in 100 million tetrameric compounds or 10 billion pentameric compounds (see Gallop et al., (1994) 37(9): 1233-1250, for example). Preparation and screening of combinatorial chemical library are well-known in the art (see United States Patent Nos. 6,004,617 and 5,985,365, for example). Also, it is possible to use various commercially
 25 available libraries.

 The thirteenth to sixteenth inventions are anti-amyloid disease drugs each containing the variant amyloid protein, the peptide, the cDNA, or the antibody of this invention. Each of the drugs controls an amyloid
 30 protein production amount or a cerebral accumulation amount thereof to

prevent and treat the diseases as well as to ameliorate symptoms. More specifically, the antibodies of the sixth invention and the seventh invention are provided for solving problems of adverse reaction in the conventional indirect immune therapy. The variant amyloid protein, the peptide, or the cDNA functions as an antigen molecule for producing an antibody effective for inhibiting or suppressing polymerization of the wildtype amyloid protein in vivo.

Each of the components is formulated by known method and means into the form which is capable of being introduced into a living body or cell. In the case of the cDNA, a drug form may be such that an expression vector into which the cDNA is integrated is integrated into hollow nanoparticles presenting biorecognition molecules or a known virus vector (retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus), for example. By introducing such drug into a living body by a gene therapy method, it is possible to express the variant amyloid protein in living cells. It is also possible to adopt a gene therapy method of injecting a solution of the cDNA into the muscle. Further, in order to formulate the variant amyloid protein, the peptide, or the antibody into the form introducible into a living body, it is possible to blend the variant amyloid protein, the peptide, or the antibody with a carrier solution which does not change structures and functions thereof and is pharmacologically acceptable. It is also possible to employ a method wherein an organ or a cell taken out of a living body is subjected to a treatment with the protein or the peptide in vitro to induce a desired character and then the organ or the cell is returned to the living body. Also, a method wherein a cDNA expression vector is introduced into an organ or a cell taken out of a living body and then the organ or the cell is returned to the living body may be employed as a mode of the therapy. In such case, the microinjection method may be employed for the introduction into the cell,

for example. Also, an intracellular introduction method using lipid (BioPORTER (Gene Therapy Systems, USA), Chariot (Active Motif, USA), and the like) may be employed. Further, each of the anti-amyloid disease drugs of this invention may be formulated into a proper form that enhances transport efficiency thereof to the cerebral tissue.

The variant amyloid protein, the peptide, the cDNA, or the antibody, which are the effective ingredients, may be used alone or in combination with a modified matter thereof or a degenerated matter thereof. Further, the variant amyloid protein, the peptide, the cDNA, or the antibody may be used concomitantly with a compound that is advantageous for the therapy. A preferable mode of a systemic administration of the drug of this invention is injection, particularly intravenous injection. It is also possible to use another injection pathway such as subcutaneous injection, intramuscular injection, or intraperitoneal injection. Another means for the systemic administration is a transmucosal or transdermal administration using a penetrating agent such as a bile acid salt and adrenal acid or other surfactants. Further, when an enteric formulation or a capsule formulation is successfully made, an oral administration is possible. The administration of the drug compositions may be topical, and a form may be an ointment, a paste, a gel, or the like.

Examples

Hereinafter, this invention will be described in particulars based on but not limited to the following Examples.

Example 1

Determination of Deletion Variant APP Base Sequence

Genome DNA was extracted from blood of a familial Alzheimer's disease patient, and total base sequences each encoding a cDNA of each of presenilin 1 (PSEN1), presenilin 2 (PSEN2), and APP, which are known to be causative genes, were subjected to PCR amplification by using the obtained DNA as a matrix and then analyzed with the use of PRISM model 310 sequencer manufactured by ABI (Perkin-Elmer, CA). As a result, a variant was found in an amyloid protein coding region (SEQ ID NO 1) of the wildtype APP gene cDNA (deletion of three bases gaa at positions 1852 to 1854 of SEQ ID NO 1).

Example 2

Determination of Structure of Amyloid Protein Synthesized from Deletion Variant APP Gene cDNA

Since the variant APP gene cDNA obtained in Example 1 had the variant inside the amyloid protein, a β secretase or γ secretase cleavage site was examined. Then, an expression vector of the variant APP gene cDNA was introduced into human cultured cell HEK cells known to express APP as well as to produce and secrete amyloid protein. The expression was left to occur for 2 days to obtain a culture supernatant, and an immunoprecipitated fraction obtained by using an anti-amyloid protein antibody was subjected to a mass analysis with the use of AXIMA-CFR manufactured by Shimadzu Corporation. The result is shown in Fig. 1.

As is apparent from Fig. 1, an experimental observation value obtained as a molecular weight of A β 1-40 (Δ E) which is the amyloid

protein secreted from the variant APP gene cDNA expressed in the human cultured cell HEK cells was 4200.51. This molecular weight was almost the same as that of a theoretical calculation value 4200.69 of a molecular weight in the case of a deletion of Glu at position 21 of A β 1-40.

5 That is, it was demonstrated that the deletion variant amyloid protein is produced and secreted in a state where the conventional β secretase and γ secretase cleavage sites are retained in this deletion variant APP. More specifically, it was demonstrated that the variant amyloid protein is A β 1-40 wherein an amino terminal starts with Asp and terminates with Val
10 with Glu at position 22 being deleted.

Example 3

Quantification of Amyloid Protein Synthesized 15 from Deletion Variant APP

It was demonstrated that the deletion variant APP expressed in the human cultured cell HEK cells produces and secretes two types of variant amyloid proteins similar to the wildtype APP as shown in Table 1.

20

Table 1

	A β 42 (pg/ml)	A β 40 (pg/ml)
Control	0	0
Wildtype APP	26	200
Variant APP	24	190

Note that a vacant expression vector dissolved into a normal saline was used as the control in Table 1. Also, A β 42 represents A β 1-42 and A β 1-43 or A β 1-42 (Δ E) and A β 1-43 (Δ E), and A β 40 represents A β 1-40 or A β 1-40 (Δ E).
25

Example 4

Toxicity of Variant Amyloid Protein

5 The variant amyloid protein used in Example 4 was an organically synthesized peptide that has an amino acid sequence and a mass same as those of the variant amyloid protein secreted from the cells according to amino acid sequence and mass analyses. Through examination of neuron toxicity with the use of the synthetic peptide, it was
10 demonstrated that the synthetic peptide has a lower toxicity than the conventional wildtype amyloid protein. The result is shown in Table 2

Table 2

	Control	Wildtype A β	Variant A β
Survival Rate (%)	100	40	90

15 In Table 2, the wildtype A β or the variant A β represents A β 1-40 or A β 1-40 (Δ E), and the control represents A β 1-40 having a reverse amino acid sequence of an amino acid sequence of the wildtype A β 1-40.

Example 5

Agglutinating Property of Variant Amyloid Protein

20 The variant amyloid protein used in Example 5 was an organically synthesized peptide that has an amino acid sequence and a mass same as those of the variant amyloid protein secreted from the cell according
25 to amino acid sequence and mass analyses. Through examination of protein agglutinating property by using the peptide by thioflavine T binding ability, it was demonstrated that the agglutinating activity of the

variant amyloid protein of this invention is considerably lower than the conventional wildtype amyloid protein. The result is shown in Table 3.

Table 3

	0 Hr	12 Hr	24 Hr
Wildtype A β	0	61	100
Variant A β	0	2	2

In Table 3, the wildtype A β represents A β 1-42, and the variant A β represents A β 1-42 (Δ E). The agglutinating activity of the wildtype A β 1-42 under the conditions of 100 micrograms/ml (PBS) at 37°C for 24 hours was set to 100%.

Example 6

Antigenicity of Variant Amyloid Protein

The peptide organically synthesized from the variant amyloid protein was heated at 37°C for 24 hours to create an oligomer. Identification of the oligomer was conducted by confirming: detection of a large amyloid complex (dimeric, trimeric, or more) by Western blot; absence of amyloid fiber proved by electronic microscopic observation; and thioflavine binding reaction negative.

An antibody having the oligomeric variant amyloid protein as an antigen was created. For this purpose, a suspension of a peptide dissolved into PBS and Freund complete adjuvant solution was immune-injected into a mouse. After a month, the mouse was immunized with a suspension containing Freund incomplete adjuvant in place of Freund complete adjuvant, and the same immunization operation was repeated after 7 days. Blood in an amount of 100 microliters was collected from the tail vein of the mouse, and reactivity thereof was confirmed.

A plurality of PVDF membrane strips spotted with the antigen peptide was prepared. After drying the PVDF membrane strips, they were blocked with PBS containing a 20% cow serum. Then, the membrane strips were separately placed in small reaction boxes to be
 5 reacted with 1/150 diluted mouse sera (No. 1 to 8) (Fig. 2). The membrane strips were subjected to a reaction with an avidin-biotin complex by using biotinylated labeled antimouse IgG goat antibody as a secondary antibody. Detection was performed by observing antibody titers through DAB coloring. The leftmost membrane strip is one
 10 example of a reaction using as a control a rabbit antibody capable of recognizing an N-terminal margin.

Referring to Fig. 2, membrane strips shown in the dot test were spotted as being shifted in a vertical direction from one another in order to distinguish the one from another. The membrane strips were dotted
 15 with 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, and 0.01 ng, PBS and albumin in this order from the top. It was revealed that the antiserum of 1/150 dilution requires at least 1 ng of antigen and is not detected when the antigen amount is less than 1 ng. Further, there was no reaction with bovine serum albumin (BSA). The important fact is that the antibody capable
 20 of recognizing the oligomer peptide was identified in all the mouse sera of the 8 test mice without exception, and that the high and reproducible antigenicity of the oligomeric variant amyloid protein was confirmed.

Further, it was confirmed that an anti-variant amyloid protein
 25 antibody created by using the variant amyloid protein as an antigen reacts not only with the variant amyloid protein but also with the wildtype amyloid protein (Fig. 3). Referring to Fig. 3, the test was conducted in the same manner as described above except for using the wildtype amyloid protein in place of the variant amyloid protein. The
 30 membrane strip was dotted with 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, and 0.01 ng of the

wildtype amyloid protein, PBS, and albumin in this order from the top.

Example 7

5 **Specificity of Anti-Variant Amyloid Protein Antibody**

Specificity of the anti-variant amyloid protein antibody was confirmed in such a manner that the variant amyloid protein oligomer was immunoprecipitated by using the obtained antiserum and then
10 detected by using another ordinary amyloid antibody by western blot.

The leftmost membrane strip in the immunoprecipitation test shown in Fig. 4 is one example of a reaction using as a control a rabbit antibody capable of recognizing an N-terminal margin and detection with the use of the same antibody. The arrows indicate electrophoresis
15 patterns of the amyloid proteins, and the monomeric form (molecular weight: 4 kDa), the dimeric form (molecular weight: 8 kDa), the trimeric form (molecular weight: 12 kDa), the tetrameric form (molecular weight: 16 kDa), and the pentameric or larger form (molecular weight: 20 kDa) are shown in this order from the bottom to the top. It was revealed that
20 mouse serums examined herein (Nos. 2, 3, and 4) recognize and bounded to the dimeric or larger oligomers. The ordinary amyloid antibody recognizes monomeric form, but the anti-variant amyloid protein antibody does not recognize the monomeric form.

Next, oligomer antibody activity of the anti-variant amyloid
25 protein antibody was quantitatively measured (Table 4). In this measurement, 100 ng, 10 ng, and 1 ng of the variant amyloid protein oligomer, PBS, or cow albumin were bounded to a 96-hole plastic plate and then blocked by a 20% cow serum PBS to test 1/450 diluted mouse serums (Nos. 2, 3, and 4). A peroxidase-labeled antimouse IgG goat
30 antibody was used as a secondary antibody.

Table 4

Oligomer Protein	100 ng	10 ng	1 ng	PBS	BSA
Serum					
#2	1.25	0.45	0.06	0.05	0.08
#3	1.50	0.26	0.08	0.05	0.08
#4	1.19	0.16	0.07	0.07	0.30
PBS	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

It is apparent from Table 4 that the anti-variant amyloid protein oligomer antibody does not react with BSA nor the monomeric amyloid protein but reacts specifically with the oligomeric amyloid protein.

Example 8

10 Immunohistochemistry with Anti-Variant Amyloid Protein Antibody

Specificity of the anti-variant amyloid protein antibody was examined through fluorescent antibody staining using a formalin-fixed Alzheimer's disease cerebral tissue section (Fig. 5). The anti-variant amyloid protein antibody was reacted at 4°C overnight as a primary antibody, and then the cerebral tissue section was washed with PBS containing a 0.05% Tween 20, followed by reaction with a Texas Red-labeled antimouse IgG antibody which was used as a secondary antibody for 2 hours, and then washed again to be encapsulated with an encapsulating agent containing an fluorescent antiphotobleaching agent. Observation was conducted by using a confocal laser scanning microscope (Axiovert 100; product of Zeiss, Germany).

The result is as shown in Fig. 5, and the stainability was such that a dot-like distribution in neuron was observed, which coincides with reported publications of the oligomeric amyloid protein (Non-Patent

Document 8; R. H. Takahashi, C. G. Almeida, P. F. Kearcy, F. Yu, M. T. Lin, T. A. Milner, G. K. Gouras, Oligomerization of Alzheimer's amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain, (2004) J. Neurosci. 24: 3592-3599; R. Kaye, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, C. G. Glabe, Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis, (2003) Science 300: 486-489).

More specifically, it was confirmed that the anti-variant amyloid protein antibody created by using the oligomeric amyloid protein as the antibody recognizes the oligomeric amyloid protein but does not recognize senile plaque that the fibrous amyloid protein forms.

Example 9

15 Anti-Variant Amyloid Protein Antibody and Neuroimmune Reaction

Antibodies induced by the conventional vaccine therapy (D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse, (1999) Nature 400: 173-177) use the wildtype amyloid protein (A β ₁₋₄₂) as the antigen and stain senile plaque (C. Hock, U. Konietzko, A. Papassotiropoulos, et al., Generation of antibodies specific for beta-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease, (2002) Nat Med 8: 1270-1275). Further, it has been reported that adverse effect of an encephalitis reaction had been caused by the antibody (J. A. Nicoll, D. Wilkinson, C. Holmes, P. Steart, H. Markham, R. O. Weller, Neuropathology of human Alzheimer's disease following immunization with amyloid beta peptide: a case report, (2003) Nat Med 9: 448-452; J. M. Orgogozo, S. Gilman, J. F. Dartigues, B. Laurent, M. Puel, L. C. Kirby, P. Jouanny, B. Dubois, L. Eisner, S. Flitman, B. P. Michel, M. Boada, A.

Frank, & C. Hock, Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after abeta42 immunization, (2003) *Neurology* 61: 46-54).

In order to compare a complement molecule (C3d) activated as an inflammatory reaction marker with the stains with the anti-variant amyloid protein antibody, an anti-variant amyloid protein mouse antibody and an anti-C3d rabbit antibody were mixed to be used as the primary antibodies and then reacted at 4°C overnight, and then the cerebral tissue section was washed with PBS containing a 0.05% Tween 20, followed by reaction with a mixture solution of a Texas Red-labeled antimouse IgG antibody and an FITC-labeled antirabbit IgG antibody, which were used as the secondary antibodies, for 2 hours, and then washed again to be encapsulated with an encapsulating agent containing a fluorescent antiphotobleaching agent. Observation was conducted by using a confocal laser scanning microscope (Axiovert 100; product of Zeiss, Germany).

The result is as shown in Fig. 6. Shown in Fig. 6 are double stain images of the same section. Shown in Fig. 6(a) is the staining image of the anti-variant amyloid protein mouse antibody, and shown in Fig. 6(b) is the staining image of the anti-C3d rabbit antibody, which were detected as different fluorescent images. As is coinciding with the conventional report (P. Eikelenboom, F. C. Stam, Immunoglobulins and complement factors in senile plaques, (1982) *Acta Neuropathol* 57: 239-242; P. Eikelenboom, C. E. Hack, J. M. Rozemuller, F. C. Stam, Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's dementia, (1989) *Virchows Arch* 56: 259-262; P. Eikelenboom, J. M. Rozemuller, F. L. van Muiswinkel, Inflammation and Alzheimer's disease: relationships between pathogenic mechanisms and clinical expression, (1998) *Exp Neurol* 154: 89-98; P. L. McGeer, E. G. McGeer, Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease, (2001) *Neurobiology of Aging* 22: 799-809; P. Eikelenboom, A. J. M. Rozemuller, J. J. M. Hoozemans, R.

Vecrhuis, & W. A. van Gool, Neuroinflammation and Alzheimer Disease: Clinical and Therapeutic Implications, Alzheimer Disease & Associated Disorders, (2000) 14, Suppl. 1: S54-S61), C3d which is an activated neuroimmune complement reaction marker has a distribution coinciding
5 with senile plaque. However, Alzheimer's disease cerebral tissue localization of C3d did not coincide with the oligomeric amyloid protein localization which is the anti-variant amyloid protein antibody staining image.

10

Industrial Applicability

This invention provides a novel variant amyloid protein and its gene relating to pathology of amyloid diseases such as Alzheimer's
15 disease, and provisions of a novel drug composition and a diagnostic measure utilizing the characteristic are useful in the fields of clinical and basic studies particularly of the amyloid diseases such as Alzheimer's disease.

20

CLAIMS

1. A human variant amyloid protein, which, in SEQ ID NO. 2, consists of the amino acid sequence of:

- (1) 39 amino acids with deletion of Glu at 618th in the
5 sequence from 597th to 636th;
- (2) 41 amino acids with deletion of Glu at 618th in the
sequence from 597th to 638th;
- (3) 42 amino acids with deletion of Glu at position 618th in
the sequence from 597th to 639th;
- 10 (4) 39 amino acids with deletion of Ala at 617th in the
sequence from 597th to 636th;
- (5) 41 amino acids with deletion of Ala at 617th in the
sequence from 597th to 638th;
- (6) 42 amino acids with deletion of Ala at 617th in the
15 sequence from 597th to 639th;
- (7) 39 amino acids with deletion of Asp at 619th in the
sequence from 597th to 636th;
- (8) 41 amino acids with deletion of Asp at 619th in the
sequence from 597th to 638th; or
- 20 (9) 42 amino acids with deletion of Asp at 619th in the
sequence from 597th to 639th.

2. A peptide which is a part of the human variant amyloid protein of claim 1, comprising 5 to 28 amino acids preceding and
25 following the deleted amino acid residue in SEQ ID NO 2.

3. A human gene encoding a variant amyloid precursor protein for the human variant amyloid protein of claim 1.

30 4. An mRNA, which is a transcription product of the human

gene of claim 3.

5. A cDNA synthesized from the mRNA of claim 4, which consists of the base sequence of SEQ ID NO 1 with deletion of bases at
5 1852nd to 1854th.

6. An antibody specifically recognizing the human variant amyloid protein of claim 1.

10 7. An antibody prepared by using an oligomer of the human variant amyloid protein of claim 1 as an antigen and specifically recognizing an oligomeric amyloid protein.

8. A diagnostic method of amyloid diseases, which comprises
15 detecting an existence of the human amyloid protein of claim 1.

9. A diagnostic method of amyloid diseases, which comprises detecting an existence of the human gene of claim 3 or the mRNA of claim 4.
20

10. A cell expressing the human gene of claim 3.

11. A non-human animal having in vivo the variant amyloid protein of claim 1, and a tissue and a cell derived from the non-human
25 animal.

12. A method for screening a therapeutic agent component for the amyloid diseases, which comprises contacting the cell of claim 10 or the non-human animal, the tissue, or the cell derived from the non-
30 human animal of claim 11 with a test substance, and measuring

behavior and activity of a human variant amyloid protein in the cell or the tissue.

13. An anti-amyloid disease drug containing the variant
5 amyloid protein of claim 1.

14. An anti-amyloid disease drug containing the peptide of
claim 2.

10 15. An anti-amyloid disease drug containing the cDNA of
claim 5.

16. An anti-amyloid disease drug containing the antibody of
claim 6 or 7.

15

ABSTRACT

It is intended to provide a novel amyloid protein (human variant amyloid protein) useful as an antigen molecule or the like for improving a vaccine therapy. This human variant amyloid protein is a protein with deletion of Glu at 22nd, Ala at 21st, or Asp at 23rd in a normal (wildtype) amyloid protein (A β 1-40, A β 1-42, or A β 1-43) consisting of 40, 42, or 43 amino acids.

SEQ LIST

SEQUENCE LISTING

00016

<110> MORI. Hiroshi

<120> Mutant amyloid protein

<130> 05F076PCT

<150> JP2004-284292

<151> 2004-10-06

<160> 4

<170> Patentin version 3.1

<210> 1

<211> 2088

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (2088)

<223>

<400> 1

atg ctg ccc ggt tta gca ctg ctc ctg ctg gcc gcc tga acg gct cgg 48
Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
1 5 10 15

acc ctg gag gta ccc act gat ggt aat gct gcc ctg ctg gct gaa ccc 96
Ala Leu Glu Val Pro Thr Asn Gly Arg Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
20 25 30

cag att gcc atg ttc tat gcc aga ctg acc atg cag atg aat gtc cag 144
Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
35 40 45

aat gag gag tgg gat tca gat cca tca gaa acc aga acc tgc att gat 192
Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
50 55 60

acc aag gaa gcc atc ctg cag tat tgc cag gaa gtc tgc cct gaa ctg 240
Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
65 70 75 80

cag atc acc aat atg gta gaa gcc aac caa cca atg acc atc cag aac 288
Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
85 90 95

tgg tgc aag cag gcc cgc aag cag tgc aag acc cat ccc cag ttt gta 336
Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
100 105 110

att ccc tgc gcc tgc tta gtt ggt gag ttt gta agt gat gcc ctt ctg 384
Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
115 120 125

gtt cct gac aag tgc aag ttc tta cag cag gag aag atg gat gtt tgc 432
Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
130 135 140

gaa act cat ctt cag tgg cag gcc gtc gcc aag gag aca tgc agt gag 480
Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
145 150 155 160

aag agt gcc aac ttg cat gac tgc gcc atg ttc ctg gcc tgc gaa att 528
Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
165 170 175

gac aag ttc cca gag gta gag ttt gta tgc tgc cca ctg gct gaa gaa 576
Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
180 185 190

agt gac aat ata gat tct gct gat acc gag gag gat aac tgc gat gtc 624

..w 00028

SEQ LIST

tat tca gat gac gtc ttg acc aac atg att agt gaa cca aag atc agt Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser 500 505 510	1536
tac gga aac gat gct ctc atg cca tct ttg acc gaa acn aag acc acc Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr 515 520 525	1584
atg gaa ctc ctt ccc atg aat gga gaa ttc aac ctg gac gat ctc cag Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln 530 535 540	1632
ccg tgg cat tct ttt gaa gct gac tct atg cca gcc aac aca gaa aac Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn 545 550 555 560	1680
gaa gtt gag cct gtt gat acc cgc cct gct acc gac cga gga cta acc Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr 565 570 575	1728
act cga cca gat tct gga ttg aca aat atc aag acg gaa gag atc tct Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser 580 585 590	1776
gaa atg aag atg gat gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val 595 600 605	1824
cat cat can aag ttg gta ttc ttt gca gaa gat gtc gat tca aac aag His His Glu Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys 610 615 620	1872
gat gca atc att gga ctc atg gta gcc gat gtt gtc ala gcc acn gta Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val 625 630 635 640	1920
atc atc atc acc ttg gta atg ctg aag aag aag cga tac aca tcc att Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile 645 650 655	1968
cat cat gat gta atg gaa gtt gac gcc gat gtc gcc cca gag gag cgc His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg 660 665 670	2016
cac ctg tcc aag atg cag cag acc gcc tac gaa gat gca acc tac aag His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys 675 680 685	2064
ttc ttt aag cag atg cag acc tgg Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn 690 695	2088

- <210> 2
- <211> 695
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 2

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

SEQ LIST

00019

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65 70 75 80
 Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 85 90 95
 Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 100 105 110
 Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
 115 120 125
 Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140
 Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160
 Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175
 Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190
 Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195 200 205
 Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210 215 220
 Val Val Gly Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Gln
 225 230 235 240
 Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255
 Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270
 Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285
 Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu
 290 295 300
 Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys
 305 310 315 320
 Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg
 325 330 335
 Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp
 340 345 350
 Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu
 355 360 365

SEQ LIST

..M RCH50

Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala
370 375 380

Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn
385 390 395 400

Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe
405 410 415

Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His
420 425 430

Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala
435 440 445

Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu
450 455 460

Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala
465 470 475 480

Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn
485 490 495

Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser
500 505 510

Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr
515 520 525

Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln
530 535 540

Pro Pro His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn
545 550 555 560

Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr
565 570 575

Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser
580 585 590

Gln Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
595 600 605

His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
610 615 620

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val
625 630 635 640

Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile
645 650 655

His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg

653

... 07051

ページ (6)

SEQ LIST																
160				185				170								
ccc	tac	gga	att	gac	aag	ttc	caa	gga	gta	gac	ttt	atg	tgt	tac	cca	758
Pro	Cys	Gly	Ile	Asp	Lys	Phe	Arg	Gly	Val	Glu	Phe	Val	Cys	Cys	Pro	
		175					180					185				
ctc	gct	gaa	gaa	agt	gac	aat	gtg	gat	tct	gct	gat	gca	gag	gag	gat	806
Leu	Ala	Glu	Glu	Ser	Asp	Asn	Val	Asp	Ser	Ala	Asp	Ala	Glu	Glu	Asp	
		190					195				200					
gac	tca	gat	gtc	tga	tga	gpc	gaa	gca	gac	gca	gac	tat	gca	gat	gga	854
Asp	Ser	Asp	Val	Trp	Trp	Gly	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Gly	
		205			210					215					220	
aat	gaa	gac	aaa	gta	gta	gaa	gta	gca	gag	gag	gaa	gaa	gtg	gct	gaa	902
Ser	Glu	Asp	Lys	Val	Val	Glu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	
				225					230					235		
gtg	gaa	gaa	gaa	gaa	gac	gat	gat	gac	gaa	gac	gat	gaa	gat	gat	gat	950
Val	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	
			240					245					250			
gag	gtg	gag	gaa	gaa	gct	gaa	gaa	ccc	tac	gaa	gaa	ccc	aca	gag	aaa	998
Glu	Val	Glu	Glu	Glu	Ala	Glu	Glu	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Thr	Glu	Arg	
		255					260					265				
acc	acc	acc	att	gac	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	acc	1046
Thr	Thr	Ser	Ile	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ser	Val	
		270					275					280				
gaa	gtg	gtt	caa	gaa	gtg	tgc	tct	gaa	caa	ccc	gag	acc	gaa	ccc	tac	1084
Glu	Val	Val	Arg	Glu	Val	Cys	Ser	Glu	Gln	Ala	Glu	Thr	Gly	Pro	Cys	
		285			290					295					300	
caa	gca	atg	atc	tcc	ccc	tga	tac	ttt	gat	gtg	act	gaa	gaa	aag	tgt	1142
Arg	Ala	Met	Ile	Ser	Arg	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Thr	Glu	Gly	Lys	Cys	
				305				310						315		
gac	cca	ttc	ttt	tac	gac	gaa	tgt	gpc	gpc	gac	gaa	aac	aac	ttt	gac	1190
Ala	Pro	Phe	Phe	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Arg	Asn	Asn	Phe	Asp	
		320					325						330			
aca	gaa	gag	tac	tgc	atg	gac	gtg	tgt	gpc	agt	gac	gtg	tcc	caa	gat	1238
Thr	Glu	Glu	Tyr	Cys	Met	Ala	Val	Cys	Gly	Ser	Ala	Met	Ser	Gln	Ser	
		335					340					345				
tta	ctc	gag	act	acc	cag	gaa	cct	ctt	gac	caa	gat	cct	glt	aaa	ctt.	1286
Leu	Leu	Lys	Thr	Thr	Gln	Glu	Pro	Leu	Ala	Arg	Asp	Pro	Val	Lys	Leu	
		350				355					360					
cct	aca	aca	gca	gac	agt	acc	cct	gat	gac	ggt	gac	aag	tgt	ctc	gag	1334
Pro	Thr	Thr	Ala	Ala	Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Tyr	Leu	Glu	
		365			370					375					380	
aca	cct	gag	gat	gag	aat	gaa	cat	gac	cat	ttc	cag	aaa	gac	aaa	gag	1382
Thr	Pro	Gly	Asp	Glu	Asn	Glu	His	Ala	His	Phe	Gln	Lys	Ala	Lys	Glu	
				385				390						395		
agg	ctt	gag	gac	aag	cac	caa	gag	aaa	atg	tcc	cag	gtc	atg	aaa	gaa	1430
Arg	Leu	Glu	Ala	Lys	His	Arg	Glu	Arg	Met	Ser	Gln	Val	Met	Arg	Glu	
			400				405						410			
tga	gaa	gaa	gca	gaa	cgt	caa	gca	aag	aac	tig	cct	aaa	gct	gat	aag	1478
Trp	Glu	Glu	Ala	Glu	Arg	Gln	Ala	Lys	Asn	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Lys	
		415					420					425				
aag	gca	gtt	gtc	cag	cat	ttc	cag	gaa	aaa	gtg	gaa	tct	tta	gaa	cag	1526
Lys	Ala	Val	Ile	Gln	His	Phe	Gln	Glu	Lys	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	Gln	
		430				435					440					
gaa	gca	gac	aac	gag	aga	caa	cag	ctg	gtg	gaa	aca	cac	atg	gac	aga	1574
Glu	Ala	Ala	Asn	Glu	Arg	Gln	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	His	Met	Ala	Arg	
		445			450					455					460	
atg	gaa	gac	atg	ctc	aat	gac	cgc	cgc	cgc	ctc	gac	ctc	gag	aac	tac	1622

SEQ LIST

Val	Glu	Ala	Met	Leu	Asn	Asp	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Leu	Glu	Asn	Tyr	
			465						470						475	
atc	acc	act	ctc	cag	gct	ggt	cct	cct	cag	cct	cgt	cac	gtg	ttc	aat	1670
Ile	Thr	Ala	Leu	Gln	Ala	Val	Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	His	Val	Phe	Asn	
			480					485					490			
atg	cta	agg	aaa	tat	gtc	cgc	aca	gaa	cag	aag	gac	aga	cag	cac	acc	1710
Met	Leu	Lys	Lys	Tyr	Val	Arg	Ala	Glu	Gln	Lys	Asp	Arg	Gln	His	Thr	
			495				500					505				
cta	aaa	cat	ttc	gag	cat	atg	cgc	ata	gtg	gat	ccc	aaa	aaa	gcc	gct	1766
Leu	Lys	His	Phe	Glu	His	Val	Arg	Met	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Ala	Ala	
			510			515					520					
cag	atc	cag	tcg	cag	ggt	atg	aca	cac	ctc	cgt	gtg	att	tat	gaa	cac	1814
Gln	Ile	Arg	Ser	Gln	Val	Met	Thr	His	Leu	Arg	Val	Ile	Tyr	Glu	Arg	
					530					535				540		
atg	aat	cag	tct	ctc	tcg	ctg	ctc	tac	aac	gtg	cct	aca	gtg	acc	gag	1862
Met	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Tyr	Asn	Val	Pro	Ala	Val	Ala	Glu	
				545				550					555			
gag	att	cag	gat	gaa	ggt	gat	gag	ctg	ctt	cag	aaa	gag	caa	aac	tat	1910
Glu	Ile	Gln	Asp	Glu	Val	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln	Lys	Glu	Gln	Asn	Tyr	
			560				565					570				
tcn	gat	gac	gtc	ttg	acc	aac	atg	att	agt	gan	cca	agg	atc	aat	tac	1958
Ser	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Asn	Met	Ile	Ser	Glu	Pro	Arg	Ile	Ser	Tyr	
			575				580					585				
gaa	aac	gat	gct	ctc	atg	cca	ict	ttg	acc	gan	acg	aaa	acc	acc	gtg	2006
Gly	Asn	Asp	Ala	Leu	Met	Pro	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Lys	Thr	Thr	Val	
			590				595				600					
gag	ctc	ctt	ccc	gtg	aat	gaa	gag	ttc	acc	ctg	gac	gat	ctc	cag	cca	2054
Glu	Leu	Leu	Pro	Val	Asn	Gly	Glu	Phe	Ser	Leu	Asp	Asp	Leu	Gln	Pro	
				610				615						620		
tgk	cat	tct	ttt	gag	gct	gac	ict	gtg	cca	acc	aac	aca	gaa	aac	gaa	2102
Tro	His	Ser	Phe	Gly	Ala	Asp	Ser	Val	Pro	Ala	Asn	Thr	Glu	Asn	Glu	
				625				630					635			
att	gag	cct	ggt	gat	gac	cgc	pct	gct	acc	gac	cca	gaa	ctg	acc	act	2150
Val	Glu	Pro	Val	Asp	Ala	Arg	Pro	Ala	Ala	Asn	Arg	Gly	Leu	Thr	Thr	
			640				645						650			
cca	cca	gat	tct	gag	ttg	aca	aat	atc	agg	acc	gag	gag	atc	tct	gaa	2198
Arg	Pro	Gly	Ser	Gly	Leu	Thr	Asn	Ile	Lys	Thr	Glu	Glu	Ile	Ser	Glu	
			655				660					665				
gtg	agg	atg	gat	aca	gaa	ttc	cga	cat	gac	tca	gaa	tat	gaa	ggt	cat	2248
Val	Lys	Met	Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	
			670			675					680					
cat	caa	aaa	tta	atg	ttc	ttt	aca	gan	gat	gtg	gat	tca	aac	aaa	gat	2294
His	Gln	Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Gln	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	
			685		690					695				700		
aca	atc	att	gaa	ctc	atg	gtg	acc	gat	ggt	gtc	ata	cca	aca	gtg	gtc	2342
Ala	Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala	Thr	Val	Ile	
			705				710						715			
atc	atc	acc	ttg	gtg	atg	ctg	aaa	agg	aaa	cag	tac	aca	ttc	att	cat	2390
Val	Ile	Thr	Leu	Val	Met	Leu	Lys	Lys	Lys	Gln	Tyr	Thr	Ser	Ile	His	
			720				725						730			
cat	gat	gtg	gtg	gaa	ggt	gac	acc	gct	gtc	acc	cca	gaa	gag	cgc	cac	2438
His	Gly	Val	Val	Glu	Val	Asp	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Glu	Glu	Arg	His	
			735			740					745					
cig	icc	agg	atg	cag	cag	aac	gac	tac	gaa	nat	cca	acc	tac	aat	ttc	2486
Leu	Ser	Lys	Met	Gln	Gln	Asn	Gly	Tyr	Glu	Asn	Pro	Thr	Tyr	Lys	Phe	
			750			755					760					

.. 00053

	SEQ LIST	
tti gaa cda atg cag aac tag accccccca caccagctc tgaagttga		2537
Phe Glu Gln Met Gln Asn		
765	770	
cagcaaaac atgctttaa taccatcga tgcctatta tagnaatac tggaaagaa		2597
cnaaccgtt ttatattta ctcattacg ccttttaca gctgtctgt aacacangta		2667
atgctctga ctgaattaa tccacacac agtaatgat tctatctct ttacatttt		2717
atctctata ctacttatt aatgatttt gtgtactga agaatttag cigtatcaa		2777
ctagtacag aatagattc ctcctgata ttatcacat agccccctag acagtgtat		2837
attattctt tggtttga cccatttaa tctacttta catatcttt agaatcat		2897
aggaatgat tcaatgaac gtaagattc agctattct ctaccctag taticcttc		2967
cigtacata tgcatttta agtaaacat tttaangta ttcagtgtt ttatgagat		3017
ttttttcca tgaatgatt ttactgaca gatttctgt tctatctat ttatgata		3077
ggaattaaa ggtacacac gttgtttct tctgtctgt ttatgttca cactttagc		3137
atgagactt cagcttttc tttttttc cactatctt ttttctttg ataaagaaa		3197
gaatccctg tcatgttag cacttttag aatccctga aatgcttgc tctctctgc		3257
ttcattacc aagaatttc cnaaacatt ttctgcaga ttattgtca gaatcttgc		3317
ttatgacag atgctttct acactgatt acataaaa ataatatua ataaccccg		3377
gcaagattt tctttagag atgctttag acattanta atgaagtaa ttgtgtag		3437
aaagaaagc cagattcant ttctttac cagtctgag ttcatttat gatacaaa		3497
aaataaaa taaagttag aatataaaa gataagaaa acatccctg acaaccctt		3557
citttagat gtcttctca ttgttatua atgtgtttt caltaanta atacattct		3617
tgaagagca aaaaaaaa aaan		3641

(210) 4
 (211) 11
 (212) PRT
 (213) Artificial

(220)
 (223) Description of artificial sequence: Synthetic oligopeptide

(400) 4
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

00054

Fig.1

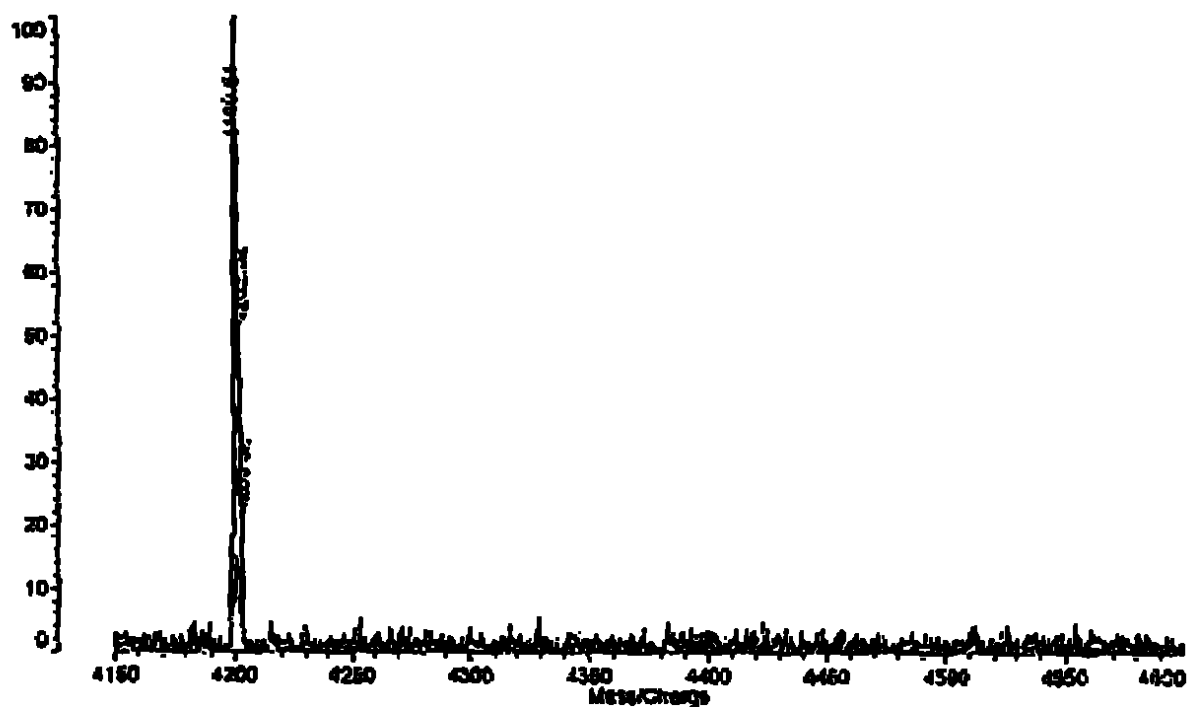


Fig.2

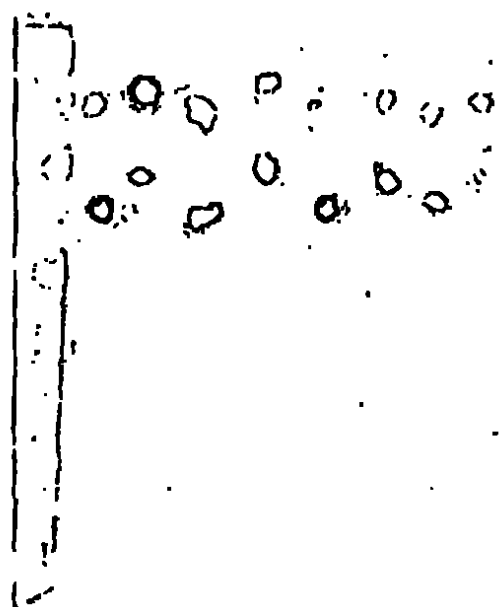


Fig.3

00056

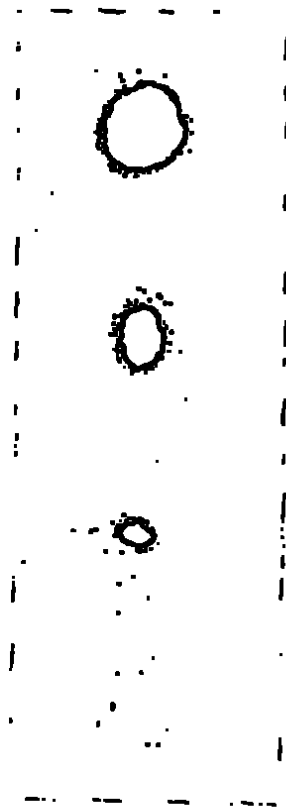


Fig.4

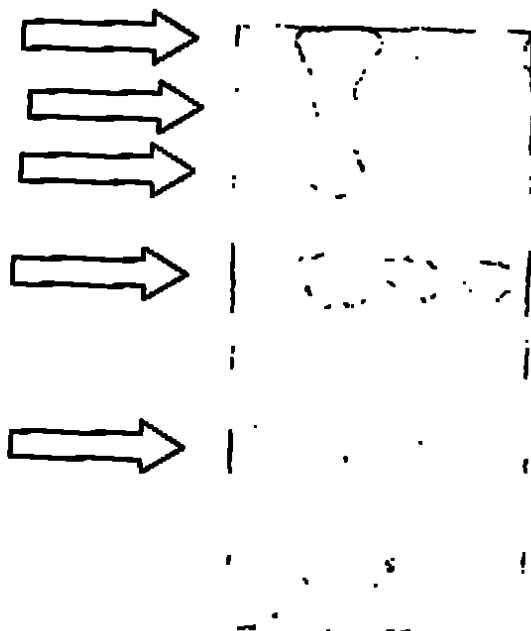


Fig.5

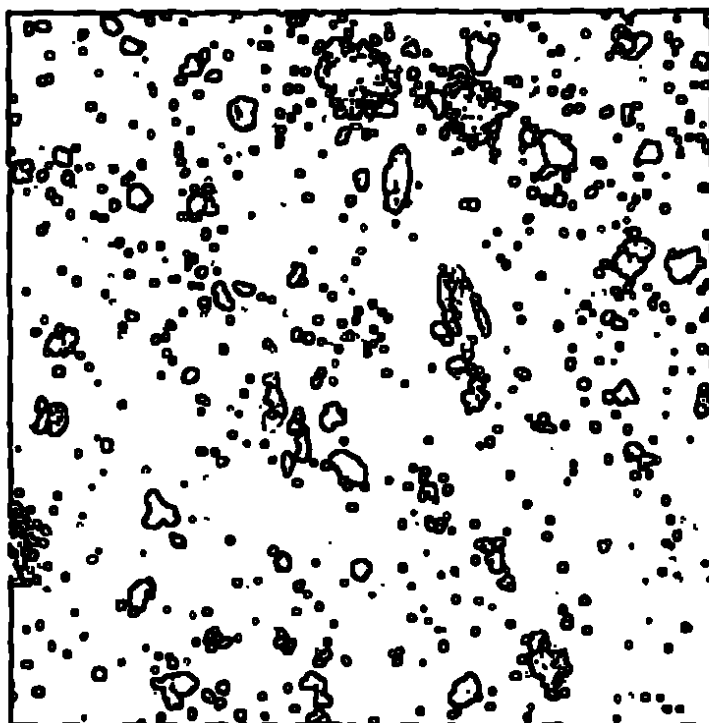
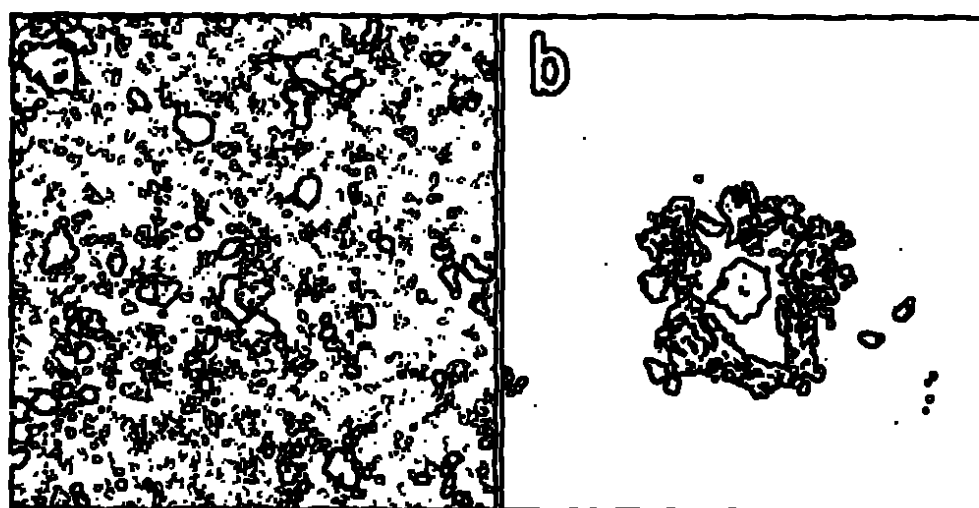


Fig.6



DESCRIPCIÓN

. 00058

PROTEÍNA VARIANTE AMILOIDE

Campo Técnico

Esta invención se relaciona con una proteína variante amiloide que existe en pacientes con enfermedad de Alzheimer familiar así como también la utilización y el desarrollo de tal proteína variante amiloide.

Antecedente de la Técnica

Una proteína amiloide es un tipo de lesión de tejido que se observa en tejidos cerebral de no solo pacientes con enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down sino también sujetos con madurez normal. La proteína amiloide consiste de 40 a 42 o 43 aminoácidos ricos en aminoácido hidrófobo y se puede producir por clivaje hidrolítico de una proteína precursora amiloide (referida de aquí en adelante como APP) que es un precursor de esta. El APP consiste de 695, 751, o 770 aminoácidos, que es una proteína de membrana tipo I con un dominio de membrana único, y tiene su terminal amino afuera de la célula. La diferencia en el número de aminoácidos depende de la presencia o ausencia de un sitio activo de inhibidor de proteasa del llamado tipo Kunitz en la región extracelular.

Un componente principal de la neurona es el APP que consiste de 695 aminoácidos (referido de aquí en adelante como APP695). En

cambio, el APP consiste de 770 aminoácidos (de aquí en adelante referido como APP770 de los cuales la secuencia base de CADN y la secuencia de aminoácido se muestran como SEQ ID NO 3) incluye una secuencia de aminoácido (75 aminoácidos de Glu a Lys en la posición 363 de la SEQ ID NO 3) que no se incluye en especie molecular de APP695. El APP770 es una especie molecular que tiene la secuencia de aminoácido idéntica a aquella de la APP695 diferente de la secuencia de aminoácido de inserción identificada anteriormente. Una isoforma llamada APP751 se conoce en adición al APP695 y APP770, y este APP consiste de 751 aminoácidos y falta en 19 aminoácidos (Met en la posición 345 a Lys en la posición 363) de APP770. La secuencia de aminoácido (56 aminoácidos de Glu en la posición 289 a Ala en la posición 344 en la secuencia de aminoácido de APP770) insertada en APP751 y APP770 tiene actividad inhibidora de proteasa del tipo Kunitz y se considera se expresa en células diferentes de neuronas.

El APP695 es una isoforma que se expresa principalmente en la neurona y es una proteína de membrana tipo 1 capaz de pasar a través de la membrana celular una vez y que tiene un dominio de transmembrana (254 aminoácidos de glicina en la posición 625 a leucina en la posición 643). La proteína amiloide consiste de una especie molecular de proteína más corta que tiene 40 aminoácidos de APP695 (SEQ ID NO 2) de ácido asparagínico en la posición 597 a valina en la posición 636 que existe afuera de la célula y una especie molecular de proteína mayor que tiene 42 o 43 aminoácidos que terminan en alanina en la posición 638 o treonina en la posición 639.

La bioactividad de la proteína amiloide se ha probado experimentalmente y su toxicidad de neurona se considera es un factor clave para el inicio de la enfermedad de Alzheimer (Documentos 1 y 2 Diferentes de Patentes). Con el fin de producir la proteína amiloide del APP, son necesarias reacciones importantes de dos etapas. En la primera etapa, el terminal amino de la proteína amiloide se prepara por clivaje APP mediante β secretasa. En la segunda etapa, el terminal carboxilo de la proteína amiloide se cliva al dividirse por γ secretasa, originando por lo tanto la disociación de la proteína amiloide y el fragmento citoplásmico de APP. De acuerdo con los hallazgos convencionales, se ha considerado que la segunda etapa de clivaje ocurre en la posición: gama (γ) que es el terminal carboxilo de la proteína amiloide (entre Val en la posición 711 y Ile en la posición 712, entre Ala en la posición 713 y Thr en la posición 714, o entre Thr en la posición 714 y Val en la posición 715 de APP770 de la SEQ ID NO 3); sin embargo, se ha reportado recientemente que la segunda etapa de clivaje ocurre en la posición epsilon (ϵ) (entre Thr en la posición 719 y Leu en la posición 720 o entre Leu en la posición 720 y Val en la posición 721 del APP770 de la SEQ ID NO 3) que es cercano al citoplasma y corriente abajo de 5 residuos de aminoácidos por 10 aminoácidos (en la dirección del terminal carboxilo).

La lesión de neurona intracerebral de la enfermedad de Alzheimer ocurre en avance de síntomas anormales clínicos tal como desorientación, declinación de la memoria, amnesia, declinación en el intelecto, y trastorno de comportamiento. La

lesión neuronal incluye deposición de proteína amiloide, alteración fibril neuronal, y pérdida celular, y la deposición de proteína amiloide es la reacción patológica inicial.

Se considera que la hipótesis amiloide, en la que la producción y deposición de proteína amiloide son hipotéticamente la causa de la enfermedad de Alzheimer, es importante entender el progreso de la enfermedad de Alzheimer, y una de las razones para la importancia se halla en el estudio de enfermedad de Alzheimer familiar.

El concepto que la y secretasa es un producto de gen de presenilina 1 (Documento 3 Diferente de Patente) y la presenilina 2 (Documentos 4 y 5 Diferentes de Patente) presentes en el cromosoma 14, se ha aceptado ampliamente que se han descubierto por ser genes responsables del inicio temprano de enfermedad de Alzheimer familiar; sin embargo, este concepto no se ha completado.

En razón a que el APP también es un gen responsable del inicio temprano de enfermedad de Alzheimer familiar (Documento 6 Diferente de Patente), se demuestra que una pluralidad de factores están involucrados en la etiología de la enfermedad de Alzheimer que es un tipo de demencia.

Como se describió anteriormente, la proteína amiloide consiste de dos componentes. Uno de ellos es el componente de proteína amiloide más corto (de aquí en adelante referido como A β 1-40) que parte del ácido asparagínico para terminar en valina

en la posición 40, y el otro es el componente de proteína amiloide mayor que consiste de 42 o 43 aminoácidos que parten del ácido asparagínico (igual como el A β 1-40 que consiste de 40 aminoácidos) y es mayor que el A β 1-40 por aminoácidos de 2 o 3 residuos para terminar en Ala en la posición 42 o Thr en la posición 43 (de aquí en adelante referido como A β 1-42 o A β 1-43, o colectivamente A β 1-42/43). En los mayores componentes, A β 1-42 es mayor en la propiedad hidrófoba y más insoluble. Una fibrilla amiloide similar a fibra que tiene un diámetro de 5 a 6 nm se forma del componente mayor y el componente menor en donde el componente mayor sirve como un núcleo y el componente menor se adhiere al núcleo.

Se ha demostrado que la producción de A β 1-42/43 que es la proteína amiloide mayor se incrementa cuando una variante del gen está presente en la presenilina 1 o presenilina 2. Se considera que el componente de proteína amiloide mayor que se considera es un determinante de un valor umbral para la polimerización de proteína amiloide se forma en una cantidad mayor debido a este efecto variante, acelerando por la tanto la reacción etiológica.

Se han identificado muchas variantes de mutación en APP, y las variantes típicas se clasifican generalmente en: variante Sueca (Met670Asn, Lys671Leu de acuerdo con la numeración de aminoácido de APP770; lo mismo aplica a las siguientes variantes) que preceden el terminal amino de la proteína amiloide, variante Holandesa (Glu693Gln), variante de Londres (Val717Ile), variante Australiana (Leu723Pro). La producción de los dos componentes de

proteína amiloide se incrementa en la variante Sueca, y solo la producción de A β 1-42/43 se incrementa en la variante de Londres y la variante Australiana. La importancia de la variante Holandesa está en el medio de la discusión, y aún no se ha hecho la conclusión.

El E4 se conoce como un alelo de factor de riesgo de apolipoproteína E. Se ha probado estadísticamente que el inicio de la enfermedad de Alzheimer se establece adelante por 8 a 10 años en el caso en donde solo uno de los alelos de cromosoma es E4 o por 16 a 20 años en el caso en donde ambos alelos de cromosoma son E4 (Documento 7 Diferente de Patente).

Se considera que la inhibición de la actividad de la β secretasa y γ secretasa suprime la producción de proteína amiloide y se puede utilizar como una droga terapéutica para detener o retrasar el progreso de la enfermedad de Alzheimer. Una reacción de α secretasa ocurre en adición a la reacción β secretasa en la primera etapa de hidrólisis de APP, y la reacción γ secretasa ocurre en la segunda etapa de la reacción α secretasa y la reacción β secretasa; por lo tanto, se espera un efecto de espectro más amplio de la reacción γ secretasa.

Aunque no se ha obtenido aún una última conclusión para la identificación de la γ secretasa, se ha probado que la presenilina 1 tiene un papel importante. De acuerdo con los experimentos de animales y experimentos en cultivos celulares de los cuales la acción de la presenilina 1 se inactiva, se reporta

que se originan anomalías en la generación de nervio cerebral, formación de espina dorsal o generación de células linfáticas. Esto es, la presenilina 1 tiene varios efectos diferentes de la proteína amiloide.

Es necesario considerar que la supresión de la actividad no específica de la γ secretasa puede inducir una reacción adversa severa tal como la inducción de transformación maligna (Documento 8 Diferente de Patente). En cambio, se ha sugerido que drogas anti-inflamatorias no esteroideas epidemiológicamente tienen un efecto anti-demencia, y se ha probado que las drogas anti-inflamatorias no esteroideas inhiben selectivamente la producción de A β 1-42/43 (Documentos 9 y 10 Diferentes de Patentes) y tienen función de quínasa Rho (Documento 11 Diferente de Patente), por lo cual llega a ser un candidato de droga anti-demencia importante. Sin embargo, las concentraciones en uso y similares todavía requieren examen.

Aunque se ha estudiado la terapia de vacuna (Documento 12 Diferente de Patente) que utiliza un péptido sintético A β 1-42 como un antígeno como un método de tratamiento promisorio, se ha destacado una reacción adversa que origina una severa encefalitis como un efecto colateral (Documento 13 Diferente de Patente). En relación a la terapia de vacuna, la terapia de vacuna indirecta o la inmunoterapia indirecta que utiliza un anticuerpo anti-amiloide (Documento 14 Diferente de Patente) ha llamado la atención, pero ellas requieren examen adicional desde el punto de vista clínico. Se ha destacado que el efecto adverso de la

terapia de vacuna se puede reducir al cambiar la posición del antígeno de la proteína amiloide utilizada como el antígeno para el terminal amino del A β 4-10, que induce el antígeno isotipo IgG2b, la inmunización de intestino a través de la administración oral, o similar, pero tales métodos no se han confirmado como medidas de alivio.

Lista de documentos Diferentes de Patento

1. Yankner, B.A. et al., Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. (1989) Science. 245(4916): 417-20.
2. Yankner, B.A., Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. (1990) Science. 1990 250(4978): 279-82.
3. Sherrington, R. et al., Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. (1995) Nature, 375(6534), 754-760.
4. Levy-Lahad, E. et al., Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. (1995) Science, 269(5226), 973-977.
5. Rogaev, E.I. et-al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. (1995) Nature 376(6543), 775-778.

6. Goate, A. et al., Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. (1991) Nature, 349(6311), 704-6.
7. Corder, E.H. et al., Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. (1993) Science. 261(5123): 921-3.
8. Hardy, J. and Israel, A. Alzheimer's disease. In search of gamma-secretase. (1999) Nature. 398(6727), 466-7.
9. Lin, G.P. et al., Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. (2000) J Neurosci 20: 5709-14.
10. Weggen, S. et al., A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity. (2001) Nature 414: 212-6.
11. Zhou, Y. et al., Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic A β 42 by inhibiting Rho. (2003) Science 302: 1215-7.
12. Schenk, D., et al. Immunization with amyloid β -attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. (1999) Nature. 400, 173-6.

13. Nicoll, J.A.R. et al., Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- peptide: a case report. (2003) Nature Med. 9: 448-452.
14. DeMattos et al. (2002) Science 295: 2264-7.; Pfeiffer, M. et al. Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy. (2002) Science 298: 1379-.

Descripción de la Invención

Esta invención se ha realizado en vista de los problemas descritos anteriormente de las tecnologías convencionales, y un objeto de estos es suministrar una proteína amiloide novedosa (proteína variante amiloide humana) útil como una molécula de antígeno y similares para mejorar la terapia de vacuna.

Otro objeto de esta invención es suministrar una medida diagnóstica para enfermedades amiloides al utilizar la anterior proteína variante amiloide y materiales de genes que codifican la proteína variante amiloide y un material para la medición diagnóstica.

Todavía otro objeto de esta invención es suministrar un método para seleccionar un componente de agente terapéutico efectivo para enfermedades amiloides basadas en mecanismos de producción de la proteína variante amiloide.

Todavía otro objeto de esta invención es suministrar una droga anti-amiloide para la enfermedad que utiliza la proteína variante amiloide o el material de gen de esta.

Esta invención suministra las siguientes invenciones para resolver los problemas descritos anteriormente.

Una primer invención es una proteína variante amiloide, que, en la SEQ ID NO 2, consiste de la secuencia de aminoácidos de:

(1) 39 aminoácidos con la supresión de Glu en 618 en la secuencia de 597 a 636;

(2) 41 aminoácidos con la supresión de Glu en 618 en la secuencia de 597 a 638;

(3) 42 aminoácidos con la supresión de Glu en la posición 618 en la secuencia de 597 a 639;

(4) 39 aminoácidos con la supresión de Ala en 617 en la secuencia de 597 a 636;

(5) 41 aminoácidos con la supresión de Ala en 617 en la secuencia de 597 a 638;

(6) 42 aminoácidos con la supresión de Ala en 617 en la secuencia de 597 a 639;

(7) 39 aminoácidos con la supresión de Asp en 619 en la secuencia de 597 a 636,

(8) 41 aminoácidos con la supresión de Asp en 619 en la secuencia de 597 a 638, o

(9) 42 aminoácidos con la supresión de Asp en 619 en la secuencia de 597 a 639

Más específicamente, la proteína variante amiloide de la primera invención es una proteína con la supresión de Glu en 22, Ala en 21, o Asp en 23 y en la proteína amiloide normal (tipo silvestre) que consiste de 40, 42 o 43 aminoácidos (A β 1-40, A β 1-42, A β 1-43). En la siguiente descripción, las proteínas variantes amiloides que consisten de las secuencias de aminoácido (1) a (9) son algunas veces referidas como sigue: (1) A β 1-40 (Δ 22E), (2) A β 1-42 (Δ 22E), (3) A β 1-43 (Δ 22E), (4) A β 1-40 (Δ 21A), (5) A β 1-42 (Δ 21A), (6) A β 1-43 (Δ 21A), (7) A β 1-40 (Δ 23D), (8) A β 1-42 (Δ 23D), (9) A β 1-43 (Δ 23D).

Note que las proteínas variantes amiloides (A β 1-40 (Δ 22E), A β 1-42 (Δ 22E), A β 1-43 (Δ 22E)) son proteínas variantes amiloides de supresión que los inventores aíslan e identifican de pacientes con enfermedad de Alzheimer familiar. Las proteínas variantes amiloides de las secuencias de aminoácido (4) a (9) se presumen con alta probabilidad de tener una función similar para las proteínas variantes amiloides de las secuencias de aminoácido (1) a (3). Más específicamente, mediante un análisis de estructura de

una proteína amiloide tipo silvestre o tipo normal con el uso de un programa de predicción de estructura de proteína existente (por ejemplo, un programa de predicción de estructura de segunda proteína incluido en Chou-Fasman 2nd Structure Prediction Program GENETKY versión 8.1.8, producto de GENETKY Co., Tokyo), se confirma que dos hélices α emitidas por una estructura de bobina irregular en aproximadamente el 7^{mo} aminoácido existe en los aminoácidos 1 a 25 y que una estructura β existe en una región del aminoácido 30 al terminal carboxilo. Esto es, la estructura de la proteína amiloide normal o tipo silvestre es "estructura β - hélice α - hélice α ". En cambio, mediante análisis de la variante Holandesa (Glu69Gln) que es la proteína variante amiloide conocida y las proteínas variantes amiloides (A β 1-40 (A22E), A β 1-42 (A22E), A β 1-43 (A22E)) de esta invención que consisten de las secuencias de aminoácido (1) a (3) de la misma forma como se describió anteriormente, se confirma que una estructura de estas proteínas variantes amiloides es "estructura β -estructura β -hélice α ". Por lo tanto, las proteínas variantes amiloides de esta invención se caracterizan por tener la estructura de "estructura β -estructura β -hélice α ", y la proteína variante amiloide (A21A o A23D) de la cual el residuo de aminoácido (Ala o Asp) que precede o que sigue al Glu en la posición 22 se elimina y tiene la estructura de "estructura β -estructura β -hélice α ". Este hecho es evidentemente diferente del hecho de que una estructura de una proteína variante amiloide de la cual un aminoácido secundario que precede o sigue al Glu en la posición 22 (Phe y Val) tiene la estructura "estructura β -hélice

α -célula α') igual a aquella de la proteína amiloide normal (tipo silvestre)

Note que la primera variante amiloide de la primera invención incluye proteínas en las cuales uno o más residuos de aminoácidos en el terminal N o terminal C se eliminan en la medida que sus actividades características (por ejemplo, toxicidad y propiedades de agregación) menores que aquellas de la proteína amiloide tipo silvestre) no se involucran

Cómo se describió anteriormente, la proteína aránte amiloide de la primera invención incluye las proteínas variantes amiloide naturales $A\beta 1-40$ (A22E), $A\beta 1-42$ (A22F), y $A\beta 1-43$ (A22E) que existe en pacientes con enfermedad de Alzheimer familiar y las proteínas variantes amiloideas no naturales $A\beta 1-40$ (A22A), $A\beta 1-42$ (A21A), $A\beta 1-43$ (A21A), $A\beta 1-40$ (A23D), $A\beta 1-42$ (A23D), y $A\beta 1-43$ (A23D) que tienen la función idéntica a aquella de las proteínas naturales. También, como se utiliza aquí la frase no natural, significa que la proteína no se ha aislado e identificado en un paciente y existe una oportunidad de que la existencia de una proteína amiloide natural de la cual $A\beta$ en la posición 21. Así en la posición 23 se elimina para confirmación a través del examen de un buen número de pacientes

Una segunda invención es un péptido que es una parte de la proteína variante amiloide humana de la primera invención, que comprende 5 a 26 aminoácidos que preceden y siguen al residuo de aminoácido eliminado en la SEQ ID NO 2

Una tercera invención es un vector (vector de aquí en adelante como gen APP variante o gen Aβ variante de supresión en algunos casos) que codifica una proteína precursora amiloide variante para la proteína variante amiloide humana de la primera invención.

Una cuarta invención es un mRNA que es un producto de transcripción del gen humano de la tercera invención.

Una quinta invención es un cADN sintetizado a partir del mRNA de la cuarta invención que consiste de la secuencia base de la SEQ ID NO 1 con la supresión de las bases en 1852 y 1854.

Una sexta invención es un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína variante amiloide humana de la primera invención.

Una séptima invención es un anticuerpo preparado al utilizar un oligómero de proteína variante amiloide humana de la primera invención como un antígeno, que reconoce específicamente una proteína amiloide oligomérica.

Una octava invención es un método de diagnóstico de enfermedades amiloides, que comprende detectar una existencia de la proteína amiloide humana de la primera invención.

Una novena invención es un método de diagnóstico de enfermedades amiloides, que comprende detectar una existencia de la

gen humano de la tercera invención o el mRNA de la cuarta invención

Una décima invención es una célula que expresa el gen humano de la tercera invención

Una décima primera invención es un animal no humano que tiene in vivo la proteína variante amiloide de la primera invención y un tejido y un derivado de células de animal no humano

Una décima segunda invención es un método para seleccionar un componente de agente terapéutico para las enfermedades amiloides que comprende poner en contacto la célula de la décima invención al animal no humano el tejido o la célula derivada del animal no humano de la décima primera invención con una sustancia de ensayo y medir el comportamiento y actividad de una proteína variante amiloide humana en la célula o el tejido

Una décima tercera invención es una droga anti-amiloide para enfermedad que contiene la proteína variante amiloide de la primera invención

Una décima cuarta invención es una droga anti-amiloide para enfermedad que contiene el péptido de la segunda invención

Una décima quinta invención es una droga anti-amiloide para enfermedad que contiene el cADN de la décima quinta invención

Una decima sexta invención es una droga anti-amiloide para enfermedad que controla el anticuerpo de la sexta invención o la séptima invención.

En esta invención es posible comparar el gen APP variante de supresión y un fragmento de este con el APP tipo silvestre convencional o el APP variante familiar reportado. Como un resultado, se espera que un nuevo mecanismo molecular, acción y efecto contribuyan a la clarificación del metabolismo de la proteína amiloide que ayudará a elucidar la patología.

También en esta invención, es posible utilizar un cerne venoso y un animal que utiliza el gen APP variante de supresión y el fragmento de este para una selección de compuesto y droga novedosos.

También, en esta invención el uso de 39 aminoácidos que comprenden la proteína amiloide de longitud completa variante de supresión A β 1-40 (A22E), A β 1-40 (A21A), o A β 1-40 (A21D), 41 aminoácidos que comprenden la proteína amiloide de longitud completa variante de supresión A β 1-42 (A22E), A β 1-42 (A21A), o A β 1-42 (A21D), o 42 aminoácidos que comprenden la supresión de la proteína amiloide de longitud completa A β 1-43 (A22E), A β 1-43 (A21A), o A β 1-43 (A21D) es ventajosa para comparar un cierto variante de supresión de este con la formación de la proteína amiloide tipo silvestre reportada.

También en esta elección la patología de la enfermedad se espera se indique en razón a que se ha identificado la variante en pacientes con enfermedad de Alzheimer familiar y se asume que la porción del A β 29-40 dentro de la membrana o en la CDM es el péptido que tiene una secuencia parcial del cual se excluye A β 29-42/43 se utiliza con el fin de hacer énfasis en un efecto variante. También es posible considerar una "materia modificada" obtenida al inducir un cambio en la propiedad hidrofóbica a través de la modificación del grupo disulfuro para el péptido de pasar la barrera de los vasos sanguíneos cerebrales o estabilidad molecular.

La proteína variante amiloide o la materia modificada de esta es un prod de degeneración del APP variante de expresión, se confirma y una propiedad de aglutinación de proteína considerablemente reducida de esta que no se ha conocido.

Como se utiliza aquí una "proteína" y "péptido" significa una molécula que consiste de una pluralidad de residuos de aminoácido que se unen mediante uniones de péptido.

Adicionalmente como se utiliza aquí "enfermedad amiloide" significa enfermedades tal como enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down en el que la proteína amiloide participa directamente o indirectamente como etiológica o con la que el participante se sospecha y las enfermedades en las que la proteína amiloide se observa en lesiones neurales. Como se

utiliza aquí "diagnóstico" significa un juicio de si o no un examinado sufre de enfermedad amiloide un juicio de si o no existe un riesgo de sufrir de la enfermedad amiloide en el futuro y un juicio de si o no existe un riesgo de recurrencia de la enfermedad amiloide después de tratamiento. También, el diagnóstico incluye una medición de un grado de cada una de las enfermedades amiloides y el riesgo.

Otros términos y convenciones en esta invención se definirán en detalle en la descripción de las modalidades y ejemplos. Note que los términos están de acuerdo con la Comisión IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica o basado en si en los significados de los términos utilizados idiomáticamente en la técnica. También varias tecnologías utilizadas para practicar la invención diferentes a las tecnologías cuyas fuentes se mencionan aquí son practicables por expertos en la técnica sin fallar basados en publicaciones conocidas y similares. Por ejemplo, las tecnologías en el campo de los biotecnológicos y la biología molecular son practicables por métodos descritos en o los métodos descritos en publicaciones citadas en J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis "Molecular Cloning: A laboratory manual (2nd edition)" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed. "DNA Cloning" 2nd ed. Vol. 1 to 4 (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); Ausubel, F. M. et al. "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons, New York, N. Y. 1995; Nihon Seikagakuikai ed. "Zoku Seikagaku Jikken Koza 1 Idensi Kenkyuho II" Tokyo Kagaku Dojin (1986); Nihon Seikagakuikai ed., Shin Seikagaku Jikken Koza 2 Kakusan III (Kumikae DNA

Gijutsu)", Tokyo Kagaku Dojin (1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology" Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology" Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987); y similares o por métodos sustancialmente iguales a aquellos descritos anteriormente y métodos modificados de estos.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 es un resultado de análisis de masa de una proteína variante amiloide secretada de una proteína precursora amiloide variante.

La Figura 2 es un resultado de un ensayo de punto conducido para evaluar la antigenicidad de la proteína variante amiloide.

La Figura 3 es un resultado de un ensayo de punto conducido para evaluar la antigenicidad de la proteína variante amiloide en la proteína amiloide y una proteína amiloide tipo silvestre.

La Figura 4 es un resultado de una precipitación inmune conducida para evaluar la especificidad de un anticuerpo de proteína amiloide anti-variante.

La Figura 5 es un resultado de inmunocitoquímica con el anticuerpo de proteína amiloide anti-variante.

La Figura 6 es un resultado de un ensayo doble de tejido inmune fluorescente conducido para examinar una relación entre la proteína variante amiloide que utilice el anticuerpo de proteína amiloide anti-variante y una reacción neuroinmune.

Mejor Forma de Llevar a cabo la Invención

Es posible aislar y generar unas proteínas variantes amiloides de esta invención como una proteína natural A β 1-40 (A22B), A β 1-42 (A22C), o A β 1-43 (A22E) de una célula de un paciente con enfermedad de Alzheimer familiar por ejemplo. Es posible obtener proteínas variantes amiloides no naturales A β 1-40 (A21A), A β 1-42 (A21A), A β 1-43 (A21A), A β 1-40 (A23D), A β 1-42 (A23D), y A β 1-43 (A23D) también mediante un método de síntesis de péptido conocido. En razón a que los materiales para la síntesis y los métodos utilizados en las etapas desarrolladas en la síntesis son bien conocidos, personas expertas en la técnica pueden producir la proteína variante amiloide deseada según se requiere al desarrollar apropiadamente síntesis, aislamiento, purificación, y similares. También, es posible producir las proteínas variantes amiloides de esta invención mediante una tecnología recombinante de gen que utiliza huéspedes conocidos tal como *E. coli*, levadura, *Bacillus subtilis*, una célula de insecto, una célula de animal, y una célula de planta. Una síntesis química se puede conducir de acuerdo con ejemplos descritos después en esta especificación, por ejemplo, es posible emplear cualquier método en la medida que un gen y péptido o un compuesto deseado de estos se obtienen mediante el método. Por

ejemplo, es posible combinar métodos bien conocidos tal como la reacción para producir Boc (t-butiloxycarbonilo), la oxidación de DMSO, la reacción álcali, la reacción ácida, la reacción epoxidación, la cromatografía de columna de gel de sílice, la reacción de alquilación, la reacción de saponificación, la reacción al calentar, la reacción de descarboxilación, la reacción de condensación, la cromatografía líquida de alto desempeño de fase inversa, y similares. También, se pueda desarrollar un método en donde los residuos de aminoácidos que constituyen la proteína variante amiloide se hacen reaccionar secuencialmente para evaluar la eficiencia y pureza de producto de reacción según se requiera. Adicionalmente, el péptido sintetizado se puede alterar en una temperatura ordinaria, una alta temperatura, al congelar y descongelar, o similares durante un período deseado de tiempo. Más específicamente, el método se puede desarrollar de acuerdo con Merrifield, R. B. J. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of tetrapeptide. J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154, 1963; Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach. Chan, W. C. and White, P. D., Oxford University Press, 2000.

Las proteínas variantes amiloides de esta invención pueden incluir una modificación para promover la síntesis y purificación, modificación para promover la estabilidad física y química, modificación para activar la estabilidad e inestabilidad para metabolismo in vivo, acondicionar, y similares, y control de modificación para originar un incremento y una reducción en la eficiencia de suministro transórgano que incluye tránsito de barrera de vaso sanguíneo cerebral. Ejemplos de modificación de

control incluyen una secuencia que consiste de 11 aminoácidos de Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg (SEQ ID NO 4) (Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S. F. In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse, Science 285: 1569-1572). Al incluir la secuencia de control que se liga por la unión de péptido en el terminal N, es posible facilitar el tránsito de la proteína variante amiloide a través de la barrera cerebral sanguínea para alcanzar un sitio objetivo del cerebro en una eficiencia mejorada.

Otros ejemplos de la modificación de las proteínas variantes amiloides de esta invención incluyen la edición mediada por ARN de transferencia de aminoácido a proteína, tal como acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de porción hem, unión covalente de derivado de nucleótido o nucleótido, unión covalente de lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclización, unión de disulfuro, demetilación, formación de unión covalente de reticulación, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gama-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento de hidrólisis de proteína, fosforilación, prenilación, racemización, unión de lípido, sulfatación, serenoilación, y arginilación; ubiquinación; y similares.

Adicionalmente, es técnicamente fácil agregar, cambiar, y convertir una estructura para el propósito de facilitar la

detECCIÓN o purificación de la proteína variante amiloide de esta invención o el anticuerpo preparado al utilizar la proteína variante amiloide como un inmunógeno o para el propósito de agregar otra función, y tales productos están abarcados por el alcance de esta invención. Adicionalmente, un fragmento Fc de globulina inmune tal como FLAG-tag, β galactosidasa, alcalifosfatasa, e IgG y productos tales como GFP obtenidos mediante un método biogenético está abarcado por el alcance de esta invención como la adición de modificación.

Es posible crear el anticuerpo de la sexta invención al seleccionar la proteína variante amiloide de esta invención, es materia modificada, o su materia degenerada (péptido parcial o similar) y al utilizar la materia seleccionada como un antígeno. El péptido parcial comprende 20 o menos residuos de aminoácido, preferiblemente menos residuos de aminoácido tal como 5 residuos de aminoácido, por ejemplo. Los antígenos se pueden utilizar en combinación para crear el anticuerpo. El antígeno no necesariamente es la proteína variante amiloide de esta invención, la materia modificada, o la materia degenerada como esta es y puede ser una proteína que tiene una secuencia primaria cercana al sitio variante de supresión del APP variante expuesto al exterior de la conformación.

También, con el fin de crear la inmunoespecificidad del anticuerpo para la proteína amiloide de esta invención, es preferible utilizar un compuesto que contiene la secuencia de aminoácido descrita anteriormente de la estructura cercana a la variante de supresión. Tales anticuerpos no se limitan

particularmente en la medida en que ellos se unen inmunológicamente al sitio o reconocen el sitio. La unión o capacidad de reconocimiento del anticuerpo se decide basado en una reacción de anticuerpo de antígeno conocida. Como se utiliza aquí, medios "inmunoespecíficos" que tienen afinidad con el compuesto son sustancialmente mayores que aquellas de las proteínas relacionadas o compuestos en la técnica.

La producción del anticuerpo se practica al desarrollar inducción inmune que tiene respuesta humoral o respuesta celular al antígeno al utilizar, como el antígeno, la proteína amiloide de esta invención, la materia modificada de esta, o la materia de degeneración de esta sola o en estado de ser unida a un portador en la presencia o ausencia de un adyuvante.

Es posible crear el anticuerpo de la séptima invención al crear un oligómero a partir de un péptido obtenido mediante síntesis orgánica de la proteína variante amiloide y luego utilizar la proteína variante amiloide oligomérica como el antígeno. Este anticuerpo tiene características útiles y novedosas que esta no reconoce de proteínas amiloides monoméricas tipo silvestre y variante tal como proteína amiloide fibrilar que forma placa senil pero reconoce específicamente las proteínas amiloide variante y de tipo silvestre oligoméricas.

Más específicamente, la creación del anticuerpo se implementa al inmunizar un ratón al inyectar una suspensión de proteína amiloide completa con adyuvante completo de Freund, seguido por inyección de una suspensión de la proteína amiloide

con adyuvante incompleto de Freund después de un mes, y luego repetir la misma operación de inmunización después de 7 días. También, es posible crear el anticuerpo mediante inducción de inmunidad a través de estimulación inmune de una célula linfática o una célula precursora de esta bajo la condición de cultivo. El portador no se limita particularmente en la medida en que este no origina efectos adversos en el huésped, y ejemplos de estos incluyen, pero no se limitan a, celulosa, una salina normal, salina normal amortiguada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, aminoácido polimerizado, albúmina, una mezcla de estos y similares. Como animales a ser inmunizados se utilizar adecuadamente, un ratón, una rata, un conejo, una cabra, un caballo, una vaca, y similares. Un anticuerpo policlonal es obtenible como un suero mediante un método conocido o mediante un método de recuperación de anticuerpo a partir del suero. Un método preferible puede ser una cromatografía de afinidad inmune.

La producción de un anticuerpo monoclonal se desarrolla en tal una forma que un tejido (de bazo o nodo linfático, por ejemplo) o una célula cultivada que contiene actividad de anticuerpo se recupera a partir de animal de inmunidad inducida, y luego introducir un transformante dentro de una célula permanentemente proliferativa conocida (cepa de mieloma tal como P3X63Ag8, por ejemplo). Por ejemplo, un híbrido creado a partir de la célula que produce anticuerpo y la célula permanentemente proliferativa se someten a clonación, y luego un híbrido que produce el anticuerpo que reconoce específicamente la proteína variante amiloide de acuerdo con esta invención se selecciona para recolectar el anticuerpo a partir de un medio de cultivo del

hibridoma. Ejemplos prácticos incluyen los métodos descritos en el método hibridoma (Kohler G. and Milstein C. (1975) Nature 256, 495-497, el método trioma (Kozbor et al. Immunology Today (1983) 4:72), y el método EBV (Cole et al. Monoclonal antibodies and cancer therapy, Alan R. Liss, Inc., (1985): 77-96), y varios otros métodos.

Es posible utilizar el anticuerpo para identificación, detección, y cuantificación de las proteínas amiloide variantes de esta invención o para la preparación y purificación de las proteínas amiloide variantes a través de cromatografía de afinidad y similares. Es posible modificar el anticuerpo en un anticuerpo humano al emplear un método conocido.

Más específicamente, el anticuerpo que muestra actividad para incrementar la actividad de la proteína variante amiloide de esta invención entre anticuerpos específicos de las proteínas amiloide variantes de esta invención es útil como un calibrador para un compuesto a ser sometido para selección de una droga inhibidora de generación de proteína amiloide o como medios de selección. Ejemplos de ensayos que utilizan los anticuerpos para las proteínas variantes amiloides de esta invención incluyen el radioinmunoensayo, ensayo de unión competitivo, cromatografía líquida de alto desempeño, el análisis western blot, el ensayo ELISA, y una combinación de estos.

La octava invención y la novena invención son métodos de diagnóstico de enfermedad amiloide caracterizado por la medición de un producto de expresión del gen de proteína variante amiloide

humano de la primera invención. Esta es, la proteína variante amiloide de esta invención es una proteína causante aislada e identificada a partir del paciente con enfermedad de Alzheimer familiar, y es posible diagnosticar las enfermedades amiloides tal como la enfermedad de Alzheimer a través de la medición de abundancia de la proteína variante amiloide. Adicionalmente, en el caso en donde la proteína variante amiloide de esta invención se administra exógenamente, es posible medir la abundancia de esta.

En el caso en donde un mRNA es el producto de expresión, es posible conducir la medición al desarrollar hibridización de sonda cuantitativa o al utilizar una microdisposición. Como un método de hibridización que utiliza una sonda de ADN estándar, es posible utilizar un método de sonda de oligonucleótido específica de alilo, el ensayo de ligación de oligonucleótido, el método invasor, y métodos similares conocidos. También, es posible medir la cantidad de mRNA mediante RT-PCR cuantitativo utilizando un mRNA aislado de un examinado como una plantilla.

Adicionalmente, en el caso en donde la proteína variante amiloide es el producto de expresión del gen, es preferible utilizar el anticuerpo de la sexta invención. Particularmente, el uso de un anticuerpo etiquetado hace posible lograr la detección con conveniencia y alta exactitud. Una enzima, radioisótopo, o fluorocromo se pueden utilizar para el etiquetado. La enzima no se limita particularmente en la medida en que esta satisface condiciones tales como tener un gran número de cambio, que es estable cuando se une al anticuerpo, y que tiñe específicamente

la matriz, y aquellos utilizados ordinariamente para EIA, tal como peroxidasa, β -galactosidasa, alcalifosfatasa, oxidasa glucosa, acetilcolinesterasa, glucosa-6-fosforilada dehidrogenasa, y similares se pueden utilizar como la enzima. También, un inhibidor de enzima, coenzima, y similares se puede utilizar. La unión de la enzima al anticuerpo se puede desarrollar al emplear un método conocido que utiliza un agente de reticulación tal como compuesto maleimida o similar. Como la matriz, una sustancia conocida se puede utilizar dependiendo del tipo de enzima a ser utilizada. Por ejemplo, se utiliza 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina en el caso de utilizar peroxidasa como la enzima, o, paranitrofenol o similares si se utiliza en el caso de utilizar alcalifosfatasa como la enzima. Como el radioisótopo, aquellos utilizados en RIA ordinarios, tal como ^{125}I y ^3H , se pueden utilizar. Como el fluorocromo, aquellos utilizados en métodos de anticuerpos fluorescentes ordinarios, tal como isotiocianato de fluorescencia (FITC) e isotiocianato tetrametilrodamina (TRITC) se puede utilizar. En el caso de utilizar la enzima, una matriz capaz de colorear por degradación a través de un efecto enzimático se agrega; la actividad de enzima se determina al medir óptimamente una cantidad de degeneración de la matriz; la actividad de enzima se convierte en una cantidad de anticuerpo unido; y una cantidad de anticuerpo se calcula a través de la comparación con un valor estándar. En el caso de utilizar el radioisótopo, una cantidad de radiación generada del isótopo radiactivo se mide mediante un contador de centelleo o similar. En el caso de utilizar el fluorocromo, una cantidad de fluorescencia se mide al utilizar un dispositivo de medición combinado con un microscopio de fluorescencia. También,

es posible desarrollar la medición al utilizar un citómetro de flujo. Adicionalmente, un método de emparejado (el método de ELISA cuando se utiliza una enzima para etiquetado) utilizando un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario etiquetado pueden ser utilizados preferiblemente.

Aquí en adelante, se describirán la célula de la décima invención y el animal de la décima primera invención. Es posible crear el animal o la célula mediante un método de inyectar la solución de proteína variante amiloide a un animal, un método de administrar una sustancia obtenida mediante un coloide de metal y la proteína variante amiloide a un animal, un método para introducir el gen APP variante de la segunda invención o el CADX de esta dentro de un animal o una célula de acuerdo con una terapia de gen que utiliza un vector de retrovirus o un vector de adenovirus, un método de fosfato de calcio, un método para utilizar una liposoma o un fantasma de célula sanguínea roja, un método de electroporación, un método para introducir la proteína variante amiloide o el péptido de esta dentro de una célula mediante un método de microinyección utilizando una pipeta de vidrio y similares.

Adicionalmente, es posible crear el animal y la célula de acuerdo con un método de creación de animal transgénico conocido (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77; 7380-7384, 1980, por ejemplo). Más específicamente, es posible crear un animal transgénico deseado al introducir el gen APP variante de la segunda invención dentro de una célula totipotencia de un animal no humano (preferiblemente un ratón o una rata) para generar una materia

sólida a partir de la célula y luego seleccionar la materia sólida en la que el gen APP variante se incorpora dentro de un genoma de una célula somática. Como el método de introducción del gen dentro de la célula totipotencia, una inyección física de ADN de gen exógeno (método de microinyección) es óptimo en vista de una eficiencia de protección del animal transgénico sólido y una eficiencia de transferencia del gen introducido a la siguiente generación. Un huevo fertilizado dentro del cual el gen se inyecta se transplanta en un tubo de Falopio de un padre de acogida, y luego nace un animal como un individuo se lleva a pesar del padre de acogida, seguido por extracción del ADN de una parte del cuerpo (punta de la cola o similar). Después de eso, se desarrolla análisis southern blot o un ensayo PCR para confirmar la existencia de un gen exógeno en el ADN extraído. Un animal heterocigoto primario en el que el gen exógeno se introduce en uno de los cromosomas diploides se obtiene como se describió anteriormente, y es posible obtener un animal homocigoto al aparear los animales heterocigotos. El animal transgénico de esta invención incluye el animal heterocigoto primario, el animal homocigoto obtenido al aparear los animales heterocigotos, descendientes de estos, y embriones de estos.

La décima segunda invención es el método para sondear una componente de agente terapéutico para enfermedades amiloides utilizando la célula o el animal. Más específicamente, una sustancia candidato es puesta en contacto con el animal o la célula, y una cantidad de un producto de expresión (mARN o proteína variante amiloide) de un gen APP variante que se expresa en el tejido animal (tejido del sistema nervioso central) en la

célula mediante los mismos métodos como aquellos de los métodos de diagnóstico de las invenciones ocho y nueve. La sustancia candidata capaz de reducir la cantidad de producto de expresión se utiliza como el componente de agente terapéutico. También, una sustancia que influencia la actividad de la proteína variante amiloide que expresa en la célula o el tejido de animal se determina como componente de agente terapéutico.

La sustancia candidato a ser utilizada para el método de selección incluye un compuesto orgánico e inorgánico (particularmente compuesto de bajo peso molecular), una proteína, un péptido, y similar, por ejemplo. De estas sustancias, las funciones y estructuras pueden ser conocidas o desconocidas. También, la librería química combinatoria es medio efectiva como un grupo de sustancia candidato para especificar eficientemente la sustancia deseada. La librería química combinatoria es una colección de composiciones químicas generadas al combinar varios elementos fundamentales químicos de reactivos y similares mediante una síntesis química o una síntesis biológica. Por ejemplo, una librería química combinatoria lineal tal como una librería de péptido se forma al combinar un conjunto de elementos fundamentales (aminoácidos) con una longitud de un compuesto dado (el tamaño del péptido) mediante todos los métodos posibles. Es posible sintetizar varias composiciones químicas a través de la mezcla combinatoria de elementos fundamentales químicos. Por ejemplo, la mezcla combinatoria sistémica de 100 elementos fundamentales químicos conmutativos resulta en 100 millones de compuestos tetraméricos o 10 billones de compuestos pentaméricos (ver Gallop et al., (1994) 37(9): 1233-1250, por ejemplo). La

preparación y selección de la librería química combinatoria es bien conocido en la técnica (ver Patente Estadounidense Número 6,004,617 y 5,985,365, por ejemplo). También, es posible utilizar varias librerías disponibles comercialmente.

La décima tercera a décima sexta invenciones son drogas antiamiloides para enfermedades cada una contiene la proteína variante amiloide, el péptido, cADN, o el anticuerpo de esta invención. Cada una de las drogas controla una producción de proteína amiloide o una cantidad de acumulación cerebral de esta para evitar y trata enfermedades así como también para aliviar síntomas. Más específicamente, los anticuerpos de la sexta invención y la séptima invención se suministran para solucionar problemas de reacción adversa en la terapia inmune indirecta convencional. La proteína variante amiloide, el péptido, o el cADN funcionan como una molécula de antígeno para producir un anticuerpo efectivo para inhibir o suprimir la polimerización de la proteína amiloide tipo silvestre *in vivo*.

Cada uno de los componentes se formula por métodos y medios conocidos en la forma que es capaz de ser introducida dentro de un cuerpo viviente o célula. En el caso del cADN, una forma de droga puede ser tal que un vector de expresión dentro del cual el cADN se integra en nanopartículas huecas que presentan moléculas de bioreconocimiento o un vector de virus conocido (retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados), por ejemplo. Al introducir tal droga dentro de un cuerpo viviente mediante un método de terapia de gen, es posible expresar la proteína variante amiloide en células vivientes. Es también posible adoptar un método de

terapia de gen para inyectar una solución de cADN en el músculo. Adicionalmente, con el fin de formular la proteína variante amiloide, el péptido, o el anticuerpo dentro de la forma introducíble en un cuerpo viviente, es posible mezclar la proteína amiloide variante, el péptido, o el anticuerpo con una solución portadora que no cambia estructuras y funciona por lo tanto y es farmacológicamente aceptable. También es posible emplear un método en donde un órgano o célula se sacan de un cuerpo viviente y se someten a un tratamiento con una proteína o el péptido in vitro para inducir un carácter deseado y luego la célula o el órgano se regresan al cuerpo viviente. También, se puede emplear como una forma de terapia un método en donde el vector de expresión de cADN se introduce dentro de un órgano o unas células tomadas de un cuerpo viviente y luego el órgano y la célula se regresan al cuerpo viviente. En tal caso, el método de microinyección se puede emplear para la introducción en la célula, por ejemplo. También, se puede emplear un método de introducción intracelular que utiliza lípidos (BioPORTER (Gene Therapy Systems, USA), Chariot (Active Motif, USA), y similares). Adicionalmente, cada una de las drogas anti-amiloides para enfermedad de esta invención se pueden formular en una manera apropiada que mejora la eficiencia de transporte de esta al tejido cerebral.

La proteína variante amiloide, el péptido, el cADN, o el anticuerpo, que son los ingredientes efectivos, se pueden utilizar solos o en combinación con una materia modificada de estos o una materia degenerada de estos. Adicionalmente, la proteína variante amiloide, el péptido, el cADN, o el anticuerpo

se pueden utilizar concomitantemente con un compuesto que es ventajoso para la terapia. Una forma preferible de una administración sistémica de la droga de esta invención es inyección, particularmente inyección intravenosa. También es posible utilizar otra senda de inyección tal como inyección subcutánea, inyección intramuscular, o inyección intraperitoneal. Otros medios para la administración es administración transdérmica o transmucosa utilizando un agente de penetración tal como sal de ácido de bilis o ácido adrenal y otros tensioactivos. Adicionalmente, cuando una formulación entérica de una formulación en capsula se hace exitosamente es posible una administración oral. La administración de las composiciones de droga puede ser tópica, y una forma puede ser un ungüento, una pasta, un gel, o similares.

Ejemplos

Aquí en adelante esta invención se describirá en particulares basados en pero no limitados a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Determinación de la Secuencia de Base APP Variante de Supresión

El ADN del genoma se extrae de la sangre de un paciente con enfermedad de Alzheimer familiar, y la secuencias de base total cada una que codifican un cADN de cada una de presenilina 1 (PSEN1), presenilina 2 (PSEN2), y APP, que son conocidas por ser genes causantes, se someten a amplificación PCR al utilizar el

ADN obtenido como una matriz y luego analizado con el uso de secuenciador PRISM modelo 310 fabricado por ABI (Perkin-Elmer, CA). Como un resultado, se encuentra una variante en una región de codificación de proteína amiloide (SEQ ID NO 1) del cADN de gen APP tipo silvestre (supresión de tres bases gaa en las posiciones 1852 a 1854 de la SEQ ID NO 1).

Ejemplo 2

Determinación de Estructura de Proteína Amiloide Sintetizada de cADN de Gen APP Variante de Supresión

En razón a que el cADN de gen APP variante obtenido en el Ejemplo 1 tiene la variante dentro de la proteína amiloide, se examina un sitio de clivaje para β secretasa o γ secretasa. Luego, un vector de expresión del cADN del gen APP variante se introduce en las células HEK de células cultivadas humanas para expresar APP así como también para producir y secretar proteína amiloide. Se deja que ocurra la expresión durante dos días para obtener un supernadante de cultivo, y una fracción inmunoprecipitada obtenida al utilizar un anticuerpo de proteína anti-amiloide se somete a un análisis de masa con el uso de AXIMA-CFR fabricado por Shimadzu Corporation. El resultado se muestra en la Figura 1.

Como es evidente de la Fig. 1, un valor de observación experimental obtenido como un peso molecular de A β 1-40 (ΔE) que es la proteína amiloide secretada del cADN del gen APP variante expresado en las células HEK de células cultivadas es de 4200.51.

Este peso molecular es casi el mismo como aquel de un valor de cálculo teórico de 4200.69 de un peso molecular en el caso de una supresión de Glu en la posición 21 de A β 1-40. Esto es, se demuestra que la proteína variante amiloide de supresión se produce y secreta en un estado en donde los sitios de clivaje β secretasa y γ secretasa se retienen en esta APP variante de supresión. Más específicamente, se demuestra que la proteína variante amiloide es A β 1-40 en donde el amino terminal inicia con el Asp y termina con el Val con Glu en la posición 22 que se suprime.

Ejemplo 3

Cuantificación de Proteína Amiloide Sintetizada a Partir de APP variante de supresión

Se demuestra que la APP variante de supresión expresada en células HEK de células cultivadas humanas produce y secreta dos tipos de proteína variante amiloides similares al APP tipo silvestre como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

	A β 42 (pg/ml)	A β 40 (pg/ml)
Control	0	0
APP tipo silvestre	26	200
APP variante	24	190

Note que un vector de expresión vacante disuelto en una salina normal se utiliza como el control, en la tabla 1. También,

A β 42 representa A β 1-42 y A β 1-43 o A β 1-42 (Δ E) y A β 1-43 (Δ E), y A β 40 representa A β 1-40 o A β 1-40 (Δ E).

Ejemplo 4

Toxicidad de Proteína variante amiloide

La proteína variante amiloide utilizada en el Ejemplo 4 es un péptido sintetizado orgánicamente que tiene una secuencia de aminoácido y una masa igual a aquella de la proteína amiloide secretada de las células de acuerdo con la secuencia de aminoácidos y análisis de masa. A través del examen de toxicidad de neuronas con los usos del péptido sintético, se demuestra que el péptido sintético tiene una menor toxicidad que la proteína amiloide tipo silvestre convencional. El resultado se muestra en la tabla 2.

Tabla 2

	Control	A β tipo silvestre	A β variante
Índice de supervivencia (%)	100	40	90

En la tabla 2, el A β tipo silvestre o la variante A β representan A β 1-40 o A β 1-40 (Δ E), y el control representa A β 1-40 que tiene una secuencia de aminoácido inversa de una secuencia de aminoácido del tipo silvestre A β 1-40.

Ejemplo 5

Propiedad de Aglutinación de Proteína variante amilida

La proteína variante amiloide utilizada en el Ejemplo 5 es un péptido sintetizado orgánicamente que tiene una secuencia de aminoácido y una masa igual a aquella de la proteína variante amiloide secretada de la célula de acuerdo con la secuencia de aminoácido y análisis de masa. A través el examen de propiedad de aglutinación de proteína al utilizar el péptido por la capacidad de unión de tioflavina T se demuestra que la actividad de aglutinación de la proteína variante amiloide de esta invención es considerablemente menor que la proteína amiloide tipo silvestre convencional. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

	0 Hr	12 Hr	24 Hr
A β tipo silvestre	0	61	100
A β variante	0	2	2

En la tabla 3, el A β tipo silvestre representa A β 1-42, y la variante A β representa A β 1-42 (Δ E). La actividad de aglutinación del A β 1-42 tipo silvestre bajo las condiciones de 100 microgramos/ml (PBS) a 37°C durante 24 horas se establece para el 100%.

Ejemplo 6

Antigenicidad de Proteína variante amiloide

El péptido sintetizado orgánicamente de la proteína variante amiloide se calienta a 37°C durante 24 horas para crear un

oligómero. La identificación del oligómero se conduce al confirmar: la detección de un complejo amiloide grande (dímérico, trimérico, o más) por Western blot; la ausencia de fibra amiloide suministrada por observación microscópica electrónica; y reacción de unión tioflavina negativa.

Se crea un anticuerpo que tiene la proteína variante amiloide oligomérica como un antígeno. Para este propósito, una suspensión de un péptido disuelto en PBS y solución adyuvante completa de Freund se inyecta en un ratón. Después de un mes, el ratón se inmuniza con una suspensión que contiene adyuvante incompleto de Freund en lugar de adyuvante completo de Freund, y la misma operación de inmunización se repite después de 7 días. Se recolecta sangre en una cantidad de 100 microlitros de la vena de la cola del ratón, y se confirma la reactividad de esta.

Una pluralidad de tiras de membrana PVDF manchadas con el péptido antígeno se prepara. Después de secar las tiras de membrana PVDF ellas se bloquean con PBS que contiene un 20% de suero de vaca. Luego, las tiras de membrana se colocan de forma separada en cajas de reacción pequeñas para reaccionar con suero de ratón diluido 1/150 (No. 1 a 8) (Fig. 2). Las tiras de membrana se someten a reacción con un complejo de avidin-biotina al utilizar anticuerpo de cabra IgG antirratón etiquetado biotilizado como un anticuerpo secundario. La detección se desarrolla al observar títulos de anticuerpo a través de coloración DAB. La tira de membrana más a la izquierda es un

ejemplo de una reacción que utiliza como un control un anticuerpo de conejo capaz de reconocer un margen N-terminal.

Con referencia a la Figura 2, las tiras de membrana mostradas en el ensayo de punto se manchan para ser cambiadas en una dirección vertical de otra con el fin de distinguirla de la otra. Las tiras de membrana se marcan con puntos de 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, y 0.01 ng, de PBS y albúmina en este orden desde la parte superior. Se revela que el anticuerpo de dilución 1/150 requiere al menos 1 ng de antígeno y no se detecta cuando la cantidad de antígeno es menor de 1 ng. Adicionalmente, no hubo reacción con albúmina de suero bovino (BSA). El hecho importante es que el anticuerpo capaz de reconocer el péptido oligómero se identifica en todos los sueros de ratón de 8 ratones de ensayo sin excepción, y que se confirma la alta antigenicidad reproducibles.

Adicionalmente, se confirma que un anticuerpo de proteína amiloide anti-variante reacciona al utilizar la proteína variante amiloide como un antígeno reacciona no solo con la proteína variante amiloide sino que también con la proteína amiloide de tipo silvestre (Fig. 3). Con referencia a la figura 3 el ensayo se conduce de la misma forma como se describió anteriormente excepto para utilizar la proteína amiloide tipo silvestre en lugar de la proteína variante amiloide. La tira de membrana se marca con puntos con 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, y 0.01 ng de la proteína amiloide tipo silvestre, PBS, y albúmina en este orden desde la parte superior.

Ejemplo 7

Especificidad de Anticuerpos de Proteína Amiloide Anti-Variante

La especificidad del anticuerpo de proteína amiloide anti-variante se confirma en tal una forma que el oligómero de proteína variante amiloide se inmunoprecipita al utilizar el anticuerpo obtenido y luego detectado al utilizar otro anticuerpo amiloide ordinario mediante western blot.

La tira de membrana más a la izquierda en el ensayo de inmunoprecipitación mostrado en la figura 4 es un ejemplo de una reacción que utiliza como un control un anticuerpo de conejo capaz de reconocer un margen N-terminal y la detección con el uso del mismo anticuerpo. Las flechas indican los patrones de electroforesis de las proteínas amiloides, y la forma monomérica (peso molecular: 4 kDa), la forma dimerica (peso molecular: 8 kDa), la forma trimérica (peso molecular: 12 kDa), la forma tetramérica (peso molecular: 16 kDa), y la forma grande pentamérica (peso molecular: 20 kDa) se muestran en este orden desde la parte inferior a al superior. Se revela que el suero de ratón examinado aquí (Nos. 2, 3, y 4) reconocen y se unen a los oligómeros mayores o diméricos. El anticuerpo amiloide ordinario reconoce la forma monomérica, pero el anticuerpo de proteína amiloide anti-variante no reconoce la forma monomérica.

Luego, la actividad de anticuerpo de oligómero del anticuerpo de proteína amiloide anti-variante se mide cuantitativamente (Tabla 4). En esta medición, 100 ng, 10 ng, y 1 ng del oligómero de proteína variante amiloide, PBS, o albúmina

de vaca se unen a una placa plástica de 96 agujeros y luego se bloquea mediante un 20% de PBS de suero de vaca para ensayar suero de ratón diluido 1/450 (Nos. 2, 3, y 4). Un anticuerpo de cabra IgG anti-ratón etiquetado con peroxidasa se utiliza como un anticuerpo secundario.

Tabla 4

Proteína oligómero	100 ng	10 ng	1 ng	PBS	BSA
Suero					
#2	1.25	0.45	0.06	0.05	0.08
#3	1.50	0.26	0.08	0.05	0.38
#4	1.19	0.16	0.07	0.07	0.30
PBS	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

Es evidente de la tabla 4 que el anticuerpo de oligómero de proteína amiloide anti-variante no reacciona con BSA ni con la proteína amiloide monomérica pero reacciona específicamente con la proteína amiloide oligomérica.

Ejemplo 8

Inmunohistoquímica con Anticuerpo de Proteína Amiloide Anti-Variante

La especificidad del anticuerpo de proteína amiloide anti-variante se examina a través de unido de anticuerpo fluorescente utilizando una sección de tejido cerebral enfermo con Alzheimer fijado con formalina (Fig. 5). El anticuerpo de proteína amiloide anti-variante se hace reaccionar a 4°C durante la noche como un

anticuerpo primario, y luego la sección de tejido cerebral lavada con PBS que contiene 0.05% Tween 20, seguido por reacción con anticuerpo IgG anti-ratón etiquetado con Rojo Texas que se utiliza como un anticuerpo secundario durante dos horas y luego se lava de nuevo para ser encapsulado con un agente de encapsulación que contiene un agente antifotoblanqueamiento fluorescente. Se conduce una observación al utilizar un microscopio de exploración láser con focal (Axiovert 100; producto de Zeiss, Alemania).

El resultado es como se muestra en la Figura 5, y el teñido es de tal forma que se observa una distribución similar a puntos en la neurona, que coincide con publicaciones reportadas de la proteína amiloide oligomérica (Documento 8 Diferente de Patente; R. H. Takahashi, C. G. Almeida, F. P. Kearey, F. Yu, M. T. Lin, T. A. Milner, G. K. Gouras, Oligomerization of Alzheimer's amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain, (2004) J. Neurosci. 24: 3592-3599; R. Kaye, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milson, C. W. Cotman, C. G. Glabe, Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis, (2003) Science 300: 486-489).

Más específicamente, se confirma que el anticuerpo de proteína amiloide anti-variante creado al utilizar la proteína amiloide oligomérica como el anticuerpo reconoce la proteína amiloide oligomérica pero no reconoce de la placa senil que forma la proteína amiloide fibrosa.

Ejemplo 9

Reacción Neuroinmune y Anticuerpo de Proteína Amiloide Anti-Variante

Anticuerpos inducidos por terapia de vacuna convencional (D. Schenk, R. Barbour, W. Dunn, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse, (1999) Nature 400: 173-177) utilizan la proteína amiloide tipo silvestre (Abeta₁₋₄₂) como el antígeno y la placa senil tejida (C. Hock, U. Konietzko, A. Papassotiropoulos, et al., Generation of antibodies specific for beta-amyloid by vaccination of patients with Alzheimerdisease, (2002) Nat Med 8: 1270-1275). Adicionalmente, se ha reportado que efectos adversos de una reacción de encefalitis se han originado por el anticuerpo (J. A. Nicoll, D. Wilkinson, C. Holmes, P. Steart, H. Markham, R. O. Weller, Neuropathology of human Alzheimer's disease following immunization with amyloid beta peptide: a case report, (2003) Nat Med 9: 448-452; J. M. Orgogozo, S. Gilman, J. F. Dartiques, B. Laurent, M. Puel, L. C. Kirby, P. Jouanny, B. Dubois, L. Eisner, S. Flitman, B. F. Michel, M. Boada, A. Frank, & C. Hock, Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after abeta42 immunization, (2003) Neurology 61: 46-54).

Con el fin de comparar una molécula complemento (C3d) activada como un marcador de reacción inflamatorio con los tejidos con el anticuerpo de proteína amiloide anti-variante, un anticuerpo de ratón de proteína amiloide anti-variante y un anticuerpo de conejo anti-C3d se mezclan para ser utilizados como los anticuerpos primarios y luego reaccionan a 4°C durante la

noche, y entonces se lava la sección de tejido cerebral con PBS que contiene 0.05% Tween 20, seguido por reacción con una solución de mezcla de un anticuerpo IgG antirratón etiquetado Rojo Texas y un anticuerpo IgG anticonejo etiquetado FIAc, que se utilizan como los anticuerpos secundarios, durante dos horas y luego se lavan de nuevo para ser encapsulados con un agente de encapsulación que contiene un agente antifotoblanqueamiento fluorescente. Se conduce una observación al utilizar un microscopio de exploración láser con focal (Axiovert 100; producto de Zeiss, Alemania).

El resultado es como se muestra en la Figura 6. En la figura 6 se muestran imágenes de tñido doble de la misma sección. Se muestra la figura 6(a) la imagen de tñido del anticuerpo de ratón de proteína amiloide anti-variante, y se muestra en la figura 6(b) la imagen de tñido de los anticuerpos de conejo anti-C3d, que se detecta como imágenes fluorescentes diferentes. Como es coincidente con el reporte convencional (P. Eikelenboom, F. C. Stam, Immunoglobulins and complement factors in senile plaques, (1982) Acta Neuropathol 57: 239-242; P. Eikelenboom, C. E. Hack, J. M. Rozemuller, F. C. Stam, Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's dementia, (1989) Virchows Arch 56: 259-262; P. Eikelenboom, J. M. Rozemuller, F. L. van Muiswinkel, Inflammation and Alzheimer's disease: relationships between pathogenic mechanisms and clinical expression, (1999) Exp Neurol 154: 89-99; P. L. McGeer, E. G. McGeer, Inflammation, neurotoxicity and Alzheimer disease, (2001) Neurobiology of Aging 22: 799-809; P. Eikelenboom, A. J. M. Rozemuller, J. J. M. Hoozemans, R. Veerhuis, & W. A. van Gool, Neuroinflammation and

Alzheimer Disease: Clinical and Therapeutic Implications, Alzheimer Disease & Associated Disorders, (2000) 14, Suppl. 1: S54-S61), el C3d es un marcador de reacción de complemento neuroinmune activado tiene una distribución que coincide con la placa senil. Sin embargo, la localización del tejido cerebral de la enfermedad de Alzheimer del C3d no coincide con la localización de la proteína amiloide oligomérica que es la imagen de ténido de anticuerpo de proteína amiloide anti-varianle.

Aplicabilidad Industrial

Esta invención suministra una proteína variante amiloide novedosa y su gen que se relaciona con la patología de enfermedades amiloides tal como enfermedad de Alzheimer, y suministra una composición de droga novedosa y una medición diagnóstica que utiliza la característica que es útil en los campos de estudios básicos y clínicos particularmente de enfermedades amiloides tal como la enfermedad de Alzheimer.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína variante amiloide humana, que, en la SEQ ID NO. 2, consiste en la secuencia de aminoácido de:

- (1) 39 aminoácidos con la supresión de Glu en 618 en la secuencia de 597 a 636;
- (2) 41 aminoácidos con la supresión de Glu en 618 en la secuencia de 597 a 638;
- (3) 42 aminoácidos con la supresión de Glu en la posición 618 en la secuencia de 597 a 639;
- (4) 39 aminoácidos con la supresión de Ala en 617 en la secuencia de 597 a 636;
- (5) 41 aminoácidos con la supresión de Ala en 617 en la secuencia de 597 a 638;
- (6) 42 aminoácidos con la supresión de Ala en 617 en la secuencia de 597 a 639;
- (7) 39 aminoácidos con la supresión de Asp en 619 en la secuencia de 597 a 636;
- (8) 41 aminoácidos con la supresión de Asp en 619 en la secuencia de 597 a 638; o
- (9) 42 aminoácidos con la supresión de Asp en 619 en la secuencia de 597 a 639.

2. Un péptido que es una parte de la proteína variante amiloide humana de la reivindicación 1, que comprende 5 a 28 aminoácidos que preceden y siguen el residuo de aminoácido eliminado en la SEQ ID NO 2.

3. Un gen humano que codifica una proteína precursora amiloide variante para la proteína variante amiloide humana de la reivindicación 1.
4. Un mRNA, que es un producto de transcripción del gen humano de la reivindicación 3.
5. Un cADN sintetizado del mRNA de la reivindicación 4, que consiste de la secuencia base de la SEQ ID NO 1 con la supresión de bases en 1852 a 1854.
6. Un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína variante amiloide humana de la reivindicación 1.
7. Un anticuerpo preparado al utilizar un oligómero de la proteína variante amiloide humana de la reivindicación 1 como un antígeno y reconocer específicamente una proteína amiloide oligomérica.
8. Un método diagnóstico de enfermedades amiloides, que comprende detectar una existencia de la proteína amiloide humana de la reivindicación 1.
9. Un método diagnóstico de enfermedades amiloides, que comprende detectar una existencia del gen humano de la reivindicación 3 o el mRNA de la reivindicación 4.
10. Una célula que expresa el gen humano de la reivindicación 3.

11. Un animal no humano que tiene in vivo la proteína variante amiloide de la reivindicación 1, y un tejido y una célula derivado del animal no humano.
12. Un método para seleccionar un componente de agente terapéutico para las enfermedades amiloides, que comprende poner en contacto la célula de la reivindicación 10 o animal no humano, el tejido, o la célula derivada del animal no humano de la reivindicación 1 con una sustancia de ensayo, y medir el comportamiento y actividad de una proteína variante amiloide humana en la célula o el tejido.
13. Una droga anti-amiloide para enfermedad que contiene la proteína variante amiloide de la reivindicación 1.
14. Una droga anti-amiloide para enfermedad que contiene el péptido de la reivindicación 2.
15. Una droga anti-amiloide para enfermedad que contiene el cADN de la reivindicación 5.
16. Una droga anti-amiloide para enfermedad que contiene el anticuerpo de la reivindicación 6 o 7.

RESUMEN

Se pretende suministrar una proteína amiloide novedosa (proteína variante amiloide humana) útil como una molécula de antígeno o similar para mejorar una terapia de vacuna. Esta proteína variante amiloide humana es una proteína con la supresión de Glu en 22, Ala en 21, o Asp en 23 en una proteína amiloide normal (tipo silvestre) (A β 1-40, A β 1-42, o A β 1-43) que consiste de 40, 42, o 43 aminoácidos.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MORI, Hiroshi

<120> Proteina Amiloide Mutante

<130> 05F076PCT

<150> JP2004-294292

<151> 2004-10-06

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2088

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2088)

<223>

<400> 1

atg ctg ccc ggt ttg gcc ctg ctc ctg cag gcc gcc tgg acg gct cag
46Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
1 5 10 15gcg ctg gag gta ccc act gat ggt aat gct ggc ctg cag gct gaa ccc
96Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
20 25 30cag att gcc atg ttc tga ggc aga ctg aac atg cac atg aat gtc cag
144Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
35 40 45aet ggg aag tgg gat tca gat cca tca ggg acc aaa acc tgc att gat
192Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
50 55 60acc aag gaa ggc atc ctg cag tat tgc caa gaa gtc tac cct gaa ctg
240Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
65 70 75 80cag atc acc aat gtg gta gaa gcc aac caa cca gtg acc atc cag aac
296

- 00110

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
85 90 95

tgg tgc aag cgg ggc cgc aag cag tgc aag acc cat ccc cac ttc gtg
336

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
100 105 110

att ccc tac cgc tgc tta gct ggt gag ttc gta agt gat gcc ctt ctc
384

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
115 120 125

gct cct gac aag tgc aaa ttc tta cac cag gag agg atg gat gtt tgc
432

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
130 135 140

gaa act cat ctt cac tgg cac acc gtc gcc aaa gag aca tgc agt gag
480

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
145 150 155 160

aag agt acc aac ttg cat gac tac ggc atg ttg ctg ccc tgc gga att
528

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
165 170 175

gac aag ttc cga ggg gta gag ttt gtg tgt tgc cca ctg gct gaa gaa
576

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
180 185 190

agt gac aat gtg gat tct gct gat gcg gag gag gat gac tcg gat gtc
624

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
195 200 205

tgg tgg ggc gga gca gac aca gac tat gca gat ggg agt gaa gac aaa
672

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
210 215 220

gta gta gaa gta gca gag gag gaa gaa gtg gct gag gtg gaa gaa gaa
720

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
225 230 235 240

gaa gcc gat gat gac gag gac gat gag gat ggt gat gag gta gag gaa
768

Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
245 250 255

gag gct gag gaa ccc tac gaa gaa gcc aca gag aga acc acc agc att
816

Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
260 265 270

gcc acc acc acc acc acc acc aca gag tct gtg gaa gag gtg gtt cga
864

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
275 280 285

gtt cct aca aca gca gcc agt acc cct gat gcc gtt gac aag tat ctc
912

Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu
290 295 300

gag aca cct ggg gat gag aat gaa cat gcc cat ttc cag aaa gcc aaa
960

Glu Thr Pro Gly Asp Gln Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys
305 310 315 320

gag agg ctt gag gcc aag cac cga gag aga atg tcc cag gtc atg aga
1008

Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg
325 330 335

gaa tgg gaa gag gca gaa cgt caa gca aag aac ttg cct aaa gct gat
1056

Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp
340 345 350

aag aag gca gtt atc cag cat ttc cag gag aaa gtg gaa tct ttg gaa
1104

Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu
355 360 365

cag gaa gca gcc aac gag aga cag cag ctg gtg gag aca cac atg gcc
1152

Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala
370 375 380

aga gtg gaa gcc atg ctc aat gac cgc cgc cgc ctg gcc ctg gag aac
1200

Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn
385 390 395 400

tac atc acc gct ctg cag gct gtt cct cct cgg cct cgt cac gtg ttc
1248

Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe
405 410 415

aat atg cta aag aag tat gtc cgc gca gaa cag aag gac aga cag cac
1296

Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His

420	425	430
acc cta aag cat ttc gag nat gtg cgc atg gtg gat ccc aag aaa gcc 1344		
Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala 435 440 445		
gct cag atc cgg tcc cag gtt atg aca cac ctc cgt gtg att tat gag 1392		
Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu 450 455 460		
cgc atg nat cag tct ctc tcc ctg ctg tgc aac gtg cct gca gtg gcc 1440		
Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala 465 470 475 480		
gag gag att cag gat gaa gtt gat gag ctg ctc cag aac gag caa aac 1496		
Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn 485 490 495		
tat tca gat gac gtc ttg gcc aac atg att agt gaa cca agg atc agt 1536		
Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser 500 505 510		
tac gga aac gat gct ctc atg cca tct ttg acc gaa acg aac aac acc 1584		
Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr 515 520 525		
gtg gag ctg ctc ccc gcc gtg aat gga gag ttc agc ctg gac gat ctc cag 1632		
Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Glu 530 535 540		
cag agg cat tct ttt ggg gct gaa tct gtg cca gcc aac aca gaa aac 1680		
Pro Trp Ala Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn 545 550 555 560		
gaa gtt gag cct gtt gat gcc cgc cct gct gcc gac cga gga ctg acc 1728		
Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr 565 570 575		
act cga cca ggt tct ggg ttg aca aat atc aag acg gag gag atc tct 1776		
Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser 580 585 590		
gaa gtg aag atg gat gcc gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt		

1824

* Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
395 600 605

cat cat caa aaa ttg gtg ttc tct gca gaa ggt gtg ggt tca aac aua
1872

His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Gln Asp Val Gly Ser Asn Lys
610 615 620

ggt gca atc att gga ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg aca gtg
1920

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val
+ 625 630 635 640

atc gtc atc aac ttg gtg atg ctg aag aag aua cug tac aca tcc att
1968

Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile
645 650 655

cat cat ggt gtg gtg gag gtt gac gcc gct gtc acc cca gag gag cgt
2016

His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg
660 665 670

cac ctg tcc aag atg cag cag aac ggc tac gaa aat cca acc tac aag
2064

His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys
675 680 685

ttc tct gag cag atg cag aac tag
2088

Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
690 695

<210> 2

* <211> 695

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
1 5 10 15

Ala Leu Gln Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
+ 20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
35 40 45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
50 55 60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
65 70 75 80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
85 90 95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Glu Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
100 105 110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Gln Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
115 120 125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
130 135 140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
145 150 155 160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
165 170 175

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
180 185 190

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Gln Asp Asp Ser Asp Val
195 200 205

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
210 215 220

Val Val Glu Val Ala Glu Gln Gln Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
225 230 235 240

Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Gln
245 250 255

Glu Ala Glu Gln Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile

260

265

270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
275 280 285

Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu
290 295 300

Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Glu Lys Ala Lys
305 310 315 320

Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg
325 330 335

Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp
340 345 350

Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu
355 360 365

Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala
370 375 380

Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn
385 390 395 400

Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe
405 410 415

Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His
420 425 430

Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala
435 440 445

Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu
450 455 460

Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala
465 470 475 480

Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn
485 490 495

Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser
500 505 510

Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr
515 520 525

Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln
530 535 540

Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn
545 550 555 560

Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr
565 570 575

Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Gln Glu Ile Ser
580 585 590

Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
595 600 605

His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
610 615 620

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val
625 630 635 640

Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile
645 650 655

His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg
660 665 670

His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys
675 680 685

Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
690 695

<210> 3
<211> 3641
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (195)..(2507)
<223>

<300>
<308> GenBank/XM_000484
<309> 2004-01-30
<313> (1)..(3641)

<400> 3
gctgactcgc ctggctctga gccccgccgc cgcgctcggg ctccgtcagt ttcctcggca
60

gcggtaggcg agagcacgcg gaggagcgtg cgcggggggc ccgggagacg gcggcggtcg
120

cgccgcgggc agagcaggga cgcggcggat cccactcgca cagcagcgca ctcggtgccc
180

cgcgcagggt cgcg atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg ctg gcc gcc
230

Met	Leu	Pro	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala
1				5						10	

tgg acg gct cgg gcg ctg gag gta ccc act gat ggt aat gct ggc ctg
270

Trp	Thr	Ala	Arg	Ala	Leu	Glu	Val	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Ala	Gly	Leu
		15					20					25			

ctg gct gaa ccc cag att gcc atg ttc tgt ggc aga ctg aac atg cac
320

Leu	Ala	Glu	Pro	Gln	Ile	Ala	Met	Phe	Cys	Gly	Arg	Leu	Asn	Met	His
	30					35					40				

atg aat gtc cag aat ggg aag tgg gat tca gat cca tca ggg acc aaa
370

Met	Asn	Val	Gln	Asn	Gly	Lys	Trp	Asp	Ser	Asp	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys
45					50			55						60	

acc tgc att gat acc aag gaa ggc atc ctg cag tat tgc caa gaa gtc
420

Thr	Cys	Ile	Asp	Thr	Lys	Glu	Gly	Ile	Leu	Gln	Tyr	Cys	Gln	Glu	Val
				65					70					75	

tac cct gaa ctg cag atc acc aat gtg gta gaa gcc aac caa cca gtg
470

Tyr Pro Glu Leu Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val
80 85 90

acc atc cag aac tgg tgc aag cgg ggc cgc aag cag tgc aag acc cat
518

Thr Ile Gln Asn Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His
95 100 105

ccc cac ttt gtg att ccc tac cgc tgc tta gtt ggt gag ttt gta agt
566

Pro His Phe Val Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser
110 115 120

gat gcc ctt ctc gtc cct gac aag tgc aac ttc tta cac cag gag agg
614

Asp Ala Leu Leu Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg
125 130 135 140

atg gat gtt tgc gaa act cat ctt cac tgg cac acc gtc gcc aac gag
662

Met Asp Val Cys Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu
145 150 155

aca tgc agt gag aag agt acc aac ttg cat gac tac ggc atg ttg ctg
710

Thr Cys Ser Glu Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu
160 165 170

ccc tgc gga att gac aag ttc cga ggg gta gag ttt gtg tgt tgc cca
758

Pro Cys Gly Ile Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro
175 180 185

ctg gct gaa gaa agt gac aat gtg gat tct gct gat gcg gag gag gat
806

Leu Ala Glu Glu Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp
190 195 200

gac tcg gat gtc tgg tgg ggc gga gca gac aca gac tat gca gat ggg
854

Asp Ser Asp Val Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly
205 210 215 220

agt gaa gac aaa gta gta gaa gta gca gag gag gaa gaa gtg gct gag
902

Ser Glu Asp Lys Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu
225 230 235

gtg gaa gaa gaa gaa gcc gat gat gac gag gac gat gag gat ggt gat
950

Val Glu Glu Glu Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp
240 245 250

gag gta gag gaa gag gct gag gaa ccc tac gaa gaa gcc aca gag aqa
998

Glu Val Glu Glu Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg
255 260 265

acc acc agc att gcc acc acc acc acc acc acc acc aca gag tct gtg gaa
1046

Thr Thr Ser Ile Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu
270 275 280

gag gtg gtt cga gag gtg tgc tct gaa caa gcc gag acg ggg ccg tgc
1094

Glu Val Val Arg Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys
285 290 295 300

cga gca atg atc tcc cgc tgg tac ttt gat gtg act gaa ggg aag tgt
1142

Arg Ala Met Ile Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys
305 310 315

gcc cca ttc ttt tac ggc gga tgt ggc ggc aac cgg aac aac ttt gac
1190

Ala Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp
320 325 330

aca gaa gag tac tgc atg gcc gtg tgt ggc agc gcc atg tcc caa agt
1238

Thr Glu Glu Tyr Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser
335 340 345

tta ctc aag act acc cag gaa cct ctt gcc cga gat cct gtt aaa ctt
1286

Leu Leu Lys Thr Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu
350 355 360

cct aca aca gca gcc agt acc cct gat gcc gtt gac aag tat ctc gag
1334

Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu
365 370 375 380

aca cct ggg gat gag aat gaa cat gcc cat ttc cag aaa gcc aaa gag
1382

Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu
385 390 395

agg ctt gag gcc aag cac cga gag aga atg tcc cag gtc atg aga gaa
1430

Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu
400 405 410

* tgg gaa gag gcu gaa cgt caa gca aag aac ttg cct aaa gct gat aag
 1478
 Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys
 415 420 425

aag gca gtt atc cag cat ttc cag gag aaa gtg gaa tct ttg gaa cag
 1526
 Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln
 430 435 440

gaa gca gcc aac gag aga cag caq ctg gtg gag aca cac atg gcc aga
 1574
 Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg
 445 450 455 460

gtg gaa gcc atg ctc aat gac cgc cgc cgc ctg gcc ctg gag aac tac
 1622
 Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr
 465 470 475

atc acc gct ctg cag gct gtt cct cct cgg cct cgt cac gtg ttc aat
 1670
 • Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn
 480 485 490

atg cta aag aag tat gtc cgc gca gaa cag aag gac aga cag cac acc
 1718
 Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr
 495 500 505

cta aag cat ttc gag cat gtg cgc atg gtg gat ccc aag aaa gcc gct
 1766
 Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala
 510 515 520

cag atc cgg tcc cag gtt atg aca cac ctc cgt gtg att tat gag cgc
 1814
 Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg
 525 530 535 540

atg aat cag tct ctc tcc ctg ctc tac aac gtg cct gca gtg gcc gag
 1862
 Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu
 545 550 555

gag att cag gat gaa gtt gat gag ctg ctt cag aag gag caa aac tat
 1910
 Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr
 560 565 570

tca gat gac gtc ttg gcc aac atg att agt gaa cca agg atc agt tac
 1958
 Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr

575

580

585

gga aac gat gct ctc atg cca tct ttg acc gaa acg aaa acc acc gtg
2006

Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val
590 595 600

gag ctc ctt ccc gtg aat gga gag ttc agc ctg gac gat ctc cag ccg
2054

Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro
605 610 615 620

tgg cat tct ttt ggg gct gac tct gtg cca gcc aac aca gaa aac gaa
2102

Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu
625 630 635

gtt gag cct gtt gat gcc cgc cct gct gcc gac cga gga ctg acc act
2150

Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr
640 645 650

cga cca ggt tct ggg ttg aca aat atc aag acg gag gag atc tct gaa
2198

Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu
655 660 665

gtg aag atg gat gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt cat
2246

Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His
670 675 680

cat caa aaa ttg gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa ggt
2294

His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly
685 690 695 700

gca atc att gga ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg aca gtg atc
2342

Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile
705 710 715

gtc atc acc ttg gtg atg ctg aag aag aaa cag tac aca tcc att cat
2390

Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His
720 725 730

cat ggt gtg gtg gag gtt gac gcc gct gtc acc cca gag gag cgc cac
2438

His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His
735 740 745

ctg tcc aag atg cag cag aac ggc tac gaa aat cca acc tac aag ttc

00122

2486

Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe
 750 755 760

ttt gag cag atg cag aac tag aaccccgcca cagcagcctc tgaagttgga
 2537

Phe Glu Gln Met Gln Asn
 765 770

cagcacaacc attgcttcac taccatcgg tgtccattta tagaataatg tgggaagaaa
 2597

caaaccggtt ttatgattta ctcatattcg ctttttgaca gctgtgctgt aacacaagta
 2657

gatgcctgaa ctggaattaa tccacacatc agtaattgat tctatctctc ttacattttc
 2717

ggctctctata ctacattttt aatgggtttt gtgtactgta aagaattttag ctgtatcaaa
 2777

ctagtgcctg aatagattct ctcttgatta tttatcacat agccctttag ccagtctgtc
 2837

attattcttg tggtttgatga cccaattaa tcttacttta catatgcttt aagaatcgat
 2897

gggggatgct tcatgtgaac gtgggagttc agctgcttct ctgcctaaag tattectttc
 2957

ctgatcacta tgcattttta agtttaacat ttttaagtat ttcagatgct ttagagagat
 3017

tttttttcca tgactgcatt ttactgtaca gattgctgct tctgctatat ttgtgatata
 3077

ggaattaaga ggatacacac gtttggtttc tctgtcctgt tttatgtgca cacatttagc
 3137

attgagactt caagcttttc ttttttctgc cactatctt tgggtctttg ataaagaaaa
 3197

gaatccctgt tcatgttaag cactttttag gggcgggtgg ggaggggtgc tctgctggtc
 3257

ttcanttacc aagaattctc caaaacaatt ttctgcagga tgattgtaca gaatcattgc
 3317

ttatgacatg atcgctttct acactgtatt acatuaataa attuaataaa ataaacccgg
 3377

gcaagacttt tctttgaagg atgactacag acattaaata atcgaagtaa ttttgggtgg
 3437

ggagagagg cagattcaat tttcttcaac cagtctgaag ttccatttat gatacaaaag
3497

aagatgaaa tggaggtggc aatataaggg gatgaggaag gcctgcctgg acanaccctt
3557

ctttaagat gctcttcaa ttgtataaa atgggtgttt catgtaata aatacattct
3617

tggaggagca aaaaaaaaaa aaaa
3641

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligopéptido sintético

<400> 4

Tyr	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg
1				5					10	

Fig.1

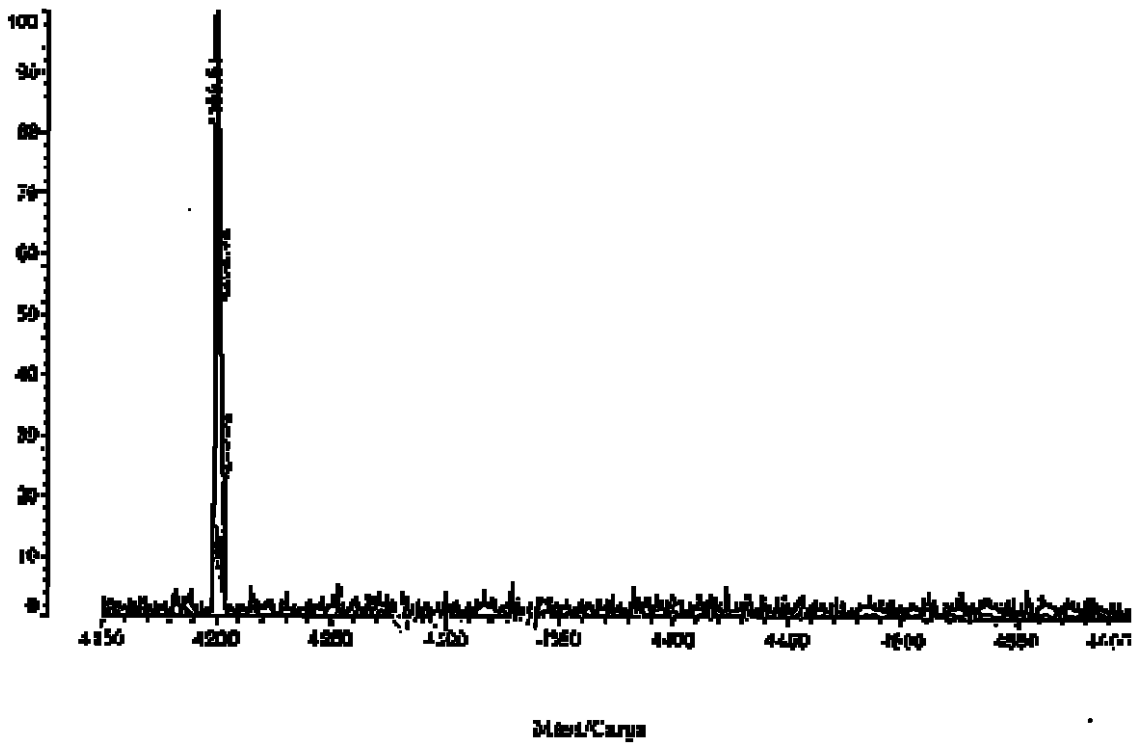


Fig.2

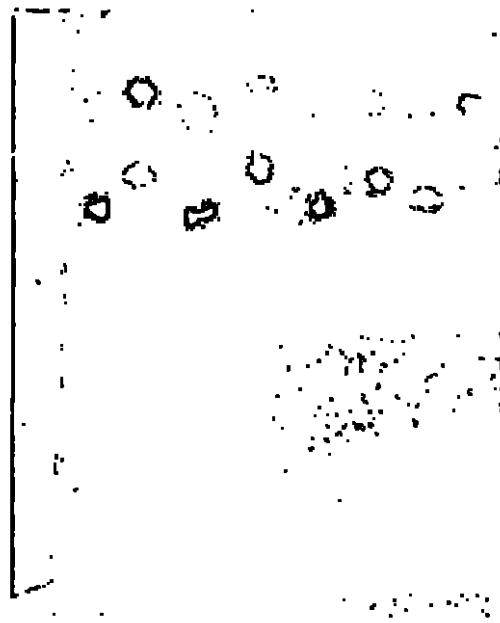


Fig.3



Fig.4

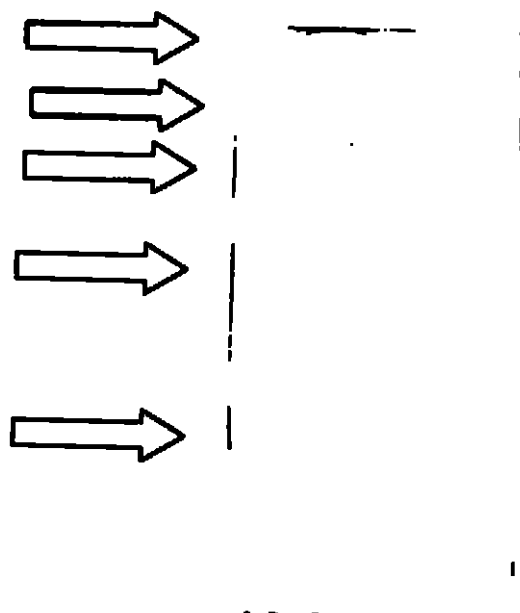
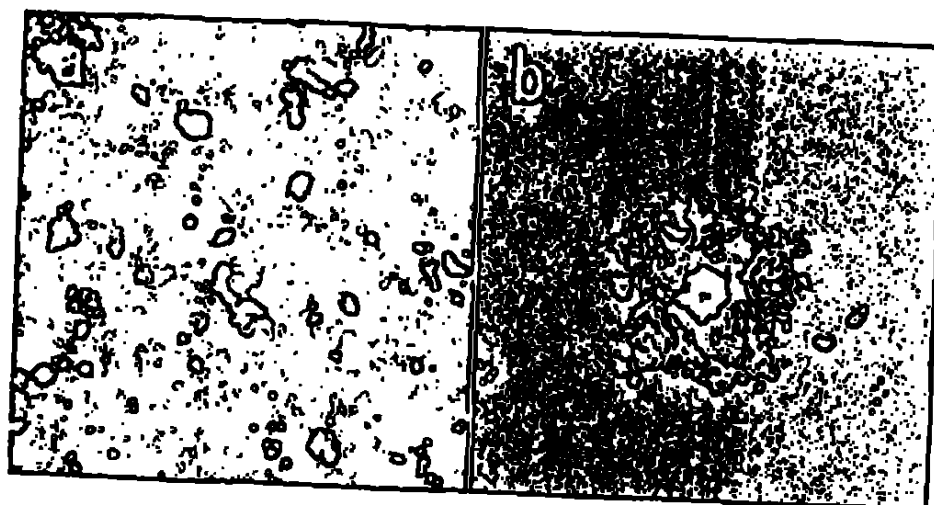


Fig.5



Fig.6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018896

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09 (2006.01), A01K67/027 (2006.01), A61K31/7088 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61K45/00 (2006.01), A61K48/00 (2006.01), A61P25/28 (2006.01), A61P43/00 (2006.01), C07K7/06 (2006.01),

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELD(S) SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09 (2006.01), A01K67/027 (2006.01), A61K31/7088 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61K45/00 (2006.01), A61K48/00 (2006.01), A61P25/28 (2006.01), A61P43/00 (2006.01), C07K7/06 (2006.01),

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 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), PubMed, JSTPlus (JOLIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-534351 A (New York University), 19 November, 2003 (18.11.03), Par. Nos. [0023] to [0026] & WO 2001/090182 A2	1-7, 10-16
X	US 2003/0166559 A1 (New York University), 04 September, 2003 (04.09.03), Par. Nos. [0061] to [0123] & WO 2003/045128 A2	1-7, 10-16
X	US 2004/0091945 A1 (Mindset Biopharmaceuticals, Inc.), 13 May, 2004 (13.05.04), Par. Nos. [0064] to [0069] & WO 2004/006881 A2	1-7, 10-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family member.

* 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 only 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 in priority date and not in conflict with the application but cited to understand the prior art 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

"Z" document in the art of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 November, 2005 (28.11.05)

Date of mailing of the international search report
06 December, 2005 (06.12.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018896

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

C07K7/08 (2006.01), C07K14/47 (2006.01), C07K16/18 (2006.01), A61K38/00 (2006.01), C12Q1/02 (2006.01), G01N33/15 (2006.01), G01N33/50 (2006.01), G01N33/68 (2006.01)

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

C07K7/08 (2006.01), C07K14/47 (2006.01), C07K16/18 (2006.01), A61K38/00 (2006.01), C12Q1/02 (2006.01), G01N33/15 (2006.01), G01N33/50 (2006.01), G01N33/68 (2006.01)

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018896

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. 8, 9

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

Claims 8 and 9 pertain to [diagnostic methods to be practiced on the human body] and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.

2. ☐ Claims Nos.:

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

3. ☐ Claims Nos.:

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

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional 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 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.

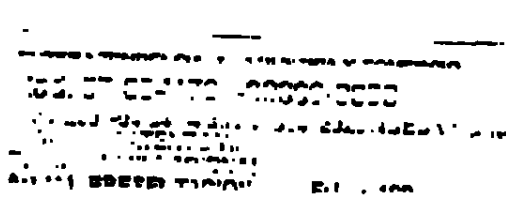
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT		00129
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A01K 67/027, A01K 31/008, A01K 35/00, A01K 36/003, A01K 45/00, A01K 46/00, A01P 25/28, A01P 43/00, C07K 14/47, C07K 18/18, C07K 7/06, C07K 7/08, C12N 15/09, C12N 5/10, C12Q 1/02, G01N 33/15, G01N 33/50 G01N 33/58		
22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) No. 2004-294292 (32) Fecha 06/10/04 (33) País JP		(71) Solicitante(s) MORI HIROSHI (72) Inventor(es) MORI, Hiroshi Otros (74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ		
(85) Fecha inicio fase nacional: 06/05/07 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 06/10/05 No. de solicitud PCT/JP2005/018898		(87) Publicación Internacional Fecha: 13/04/06 N° publicación: WO2006/038728		
(54) Título: PROTEÍNA VARIANTE AMILOIDE				

Reivindicación(es):

1. Una proteína variante amiloide humana, que, en la SEQ ID NO. 2, consiste en la secuencia de aminoácido de:

- (1) 39 aminoácidos con la supresión de Glu en 618 en la secuencia de 597 a 636;
- (2) 41 aminoácidos con la supresión de Glu en 618 en la secuencia de 597 a 636;
- (3) 42 aminoácidos con la supresión de Glu en la posición 618 en la secuencia de 597 a 636;
- (4) 39 aminoácidos con la supresión de Ala en 617 en la secuencia de 597 a 636;
- (5) 41 aminoácidos con la supresión de Ala en 617 en la secuencia de 597 a 636;
- (6) 42 aminoácidos con la supresión de Ala en 617 en la secuencia de 597 a 636;
- (7) 39 aminoácidos con la supresión de Asp en 619 en la secuencia de 597 a 636;
- (8) 41 aminoácidos con la supresión de Asp en 619 en la secuencia de 597 a 636; o
- (9) 42 aminoácidos con la supresión de Asp en 619 en la secuencia de 597 a 636.

Relino Folios 131 y 132
"Tajetes"



**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒ **MODELO DE UTILIDAD** ☐

♦ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
♦ Descripción de la invención ☒
♦ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐ **INCOMPLETA** ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

♦ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
♦ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐ **INCOMPLETA** ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

♦ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
♦ Representación gráfica del esquema trazado ☐
♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐ **INCOMPLETA** ☐

Andrés M. Nava
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

132

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO

REFERENCIA	Radicación No.	7 34178
	Solicitud internacional	PCT/JP2005/018896
	Fecha inicio fase nacional	06/05/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	000 8889

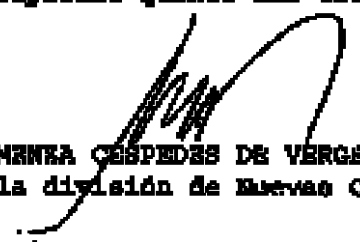
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Daica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 27 JUL 2007
adpall