

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-521092

(P2017-521092A)

(43) 公表日 平成29年8月3日(2017.8.3)

| (51) Int.Cl.                        | F I                   | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------|
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>      | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B 0 2 9   |
| <b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>       | C 1 2 Q 1/68 A        | 4 B 0 6 3   |
| <b>C 1 2 M 1/00 (2006.01)</b>       | C 1 2 N 15/00 F       | 4 C 0 8 4   |
| <b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>      | C 1 2 M 1/00 A        | 4 C 0 8 5   |
| <b>A 6 1 K 35/76 (2015.01)</b>      | A 6 1 K 48/00         | 4 C 0 8 7   |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く |                       |             |

(21) 出願番号 特願2017-512868 (P2017-512868)  
 (86) (22) 出願日 平成27年5月15日 (2015.5.15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年1月12日 (2017.1.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/031011  
 (87) 国際公開番号 W02015/175898  
 (87) 国際公開日 平成27年11月19日 (2015.11.19)  
 (31) 優先権主張番号 61/994,644  
 (32) 優先日 平成26年5月16日 (2014.5.16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

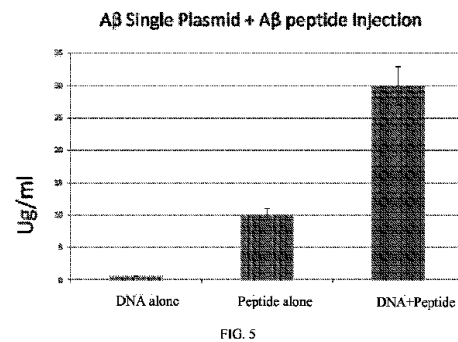
(71) 出願人 516342151  
 ヴィトルヴィアン バイオメディカル,  
 インク.  
 V I T R U V I A N B I O M E D I C A  
 L, I N C.  
 アメリカ国 7 5 0 0 1 テキサス アデ  
 イソン ダラスパークウェイ 1 6 4 7 5  
 スイート 7 5 0  
 (74) 代理人 100107984  
 弁理士 廣田 雅紀  
 (74) 代理人 100102255  
 弁理士 小澤 誠次  
 (74) 代理人 100096482  
 弁理士 東海 裕作

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の診断検査及び治療／予防

## (57) 【要約】

本発明は、アルツハイマー病の診断及び治療及び予防のための方法であって、アルツハイマー病を有すると疑われる対象から生体サンプルを得るステップ；H S P 2 7 の発現のレベルを決定するステップであって、前記サンプルにおけるH S P 2 7 タンパク質発現の、非アルツハイマー病患者からのサンプルと比較した統計的に有意な増加が、前記対象がアルツハイマー病を有することを示すステップ；及び、標準治療、又はA  $\beta$  4 2 ペプチドに対する免疫応答を引き起こし、これによってA  $\beta$  4 2 ペプチドの蓄積を予防し、したがってアルツハイマー病を予防又は治療する、A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドを発現する単一のベクター及びA  $\beta$  4 2 ペプチドの任意の追加を対象に提供することによる、アルツハイマー病の検出の結果として前記対象の治療を変更するステップを含む、前記方法を含む。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アルツハイマー病の診断、治療又は予防のための方法であって、  
アルツハイマー病を有すると疑われる対象から生体サンプルを得るステップ；  
H S P 2 7 の発現レベルを決定するステップであって、前記サンプルにおける H S P 2 7  
タンパク質発現の、非アルツハイマーの患者からのサンプルと比較した統計的に有意な増  
加が、前記対象がアルツハイマー病を有することを示す、ステップ；及び  
標準治療又は A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドを発現する単一のベクターを含む組成物を前記対象  
に提供することによる、アルツハイマー病の検出の結果として前記対象の治療を変更する  
ステップであって、前記組成物が A  $\beta$  4 2 ペプチドへの免疫応答をトリガする、ステップ  
；  
を含む、  
前記方法。

## 【請求項 2】

組成物が、A  $\beta$  4 2 ペプチド及び D N A ベクターをさらに含み、  
前記 A  $\beta$  4 2 ペプチドが、遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなく筋肉内注射され、前  
記 A  $\beta$  4 2 ペプチドへの免疫応答をトリガする、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

対象がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

治療が、配列番号 1 のベクター及び配列番号 3 のペプチドを含む、請求項 1 に記載の方  
法。

## 【請求項 5】

H S P 2 7 のレベルが、タンパク質発現を測定することによって決定され、  
方法が、蛍光検出、化学発光検出、電気化学発光検出及びパターン化アレイ、抗体結合、  
蛍光活性化ソーティング、検出可能ビーズソーティング、抗体アレイ、マイクロアレイ、  
酵素アレイ、受容体結合アレイ、固相結合アレイ、液相結合アレイ、蛍光共鳴移動、又は  
放射性標識から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

H S P 2 7 の発現レベルが、核酸レベルで決定され、  
方法が、蛍光検出、化学発光検出、電気化学発光検出及びパターン化アレイ、逆転写ポリ  
メラーゼ連鎖反応、検出可能ビーズソーティング、マイクロアレイ、酵素アレイ、対立遺  
伝子特異的プライマー伸長法、標的特異的プライマー伸長法、固相結合アレイ、液相結合  
アレイ、蛍光共鳴移動、又は放射性標識から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

血液サンプルにおける H S P 2 7 の発現レベルが、8 5、9 0、9 5、1 0 0、1 1 0  
、1 1 5、1 2 0、1 2 5、1 3 0、1 4 5、1 5 0、2 7 5、3 0 0、又は 3 1 5 n g  
／m l H S P 2 7 より高い、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

血液サンプルにおける H S P 2 7 の発現レベルが、1 0 5、1 3 0、1 4 5、1 5 0、  
2 7 5、3 0 0、又は 3 1 5 n g ／m l H S P 2 7 より高い、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

発現した A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドが、非炎症性 I g G 1 応答をトリガする、請求項 1 に  
記載の方法。

## 【請求項 10】

A  $\beta$  4 2 ペプチド及び発現した A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドが、アジュバントを用いること  
なく A  $\beta$  4 2 ペプチドへの免疫応答をトリガするのに有効である、請求項 1 に記載の方法  
。

## 【請求項 11】

アルツハイマー病の治療に有用であると考えられる候補薬剤を評価するための方法であ

10

20

30

40

50

って、

(a) アルツハイマー病患者から得られたサンプルから H S P 2 7 の発現レベルを測定するステップ；

(b) 第 1 サブセットの前記患者に候補薬剤を、第 2 サブセットの前記患者にプラセボを投与するステップであって、前記候補薬剤が A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドをコードする単一の D N A ベクターを含む、ステップ；及び

(c) H S P 2 7 の発現レベル又はアルツハイマー病の症状が、前記第 2 サブセットの患者と比較して前記第 1 セットの患者において低下したか決定するステップであって、統計的に有意な低下が、前記候補薬剤がアルツハイマー病の治療に有用であることを示す、ステップ；

を含む、

前記方法。

【請求項 1 2】

候補薬剤が、A  $\beta$  4 2 ペプチドの添加をさらに含み、A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドを発現する D N A ベクターと、前記 A  $\beta$  4 2 ペプチドとが、遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなく筋肉内注射され、前記 A  $\beta$  4 2 ペプチドへの免疫応答をトリガする、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

対象がヒトである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドをコードする D N A ベクターが、配列番号 1 であり、A  $\beta$  4 2 ペプチドが配列番号 3 である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

H S P 2 7 のレベルが、タンパク質発現を測定することによって決定され、方法が、蛍光検出、化学発光検出、電気化学発光検出及びパターン化アレイ、抗体結合、蛍光活性化ソーティング、検出可能ビーズソーティング、抗体アレイ、マイクロアレイ、酵素アレイ、受容体結合アレイ、固相結合アレイ、液相結合アレイ、蛍光共鳴移動、又は放射性標識から選択される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

H S P 2 7 の発現レベルが、核酸レベルで決定され、方法が、蛍光検出、化学発光検出、電気化学発光検出及びパターン化アレイ、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、検出可能ビーズソーティング、マイクロアレイ、酵素アレイ、対立遺伝子特異的プライマー伸長法、標的特異的プライマー伸長法、固相結合アレイ、液相結合アレイ、蛍光共鳴移動、又は放射性標識から選択される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

血液サンプルにおける H S P 2 7 の発現レベルが、8 5、9 0、9 5、1 0 0、1 1 0、1 1 5、1 2 0、1 2 5、1 3 0、1 4 5、1 5 0、2 7 5、3 0 0、又は 3 1 5 n g / m l H S P 2 7 より高い、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

血液サンプルにおける H S P 2 7 の発現レベルが、1 0 5、1 3 0、1 4 5、1 5 0、2 7 5、3 0 0、又は 3 1 5 n g / m l H S P 2 7 より高い、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

ウイルス遺伝子リーダー配列、A  $\beta$  4 2 三量体配列、及びエンドソームターゲティング配列の順番でこれらの配列を含む単一の核酸を含むベクター。

【請求項 2 0】

ウイルス遺伝子リーダー配列が、アデノウイルス E 3 遺伝子リーダー配列である、請求項 1 9 に記載のベクター。

【請求項 2 1】

核酸の上流に C M V プロモーターをさらに含む、請求項 1 9 に記載のベクター。

【請求項 2 2】

10

20

30

40

50

配列番号 1 を含む、請求項 19 に記載のベクター。

【請求項 23】

エンドソームターゲティング配列が、D X X L L（配列番号 2）である、請求項 19 に記載のベクター。

【請求項 24】

ベクターが、P V 1 - H 3 であり、かつ、アルツハイマー病を治療又は予防するための使用に適合されている、請求項 19 に記載のベクター。

【請求項 25】

アルツハイマー病の症状を改善するのに十分な量で A  $\beta$  42 ペプチドと、A  $\beta$  42 三量体ペプチドを発現する D N A ベクターとを含む、アルツハイマー病の症状を改善するための組成物であって、  
A  $\beta$  42 ペプチドへの免疫応答をトリガする、  
前記組成物。

10

【請求項 26】

D N A ベクター及び A  $\beta$  42 ペプチド及び D N A ベクターが、遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなく筋肉内注射される、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

A  $\beta$  42 ペプチドが、準毒性投与量で提供される、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 28】

アジュバントを用いることなく提供される、請求項 25 に記載の組成物。

20

【請求項 29】

主に T h 2 応答を引き起こす、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 30】

ペプチドが配列番号 3 を含む、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 31】

ベクターが配列番号 1 を含む、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 32】

配列番号 1 のベクター及び配列番号 3 のペプチドから本質的になる、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 33】

D N A ベクターが、単一の D N A ベクターである、請求項 25 に記載の組成物。

30

【請求項 34】

A  $\beta$  42 ペプチド、及び A  $\beta$  42 三量体ペプチドを発現する D N A ベクターの両方を、アルツハイマー病の症状を改善するのに十分な量で含む、アルツハイマー病の症状を改善するための組成物であって、  
前記 A  $\beta$  42 ペプチド及び前記 D N A ベクターが、遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなく筋肉内注射され、  
前記組成物が、A  $\beta$  42 ペプチドへの免疫応答をトリガする、  
前記組成物。

【請求項 35】

A  $\beta$  42 ペプチド、及び A  $\beta$  42 三量体ペプチドを発現する D N A ベクターの両方が、アジュバントを用いることなく提供される、請求項 34 に記載の組成物。

40

【請求項 36】

D N A ベクターが単一の D N A ベクターである、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 37】

主に T h 2 応答を引き起こす、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 38】

ペプチドが配列番号 3 を含む、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 39】

ベクターが配列番号 1 を含む、請求項 34 に記載の組成物。

50

## 【請求項 40】

配列番号 1 のベクター及び配列番号 3 のペプチドから本質的になる、請求項 34 に記載の組成物。

## 【請求項 41】

A $\beta$  42 ペプチド、及び A $\beta$  42 三量体ペプチドを発現する DNA ベクターの両方を注射することを含む、アルツハイマー病の治療又は予防のための方法であって、前記 A $\beta$  42 ペプチド及び前記 DNA ベクターが、遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなく筋肉内注射に適合されており、前記組成物が A $\beta$  42 ペプチドへの免疫応答をトリガする、前記方法。

10

## 【請求項 42】

注射が、非炎症性 IgG1 応答をトリガする、請求項 41 に記載の方法。

## 【請求項 43】

A $\beta$  42 ペプチド、及び A $\beta$  42 三量体ペプチドを発現する DNA ベクターの両方が、アジュバントを用いることなく提供される、請求項 41 に記載の方法

## 【請求項 44】

DNA ベクターが、単一の DNA ベクターである、請求項 41 に記載の方法。

## 【請求項 45】

組成物が、主に Th2 応答を引き起こす、請求項 41 に記載の方法。

## 【請求項 46】

A $\beta$  42 ペプチドが配列番号 3 を含む、請求項 41 に記載の方法。

20

## 【請求項 47】

ベクターが配列番号 1 を含む、請求項 41 に記載の方法。

## 【請求項 48】

組成物が、配列番号 1 のベクター及び配列番号 3 のペプチドから本質的になる、請求項 41 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は一般的にアルツハイマー病の分野、より具体的には、アルツハイマー病の治療及び予防のための診断方法及び組成物及び方法に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

発明の範囲を限定することなく、その背景をアルツハイマー病と関連して記載する。

## 【0003】

米国特許第 7, 479, 550 号は、Rosenberg, et al. に付与され、名称は “Amyloid  $\beta$  gene vaccines” である。この発明は、アミロイドベータ (A $\beta$ ) タンパク質による遺伝子ワクチン接種のための組成物及び方法を含む。該ワクチンは、アルツハイマー病などの神経変性病に有効な治療を提供すると言われている。ワクチン接種方法は、A $\beta$  に対する Th2 タイプ免疫応答を誘導するために使用できる。この免疫応答は、アルツハイマーのモデル系において A $\beta$  濃度及び A $\beta$  斑サイズを実質的に低減させると言われている。この系の使用に伴う一つの課題は、Gal4/UAS 系として知られる 2 つの別個のベクターを使用する必要性である。Gal4/UAS 系は、トランスジェニックマウスモデルにおけるアミロイド A ベクター 42 ペプチドに対する免疫応答の誘導に有効であり、アミロイド A ベクター 42 蓄積の阻害をもたらした。しかし、バイナリーベクター系とも呼ばれる 2-ベクター系は 2 つのプラスミドベクターを使用し、より高い生産負荷、滅菌問題、及び患者への準最適な使用を強いる。単一のプラスミドワクチンが生産及びクリニックにおける適用に理想的だろう。

40

## 【0004】

米国特許第 4, 816, 388 号は、Sipe, et al. に付与され、名称は “Human prealb

50

umin and related methods and products”である。簡潔には、この特許は、組換えヒトプレアルブミンに加え、プレアルブミンのバリエーション型が関連する医学的状態のハイブリダイゼーション方法論による診断におけるヒトプレアルブミン cDNA の使用、言い換えると、ヌクレオチド塩基配列 5'-ATGCAT-3' を認識する酵素を用いた制限エンドヌクレアーゼアッセイによるタイプ I 家族性アミロイドポリニューロパチーの診断を教示すると言われている。

#### 【0005】

米国特許出願公開第 2014/0031245 号は、Khan, et al. によって提出され、名称は、Alzheimer's Disease-Specific Alterations of the ERK1/ERK2 Phosphorylation Ratio-Alzheimer's Disease-Specific Molecular Biomarkers (ADSMB) である。簡潔には、この出願は、アルツハイマー病を診断する方法並びに対象におけるアルツハイマー病の有無を確認する方法を教示すると言われている。本発明は、非アルツハイマーの細胞をアミロイドペプチドと接触させ、プロテインキナーゼ C アクチベーターで細胞を刺激し、細胞をテスト化合物と接触させ、そしてアルツハイマー病特異的分子バイオマーカーの値を決定することにより、アルツハイマー病の治療に有用なリード化合物を特定している。本出願はまた、刺激後の細胞における特異的リン酸化 MAP キナーゼタンパク質と、プロテインキナーゼ C アクチベーターとの比の変化を検出することによる、対象におけるアルツハイマー病を診断する方法を教示すると言われている。

#### 【0006】

米国特許出願公開第 2012/0192294 号は、Heneka, et al. によって出願され、名称は “Inhibitors of the Nitration of Amyloid Beta Peptides and Their Uses in the Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease” である。簡潔には、この出願は、アミロイド-β ペプチド (Aβ) の凝集のインヒビターを特定する方法であって、a) 少なくとも一つの Aβ ペプチド及び／又はそのニトロ化形態を、ニトロ化が可能な前記 Aβ ペプチドにおける領域に潜在的に特異的に結合する少なくとも 1 つの候補インヒビターと接触させるステップ、及び b) 前記少なくとも一つの Aβ ペプチドの凝集の欠如又は低減の検出を通して、前記 Aβ ペプチドにおける前記領域に特異的に結合している前記インヒビターを検出するステップを含む前記方法を教示すると言われている。本発明はさらに、前記インヒビターに基づく、ニューロン退化及び特にアルツハイマー病を治療するための改善された方法に関連する。本発明はさらに、ニューロン退化及び特にアルツハイマー病の関連における、Aβ ペプチドの凝集を診断する方法に関する。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0007】

【特許文献 1】米国特許第 7, 479, 550 号

【特許文献 2】米国特許第 4, 816, 388 号

【特許文献 3】米国特許出願公開第 2014/0031245 号

【特許文献 4】米国特許出願公開第 2012/0192294 号

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

本発明は、アルツハイマー病等の病気を有したことがあるか又は生じる可能性が高かった患者からの、組織、血液等の体液又は他の体要素などの患者のサンプルにおける、タンパク質の熱ショックタンパク質 27 (HSP27) のタンパク質レベル及び／又は RNA 発現レベルに基づくアルツハイマー病のための診断検査を含む。HSP27 のレベルは、ELISA、核酸ハイブリダイゼーション、ナノバイオセンサー技術又は他の検出システムを使用して患者のサンプルにおいて決定される。そして、新規な発現ベクターを用いて潜在的な患者及び患者におけるアルツハイマー病の治療又は予防を方向づけるために、上記診断検査が使用された。

#### 【0009】

一実施形態では、本発明は、アルツハイマー病を有すると疑われる対象から生体サン

10

20

30

40

50

ルを得るステップ；H S P 2 7 の発現のレベルを決定するステップであって、前記サンプルにおけるH S P 2 7 タンパク質発現の、非アルツハイマーの患者からのサンプルと比較した統計的に有意な増加が、前記対象がアルツハイマー病を有することを示すステップ；及び標準治療又はA  $\beta$  4 2 三量体ペプチドをコードする単一のD N A ベクターを含む組成物を前記対象に与えることによる、アルツハイマー病の検出の結果として前記対象の治療を変更するステップであって、前記発現したA  $\beta$  4 2 三量体ペプチドがA  $\beta$  4 2 ペプチドへの免疫応答をトリガするステップ、を含むアルツハイマー病の診断の方法及び治療及び予防を含む。一態様では、対象がヒトである。別の態様では、H S P 2 7 がヒトH S P 2 7 である。別の態様では、組成物がA  $\beta$  4 2 ペプチドをさらに含み、D N A ベクター及びA  $\beta$  4 2 ペプチドを含む前記組成物が、遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなく筋肉内注射される。別の態様では、H S P 2 7 のレベルがタンパク質発現を測定することによって決定され、方法が、蛍光検出、化学発光検出、電気化学発光検出及びパターン化アレイ、抗体結合、蛍光活性化ソーティング、検出可能ビーズソーティング、抗体アレイ、マイクロアレイ、酵素アレイ、受容体結合アレイ、固相結合アレイ、液相結合アレイ、蛍光共鳴移動、又は放射性標識から選択される。別の態様では、H S P 2 7 の発現のレベルが核酸レベルで決定され、方法が、蛍光検出、化学発光検出、電気化学発光検出及びパターン化アレイ、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、検出可能ビーズソーティング、マイクロアレイ、酵素アレイ、対立遺伝子特異的プライマー伸長法、標的特異的プライマー伸長法、固相結合アレイ、液相結合アレイ、蛍光共鳴移動、又は放射性標識から選択される。別の態様では、血液サンプルにおけるH S P 2 7 の発現のレベルが、8 5、9 0、9 5、1 0 0、1 1 0、1 1 5、1 2 0、1 2 5、1 3 0、1 4 5、1 5 0、2 7 5、3 0 0、又は3 1 5 n g / m l H S P 2 7 より高い。別の態様では、血液サンプルにおけるH S P 2 7 の発現のレベルが、1 0 5、1 3 0、1 4 5、1 5 0、2 7 5、3 0 0、又は3 1 5 n g / m l H S P 2 7 より高い。別の態様では、発現したA  $\beta$  4 2 三量体ペプチドが非炎症性I g G 1 応答をトリガするが、I g G 2 a 又はI g G 2 b 応答をトリガしない。別の態様では、A  $\beta$  4 2 ペプチドと、A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドを発現するD N A ベクターとが、アジュバントを用いることなくA  $\beta$  4 2 ペプチドへの免疫応答をトリガするのに有効である。

#### 【0010】

本発明の別の実施形態は、(a) アルツハイマー病患者から得られたサンプルからH S P 2 7 の発現のレベルを測定するステップ；(b) 第1サブセットの前記患者に候補薬剤を、第2サブセットの前記患者にプラセボを投与するステップであって、前記候補薬剤がA  $\beta$  4 2 三量体ペプチドをコードする単一のD N A ベクターを含むステップ；(c) H S P 2 7 の発現のレベル又はアルツハイマー病の症状が、前記第2サブセットの患者と比較して前記第1セットの患者において低下したか決定するステップであって、統計的に有意な低下が、前記候補薬剤がアルツハイマー病の治療に有用であることを示すステップ、を含むアルツハイマー病の治療に有用であると考えられる候補薬剤を評価するための方法を含む。一態様では、対象がヒトである。別の態様では、候補薬剤がA  $\beta$  4 2 三量体ペプチドをさらに含み、遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなくD N A ベクター及びA  $\beta$  4 2 三量体ペプチドが筋肉内注射される。別の態様では、H S P 2 7 がヒトH S P 2 7 である。別の態様では、H S P 2 7 のレベルがタンパク質発現を測定することによって決定され、方法が、蛍光検出、化学発光検出、電気化学発光検出及びパターン化アレイ、抗体結合、蛍光活性化ソーティング、検出可能ビーズソーティング、抗体アレイ、マイクロアレイ、酵素アレイ、受容体結合アレイ、固相結合アレイ、液相結合アレイ、蛍光共鳴移動、又は放射性標識から選択される。別の態様では、H S P 2 7 の発現のレベルが核酸レベルで決定され、方法が、蛍光検出、化学発光検出、電気化学発光検出及びパターン化アレイ、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、検出可能ビーズソーティング、マイクロアレイ、酵素アレイ、対立遺伝子特異的プライマー伸長法、標的特異的プライマー伸長法、固相結合アレイ、液相結合アレイ、蛍光共鳴移動、又は放射性標識から選択される。別の態様では、血液サンプルにおけるH S P 2 7 の発現のレベルが、8 5、9 0、9 5、1 0 0、1 1 0、1 1 5、1 2 0、1 2 5、1 3 0、1 4 5、1 5 0、2 7 5、3 0 0、又は3 1 5 n g / m

1 H S P 2 7 より高い。別の態様では、血液サンプルにおける H S P 2 7 の発現のレベルが、1 0 5、1 3 0、1 4 5、1 5 0、2 7 5、3 0 0、又は 3 1 5 n g / m l H S P 2 7 より高い。別の態様では、D N A ベクターが単一の D N A ベクターである。

#### 【0011】

本発明のさらに別の実施形態は、組成物、方法、医薬品、作製の方法、使用、及び、ウイルス遺伝子リーダー配列、A  $\beta$  4 2 三量体配列、及びエンドソームターゲティング配列の順番でこれらの配列を含む単一の核酸を含む単一のベクターを含む、アルツハイマー病を治療又は予防するように製造された組成物を含む。一態様では、ウイルス遺伝子リーダー配列がアデノウイルス E 3 遺伝子リーダー配列である。別の態様では、ベクターが核酸の上流に C M V プロモーターをさらに含む。別の態様では、ベクターが配列番号 1 を含む。別の態様では、エンドソームターゲティング配列が例えば D X X L L (配列番号 2) であるか、又はヒトインバリエント (I1) 鎖から得ることができる。別の態様では、ベクターが P V 1 - H 3 である。別の態様では、ベクターが P V 1 - H 3 であり、アルツハイマー病を治療又は予防するために使用される。

#### 【0012】

本発明のさらに別の実施形態は、アルツハイマー病の症状を改善するのに十分な量で A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドと、A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドをコードする D N A ベクターとを含む、アルツハイマー病の症状を改善するための組成物を含む。一態様では、組成物がアジュバントを用いることなく提供される。別の態様では、組成物が主に T h 2 応答をトリガする。別の態様では、A  $\beta$  4 2 三量体ペプチド及び D N A ベクターが、遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなく筋肉内注射される。一態様では、D N A ベクターが単一の D N A ベクターである。別の態様では、ペプチドが配列番号 3 を含む。別の態様では、ベクターが配列番号 1 を含む。別の態様では、組成物が配列番号 1 のベクター及び配列番号 3 のペプチドから本質的になる。

#### 【0013】

さらに別の実施形態では、本発明は、アルツハイマー病の症状を改善するのに十分な量で A  $\beta$  4 2 ペプチドと、A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドを発現する D N A ベクターとを両方含むアルツハイマー病の症状を改善するための組成物であって、A  $\beta$  4 2 ペプチドと、A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドを発現する D N A ベクターとが両方とも、遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなく（及びそれを使用することなく）筋肉内注射され、前記組成物が A  $\beta$  4 2 ペプチドへの免疫応答をトリガする前記組成物を含む。一態様では、発現した A  $\beta$  4 2 三量体ペプチド及び D N A ベクターがアジュバントを用いず提供される。別の態様では、D N A ベクターが単一の D N A ベクターである。別の態様では、組成物が主に T h 2 応答を導く。別の態様では、ペプチドが配列番号 3 を含む。別の態様では、ベクターが配列番号 1 を含む。別の態様では、組成物が配列番号 1 のベクター及び配列番号 3 のペプチドから本質的になる。

#### 【0014】

別の実施形態では、本発明は、A  $\beta$  4 2 ペプチドと、A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドを発現する D N A ベクターとを両方含む組成物を注射することを含む、アルツハイマー病の治療又は予防のための方法であって、A  $\beta$  4 2 ペプチド及び D N A ベクターが遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなく（及びそれを使用することなく）筋肉内注射に適合され、前記組成物が A  $\beta$  4 2 ペプチドへの免疫応答をトリガする前記方法を含む。別の態様では、注射が非炎症性 I g G 1 応答をトリガする。別の態様では、A  $\beta$  4 2 ペプチド及び D N A ベクターがアジュバントを用いず提供される。別の態様では、D N A ベクターが単一の D N A ベクターである。別の態様では、組成物が主に T h 2 応答を導く。別の態様では、A  $\beta$  4 2 ペプチドが配列番号 3 を含む。別の態様では、ベクターが配列番号 1 を含む。別の態様では、組成物が配列番号 1 のベクター及び配列番号 3 のペプチドから本質的になる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0015】

本発明の特徴及び利点のより完全な理解のために、発明の詳細な説明並びに付随の図に

について記載する。

【図 1】図 1 は、金粒子に結合する DNA を示すグラフである。DNA 対金の最適な比は、 $4.5 \mu\text{g}$  の DNA (p4u-A b42 三量体) と  $1 \text{mg}$  の金である。この比において、カートリッジ (プレット) プラス追加として 20% の CMV i-G a l 4 DNA あたり、約  $3.8 \mu\text{g}$  の A b42 三量体 DNA が  $1.5 \text{mg}$  の金に結合できる。

【図 2】図 2 は、アルツハイマー病に対する DNA ワクチンのための単一のプラスミドベクターの概略図である。アミロイド A ベーター 42 三量体遺伝子は、上流の CMV (pCMV) プロモーター及び下流の SV40 ポリ A の間でクローニングされる。

【図 3】図 3 は、本発明の単一のプラスミドがバイナリー系の 2X より活性が高いことを示す。

【図 4】図 4 は、非炎症性プロファイルである単一のプラスミド PV1-H3 によって生成される抗体の抗体アイソタイプを示す。

【図 5】図 5 は、三量体 DNA +  $10 \mu\text{g}$  A  $\beta$  ペプチド (又は別個の注射) による 4 筋肉注射 (週に一回 ( $20 \mu\text{g}$ )) を行い、抗体を 6 週目に検査した結果を示すグラフである。アジュバントを使用しない DNA + ペプチドがより強い免疫応答を引き起こすことが分かった。

【図 6】図 6 は、4 筋肉注射 4 回 (週に一回) の筋肉注射 ( $20 \mu\text{g}$  の三量体 DNA +  $10 \mu\text{g}$  の A  $\beta$  ペプチド) を行い、ELISA 法を用いて 6 週目に A ベータアイソタイプ抗体について血清を検査した結果を示すグラフである。アジュバントを使用しない DNA + ペプチドが、ペプチド単体と比較してより強い免疫応答を引き起こすことが分かった。より高いアイソタイプ抗体レベルが DNA + ペプチドにおいて得られたが、両グループとも、主に Th2 (IgG1 及び IgG2a) に偏って、Th1 及び Th2 反応を誘導した。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明の様々な実施形態の作製及び使用を以下に詳細に検討しているが、本発明は、広範な特定の状況において具体化できる多くの適用可能な発明コンセプトを提供することが理解されるべきである。ここで検討される特定の実施形態は、発明を作製及び使用するための特定の方法の単なる説明であり、発明の範囲を限定しない。

【0017】

本発明の理解を容易にするために、多くの用語が以下に定義されている。ここに定義されている用語は、本発明に関する当業者によって一般的に理解される意味を有する。「a」、「an」及び「the」などの用語は単数実体のみを指すことを意図せず、特定の例が説明のために使用され得る一般的なクラスを含む。ここでの専門用語は、発明の特定の実施形態を説明するために使用されるが、請求項に概要される場合を除きそれらの使用は発明を限定しない。

【0018】

ここで教示される「アミロイド A ベーター 42」なる用語は、記載されているベクター全体 (配列番号 1) の一部であり、且つ配列番号 2 のアミノ酸列を有する、ここに教示されるアミロイド A ベーター 42 ペプチドバリエーションをコードするヌクレオチドを指す。

【0019】

ヌクレオチドに関して、「配列番号 (#) で本質的に記載される配列」、「に類似の配列」、「ヌクレオチド配列」なる用語及び類似の用語は、配列番号 1 としてここに特定されている配列のいずれかの部分に実質的に対応している配列を指す。これらの用語は、合成並びに天然由来の分子を指し、例えば、核酸セグメントによるハイブリダイゼーション、又はアミロイド A ベーター 42 の全て又は一部をコードする能力、又はアミロイド A ベーター 42 活性について等、生物学的に、免疫学的に、実験的に、又はさもなければ機能的に同等の活性を有する配列を含む。当然ながら、これらの用語は、その線形順序によって特定される配列における情報を含むことを意味する。

【0020】

アミノ酸に関して、「配列番号 2 に本質的に記載される配列」、「に類似の配列」、「

10

20

30

40

50

「アミノ酸配列」なる用語及び類似の用語は、配列番号 2 の配列に実質的に対応するペプチド、ポリペプチド、タンパク質、断片、融合体、誘導体及びその変化したものを指す。これらの用語は、合成並びに天然由来の分子を指し、例えば、抗原決定基として免疫学的活性を有するアミノ酸のセグメントについて等、生物学的に、免疫学的に、実験的に、又はさもなければ機能的に同等の活性を有する配列を含む。当然ながら、これらの用語は、その線形順序によって特定される配列における情報を含むことを意味する。

#### 【0021】

「遺伝子」なる用語は、機能的なタンパク質、ポリペプチド又はペプチドをコードするユニットを指すために使用される。当分野で理解されるように、この機能的な用語は、ゲノム配列、cDNA配列、又はその断片又は組合せ、並びに遺伝子産物を含み、人間の手によって変化され得たものを含む。精製された遺伝子、核酸、タンパク質及び同類のものは、通常伴う少なくとも 1 つの汚染核酸又はタンパク質から特定及び分離されたこれらの実体を指すときに使用される。

10

#### 【0022】

ここで使用される場合、「ベクター」なる用語は、DNAセグメントをある細胞から別の細胞へ移動させる核酸分子を指す時に使用される。ベクターは、配列を増幅するように設計されたものとして、又はここに教示されるアミロイド A ベクター 42 遺伝子配列に動作可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターとして、又はそのようなプロモーターが導入されるように設計されたものとしてさらに定義され得る。ベクターは、宿主細胞染色体と独立した状態で存在し得、又は宿主細胞染色体に組み込まれ得る。

20

#### 【0023】

「宿主細胞」なる用語は、ここに教示されるアミロイド A ベクター 42 遺伝子の核酸セグメント、又は古細菌的に、原核生物的に、又は真核生物的に変更されたセグメントを含むように設計されている細胞を指す。このように、設計された、又は組換えの細胞は、人間の手によって組み換え導入された遺伝子を含まない天然に生じる細胞と区別できる。

#### 【0024】

ここで使用される場合、「エンドソームターゲティング配列」なる用語は、ポリペプチド（又はその一部）をターゲットにするアミノ酸配列を指し、ポリペプチドに含まれた場合（例えば、ポリペプチドに融合又はコンジュゲートされる）、ポリペプチドのエンドソーム局在化を増加させる。分子をエンドソームに向けるエンドソームターゲティングシグナルは当分野で知られており、その配列を発現ベクターに組み込み、融合タンパク質がエンドソームターゲティングシグナルを含み生産されるようにすることができる。例えば、エンドソームターゲティングシグナル（インバリアント鎖 I i 及びリソソーム膜タンパク質 LAMP-1 を含む）、及び抗原をエンドソームの及び／又はリソソームの細胞内コンパートメントに向ける場合におけるそれらの使用を記載する Sanderson et al. (Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 92:7217-7221, 1995)、Wu et al. (Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 92:11671-11675, 1995) 及び Thomson et al. (J. Virol. 72:2246-2252, 1998) を参照のこと。したがって、エンドソームターゲティング配列は、例えばヒトインバリアント鎖などのターゲティング配列の全配列又は少しの部分のみを含んでもよく、一旦ポリペプチドがエンドソームに到達すると外されるプロポリペプチドに含まれてもよい。当業者は容易に、ターゲティング分子のエンドソームターゲティング部分を決定でき、エンドソームターゲティング配列を含む組換え融合タンパク質を作製するためによく知られた分子生物学技術を使用できる。さらなるエンドソームターゲティング配列が、当業者によって特定され、単なる日常の実験を使用して、HLA クラス II ペプチド提示経路へのターゲティングについて検査され得る。

30

40

#### 【0025】

HSP27。27 キロダルトンの熱ショックタンパク質 (Hsp27) は、ATP 非依存性シャペロンである小熱ショックタンパク質ファミリーに属する。Hsp27 の最も重要な機能は、非天然のタンパク質に結合し、リフォールディングコンピテント状態を維持している正しく折り畳まれなかったタンパク質の凝集を阻害する能力に基づく。さらに

50

、これは抗アポトーシス及び抗酸化作用を有する。

#### 【0026】

アルツハイマー病（AD）は、老人斑（SP）、脳アミロイドアンギオパチー（CAA）及び神経原線維タングル（NFT）等の病変を特徴とし、それぞれ正しく折りたたまれなかったタンパク質のアミロイド $\beta$ （A $\beta$ ）及びタウから主になる。Hsp27の細胞外発現は、古典的SPにおいて、及びSP及びCAA両方に関連するアストロサイトにおいて観察されている。病変内で見られるアミロイド $\beta$ （A $\beta$ ）及びタウタンパク質はニューロンの欠失及び認知障害を誘導し、ADの主な原因となると信じられている。アルツハイマー病ADの研究に多大な労力が費やされてきたが、ADの発症を決定するための正確な又は高精度な技術は現在のところない。

10

#### 【0027】

本発明者は、アルツハイマー病（AD）のプロセスの初期に、老人斑（SP）、脳アミロイドアンギオパチー（CAA）及び神経原線維タングル（NFT）などの病変内の死細胞及び瀕死細胞がそれらの細胞内容物を放出し、それらは体循環へと向かうことを発見した。Hsp27は病変の高い割合を占めるので、発明者は、アルツハイマー病（AD）の早期発症を決定するために、Hsp27の簡単で高精度な血液検査を開発した。

#### 【0028】

バイオマーカーとして熱ショックタンパク質27（HSP27）を使用。

#### 【0029】

本発明は、癌及びアルツハイマー病を含むいずれかの疾患を有したことがあるか又は生じる可能性が高かった患者からの、組織、血液等の体液又は他の体要素などの患者のサンプルにおける、タンパク質の熱ショックタンパク質27（HSP27）のタンパク質レベル及び／又はRNA発現レベルに基づくアルツハイマー病のための診断検査を含む。HSP27のレベルは、ELISA、核酸ハイブリダイゼーション、ナノバイオセンサー技術又は他の検出システムを使用して患者のサンプルにおいて決定される。

20

#### 【0030】

HSP27は、熱ショックタンパク質（HSP）ファミリーの27,000ダルトンのメンバーである。HSPタンパク質はATP非依存性シャペロンであり、タンパク質のフォールディング等のタンパク質構造の完全性を維持するために働く。このような構造タンパク質の完全性への摂動は、異なる疾患状態に関連する。一例は、A $\beta$ アミロイドの間違ったフォールディングであり、アルツハイマー病の初期段階と関連する。

30

#### 【0031】

診断検査は、アルツハイマー病、癌及び他の疾患などの疾患の存在の兆候又は予測として、血液、組織又は他の体要素におけるHSP27タンパク質のレベル及び／又はHSP27遺伝子の発現レベルを決定するために開発された。HSP27に特異的なELISA免疫学検査が、患者のサンプル及び問題の疾患を有していない個体からのサンプルにおけるHSP27タンパク質レベルを特定するために採用され、HSP27タンパク質レベルが比較される。疾患を伴う患者からのサンプルが、統計的により高いレベルのHSP27（又は疾患によってはより低いレベル）を示した場合、それがその特定の疾患の診断検査の根拠となり得る。疾患（又は疾患前）サンプル及び非疾患サンプルにおけるHSP27タンパク質のレベルを比較することに加え、疾患及び非疾患サンプルにおけるHSP27のmRNAのレベルも、DNA又は他の核酸プローブを使用したハイブリダイゼーションによって決定できる。診断検査を改善するためのこのような方法論の一例は、ナノバイオセンサー技術（一例は導波モード共鳴センサー技術）であり、放射性同位体等のタグ又はビオチンなどの化学性タグ等を必要とすることなく、HSP27タンパク質又はmRNAの検出を可能にし、リアルタイムで結果を示すことを可能にする。

40

#### 【0032】

血液サンプルにおけるHsp27は、早期発症型アルツハイマー病（AD）を示す。この仮説をテストするために、我々は、臨床記録から決定された早期発症型アルツハイマー病（AD）を有すると最近決定された8人の患者、及び5人の正常な年齢と性別が適合し

50

た対象から血液サンプルを得た。血漿タンパク質を血液から回収し、古典的サンドイッチ酵素結合免疫吸着法（E L I S A）を使用してリン酸化H s p 2 7（p H s p 2 7）の濃度について検査した。簡潔には、血液を患者から採り、E D T Aを含むチューブに加え、遠心分離して血漿を回収し、アリコートし（aliquoted）、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した。各アリコート（aliquot）の総タンパク質含有量を、標準としてウシ血清アルブミンを使用したブラッドフォード法により決定した。次いで、サンプルを、穏やかに振盪させながら $4^{\circ}\text{C}$ で10分間、1%のLubrol WXと混合させ、p H s p 2 7含有量をスタンダードサンドイッチE L I S Aで測定した。簡潔には、96ウェルのマイクロタイタープレート（Nunc Immunoplate Maxisorp; Life Technologies）を、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩、p H 9.5の炭酸バッファーにおけるマウスモノクローナル抗ヒトp H s p 2 7（ $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ）でコートした。次いで、プレートを、1%のTwee n - 2 0を含むP B S（P B S - T）で洗浄し、P B S - Tにおいて1%ウシ血清アルブミンによるインキュベーションでブロックした。上清を加え、結合したp H s p 2 7をウサギポリクローナル抗p H s p 2 7抗体の添加によって検出した。結合したポリクローナル抗体を、ウサギ免疫グロブリンに対するアルカリホスファターゼ-コンジュゲート化マウスモノクローナル抗体（Sigma Chemical Co）、次いでp - ニトロフェニルリン酸基質（Sigma Chemical Co）により検出した。結果として得られた吸光をBioRad Benchmark Plus plate readerを用いて $405\text{nm}$ で測定した。標準の用量反応曲線をp H s p 2 7（ $0\sim 20$ ,  $000\text{ng}/\text{mL}$ ; StressGen）に応じて作成し、p H s p 2 7の濃度を、これらの標準曲線を参照してASSAYZAP data analysis software（BIOSOFT）を用いて決定した。p H s p 2 7免疫学的検定のインターアッセイ変動は、 $<10\%$ だった。結果は、5人の正常な対象と比較して、アルツハイマー病（A D）を有する8/8の患者の血漿においてp H s p 2 7に有意な増加があることを示した（表1）。

【0033】

【表1】

**表1. 早期発症型のアルツハイマー病（A D）を有する患者におけるH s p 2 7レベルの測定**

| 患者番号            | 平均 Hsp72 濃度 (ng/ml $\pm$ SD)a |
|-----------------|-------------------------------|
| Control #12-581 | $60 \pm 10$                   |
| Control #12-254 | $85 \pm 15$                   |
| Control #12-542 | $65 \pm 13$                   |
| Control #12-154 | $45 \pm 11$                   |
| Control #12-488 | $82 \pm 15$                   |
| AD #12-658      | $125 \pm 12^*$                |
| AD #12-325      | $145 \pm 13^*$                |
| AD #12-782      | $225 \pm 28^*$                |
| AD #12-489      | $138 \pm 15^*$                |
| AD #12-770      | $149 \pm 25^*$                |
| AD #12-333      | $308 \pm 50^*$                |
| AD #12-411      | $149 \pm 15^*$                |
| AD #12-807      | $108 \pm 23^*$                |

## 【0034】

データは、材料及び方法のセクションに詳細に記載されているように、古典的な p H s p 2 7 の E L I S A を使用して測定された、コントロール（正常な対象）及びアルツハイマー病（A D）を有する患者からの血漿 p H s p 2 7 濃度である。データは、p H s p 2 7 の平均濃度（n g / m l ± S D）であり、4 ウェルずつ（quadruplicates）実施された3つの独立実験の合計である。\*、 $p < 0.001$  対コントロール（正常な対象）。

## 【0035】

結果は、5つの非アルツハイマー病血液サンプルにおける60、85、65、45、82の平均H S P 2 7 濃度（n g / m l）、及び8つのアルツハイマー病血液サンプルにおける125、145、225、138、149、308、149、108のH P S 2 7 濃度（n g / m l）を示す。このように、非アルツハイマー病患者の血液と比較してアルツハイマー病患者の血液において、H S P 2 7 のレベルの統計的に有意（ $p < 0.001$ ）な増加がある。したがって、これは、個人からの血液サンプルにおけるH S P 2 7 のレベルに基づく診断検査が、アルツハイマー病の存在を示し得るという開示である。

## 【0036】

大量のアルツハイマー病及び非アルツハイマー病の個人からの大量のサンプルによる比較試験。さらに、決定は、P S 1 又は P S 2 遺伝子異常を保有するが、アルツハイマー病の症状を持たないファミリーメンバーにおけるH S P 4 2 レベルから成されることができる。P S 1 又は P S 2 遺伝子異常を有する個人は、アルツハイマー病をおよそ45～50の年齢で開始する90%より高い危険性を有し、該疾患の他の形態で一般的である65～70以上の年齢と対照的である。P S 1 又は P S 2 無症候性患者における高レベルのH S P 2 7 は、アルツハイマー病を発症するように進行し得、したがって、H S P 2 7 のレベルは症状の前にアルツハイマー病を予測し；このように、H S P 2 7 レベルを示す診断検査は予測的であり、アルツハイマー病の一般集団の血液をスクリーニングするために使用でき得る。

## 【0037】

一旦本方法、又は標準のアルツハイマー病臨床検査を含む他の方法論を使用して診断が為されたら、本発明は、標的細胞への増強された送達、及び機能性A  $\beta$  4 2 三量体ペプチドの増強された発現を有する新規な核酸ベクターも含む。

## 【0038】

プラスミドの構築。

本発明者は、上流のC M V プロモーター及び下流のS V 4 0 ポリAの間でクローニングされる、アミロイドA ベーター4 2 遺伝子の3つのコピーを有する単一のプラスミドベクターを構築した（図2）。驚くべきことに、単一のプラスミドベクターP V 1 - H 3 は、より活性が高く、2ベクター系と比較してアミロイドA ベーター4 2 に対する抗体を2倍以上誘導する。これは驚くべきことであり、なぜなら、活性は最初の2ベクター系とおよそ同じだろうと仮定されていたからである。しかし、本発明は、より高い活性を示す利点に加え、製造、規制当局の承認、及び臨床有用性、単純性において、単一のベクター系であることの利点を見いだす。

## 【0039】

図2は、アルツハイマー病に対するD N A ワクチンのための単一のプラスミドベクターの概略図である。アミロイドA ベーター4 2 三量体遺伝子は、上流のC M V（p C M V）プロモーター及び下流のS V 4 0 ポリAの間でクローニングされた。

## 【0040】

図3は、本発明の単一のプラスミドがバイナリー系の2Xより活性が高いことを示す。簡潔には、8アプリケーションが使用される時、単一のプラスミドP V 1 - H 3 は、アミロイドA ベーター4 2 に対して約2X以上の抗体を誘導することが分かった（単一のベクターP V 1 - H 3 による33  $\mu$  g / m l の抗A ベータ4 2 抗体をバイナリー系P 4 u - H 3 による16  $\mu$  g / m l の抗A ベータ4 2 抗体と比較）。

## 【0041】

図4は、非炎症性プロファイルである単一のプラスミドPV1-H3によって生成される抗体の抗体アイソタイプを示す。

#### 【0042】

驚くべきことに、本発明のPV1-H3単一のプラスミドは、主にIgG1抗体及び少量のIgG2a及びIgG2bを生成したことも分かった。IgG1抗体は炎症性応答に関与しない。遺伝子ではなく、ワクチンとしてアミロイドAベクター42ペプチド自体を使用した過去の研究は、同量のIgG1及びIgG2aを誘導し、炎症性応答をもたらした。これらの結果は、PV1-H3が炎症性ではないIgG1を主に生成することを裏付ける。

#### 【0043】

高効率の単一のベクターPV1-H3が本発明者によって作製され、これは2ベクター系よりアミロイドAベクター42ペプチドに対する抗体を2倍高いレベルで誘導し、生成される抗体は、非炎症性応答を特徴にするIgG1が90%である。

#### 【0044】

Aβ42三量体遺伝子を化学的に合成し、免疫付与ベクター系にクローニングした。

1. A. 42 DNA配列の相補オリゴヌクレオチドのセットを、DNAビルダープログラムを使用して設計し、カスタム合成した (Sigma, St. Louis, MO)。

2. これらのオリゴヌクレオチドは、ヘアピン、プライマーダイマー構造及び他のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による遺伝子合成の妨げとなる配列間の不適切なマッチングを避けるために、ヌクレオチド配列のより柔軟性のある設計を可能にする特定のアミノ酸のための複数のコドンを使用して、それぞれのAβ42アミノ酸配列をもとに設計した。

3. 合計で32のオリゴヌクレオチド (最終濃度250 nM) を、それらを組み合わせるために第1のPCR反応で混合し、設計した遺伝子配列を作った (30サイクル: 94℃で15秒、55℃で30秒及び72℃で45秒; Platinum (登録商標) Taq DNA Polymerase, Invitrogen, Carlsbad, CA)。

4. 第2のPCRを使用し、フォワード及びリバースプライマーを使用して完全長産物を増幅させた (30サイクル: 94℃で15秒、55℃で30秒及び72℃で45秒)。

5. この第2の実行からのPCR産物を、ゲル電気泳動によって精製し、制限酵素で消化し (Promega, Madison, WI)、プラスミドベクターのポリクローニング部位にクローニングした (EcoRI/XbaI digestion)。

6. ライゲーションしたプラスミドで細菌を形質転換し、クローンを配列分析で同定した (Applied Biosystem, CA, Sequencing core of UTSW)。

7. アデノウイルスE3遺伝子リーダー配列及びエンドソームターゲティング配列を、Aβ42遺伝子上流及び下流にそれぞれクローニングした。

8. コントロール免疫付与のために、対応するプラスミドを構築した。プラスミドpGal4/UAS-Lucは、pGal4/UAS-Aβ42三量体又は単量体と同じであるがE3リーダー及びエンドソームターゲティング配列が無いバイナリープラスミド系から成り、Luc遺伝子の転写はGal4転写因子の結合によって駆動される。pCMV-Lucでは、転写はCMVプロモーターによって駆動される。

#### 【0045】

DNA精製。

全てのプラスミドDNAを、市販のplasmid maxi kit (Qiagen, Valencia, CA) を使用して精製した。DNAの純度及び濃度を、260/280 nmの光学密度測定及びゲル電気泳動で測定した。Qiagen endotoxin-free DNA purification kitが、エレクトロポレーションワクチンに必要であり得る。

#### 【0046】

DNA-金粒子調製 (臨床調製のための先進プロトコル)。

1. 1. 5 mlのマイクロフュージチューブ (シリコン処理, Fisher brand #05-541-27) に、60 mgの金マイクロキャリア (Degussa Corporation Comgitm #及びBatch # 334 51 60021-05) を量る。

10

20

30

40

50

2. 100%のアルコールで2回洗浄し、40℃で乾燥させる。
3. 270  $\mu$ gのp4u-A b 4 2三量体（マウスワクチン用は慣習通りに70  $\mu$ g）及び54  $\mu$ gのpCMVi-gal4（慣習通りに14  $\mu$ g）、合計DNA324  $\mu$ g（慣習通りに74  $\mu$ g）を加える。
4. 100  $\mu$ lの0.05Mのスペルミジンを加える。
5. 金及びスペルミジン混合物を10秒間ボルテックスする。
6. 中度の速さのボルテックスミキサーで混合物をボルテックスする間、100  $\mu$ lの2.5MのCaCl<sub>2</sub>を混合物に滴加する。
7. 混合物を15分間、氷上で沈殿させる。
8. マイクロキャリア溶液をマイクロフュージで1分間スピンさせ（3000rpm）、金を沈殿させる。 10
9. 上清を除去し、捨てる。
10. 毎回1mlの新しい100%エタノールを使用して、沈殿物を3回洗浄する。
11. 最後のエタノール洗浄の後、沈殿物を1.5mlのエタノールに再懸濁する。
12. これにより、懸濁液はチューブ準備のために準備ができた。あるいは、DNA／マイクロキャリア懸濁液は、-20℃で2ヶ月まで保管できる。凍結の前に、蓋をしっかりと強く締め、チューブの蓋の周りにパラフィルム（登録商標）を巻く。-20℃での保管後、パラフィルム封を壊す前に、粒子懸濁液を室温にもどす。
13. Tubing Prep Stationを使用してGold-CoatチューブにDNA／マイクロキャリア懸濁液をロードする。 20
14. マイクロキャリアを3～5分間落ち着かせる。エタノールを吸い出す。
15. 0.35～0.4 LPMの窒素で窒素を流し、Gold-Coatチューブを乾燥させる。
16. Gold-Coatチューブを3～5分間、回転させながら引き続き乾燥させる。
17. チューブをチューブサポートシリンダーから外す。
18. 0.5インチのカートリッジに切断し、容器に入れる。
19. 容器を強く締め、ラベルを付け、パラフィルムで巻き、-20℃で保管する。
20. 24時間の凍結及び1回の解凍の後、カートリッジ（ブレット）あたりの金粒子は、約1.5mgの金に対し約3.8  $\mu$ gのP4U-A b 4 2三量体及び0.96  $\mu$ gのCMVi-Gal4である。ブレットあたりのDNA量は1週間及び1ヶ月の-20℃での保管後に検査され、P4U-A b 4 2三量体はブレットあたり約3.5  $\mu$ gであるべきである。 30

#### 【0047】

図1は、金粒子に結合したDNAを示すグラフである。DNA対金の最適な比は、4.5  $\mu$ gのDNA（p4u-A b 4 2三量体）と1mgの金である。この比において、カートリッジ（ブレット）プラス追加として20%のCMVi-Gal4 DNAあたり、約3.8  $\mu$ gのA b 4 2三量体DNAが1.5mgの金に結合できる。

#### 【0048】

プラスミドDNA配列。

P4U-H3（Aベータ三量体）。

配列：p4UK-H3 範囲：1～4600

```

      >AseI      >SnaBI
      |         |
      | 10      | 20          30          40          50
TAGTTATTAATTACGTAGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAC
ATCAATAATTAATGCATCCGAATTGATACGCCGTAGTCTCGTCTAACATG

                                >SbfI
                                |
                                >HindIII      >PstI
                                |         |
                                | 60      70      80      90      100
TGAGAGTGCACCATAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGAAGCGGAGTACTGT
ACTCTCACGTGGTATTCGAACGTACGGACGTCCAGCTTCGCCTCATGACA
      _____ 1 TO 527 OF P4U-AB42TRIMERAMP _____> 110
                        120      130      140      150

CCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTTCGAGCGGA
GGAGGCTCGCCTCATGACAGGAGGCTCGCCTCATGACAGGAAGCTCGCCT
_____ 1 TO 527 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ _____>

      >HincII      >XhoI
      |             |
      >AccI         >TliI
      ||           |
      >SalI         >PaeR7I
      |||          |
      |||170      180      190      200
GTACTGTCCTCCGAGTCGACTCTAGAGGGTATATAATGGATCTCGAGATG
CATGACAGGAGGCTCAGCTGAGATCTCCCATATATTACCTAGAGCTCTAC
_____ 1 TO 527 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ _____>

      >TspMI      >XhoI
      |           |
      >XmaI       >TliI

```

10

20

30

```

                |      |
          >MluI    >BmtI    >PaeR7I
                |      ||      |
          >SacI    |      >NheI    |>SmaI    |      >BglIII
                |      |      ||      |      |
          210      |      220      ||      |      230      |      240      250
TACCGAGCTCTTACGCGTGCTAGCCCGGGCTCGAGATCTGGGCGGTAGGC
ATGGCTCGAGAATGCGCACGATCGGGCCCGAGCTCTAGACCCGCCATCCG
_____1 TO 527 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ_____>

```

10

```

                                >SacI
                                |
          260      270      280 |      290      300
GTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAG
CACATGCCACCCTCCAGATATATTCGTCTCGAGCAAATCACTTGGCAGTC
_____1 TO 527 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ_____>

```

```

                >BmtI
                |
          >NheI |
                |      |
          310 |      |      320      330      340      350
ATCACTAGAAGCTAGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTA
TAGTGATCTTCGATCGAAATAACGCCATCAAATAGTGTCAATTTAACGAT
_____1 TO 527 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ_____>

```

20

```

                                                >PstI
                                                |
          360      370      380      390      |      400
ACGCAGTCAGTGCTTCTGACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGAAGT
TGCGTCAGTCACGAAGACTGTGTTGTCAGAGCTTGAATTGACGTCTTCA
_____1 TO 527 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ_____>

```

30

```

          410      420      430      440      450
TGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTA
ACCAGCACTCCGTGACCCGTCCATTCATAGTTCCAATGTTCTGTCCAAAT

```

\_\_\_\_\_ 1 TO 527 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ \_\_\_\_\_>

460 470 480 490 500  
AGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTT  
TCCTCTGGTTATCTTTGACCCGAACAGCTCTGTCTCTTCTGAGAACGCAA

\_\_\_\_\_ 1 TO 527 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ \_\_\_\_\_>

510 520 530 540 550  
TCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCC  
AGACTATCCGTGGATAACCAGAATGACTGTAGGTGAAACGGAAAGAGAGG

\_\_\_\_\_ 1 TO 527 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ \_\_\_\_\_>

>EcoRI

560 570 580 590 | 600  
ACAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAATTCCAC  
TGTCCACAGGTGAGGGTCAAGTTAATGTCGAGAATCCGATCTTAAGGTG

\_\_\_\_\_ 1 TO 527 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ \_\_\_\_\_>

610 620 630 640 650  
GCCGCCACCATGGGCTACATGATCCTGGGCCTCCTGGCCCTGGCGGCCGT  
CGGCGGTGGTACCCGATGTACTAGGACCCGGAGGACCGGGACCGCCGCA  
\_\_\_\_\_ 534 TO 1196 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ \_\_\_\_\_>

>AfeI >MluI

| 660 | 670 680 690 700  
GTGCAGCGCTGCCACGCGTGGAGGCGGGAGCGACGCCGAGTTCCGCCACG  
CAGCTCGCGACGGTGGCGACCTCCGCCCTCGCTGCGGCTCAAGGCGGTGC  
\_\_\_\_\_ 534 TO 1196 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ \_\_\_\_\_>

\_\_\_\_\_ 61 TO 633 OF AB42-TRIMER \_\_\_\_\_>

\_\_\_\_\_ 79 TO 723 OF HAB42TRIMER \_\_\_\_\_>

>BmgBI

720 730 740 750  
ACAGCGGCTACGAGGTGCACCACCAGAAGCTGGTGTCTTCGCCGAGGAC  
TGTCGCCGATGCTCCACGTGGTGGTCTTCGACCACAAGAAGCGGCTCCTG  
\_\_\_\_\_ 534 TO 1196 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ \_\_\_\_\_>

\_\_\_\_\_ 61 TO 633 OF AB42-TRIMER.ENDO \_\_\_\_\_>

\_\_\_\_\_ 79 TO 723 OF HAB42TRIMER.E3.ENDO.SEQ [SPLIT \_\_\_\_\_>

760 770 780 790 800  
GTGGGCAGCAACAAGGGCGCCATCATCGGCCTGATGGTGGGCGGCGTGGT  
CACCCGTCGTTGTTCCCGCGGTAGTAGCCGACTACCACCCGCCGACCA

\_\_\_\_\_ 534 TO 1196 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ \_\_\_\_\_>

\_\_\_\_\_ 61 TO 633 OF AB42-TRIMER.ENDO \_\_\_\_\_>

\_\_\_\_\_ 79 TO 723 OF HAB42TRIMER.E3.ENDO.SEQ [SPLIT \_\_\_\_\_>

810 820 830 840 850  
GATCGCCGACGCTACGATGCGGAATTTGACATGACAGTGATATGAAG  
CTAGCGGCGTCGGATGCTACGCCTTAAGCTGTACTGTACCTATACTTC

\_\_\_\_\_ 534 TO 1196 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ \_\_\_\_\_>

10

20

30

40

```

_____ 61 TO 633 OF AB42-TRIMER.ENDO _____>
_____ 79 TO 723 OF HAB42TRIMER.E3.ENDO.SEQ [SPLIT _____>

      860      870      880      890      900
TACATCACCAAAACTCGTATTTTTTCGCGGAAGATGTAGGAAGCAACAAG
ATGTAGTGGTTTTTTGAGCATAAAAAGCGCCTTCTACATCCTTCGTTGTTT
_____ 534 TO 1196 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ _____>
_____ 61 TO 633 OF AB42-TRIMER.ENDO _____>
_____ 79 TO 723 OF HAB42TRIMER.E3.ENDO.SEQ [SPLIT _____>

      910      920      930      940      950
GGAGCAATCATAGGACTAATGGTAGGAGGGGTAGTCATAGCAGCGGCTTA
CCTCGTTAGTATCCTGATTACCATCCTCCCCATCAGTATCGTCGCCGAAT
_____ 534 TO 1196 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ _____>
_____ 61 TO 633 OF AB42-TRIMER.ENDO _____>
_____ 79 TO 723 OF HAB42TRIMER.E3.ENDO.SEQ [SPLIT _____>

      960      970      980      990      1000
TGATGCTGAATTTTCGTCATGATTCGGGTTATGAAGTTCATCATCAAAAAT
ACTACGACTTAAAGCAGTACTAAGCCCAATACTTCAAGTAGTAGTTTTTA
_____ 534 TO 1196 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ _____>
_____ 61 TO 633 OF AB42-TRIMER.ENDO _____>
_____ 79 TO 723 OF HAB42TRIMER.E3.ENDO.SEQ [SPLIT _____>

      1010      1020      1030      1040      1050
TAGTGTTTTTTCGCTGAAGATGTTGGTTCTAATAAAGGAGCTATTATAGGT
ATCACAAAAAGCGACTTCTACAACCAAGATTATTCCTCGATAATATCCA
_____ 534 TO 1196 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ _____>
_____ 61 TO 633 OF AB42-TRIMER.ENDO _____>
_____ 79 TO 723 OF HAB42TRIMER.E3.ENDO.SEQ [SPLIT _____>

                                                    >BglIII
                                                    |
      1060      1070      1080      1090      1100
TTAATGGTTGGGGTGTTGTTATTGCTGGTGGCGGTTTCGAGATCTATCCA
AATTACCAACCCCCACAACAATAACGACCACCGCCAAGCTCTAGATAGGT
_____ 534 TO 1196 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ _____>
_____ 61 TO 633 OF AB42-TRIMER.ENDO _____>
_____ 79 TO 723 OF HAB42TRIMER.E3.ENDO.SEQ [SPLIT _____>

      1110      1120      1130      1140      1150
GACCGTCAAGGTGAGCGTGAGCGCCGCCACCCTGGGCCTGGGCTTCATCA
CTGGCAGTTCCACTCGCACTCGCGGCGGTGGGACCCGGACCCGAAGTAGT
_____ 534 TO 1196 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ _____>
_____ 61 TO 633 OF AB42-TRIMER.ENDO _____>
_____ 79 TO 723 OF HAB42TRIMER.E3.ENDO.SEQ [SPLIT _____>

      1160      1170      1180      1190      1200
TCTTCTGCGTGGGGTTCTTCCGGTGGCGCAAGAGCCACTCCTCCAGCTAC
AGAAGACGCACCCCAAGAAGGCCACCGGTTCTCGGTGAGGAGGTGCGATG
_____ 534 TO 1196 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ _____>
_____ 61 TO 633 OF AB42-TRIMER.ENDO _____>
_____ 79 TO 723 OF HAB42TRIMER.E3.ENDO.SEQ [SPLIT _____>

```

10

20

30

40

```

                                >HindIII
                                |
      1210      1220      1230      1240 | 1250
      ACCCCCCTCTCCGGCTCCACCTATCCCGAGGGGCGCCACTAGAAAGCTTTC
      TGGGGGGAGAGGCCGAGGTGGATAGGGCTCCCCGCGGTGATCTTCGAAAG
      _____ 534 TO 1196 OF P4U-AB42TRIMERAMP.SEQ _____>
      _____ 61 TO 633 OF AB42-TRIMER.ENDO _____>
      _____ 79 TO 723 OF HAB42TRIMER.E3.ENDO.SE _____>

                                >NotI
                                |
      1260      1270      1280      1290      1300
      TAGTTCTAGAGCACTGGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACC
      ATCAAGATCTCGTGACCGCCGGCGCTGAGATCTAGTATTAGTCGGTATGG
      _____>

      1310      1320      1330      1340      1350
      ACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCT
      TGTAAACATCTCCAAAATGAACGAAATTTTTTGGAGGGTGTGGAGGGGGA

                                >BsmI      >HpaI
                                |          |
                                >MfeI      >HincII
                                ||         |
      1360      1370      || 1380      1390      1400
      GAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTG
      CTTGGACTTTGTATTTTACTTACGTTAACAACAACAATTGAACAAATAAC

                                >PsiI
                                |
      1410      1420      1430      1440      1450
      CAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAAT
      GTCGAATATTACCAATGTTTATTTTCGTTATCGTAGTGTTTAAAGTGTTTA

                                >BsmI
                                |
      1460      1470      1480      1490      1500
      AAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAA
      TTTCGTAAAAAAGTGACGTAAGATCAACACCAAACAGGTTTGAGTAGTT

                                >SspI
                                |
      1510      1520      1530 | 1540      1550
      TGTATCTTAAGGCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCG
      ACATAGAATTCGCGATTTAACATTGCAATTATAAAACAATTTTAAGCGC

      1560      1570      1580      1590      1600
      TTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGG
      AATTTAAAAACAATTTAGTCGAGTAAAAAATTGGTTATCCGGCTTTAGCC

                                >PsiI
                                |
      1610 | 1620      1630      1640      1650
      CAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTG

```

10

20

30

40

GTTTTAGGGAATATTTAGTTTTCTTATCTGGCTCTATCCCAACTCACAAC

1660 1670 1680 1690 1700  
TTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTC  
AAGGTCAAACCTTGTCTCAGGTGATAATTTCTTGACCTGAGGTTGCAG

1710 1720 1730 1740 1750  
AAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATC  
TTTCCCGCTTTTTGGCAGATAGTCCCGCTACCGGTGATGCACTTGGTAG

1760 1770 1780 1790 1800  
ACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGA  
TGGGATTAGTTCAAAAACCCAGCTCCACGGCATTTCGTGATTTAGCCT

1810 1820 1830 1840 1850  
ACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAAC  
TGGGATTTCCCTCGGGGGCTAAATCTCGAACTGCCCTTTTCGGCCGCTTG

1860 1870 1880 1890 1900  
GTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCT  
CACCGCTCTTTCCTTCCCTTCTTTTCGCTTTCCTCGCCCGCGATCCCGCGA

1910 1920 1930 1940 1950  
GGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTA  
CCGTTCACATCGCCAGTGCGACGCGCATTGGTGGTGTGGGCGGCGCAAT

1960 1970 1980 1990 2000  
ATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGC  
TACGCGGCGATGTCCCGCGCAGTCCACCGTGAAAAGCCCCTTTACACGCG

2010 2020 2030 2040 2050  
GGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCT  
CCTTGGGGATAAACAAATAAAAAGATTTATGTAAGTTTATACATAGGCGA

>SspI

2060 2070 2080 2090 2100  
CATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGA  
GTA CTCTGTTATTGGGACTATTTACGAAGTTATTATACTTTTCCTTCT

>Bsu36I

>PvuII

2110 2120 2130 2140 2150  
GTCCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTG  
CAGGACTCCGCCTTTCTTGGTCGACACCTTACACACAGTCAATCCCACAC

2160 2170 2180 2190 2200  
GAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTC  
CTTTCAGGGGTCCGAGGGGTCGTCCGTCTTCATACGTTTCGTACGTAGAG

>SexAI

2210 2220 2230 2240 2250  
AATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAG

```

TTAATCAGTCGTTGGTCCACACCTTTTCAGGGGTCCGAGGGGTCGTCCGTC
      2260      2270      2280      2290      2300
AAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCC
TTCATACGTTTCGTACGTAGAGTTAATCAGTCGTTGGTATCAGGGCGGGG

      2310      2320      2330      2340      2350
TAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCGCCCCATTCTCCG
ATTGAGGCGGGTAGGGCGGGGATTGAGGCGGGTCAAGGCGGGTAAGAGGC

      2360      2370      2380      2390      2400
CCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCCTC
GGGGTACCGACTGATTAAAAAAATAAATACGTCTCCGGCTCCGGCGGAG

                                                    >AvrII
                                                    |
                                                    >StuI
                                                    || 2410
      2420      2430      2440      || 2450
GGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAG
CCGGAGACTCGATAAGGTCTTCATCACTCCTCCGAAAAACCTCCGGATC

>ClaI
|
>BspDI
|
      2460      | 2470      2480      2490      2500
GCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGAT
CGAAAAACGTTTCTAGCTAGTTCTCTGTCTACTCCTAGCAAAGCGTACTA

      2510      2520      2530      2540      2550
TGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGC
ACTTGTTCTACCTAACGTGCGTCCAAGAGGCCGGCGAACCCACCTCTCCG

      2560      2570      2580      2590      2600
TATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCC
ATAAGCCGATACTGACCCGTGTTGTCTGTTAGCCGACGAGACTACGGCGG

      2610      2620      2630      2640      2650
GTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGA
CACAAAGGCCGACAGTCGCGTCCCCGCGGGCCAAGAAAAACAGTTCTGGCT

      2660      2670      2680      2690      2700
CCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGT
GGACAGGCCACGGGACTTACTTGACGTTCTGCTCCGTCGCGCCGATAGCA

                                                    >PvuII
                                                    |
>MscI
|
      2710      2720      | 2730      2740      2750
GGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGGCGAGCTGTGCTCGACGTTGTCACT
CCGACCGGTGCTGCCCCGAAGGAACGCGTCGACACGAGCTGCAACAGTGA

```

10

20

30

40

2760 2770 2780 2790 2800  
GAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCT  
CTTCGCCCTTCCCTGACCGACGATAACCCGCTTCACGGCCCCGTCTCTAGA

2810 2820 2830 2840 2850  
CCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATG  
GGACAGTAGAGTGGAACGAGGACGGCTCTTTCATAGGTAGTACCGACTAC

2860 2870 2880 2890 2900  
CAATGCCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTTCGACCAC  
GTTACGCCCGGACGTATGCGAACTAGGCCGATGGACGGGTAAGCTGGTG

2910 2920 2930 2940 2950  
CAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCT  
GTTTCGCTTTGTAGCGTAGCTCGCTCGTGATGAGCCTACCTTCGGCCAGA

2960 2970 2980 2990 3000  
TGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCG  
ACAGCTAGTCCTACTAGACCTGCTTCTCGTAGTCCCCGAGCGCGGTCTCGG

3010 3020 3030 3040 3050  
AACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCCGACGGCGAGGATCTCGTC  
TTGACAAGCGGTCCGAGTTCGCTCGTACGGGCTGCCGCTCCTAGAGCAG

3060 3070 3080 3090 3100  
GTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCG  
CACTGGGTACCGCTACGGACGAACGGCTTATAGTACCACCTTTTACCGGC

>RsrII

|

>AvaII

|

3110 3120 3130 3140 3150  
CTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATC  
GAAAAGACCTAAGTAGCTGACACCGGCCGACCCACACCGCCTGGCGATAG

3160 3170 3180 3190 3200  
AGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAA  
TCCTGTATCGCAACCGATGGGCACTATAACGACTTCTCGAACCGCCGCTT

3210 3220 3230 3240 3250  
TGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCA  
ACCCGACTGGCGAAGGAGCACGAAATGCCATAGCGGCGAGGGCTAAGCGT

3260 3270 3280 3290 3300  
GCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCT  
CGCGTAGCGGAAGATAGCGGAAGAACTGCTCAAGAAGACTCGCCCTGAGA

>BstBI

|

3310 3320 3330 3340 3350  
GGGGTTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATT  
CCCCAAGCTTTACTGGCTGGTTCGCTGCGGGTTGGACGGTAGTGCTCTAA

10

20

30

40

3360 3370 3380 3390 3400  
TCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTC  
AGCTAAGGTGGCGGCGGAAGATACTTTCCAACCCGAAGCCTTAGCAAAAG

3410 3420 3430 3440 3450  
CGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTT  
GCCCTGCGGCCGACCTACTAGGAGGTCGCGCCCCTAGAGTACGACCTCAA

>AvrII

3460 3470 3480 3490 3500  
CTTCGCCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATAC  
GAAGCGGGTGGGATCCCCCTCCGATTGACTTTGTGCCTTCCTCTGTTATG

3510 3520 3530 3540 3550  
CGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCAC  
GCCTTCCTTGGGCGCGATACTGCCGTTATTTTTCTGTCTTATTTTGCCTG

>AvaII

3560 3570 3580 3590 3600  
GGTGTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCCGGTCCCAGGGCTGGCA  
CCACAACCCAGCAAACAAGTATTTGCGCCCCAAGCCAGGGTCCCAGCCGT

3610 3620 3630 3640 3650  
CTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATGGGGCCAATACGCCCCGCTTT  
GAGACAGCTATGGGGTGGCTCTGGGGTAACCCCGTTATGCGGGCGCAAA

3660 3670 3680 3690 3700  
CTTCCTTTTCCCCACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTC  
GAAGGAAAAGGGGTGGGGTGGGGGTTCAAGCCCACTTCCGGGTCCCAG

>EcoO109I

>Bsu36I

3710 3720 3730 3740 3750  
GCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATA  
CGTCGGTTGCAGCCCCGCCGTCCGGGACGGTATCGGAGTCCAATGAGTAT

3760 3770 3780 3790 3800  
TATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGG  
ATATGAAATCTAACTAAATTTGAAGTAAAAATTAAATTTTCCTAGATCC

3810 3820 3830 3840 3850  
TGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTT  
ACTTCTAGGAAAACTATTAGAGTACTGGTTTTAGGGAATTGCACTCAAA

3860 3870 3880 3890 3900  
TCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG  
AGCAAGGTGACTCGCAGTCTGGGGCATCTTTCTAGTTTCTTAGAAGAAC

3910 3920 3930 3940 3950  
AGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACAC  
TCTAGGAAAAAAGACGCGCATTAGACGACGAACGTTTGTTTTTTGGTG

10

20

30

40

3960 3970 3980 3990 4000  
CGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTT  
GCGATGGTCGCCACCAACAAACGGCCTAGTTCTCGATGGTTGAGAAAAA

4010 4020 4030 4040 4050  
CCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCCTTCT  
GGCTTCCATTGACCGAAGTCGTCTCGCGTCTATGGTTTATGACAGGAAGA

4060 4070 4080 4090 4100  
AGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC GCCTA  
TCACATCGGCATCAATCCGGTGGTGAAGTTCTTGAGACATCGTGGCGGAT

4110 4120 4130 4140 4150  
CATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGAT  
GTATGGAGCGAGACGATTAGGACAATGGTCACCGACGACGGTCACCGCTA

4160 4170 4180 4190 4200  
AAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGC  
TTCAGCACAGAATGGCCCAACCTGAGTTCTGCTATCAATGGCCTATTCCG

4210 4220 4230 4240 4250  
GCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGC  
CGTCGCCAGCCGACTTGCCCCCAAGCACGTGTGTGGGTGCAACCTCG

4260 4270 4280 4290 4300  
GAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGC  
CTTGCTGGATGTGGCTTGACTCTATGGATGTCGCACTCGATACTCTTTTCG

4310 4320 4330 4340 4350  
GCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG  
CGGTGCGAAGGGCTTCCCTCTTTCCGCCTGTCCATAGGCCATTGCGCGTC

4360 4370 4380 4390 4400  
GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGT  
CCAGCCTTGTCTCTCGCGTGCTCCCTCGAAGGTCCCCCTTTGCGGACCA

4410 4420 4430 4440 4450  
ATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTT  
TAGAAATATCAGGACAGCCCAAAGCGGTGGAGACTGAACTCGCAGCTAAA

4460 4470 4480 4490 4500  
TTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC  
AACACTACGAGCAGTCCCCCGCCTCGGATACCTTTTTGCGGTGCTTGCG

>PciI

4510 4520 4530 4540 4550  
GGCCTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCT  
CCGGAAAAATGCCAAGGACCGGAAAACGACCGGAAAACGAGTGTACAAGA

4560 4570 4580 4590 4600  
TTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT  
AAGGACGCAATAGGGGACTAAGACACCTATTGGCATAATGGCGGTACGTA

( 配列番号 :1)

10

20

30

40

Pcmv-Gal4.

```

      >NruI                      >MluI                      >SpeI
      |                          |                          |
      20      30      40      50
GACTCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGA
CTGAGAAGCGCTACATGCCCGGTCTATATGCGCAACTGTAATAATAACT

      >AseI
      |
      60      70      80      90      100
CTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATAT
GATCAATAATTATCATTAGTTAATGCCCCAGTAATCAAGTATCGGGTATA

      110      120      130      140      150
ATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC
TACCTCAAGGCGCAATGTATTGAATGCCATTTACCGGGCGGACCGACTGG

      160      170      180      190      200
GCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAG
CGGGTTGCTGGGGGCGGGTAACTGCAGTTATTACTGCATACAAGGGTATC

      210      220      230      240      250
TAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGG
ATTGCGGTTATCCCTGAAAGGTAAGTGCAGTTACCCACCTGATAAATGCC

      >NdeI
      |
      260      270      280      290      300
TAAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC
ATTTGACGGGTGAACCGTCATGTAGTTCACATAGTATACGGTTCATGCGG

      310      320      330      340      350
CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT
GGGATAACTGCAGTTACTGCCATTTACCGGGCGGACCGTAATACGGGTCA

      >SnaBI
      |
      360      370      380      390      400
ACATGACCTTATGGGACTTTCTTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC
TGTAAGGATACCCCTGAAAGGATGAACCGTCATGTAGATGCATAATCAG

      >NcoI
      |
      >BtgI
      |
      410      420      430      440      450
ATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG
TAGCGATAATGGTACCACTACGCCAAAACCGTCATGTAGTTACCCGCACC

      460      470      480      490      500
ATAGCGGTTTGAATCACGGGGATTTCCTCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCA
TATCGCCAAACTGAGTGCCCTAAAGGTTTCAGAGGTGGGGTAACTGCAGT

```

10

20

30

40

510 520 530 540 550  
 ATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGT  
 TACCCTCAAACAAAACCGTGGTTTTAGTTGCCCTGAAAGGTTTTACAGCA  
 560 570 580 590 600  
 AACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGA  
 TTGTTGAGGCGGGGTAAGTACGTTTACCCGCCATCCGCACATGCCACCCT  
 >SacI  
 610 620 630 640 650  
 GGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACT  
 CCAGATATATTCTGCTCTGAGAGACCGATTGATCTCTTGGGTGACGAATGA  
 >BmtI  
 >AseI  
 660 670 680 690 700  
 GGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAG  
 CCGAATAGCTTTAATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGTTGACCGGATC  
 >KpnI  
 >AflIII >Acc65I >BamHI  
 >PmeI >HindIII >SacI >SpeI  
 710 720 730 740 750  
 CGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGG  
 GCAAATTTGAATTCGAACCATGGCTCGAGCCTAGGTGATCAGGTCACACC  
 >EcoRI  
 760 770 780 790 800  
 TGGAATTCACGCCGCCACCATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAACAAGCA  
 ACCTTAAGGTGCGGCGGTGGTACTTCGATGACAGAAGATAGCTTGTTCGT  
 1 TO 2658 OF GAL4.DNA  
 810 820 830 840 850  
 TGCGATATTTGCCGACTTAAAAAGCTCAAGTGCTCCAAAGAAAAACCGAA  
 ACGCTATAAACGGCTGAATTTTTTCGAGTTCACGAGGTTTCTTTTTGGCTT  
 1 TO 2658 OF GAL4.DNA  
 860 870 880 890 900  
 GTGCGCCAAGTGTCTGAAGAACAAGTGGGAGTGTCGCTACTCTCCCAAAA  
 CACGCGGTTACAGACTTCTTGTGACCCTCACAGCGATGAGAGGGTTTT  
 1 TO 2658 OF GAL4.DNA  
 910 920 930 940 950  
 CCAAAGGTCTCCGCTGACTAGGGCACATCTGACAGAAGTGGAATCAAGG  
 GGTTTTCCAGAGGCGACTGATCCCGTGTAGACTGTCTTCACCTTAGTTC  
 1 TO 2658 OF GAL4.DNA

10

20

30

40

```

                                >AvaI
                                |
                                >BsoBI
                                |
                                >PaeR7I
                                |
                                >TliI
                                |
                                >XhoI
                                |
                                >HpaI
                                |
960      970      980      990      1000
CTAGAAAGACTGGAACAGCTATTTCTACTGATTTTTCCTCGAGAAGACCT
GATCTTTCTGACCTTGTTCGATAAAGATGACTAAAAAGGAGCTCTTCTGGA
_____ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA _____>

                                >HpaI
                                |
                                1010
1020      1030      1040      1050
TGACATGATTTTGAAAATGGATTCTTTACAGGATATAAAAGCATTGTTAA
ACTGTACTAAACTTTTACCTAAGAAATGTCCTATATTTTCGTAACAATT
_____ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA _____>

                                >BsrGI
                                |
1060      1070      1080      1090      1100
CAGGATTATTTGTACAAGATAATGTGAATAAAGATGCCGTCACAGATAGA
GTCCTAATAAACATGTTCTATTACACTTATTTCTACGGCAGTGTCTATCT
_____ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA _____>

1110      1120      1130      1140      1150
TTGGCTTCAGTGGAGACTGATATGCCTCTAACATTGAGACAGCATAGAAT
AACCGAAGTCACCTCTGACTATACGGAGATTGTAACCTCTGTCGTATCTTA
_____ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA _____>

1160      1170      1180      1190      1200
AAGTGCGACATCATCATCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGT
TTCACGCTGTAGTAGTACCTTCTCTCATCATTGTTTCCAGTTTCTGTCA
_____ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA _____>

                                >ClaI
                                |
                                >BspDI
                                |
1210      1220      1230      1240      1250
TGACTGTATCGATTGACTCGGCAGCTCATCATGATAACTCCACAATTCCG
ACTGACATAGCTAACTGAGCCGTCGAGTAGTACTATTGAGGTGTTAAGGC
_____ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA _____>

1260      1270      1280      1290      1300
TTGGATTTTATGCCCAGGGATGCTCTTCATGGATTTGATTGGTCTGAAGA
AACCTAAAATACGGGTCCCTACGAGAAGTACCTAACTAACCAGACTTCT
_____ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA _____>

                                >PciI

```

10

20

30

40

1  
 1310 1320 1330 1340 1350  
 GGATGACATGTCGGATGGCTTGCCCTTCCTGAAAACGGACCCCAACAATA  
 CCTACTGTACAGCCTACCGAACGGGAAGGACTTTTGCCTGGGGTTGTTAT  
 \_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

1360 1370 1380 1390 1400  
 ATGGGTTCTTTGGCGACGGTCTCTCTTATGTATTCTTCGATCTATTGGC  
 TACCCAAGAAACCGCTGCCAAGAGAGAATACATAAGAAGCTAGATAACCG  
 \_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

>HpaI  
 |  
 >AclI |  
 | |  
 1410 1420 1430 1440 1450  
 TTAAACCGGAAAATTACACGAACCTAACGTTAACAGGCTCCCGACCAT  
 AAATTTGGCCTTTTAAATGTGCTTGAGATTGCAATTGTCCGAGGGCTGGTA  
 \_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

>XbaI  
 |  
 1460 1470 1480 1490 1500  
 GATTACGGATAGATACACGTTGGCTTCTAGATCCACAACATCCCGTTTAC  
 CTAATGCCTATCTATGTGCAACCGAAGATCTAGGTGTTGTAGGGCAAATG  
 \_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

>ApaLI  
 |  
 1510 1520 1530 1540 1550  
 TTCAAAGTTATCTCAATAATTTTACCCCTACTGCCCTATCGTGCACTCA  
 AAGTTTCAATAGAGTTATTAAAAGTGGGGATGACGGGATAGCACGTGAGT  
 \_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

1560 1570 1580 1590 1600  
 CCGACGCTAATGATGTTGTATAATAACCAGATTGAAATCGCGTCGAAGGA  
 GGCTGCGATTACTACAACATATTATTGGTCTAACTTTAGCGCAGCTTCCT  
 \_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

1610 1620 1630 1640 1650  
 TCAATGGCAAATCCTTTTAACTGCATATTAGCCATTGGAGCCTGGTGTA  
 AGTTACCGTTTAGGAAAAATTGACGTATAATCGGTAACCTCGGACCACAT  
 \_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

1660 1670 1680 1690 1700  
 TAGAGGGGGAATCTACTGATATAGATGTTTTTACTATCAAAATGCTAAA  
 ATCTCCCCCTTAGATGACTATATCTACAAAAAATGATAGTTTTACGATTT  
 \_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

1710 1720 1730 1740 1750  
 TCTCATTTGACGAGCAAGGTCTTCGAGTCAGGTCCATAATTTTGGTGAC  
 AGAGTAACTGCTCGTTCCAGAAGCTCAGTCCAAGGTATTAAAACCACTG  
 \_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

10

20

30

40

40

ACGAACTACTAAACATTACTCTAACTCCTCCAAAGCTCTGTCCGTGGTTT  
\_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

2210 2220 2230 2240 2250  
GTTTTTACAAATGGATATTTCCACCACCGCTCTAACCAATTTGTTGAAGG  
CAAAAATGTTTACCTATAAAGGTGGTGGCGAGATTGGTTAAACAACCTCC  
\_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

>BstBI

2260 2270 2280 2290 2300  
AACACCCTTGGCTATCCTTTACAAGATTCTGAAGTGGAAACAGTTG  
TTGTGGGAACCGATAGGAAATGTTCTAAGCTTGACTTCACCTTTGTCAAC  
\_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

2310 2320 2330 2340 2350  
TCTCTTATCATTATGTATTAAGAGATTTTTTCACTAATTTTACCCAGAA  
AGAGAATAGTAAATACATAATTCTCTAAAAAAGTGATTAAATGGGTCTT  
\_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

2360 2370 2380 2390 2400  
AAAGTCACAACACTAGAACAGGATCAAAATGATCATCAAAGTTATGAAGTTA  
TTTCAGTGTTGATCTTGTCTAGTTTACTAGTAGTTTCAATACTTCAAT  
\_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

2410 2420 2430 2440 2450  
AACGATGCTCCATCATGTTAAGCGATGCAGCACAAAGAACTGTTATGTCT  
TTGCTACGAGGTAGTACAATTCGCTACGTCGTTTCTTGACAATACAGA  
\_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

2460 2470 2480 2490 2500  
GTAAGTAGCTATATGGACAATCATAATGTCACCCCATATTTTGCTGGAA  
CATTTCATCGATATACCTGTTAGTATTACAGTGGGTATAAAACGGACCTT  
\_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

2510 2520 2530 2540 2550  
TTGTTCTTATTACTTGTTCATGCGAGTCCTAGTACCCATAAAGACTCTAC  
AACAAGAATAATGAACAAGTTACGTCAGGATCATGGGTATTTCTGAGATG  
\_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

>BsmI

2560 2570 2580 2590 2600  
TCTCAAACCTCAAATCGAATGCTGAGAATAACGAGACCGCACAAATTATTA  
AGAGTTTGAGTTTTAGCTTACGACTCTTATTGCTCTGGCGTGTTAATAAT  
\_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

2610 2620 2630 2640 2650  
CAACAAATTAACACTGTTCTGATGCTATTAATAAACTGGCCACTTTTAA  
GTTGTTTAATTGTGACAAGACTACGATAATTTTTTGACCGGTGAAAATT  
\_\_\_\_\_ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA \_\_\_\_\_>

>ScaI

|

10

20

30

40

2660 2670 2680 2690 2700  
AATCCAGACTTGTGAAAAATACATTCAAGTACTGGAAGAGGTATGTGCGC  
TTAGGTCTGAACACTTTTTATGTAAGTTCATGACCTTCTCCATACACGCG  
1 TO 2658 OF GAL4.DNA >

>PsiI  
2710  
2720 2730 2740 2750  
CGTTTCTGTTATCACAGTGTGCAATCCATTACCGCATATCAGTTATAAC  
GCAAAGACAATAGTGTACACGTTAGGGTAATGGCGTATAGTCAATATTG  
1 TO 2658 OF GAL4.DNA >

>SspI  
2760 2770 2780 2790 2800  
AATAGTAATGGTAGCGCCATTAAAAATATTGTCGGTCTGCAACTATCGC  
TTATCATTACCATCGCGGTAATTTTATAACAGCCAAGACGTTGATAGCG  
1 TO 2658 OF GAL4.DNA >

>BspEI  
2810 2820 2830 2840 2850  
CCAATACCCTACTCTTCCGGAGGAAAATGTCAACAATATCAGTGTAAAT  
GGTTATGGGATGAGAAGGCCTCCTTTTACAGTTGTTATAGTCACAATTTA  
1 TO 2658 OF GAL4.DNA >

2860 2870 2880 2890 2900  
ATGTTTCTCCTGGCTCAGTAGGGCCTTCACCTGTGCCATTGAAATCAGGA  
TACAAAGAGGACCGAGTCATCCCGGAAGTGGACACGGTAACTTTAGTCCT  
1 TO 2658 OF GAL4.DNA >

2910 2920 2930 2940 2950  
GCAAGTTTCAGTGATCTAGTCAAGCTGTTATCTAACCGTCCACCCTCTCG  
CGTTCAAAGTCACTAGATCAGTTCGACAATAGATTGGCAGGTGGGAGAGC  
1 TO 2658 OF GAL4.DNA >

2960 2970 2980 2990 3000  
TAACTCTCCAGTGACAATACCAAGAAGCACACCTTCGCATCGCTCAGTCA  
ATTGAGAGGTCACTGTTATGGTTCTTCGTGTGGAAGCGTAGCGAGTCAGT  
1 TO 2658 OF GAL4.DNA >

>BstAPI  
3010 3020 3030 3040 3050  
CGCCTTTTCTAGGGCAACAGCAACAGCTGCAATCATTAGTGCCACTGACC  
GCGGAAAAGATCCCGTTGTCGTTGTCGACGTTAGTAATCACGCTGACTGG  
1 TO 2658 OF GAL4.DNA >

>SspI  
3060  
3070 3080 3090 3100  
CCGTCTGCTTTGTTTGGTGGCGCCAATTTTAATCAAAGTGGGAATATTGC  
GGCAGACGAAACAAACCACCGGTTAAATAGTTTACCCTTATAACG  
1 TO 2658 OF GAL4.DNA >

10

20

30

40

```

                                     >RsrII
                                     |
          3110      3120      3130      3140|      3150
TGATAGCTCATTGTCCTTCACTTTCACTAACAGTAGCAACGGTCCGAACC
ACTATCGAGTAACAGGAAGTGAAAGTGATTGTCATCGTTGCCAGGCTTGG
_____ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA _____>

                                     >AfeI      >MfeI
                                     |      |
          3160      3170      3180      3190      3200
TCATAACAACCTCAAACAAATTCTCAAGCGCTTTTACAACCAATTGCCTCC
AGTATTGTTGAGTTTGTTTAAGAGTTTCGCGAAAGTGTTGGTTAACGGAGG
_____ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA _____>

          >AclI
          |
          | 3210      3220      3230      3240      3250
TCTAACGTTTCATGATAACTTCATGAATAATGAAATCACGGCTAGTAAAAT
AGATTGCAAGTACTATTGAAGTACTTATTACTTTAGTGCCGATCATTTTA
_____ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA _____>

                                     >SexAI
                                     |
          3260      3270      3280|      3290      3300
TGATGATGGTAATAATTCAAAACCACTGTACCTGGTTGGACGGACCAAA
ACTACTACCATTATTAAGTTTTTGGTGACAGTGACCAACCTGCCTGGTTT
_____ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA _____>

          >MluI
          |
          | 3310      3320      3330      3340      3350
CTGCGTATAACGCGTTTGAATCACTACAGGGATGTTTAATACCACTACA
GACGCATATTGCGCAAACCTTAGTGATGTCCCTACAAATTATGGTGATGT
_____ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA _____>

          3360      3370      3380      3390      3400
ATGGATGATGTATATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCCAACAAA
TACCTACTACATATATTGATAGATAAGCTACTACTTCTATGGGGTGTTT
_____ 1 TO 2658 OF GAL4.DNA _____>

          >AvaI
          |
          >BsoBI
          |
          >PaeR7I
          |
          >PspXI      >XbaI
          |      |
          >NotI      >TliI      |      >ApaI
          |      |      |      |
          >EagI      >XhoI      |      >PspOMI      >PmeI
          |      |      |      |      |
          3420      |      3430      |      3440      |      3450

```

10

20

30

40

CCCCAAAAAAGAGTAAGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACC  
GGGTTTTTTTCTCATTGCGCGGCGAGCTCAGATCTCCCGGGCAAATTTGG

\_\_\_1 TO 2658\_\_\_>

3460 3470 3480 3490 3500  
CGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTG  
GCGACTAGTCGGAGCTGACACGGAAGATCAACGGTCGGTAGACAACAAC

3510 3520 3530 3540 3550  
CCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCC  
GGGGAGGGGGCACGGAAGGAAGTGGGACCTTCCACGGTGAGGGTGACAGG

10

3560 3570 3580 3590 3600  
TTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAT  
AAAGGATTATTTTACTCCTTTAACGTAGCGTAACAGACTCATCCACAGTA

3610 3620 3630 3640 3650  
TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGA  
AGATAAGACCCCCACCCACCCCGTCTGTCGTTCCCCCTCCTAACCCCT

3660 3670 3680 3690 3700  
AGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTACTG  
TCTGTTATCGTCCGTACGACCCCTACGCCACCCGAGATACCGAAGATGAC

20

3710 3720 3730 3740 3750  
GGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCAGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCT  
CCGCCAAAATACCTGTCGTTGCTTGGCCTTAACGGTCGACCCCGCGGGA

3760 3770 3780 3790 3800  
CTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTCGCCG  
GACCATTCCAACCCTTCGGGACGTTTCATTTGACCTACCGAAAGAGCGGC

3810 3820 3830 3840 3850  
CCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATG  
GGTTCCTAGACTACCGCGTCCCTAGTTCGAGACTAGTTCTCTGTCTCTAC

30

>EagI

| 3860

3870 3880 3890 3900  
AGGATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGG  
TCCTAGCAAAGCGTACTAAGTTGTTCTACCTAACGTGCGTCCAAGAGGCC

3910 3920 3930 3940 3950  
CCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATC  
GGCGAACCACCTCTCCGATAAGCCGATACTGACCCGTGTTGTCTGTCTAG

3960 3970 3980 3990 4000  
GGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGT  
CCGACGAGACTACGGCGGCACAAGCCGACAGTCGCGTCCCCGCGGGCCA

40

4010 4020 4030 4040 4050  
TCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACG  
AGAAAAACAGTTCTGGCTGGACAGGCCACGGGACTTACTTGACGTTCTGC

```

                                >FspI
                                |
      4060      4070      4080      4090      |      4100
AGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCT
TCCGTCGCGCCGATAGCACCGACCGGTGCTGCCCGCAAGGAACGCGTCGA

      4110      4120      4130      4140      4150
GTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGA
CACGAGCTGCAACAGTGACTTCGCCCTTCCCTGACCGACGATAACCCGCT

      4160      4170      4180      4190      4200
AGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAG
TCACGGCCCCGTCCTAGAGGACAGTAGAGTGGAACGAGGACGGCTCTTTC

      4210      4220      4230      4240      4250
TATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCT
ATAGGTAGTACCGACTACGTTACGCCGCCGACGTATGCGAACTAGGCCGA

      4260      4270      4280      4290      4300
ACCTGCCCCATTGACCAACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAC
TGGACGGGTAAAGCTGGTGGTTGCTTTGTAGCGTAGCTCGCTCGTGCATG

                                >BsrFI
                                |
      4310 |      4320      4330      4340      4350
TCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATC
AGCCTACCTTCGGCCAGAACAGCTAGTCCTACTAGACCTGCTTCTCGTAG

      4360      4370      4380      4390      4400
AGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCC
TCCCCGAGCGCGGTGCGCTTGACAAGCGGTCCGAGTTCGCTCGTACGGG

                                >BtgI
                                |
                                >NcoI
                                |
      4410      4420      |      4430      4440      4450
GACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATAT
CTGCCGCTCCTAGAGCAGCACTGGGTACCGCTACGGACGAACGGCTTATA

                                >NaeI
                                |
                                >NgoMIV
                                | |
                                >BsrFI
                                | |
      4460      4470      4480      4490      | |      4500
CATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGG
GTACCACCTTTTACCGGCGAAAAGACCTAAGTAGCTGACACCGGCCGACC

                                >RsrII
                                |
      4510      4520      4530      4540      4550
GTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCT

```

10

20

30

40

CACACCGCCTGGCGATAGTCCTGTATCGCAACCGATGGGCACTATAACGA

>BssSI

|

4560 4570 4580 | 4590 4600  
GAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTAT  
CTTCTCGAACCGCCGCTTACCCGACTGGCGAAGGAGCACGAAATGCCATA

4610 4620 4630 4640 4650  
CGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGT  
GCGGCGAGGGGCTAAGCGTCGCGTAGCGGAAGATAGCGGAAGAACTGCTCA

10

4660 4670 4680 4690 4700  
TCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTT  
AGAAGACTTAATAATTGCGAATGTTAAAGGACTACGCCATAAAAAGAGGAA

4710 4720 4730 4740 4750  
ACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATAACAGGTGGCACTTTTCGGGGG  
TGCGTAGACACGCCATAAAGTGTGGCGTATGTCCACCGTGAAAAGCCCCT

4760 4770 4780 4790 4800  
AATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATAT  
TTACACGCGCCTTGGGGATAAACAAATAAAAAGATTTATGTAAGTTTATA

20

>PmlI

| 4810

4820 4830 4840 4850  
GTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACG  
CATAGGCGAGTACTCTGTTATTGGGACTATTTACGAAGTTATTATCGTGC

4860 4870 4880 4890 4900  
TGCTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT  
ACGATTTTGAAGTAAAAATTAAATTTTCTAGATCCACTTCTAGGAAAAA

4910 4920 4930 4940 4950  
GATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGC  
CTATTAGAGTACTGGTTTTAGGGAATTGCACTCAAAGCAAGGTGACTCG

30

4960 4970 4980 4990 5000  
GTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTC  
CAGTCTGGGGCATCTTTTCTAGTTTCTAGAGAAGTCTAGGAAAAAAG

5010 5020 5030 5040 5050  
TGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTG  
ACGCGCATTAGACGACGAACGTTTGTTTTTTGGTGGCGATGGTCGCCAC

5060 5070 5080 5090 5100  
GTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGG  
CAAACAAACGGCCTAGTTCTCGATGGTTGAGAAAAAGGCTTCCATTGACC

40

5110 5120 5130 5140 5150  
CTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGT  
GAAGTCGTCTCGCGTCTATGGTTTATGACAGGAAGATCACATCGGCATCA

5160 5170 5180 5190 5200  
TAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTG  
ATCCGGTGGTGAAGTTCTTGAGACATCGTGGCGGATGTATGGAGCGAGAC  
5210 5220 5230 5240 5250  
CTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTAC  
GATTAGGACAATGGTCACCGACGACGGTCACCGCTATTGAGCAGAGAATG

5260 5270 5280 5290 5300  
CGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCT  
GCCCCAACCTGAGTTCTGCTATCAATGGCCTATTCCGCGTCGCCAGCCCCGA

10

>ApaLI

5310 | 5320 5330 5340 5350  
GAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACC  
CTTGCCCCCAAGCACGTGTGTGCGGTCGAACCTCGCTTGCTGGATGTGG

5360 5370 5380 5390 5400  
GAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGA  
CTTGACTCTATGGATGTGCGACTCGATACTCTTTTCGCGGTGCGAAGGGCT

5410 5420 5430 5440 5450  
AGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAG  
TCCCTCTTTCCGCCTGTCCATAGGCCATTGCGCGTCCCAGCCTTGTCCTC

20

>BssSI

|  
| 5460 5470 5480 5490 5500  
AGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCT  
TCGCGTGCTCCCTCGAAGGTCCCCCTTTGCGGACCATAGAAATATCAGGA

5510 5520 5530 5540 5550  
GTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTC  
CAGCCCAAAGCGGTGGAGACTGAACTCGCAGCTAAAAACTACGAGCAG

5560 5570 5580 5590 5600  
AGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGCCCTTTTACGGT  
TCCCCCGCCTCGGATACCTTTTTCGCGTCTGCGCCGAAAAATGCCA

30

>PciI

|  
5610 5620 5630  
TCCTGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT  
AGGACCCGAAAACGACCGGAAAACGAGTGTACAAGAA

( 配列番号 : 4 )

ABeta 42 Peptide

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 10  
15  
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25  
30  
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala ( 配列番号 : 3 )  
35 40

40

【 0 0 4 9 】

遺伝子銃及び金粒子を必要としない、a ベータ 4 2 アルツハイマー病 D N A ワクチンの  
筋肉内送達。

50

## 【0050】

A Dワクチンの商品化の主な障害は、患者送達について無菌条件下及び実用条件下でのA Dワクチンベクターの送達だった。遺伝子銃は、製薬業界及びFDA規制機関にとって問題があるように思われる。他の様式の送達が、上記及び他のもの、例えばエレクトロポレーションによって取り組まれてきたが、効果がないと分かった。

## 【0051】

驚くべきことに、発明者は、A D単一DNAベクター及び低濃度のA ベータ42ペプチドの筋肉内注射が、図5に示すようにA ベータ42ペプチドに対してとても高い抗体力価を引き起こすことをここに示す。

## 【0052】

図5は、三量体DNA + 10  $\mu$ g のA  $\beta$  ペプチド（又は別個の注射）による4筋肉注射（週に1回（20  $\mu$ g）を行い、抗体を6週目に検査した結果を示すグラフである。アジュバントを含まないDNA + ペプチドがより強い免疫応答を引き起こすことが分かった。

## 【0053】

抗体アイソタイププロファイルを分析し、Th1 / Th2 応答のバランスを決定した。驚くべきことに、本発明のアプローチはアジュバントを必要としなかったことが分かった。ここに教示される組成物の注射の簡単で早い方法は、治験及び患者に対する臨床使用を大きく拡大する。

## 【0054】

送達されたDNA及びa ベータ45ペプチドを使用して生成される抗体のアイソタイプ。筋肉内注射によって：三量体単一DNAベクター（pv1-h3）20  $\mu$ g + 10  $\mu$ g のa ベータ42ペプチドを、合計で4週間、週に1回、マウスの筋肉に注射した。血清をマウスから取得し、ELISA方法を使用して6週目にa ベータアイソタイプ抗体を検査した。

## 【0055】

図6に見られるように、アジュバントを含まない三量体DNA + ペプチドは、ペプチド単体と比較してより強い免疫応答を引き起こした。より高いアイソタイプ抗体レベルが、DNA + ペプチドで得られた。両グループがTh1及びTh2反応を誘導したが、Th2が優勢だった（IgG1及びIgG2a）。

## 【0056】

図6は、4筋肉注射4回（週に1回）の筋肉注射（20  $\mu$ g の三量体DNA + 10  $\mu$ g のA  $\beta$  ペプチド）からの結果を示すグラフであり、血清をELISA法により6週目にA ベータアイソタイプ抗体について検査した。アジュバントを含まないDNA + ペプチドは、ペプチド単体と比較してより強い免疫応答を引き起こした。より高いアイソタイプ抗体レベルが、DNA + ペプチドで得られたが、両グループとも、主にTh2（IgG1及びIgG2a）に偏って、Th1及びTh2反応を誘導した。

## 【0057】

このように、三量体DNAベクターが、遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなく、筋肉内注射によって送達できることが分かった。さらに、抗体のレベル（30  $\mu$ g / ml）は、筋肉内注射又は静脈内注射では、DNA（3  $\mu$ g / ml）又はペプチド単体（10  $\mu$ g / ml）より有意に高い。さらに、生成された抗体は、図5に示すように、主にTh2 応答（IgG1及びIgG2a）だった。

## 【0058】

本明細書において議論した実施形態は、本発明のいかなる方法、キット、試薬、又は組成物に関しても実行することができると考えられ、逆もまた同じである。さらに、本発明の組成物は本発明の方法を成し遂げるために使用することができる。

## 【0059】

本明細書に記載される特定の実施形態は、例示のために示され、本発明の限定としてではないことが理解される。本発明の主要な特性は、本発明の範囲を逸脱することなく、様々な実施形態において用いることができる。当業者は、ただの日常の実験を用いて、本明

10

20

30

40

50

細書に記載の特定の手順の多くの等価物を認識する又は確かめることができる。そのような等価物は、本発明の範囲内にあると考えられ、特許請求の範囲によってカバーされる。

#### 【0060】

本明細書に述べた、全ての出版物及び特許出願は、本発明が属する当業者の技術のレベルを示している。全ての出版物及び特許出願は、それぞれ個々の出版物又は特許出願が参照により組み込まれることが具体的に及び個々に示されるのと同程度に、本明細書に参照により組み込まれる。

#### 【0061】

特許請求の範囲及び／又は明細書中で用語「含む (comprising)」と併せて使用した場合、単語「1つの (a)」又は「1つの (an)」の使用は、「1つの (one)」を意味し得るが、「1又は2以上」「少なくとも1つ」及び「1又は1より大きい」の意味とも一致する。特許請求の範囲中の用語「又は」の使用は、代替物のみ又は代替物が相互に排他的であることを指すとはっきりと示されない限り「及び／又は」を意味するために使用されるが、本開示は代替物のみ及び「及び／又は」を指す定義を支持する。本出願を通して、用語「約」は、値がデバイスのエラーの固有の変動を含むことを示すために使用され、本方法は、研究対象中に存在する値又は変動を決定するために用いられる。

#### 【0062】

本明細書及び特許請求の範囲（複数可）において使用されるように、単語「含む (comprising)」(並びに「含む (comprise)」及び「含む (comprises)」など、「含む」の任意の形態)、「有する (having)」(並びに「有する (have)」及び「有する (has)」など、「有する」の任意の形態)、「含む (including)」(並びに「含む (includes)」及び「含む (include)」など、含むの任意の形態)、「又は」含有する (containing)」(並びに「含有する (contains)」及び「含有する (contain)」など、含有するの任意の形態)は、包括的であり又は制限がなく、さらなる列挙されていない要素又は方法ステップを除外しない。本明細書において提供される任意の組成物及び方法の実施形態において、「含む (comprising)」は「から本質的になる (consisting essentially of)」又は「からなる (consisting of)」で置き換えることができる。本明細書で使用されるように、句「から本質的になる (consisting essentially of)」は、特定の整数（複数可）又はステップ、並びに請求した本発明の特徴又は機能に実質的に影響しないものを必要とする。本明細書で使用されるように、用語「からなる (consisting)」は、列挙した整数の存在（例えば、特性、要素、特徴、性質、方法／プロセスステップ、又は制限）又は整数の群（例えば、特性（複数可）、要素（複数可）、特徴（複数可）、性質（複数可）、方法／プロセスステップ、又は制限（複数可））のみを示すために使用される。

#### 【0063】

本明細書で使用されるように、用語「又はそれらの組合せ」は、用語の前に列挙した項目の全ての並べ替え及び組合せを指す。例えば、「A、B、C、又はそれらの組合せ」は、A、B、C、AB、AC、BC、又はABC、また特定の文脈において順序が重要な場合には、BA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BAC又はCABの少なくとも1つを含むことを意図する。この例に続いて、例えばBB、AAA、AB、BBC、AAABCC、CBBAAA、CABABBなど、1又は2以上の項目又は用語の繰り返しを含有する組合せが明確に含まれる。文脈からそうでないことが明らかでない限り、通常いかなる組合せにおいても項目又は用語の数に制限はないことを当技術者は理解する。

#### 【0064】

本明細書で使用されるように、およその単語、例えば、制限することなく、「約」、「実質的な」、又は「実質的には」は、そのように修飾された場合、必ずしも絶対でも完全でもない理解されるが、当業者が、条件が存在すると指定することを正当化するのに十分に近いと考えられる条件を指す。記載を変え得る程度は、いかに大きな変化を設定することができるか、及び当業者に、改変した特性が改変していない特性の必要な特徴及び能力を依然として有するとなおも認識させるかによる。先の議論の対象であるが、一般に、「約」など、およその単語によって修飾された本明細書における数値は、少なくとも±1

、2、3、4、5、6、7、10、12、又は15%述べた値から変動し得る。

【0065】

本明細書において開示及び請求された組成物及び／又は方法の全ては、本開示に照らして、過度の実験なく作製及び実行できる。本発明の組成物及び方法が、好ましい実施形態に関して記載されているが、変形形態が本発明の概念、精神及び範囲から逸脱することなく、本明細書に記載される組成物及び／又は方法並びに方法のステップ又はステップの順序に適用できることが当業者には明らかである。当業者に明らかな全てのそのような類似の代替物及び改変物は、添付の特許請求の範囲により定義したように本発明の精神、範囲及び概念内にあると考えられる。

【図1】

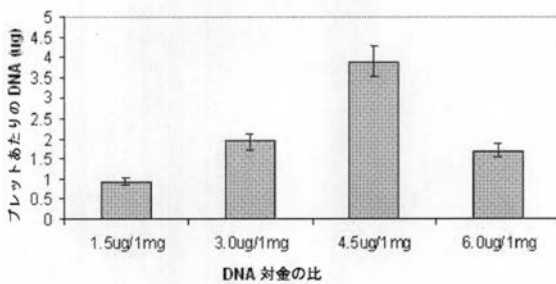


FIG. 1

【図2】

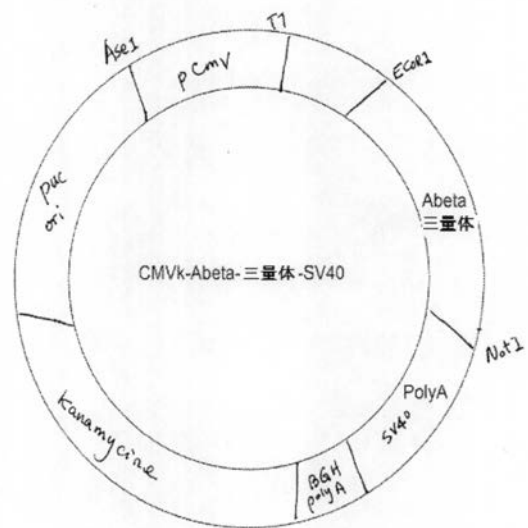


FIG. 2

【図 3】

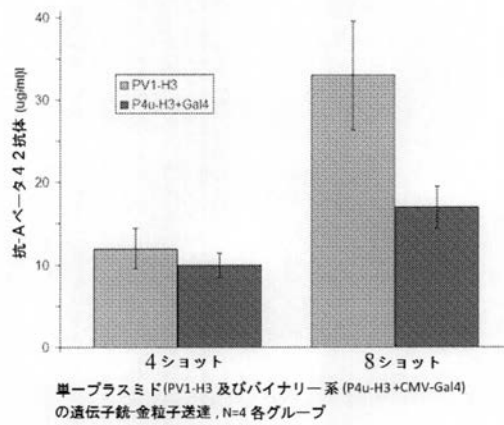
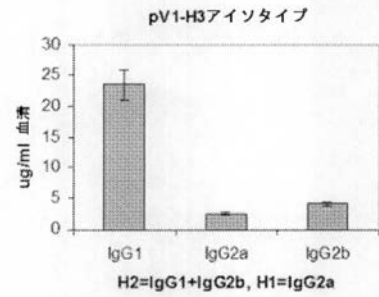


FIG. 3

【図 4】



単一プラスミドショット8回, 4マウスの結果

FIG. 4

【図 5】

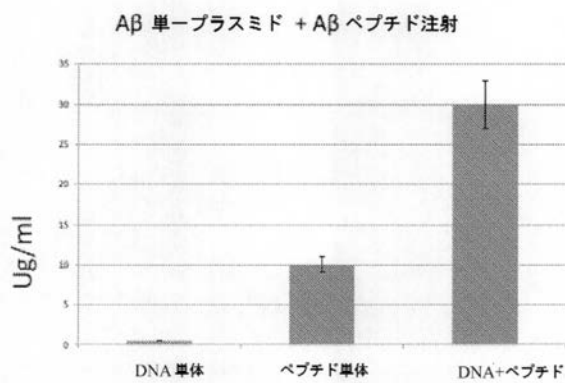


FIG. 5

【図 6】

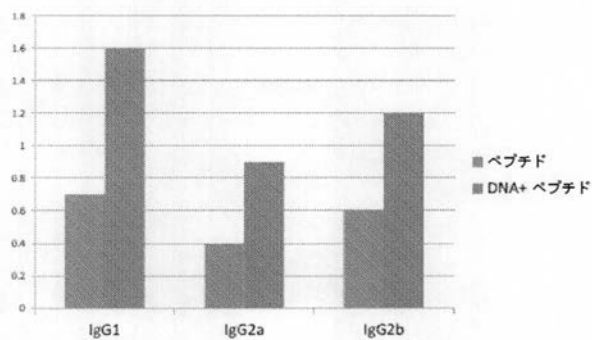


FIG. 6

## 【配列表】

2017521092000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成29年2月23日(2017.2.23)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

A $\beta$ 42三量体ペプチドを発現する単一のベクターを含む、アルツハイマー病の診断、治療又は予防のための組成物であって、

A $\beta$ 42ペプチドへの免疫応答をトリガし、

以下のステップを含む方法に使用される、前記組成物。

アルツハイマー病を有すると疑われる対象から生体サンプルを得るステップ；

HSP27の発現レベルを決定するステップであって、前記サンプルにおけるHSP27タンパク質発現の、非アルツハイマーの患者からのサンプルと比較した統計的に有意な増加が、前記対象がアルツハイマー病を有することを示す、ステップ；及び

前記組成物を前記対象に提供することによる、アルツハイマー病の検出の結果として前記対象の治療を変更するステップ；

## 【請求項2】

組成物が、A $\beta$ 42ペプチド及びDNAベクターの少なくとも1つをさらに含み、かつ前記A $\beta$ 42ペプチドが、遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなく筋肉内注射され、前記A $\beta$ 42ペプチドへの免疫応答をトリガするか、或いは

治療が、配列番号1のベクター及び配列番号3のペプチドを含むか、

対象がヒトであるか、或いは

A $\beta$ 42三量体ペプチドが、非炎症性IgG1応答をトリガするか、或いは

A $\beta$ 42ペプチド及び発現したA $\beta$ 42三量体ペプチドが、アジュバントを用いることなくA $\beta$ 42ペプチドへの免疫応答をトリガするのに有効である、請求項1に記載の組成物

。

## 【請求項3】

HSP27の発現レベルが、タンパク質又は核酸の発現を測定することによって決定され、

方法が、蛍光検出、化学発光検出、電気化学発光検出及びパターン化アレイ、抗体結合、蛍光活性化ソーティング、検出可能ビーズソーティング、抗体アレイ、マイクロアレイ、酵素アレイ、受容体結合アレイ、固相結合アレイ、液相結合アレイ、蛍光共鳴移動、又は放射性標識から選択される、請求項1又は2に記載の組成物。

## 【請求項4】

サンプルが、血液サンプルであり、HSP27の発現レベルが、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、145、150、275、300、又は315ng/ml HSP27より高い、請求項1～3のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項5】

A $\beta$ 42ペプチド及び発現したA $\beta$ 42三量体ペプチドが、アジュバントを用いることなくA $\beta$ 42ペプチドへの免疫応答をトリガするのに有効である、請求項1～4のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項6】

ウイルス遺伝子リーダー配列、A $\beta$ 42三量体配列、及びエンドソームターゲティング配列の順番でこれらの配列を含む単一の核酸を含むベクター。

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載のベクターであって、  
ウイルス遺伝子リーダー配列が、アデノウイルス E 3 遺伝子リーダー配列であるか、  
前記ベクターが、核酸の上流に CMV プロモーターをさらに含むか、  
前記ベクターが配列番号 1 を含むか、  
エンドソームターゲティング配列が、DXXLL（配列番号 2）であるか、或いは  
前記ベクターが、PV1-H3 であり、かつアルツハイマー病を治療又は予防するための  
使用に適合されている、  
前記ベクター。

## 【請求項 8】

アルツハイマー病の症状を改善するのに十分な量で A $\beta$  42 ペプチドと、A $\beta$  42 三量体ペプチドを発現する DNA ベクターとを含む、アルツハイマー病の症状を改善するための組成物であって、  
A $\beta$  42 ペプチドへの免疫応答をトリガする、  
前記組成物。

## 【請求項 9】

DNA ベクター及び A $\beta$  42 ペプチドが、遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなく筋肉内注射されるように適合されている、請求項 8 に記載の組成物。

## 【請求項 10】

A $\beta$  42 ペプチドが準毒性投与量で提供されるか、  
対象がヒトであるか、或いは  
A $\beta$  42 三量体ペプチドが、非炎症性 IgG1 応答をトリガするか、或いは  
A $\beta$  42 ペプチド及び発現された A $\beta$  42 三量体ペプチドが、アジュバントを用いることなく A $\beta$  42 ペプチドへの免疫応答をトリガするのに有効であるか、或いは  
A $\beta$  42 ペプチド、及び A $\beta$  42 三量体ペプチドを発現する DNA ベクターの両方が、アジュバントを用いることなく提供される、  
の少なくとも 1 つである、請求項 8 又は 9 に記載の組成物。

## 【請求項 11】

アジュバントを用いることなく提供される、請求項 8～10 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 12】

主に Th2 応答を引き起こす、請求項 8～11 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 13】

配列番号 1 のベクター及び配列番号 3 のペプチドから本質的になる、請求項 8～12 のいずれかに記載の組成物。

## 【請求項 14】

A $\beta$  42 ペプチドと、A $\beta$  42 三量体ペプチドを発現する DNA ベクターとを含む、アルツハイマー病の治療又は予防のための組成物であって、  
前記 A $\beta$  42 ペプチド及び前記 DNA ベクターが、遺伝子銃又は金粒子を必要とすることなく筋肉内注射に適合されており、  
前記組成物が A $\beta$  42 ペプチドへの免疫応答をトリガする、  
前記組成物。

## 【請求項 15】

配列番号 1 のベクター及び配列番号 3 のペプチドから本質的になる、請求項 14 に記載の組成物。

## 【国際調査報告】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                     | International application No.<br><b>PCT/US2015/031011</b>                                                                                                                                                                                           |
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><b>A61K 48/00 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)</b>                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Databases: EPDOC, MEDLINE, WPIAP, HCAPLUS, BIOSIS, EMBASE. Keywords: ABeta42, A <math>\beta</math>42, amyloid, Trimer, tripeptide, vector, DNA therapy, Gene therapy, vaccine, immunization, HSP 27, heat shock protein 27, HSPB1, heat shock protein <math>\beta</math>1, Alzheimer, diagnosis, and similar terms, synonyms and plurals (as appropriate).</b> |                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Database: GENOME QUEST, Sequence: SEQ ID No: 1, 4.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Applicant and Inventor Name searches</b> of the patent and non-patent literature were performed using Patentscope ( <a href="http://www.wipo.int/patentscope/en/">http://www.wipo.int/patentscope/en/</a> ) and PubMed ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a> )                                                 |                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                  | Relevant to claim No.                                                                                                                                                                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Documents are listed in the continuation of Box C                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| *<br>"A"                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Special categories of cited documents:<br>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                      | "T"<br>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                              |
| "E"                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | earlier application or patent but published on or after the international filing date                                                                               | "X"<br>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                                                                     |
| "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) | "Y"<br>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 |
| "O"                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                                                                                            | "&"<br>document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                    |
| "P"                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Date of the actual completion of the international search<br>31 July 2015                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                     | Date of mailing of the international search report<br>31 July 2015                                                                                                                                                                                  |
| <b>Name and mailing address of the ISA/AU</b><br><br>AUSTRALIAN PATENT OFFICE<br>PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA<br>Email address: <a href="mailto:pct@ipaaustralia.gov.au">pct@ipaaustralia.gov.au</a>                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                     | <b>Authorised officer</b><br><br>Amanda Lim<br>AUSTRALIAN PATENT OFFICE<br>(ISO 9001 Quality Certified Service)<br>Telephone No. +61 2 62832157                                                                                                     |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | International application No.                                                 |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | PCT/US2015/031011                                                             |
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                          | Relevant to claim No.                                                         |
| X                                                     | QU, B-X, et al., 'Analysis of three plasmid systems for use in DNA A $\beta$ 42 immunization as therapy for Alzheimer's Disease', July 2010, Vaccine, Vol. 28, No. 32, pages 5280-5287, doi:10.1016/j.vaccine.2010.05.054.<br>Abstract; section 2.2; Figure 1B                                                              | 1, 3 and 5-9 (Group 2 claims); 11, 13, 15-18 and 19-21 (Group 2 claims)       |
| X<br>A                                                | WO 2008/148490 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 11 December 2008<br>page 1, lines 22-27; page 3, lines 16-18, 20-21, 26-28; pages 7, 8<br>whole document                                                                                                                                                                        | 1, 3 and 5-8 (Group 1 claims)<br>1, 3 and 5-8 and 2, 4, 9-18 (Group 2 claims) |
| X                                                     | LAMBRACHT-WASHINGTON, D. et al., 'A peptide prime-DNA boost immunization protocol provides significant benefits as a new generation A $\beta$ 42 DNA vaccine for Alzheimer Disease', January 2013, J. Neuroimmunol. Vol. 254, pages 63-68, doi:10.1016/j.jneuroim.2012.09.008.<br>Sections 2.1, 2.2, 4                      | 25-30, 33-38 and 41-46 (Group 2 claims)                                       |
| A                                                     | LAMBRACHT-WASHINGTON, D. et al., 'DNA Immunization Against Amyloid beta 42 has High Potential as Safe Therapy for Alzheimer's Disease as it Diminishes Antigen-Specific Th1 and Th17 Cell Proliferation', August 2011, Cell Mol Neurobiol., Vol. 31, No. 6, pages 867-874, doi:10.1007/s10571-011-9680-7.<br>whole document | 19-48 (Group 2 claims)                                                        |
| A                                                     | RENKAWEK, K. et al., 'Increased expression of heat-shock protein 27 kDa in Alzheimer disease: a preliminary study', 1993, NeuroReport Vol. 5, pages 14-16.<br>whole document                                                                                                                                                | 1-18 (Group 1 and 2 claims)                                                   |
| A                                                     | SMITH, R.C., et al., 'Stress Proteins in Alzheimer's Disease', August 2005, Int. J. Hyperthermia, Vol. 21, No. 5, pages 421-431.<br>whole document                                                                                                                                                                          | 1-18 (Group 1 and 2 claims)                                                   |
| A                                                     | ABISAMBRA, J. F. et al., 'Exploiting the Diversity of the Heat-Shock Protein Family for Primary and Secondary Tauopathy Therapeutics', 2011, Current Neuropharmacology, Vol. 9, pages 623-631.<br>whole document                                                                                                            | 1-18 (Group 1 and 2 claims)                                                   |
| Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                               |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2015/031011

**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.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
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:

**See Supplemental Box for Details**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | International application No.<br>PCT/US2015/031011 |
| <b>Supplemental Box</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                    |
| <p><b>Continuation of: Box III</b></p> <p>This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.</p> <p>This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Group 1: Claims 1, 3 and 5-8 (all in part) are directed to a method for diagnosis, treatment or prevention of Alzheimer's Disease comprising: obtaining a biological sample from a subject suspected of having Alzheimer's Disease; determining the level of expression of HSP 27, wherein a statistically significant increase in HSP27 protein expression in the sample as compared to a sample from a non-Alzheimer's patient is indicative that the subject has Alzheimer's Disease; and modifying a treatment of the subject as a result of the detection of Alzheimer's Disease by providing the subject with standard therapy. The feature of modifying a treatment of the subject as a result of the detection of Alzheimer's Disease by providing the subject with standard therapy is specific to this group of claims.</li> <li>Group 2: Claims 1 (in part), 2 (completely), 3 (in part), 4 (completely), 5-8 (in part), 9 and 10 (completely) are directed to a method for diagnosis, treatment or prevention of Alzheimer's Disease comprising determining the level of expression of HSP 27 and modifying a treatment of the subject as a result of the detection of Alzheimer's Disease by providing the subject with a composition comprising a single DNA vector that expresses an A<math>\beta</math>42 trimer peptide. Claims 11-18 (completely) are directed to a method to evaluate a candidate drug which comprises a single DNA vector encoding an A<math>\beta</math>42 trimer peptide, wherein the method comprises determining the levels of expression of HSP 27 or symptoms of Alzheimer's Disease. Claims 19-24 (completely) are directed a vector comprising single nucleic acid encoding an A<math>\beta</math>42 trimer peptide. Claims 25-40 (completely) are directed to a composition comprising an A<math>\beta</math>42 peptide and a DNA vector encoding an A<math>\beta</math>42 trimer peptide. Claims 41-48 (completely) are directed to a method for the treatment or prevention of Alzheimer's Disease comprising administering A<math>\beta</math>42 peptide and a DNA vector encoding an A<math>\beta</math>42 trimer peptide. The feature of a DNA vector encoding an A<math>\beta</math>42 trimer peptide is specific to this group of claims.</li> </ul> <p>PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.</p> <p>When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.</p> <p>In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a priori</i>.</p> <p>Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2009)</p> |                                                    |

| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b><br>Information on patent family members                                                                                                                                                                                            |                         | International application No.<br><b>PCT/US2015/031011</b> |                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------|
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                         |                                                           |                         |
| <b>Patent Document/s Cited in Search Report</b>                                                                                                                                                                                                                       |                         | <b>Patent Family Member/s</b>                             |                         |
| <b>Publication Number</b>                                                                                                                                                                                                                                             | <b>Publication Date</b> | <b>Publication Number</b>                                 | <b>Publication Date</b> |
| WO 2008/148490 A1                                                                                                                                                                                                                                                     | 11 December 2008        | WO 2008148490 A1                                          | 11 Dec 2008             |
| <b>End of Annex</b>                                                                                                                                                                                                                                                   |                         |                                                           |                         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                         |                                                           |                         |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.<br>Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)                                                                                               |                         |                                                           |                         |

フロントページの続き

|                      |                  |         |       |             |
|----------------------|------------------|---------|-------|-------------|
| (51)Int.Cl.          |                  | F I     |       | テーマコード (参考) |
| <b>A 6 1 P 25/28</b> | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 K | 35/76 |             |
| <b>A 6 1 K 39/00</b> | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 P | 25/28 |             |
|                      |                  | A 6 1 K | 39/00 | H           |

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100188352  
弁理士 松田 一弘

(74)代理人 100131093  
弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902  
弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391  
弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074  
弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100145920  
弁理士 森川 聡

(74)代理人 100096013  
弁理士 富田 博行

(72)発明者 ボロン アーサー ピー.  
アメリカ国 7 5 2 3 4 テキサス ダラス シダーレーン 1 3 2 2 7

(72)発明者 チュ バオシー  
アメリカ国 2 0 1 4 8 バージニア アッシュバーン ガーデンウォークドライブ 2 1 2 4

F ターム (参考) 4B029 AA07 AA08 BB11 FA15 GA03  
4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ42 QQ52 QQ79 QR08 QR32 QR35 QR48  
QS32 QS34 QX02  
4C084 AA13 NA14 ZA16 ZB02 ZB05 ZB07 ZB09  
4C085 AA03 BB11 BB36 GG01 GG03  
4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA08 NA14 ZA16 ZB02 ZB05 ZB07  
ZB09