

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7550643号
(P7550643)

(45)発行日 令和6年9月13日(2024.9.13)

(24)登録日 令和6年9月5日(2024.9.5)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H Z N A
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39	
A 6 1 K	39/08 (2006.01)	A 6 1 K	39/08	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/28	
請求項の数 22 (全65頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2020-523284(P2020-523284)	(73)特許権者	514010601	
(86)(22)出願日	平成30年10月24日(2018.10.24)		ヤンセン ファーマシューティカルズ、	
(65)公表番号	特表2021-501147(P2021-501147		インコーポレーテッド	
	A)		アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州	
(43)公表日	令和3年1月14日(2021.1.14)		0 8 5 6 0 , タイタスビル, トレントン	
(86)国際出願番号	PCT/US2018/057286		ーハーバートン ロード 1 1 2 5	
(87)国際公開番号	WO2019/084118	(73)特許権者	513022966	
(87)国際公開日	令和1年5月2日(2019.5.2)		エーシー イミュン エス. エー.	
審査請求日	令和3年9月2日(2021.9.2)		スイス国 ツェーハー ー 1 0 1 5 ローザ	
(31)優先権主張番号	62/577,157		ンヌ, ビルディングビー, イーピーエ	
(32)優先日	平成29年10月25日(2017.10.25)		フエル イノベーション パーク	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100092783	
			弁理士 小林 浩	
		(74)代理人	100095360	
			弁理士 片山 英二	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リン酸化タウペプチドの組成物およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

- a. タウホスホペプチドと、
b. ヘルパーT細胞エпитープと、
c. 脂質付加C p Gオリゴヌクレオチドと、
d. トール様受容体4リガンドを含有するアジュバントと

を含むリポソームであって、

前記タウホスホペプチドが、リポソームの表面上に提示されており、配列番号2、配列番号5、配列番号9および配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記アミノ酸配列が、前記タウホスホペプチドが前記リポソームの表面上に提示されることを可能にする1つまたは複数の修飾をさらに含み；

前記ヘルパーT細胞エпитープが、配列番号23～26からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含み；

前記脂質付加C p Gオリゴヌクレオチドが、配列番号18～22からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有し、前記C p Gオリゴヌクレオチドは1つまたは複数のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有し、前記C p Gオリゴヌクレオチドは少なくとも1つの親油性基と共有結合しており；および

前記トール様受容体4リガンドがモノホスホリル脂質A（MPLA）である、前記リポソーム。

【請求項2】

1, 2-ジミリスティール-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC)、1, 2-ジミリスティール-sn-グリセロ-3-ホスホリル-3'-rac-グリセロール (DMPG)、およびコレステロールからなる群から選択される1つまたは複数の脂質をさらに含む、請求項1に記載のリボソーム。

【請求項3】

a. 配列番号28、配列番号31、配列番号35および配列番号38からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するタウペプチドと、

b. 配列番号39～配列番号44からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するヘルパーT細胞エピトープと、

c. 配列番号18～配列番号22からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する脂質付加CpGオリゴヌクレオチドであって、前記CpGオリゴヌクレオチドは1つまたは複数のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、前記CpGオリゴヌクレオチドはリンカーを介して少なくとも1つのコレステロールと共有結合している、脂質付加CpGオリゴヌクレオチドと

d. モノホスホリル脂質A (MPLA) とを含む、リボソーム。

【請求項4】

a. 配列番号2、5、9および12からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するタウペプチド；

b. 配列番号23～26からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を有するヘルパーT細胞エピトープ；

c. 配列番号18のヌクレオチド配列を有する脂質付加CpGオリゴヌクレオチドであって、前記CpGオリゴヌクレオチドは1つまたは複数のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有し、前記CpGオリゴヌクレオチドはリンカーを介して少なくとも1つのコレステロールと共有結合している、前記脂質付加CpGオリゴヌクレオチド；および

d. モノホスホリル脂質A (MPLA) とを含む、リボソームであって、

前記タウペプチドが、前記リボソームの表面上に提示されている、前記リボソーム。

【請求項5】

a. 前記タウペプチドが配列番号28、31、35および38からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し；

b. 前記脂質付加CpGオリゴヌクレオチドが配列番号18のヌクレオチド配列を有し；および

c. 前記ヘルパーT細胞エピトープが、配列番号23、24および25のアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列は、任意に1つまたは複数のリンカーを介して互いに共有結合している、

請求項4に記載のリボソーム。

【請求項6】

前記ヘルパーT細胞エピトープが、配列番号39、40、41、42および43からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項5に記載のリボソーム。

【請求項7】

前記ヘルパーT細胞エピトープが、配列番号13、14、15、16、17および44からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項5に記載のリボソーム。

【請求項8】

1, 2-ジミリスティール-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC)、1, 2-ジミリスティール-sn-グリセロ-3-ホスホリル-3'-rac-グリセロール (DMPG)、およびコレステロールからなる群から選択される1つまたは複数の脂質をさらに含む、請求項4に記載のリボソーム。

【請求項9】

10

20

30

40

50

- a. 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタウペプチド；
 - b. 配列番号 39、40、41、42 および 43 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するヘルパー T 細胞エピトープ；
 - c. 配列番号 18 のヌクレオチド配列を有する脂質付加 CpG オリゴヌクレオチドであって、前記 CpG オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して少なくとも 1 つのコレステロールと共有結合している、前記脂質付加 CpG オリゴヌクレオチド；および
 - d. モノホスホリル脂質 A (MPLA)
- を含む、リボソームであって、
前記タウペプチドが、前記リボソームの表面上に提示されている、
前記リボソーム。

10

【請求項 10】

1, 2-ジミリスティル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC)、1, 2-ジミリスティル-s n-グリセロ-3-ホスホリル-3'-rac-グリセロール (DMPG)、およびコレステロールからなる群から選択される 1 つまたは複数の脂質をさらに含み、

- a. 前記タウペプチドが配列番号 28 のアミノ酸配列を有し；
- b. 前記ヘルパー T 細胞エピトープが配列番号 39 のアミノ酸配列を有し；および
- c. 前記脂質付加 CpG オリゴヌクレオチドが配列番号 18 のヌクレオチド配列を有する、

請求項 9 に記載のリボソーム。

20

【請求項 11】

前記ヘルパー T 細胞エピトープが、配列番号 13 のアミノ酸配列を有する、請求項 10 に記載のリボソーム。

【請求項 12】

1, 2-ジミリスティル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC)、1, 2-ジミリスティル-s n-グリセロ-3-ホスホリル-3'-rac-グリセロール (DMPG)、およびコレステロールからなる群から選択される 1 つまたは複数の脂質をさらに含み、

- a. 前記タウペプチドが配列番号 28 のアミノ酸配列を有し；
- b. 前記ヘルパー T 細胞エピトープが配列番号 40 のアミノ酸配列を有し；および
- c. 前記脂質付加 CpG オリゴヌクレオチドが配列番号 18 のヌクレオチド配列を有する、

請求項 9 に記載のリボソーム。

30

【請求項 13】

前記ヘルパー T 細胞エピトープが、配列番号 14 のアミノ酸配列を有する、請求項 12 に記載のリボソーム。

【請求項 14】

1, 2-ジミリスティル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC)、1, 2-ジミリスティル-s n-グリセロ-3-ホスホリル-3'-rac-グリセロール (DMPG)、およびコレステロールからなる群から選択される 1 つまたは複数の脂質をさらに含み、

- a. 前記タウペプチドが配列番号 28 のアミノ酸配列を有し；
- b. 前記ヘルパー T 細胞エピトープが配列番号 41 のアミノ酸配列を有し；および
- c. 前記脂質付加 CpG オリゴヌクレオチドが配列番号 18 のヌクレオチド配列を有する、

請求項 9 に記載のリボソーム。

40

【請求項 15】

前記ヘルパー T 細胞エピトープが、配列番号 15 のアミノ酸配列を有する、請求項 14 に記載のリボソーム。

【請求項 16】

50

請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のリボソームと薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 17】

神経変性障害を患っている対象において免疫応答を誘導するための、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

それを必要としている対象において神経変性疾患または障害を処置または防止するための、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記神経変性疾患または障害が、神経原線維病変の形成によって引き起こされる、またはそれに関連している、請求項 17 または 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記神経変性疾患または障害が、アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルトーヤコブ病、拳闘家認知症、ダウン症候群、ゲルストマンーストロイスラーシャインカー病、封入体筋炎、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、外傷性脳傷害、筋萎縮性側索硬化症、グアムのパーキンソン認知症複合、神経原線維のもつれを伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、レビー認知症筋萎縮性側索硬化症、石灰化を伴うびまん性の神経原線維のもつれ、17 番染色体に連鎖するパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（FTDP-17）、ハレルフォルデンスパッツ病、多系統萎縮症、ニーマンーピック病 C 型、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性汎脳炎、もつれのみの認知症、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィー、慢性外傷性脳障害（CTE）、原発性加齢関連タウオパチー（PART）、またはレビー小体認知症（LBD）である、請求項 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記神経変性疾患または障害が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症候群、17 番染色体に連鎖するパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（FTDP-17）、大脳皮質基底核変性症、レビー認知症筋萎縮性側索硬化症、筋緊張性ジストロフィー、慢性外傷性脳障害（CTE）、脳血管症、原発性加齢関連タウオパチー（PART）、またはレビー小体認知症（LBD）である、請求項 17 から 20 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

それを必要としている対象において神経変性疾患または障害の処置または防止において使用するための、請求項 16 に記載の医薬組成物を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は医学分野のものである。本発明は、特に、タウペプチドのリボソームまたはコンジュゲート、およびアルツハイマー病などのタウオパチーを防止または処置するためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病（AD）は、世界中で推定 4400 万人が冒されている進行性衰弱性神経変性疾患である（Alzheimers.net）。診療所において現在利用可能な AD 治療は臨床症状の進行を遅らせることを目的とするが、疾患の根底にある病原性プロセスを標的としない。残念ながら、これらの治療は最小限にしか有効でなく、したがって、追加の防止的および治療的手段を開発および試験する緊急の必要性が存在する。

【0003】

アルツハイマー病の特徴的な病態は、凝集したアミロイドベータタンパク質を含む細胞外溶菌斑、および高リン酸化タウタンパク質の細胞内「もつれ」または凝集の蓄積である。これらのタンパク質の蓄積をもたらす分子学的事象の特徴づけは不十分である。アミロ

10

20

30

40

50

イドでは、アミロイド前駆体タンパク質の異常切断が、アミノ酸1～42を含む、凝集する傾向のある断片の蓄積をもたらすと仮定されている。タウでは、キナーゼ、ホスファターゼのどちらか、または両方の調節不全が、タウの異常リン酸化をもたらすと仮定されている。タウは、高リン酸化された後、微小管と有効に結合してそれを安定化する能力を失い、その代わりに患部ニューロンの細胞質に蓄積される。未結合かつ高リン酸化のタウが最初のオリゴマー、その後により高次の凝集体を形成すると考えられ、その存在は、おそらくは正常な軸索輸送の中断を介して、それが形成されるニューロンの機能に負の影響を与えると推定される。

【0004】

先進国では、アルツハイマー病又は他の認知症性タウオパチーを診断された個体は、一般的にコリンエステラーゼ阻害剤（たとえばA r i c e p t（登録商標））またはメマンチン（たとえばN a m e n d a（商標））を用いて処置する。これらの薬物は、合理的に良好な耐用性を示すが、有効性が非常に控えめである。たとえば、A r i c e p t（登録商標）は、処置した個体の約50%において症状の悪化を6～12カ月遅延させる。残りの処置は非薬理的であり、患者の認知能力が低下するについて、その日々の日常課題の管理を可能にすることに焦点を当てている。

【0005】

いくつかの公開された研究（Asuni AA et al., J Neurosci. 2007 Aug 22;27(34):9115-29、Theunis C et al., PLoS One. 2013; 8(8): e72301、Kontsekova E et al., Alzheimers Res Ther. 2014 Aug 1;6(4):44）は、タウペプチドを含有する活性ワクチンが、マウスまたはラットにおいて抗タウ免疫応答を誘導することができる、げっ歯類の脳における病理学的タウ凝集体の蓄積を低下させることができる、およびアルツハイマー病の動物モデルにおいて認知低下の進行速度を低下させることができることを実証している。病理学的タウタンパク質に対する活性ワクチンは、アルツハイマー病を有するヒト患者において免疫原性であることが示されている（Novak P et al., Lancet Neurology 2017, 16:123-134）。国際公開2010/115843号パンフレットは、タンパク質タウの主要な病理学的ホスホエピトープを模倣する抗原性ホスホペプチド、ならびにアルツハイマー病を含めたタウオパチーの処置における治療的および診断的使用のための関連組成物を記載している。しかし、現在、タウ媒介性疾患の発症を防止するために認可された有効なワクチンは、依然として市場に存在しない。疾患が始まった後にその経過を妨害または遅らせるための有効な薬物も、市場に存在しない。したがって、これらの疾患を防止することができる新しい防止手段（たとえばワクチン）の同定が差し迫って必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

一般的な一態様では、本発明は、

- a. 好ましくはタウホスホペプチドであるタウペプチドと、
- b. ヘルパーT細胞エピトープと

を含み、タウペプチドがリボソームの表面上に提示されている、リボソームに関する。

【0007】

一実施形態では、リボソームは、トール様受容体リガンドを含む少なくとも1つのアジュバントをさらに含む。好ましくは、リボソームは、トール様受容体4リガンドおよびトール様受容体9リガンドのうちの少なくとも1つをさらに含む。

【0008】

好ましい実施形態では、本発明は、

- a. 好ましくはタウホスホペプチドであるタウペプチドと、
- b. ヘルパーT細胞エピトープと、
- c. i. トール様受容体9リガンド、好ましくは脂質付加CpGオリゴヌクレオチド、および
- ii. トール様受容体4リガンド、好ましくはトール様受容体4作用剤

のうちの少なくとも1つと

を含み、タウペプチドがリポソームの表面上に提示されている、リポソームに関する。

【0009】

さらなる好ましい実施形態では、本発明は、

- a. タウホスホペプチドと、
- b. ヘルパーT細胞エпитープと、
- c. 脂質付加CpGオリゴヌクレオチドと、
- d. トール様受容体4リガンドを含有するアジュバントと

を含み、

タウホスホペプチドがリポソームの表面上に提示されている、リポソームに関する。

10

【0010】

別の一般的な態様では、本発明は、タウペプチド、好ましくはタウホスホペプチドと、それとコンジュゲートさせた免疫原性担体とを含み、タウペプチドがリンカーを介して担体とコンジュゲートしている、コンジュゲートに関する。リンカーは、ポリエチレングリコール（PEG）、スクシンイミジル3-（プロモアセトアミド）プロピオネート（SBAP）、およびm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）のうちの1つまたは複数を含むことができる。本発明において有用な免疫原性担体の例には、それだけには限定されないが、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、破傷風トキソイド（TT）、CRM197、および髄膜炎菌（*N. meningitidis*）由来の外膜タンパク質混合物（OMP）、またはその誘導体が含まれる。

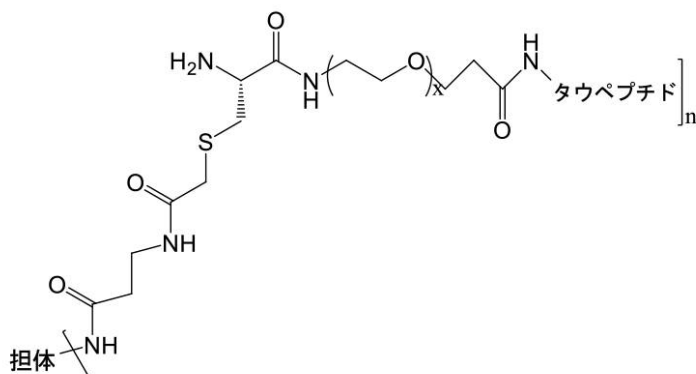
20

【0011】

好ましい一実施形態では、本発明は、式（I）の構造：

【0012】

【化1】

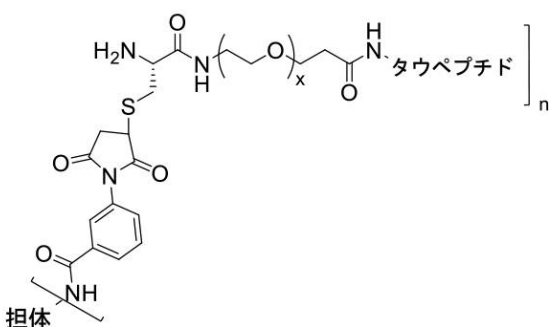


30

または式（II）の構造：

【0013】

【化2】



40

【式中、

50

x は、0～10、好ましくは2～6、最も好ましくは3の整数であり、
n は、2～11、好ましくは3～11の整数である]
を有するコンジュゲートに関する。

【0014】

本発明のさらなる態様は、本発明のリボソームまたはコンジュゲートと薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物、医薬組成物を調製する方法、および、それを必要としている対象における、タウに対する免疫応答の誘導、または神経変性疾患もしくは障害の処置もしくは防止における、医薬組成物の使用に関する。

【0015】

一実施形態では、本発明は、神経変性障害を患っている対象において免疫応答を誘導する方法、または、それを必要としている対象において神経変性疾患もしくは障害を処置もしくは防止することに関する。方法は、対象に、本発明のリボソームと薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物、または本発明のコンジュゲートと薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を投与することを含む。好ましくは、方法は、対象に、免疫化をプライミングするための本発明の医薬組成物、および免疫化をブーストするための本発明の医薬組成物を投与することを含む。

【0016】

本発明のさらなる態様、特長、および利点は、以下の発明を実施するための形態および特許請求の範囲を読むことによってより良好に理解されるであろう。

【0017】

前述の概要および以下の本出願の好ましい実施形態の詳細は、添付の図面と併せて読んだ際により良好に理解されるであろう。しかし、本出願は図面中に示すこれらの詳細な実施形態に限定されないことを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、本発明の実施形態による新規ワクチンを例示する図である。本発明の一実施形態によるタウリボソーム（上）および本発明の一実施形態によるタウコンジュゲート（下）である。

【図2】図2は、カプセル封入されたヘルパーT細胞エピトープ（たとえば破傷風ポリペプチド（tet））を含有する本発明の一実施形態によるリボソーム（第二世代リボソーム）を含むワクチンが、ヘルパーT細胞を活性化させることを例示する図である。

【図3】図3は、非自己または免疫原性担体タンパク質を含有する本発明の一実施形態によるコンジュゲートを含むワクチンが、ヘルパーT細胞を活性化させることを例示する図である。

【図4】図4は、本発明の実施形態によるタウワクチンが、アカゲザルマカクにおいて持続的な高力価の抗リン酸化タウ抗体を誘導することを示す図である。酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）によって経時的に測定した1群あたりのエンドポイント力価の幾何平均は、ヘルパーT細胞エピトープなしの対照リボソームワクチンよりも、本発明の一実施形態によるリボソーム（リボソームZ）を含むワクチンまたは本発明の一実施形態によるコンジュゲート（コンジュゲートA）を含むワクチンの方が高い。

【図5】図5は、本発明の一実施形態によるリボソーム（リボソームZ）を用いて免疫化したアカゲザルマカクからの血清は、健康なヒト脳切片（右パネル）と比較して、ヒトAD脳切片（左パネル）において病理学的タウ構造と結合することを示す図である。

【図6】図6は、可溶性CpGおよびミョウバン水酸化物（alum hydroxide）を含有する組成物中で配合した、本発明の一実施形態によるコンジュゲート（コンジュゲートA）を用いて免疫化したアカゲザルマカクからの血清は、健康なヒト脳切片（下段）と比較して、ヒトAD脳切片（上段）において病理学的タウ構造と結合することを示す図である。

【図7】図7は、そのそれぞれがカプセル封入されたT細胞エピトープT50と1つまたは複数のアジュバントとを含有する、本発明の実施形態によるリボソームワクチン、リボソームX、Y、およびZによって誘導された、アカゲザルマカクにおける抗リン酸化タウ

10

20

30

40

50

抗体の力価を示す図である。力価はE L I S Aによって測定し、個々のサルにおける経時的なエンドポイント力価で提示されている。具体的には以下の通りである。図7 Aは、T L R 4リガンドM P L A（3 D－（6－アシル）P H A D（登録商標））を単独でアジュバントとして有するリポソームXによって誘導された抗リン酸化タウ抗体の力価を示す図である。図7 Bは、T L R 9リガンド（脂質付加C p Gオリゴヌクレオチド）を単独でアジュバントとして有するリポソームYによって誘導された抗リン酸化タウ抗体の力価を示す図である。図7 Cは、T L R 4リガンドM P L A（3 D－（6－アシル）P H A D（登録商標））とT L R 9リガンド（脂質付加C p Gオリゴヌクレオチド）との組合せをアジュバントとして有するリポソームZによって誘導された抗リン酸化タウ抗体の力価を示す図であり、2つのアジュバントの組合せは、個々のサル間で誘導される抗体価のばらつきがより少ないことも示している。図7 Dは、上述の免疫化群、およびT L R 4リガンドM P L Aを有するがT細胞エпитープを有さない対照リポソームワクチンとの抗体価の幾何平均を表し、本発明の実施形態によるワクチンが、対照リポソームワクチンよりも高い抗リン酸化タウ抗体の抗体価をもたらすことを示す図である。力価はE L I S Aによって測定し、経時的な1群あたりのエンドポイント力価の幾何平均+／－95%の信頼区間で表されている。

10

【図8】図8は、本発明の一実施形態によるリポソームワクチン（たとえば、リポソームX、Y、もしくはZ）またはコンジュゲートワクチン（コンジュゲートA）を使用した免疫化が、アルツハイマー病患者の死後脳から単離した濃縮対らせん状細線維（e P H F）に特異的な抗体I g G力価を誘導することを示す図である。抗体価はM e s o S c a l e D i s c o v e r y（M S D）の技術によって測定し、50日目での個々のサルの値および最初の免疫化後の幾何平均+／－95%のC Iとして表されている。

20

【図9】図9は、カプセル封入されたT 5 0およびT L R 4リガンド（3 D－（6－アシル）P H A D（登録商標））とT L R 9リガンド（脂質付加C p Gオリゴヌクレオチド）との組合せをアジュバントとして含有する、本発明の一実施形態によるリポソームワクチン（リポソームZ）を用いた免疫化は、ほとんど配列番号2のリン酸化タウペプチドのN末端と結合する抗体を誘導する（図9 A）一方で、本発明の一実施形態によるコンジュゲートワクチン（コンジュゲートA）を用いて免疫化したサルは、リン酸化ペプチド（左）および非リン酸化ペプチド（右）のどちらについても、ほとんどペプチドのC末端部分と結合するI g G抗体を生じる（図9 B）ことを示す図である。

30

【図10】図10 AおよびBは、カプセル封入されたT細胞エпитープT 5 0およびT L R 4リガンド（3 D－（6－アシル）P H A D（登録商標））をアジュバントとして含有する、本発明の一実施形態によるリポソームワクチン（リポソームS）を用いたワクチン接種が、マウスにおいて、対照リポソームワクチン（T L R 4リガンド、3 D－（6－アシル）P H A D（登録商標））を有するがT細胞エпитープT 5 0を有さない、リポソームR）ならびに表面T細胞エпитープT 5 7（ジパルミトイル化T 5 0）およびT L R 4リガンド（3 D－（6－アシル）P H A D（登録商標））を含有する本発明の一実施形態によるリポソームワクチン（リポソームT）よりも顕著に高い抗体価を誘導することを示す図である。最初の免疫化後の21日目（図10 A）および35日目（図10 B）での抗体価をE L I S Aによって測定し、個々の値および1群あたりの幾何平均±95%のC Iとして表されている。（**：p<0.01、***：p<0.001）。

40

【図11】図11は、T細胞ペプチドT 4 8またはT 5 2のリポソーム内へのカプセル封入（それぞれリポソームMまたはN）が、マウスにおいてカプセル封入されたペプチドに特異的なT細胞応答を誘導することを示す図である。T細胞応答はI F N－γ（図11 A）およびI L－4（図11 B）E L I S P O Tによって評価した。

【図12】図12は、カプセル封入されたT細胞エпитープを含有するリポソームワクチン（リポソームL）および繫留されたT細胞エпитープを含有するリポソームワクチン（リポソームO）はそれぞれ、T細胞エпитープを有さない対照リポソームワクチンよりも高いタウホスホペプチド特異的抗体価を誘導したことを示す図である。リポソームL、リポソームO、および対照リポソームのそれぞれは、M P L Aをアジュバントとしてさらに

50

含有する。

【図13】図13は、タウコンジュゲート（KLH-TAU VAC-p7.1またはKLH-TAU VAC-p22.1）が野生型マウスにおいてTfH細胞およびタウペプチドに対する頑強なAb力価を誘導することを示す図である。具体的には以下の通りである。図13Aは、成体雌Balb/Cマウス（n=14匹/群）の群を、合計4回、100ugのアジュバント化KLH-タウコンジュゲートワクチン（KLH-TAU VAC-p7.1もしくはKLH-TAU VAC-p22.1）、活性プラセボワクチン（KLH+ミョウバンもしくはRib i）、または不活性のプラセボ（PBS）を用いて、示したスケジュールに従って免疫化したことを例示する図である。それぞれの免疫化群から4匹の動物を一次免疫化の7日後に 殺し、注射部位を排出するリンパ節を採取した。図13Bは、免疫化群（n=4匹のマウス/群、個々に分析）毎の排出リンパ節中のTfHの幾何平均パーセントを示す図である。活性ワクチンまたはプラセボを受けているすべての群が測定可能なTfHを有していた。さらに、ワクチンKLH-TAU VAC-p7.1、KLH-TAU VAC-p22.1、または活性プラセボKLH+ミョウバンを受けている動物は、不活性のプラセボを与えた動物よりもTfHを顕著に多く有していた（KLH-TAU VAC-p7.1では $p=0.0044$ 、KLH-TAU VAC-p22.1では $p=0.0482$ 、KLHでは $p=0.0063$ 、ANOVA検定を使用、次いで多重比較用にダネットの調整）。図13C~Hは、免疫化後の4つの時点（14、28、56、および84日目）での、ベースライン（0日目）からの血清力価の変化を、群の平均（n=5~10匹）について95%の信頼区間と共に示す図である。アスタリスクは、KLH-TAU VAC誘導性の抗体応答が、活性プラセボによって誘導されたものよりも顕著に高い時点を示す（ $p \leq 0.05$ 、ANOVA検定を使用して測定、次いで多重比較用にチューキーの調整）、より詳細には以下の通りである。図13Cは、リン酸化タウペプチドp7.1に対する結合力価を示す図である。図13Dは、リン酸化タウペプチドp22.1に対する結合力価を示す図である。図13Eは、非リン酸化タウペプチド7.1に対する結合力価を示す図である。図13Fは、非リン酸化タウペプチド22.1に対する結合力価を示す図である。図13GおよびHはそれぞれ、担体タンパク質KLHに対する結合力価を示す図である。

【図14】図14は、タウコンジュゲートを用いて免疫化したマウスからの血清が、他のタウオパチーからの病理学的タウ構造とも結合したことを示す図である。一次免疫化の84日後のそれぞれのワクチン接種群からプールした血清（n=6匹）を使用して、MAPT突然変異（MAPT P301S、前頭皮質）を有する前頭側頭認知症症例、ピック病（前頭皮質）、進行性核上性麻痺（PSP、尾状核）、および原発性加齢関連タウオパチー（PART、海馬）を有する症例からの脳組織を染色した。活性ワクチンを受けている動物からの血清では、それぞれのタウオパチーに典型的なタウ関連構造を強調された一方で、活性プラセボ（KLH-ミョウバンもしくはKLH-Rib i）または不活性のもの（PBS）を用いて免疫化した動物からの血清では、これらの構造のどれも染色されなかった。参考として、対応する領域のAT8を用いた免疫染色を示し、スケールバー=50umである。

【図15】図15は、ワクチン誘導性の抗体が加速タウオパチーモデルにおいて凝集タウを低下させることを示す図である。具体的には以下の通りである。図15Aは、3カ月齢のP301Lトランスジェニックマウス（n=15匹/群）がKLH-TAU VAC-p7.1+RIB Iまたは活性プラセボKLH+RIB Iのどちらかを用いて免疫化したマウスからの精製IgGと共にブレインキュベートしたヒトePHFの定位注射を受けたことを示す図である。注射の2カ月後、すべてのマウスを 殺し、マウスにおける全画分およびサルコシル不溶性画分中の凝集タウの量を決定した。図15Bおよび15Cは、それぞれの動物の注射した半球から採取した全画分（B）およびサルコシル不溶性画分（C）を示す図である。グラフはMSDによって測定されたタウの量を示す。全画分および不溶性画分のどちらにおいても、KLH-TAU VAC-p7.1で免疫化したマウスからのIgGと共にブレインキュベートしたePHFを受けているマウスの脳は、対照抗体と共

10

20

30

40

50

にブレインキューベートしたePHFを受けているマウスよりも顕著に少ない凝集タウを有していた。(p<0.0001、ANOVA検定を使用、次いで多重比較用にホルムーボンフェローニ調整)

【図16】図16は、本発明の一実施形態によるタウコンジュゲート(コンジュゲートB)が、非ヒト霊長類においてリン酸化タウおよびePHFに対する高力価の抗体を誘導することを示す図である。アカゲザルマカクを、ミョウバンとCpGアジュバント化KLH-TAUVA-C-p7.1(n=6匹)またはKLH(n=2匹)を用いて、1、29、85、および169日目に免疫化した。血液を14日毎に採取した。具体的には以下の通りである。図16Aは、KLH-TAUVA-C-p7.1を用いて免疫化した動物からの血清を、免疫化ペプチドp7.1に対する反応性について、ELISAを使用して試験したことを示す図である。図16Bは、一次免疫化の50日後にすべての動物から採取した血清は、MSDを使用してヒトePHFに対して測定可能な抗体レベルを有しており、6匹の動物のうちの3匹がこの抗原に対して高い反応性を示していたことを示す図である。図16Cは、一次免疫化の50日後に動物から採取した血清を健康な個体またはAD患者からのヒト脳切片に適用し、KLH-TAUVA-C-p7.1群からの免疫後血清はAD脳組織中の病理学的タウ構造、すなわち、神経原線維のもつれ、神経絨毛糸、および神経突起老人斑を染色した一方で、KLHで免疫化したマウスからの血清はいかなる反応性も示さず、対照組織では染色は観察されなかったことを示す図である。図16Dは、タウ免疫枯渇アッセイにて試験した場合に、KLH-TAUVA-C-p7.1を受けている動物は、タウ種と結合して枯渇させることができる抗体を有していた一方で(50日目ではp=0.03、ANOVA検定を使用、次いで多重比較用にダネットの調整)、KLHを用いた免疫化はそのような抗体を始動させなかったことを示す図である。図16Eは、免疫化前および後の血清も連続希釈した個々の試料として中和アッセイにおいて試験したことを示す図である。ベースラインからの変化(CFB)を、ワクチン接種前の-14日目(ベースライン)とワクチン接種後50、106、および190日目のそれぞれとの間の、読取り値のFRET計数の差異として計算した。その後、特定のワクチン接種後の日での応答(日_i)を以下のように計算した。"応答 = %FRET_日_i - %FRET_ベースライン"

動物を変量効果として用いた、前述の応答に対する一般的な線形混合モデルを、カテゴリ変数として扱ったワクチン群、日、および血清レベルの変数ならびにすべてのその相互作用を用いて適用した。

【図17】図17は、本発明の一実施形態によるコンジュゲートワクチン(コンジュゲートA)ならびにミョウバン水酸化物(ミョウバン)とオリゴCpG(CpG)アジュバントとの組合せを用いて免疫化したマウスが、ワクチンペプチドに対してより高い力価抗体応答をもたらすことを示す図である。成体雌C57BL/6マウス(n=5~6匹/群)を、2ugまたは0.2ugのどちらかのコンジュゲートAワクチンを用いて、筋肉内で免疫化し、コンジュゲートワクチンを、単独で、ミョウバンと共に、CpGと共に、またはミョウバンとCpGの組合せと共にのいずれかで投与した。すべてのマウスに、研究の0日目に一次免疫化を与え、次いで28日目に単一のブースター免疫化を与えた。ミョウバンアジュバントの用量は500ug/マウス/注射であり、CpGアジュバントの用量は20ug/マウス/注射であった。グラフは、ワクチンペプチドT3.5をコーティング抗原として用いた免疫化マウスから採取した血清を使用した結合ELISAの結果を示し、免疫化前(0日目)ならびに免疫化後の2つの時点(28および42日目)に1群あたりのT3.5特異的平均エンドポイント力価をプロットし、エラーバーは標準誤差を表す。表は、ノンパラメトリックなクラスカル-ワリス検定を使用して抗体価を比較し、クラスカルワリス検定の事後としてウィルコクソン符号順位検定を使用して対での群の比較を評価した結果の統計分析を示す。具体的には以下の通りである。図17Aは、マウスを、2ugのコンジュゲートAワクチンを用いて免疫化したことを示す図である。図17Bは、マウスを、0.2ugのコンジュゲートAワクチンを用いて免疫化したことを示す図である。

【図18】図18は、様々なタウペプチド対T細胞エピトープの比を有する本発明の実施

形態によるタウワクチンが、アカゲザルマカクにおいて持続的な高力価の抗リン酸化タウ抗体を誘導することを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

様々な刊行物、論文、および特許が背景技術および明細書全体にわたって引用または記載されており、これらの参考文献のそれぞれが、その全体で本明細書中に参考として組み込まれている。本明細書中に含められた文書、行為、材料、装置、論文などの議論は、本発明のコンテキストを提供する目的のものである。そのような議論は、これらの事項の任意のものまたは全体が、開示または特許請求されている任意の発明に関して従来技術の一部を形成することを承認するものではない。

10

【0020】

別段に定義しない限りは、本明細書中で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の技術者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。そうでない場合は、本明細書中で使用する特定の用語は本明細書中に記載する意味を有する。

【0021】

本明細書および添付の特許請求の範囲中で使用する単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(th)」には、コンテキストにより明らかにそうでないと指示されない限り、複数形の指示対象が含まれることに注意する必要がある。

【0022】

別段に記述しない限りは、本明細書中に記載の濃度または濃度範囲などの任意の数値は、すべての場合において用語「約」によって修飾されるとして理解されるものである。したがって、数値には、典型的には言及した値の $\pm 10\%$ が含まれる。たとえば、 1 mg/mL の濃度には $0.9\text{ mg/mL} \sim 1.1\text{ mg/mL}$ が含まれる。同様に、 $1\% \sim 10\%$ (w/v)の濃度範囲には $0.9\% (w/v) \sim 1.1\% (w/v)$ が含まれる。本明細書中で使用する数値範囲の使用は、コンテキストにより明らかにそうでないと指示されない限り、すべての可能な部分範囲、その範囲内にあるすべての個々の数値（そのような範囲内にある整数が含まれる）、および値の分数が明白に含まれる。

20

【0023】

別段に指定しない限りは、一連の要素に先行する用語「少なくとも」とは、その一連にあるすべての要素をいうと理解されるものである。当業者は、本明細書中に記載の本発明の具体的な実施形態の多くの均等物を理解する、または日常的な実験以上のものを使用せずにそれを確認できるであろう。そのような均等物は本発明によって包含されることを意図する。

30

【0024】

本明細書中で使用する用語「含むこと」、「含む」、「含まれること」、「含まれる」、「有すること」、「有する」、「含有すること」、もしくは「含有する」、またはその任意の他の変形は、記述した整数または整数群の包含を暗示するが、任意の他の整数または整数群の排除を暗示せず、また、非排他的または開放型であることを意図すると理解されるものとする。たとえば、要素のリストを含む組成物、混合物、プロセス、方法、論文、または器具は、必ずしもそれらの要素のみに限定されず、明白に列挙されていない、またはそのような組成物、混合物、プロセス、方法、論文、もしくは器具に固有でない他の要素も含まれることができる。さらに、反対のことが明白に記述されていない限りは、「または」とは、排他的なまたはではなく、包括的なまたはをいう。たとえば、条件AまたはBは、以下のうちの任意の1つによって満たされる：Aが真である（または存在する）かつBが偽である（または存在しない）、Aが偽である（または存在しない）かつBが真である（または存在する）、およびAおよびBがどちらも真である（または存在する）。

40

【0025】

当業者には理解されるであろうことに、好ましい発明の構成要素の寸法または特徴に言及する場合に本明細書中で使用する用語「約」、「約」、「一般に」、「実質的に」、および同様の用語は、記載した寸法／特徴が厳密な境界またはパラメーターではなく、機能

50

的に同じまたは同様である、それからの軽微な変形を排除しないことを示すことを理解されたい。最小限でも、数値パラメーターが含まれるそのような言及には、当分野において認められている数学的および工業的原理（たとえば、丸め、測定誤差または他の系統誤差、製作公差など）を使用して、最小有効数字を変化させない変形が含まれるであろう。

【0026】

微小管関連タンパク質タウ、MAPT、神経原線維のもつれタンパク質、対らせん状細線維-タウ、PHF-タウ、MAPTL、MTBT1としても知られる、本明細書中で使用する用語「タウ」または「タウタンパク質」、複数のアイソフォームを有する、豊富な中枢および末梢神経系のタンパク質をいう。ヒト中枢神経系（CNS）では、選択的スプライシングが原因で、352～441個のアミノ酸の長さの大きさの範囲の、6個の主要なタウアイソフォームが存在する（Hanger et al., Trends Mol Med. 15:112-9, 2009）。タウの例には、それだけには限定されないが、4つの反復および2つの挿入を有する、441個のアミノ酸の最も長いタウアイソフォーム（4R2N）、ならびに3つの反復を有し、挿入なしの、352個のアミノ酸の長さの最も短い（胎児）アイソフォーム（3R0N）などの、CNS中のタウアイソフォームが含まれる。また、タウの例には、300個の追加の残基（エクソン4a）を含有する、末梢神経中で発現される「ビッグタウ（big tau）」アイソフォームも含まれる。Friedhoff et al., Biochimica et Biophysica Acta 1502 (2000) 122-132。タウの例には、6762個のヌクレオチドの長さのmRNA転写物（NM_016835.4）によってコードされている、758個のアミノ酸の長さのタンパク質であるヒトビッグタウ、またはそのアイソフォームが含まれる。例示したヒトビッグタウのアミノ酸配列はGenBank受託番号NP_058519.3に表されている。本明細書中で使用する用語「タウ」には、（カニクイ（cynomolgous）ザル（Macaca Fascicularis））または（チンパンジー（Pan troglodytes））などのヒト以外の種からのタウの相同体が含まれる。本明細書中で使用する用語「タウ」には、完全長野生型タウの突然変異、たとえば、点突然変異、断片、挿入、欠失、およびスプライス変異体を含むタンパク質が含まれる。また、用語「タウ」には、タウアミノ酸配列の翻訳後修飾も包含される。翻訳後修飾には、それだけには限定されないがリン酸化が含まれる。

【0027】

本明細書中で使用する用語「ペプチド」または「ポリペプチド」とは、ペプチド結合によって連結された、アミノ酸残基から構成されるポリマー、関連する天然に存在する構造的変異体、およびその合成の天然に存在しない類似体をいう。この用語は、任意の大きさ、構造、または機能のペプチドをいう。典型的には、ペプチドは少なくとも3個のアミノ酸の長さである。ペプチドは、天然に存在する、組換え、もしくは合成のもの、またはその任意の組合せであることができる。合成ペプチドは、たとえば自動ポリペプチド合成機を使用して合成することができる。タウペプチドの例には、約5～約30個のアミノ酸の長さ、好ましくは約10～約25個のアミノ酸の長さ、より好ましくは約16～約21個のアミノ酸の長さのタウタンパク質の任意のペプチドが含まれる。本開示では、ペプチドをNからC末端に標準の3文字または1文字のアミノ酸略記を使用して列挙し、リン酸残基を「p」で示す。本発明において有用なタウペプチドの例には、それだけには限定されないが、配列番号1～12のいずれかのアミノ酸配列を含むタウペプチド、または配列番号1～12のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、もしくは95%同一であるアミノ酸配列を有するタウペプチドが含まれる。

【0028】

本明細書中で使用する用語「ホスホペプチド」または「ホスホエピトープ」とは、1つまたは複数のアミノ酸残基でリン酸化されたペプチドをいう。タウホスホペプチドの例には、1つまたは複数のリン酸化されたアミノ酸残基を含む任意のタウペプチドが含まれる。本発明において有用なタウホスホペプチドの例には、それだけには限定されないが、配列番号1～3もしくは5～12のいずれかのアミノ酸配列を含むタウホスホペプチド、または配列番号1～3もしくは5～12のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも75%、8

10

20

30

40

50

0%、85%、90%、もしくは95%同一であるアミノ酸配列を有するタウホスホペプチドが含まれる。

【0029】

本発明のタウペプチドは、固相ペプチド合成または組換え発現系によって合成することができる。自動ペプチド合成機は、Applied Biosystems（カリフォルニア州Foster City）などの数々の供給業者から販売されている。組換え発現系には、大腸菌（E. coli）などの細菌、酵母、昆虫細胞、または哺乳動物細胞などを含むことができる。組換え発現のための手順は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H.P. Press, NY 2d ed., 1989)によって記載されている。

【0030】

タウはヒト「自己」タンパク質である。このことは、原則的に、タウに特異的な受容体を保有するすべてのリンパ球は、発生の中に消失している（中枢性寛容）、または末梢性寛容機構によって不応性とされているはずであることを意味する。この問題は、自己または「変更された自己」タンパク質（たとえば腫瘍抗原）に対するワクチンの開発における顕著な障害であることが判明している。

【0031】

抗原（自己または感染性）に対する高品質の抗体の生成は、抗体を産生するBリンパ球だけでなく、CD4⁺T「ヘルパー」リンパ球の作用も必要とする。CD4⁺T細胞は重大な生存および成熟シグナルをBリンパ球に提供し、CD4⁺T細胞欠乏動物は免疫抑制が深刻である。また、CD4⁺T細胞は寛容機構の影響を受けやすく、強力な抗自己（たとえば抗タウ）抗体応答を生じることのさらなる障害は、タウ反応性CD4⁺T細胞がヒト／動物レパートリーにおいて希少または存在しない可能性も高いことである。

【0032】

理論に束縛されることを望まず、いかなる様式でも本発明の範囲を限定しないが、この問題は本発明のワクチン組成物によって回避され则认为られている。

【0033】

一実施形態では、HLA DR（ヒト白血球抗原－抗原D関連）分子のほとんどまたは全部と結合することができるT細胞エピトープも含む、タウペプチドを含むリポソーム（一例を図1の上部に示す）を生成する。その後、T細胞エピトープはCD4⁺T細胞を活性化させることができ、必須の成熟および生存シグナルをタウ特異的B細胞に提供する（図2）。別の実施形態では、タウペプチドと担体タンパク質とのコンジュゲートを生成し（一例を図1の下部に示す）、これは強力なヘルパーT細胞応答（図3）を生じる。本実施形態では、担体に特異的なT細胞が生存および成熟シグナルを自己反応性B細胞に提供する、「非連結認識」を使用する。したがって、タウ特異的B細胞は、親和性成熟、免疫グロブリンクラススイッチを始動させ、長期的な記憶プールを確立するために重大なシグナルを受け取る。タウリポソームおよびタウコンジュゲートを使用して、同種または異種の免疫化スキームにおいて、プライムおよび／またはブーストにおいてリポソームまたはコンジュゲートのいずれかをを用いて、タウ抗原に対する高品質な抗体を生成することができる。

【0034】

リポソーム

一般的な一態様では、本発明は、

- a. 好ましくはタウホスホペプチドであるタウペプチドと、
- b. ヘルパーT細胞エピトープと、

を含み、タウペプチドがリポソームの表面上に提示されている、リポソームに関する。

【0035】

本発明の実施形態によるリポソームは、本明細書中、「改善リポソーム」、「改善リポソームワクチン」または「本発明の実施形態によるリポソームワクチン」または「タウリポソーム」または「最適化リポソームワクチン」または「第二世代リポソーム」とも呼ばれる。

【0036】

本明細書中で使用する用語「リポソーム」とは、一般に、高い脂質含有量を有する材料、たとえば、リン脂質、コレステロールから作られる脂質小胞をいう。これらの小胞の脂質は、一般に、脂質二重層の形態で組織化されている。脂質二重層は、一般に、脂質二重層の複数のタマネギ様の殻の間に散在しており多重膜脂質小胞（MLV）を形成しているか、または非晶質中心腔内に含有されている、体積をカプセル封入している。非晶質中心腔を有する脂質小胞は単層脂質小胞である、すなわち、腔を取り囲む単一の末梢二重層を有するものである。大型単層膜ベシクル（LUV）は、一般に、100 nm～数マイクロメートル、たとえば100～200 nm以上の直径を有する一方で、小型単層脂質小胞（SUV）は、一般に、100 nm未満、たとえば20～100 nm、典型的には15～30 nmの直径を有する。

10

【0037】

特定の実施形態によれば、リポソームは1つまたは複数のタウペプチドを含む。特定の実施形態によれば、リポソーム中のタウペプチドは同じまたは異なり得る。

【0038】

当業者に知られている任意の適切なタウペプチドを、本開示に鑑みて本発明において使用することができる。特定の実施形態によれば、タウペプチドのうちの1つまたは複数は、配列番号1～12のうちの1つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、タウペプチドのうちの1つまたは複数は、配列番号1～12のうちの1つのアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、もしくは95%同一であるアミノ酸配列を含み、ここで、アミノ酸残基はどれもリン酸化されていない、または1つもしくは複数のアミノ酸残基がリン酸化されている。

20

【0039】

特定の実施形態によれば、タウペプチドのうちの1つまたは複数はタウホスホペプチドである。特定の実施形態によれば、1つまたは複数のタウホスホペプチドは、配列番号1～3もしくは5～12のうちの1つのアミノ酸配列、または配列番号1～3もしくは5～12のうちの1つのアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、もしくは95%同一であるアミノ酸配列を含み、ここで、示したアミノ酸残基のうちの1つまたは複数はリン酸化されている。好ましくは、タウホスホペプチドは配列番号1～3のうちの1つのアミノ酸配列を含む。タウペプチドはC末端がアミド化され得る。

30

【0040】

本出願の実施形態によれば、タウペプチドはリポソームの表面上に提示されている。タウペプチド、好ましくはタウホスホペプチドは、本開示に鑑みて当分野で知られている方法を使用して、リポソームの表面上に提示させることができる。たとえば、その内容が本明細書中に参考として組み込まれている米国特許第8,647,631号明細書および第9,687,447号明細書中の関連開示を参照されたい。特定の実施形態によれば、ホスホペプチドを含めた1つまたは複数のタウペプチドは、タウペプチドがリポソームの表面上に提示されることを可能にする、パルミトイル化またはドデシル修飾などの1つまたは複数の修飾をさらに含む。修飾を容易にするために、Lys、Cys、または場合によってはSerもしくはThrなどの追加のアミノ酸残基をタウペプチドに付加することができる。脂質アンカーの位置が、ペプチド配列の様々なコンホメーションを誘導することが報告されている（Hickman et al., J. Biol. Chem. vol. 286, NO. 16, pp. 13966-13976, April 22, 2011）。理論に束縛されることを望まないが、両末端に疎水性部分を付加することが、タウペプチドの病理学的ベータシートコンホメーションを増加させ得ると考えられている。したがって、1つまたは複数のタウペプチドは、両末端に疎水性部分をさらに含む。修飾されたタウペプチドはC末端がアミド化され得る。好ましくは、リポソームの表面上に提示されたタウペプチドは、配列番号27～配列番号38のうちの1つアミノ酸配列からなる。

40

【0041】

本明細書中で使用する用語「ヘルパーT細胞エピトープ」とは、ヘルパーT細胞による

50

認識が可能なエピトープを含むポリペプチドをいう。ヘルパーT細胞エピトープの例には、それだけには限定されないが、破傷風トキソイド（たとえば、P2およびP30エピトープ、それぞれT2およびT30とも呼ばれる）、B型肝炎表面抗原、コレラ毒素B、トキソイド、ジフテリアトキソイド、麻疹ウイルスFタンパク質、トラコーマクラミジア（*Chlamydia trachomatis*）主要外膜タンパク質、熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）スポロゾイト周辺（*circumsporozoite*）T、熱帯熱マラリア原虫（*P. falciparum*）CS抗原、マンソン住血吸虫（*Schistosoma mansoni*）トリオースリン酸イソメラーゼ、百日咳菌（*Bordetella pertussis*）、破傷風菌（*Clostridium tetani*）、パーツサリア・トラキサリナ（*Pertusaria trachythallina*）、大腸菌（*Escherichia coli*）TraT、およびインフルエンザウイルス赤血球凝集素（HA）が含まれる。

10

【0042】

当業者に知られている任意の適切なヘルパーT細胞エピトープを、本開示に鑑みて本発明において使用することができる。特定の実施形態によれば、ヘルパーT細胞エピトープは、配列番号23～配列番号26からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む。好ましくは、ヘルパーT細胞エピトープは、1つまたは複数のアミノ酸、たとえば、Val（V）、Ala（A）、Arg（R）、Gly（G）、Ser（S）、Lys（K）を含むペプチドリinkerなどのリンカーを介して一緒に融合された、配列番号23～配列番号26のアミノ酸配列のうちの2つ以上を含む。リンカーの長さは変動することができ、好ましくは1～5個のアミノ酸である。好ましくは、ヘルパーT細胞エピトープは、VVR、GS、RR、RKからなる群から選択される1つまたは複数のリンカーを介して一緒に融合された、配列番号23～配列番号26のアミノ酸配列のうちの3つ以上を含む。ヘルパーT細胞エピトープはそのC末端がアミド化され得る。

20

【0043】

本出願の実施形態によれば、ヘルパーT細胞エピトープは、たとえば共有結合した疎水性部分によって繫留させて、リポソーム表面上に取り込ませることができ、ここで、前記疎水性部分は、アルキル基、脂肪酸、トリグリセリド、ジグリセリド、ステロイド、スフィンゴ脂質、糖脂質、またはリン脂質、特にアルキル基または脂肪酸、特に少なくとも3個の炭素原子、特に少なくとも4個の炭素原子、特に少なくとも6個の炭素原子、特に少なくとも8個の炭素原子、特に少なくとも12個の炭素原子、特に少なくとも16個の炭素原子の炭素主鎖を有するものである。本発明の一実施形態では、疎水性部分はパルミチン酸である。あるいは、ヘルパーT細胞エピトープはリポソーム内にカプセル封入させることができる。特定の実施形態によれば、ヘルパーT細胞エピトープはリポソーム内にカプセル封入されている。

30

【0044】

ヘルパーT細胞エピトープは、本開示に鑑みて当分野で知られている方法を使用して、リポソーム中のその所望の位置を修飾することができる。特定の実施形態によれば、本発明において有用なヘルパーT細胞エピトープは、配列番号39～配列番号44のうちの1つのアミノ酸配列を含む。好ましくは、ヘルパーT細胞エピトープは、配列番号13～配列番号17からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。

【0045】

特定の実施形態によれば、リポソームは、タウペプチドとヘルパーT細胞エピトープとを1：1、2：1、3：1、4：1、5：1、または6：1の重量比で含む。

40

【0046】

一実施形態では、リポソームは、トール様受容体リガンドを含む少なくとも1つのアジュバントをさらに含む。したがって、別の一般的な態様では、本発明は、

- a. タウペプチド、好ましくはタウホスホペプチドと、
- b. ヘルパーT細胞エピトープと、
- c. i. トール様受容体9リガンド、および

- ii. トール様受容体4リガンド

のうちの少なくとも1つと

50

を含む、リボソームに関する。

【0047】

本明細書中で使用する用語「トール様受容体」または「TLR」とは、自然免疫応答において主要な役割を果たすパターン認識受容体（PRR）タンパク質のクラスをいう。TLRは、細菌、真菌、寄生生物、およびウイルスなどの微生物病原体からの病原体関連分子パターン（PAMP）を認識し、これは宿主分子とは区別することができる。TLRは、典型的には二量体として機能する膜貫通タンパク質であり、抗原提示樹状細胞および食作用マクロファージを含めた自然免疫応答に関与する細胞によって発現される。少なくとも10個のヒトTLRファミリーメンバー、すなわちTLR1～TLR10、ならびに少なくとも12個のネズミTLRファミリーメンバー、すなわちTLR1～TLR9およびTLR11～TLR13が存在し、これらは、それが認識する抗原の種類が異なる。たとえば、TLR4は、多くのグラム陰性細菌中に存在する構成要素であるリポ多糖（LPS）、ならびに低密度リポタンパク質、ベーターデフェンシン、および熱ショックタンパク質などのウイルスのタンパク質、多糖、および内在性タンパク質を認識し、TLR9は、原核ゲノムでは豊富であるが脊椎動物ゲノムでは希少である、非メチル化シトシンーリン酸ーグアニン（CpG）一本鎖または二本鎖ジヌクレオチドによって活性化される、ヌクレオチド感知TLRである。TLRの活性化は、I型インターフェロン（IFN）、炎症性サイトカイン、およびケモカインの産生、ならびに免疫応答の誘導をもたらす、一連のシグナル伝達事象をもたらす。最終的に、この炎症は適応免疫系も活性化し、その後、浸潤病原体および感染細胞の排除をもたらす。

10

20

【0048】

本明細書中で使用する用語「リガンド」とは、生体分子（たとえば受容体）と複合体を形成して生物学的目的を果たす分子をいう。特定の実施形態によれば、トール様受容体リガンドはトール様受容体作用剤である。

【0049】

本明細書中で使用する用語「作用剤」とは、1つまたは複数のTLRと結合し、受容体媒介性の応答を誘導する分子をいう。たとえば、作用剤は、受容体の活性を誘導、刺激、増加、活性化、促進、増強、またはアップレギュレートすることができる。そのような活性は「作用活性」という。たとえば、TLR4またはTLR9作用剤は、結合した受容体を介して細胞シグナル伝達を活性化または増加することができる。作用剤には、それだけには限定されないが、核酸、小分子、タンパク質、炭水化物、脂質、または受容体と結合もしくは相互作用する任意の他の分子が含まれる。作用剤は、天然受容体リガンドの活性を模倣することができる。作用剤は、受容体によって認識されることができるよう、配列、コンホメーション、電荷、または他の特徴に関してこれら天然受容体リガンドと相同的であることができる。この認識は、細胞が、天然受容体リガンドが存在していた場合と同じ様式で作用剤の存在に反応するような、細胞内での生理的および／または生化学的な変化をもたらすことができる。特定の実施形態によれば、トール様受容体作用剤はトール様受容体4作用剤およびトール様受容体9作用剤のうちの少なくとも1つである。

30

【0050】

本明細書中で使用する用語「トール様受容体4作用剤」とは、TLR4の作用剤として役割を果たす任意の化合物をいう。当業者に知られている任意の適切なトール様受容体4作用剤を、本開示に鑑みて本発明において使用することができる。本発明において有用なトール様受容体4リガンドの例には、それだけには限定されないがモノホスホリル脂質A（MPLA）を含めたTLR4作用剤が含まれる。本明細書中で使用する用語「モノホスホリル脂質A」またはMPLAとは、グラム陰性細菌リポ多糖（LPS）内毒素の生物活性部分である、脂質Aの修飾された形態をいう。MPLAは、免疫賦活活性を維持しつつも、LPSより毒性が低い。ワクチンアジュバントとしては、MPLAはワクチン抗原に対する細胞応答および液性応答をどちらも刺激する。MPLAの例には、それだけには限定されないが、3-O-脱アシル-4'-モノホスホリル脂質A、モノホスホリルヘキサアシル脂質A、3-脱アシル、モノホスホリル3-脱アシル脂質A、および構造的に関連

40

50

するその変異体が含まれる。本発明において有用なMPLAは、当分野で知られている方法を使用して、または、Avanti Polar Lipids（米国アラバマ州Alabaster）の3D-（6-アシル）PHAD（登録商標）、PHAD（登録商標）、PHAD（登録商標）-504、3D-PHAD（登録商標）、もしくは様々な商業的供給源のMPL（商標）などの商業的供給源から得ることができる。特定の実施形態によれば、トール様受容体4作用剤はMPLAである。本明細書中で使用する用語「トール様受容体9作用剤」とは、TLR9の作用剤として作用する任意の化合物をいう。当業者に知られている任意の適切なトール様受容体9作用剤を、本開示に鑑みて本発明において使用することができる。本発明において有用なトール様受容体9リガンドの例には、それだけには限定されないがCpGオリゴヌクレオチドを含めたTLR9作用剤が含まれる。

10

【0051】

本明細書中で使用する用語「CpGオリゴヌクレオチド」、「CpGオリゴデオキシヌクレオチド」、または「CpG ODN」とは、少なくとも1つのCpGモチーフを含むオリゴヌクレオチドをいう。本明細書中で使用する「オリゴヌクレオチド」、「オリゴデオキシヌクレオチド」、または「ODN」とは、複数の連結したヌクレオチド単位から形成されたポリヌクレオチドをいう。そのようなオリゴヌクレオチドは、既存の核酸源から得ることができるか、または合成方法によって生成することができる。本明細書中で使用する用語「CpGモチーフ」とは、リン酸結合またはリン酸ジエステル主鎖もしくは他のヌクレオチド間結合によって連結された非メチル化シトシン-リン酸-グアニン（CpG）ジヌクレオチド（すなわち、シトシン（C）次いでグアニン（G））を含有するヌクレオチド配列をいう。

20

【0052】

特定の実施形態によれば、CpGオリゴヌクレオチドは脂質付加されている、すなわち脂質部分とコンジュゲートされている（共有結合している）。

【0053】

本明細書中で使用する「脂質部分」とは、親油性構造を含有する部分をいう。アルキル基、脂肪酸、トリグリセリド、ジグリセリド、ステロイド、スフィンゴ脂質、糖脂質、またはリン脂質、特にコレステロールなどのステロールまたは脂肪酸などの脂質部分は、核酸などの高親水性分子に付着した場合に、血漿タンパク質の結合、結果的には親水性分子の循環半減期を実質的に増強させることができる。さらに、リポタンパク質などの特定の血漿タンパク質との結合は、対応するリポタンパク質受容体（たとえば、LDL受容体、HDL受容体、またはスカベンジャー受容体SR-B1）を発現する特定の組織中への取り込みを増加させることが示されている。特に、ホスホペプチドおよび／またはCpGオリゴヌクレオチドとコンジュゲートさせた脂質部分は、前記ペプチドおよび／またはオリゴヌクレオチドが疎水性部分を介してリポソームの膜内に繫留されることを可能にする。

30

【0054】

特定の実施形態によれば、本開示に鑑みて、CpGオリゴヌクレオチドは任意の適切なヌクレオチド間結合を含むことができる。

【0055】

本明細書中で使用する用語「ヌクレオチド間結合」とは、隣接するヌクレオチド間のリン原子と荷電基または中性基からなる、2つのヌクレオチドをその糖を介して結合させる化学結合をいう。ヌクレオチド間結合の例には、リン酸ジエステル（po）、ホスホロチオエート（ps）、ホスホロジチオエート（ps2）、メチルホスホネート（mp）、およびメチルホスホロチオエート（rp）が含まれる。ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、およびメチルホスホロチオエートは安定化ヌクレオチド間結合である一方で、リン酸ジエステルは天然に存在するヌクレオチド間結合である。オリゴヌクレオチドホスホロチオエートは、典型的にはRpおよびSpホスホロチオエート結合のランダムなラセミ混合物として合成される。

40

【0056】

当業者に知られている任意の適切なCpGオリゴヌクレオチドを、本開示に鑑みて本発

50

明において使用することができる。そのようなC p Gオリゴヌクレオチドの例には、それだけには限定されないが、C p G 2 0 0 6 (C p G 7 9 0 9としても知られる)、C p G 1 0 1 8、C p G 2 3 9 5、C p G 2 2 1 6、またはC p G 2 3 3 6が含まれる。

【0057】

本開示に鑑みて当分野で知られている方法を使用して、C p Gオリゴヌクレオチドに脂質付加することができる。一部の実施形態では、C p Gオリゴヌクレオチドの3'末端は、任意選択でP E Gリンカーを介して、リン酸結合を介してコレステロール分子と共有結合している。また、他の親油性部分もC p Gオリゴヌクレオチドの3'末端と共有結合することができる。たとえば、C p Gオリゴヌクレオチドは、任意選択でP E Gリンカーを介して、リポソームからのリン脂質と同じ長さの脂質アンカー、すなわち、1本のパルミチン酸鎖 (P a l - O Hもしくは類似のものを使用、カップリング用に活性化) または2本のパルミチン酸 (たとえば1, 2-ジパルミトイル-s n -グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N- (スクシニル) もしくは類似のものを使用、カップリング用に活性化) と共有結合することができる。たとえば、その内容が本明細書中に参考として組み込まれている米国特許第7, 741, 297号明細書中の関連開示を参照されたい。P E Gの長さは、たとえば1~5個のP E G単位で変動することができる。

【0058】

他のリンカーも、C p Gオリゴヌクレオチドを親油性部分 (コレステロール分子など) と共有結合させるために使用することができ、その例には、それだけには限定されないが3~12個の炭素を有するアルキルスペーサーが含まれる。オリゴヌクレオチド化学に適合性のある短いリンカーがアミノジオールとして必要である。一部の実施形態では、共有結合にリンカーを使用しない。たとえば、その関連開示が本明細書中に参考として組み込まれているRies et al., "Convenient synthesis and application of versatile nucleic acid lipid membrane anchors in the assembly and fusion of liposomes, Org. Biomol. Chem., 2015, 13, 9673を参照されたい。

【0059】

特定の実施形態によれば、本発明において有用な脂質付加C p Gオリゴヌクレオチドは、配列番号18~配列番号22からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチド配列は、1つまたは複数のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含んでおり、リンカーを介して少なくとも1つのコレステロールと共有結合している。任意の適切なリンカーを使用してC p Gオリゴヌクレオチドをコレステロール分子と共有結合させることができる。好ましくは、リンカーはポリエチレングリコール (P E G) を含む。

【0060】

特定の実施形態によれば、リポソームは、

- a. タウホスホペプチドと、
- b. ヘルパーT細胞エピトープと、
- c. 脂質付加C p Gオリゴヌクレオチドと、
- d. トール様受容体4リガンドと

を含み、タウホスホペプチドはリポソームの表面上に提示されており、ヘルパーT細胞エピトープはリポソーム内にカプセル封入されている。

【0061】

特定の実施形態によれば、リポソームは、

- a. 配列番号27~配列番号38からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するタウペプチドと、
- b. 配列番号39~配列番号44からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するヘルパーT細胞エピトープ、好ましくは、配列番号13~配列番号17からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるヘルパーT細胞エピトープと、
- c. 配列番号18~配列番号22からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有し、1つまたは複数のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、リンカーを介して少なくとも1つのコレステロールと共有結合している、脂質付加C p Gオリゴヌクレオチドと

d. モノホスホリル脂質 A (MPLA) とを含む。

【0062】

特定の実施形態によれば、リポソームは、1,2-ジミリスチル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン (DMPC)、1,2-ジミリスチル-sn-グリセロール-3-ホスホリル-3'-rac-グリセロール (DMPG)、およびコレステロールからなる群から選択される1つまたは複数の脂質をさらに含む。

【0063】

特定の実施形態によれば、リポソームは緩衝液をさらに含む。当業者に知られている任意の適切な緩衝液を、本開示に鑑みて本発明において使用することができる。一実施形態では、リポソームはリン酸緩衝生理食塩水を含む。特定の実施形態によれば、緩衝液はヒスチジンおよびスクロースを含む。

【0064】

特定の実施形態によれば、リポソームは、DMPC、DMPG、コレステロール、タウホスホペプチド、およびヘルパーT細胞エピトープを9:1:7:0.07:0.04のモル比で含む。

【0065】

本発明のリポソームは、本開示に鑑みて当分野で知られている方法を使用して作製することができる。

【0066】

本出願の例示的なリポソームを図1に例示する。より詳細には、タウテトラパルミトイル化ホスホペプチド (pタウペプチドT3、配列番号28) は、タウペプチドのそれぞれの末端で2つのパルミチン酸を介してリポソームの表面上に提示されている。脂質付加 CpG (アジュバント CpG 7909-Chol) を含む TLR-9 リガンドは、共有結合しているコレステロールを介してリポソーム膜内に取り込まれている。TLR-4 リガンド (アジュバント 3D-(6-アシル) PHAD (登録商標)) も膜内に取り込まれている。ヘルパーT細胞エピトープ (PAN-DR 結合剤 T50) はカプセル封入されている。

【0067】

コンジュゲート

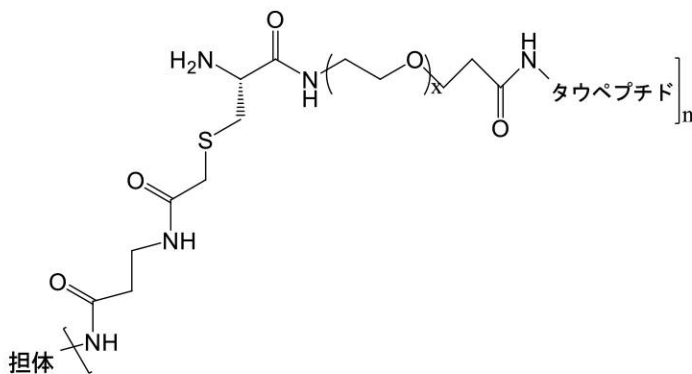
一般的な一態様では、本発明は、タウペプチドと、それとコンジュゲートさせた免疫原性担体とを含むコンジュゲートに関する。

【0068】

特定の態様によれば、コンジュゲートは、以下の構造：

【0069】

【化3】



または式 (II) の構造：

【0070】

10

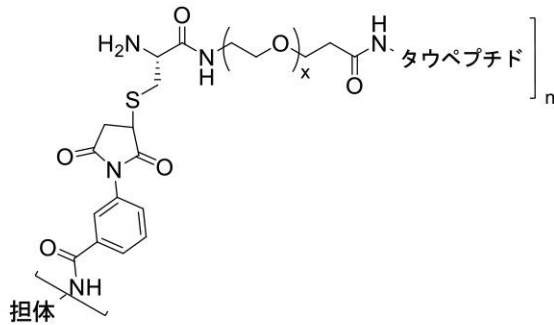
20

30

40

50

【化 4】



10

【式中、

x は、0～10の整数であり、

n は、2～15、好ましくは3～11の整数である]

を有する。

【0071】

特定の実施形態によれば、x は、1～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、または2～3の整数である。特定の実施形態によれば、x は3である。

【0072】

特定の実施形態によれば、n は、2～15、3～11、3～9、3～8、または3～7である。

20

【0073】

特定の実施形態によれば、コンジュゲートは1つまたは複数のタウペプチドを含む。特定の実施形態によれば、コンジュゲートのタウペプチドは同じまたは異なり得る。

【0074】

特定の実施形態によれば、任意の適切なタウペプチドを、本開示に鑑みて本発明において使用することができる。特定の実施形態によれば、タウペプチドのうちの1つまたは複数は、配列番号1～12のうちの1つのアミノ酸配列、または配列番号1～12のうちの1つのアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、もしくは95%同一であるアミノ酸配列を含み、ここで、アミノ酸残基のうちの0個、1個、または複数がリン酸化されている。

30

【0075】

特定の実施形態によれば、タウペプチドのうちの1つまたは複数はタウホスホペプチドである。特定の実施形態によれば、1つまたは複数のタウホスホペプチドは、配列番号1～3もしくは5～12のうちの1つのアミノ酸配列、または配列番号1～3もしくは5～12のうちの1つのアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、もしくは95%同一であるアミノ酸配列を含み、ここで、示したアミノ酸残基のうちの1つまたは複数はリン酸化されている。

【0076】

特定の実施形態によれば、タウホスホペプチドは配列番号1～3のうちの1つのアミノ酸配列からなる。

40

【0077】

本明細書中で使用する用語「免疫原性担体」とは、タウペプチドとカップリングさせることができる免疫原性物質をいう。タウペプチドとカップリングされた免疫原性部分は、免疫応答を誘導し、タウペプチドと特異的に結合することができる抗体の産生を誘発することができる。免疫原性部分は、外来物として認識され、したがって宿主から免疫応答を誘発させる、タンパク質、ポリペプチド、糖タンパク質、複合多糖、粒子、核酸、ポリヌクレオチドなどを含めた作動可能な部分である。当業者に知られている任意の適切な免疫原性担体を、本開示に鑑みて本発明において使用することができる。特定の実施形態によれば、免疫原性担体は、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、破傷風トキソイ

50

ド、CRM197（ジフテリア毒素の無毒性形態）、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）由来の外膜タンパク質混合物（OMP）、またはその誘導体である。特定の実施形態によれば、免疫原性担体はKLHまたはCRM197である。

【0078】

特定の実施形態によれば、タウペプチドはリンカーを介して担体とコンジュゲートしている。本明細書中で使用する用語「リンカー」とは、免疫原性担体をタウペプチドと結合させる化学部分をいう。当業者に知られている任意の適切なリンカーを、本開示に鑑みて本発明において使用することができる。リンカーは、たとえば、単一共有結合、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のヘテロアルキル部分、ポリエチレングリコール（PEG）リンカー、ペプチドリンカー、糖に基づくリンカー、ジスルフィド結合もしくはプロテアーゼ切断部位などの切断可能なリンカー、アミノ酸、またはその組合せであることができる。リンカーの例は、ポリエチレングリコール（PEG）、スクシンイミジル3-（ブromoアセトアミド）プロピオネート（SBAP）、*m*-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）のうちの1つまたは複数、Cys、Lys、または場合によってはSerもしくはThrなどの1つまたは複数のアミノ酸、あるいはその組合せを含むことができる。

【0079】

特定の実施形態によれば、リンカーは、 $(C_2H_4O)_x$ -システイン-アセトアミドプロピオンアミドまたは*m*-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル-システイン- $(C_2H_4O)_x$ を含む【式中、 x は、0～10の整数、たとえば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である】。

【0080】

特定の実施形態によれば、担体はリンカーを介してタウペプチドのN末端と共有結合している。

【0081】

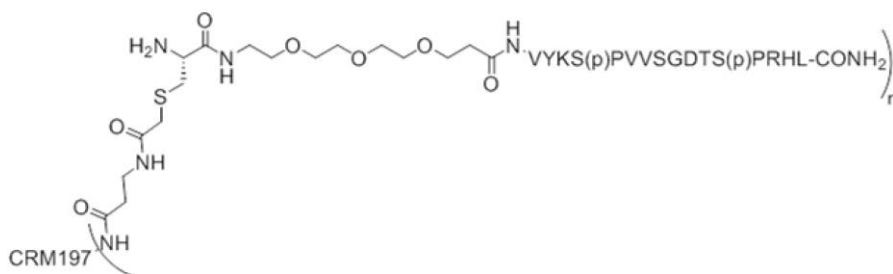
他の特定の実施形態によれば、担体はリンカーを介してタウペプチドのC末端と共有結合している。

【0082】

特定の実施形態によれば、コンジュゲートは、以下の構造：

【0083】

【化5】



【式中、 n は、2～15、好ましくは3～11、より好ましくは3～7の整数である】を有する。

【0084】

本発明のコンジュゲートは、本開示に鑑みて当分野で知られている方法によって作製することができる。たとえば、上記コンジュゲートは、スクシンイミジル3-（ブromoアセトアミド）プロピオネート（SBAP）：

【0085】

10

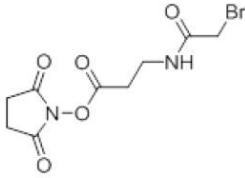
20

30

40

50

【化 6】



を CRM 197 のアミノ基と反応させてアミド結合を形成させることによって、形成することができる。続いて、この CRM 197 前駆体を、その N 末端またはその C 末端で遊離求核性チオール基を有する PEG-システインリンカーとコンジュゲートしているタウペプチド（たとえば配列番号 2 のリン酸化タウペプチド）と反応させて、タウホスホペプチドコンジュゲートを形成することができる。

【0086】

本出願の一実施形態による例示的なコンジュゲートを図 1 に例示する。より詳細には、複数のタウホスホペプチド（p タウペプチド T 3.76）が担体タンパク質 CRM 197 と共有結合している。

【0087】

医薬組成物

一般的な一態様では、本発明は、治療有効量の本発明のリボソームまたはコンジュゲートを、薬学的に許容される賦形剤および／または担体と一緒に含む、医薬組成物に関する。薬学的に許容される賦形剤および／または担体は当分野で周知である（Remington's Pharmaceutical Science (15th ed.), Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980 を参照）。医薬組成物の好ましい配合は、意図する投与様式および治療の適用に依存する。組成物には、動物またはヒト投与のための医薬組成物を配合するために一般的に使用されるビヒクルとして定義される、薬学的に許容される無毒性の担体または希釈剤が含まれることができる。希釈剤は、組合せの生物活性に影響を与えないように選択する。そのような希釈剤の例は、蒸留水、生理的リン酸緩衝食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、およびハンス液である。さらに、医薬組成物または配合物には、他の担体、アジュバント、または無毒性の非治療的な非免疫原性の安定化剤なども含まれ得る。担体、賦形剤、または希釈剤の特徴は特定の適用の投与経路に依存することが理解されよう。

【0088】

医薬組成物は、同じ免疫原性タウペプチドの混合物を含有することができる。あるいは、医薬組成物は、本発明の異なる免疫原性タウペプチドの混合物を含有することができる。

【0089】

神経疾患に対するワクチンに関連する別の問題は、有効性を保証するために並外れて高い抗体価が必要な可能性があることである。これは、ワクチンの標的抗原が脳内に位置しているからである。脳は、血液脳関門（BBB）と呼ばれる特殊な細胞構造によって循環から分離されている。BBB は、循環から脳内への物質の通過を制限する。これにより、毒素、微生物などが中枢神経系内に入ることが防止される。また、BBB は、免疫媒介物質（抗体など）の、脳を取り囲む間質液および脳脊髄液内への効率的な侵入を防止するという、潜在的により望ましくない効果も有する。

【0090】

全身循環中に存在する抗体の約 0.1% が BBB を横断して脳に入る。このことは、CNS 抗原を標的とするワクチンによって誘導される全身性力価が、脳内で有効となるためには、最小有効力価よりも少なくとも 1000 倍高くなければならないことを意味する。

【0091】

特定の実施形態によれば、本発明の医薬組成物はしたがって 1 つまたは複数の適切なアジュバントをさらに含む。したがって、リボソームまたはコンジュゲート中に存在する本発明のタウペプチドは、対象において所望の免疫応答を達成するために適切なアジュバン

トと組み合わせて投与することができる。適切なアジュバントは、本発明のリボソームまたはコンジュゲートの投与の前、後、またはそれと同時に投与することができる。好ましいアジュバントは、応答の定性的形態に影響を与える免疫原のコンホメーション変化を引き起こさずに、本来備わっている免疫原に対する応答を増大させる。アジュバントの例は、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、および硫酸アルミニウムなどのアルミニウム塩（ミョウバン）である。そのようなアジュバントは、MPLAクラス（3脱-O-アシル化モノホスホリル脂質A（MPL（商標））、モノホスホリルヘキサアシル脂質A 3-脱アシル合成（3D-（6-アシル）PHAD（登録商標））、PHAD（商標）、PHAD（登録商標）-504、3D-PHAD（登録商標））脂質A）、ポリグルタミン酸またはポリリシンなどのポリマーまたは単量体のアミノ酸等の、他の特定の免疫賦活剤を用いてまたは用いずに使用することができる。そのようなアジュバントは、ムラミルペプチド（たとえば、N-アセチルムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン（thr-MDP）、N-アセチル-L-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン（nor-MDP）、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-（1'-2'ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ）-エチルアミン（MTP-PE）、N-アセチルグルコサミニル-N-アセチルムラミル-L-Ala-D-イソグル-L-Ala-ジパルミトキシプロピルアミド（DTP-DPP）Theramide（商標））、または他の細菌細胞壁構成要素などの、他の特定の免疫賦活剤を用いてまたは用いずに使用することができる。水中油乳濁液には、5%のスクアレン、0.5%のTween 80、および0.5%のSpan 85を含有する（任意選択で様々な量のMTP-PEを含有する）MF59（微小流動化装置を使用してサブミクロン粒子へと配合）（国際公開第90/14837号パンフレット参照）、10%のスクアレン、0.4%のTween 80、5%のプルロニックブロックポリマーL121、およびthr-MDPを含有するSAF（サブミクロン乳濁液へと微小流動化またはボルテックスしてより大きな粒径の乳濁液を生成するかのいずれか）、Ribi（商標）アジュバント系（RAS）（Ribi ImmunoChem、モンタナ州Hamilton）0.2%のTween 80、ならびに、モノホスホリル脂質A（MPL（商標））、トレハロースジミコレート（TDM）、および細胞壁骨格（CWS）、好ましくはMPL（商標）+CWS（Detox（商標））からなる群から選択される1つまたは複数の細菌細胞壁構成要素が含まれる。他のアジュバントには、完全フロイントアジュバント（CFA）、ならびにインターロイキン（IL-1、IL-2、およびIL-12）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、および腫瘍壊死因子（TNF）などのサイトカインが含まれる。

【0092】

2つ以上の治療を対象に投与するコンテキストにおいて本明細書中で使用する用語「組み合わせて」とは、複数の治療薬の使用をいう。用語「組み合わせて」の使用は、治療薬を対象に投与する順序を制限しない。たとえば、第1の治療薬（たとえば本明細書中に記載の組成物）を、第2の治療薬を対象に投与する前（たとえば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、16時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、もしくは12週間前）、それと同時に、またはそれに続いて（たとえば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、16時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、もしくは12週間後）に投与することができる。

【0093】

本発明の医薬組成物は、当分野で周知の方法によって配合することができる。組成物中のそれぞれの構成要素の最適な比は、本開示に鑑みて当業者に周知の技法によって決定することができる。

【0094】

使用方法

本発明の別の一般的な態様は、対象に本発明の一実施形態による医薬組成物を投与することを含む、神経変性疾患、障害、または状態を患っている対象においてタウタンパク質に対する免疫応答を誘導する方法に関する。特定の態様によれば、免疫応答はリン酸化タウタンパク質、好ましくはe P H Fに対して誘導される。

【0095】

本発明の別の一般的な態様は、神経変性疾患、障害、または状態、対象に本発明の一実施形態による医薬組成物を投与することを含む、処置または防止する方法に関する。

【0096】

本明細書中で使用する用語「誘導する」および「刺激する」ならびにその変形は、細胞活性のいかなる量の測定可能な増加をいう。免疫応答の誘導には、たとえば、免疫細胞集団の活性化、増殖、もしくは成熟、サイトカイン産生の増加、および／または増加した免疫機能の別の指標が含まれることができる。特定の実施形態では、免疫応答の誘導には、B細胞の増殖の増加、抗原特異的抗体の産生、抗原特異的T細胞の増殖の増加、樹状細胞抗原提示の改善、ならびに／または特定のサイトカイン、ケモカイン、および共刺激マーカーの発現の増加が含まれることができる。

【0097】

動物またはヒト生物への投与の際に抗タウ免疫応答を誘導または刺激する能力は、当分野において標準的である様々なアッセイを使用して *in vitro* または *in vivo* のどちらかで評価することができる。免疫応答の開始および活性化を評価するために利用可能な技法の一般的な説明には、たとえば Coligan et al. (1992 and 1994, Current Protocols in Immunology; ed. J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health) を参照されたい。細胞性免疫の測定は、当分野で容易に知られている方法によって、たとえば、CD4⁺ および CD8⁺ T細胞に由来するものを含めた活性化されたエフェクター細胞によって分泌されたサイトカインプロファイルの測定によって（たとえば、ELISPOTによるIL-4またはIFNガンマ産生細胞の定量）、免疫エフェクター細胞の活性化状態の決定によって（たとえば、古典的な[3H]チミジン取り込みによるT細胞増殖アッセイ）、感作された対象において抗原特異的Tリンパ球をアッセイすることによって（たとえば、細胞毒性アッセイにおけるペプチド特異的溶解など）、行うことができる。

【0098】

細胞応答および／または液性応答を刺激する能力は、対象からの生体試料（たとえば、血液、血漿、血清、PBMC、尿、唾液、糞便、CSF、またはリンパ液）を、医薬組成物中で投与した免疫原性タウペプチドに向けられた抗体の存在について試験することによって、決定することができる（たとえばHarlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Pressを参照）。たとえば、免疫原を提供する組成物の投与に応答して産生された抗体の力価は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ドットプロット、SDS-PAGEゲル、ELISPOT、または抗体依存性細胞貪食（ADCP）アッセイによって測定することができる。

【0099】

本明細書中で使用する用語「対象」とは、動物をいう。特定の実施形態によれば、対象は、非霊長類（たとえば、ラクダ、ロバ、シマウマ、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ラット、ウサギ、モルモット、もしくはマウス）または霊長類（たとえば、サル、チンパンジー、もしくはヒト）を含めた哺乳動物である。特定の実施形態によれば、対象はヒトである。

【0100】

本明細書中で使用する用語「治療有効量」とは、対象において所望の生物学的または医薬的応答を誘発する、活性成分または構成要素の量をいう。治療有効量は、記述した目的に関連して、経験的にかつルーチン的な様式で決定することができる。たとえば、最適な用量範囲の同定を助けるために、*in vitro* アッセイを任意選択で用いることができる。特定の有効用量の選択は、処置または防止する疾患、関与する症状、患者の体重、患者の免疫状態、および当業者に知られている他の要因を含めたいくつかの要因の考慮に

10

20

30

40

50

基づいて、当業者によって（たとえば臨床治験を介して）決定することができる。また、配合物中で用いる正確な用量も投与経路および疾患の重症度に依存し、従事者の判断およびそれぞれの患者の状況に従って決定されるべきである。有効用量は、*in vitro* または動物モデル試験系から導き出された用量応答曲線から外挿することができる。

【0101】

本明細書中で使用する用語「処置する」、「処置すること」、および「処置」はすべて、神経変性疾患、障害、または状態に関連する少なくとも1つの測定可能な物理的パラメーターの寛解または逆転をいうことを意図し、これらは必ずしも対象において識別可能である必要はないが、対象において識別可能であることができる。また、用語「処置する」、「処置すること」、および「処置」は、疾患、障害、または状態の回帰を引き起こすこと、進行を防止すること、または進行を少なくとも遅らせることもいうことができる。特定の実施形態では、「処置する」、「処置すること」、および「処置」とは、神経変性疾患、障害、または状態に関連する1つまたは複数の症状の軽減、発生もしくは発症の防止、または持続期間の短縮をいう。特定の実施形態では、「処置する」、「処置すること」、および「処置」とは、疾患、障害、または状態の再発の防止をいう。特定の実施形態では、「処置する」、「処置すること」、および「処置」とは、疾患、障害、または状態を有する対象の生存の増加をいう。特定の実施形態では、「処置する」、「処置すること」、および「処置」とは、対象における疾患、障害、または状態の排除をいう。

【0102】

特定の実施形態によれば、治療有効量とは、以下の効果のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれより多くを達成するために十分な治療薬の量をいう：(i) 処置する疾患、障害、もしくは状態、またはそれに関連する症状の重症度の軽減または寛解、(ii) 処置する疾患、障害、もしくは状態、またはそれに関連する症状の持続期間の短縮、(iii) 処置する疾患、障害、もしくは状態、またはそれに関連する症状の進行の防止、(iv) 処置する疾患、障害、もしくは状態、またはそれに関連する症状の回帰を引き起こすこと、(v) 処置する疾患、障害、もしくは状態、またはそれに関連する症状の発生または発症の防止、(vi) 処置する疾患、障害、もしくは状態、またはそれに関連する症状の再発の防止、(vii) 処置する疾患、障害、もしくは状態、またはそれに関連する症状を有する対象の入院の短縮、(viii) 処置する疾患、障害、もしくは状態、またはそれに関連する症状を有する対象の入院の長さの短縮、(ix) 処置する疾患、障害、もしくは状態、またはそれに関連する症状を有する対象の生存の増加、(x) 対象における処置する疾患、障害、もしくは状態、またはそれに関連する症状の阻害または軽減、および／あるいは (xi) 別の治療薬の予防的または治療的効果の増強または改善。

【0103】

本明細書中で使用する「神経変性疾患、障害、または状態」には、本開示に鑑みて当業者に知られている任意の神経変性疾患、障害、または状態が含まれる。神経変性疾患、障害、または状態の例には、タウオパチーと呼ばれるタウ関連の疾患、障害、または状態などの、神経原線維病変の形成によって引き起こされるまたはそれに関連する神経変性疾患または障害が含まれる。特定の実施形態によれば、神経変性疾患、障害、または状態には、それだけには限定されないが、アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、拳闘家認知症、ダウン症候群、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、封入体筋炎、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、外傷性脳傷害、筋萎縮性側索硬化症、グアムのパーキンソン認知症複合、神経原線維のもつれを伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、レビー認知症筋萎縮性側索硬化症、石灰化を伴うびまん性の神経原線維のもつれ、前頭側頭型認知症、好ましくは17番染色体に連鎖するパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症 (FTDP-17)、前頭側頭葉認知症、ハレルフォルデンスパッツ病、多系統萎縮症、ニーマン・ピック病C型、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性汎脳炎、もつれのための認知症、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィー、慢性外傷性脳障害 (CTE)、原発性加齢関連タウオパチー (PART)、またはレビー小体認知症 (L

BD)を含めた、タウおよびアミロイド病理の共存を示す疾患または障害のうちの任意のものが含まれる。特定の実施形態によれば、神経変性疾患、障害、または状態はアルツハイマー病または別のタウオパチーである。

【0104】

また、本発明は、対象の脳からのタウ凝集体の排除を促進するために有効な条件下で、対象に本発明の一実施形態による医薬組成物を投与することを含む、対象の脳からのタウ凝集体の排除を促進する方法も提供する。特定の実施形態によれば、タウ凝集体は神経原線維のもつれまたはその病理学的タウ前駆体である。

【0105】

また、本発明は、対象におけるタウ病理に関連する行動性表現型の進行を遅延させるために有効な条件下で、対象に本発明の一実施形態による医薬組成物を投与することを含む、対象におけるタウ病理に関連する行動性表現型の進行を遅延させる方法も提供する。

【0106】

本発明の好ましい実施形態では、本発明の一実施形態による医薬組成物の投与を介したタウペプチドの投与は、対象においてタウペプチドおよびタウの病理学的形態に対する活性免疫応答を誘導し、したがって、関連するタウ凝集体の排除を容易にする、タウ病理に関連する行動の進行を遅延させる、および／または根底にあるタウオパチーを処置する。本発明のこの態様によれば、免疫応答は、タウペプチドに対して向けられた液性（抗体媒介性）応答およびT細胞エпитープまたは免疫原性担体に対して向けられた細胞（抗原特異的T細胞またはその分泌産物によって媒介）応答の有益な発生を含む。

【0107】

本明細書中で使用する、タウ病理に関連する行動性表現型には、それだけには限定されないが、認知機能障害、早期人格変化および脱抑制、アパシー、無為、無言症、失行症、固執、常同動作／行動、口愛過度、混乱、連続課題の計画または構築不能、利己的／無感覚、反社会的特質、共感欠如、口ごもり、頻繁な錯誤的な誤りを伴うが理解は比較的保たれている失文法的な発話、理解障害および字句発見欠損症、緩徐進行性歩行不安定症、後方突進、すくみ、頻繁な転倒、レボドパ不応性軸性硬直、核上性中止麻痺、矩形波眼球運動、ゆっくりとした垂直サッケード、仮性球麻痺、肢失行症、ジストニア、皮質性感覚消失、および振戦が含まれる。

【0108】

本発明の方法を実施するにあたって、本発明の免疫原性ペプチドまたは抗体を投与する前に、アルツハイマー病もしくは他のタウオパチーに罹患しているもしくは罹患する危険性にある対象、脳内にタウ凝集体を有する対象、またはもつれ関連の行動性表現型を示している対象を選択することが好ましい。処置に従順な対象には、疾患の危険性にあるが症状を示していない個体、および現在症状を示している患者が含まれる。アルツハイマー病の場合、事実上誰もがアルツハイマー病を罹患する危険性にある。したがって、本方法は、対象患者の危険性のいかなる評価も必要とせずに、一般集団に予防的に投与することができる。本方法は、既知のアルツハイマー病の遺伝的リスクを有する個体に特に有用である。そのような個体には、疾患を経験した親族を有する者、および遺伝子または生化学的マーカーの分析によってその危険性が決定されている者が含まれる。

【0109】

無症候性の患者では、処置を任意の年齢（たとえば、10、20、30歳）で開始することができる。しかし、通常は、患者が40、50、60、または70歳に達するまで処置を開始する必要はない。処置は、典型的には、一定期間にわたる複数回の投薬を伴う。処置は、抗体、または治療剤に対する活性化されたT細胞もしくはB細胞の応答を、経時的にアッセイすることによってモニタリングすることができる。応答が減少した場合はブースター用量を指示している。

【0110】

予防的適用では、タウペプチドを含有する医薬組成物を、アルツハイマー病または他のタウオパチーに罹患しやすい、または他の様式でその危険性がある患者に、疾患の生化学

10

20

30

40

50

的、組織学的および／または行動学的症状、疾患の発生中に提示されるその合併症および中間病理学的表現型を含めた危険性を排除もしくは低下させる、重症度を軽くする、または疾患の発症を遅延させるために十分な量で投与する。治療的適用では、タウペプチドを含有する医薬組成物を、そのような疾患が疑われる、または既にそれに罹患している患者に、疾患の発生におけるその合併症および中間病理学的表現型を含めた疾患の症状（生化学的、組織学的、および／または、行動学的）を治療する、または少なくとも部分的に停止するために十分な量で、投与する。

【0111】

神経変性疾患、障害、または状態を防止および／または処置するために有効な用量の本発明の医薬組成物は、投与様式、標的部位、患者の生理的状态、投与した他の医薬品、および処置が予防的であるか治療的であるかを含めた、多くの様々な要因に応じて変動する。ペプチドの量はアジュバントも投与するかどうかに依存し、アジュバントの非存在下ではより高用量が必要となる。注射のタイミングは、1日1回から1年に1回から10年に1回まで、顕著に変動する可能性がある。典型的なレジメンは、免疫化、次いで、6週間間隔などの時間間隔でのブースター注射からなる。別のレジメンは、免疫化、次いで、1、2、6、9、および12カ月後のブースター注射からなる。別のレジメンは、一生涯2カ月ごとの注射を伴う。あるいは、ブースター注射は、免疫応答のモニタリングによって指示されるように不規則であることができる。

10

【0112】

当業者には、プライムおよびブースト用の投与のレジメンは、投与後の測定した免疫応答に基づいて調整できることが容易に理解されよう。たとえば、ブースト用組成物は、一般に、プライム用組成物の投与の数週間または数カ月後、たとえば、プライム用組成物の投与の約2～3週間後、または4週間後、または8週間後、または16週間後、または20週間後、または24週間後、または26週間後、または28週間後、または30週間後、または32週間後、または36週間後、または1～2年後に投与する。

20

【0113】

ペプチドは、予防的および／または治療的処置のために、非経口、局所、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、腹腔内、皮内、鼻腔内、または筋肉内の手段によって投与することができる。免疫原性剤の最も典型的な投与経路は皮下または筋肉内注射である。この後者の種類の注射は、最も典型的には腕または脚の筋肉内に行われる。

30

【0114】

特定の態様によれば、1つまたは複数のブースト免疫化を投与することができる。それぞれのプライム用およびブースト用組成物中の抗原は、いかに多数のブースト用組成物を用いようとも、同一である必要はないが、抗原決定基を共有するまたは互いに実質的に類似であるべきである。

【0115】

組成物は、所望する場合は、活性成分を含有する1つまたは複数の単位剤形を含有することができる、キット、パック、またはディスペンサーで提示することができる。キットは、たとえば、ブリストパックなどの金属またはプラスチックの箔を含むことができる。キット、パック、またはディスペンサーには投与の指示書を添付することができる。

40

【0116】

特定の実施形態によれば、キットは、本発明の一実施形態によるリポソームを含む医薬組成物および本発明の一実施形態によるコンジュゲートを含む医薬組成物のうちの少なくとも1つを含む。

【0117】

実施形態

また、本発明は、以下の非限定的な実施形態も提供する。

【0118】

実施形態1は、

a. タウペプチドと、

50

b. ヘルパーT細胞エピトープと
を含み、タウペプチドがリポソームの表面上に提示されている、リポソームである。

【0119】

実施形態2は、タウペプチドがタウホスホペプチドである、実施形態1に記載のリポソームである。

【0120】

実施形態3は、トール様受容体リガンドをさらに含む、実施形態1または2に記載のリポソームである。

【0121】

実施形態4は、トール様受容体リガンドがトール様受容体4リガンドおよびトール様受容体9リガンドのうちの少なくとも1つを含む、実施形態3に記載のリポソームである。

10

【0122】

実施形態5は、トール様受容体リガンドがトール様受容体4リガンドである、実施形態3または4に記載のリポソームである。

【0123】

実施形態6は、トール様受容体4リガンドがモノホスホリル脂質A (MPLA) を含む、実施形態5に記載のリポソームである。

【0124】

実施形態7は、トール様受容体リガンドがトール様受容体9リガンドである、実施形態3または4に記載のリポソームである。

20

【0125】

実施形態8は、トール様受容体9リガンドが脂質付加CpGオリゴヌクレオチドを含む、実施形態7に記載のリポソームである。

【0126】

実施形態9は、

- a. タウペプチドと、
- b. ヘルパーT細胞エピトープと、
- c. i. トール様受容体9リガンド、および
- ii. トール様受容体4リガンド

のうちの少なくとも1つと

30

を含む、実施形態1に記載のリポソームである。

【0127】

実施形態10は、タウペプチドがタウホスホペプチドである、実施形態9に記載のリポソームである。

【0128】

実施形態11は、トール様受容体9リガンドが脂質付加CpGオリゴヌクレオチドである、実施形態9または10に記載のリポソームである。

【0129】

実施形態12は、トール様受容体4リガンドおよびトール様受容体9リガンドを含む、実施形態9から11のいずれかに記載のリポソームである。

40

【0130】

実施形態13は、トール様受容体4リガンドがモノホスホリル脂質A (MPLA) を含む、実施形態12に記載のリポソームである。

【0131】

実施形態14は、

- a. タウホスホペプチドと、
- b. ヘルパーT細胞エピトープと、
- c. 脂質付加CpGオリゴヌクレオチドと、
- d. トール様受容体4リガンドを含有するアジュバントと

を含み、

50

タウホスホペプチドがリポソームの表面上に提示されている、リポソームである。

【0132】

実施形態15は、トール様受容体4リガンドがモノホスホリル脂質A (MPLA) を含む、実施形態14に記載のリポソームである。

【0133】

実施形態16は、ヘルパーT細胞エピトープがリポソーム内にカプセル封入されている、実施形態1から15のいずれかに記載のリポソームである。

【0134】

実施形態16aは、ヘルパーT細胞エピトープがリポソームの膜内に取り込まれている、実施形態1から15のいずれかに記載のリポソームである。

【0135】

実施形態16bは、ヘルパーT細胞エピトープがリポソームの表面上に提示されている、実施形態1から15のいずれかに記載のリポソームである。

【0136】

実施形態17は、

- a. タウホスホペプチドと、
- b. ヘルパーT細胞エピトープと、
- c. 脂質付加 CpG オリゴヌクレオチドと、
- d. モノホスホリル脂質A (MPLA) と

を含み、

タウホスホペプチドがリポソームの表面上に提示されており、
T細胞エピトープがリポソーム内にカプセル封入されている、
リポソーム組成物である。

【0137】

実施形態17aは、MPLAが3-O-脱アシル-4'-モノホスホリル脂質A、好ましくはMPL (商標) である、実施形態17に記載のリポソームである。

【0138】

実施形態17bは、MPLAがモノホスホリルヘキサアシル脂質A、3-脱アシル、好ましくは3D- (6-アシル) PHAD (登録商標) である、実施形態17に記載のリポソームである。

【0139】

実施形態17cは、MPLAがモノホスホリル3-脱アシル脂質A、好ましくは3D-PHAD (登録商標) である、実施形態17に記載のリポソームである。

【0140】

実施形態18は、1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC)、1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホリル-3'-rac-グリセロール (DMPG)、およびコレステロールからなる群から選択される1つまたは複数の脂質をさらに含む、実施形態1から17cのいずれかに記載のリポソームである。

【0141】

実施形態19は、タウペプチドが、配列番号1~配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列、または配列番号1~配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、もしくは95%同一であるアミノ酸配列を有する、実施形態1から18のいずれかに記載のリポソームである。

【0142】

実施形態19-1は、タウペプチドが、配列番号1~3および5~12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むホスホペプチドである、実施形態19に記載のリポソームである。

【0143】

実施形態19-2は、タウホスホペプチドが配列番号1のアミノ酸配列を含む、実施形態19-1に記載のリポソームである。

10

20

30

40

50

【0144】

実施形態19-3は、タウホスホペプチドが配列番号2のアミノ酸配列を含む、実施形態19-1に記載のリポソームである。

【0145】

実施形態19-4は、タウホスホペプチドが配列番号3のアミノ酸配列を含む、実施形態19-1に記載のリポソームである。

【0146】

実施形態19aは、アミノ酸配列が、タウペプチドがリポソームの表面上に提示されることを可能にする1つまたは複数の修飾をさらに含む、実施形態19、19-1、19-2、19-3、および19-4のいずれか一項に記載のリポソームである。

10

【0147】

実施形態19bは、1つまたは複数の修飾が、パルミトイル化およびドデシル修飾のうちの少なくとも1つを含む、実施形態19aに記載のリポソームである。

【0148】

実施形態19cは、タウペプチドがそのN末端で1つまたは複数の修飾によって修飾されている、実施形態19aまたは19bに記載のリポソームである。

【0149】

実施形態19dは、タウペプチドがそのC末端で1つまたは複数の修飾によって修飾されている、実施形態19aから19cのいずれかに記載のリポソームである。

20

【0150】

タウペプチドがそのN末端およびC末端の両方でパルミトイル化されている、実施形態19eは、実施形態19dに記載のリポソームである。

【0151】

実施形態19fは、タウペプチドが、1つまたは複数の修飾を容易にするための1つまたは複数の追加のアミノ酸をさらに含む、実施形態19aから19eのいずれかに記載のリポソームである。

【0152】

実施形態19gは、1つまたは複数の追加のアミノ酸が、Lys、Cys、Ser、およびThrからなる群から選択される、実施形態19fに記載のリポソームである。

【0153】

30

実施形態19hは、タウペプチドがそのC末端でアミド化されている、実施形態19から19gのいずれかに記載のリポソームである。

【0154】

実施形態19iは、タウペプチドが配列番号27～配列番号38からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、実施形態19から19hのいずれかに記載のリポソームである。

【0155】

実施形態19jは、タウペプチドが配列番号27のアミノ酸配列からなる、実施形態19から19iのいずれかに記載のリポソームである。

【0156】

40

実施形態19kは、タウペプチドが配列番号28のアミノ酸配列からなる、実施形態19から19iのいずれかに記載のリポソームである。

【0157】

実施形態19lは、タウペプチドが配列番号29のアミノ酸配列からなる、実施形態19から19iのいずれかに記載のリポソームである。

【0158】

実施形態20は、ヘルパーT細胞エピトープが、配列番号23～配列番号26からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、実施形態1から19lのいずれかに記載のリポソームである。

【0159】

50

実施形態 20 a は、ヘルパー T 細胞エピトープが、配列番号 23 ～配列番号 26 からなる群から選択される少なくとも 2 つのアミノ酸配列を含む、実施形態 20 に記載のリポソームである。

【0160】

実施形態 20 b は、ヘルパー T 細胞エピトープが、配列番号 23 ～配列番号 26 からなる群から選択される少なくとも 3 つのアミノ酸配列を含む、実施形態 20 に記載のリポソームである。

【0161】

実施形態 20 c は、ヘルパー T 細胞エピトープが、配列番号 23 ～配列番号 26 の 4 つのアミノ酸配列を含む、実施形態 20 に記載のリポソームである。

【0162】

実施形態 20 d は、配列番号 23 ～配列番号 26 からなる群から選択される 2 つ以上のアミノ酸配列がリンカーによって共有結合されている、実施形態 20 a から 20 c のいずれかに記載のリポソームである。

【0163】

実施形態 20 e は、リンカーが、Val (V)、Ala (A)、Arg (R)、Gly (G)、Ser (S)、Lys (K) からなる群から選択される 1 つまたは複数のアミノ酸を含む、実施形態 20 d に記載のリポソームである。

【0164】

実施形態 20 f は、リンカーが、VVR、GS、RR、および RK からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 20 e に記載のリポソームである。

【0165】

実施形態 20 g は、ヘルパー T 細胞エピトープがその C 末端でアミド化されている、実施形態 20 から 20 f のいずれかに記載のリポソームである。

【0166】

実施形態 20 h は、ヘルパー T 細胞エピトープが、ヘルパー T 細胞エピトープの意図する位置に応じて、リポソームの膜内への挿入、リポソームの表面上での提示、またはリポソーム内へのカプセル封入のために修飾されている、実施形態 20 から 20 g のいずれかに記載のリポソームである。

【0167】

実施形態 20 i は、ヘルパー T 細胞エピトープが配列番号 13 ～配列番号 17 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、実施形態 20 から 20 h のいずれかに記載のリポソームである。

【0168】

実施形態 20 j は、タウペプチドとヘルパー T 細胞エピトープとを 6 : 1 の重量比で含む、実施形態 1 から 20 i のいずれかに記載のリポソームである。

【0169】

実施形態 20 k は、タウペプチドとヘルパー T 細胞エピトープとを 5 : 1 の重量比で含む、実施形態 1 から 20 i のいずれかに記載のリポソームである。

【0170】

実施形態 20 l は、タウペプチドとヘルパー T 細胞エピトープとを 4 : 1 の重量比で含む、実施形態 1 から 20 i のいずれかに記載のリポソームである。

【0171】

実施形態 20 m は、タウペプチドとヘルパー T 細胞エピトープとを 3 : 1 の重量比で含む、実施形態 1 から 20 i のいずれかに記載のリポソームである。

【0172】

実施形態 20 n は、タウペプチドとヘルパー T 細胞エピトープとを 2 : 1 の重量比で含む、実施形態 1 から 20 i のいずれかに記載のリポソームである。

【0173】

実施形態 20 o は、タウペプチドとヘルパー T 細胞エピトープとを 1 : 1 の重量比で含

10

20

30

40

50

む、実施形態 1 から 20 i のいずれかに記載のリポソームである。

【0174】

実施形態 21 は、脂質付加 CpG オリゴヌクレオチドが配列番号 18 ～配列番号 22 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、実施形態 1 から 20 o のいずれかに記載のリポソームである。

【0175】

実施形態 21 a は、CpG オリゴヌクレオチドが 1 つまたは複数のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する、実施形態 21 に記載のリポソームである。

【0176】

実施形態 21 b は、CpG オリゴヌクレオチドがすべてホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する、実施形態 21 a に記載のリポソームである。

10

【0177】

実施形態 21 c は、脂質付加 CpG オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して少なくとも 1 つの親油性基と共有結合している CpG オリゴヌクレオチドを含む、実施形態 21 から 21 b のいずれかに記載のリポソームである。

【0178】

実施形態 21 d は、リンカーが $(C_2H_4O)_n$ を含む [式中、 n は 0 ～10 の整数である]、実施形態 21 c に記載のリポソームである。

【0179】

実施形態 21 e は、リンカーが 3 ～12 個の炭素を有するアルキルスペーサーを含む、実施形態 21 c に記載のリポソームである。

20

【0180】

実施形態 21 f は、少なくとも 1 つの親油性基がコレステロールである、実施形態 21 から 21 e のいずれかに記載のリポソームである。

【0181】

実施形態 21 g は、脂質付加 CpG オリゴヌクレオチドが、 $(C_2H_4O)_n$ [式中、 n は 3 ～5 の整数である] を含むリンカーを介してコレステロール分子と共有結合している配列番号 18 または配列番号 19 のヌクレオチド配列を含む、実施形態 21 から 21 f のいずれかに記載のリポソームである。

【0182】

30

実施形態 22 は、

a. 配列番号 27 ～配列番号 38 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するタウペプチドと、

b. 配列番号 39 ～配列番号 44 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するヘルパー T 細胞エпитープ、好ましくは、配列番号 13 ～配列番号 17 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるヘルパー T 細胞エпитープと、

c. 配列番号 18 ～配列番号 22 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有し、1 つまたは複数のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、リンカーを介して少なくとも 1 つのコレステロールと共有結合している、脂質付加 CpG オリゴヌクレオチドと

d. モノホスホリル脂質 A (MPLA) とを含む、リポソームである。

40

【0183】

実施形態 22 a は、

a. 配列番号 27、配列番号 28、または配列番号 29 のアミノ酸配列からなるタウホスホペプチドと、

b. 配列番号 13 のアミノ酸配列からなるヘルパー T 細胞エпитープと、

c. $(C_2H_4O)_n$ [式中、 n は 3 ～7 の整数である] を含むリンカーを介してコレステロールと共有結合している配列番号 18 または配列番号 19 のヌクレオチド配列からなる脂質付加 CpG オリゴヌクレオチドと、

d. モノホスホリル脂質 A (MPLA) と

50

を含む、実施形態 22 に記載のリポソームである。

【0184】

実施形態 22 b は、MPLA が 3-O-脱アシル-4'-モノホスホリル脂質 A、好ましくは MPL (商標) である、実施形態 22 または 22 a に記載のリポソームである。

【0185】

実施形態 22 c は、MPLA が好ましくは 3D-(6-アシル) PHAD (登録商標) である、実施形態 22 または 22 a に記載のリポソームである。

【0186】

実施形態 22 d は、MPLA が好ましくは 3D-PHAD (登録商標) である、実施形態 22 または 22 a に記載のリポソームである。

10

【0187】

実施形態 23 は、ヘルパー T 細胞エピトープがリポソーム内にカプセル封入されている、実施形態 22 から 22 d のいずれかに記載のリポソームである。

【0188】

実施形態 24 は、実施形態 1 から 23 のいずれかに記載のリポソームと薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物である。

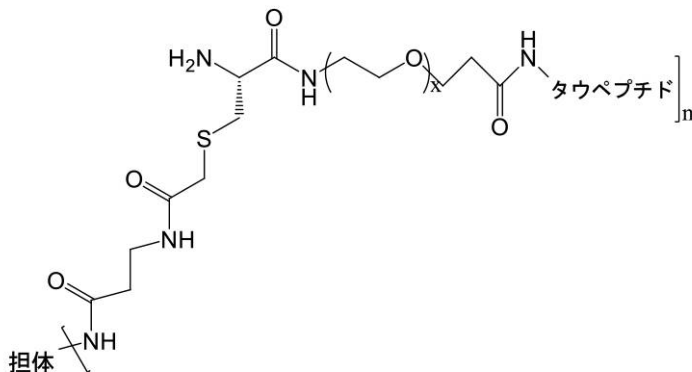
【0189】

実施形態 25 は、以下の構造：

【0190】

【化 7】

20



30

[式中、

x は、0 ~ 10 の整数であり、

n は、2 ~ 15 の整数である]

を有する、タウホスホペプチドと、リンカーを介してそれとコンジュゲートさせた免疫原性担体とを含むコンジュゲートである。

【0191】

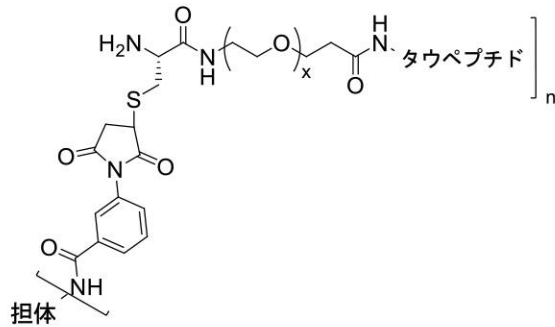
実施形態 25 a は、式 (II) の構造：

【0192】

40

50

【化 8】



10

【式中、

x は、0 ～ 10 の整数であり、

n は、2 ～ 15 の整数である】

を有する、タウホスホペプチドと、リンカーを介してそれとコンジュゲートさせた免疫原性担体とを含むコンジュゲートである。

【0193】

実施形態 26 は、x が 2 ～ 6 の整数である、実施形態 25 または 25 a のいずれかに記載のコンジュゲートである。

【0194】

実施形態 27 は、x が 3 である、実施形態 25 または 25 a のいずれかに記載のコンジュゲートである。

【0195】

実施形態 28 は、n が 3 ～ 7 である、実施形態 25 から 25 a のいずれかに記載のコンジュゲートである。

【0196】

実施形態 29 は、担体が、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、破傷風トキソイド、CRM 197、および髄膜炎菌 (N. meningitidis) 由来の外膜タンパク質混合物 (OMP)、またはその誘導体からなる群から選択される免疫原性担体である、実施形態 25 から 28 のいずれかに記載のコンジュゲートである。

30

【0197】

実施形態 30 は、タウホスホペプチドが、配列番号 1 ～ 配列番号 12 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、実施形態 25 から 29 のいずれかに記載のコンジュゲートである。

【0198】

実施形態 30 a は、タウホスホペプチドが、配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 のアミノ酸配列からなる、実施形態 30 に記載のコンジュゲートである。

【0199】

実施形態 31 は、担体が CRM 197 である、実施形態 25 から 30 のいずれかに記載のコンジュゲートである。

40

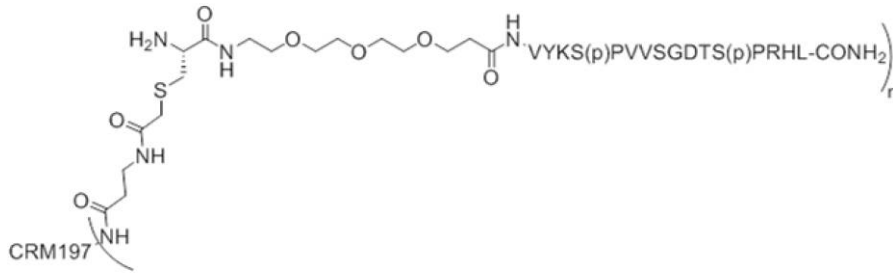
【0200】

実施形態 32 は、以下の構造：

【0201】

50

【化 9】



10

【式中、 n は 3 ～ 7 である】

を有する、実施形態 25 に記載のコンジュゲートである。

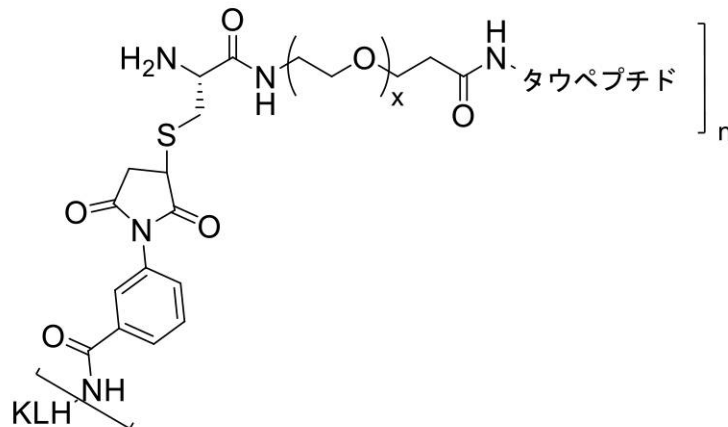
【0202】

実施形態 32a は、

KLH- [m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル-システイン- (C₂H₄O)_x-タウペプチド]_n

【0203】

【化 10】



20

【式中、

タウペプチドは、配列番号 1 または配列番号 3 からなり、

x は、0 ～ 10 の整数であり、

n は、2 ～ 15 の整数である】

である、実施形態 25 に記載のコンジュゲートである。

【0204】

実施形態 33 は、実施形態 25 から 32a のいずれかに記載のコンジュゲートと薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物である。

【0205】

実施形態 33a は、アジュバントをさらに含む、請求項 33 に記載の医薬組成物である。

【0206】

実施形態 33b は、アジュバントが TLR-4 リガンドおよび TLR-9 リガンドのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 33a に記載の医薬組成物である。

【0207】

実施形態 34 は、対象に、実施形態 24 および 33 から 33b の医薬組成物のうちの少なくとも 1 つを投与することを含む、神経変性障害を患っている対象において免疫応答を誘導する方法。

【0208】

実施形態 35 は、対象に、免疫化をプライムするための実施形態 24 および 33 から 3

30

40

50

3 bの医薬組成物のうちの少なくとも1つを投与することと、対象に、免疫化をブーストするための実施形態24および33から33bの医薬組成物のうちの少なくとも1つを投与することを含む、実施形態34に記載の方法である。

【0209】

実施形態36は、対象に、実施形態24または33の医薬組成物のうちの少なくとも1つを投与することを含む、それを必要としている対象において神経変性疾患または障害を処置または防止する方法である。

【0210】

実施形態37は、対象に、免疫化をプライムするための実施形態24および33から33bの医薬組成物のうちの少なくとも1つを投与することと、対象に、免疫化をブーストするための実施形態24および33から33bの医薬組成物のうちの少なくとも1つを投与することを含む、実施形態36に記載の方法である。

【0211】

実施形態38は、神経変性疾患または障害が、神経原線維病変の形成によって引き起こされる、またはそれに関連している、実施形態34から37のいずれかに記載の方法である。

【0212】

実施形態39は、神経変性疾患または障害が、アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルトーヤコブ病、拳闘家認知症、ダウン症候群、ゲルストマンーストロイスラーシャインカー病、封入体筋炎、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、外傷性脳傷害、筋萎縮性側索硬化症、グアムのパーキンソン認知症複合、神経原線維のもつれを伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、レビー認知症筋萎縮性側索硬化症、石灰化を伴うびまん性の神経原線維のもつれ、前頭側頭型認知症、好ましくは17番染色体に連鎖するパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（FTDP-17）、前頭側頭葉認知症、ハレルフォルデン（Hallevorden）ースパッツ病、多系統萎縮症、ニーマンピック病C型、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性汎脳炎、もつれのみの認知症、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィー、慢性外傷性脳障害（CTE）、原発性加齢関連タウオパチー（PART）、またはレビー小体認知症（LBD）である、実施形態34から38のいずれかに記載の方法である。

【0213】

実施形態40は、神経変性疾患または障害が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症候群、進行性核上性麻痺（PSP）、前頭側頭型認知症と17番染色体に連鎖するパーキンソニズム（FTDP-17）、ピック病、大脳皮質基底核変性症、レビー認知症筋萎縮性側索硬化症、筋緊張性ジストロフィー（disphasy）、慢性外傷性脳障害（CTE）、脳血管症、原発性加齢関連タウオパチー（PART）、またはレビー小体認知症（LBD）である、実施形態34から39のいずれかに記載の方法である。

【0214】

実施形態40bは、神経変性疾患または障害が、アルツハイマー病、進行性核上性麻痺（PSP）、前頭側頭型認知症と17番染色体に連鎖するパーキンソニズム（FTDP-17）、またはピック病、およびPART（原発性加齢関連タウオパチー）である、実施形態34から39のいずれかに記載の方法である。

【0215】

実施形態40cは、神経変性疾患または障害が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症候群、前頭側頭型認知症と17番染色体に連鎖するパーキンソニズム（FTDP-17）、大脳皮質基底核変性症、レビー認知症筋萎縮性側索硬化症、筋緊張性ジストロフィー（disphasy）、慢性外傷性脳障害（CTE）、脳血管症、原発性加齢関連タウオパチー（PART）、またはレビー小体認知症（LBD）である、実施形態34から39のいずれかに記載の方法である。

【0216】

実施形態 4 1 は、実施形態 2 4 の医薬組成物および実施形態 3 3、3 3 a、または 3 3 b の医薬組成物のうちの少なくとも 1 つを含む、キットである。

【0 2 1 7】

実施形態 4 2 は、配列番号 1 3 ~ 配列番号 1 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるヘルパー T 細胞エピトープである。

【0 2 1 8】

実施形態 4 3 は、実施形態 4 2 に記載のヘルパー T 細胞エピトープを含む医薬組成物である。

【0 2 1 9】

実施形態 4 4 は、対象に、抗原を、実施形態 4 3 の医薬組成物と一緒に投与することを含む、それを必要としている対象において抗原に対する免疫応答を増強させる方法である。

【実施例】

【0 2 2 0】

以下の本発明の実施例は、本発明の性質をさらに例示するためのものである。以下の実施例は本発明を限定せず、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によって決定されることを理解されたい。

【0 2 2 1】

以下の実施例中で使用する実験方法は、別段に指定しない限りは、すべて常法である。以下の実施形態で使用する試薬は、別段に指定しない限りは、すべて通常の試薬供給業者から購入したものである。

【0 2 2 2】

[実施例 1]

リポソームワクチンの調製

対照リポソームワクチンの調製（エタノール注入技法）

対照リポソームワクチンを、エタノール（EtOH）注入技法、次いで押出し成形によって生成した。最初に、DMPC（Lipoid GmbH、ドイツ Ludwigshafen）、DMPG（Lipoid GmbH、ドイツ Ludwigshafen）、コレステロール（Dishman、オランダ）、および MPLA（Avanti Polar Lipids、米国アラバマ州）を、9 : 1 : 7 : 0.05 のモル比で、EtOH および tert-ブタノール（t-BuOH）の 20 : 1（V/V）混合物中に 60℃ で可溶化した。10% の EtOH 濃度を維持するために脂質 / エタノール溶液をリン酸緩衝液生理食塩水（PBS）、pH 7.4 に 60℃ で希釈し、多重膜リポソーム小胞（MLV）の形成がもたらされた。その後、Emulsiflex-C5（Avestin、カナダ）を使用して、MLV を 0.08 μm の孔径を有する直列の 3 枚のポリカーボネートフィルター（Whatman）を通した、5 回の連続した押出し成形に供した。生じたリポソームを PBS、pH 7.4 で希釈し、60℃ まで加熱して、タウペプチドを添加する前のリポソーム溶液が得られた。

【0 2 2 3】

本明細書中以降、医薬品有効成分（API）と呼ぶ配列番号 2 の酢酸テトラパルミトイル化（acetate tetrapalmitoylated）リン酸化タウペプチド（Bachem AG、スイス）を、1 mg/mL の濃度の 2.0% のオクチル β-D-グルコピラノシド（Sigma-Aldrich、米国）を含む PBS、pH 11.4 に溶かし、ペプチド溶液を 60℃ でリポソーム溶液内に注入し、次いで、30 分間、60℃ で攪拌した。濃縮は、標的最終体積までの限外濾過によって行い、緩衝液交換は、ダイアフィルトレーション中に PBS、pH 7.4 を用いて 10 回実施した。その後、API がリポソームの表面上に提示された生じたリポソームを、2 枚の直列の 0.2 μm のポリカーボネートシリンジフィルターを通すことによって滅菌濾過し、最終産物を 5℃ で保存した。

【0 2 2 4】

リポソーム X、Y、Z、および Z⁺ ワクチンの調製

リポソーム X および Y ワクチンは、脂質薄層技術、次いでホモジナイゼーションおよび

10

20

30

40

50

押出し成形によって生成した。

【0225】

1200ug/mlの最終API濃度および1200ug/mlの最終T50濃度を有するリポソームZ⁺ワクチンは、エタノール注入技法、次いで押出し成形によって生成し、400ug/mlの最終API濃度および100ug/mlの最終T50濃度を有するリポソームZワクチンは、脂質薄層技術、次いでホモジナイゼーションおよび押出し成形によって生成した。

【0226】

400ug/mlの最終API濃度および400ug/mlの最終T50濃度を有するリポソームZ⁺⁺ワクチンは、脂質薄層技術、次いでホモジナイゼーションおよび押出し成形によって生成した。

【0227】

1200ug/mlの最終API濃度および300ug/mlの最終T50濃度を有するリポソームZ⁺⁺⁺ワクチンは、エタノール注入技法、次いで押出し成形によって生成した。

【0228】

脂質薄層技法によるリポソームX、Y、Z、およびZ⁺⁺ワクチンの調製

リポソームX、Y、Z、およびZ⁺⁺ワクチンは、脂質薄層技術、次いでホモジナイゼーションおよび押出し成形によって生成した。最初に、DMPC (Lipoid GmbH、ドイツLudwigshafen)、DMPG (Lipoid GmbH、ドイツLudwigshafen)、コレステロール (Dishman、オランダ)、およびモノホスホリルヘキサアシル脂質A3-脱アシル合成 (3D-(6-アシル) PHAD (登録商標)) (Avanti Polar Lipids、米国アラバマ州) を、9:1:7:0.05のモル比でEtOHに60℃で可溶化したが、リポソームYは例外で、3D-(6-アシル) PHAD (登録商標) を含有していなかった。エタノールを真空下のrotavaporで蒸発させて、脂質薄層が得られた。

【0229】

脂質フィルムを、0.15mg/mLのT50ペプチド (Peptides & Elephants、ドイツ) を含有するPBS、pH7.4、5%のDMSO (すべてSigma-Aldrich) を用いて再水和させた。試料を15分間穏やかに攪拌し、脂質薄層を溶かすためにさらに激しくボルテックスした。生じた多重膜小胞を10回の凍結解凍サイクル (液体N₂および37℃での水浴) に供し、ホモジナイゼーション、次いで0.08umの孔径を有するポリカーボネート膜 (Whatman、英国) を通した連続押出し成形に供した。ホモジナイゼーションおよび押出し成形ステップはどちらもEmulsiflex-C5 (Avestin、カナダ) にて行った。カプセル封入されたT50ペプチドを有する押出し成形したリポソームを限外濾過によって濃縮し、ダイアフィルトレーションによって緩衝液をPBS、pH7.4に交換した。生じたりポソームをPBS、pH7.4で希釈し、60℃まで加熱して、タウペプチドおよびアジュバントを添加する前のリポソーム溶液が得られた。

【0230】

CpG2006-コレステロール (CpG2006-Chol) (Microsynth、スイス) は、すべてのヌクレオチド間結合をチオホスフェートとして有しており、5'末端が、PEGスパーサーによってリン酸結合を介してコレステロール分子で修飾されている、DNAオリゴヌクレオチドである。CpG2006-コレステロール (CpG2006-Chol) (Microsynth、スイス) をPBS、pH7.4に1mg/mLで溶かし、リポソーム溶液内に注入し (リポソームXは例外で、CpG2006-Cholを含有していなかった)、次いで15分間インキュベーションした後に、APIを挿入した。

【0231】

API (Bachem AG、スイス) を、1mg/mLの濃度の2%のオクチルβ-

10

20

30

40

50

D-グルコピラノシド (Sigma-Aldrich、米国) を含む PBS、pH 11.4 に溶かし、ペプチド溶液を 60℃ でリポソーム溶液内に注入し、次いで、30 分間、60℃ で攪拌した。濃縮は限外濾過によって行って標的値 (リポソーム X、Y、Z では 400 ug/ml の API および 100 ug/ml の T50、リポソーム Z⁺⁺ では 400 ug/ml の API および 400 ug/ml の T50) を得て、緩衝液交換は、ダイアフィльтраートレーション中に PBS、pH 7.4 を用いて 10 回実施した。その後、API がリポソームの表面上に提示された生じたリポソームを、0.2 um のポリカーボネートシリンジフィルターを通すことによって滅菌濾過し、最終産物を 5℃ で保存した。

【0232】

エタノール注入技法によるリポソーム O の調製

リポソーム O ワクチンを、エタノール (EtOH) 注入技法、次いで押出し成形によって生成した。最初に、DMPC (Lipoid GmbH、ドイツ Ludwigshafen)、DMPG (Lipoid GmbH、ドイツ Ludwigshafen)、コレステロール (Dishman、オランダ)、および MPLA (Avanti Polar Lipids、米国アラバマ州) を、9:1:7:0.05 のモル比で、EtOH および tert-ブタノール (t-BuOH) の 20:1 (V/V) 混合物中に 60℃ で可溶化した。10% の EtOH 濃度を維持するために脂質/エタノール溶液をリン酸緩衝液生理食塩水 (PBS)、pH 7.4 に 60℃ で希釈し、多重膜リポソーム小胞 (MLV) の形成がもたらされた。その後、Emulsiflex-C5 (Avestin、カナダ) を使用して、MLV を 0.08 um の孔径を有する直列の 3 枚のポリカーボネートフィルター (Whatman) を通した、5 回の連続した押出し成形に供した。生じたリポソームを PBS、pH 7.4 で希釈し、60℃ まで加熱して、タウペプチドを添加する前のリポソーム溶液が得られた。

【0233】

T46 ペプチド (Pepscan、オランダ) を PBS、pH 7.4 に 1 mg/ml で溶かし、リポソーム溶液内に注入し、次いで 15 分間インキュベーションした後に、API を挿入した。

【0234】

API (Bachem、スイス) を、1 mg/ml の濃度の 2% のオクチルβ-D-グルコピラノシド (Sigma-Aldrich、米国) を含む PBS、pH 11.4 に溶かし、ペプチド溶液を 60℃ でリポソーム溶液内に注入し、次いで、30 分間、60℃ で攪拌した。濃縮は限外濾過によって行って標的値 (400 ug/ml の API および 100 ug/ml の T46) を得て、緩衝液交換は、ダイアフィльтраートレーション中に PBS、pH 7.4 を用いて 10 回実施した。その後、API がリポソームの表面上に提示された生じたリポソームを、0.2 um のポリカーボネートシリンジフィルターを通すことによって滅菌濾過し、最終産物を 5℃ で保存した。

【0235】

エタノール注入によるリポソーム Z⁺ およびリポソーム Z⁺⁺⁺ ワクチンの調製

リポソーム Z⁺ およびリポソーム Z⁺⁺⁺ ワクチンは、エタノール注入に基づくプロセスを使用して生成した。最初に、DMPC (Lipoid GmbH、ドイツ Ludwigshafen)、DMPG (Lipoid GmbH、ドイツ Ludwigshafen)、コレステロール (Dishman、オランダ)、および 3D-(6-アシル) PHAD (登録商標) (Avanti Polar Lipids、米国アラバマ州) を、約 9:1:7:0.04 のモル比で EtOH に 60℃ で可溶化した。T50 ペプチド (Bachem AG、スイス) を 10 mM の His/270 mM のスクロース (pH 5.8~6.0) に溶かした。その後、脂質エタノール溶液を、T50 ペプチドを含有する溶液内に注入し、15 分間穏やかに攪拌して、多重膜小胞 (MLV) が生じた。MLV を、ホモジナイゼーション (リポソーム Z⁺ では 6 回、リポソーム Z⁺⁺⁺ ではホモジナイゼーションなし)、次いで 0.08 um の孔径を有するポリカーボネート膜 (Whatman、英国) を通した連続押出し成形 (リポソーム Z⁺ では 5 回、リポソーム Z⁺⁺⁺ では 3~5 回) に

10

20

30

40

50

供した。リポソームZ⁺では、ホモジナイゼーションおよび押出し成形ステップはどちらもEmulsiFlex-C5 (Avestin、カナダ) にて行った。リポソームZ⁺⁺の押出し成形はLIPEXフィルター押出し成形機を使用して行った。押出し成形したリポソームを限外濾過によって濃縮し、ダイアフィルトレーションによって緩衝液を20mMのHis/145mMのNaCl、pH7.4に交換した。カプセル封入されたT50ペプチドを有する生じたリポソームを20mMのHis/145mMのNaCl、pH7.4で希釈し、60℃まで加熱して、APIおよびアジュバントを添加する前のリポソーム溶液が得られた。

【0236】

CpG2006-Chol (リポソームZ⁺ではMicrosynth、スイス、リポソームZ⁺⁺ではAvecia、米国) を1mg/mLの20mMのHis/145mMのNaCl、pH7.4に溶かし、リポソーム溶液内に注入し、次いで15分間インキュベーションした後に、APIを挿入した。

【0237】

API (Bachem AG、スイス) を、1mg/mLの濃度の1%のオクチルβ-D-グルコピラノシド (Sigma-Aldrich、米国) と共に炭酸緩衝液、pH10.2に溶かし、ペプチド溶液を60℃でリポソームZ⁺溶液内に注入し、次いで、30分間、60℃で撹拌した。T-Line Mixingを使用してペプチド溶液を60℃でリポソームZ⁺溶液内に混合し、次いで、30分間、60℃で撹拌した。濃縮は限外濾過によって行って標的値 (リポソームZ⁺では1200ug/mLのAPIおよび1200ug/mLのT50、リポソームZ⁺⁺では1200ug/mLのAPIおよび300ug/mLのT50) を得て、緩衝液交換は、ダイアフィルトレーション中に10mMのHis/270mMのスクロース、pH6.5を用いて10回実施した。その後、APIがリポソームの表面上に提示された生じたZ⁺リポソームおよびAPIがリポソームの表面上に提示された生じたZ⁺⁺リポソームを、0.2umのポリカーボネートシリンジ/カプセルフィルターを通すことによって滅菌濾過し、最終産物を5℃で保存した。

【0238】

リポソームL、M、およびNワクチンの調製

リポソームL、M、およびNワクチンは、脂質薄層技術、次いでホモジナイゼーションおよび押出し成形によって生成した。最初に、DMPC (Lipoid GmbH、ドイツLudwigshafen)、DMPG (Lipoid GmbH、ドイツLudwigshafen)、コレステロール (Dishman、オランダ)、およびMPLA (Avanti Polar Lipids、米国アラバマ州) を、9:1:7:0.05のモル比でEtOHに60℃で可溶化した。エタノールを真空下のrotavaporで蒸発させることで、脂質薄層が得られた。

【0239】

脂質フィルムを、以下のうちのいずれかを含有するPBS、pH7.4、5%のDMSO (すべてSigma-Aldrich) を用いて再水和させた:

リポソームMでは0.15mg/mLのT48ペプチド (Peptides & Elephants、ドイツ)、または

リポソームL0.13mg/mLのT50ペプチド (Peptides & Elephants、ドイツ)、または

リポソームNでは0.15mg/mLのT52ペプチド (Peptides & Elephants、ドイツ)。

【0240】

試料を15分間穏やかに撹拌し、脂質薄層を溶かすためにさらに激しくボルテックスした。生じた多重膜小胞を10回の凍結解凍サイクル (液体N₂および37℃での水浴) に供し、ホモジナイゼーション、次いで0.08umの孔径を有するポリカーボネート膜 (Whatman、英国) を通した連続押出し成形に供した。ホモジナイゼーションおよび押出し成形ステップはどちらもEmulsiFlex-C5 (Avestin、カナダ)

にて行った。押出し成形したリポソームを限外濾過によって濃縮し、ダイアフィルトレーションによって緩衝液をPBS、pH 7.4に交換した。カプセル封入されたT48、T50、またはT52ペプチドを有する生じたリポソームを、PBS、pH 7.4で希釈し、60℃まで加熱して、タウペプチドを添加する前のリポソーム溶液が得られた。

【0241】

API (Bachem AG、スイス) を、1mg/mLの濃度の2%のオクチルβ-D-グルコピラノシド (Sigma-Aldrich、米国) を含むPBS、pH 11.4に溶かし、ペプチド溶液を60℃でリポソーム溶液内に注入し、次いで、30分間、60℃で攪拌した。濃縮は限外濾過によって行って標的値 (400ug/mLのAPIおよび100ug/mLのT48、T50、またはT52) を得て、緩衝液交換は、ダイアフィルトレーション中にPBS、pH 7.4を用いて10回実施した。その後、APIがリポソームの表面上に提示された生じたリポソームを、0.2umのポリカーボネートシリンジフィルターを通すことによって滅菌濾過し、最終産物を5℃で保存した。

【0242】

リポソームR、S、およびTワクチンの調製

リポソームR、S、およびTワクチンは、エタノール注入に基づくプロセス、次いで押出し成形を使用して生成した。最初に、DMPC (Lipoid GmbH、ドイツLudwigshafen)、DMPG (Lipoid GmbH、ドイツLudwigshafen)、コレステロール (Dishman、オランダ)、および3D-(6-アシル) PHAD (登録商標) (Avanti Polar Lipids、米国アラバマ州) を、9:1:7:0.04のモル比でEtOHに60℃で可溶化した。リポソームRおよびTでは、10%の溶媒 (EtOH) に到達するように上記脂質エタノール溶液を270mMのスクロースを補充した10mMのヒスチジン、pH 5.8に混合し、その後、30分間、60℃でインキュベートした。リポソームSでは、T50ペプチド (Bachem AG、スイス) を10mMのHis/270mMのスクロース (pH 5.8~6.0) に溶かした。リポソームR、S、およびTに関する脂質-緩衝液混合液を15分間穏やかに攪拌して、多重膜小胞 (MLV) が生じた。生じた多重膜小胞を、Emulsiflex-C5高圧システム (Avestin、カナダ) において0.08umの孔径を有するポリカーボネート膜 (Whatman、英国) を通した押出し成形に供した (5回)。

【0243】

押出し成形したリポソームを限外濾過によって濃縮し、ダイアフィルトレーションによって緩衝液を20mMのHis/145mMのNaCl、pH 7.4に交換した。カプセル封入されたT50を有する生じたリポソーム (リポソームS)、ならびに生じたリポソームRおよびTを、20mMのHis/145mMのNaCl、pH 7.4でさらに希釈し、60℃まで加熱して、APIおよびT57 (リポソームT) を添加する前のリポソーム溶液が得られた。

【0244】

リポソームTでは、T57を脱イオン蒸留水中に1%のオクチルβ-D-グルコピラノシド (Sigma-Aldrich、米国) で1mg/mLに溶かし、リポソーム中に挿入、次いで15分間、60℃でインキュベーションした後に、API挿入を行った。

【0245】

API (Bachem AG、スイス) を、1mg/mLの濃度の1%のオクチルβ-D-グルコピラノシド (Sigma-Aldrich、米国) と共に炭酸緩衝液、pH 10.2に溶かし、ペプチド溶液を60℃でリポソーム溶液中に混合し、次いで、30分間、60℃で攪拌した。濃縮は限外濾過によって行って、以下の標的値が得られた:

ーリポソームRでは1200ug/mLのAPI、

ーリポソームSでは1200ug/mLのAPIおよび300ug/mLのT50、ならびに

ーリポソームTでは1200ug/mLのAPIおよび300ug/mLのT57。

【0246】

緩衝液交換は、ダイアフィルトレーション中に10mMのHis / 270mMのスクロース、pH6.5を用いて10回実施した。その後、APIがリポソームの表面上に提示された生じたリポソームを、0.2µmのポリカーボネートシリンジフィルターを通すことによって滅菌濾過し、最終産物を5℃で保存した。

【0247】

[実施例2]

コンジュゲートワクチンの調製

ペプチドおよびアジュバント

2つの多重リン酸化ペプチドエピトープ（それぞれ3つおよび2つのリン酸化されたアミノ酸を有するTAUVAC-p7.1およびTAUVAC-p22.1）の配列を、B細胞の表面免疫グロブリンとより良好に結合し得るように、また、ヒトHLAクラスII A、B、およびC分子と高い親和性で結合すると予測されるエピトープを配列が含有しないように、長さを最適化することによって、洗練した。後者の基準は、健著な神経損傷を引き起こす可能性のある、タウに対する細胞毒性CD8⁺T細胞応答の誘導を回避するために重要であった。免疫エピトープデータベースおよび分析資源（Immune Epitope Database and Analysis Resources）のT細胞エピトープ予測ツールを使用して、ペプチドTAUVAC-p7.1は、ヒトHLAクラスII A、B、CならびにHLAクラスII DQおよびDR分子と高い親和性で結合することができる予測されるエピトープを示さなかった一方で、ペプチドTAUVAC-p22.1は、HLAクラスII DQおよびDR分子と中程度／高い親和性で結合するエピトープを含有すると予測された（データ示さず）。

【0248】

この研究において使用したリン酸化タウペプチド（配列番号1、配列番号2、配列番号3）は合成によって生成し（Pepscan、オランダ）、ホスホ残基を合成中に付加した。リンカーを介してKLH担体と共有結合している配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を有するリン酸化タウペプチドを含むコンジュゲートは、本明細書中でそれぞれコンジュゲートBまたはコンジュゲートCと呼ばれる。リンカーを介してCRM担体と共有結合している配列番号2のアミノ酸配列を有するリン酸化タウペプチドを含むコンジュゲートは本明細書中でコンジュゲートAと呼ばれる。

【0249】

コンジュゲートBおよびCを製造するために、ワクチンペプチドを、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）リンカーおよびペプチドのN末端の余分なシステインを介して、担体タンパク質KLHとコンジュゲートさせた。Sephadex G25カラムを使用して未結合のペプチドを除去した後に、コンジュゲートを濃縮した。コンジュゲートを混合した後、強力な多構成要素アジュバント（Sigma Adjuvant System、Sigma-Aldrich）または単一構成要素デポーアジュバント（水酸化アルミニウム、Alhydrogel（登録商標）、Invivogen）のどちらかに、製造者の指示に従って注入した。

【0250】

ワクチンペプチドを、ポリエチレングリコール（PEG）-システイン-アセトアミドプロピオンアミドリンカーを介して、担体タンパク質CRM197とコンジュゲートさせた。配列番号2のアミノ酸配列を有するリン酸化タウペプチドは合成によって生成し（Polypeptide Laboratories SAS）、ホスホ残基およびPEG3スパーサーを合成中に付加した。コンジュゲートAは、担体タンパク質CRM197を、スクシンイミジル3-（プロモアセトアミド）プロピオネート（SBAP）リンカーを介して、ペプチドのN末端のシステインとコンジュゲートさせることによって製造した。NHSエステル反応化学を介してSBAPをCRM197タンパク質第一級アミン（-NH₂）とライゲーションさせた。過剰なSBAPリンカーは限外濾過およびダイアフィルトレーション（UF / DF）を使用して除去した。CRM197-SBAP中間体をリン酸化タウペプチドとコンジュゲートさせ、反応が完了した後、過剰量のL-シスチンを加え

て反応をクエンチすることで、コンジュゲーション反応を停止させた。粗CRM197-ペプチドコンジュゲート生成物をCapto Q ImpRes (GE Healthcare) クロマトグラフィーカラムを使用して精製し、塩均一濃度方法を使用して溶出させた。その後、UF/DFを使用して、精製したCRM197-ペプチド生成物を、20 mMのトリス、250 mMのスクロース、pH 8.1中で0.5 mg/mLの濃度まで配合した。10%のPS80ストック緩衝液を加えて0.01%のPS80の最終濃度に到達させることによって、CRM197-タウペプチド原薬(DS)を生成した。溶液は濾過の前に十分に混合した。

【0251】

[実施例3]

ワクチンがタウホスホペプチド特異的IgG抗体を誘導した

すべての動物実験は認可されており、動物実験に関する現地の規制に従って行った。アカゲザルマカク(Macaca mulatta)は、Kunming Biomed International Ltd、中国、Yunnan Yinmore Bio-Tech Co. LTD、中国、およびYunnan Laboratory Primates Inc.、中国から入手した。動物は免疫化の開始時に2~5歳であり、最小体重は2.5 kgであった。処置の開始前、およびそれ以降は週に1回、詳細な臨床検査を行った。さらに、マカクを日に2回観察し、臨床的徴候を記録した。

【0252】

成体のアカゲザルマカク(n=3匹の雄および3匹の雌/群)を、1800 µgの配列番号2の酢酸テトラパルミトイル化リン酸化タウペプチド/用量の、対照リポソームワクチン(配列番号2のテトラパルミトイル化リン酸化タウペプチドおよびMPLAを有するリポソーム)もしくは本出願の実施形態によるリポソームワクチン、たとえば、リポソームZ(配列番号2のテトラパルミトイル化リン酸化タウペプチド、3D-(6-アシル)PHAD(登録商標)、脂質付加CpGオリゴヌクレオチドCpG2006、およびT細胞ペプチドT50を有するリポソーム)、または15 µg/用量の本発明の一実施形態によるコンジュゲートワクチン(たとえば、コンジュゲートA、CRM197と連結させた配列番号2のリン酸化タウペプチド)を用いて、1、29、および85日目に、ミョウバンおよびCpGオリゴヌクレオチドCpG2006と共に同時注射して、皮下で免疫化した。出血を、免疫化前ならびに8、22、36、50、64、78、92、106、120、134、および148日目に行い、血清を単離した。

【0253】

特異的IgG抗体価は、配列番号2のリン酸化タウペプチドをコーティング抗原として使用して、ELISAによって決定した。個々の免疫化したサルからの血清をアッセイ緩衝液(PBS、0.05%のTween 20、1%のBSA)中で連続希釈し、関連ペプチドでコーティングされた96ウェルプレートに適用した。2時間インキュベーションした後、試料を除去し、プレートをPBST(PBS、0.05%のTween 20)で洗浄した。抗体は、HRPとコンジュゲートさせた抗サルIgG(KPL)、次いでABTS基質(Roche)を使用して検出した。すべての試料は8つの2倍希釈液で実行し、それぞれのプレートに陽性および陰性の対照試料を含めた。データは1群あたりのエンドポイント力価(肯定応答を誘導する最後の血清希釈率)の幾何平均として表した。

【0254】

図4に示すように、リポソームZワクチンおよびコンジュゲートAはどちらも対照リポソームワクチンと比較してより高いホスホペプチド特異的IgG力価を誘導した。

【0255】

[実施例4]

ワクチンがヒト脳において病理学的タウ構造に特異的な抗体を誘導した

すべての脳組織はオランダ脳バンク(Netherlands Brain Bank、NBB)から入手し、脳剖検ならびに試料およびその臨床情報の研究目的での使用のためのインフォームドコンセントの署名後に、ドナーから採取した。認知症でない対照(健康

10

20

30

40

50

）、アルツハイマー病（AD）、タウ病理を伴った前頭側頭認知症（FTD-タウ）、ピック病、原発性加齢関連タウオパチー（PART）、および進行性核上性麻痺（PSP）からのパラフィン切片を使用した。脳領域には、頭頂葉皮質、中前頭回、海馬、または尾状核が含まれていた。

【0256】

具体的には、対照ヒト対象（健康）およびアルツハイマー病を患っているヒト対象（ADブランクV/VI）の頭頂葉皮質からのホルマリン固定しパラフィン包埋した切片を、通常抗体希釈剤（Immunologic）中で1：100に希釈した免疫後のマカク血清を用いて染色した。その後、切片を洗浄し、ヤギ抗サル-HRP（Abcam）で染色した。最後に、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）の存在下で茶色の特異的染色を沈着させる3，3'-ジアミノベンジジン（DAB、Dako）を使用して、染色を可視化した。スライドをヘマトキシリンで対比染色し、脱水し、Quick D封入剤（Klinipath）を用いて搭載した。写真はLeica DC500顕微鏡を用いて撮影した。

【0257】

図5の結果は、リポソームZ（配列番号2のテトラパルミトイル化リン酸化タウペプチド、3D-（6-アシル）PHAD（登録商標）、脂質付加CpGオリゴヌクレオチドCpG2006、およびT細胞ペプチドT50を有するリポソーム）を用いて免疫化したアカゲザルマカクからの免疫後血清が、ヒト脳切片中の病理学的タウ構造を染色したことを示す。改善リポソームを用いた一次免疫化後の106日目に、アカゲザルマカクから血清を採取した。このマカクは、血清採取の0、1、および3カ月前に免疫化を受けていた。左（ADブランクV/VI）パネルは、ブランクステージVドナーからの頭頂葉皮質の染色を示す。矢印はタウのもつれの染色を示す。右（健康）パネルは、ブランクステージ0ドナーからの頭頂葉皮質の染色を示す。血清を1：100の希釈率で切片に適用し、次いでヤギ抗サル抗体を1：100で適用し、DAB発色剤を使用して染色を可視化した。

【0258】

図6の結果は、配列番号2のリン酸化タウペプチド+可溶性CpGおよびミョウバン水酸化物を含有するコンジュゲートAを用いて免疫化したアカゲザルマカクからの血清が、ヒトAD脳切片中の病理学的タウ構造と結合することを示す。CRMコンジュゲートワクチンを用いた一次免疫化後の106日目に血清を採取した。これらのマカクは、血清採取の0、1、および3カ月前に免疫化を受けていた。上（AD）パネルは、ブランクステージVドナーからのタウのもつれを含めた頭頂葉皮質の染色を示す。下（対照）パネルは、ブランクステージ0ドナーからの頭頂葉皮質の染色を示す。血清を1：100の希釈率で切片に適用し、次いでヤギ抗サル抗体を1：100で適用し、DAB発色剤を使用して染色を可視化した。

【0259】

【実施例5】

1つまたは2つのアジュバントを用いたリポソームワクチン

改善リポソームワクチンに2つのアジュバントを加えることで、タウホスホペプチド特異的IgG抗体価のレベル、および個体間での抗体応答の一貫性が増加する。

【0260】

成体のアカゲザルマカク（n=3匹の雄および3匹の雌/群）を、1、29、85、および169日目に、1800μgの配列番号2の酢酸テトラパルミトイル化リン酸化タウペプチド/用量の対照リポソームワクチン、または、3D-（6-アシル）PHAD（登録商標）アジュバント単独（リポソームX、図7A）、脂質付加CpG2006オリゴヌクレオチドアジュバント単独（リポソームY、図7B）のどちらか、もしくは3D-（6-アシル）PHAD（登録商標）および脂質付加CpG2006オリゴヌクレオチドアジュバントの両方（リポソームZ、図7C）を含有する、カプセル封入されたT50 T細胞エピトープを有する改善リポソームワクチンを用いて、皮下で免疫化した。出血を、免疫化前ならびに8、22、36、50、64、78、92、106、120、134、148、162、176、および190日目に、抗体を単離した。血清中の特異的Ig

G抗体価を、配列番号2のリン酸化タウペプチドをコーティング抗原として、および抗サルIgG二次抗体を使用して、ELISAによって決定した。生じる抗体レベルを、それぞれの個々のサルを経時的なエンドポイント力価（肯定応答を誘導する最後の血清希釈率）として提示する。それぞれの免疫化群を1つのパネルに表す（図7A～C）。1群あたりのエンドポイント力価の幾何平均±95%の信頼区間を図7Dに提示する。要約すると、図7A～Dは、カプセル封入されたT50を含有するリボソームワクチンに2つのアジュバントを含めることで、タウホスホペプチドに対する抗体応答のレベルおよび一貫性が改善され、個々のサル間でより少ない抗体応答のばらつきがもたらされたことを示す。より詳細には、図7Dに示すように、配列番号2のリン酸化タウペプチド、T50 T細胞エпитープ（リボソームX、Y、およびZ）、ならびに1つまたは2つのアジュバントを有する改善リボソームワクチンは、T細胞エпитープを有さない対照リボソームワクチンよりも高い、タウホスホペプチドに対する力価を誘導した。改善リボソームワクチンのそれぞれを注射した場合はすべてのサルがレスポnderであった一方で、対照リボソームワクチンの場合は6匹のうち4匹の動物がレスポnderであった。

【0261】

[実施例6]

ワクチンが濃縮対らせん状細線維（ePHF）に特異的な抗体を誘導した

アカゲザルマカクの群（n=3匹の雄および3匹の雌／群）を、1日目および29日目に、ワクチン接種によって、（i）T50 T細胞エピトープおよび3D-（6-アシル）PHAD（登録商標）アジュバント単独（リボソームX）を含有する改善リボソームワクチン、（ii）T50 T細胞エピトープおよび脂質付加CpG2006アジュバント単独（リボソームY）を含有する改善リボソームワクチン、（iii）T50 T細胞エピトープならびに2つのアジュバント（3D-（6-アシル）PHAD（登録商標）および脂質付加CpG2006、リボソームZ）を含有する改善リボソームワクチン、または（iv）コンジュゲートワクチン（CRM197と連結させた配列番号2のリン酸化タウペプチド）を用いて、ミョウバンおよびCpGオリゴヌクレオチドCpG2006（コンジュゲートA）と同時注射して、皮下で免疫化した。

【0262】

濃縮対らせん状細線維（ePHF）の調製物は、組織学的に確認されたAD対象の死後脳組織から、不溶性タウのサルコシル抽出によって、GreenbergおよびDaviesの改変方法（Greenberg and Davies, 1991, Proc Natl Acad Sci U S A, 87(15):5827-31）を使用して得た。濃縮対らせん状細線維（ePHF）に特異的な抗体価はMesoscale Discovery（MSD）プラットフォームを使用して評価した。MSDストレプトアビジンプレート（Bio-Tech）を、ビオチン標識した抗タウ捕捉抗体（HT7-ビオチン、Thermo Scientific）でコーティングした後、アルツハイマー病患者から単離したePHFと共にインキュベーションした一方で、ePHFに特異的なIgG抗体を、サルIgG抗体と交叉反応する、スルホタグ標識した抗ヒトIgG抗体を使用してさらに検出した。より詳細には、ePHFを、事前に1%のBSAで飽和し、ビオチン標識したHT7（Thermo Scientific）でコーティングした、MSD Gold小スポットストレプトアビジン96ウェルプレート（MSD）に加えた。1時間インキュベーションした後、プレートをPBSTで洗浄し、血清の段階希釈液を加え、2時間インキュベートした。スルホタグ標識した抗ヒトIgG抗体を使用して結合抗体を検出し、次いで、1%のPFA中の固定ステップの後にRead Buffer Tを加えた。Sector Imager（MSD）を使用してプレートを分析した。結果は、それぞれの個々のサルについて1ミリリットルあたりの任意単位（AU/mL）で、1群あたりの幾何平均と共に表した。最初の免疫化後の50日目でのePHF特異的な抗体価を表す。

【0263】

図8は、すべてのワクチンが高力価のePHF特異的なIgG抗体を誘導したことを示す。

【0264】

また、高力価のe P H F特異的I g G抗体の同様の結果が、筋肉内投与を介してアカゲザルマカクに投与したリポソームZ+などの他のリポソームでも得られた。

【0265】

[実施例7]

アカゲザルにおいてリポソームワクチンおよびコンジュゲートワクチンによって誘導されたタウホスホペプチド特異的抗体の幅

アカゲザルマカクの群（ $n = 3$ 匹の雄および3匹の雌／群）を、1および29日目に、（i）カプセル封入されたT50ならびに2つのアジュバント：TLR4リガンド（3D-（6-アシル）PHAD（登録商標））および脂質付加CpG2006オリゴヌクレオチド（リポソームZ）を含有する改善リポソームワクチン、（ii）コンジュゲートワクチン（CRMと連結させた配列番号2のリン酸化タウペプチド）（コンジュゲートA）を用いて、ミョウバンおよびCpGオリゴヌクレオチドCpG2006と共に同時注射して、皮下で免疫化した。抗体のエピトープ認識プロファイルは、2回目の免疫化（50日目）の3時間後に、1つのアミノ酸をシフトしたN末端ビオチン標識した8量体ペプチドのライブラリー、およびカバーする配列番号2のリン酸化タウペプチドの配列、ならびに配列番号4の配列（VYKSPVVS GDTSPRHL、配列番号2と同じアミノ酸配列を有する非リン酸化タウペプチド）および対応するビオチン標識した完全長ペプチドを使用して、エピトープマッピングELISAによって決定した。

【0266】

図9は、リポソームZを用いて免疫化したサルは、配列番号2のリン酸化ペプチドのN末端部分とほとんど結合したI g G抗体を生じた一方で（図9A）、コンジュゲートワクチン（CRMと連結させた配列番号2のリン酸化タウペプチド）を用いて免疫化したサルは、配列番号2のタウペプチドのC末端部分とほとんど結合したI g G抗体を生じた（図9B）ことを示す。

【0267】

[実施例8]

カプセル封入されたT細胞エピトープを有するリポソームワクチンによって誘導されたタウホスホペプチド特異的I g G抗体の増加した力価

3つの群のC57BL/6Jマウス（ $n = 10$ 匹／群）を、0および14日目に、i）TLR4作用剤を含有するリポソームワクチン（3D-（6-アシル）PHAD（登録商標））（リポソームR）、ii）カプセル封入されたT細胞エピトープT50およびTLR4リガンド（3D-（6-アシル）PHAD（登録商標））をアジュバントとして含有するリポソームワクチン（リポソームS）、またはiii）リポソーム表面上に繫留されたT細胞エピトープT57（すなわちジパルミトイル化T50）およびTLR4リガンド（3D-（6-アシル）PHAD（登録商標））をアジュバントとして含有するリポソームワクチン（リポソームT）を用いて、皮下で免疫化した。配列番号2のリン酸化タウペプチドに特異的なI g G抗体のレベルを、マウス血漿への最初の注射の21および35日後にELISAによって測定した。結果は、個々のマウスの値として、任意単位（AU）／mLで表した1群あたりの幾何平均 $\pm 95\%$ のCIと共に、提示した。図10Aに示すように、カプセル封入されたT50を含有するリポソームワクチン（リポソームS）を用いたワクチン接種は、最初の免疫化の21日後に、対照リポソームワクチン（リポソームR）および繫留されたT細胞エピトープを含有するリポソームワクチン（リポソームT）よりも有意に高い抗体価を誘導し（クラスカルーワリス検定：それぞれ $p = 0.0089$ および $p = 0.002$ ）、また、最初の免疫化の35日後に、対照リポソームワクチンよりも高い抗体価、および繫留されたT細胞エピトープを含有するリポソームワクチンよりも有意に高い抗体価を誘導した（クラスカルーワリス検定：それぞれ $p = 0.7591$ および $p = 0.053$ ）（図10B）。

【0268】

[実施例9]

リポソームワクチンが取り込まれたT細胞エピトープに特異的なT細胞応答を誘導した

3つの群のC57BL/6Jマウス（ $n=5$ 匹／群）を、0、14、および28日目に、（i）カプセル封入されたT細胞ペプチドT48（GSリンカーによって分離されたT細胞エピトープPADRE、T2、T30、およびT17を含有）ならびにTLR4作用剤をアジュバント（MPLA）として有する改善リポソームワクチン（リポソームM）、（ii）カプセル封入されたT52（RKリンカーによって分離されたT細胞エピトープPADRE、T2、およびT30を含有）ならびにTLR4作用剤（MPLA）をアジュバント（リポソームN）として有する改善リポソームワクチン、または（iii）PBSを用いて、皮下で免疫化した。IL-4およびIFN- γ ELISPOTによるT細胞応答の分析のために、マウスから脾臓を最初の免疫化の42日後に収集した。単個細胞懸濁液を、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ の培地、T48、またはT52ペプチドと共に48時間インキュベートした。プレートを、ビオチン標識した抗マウスIL-4またはIFN- γ モノクローナル抗体およびストレプトアビジンアルカリホスファターゼ（AP）と共にインキュベートした。AP基質を加えることでスポットを発色させた。図11は、リポソーム内にカプセル封入されているものと同じペプチドを用いたマウス脾細胞の再刺激では、IL-4（図11B）およびIFN- γ スポット形成細胞（図11A）が誘導された一方で、PBSを注射したマウスの脾細胞では誘導されなかったことを示す。これにより、ワクチンにT細胞エピトープを加えることで、特定のT細胞の活性化が誘導され、タウ特異的B細胞に対する抗体産生における支援をさらに提供することが可能になることが確認された。

【0269】

[実施例10]

カプセル封入されたT細胞エピトープおよび繫留されたT細胞エピトープを含有するリポソームワクチン

アカゲザルマカクの群（ $n=6$ 匹／群）を、1、29、85、および169日目に、（i）カプセル封入されたT細胞エピトープT50およびTLR4リガンド（MPLA）をアジュバントとして含有するリポソームワクチン（リポソームL）、（ii）繫留されたT細胞エピトープT46およびTLR4リガンド（MPLA）をアジュバントとして含有するリポソームワクチン（リポソームO）、ならびに（iii）TLR4リガンド（MPLA）をアジュバントとして含有し、T細胞エピトープを含有しない対照リポソームワクチンを用いて、皮下で免疫化した。出血を、免疫化前（-14日目）ならびに8、22、36、50、64、78、92、106、120、134、148、162、176、および190日目に行い、抗体を単離した。特異的IgG抗体価を、配列番号2のリン酸化タウペプチドをコーティング抗原として、および抗サルIgG二次抗体を使用して、ELISAによって決定した。生じる抗体レベルをエンドポイント力価（肯定応答を誘導する最後の血清希釈率）として計算し、データを1群あたりの幾何平均として表した。図12に示すように、カプセル封入されたT細胞エピトープを含有するリポソームワクチン（リポソームL）および繫留されたT細胞エピトープを含有するリポソームワクチン（リポソームO）は、それぞれ、T細胞エピトープを有さない対照リポソームワクチンよりも高いタウホスホペプチド特異的抗体価を誘導した。

【0270】

[実施例11]

コンジュゲートワクチンによって誘導されたマウスにおける抗体応答

雌BALB/cマウス（14匹のマウス匹／群）を、コンジュゲートBまたはコンジュゲートC（KLHと共有結合した配列番号1または配列番号3を含有）を用いて、図13Aに示したスケジュールに従って、強力な多構成要素のアジュバント（Sigma Adjuvant System（登録商標）、Sigma-Aldrich、以降Ribiと呼ぶ）または単一構成要素のデポーアジュバント（Alhydrogel（登録商標）アジュバント2%もしくは水酸化アルミニウムゲル、InvivoGen、以降ミョウバンと呼ぶ）のどちらかでアジュバント化したワクチン候補を使用して、免疫化した。配列番号1のアミノ酸配列は、マウスタンパク質のそれと比較して1個のアミノ酸の相違のみを含有する一方で、配列番号3の配列は、ヒトとマウスとの間で100%保存されている

。したがって、選択されたエピトープはマウスの「自己」タンパク質であると合理的にみなすことができ、マウスを、免疫寛容が免疫原性に課し得る制限を調査するための関連モデルとするべきである。

【0271】

ワクチン免疫原性の第1の手段として、フローサイトメトリーを、ワクチン注射部位を排出させる頸部リンパ節におけるT濾胞性ヘルパー細胞(TfH)の誘導を測定するために使用した(4匹のマウス/群)。TfHは、他の分子の中でとりわけCXCR5、PD-1、およびICOSの発現によって特徴づけられる、特殊なCD4⁺T細胞集団である。TfHは、ワクチンまたは他の免疫刺激に曝された後に拡大し、胚中心でのB細胞の親和性成熟を支援する(Crotty, 2011, Annual Reviews of Immunology, Vol 29:p621-663)。誘導されたTfHの数は、ヒト(Bentebibel et al., 2013, Sci Transl Med., 5(176):176ra32、Spensieri et al., 2013, Proc Natl Acad Sci U S A., 110(35):14330-5) および小動物におけるワクチンの保護効率と正に相関する。図13Bに示すように、両方のワクチン、およびKLH+アジュバントの対照免疫化が、ワクチン接種したマウスにおいて測定可能なTfHを誘導した。さらに、排出頸部リンパ節を最初の免疫化の7日後に収集した場合に、活性ワクチン(コンジュゲートBおよびコンジュゲートCの群)または活性プラセボ(KLH)+ミョウバンを受けているすべての動物が、不活性のプラセボ(PBS群)を与えた動物よりも有意に多いTfHを有していた(KLH-TAUVAC-p7.1ではP=0.0044、KLH-TAUVAC-p22.1ではP=0.0482、KLHではP=0.0063、ANOVA検定を使用、次いで多重比較用にダネットの調整)。

【0272】

0日目ならびに免疫化後の4つの追加の時点(14、28、56、および84日目、図13C、D、G、およびHを参照)でのタウホスホペプチドおよびKLHと結合する抗体の血清力価を決定するために、ELISAを実施した。図13Cに示すように、コンジュゲートBを用いた免疫化により、対応するワクチンペプチドに対して反応性のある結合腔外が誘導された。コンジュゲートBおよびRib iアジュバントを用いて免疫化した動物では、測定したすべての時点において、ワクチンペプチドに対する結合力価は、活性プラセボによって誘導された結合力価よりも有意に高かった(コンジュゲートB+Rib iとKLH+Rib iとを比較)(P<0.001、ANOVA検定を使用、次いで多重比較用にチューキーの調整)。ミョウバンアジュバント化群では、差異は56および84日目でのみ有意であった(それぞれP=0.001および0.012)。

【0273】

コンジュゲートCに対するタウ特異的抗体応答(図13D)は、コンジュゲートBに対する応答よりも全体的に低い規模のものであったが、アッセイが違う(異なるコーティングペプチド)ことで、2つのワクチン間で直接の統計的比較を行うことは除外される。それにもかかわらず、免疫化後の28および84日目(それぞれP=0.001および0.008)でのコンジュゲートCに対する抗体価は、コンジュゲートC+Rib iをワクチン接種したマウスにおいて活性プラセボKLH Rib iを受けているマウスよりも有意に高かった。ミョウバンアジュバント化群の力価は、活性プラセボのものと有意な差異はなかった。

【0274】

担体タンパク質はホスホペプチドをin vivoでの分解からある程度は保護するが、in vivoでのペプチド抗原のホスファターゼ消化が一部の非リン酸化ペプチドを免疫系に曝露させるであろう可能性が高かった。その曝露が、コンジュゲートBおよびコンジュゲートC中の非リン酸化ペプチドと結合することができる抗体の精製をもたらしたかどうかを決定するために、非リン酸化ペプチドをコーティング抗原として使用したELISAを行った。図13E~Fに示すように、非リン酸化タウペプチドに対する応答は低く、同じ非リン酸化ペプチドに対する活性プラセボの応答に匹敵していた。さらに、コンジュゲートBおよびRib iを用いて免疫化した動物では、測定したすべての時点におい

て、リン酸化ペプチドに対する結合能力価は非リン酸化ペプチドに対する結合能力価よりも有意に高かった（14日目では $P=0.009$ 、28、56、および84日目では $P<0.0001$ 、ANOVA検定を使用）。ミョウバンアジュバント化群では、差異は56および84日目でのみ有意であった（それぞれ $P=0.0002$ および 0.001 ）。コンジュゲートCを用いて免疫化した動物、リン酸化ペプチドに対する応答は、Rib iアジュバントを使用した場合のみより高かった（28日目では $P<0.0001$ 、56および84日目では $P=0.0001$ ）。

【0275】

[実施例12]

コンジュゲートワクチンによって誘導された抗体は、変更されたタウの生理的に関連する形態と結合する

ワクチン誘導性の抗体が変更されたタウの生理的に関連する形態と結合できるかどうかをさらに決定するために、本発明者らは、ワクチン接種したマウスからの免疫後血清を使用して、アルツハイマー病患者（5件のAD事例）、他のタウオパチーを患っている患者（3件の事例のPART、FTD、PICK、およびPSP）、または年齢が一致した健康な対照（5件の対照事例、対照）のいずれかから採取した死後ヒト脳切片を染色した。予想どおり、対照動物（PBSおよび活性プラセボ群）からの血清は脳切片と結合しなかった一方で、ネズミクローンから得たpTau [pSer202、pThr205]と結合するモノクローナル抗体であるAT8は、対応する領域の隣接組織切片においてタウ病理の強力な免疫反応性を示した（図14）。活性ワクチン、コンジュゲートBおよびコンジュゲートCを用いて免疫化した動物からの血清は、AD切片だけでなく（データ示さず）、他のタウオパチーからのものにおける病理学的タウ構造とも結合した（図14）。コンジュゲートBに誘導された抗体は、AD事例中の（プレ）もつれ、神経絨毛系、および神経突起老人斑と反応した。また、これらの免疫後血清は、PART脳組織中の神経原線維のもつれおよび神経絨毛系、FTD-タウ（MAPT P301S）組織中の神経封入体および神経絨毛系、ピック病事例の一部中の封入体および星細胞、ならびにPSPに典型的な神経封入体、神経絨毛系、および星細胞とも免疫反応することができた。また、コンジュゲートCに誘導されたポリクローナル血清は、それぞれのタウオパチーに特長的な病理学的タウ構造とも反応した。AD事例では、染色は主に神経原線維のもつれに集中しており、より低い程度で神経突起老人斑および神経絨毛系に集中していた。対応する領域のより低い拡大率で同様の結果が示された（データ示さず）。

【0276】

[実施例13]

ワクチン誘導性の抗体はマウスにおいて機能的である

コンジュゲートBワクチンの保護効率をタウオパチーの注射モデルにて試験した（Peer aer et al., 2015, Neurobiol Dis., 73:83-95）。このモデルでは、遺伝子突然変異（P301L）によってタウオパチーに罹患しやすくしたマウスが、図15Aに示したタイムラインに従って、ヒトAD脳から単離した濃縮PHFの脳内注射を受ける。導入遺伝子誘導性のタウオパチーの発症の前に行うこの注射は、これらの動物においてタウオパチーの発生を加速させる。逆に、ePHF「種」を、AT8などのタウ播種活性を抑制することができる抗体と事前に混合した場合、タウオパチーの誘導は低下する（非公開データ、示さず）。

【0277】

図15Aのスキームに従って、本発明者らは、コンジュゲートB、Rib i、または活性対照KLH Rib iを用いて免疫化した動物の血清から精製したIgGと事前に混合した濃縮ヒトPHFの定位注射後の、タウオパチーの発生を評価した。注射の2カ月後、これらのマウスの脳を収集し、標準の生化学分析を使用して全画分およびサルコシル不溶性画分中の凝集タウの量を決定した。得られたデータにより、マウスに、コンジュゲートBをワクチン接種したマウスからのIgGと事前に混合したePHFを注射した場合、全画分（図15B）およびサルコシル不溶性（図15C）画分の両方において、対照注射を

受けている動物よりも凝集ホスホタウが有意に低かったことが示された ($p < 0.0001$ KLH Rib i 対 KLH-TAU VAC-p7.1 Rib i、ANOVA 検定を使用、次いで多重比較用にホルムーボンフェローニ調整)。サルコシル不溶性タウは良好に受容されてタウオパチーの病理学的特長と相関しており、この結果は、KLH-TAU VAC-p7.1 を用いたワクチン接種によって誘導された抗体が *in vivo* で保護的であることを実証している。

【0278】

[実施例 14]

ワクチン誘導性の抗体は非ヒト霊長類において機能的である

アカゲザルマカクを、ミョウバンおよび CpG オリゴヌクレオチドでアジュバント化したコンジュゲート B ($n = 6$) または KLH ($n = 2$) を用いて、1、29、85、および 169 日目に免疫化した。血液を 14 日毎に採取し、コンジュゲート B を用いて免疫化した動物からの血清を、ELISA を使用して免疫化ペプチドに対する反応性について (図 16 A)、および MSD を使用してヒト ePHF について (図 16 B) 試験した。コンジュゲート B を用いた免疫化は、ワクチンホスホペプチドに対して持続的かつ一貫した抗体応答をもたらした。さらに、すべての動物は、ヒト ePHF に対して測定可能な抗体レベルを有しており、6 匹の動物のうちの 3 匹がこの抗原に対して高い反応性を示していた。一次免疫化の 50 日後に動物から採取した血清を健康な個体または AD 患者からのヒト脳切片に適用した (図 16 C)。コンジュゲート B 群からの免疫後血清は AD 脳組織中の病理学的タウ構造、すなわち、神経原線維のもつれ、神経絨毛糸、および神経突起老人斑を染色した一方で、KLH で免疫化したマウスからの血清はいかなる反応性も示さなかった。対照組織では染色は観察されなかった。タウ免疫枯渇アッセイにて試験した場合に、コンジュゲート B を受けている動物は、タウ種と結合して枯渇させることができる抗体を有していた一方で (50 日目では $p = 0.03$ 、ANOVA 検定を使用、次いで多重比較用にダネットの調整)、KLH を用いた免疫化はそのような抗体を始動させなかった (図 16 D)。また、免疫化前および後の血清を中和アッセイで連続希釈した個々の試料としても試験した (図 16 E)。ベースラインからの変化 (CFB) を、ワクチン接種前の -14 日目 (ベースライン) とワクチン接種後 50、106、および 190 日目のそれぞれとの間の、読取り値の FRET 計数の差異として計算した。その後、特定のワクチン接種後の日での応答 (日_i) を以下のように計算した：

【0279】

【数 1】

$$\text{応答} = \%FRET_{\text{日}_i} - \%FRET_{\text{ベースライン}}$$

【0280】

動物を変量効果として用いた、前述の応答に対する一般的な線形混合モデルを、カテゴリー変数として扱ったワクチン群、日、および血清レベルの変数ならびにすべてのその相互作用を用いて適用した。本研究の探索的性質を考慮すると、複数の試験調整は検討しなかった。仮説の試験を 5% の有意性レベルで行った。

【0281】

[実施例 15]

ミョウバンおよび CpG オリゴヌクレオチドアジュバントと組み合わせたコンジュゲートワクチンを用いて免疫化したマウスは、ワクチンペプチドに対してより高い力価抗体応答をもたらした

成体雌 C57BL/6 マウス ($n = 5 \sim 6$ 匹/群) を、2 μg (図 17 A) または 0.2 μg (図 17 B) のどちらかのコンジュゲート A ワクチンを用いて、筋肉内で免疫化した。コンジュゲートワクチンを、単独で (アジュバントなし)、ミョウバン水酸化物と共に、CpG オリゴヌクレオチドと共に、またはミョウバンと CpG オリゴヌクレオチドの

10

20

30

40

50

組合せと共にのいずれかで投与した。すべてのマウスに、研究の0日目に一次免疫化を与え、次いで28日目に単一のブースター免疫化を与えた。ミョウバンアジュバントの用量は500ug/マウス/注射であり、CpGオリゴヌクレオチドアジュバントの用量は20ug/マウス/注射であった。図17のグラフは、免疫化前(0日目)ならびにワクチンペプチドT3.5をコーティング抗原として用いた免疫化の2つの時点(28および42日目)にマウスから採取した血清を使用した、結合ELISAの結果を示す。1群あたりのT3.5特異的平均エンドポイント力価をプロットし、エラーバーは標準誤差を表す。表は、ノンパラメトリックなクラスカル・ワリス検定を使用して抗体価を比較し、クラスカル・ワリス検定の事後としてウィルコクソン符号順位検定を使用して対での群の比較を評価した結果の統計分析を示す。

10

【0282】

図17に示す結果は、どちらの用量でも、非アジュバント化ワクチンは強力な免疫応答を誘導できなかったことを例示している。ミョウバンもしくはCpGオリゴヌクレオチドまたは両方の組合せの使用は抗体応答の規模を改善した($p \leq 0.0152$)。さらに、2ugのワクチンを用いて免疫化した動物では、アジュバントの組合せは、28日目に単一アジュバントよりも有意に高い抗体価を与えた($p = 0.0028$)。また、42日目に0.2ugのワクチンを用いて免疫化した動物では、ミョウバン-CpGオリゴヌクレオチドの組合せは、CpGオリゴヌクレオチド単独よりも良好な性能であった($p = 0.0497$)。これらのデータはミョウバンとCpGオリゴヌクレオチドアジュバントとの組合せの使用を支持している。

20

【0283】

[実施例16]

様々なタウペプチド：T細胞エпитープの比を有するリポソームワクチンは、高いかつ持続的なレベルのタウホスホペプチド特異的IgG抗体価を誘導する

成体のアカゲザルマカク($n = 6$ 匹/群)を、1、29、85、および169日目に、3D-(6-アシル)PHAD(登録商標)および脂質付加CpG2006オリゴヌクレオチドアジュバントをどちらも含有し、i) 400ug/mLの配列番号2のリン酸化タウペプチドおよび100ug/mLのT50(リポソームZ)、ii) 1200ug/mLの配列番号2のリン酸化タウペプチドおよび1200ug/mLのT50(リポソームZ⁺)、iii) 400ug/mLの配列番号2のリン酸化タウペプチドおよび400ug/mLのT50(リポソームZ⁺⁺)、iv) 1200ug/mLの配列番号2のリン酸化タウペプチドおよび300ug/mLのT50(リポソームZ⁺⁺⁺)を有する、カプセル封入されたT50-T細胞エピトープを有する改善リポソームワクチン中に1800ugの配列番号2の酢酸テトラパルミトイル化リン酸化タウペプチド/用量を用いて、皮下で免疫化した。出血を、免疫化前ならびに8、22、36、50、64、78、92、106、120、134、148、162、176、および190日目に行い、抗体を単離した。血清中の特異的IgG抗体価を、配列番号2のリン酸化タウペプチドをコーティング抗原として、および抗サルIgG二次抗体を使用して、ELISAによって決定した。生じる抗体レベルを、それぞれの個々のサルの経時的なエンドポイント力価(肯定応答を誘導する最後の血清希釈率)として計算した。1群あたりのエンドポイント力価の幾何平均 $\pm 95\%$ の信頼区間を図18に提示し、これは、試験した4つすべてのリポソームワクチンが、タウホスホペプチドに対して高いかつ持続的な力価を誘導したことを示している。

30

40

【0284】

配列番号1-ホスホタウペプチド(7.1)

GDRSGYS [pS] PG [pS] PG [pT] PGSRSRT

配列番号2-ホスホタウペプチド(T3.5)

VYK [pS] PVVSGDT [pS] PRHL

配列番号3-ホスホタウペプチド(22.1)

SSTGSI DMVD [pS] PQLA [pT] LA

50

配列番号4-タウペプチド

VYKSPVVS GDTSPRHL

配列番号5-ホスホタウペプチド

RENAKAKTDHGAEIVYK [pS] PVVSGDT [pS] PRHL

配列番号6-ホスホタウペプチド

RQEF EVMEDHAGT [pY] GL

配列番号7-ホスホタウペプチド

PGSR SR [pT] P [pS] LPTPTTR

配列番号8-ホスホタウペプチド

GYSSPG [pS] PG [pT] PGSRSR

10

配列番号9-ホスホタウペプチド

GDT [pS] PRHL [pS] NVSSTGSID

配列番号10-ホスホタウペプチド

PG [pS] PG [pT] PGSRSR [pT] P [pS] LP

配列番号11-ホスホタウペプチド

HL [pS] NVSSTGSID

配列番号12-ホスホタウペプチド

VSGDT [pS] PRHL

配列番号13-T50 T細胞エピトープ

AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNFTV

20

SFWLRVPKVSASHLE-NH₂

配列番号14-T46 T細胞エピトープ

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNFTVSF

WLRVPKVSASHLEK (Pal) K (Pal) -NH₂

配列番号15-T48ヘルパーT細胞エピトープ

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNFTVSF

WLRVPKVSASHLEGLINSTKIYSYFPSVISKVNQ-NH₂

配列番号16-T51ヘルパーT細胞エピトープ

AKFVAAWTLKAAARRQYIKANSKFIGITELRRFNFTVSF

WLRVPKVSASHLE-NH₂

30

配列番号17-T52ヘルパーT細胞エピトープ

AKFVAAWTLKAAARKQYIKANSKFIGITELRKFNFTVSF

WLRVPKVSASHLE-NH₂

配列番号18-CpG2006 (CpG7909としても知られる)

5'-tcgtcgttttgcgttttgcgtt-3'

ただし、小文字はホスホデオキシリボースヌクレオチド間結合を意味する

配列番号19-CpG1018

5'-tgactgtgaacgttcgagatga-3'

ただし、小文字はホスホデオキシリボースヌクレオチド間結合を意味する

配列番号20-CpG2395

5'-tcgtcgttttccggcggcggcgg-3'

ただし、小文字はホスホデオキシリボースヌクレオチド間結合を意味する

40

配列番号21-CpG2216

5'-ggGGGACGATCGTCgggggg-3'

ただし、小文字はホスホデオキシリボースヌクレオチド間結合を意味し、大文字はリン酸ジエステル (po) 結合を意味する

配列番号22-CpG2336

5'-gggGACGACGTCGTGgggggg-3'、

ただし、小文字はホスホデオキシリボースヌクレオチド間結合を意味し、大文字はリン酸ジエステル結合を意味する

50

配列番号 23 - Pan DR エピトープ (PADRE) ペプチド

AKFVAAWTLKAAA

配列番号 24 - P2

QYIKANSKFIGITEL

配列番号 25 - P30

FNNFTVSWFLRVPKVSASHLE

配列番号 26 - TT_{586~605}

LINSTKIYSYFPSVISKVNQ

配列番号 27 - パルミトイル化ホスホタウペプチド (パルミトイル化 7.1)

K (pal) K (pal) GDRSGYS [pS] PG [pS] PG [pT] PGSRS
RTK (pal) K (pal)

10

配列番号 28 - パルミトイル化ホスホタウペプチド (T3、パルミトイル化 T3.5)

K (pal) K (pal) VYK [pS] PVVSGDT [pS] PRHLK (pal)
K (pal)

配列番号 29 - パルミトイル化ホスホタウペプチド (パルミトイル化 22.1)

K (pal) K (pal) SSTGSIDMVD [pS] PQLA [pT] LAK (pal)
K (pal)

配列番号 30 - パルミトイル化タウペプチド

K (pal) K (pal) VYKSPVVS GDTSPRHLK (pal) K (pal)

配列番号 31 - パルミトイル化ホスホタウペプチド

20

K (pal) K (pal) RENAKAKTDHGAEIVYK [pS] PVVSGDT
[pS] PRHLK (pal) K (pal)

配列番号 32 - パルミトイル化ホスホタウペプチド

K (pal) K (pal) RQEFVME DHAGT [pY] GLK (pal) K (pal)

配列番号 33 - パルミトイル化ホスホタウペプチド

K (pal) K (pal) PGSRSR [pT] P [pS] LPTPTTRK (pal)
K (pal)

配列番号 34 - パルミトイル化ホスホタウペプチド

K (pal) K (pal) GYSSPG [pS] PG [pT] PGSRSRK (pal)
K (pal)

30

配列番号 35 - パルミトイル化ホスホタウペプチド

K (pal) K (pal) GDT [pS] PRHL [pS] NVSSTGSIDK (pal)
K (pal)

配列番号 36 - パルミトイル化ホスホタウペプチド

K (pal) K (pal) PG [pS] PG [pT] PGSRSR [pT] P [pS] L
PK (pal) K (pal)

配列番号 37 - パルミトイル化ホスホタウペプチド

K (pal) K (pal) HL [pS] NVSSTGSIDK (pal) K (pal)

配列番号 38 - パルミトイル化ホスホタウペプチド

40

K (pal) K (pal) VSGDT [pS] PRHLK (pal) K (pal)

配列番号 39 - C末端アミドなしの T50

AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNNFTV
SWFLRVPKVSASHLE

配列番号 40 - C末端の -Lys (Pal) -Lys (Pal) -NH₂ なしの T46

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSF
WLRVPKVSASHLE

配列番号 41 - C末端アミドなしの T48

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSF
WLRVPKVSASHLEGS LINSTKIYSYFPSVISKVNQ

50

配列番号 42 - C 末端アミドなしの T51

AKFVAAWTLKAAARRQYIKANSKFIGITELRRFNNFTVSF
WLRVPKVSASHLE

配列番号 43 - C 末端アミドなしの T52

AKFVAAWTLKAAARKQYIKANSKFIGITELRKFNFTVSF
WLRVPKVSASHLE

配列番号 44 - T57

AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNFTV
SFWLRVPKVSASHLE - K (Pal) K (Pal) - NH2

【0285】

参考文献

10

20

30

40

50

【表 1】

Asuni AA et al., J Neurosci. 2007 Aug 22;27(34):9115-29

Bentebibel et al., 2013, Sci Transl Med., 5(176):176ra32

Crotty, 2011, Annual Reviews of Immunology. Vol 29:p621-663

Friedhoff et al., Biochimica et Biophysica Acta 1502 (2000) 122-132

10

Greenberg and Davies, 1991, Proc Natl Acad Sci U S A, 87(15):5827-31

Hanger et al., Trends Mol Med. 15:112-9, 2009

Hickman et al., J. Biol. Chem. vol. 286, NO. 16, pp. 13966–13976, April 22, 2011

Kontsekova E et al., Alzheimers Res Ther. 2014 Aug 1;6(4):44

Novak P et al., Lancet Neurology 2017, 16:123-134

20

Peeraer et al., 2015, Neurobiol Dis., 73:83-95

Ries et al., 2015, Org. Biomol. Chem., 13:9673

Spensieri et al., 2013, Proc Natl Acad Sci U S A., 110(35):14330-5

Theunis C et al., PLoS One. 2013; 8(8): e72301

US7,741,297

30

US8,647,631

US9,687,447

WO90/14837

WO2010/115843

40

以下に、本願の当初の特許請求の範囲に記載の発明を記載する。

【発明 1】

a. タウペプチドと、

b. ヘルパー T 細胞エピトープと

を含み、

前記タウペプチドがリポソームの表面上に提示されている、リポソーム。

【発明 2】

トール様受容体 4 リガンドおよびトール様受容体 9 リガンドのうちの少なくとも 1 つをさらに含む、発明 1 に記載のリポソーム。

【発明 3】

50

a. タウホスホペプチドと、
b. ヘルパーT細胞エピトープと、
c. 脂質付加CpGオリゴヌクレオチドと、
d. トール様受容体4リガンドを含有するアジュバントと
を含み、

前記タウホスホペプチドがリボソームの表面上に提示されている、リボソーム。

〔発明4〕

1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)、1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホリル-3'-rac-グリセロール(DMPG)、およびコレステロールからなる群から選択される1つまたは複数の脂質をさらに含む、発明1から3のいずれか一つに記載のリボソーム。

10

〔発明5〕

前記タウペプチドが配列番号1～配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、

前記アミノ酸配列が、前記タウホスホペプチドが前記リボソームの表面上に提示されることを可能にする1つまたは複数の修飾をさらに含む、発明1から4のいずれか一つに記載のリボソーム。

〔発明6〕

前記ヘルパーT細胞エピトープが、配列番号23～配列番号26からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、発明1から5のいずれか一つに記載のリボソーム。

20

〔発明7〕

配列番号18～配列番号22からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する前記脂質付加CpGオリゴヌクレオチドを含み、前記CpGオリゴヌクレオチドは1つまたは複数のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有し、前記CpGオリゴヌクレオチドは少なくとも1つの親油性基と共有結合している、発明1から6のいずれか一つに記載のリボソーム。

〔発明8〕

前記トール様受容体4リガンドがモノホスホリル脂質A(MPLA)である、発明1から7のいずれかに記載のリボソーム。

30

〔発明9〕

a. 配列番号27～配列番号38からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するタウペプチドと、

b. 配列番号39～配列番号44からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するヘルパーT細胞エピトープ、好ましくは、配列番号13～配列番号17からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる前記ヘルパーT細胞エピトープと、

c. 配列番号18～配列番号22からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有し、1つまたは複数のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、リンカーを介して少なくとも1つのコレステロールと共有結合している、脂質付加CpGオリゴヌクレオチドと

d. モノホスホリル脂質A(MPLA)と
を含む、リボソーム。

40

〔発明10〕

発明1から9のいずれか一つに記載のリボソームと薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

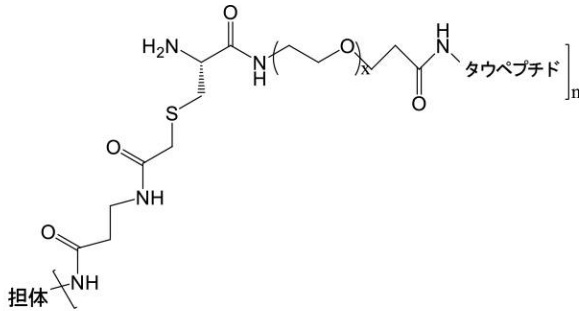
〔発明11〕

タウホスホペプチドと、リンカーを介してそれとコンジュゲートさせた免疫原性担体とを含むコンジュゲートであって、以下の構造：

(i) 式(I)：

50

【化 1 - 1】

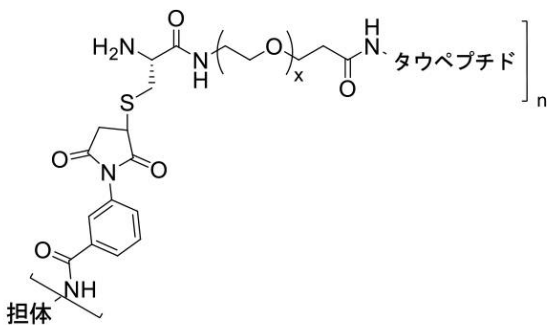


10

または

(i i) 式 (I I) :

【化 2 - 1】



20

〔式中、

x は、0 ～ 10、好ましくは 2 ～ 6、最も好ましくは 3 の整数であり、

n は、3 ～ 15、好ましくは 3 ～ 12 の整数である〕、

を有する、コンジュゲート。

〔発明 1 2〕

前記免疫原性担体が、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、破傷風トキソイド、CRM197、および髄膜炎菌（*N. meningitidis*）由来の外膜タンパク質混合物（OMP）、またはその誘導体からなる群から選択される、発明 1 1 に記載のコンジュゲート。

30

〔発明 1 3〕

前記タウペプチドが配列番号 1 ～ 配列番号 12 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、発明 1 1 または 1 2 に記載のコンジュゲート。

〔発明 1 4〕

式（I）の構造を有し、前記免疫原性担体が CRM197 である、発明 1 3 に記載のコンジュゲート。

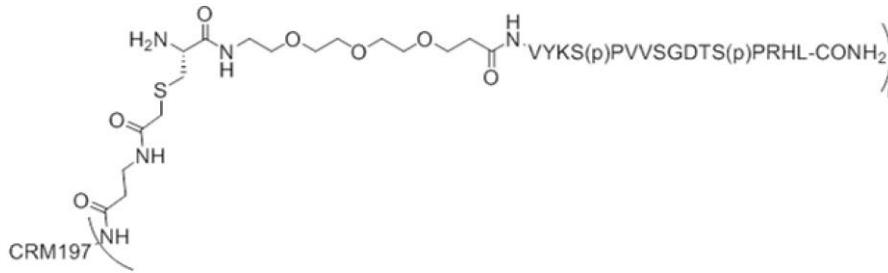
〔発明 1 5〕

以下の構造：

40

50

【化 3 - 1】



〔式中、

n は、3 ～ 7 の整数である〕、

を有する、発明 1 4 に記載のコンジュゲート。

〔発明 1 6〕

発明 1 1 から 1 5 のいずれか一つに記載のコンジュゲートと薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

〔発明 1 7〕

神経変性障害を患っている対象において免疫応答を誘導する方法であって、前記対象に、発明 1 0 に記載の医薬組成物または発明 1 6 に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

〔発明 1 8〕

それを必要としている対象において神経変性疾患または障害を処置または防止する方法であって、前記対象に、発明 1 0 に記載の医薬組成物または発明 1 6 に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

〔発明 1 9〕

前記神経変性疾患または障害が、神経原線維病変の形成によって引き起こされる、またはそれに関連している、発明 1 7 および 1 8 のいずれか一つに記載の方法。

〔発明 2 0〕

前記神経変性疾患または障害が、アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルトーヤコブ病、拳闘家認知症、ダウン症候群、ゲルストマンーストロイスラーシャインカー病、封入体筋炎、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、外傷性脳傷害、筋萎縮性側索硬化症、グアムのパーキンソン認知症複合、神経原線維のもつれを伴う非グアム型運動ニューロン疾患、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、レビー認知症、筋萎縮性側索硬化症、石灰化を伴うびまん性の神経原線維のもつれ、17 番染色体に連鎖するパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症（FTDP-17）、ハレルフォルデンースパッツ病、多系統萎縮症、ニーマンピック病 C 型、ピック病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性汎脳炎、もつれのみの認知症、脳炎後パーキンソニズム、筋緊張性ジストロフィー、慢性外傷性脳障害（CTE）、原発性加齢関連タウオパチー（PART）、またはレビー小体認知症（LBD）である、発明 1 9 に記載の方法。

〔発明 2 1〕

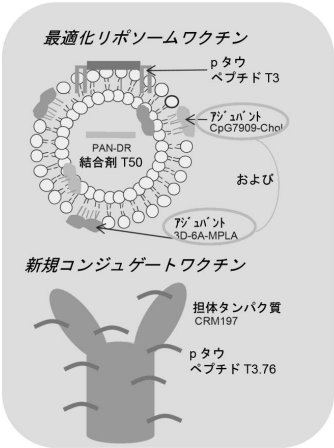
前記神経変性疾患または障害が、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症候群、前頭側頭型認知症と 17 番染色体に連鎖するパーキンソニズム（FTDP-17）、大脳皮質基底核変性症、レビー認知症、筋萎縮性側索硬化症、筋緊張性ジストロフィー（dysphasy）、慢性外傷性脳障害（CTE）、脳血管症、原発性加齢関連タウオパチー（PART）、またはレビー小体認知症（LBD）である、発明 1 7 から 2 0 のいずれか一つに記載の方法。

〔発明 2 2〕

それを必要としている対象において神経変性疾患または障害の処置または防止において使用するための、発明 1 0 に記載の医薬組成物および発明 1 6 に記載の医薬組成物のうちの少なくとも 1 つを含む、キット。

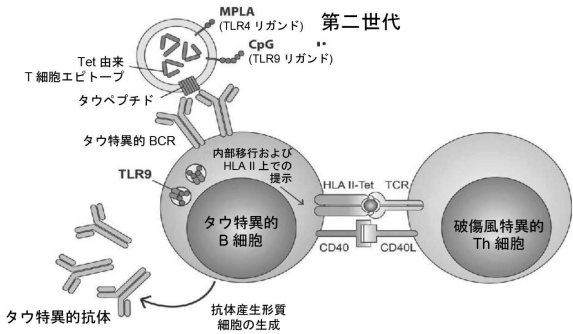
【図面】
【図 1】

図 1



【図 2】

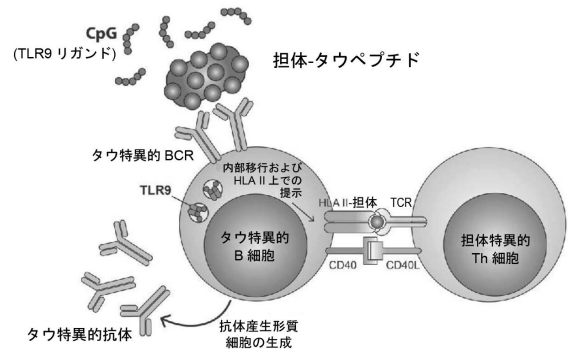
図 2



10

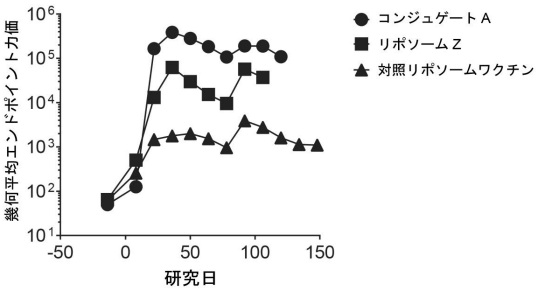
【図 3】

図 3



【図 4】

図 4



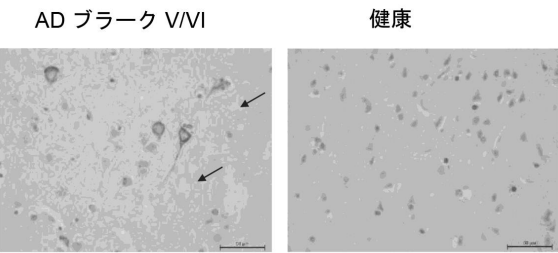
30

40

50

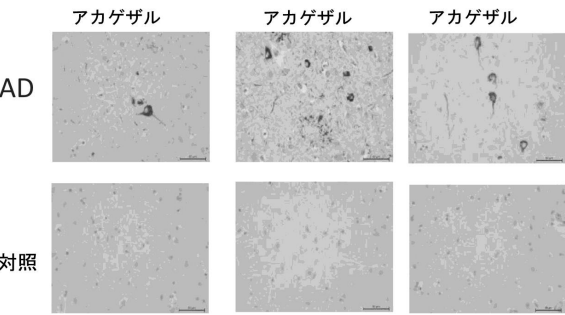
【図 5】

図 5



【図 6】

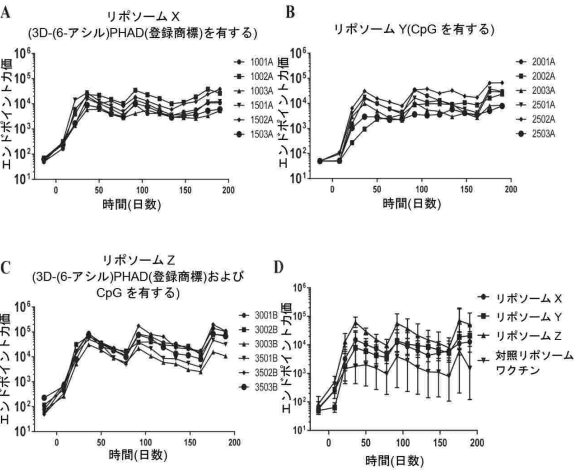
図 6



10

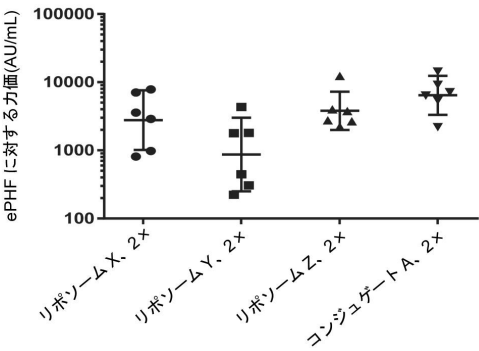
【図 7】

図 7



【図 8】

図 8



20

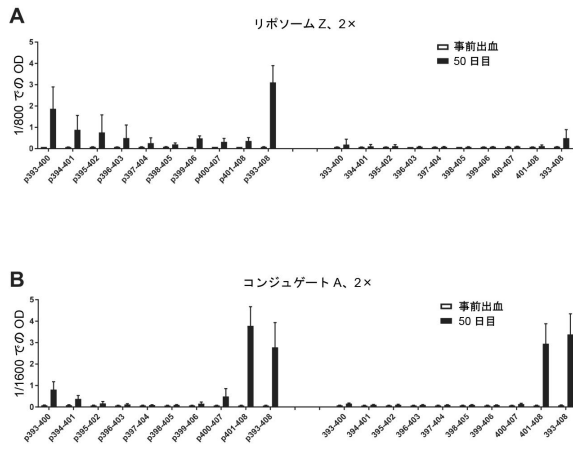
30

40

50

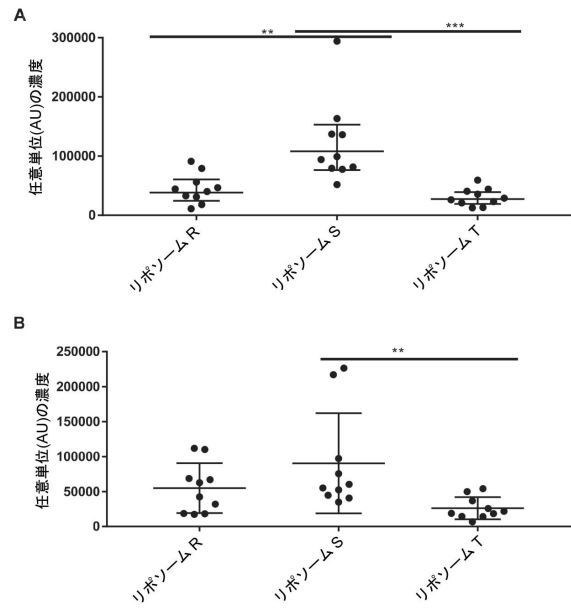
【図 9】

図 9



【図 10】

図 10

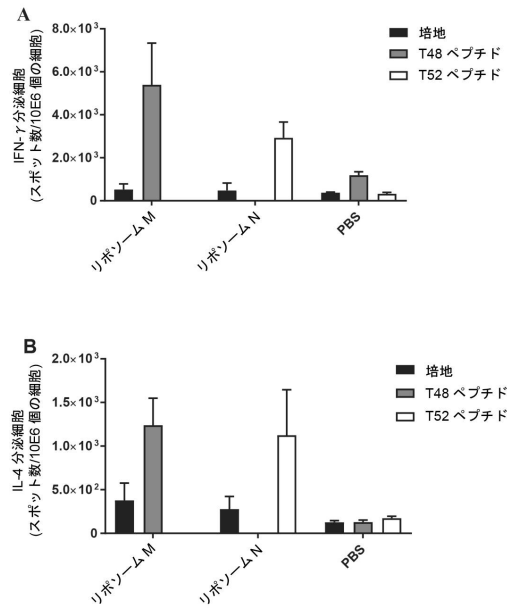


10

20

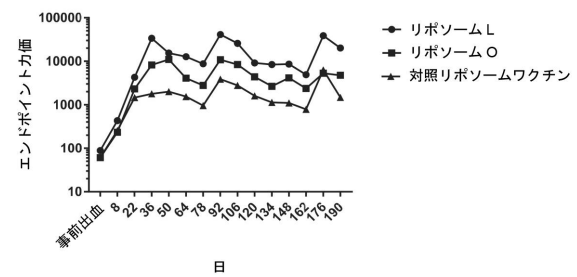
【図 11】

図 11



【図 12】

図 12



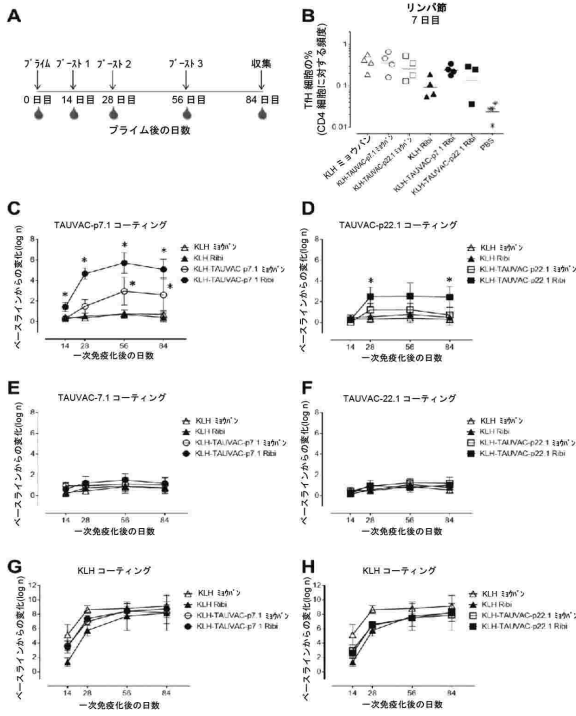
30

40

50

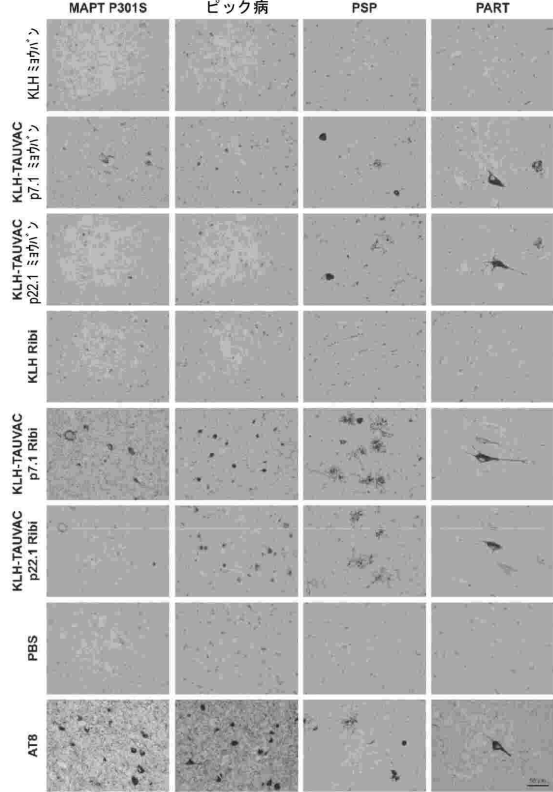
【図 13】

図 13



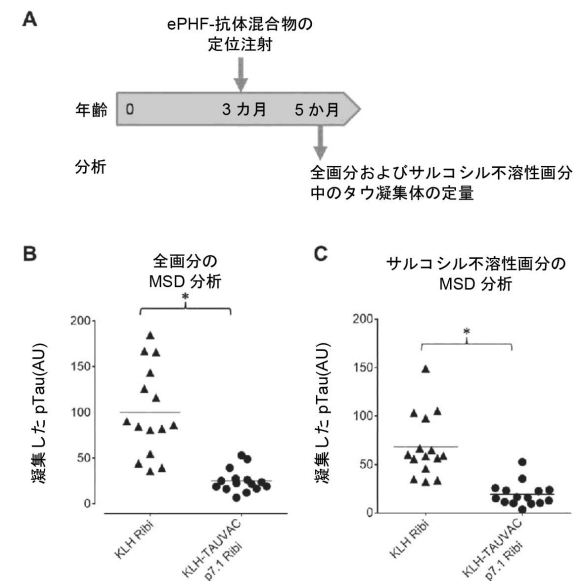
【図 14】

図 14



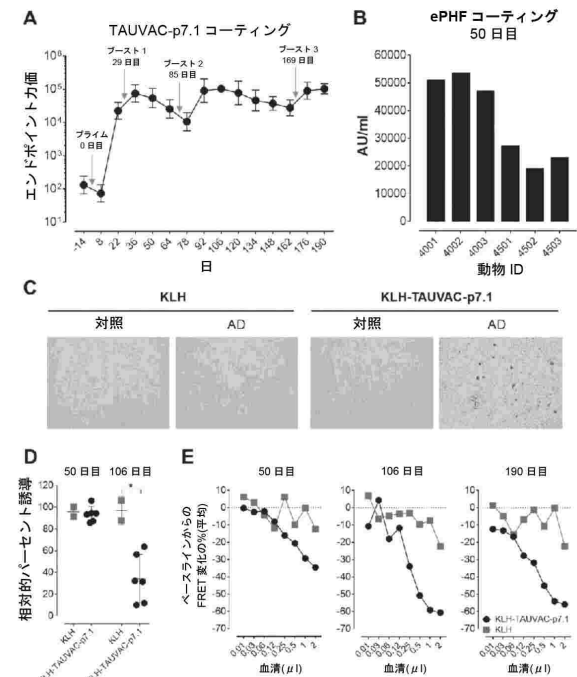
【図 15】

図 15



【図 16】

図 16



10

20

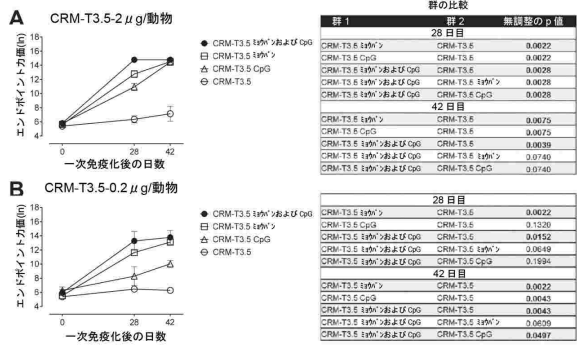
30

40

50

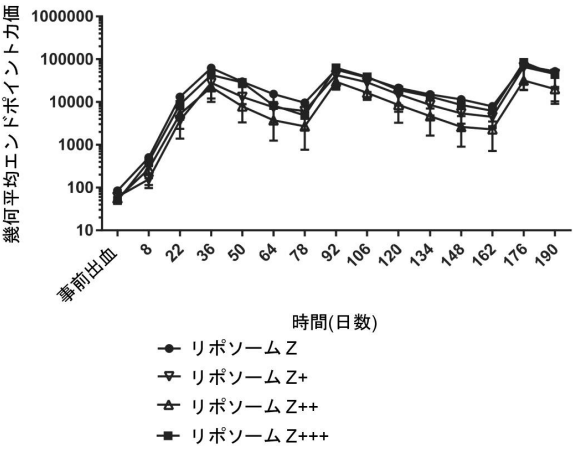
【図 17】

図 17



【図 18】

図 18



【配列表】

0007550643000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

F I

A 6 1 P 25/28

(74)代理人 100093676

弁理士 小林 純子

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100186897

弁理士 平川 さやか

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ラムスバーグ, エリザベス アン

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 5 6 0, タイタスビル, トレントン-ハーバートン ロード 1 1 2 5, ヤンセン ファーマシューティカルズ, インコーポレーテッド内

(72)発明者 デ マルコ, ドナタ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 5 6 0, タイタスビル, トレントン-ハーバートン ロード 1 1 2 5, ヤンセン ファーマシューティカルズ, インコーポレーテッド内

(72)発明者 チャッカムカル, アニッシュ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 5 6 0, タイタスビル, トレントン-ハーバートン ロード 1 1 2 5, ヤンセン ファーマシューティカルズ, インコーポレーテッド内

(72)発明者 サダカ, シャーロット

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 5 6 0, タイタスビル, トレントン-ハーバートン ロード 1 1 2 5, ヤンセン ファーマシューティカルズ, インコーポレーテッド内

(72)発明者 ゴーズミット, ジャーブ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 5 6 0, タイタスビル, トレントン-ハーバートン ロード 1 1 2 5, ヤンセン ファーマシューティカルズ, インコーポレーテッド内

(72)発明者 ムース, アンドレア

スイス国 ツェーハー-1 0 1 5 ローザンヌ, ビルディングビー, イービーエフエル イノヴェーション パーク, エーシー イミューン エス. エー. 内

(72)発明者 ビルグレン ボッシュ, マリア

スイス国 ツェーハー-1 0 1 5 ローザンヌ, ビルディングビー, イービーエフエル イノヴェーション パーク, エーシー イミューン エス. エー. 内

(72)発明者 ヴキチェヴィッチ ヴェリル, マリヤ

スイス国 ツェーハー-1 0 1 5 ローザンヌ, ビルディングビー, イービーエフエル イノヴェーション パーク, エーシー イミューン エス. エー. 内

(72)発明者 ヒックマン, デヴィッド

スイス国 ツェーハー-1 0 1 5 ローザンヌ, ビルディングビー, イービーエフエル イノヴェーション パーク, エーシー イミューン エス. エー. 内

(72)発明者 ピオット, ニコラス

スイス国 ツェーハー-1 0 1 5 ローザンヌ, ビルディングビー, イービーエフエル イノヴェーション パーク, エーシー イミューン エス. エー. 内

(72)発明者 ギミレ, サロージ ラージ

スイス国 ツェーハー-1 0 1 5 ローザンヌ, ビルディングビー, イービーエフエル イノヴェーション パーク, エーシー イミューン エス. エー. 内

審査官 春田 由香

(56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 2 2 7 5 4 (J P, A)

特表 2 0 1 4 - 5 0 3 4 7 5 (J P, A)

Davtyan, H. et al., The MultiTEP platform-based Alzheimer's disease epitope vaccine activates a broad repertoire of T helper cells in nonhuman primates, Alzheimer's & dementia, 2

014年, Vol.10, No.3, p.271-283, doi:10.1016/j.jalz.2013.12.003

Davtyan, H. et al., Alzheimer's disease Advax(CpG)- adjuvanted MultiTEP-based dual and single vaccines induce high-titer antibodies against various forms of tau and A β pathological molecules, Scientific Reports, 2016年, Vol.6, 28912, doi:10.1038/srep28912

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d