(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4547373号
(P4547373)

(45)発行日　平成22年9月22日(2010.9.22)　(24)登録日　平成22年7月9日(2010.7.9)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	ZNAZ
A61P 25/28	(2006.01)	A61P	25/28	
C07K 7/00	(2006.01)	C07K	7/00	
C07K 1/22	(2006.01)	C07K	1/22	
C07K 7/04	(2006.01)	C07K	7/04	

請求項の数 9　(全 17 頁)

(21)出願番号	特願2006-500553 (P2006-500553)
(86)(22)出願日	平成16年1月13日 (2004.1.13)
(65)公表番号	特表2006-515876 (P2006-515876A)
(43)公表日	平成18年6月8日 (2006.6.8)
(86)国際出願番号	PCT/EP2004/000162
(87)国際公開番号	WO2004/062556
(87)国際公開日	平成16年7月29日 (2004.7.29)
審査請求日	平成18年8月3日 (2006.8.3)
(31)優先権主張番号	A36/2003
(32)優先日	平成15年1月14日 (2003.1.14)
(33)優先権主張国	オーストリア(AT)
(31)優先権主張番号	A1464/2003
(32)優先日	平成15年9月17日 (2003.9.17)
(33)優先権主張国	オーストリア(AT)

(73)特許権者　506083604
アフィリス・アクチェンゲゼルシャフト
ＡＦＦＩＲＩＳ　ＡＧ
オーストリア、アー－１０３０ヴィエンナ、カール－ファルカス－ガッセ２２番
(74)代理人　100068526
弁理士　田村　恭生
(74)代理人　100100158
弁理士　鮫島　睦
(74)代理人　100138900
弁理士　新田　昌宏
(74)代理人　100076521
弁理士　坪井　有四郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アルツハイマー病の予防および治療方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ＤＫＥＬＲＩ、ＤＷＥＬＲＩ、ＹＡＥＦＲＧ、ＥＡＥＦＲＧ、ＤＹＥＦＲＧ、ＤＲＥＬＲＩ、ＤＫＥＬＲ、ＥＹＥＦＲＧ、ＤＷＥＦＲＤＡおよびＳＷＥＦＲＴから選択されるアミノ酸配列を含む、５から１５アミノ酸残基よりなるペプチド化合物のアルツハイマー病（ＡＤ）に対するワクチン作製のための使用。

【請求項２】

当該ペプチド化合物が、ＤＫＥＬＲＩ、ＤＷＥＬＲＩ、ＹＡＥＦＲＧ、ＥＡＥＦＲＧ、ＤＹＥＦＲＧ、ＤＲＥＬＲＩ、ＤＫＥＬＲ、ＥＹＥＦＲＧ、ＤＷＥＦＲＤＡおよびＳＷＥＦＲＴから選択されるペプチドである、請求項１に記載の使用。

【請求項３】

当該ペプチド化合物が６から１２アミノ酸残基よりなる、請求項１に記載の使用。

【請求項４】

該ペプチド化合物が薬学的に許容される担体、および任意で水酸化アルミニウムと縮合していることを特徴とする、請求項１～３のいずれかに記載の使用。

【請求項５】

薬学的に許容される担体がＫＬＨである、請求項４に記載の使用。

【請求項６】

該ペプチド化合物を０．１ｎｇから１０ｍｇ含むことを特徴とする、請求項１～５のいずれかに記載の使用。

【請求項７】
該ペプチド化合物を１０ｎｇから１ｍｇ含むことを特徴とする、請求項１～５のいずれかに記載の使用。
【請求項８】
該ペプチド化合物を１００ｎｇから１００μｇを含むことを特徴とする、請求項１～５のいずれかに記載の使用。
【請求項９】
ＤＫＥＬＲＩ、ＤＷＥＬＲＩ、ＹＡＥＦＲＧ、ＥＡＥＦＲＧ、ＤＹＥＦＲＧ、ＤＲＥＬＲＩ、ＤＫＥＬＲ、ＥＹＥＦＲＧ、ＤＷＥＦＲＤＡおよびＳＷＥＦＲＴから選択される少なくとも一つのペプチドを含む抗原を含む、アルツハイマー病に対するワクチン。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、アルツハイマー病の予防および治療方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
アミロイドβペプチド（Ａβ）はアルツハイマー病（ＡＤ）の神経病理学上中心的な役割を担っている〔Roher 等、1993年、「β-アミロイド(1-42)は、脳血管アミロイド沈着物の主たる成分；アルツハイマー病の病変への影響」PNAS.,90:10836〕。この病気の家族型はアミロイド前駆体タンパク（ＡＰＰ）およびプレセニリン遺伝子における突然変異と関連している。これら遺伝子における病気関連突然変異は、該ペプチド（Aβ42）の42アミノ酸型の産生を増大させるが、これはアルツハイマー病のアミロイド斑中で見られる主たる形態である。この病気の動物モデルは市販品から入手できる。ＰＤＡＰＰ遺伝子組み換えマウスでは突然変異したヒトのＡＰＰ（717位のアミノ酸がＶに代わってＦである）が過剰発現されており、アルツハイマー病における神経病理学上の顕著な特徴が年齢および脳に依存しつつ次第に発達してくる〔Games等 1995:「Ｖ７１７ＦβアミロイドAβ前駆体タンパクを過剰発現した遺伝子組み換えマウスにおけるアルツハイマー型神経病理学」Nature,373:523〕。
【０００３】
ミモトープに依存しない通常のワクチンを用いたワクチン接種の研究がすでになされている。AD型神経病変の発現（６週）前または高齢化の時点（１１ヶ月）において遺伝子組み換え動物を凝集Ａβ42で免役した：若い動物の免疫化は斑の形成、神経突起のジストロフィー、星状神経膠症の発達を抑制した。高齢化動物の治療は明らかにAD様神経病変を減少させた。この実験的なワクチン化の研究は血液脳関門を通過してアミロイド斑を攻撃可能なＡβ42抗体の発展を導いた〔Schenk等 1999:「βアミロイドによる免疫化はPD-APPマウスにおけるアルツハイマー様病変を減少させる。」Nature 400: 173〕。続いて、該アミロイド斑はＦｃ受容体が関与する食作用を含むいくつかのメカニズムにより除去される〔Bard等、2000:「末梢的に投与されたアミロイドβペプチドに対する抗体は中枢神経系に入ってアルツハイマー病モデルマウスの病変を減少させる」Nature Med, 6: 916〕。このワクチンはまた記憶不足の進行を妨げる〔Janus 等 2000:「Ａβペプチド免疫化はアルツハイマー病モデルにおいて行動上の障害およびアミロイド斑を減少させる」Nature 408:979〕。
【０００４】
ＡＤに対する非常に有望な免疫療法が1999年遅くから臨床治験されている。正しいメカニズムはより詳細に特徴づけられる必要があるが、免疫化によって免疫系の引き金が引かれ、該免疫系がアミロイド斑を攻撃しこれらの沈着物を感染したヒト脳より一掃するものと推測される。
【０００５】
これら臨床治験は製薬会社Elanとそのパートナーであるamerican Home Productsにより実施された〔治療用ワクチンAN-1792、アジュバントはQS21〕。第一相試験は2000年成功

裡に終了した。軽度から中程度のAD患者被治験者において効果を試験するため、第二相試験が2001年末より開始された。

【０００６】

しかしこの第二相試験は幾人かの患者で神経性炎症が見られたため永久的に中止されている〔論説2002「未解決問題？」Nature Med 8: 191〕。その徴候には無菌性髄膜脳炎が含まれ、全世界での治験は直ちに中止となった。最悪の場合は、感染した患者は多くの免疫療法に内在する危険である、自己免疫応答の開始を示す。自己免疫の混乱はＡＰＰの偏在性を与えると予想され、これはタンパク分解性生物と共通して抗原決定基を当然に有する。最近、凝集Ａβ42免疫化誘導抗体（ヒトおよびマウス）についての研究が集中的になされ、多くの抗体がＡβ42の４位-10位のアミノ酸（Ａβ4-10）の小さな領域を認識していることが明らかになった。マウス抗体はＡβ原線維生成を阻止し、先在するＡβ線維を分解することができた〔McLaurin等 2002:「アミロイド-βペプチドに対する治療上有効な抗体は、アミロイド-β残基4-10を標的とし、細胞毒性と原線維生成を阻害する」Nature Med 8: 1263〕。注目すべきことに、ヒト抗体は細胞表面に露出したＡＰＰとは反応せず、また他のいずれの非凝集体（該前駆体の分解生成物）とも反応しない〔Hock等 2002:「アルツハイマー患者のワクチン化によるβアミロイド特異的抗体の生成」 Nature Med 8: 1270〕。ヒトおよびマウス血清の間には明らかな血清が観察される；ヒト抗体とは対照的にマウス抗体は単量体、オリゴマーおよび線維化Ａβを検出できる。これは非常に重要であって、治療効力のための必須要件と考えられ、ヒト抗Ａβでは認識できない小さなＡβオリゴマーがこの疾患における主たる毒性発現体であるとの証拠が蓄積されている〔Walsh等 2002:「自然に分泌されるアミロイドβタンパクのオリゴマーはin vivoで海馬における長期増強現象（ＬＴＰ）を強力に阻害する」Nature 416: 535〕。こうして、β-アミロイドアミノ酸4-10（Ａβ42凝集体に代わり）を含むワクチンによる免疫化が可能性のある新しい戦略となった。効力が未知にもかかわらず、患者は（リニアーＢ細胞）「自己」エピトープで直接的に免疫されるので、この戦略はまた自己免疫の問題に直面するかもしれない、

【０００７】

最近のＡＤワクチン化戦略のこれら失望的な発展にもかかわらず、Ａβワクチンは依然としてＡＤとの戦いにおいて最も有望な方法と見なされている。しかし、ＡＤワクチン化には改良と新しい戦略が急ぎ必要である。特に自己反応性Ｔ細胞／Ｂ細胞を誘導しないようなワクチンが必要である。

【０００８】

そこで、本発明は次のアミノ酸配列を含む化合物

【化１】

$$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$$

（式中、X_1はアミノ酸であって、Ｃではなく、
X_2はアミノ酸であって、Ｃではなく、
X_3はアミノ酸であって、Ｃではなく、
X_4はアミノ酸であって、Ｃではなく、
X_5はアミノ酸であって、Ｃではなく、
X_6はアミノ酸であって、Ｃではなく、
また、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$はＤＡＥＦＲＨではない。）
の、アルツハイマー病（ＡＤ）ワクチン製造のための使用を提供する。ここで、該化合物は天然のＡβＮ末端配列ＤＡＥＦＲＨに特異的な抗体と結合する能力があり、さらにその五量体は天然のＡβＮ末端配列ＤＡＥＦＲＨに特異的な抗体と結合する能力がある。

【０００９】

本発明に従えば、Ａβ42ミモトープがＡＤに対するワクチン化に使用される；該ミモトープはＡβ42に対する抗体を誘導するが、天然のＡＰＰに対しては誘導しない。このミモ

トープは（モノクローナル）抗体および（市販品として入手可能な）ペプチドライブラリーにより同定される〔例えば、Reineke 等 2002:「無作為に生成させた配列5520のペプチド配列からの特徴的な抗体エピトープおよびミモトープの同定」 J Immunol Methods 267: 37〕。ＡＰＰは認識しないがアミノ末端Aspが異なるＡβ種のみを検出する（モノクローナル）抗体が使用される〔そのような抗体の例を記載；Johnson-Wood 等 1997: 「アルツハイマー病の遺伝子組み換えマウスモデルにおけるアミロイド前駆体タンパクのプロセシングとＡβ沈着」 PNAS 94: 1550〕。そのような抗体はワクチンに適したミモトープを同定するための理想的な道具であることが本発明の過程で示された。このようなモノクローナル抗体はＡＤマウスモデルにおいて直接投与した場合有益な効果があることが示された〔Bard 等 2000:「末梢投与されたアミロイドβペプチド抗体が中枢神経系に入ってアルツハイマー病マウスモデルの病変を減少させる」 Nature Med 6: 916〕が、ＡＤワクチン化合物単離のためのミモトープ探索道具としての使用がこれら抗体について提案されたことはない。

【００１０】

先行技術においては、あらゆる努力は天然に存在するＡβペプチドに集中的に注がれた。既に述べたが、Ａβペプチドワクチンの臨床治験は神経性炎症のために中止された。実際、Ｔ細胞エピトープ予測プログラム（クラスI制限エピトープにはBIMAS、クラスII制限エピトープにはTEPTITOPE）が配列内に高スコアーの「自己」エピトープを提案している。神経性炎症の現象が該ワクチンの一般的な適用を不適にする自己免疫反応のためであることを意味する。

【００１１】

先行技術で提案されたそのようなＡβワクチンとは対照的に、本発明のミモトープを含むワクチンで治療する間そのような自己免疫反応は生じないと理解される。何故なら、本発明に従ってミモトープ同定に使用されるモノクローナル抗体はＡＰＰを認識せず、該ミモトープ配列はＡβ42由来の自己配列であってこれまでの治験で使用されまたは将来の治験で使用されるものとは異なるからである。

【００１２】

本発明に従ってミモトープ同定に使用される抗体はＡβ由来のアミノ酸配列であってアミノ末端がフリーのアスパラギン酸であるＤＡＥＦＲＨ（オリジナルのエピトープ）を検出するが、天然のＡＰＰは認識しない。該抗体はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはそのいずれの抗体の一部若しくは誘導体であってもよく、唯一の必要条件はその抗体分子がＤＡＥＦＲＨエピトープを特異的に認識すること、即ち、アミロイド前駆体タンパクの天然のアミノ末端延長型とは結合しないことである。このことは、ＤＡＥＦＲＨエピトープの結合能力がＡＰＰ分子に比して少なくとも１００倍、好ましくは少なくとも１０００倍、更に好ましくは少なくとも10^5倍高いことを示している。該抗体は、ＤＡＥＦＲＨ配列に対する結合能力がJohnson-Wood 等、1997に記載された抗体と同等またはそれ以上に高い抗体である。当然ながら、より高い結合容量が好ましいけれども、低い結合容量を有する抗体もまた使用され得る（Johnson-Wood 等の抗体の結合容量の10%以上、50%以上または80%以上）。

【００１３】

本発明に従う化合物はＤＡＥＦＲＨ配列と同程度の特異性でこれら抗体と結合する。

好ましくは、本発明に従って使用される化合物はペプチドを包含しまたはペプチドより構成され、ここで

X_1はＧまたは水酸基を有する若しくは負電荷を負ったアミノ酸であって、好ましくはＥ、Ｙ、Ｓ、またはＤであり；

X_2は疎水性のアミノ酸または正電荷を負ったアミノ酸であって、好ましくはＩ、Ｌ、Ｖ、Ｋ、Ｗ、Ｒ、Ｙ、Ｆ、またはＡであり；

X_3は負電荷を負ったアミノ酸であって、好ましくはＤまたはＥであり；

X_4は芳香族アミノ酸またはＬであって、好ましくはＹ、Ｆ、またはＬであり；

X_5はＨ、Ｋ、Ｙ、Ｆ、またはＲであって、好ましくはＨ、Ｆ、またはＲであり；

X_6はＳ、Ｔ、Ｎ、Ｑ、Ｄ、Ｅ、Ｒ、Ｉ、Ｋ、Ｙ、またはＧであって、好ましくはＴ、Ｎ、Ｄ、Ｒ、Ｉ、またはＧであり；

【００１４】

特にＥＩＤＹＨＲ、ＥＬＤＹＨＲ、ＥＶＤＹＨＲ、ＤＩＤＹＨＲ、ＤＬＤＹＨＲ、ＤＶＤＹＨＲ、ＤＩＤＹＲＲ、ＤＬＤＹＲＲ、ＤＶＤＹＲＲ、ＤＫＥＬＲＩ、ＤＷＥＬＲＩ、ＹＲＥＦＲＩ、ＹＡＥＦＲＧ、ＥＡＥＦＲＧ、ＤＹＥＦＲＧ、ＥＬＥＦＲＧ、ＤＲＥＬＲＩ、ＤＫＥＬＫＩ、ＤＲＥＬＫＩ、ＧＲＥＦＲＮ、ＥＹＥＦＲＧ、ＤＷＥＦＲＤＡ、ＳＷＥＦＲＴ、ＤＫＥＬＲ、またはＳＦＥＦＲＧである。

【００１５】

本発明の化合物（ミモトープ）は好ましい長さがあり、５から１５アミノ酸である。この化合物はワクチンとしてまたは単離型（ペプチド）として提供され、或いは他の分子、例えば薬学上の担体分子またはポリペプチド、脂質、若しくは炭水化物構造と結合若しくは複合体形成することもできる。好ましくは、本発明の化合物は、５から１５アミノ酸、６から１２アミノ酸、特に９から１１アミノ酸の（最小の）ペプチド鎖を有する。しかしながら、このミモトープは非特異的なリンカーまたは担体、特にペプチドリンカーまたはタンパク質担体と結合（共有または非共有結合）させることができる。更には、そのペプチドリンカーまたはタンパク質担体は、ヘルパーＴ細胞エピトープから構成されまたはこれを包含してもよい。

【００１６】

好ましくは、薬学的に許容される担体はＫＬＨ、破傷風トキソイド、アルブミン結合タンパク、ウシ血清アルブミン、デンドリマー（ＭＡＰ；Biol.Chem.358, 581）の他、Singh等、Nat. Biotech. 17(1999),1075-1081（特に同文献表１に記載のもの）や、O'Hagan等、Nature Reviews, Drug Discovery 2(9),(2003),727-735（特に、ここで記載された本質的な免疫活性化合物および輸送系）に記載のアジュバント物質またはその混合物である。加えて、ワクチン組成物は水酸化アルミニウムを含んでもよい。

【００１７】

本発明化合物（ミモトープ）および薬学的に許容される担体を含むワクチンは例えばi.v.、i.p.、i.m.、経鼻、経口、経皮等いずれの投与経路によっても投与され、いずれの適切な投与手段（O'Hagan 等、Nature Reviews, Drug Discovery 2(9),(2003),727-735）を用いてもよい。一般的には、ワクチンには本発明化合物が0.1ngから10mg、好ましくは10ngから1mg、特別には100ngから100μgが含まれ、或いは、例えば100fmoleから10μmole、好ましくは10pmoleから1μmole、特別には100pmoleから100nmoleが含まれる。該ワクチンはまた通常の補助的物質、例えば緩衝剤、安定化剤等を含んでもよい。

【００１８】

別の観点によれば、本発明は更に天然のＮ端Ａβ42配列ＤＡＥＦＲＨに特異的な抗体と結合する化合物を単離する方法に関するものであり、該方法は下記のアミノ酸配列

【化２】

$$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$$

（ここでX_1はアミノ酸であって、Ｃではなく、
X_2はアミノ酸であって、Ｃではなく、
X_3はアミノ酸であって、Ｃではなく、
X_4はアミノ酸であって、Ｃではなく、
X_5はアミノ酸であって、Ｃではなく、
X_6はアミノ酸であって、Ｃではなく、
また、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$はＤＡＥＦＲＨではない。）
を含むペプチドを包含するペプチド化合物ライブラリーを提供し、さらに、該方法は当該ペプチドライブラリーを該抗体と接触させ、該抗体と結合するそのペプチドライブラリー構成物を単離する工程を含む。

【００１９】
この観点の特別な態様によると、本発明は天然のＮ端Ａβ42配列ＤＡＥＦＲＨに特異的な抗体と結合する化合物を単離する方法に関するものであり、該方法は下記のアミノ酸配列
【化３】

$$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$$

（ここでX_1はアミノ酸であって、ＫまたはＣではなく、
X_2は天然アミノ酸であって、Ｃではなく、
X_3は天然アミノ酸であって、ＫまたはＣではなく、
X_4は天然アミノ酸であって、ＫまたはＣではなく、
X_5は天然アミノ酸であって、Ｃではなく、
X_6は天然アミノ酸であって、ＰまたはＣではなく、
また、$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$はＤＡＥＦＲＨではない。）
を含むペプチドを包含するペプチド化合物ライブラリーを提供し、さらに、該方法は当該ペプチドライブラリーを該抗体と接触させ、該抗体と結合するそのペプチドライブラリー構成物を単離する工程を含む。
【００２０】
本発明に従って適切な５量体を単離するためには、上記の方法において五アミノ酸変化体ライブラリーを適用し、好ましくはここで記載するX_1からX_5のアミノ酸変化体を有するライブラリーをスクリーニングするか、または６量体ライブラリー（上記参照）中でスクリーニングされた陽性の構成物中から適切な５量体を同定することにより達成される。同様にして、７量体、８量体、９量体、１０量体、・・・の各ライブラリーもまた目下の抗体タイプに結合する適切な配列をスクリーニングするのに適用される。そのような長い配列の適切な抗体結合フラグメントは、例えば５、６、７、８、９、・・・アミノ酸残渣の長さのこれらフラグメントと目下の抗体との結合を試験することによって見出し得る。
【００２１】
そのような方法が、本発明に従ってＡβミモトープを成功裏に提供できることが証明された。
好ましくは、該ペプチドは該ライブラリー中個別の形態で、例えばＭＵＬＴＩＰＩＮ（商標）ペプチド化学で可能なように、特に固体表面上に固定化して提供される。該ライブラリーはまたペプチド混合物としても提供され、抗体：ペプチド複合体が抗体結合の後に単離される。或いは、抗体を固定化してからペプチドライブラリーを（懸濁液または溶液で）その固体化抗体と接触させてもよい。
また好ましくは、スクリーニング抗体（またはペプチドライブラリー構成物）に適当なマーカーを含ませ、ライブラリーのペプチドと結合した抗体若しくは抗体：ペプチド複合体の単離若しくは検出を可能とする。適当なマーカー系（ビオチン化、蛍光、放射線活性、磁気マーカー、発色マーカー、二次抗体）は当業者により容易に利用できる。
【００２２】
該ライブラリーは天然に存在するＡβ配列（例えば、ＤＡＥＦＲＨ）を除くように構成しなければならない。このような配列のワクチン化は明らかに本発明より除外される。
本発明に従ってエピトープを単離するためのさらに適切な技術はファージ-ペプチドライブラリーのスクリーニングであり例えばＷＯ０３／０２０７５０に記載がある。
【００２３】
本発明はまた個々で定義される抗Ｎ端Ａβ42抗体結合ペプチド〔または、ある好ましい場合にはそのようなペプチド（例えば、担体若しくは運搬分子と結合したペプチド）を包含する大きな分子〕を含む組成物に関する（任意で、単一有効成分として）。そして、好ましくはアルツハイマー病に対するワクチンであって抗原、特にＥＩＤＹＨＲ、ＥＬＤＹ

ＨＲ、ＥＶＤＹＨＲ、ＤＩＤＹＨＲ、ＤＬＤＹＨＲ、ＤＶＤＹＨＲ、ＤＩＤＹＲＲ、ＤＬＤＹＲＲ、ＤＶＤＹＲＲ、ＤＫＥＬＲＩ、ＤＷＥＬＲＩ、ＹＲＥＦＲＩ、ＹＡＥＦＲＧ、ＥＡＥＦＲＧ、ＤＹＥＦＲＧ、ＥＬＥＦＲＧ、ＤＲＥＬＲＩ、ＤＫＥＬＫＩ、ＤＲＥＬＫＩ、ＧＲＥＦＲＮ、ＥＹＥＦＲＧ、ＤＷＥＦＲＤＡ、ＳＷＥＦＲＴ、ＤＫＥＬＲおよびＳＦＥＦＲＧよりなる群から選択される少なくとも一つのペプチドを含む抗原を含んでなるワクチンに関する。

【００２４】

本発明で提供される他のペプチドの他に、これらのペプチドは、薬学的組成物、特にＡＤワクチンの調製に用いるのに特に適している。これらの配列は純粋に人工的なＡβミモトープである。該ペプチドはワクチン化の目的で適切な担体と結合（共有結合でまたは非共有結合で）させることができ、ペプチド化合物として若しくは他の化合物、部分、例えば、アジュバント、ペプチド若しくはタンパク質担体等との複合体として提供することができて、適切な方法により投与することができる〔例えば、O'Hagan 等、Nature Reviews, Drug Discovery 2(9),(2003),727-735に記載〕。

本発明を以下の実施例および図によって更に説明するが、当然ながらこれらに限定されるものではない。

【実施例】

【００２５】

１．Ｎ末端がフリーのＡβ42由来ペプチド（Ｎ末端がフリーのアスパラギン酸）を検出するためのモノクローナル抗体（ｍＡｂ）の創出

６量体ペプチドＤＡＥＦＲＨ（天然のＮ端Ａβ42配列）をウシ血清アルブミンＢＳＡ（ハプテン担体効果を利用）と結合させ、ＣＦＡ（初回の注射）およびＩＦＡ（ブースター注射）中に乳化してマウスをワクチン化する。ＤＡＥＦＲＨペプチド特異的、抗体産生ハイブリドーマをＥＬＩＳＡ（ＤＡＥＦＲＨペプチド被膜化ＥＬＩＳＡプレート）で検出する。ペプチドＳＥＶＫＭＤＡＥＦＲＨ（天然Ｎ端延長配列、ＡＰＰ由来、Ａβ42由来配列ＤＡＥＦＲＨを含む）を陰性対照ペプチドとして使用する。Ｎ端にフリーのアスパラギン酸を有するＡβ42由来ペプチドと、フリーのアスパラギン酸を持たないＡＰＰ由来ペプチドを区別しないので、延長したペプチドＤＡＥＦＲＨを認識するハイブリドーマは除外する。

【００２６】

２．ペプチドライブラリーの構築

Reinke 等、2000の方法を適用し、Ｎ端にフリーのアスパラギン酸を有しＡβ種に特異的な抗体（好ましくはモノクローナル抗体）に結合するペプチドライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のミモトープを見出した。他の方法は市販品として入手できるMULTIPIN（商標）ペプチド技術である。

MULTIPIN（商標）ペプチド技術は、特別に調製されたポチエチレンのピン上におけるペプチド合成を含む。当該ピンはブロック上に装着されフォーマットは多くの生物学的試験で使用される標準的な８ｘ１２のミクロチタープレートと互換性がある。ピン結合ペプチド（共有結合によりそのピンに結合したままの非切断ペプチド）および液相ペプチド（ピン表面から切断されたもの）の両ペプチドがこの方法で製造できる。マルチピン合成系に基づくと、ペプセットは多くのペプチドのスクリーニングと同時合成を可能にする。

【００２７】

ペプセットは、個別に合成された９６のペプチドのブロックより構成され、その内の二つは注意して選ばれた対照の配列である。切断された対照は逆層ＨＰＬＣにより純度を評価され、ペプチドの中身はアミノ酸分析により定量される。陽性および陰性の非切断対照は標準的なＥＬＩＳＡ技術により評価される。

ペプセットペプチドは種々の化学修飾されたものが利用可能であり、アセチル化、ビオチン化、ホスホリル化、環状化等されたものを含む。液層（切断）のペプチドは凍結乾燥粉末として市場に出される。

【００２８】

液層におけるペプチドの生産については、Ｃ末端の終了の選択があり、意図されたペプチドの用途に依存して、酸またはアミドが含まれる。切断可能な結合が、事前に調製されたＣ末端アミノ酸のエステル誘導体として、またはアミドリンカーの「ＲＩＮＫ」上においてピン表面上に導入される。ピン結合ペプチドを強酸で処理すると、酸若しくはアミド末端基を有するペプチドが遊離する。合成スケールの選択肢としては、名目上１μmoleから５μmoleである。疎水性や切断効率のような因子がペプチド回収率に影響し、予想されるペプチドの収率は名目上１μmoleスケールでペプチドを合成した場合、０．５から１μmole（15量体の場合およそ１mg）であり、名目上５μmoleスケールでペプチドを合成した場合は2.5から５μmoleである。

【００２９】

非切断ペプチドはピンに共有結合で結合したままであり、ＥＬＩＳＡ技術を利用して興味あるペプチドの迅速なスクリーニングに使用できる。そのようなペプチドは抗体エピトープの選別や構造活性相関の研究に有用である。結合した抗体や他の蛋白質を除去するとペプチドを再生することができ更なる試験に再度利用することができる。ペプセットは種々の適用に利用することができ、蛋白質配列の走査から生物学的興味のあるペプチド先端の同定、ペプチド先端の最適化、および新しい世代の同族体の発展等が含まれる。スクリーニング工程での全体的な戦略の観点からすると、種々の合成デザインの使用は柔軟性を大きく向上させ、先導的候補物を完全に特徴づける系統的方法を提供する。

【００３０】

系統的なペプチドのセットから得られる包括的な結果は、興味対象のペプチドを同定するのみならず、決定的な残基、置換可能性、および最適のペプチド長を示す。その結果として、関連するペプチドの範囲はそのような発見の結果として位置づけられる。Ｌ-アミノ酸をＤ-アミノ酸若しくは他の特殊アミノ酸で置換することはペプチドの構造と立体構造を操る強力な手法である。この方法はまた異なる薬理学的活性を有する同族体、例えば、拮抗剤や安定性の増大したペプチドを発見する素早い方法でもある。

【００３１】

公知のタンパク質配列から出発して、マルチピン手法を用いるとすべての系列的抗体エピトープをマップ化できる。系列的Ｂ細胞エピトープのマップ化について、現在これに代わるいくつかの方法が可能である。ピン結合ペプチド、ミクロチタープレート上にコートされた液相ペプチド、および事前にアビジン若しくはストレプトアビジンでコートされミクロチタープレート上に捕捉されたビオチン化ペプチドがこれに含まれる。

本実施例では、実施例１に記載の抗体はペプチドライブラリーのスクリーニングに使用される。しかし、いずれの抗体もＤＡＥＦＲＨ配列を認識するが、Ａβ分子の天然Ｎ末端延長配列（例えば、ＭＤＡＥＦＲＨ、ＫＭＤＡＥＦＲＨ、ＳＥＶＫＭＤＡＥＦＲＨまたは完全なアミロイド（前駆体）タンパク、ＡＰＰ）は認識せず、Johnson-Wood 等、1997に記載のとおりである。

【００３２】

この目的のため、４つのライブラリーを構築した。

２．１：ライブラリー１

この６量体ライブラリーは以下の配列のペプチドを含む（アミノ酸１位－６位）：

１位：Ｄ、ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１７の可能性）
２位：Ａ、ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１７の可能性）
３位：Ｅ、ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１７の可能性）
４位：Ｆ、ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１７の可能性）
５位：Ｒ、ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１７の可能性）
６位：Ｈ、Ｋ、ＣおよびＰを除くすべての天然アミノ酸（１６の可能性）

【００３３】

ライブラリー１はヘキサペプチドの混合物である。理論的には、１７の異なるアミノ酸（下記参照）を含むすべての可能なペプチドが包含される。該混合物はリシンおよびシステイン残基は含まない。さらに該混合物は以下のものを含まない；

１位が特異的にアスパラギン酸、
２位が特異的にアラニン、
３位が特異的にグルタミン酸、
４位が特異的にフェニルアラニン、
５位が特異的にアルギニン、かつ
６位が特異的にヒスチジンのペプチド

【００３４】

合成は、FastMocプロトコールに従ってアプライドバイオシステムズ（Applied Biosystems）431A-シンセサイザーにより、0.25mmoleの合成スケールにて実施される。

合成はすべての所望のアミノ酸（アミノ基および側鎖は保護済）１mmoleを秤量することから始まる。その後、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｇｌｙ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｒｏ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、およびＶａｌの混合物が作製された。それぞれの位置に特異的に、以下のアミノ酸が添加される；

１位（混合物１）：Ａｌａ、Ｇｌｕ、Ｐｈｅ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ
２位（混合物２）：Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｐｈｅ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ
３位（混合物３）：Ａｓｐ、Ａｌａ、Ｐｈｅ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ
４位（混合物４）：Ａｓｐ、Ａｌａ、Ｇｌｕ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ
５位（混合物５）：Ａｓｐ、Ａｌａ、Ｇｌｕ、Ｐｈｅ、Ｈｉｓ
６位（混合物６）：Ａｓｐ、Ａｌａ、Ｇｌｕ、Ｐｈｅ、Ａｒｇ（Ｐｒｏなし）

【００３５】

混合物６を用いて樹脂（2-クロロ-トリチルクロリド樹脂、1.49 mmole/g、Alexis Germany）を装着した。

アミノ酸残基混合物６	1 mmole
樹脂（反応基0.91mmole）	611 mmole
ジクロロメタン	15 ml
ジイソプロピルエチルアミン	5.5当量=5 mmole（871μl）

【００３６】

混合物をフラスコ中で1時間振盪する。その後、メタノール1mlを加えて更に10分間浸透する。グラスフィルターで反応樹脂を取り出して、ジメチルホルムアミド、ジクロロメタン、イソプロパノール、メタノールおよびエーテル（各30ml）で２回洗浄する。高真空下で終夜乾燥し、737mgを得る。

密度を定量するため、樹脂の一部5.66 mgを20%ピペリジン/DMF 1mlで30分間処理する。混合物を遠心分離し、上澄中の遊離したFmoc基を光度的に定量する（301nm、減衰係数7800 M(e-1)）。樹脂の密度は0.49 mmol/gである。

【００３７】

他の混合物（５の異なるカートリッジ）、および装着済み樹脂515 mg（0.25 mmole相当；アミノ酸混合物は４倍量過剰に使用）を用い、以下の工程はすべてシンセサイザーで行った。Ｎ端Fmoc保護基は合成後に切断する。エタノールで洗浄し終夜乾燥した後、ペプチドの樹脂からの切断はTFA/H_2O(95:5、v:v)により行う。TFA溶液をSpeed Vacで１／５の体積にまで濃縮し沈殿させ、ジエチルエーテルで洗浄して凍結乾燥する。

６量体ペプチドＥＩＤＹＨＲ、ＥＬＤＹＨＲ、およびＥＶＤＹＨＲは上記実施例１で作製したモノクローナル抗体により検出されるミモトープの例である。

【００３８】

２．２：ライブラリー２

この６量体ライブラリーは以下の配列のペプチドを含む（アミノ酸１位－６位）：

１位：Ｄ（固定）
２位：Ａ、ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１７の可能性）
３位：Ｅ、ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１７の可能性）
４位：Ｆ、ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１７の可能性）
５位：Ｒ、ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１７の可能性）

６位：Ｈ、Ｋ、ＣおよびＰを除くすべての天然アミノ酸（１６の可能性）

【００３９】

ペプチドライブラリー２は上記ライブラリー１について記載した方法（２．１）に従って構築した。

６量体ペプチドＤＩＤＹＨＲ、ＤＬＤＹＨＲ、およびＤＶＤＹＨＲは上記実施例１で作製したモノクローナル抗体により検出されるミモトープの例である。

【００４０】

２．３：ライブラリー３

第三のペプチドライブラリーがミモトープ配列の解明のための追加的な手段として使用される。このライブラリーはオリジナルの配列を含み、原エピトープとより密接に関連したミモトープの検出を可能とする。

この６量体ライブラリーは以下の配列のペプチドを含む（アミノ酸１位－６位）：

１位：ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１８の可能性）

２位：ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１８の可能性）

３位：ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１８の可能性）

４位：ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１８の可能性）

５位：ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１８の可能性）

６位：Ｋ、ＣおよびＰを除くすべての天然アミノ酸（１７の可能性）

【００４１】

ペプチドライブラリー３は上記ライブラリー１について記載した方法（２．１）に従って構築した。

６量体ペプチドＤＩＤＹＲＲ、ＤＬＤＹＲＲ、およびＤＶＤＹＲＲは上記実施例１で作製したモノクローナル抗体により検出されるミモトープの例である（１位のＤおよび５位のＲは原エピトープと同じである。）。

【００４２】

２．４：ライブラリー４

このペプチドライブラリー４は5 x 18 = 90ペプチドからなり、Mimotopes Ltd.（フランス国パリ；製造者のガイドライン参照）より市販品として購入でき、天然Ｎ末端Ａβ42配列ＤＡＥＦＲＨに従ってデザインされている。

１位：Ｄ（固定）

２位：ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１８の可能性）

３位：ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１８の可能性）

４位：ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１８の可能性）

５位：ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１８の可能性）

６位：ＫおよびＣを除くすべての天然アミノ酸（１８の可能性）

【００４３】

ライブラリー４の個別のペプチド構成物をFig１に示す。ペプチド番号１、24、48、56、および80はＡβ42Ｎ末端配列の原配列である。他のすべてのペプチドは、ＤＡＥＦＲＨ結合抗体に対する結合能について試験する候補ペプチドである。

【００４４】

２．５：ペプチドライブラリーのＥＬＩＳＡ

上記の通り、ペプチドライブラリー１、２および３をアプライドバイオシステムズ431Aペプチドシンセサイザーを用いて古典的Fmoc化学に従い作製する。市販品として入手できるペプチドライブラリー４は製造者の記述に従って作製する（上記並びにホームページwww.mimotopes.com参照）。90ペプチドのＣ末端はピンに結合している。

【００４５】

以下の標準的なプロトコールに従い、各ペプチドライブラリーについてＥＬＩＳＡを実施する：

該ペプチドライブラリーを１００％ＤＭＳＯに溶解する（最終濃度10mg/ml）。

該ペプチド溶液をＰＢＳでさらに希釈する。

ペプチド混合物をＥＬＩＳＡプレート(Nunc Maxisorp、Germany)上に終夜（4℃）で被膜化し、500μg/ウェルから出発して滴定により100ng/ウェルとする。
該プレートをＰＢＳ／ツイーン20(0.1%v/v)で３回洗浄する。
該プレートをＰＢＳ／ＢＳＡでブロックする（室温で2時間）。
【００４６】
該プレートをＰＢＳ／ツイーンで３回洗浄する。
該プレートにビオチン化ＤＡＥＦＲＨ特異的mAb(PBS中10μg/ml)を加えて室温で4時間インキュベートする。
該プレートをＰＢＳ／ツイーンで３回洗浄する。
該プレートにストレプトアビジン-ホースラディシュ・ペルオキシダーゼを添加してインキュベートする（室温で30分間）。
該プレートをＰＢＳ／ツイーンで５回洗浄する。
該プレートをABTS＋H_2O_2（0.1%w/v；10分間から45分間）とともにインキュベートし、クエン酸を添加して反応を停止させ、光度的な評価を実施する（波長405nm）。
【００４７】
３．阻害試験によるミモトープの確認
３．１追加的ライブラリー
上記の４ライブラリー（２．１、２．２、２．３、および２．４参照）に加えて、ミモトープ配列を明らかにするため、第五のライブラリーを使用する。この６量体ライブラリーはEMCミクロコレクションズ(Tubingen Germany)より市販品として入手できるが、114の異なるヘキサペプチド混合物を包含し、混合物について一つの位置がＣを除くすべての天然アミノ酸のひとつで定義され（１９の可能性）、他の５つの位置は変数である。
【００４８】
混合物01-06（ひとつの位置がアラニンＡで固定され残りの５つの位置は変数Ｘ）
混合物01：ＡＸＸＸＸＸ
混合物02：ＸＡＸＸＸＸ
混合物03：ＸＸＡＸＸＸ
混合物04：ＸＸＸＡＸＸ
混合物05：ＸＸＸＸＡＸ
混合物06：ＸＸＸＸＸＡ
【００４９】
混合物07-12（ひとつの位置がアルギニンＲで固定され残りの５つの位置は変数Ｘ）
混合物07：ＲＸＸＸＸＸ
混合物08：ＸＲＸＸＸＸ
混合物09：ＸＸＲＸＸＸ
混合物10：ＸＸＸＲＸＸ
混合物11：ＸＸＸＸＲＸ
混合物12：ＸＸＸＸＸＲ
従って、混合物13から114はＣを除くすべての天然アミノ酸を用いてデザインされる。
【００５０】
３．２阻害試験
Fig.２およびFig.３は、上記の五つのライブラリーに包含され、かつ得られたミモトープペプチドについての阻害試験の結果を示す。該ミモトープペプチドはモノクローナル抗体による認識に際し、原エピトープと競合する。原エピトープおよびミモトープペプチドはタンパク質担体とのカップリングのためにＣ末端に追加的なＣ残基を含む（望ましいならば）。
【００５１】
下記のペプチドを使用する；
ペプチド 1737 ＤＡＥＦＲＨ
ペプチド 3001 ＤＫＥＬＲＩ

ペプチド 3002 ＤＷＥＬＲＩ
ペプチド 3003 ＹＲＥＦＦＩ
ペプチド 3004 ＹＲＥＦＲＩ
ペプチド 3005 ＹＡＥＦＲＧ
ペプチド 3006 ＥＡＥＦＲＧ
ペプチド 3007 ＤＹＥＦＲＧ
ペプチド 3008 ＥＬＥＦＲＧ
ペプチド 3009 ＳＦＥＦＲＧ
ペプチド 3010 ＤＩＳＦＲＧ
ペプチド 3011 ＤＩＧＷＲＧ

【００５２】

方法：

ＥＬＩＳＡプレート（Nunc Maxisorp）を原ペプチドエピトープＤＡＥＦＲＨ（Ｃ末端をＣで延長し、ウシ血清アルブミンＢＳＡと結合させた）で被膜化して濃度0.1μg/ml ペプチド-BSA（100μl/ウェル、12ｈ、４℃）とする。PBS/BSA 1%(200μl/ウェル、12h、4℃)でブロックした後、プレートをＰＢＳ／ツイーンで３回洗浄する。その後、ビオチン化モノクローナル抗体(1:2000、50μl/ウェル)およびペプチド(50μl/ウェル) 50、5、0.5、0.05、0.005、および0.0005μg/mlを37℃、20分間で加える。プレートをＰＢＳ／ツイーンで３回洗浄し、ホースラディシュ・ペルオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジン（100μl/ウェル、30分間、ＲＴ）でインキュベートする。プレートをＰＢＳ／ツイーンで５回洗浄し、ABTS＋H_2O_2（0.1%w/v、10分間から45分間)とともにインキュベートする。クエン酸を添加して反応を停止させ、光度的な評価を実施する（波長405nm）。

Fig.２に示されまたは予想されるように、ペプチド1737 ＤＡＥＦＲＨはＢＳＡ縮合、プレート結合ペプチドＤＡＥＦＲＨと競合してモノクローナル抗体による認識を阻害する。さらに、ペプチド3003はモノクローナル抗体と原エピトープとの結合を阻害することができない。反対に、ペプチド3001、3002、3004、3005、3006、および3007は（程度は異なるが）エピトープ認識をブロックする。一方、ペプチド3004は高濃度（50μg/ml）においてのみ阻害作用を示すが、ペプチド3001、3006および3007は、阻害作用が強力でIC_{50}は0.5μg/mlより小さい。ペプチド3002および3005は「中間的な」阻害剤でIC_{50}は0.5μg/mlより大きい。

【００５３】

Fig.３に示されまたは予想されるように、ペプチド1737 ＤＡＥＦＲＨは追加的に行った独立の試験でモノクローナル抗体による認識においてＢＳＡ縮合、プレート結合ペプチドＤＡＥＦＲＨと競合する。更に、ペプチド3010および3011は試験した濃度では阻害作用を示さず、他方、ペプチド3008および3009はIC_{50}が5μg/mlより小さな、（比較的）弱い阻害剤であることが示された。

Table 1は上記ライブラリーに包含され、かつこれより得られるミモトープの阻害能を簡潔にまとめる。

【００５４】

【表１】
Table 1　ミモトープの阻害能

ペプチド 3001 ＤＫＥＬＲＩ	強い
ペプチド 3002 ＤＷＥＬＲＩ	中間
ペプチド 3003 ＹＲＥＦＦＩ	なし
ペプチド 3004 ＹＲＥＦＲＩ	弱い
ペプチド 3005 ＹＡＥＦＲＧ	中間
ペプチド 3006 ＥＡＥＦＲＧ	強い
ペプチド 3007 ＤＹＥＦＲＧ	強い
ペプチド 3008 ＥＬＥＦＲＧ	弱い
ペプチド 3009 ＳＦＥＦＲＧ	弱い
ペプチド 3010 ＤＩＳＦＲＧ	なし
ペプチド 3011 ＤＩＧＷＲＧ	なし

【００５５】
４．本発明に従ってスクリーニングされた追加的ミモトープの阻害試験
Fig.4および5は、５つのライブラリー（既に記載）に含まれ、これらより得られたミモトープペプチドについての阻害試験結果を記載する。該ミモトープペプチドはモノクローナル抗体による認識について原エピトープと競合する。原エピトープおよびミモトープペプチドはＣ末端（７位）にタンパク質担体と結合（望むならば）するための追加的Ｃ残基を含む。
【００５６】
以下のペプチドが使用される：
ペプチド 1737 ＤＡＥＦＲＨ（原エピトープ＋Ｃ）
ペプチド 1234 ＫＫＥＬＲＩ
ペプチド 1235 ＤＲＥＬＲＩ
ペプチド 1236 ＤＫＥＬＫＩ
ペプチド 1237 ＤＲＥＬＫＩ
ペプチド 1238 ＤＫＥＬＲ
ペプチド 1239 ＥＹＥＦＲＧ
ペプチド 1241 ＤＷＥＦＲＤＡ
ペプチド 4002 ＳＷＥＦＲＴ
ペプチド 4003 ＧＲＥＦＲＮ
ペプチド 4004 ＷＨＷＳＷＲ
【００５７】
方法：
ＥＬＩＳＡプレート（Nunc Maxisorp）を原ペプチドエピトープＤＡＥＦＲＨ（Ｃ末端をＣ残基で延長し、ウシ血清アルブミンBSAと結合させた）を用いて0.1μg/mlペプチド-BSAの濃度で被膜化する（100μl/ウェル、12H、4℃）。PBS/BSA 1%(200μl/ウェル、12h、4℃)でブロックした後、プレートをPBS/ツィーンで３回洗浄した。その後、ビオチン化モノクローナル抗体（1:2000、50μl/ウェル）と異なる濃度のペプチド(50μl/ウェル)を20分間37℃で添加した。プレートをPBS/ツィーンで３回洗浄し、ホースラディシュ・ペルオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジン（100μl/ウェル、30分間、ＲＴ）でインキュベートする。プレートをＰＢＳ／ツイーンで５回洗浄し、ABTS＋H_2O_2（0.1%w/v、10分間から45分間)とともにインキュベートする。クエン酸を添加して反応を停止させ、光度的な評価を実施する（波長405nm）。
【００５８】
Fug.4に示されまたは予測されるように、ペプチド1737ＤＡＥＦＲＨはBSA-結合、プレート結合ペプチドＤＡＥＦＲＨと競合し、モノクローナル抗体による認識を阻害する。さらに、ペプチド4004はモノクローナル抗体と原エピトープとの結合を阻害することができ

ない。反対に、ペプチド4002および4003はエピトープ認識をブロックする（異なる程度で）。ペプチド4003は比較的高濃度(10μg/ml)においてのみ阻害効果を示すが、ペプチド4002は強力な阻害効果を示しIC$_{50}$は0.4μg/mlより小である。

【００５９】

Fug.5に示されまたは予測されるように、モノクローナル抗体の認識に関する、追加的になされた独立の実験において、ペプチド1737ＤＡＥＦＲＨはBSA-結合、プレート結合ペプチドＤＡＥＦＲＨと成功裏に競合する。更に、ペプチド1234は試験濃度では殆ど阻害しないが、ペプチド1235、1236、1237、1238、1239、および1241はエピトープ認識をブロックする（異なる程度で）。ペプチド1235、1238、および1241はIC$_{50}$が0.5μg/mlより小さい強力な阻害剤であるが、ペプチド1236および1237は（比較的）弱い阻害剤でIC$_{50}$が5μg/mlより大きい。ペプチド1239は中間的な阻害剤でIC$_{50}$が0.5μg/mlより大きい。

Table 2は上記ライブラリーに包含され、かつこれより得られるミモトープの阻害能を簡潔にまとめる。

【００６０】

【表２】

Table 2　ミモトープの阻害能

ペプチド 1234 ＫＫＥＬＲＩ	なし
ペプチド 1235 ＤＲＥＬＲＩ	強い
ペプチド 1236 ＤＫＥＬＫＩ	弱い
ペプチド 1237 ＤＲＥＬＫＩ	弱い
ペプチド 1238 ＤＫＥＬＲ	強い
ペプチド 1239 ＥＹＥＦＲＧ	中間
ペプチド 1241 ＤＷＥＦＲＤＡ	強い
ペプチド 4002 ＳＷＥＦＲＴ	強い
ペプチド 4003 ＧＲＥＦＲＮ	弱い
ペプチド 4004 ＷＨＷＳＷＲ	なし

【００６１】

Fug.4および5に示された結果は、上記の種々の６量体ペプチドに加えて、５量体ペプチド（即ち、ペプチド 1238 ＤＫＥＬＲ）および７量体ペプチド（即ち、ペプチド 1241 ＤＷＥＦＲＤＡ）もミモトープに基づくアルツハイマーワクチンにエピトープとして使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【００６２】

【図１Ａ】アミノ酸記号を示す。

【図１Ｂ】スクリーニング工程で使用したライブラリー４を構成する個別のペプチドを示す。

【図１Ｃ】スクリーニング工程で使用したライブラリー４を構成する個別のペプチドを示す。

【図２】ＤＡＥＦＲＨについてのミモトープを用いた阻害試験を示す。

【図３】ＤＡＥＦＲＨについての他のミモトープを用いた阻害試験を示す。

【図４】本発明に従ってミモトープペプチドにより行った阻害試験の結果を示す。

【図５】本発明に従ってミモトープペプチドにより行った阻害試験の結果を示す。

【図１Ａ】

1	アラニン	ala	A
2	アルギニン	arg	R
3	アスパラギン	asn	N
4	アスパラギン酸	asp	D
5	システイン	cyc	C
6	グルタミン	gln	Q
7	グルタミン酸	glu	E
8	グリシン	gly	G
9	ヒスチジン	his	H
１０	イソロイシン	ile	I
１１	ロイシン	leu	L
１２	リシン	lys	L
１３	メチオニン	met	M
１４	フェニルアラニン	phe	F
１５	プロリン	pro	P
１６	セリン	ser	S
１７	トレオニン	thr	T
１８	トリプトファン	trp	W
１９	チロシン	tyr	Y
２０	バリン	val	V

【図１Ｂ】

Fig.1B

No.	D	A	E	F	R	H	
1	D	A	E	F	R	H	陽性対照
2	D	R	E	F	R	H	
3	D	N	E	F	R	H	
4	D	D	E	F	R	H	
5	D	Q	E	F	R	H	
6	D	E	E	F	R	H	
7	D	G	E	F	R	H	
8	D	H	E	F	R	H	
9	D	I	E	F	R	H	
10	D	L	E	F	R	H	
11	D	M	E	F	R	H	
12	D	F	E	F	R	H	
13	D	P	E	F	R	H	
14	D	S	E	F	R	H	
15	D	T	E	F	R	H	
16	D	W	E	F	R	H	
17	D	Y	E	F	R	H	
18	D	V	E	F	R	H	
19	D	A	A	F	R	H	
20	D	A	R	F	R	H	
21	D	A	N	F	R	H	
22	D	A	D	F	R	H	
23	D	A	Q	F	R	H	
24	D	A	E	F	R	H	陽性対照
25	D	A	G	F	R	H	
26	D	A	H	F	R	H	
27	D	A	I	F	R	H	
28	D	A	L	F	R	H	
29	D	A	M	F	R	H	
30	D	A	F	F	R	H	
31	D	A	P	F	R	H	
32	D	A	S	F	R	H	
33	D	A	T	F	R	H	
34	D	A	W	F	R	H	
35	D	A	Y	F	R	H	
36	D	A	V	F	R	H	
37	D	A	E	A	R	H	
38	D	A	E	R	R	H	
39	D	A	E	N	R	H	
40	D	A	E	D	R	H	
41	D	A	E	Q	R	H	
42	D	A	E	E	R	H	
43	D	A	E	G	R	H	
44	D	A	E	H	R	H	
45	D	A	E	I	R	H	
46	D	A	E	L	R	H	
47	D	A	E	M	R	H	
48	D	A	E	F	R	H	陽性対照
49	D	A	E	P	R	H	
50	D	A	E	S	R	H	
51	D	A	E	T	R	H	
52	D	A	E	W	R	H	
53	D	A	E	Y	R	H	
54	D	A	E	V	R	H	

【図１Ｃ】

Fig.1C

55	D	A	E	F	A	H	
56	D	A	E	F	R	H	陽性対照
57	D	A	E	F	N	H	
58	D	A	E	F	D	H	
59	D	A	E	F	Q	H	
60	D	A	E	F	E	H	
61	D	A	E	F	G	H	
62	D	A	E	F	H	H	
63	D	A	E	F	I	H	
64	D	A	E	F	L	H	
65	D	A	E	F	M	H	
66	D	A	E	F	F	H	
67	D	A	E	F	P	H	
68	D	A	E	F	S	H	
69	D	A	E	F	T	H	
70	D	A	E	F	W	H	
71	D	A	E	F	Y	H	
72	D	A	E	F	V	H	
73	D	A	E	F	R	A	
74	D	A	E	F	R	R	
75	D	A	E	F	R	N	
76	D	A	E	F	R	D	
77	D	A	E	F	R	Q	
78	D	A	E	F	R	E	
79	D	A	E	F	R	G	
80	D	A	E	F	R	H	陽性対照
81	D	A	E	F	R	I	
82	D	A	E	F	R	L	
83	D	A	E	F	R	M	
84	D	A	E	F	R	F	
85	D	A	E	F	R	P	
86	D	A	E	F	R	S	
87	D	A	E	F	R	T	
88	D	A	E	F	R	W	
89	D	A	E	F	R	Y	
90	D	A	E	F	R	V	

【図２】

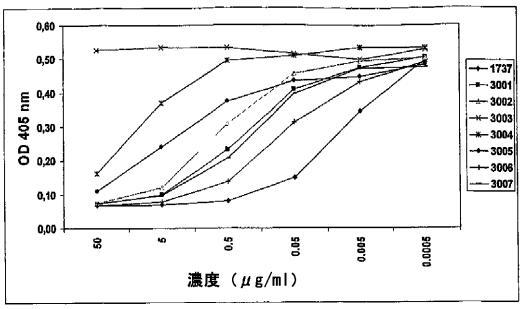


Fig.2

【図３】

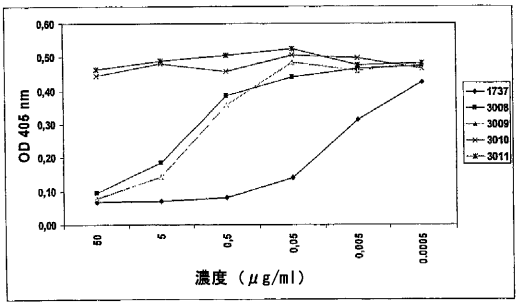


Fig.3

【図４】

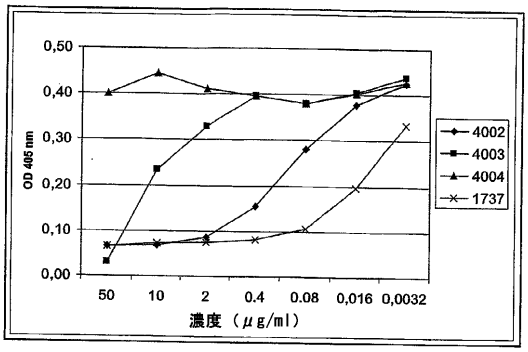


Fig.4

【図５】

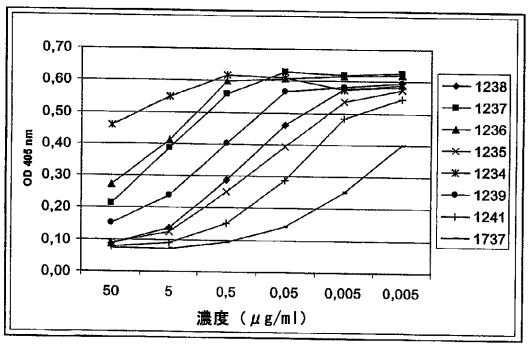


Fig.5

【配列表】

0004547373000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　フランク・マットナー
オーストリア、アー－１１９０ヴィエナ、クロッテンバッハシュトラーセ２６７番

審査官　横井　宏理

(56)参考文献　国際公開第００／０７２８８０（WO，Ａ１）
特表２００２－５３７３５４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第０２／０２８８８８（WO，Ａ１）
国際公開第０１／０６４００８（WO，Ａ１）
特表平０６－５０１８４８（ＪＰ，Ａ）
REINEKE, U., et al., Identification of distinct antibody epitopes and mimotopes from a peptide array of 5520 randomly generated sequences, Journal of Immonological Methods, ２００２年, Vol.267, p.37-51

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61K 39/00
A61P 25/00-28
C07K 1/00-22
C07K 7/00-04
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
SwissProt/PIR/PDB/GeneSeq
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)