(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-538332
(P2004-538332A)
(43)公表日　平成16年12月24日(2004.12.24)

(51)Int.Cl.⁷	F I		テーマコード(参考)
A61K 38/00	A61K 37/02		4B024
A61K 35/74	A61K 35/74		4B065
A61K 35/76	A61K 35/76		4C084
A61K 39/00	A61K 39/00	H	4C085
A61K 39/02	A61K 39/02		4C087

審査請求 未請求　予備審査請求 有　(全 186 頁)　最終頁に続く

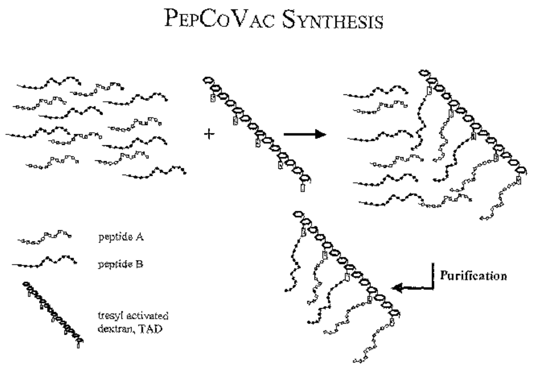
(21)出願番号　特願2003-520770(P2003-520770)
(86)(22)出願日　平成14年8月20日(2002.8.20)
(85)翻訳文提出日　平成16年2月19日(2004.2.19)
(86)国際出願番号　PCT/DK2002/000547
(87)国際公開番号　WO2003/015812
(87)国際公開日　平成15年2月27日(2003.2.27)
(31)優先権主張番号　PA 2001 01231
(32)優先日　平成13年8月20日(2001.8.20)
(33)優先権主張国　デンマーク(DK)
(31)優先権主張番号　60/337,543
(32)優先日　平成13年10月22日(2001.10.22)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　PA 2002 00558
(32)優先日　平成14年4月16日(2002.4.16)
(33)優先権主張国　デンマーク(DK)

(71)出願人　501023476
ファーメクサ　エイ／エス
デンマーク、ディーケー－２９７０　ホーショルム、コグレ　アレ　６
Ｋｏｇｌｅ　Ａｌｌｅ　６，ＤＫ－２９７０　Ｈｏｒｓｈｏｌｍ　ＤＥＮＭＡＲＫ
(74)代理人　100065248
弁理士　野河　信太郎
(72)発明者　ラスムッセン，ペター，ビーク
デンマーク、ディーケー－２９７０　ホーショルム、コグレ　アレ　６、ファーメクサ　エイ／エス

最終頁に続く

(54)【発明の名称】β－アミロイドアナログ－Ｔ細胞エピトープワクチン

(57)【要約】
アミロイド沈着と特徴とする疾患と戦う、新規の方法が開示される。該方法は、アミロイド前駆体タンパク質(APP)またはβアミロイド(Aβ)に対する免疫化に一般的に依存する。免疫化は、自己APPまたはAβのアナログの投与によりもたらされ、該アナログは、自己アミロイド産生ポリペプチドに対する抗体産生を誘導することができる。免疫原として特に好ましいものは、単一またはいくつかの外来、免疫優性かつ乱交雑なT細胞エピトープの導入により修飾された自己Aβである。APPまたはAβに対する核酸ワクチン化および生ワクチンを用いたワクチン化、ならびにワクチン化に有用な方法および手段も開示される。このような方法ならびに手段は、アナログおよび医薬製剤の製造方法とともに、核酸断片、ベクター、形質転換細胞、ポリペプチドおよび医薬製剤を含む。
【選択図】図２



【特許請求の範囲】
【請求項１】
アナログが
a)　SEQ ID NO: 2の残基672～714のサブシークエンスの少なくとも1つのコピーからなるポリアミノ酸であり、外来Tヘルパーエピトープ(T_Hエピトープ)が、アミノ酸の付加および／または挿入および／または欠失および／または置換により組み込まれ、該サブシークエンスが、SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基673～714からなるアミノ酸配列の残基1～42、残基1～40、残基1～39、残基1～35、残基1～34、残基1～28、残基1～12、残基1～5、残基13～28、残基13～35、残基17～28、残基25～35、残基35～40、残基36～42および残基35～42からなる群より選択されるか；および／または
b)　外来T_Hエピトープおよび破壊されたアミロイド前駆体タンパク質(APP)またはβアミロイド(Aβ)配列を含むポリアミノ酸であることにより、該アナログが、T細胞応答を開始するMHCクラスII分子に生産的に結合する、SEQ ID NO: 2のいずれの配列をも含まないか；および／または
c)　外来T_HエピトープおよびAPPまたはAβ由来アミノ酸を含み、該アナログのC末端に位置する単一のメチオニン残基を含むポリアミノ酸であり、APPまたはAβおよび外来T_Hエピトープの中の他のメチオニン残基が置換されているかもしくは欠失されており、好ましくはロイシンもしくはイソロイシンにより置換されているか；および／または
d)　a)で定義したポリアミノ酸および／またはb)で定義したポリアミノ酸および／またはc)で定義したポリアミノ酸が別個に結合しているポリヒドロキシポリマー骨格を含むコンジュゲートであるか；および／または
e)　1) 外来T_Hエピトープならびに2) a)で定義したサブシークエンス、b)で定義した破壊されたAPPもしくはAβ配列、およびC末端に位置する単一のメチオニン残基を含み、APPまたはAβおよび外来T_Hエピトープの中の他のメチオニン残基が置換されているかもしくは欠失しており、好ましくはロイシンもしくはイソロイシンにより置換されているAPPまたはAβ由来アミノ酸配列からなる群より選択されるポリアミノ酸が別個に結合しているポリヒドロキシポリマー骨格を含むコンジュゲートである、アナログによる動物の免疫化が、動物の自己APPまたはAβに対する抗体産生を誘導するように、APPおよび／またはAβの少なくとも1つのB細胞エピトープと少なくとも1つの外来T_Hエピトープとを同じ分子に組み込む、APPまたはAβの少なくとも1つのアナログの免疫原的有効量を動物の免疫系に提示することを含む、ヒトを含む動物におけるAPPまたはAβのインビボダウンレギュレーション方法。
【請求項２】
APPまたはAβのB細胞エピトープの実質的なフラクションがアナログにおいて保存され、
－抗原提示細胞(APC)もしくはBリンパ球へのアナログの標的化をもたらす、少なくとも1つの第一成分を導入するか、および／または
－免疫系を刺激する、少なくとも1つの第二成分を導入するか、および／または
－免疫系へのアナログの提示を最適化する、少なくとも1つの第三成分を導入する、
請求項1に記載の方法。
【請求項３】
第一および／または第二および／または第三成分が、APPもしくはAβ配列における適切な化学群への共有もしくは非共有結合により側鎖として結合している、請求項2に記載の方法。
【請求項４】
アナログが融合ポリペプチドを含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項５】
アミノ酸の置換および／または欠失および／または挿入および／または付加の導入が、APPまたはAβの全体の三次構造の実質的な保存となる、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項６】

アナログが、APPもしくはAβの少なくとも1つのB細胞エピトープの重複、および／またはハプテンの導入を含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項７】
外来T細胞エピトープが動物において免疫優性である、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項８】
外来T細胞エピトープが、天然乱交雑T細胞エピトープおよび人工MHC-II結合ペプチド配列から選択される外来T細胞エピトープのように乱交雑である、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項９】
天然T細胞エピトープが、P2またはP30のような破傷風トキソイドエピトープ、ジフテリアトキソイドエピトープ、インフルエンザウイルスヘマグルチニンエピトープ、およびピー・ファルシパルムCSエピトープから選択される、請求項8に記載の方法。
【請求項１０】
アナログが、前駆体ポリペプチドAβの細胞結合形態に存在する場合に細胞外の相に露出しないB細胞エピトープを含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１１】
アナログが、前駆体ポリペプチドの細胞結合形態に存在する場合に細胞外の相に露出する少なくとも1つのB細胞エピトープを有さない、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１２】
アナログが、最大で8、最大で7、最大で6、最大で5、最大で4および最大で3の連続したアミノ酸のようなSEQ ID NO: 2の最大で9の連続したアミノ酸を含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１３】
アナログがSEQ ID NO: 2の少なくとも1つのサブシークエンスを含むことにより、SEQ ID NO: 2の少なくとも1つのサブシークエンスがそれぞれ独立して、SEQ ID NO: 2の9の連続したアミノ酸、SEQ ID NO: 2の8の連続したアミノ酸、SEQ ID NO: 2の7の連続したアミノ酸、SEQ ID NO: 2の6の連続したアミノ酸、SEQ ID NO: 2の5の連続したアミノ酸、SEQ ID NO: 2の4の連続したアミノ酸、およびSEQ ID NO: 2の3の連続したアミノ酸からなる群より選択されるアミノ酸範囲からなる、請求項12に記載の方法。
【請求項１４】
連続したアミノ酸が、残基672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713および714からなる群より選択されるアミノ酸残基から始まる、請求項22または23に記載の方法。
【請求項１５】
少なくとも2コピーのAβ由来断片、または抗原決定基の多コピーを提示することができる担体分子に共有的もしくは非共有的に結合したアナログを有することにより、免疫系への提示が行われる、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１６】
変形dまたはeで、ポリアミノ酸およびT_Hエピトープが、アミド結合によりポリヒドロキシポリマーに結合している、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１７】
変形dまたはeで、ポリヒドロキシポリマーが多糖類である、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１８】
アナログが、自己抗原への自己寛容を破壊するのを促進するアジュバントとともに処方される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１９】
アナログの有効量が、皮内、皮下および筋肉内のような非経口経路；腹膜経路；経口経路

；バッカル経路；舌下経路；硬膜外経路；脊髄経路；肛門経路；頭蓋内経路から選択される経路を経て動物に投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項２０】
有効量が、0.5μg～2,000μgのアナログである、請求項19に記載の方法。
【請求項２１】
変形a～cで、免疫系へのアナログの提示が、アナログをエンコードする核酸を動物細胞に導入し、それにより導入された核酸の該細胞によるインビボ発現を得ることによりもたらされる、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。
【請求項２２】
導入された核酸が、裸のDNA、荷電または非荷電の脂質とともに処方されたDNA、リポソーム中に処方されたDNA、ウイルスベクターに包含されたDNA、トランスフェクション促進タンパク質またはポリペプチドとともに処方されたDNA、標的化タンパク質またはポリペプチドとともに処方されたDNA、カルシウム沈殿剤とともに処方されたDNA、不活性担体分子に結合したDNA、キチンまたはキトサン中に被包されたDNA、およびアジュバントとともに処方されたDNAから選択される、請求項21に記載の方法。
【請求項２３】
少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも6、少なくとも12の投与/導入のような、1年あたり少なくとも1の投与/導入を含む、請求項19～22のいずれか1項に記載の方法。
【請求項２４】
アミロイドの全量が減少するか、もしくはアミロイド形成の速度が臨床上有意義に減少する程度に、前記請求項のいずれか1項に記載の方法によりAPPまたはAβをダウンレギュレーションすることを含む、アルツハイマー病またはアミロイド沈着を特徴とする他の疾患および症状の治療および／または予防および／または改善方法。
【請求項２５】
アナログを用いた動物の免疫化が、動物の自己APPもしくはAβに対する抗体の産生を誘導する結果となる修飾が導入されており、該アナログが請求項1～17のいずれか1項に定義される、動物のAPPもしくはAβに由来するAPPまたはAβのアナログ。
【請求項２６】
医薬上および免疫学上許容される担体および／または賦形剤ならびに任意にアジュバントを含む、請求項25に記載のアナログの免疫原的有効量を含む免疫原性組成物。
【請求項２７】
請求項25に記載のアナログをエンコードする、核酸断片。
【請求項２８】
自立複製可能なベクターのような、請求項27に記載の核酸断片を有するベクター。
【請求項２９】
プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ染色体、およびウイルスからなる群より選択される、請求項28に記載のベクター。
【請求項３０】
請求項27に記載の核酸断片の発現を推進するプロモーター、ポリペプチド断片の分泌もしくは膜への組み込みを可能にするリーダーペプチドをエンコードする、任意の核酸配列、請求項27に記載の核酸断片、および任意のターミネーターを、5'→3'方向に実施可能な連鎖で含む、請求項28または29に記載のベクター。
【請求項３１】
宿主細胞に導入された場合に、宿主細胞のゲノムに組み込まれることが可能であるか、または不可能である、請求項28～30のいずれか1項に記載のベクター。
【請求項３２】
プロモーターが、真核細胞および／または原核細胞における発現を推進する、請求項30または31に記載のベクター。
【請求項３３】

請求項27に記載の核酸断片を複製することができる形質転換細胞のような、請求項28～32のいずれか1項に記載のベクターを有する形質転換細胞。

【請求項３４】

細菌、酵母、原虫、または真菌、S_2もしくはSF細胞のような昆虫細胞、植物細胞および哺乳動物細胞から選択される多細胞生物に由来する細胞から選択される微生物である、請求項33に記載の形質転換細胞。

【請求項３５】

請求項25に記載のアナログを分泌するか、またはその表面に有する形質転換細胞のような、請求項28に記載の核酸断片を発現する、請求項33または34に記載の形質転換細胞。

【請求項３６】

変形a～cで、免疫系への提示が、アナログをエンコードして発現する核酸断片を有する非病原性微生物またはウイルスを投与することによりもたらされる、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項３７】

－請求項27に記載の核酸断片もしくは請求項28～32のいずれか1項に記載のベクター、ならびに

－医薬上および免疫学上許容される担体および／または賦形剤および／またはアジュバント

を含む、アミロイドに対する抗体産生を誘導する組成物。

【請求項３８】

請求項28～32のいずれか1項に記載のベクターを有し、請求項27に記載の核酸断片を発現し、その表面に請求項25に記載のアナログを任意に分泌するか、または有する、安定な細胞ライン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

技術分野

本発明は、アルツハイマー病(AD)、およびアミロイド沈着を特徴とする、例えば中枢神経系(CNS)におけるアミロイド沈着を特徴とする他の疾患の治療ならびに予防における改良に関する。より特異的には、本発明は、アミロイド沈着に関与する病理を有する疾患に苦しんでいるか、または苦しむ危険性がある患者において、関連タンパク質(APPもしくはAβ)またはその成分に対する抗体の産生を可能にすることによる、（望まれていない）アミロイド沈着をダウンレギュレーションする方法に関する。本発明はまた、この方法において有用なポリペプチドの製造方法とともに、そのように修飾されたポリペプチドを提供する。本発明により包含されるものとしてはまた、修飾されたポリペプチドをエンコードする核酸断片とともに、これらの核酸断片が組込まれたベクターおよび宿主細胞ならびにそれにより形質転換された細胞ラインである。最後に、本発明は、新しいタイプのコンジュゲートペプチド免疫原を規定する。

【背景技術】

【０００２】

背景技術

アミロイドーシスは、不溶性タンパク質フィブリルの細胞外沈着で、組織損傷および疾患を導く(Pepys, 1996；Tanら、1995；Kelly、1996)。フィブリルは、通常、溶解性のタンパク質およびペプチドが異常な方法により自己会合するときに形成される(Kelly、1997)。

【０００３】

アミロイドは、全身性アミロイドーシス、AD、成人発症型糖尿病、パーキンソン病、ハンチントン病、前頭側頭型痴呆、およびプリオンに関する伝染性海綿状脳症（ヒトにおけるクールーおよびクロイツフェルトーヤコブ病、ならびにそれぞれヒツジおよびウシにおけるスクラピーおよびBSE）を含む重篤な疾患に関連し、例えばアルツハイマー病における

アミロイドプラーク形成は、ヒトの疾患の悪化に密接に関連しているようである。β－アミロイドタンパク質のような沈着において見出されるタンパク質の過剰発現、またはその修飾された形態の発現の動物モデルは、種々の疾患の症状、例えばアルツハイマー様症状を誘導することが示されている。アミロイド沈着に対する特異的療法はなく、これらの疾患は、通常、致命的である。

【０００４】

アミロイドフィブリルのサブユニットは、野生型、変異型またはトランケーテッド(truncated)タンパク質であり、同様のフィブリルをオリゴペプチドおよび変性タンパク質からインビトロで形成することができる(Bradburyら、1960；Filshieら、1964；BurkeおよびRougvie、1972)。フィブリルのポリペプチド成分の性質が、アミロイドーシスの特徴を明らかにしている。アミロイドタンパク質のサイズ、天然の構造および機能における大きな相違にもかかわらず、全てのアミロイドフィブリルは、長さが未定であり、分岐せず、直径70～120Åであり、コンゴーレッドで特徴的な染色を示す(Pepys、1996)。これらは、ポリペプチド鎖がβシートに構成されている、クロスβ構造(PaulingおよびCorey、1951)に特有である。アミロイドタンパク質は大きく異なった前駆体構造を有するが、これらは全て、おそらくは同様の経路に沿って、β－シートヘリックスプロトフィラメントの基礎単位である、誤って折りたたまれた形状への構造転換を受けることができる。

【０００５】

アミロイドーシスに導く、この特有の繊維形状はβ－フィブリロース(β-fibrilloses) (Glenner、1980a、b)と呼ばれ、ADのフィブリルタンパク質は、その二次構造が知られる以前に、β－タンパク質と名付けられた(GlennerおよびWong、1984)。特徴的なクロス－β回折パターンは、フィブリルの外観および着色特性とともに、現在では、アミロイドの診断上の顕著な特徴として受け入れられており、非常に異なるタンパク質前駆体から形成されるが、フィブリルが構造上類似の程度を共有し、それらの前駆体タンパク質の性質に関わらず構造上のスーパーファミリーを構成することを示唆する(Sunde M、Serpell LC、Bartlam M、Fraser PE、Pepys MB、Blake CCFJ Mol Biol 1997 Oct 31；273(3)：729～739)。

【０００６】

中枢神経系におけるアミロイド沈着が、疾患の進行において中心的役割を有することを示唆する、最も広くいきわたった、よく知られた疾患の一つは、ADである。

【０００７】

AD

アルツハイマー病(AD)は、回復不能の進行性の脳障害で、徐々に発生し、記憶喪失、行動性および人格の変化、ならびに精神的能力の減退に帰着する。これらの喪失は、脳細胞の死およびこれらの間の接続の崩壊に関する。この疾患の経過は個人によって変動し、減退の速度も同様である。AD患者は平均で、診断後8～10年間生存するが、疾患は20年まで続くことができる。

【０００８】

ADは、初期の、軽度の健忘性から精神的機能の重度の喪失まで、段階的に進行する。この喪失は痴呆として知られる。ADの人のほとんどにおいて、症状は60の年齢後にまず現れるが、より早期の発症は珍しくない。最も早期の症状はしばしば、記銘力の喪失、判断の誤り、および人格の変化を含む。しばしば、ADの初期段階の人々は、考えることがはっきりしなくなり、親しい人々や一般の物体の名前を忘れる。疾患の後期では、単純な作業であってもどのように行うかを忘れる。ついに、ADの人々は、全ての推理能力を喪失し、彼らの日々の世話について他の人々に依存するようになる。結局、疾患は、患者を寝たきりにし、他の疾患および感染が進行しがちになるほど衰弱させる。最も一般的には、ADの人々は肺炎で死亡する。

【０００９】

ADが発生する危険性は年齢とともに増加するが、ADおよび痴呆の症状は、通常の老化の部分ではない。ADおよび他の痴呆性の障害は、脳に影響する疾患に原因がある。通常の老化

では、脳の神経細胞が大量に喪失することはない。これに対して、ADは3つの鍵となる過程を破壊する：神経細胞伝達、代謝および修復である。この破壊は、結局、多くの神経細胞が機能を停止し、他の神経細胞との接続を喪失し、死ぬことの原因となる。

【００１０】

まず、ADは、記憶を制御する脳の部分、特に海馬および関係する構造にあるニューロンを破壊する。海馬にある神経細胞が正確に機能しなくなると、短期間の記憶が衰弱し、しばしば、簡単で熟知した作業を行う個人の能力が減退し始める。ADは、大脳皮質、特に言語および推理をつかさどる領域をも攻撃する。ついに、脳の多くのほかの領域が含まれ、これらの全ての脳の領域が萎縮（収縮）し、AD患者は、寝たきりで、失禁性で、完全に無力になり、外界に対して応答しなくなる(出典：National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease、1999)。

【００１１】

ADの影響

ADは、65歳以上の人々の間で最も一般的な痴呆の原因である。これは、個人、家族、健康管理システムおよび全体としての社会に対するその莫大な影響から、主要な健康問題を提示する。科学者は、400万人以下の人々がこの疾患に苦しみ、65歳を超えると5歳ごとに有病率は倍になると見積もっている。毎年、約36万の新しい症例（発病）が発生するとも見積もられ、この数字は集団の年齢に伴い増加する(Brookmeyerら、1998)。

【００１２】

ADは、社会に重大な経済的負荷を課す。最近の米国での研究は、一人のAD患者を介護する年間の費用が軽度のAD患者で18,408ドル、中程度のAD患者で30,096ドル、そして重度のAD患者で36,132ドルであると見積もっている。米国におけるAD患者の介護の年間の国の費用は、500億ドルをわずかに上回ると見積もられている(Leonら、1998)。

【００１３】

およそ400万人の米国人は85歳以上であり、最も産業化された国では、この年齢の群は、人口のうちで最も速く成長している部分の一つである。米国では、この群は2030年までに850万に近い数になると見積もられている；この数はさらに多くなり得るとさえ示唆する、人口の動向を研究する専門家もいる。より多くの人々がより長く生きるようになると、ADを含む老化の疾患に冒される人数は増加し続ける。例えば、85歳以上の全ての人の半分近くが痴呆の何らかの形態を有することを示す研究もある(National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease、1999)。

【００１４】

ADの主な特徴

脳における2つの異常な構造がADの顕著な特徴である：アミロイドプラークと神経原線維もつれ(NFT)である。プラークは、脳のニューロンの外側および周囲のタンパク質ならびに細胞性物質の、濃密でほとんど不溶性の沈着である。もつれは、ニューロンの内側に形成された不溶性のねじれた線維である。2種類のADが存在する：ある遺伝のパターンに従う家族性AD (FAD)と、遺伝の明らかなパターンが見られない孤発性ADである。発症の年齢が異なるので、ADはさらに、早期発症（65歳より若い人に発生する）または晩期発症（65歳以上の人に発生する）と表される。早期発症ADは珍しく（症例の約10%）、一般に30～60歳の人に影響する。早期発症ADのある形態は遺伝性で、家族に遺伝する。早期発症ADは、しばしば、より一般的な晩期発症ADよりも早く進行する。

【００１５】

現在までに知られている全てのFADは早期に発症し、FADの症例の50%までもが3つの異なる染色体上に位置する3つの遺伝子の欠損により引き起こされることが、現在知られている。これらは、第21染色体上のAPP遺伝子の変異；第14染色体上のプレセニリン1と呼ばれる遺伝子の変異；および第1染色体上のプレセニリン2と呼ばれる遺伝子の変異である。しかしながら、これらの変異のいずれかが、より一般的な、孤発性または非家族性の形態の晩期発症ADにおいて主な役割を果たしていることの証明はまだない(National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease、1999)。

【００１６】
アミロイドプラーク
ADでは、アミロイドプラークは、まず記憶および他の認識の機能に用いられる領域において発生する。これは、ニューロンの部分と小神経膠細胞および星状神経膠細胞のような非神経細胞とともに混ざり合った、βアミロイド（以下、Aβと表す）－アミロイド前駆体タンパク質（APP、このアミノ酸配列をSEQ ID NO: 2に示す）と呼ばれるより大きいタンパク質のタンパク質断片－の、ほとんど不溶性の沈着からなる。アミロイドプラーク自体がADの主な原因を構成するのか、またはそれらがADの過程での副産物であるのかは知られていない。確かに、APP遺伝子の変異により引き起こされたADの遺伝性の形態において示されたように、APPタンパク質における変化はADの原因となり、Aβプラーク形成は、ヒトの疾患の進行に緊密に関連しているようである(Lippa C. F.ら、1998)。
【００１７】
APP
APPは、細胞膜に結合している多くのタンパク質の一つである。それが作られた後、APPは、神経細胞の膜に埋め込まれるようになり、部分的に細胞の内部にあり、部分的に外部にある。トランスジェニックマウスを用いた最近の研究は、APPがニューロンの成長および生存において重要な役割を果たしていると考えられることを示す。例えば、APPのある形態および量は、短期および長期の両方の損傷に対してニューロンを保護し、自己修復できるように、損傷を受けたニューロンを改善し、脳損傷後にニューロンの部分が成長するのを助けるであろう。
【００１８】
APPは細胞膜に埋め込まれているが、プロテアーゼがAPPの特定の位置に作用し、タンパク質断片に切断する。あるプロテアーゼはAPPを切断してAβを形成するのを助け、他のプロテアーゼはアミロイド断片の中間でAPPを切断するので、Aβは形成されない。形成されたAβは2つの異なる長さであり、比較的溶解性でゆっくりと凝集する、より短い40（または41）アミノ酸のAβと、迅速に不溶性の凝集塊を形成する、わずかに長い42アミノ酸の「粘着性の」Aβである。Aβが形成される間、これが神経細胞の中または周辺をどのように動いているのかは、はっきり知られていない。この過程の最後の段階において、「粘着性の」Aβは、細胞外で長いフィラメントに凝集し、すでに死んだかまたは死んでいくニューロンの断片、ならびに小神経膠細胞および星状神経膠細胞とともに、脳組織においてADの特徴であるプラークを形成する。
【００１９】
APPにおける変異が、APP前駆体からAβを切り取るようであり、したがって全Aβがより多くなるか、または「粘着性の」形態が比較的多く形成されることを引き起こすとの証拠がいくつか存在する。プレセニリン遺伝子における変異が、少なくとも2つの方法：Aβの産生を変更すること、またはより直接的に細胞死を引き起こすこと、においてニューロンの分解に寄与しているとも考えられる。他の研究者は、変異したプレセニリン1および2は、アポトーシスの速度を促進するのに関与することを示唆する。
【００２０】
疾患が進行するにつれて、より多くのプラークが形成され、脳のより多くを占めることが予想される。研究により、Aβは、動的平衡のように、同時に集合し、ばらばらになっているであろうことが示唆される。これは、プラークが形成された後でもそれを分解することが可能であるかもしれないとの希望を高める。(National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease、1999)。
【００２１】
Aβは、ニューロンに毒性であると考えられている。組織培養研究において、研究者は、正常なヒトAPPを過剰発現するニューロンに比較して、変異した形態のヒトAPPを過剰発現するようにした海馬ニューロン細胞の死が増加したことを観察した(Luoら、1999)。
さらに、Aβタンパク質の過剰発現または修飾された形態の発現は、動物モデルにおいて、アルツハイマー様の症状を誘発することが示されている(Hsiao K.ら、1998)。

【００２２】
増加したAβの発生、プラークへのその集合、および結果としての神経毒性がADに導くとすれば、プラークへのAβの集合が遅くなるか、ブロックされる条件を調査することは、治療上の興味の対象である。
【００２３】
プレセニリン
プレセニリン-1 (S-180)における変異は、早期発症家族性AD (FAD)の全ての症例の約50%に達する。ADを起こす約30の変異が同定されている。ADの発症は、変異によって変動する。プレセニリン-2における変異は、FADの症例のより少ない部分を占めるが、重要な因子である。プレセニリンが、孤発性の非家族性ADに関与するかは知られていない。プレセニリンの機能は知られていないが、Aβ-42（ペプチド、SEQ ID NO: 2の残基673～714のより長い、より粘着性の形態）を与えるAPPのプロセシングに関与していると考えられる。なぜなら、プレセニリン変異があるAD患者はこのペプチドのレベルが増加したからである。プレセニリンがNFTの発生を引き起こす役割をも有するかは、不明である。プレセニリンは、ニューロンの分解およびニューロンの死に、より直接的な役割を有するかもしれないことを示唆する者もいる。プレセニリン-1は第14染色体に位置し、プレセニリン-2は第1染色体に結合している。もし、これらの遺伝子のたった1つの変異バージョンを有していると、その人が早期発症ADを発生することはほぼ確実である。
【００２４】
プレセニリン-1が、APPのプロセシングに関与する、仮説のγ-セクレターゼと同一であるかについては、不明な点がある(Naruseら、1998)。
【００２５】
アポリポタンパク質E
アポリポタンパク質Eは、通常、コレステロールと結合するが、ADの脳のプラークやもつれにおいても見出される。対立遺伝子1～3はADに関与していないようであるが、APOE-ε4対立遺伝子の存在と晩期ADの発生との間には、重要な相関関係がある(Strittmatterら、1993)。しかしながら、これは危険因子であって、プレセニリンおよびAPP変異の場合のような直接の原因ではなく、これは家族性ADに限定されない。
【００２６】
ApoEε4タンパク質がADの発生の可能性を増加させる方法は、明確には知られていないが、可能性のある理論としては、それがAβの形成を促進してADの発症の年齢を引き下げることに寄与するか、または特定のAPOE対立遺伝子の存在もしくは非存在が、ニューロンが損傷に応答する方法に影響することである(Buttiniら、1999)。
【００２７】
Apo A1も、アミロイド産生性である(amyloigenic)ことが示されている。無損傷apo A1自体は、コンゴーレッド陽性であるアミロイド様フィブリルをインビトロで形成することができる(Am J Pathol 147 (2)：238～244 (Aug 1995)、Wisniewski T、Golabek AA、Kida E、Wisniewski KE、Frangione B)。
他の対立遺伝子に比べて、知力喪失の症状の減少におけるAPOE-ε4対立遺伝子の肯定的な効果があることを示唆する、矛盾した結果がいくつかあるようである(Stern, Brandt、1997、Annals of Neurology 41)。
【００２８】
神経原線維もつれ
ADの2つ目の顕著な特徴は、神経細胞の内部で見出されるねじれた糸の異常な集積からなる。もつれの主要な成分は、タウ（τ）と呼ばれるタンパク質の一つの形態である。中枢神経系においては、タウタンパク質は、細胞の内部支持構造の構成成分の一つである微小管または骨格に結合し、安定化するのを助ける能力について最もよく知られている。しかしながら、ADにおいては、タウは化学的変化を受け、この変化したタウはもはや微小管を安定化することができず、微小管を崩壊させる原因となる。この輸送系の崩壊は、まず神経細胞間の伝達の機能不全となり、後にニューロンの死を導くであろう。

【００２９】
ADにおいては、化学的変化を受けたタウは、2本の糸のタウが互いの周りに巻きついた、二重らせんフィラメントによじれる。これらのフィラメントは神経原線維もつれにおいて見出される主要な物質である。最近のある研究では、研究者は、健康な脳の海馬の特定の部分のニューロンの6%未満、軽度のADで死亡した人のこれらのニューロンの43%より多く、および重度のADで死亡した人のこれらのニューロンの71%において、神経原線維変化を見出した。ニューロンの喪失が研究されたとき、同様の進行が見られた。このタイプの証拠は、もつれの形成およびニューロンの喪失は、ADの過程においてともに進行するとの考えを支持する(National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease、1999)。

【００３０】
タウオパシー(tauopathies)およびもつれ

AD以外のいくつかの神経変性疾患は、ニューロンおよび神経膠においてタウが凝集して不溶性のフィラメントになり、機能不全ならびに死に導くことが特徴である。非常に最近、AD以外の遺伝性痴呆の多様性がある家族を研究していた研究者のいくつかのグループが、第17染色体上のタウ遺伝子における最初の変異を発見した(Clarkら、1998；Huttonら、1998；Poorkajら、1998；Spillantiniら、1998)。これらの家族では、タウ遺伝子における変異が、ニューロン細胞死および痴呆を引き起こす。ADとある特徴を共有しているがいくつかの重要な点において異なるこれらの障害は、まとめて「第17染色体に関連する前頭側頭型痴呆およびパーキンソニズム(fronto temporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17)」(FTDP-17)と呼ばれる。これらは、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)のある形態、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺およびピック病などの疾患であり、全てがタウタンパク質の異常な凝集を特徴とする。

【００３１】
他のAD様神経病

ADと、プリオン病（クールー、クロイツフェルトーヤコブ病およびウシの海綿状脳炎など）、パーキンソン病、ハンチントン病ならびに前頭側頭型痴呆を含む他の神経病との間には、重要な類似がある。全てが脳における異常タンパク質の沈着を含む。ADおよびプリオン病は、痴呆と死を引き起こし、両者は不溶性のアミロイドフィブリルの形成に関連するが、膜タンパク質からは互いに異なる。

【００３２】
ADに次ぐ第二の最も一般的な神経変性障害であるパーキンソン病を研究する科学者らは、疾患に関係する最初の遺伝子を発見した。この遺伝子は、AD患者の脳のアミロイドプラークにおいても興味深く見出される、シヌクレインと呼ばれるタンパク質をコードする(Lavedan C、1998、Genome Res. 8(9): 871 80)。研究者らは、痴呆の原因となる別の進行性神経変性障害であるハンチントン病における遺伝子欠損が、ハンチントンタンパク質がADのAβフィブリルおよびプリオン病のタンパク質フィブリルに非常によく似た不溶性のフィブリルを形成することの原因となることをも見出した(Scherzinger Eら、1999、PNAS U.S.A. 96(8)：4604～9)。

【００３３】
科学者らは、変異した場合に、ADにおいてみられるのに類似した深刻な行動障害および進行性痴呆を引き起こす珍しい遺伝性の疾患である、家族性ブリティッシュ痴呆(familial British dementia (FBD))の原因となる、新規な遺伝子をも発見している。FBDプラークにおいて見出されるアミロイドフィブリルの生化学的分析では、ABriと名付けられた特有のペプチドが見出された(Vidalら、1999)。この遺伝子における特定の点での変異は、通常より長いBriタンパク質の産生に帰着する。Briタンパク質の変異末端から切り取ったABiペプチドは、アミロイドフィブリルとして沈着する。これらのプラークは、FBDを特徴付けるニューロンの機能不全および痴呆に導くと考えられている。

【００３４】
Aβでの免疫化

免疫系は、生物中の外来タンパク質およびタンパク様の粒子の除去に、通常、貢献するが、上記の疾患に関連する沈着は主に自己タンパク質からなり、したがってこれらの疾患の制御において免疫系に役割を与えることは、あまり明白ではない。さらに、沈着は、通常、免疫系から分離された区画(CNS)に位置し、これら両方の事実はワクチンまたは免疫療法的アプローチは成功しないであろうことを示唆する。

【００３５】

にもかかわらず、科学者らは最近、異種のヒトAβと免疫系を刺激することが知られている物質とからなるワクチンでマウスを免疫化することを試みている(Schenkら、1999およびWO 99/27944)。このワクチンは、マウスのDNAにヒトAPPの変異遺伝子を挿入した、ADの部分トランスジェニックマウスモデルにおいて試験された。マウスは修飾されたAPPタンパク質を産生し、成長するにつれてアミロイドプラークを発生した。このマウスモデルは修飾されたトランスジェニックヒトAPPに対するワクチンがプラーク形成に影響を有するかを試験するのに用いられた。最初の実験では、トランスジェニックマウスの1つの群は、6週齢から始まり11ヶ月で終わる毎月のワクチン注射を受けた。トランスジェニックマウスの第2の群は、注射を受けずコントロール群となった。13ヶ月齢までに、コントロール群のマウスはその脳の2～6%を覆うプラークを有した。これに比べて、免疫されたマウスは実質的にプラークがなかった。

【００３６】

第2の実験では、研究者らは、いくらかのプラークがすでに発生している11ヶ月で注射を始めた。7ヶ月の期間の間に、コントロールのトランスジェニックマウスはその脳の中でプラークの量が17倍に増加したが、ワクチンを受けたものは、18ヶ月齢のコントロールトランスジェニックマウスに比べて99%の減少であった。あるマウスでは、予め存在していたプラーク沈着のいくらかが、処置により除去されたようであった。また、免疫化の結果として、炎症や異常な神経細胞のプロセスのようなプラークに関連する他の損傷が減少したことも見出された。

【００３７】

上記のことは、したがってマウスにおける予備的研究であり、研究者らは、例えばワクチン化されたマウスがほかの点においても健康を維持するのか、これらのワクチン化されたものの記憶は正常に保たれるのかを見出す必要がある。さらに、マウスモデルはADの完全な代表ではない（動物は神経原線維もつれを発生せず、そのニューロンが大量に死ぬことがない）ので、ヒトがマウスと類似または異なる反応を示すかを決定するのに、付加的な研究が必要である。考慮が必要な他の問題としては、この方法がアミロイド沈着を「治療」するであろうが、痴呆の発達を止めることができないことである。

【００３８】

技術的な論点は、主要な難題をも表す。例えば、この技術を用いてヒトがその自己のタンパク質に対する抗体を産生することを可能にするワクチンを作成することは、可能ではないようである。ヒトにおけるいずれの試験をも考慮することができる前に、安全性および効率について非常に多くの問題を解決しなければならない。

【００３９】

Schenkらによる研究は、よって、ADにおいて形成されたプラークのような中枢神経系でのタンパク様の沈着中の自己タンパク質に対する強い免疫応答を発生させることが可能であれば、沈着の形成を防止し、すでに形成されたプラークをおそらく除去することの両方が可能であることを示す。

【００４０】

最近、上記で論じたAβワクチンを用いた臨床試験が、副作用により停止された：ワクチン化された多くの患者が、CNSにおいて、Aβに対する制御されない自己免疫によると考えられる慢性脳炎を発生した。

【００４１】

発明の目的

本発明の目的は、ADのようなアミロイドの沈着を特徴とする症状に対する新規の治療を提

供することである。更なる目的は、ADおよびアミロイド沈着を含む他の病理学的障害への新規の治療を得るために、アミロイドに対する自家ワクチンを開発することである。

【００４２】

発明の要旨

非免疫原性APPおよびAβに対する強い免疫応答を発生させるための自家ワクチン療法技術の使用が、本明細書に記載される。また、アミロイド沈着に関連するこのような疾患の症状の予防、可能な治療または緩和のためのこのようなワクチンの製造も記載される。

【００４３】

したがって、本発明の最も広く最も全般的な観点において、本発明は、アナログが

a)　SEQ ID NO: 2の残基672～714のサブシークエンスの少なくとも1つのコピーからなるポリアミノ酸であり、外来Tヘルパーエピトープ(T_Hエピトープ)が、アミノ酸の付加および／または挿入および／または欠失および／または置換により組み込まれ、該サブシークエンスが、SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基673～714からなるアミノ酸配列の残基1～42、残基1～40、残基1～39、残基1～35、残基1～34、残基1～28、残基1～12、残基1～5、残基13～28、残基13～35、残基17～28、残基25～35、残基35～40、残基36～42および残基35～42からなる群より選択されるか；および／または

b)　外来T_Hエピトープおよび破壊されたアミロイド前駆体タンパク質(APP)またはβアミロイド(Aβ)配列を含むポリアミノ酸であることにより、該アナログが、T細胞応答を開始するMHCクラスII分子に生産的に結合する、SEQ ID NO: 2のいずれの配列をも含まないか；および／または

c)　外来T_HエピトープおよびAPPまたはAβ由来アミノ酸を含み、該アナログのC末端に位置する1つの単独メチオニン残基を含むポリアミノ酸であり、APPまたはAβおよび外来T_Hエピトープの中の他のメチオニン残基が置換されているかもしくは欠失されており、好ましくはロイシンもしくはイソロイシンにより置換されているか；および／または

d)　a)で定義したポリアミノ酸および／またはb)で定義したポリアミノ酸および／またはc)で定義したポリアミノ酸が別個に結合しているポリヒドロキシポリマー骨格を含むコンジュゲートであるか；および／または

e)　1)外来T_Hエピトープならびに2) a)で定義したサブシークエンス、b)で定義した破壊されたAPPもしくはAβ配列、およびC末端に位置する単一のメチオニン残基を含み、APPまたはAβおよび外来T_Hエピトープの中の他のメチオニン残基が置換されているかもしくは欠失されており、好ましくはロイシンもしくはイソロイシンにより置換されているAPPまたはAβ由来アミノ酸配列からなる群より選択されるポリアミノ酸が別個に結合しているポリヒドロキシポリマー骨格を含むコンジュゲートである、

アナログによる動物の免疫化が、動物の自己のAPPまたはAβに対する抗体産生を誘導するように、APPおよび／またはAβの少なくとも1つのB細胞エピトープと少なくとも1つの外来T_Hエピトープとを同じ分子に組み込む、APPまたはAβの少なくとも1つのアナログの免疫原的有効量を動物の免疫系に提示することを含む、ヒトを含む動物におけるAPPまたはAβのインビボダウンレギュレーション方法に関する。

【００４４】

本譲渡人は、以前、APPおよびAβのようなアミロイド産生ポリペプチド(amyloidogenic polypeptide)に対する安全なワクチン化方法に関する国際特許出願をファイルしており、WO 01/62284参照。この出願は、本出願の出願日に公開されておらず、さらに、上記のAPPおよびAβの有用なアナログに関する詳細を含まない。

【００４５】

本発明は、APPおよびAβのアナログとともに、これらの部分集合をエンコードする核酸断片にも関する。アナログまたは核酸断片を含む免疫原性組成物も、本発明の部分である。

【００４６】

図の凡例

図1：Aβタンパク質Aβ-43 (またはC-100)に対する抗体応答を発生させることを目的とした、アミロイド前駆体タンパク質に由来する自家ワクチン(Autovac)変異体の概略図。APP

を図の一番上に図示し、残りの概略の構築物は、モデルエピトープP2およびP30が置換されるか、または種々のトランケーション(truncation)中に挿入されることを示す。図において、黒の縞模様はAPPシグナル配列を示し、二方向の斜交線模様はAPPの細胞外部分を示し、濃い鉛直の平行線はAPPの膜貫通ドメインを示し、明るい鉛直の平行線はAPPの細胞内ドメインを示し、粗い斜交線模様はP30エピトープを示し、細かい斜交線模様はP2エピトープを表す。実線の箱はAβ-42/43を示し、実線の箱および点線の箱は一緒にC-100を示す。「Abeta」はAβを意味する。

【００４７】

図2：一般的に適用可能な免疫原性コンジュゲートの合成の実施形態の概略図。ペプチドA（あらゆる抗原性の配列、例えば本明細書に記載のAβ配列）およびペプチドB(外来Tヘルパーエピトープを含むアミノ酸配列)を合成して混合する。その後、これらを適切な活性ポリヒドロキシポリマーと接触させて、ペプチドAおよびBを、ペプチド混合物中のこれら2つの物質の間の最初の比に相当する定量で、活性化基を介して結合する。詳細は実施例4を参照。

【００４８】

詳細な発明の開示

<u>定義</u>

以下において、本明細書および請求項において用いるいくつかの語について、本発明の境界を明確にするために、定義して詳細に説明する。

【００４９】

本明細書において交換可能に用いられる「アミロイド」および「アミロイドタンパク質」の語は、長さが不確定の、分岐していないタンパク様フィブリルのクラスを意味する。アミロイドフィブリルは、コンゴーレッドで特徴的な染色を示し、ポリペプチド鎖がβシートに組織されているクロスβ構造を共有する。アミロイドは、非常に異なる前駆体構造を有するが、全てが、βシートヘリックスプロトフィラメントの基礎単位である、間違って折りたたまれた形態に構造変化を受けることができる、アミロイド産生タンパク質に通常由来する。通常、アミロイドフィブリルの径は、約70～約120Åの間で変動する。

【００５０】

「アミロイド産生タンパク質」の語は、そのまま沈着の部分となること、または沈着の形成を導く生合成経路の部分となることのいずれかにより、アミロイド沈着の形成に関与するポリペプチドを意味することを意図する。よって、アミロイド産生タンパク質の例はAPPおよびAβであるが、これらの代謝に含まれるタンパク質もアミロイド産生タンパク質である。

【００５１】

本明細書において「アミロイドポリペプチド」は、ヒトまたはその他の哺乳動物に由来する、上記のアミロイド産生タンパク質（または無傷のアミロイド産生タンパク質と実質的な量のB細胞エピトープを共有する、これらのトランケート(truncate)）のアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味することを意図する－よって、アミロイド産生ポリペプチドは、例えばアミロイド産生ポリペプチドの前駆体の実質的な部分を含むことができる（Aβの場合、一つの可能なアミロイドポリペプチドはAPP由来である）。例えば酵母または他の非哺乳類の真核発現系の使用により、種々のグリコシル化パターンを有する形態とともに、原核生物系において製造されたアミロイド産生ポリペプチドの非グリコシル化形態もこの語の境界内である。しかしながら、「アミロイド産生ポリペプチド」の語を用いる場合、問題のポリペプチドは、治療される動物に提示されるときに、通常、非免疫原性であることを意図することが記載される。言い換えると、アミロイド産生ポリペプチドは、自己タンパク質であるか、または問題の動物のアミロイド産生性に対して免疫応答を通常起こさないこのような自己タンパク質のアナログである。

【００５２】

「アナログ」は、その分子構造の中に1つまたはいくつかの変化を組み込んだAPPまたはAβ由来の分子である。このような変化は、例えばAPPまたはAβポリアミノ酸の適切な融合

パートナーとの融合の形態(すなわちCおよび／またはN末端へのアミノ酸残基の付加を排他的に含む一次構造の変化)にあるか、および／またはポリペプチドのアミノ酸配列における挿入および／または欠失および／または置換であることが可能である。この語により、派生APPまたはAβ由来分子も含まれ、APPまたはAβの修飾についての以下の議論を参照。アナログは、アミロイドの通常の前駆体タンパク質に対する抗体を誘導することがほとんど、またはまったくできないように構築されたものである場合があり、それによりアミロイドタンパク質の前駆体であるポリペプチドの（生理学的に正常な）非凝集形態との望まれない干渉を回避する。

【００５３】

ヒトAPPまたはAβの外来アナログ(例えばイヌまたはブタアナログ)の、ヒトにおけるワクチンとしての使用が、APPまたはAβに対して所望の免疫性を産生することが推測できることが記載される。免疫化のためのこのような外来アナログの使用も、本発明の部分であると考えられる。

【００５４】

「ポリペプチド」の語は、本明細書で、2～10アミノ酸残基の短いペプチド、11～100アミノ酸残基のオリゴペプチド、100を超えるアミノ酸残基のポリペプチドを共に意味することを意図する。さらに、この語はタンパク質、すなわち少なくとも1つのポリペプチドを含む機能性生体分子を含むことをも意図する；少なくとも2つのポリペプチドを含む場合、これらは複合体を形成するか、共有結合するか、または非共有結合することができる。タンパク質中のポリペプチドは、グリコシル化されるか、および／または脂質化されるか(lipidated)、および／または補欠分子団を含むことができる。「ポリアミノ酸」の語は、「ポリペプチド」の語と同等である。

【００５５】

「Tリンパ球」および「T細胞」の語を、各種の細胞媒介免疫応答とともにヒトの免疫応答においてヘルパー活性の原因である、胸腺起源のリンパ球に対して同義的に用いるつもりである。同様に、「Bリンパ球」および「B細胞」の語を、抗体産生リンパ球に対して同義的に用いるつもりである。

【００５６】

「サブシークエンス」の語は、天然に存在するアミロイドのアミノ酸配列または核酸配列からそれぞれ直接由来した、少なくとも3つのアミノ酸、または適切な場合には、少なくとも3つのヌクレオチドのあらゆる連続的な範囲を意味する。

【００５７】

「動物」の語は、本明細書において一般に、ホモ・サピエンス(Homo sapiens)、カニス・ドメスティカス(Canis domesticus)などのような動物種(好ましくは哺乳動物) で、単一の動物だけではないことを意味することを意図する。しかしながら、本発明の方法により免疫化された個体が全て、同じ免疫原で動物を免疫化することを許容する、実質的に同じAPPまたはAβを有することが重要であるので、この語はこのような動物種の個体群をも意味する。本明細書における動物が免疫系を有する生物であることは、当業者には明白であろう。該動物は、哺乳動物のような脊椎動物が好ましい。

【００５８】

本明細書中の「APPまたはAβのインビボダウンレギュレーション」の語により、関連するタイプの沈着したアミロイドタンパク質（またはアミロイドそのもの）の生物における全量の減少を意味する。ダウンレギュレーションは、いくつかの機構により得ることができる：それらのうち、間違った凝集を防ぐための、抗体結合によるアミロイドでの単純な干渉が最も単純である。しかしながら、清掃細胞（マクロファージや他の食細胞など）によるアミロイドの除去となる抗体の結合、およびアミロイド形成に導く他のアミロイド産生ポリペプチドに干渉する抗体も、本発明の範囲内である。更なる可能性としては、抗体がCNSの外部でAβに結合し、それにより、単純な質量作用原理により効果的にAβをCNSから除去することである。

【００５９】

「免疫系に・・・提示する」の表現は、動物の免疫系が、制御された方法で免疫原性攻撃に供されることを意味することを意図する。以下の開示から明らかなように、このような免疫系の攻撃は、多くの方法によりもたらすことができ、それらのうちで最も重要なものは、「ファーマクシン(pharmaccine)」（すなわち進行中の疾患を治療または改善するのに投与されるワクチン）を含むポリペプチドによるワクチン化、または核酸「ファーマクシン」ワクチン化である。達成する重要な結果は、動物における免疫適格細胞が免疫原的に効果的な方法で、抗原と対峙することであって、この結果を達成する精密なモードは、本発明の根底にある発明の概念にはほとんど重要ではない。

【００６０】

「免疫原的有効量」の語は、当該技術における通常の意味を有し、すなわち免疫原と免疫学的な特徴を共有する病原性の剤に著しく関与する免疫応答を誘導し得る免疫原の量である。

【００６１】

本明細書において、APPまたはAβが「修飾された」との表現を用いる場合、APPまたはAβについてポリペプチドの化学的修飾が行われたことを意味する。このような修飾は、例えば配列中のあるアミノ酸残基の派生（例えばアルキル化）を含み得るが、以下の開示から認識されるように、好ましい修飾はアミノ酸配列の一次構造の変化を含む。

【００６２】

「APPまたはAβに対する自己寛容」を論じる場合、ポリペプチドはワクチン化される個体群で自己タンパク質であるので、個体群における正常な個体はポリペプチドに対して免疫応答しないことが理解される；しかし、動物個体群で、まばらに存在する個体が、例えば自己免疫異常の部分として、天然のポリペプチドに対して抗体を産生できるかもしれないことは除外することはできない。いずれの割合においても、動物は、通常、そのAPPまたはAβに対してのみ自己寛容であるだろうが、他の動物種または異なる表現型を有する個体群に由来するアナログも該動物により寛容化されることを除外することはできない。

【００６３】

「外来T細胞エピトープ」（または「外来Tリンパ球エピトープ」）は、MHC分子に結合でき、動物種においてT細胞を刺激するペプチドである。本発明において好ましい外来T細胞エピトープは、「乱交雑(promiscuous)」エピトープ、すなわち、動物種または個体群において、特定のクラスのMHC分子の実質的なフラクションと結合するエピトープである。ごく限られた数のこのような乱交雑T細胞エピトープのみが知られており、それらを以下に詳述する。乱交雑T細胞エピトープは、「ユニバーサル」T細胞エピトープとも表される。本発明に従って使用される免疫原を、できるだけ大きな動物個体群のフラクションで有効にするため、1) 同じアナログにいくつかの外来T細胞エピトープを挿入するか、または2) 各アナログが挿入された異なる乱交雑エピトープを有する、いくつかのアナログを作ることが必要であろうことが記載される。また、外来T細胞エピトープの観念は、潜在性T細胞エピトープ、すなわち自己タンパク質に由来し、かつ該自己タンパク質の部分ではない単離の形態で存在する場合に、免疫原性の挙動を奏するのみであるエピトープの使用を包含することが記載される。

【００６４】

「外来Tヘルパーリンパ球エピトープ」（外来T_Hエピトープ）は、MHCクラスII分子を結合し、MHCクラスII分子に結合した抗原提示細胞（APC）の表面に存在することができる外来T細胞エピトープである。

【００６５】

（生体）分子の“機能性部分”は、本明細書において、分子によって奏される少なくとも1つの生化学的または生理学的な効果の原因となる分子の部分を意味することを意図する。多くの酵素および他のエフェクター分子が、該分子によって奏される効果の原因となる活性部位を有することは、当該技術で周知である。分子の他の部分は、安定化または溶解性を増強する目的に役立つであろう、従って、この目的が、本発明のある実施形態に関して適切でないならば除外することができる。例えば、APPまたはAβにおける修飾成分とし

て、あるサイトカインを用いることが可能であり（以下の詳細な議論を参照）、そのような場合、APPまたはAβへの結合は必要な安定性を提供すると考えられるので、安定性の問題は関係がない。

【００６６】

「アジュバント」の語は、ワクチン技術の分野での一般的な意味を有し、すなわち、1)ワクチンの免疫原に対する特異的な免疫応答をそれ自体で有することができないが、2) にもかかわらず、免疫原に対する免疫応答を増強できる物質または物質の組成物である。または、言い換えると、アジュバントのみでのワクチン化は、免疫原に対する免疫応答を提供せず、免疫原でのワクチン化は免疫原に対する免疫応答を発生させるか、または発生させないが、免疫原とアジュバントとを組合わせたワクチン化は、免疫原単独で誘導されるより強い、免疫原に対する免疫応答を誘導する。

【００６７】

分子の「標的化」は、本明細書において、動物に導入される分子が、特定の組織で優先的に現れるか、または特定の細胞もしくは細胞のタイプと優先的に会合する状況を示すことを意図する。その効果は、標的化を促進する組成物中への分子の処方、または標的化を促進する分子の群に導入することを含む多くの方法で達成することができる。これらの問題を以下に詳細に述べる。

【００６８】

「免疫系の刺激」は、ある物質または物質の組成物が、一般の非特異的な免疫刺激効果を発揮することを意味する。いくつかのアジュバントと推定上のアジュバント（例えばあるサイトカイン）は、免疫系を刺激する能力を共有する。免疫刺激剤を用いる成果は、免疫原での同時または続いて起こる免疫化が、免疫原の分離された使用と比較して有意でより効果的な免疫応答を誘導することを意味する免疫系の増加された「機敏さ（alertness）」である。

【００６９】

「生産的な結合」は、MHC分子に結合したペプチドを提示する細胞にたずさわるT細胞を刺激することができるように、ペプチドがMHC分子(クラスIまたはII)へ結合することを意味する。例えば、APC表面においてMHCクラスII分子に結合したペプチドは、このAPCが、提示されたペプチド－MHCクラスII複合体に結合するT_H細胞を刺激する場合に、生産的に結合するという。

【００７０】

アミロイドダウンレギュレーションの好ましい実施形態

本発明の方法において免疫原として用いられるアナログは、APPまたはAβのアミノ酸配列中に少なくとも1つの変化が存在する、修飾されたAPPまたはAβ分子が好ましい。なぜなら、自己寛容の全て重要な破壊は、この方法で大きく促進されるからである－これは、例えば、野生型Aβによる免疫化をAβ変異型分子による免疫化と比較した本明細書の実施例2に示す結果から明らかである。自己タンパク質を認識する潜在的な自己反応性Bリンパ球が正常な個体に生理学的に存在することは、示されている(Dalum Iら、1996、J. Immunol. 157：4796～4804)。しかしながら、これらのBリンパ球が適切な自己タンパク質に反応し得る抗体を実際に産生するように誘導されるためには、サイトカイン産生Tヘルパーリンパ球(T_H細胞またはT_Hリンパ球)の補助が必要である。抗原提示細胞(APC)により提示された場合に、Tリンパ球は、自己タンパク質に由来するT細胞エピトープを一般的に認識しないので、この補助は、通常、提供されない。しかしながら、自己タンパク質中に「外来性」の要素を与えることによって(すなわち免疫学的に重要な修飾を導入することにより)、外来要素を認識するT細胞が、APC上の外来エピトープ(最初は単核細胞のようなもの)を認識することより活性化される。

【００７１】

修飾された自己タンパク質上の自己エピトープを認識し得るポリクローナルBリンパ球（APCでもある）も、抗原を取り込み、その後、その外来T細胞エピトープを提示し、活性化されたTリンパ球は、その後、これらの自己反応性ポリクローナルBリンパ球にサイトカイ

ンの補助を提供する。これらのポリクローナルBリンパ球により産生される抗体は、天然のポリペプチド上に存在するものをも含む、修飾されたポリペプチド上の異なるエピトープと反応し得るので、非修飾自己タンパク質と交差反応性である抗体が誘導される。

【００７２】

結論として、Tリンパ球は、実際は挿入されたエピトープのみが宿主にとって外来であるのに、ポリクローナルBリンパ球の個体群が外来抗原の全てを認識するかのようにふるまうように誘導されることができる。このようにして、非修飾自己抗原と交差反応することができる抗体が誘導される。

【００７３】

自己寛容の破壊を得るためにペプチド自己抗原を修飾するいくつかの方法が、当該技術において公知である。にもかかわらず、本発明のアナログは、

－抗原提示細胞(APC)への修飾された分子の標的化をもたらす、少なくとも1つの第一成分を導入するか、および／または

－免疫系を刺激する、少なくとも1つの第二成分を導入するか、および／または

－免疫系へのアナログの提示を最適化する、少なくとも1つの第三成分を導入する

を含むことが好ましい。

【００７４】

しかしながら、これらの全ての修飾は、APPまたはAβ中の本来のBリンパ球エピトープの実質的なフラクションを維持している間に行われるべきである。なぜなら、天然分子のBリンパ球による認識は、それにより促進されるからである。

【００７５】

ある好ましい実施形態においては、側鎖（外来T細胞エピトープまたは上記の第一、第二および第三成分の形態における）が、共有結合的に、または非共有結合的に導入される。これは、一次元アミノ酸配列を変化させることなく、または鎖中の個別のアミノ酸の間のペプチド結合に少なくとも変化を導入することなく、APPまたはAβに由来するアミノ酸残基の範囲を派生することを意味する。

【００７６】

これに代わる、好ましい実施形態は、アミノ酸の置換および／または欠失および／または挿入および／または付加（組換え手段により、またはペプチド合成によりもたらされるであろう；アミノ酸のより長い範囲を含む修飾は、融合ポリペプチドを発生させることができる）を利用する。この実施形態の、ある特に好ましいバージョンは、いくつかのアミノ酸配列を、それぞれ外来免疫優性T細胞エピトープを含むいくつかの対応するアミノ酸配列で置換し、同時に、アナログ中の自己タンパク質の全体の三次構造を維持する、自己タンパク質のアナログで免疫化することによる自己タンパク質のダウンレギュレーション方法を開示する、WO 95/05849に記載の技術である。しかしながら、本発明の目的に対しては、修飾（挿入、付加、欠失または置換）が外来T細胞エピトープを発生させ、同時に、APPまたはAβ中のB細胞エピトープの実質的な数を維持することで充分である。しかしながら、誘導された免疫応答の最大の効率を得るためには、APPまたはAβの全体の三次構造が、修飾された分子中で保存されることが好ましい。

【００７７】

APPもしくはAβまたはこれらの断片が変異されていることが好ましい場合がある。Aβ－43の位置35のメチオニンが、好ましくはロイシンもしくはイソロイシンで置換された置換変異体か、または単純に欠失されていることが特に好ましい。特に好ましいアナログは、C末端に位置する単一のメチオニンを含み、これは、それがアミロイド産生ポリペプチドまたは外来T_Hエピトープ中に天然に発生するからか、またはそれが挿入または付加されたからのいずれかである。よって、外来T_Hエピトープを含むアナログの部分が、C末端に位置する可能性があるメチオニンを除いては、メチオニンを有さないことも好ましい。

【００７８】

1つのメチオニンを除いて全てを除去する主要な理由は、その後、臭化シアンにより開裂することができ、単独のアナログを放出する、多量体のアナログを組換え的に調製するこ

とが可能になることである。この方法により、組換えの産生が促進されることが利点である。

【００７９】

実際、本発明において用いられるAPPまたはAβのアナログの全てが、アナログ中のC末端アミノ酸としての位置にあり、アミロイド産生ポリペプチドもしくは外来T_Hエピトープのいずれかの中にある他のメチオニンは欠失されているか、または他のアミノ酸に置換されている、単一のメチオニンを単に含むという特徴を共有する。

【００８０】

さらに興味深いある変異は、Aβ-43中の位置19にあるフェニルアラニンの欠失または置換であり、この変異は、このフェニルアラニン残基のプロリンへの置換であることが特に好ましい。

【００８１】

アナログ中で用いられる別の興味深いポリアミノ酸は、Aβ-43タンパク質のトランケーテッド(truncated)部分である。これらは、本発明による免疫原性アナログ中に用いることもできる。特に好ましいものは、トランケートAβ(1～42)、Aβ(1～40)、Aβ(1～39)、Aβ(1～35)、Aβ(1～34)、Aβ(1～34)、Aβ(1～28)、Aβ(1～12)、Aβ(1～5)、Aβ(13～28)、Aβ(13～35)、Aβ(17～28)、Aβ(25～35)、Aβ(35～40)、(36～42)、およびAβ(35～42)（カッコ内の数字は、適切な断片を構成するAβ-43のアミノ酸範囲を表すーAβ(35～40)は、例えばSEQ ID NO: 2のアミノ酸706～711に一致する)である。Aβ-43のトランケーテッド部分をもつこれらの全ての変異は、本明細書に記載のAβ断片、特に実施例1に示す変異9、10、11、12および13を用いて作製することができる。

【００８２】

次に示す式は、本発明により一般的に保護される分子的構築物を示す：

$(MOD_1)_{s1}$(アミロイド$_{e1}$)$_{n1}$$(MOD_2)_{s2}$(アミロイド$_{e2}$)$_{n2}$・・・・$(MOD_x)_{sx}$(アミロイド$_{ex}$)$_{nx}$ (I)

（ここで、アミロイド$_{e1}$～アミロイド$_{ex}$は、APPまたはAβのサブシークエンスを含むx個のB細胞エピトープであり、これらは独立して同一または異なっており、外来の側鎖を有していても有していなくてもよい；xは≧3の整数であり、n1～nxはx個の≧0である整数(少なくとも1つが≧1である)であり、MOD_1～MOD_xは、保存されたB細胞エピトープの間に導入されたx個の修飾であり、s_1～s_xはx個の≧0である整数(アミロイド$_{ex}$サブシークエンスに側鎖が導入されない場合は、少なくとも1つが≧1である））。

よって、構築物の免疫原性に一般的な機能的抑制があるならば、本発明は、APPまたはAβの本来の配列の順列の全ての種類、およびその中の修飾の全ての種類を許容する。よって、例えばインビボにおいて副作用を示す配列の部分の脱落、または通常細胞内であるので、望まれない免疫学的反応を生じることができる部分の脱落により得られる、修飾されたAPPまたはAβは本発明に含まれる。

【００８３】

上で概説した構築物のある好ましいバージョンは、適用可能である場合、アミロイドタンパク質のサブシークエンスを含むB細胞エピトープが、アミロイドが由来する前駆体ポリペプチドにおいて、細胞外に露出しないものである。このようなエピトープの選択をすることにより、前駆体を産生する細胞に反応し得る抗体が発生しないことが確実になり、これにより、発生した免疫応答が、望まれないアミロイド沈着に対する免疫応答に限定されるようになる。この場合、それらが産生された細胞に対するいかなる結合をも有さない場合にのみ細胞外の相に露出しているAPPまたはAβのエピトープに対する免疫を誘導することが可能であろう。

【００８４】

B細胞エピトープの実質的なフラクション、または本明細書に記載のような修飾に供されるタンパク質の全体の三次構造の保存は、多くの方法により達成することができる。一つ目は、問題のポリペプチドに対するポリクローナル抗血清（例えばウサギにおいて作製された抗血清）を単純に作製し、その後、この抗血清を、産生される修飾されたタンパク質

に対する試験試薬として(例えば競合的ELISAにおいて)用いることである。このような抗血清との限定された（しかしまだ意味のある、特異的な）反応性を示すアナログが本来のB細胞エピトープの実質的なフラクションを保持しているとみなされるが、APPまたはAβが反応するのと同程度に抗血清と反応する、修飾されたバージョン(アナログ)は、APPまたはAβと同じ全体の三次構造を有するとみなされなければならない。

【００８５】

代わりに、APPまたはAβ上の別個のエピトープと反応し得るモノクローナル抗体の選択を作製し、試験パネルとして用いることができる。このアプローチは、1) APPまたはAβのエピトープマッピング、および2) 作製されたアナログにおいて保持されるエピトープのマッピングを許容する利点を有する。

【００８６】

もちろん、第三のアプローチは、APPもしくはAβ、またはこれらの生物学的に活性なトランケート（上記参照）の三次構造を決定し、これを、作製されたアナログの、決定された三次構造と比較することであろう。三次構造は、X線回折の検討およびNMR分光法により決定することができる。三次構造に関する更なる情報は、与えられた分子の三次構造についての有用な情報を得るために、純粋な形態のポリペプチドが要求されるだけであることに利点を有する（X線回折はポリペプチドの結晶を用いることが要求され、NMRはポリペプチドの同位体変形が要求される）円偏光二色性分光分析の検討によりある程度は得ることができる。しかしながら、円偏光二色性分析は二次構造の要素の情報を通じて、正しい三次構造の間接的な証拠を提供することができるのみであるので、決定的なデータを得るには、結局、X線回折および／またはNMRが必要である。

【００８７】

本発明のある好ましい実施形態は、APPまたはAβのBリンパ球エピトープの多数の提示（すなわち、少なくとも1つのB細胞エピトープが2つの位置に存在する式I）を用いる。この効果は、種々の方法、例えば(ポリペプチド由来のAPPまたはAβ)$_m$（ここで、mは≧2の整数である)の構造を含む融合ポリペプチドを単に作製し、次いでAPPまたはAβ配列の少なくとも1つに、本明細書に記載の修飾を導入することにより達成することができる。導入された修飾がBリンパ球エピトープの少なくとも1つの重複および／またはハプテンの導入を含むことが好ましい。選択されたエピトープの多数の提示を含むこれらの実施形態は、APPまたはAβの単なる重要でない部分がワクチン剤における構成成分として有用である場合に、特に好ましい。

【００８８】

上述したように、外来T細胞エピトープの導入は、少なくとも一つのアミノ酸の挿入、付加、欠失または置換の導入により達成することができる。もちろん、通常の状況は、アミノ酸配列における1つ以上の変化の導入（例えば完全なT細胞エピトープの挿入またはそれによる置換）であるが、到達する重要な目的は、抗原提示細胞(APC)により加工された場合に、アナログが、APCの表面上にMCHクラスII分子の意味において提示されている、このような外来免疫優性T細胞エピトープを生じさせることである。したがって、もし、適切な位置にあるAPPまたはAβのアミノ酸配列が、外来T_Hエピトープにおいても見出すことができるいくつかのアミノ酸残基を含む場合、外来T_Hエピトープの導入は、アミノ酸の挿入、付加、欠失および置換によって外来エピトープの残りのアミノ酸を提供することにより達成することができる。言い換えると、本発明の目的を満たすために、挿入または置換による完全なT_Hエピトープの導入は必要ではない。

【００８９】

挿入、欠失、置換または付加のアミノ酸の数は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20および25のような少なくとも2の挿入、置換、付加または欠失であることが好ましい。挿入、置換、付加または欠失のアミノ酸の数が、最大で100、最大で90、最大で80、最大で70のように150を超えないことがさらに好ましい。置換、挿入、欠失または付加の数は、60を超えないことが特に好ましく、特に、この数は50または40さえも超えるべきではない。最も好ましくは、30を超えない数である。アミノ酸付加

については、得られる構築物が融合ポリペプチドの形態にある場合、これらはしばしば、150よりかなり高いことが記載される。

【００９０】

本発明の好ましい実施形態は、少なくとも1つの外来免疫優性T細胞エピトープを導入することによる修飾を含む。T細胞エピトープの免疫優性の問題は、問題の動物種に依存することが理解されるであろう。本明細書において用いられるように、「免疫優性」の語は、ワクチン化された個体/個体群においてかなりの免疫応答を起こすエピトープを単にいうが、ある個体/個体群において免疫優性であるT細胞エピトープは、同じ種の他の個体においても免疫優性である必要がなく、それが後者の個体においてはMHC-II分子に結合することが可能であってもそうであることは公知の事実である。よって、本発明の目的については、免疫優性T細胞エピトープは、抗原中に存在する場合に、T細胞の援助を提供するのに効果的なT細胞エピトープである。典型的に、免疫優性T細胞エピトープは、それらが発現するポリペプチドに関わらず、本質的にいつもMHCクラスII分子に結合して提示される、固有の特徴を有する。

【００９１】

他の重要な点は、T細胞エピトープのMHC制限の問題である。一般的に、天然に発生するT細胞エピトープはMHC制限され、すなわちT細胞エピトープを構成する、あるペプチドはMHCクラスII分子の部分集合に効果的に結合するのみである。これは、多くの場合、ある特定のT細胞エピトープの使用が、個体群のフラクションにおいてのみ効果的であるワクチン成分となる効果を有し、そのフラクションのサイズに依存して、同じ分子においてより多くのT細胞エピトープを含むか、または代わりに構成成分が導入されたT細胞エピトープの性質によって互いに区別されるAPPまたはAβの変形である多成分ワクチンを作製することが必要になることが可能である。

【００９２】

もし、用いるT細胞のMHC制限が全くわからない場合（例えばワクチン化された動物がほとんど明確でないMHC組成物を有する状況において）、特定のワクチン組成物により包含される個体群のフラクションは、次の式

【００９３】

【数１】

$$f_{個体群} = 1 - \prod_{i=1}^{n}(1 - p_i) \qquad (II)$$

【００９４】

(ここで、p_iは、ワクチン組成物に存在するi番目の外来T細胞エピトープに対する、応答者の個体群中の頻度であり、nはワクチン組成物中の外来T細胞エピトープの総数である）により見積もられる。よって、それぞれ0.8、0.7および0.6の個体群における応答頻度を有する、3つの外来T細胞エピトープを含むワクチン組成物は

1 − 0.2 × 0.3 × 0.4 = 0.976

を与えることになり、すなわち、個体群の97.6%が、ワクチンに対するMHC-II媒介応答を統計学的に有するであろう。

【００９５】

上記式は、用いるペプチドの多少正確なMHC制限パターンがわかっている状況においては当てはまらない。もし、例えばあるペプチドがHLA-DR対立遺伝子であるDR1、DR3、DR5およびDR7によりエンコードされるヒトMHC-II分子にのみ結合するのであれば、このペプチドを、HLA-DR対立遺伝子によりエンコードされる残りのMHC-II分子に結合する他のペプチドとともに用いることが、問題の個体群における100%の適用範囲を達成する。同様に、もし第二のペプチドがDR3およびDR5にのみ結合するならば、このペプチドの添加は、適用範囲を全く増加させない。もしワクチン中のT細胞エピトープの純粋にMHC制限上への個体群の応答の計算に基礎をおく場合、特定のワクチン組成物により包含される個体群の最小

のフラクションは次の式：

【００９６】

【数２】

$$f_{個体群} = 1 - \prod_{j=1}^{3} (1 - \varphi_j)^2 \qquad (III)$$

【００９７】

（ここで、φjは、ワクチン中のT細胞エピトープのいずれか一つに結合し、3つの公知のHLA遺伝子座(DP、DRおよびDQ)のj番目に属する、MHC分子をエンコードする対立遺伝子のハプロタイプの個体群中の頻度の合計である；実際問題として、まずどのMHC分子がワクチン中の各T細胞エピトープを認識するのかを決定し、その後それらをタイプ(DP、DRおよびDQ)により列挙し、次いで列挙された異なる対立遺伝子のハプロタイプのそれぞれの頻度を各タイプについて合計し、それによりϕ_1、ϕ_2およびϕ_3を得る）により決定することができる。

【００９８】

式IIのp_iの値が、対応する理論値π_i：

【００９９】

【数３】

$$\pi_i = 1 - \prod_{j=1}^{3} (1 - \nu_j)^2 \qquad (IV)$$

【０１００】

（ここで、ν_jは、ワクチン中のi番目のT細胞エピトープに結合し、3つの公知のHLA遺伝子座(DP、DRおよびDQ)のj番目に属する、MHC分子をエンコードする対立遺伝子のハプロタイプの個体群中の頻度の合計である）を超えることが起こり得る。これは、１－Π_iの個体群中では、応答者の頻度の$f_{残存_i}$ = (p_i － Π_i) / (1 － Π_i)であることを意味する。よって、式IIIは、式V：

【０１０１】

【数４】

$$f_{個体群} = 1 - \prod_{j=1}^{3} (1 - \varphi_j)^2 + \left(1 - \prod_{i=1}^{n} (1 - f_{残存_i})\right) \qquad (V)$$

【０１０２】

（ここで、１－$f_{残存_i}$の表現は、負である場合、ゼロに設定される）を得るように調節することができる。式Vは、全てのエピトープがハプロタイプの同じ組に対してハプロタイプの位置づけをされていることが必要であることが記載される。

【０１０３】

よって、アナログに導入されることとなるT細胞エピトープを選択する場合、エピトープについての入手可能である全ての知識を含むことが重要である：1) 個体群中の応答者の各エピトープに対する頻度、2) MHC制限データ、および3) 適切なハプロタイプの個体群中における頻度である。

【０１０４】

動物種または動物個体群の多くの割合において活性である、天然に発生する「乱交雑」T細胞エピトープがいくつか存在し、これらはワクチンに導入されることが好適であり、それにより同じワクチン中における非常に多数の異なるアナログの必要性が減少される。

【０１０５】

本発明の乱交雑エピトープは、破傷風トキソイド(例えばP2およびP30エピトープ)、ジフ

テリアトキソイド、インフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)、およびピー・ファルシパルム(P. falciparum) CS抗原からのエピトープのような天然に発生するヒトT細胞エピトープであることができる。

【０１０６】

長年にわたって、他の乱交雑T細胞エピトープがいくつか同定されている。特に、異なるHLA-DR対立遺伝子によりエンコードされるHLA-DR分子の多くの割合に結合することができるペプチドが同定され、これらは全て、本発明において用いるアナログに導入される可能性があるT細胞エピトープである。本明細書にその全てが参照として組み込まれる、次の参考文献において議論されるエピトープも参照：WO 98/23635 (Frazer IHら、The University of Queenslandに譲渡)；Southwood Sら、1998、J. Immunol. 160：3363～3373；Sinigaglia Fら、1988、Nature 336：778～780；Chicz RMら、1993、J. Exp. Med 178：27～47；Hammer Jら、1993、Cell 74：197～203；およびFalk Kら、1994、Immunogenetics 39：230～242。後の参考文献もまたHLA-DQおよび-DPリガンドに関する。これらの5つの参考文献に列挙されたエピトープは全て、本発明において用いることとなる天然のエピトープの候補として適切である。なぜなら、これらと共通モチーフを共有するエピトープだからである。

【０１０７】

代わりに、エピトープは、MHCクラスII分子の多くの割合に結合することができるいずれの人工T細胞エピトープであってもよい。この関連において、WO 95/07707および対応する論文Alexander Jら、1994、Immunity 1：751～761(どちらの開示も本明細書に参照として組み込まれる)に記載のpan DRエピトープペプチド("PANDRE")は、本発明により用いられることとなるエピトープの候補として興味深い。これらの論文に開示の最も効果的なPANDREペプチドは、投与されたときに安定性を向上するためにCおよびN末端にD-アミノ酸を有することが記載される。しかしながら、本発明は、続いてAPCのリソソーム区画内で酵素的に分解され、MHC-II分子に関する、続いて起こる提示を許容するアナログの部分としての適切なエピトープの組み込みをまず目的とし、よって本発明において用いるエピトープではD-アミノ酸を組み込むことは得策ではない。

【０１０８】

特に好ましいPANDREペプチドは、アミノ酸配列AKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 17)またはその免疫学的に有効なサブシークエンスを有するものである。同じMHC制限の欠損を有するこのエピトープおよび他のエピトープは、本発明の方法に用いるアナログ中に存在するべき、好ましいT細胞エピトープである。このような超乱交雑(super-promiscuous)エピトープは、ただ1つの単独のアナログがワクチン化された動物の免疫系に提示される、本発明の最も単純な実施形態について許容する。

【０１０９】

上述したように、APPまたはAβの修飾は、APCまたはBリンパ球に対して修飾されたアミロイド産生ポリペプチドを標的化する第一成分の導入をも含む。例えば、第一成分は、Bリンパ球特異的表面抗原またはAPC特異的表面抗原に対する特異的結合パートナーであることができる。多くのこのような特異的表面抗原が当該技術において公知である。例えば、該成分は、Bリンパ球またはAPC上にそれに対する受容体がある炭水化物(例えばマンナンまたはマンノース)であることができる。代わりに、第二成分はハプテンであることができる。APCまたはリンパ球上の表面分子を特異的に認識する抗体フラグメントは、第一成分として用いることができる（表面分子は、例えばFCγRIのようなマクロファージおよび単核細胞のFCγ受容体、または代わりに、CD40もしくはCTLA-4のようなその他のいかなる特異的表面マーカーであってよい）。これらの全ての例示した標的化分子は、アジュバントの部分としても用いることができることが記載される、下記を参照。

【０１１０】

増大された免疫応答を達成するために、ある細胞タイプに対するアナログの標的化の代替物または補足物として、免疫系を刺激する上記の第二成分を含むことにより免疫系の応答性のレベルを増加させることが可能である。このような第二成分の典型的な例は、サイト

カインおよびヒートショックタンパク質または分子状シャペロン、ならびにそれらの効果的な部分である。

【０１１１】
本発明に用いられる好適なサイトカインは、ワクチン組成物中でアジュバントとしても通常機能するもの、すなわち、例えばインターフェロンγ(IFN-γ)、インターロイキン1 (IL-1)、インターロイキン2 (IL-2)、インターロイキン4 (IL-4)、インターロイキン6 (IL-6)、インターロイキン12 (IL-12)、インターロイキン13 (IL-13)、インターロイキン15 (IL-15)、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)である；代わりに、サイトカイン分子の機能性部分は、第二成分として充分であろう。このようなサイトカインのアジュバント物質としての使用に関しては、以下の議論を参照。

【０１１２】
本発明によると、第二成分として用いられる好適なヒートショックタンパク質または分子状シャペロンは、HSP70、HSP90、HSC70、GRP94 (gp96としても知られる、Wearsch PAら、1998、Biochemistry 37：5709～19参照)、およびCRT (カルレティキュリン)であることができる。

【０１１３】
代わりに、第二成分は、リステリオライシン(LLO)、リピドAおよび熱不安定エンテロトキシンのようなトキシンであることができる。また、MDP (ムラミルジペプチド)、CFA (完全フロイントアジュバント)、ならびにトレハロースジエステルTDMおよびTDEのようないくつかのマイコバクテリア由来物も興味深い可能性である。

【０１１４】
免疫系に対するアナログの提示を増大させる第三成分の導入の可能性も、本発明の重要な実施形態である。当該技術は、この原理のいくつかの例を示している。例えば、ボレリア・ブルグドルフェリ(Borrelia burgdorferi)タンパク質OspA中のパルミトイル脂質化アンカーは、自己アジュバント化ポリペプチドを与えるように用いることができることが知られている(例えばWO 96/40718参照)－脂質化タンパク質は、ポリペプチドの脂質化アンカー部分とそこから突起している分子の残りの部分とから構成される核とともにミセル様構造を形成し、抗原決定基の多数の提示となるようである。よって、この使用および異なる脂質化アンカー(例えばミリスチル基、ミリスチル基、ファルネシル基、ゲラニルーゲラニル基、GPIーアンカー、およびN-アシルジグリセリド基)を用いる、関連するアプローチは、本発明の好ましい実施形態であり、それは、特に組換え的に産生されたタンパク質におけるこのような脂質化アンカーの提供は、全く率直であり、アナログへの融合パートナーとして、例えば天然に発生するシグナル配列の使用を単に必要とするだけであるからである。他の可能性は、相補因子C3のC3d断片またはC3自体の使用である(Dempseyら、1996、Science 271、348～350およびLou & Kohler、1998、Nature Biotechnology 16、458～462参照)。

【０１１５】
免疫系に対するAPPまたはAβの重要なエピトープ領域の多コピー(例えば少なくとも2)の好ましい提示となる、本発明の別の実施形態は、特定分子、すなわち上記の変形dまたはeへのアナログの共有結合である。例えばポリマーを用いることができ、例えばデキストランのような炭水化物(例えばLees Aら、1994、Vaccine 12：1160～1166；Lees Aら、1990、J Immunol. 145：3594～3600参照)であるが、マンノースおよびマンナンも有用な代替物である。例えばイー・コリ(E. coli)およびその他のバクテリアからの必要不可欠な膜タンパク質も有用な結合パートナーである。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、ジフテリアトキソイドおよびウシ血清アルブミン(BSA)のような伝統的な担体分子も、好ましい有用な結合パートナーである。

【０１１６】
炭水化物のような、ポリヒドロキシポリマーへのAPPまたはAβの由来物の共有結合の好ましい実施形態は、ポリヒドロキシポリマーに別個に結合する少なくとも1つのAPPまたはAβ由来ペプチドおよび少なくとも1つの外来Tヘルパーエピトープの使用を含む(すなわち

、外来Tヘルパーエピトープおよび APPまたはAβ由来アミノ酸配列は互いに融合するのではなく、むしろポリヒドロキシポリマーに結合し、次いでそれが担体の骨格としての役割を果たす)。再び、このような実施形態は、APPまたはAβ由来ペプチドの領域を有する適切なB細胞エピトープが、短いペプチドの範囲により構成される場合に、最も好ましい－これは、このアプローチが、得られる免疫原性の剤における選択されたエピトープの多数の提示を達成する非常に簡便な方法の一つだからである。しかしながら、本明細書においてすでに述べたアナログをポリヒドロキシポリマー骨格に単純に結合させる、すなわちAPPまたはAβ由来物が外来T_Hエピトープとは別個に骨格に結合していないことも可能である。

【０１１７】
外来Tヘルパーエピトープおよび APPまたはAβ由来(ポリ)ペプチドの結合は、ペプチダーゼにより切断可能なアミド結合によることが好ましい。このストラテジーは、APCがコンジュゲートを取り上げると、同時にコンジュゲートを加工処理することができ、続いてMHCクラスIIの関係において外来T細胞エピトープを提示する効果を有する。

【０１１８】
ペプチド(興味の対象であるAPPまたはAβ由来ペプチドとともに外来エピトープの両方)の結合を達成する一つの方法は、トレシル(トリフルオロエチルスルホニル)基またはマレイミド、p-ニトロフェニルクロロホルメート(OH基の活性化およびペプチドとポリヒドロキシポリマーとの間のペプチド結合の形成のため)、およびトシル(p-トルエンスルホニル)のようなその他の適切な活性化基を用いて、適切なポリヒドロキシポリマーを活性化することである。例えば、WO 00/05316およびUS 5,874,469(両者とも本明細書に参照として組み込まれる)に記載のようにして、活性化された多糖類を製造して、これらをAPPまたはAβ由来ペプチドまたはポリアミノ酸、ならびに通常の固相もしくは液相ペプチド合成技術により作製されたT細胞エピトープに結合させることが可能である。得られた生成物は、APPまたはAβおよび外来T細胞エピトープに由来のポリアミノ酸を、そのN末端またはその他の利用可能な窒素部分により結合して有する、ポリヒドロキシポリマー骨格(例えばデキストラン骨格)からなる。所望により、N末端にある一つを除いて全ての利用可能なアミノ基を保護するようにAPPまたはAβペプチドを合成し、続いて、得られた保護されたペプチドをトレシル化されたデキストラン部分に結合し、最後に、得られたコンジュゲートを脱保護することが可能である。このアプローチの特定の例は、以下の実施例に述べる。

【０１１９】
WO 00/05316およびUS 5,874,469に教示のような水溶性多糖類分子を使用する代わりに、架橋された多糖類分子を用いることが同等に可能であり、それによりポリペプチドおよび多糖類の間の粒状のコンジュゲートを得る－これは、2つの目的、すなわちコンジュゲートを注射した場合の局所的沈着効果を得ること、およびAPCに対してひきつける力がある標的である粒子を得ることが達成されるので、免疫系に対するポリペプチドの向上された提示に導くと考えられている。このような粒状の系を用いるアプローチも、実施例において説明する。

【０１２０】
APPまたはAβに修飾を導入するのに選択された領域については、a) 知られた、予想されるB細胞エピトープの保存、b) 三次構造の保存、c) 「産生細胞」上にB細胞エピトープが存在することの回避などを考慮することが根底にある。いずれにしても、上述したように、異なる位置におけるT細胞エピトープの導入に全て供されたアナログの一組を検査することは、全く簡単である。

【０１２１】
本発明の最も好ましい実施形態がヒトAβのダウンレギュレーションを含むので、上記のAPPまたはAβポリペプチドはヒトAβポリペプチドであることが好ましい。この実施形態においては、APPまたはAβポリペプチドは、SEQ ID NO: 2における少なくとも1つのアミノ酸配列が、同じもしくは異なる長さであって、外来T_Hエピトープを含む少なくとも1つのアミノ酸配列で置換されることにより修飾されていることが特に好ましい。修飾されたア

ミロイド産生APPおよびAβの好ましい例を、P2およびP30エピトープを例として用いて、図1に概略を示す。このような構築物の背景原理は、実施例において詳細に論ずる。

【０１２２】

より特異的には、SEQ ID NO: 2中に導入されるT_Hを含む(または完成する)アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2中のいずれのアミノ酸において導入してもよい。すなわち、導入はSEQ ID NO: 2中の1～770のいずれのアミノ酸の後でもよいが、好ましくはSEQ ID NO: 2の671、672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713および714のいずれかのアミノ酸の後である。これは、1～671のいずれかもしくは全てのアミノ酸、または715～770のいずれかもしくは全てのアミノ酸の欠失と組合わせてもよい。さらに、置換の技術を用いる場合、SEQ ID NO: 2中の671、672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713および714のいずれか1つのアミノ酸が、導入と組合わせて置換されていてもよい。

【０１２３】

本発明の他の実施形態は、T細胞応答を開始するMHCクラスII分子に生産的に結合する、SEQ ID NO: 2のいずれのサブシークエンスをも含まないアナログの提示である。

【０１２４】

免疫系が例えば抗Aβ免疫応答を誘導することを保証する抗原の設計についてのこのようなストラテジーの背景にある原理は、次のようである：自己タンパク質に対する体の免疫寛容性を破壊するのに充分に強いアジュバント中に処方された、Aβのような豊富な自己由来タンパク質で免疫化する場合、あるワクチン化された個体においては、誘導された免疫応答が、単純に免疫化を停止するだけでは停止されない危険性がある。これは、このような個体において誘導された免疫応答が、自己タンパク質の天然T_Hエピトープにより推進されているようであり、このことがワクチン化された個体自身のタンパク質が、それ自身で免疫化剤として機能し得る悪影響を有するからである：よって、自己免疫状態が確立されている。

【０１２５】

外来T_Hエピトープの使用を含む好ましい方法は、抗ー自己免疫応答が外来T_Hエピトープにより推進されるので、発明者の知る限りでは、この効果を生み出すことは観察されておらず、好ましい技術に頼った、誘導された免疫応答が免疫化の停止後に実際に衰弱することは、本発明者らにより繰り返して示されている。しかしながら、免疫応答がそれに対して免疫化する適切な自己タンパク質の自己T_Hエピトープによっても推進されることは、いくつかの個体において理論上では起こり得るーこれは、比較的豊富にある、Aβのような自己タンパク質を考慮する場合に特に適切であるが、他の治療上適切な自己タンパク質は局所的に存在するだけであるか、または体内において、「自己免疫効果」が不可能であるほど非常にわずかな量である。これを回避するある非常に単純な方法は、T_Hエピトープとして役に立つことができるであろうペプチド配列の免疫原を含むことを全く回避することである（および、約9アミノ酸より短いペプチドはT_Hエピトープとして役に立つことができないので、より短い断片の使用は、ある単純で実行可能なアプローチである）。したがって、本発明のこの実施形態は、さもなければT_Hエピトープとして機能するであろう標的タンパク質の配列中の保存性の置換を単に含む配列を含む、「自己刺激T_Hエピトープ」として役に立つことができる、標的APPまたはAβのペプチド配列を含まない免疫原を確実にすることを供給する。

【０１２６】

APPまたはAβのアナログの免疫系提示の好ましい実施形態は、MHCクラスII分子に生産的に結合しない少なくとも1つのAPPまたはAβ由来ペプチド、および少なくとも1つの外来Tヘルパーエピトープを含むキメラペプチドの使用を含む。さらに、APPまたはAβ由来ペプチドがB細胞エピトープを有することが好ましい。免疫原性アナログが、1つ以上のB細胞

エピトープを含むアミノ酸配列が連続配列または挿入を含む配列のいずれかとして表されるものであり、該挿入が外来Tヘルパーエピトープを含むことが特に好ましい。

【０１２７】

再び、このような実施形態は、APPまたはAβの領域を有する適切なB細胞エピトープが、MHCクラスII分子に生産的に結合することができる手段がない、短いペプチド範囲からなる場合に最も好ましい。アミロイド産生ポリペプチドの選択されたB細胞エピトープまたは複数のエピトープは、したがってSEQ ID NO: 2の最大で9の連続したアミノ酸を含むべきである。アミロイド産生ポリペプチドのアミノ酸配列からの、最大で8、7、6、5、4または3の連続したアミノ酸を有するもののような、より短いペプチドが好ましい。

【０１２８】

アナログがSEQ ID NO: 2の少なくとも1つのサブシークエンスを含むので、そのような1つのサブシークエンスがそれぞれ独立して、9の連続したアミノ酸、8の連続したアミノ酸、7の連続したアミノ酸、6の連続したアミノ酸、5の連続したアミノ酸、4の連続したアミノ酸、および3の連続したアミノ酸からなる群より選択される、APPまたはAβからのアミノ酸範囲からなることが好ましい。

【０１２９】

連続したアミノ酸が、SEQ ID NO: 2の残基672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713および714からなる群より選択されるアミノ酸残基から始まることが特に好ましい。

【０１３０】

<u>タンパク質/ペプチドワクチン化；アナログの処方および投与</u>

動物へのアナログの投与により動物の免疫系にアナログを提示する場合、ポリペプチドの処方は、当該技術において通常承認される原理に従う。

【０１３１】

有効成分としてペプチド配列を含むワクチンの製造は、全て本明細書に参照として組み込まれる米国特許4,608,251；4,601,903；4,599,231；4,599,230；4,596,792；および4,578,770に例示のように、当該技術において一般的によく理解されている。典型的には、このようなワクチンは、液体の溶液または懸濁物のいずれかとして、注射可能なように製造される；注射の前の液体における溶液または液体における懸濁物に適した固体形態も製造することができる。製造物は、乳化されていてもよい。

【０１３２】

免疫原性有効成分は、医薬上許容され、有効成分に影響を及ぼさない添加剤としばしば混合される。適切な添加剤は、例えば水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、またはこれらの組合わせである。加えて、所望により、ワクチンは、湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝剤、またはワクチンの効果を増大させるアジュバントのような補助物質を少量含むことができる；以下の、アジュバントの詳細な議論を参照。

【０１３３】

ワクチンは、非経口で、例えば皮下、皮内または筋肉内のいずれかの注射により、通常、投与される。投与の他の形態に適した付加的な製剤は、坐剤や、ある場合においては、経口、バッカル、舌下、腹膜内、膣内、肛門、硬膜外、脊髄、および頭蓋内の製剤を含む。坐剤については、伝統的な結合剤および担体は、例えばポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドを含むことができる；このような坐剤は、有効成分を0.5%～10%、好ましくは1～2%の範囲で含む混合物からつくられる。経口製剤は、例えば医薬グレードのマンニトール、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの通常用いられる添加剤を含む。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル、持続放出性製剤または粉剤の形態をとり、10～95%、好ましくは25～70%の有効成分を含む。経口製剤について、コレラトキシンは、興味深い製剤パートナーである（および抱合パートナーとしても可能性がある）。

【０１３４】
ポリペプチドは、中性または塩の形態でワクチンに処方することができる。医薬上許容される塩は、酸付加塩(ペプチドの遊離のアミノ基とともに形成される)、および例えば塩酸もしくはリン酸のような無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸とともに形成されるものを含む。遊離のカルボキシル基と形成される塩は、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄のような無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2－エチルアミノ　エタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基に由来するものであってもよい。

【０１３５】
ワクチンは、投与量製剤に影響を及ぼさない方法で、治療上有効な免疫原性である量で投与される。投与される量は、例えば免疫応答をする個体の免疫系の受容力、および所望の防御の程度を含み、治療される被験者に依存する。適切な投与量範囲は、ワクチン接種あたり数百μgのオーダーの有効成分であり、好ましい範囲が、約0.5μg～1,000μgの範囲のような約0.1μg～2,000μg (1～10 mgの範囲のより高い量が予期されるが)、好ましくは1μg～500μmの範囲、特に約10μg～100μgの範囲である。
最初の投与およびブースター注射の好適なレジメント(regiments)も変動するが、最初の投与に続いて接種または他の投与を行うことにより代表される。

【０１３６】
適用の仕方は広く変動する。ワクチンの投与の通常の方法のいずれも適用可能である。これらは、固体の生理学的に許容されるベース上の、または生理学的に許容される分散液中の経口適用、注射による非経口などを含む。ワクチンの投与量は、投与経路に依存し、ワクチン化されるヒトの年齢および抗原の製剤により変動する。

【０１３７】
ワクチンのポリペプチドのいくつかは、ワクチン中において充分に免疫原性であるが、他のいくつかについては、ワクチンがさらにアジュバント物質を含む場合、免疫応答が増強される。

【０１３８】
ワクチンについてアジュバント効果を達成する種々の方法が知られている。一般的な原理および方法は、“The Theory and Practical Application of Adjuvants"、1995、Duncan E.S. Stewart-Tull(編)、John Wiley & Sons Ltd、ISBN 0-471-95170-6、および“Vaccines: New Generationn Immunological Adjuvants"、1995、Gregoriadis Gら(編)、Plenum Press、New York、ISBN 0-306-45283-9に詳述され、両者とも本明細書に参照として組み込まれる。

【０１３９】
自己抗原への自己寛容の破壊の促進を示し得るアジュバントを用いることが、特に好ましい；実際、非修飾アミロイド産生ポリペプチドを自己ワクチン中の有効成分として用いる場合に、これは必須である。適切なアジュバントの制限されない例は、免疫標的化アジュバント；トキシン、サイトカインおよびマイコバクテリア派生物のような免疫変調アジュバント；油処方成分；ポリマー；ミセル形成アジュバント；サポニン；免疫刺激複合マトリクス(immunostimulating complex matrix) (ISCOMマトリックス)；粒子；DDA；アルミニウムアジュバント；DNAアジュバント；γ－イヌリン；およびカプセル化アジュバントからなる群より選択される。一般的に、アナログ中の第一、第二および第三成分として有用な化合物および剤に関する上記の開示は、必要な変更を加えて、本発明のワクチンのアジュバントにおけるそれらの使用に当てはまることが記載される。

【０１４０】
アジュバントの適用は、緩衝食塩水中の0.05～0.1%溶液として通常用いられる水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウム（ミョウバン）のような剤、0.25%溶液として用いられる糖の合成ポリマー(例えばCarbopol（登録商標）)との混合物の使用を含み、それぞれ70～101℃の範囲の温度において30秒～2分間の熱処理によるワクチン中のタンパク質の凝

集、および架橋剤による凝集も可能である。アルブミンへのペプシン処理抗体(Fab断片)を用いた再活性化による凝集、シー・パルバム(C. parvum)のような細菌細胞もしくはエンドトキシンもしくはグラム陰性細菌のリポ多糖類成分との混合物、マンニドモノーオレエート (Aracel A)のような生理学的に許容される油賦形剤中の乳化物、またはブロック代替物として用いられるパーフルオロカーボン(Fluosol-DA)の20%溶液とのエマルジョンも用いることができる。スクアレンのような油およびIFAとの混合物も好ましい。

【０１４１】

本発明によると、DDA(ジメチルジオクタデシルアンモニウム　ブロミド)は、DNAおよびγーイヌリンのままでのアジュバントだけでなくフロイントの完全アジュバントおよび不完全アジュバントとして興味深い候補であり、またQuilAおよびQS21のようなキラヤサポニンはRIBIのままで興味深い。更なる可能性は、モノホスホリルリピドA (MPL)、前記のC3およびC3d、ならびにムラミルジペプチド(MDP)である。

【０１４２】

リポソーム製剤も、アジュバント効果を与えることが知られており、よって本発明によると、リポソームアジュバントは好ましい。

【０１４３】

また、免疫刺激複合体マトリックスタイプ (ISCOM（登録商標）マトリックス)アジュバントも、このタイプのアジュバントがAPCによりMHCクラスII発現をアップレギュレーションすることができるので特に、本発明による好ましい選択である。ISCOM（登録商標）マトリックスは、キラヤ・サポナリア(Quillaja saponaria)からの(任意に分別された)サポニン(トリテルペノイド)、コレステロール、およびリン脂質からなる。免疫原性タンパク質と混合した場合、得られる粒子製剤は、サポニンが60～70%、コレステロールおよびリン脂質が10～15%、ならびにタンパク質が10～15%を構成する、ISCOM粒子として知られるものである。組成物および免疫刺激複合体に関する詳細は、例えばアジュバントに関する上記の教科書に見出されるが、Morein Bら、1995、Clin. Immunother. 3：461～475、ならびにBarr IGおよびMitchell GF、1996、Immunol. and Cell Biol. 74：8～25(両者とも本明細書に参照として組み込まれる)も、完全免疫刺激複合体の製造についての有用な教示を与える。

【０１４４】

アジュバント効果を達成する、その他の非常に興味深い（よって、好ましい）可能性は、Gosselinら、1992(本明細書に参照として組みこまれる)に記載の技術を用いることである。簡単に、本発明の抗原のような適切な抗原の提示は、抗原を単核/マクロファージ上のFcγ受容体に対する抗体(または抗原結合抗体フラグメント)に結合させることにより増大される。特に、抗原と抗－FcγRIとの間の抱合は、ワクチン化の目的のための免疫原性を増大させることが示されている。

【０１４５】

他の可能性は、アミロイド産生ポリペプチドの修飾されたバージョン中の第一及び第二成分の候補として上述した標的化および免疫調節物質（とりわけサイトカイン）の使用を含む。この関連において、ポリI:Cのようなサイトカインの合成インデューサーも可能性がある。

【０１４６】

好適なマイコバクテリア由来物は、ムラミルジペプチド、完全フロイントアジュバント、RIBI、ならびにTDMおよびTDEのようなトレハロースのジエステルからなる群より選択される。

【０１４７】

好適な免疫標的化アジュバントは、CD40リガンドおよびCD40抗体またはそれらの特異的結合断片(上記の議論参照)、マンノース、Fab断片、ならびにCTLA-4からなる群より選択される。

【０１４８】

好適なポリマーアジュバントは、デキストラン、PEG、スターチ、マンナンおよびマンノ

ースのような炭水化物；プラスチックポリマー；ならびにラテックスビーズのようなラテックスからなる群より選択される。

【０１４９】

興味深いその他の免疫応答の調節の手段は、「バーチャルリンパ節」(VLN) (ImmunoTherapy, Inc.、360 Lexington Avenue、New York、NY 10017-6501により開発された専売医用装置)中に、免疫原(任意にアジュバントおよび医薬上許容される担体および賦形剤とともに)を含むことである。VLN(薄い管状の装置)は、リンパ節の構造および機能を模倣している。皮膚の下へのVLNの挿入は、サイトカインおよびケモカインの急な高まりを伴う無菌の炎症の部位を創生する。T細胞およびB細胞とともにAPCも危険信号に迅速に応答し、炎症を起こした部位に戻り、VLNの多孔性マトリックスの内側に蓄積する。抗原に免疫応答を装備するのに要求される必要な抗原投与量は、VLNを用いる場合に減少されることと、VLNを用いたワクチン化により与えられた免疫防御は、アジュバントとしてRibiを用いた通常の免疫化に勝ることとが示されている。この技術は、とりわけGelber Cら、1998、"Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of Immunogens Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node"："From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts、October 12th～15th 1998, Seascape Resort、Aptos、California"に簡単に記載されている。

【０１５０】

ワクチンの微粒子製剤は、タンパク質抗原の免疫原性を増加させることが多くの件で示され、したがって本発明の他の好ましい実施形態である。微粒子は、抗原と、ポリマー、脂質、炭水化物もしくは粒子を形成するのに好適な他の分子との共製剤として作られるか、または微粒子は抗原自体のみからなる均質の粒子であることができる。

【０１５１】

ポリマーベースの微粒子の例としては、ポリマーと抗原とが固体粒子に濃縮されたPLGAおよびPVPベースの粒子(Gupta, R.K. ら、1998)である。脂質ベースの粒子は、ミセルの中に抗原を取り込んだ脂質のミセル(いわゆるリポソーム)として作ることができる(Pietrobon, P.J. 1995)。炭水化物ベースの粒子は、スターチまたはキトサンのような適切な分解し得る炭水化物から典型的に作られる。炭水化物と抗原とを混合し、ポリマー粒子について用いられた方法(Kas, H.S.ら、1997)と同様の方法で粒子に濃縮する。

【０１５２】

抗原のみからなる粒子は、種々の噴霧および凍結乾燥技術により作ることができる。本発明の目的に特に好適なものは、制御されたサイズの非常に均一な粒子を作るのに用いられる超臨界流体技術である(York, P. 1999およびShekunov, B.ら、1999)。

【０１５３】

ワクチンは、1年に1、2、3、4、5または6回のような年に1～6回、個体に必要に応じて投与されるべきであることが予期される。本発明による好ましい自己ワクチンの使用により誘導される記憶免疫性は永続せず、したがって免疫系はアミロイド産生ポリペプチドまたは修飾されたアミロイド産生ポリペプチドで定期的に攻撃されることが必要であることがすでに示されている。

【０１５４】

遺伝的変異のために、異なる個体が同じポリペプチドに対して変動した強度の免疫応答で反応するであろう。したがって、本発明のワクチンは、免疫応答を増加させるためにいくつかの異なるポリペプチドを含んでいてもよく、これは外来T細胞エピトープ導入の選択に関する、上記の議論を参照。ワクチンは2以上のポリペプチドを含んでいてよく、全てのポリペプチドは、上記のとおりである。

この結果、ワクチンは、3～10の異なるポリペプチドのような3～20の異なる、修飾または非修飾のポリペプチドを含むことができる。

【０１５５】

<u>核酸ワクチン化</u>

ペプチドベースワクチンの伝統的な投与の代替として、核酸ワクチン化(「核酸免疫化」

、「遺伝的免疫化」および「遺伝子免疫化」としても知られる)の技術は、多くの魅力的な特徴を提供する。

【０１５６】
第一に、伝統的なワクチンのアプローチに比較して、核酸ワクチン化は、免疫原性剤の大規模な製造（例えば修飾されたアミロイド産生ポリペプチドを製造する微生物の工業的規模の発酵の形態）を消費する資源を必要としない。さらに、免疫原を精製およびリフォールディングする装置の必要がない。最後に、核酸ワクチン化は、導入された核酸の発現産物を製造するために、ワクチン化された個体の生化学的器官に頼っているので、発現産物の最適な翻訳後プロセシングが起こることが期待される；これは、上述したように、本来のB細胞エピトープのかなりのフラクションが修飾された分子中に保存されるべきであり、B細胞エピトープは、いずれの(生体)分子(例えば炭水化物、脂質、タンパク質など)の部分からも原則として構成することができるので、自己ワクチン化の場合に特に重要である。したがって、免疫原の本来のグリコシル化およびリピド化は、全体としての免疫原性に非常に重要であり、これは免疫原を産生する宿主を有することにより最も確実にされる。

【０１５７】
よって、本発明の変形a～cの好ましい実施形態は、アナログをエンコードする核酸を動物の細胞に導入することにより免疫系にアナログを提示し、それにより核酸が導入された細胞によるインビボ発現を得ることを含む。

【０１５８】
本実施形態においては、導入された核酸は、裸のDNA、荷電または非荷電の脂質とともに処方されたDNA、リポソーム中に処方されたDNA、ウイルスベクターに包含されたDNA、トランスフェクション促進タンパク質またはポリペプチドとともに処方されたDNA、標的化タンパク質またはポリペプチドとともに処方されたDNA、カルシウム沈殿剤とともに処方されたDNA、不活性担体分子に結合したDNA、ポリマー、例えばPLGA (WO 98/31398に記載のマイクロカプセル化技術を参照)中またはキチンもしくはキトサン中に被包されたDNA、およびアジュバントとともに処方されたDNAの形態にあり得るDNAが好ましい。この関係において、伝統的なワクチン処方でのアジュバントの使用に適する実用上全ての考慮すべき事柄が、DNAワクチンの処方に当てはまることが注目される。よって、ポリペプチドベースのワクチンの関係においてアジュバントの使用に関する、本明細書における全ての開示は、必要な変更を加えて、核酸ワクチン化技術におけるその使用に当てはまる。

【０１５９】
上記で説明したポリペプチドベースのワクチンの投与経路および投与スキームに関し、これらは本発明の核酸ワクチンにも適用可能であり、ポリペプチドについての投与経路および投与スキームに適する上記の全ての議論は、必要な変更を加えて、核酸にも当てはまる。核酸ワクチンは、静脈内および動脈内に適切に投与され得ることをこれに追加するべきである。さらに、核酸ワクチンは、いわゆる遺伝子銃により投与され得ることは当該技術において公知であり、よってこのことおよびこれと同等の投与形態は、本発明の部分であるとみなされる。最後に、核酸の投与におけるVLNの使用は、良好な結果を生じることが報告されており、よってこの特定の投与形態は特に好ましい。

【０１６０】
さらに、免疫化剤として用いられる核酸は、例えば有用なアジュバントとして論じたサイトカインのような、上記の免疫調節物質の形態にある第一、第二および／または第三成分をエンコードする領域を含むことができる。この実施形態の好ましいバージョンは、アナログのコーディング領域および免疫調節剤のコーディング領域を、異なるリーディングフレームで、または少なくとも異なるプロモーターの制御下で有することを包含する。これにより、アナログまたはエピトープが免疫調節剤の融合パートナーとして産生されるのを回避する。代わりに、2つの別個なヌクレオチド断片を用いることができるが、これは、同じ分子中に含まれた両方のコーディング領域を有する場合、共発現が確実になる利点があるので、あまり好適ではない。

【０１６１】
したがって、本発明は
－本発明の核酸断片またはベクター(以下のベクターの議論を参照)、ならびに
－上記の医薬上および免疫学上許容される賦形剤および／または担体および／またはアジュバント
を含む、APPまたはAβに対する抗体産生を誘導する組成物に関する。
【０１６２】
通常の環境において、変形をエンコードする核酸は、発現がウイルスプロモーターの調節下にあるベクターの形態で導入される。本発明によるベクターのより詳細な議論については、以下の議論を参照。また、核酸ワクチンの処方および使用に関する詳細な議論は入手可能であり、Donnelly JJら、1997、Annu. Rev. Immunol. 15：617～648およびDonnelly JJら、1997、Life Sciences 60：163～172を参照。これらの両者の参考文献は、本明細書に参照として組み込まれる。
【０１６３】
生ワクチン
免疫系に対して、変形a～cに定義されるようなアナログを提示する第三の代案は、生ワクチン技術の使用である。生ワクチンでは、免疫系への提示は、アナログをエンコードする核酸断片またはこのような核酸断片を組み込んだベクターで形質転換された非病原性微生物を、動物に投与することによりもたらされる。非病原性微生物は、いずれの適切な弱毒化細菌株(継代培養によるか、または組換えDNA技術による病原性発現産物の除去により弱毒化)、たとえばマイコバクテリウム・ボビス　ビーシージー(Mycobacterium bovis BCG.)、非病原性のストレプトコッカス種(Streptococcus spp.)、イー・コリ、サルモネラ種(Salmonella spp.)、ビブリオ・コレラ(Vibrio cholerae)、シゲラ(Shigella)であってもよい。最新の生ワクチンの製造に関する概説は、例えばSaliou P、1995、Rev. Prat. 45：1492～1496およびWalker PD、1992、Vaccine 10：977～990に見出され、両者は本明細書中に参照として組み込まれる。このような生ワクチン中で用いられる核酸断片およびベクターについての詳細は、以下の議論を参照。
【０１６４】
細菌の生ワクチンの代替物として、ワクシニア株またはいずれの他の適切なポックスウイルスのような非ビルレントウイルスワクチンベクター中に、以下で論じられる本発明の核酸断片を組み込むことができる。
【０１６５】
通常、非病原性微生物またはウイルスは、動物に一度のみ投与されるが、防御免疫を維持するために、寿命の間に1回以上微生物を投与することが必要な場合がある。ポリペプチドワクチン化について上記で説明したような免疫化スキームが、生またはウイルスワクチンを用いる場合に、有用であろうことが考えられる。
【０１６６】
代わりに、生またはウイルスワクチン化を、その前またはその後のポリペプチドおよび／または核酸ワクチン化と組合わせてもよい。例えば、生またはウイルスワクチンによる一次免疫化をもたらし、続いてポリペプチドまたは核酸アプローチを用いてブースター免疫化を行うことが可能である。
【０１６７】
微生物またはウイルスは、例えば有用なアジュバントとして論じたサイトカインのような、上記の免疫調節物質の形態にある第一、第二および／または第三成分をエンコードする領域を含む核酸で形質転換されることができる。この実施形態の好ましいバージョンは、アナログのコーディング領域および免疫調節剤のコーディング領域を、異なるリーディングフレームで、または少なくとも異なるプロモーターの制御下で有することを包含する。これにより、アナログまたはエピトープが免疫調節剤の融合パートナーとして産生されるのを回避する。代わりに、2つの別個なヌクレオチド断片を形質転換の剤として用いることができる。もちろん、第一および／または第二および／または第三成分を同じリーディ

ングフレームに有することは、発現産物として本発明のアナログを提供することができ、このような実施形態は、本発明において特に好ましい。

【０１６８】

疾患の治療における本発明の方法の使用

上記の議論から認識されるように、本発明の方法の提供は、アミロイド沈着と特徴とする疾患の制御を許容する。この関係において、ADが本発明の方法の鍵となる標的であるだけでなく、Aβを含むアミロイド沈着を特徴とする他の疾患も可能な標的である。よって、アミロイド活性のダウンレギュレーションのための本発明の方法の重要な実施形態は、アミロイド沈着を特徴とするADまたは他の疾患を治療および／または予防および／または改善することを含み、該方法は、アミロイドの量が有意に減少される程度まで、本発明の方法に従ってAPPまたはAβをダウンレギュレーションすることを含む。

【０１６９】

アミロイドの減少が、アミロイド形成とアミロイド分解/除去との間のバランスの逆転になること、すなわちアミロイド分解/除去の速度がアミロイド形成の速度を超えるようになることが特に好ましい。それを必要とする個体の免疫化の数および免疫学的影響を注意深く制御することにより、過剰な副作用を有することなくアミロイド沈着の総計での減少となる、時間に関してのバランスを得ることが可能になる。

【０１７０】

代わりに、個体において本発明の方法が現存するアミロイド沈着を除去または減少できない場合、本発明の方法は、新しいアミロイドの形成における診療上有意な減少を得て、それにより、疾患の状態が衰弱させられない時間をかなり延長するのに用いることができる。アミロイドの血清濃度(沈着物質と平衡にあると考えられている)を測定することによるか、または陽電子放射断層撮影(PET)スキャンを用いることにより、アミロイド沈着の速度をモニターすることができるはずであり、Small GWら、1996、Ann N Y Acad Sci 802：70～78参照。

【０１７１】

本発明の手段および方法が、類似の方法において治療または改善に用いられるその他の疾患および症状は、上記の「発明の背景」において述べたか、または以下の「これらに関連する他のアミロイドの疾患およびタンパク質」の題がついた項目において列挙される。

【０１７２】

本発明のペプチド、ポリペプチドおよび組成物

上記からも明らかなように、本発明は、病理に関するアミロイド沈着の量を減少させるために、APPまたはAβ抗原に対して個体を免疫化するという概念に基づく。このような免疫化を得る好ましい方法は、本明細書で記載のアナログを用いることであり、それにより当該技術において以前に記載されていない分子を提供する。

【０１７３】

本明細書において論じるアナログは、それ自体で発明であり、したがって本発明の重要な部分は、上述したようなアナログに関係する。よって、修飾されたAPPまたはAβに関係する本明細書におけるいずれの開示も、本発明のアミロイド産生アナログを説明する目的に関し、このような開示のいずれも、必要な変更を加えて、これらのアナログの記載に当てはまる。

【０１７４】

好ましい、修飾されたAPPまたはAβ分子は、APPもしくはAβ、または少なくとも10アミノ酸の長さのそれらのサブシークエンスと少なくとも70%の配列相同性を有するポリペプチドとなる修飾を含むことが記載される。より高い配列相同性、例えば少なくとも75%、または少なくとも80、85、90もしくは95%が好ましい。タンパク質および核酸の配列相同性は、$(N_{ref} - N_{dif})\cdot 100/N_{ref}$（ここで、$N_{dif}$は、整列したときに、2つの配列中の非相同残基の総数であり、N_{ref}は、1つの配列中の残基数である。)のように算出できる。よって、DNA配列AGTCAGTCは、配列AATCAATCと75%の配列相同性を有する(N_{dif}=2およびN_{ref}=8)。

【０１７５】
本発明は、本発明の方法を実行するのに有用な組成物にも関する。よって、本発明は、さらに医薬上および免疫学上許容される希釈剤および／または賦形剤および／または担体および／または添加剤ならびに任意にアジュバントを含む、上記のアナログを免疫原的有効量含む免疫原性組成物に関する。言い換えると、本発明のこの部分は、本質的に上述したように、アナログの処方に関する。アジュバント、担体および添加剤の選択は、本発明のAPPまたはAβのダウンレギュレーション方法における、使用のための修飾または非修飾アミロイド産生ポリペプチドの処方について言及するときに論じたことに従う。

【０１７６】
ポリペプチドは、当該技術において公知の方法により製造される。より長いポリペプチドは、アナログをエンコードする核酸配列の適切なベクターへの導入、該ベクターによる適切な宿主細胞の形質転換、宿主細胞による核酸配列の発現、宿主細胞またはその培養上清からの発現産物の回収、ならびにその後の精製および任意の更なる修飾、例えばリフォールディングまたは派生(derivatization)を含む組換え遺伝子の手段により、通常、製造される。

【０１７７】
より短いペプチドは、固相または液相ペプチド合成の公知の技術により製造するのが好ましい。しかしながら、この技術における最近の進歩は、この手段による全長ポリペプチドおよびタンパク質の製造を可能にし、したがって合成手段により長い構築物を製造することも本発明の範囲内である。

【０１７８】
<u>本発明の核酸断片およびベクター</u>
ポリアミノ酸アナログが組換え遺伝子技術だけでなく化学合成または半合成により製造できることが、上記の開示から認められるであろう；後者の2つの選択は、修飾がタンパク質担体（KLH、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、およびBSAのような）と、炭水化物ポリマーのような非タンパク性分子との結合にある場合、ならびに修飾がAPPまたはAβ由来ペプチド鎖への側鎖もしくは側面の群の付加を含む場合にももちろん、特に適切である。

【０１７９】
組換え遺伝子技術の目的のために、およびもちろん核酸免疫化の目的のために、アナログをエンコードする核酸断片は重要な化学産物である。よって、本発明の重要な部分は、本発明のアナログ、すなわち融合パートナーが付加もしくは挿入されている天然の配列を含むAPPまたはAβ由来ポリペプチド、または好ましくは挿入および／または付加により、好ましくは置換および／または欠失により外来T細胞エピトープが導入されたAPPまたはAβ由来ポリペプチドをエンコードする核酸断片に関する。本発明の核酸断片は、DNAまたはRNA断片のいずれかである。

【０１８０】
本発明の核酸断片は、通常、適切なベクターに挿入され、本発明の核酸断片を有するクローニングまたは発現ベクターとなる；このような新規ベクターもまた本発明の部分である。本発明のこれらのベクターの構築に関する詳細は、形質転換細胞および微生物の関係において以下で論じる。ベクターは、適用の目的およびタイプに応じて、プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ染色体またはウイルスの形態にあり得るだけでなく、特定の細胞において一過的に発現するだけの裸のDNAも重要なベクターである。本発明の好ましいクローニングおよび発現ベクターは自律複製が可能であり、それにより、後に続くクローニングのための高レベル発現または高レベル複製を目的とする高いコピー数を可能にする。

【０１８１】
本発明のベクターの全体的な概要は、5'→3'方向に実施可能な連鎖で次の特徴を含む：本発明の核酸断片の発現を推進するプロモーター、ポリペプチド断片の(細胞外の相へ、もしくは適用可能である場合にはペリプラズマへの)分泌または膜への組み込みを可能にするリーダーペプチドをエンコードする、任意の核酸配列、本発明の核酸断片、および任意

のターミネーターをエンコードする核酸配列である。生産株または細胞ラインにおいて発現ベクターとともに機能する場合、好ましい形質転換細胞の遺伝的安定性を目的として、宿主細胞に導入されたときのベクターは、宿主細胞ゲノムに組み込まれる。これに対して、動物においてインビボ発現をもたらすために用いるベクターとともに作用する場合(すなわち、DNAワクチン化においてベクターを用いる場合)、ベクターが宿主細胞ゲノムに組み込まれることができないことが、安全性の理由から好ましい；典型的に、裸のDNAまたは非組み込みウイルスベクターが用いられ、その選択は当業者に公知である。

【０１８２】
本発明のベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、本発明のアナログを産生する。本発明の部分でもある、このような形質転換細胞は、本発明の核酸断片またはベクターを増殖させるのに用いるか、または本発明のアナログの組換え産生に用いる培養細胞または細胞ラインであり得る。代わりに、形質転換細胞は、アナログの分泌、または細菌の膜もしくは細胞壁への組み込みをもたらすように核酸断片(単一または多コピー)が挿入された、適切な生ワクチン株であり得る。

【０１８３】
本発明の好ましい形質転換細胞は、細菌(エシェリヒア[たとえばイー・コリ]、バチルス(Bacillus) [例えばバチルス・サチリス(Bacillus subtilis)]、サルモネラ、またはマイコバクテリア[好ましくは非病原性の、例えばエム・ボビス　ビーシージー]種)、酵母(サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)など)、ならびに原虫のような微生物である。代わりに、形質転換細胞は真菌、昆虫細胞、植物細胞、または哺乳動物細胞のような多細胞生物に由来する。最も好ましくは、ヒト由来であるが、これは以下の細胞ラインおよびベクターの議論を参照。最近の結果は、出願人の実験室において、市場で入手可能なドロソフィラ・メラノガスター(Drosophila melanogaster)細胞ライン(Invitrogenから入手可能なスナイダー2 (S_2)細胞ラインおよびベクター系)の、ポリペプチドの組換え産生における使用に大きな見込みを示し、したがってこの発現系は特に好ましい。

【０１８４】
クローニングおよび／または最適化された発現の目的のために、形質転換細胞が本発明の核酸断片を複製することができることが好ましい。核酸断片を発現する細胞は、本発明の好ましい有用な実施形態である；これらは、本発明のアナログの小規模または大規模の製造のために、または非病原性細菌の場合には、生ワクチン中のワクチン構成成分として用いることができる。

【０１８５】
形質転換細胞により本発明のアナログを製造する場合に、少しも必須ではないが、発現産物が培地中に運び出されるか、または形質転換細胞の表面上にあるかのいずれかが便利である。

【０１８６】
効果的な産生細胞が同定された場合、それを基礎として、本発明のベクターを有し、修飾されたアミロイド産生ポリペプチドをエンコードする核酸断片を発現する安定な細胞ラインを樹立することが好ましい。好ましくは、この安定な細胞ラインは、本発明のアナログを分泌するか、有し、それによりその精製を促進する。

【０１８７】
一般に、宿主細胞に影響を与えない種に由来するレプリコンおよび調節配列を含むプラスミドベクターは、宿主と関連して用いる。ベクターは、通常、複製部位とともに、形質転換細胞において表現型の選択を提供し得るマーキング配列を有する。例えば、イー・コリは、イー・コリ種に由来するプラスミド、pBR322を用いて典型的に形質転換される(例えばBolivarら、1977参照)。pBR322プラスミドは、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性遺伝子を含み、したがって形質転換細胞を同定するのに簡単な手段を提供する。pBRプラスミド、または他の微生物のプラスミドもしくはファージは、発現のために原核細胞微生物により使用され得るプロモーターをも含まなければならないか、含むように修飾されなければならない。

【０１８８】
これらのプロモーターは、B-ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)およびラクトースプロモーター系(Changら、1978；Itakuraら、1977；Goeddelら、1979)およびトリプトファン(trp)プロモーター系(Goeddelら、1979；EP-A-0 036 776)を含む組換えDNA構築において、最も一般的に用いられる。これらは最も一般的に用いられるが、他の微生物のプロモーターが発見および使用され、これらの核酸配列に関する詳細が発表され、当業者がそれらをプラスミドベクターと機能的に連結することを可能にする(Siebwenlistら、1980)。原核生物からのある遺伝子は、人為的な手段による他のプロモーターの付加を必要とすることなく、それ自身のプロモーター配列からイー・コリにおいて効率的に発現することができる。

【０１８９】
原核生物に加えて、酵母培養のような真核微生物も用いることができ、ここでプロモーターは発現を推進することが可能であるべきである。サッカロミセス・セレビシエ、または通常のパン酵母は、真核微生物中で最も一般的に用いられるが、いくつかのその他の株も、通常、入手可能である。サッカロミセス中での発現には、たとえばプラスミドYRp7が一般的に用いられる(Stinchcombら、1979；Kingsmanら、1979；Tschemperら、1980)。このプラスミドは、トリプトファン中で成長する能力が欠失した酵母の変異株、例えばATCC No. 44076またはPEP4-1 (Jones、1977)に対して選択マーカーを提供するtrpl遺伝子を予め含む。酵母宿主細胞ゲノムの特徴としてのtrpl障害の存在は、よってトリプトファンの非存在下での成長により形質転換を検出する、効果的な環境を提供する。

【０１９０】
酵母ベクター中の適切なプロモーター配列は、3－ホスホグリセレートキナーゼ(Hitzmanら、1980)、またはエノラーゼ、グリセルアルデヒド－3－ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフラクトキナーゼ、グルコース－6－ホスフェートイソメラーゼ、3－ホスホグリセレートムターゼ、ピルベートキナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼのような他の糖分解酵素(Hessら、1968；Hollandら、1978)のプロモーターを含む。適切な発現プラスミドの構築において、これらの遺伝子に関連する終結配列は、発現ベクターの発現が所望される配列の3'に連結され、mRNAのポリアデニル化および停止を提供する。

【０１９１】
成長条件により制御される転写の付加的な利点を有するその他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシトクロムC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関する分解酵素、および上記のグリセルアルデヒド－3－ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ならびにマルトースおよびガラクトース利用に責任がある酵素のプロモーター領域である。酵母に影響を与えないプロモーター、複製起点および終結配列を含むいずれのプラスミドベクターも適切である。

【０１９２】
微生物に加えて、多細胞生物由来の細胞の培養も宿主として用いることができる。原則として、そのような細胞培養は、脊椎動物または非脊椎動物培養からのいずれであっても機能し得る。しかしながら、脊椎動物細胞における興味は最大であり、培養(組織培養)での脊椎動物の増殖は、近年、ルーチンの手順となっている(Tissue Culture、1973)。このような有用な宿主細胞ラインの例は、VEROおよびHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)細胞ラインおよびW138、BHK、COS-7 293、スポドプテラ・フルギペルダ(Spodoptera frugiperda) (SF)細胞(とりわけProtein Sciences、1000 Research Parkway、Meriden、CT 06450、U.S.A.およびInvitrogenからの完全発現系として市場で入手可能)、ならびにMDCK細胞ラインである。本発明においては、Invitrogen、PO Box 2312、9704 CH Groningen、The Netherlands から入手可能なS_2が特に好ましい細胞ラインである。

【０１９３】
このような細胞の発現ベクターは、(必要であれば)複製起点、いずれかの必要なリボソーム結合部位とともに、発現される遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAスプライス

部位、ポリアデニル化部位、および転写終結配列を通常含む。

【０１９４】

哺乳動物細胞における使用には、発現ベクター上の制御機能がウイルス材料からしばしば提供される。例えば、一般的に用いられるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、最も頻繁にはシミアンウイルス40（SV40）に由来する。SV40ウイルスの初期および後期プロモーターは、SV40ウイルスの複製起点をも含む断片としてウイルスから簡単にどちらも得られるので、特に有用である(Fiersら、1978)。ウイルスの複製起点中に位置するHindIII部位からBglI部位に広がる約250 bpの配列を含むのであれば、より小さいまたはより大きいSV40断片を用いることもできる。さらに、所望する遺伝子配列と通常関連するプロモーターまたは調節配列を用いることが、このような調節配列が宿主細胞系に影響を及ぼさないのであれば、可能であり、しばしば所望される。

【０１９５】

複製起点は、SV40またはその他のウイルス(例えばポリオーマ、アデノ、VSV、BPV)に由来するような外来の起点を含むベクターの構築により提供されるか、または宿主細胞の染色体複製機構により提供されるかのいずれかであってよい。ベクターが宿主細胞の染色体に組み込まれる場合、後者がしばしば充分である。

【０１９６】

有用なアナログの同定

天然に発生するAPPまたはAβの全ての可能な変形または修飾が、天然の形態と交差反応性である動物において抗体を誘発する能力を有するわけではないことは、当業者には明白である。しかしながら、本明細書において論じる免疫学的反応性についての最小の要求を満たす、修飾されたアミロイド産生分子の効率的な標準スクリーンを設定することは困難ではない。よって、

－ペプチド合成または遺伝子工学技術により、アミノ酸配列が動物種のAPPまたはAβのアミノ酸配列中に挿入、欠失、または置換された、本発明の、相互に別個のアナログの組を作成することにより、動物種にとって外来であるT細胞エピトープを含むアミノ酸配列の組を生じさせるか、または相互に別個のアナログの組をエンコードする核酸断片の組を作成し、

－非修飾APPまたはAβに対して、動物種による抗体産生を誘導する能力について、アナログまたは核酸断片の該組のメンバーを試験し、そして

－種における非修飾APPまたはAβに対する抗体産生を大きく誘導するアナログの組のメンバーを同定して、任意に単離するか、または動物種における非修飾APPまたはAβに対する抗体産生を大きく誘導する核酸断片の組のメンバーによりエンコードされるポリペプチド発現産物を同定して、任意に単離する

ことを含む、非修飾アミロイド産生ポリペプチドが(非免疫原性)自己タンパク質である動物種において、非修飾アミロイド産生ポリペプチドに対する抗体を誘導し得る、修飾されたアミロイド産生ポリペプチドの同定方法を用いることが可能である。

【０１９７】

この関係において、「相互に別個の修飾されたアミロイド産生ポリペプチドの組」は、例えば上記の基準(例えば円偏光二色性分光分析、NMRスペクトル、および／またはX線回折パターンとの組合わせ)に基づいて選択された、非同一のアナログの集団である。該組は、わずかなメンバーのみで構成されていてもよいが、該組は数百のメンバーを含むことができると考えられる。

組のメンバーの試験は、結局インビボで行うことができるが、本発明の目的を提供する修飾された分子の数を狭める、いくつかのインビトロ試験を適用することができる。

【０１９８】

外来T細胞エピトープを導入する目的がT細胞の助けによりB細胞応答を補助することであるので、必要条件は、T細胞増殖がアナログにより誘導されることである。T細胞増殖は、インビトロでの標準化された増殖アッセイにより試験することができる。簡単に、T細胞が豊富なサンプルを患者から得て、その後培養に維持する。培養されたT細胞を、修飾さ

れた分子で予め処理した患者のAPCに接触させ、そのT細胞エピトープを提示するように加工処理する。T細胞の増殖をモニターし、適切なコントロール(例えば、処理していない天然のアミロイド産生ポリペプチドで処理したAPCと接触させた培養中のT細胞)と比較する。代わりに、増殖は、外来T細胞のその認識に応答してT細胞により放出された適切なサイトカインの濃度を測定することにより、測定できる。

【０１９９】

組のいずれかのタイプの少なくとも1つのアナログが、APPまたはAβに対する抗体産生を誘導し得ることの可能性を高めると、動物種においてAPPまたはAβと反応し得る抗体産生を大きく誘導する、組のメンバーと、医薬上および免疫学上許容される担体および／または賦形剤および／または希釈剤および／または添加剤と、任意に少なくとも1つの医薬上および免疫学上許容されるアジュバントとを組合わせて混合することを含む、非修飾のAPCまたはAβが自己タンパク質である場合に、動物種における非修飾のAPCまたはAβに対する抗体を誘導し得る少なくとも1つのアナログを含む、免疫原性組成物を製造することが可能である。

【０２００】

ポリペプチドの組の上記の試験は、まず、本発明の、相互に別個のいくつかの核酸配列またはベクターを作成し、これらを適切な発現ベクターに挿入し、該ベクターで適切な宿主細胞を形質転換し、本発明の核酸配列の発現をもたらすことにより、適切に行われる。これらの工程に続いて、発現産物の単離を行うことができる。核酸配列および／またはベクターが、PCRのような分子増幅技術の実施を含む方法によるか、または核酸合成により作成されることが好ましい。

【０２０１】

特異的アミロイド産生標的

アルツハイマーに最もしばしば関連するタンパク質である、APP、ApoE4およびタウに加えて、それがADの脳のプラークまたはもつれに直接存在することによるか、ADの進行の危険性の増加との、その明確な遺伝子的関連のいずれかにより、ADと何らかの関連がある、その他のタンパク質が多く列挙される。全てではないとしてもそれらの抗原のほとんどが、上記のAβ、APP、プレセニリンおよびApoE4とともに、本発明のある実施形態において、推定の標的タンパク質である。これらの推定の標的は、WO 01/62284において、すでに詳細に議論されている。よって、これらの推定の標的については、ここでは短く言及するのみであり、より詳細な背景の議論は、本明細書に参照として組み込まれるWO 01/62284に見出すことができる：

α1-アンチキモトリプシン(ACT)；α2-マクログロブリン；ABAD (Aβ-ペプチド結合アルコールデヒドロゲナーゼ)；APLP1および－2 (アミロイド前駆体様タンパク質1および－2)；AMY117；Bax；Bcl-2；ブレオマイシンヒドロラーゼ；BRI/ABRI；クロモグラニンA；クラステリン/apoJ；CRF (副腎皮質ホルモン放出因子)結合タンパク質；EDTF (内皮由来傷害性因子)；ヘパラン硫酸プロテオグリカン；ヒトコラプシン応答媒介タンパク質－2 (collapsin response mediator protein-2)；ハンチントン(ハンチントン病タンパク質)；ICAM-I；IL-6；リソソーム関連抗原CD68；P21 ras；PLC-δ1 (ホスホリパーゼC アイソエンザイムδ1)；血清アミロイドP成分(SAP)；シナプトフィシン；シヌクレイン(α－シヌクレインまたはNACP)；およびTGF-b1 (トランスフォーミング成長因子b1)。

【０２０２】

ここに記載のAPPまたはAβのダウンレギュレーションの手段および方法は、これらの他のアミロイド産生ポリペプチドのいずれにも対する療法、例えば能動特異的免疫療法と組合わせることができる。

【０２０３】

アルツハイマー病とは別に、脳のアミロイドアンギオパチーも、本明細書に開示の技術の適切な標的である疾患である。

APPまたはAβに対する免疫方法のほとんどが、天然のAPPまたはAβと交差反応性の抗体を生じさせる免疫化に限定されるべきであることが考えられる。にもかかわらず、アミロイ

ド産生ポリペプチドからのMHCクラスIエピトープを提示する細胞に対するCTL応答の形態で細胞免疫を誘導することが興味の対象である場合もある－これは、APPまたはAβを産生する細胞の数の減少が深刻な副作用を構成しない場合に、好都合であり得る。CTL応答が所望される場合、出願人のWO 00/20027の教示を用いることが好ましい。これらの2つの文書の開示は、本明細書に参照として組み込まれる。

【０２０４】

免疫原担体

賦形剤として働く非免疫原性ポリマー分子、例えば多価の活性化されたポリーヒドロキシポリマーに共有結合したB細胞エピトープを提示するか、もしくは含むTヘルパーエピトープまたはAPPもしくはAβを含む分子は、上述のように、免疫学的に適切な部分のみを含むワクチン分子として機能して、それを得ることが可能であり、そして上記で開示の変形dおよびeにおける興味深い実施形態である。乱交雑の、またはいわゆるユニバーサルTヘルパーエピトープは、例えばワクチンへの標的がAPPまたはAβのような自己抗原である場合に用いることができる。さらに、免疫応答を増大させる要素は、賦形剤と共結合することができ、それによりアジュバントとして働くことができる。このような要素は、マンノース、タフトシン、ムラミルジペプチド、CpGモチーフなどであり得る。この場合、ワクチン産物の、その後のアジュバント処方は不要であり、産物は純水または食塩水中に投与することができるであろう。

【０２０５】

細胞傷害性T細胞(CTL)エピトープとTヘルパーエピトープとが結合することにより、CTLエピトープが由来する抗原に特異的なCTLを発生することも可能になる。APC、例えばマクロファージの、細胞質ゾルへの生成物の取り込みを促進する要素、例えばマンノースは、CTL－およびT細胞エピトープとともに賦形剤に共結合して、CTL応答を増大させることもできる。

【０２０６】

最終生成物中のB細胞エピトープとTヘルパーエピトープ(P2およびP30)との比は、合成工程におけるこれらのペプチドの濃度を変動させることにより変動することができる。上述したように、免疫原性分子には、例えばマンノース、タフトシン、CpGモチーフまたは他の免疫刺激物質(本明細書中に記載)を、必要により例えば該物質のアミノ化誘導体を用いて、合成工程中においてカーボネートバッファーにこれらを添加することにより、タグとして付けることができる。

【０２０７】

不溶性の活性化されたポリヒドロキシポリマーを、APPまたはAβ B細胞エピトープを含むペプチドとTヘルパーエピトープとを結合させるのに用いる場合、上述したように、固体相合成として行うことができ、最終生成物は洗浄およびろ過により回収して精製することができる。トレシル活性化されたポリヒドロキシポリマーに結合させる要素(ペプチド、タグなど)は、低いpH、例えばpH4～5においてポリヒドロキシポリマーに添加することができ、受動拡散により「ゲル」中に均一に分布することが許容される。その後、pHをpH9～10に向上させて、ペプチド上の第一級アミノ基とタグの、ポリヒドロキシポリマーのトレシル基への反応を開始することができる。ペプチドと例えば免疫刺激要素とを結合させた後、ゲルを、免疫化に適切なサイズの粒子を形成するように細かくする。

【０２０８】

このような免疫原は、したがって

a)　少なくとも1つの第一のアミノ酸配列が少なくとも1つのB細胞および／または少なくとも1つのCTLエピトープを含む、APPまたはAβ由来の少なくとも1つの第一のアミノ酸配列、ならびに

b)　外来Tヘルパー細胞エピトープを含む少なくとも1つの第二のアミノ酸配列

を含み、

少なくとも第一および少なくとも第二のアミノ酸配列のそれぞれは、医薬上許容される、活性化されたポリヒドロキシポリマー担体に結合している。

【０２０９】
アミノ酸配列がポリヒドロキシポリマーに結合するためには、アミノ酸配列との必要な連結を形成することができる適切な反応性基で、ポリヒドロキシポリマーを「活性化する」ことが通常必要である。

【０２１０】
「ポリヒドロキシポリマー」の語は、WO 00/05316中と同じ意味を有する、すなわちポリヒドロキシポリマーが、この出願中に特異的に述べられているのと全く同じ特徴を有することができることを意図する。よって、ポリヒドロキシポリマーは、水に溶解性または不溶性であり得る（よって、免疫原の製造中において異なる合成工程を必要とする）。ポリヒドロキシポリマーは、天然に発生するポリヒドロキシ化合物および合成ポリヒドロキシ化合物から選択することができる。

【０２１１】
特定の、好ましいポリヒドロキシポリマーは、アセタン(acetan)、アミロペクチン、ガム寒天(gum agar-agar)、アガロース、アルジネート、アラビアゴム、カレゲナン(carregeenan)、セルロース、シクロデキストリン、デキストラン、フルセララン(furcellaran)、ガラクトマンナン、ゼラチン、ガッティ(ghatti)、グルカン、グリコーゲン、グアー、カラヤ(karaya)、コンジャク/A (konjac/A)、ローカストビーンガム、マンナン、ペクチン、オオバコ、プルラン、スターチ、タマリン、トラガカント、ザンサン、キシラン、およびキシログルカンから選択される多糖類である。デキストランが特に好ましい。

【０２１２】
しかしながら、ポリヒドロキシポリマーは、高度に分岐したポリ(エチレンイミン) (PEI)、テトラチエニレン　ビニレン(tetrathienylene vinylene)、Kevlar (長鎖ポリパラフェニルテレフタルアミド)、ポリ(ウレタン)、ポリ(シロキサン)、ポリジメチルシロキサン、シリコン、ポリ(メチルメタクリレート) (PMMA)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(アクリル酸)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレン－酢酸ビニル) (Poly(ethylene-co-vinyl acetate))、ポリ(エチレングリコール)および誘導体、ポリ(メタクリル酸)、ポリラクチド(PLA)、ポリグリコリド(PGA)、ポリ(ラクチドーグリコリド) (Poly(lactide-co-glycolides)) (PLGA)、ポリ無水物、ならびにポリオルトエステルから選択することもできる。

【０２１３】
問題の(すなわち活性化前)ポリヒドロキシポリマーの(重量)平均分子量は、典型的に、少なくとも2,000のような少なくとも1,000、好ましくは2,500～2,000,000の範囲、より好ましくは3,000～1,000,000の範囲、特に5,000～500,000の範囲である。実施例において、平均分子量が10,000～200,000の範囲であるポリヒドロキシポリマーが特に有利であることが示されている。

【０２１４】
ポリヒドロキシポリマーは、室温において、少なくとも10 mg/ml、好ましくは、少なくとも50 mg/mlのような少なくとも25 mg/ml、特に、少なくとも150 mg/mlのような少なくとも100 mg/mlの範囲で水溶性であることが好ましい。デキストランは、本明細書に記載のように活性化されても、水溶性に関しての要件を満足することが知られている。

【０２１５】
最も興味深いポリヒドロキシポリマーのいくつかについて、活性化されていないポリヒドロキシポリマー(すなわち活性前の天然のポリヒドロキシポリマー)のC(炭素原子)とOH基(ヒドロキシ基)との間の比は、1.5～2.3のような1.3～2.5、好ましくは1.6～2.1、特に1.85～2.05の範囲内である。いずれの特定の理論に拘束されることなく、活性化されていないポリヒドロキシポリマーのC/OH比のようなものは、親水性の非常に有利なレベルを示すと考えられる。ポリビニルアルコールおよび多糖類は、この要件を満足するポリヒドロキシポリマーの例である。活性化の比がやや低いが、上記の比は、活性化されたポリヒドロキシポリマーについてほぼ同様であると考えられる。

【０２１６】
「ポリヒドロキシポリマー担体」の語は、アミノ酸配列を有する免疫原の部分を意味することを意図する。一般的な規則として、ポリヒドロキシポリマー担体は、ペプチダーゼによりアミノ酸配列が切断され得る外側の境界を有し、例えば抗原提示細胞ではそれは免疫原を加工処理する。よって、ポリヒドロキシポリマー担体は、活性化基を有するポリヒドロキシポリマーであることが可能であり、そこで活性化基とアミノ酸配列との間の結合がAPCにおいてペプチダーゼにより切断されるか、またはポリヒドロキシポリマー担体は、活性化基および例えば単一のL-アミノ酸もしくはいくつかのD-アミノ酸のようなリンカーを有するポリヒドロキシポリマーであることが可能であり、そこでリンカーの最後の部分がアミノ酸配列に結合し、APCにおいてペプチダーゼに切断される。

【０２１７】
上述したように、ポリヒドロキシポリマーは、担体にペプチドをつなぎとめることを促進する官能基(活性化基)を有する。当該技術において広い範囲の適用可能な官能基が知られており、例えばトレシル(トリフルオロエチルスルホニル)、マレイミド、p-ニトロフェニルクロロホルメート、シアノゲンブロミド、トシル(p-トルエンスルホニル)、トリフリル(トリフルオロメタンスルホニル)、ペンタフルオロベンゼンスルホニルおよびビニルスルホン基である。本発明に含む官能基の好ましい例は、トレシル、マレイミド、トシル、トリフリル、ペンタフルオロベンゼンスルホニル、p-ニトロフェニルクロロホルメートおよびビニルスルホン基であり、これらのうちトレシル、マレイミドおよびトシル基が特に適切である。

【０２１８】
トレシル活性化されたポリヒドロキシポリマーは、トレシルクロライドを用いて、WO 00/05316の実施例1のデキストランの活性化について記載のようにするか、またはGregoriusら、J. Immunol. Meth. 181 (1995) 65～73に記載のようにして製造することができる。

【０２１９】
マレイミド活性化されたポリヒドロキシポリマーは、p-マレイミドフェニルイソシアネートを用いて、WO 00/05316の実施例3のデキストランの活性化について記載のようにして製造することができる。代わりに、トレシル活性化されたポリヒドロキシポリマー(トレシル活性化デキストラン(TAD)のような)を、過剰の例えば1,3-ジアミノプロパンのようなジアミン化合物(通常、$H_2N-C_nH_{2n}-NH_2$、ここでnは1～20、好ましくは1～8)で派生させ、その後、TADに導入されたアミノ基をスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、スルホ-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)、スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(SMPB)、スルホ-スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(スルホ-SMPB)、N-γ-マレイミドブチリルオキシ-スクシンイミドエステル(GMBS)またはN-γ-マレイミドブチリルオキシ-スルホスクシンイミド　エステルのような試薬と反応させることにより、デキストランのようなポリヒドロキシポリマーにマレイミド基を導入することができる。活性化についての異なる試薬および経路により、マレイミド官能基と、活性化が行われる親のヒドロキシ基の残りの部分との間の結合に関して、形式的にわずかに異なるマレイミド活性化された産物となるが、全ておよびそれぞれが「マレイミド活性化されたポリヒドロキシポリマー」と考えられる。

【０２２０】
トシル活性化されたポリヒドロキシポリマーは、トシルクロライドを用いて、WO 00/05316の実施例2のデキストランの活性化について記載のようにして製造することができる。トリフリルおよびペンタフルオロベンゼンスルホニル活性化ポリヒドロキシポリマーは、トシルまたはトレシル活性化アナログとして、例えば対応する酸塩化物を用いることにより製造される。

【０２２１】
シアノゲンブロミド活性化されたポリヒドロキシポリマーは、従来の方法を用いてポリヒドロキシポリマーをシアノゲンブロミドと反応させることにより製造することができる。

得られる官能基は、通常、ポリヒドロキシポリマーの2つのヒドロキシ基とのシアネートエステルである。

【０２２２】

活性化の程度は、遊離のヒドロキシ基と活性化基(すなわち機能化されたヒドロキシ基)との間の比で表すことができる。ポリヒドロキシポリマーの遊離のヒドロキシ基と活性化基との間の比は、ポリヒドロキシポリマーの親水性および反応性の間の有利なバランスを得るために、250：1〜4：1の間であるべきであると考えられる。好ましくは、比が100：1〜6：1の間、より好ましくは60：1〜8：1の間、特に40：1〜10：1の間である。

【０２２３】

本発明による一般的に適用可能な免疫原の製造方法において用いる、特に興味深い活性化されたポリヒドロキシポリマーは、トレシル、トシルおよびマレイミド活性化された多糖、特にトレシル活性化されたデキストラン(TAD)、トシル活性化されたデキストラン(TosAD)、およびマレイミド活性化されたデキストラン(MAD)である。

【０２２４】

ポリヒドロキシポリマー担体とそこに結合するアミノ酸配列との間の結合は、例えばAPCにおける抗原の加工処理において活性なペプチダーゼのようなペプチダーゼにより切断可能であることが好ましい。したがって、少なくとも第一および少なくとも第二のアミノ酸配列がアミド結合またはペプチド結合を介して活性化されたポリヒドロキシポリマー担体に結合することが好ましい。少なくとも第一および少なくとも第二のアミノ酸配列のそれぞれが、窒素原子部分にそれぞれのアミノ結合を提供することが特に好ましい。

【０２２５】

ポリヒドロキシポリマー担体は、アミノ酸残基を実質的に有さず、活性化基がペプチダーゼ切断可能結合の部分を提供することを必要とするが、上述したように、担体が少なくとも1つのL-アミノ酸を含むスペーサーを単純に含んでいてもよい。にもかかわらず、少なくとも第一および少なくとも第二のアミノ酸配列は、アミノ酸配列のN末端における窒素原子を介して活性化されたバージョンのポリヒドロキシポリマーに、通常、結合する。

【０２２６】

上述の、本発明の一般的に適用可能な免疫原は、本質的に、ポリペプチドワクチンについて本明細書において記載したような免疫化方法において用いることができる。すなわち、本明細書において論じたアミロイド産生ポリペプチドのダウンレギュレーションのためのポリペプチドワクチンの投与量、投与形態および処方に関する全ての開示は、必要な変更を加えて、一般的に適用可能な免疫原に適用する。

【０２２７】

一般的に適用可能な、安全なワクチン化技術

上述したように、本発明のある好ましい実施形態は、アミロイド産生ポリペプチドに対する免疫応答を推進するであろう自己由来T_Hエピトープを提供することができないアミロイド産生ポリペプチドの変形の使用を包含する。

【０２２８】

しかしながら、抗－自己ワクチンを設計するため、および抗－自己免疫をもたらすためのこのストラテジーは、それ自体で発明な、一般的に適用可能な技術であると本発明者らは考える。ダウンレギュレーションしようとする自己抗原が体内で充分に豊富であるので免疫応答の自己刺激が起こることが可能になる場合に、特に適することを証明するべきである。したがって、本実施形態の上記の全ての開示は、APCまたはAβに対する抗－自己免疫応答の供給に関する範囲の限りでは、必要な変更を加えて、他の自己ポリペプチドに対する免疫化に適用し、特にそれらに対して充分な量で存在して、制御されない自己免疫状態の形態において免疫応答を維持するものに適用する。なぜなら、適切な自己ポリペプチドの自己T_Hエピトープは、免疫応答を推進しているからである。

【０２２９】

実施例1

ADに対する免疫化のための自己ワクチン化アプローチ

Aβタンパク質ノックアウトマウスがいずれの異常または悪い副作用を示さないという事実は、Aβの除去もしくは量の減少が安全であることを示唆する、Zheng H. (1996)。

【０２３０】

トランスジェニック動物がトランスジェニックヒトAβタンパク質に対して免疫化された、発表された実験は、自己寛容を破壊することができれば、自己反応性抗体によりAβのダウンレギュレーションを得ることができることを示唆する。これらの実験は、このようなAβのダウンレギュレーションがプラークの形成を防止し、すでに形成されたAβプラークを脳から除去することの両方を行うであろうことをさらに示唆する、Schenkら(1999)参照。しかし、伝統的に、自己タンパク質に対する抗体を産生することは可能ではない。

【０２３１】

したがって、発表されたデータは真の自己タンパク質に対する真の自己寛容を破壊する手段を提供しない。免疫応答が、それが必要であると考えられる場合に、細胞膜結合Aβ前駆体タンパク質(APP)に対してではなく、Aβ沈着にのみ、または主にそれに対して向けられていることをどのように確実にするかについての情報を提供するデータをも提供しない。現存する技術を用いて発生させた免疫応答は、制御されない方法で自己タンパク質に対する免疫応答をおそらく発生するであろうから、Aβタンパク質の部分に対する不要な過剰の自己反応性が発生するであろう。よって、現存する免疫化ストラテジーを用いることは、自己タンパク質に対する強い免疫応答を発生することができないようであり、さらにCNS中の多数の細胞上に存在する膜結合APPに対する強い交差反応性の可能性のために、安全ではない。

【０２３２】

本発明は、CNSまたは体内のその他の区画中においてプラークを形成し、深刻な疾患の原因となる可能性がある真の自己タンパク質に対する、強い制御された免疫応答を効率的に発生させる手段を提供する。安全で効果的なヒトAβタンパク質の治療ワクチンは、ADの治療のために、この技術を用いて開発される。

【０２３３】

これに鑑みて、次世紀の健康管理システムを損なうと予想される疾患であるADが治癒され、記載されたようなワクチンが、この疾患の症状の治療および進行に効果的な治療上のアプローチを少なくとも構成することができることを予測することが可能である。この技術は、ADおよび他の神経疾患におけるアミロイド沈着をブロックする、全く新しい免疫学的アプローチを表す。

【０２３４】

以下の表では、35の企画された構築物を示す。表中に示された全ての位置は、APPの開始のメチオニン(SEQ ID NO: 2中の最初のアミノ酸)に関するものであり、開始および終了のアミノ酸の両方を含み、例えば672～714断片は、アミノ酸672および714の両方を含む。P2およびP30についての開始および終了の位置は、エピトープが示された位置でAPP断片の部分を置換する(両方の位置が置換に含まれる)ことを示すーほとんどの構築物においては、導入されたエピトープは、エピトープの長さの断片を置換する。表中のアステリスクは次の意味を有する：

*) P2およびP30のただ1つの位置は、示された位置においてエピトープがAPP誘導体に挿入されたことを示す(エピトープは、与えられた位置のC末端側に近接したアミノ酸から開始する)。

**) 構築物34は、それぞれP30およびP2により分離された3つの同一のAPP断片を含む。

***) 構築物35は、P30およびP2エピトープを変化させることにより分離された9つの同一のAPP断片を含む。

【０２３５】

【表１】

APP自己ワクチン構築

変形No.	APPのaa 1に対する、APPセグメントの開始	APPのaa 1に対する、APPセグメントの終了	APPのaa 1に対する、P2エピトープの位置	APPのaa 1に対する、P30エピトープの位置	分子の長さ
1	630	770	656～670	635～655	141
2	630	714	656～670	635～655	85
3	672	770	735～749	714～728	99
4	672	770		714～728	99
5	672	770	714～728		99
6	672	770	723*	723*	135
7	672	770		723*	120
8	672	770	723*		114
9	672	714		672*	64
10	672	714		714*	64
11	672	714	672*		58
12	672	714	714*		58
13	672	714	714*	672*	79
14	672	714	680～694		43
14	672	714	685～799		43
16	672	714	690～704		43
17	672	714	695～709		43
18	672	714		675～695	43
19	672	714		680～700	43
20	672	714		685～705	43
21	672	714		690～710	43
22	672	714	680*	680*	79
23	672	714	690*	690*	79
24	672	714	700*	700*	79
25	672	714	710*	710*	79
26	672	714		680*	64
27	672	714		690*	64
28	672	714		700*	64
29	672	714		710*	64
30	672	714	680*		58
31	672	714	690*		58
32	672	714	700*		58
33	672	714	710*		58
34	672	714	リピート1の後**	リピート2の後**	165
35	672	714	34 × 3*	34 × 3***	165

【０２３６】
それに対して応答を発生するのが最も興味深いAPPの部分は、ADの脳におけるアミロイドプラークの主要な構成物である、43アミノ酸のAβコアペプチド(Aβ-43、SEQ ID NO: 2の残基672～714に相当)である。このAPP断片は、上で列挙した全ての構築の部分である。

【０２３７】
変形1および2は、モデルエピトープであるP2およびP30が位置する、Aβ-43の上流のAPP部分を含む。変形1および3～8の全ては、神経毒性であることが示されているC-100断片を含む－C-100断片は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基714～770に相当する。変形3～5において

、エピトープはC-100断片の部分を置換しているが、変形6～8ではC-100に挿入されている。

【０２３８】
変形9～35は、コアＡβ-43タンパク質のみを含む。変形9～13では、P2およびP30がＡβ-43のいずれかの末端に融合されている；14～21では、P2およびP30がＡβ-43の部分を置換している；22～33においては、P2およびP30がＡβ-43中に挿入されている；34は、それぞれP30およびP2により間隔が置かれた3つの同一のＡβ-43断片を含む；35は、交互のP2およびP30エピトープにより間隔が置かれた9つのＡβ-43の繰返しを含む。

【０２３９】
上記で論じたＡβ-43タンパク質のトランケーテッド部分も、本発明の免疫原性アナログに用いることができる。特に好ましくは、トランケートＡβ(1～42)、Ａβ(1～40)、Ａβ(1～39)、Ａβ(1～35)、Ａβ(1～34)、Ａβ(1～34)、Ａβ(1～28)、Ａβ(1～12)、Ａβ(1～5)、Ａβ(13～28)、Ａβ(13～35)、Ａβ(17～28)、Ａβ(25～35)、Ａβ(35～40)、Ａβ(36～42)およびＡβ(35～42)である(カッコ内の番号は、適切な断片を構築するＡβ-43のアミノ酸範囲を示すーＡβ(35～40)は、例えばSEQ ID NO: 2のアミノ酸706-711と同一である)。Ａβ-43のトランケーテッド部分を有するこれらの全ての変形は、本明細書に記載のＡβ断片、特に変形9、10、11、12および13を用いて作成することができる。

【０２４０】
Ａβ-43またはその断片は、変異していることが好ましい場合がある。特に好ましくは、Ａβ-43の位置35のメチオニンが、好ましくはロイシンもしくはイソロイシンで置換されているか、または単純に欠失されている置換変形である。特に好ましいアナログは、アミロイド産生ポリペプチドもしくは外来T_Hエピトープ中に天然に発生したか、または挿入されたかもしくは付加されたかのいずれかの理由により、C末端に位置する単一のメチオニンを含む。よって、外来T_Hエピトープを含むアナログの部分が、C末端に位置する可能性があるメチオニンを除いて、メチオニンを有さないことも好ましい。

【０２４１】
実際に、本発明により用いられるAPPまたはＡβの全てのアナログが、アナログ中のC末端アミノ酸として位置する単一のメチオニンを単に含み、そしてアミロイド産生ポリペプチドもしくは外来T_Hエピトープのいずれにある他のメチオニンが欠失しているか、または他のアミノ酸に置換されているかという特徴を共有することが、一般的に好ましい。

【０２４２】
さらに興味深いある変異は、Ａβ-43の位置19でのフェニルアラニンの欠失または置換であり、該変異がこのフェニルアラニン残基のプロリンへの置換であることが特に好ましい。

【０２４３】
次の表は、Ａβ-43のトランケートまたは変異とともに働く特に好ましい構築物の群を示す：

【０２４４】
【表２】

変形No.	Aβのaa 1に対する、分子において用いたAβセグメント (1-42/43)	分子のaa 1に対する、Aβセグメントの位置	分子のaa 1に対する、P2エピトープの位置	分子のaa 1に対する、P30エピトープの位置	分子の全長 (aa)
36	1～28	22～49	50～64	1～21	64
37	1～12 (a) + 13～28 (b)	1～12 (a) + 49～64 (b)	34～48	13～33	64
38	1～12 (×3)	1～12、34～45、61～72	46～60	13～33	72
39	13～28 (×3)	1～16、38～53、69～84	54～68	17～37	84
40	1～12 (a) + 13～35 (b) + 36～42 (c)	1～12 (a) + 34～56 (b) + 72～78 (c)	57～71	13～33	78
41	1～28 (×3)	1～28、50～77、93～120	78～92	29～49	120
42	1～43 (F19P/M35K)	1～43	65～79	44～64	79

【０２４５】
この表において、分子中で用いたAβセグメントは、Aβ(1-42/43)分子のアミノ酸1 (aa 1)に対するアミノ酸番号で示し、すなわち1～28は、Aβ(1-42/43)の断片1～28を分子中において用いることを意味する。2つ以上の異なるセグメントを用いる場合、両方を表中に示し、すなわち1～12 (a) + 13～28 (b)は、Aβ(1-42/43)の断片1～12および断片13～28の両方を分子中において用いることを意味する。
【０２４６】
また、同じセグメントが構築物において1以上のコピーで存在する場合、表中に示し、すなわち1～12 (×3)は、Aβ(1-42/43)の断片1～12が構築物中において3コピーで存在することを示す。
【０２４７】
さらに、分子中のAβセグメントの位置は、分子の最初のアミノ酸に対するアミノ酸の位置により示し、すなわち22～49は、問題のAβ断片が、分子のアミノ酸22からアミノ酸49に、両方の位置を含んで位置することを示す。P2およびP30エピトープの位置は、同等に示される。分子中で2つ以上のAβ断片を用いる場合、その位置を全て示し、すなわち1～12 (a) + 49～64 (b)は、断片(a)が分子中のアミノ酸1～12に位置し、断片(b)がアミノ酸49～64に位置することを示す。
【０２４８】
さらに、同じ断片の1つ以上のコピーが分子中に存在する場合、全てのコピーの位置を示し、すなわち1～12、34～45、61～72は、Aβ断片の3つのコピーが分子中に、それぞれ位置1～12、34～45および61～72に位置することを示す。
【０２４９】
最後に、各分子の全長の表示は、Aβ断片ならびにP2およびP30エピトープの両方を含む。
【０２５０】
変形42は、Aβ断片を示す欄に示すように、位置19 (pheからpro)および35 (metからlys)における2つのアミノ酸置換を含む。
【０２５１】
外来T細胞エピトープの導入のための特定の点の詳細については、図1および上記の表を参照。
【０２５２】
さらに、あるタイプの構築物が特に好ましい。本発明の目的の一つが、Aβの除去が望ま

れる場合にAPPを産生する細胞の破壊を回避することであるので、APP中に存在する場合に細胞外の相に露出しない自己ワクチン構築物を製造することが可能であると考えられる。したがって、このような構築物は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸700～714により定義されるアミノ酸断片に由来する少なくとも1つのB細胞エピトープを含むことが必要であろう。このような短いポリペプチド断片は弱い免疫原性のみであることが予想されるので、このような自己ワクチン構築物はB細胞エピトープのいくつかのコピーからなることが好ましく、すなわち本発明の詳細な開示における式Iに示す構造を有する構築物の形態であり、上記を参照。式Iのこのバージョンにおいて、アミロイドe1～アミロイドexの語は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸700～714に由来するアミノ酸配列を含む、x個のB細胞エピトープである。好ましい代案は、多糖類担体分子への、アミド結合を介したアミロイド産生(ポリ)ペプチドおよび選択された外来Tヘルパーエピトープの結合の、上記で説明した可能性である－これにより、SEQ ID NO: 2のアミノ酸700～714により構築される「弱い」エピトープの多数の提示が可能になり、B細胞およびT細胞エピトープの間の最適な比を選択することも可能になる。

【０２５３】

実施例2

Aβおよび本発明の修飾タンパク質を用いたトランスジェニックマウスの免疫化

hAB43+-34をエンコードするDNAの構築。hAB43+-34遺伝子をいくつかの工程で構築した。まず、プライマーME#800 (SEQ ID NO: 9)を鋳型として用いて、プライマーME#801 (SEQ ID NO: 10)およびME#802 (SEQ ID NO: 11)とともにPCR断片をつくった。ME#800は、イー・コリ最適コドンとともにヒトAβ-43断片をエンコードする。ME#801および802は、断片に適切な制限部位を付加する。

【０２５４】

PCR断片を精製し、NcoIおよびHindIIIで消化し、再び精製して、NcoI-HindIIIで消化して精製したpET28b+イー・コリ発現ベクターにクローン化した。野生型ヒトAβ-43をエンコードする、得られたプラスミドをpAB1と名付けた。

【０２５５】

次の工程では、Tヘルパーエピトープ、P2を分子のC末端に付加する。プライマーME#806 (SEQ ID NO: 12)は、P2エピトープをエンコードする配列を含み、よってPCR反応によりP2およびAβ-43の融合体を発生する。

【０２５６】

クローニングは、pAB1を鋳型として用いて、プライマーME#178 (SEQ ID NO: 8)およびME#806とともにPCR断片を作成することにより行った。断片を精製し、NcoIおよびHindIIIで消化し、再び精製して、NcoI-HindIIIで消化して精製したpET28b+ベクターにクローン化した。得られたプラスミドをpAB2と呼ぶ。

【０２５７】

類似の方法において、他のTヘルパーエピトープ、P30がN末端に付加されたAβ-43をエンコードする配列を有する、他のプラスミドを作成した。これは、pAB1を鋳型として用いて、プライマーME#105 (SEQ ID NO: 7)およびME#807 (SEQ ID NO: 13)とともにPCR断片を作成することにより行った。

断片を精製し、NcoIおよびHindIIIで消化し、再び精製して、NcoI-HindIIIで消化して精製したpET28b+ベクターにクローン化した。得られたプラスミドをpAB3と呼ぶ。

【０２５８】

第三の工程において、プライマーME#809 (SEQ ID NO: 14)により、プラスミドpAB2のP2エピトープのC末端に第二のAβ-43リピートを付加する。ME#809は、Aβ-43リピートの直後に、BamHI部位を同時に創る。PCR断片を、pAB2を鋳型として用いてプライマーME#178およびME#809とともに作成した。断片をNcoIおよびHindIIIで消化し、精製して、NcoI-HindIIIで消化して精製したpET28b+ベクターにクローン化した。得られたプラスミドをpAB4と名付ける。

【０２５９】

最後に、pAB3からの、P30エピトープーAβ-43リピート配列をpAB4プラスミドにクローン化した。これは、pAB3を鋳型として用いて、プライマーME#811 (SEQ ID NO: 16)およびME#105とともにPCR断片を作成することにより行った。該断片を精製し、 pAB3を鋳型として用いる、その後のME#810 (SEQ ID NO: 15) とのPCRにおいてプライマーとして用いた。得られた断片を精製し、BamHIおよびHindIIIで消化し、BamHI-HindIIIで消化して精製したpAB4プラスミドにクローン化した。得られたプラスミド、pAB5は、hAB43+-34分子をエンコードする。

【０２６０】

全てのPCRおよびクローニング手順は、Sambrook, J.、Fritsch, E.F.およびManiatis, T. 1989 "Molecular cloning: a laboratory manual"、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、N.Yに実質的に記載のようにして行った。

全てのクローニング手順において、イー・コリK-12細胞、Top-10 F'株(Stratagene、USA)を用いた。pET28b+ベクターは、Novagen、USAから購入した。すべてのプライマーは、DNA Technology、Denmarkにおいて合成した。

【０２６１】

hAB43+-34の発現と精製。pAB5によりエンコードされるhAB43+-34タンパク質を、pET28b+システム(Novagen)の供給業者により記載されたようにしてBL21-Gold (Novagen)イー・コリ細胞において発現した。

【０２６２】

発現したhAB43+-34タンパク質を、封入体を洗浄し、その後、6 M尿素存在下にBioCad精製ワークステーション(PerSeptive Biosystems、USA)を用いて、カチオン交換クロマトグラフィーを行うことにより、85%を超える純度に精製した。その後、減少した量の尿素を含む溶液に対して段階的に透析を行うことにより、尿素を除去した。最終バッファーは、10 mM Tris、pH 8.5であった。

【０２６３】

免疫化研究。ヒトAPP(アルツハイマーの前駆体タンパク質)へのマウストランスジェニックを、研究に用いた。TgRND8+と呼ばれるこれらのマウスは、マウスの脳においてAβ-40およびAβ-42の高い濃度となるAPPの変異形態を発現する(Janus, C.ら)。

【０２６４】

マウス(群あたり8〜10匹のマウス)を、Aβ-42 (SEQ ID NO: 2、残基673〜714、標準Fmocストラテジーにより合成)またはhAB43+-34変形(実施例1の表中の構築物34、組換え的に製造)のいずれかで、2週間間隔で4回免疫した。投与量は、Aβについて100 mgまたはhAB43+-34について50 mgのいずれかであった。43日目(3回の注射後)および52日目(4回の注射後)にマウスの血を採取し、血清を、直接Aβ-42 ELISA を用いて抗-Aβ-42特異的力価のレベルを測定するのに用いた。

以下の表は、平均の相対的抗-Aβ-42力価を示す。

【０２６５】

【表３】

免疫原	第43日(3免疫化後)	第52日(4免疫化後)
Aβ-42	4000	3000
hAB43+-34	16000	23000

【０２６６】

明らかに、hAB43+-34 Aβ変形で免疫して得られた抗体力価は、変化していない野生型Aβ-42を抗原として用いて得られた力価より、3および4免疫化後で、それぞれ約4倍および7.5倍高い。免疫化に用いた変形の量が、免疫に用いた野生型配列の量の50%のみであった場合に、この事実は、さらに正しい相関関係におかれる。

【０２６７】

実施例3

架橋剤として活性化されたポリヒドロキシポリマーを用いた、Aβペプチドコポリマーワ

クチンの合成。
導入。伝統的なコンジュゲートワクチンは、担体タンパク質に共有的に結合した(ポリ)ペプチドからなる。ペプチドはB細胞エピトープを含み、担体タンパク質はTヘルパーエピトープを提供する。しかしながら、担体タンパク質のほとんどは、全配列のわずかな部分しか適切なTヘルパーエピトープを含まないので、通常、Tヘルパーエピトープの起源として適切ではない。このようなエピトープは、例えば12～15アミノ酸のペプチドとして定義され、合成され得る。これらのペプチドが、例えば多価活性化されたポリヒドロキシポリマーを介してB細胞エピトープを含むペプチドに共有的に結合する場合、適切な部分のみを含むワクチン分子を得ることができる。B細胞およびT細胞エピトープの間の最適化された比を含むワクチンコンジュゲートを提供することも、さらに可能である。
【０２６８】
活性化されたポリヒドロキシポリマーの合成。デキストラン、スターチ、アガロースなどのポリヒドロキシポリマーは、N-メチルピロリジノン(NMP)中に溶解した均質合成(デキストラン)か、または例えばアセトン中における不均質合成(スターチ、アガロース、架橋デキストラン)のいずれかにより、2,2,2-トリフルオロエタンスルホニル　クロライド(トレシルクロライド)とともに活性化することができる。
【０２６９】
乾燥N-メチルピロリジノン(NMP) 225 mlを、乾燥条件下に、攪拌のための磁石を備えた500 ml丸底フラスコ中の凍結乾燥した水溶性デキストラン(4.5 g、83 mmol、臨床グレード、Mw(平均) 78000)に添加する。フラスコを磁石で攪拌しながら60℃の油浴中におく。温度を20分間かけて92℃に上昇させる。デキストランが溶解したら、フラスコを油浴中から直ちに出し、浴中の温度を40℃に下げる。フラスコをさらに磁石で攪拌しながら再び油浴中におき、トレシルクロライド(2.764 ml、25 mmol)を滴下する。15分後、乾燥ピリジン(無水、2.020 ml、25 mmol)を滴下する。フラスコを油浴から出し、室温で1時間攪拌する。生成物(トレシル活性化デキストラン、TAD)を、冷エタノール(99.9%) 1200 ml中で沈殿させる。
【０２７０】
上清を移し、2000 rpm での遠心分離により、沈殿物を50 mlのポリプロピレンチューブに回収する。沈殿物を0.5%酢酸50 mlに溶解し、0.5%酢酸5000 mlに対して2回透析して、凍結乾燥する。TADは、凍結乾燥粉末として-20℃で保存できる。
【０２７１】
アガロースや架橋デキストランのような不溶性ポリヒドロキシポリマーは、例えばアセトン中にポリヒドロキシポリマーの懸濁液をつくり、固相合成としての合成を行うことによりトレシル活性化することができる。活性化ポリヒドロキシポリマーは、ろ過により回収することができる。適切な方法は、例えばNilsson KおよびMosbach K (1987)、Methods in Enzymology 135、p. 67、ならびにHermansson GTら(1992)、"Immobilized Affinity Ligand Techniques"、Academic Press, Inc.、p. 87に報告されている。
【０２７２】
Aβペプチドコポリマーワクチンの合成。TAD (10 mg)をH_2O 100μlに溶解し、Aβ-42 (SEQ ID NO: 2、残基673～714) 5 mg、P2 (SEQ ID NO: 4) 2.5 mgおよびP30 (SEQ ID NO: 6) 2.5 mgを含むpH 9.6のカーボネートバッファー1000μlを添加する。Aβ-42 ならびにP2およびP30ペプチドは全て、保護されたリシン基を含む：これらは、1-(4,4-ジメチル-2,6-ジシクロヘキシ-1-イリデン)エチル (Dde)保護リシン基の形態にある。ペプチドを標準Fmocストラテジーにより製造するが、ここで、従来のFmoc-Lys(Boc)-OHをFmoc-Lys(Dde)-OH (Novabiochemより入手、カタログ番号04-12-1121)で置換し、すなわちリシンのε-アミノ基がBoc の代わりにDdeで保護される。
【０２７３】
pHの値を測定し、1 M HClを用いて9.6に合わせる。室温にて2.5時間後、80%溶液からのヒドラジンを最終ヒドラジン濃度8%まで添加し、溶液をさらに室温にて30分間インキュベートし、その後、直ちに凍結乾燥する。凍結乾燥した生成物をH_2Oに溶解し、最終の凍結乾

燥の前に、H_2Oに対して延長して透析する。

【０２７４】

最終生成物中のB細胞エピトープ(Aβ)およびT細胞エピトープ(P2およびP30)の間の比は、合成工程において異なる濃度のこれらのペプチドを用いることにより、変動させることができる。さらに、最終産物は、合成工程においてカーボネートバッファーにアミノ化マンノースを添加することにより、例えばマンノース(APCへのコンジュゲートを標的とするように)でタグを付加することができる。

【０２７５】

不溶性の活性化されたポリヒドロキシポリマーを、B細胞エピトープを含むペプチドおよびT細胞エピトープを結合するのに用いる場合、ポリマーへの結合は、固相合成として行うことができ、最終産物は洗浄およびろ過により回収して精製する。

【０２７６】

一般的な説明において言及したように、ペプチドベースのワクチンを製造する今回記載のアプローチは、全く合成のペプチドワクチンを製造するのが便利である場合、および問題のポリペプチド抗原が単一のペプチドにおいて充分な免疫原性を提供する場合に、いずれの他のポリペプチド抗原にも適用することができる。

【０２７７】

実施例4

合成ペプチドコポリマーワクチン

TAD (10 mg)をH_2O 100μlに溶解し、ペプチドA (興味のあるいずれの免疫原性ペプチド) 1～5 mg、P2 (ジフテリアトキソイドP2エピトープ) 1～5 mg およびP30 (ジフテリアトキソイドP30エピトープ) 1～5 mgを含むpH 9.6のカーボネートバッファー1000μlを添加する。pHの値を測定し、0.1 M HClを用いて9.6に合わせる。室温にて2.5時間後、溶液をその後直ちに凍結乾燥する。凍結乾燥した生成物をH_2Oに溶解し、最終の凍結乾燥の前に、H_2Oに対して延長して透析するか、またはゲルろ過カラム上で脱塩する。ペプチドが配列中にリシンを有する場合、リシン側鎖中のε-アミンを、合成中にFmoc-Lys(Dde)-OH 誘導体を用いてDdeにより保護するべきである (GregoriusおよびTheisen 2001、提出済み)。結合後、80%溶液からのヒドラジンを最終ヒドラジン濃度1～20%まで添加し、溶液を室温にてさらに30分間インキュベートし、その後、直ちに凍結乾燥し、最終の凍結乾燥の前に、H_2Oに対して延長して透析するか、またはゲルろ過カラム上で脱塩する。原理を図2の概略図に示す。

【０２７８】

このような免疫原は、「ペプチドA」としてのボレリア・ブルゴドルフェリのタンパク質OspCの短いC末端断片、およびペプチドBとしてのジフテリアトキソイドエピトープ(P2またはP30)とともに、本発明者らにより用いられている。この抗原による免疫化研究の結果は、OspC断片およびワクチン化したマウスのMHCハプロタイプに適合する外来ジフテリアエピトープを含む、本発明の抗原だけが、これらのマウスにおいてOspCに反応性の抗体を誘導することが可能であったことを明らかにした。これに対して、OspCペプチドのみを含む分子は、抗体産生を誘導することができず、また、一方がOspCを含み、他方がエピトープを含む、2の免疫原の混合物についても同様であった。よって、本質的でないとしても、OspCのような短いペプチドハプテンに対する抗体産生を誘導するために、同じポリヒドロキシポリマー担体への包含がより優れていると結論付ける。

【０２７９】

参考文献のリスト

Brookmeyer, R.; Gray, S.; Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer's Disease in the United States and the Public Health Impact of Delaying Disease Onset. American Journal of Public Health、88(9)、1337～1342。

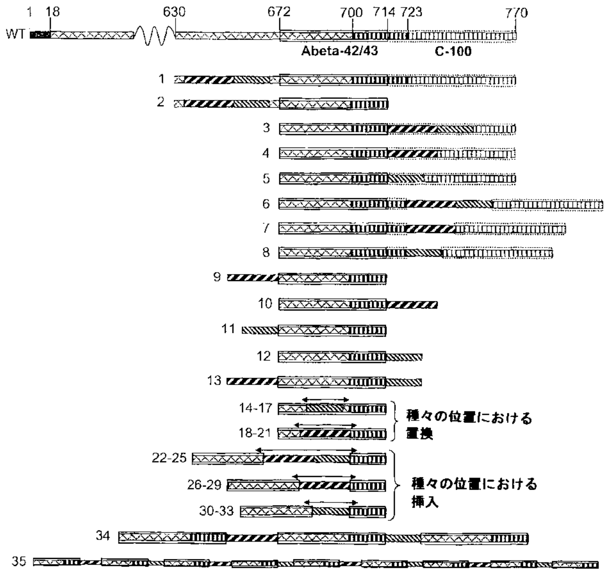
Buttini, M.; Orth, M.; Bellosta, S.; Akeefe, H.; Pitas, R.E.; Wyss Coray, T.; Mucke, L.; Mahley, R.W. (1999). Expression of Human Apolipoprotein E3 or E4 in the Brains of Apoe-/- Mice: Isoform Specific Effects on Neurodegeneration. Journal

of Neuroscience、19、4867～4880。
【０２８０】
Clark, L.N.；Poorkaj, P.；Wszolek, Z.；Geschwind, D.H.；Nasreddine, Z.S.；Miller, B.；Li, D.；Payami, H.；Awert, F.；Markopoulou, K.；Andreadis, A.；D'Souza, I.；Lee, V.M.；Reed, L.；Trojanowski, J.Q.；Zhukareva, V.；Bird, T.；Schellenberg, G.；Wilhelmsen, K.C. (1998). Pathogenic Implications of Mutations in the Tau Gene in Pallido Ponto Nigral Degeneration and Related Neurodegenerative Disorders Linked to Chromosome 17. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.、95(22)、13103～13107。
Gupta, R. K.ら(1998)、Dev Biol Stand. 92：63～78。
【０２８１】
Hsiao K.ら(1998) Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins"、Exp. Gerontol. 33 (7～8)、883～889
Hutton, M.；Lendon, C.L.；Rizzu, P.；Baker, M.；Froelich, S.；Houlden, H.；Pickering Brown, S.；Chakraverty, S.；Isaacs, A.；Grover, A.；Hackett, J.；Adamson, J.；Lincoln, S.；Dickson, D.；Davies, P.；Petersen, R.C.；Stevens, M.；de Graaff, E.；Wauters, E.；van Baren, J.；Hillebrand, M.；Joosse, M.；Kwon, J.M.；Nowotny, P.；Che, L.K.；Norton, J.；Morris, J.C.；Reed, L.E.；Trojanowski, J.；Basun, H.；Lannfelt, L.；Neystat, M.；Fahn, S.；Dark, F.；Tannenberg, T.；Dodd, P.；Hayward, N.；Kwok, J.B.J.；Schofield, P.R.；Andreadis, A.；Snowden, J.；Craufurd, D.；Neary, D.；Owen, F.；Oostra, B.A.；Hardy, J.；Goate, A.；van Swieten, J.；Mann, D.；Lynch, T.；Heutink, P. (1998). Association of Missense and 5' Splice Site Mutations in Tau with the Inherited Dementia FTDP 17. Nature、393、702～705。
【０２８２】
Janus, C.ら(2000)、Nature 408：979～982。
Kas, H.S. (1997) J Microencapsul 14：689～711
Leon, J.；Cheng, C.K.；Neumann, P.J. (1998). Alzheimer's Disease Care: Costs and Potential Savings. Health Affairs、17(6)、206～216。
Lippa C. F.ら(1998) Ab-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. Lancet 352、1117～1118
Luo, J. J.；Wallace, W.；Riccioni, T.；Ingram, D.K.；Roth, G.S.；Kusiak, J.W. (1999). Death of PC12 Cells and Hippocampal Neurons Induced by Adenoviral Mediated FAD Human Amyloid Precursor Protein Gene Expression. Journal of Neuroscience Research、55(5)、629～642。
【０２８３】
Naruse, S.；Thinakaran, G.；Luo, J. J.；Kusiak, J.W.；Tomita, T.；Iwatsubo, T.；Qian, X.；Ginty, D.D.；Price, D.L.；Borchelt, D.R.；Wong, P.C.；Sisodia, S.S. (1998). Effects of PS1 Deficiency on Membrane Protein Trafficking in Neurons. Neuron、21(5)、1213～1231。
National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease、1999、NIH Publication No. 99-4664。
Pietrobon, P.J. (1995)、Pharm Biotechnol. 6：347～61Poorkaj, P.；Bird, T.D.；Wijsman, E.；Nemens, E.；Garruto, R.M.；Anderson, L.；Andreadis, A.；Wiederhold, W.C.；Raskind, M.；Schellenberg, G.D. (1998). Tau Is a Candidate Gene for Chromosome 17 Frontotemporal Dementia. Annals of Neurology、43、815～825。
Schenk, D.；Barbour, R.；Dunn, W.；Gordon, G.；Grajeda, H.；Guido, T.；Hu, K.；Huang, J.；Johnson Wood, K.；Khan, K.；Kholodenko, D.；Lee, M.；Liao, Z.；Lieberburg, I.；Motter, R.；Mutter, L.；Soriano, F.；Shopp, G.；Vasquez, N.；Vandevert, C.；Walker, S.；Wogulis, M.；Yednock, T.；Games, D.；Seubert, P. (1999). Immunization with A beta Attenuates Alzheimer's Disease Like Pathology in the PDAPP Mo

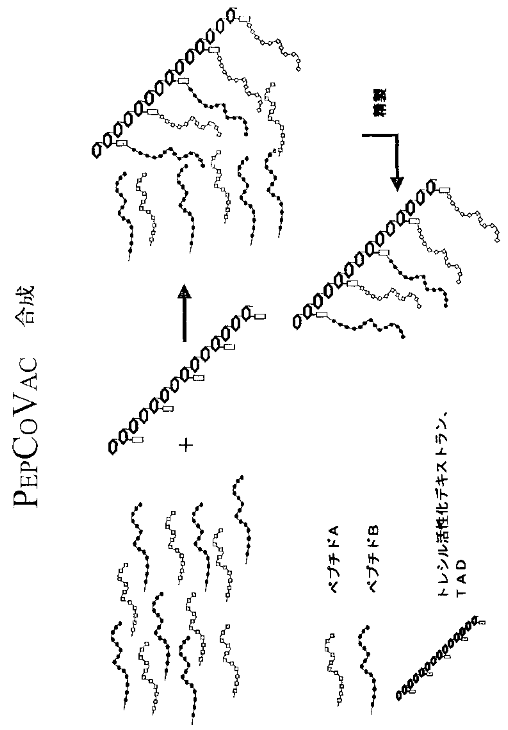
use. Nature、400(6740)、173～177。
【０２８４】
Shekunov, B.ら(1999)、J. Crystal Growth 198/199：1345～1351。
Spillantini, M.G.；Murrell, J.R.；Goedert, M.；Farlow, M.R.；Klug, A.；Ghetti, B. (1998). Mutation in the Tau Gene in Familial Multiple System Tauopathy with Presenile Dementia. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 95(13)、7737～7741。
Strittmatter, W.J.；Saunders, A.M.；Schmechel, D.；Pericak Vance, M.；Enghild, J.；Salvesen, G.S.；Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: High Avidity Binding to Aβ and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late Onset Familial Alzheimer Disease. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.、90、1977～1981。
Vidal, R.；Frangione, B.；Rostagno, A.；Mead, S.；Revesz, T.；Plant, G.；Ghiso, J. (1999). A Stop Codon Mutation in the BRI Gene Associated with Familial British Dementia. Nature、399：776～781。
Zheng H. (1996) "Mice deficient for the amyloid precursor protein gene. Ann. N Y Acad. Sci.、777、421～426。
York, P. (1999)、PSTT 11：430～440

【図面の簡単な説明】
【０２８５】
【図１】図1は、Aβタンパク質Aβ-43 (またはC-100)に対する抗体応答を発生させることを目的とした、アミロイド前駆体タンパク質に由来する自家ワクチン変異体の概略図である。
【図２】図2は、一般的に適用可能な免疫原性コンジュゲートの合成の実施形態の概略図である。

【図１】



【図２】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/015812 A2

(51) International Patent Classification[7]: A61K 39/00, 39/385, C07K 14/47, A61P 25/28

(21) International Application Number: PCT/DK02/00547

(22) International Filing Date: 20 August 2002 (20.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

PA 2001 01231	20 August 2001 (20.08.2001)	DK
60/337,543	22 October 2001 (22.10.2001)	US
PA 2002 00558	16 April 2002 (16.04.2002)	DK
60/373,027	16 April 2002 (16.04.2002)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **PHARMEXA A/S** [DK/DK]; Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **RASMUSSEN, Peter, Birk** [DK/DK]; Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK). **JENSEN, Martin, Roland** [DK/DK]; Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK). **NIELSEN, Klaus, Gregorius** [DK/DK]; Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK). **KOEFOED, Peter** [DK/DK]; Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK). **DEGAN, Florence, Dal** [DZ/DZ]; Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK).

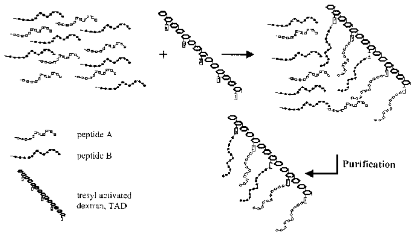
(74) Agent: **KOEFOED, Peter**; Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL METHOD FOR DOWN-REGULATION OF AMYLOID

PepCoVac Synthesis



WO 03/015812 A2

(57) Abstract: Disclosed are novel methods for combatting diseases characterized by deposition of amyloid. The methods generally rely on immunization against amyloid precursor protein (APP) or beta amyloid (Aβ). Immunization is preferably effected by administration of analogues of autologous APP or Aβ, said analogues being capable of inducing antibody production against the autologous amyloidogenic polypeptides. Especially preferred as an immunogen is autologous Aβ which has been modified by introduction of one single or a few foreign, immunodominant and promiscuous T-cell epitopes. Also disclosed are nucleic acid vaccination against APP or Aβ and vaccination using live vaccines as well as methods and means useful for the vaccination. Such methods and means include methods for the preparation of analogues and pharmaceutical formulations, as well as nucleic acid fragments, vectors, transformed cells, polypeptides and pharmaceutical formulations.

(84) **Designated States** *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

NOVEL METHOD FOR DOWN-REGULATION OF AMYLOID

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to improvements in therapy and prevention of Alzheimer's disease (AD) and other diseases characterized by deposition of amyloid, e.g. characterized by amyloid deposits in the central nervous system (CNS). More specifically, the present invention provides a method for down-regulating (undesired) deposits of amyloid by enabling the production of antibodies against a relevant protein (APP or Aβ) or components thereof in subjects suffering from or in danger of suffering from diseases having a pathology involving amyloid deposition. The invention also provides for methods of producing polypeptides useful in this method as well as for the modified polypeptides as such. Also encompassed by the present invention are nucleic acid fragments encoding the modified polypeptides as well as vectors incorporating these nucleic acid fragments and host cells and cell lines transformed therewith. Finally, the present invention also provides for a new type of conjugate peptide immunogen.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Amyloidosis is the extracellular deposition of insoluble protein fibrils leading to tissue damage and disease (Pepys, 1996; Tan et al., 1995; Kelly, 1996). The fibrils form when normally soluble proteins and peptides self-associate in an abnormal manner (Kelly, 1997).

Amyloid is associated with serious diseases including systemic amyloidosis, AD, maturity onset diabetes, Parkinson's disease, Huntington's disease, fronto-temporal dementia and the

prion-related transmissible spongiform encephalopathies (kuru and Creutzfeldt-Jacob disease in humans and scrapie and BSE in sheep and cattle, respectively) and the amyloid plaque formation in for instance Alzheimer's seems to be closely associated with the progression of human disease. In animal models over-expression, or the expression of modified forms, of proteins found in deposits, like the β-amyloid protein, has been shown to induce various symptoms of disease, e.g. Alzheimer's-like symptoms. There is no specific treatment for amyloid deposition and these diseases are usually fatal.

The subunits of amyloid fibrils may be wild-type, variant or truncated proteins, and similar fibrils can be formed in vitro from oligopeptides and denatured proteins (Bradbury et al., 1960; Filshie et al., 1964; Burke & Rougvie, 1972). The nature of the polypeptide component of the fibrils defines the character of the amyloidosis. Despite large differences in the size, native structure and function of amyloid proteins, all amyloid fibrils are of indeterminate length, unbranched, 70 to 120 Å in diameter, and display characteristic staining with Congo Red (Pepys, 1996). They are characteristic of a cross-β structure (Pauling & Corey, 1951) in which the polypeptide chain is organized in β-sheets. Although the amyloid proteins have very different precursor structures, they can all undergo a structural conversion, perhaps along a similar pathway, to a misfolded form that is the building block of the β-sheet helix protofilament.

This distinctive fibre pattern led to the amyloidoses being called the β-fibrilloses (Glenner, 1980a,b), and the fibril protein of AD was named the β-protein before its secondary structure was known (Glenner & Wong, 1984). The characteristic

cross-β diffraction pattern, together with the fibril appearance and tinctorial properties are now the accepted diagnostic hallmarks of amyloid, and suggest that the fibrils, although formed from quite different protein precursors, share a degree of structural similarity and comprise a structural superfamily, irrespective of the nature of their precursor proteins (Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CCFJ Mol Biol 1997 Oct 31; 273(3):729-739).

One of the most widespread and well-known diseases where amyloid deposits in the central nervus system are suggested to have a central role in the progression of the disease, is AD.

AD

Alzheimer's disease (AD) is an irreversible, progressive brain disorder that occurs gradually and results in memory loss, behavioural and personality changes, and a decline in mental abilities. These losses are related to the death of brain cells and the breakdown of the connections between them. The course of this disease varies from person to person, as does the rate of decline. On average, AD patients live for 8 to 10 years after they are diagnosed, though the disease can last for up to 20 years.

AD advances by stages, from early, mild forgetfulness to a severe loss of mental function. This loss is known as dementia. In most people with AD, symptoms first appear after the age of 60, but earlier onsets are not infrequent. The earliest symptoms often include loss of recent memory, faulty judgment, and changes in personality. Often, people in the initial stages of AD think less clearly and forget the names of familiar people and common objects. Later in the disease, they may forget how to do even simple tasks. Eventually, people with AD lose all

reasoning ability and become dependent on other people for their everyday care. Ultimately, the disease becomes so debilitating that patients are bedridden and likely to develop other illnesses and infections. Most commonly, people with AD die from pneumonia.

Although the risk of developing AD increases with age, AD and dementia symptoms are not a part of normal aging. AD and other dementing disorders are caused by diseases that affect the brain. In normal aging, nerve cells in the brain are not lost in large numbers. In contrast, AD disrupts three key processes: Nerve cell communication, metabolism, and repair. This disruption ultimately causes many nerve cells to stop functioning, lose connections with other nerve cells, and die.

At first, AD destroys neurons in parts of the brain that control memory, especially in the hippocampus and related structures. As nerve cells in the hippocampus stop functioning properly, short-term memory fails, and often, a person's ability to do easy and familiar tasks begins to decline. AD also attacks the cerebral cortex, particularly the areas responsible for language and reasoning. Eventually, many other areas of the brain are involved, all these brain regions atrophy (shrink), and the AD patient becomes bedridden, incontinent, totally helpless, and unresponsive to the outside world (source: National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

The Impact of AD

AD is the most common cause of dementia among people age 65 and older. It presents a major health problem because of its enormous impact on individuals, families, the health care system, and society as a whole. Scientists estimate that up to 4

million people currently suffer from the disease, and the prevalence doubles every 5 years beyond age 65. It is also estimated that approximately 360,000 new cases (incidence) will occur each year, though this number will increase as the population ages (Brookmeyer *et al.*, 1998).

AD puts a heavy economic burden on society. A recent study in the United States estimated that the annual cost of caring for one AD patient is $18,408 for a patient with mild AD, $30,096 for a patient with moderate AD, and $36,132 for a patient with severe AD. The annual national cost of caring for AD patients in the US is estimated to be slightly over $50 billion (Leon *et al.*, 1998).

Approximately 4 million Americans are 85 or older, and in most industrialized countries, this age group is one of the fastest growing segments of the population. It is estimated that this group will number nearly 8.5 million by the year 2030 in the US; some experts who study population trends suggest that the number could be even greater. As more and more people live longer, the number of people affected by diseases of aging, including AD, will continue to grow. For example, some studies show that nearly half of all people age 85 and older have some form of dementia. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999)

The Main Characteristics of AD

Two abnormal structures in the brain are the hallmarks of AD: amyloid plaques and neurofibrillary tangles (NFT). Plaques are dense, largely insoluble deposits of protein and cellular material outside and around the brain's neurons. Tangles are insoluble twisted fibres that build up inside neurons.

Two types of AD exist: familial AD (FAD), which follows a certain pattern of inheritance, and sporadic AD, where no obvious pattern of inheritance is seen. Because of differences in the age at onset, AD is further described as early-onset (occurring in people younger than 65) or late-onset (occurring in those 65 and older). Early-onset AD is rare (about 10 percent of cases) and generally affects people aged 30 to 60. Some forms of early-onset AD are inherited and run in families. Early-onset AD also often progresses faster than the more common, late-onset form.

All FADs known so far have an early onset, and as many as 50 percent of FAD cases are now known to be caused by defects in three genes located on three different chromosomes. These are mutations in the APP gene on chromosome 21; mutations in a gene on chromosome 14, called presenilin 1; and mutations in a gene on chromosome 1, called presenilin 2. There is as yet no evidence, however, that any of these mutations play a major role in the more common, sporadic or non-familial form of late-onset AD. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999)

Amyloid Plaques

In AD, amyloid plaques develop first in areas of the brain used for memory and other cognitive functions. They consist of largely insoluble deposits of beta amyloid (hereinafter designated Aβ) - a protein fragment of a larger protein called amyloid precursor protein (APP, the amino acid sequence of which is set forth in SEQ ID NO: 2) - intermingled with portions of neurons and with non-nerve cells such as microglia and astrocytes. It is not known whether amyloid plaques themselves constitute the main cause of AD or whether they are a

by-product of the AD process. Certainly, changes in the APP protein can cause AD, as shown in the inherited form of AD caused by mutations in the APP gene, and Aβ plaque formation seems to be closely associated with the progression of the human disease (Lippa C. F. *et al.* 1998).

APP

APP is one of many proteins that are associated with cell membranes. After it is made, APP becomes embedded in the nerve cell's membrane, partly inside and partly outside the cell. Recent studies using transgenic mice demonstrate that APP appears to play an important role in the growth and survival of neurons. For example, certain forms and amounts of APP may protect neurons against both short- and long-term damage and may render damaged neurons better able to repair themselves and help parts of neurons grow after brain injury.

While APP is embedded in the cell membrane, proteases act on particular sites in APP, cleaving it into protein fragments. One protease helps cleave APP to form Aβ, and another protease cleaves APP in the middle of the amyloid fragment so that Aβ cannot be formed. The Aβ formed is of two different lengths, a shorter 40 (or 41) amino acids Aβ that is relatively soluble and aggregates slowly, and a slightly longer, 42 amino acids "sticky" Aβ that rapidly forms insoluble clumps. While Aβ is being formed, it is not yet known exactly how it moves through or around nerve cells. In the final stages of this process, the "sticky" Aβ aggregates into long filaments outside the cell and, along with fragments of dead and dying neurons and the microglia and astrocytes, forms the plaques that are characteristic of AD in brain tissue.

Some evidence exists that the mutations in APP render more likely that Aβ will be snipped out of the APP precursor, thus causing either more total Aβ or relatively more of the "sticky" form to be made. It also appears that mutations in the presenilin genes may contribute to the degeneration of neurons in at least two ways: By modifying Aβ production or by triggering the death of cells more directly. Other researchers suggest that mutated presenilins 1 and 2 may be involved in accelerating the pace of apoptosis.

It is to be expected that as the disease progresses, more and more plaques will be formed, filling more and more of the brain. Studies suggest that it may be that the Aβ is aggregating and disaggregating at the same time, in a sort of dynamic equilibrium. This raises the hope that it may be possible to break down the plaques even after they have formed. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

It is believed that Aβ is toxic to neurons. In tissue culture studies, researchers observed an increase in death of hippocampal neurons cells engineered to over-express mutated forms of human APP compared to neurons over-expressing the normal human APP (Luo *et al.*, 1999).

Furthermore, overexpression or the expression of modified forms of the Aβ protein has in animal models been demonstrated to induce Alzheimer-like symptoms, (Hsiao K. *et al.*, 1998)

Given that increased Aβ generation, its aggregation into plaques, and the resulting neurotoxicity may lead to AD, it is of therapeutic interest to investigate conditions under which Aβ aggregation into plaques might be slowed down or even blocked.

Presenilins

Mutations in presenilin-1 (S-180) account for almost 50% of all cases of early-onset familial AD (FAD). Around 30 mutations have been identified that give rise to AD. The onset of AD varies with the mutations. Mutations in presenilin-2 account for a much smaller part of the cases of FAD, but is still a significant factor. It is not known whether presenilins are involved in sporadic non-familial AD. The function of the presenilins is not known, but they appear to be involved in the processing of APP to give Aβ-42 (the longer stickier form of the peptide, SEQ ID NO: 2, residues 673-714), since AD patients with presenilin mutations have increased levels of this peptide. It is unclear whether the presenilins also have a role in causing the generation of NFT's. Some suggest that presenilins could also have a more direct role in the degeneration of neurons and neuron death. Presenilin-1 is located at chromosome 14 while presenilin-2 is linked to chromosome 1. If a person harbours a mutated version of just one of these genes he or she is almost certain to develop early onset AD.

There is some uncertainty to whether presenilin-1 is identical to the hypothetical gamma-secretase involved in the processing of APP (Naruse et al., 1998).

Apolipoprotein E

Apolipoprotein E is usually associated with cholesterol, but is also found in plaques and tangles of AD brains. While alleles 1-3 do not seem to be involved in AD there is a significant correlation between the presence of the APOE-ε4 allele and development of late AD (Strittmatter et al., 1993). It is, however, a risk factor and not a direct cause as is the case

for the presenilin and APP mutations and it is not limited to familial AD.

The ways in which the ApoE ε4 protein increases the likelihood of developing AD are not known with certainty, but one possible theory is that it facilitates Aβ buildup and this contributes to lowering the age of onset of AD, or the presence or absence of particular APOE alleles may affect the way neurons respond to injury (Buttini et al., 1999).

Also Apo A1 has been shown to be amyloigenic. Intact apo A1 can itself form amyloid-like fibrils *in vitro* that are Congo red positive (Am J Pathol 147 (2): 238-244 (Aug 1995), Wisniewski T, Golabek AA, Kida E, Wisniewski KE, Frangione B).

There seem to be some contradictory results indicating that there is a positive effect of the APOE-ε4 allele in decreasing symptoms of mental loss, compared to other alleles (Stern, Brandt, 1997, Annals of Neurology 41).

Neurofibrillary Tangles

This second hallmark of AD consists of abnormal collections of twisted threads found inside nerve cells. The chief component of tangles is one form of a protein called tau (τ). In the central nervous system, tau proteins are best known for their ability to bind and help stabilize microtubules, which are one constituent of the cell's internal support structure, or skeleton. However, in AD tau is changed chemically, and this altered tau can no longer stabilize the microtubules, causing them to fall disintegrate. This collapse of the transport system may at first result in malfunctions in communication between nerve cells and may later lead to neuronal death.

In AD, chemically altered tau twists into paired helical filaments - two threads of tau that are wound around each other. These filaments are the major substance found in neurofibrillary tangles. In one recent study, researchers found neurofibrillary changes in fewer than 6 percent of the neurons in a particular part of the hippocampus in healthy brains, in more than 43 percent of these neurons in people who died with mild AD, and in 71 percent of these neurons in people who died with severe AD. When the loss of neurons was studied, a similar progression was found. Evidence of this type supports the idea that the formation of tangles and the loss of neurons progress together over the course of AD. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

Tauopathies and Tangles

Several neurodegenerative diseases, other than AD, are characterized by the aggregation of tau into insoluble filaments in neurons and glia, leading to dysfunction and death. Very recently, several groups of researchers, who were studying families with a variety of hereditary dementias other than AD, found the first mutations in the tau gene on chromosome 17 (Clark *et al.*, 1998; Hutton *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998). In these families, mutations in the tau gene cause neuronal cell death and dementia. These disorders which share some characteristics with AD but differ in several important respects, are collectively called "fronto temporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17" (FTDP-17). They are diseases such as Parkinson's disease, some forms of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), corticobasal degeneration, progressive supranuclear palsy, and Pick's disease, and are all characterized by abnormal aggregation of tau protein.

Other AD-like neurological diseases.

There are important parallels between AD and other neurological diseases, including prion diseases (such as kuru, Creutzfeld-Jacob disease and bovine spongiform encephalitis), Parkinson's disease, Huntington's disease, and fronto-temporal dementia. All involve deposits of abnormal proteins in the brain. AD and prion diseases cause dementia and death, and both are associated with the formation of insoluble amyloid fibrils, but from membrane proteins that are different from each other.

Scientists studying Parkinson's disease, the second most common neurodegenerative disorder after AD, discovered the first gene linked to the disease. This gene codes for a protein called synuclein, which, intriguingly, is also found in the amyloid plaques of AD patients' brains (Lavedan C, 1998, Genome Res. 8(9): 871-80). Investigators have also discovered that genetic defects in Huntington's disease, another progressive neurodegenerative disorder that causes dementia, cause the Huntington protein to form into insoluble fibrils very similar to the Aβ fibrils of AD and the protein fibrils of prion disease, (Scherzinger E, *et al.*, 1999, PNAS U.S.A. 96(8): 4604-9).

Scientists have also discovered a novel gene, which when mutated, is responsible for familial British dementia (FBD), a rare inherited disease that causes severe movement disorders and progressive dementia similar to that seen in AD. In a biochemical analysis of the amyloid fibrils found in the FBD plaques, a unique peptide named ABri was found (Vidal *et al.*, 1999). A mutation at a particular point along this gene results in the production of a longer-than-normal Bri protein.

The ABri peptide, which is snipped from the mutated end of the Bri protein is deposited as amyloid fibrils. These plaques are thought to lead to the neuronal dysfunction and dementia that characterizes FBD.

Immunization with Aβ

The immune system will normally take part in the clearing of foreign protein and proteinaceous particles in the organism but the deposits associated with the above-mentioned diseases consist mainly of self-proteins, thereby rendering the role of the immune system in the control of these diseases less obvious. Further, the deposits are located in a compartment (the CNS) normally separated from the immune system, both facts suggesting that any vaccine or immunotherapeutical approach would be unsuccessful.

Nevertheless, scientists have recently attempted immunizing mice with a vaccine composed of heterologous human Aβ and a substance known to excite the immune system (Schenk *et al.*, 1999 and WO 99/27944). The vaccine was tested in a partial transgenic mouse model of AD with a human mutated gene for APP inserted into the DNA of the mouse. The mice produced the modified APP protein and developed amyloid plaques as they grew older. This mouse model was used to test whether vaccination against the modified transgenic *human* APP had an effect on plaque build-up. In a first experiment, one group of transgenic mice was given monthly injections of the vaccine starting at 6 weeks of age and ending at 11 months. A second group of transgenic mice received no injections and served as a control group. By 13 months of age, the mice in the control group had plaques covering 2 to 6 percent of their brains. In contrast, the immunized mice had virtually no plaques.

In a second experiment, the researchers began the injections at 11 months, when some plaques had already developed. Over a 7-month period, the control transgenic mice had a 17-fold increase in the amount of plaque in their brains, whereas those who received the vaccine had a 99-percent decrease compared to the 18-month-old control transgenic mice. In some mice, some of the pre-existing plaque deposits appeared to have been removed by the treatment. It was also found that other plaque-associated damage, such as inflammation and abnormal nerve cell processes, lessened as a result of the immunization.

The above is thus a preliminary study in mice and for example, scientists need to find out whether vaccinated mice remain healthy in other respects and whether memory of those vaccinated remains normal. Furthermore, because the mouse model is not a complete representation of AD (the animals do not develop neurofibrillary tangles nor do many of their neurons die), additional studies will be necessary to determine whether humans have a similar or different reaction from mice. Another issue to consider is that the method may perhaps "cure" amyloid deposition but fail to stop development of dementia.

Technical issues present major challenges as well. For example it is unlikely that it is even possible, using this technology, to create a vaccine which enables humans to raise antibodies against their own proteins. So numerous issues of safety and effectiveness will need to be resolved before any tests in humans can be considered.

The work by Schenk *et al.* thus shows that if it was possible to generate a strong immune response towards self-proteins in

proteinaceous deposits in the central nervus system such as the plaques formed in AD, it is possible to both prevent the formation of the deposits and possibly also clear already formed plaques.

Recently, clinical trials using the above-discussed Aβ vaccines have been terminated due to adverse effects: A number of the vaccinated subjects developed chronic encephalitis that may be due to an uncontrolled autoimmunity against Aβ in the CNS.

OBJECT OF THE INVENTION

The object of the present invention is to provide novel therapies against conditions characterized by deposition of amyloid, such as AD. A further object is to develop an autovaccine against amyloid, in order to obtain a novel treatment for AD and for other pathological disorders involving amyloid deposition.

SUMMARY OF THE INVENTION

Described herein is the use of an autovaccination technology for generating strong immune responses against otherwise non-immunogenic APP and Aβ Described is also the preparation of such vaccines for the prevention, possible cure or alleviation of the symptoms of such diseases associated with amyloid deposits.

Thus, in its broadest and most general scope, the present invention relates to a method for *in vivo* down-regulation of

amyloid precursor protein (APP) or beta amyloid (Aβ) in an animal, including a human being, the method comprising effecting presentation to the animal's immune system of an immunogenically effective amount of at least one analogue of APP or Aβ that incorporates into the same molecule at least one B-cell epitope of APP and/or Aβ and at least one foreign T-helper epitope (T_H epitope) so that immunization of the animal with the analogue induces production of antibodies against the animal's autologous APP or Aβ, wherein the analogue

a) is a polyamino acid that consists of at least one copy of a subsequence of residues 672-714 in SEQ ID NO: 2, wherein the foreign T_H epitope is incorporated by means of amino acid addition and/or insertion and/or deletion and/or substitution, wherein the subsequence is selected from the group consisting of residues 1-42, residues 1-40, residues 1-39, residues 1-35, residues 1-34, residues 1-28, residues 1-12, residues 1-5, residues 13-28, residues 13-35, residues 17-28, residues 25-35, residues 35-40, residues 36-42 and residues 35-42 of the amino acid sequence consisting of amino acid residues 673-714 of SEQ ID NO: 2; and/or

b) is a polyamino acid that contains the foreign T_H epitopes and a disrupted APP or Aβ sequence so that the analogue does not include any subsequence of SEQ ID NO: 2 that binds productively to MHC class II molecules initiating a T-cell response; and/or

c) is a polyamino acid that comprises the foreign T_H epitope and APP or Aβ derived amino acids, and comprises 1 single methionine residue located in the C-terminus of the analogue, wherein other methionine residues in APP

or Aβ and in the foreign T_H epitope have been substituted or deleted, and preferably have been substituted by leucin or isoleucine; and/or

d) is a conjugate comprising a polyhydroxypolymer backbone to which is separately coupled a polyamino acid as defined in a) and/or a polyamino acid as defined in b) and/or a polyamino acid as defined in c); and/or

e) is a conjugate comprising a polyhydroxypolymer backbone to which is separately coupled 1) the foreign T_H epitope and 2) a polyamino acid selected from the group consisting of a subsequence as defined in a), a disrupted sequence of APP or Aβ as defined in b), and an APP or Aβ derived amino acid sequence that comprises 1 single methionine residue located in the C-terminus, wherein other methionine residues in APP or Aβ and in the foreign T_H epitope have been substituted or deleted, and preferably have been substituted by leucin or isoleucine.

The present assignee has previously filed an international patent application directed to safe vaccination strategies against amyloidogenic polypeptides such as APP and Aβ, cf. WO 01/62284. This application was not published on the filing date of the present application and further does not contain details concerning the above-mentioned useful analogues of APP and Aβ.

The invention also relates to analogues of the APP and Aβ as well as to nucleic acid fragments encoding a subset of these. Also immunogenic compositions comprising the analogues or the nucleic acid fragments are part of the invention.

LEGEND TO THE FIGURE

Fig. 1: Schematic depiction of Autovac variants derived from the amyloid precursor protein with the purpose of generating antibody responses against the Aβ protein Aβ-43 (or C-100). The APP is shown schematically at the top of the figure and the remaining schematic constructs show that the model epitopes P2 and P30 are substituted or inserted into various truncations of APP. In the figure, the black pattern indicates the APP signal sequence, two-way cross-hatching is the extracellular part of APP, dark vertical hatching is the transmembrane domain of APP, light vertical hatching is the intracellular domain of APP, coarse cross-hatching indicates the P30 epitope, and fine cross-hatching indicates the P2 epitope. The full line box indicates Aβ-42/43 and the full-line box and the dotted line box together indicate C-100. "Abeta" denotes Aβ.

Fig. 2: Schematic depiction of an embodiment of the synthesis of generally applicable immunogenic conjugates. Peptide A (any antigenic sequence, e.g. an Aβ sequence described herein) and peptide B (an amino acid sequence including a foreign T-helper epitope are synthesized and mixed. After that they are contacted with a suitable activated polyhydroxypolymer, peptides A and B are attached via the activation group in a ration corresponding to the initial ratio between these two substances in the peptide mixture. Cf. Example 4 for details.

DETAILED DISCLOSURE OF THE INVENTION

Definitions

In the following a number of terms used in the present specification and claims will be defined and explained in de-

tail in order to clarify the metes and bounds of the invention.

The terms "amyloid" and "amyloid protein" which are used interchangeably herein denote a class of proteinaceous unbranched fibrils of indeterminate length. Amyloid fibrils display characteristic staining with Congo Red and share a cross-β structure in which the polypeptide chain is organized in β-sheets. Amyloid is generally derived from amyloidogenic proteins which have very different precursor structures but which can all undergo a structural conversion to a misfolded form that is the building block of the β-sheet helix protofilament. Normally, the diameter of amyloid fibrils varies between about 70 to about 120 Å.

The term "amyloidogenic protein" is intended to denote a polypeptide which is involved in the formation of amyloid deposits, either by being part of the deposits as such or by being part of the biosynthetic pathway leading to the formation of the deposits. Hence, examples of amyloidogenic proteins are APP and Aβ, but also proteins involved in the metabolism of these may be amyloidogenic proteins.

An "amyloid polypeptide" is herein intended to denote polypeptides comprising the amino acid sequence of the above-discussed amyloidogenic proteins derived from humans or other mammals (or truncates thereof sharing a substantial amount of B-cell epitopes with an intact amyloidogenic protein) - an amyloidogenic polypeptide can therefore e.g. comprise substantial parts of a precursor for the amyloidogenic polypeptide (in the case of Aβ, one possible amyloid polypeptide could be APP derived). Also unglycosylated forms of amyloidogenic polypeptides which are prepared in prokaryotic system are included

within the boundaries of the term as are forms having varying glycosylation patterns due to the use of e.g. yeasts or other non-mammalian eukaryotic expression systems. It should, however, be noted that when using the term "an amyloidogenic polypeptide" it is intended that the polypeptide in question is normally non-immunogenic when presented to the animal to be treated. In other words, the amyloidogenic polypeptide is a self-protein or is an analogue of such a self-protein which will not normally give rise to an immune response against the amyloidogenic of the animal in question.

An "analogue" is an APP or Aβ derived molecule that incorporates one or several changes in its molecular structure. Such a change can e.g. be in the form of fusion of APP or Aβ polyamino acids to a suitable fusion partner (*i.e.* a change in primary structure exclusively involving C- and/or N-terminal additions of amino acid residues) and/or it can be in the form of insertions and/or deletions and/or substitutions in the polypeptide's amino acid sequence. Also encompassed by the term are derivatized APP or Aβ derived molecules, cf. the discussion below of modifications of APP or Aβ. In some cases the analogue may be constructed so as to be less able or even unable to elicit antibodies against the normal precursor protein(s) of the amyloid, thereby avoiding undesired interference with the (physiologically normal) non-aggregated form of the polypeptide being a precursor of the amyloid protein.

It should be noted that the use as a vaccine in a human of a xeno-analogue (e.g. a canine or porcine analogue) of a human APP or Aβcan be imagined to produce the desired immunity against the APP or Aβ. Such use of an xeno-analogue for immunization is also considered part of the invention.

The term "polypeptide" is in the present context intended to mean both short peptides of from 2 to 10 amino acid residues, oligopeptides of from 11 to 100 amino acid residues, and polypeptides of more than 100 amino acid residues. Furthermore, the term is also intended to include proteins, *i.e.* functional biomolecules comprising at least one polypeptide; when comprising at least two polypeptides, these may form complexes, be covalently linked, or may be non-covalently linked. The polypeptide(s) in a protein can be glycosylated and/or lipidated and/or comprise prosthetic groups. Also, the term "polyamino acid" is an equivalent to the term "polypeptide"

The terms "T-lymphocyte" and "T-cell" will be used interchangeably for lymphocytes of thymic origin which are responsible for various cell mediated immune responses as well as for helper activity in the humoral immune response. Likewise, the terms "B-lymphocyte" and "B-cell" will be used interchangeably for antibody-producing lymphocytes.

The term "subsequence" means any consecutive stretch of at least 3 amino acids or, when relevant, of at least 3 nucleotides, derived directly from a naturally occurring amyloid amino acid sequence or nucleic acid sequence, respectively.

The term "animal" is in the present context in general intended to denote an animal species (preferably mammalian), such as *Homo sapiens*, *Canis domesticus*, etc. and not just one single animal. However, the term also denotes a population of such an animal species, since it is important that the individuals immunized according to the method of the invention all harbour substantially the same APP or Aβ allowing for immunization of the animals with the same immunogen(s). It will be clear to the skilled person that an animal in the present con-

text is a living being which has an immune system. It is preferred that the animal is a vertebrate, such as a mammal.

By the term "*in vivo* down-regulation of APP or Aβ" is herein meant reduction in the living organism of the total amount of deposited amyloid protein (or amyloid as such) of the relevant type. The down-regulation can be obtained by means of several mechanisms: Of these, simple interference with amyloid by antibody binding so as to prevent misaggregation is the most simple. However, it is also within the scope of the present invention that the antibody binding results in removal of amyloid by scavenger cells (such as macrophages and other phagocytic cells) and that the antibodies interfer with other amyloidogenic polypeptides which lead to amyloid formation. A further possibility is that antibodies bind Aβ outside the CNS, thereby effectively removing Aβ from the CNS via a simple mass action principle.

The expression "effecting presentation ... to the immune system" is intended to denote that the animal's immune system is subjected to an immunogenic challenge in a controlled manner. As will appear from the disclosure below, such challenge of the immune system can be effected in a number of ways of which the most important are vaccination with polypeptide containing "pharmaccines" (*i.e.* a vaccine which is administered to treat or ameliorate ongoing disease) or nucleic acid "pharmaccine" vaccination. The important result to achieve is that immune competent cells in the animal are confronted with the antigen in an immunologically effective manner, whereas the precise mode of achieving this result is of less importance to the inventive idea underlying the present invention.

The term "immunogenically effective amount" has its usual meaning in the art, *i.e.* an amount of an immunogen, which is capable of inducing an immune response that significantly engages pathogenic agents sharing immunological features with the immunogen.

When using the expression that the APP or Aβ has been "modified" is herein meant that a chemical modification of the polypeptide has been performed on APP or Aβ. Such a modification can e.g. be derivatization (e.g. alkylation) of certain amino acid residues in the sequence, but as will be appreciated from the disclosure below, the preferred modifications comprise changes of the primary structure of the amino acid sequence.

When discussing "autotolerance towards APP or Aβ" it is understood that since the polypeptide is a self-protein in the population to be vaccinated, normal individuals in the population do not mount an immune response against the polypeptide; it cannot be excluded, though, that occasional individuals in an animal population might be able to produce antibodies against the native polypeptide, e.g. as part of an autoimmune disorder. At any rate, an animal will normally only be autotolerant towards its own APP or Aβ, but it cannot be excluded that analogues derived from other animal species or from a population having a different phenotype would also be tolerated by said animal.

A "foreign T-cell epitope" (or: "foreign T-lymphocyte epitope") is a peptide which is able to bind to an MHC molecule and which stimulates T-cells in an animal species. Preferred foreign T-cell epitopes in the invention are "promiscuous" epitopes, *i.e.* epitopes which bind to a substantial fraction

of a particular class of MHC molecules in an animal species or population. Only a very limited number of such promiscuous T-cell epitopes are known, and they will be discussed in detail below. Promiscuous T-cell epitopes are also denoted "universal" T-cell epitopes. It should be noted that in order for the immunogens which are used according to the present invention to be effective in as large a fraction of an animal population as possible, it may be necessary to 1) insert several foreign T-cell epitopes in the same analogue or 2) prepare several analogues wherein each analogue has a different promiscuous epitope inserted. It should be noted also that the concept of foreign T-cell epitopes also encompasses use of cryptic T-cell epitopes, *i.e.* epitopes which are derived from a self-protein and which only exerts immunogenic behaviour when existing in isolated form without being part of the self-protein in question.

A "foreign T helper lymphocyte epitope" (a foreign T_H epitope) is a foreign T cell epitope, which binds an MHC Class II molecule and can be presented on the surface of an antigen presenting cell (APC) bound to the MHC Class II molecule.

A "functional part" of a (bio)molecule is in the present context intended to mean the part of the molecule which is responsible for at least one of the biochemical or physiological effects exerted by the molecule. It is well-known in the art that many enzymes and other effector molecules have an active site which is responsible for the effects exerted by the molecule in question. Other parts of the molecule may serve a stabilizing or solubility enhancing purpose and can therefore be left out if these purposes are not of relevance in the context of a certain embodiment of the present invention. For instance it is possible to use certain cytokines as a modifying moiety

in APP or Aβ (cf. the detailed discussion below), and in such a case, the issue of stability may be irrelevant since the coupling to the APP or Aβmay provide the stability necessary.

The term "adjuvant" has its usual meaning in the art of vaccine technology, *i.e.* a substance or a composition of matter which is 1) not in itself capable of mounting a specific immune response against the immunogen of the vaccine, but which is 2) nevertheless capable of enhancing the immune response against the immunogen. Or, in other words, vaccination with the adjuvant alone does not provide an immune response against the immunogen, vaccination with the immunogen may or may not give rise to an immune response against the immunogen, but the combined vaccination with immunogen and adjuvant induces an immune response against the immunogen which is stronger than that induced by the immunogen alone.

"Targeting" of a molecule is in the present context intended to denote the situation where a molecule upon introduction in the animal will appear preferentially in certain tissue(s) or will be preferentially associated with certain cells or cell types. The effect can be accomplished in a number of ways including formulation of the molecule in composition facilitating targeting or by introduction in the molecule of groups, which facilitate targeting. These issues will be discussed in detail below.

"Stimulation of the immune system" means that a substance or composition of matter exhibits a general, non-specific immunostimulatory effect. A number of adjuvants and putative adjuvants (such as certain cytokines) share the ability to stimulate the immune system. The result of using an immunostimulating agent is an increased "alertness" of the immune system

meaning that simultaneous or subsequent immunization with an immunogen induces a significantly more effective immune response compared to isolated use of the immunogen.

"Productive binding" means binding of a peptide to the MHC molecule (Class I or II) so as to be able to stimulate T-cells that engage a cell that present the peptide bound to the MHC molecule. For instance, a peptide bound to an MHC Class II molecule on the surface of an APC is said to be productively bound if this APC will stimulate a T_H cell that binds to the presented peptide-MHC Class II complex.

Preferred embodiments of amyloid down-regulation

It is preferred that the analogue used as an immunogen in the method of the invention is a modified APP or Aβ molecule wherein at least one change is present in the amino acid sequence of the APP or Aβ, since the chances of obtaining the all-important breaking of autotolerance is greatly facilitated that way - this is e.g. evident from the results presented in Example 2 herein, where immunization with wild-type Aβ is compared to immunization with an Aβ variant molecule. It has been shown (in Dalum I *et al.*, 1996, J. Immunol. **157**: 4796-4804) that potentially self-reactive B-lymphocytes recognizing self-proteins are physiologically present in normal individuals. However, in order for these B-lymphocytes to be induced to actually produce antibodies reactive with the relevant self-proteins, assistance is needed from cytokine producing T-helper lymphocytes (T_H-cells or T_H-lymphocytes). Normally this help is not provided because T-lymphocytes in general do not recognize T-cell epitopes derived from self-proteins when presented by antigen presenting cells (APCs). However, by providing an element of "foreignness" in a self-protein (*i.e.* by introducing

an immunologically significant modification), T-cells recognizing the foreign element are activated upon recognizing the foreign epitope on an APC (such as, initially, a mononuclear cell). Polyclonal B-lymphocytes (which are also APCs) capable of recognising self-epitopes on the modified self-protein also internalise the antigen and subsequently presents the foreign T-cell epitope(s) thereof, and the activated T-lymphocytes subsequently provide cytokine help to these self-reactive polyclonal B-lymphocytes. Since the antibodies produced by these polyclonal B-lymphocytes are reactive with different epitopes on the modified polypeptide, including those which are also present in the native polypeptide, an antibody cross-reactive with the non-modified self-protein is induced. In conclusion, the T-lymphocytes can be led to act as if the population of polyclonal B-lymphocytes have recognised an entirely foreign antigen, whereas in fact only the inserted epitope(s) is/are foreign to the host. In this way, antibodies capable of *cross-reacting* with non-modified self-antigens are induced.

Several ways of modifying a peptide self-antigen in order to obtain breaking of autotolerance are known in the art. It is nevertheless preferred that the analogue according to the present invention includes

- at least one first moiety is introduced which effects targeting of the modified molecule to an antigen presenting cell (APC), and/or

- at least one second moiety is introduced which stimulates the immune system, and/or

- at least one third moiety is introduced which optimizes presentation of the analogue to the immune system.

However, all these modifications should be carried out while maintaining a substantial fraction of the original B-lymphocyte epitopes in the APP or Aβ, since the B-lymphocyte recognition of the native molecule is thereby enhanced.

In one preferred embodiment, side groups (in the form of the foreign T-cell epitopes or the above-mentioned first, second and third moieties) are covalently or non-covalently introduced. This is to mean that stretches of amino acid residues derived from the APP or Aβ are derivatized without altering the primary amino acid sequence, or at least without introducing changes in the peptide bonds between the individual amino acids in the chain.

An alternative, and preferred, embodiment utilises amino acid substitution and/or deletion and/or insertion and/or addition (which may be effected by recombinant means or by means of peptide synthesis; modifications which involves longer stretches of amino acids can give rise to fusion polypeptides). One especially preferred version of this embodiment is the technique described in WO 95/05849, which discloses a method for down-regulating self-proteins by immunising with analogues of the self-proteins wherein a number of amino acid sequence(s) has been substituted with a corresponding number of amino acid sequence(s) which each comprise a foreign immunodominant T-cell epitope, while at the same time maintaining the overall tertiary structure of the self-protein in the analogue. For the purposes of the present invention, it is however sufficient if the modification (be it an insertion, addition, deletion or substitution) gives rise to a foreign T-cell epitope and at the same time preserves a substantial number of the B-cell epitopes in the APP or Aβ. However, in order to obtain maximum efficacy of the immune response induced, it is

preferred that the overall tertiary structure of the APP or Aβ is maintained in the modified molecule.

In some cases, it is preferred that the APP or Aβ or fragments thereof are mutated. Especially preferred are substitution variants where the methionine in position 35 in Aβ-43 has been substituted, preferably with leucine or isoleucine, or simply deleted. Especially preferred analogues contain one single methionine that is located in the C-terminus, either because it is naturally occurring in the amyloidogenic polypeptide or foreign T_H epitope, or because it has been inserted or added. Hence, it also preferred that the part of the analogue that includes the foreign T_H epitope is free from methionine, except from the possible C-terminal location of a methionine.

The main reason for removing all but one methionine is that it becomes possible to recombinantly prepare multimeric analogues that can be subsequently cleaved by cyanogenbromide to leave the single analogues. The advantage is, that recombinant production becomes facilitated this way.

In fact, it is generally preferred that all analogues of APP or Aβ that are used according to the present invention share the characteristic of merely including one single methionine that is positioned as the C-terminal amino acid in the analogue and that other methionines in either the amyloidogenic polypeptide or the foreign T_H epitope are deleted or substituted for another amino acid.

One further interesting mutation is a deletion or substitution of the phenylalanine in position 19 in Aβ-43, and it is especially preferred that the mutation is a substitution of this phenylalanine residue with a proline.

Other interesting polyamino acids to be used in the analogues are truncated parts of the Aβ-43 protein. These can also be employed in immunogenic analogues according to the present invention. Especially preferred are the truncates Aβ(1-42), Aβ(1-40), Aβ(1-39), Aβ(1-35), Aβ(1-34), Aβ(1-34), Aβ(1-28), Aβ(1-12), Aβ(1-5), Aβ(13-28), Aβ(13-35), Aβ(17-28), Aβ(25-35), Aβ(35-40), Aβ(36-42), and Aβ(35-42) (where the numbers in the parentheses indicate the amino acid stretches of Aβ-43 that constitute the relevant fragment - Aβ(35-40) is e.g. identical to amino acids 706-711 in SEQ ID NO: 2). All these variants with truncated parts of Aβ-43 can be made with the Aβ fragments described herein, in particular with variants 9, 10, 11, 12, and 13 mentioned in Example 1.

The following formula describes the molecular constructs generally covered by the invention:

$$(MOD_1)_{s1}(amyloid_{e1})_{n1}(MOD_2)_{s2}(amyloid_{e2})_{n2}\ldots\ldots(MOD_x)_{sx}(amyloid_{ex})_{nx} \quad (I)$$

-where $amyloid_{e1}$-$amyloid_{ex}$ are x B-cell epitope containing subsequences of APP or Aβ which independently are identical or non-identical and which may contain or not contain foreign side groups, x is an integer ≥ 3, n1-nx are x integers ≥ 0 (at least one is ≥ 1), MOD_1-MOD_x are x modifications introduced between the preserved B-cell epitopes, and s_1-s_x are x integers ≥ 0 (at least one is ≥ 1 if no side groups are introduced in the $amyloid_{ex}$ sequences). Thus, given the general functional restraints on the immunogenicity of the constructs, the invention allows for all kinds of permutations of the original sequence of the APP or Aβ, and all kinds of modifications therein. Thus, included in the invention are modified APP or Aβ obtained by omission of parts of the sequence which e.g. ex-

hibit adverse effects *in vivo* or omission of parts which are normally intracellular and thus could give rise to undesired immunological reactions.

One preferred version of the constructs outlined above are, when applicable, those where the B-cell epitope containing subsequence of an amyloid protein is not extracellularly exposed in the precursor polypeptide from which the amyloid is derived. By making such a choice of the epitopes, it is ensured that antibodies are not generated which would be reactive with the cells producing the precursor and thereby the immune response which is generated becomes limited to an immune response against the undesired amyloid deposits. In this case it will e.g. be feasible to induce immunity against epitopes of APP or Aβ which are only exposed to the extracellular phase when being free from any coupling to the cells from which they are produced.

Maintenance of a substantial fraction of B-cell epitopes or even the overall tertiary structure of a protein which is subjected to modification as described herein can be achieved in several ways. One is simply to prepare a polyclonal antiserum directed against the polypeptide in question (e.g. an antiserum prepared in a rabbit) and thereafter use this antiserum as a test reagent (e.g. in a competitive ELISA) against the modified proteins which are produced. Modified versions (analogues) which react to the same extent with the antiserum as does the APP or Aβ must be regarded as having the same overall tertiary structure as APP or Aβ whereas analogues exhibiting a limited (but still significant and specific) reactivity with such an antiserum are regarded as having maintained a substantial fraction of the original B-cell epitopes.

Alternatively, a selection of monoclonal antibodies reactive with distinct epitopes on the APP or Aβ can be prepared and used as a test panel. This approach has the advantage of allowing 1) an epitope mapping of the APP or Aβ and 2) a mapping of the epitopes which are maintained in the analogues prepared.

Of course, a third approach would be to resolve the 3-dimensional structure of the APP or Aβ or of a biologically active truncate thereof (cf. above) and compare this to the resolved three-dimensional structure of the analogues prepared. Three-dimensional structure can be resolved by the aid of X-ray diffraction studies and NMR-spectroscopy. Further information relating to the tertiary structure can to some extent be obtained from circular dichroism studies which have the advantage of merely requiring the polypeptide in pure form (whereas X-ray diffraction requires the provision of crystallized polypeptide and NMR requires the provision of isotopic variants of the polypeptide) in order to provide useful information about the tertiary structure of a given molecule. However, ultimately X-ray diffraction and/or NMR are necessary to obtain conclusive data since circular dichroism can only provide indirect evidence of correct 3-dimensional structure via information of secondary structure elements.

One preferred embodiment of the invention utilises multiple presentations of B-lymphocyte epitopes of APP or Aβ (*i.e.* formula I wherein at least one B-cell epitope is present in two positions). This effect can be achieved in various ways, e.g. by simply preparing fusion polypeptides comprising the structure (APP or Aβ derived polypeptide)$_m$, where m is an integer $\geq$ 2 and then introduce the modifications discussed herein in at

least one of the APP or Aβ sequences. It is preferred that the modifications introduced includes at least one duplication of a B-lymphocyte epitope and/or the introduction of a hapten. These embodiments including multiple presentations of selected epitopes are especially preferred in situations where merely minor parts of the APP or Aβ are useful as constituents in a vaccine agent.

As mentioned above, the introduction of a foreign T-cell epitope can be accomplished by introduction of at least one amino acid insertion, addition, deletion, or substitution. Of course, the normal situation will be the introduction of more than one change in the amino acid sequence (e.g. insertion of or substitution by a complete T-cell epitope) but the important goal to reach is that the analogue, when processed by an antigen presenting cell (APC), will give rise to such a foreign immunodominant T-cell epitope being presented in context of an MCH Class II molecule on the surface of the APC. Thus, if the amino acid sequence of the APP or Aβ in appropriate positions comprises a number of amino acid residues which can also be found in a foreign T_H epitope then the introduction of a foreign T_H epitope can be accomplished by providing the remaining amino acids of the foreign epitope by means of amino acid insertion, addition, deletion and substitution. In other words, it is not necessary to introduce a complete T_H epitope by insertion or substitution in order to fulfill the purpose of the present invention.

It is preferred that the number of amino acid insertions, deletions, substitutions or additions is at least 2, such as 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, and 25 insertions, substitutions, additions or deletions. It is furthermore preferred that the number of amino acid inser-

tions, substitutions, additions or deletions is not in excess of 150, such as at most 100, at most 90, at most 80, and at most 70. It is especially preferred that the number of substitutions, insertions, deletions, or additions does not exceed 60, and in particular the number should not exceed 50 or even 40. Most preferred is a number of not more than 30. With respect to amino acid additions, it should be noted that these, when the resulting construct is in the form of a fusion polypeptide, is often considerably higher than 150.

Preferred embodiments of the invention includes modification by introducing at least one foreign immunodominant T-cell epitope. It will be understood that the question of immune dominance of a T-cell epitope depends on the animal species in question. As used herein, the term "immunodominance" simply refers to epitopes which in the vaccinated individual/population gives rise to a significant immune response, but it is a well-known fact that a T-cell epitope which is immunodominant in one individual/population is not necessarily immunodominant in another individual of the same species, even though it may be capable of binding MHC-II molecules in the latter individual. Hence, for the purposes of the present invention, an immune dominant T-cell epitope is a T-cell epitope which will be effective in providing T-cell help when present in an antigen. Typically, immune dominant T-cell epitopes has as an inherent feature that they will substantially always be presented bound to an MHC Class II molecule, irrespective of the polypeptide wherein they appear.

Another important point is the issue of MHC restriction of T-cell epitopes. In general, naturally occurring T-cell epitopes are MHC restricted, *i.e.* a certain peptides constituting a T-cell epitope will only bind effectively to a subset of MHC

Class II molecules. This in turn has the effect that in most cases the use of one specific T-cell epitope will result in a vaccine component which is only effective in a fraction of the population, and depending on the size of that fraction, it can be necessary to include more T-cell epitopes in the same molecule, or alternatively prepare a multi-component vaccine wherein the components are variants of APP or Aβ which are distinguished from each other by the nature of the T-cell epitope introduced.

If the MHC restriction of the T-cells used is completely unknown (for instance in a situation where the vaccinated animal has a poorly defined MHC composition), the fraction of the population covered by a specific vaccine composition can be approximated by means of the following formula

$$f_{population} = 1 - \prod_{i=1}^{n} (1 - p_i) \qquad \text{(II)}$$

-where p_i is the frequency in the population of responders to the i^{th} foreign T-cell epitope present in the vaccine composition, and n is the total number of foreign T-cell epitopes in the vaccine composition. Thus, a vaccine composition containing 3 foreign T-cell epitopes having response frequencies in the population of 0.8, 0.7, and 0.6, respectively, would give

$$1 - 0.2 \times 0.3 \times 0.4 = 0.976$$

-*i.e.* 97.6 percent of the population will statistically mount an MHC-II mediated response to the vaccine.

The above formula does not apply in situations where a more or less precise MHC restriction pattern of the peptides used is known. If, for instance a certain peptide only binds the human MHC-II molecules encoded by HLA-DR alleles DR1, DR3, DR5, and

DR7, then the use of this peptide together with another peptide which binds the remaining MHC-II molecules encoded by HLA-DR alleles will accomplish 100% coverage in the population in question. Likewise, if the second peptide only binds DR3 and DR5, the addition of this peptide will not increase the coverage at all. If one bases the calculation of population response purely on MHC restriction of T-cell epitopes in the vaccine, the minimum fraction of the population covered by a specific vaccine composition can be determined by means of the following formula:

$$f_{population} = 1 - \prod_{j=1}^{3}(1-\varphi_j)^2 \qquad \text{(III)}$$

-wherein φ_j is the sum of frequencies in the population of allelic haplotypes encoding MHC molecules which bind any one of the T-cell epitopes in the vaccine and which belong to the j^{th} of the 3 known HLA loci (DP, DR and DQ); in practice, it is first determined which MHC molecules will recognize each T-cell epitope in the vaccine and thereafter these are listed by type (DP, DR and DQ) - then, the individual frequencies of the different listed allelic haplotypes are summed for each type, thereby yielding φ_1, φ_2, and φ_3.

It may occur that the value p_i in formula II exceeds the corresponding theoretical value π_i:

$$\pi_i = 1 - \prod_{j=1}^{3}(1-\nu_j)^2 \qquad \text{(IV)}$$

-wherein υ_j is the sum of frequencies in the population of allelic haplotype encoding MHC molecules which bind the i^{th} T-cell epitope in the vaccine and which belong to the j^{th} of the 3 known HLA loci (DP, DR and DQ). This means that in $1-\pi_i$ of the population is a frequency of responders of $f_{residual_i} = (p_i-$

π_i)/(1-π_i). Therefore, formula III can be adjusted so as to yield formula V:

$$f_{population} = 1 - \prod_{j=1}^{3}(1-\varphi_j)^2 + \left(1 - \prod_{i=1}^{n}(1 - f_{residual_i})\right) \qquad (V)$$

-where the term 1-$f_{residual-i}$ is set to zero if negative. It should be noted that formula V requires that all epitopes have been haplotype mapped against identical sets of haplotypes.

Therefore, when selecting T-cell epitopes to be introduced in the analogue, it is important to include all knowledge of the epitopes which is available: 1) The frequency of responders in the population to each epitope, 2) MHC restriction data, and 3) frequency in the population of the relevant haplotypes.

There exist a number of naturally occurring "promiscuous" T-cell epitopes which are active in a large proportion of individuals of an animal species or an animal population and these are preferably introduced in the vaccine thereby reducing the need for a very large number of different analogues in the same vaccine.

The promiscuous epitope can according to the invention be a naturally occurring human T-cell epitope such as epitopes from tetanus toxoid (e.g. the P2 and P30 epitopes), diphtheria toxoid, Influenza virus hemagluttinin (HA), and *P. falciparum* CS antigen.

Over the years a number of other promiscuous T-cell epitopes have been identified. Especially peptides capable of binding a large proportion of HLA-DR molecules encoded by the different HLA-DR alleles have been identified and these are all possible T-cell epitopes to be introduced in the analogues used according to the present invention. Cf. also the epitopes discussed

in the following references which are hereby all incorporated by reference herein: WO 98/23635 (Frazer IH *et al.*, assigned to The University of Queensland); Southwood S *et. al*, 1998, J. Immunol. **160**: 3363-3373; Sinigaglia F *et al.*, 1988, Nature **336**: 778-780; Chicz RM *et al.*, 1993, J. Exp. Med **178**: 27-47; Hammer J *et al.*, 1993, Cell **74**: 197-203; and Falk K *et al.*, 1994, Immunogenetics **39**: 230-242. The latter reference also deals with HLA-DQ and -DP ligands. All epitopes listed in these 5 references are relevant as candidate natural epitopes to be used in the present invention, as are epitopes which share common motifs with these.

Alternatively, the epitope can be any artificial T-cell epitope which is capable of binding a large proportion of MHC Class II molecules. In this context the pan DR epitope peptides ("PADRE") described in WO 95/07707 and in the corresponding paper Alexander J *et al.*, 1994, Immunity **1**: 751-761 (both disclosures are incorporated by reference herein) are interesting candidates for epitopes to be used according to the present invention. It should be noted that the most effective PADRE peptides disclosed in these papers carry D-amino acids in the C- and N-termini in order to improve stability when administered. However, the present invention primarily aims at incorporating the relevant epitopes as part of the analogue which should then subsequently be broken down enzymatically inside the lysosomal compartment of APCs to allow subsequent presentation in the context of an MHC-II molecule and therefore it is not expedient to incorporate D-amino acids in the epitopes used in the present invention.

One especially preferred PADRE peptide is the one having the amino acid sequence AKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 17) or an immunologically effective subsequence thereof. This, and other

epitopes having the same lack of MHC restriction are preferred T-cell epitopes which should be present in the analogues used in the inventive method. Such super-promiscuous epitopes will allow for the most simple embodiments of the invention wherein only one single analogue is presented to the vaccinated animal's immune system.

As mentioned above, the modification of the APP or Aβ can also include the introduction of a first moiety which targets the modified amyloidogenic polypeptide to an APC or a B-lymphocyte. For instance, the first moiety can be a specific binding partner for a B-lymphocyte specific surface antigen or for an APC specific surface antigen. Many such specific surface antigens are known in the art. For instance, the moiety can be a carbohydrate for which there is a receptor on the B-lymphocyte or the APC (e.g. mannan or mannose). Alternatively, the second moiety can be a hapten. Also an antibody fragment which specifically recognizes a surface molecule on APCs or lymphocytes can be used as a first moiety (the surface molecule can e.g. be an FCγ receptor of macrophages and monocytes, such as FCγRI or, alternatively any other specific surface marker such as CD40 or CTLA-4). It should be noted that all these exemplary targeting molecules can be used as part of an adjuvant also, cf. below.

As an alternative or supplement to targeting the analogue to a certain cell type in order to achieve an enhanced immune response, it is possible to increase the level of responsiveness of the immune system by including the above-mentioned second moiety which stimulates the immune system. Typical examples of such second moieties are cytokines, and heat-shock proteins or molecular chaperones, as well as effective parts thereof.

Suitable cytokines to be used according to the invention are those which will normally also function as adjuvants in a vaccine composition, *i.e.* for instance interferon γ (IFN-γ), interleukin 1 (IL-1), interleukin 2 (IL-2), interleukin 4 (IL-4), interleukin 6 (IL-6), interleukin 12 (IL-12), interleukin 13 (IL-13), interleukin 15 (IL-15), and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF); alternatively, the functional part of the cytokine molecule may suffice as the second moiety. With respect to the use of such cytokines as adjuvant substances, cf. the discussion below.

According to the invention, suitable heat-shock proteins or molecular chaperones used as the second moiety can be HSP70, HSP90, HSC70, GRP94 (also known as gp96, cf. Wearsch PA *et al.* 1998, Biochemistry **37**: 5709-19), and CRT (calreticulin).

Alternatively, the second moiety can be a toxin, such as listeriolycin (LLO), lipid A and heat-labile enterotoxin. Also, a number of mycobacterial derivatives such as MDP (muramyl dipeptide), CFA (complete Freund's adjuvant) and the trehalose diesters TDM and TDE are interesting possibilities.

Also the possibility of introducing a third moiety which enhances the presentation of the analogue to the immune system is an important embodiment of the invention. The art has shown several examples of this principle. For instance, it is known that the palmitoyl lipidation anchor in the *Borrelia burgdorferi* protein OspA can be utilised so as to provide self-adjuvating polypeptides (cf. e.g. WO 96/40718) - it seems that the lipidated proteins form up micelle-like structures with a core consisting of the lipidation anchor parts of the polypeptides and the remaining parts of the molecule protruding therefrom, resulting in multiple presentations of the antigenic determi-

nants. Hence, the use of this and related approaches using different lipidation anchors (e.g. a myristyl group, a myristyl group, a farnesyl group, a geranyl-geranyl group, a GPI-anchor, and an N-acyl diglyceride group) are preferred embodiments of the invention, especially since the provision of such a lipidation anchor in a recombinantly produced protein is fairly straightforward and merely requires use of e.g. a naturally occurring signal sequence as a fusion partner for the analogue. Another possibility is use of the C3d fragment of complement factor C3 or C3 itself (cf. Dempsey *et al.*, 1996, Science **271**, 348-350 and Lou & Kohler, 1998, Nature Biotechnology **16**, 458-462).

An alternative embodiment of the invention which also results in the preferred presentation of multiple (e.g. at least 2) copies of the important epitopic regions of APP or Aβ to the immune system is the covalent coupling of the analogue to certain molecules, *i.e.* variants d and e mentioned above. For instance, polymers can be used, e.g. carbohydrates such as dextran, cf. e.g. Lees A et al., 1994, Vaccine 12: 1160-1166; Lees A et al., 1990, J Immunol. 145: 3594-3600, but also mannose and mannan are useful alternatives. Integral membrane proteins from e.g. E. coli and other bacteria are also useful conjugation partners. The traditional carrier molecules such as keyhole limpet hemocyanin (KLH), tetanus toxoid, diphtheria toxoid, and bovine serum albumin (BSA) are also preferred and useful conjugation partners.

Preferred embodiments of covalent coupling of the APP or Aβ derived material to polyhydroxypolymers such as carbohydrates involve the use of at least one APP or Aβ derived peptide and at least one foreign T-helper epitope which are coupled separately to the polyhydroxypolymer (i.e. the foreign T-helper

epitope and the APP or Aβ derived amino acid sequence are not fused to each other but rather bound to the polyhydroxypolymer which then serves as a carrier backbone). Again, such an embodiment is most preferred when the suitable B-cell epitope carrying regions of the APP or Aβ derived peptides are constituted by short peptide stretches - this is because this approach is one very convenient way to achieve multiple presentations of selected epitopes in the resulting immunogenic agent. It is, however, also possible to simply coupled analogues already described herein to the polyhydroxypolymer backbone, *i.e.* that the APP or Aβ derived material is not attached to the backbone separately from the foreign T_H epitopes.

It is especially preferred that the coupling of the foreign T-helper epitope and the APP or Aβ derived (poly)peptide is by means of an amide bond which can be cleaved by a peptidase. This strategy has the effect that APCs will be able to take up the conjugate and at the same time be able to process the conjugate and subsequently present the foreign T-cell epitope in an MHC Class II context.

One way of achieving coupling of peptides (both the APP or Aβ derived peptide of interest as well as the foreign epitope) is to activate a suitable polyhydroxypolymer with tresyl (trifluoroethylsulphonyl) groups or other suitable activation groups such as maleimido, p-Nitrophenyl cloroformate (for activation of OH groups and formation of a peptide bond between peptide and polyhydroxypolymer), and tosyl (p-toluenesulfonyl). It is e.g. possible to prepare activated polysaccharides as described in WO 00/05316 and US 5,874,469 (both incorporated by reference herein) and couple these to APP or Aβ derived peptides or polyamino acids as well as to T-cell epi-

topes prepared by means of conventional solid or liquid phase peptide synthesis techniques. The resulting product consists of a polyhydroxypolymer backbone (e.g. a dextran backbone) that has, attached thereto by their N-termini or by other available nitrogen moieties, polyamino acids derived from APP or Aβ and from foreign T-cell epitopes. If desired, it is possible to synthesise the APP or Aβ peptides so as to protect all available amino groups but the one at the N-terminus, subsequently couple the resulting protected peptides to the tresylated dextran moiety, and finally de-protecting the resulting conjugate. A specific example of this approach is described in the examples below.

Instead of using the water-soluble polysaccharide molecules as taught in WO 00/05316 and US 5,874,469, it is equally possible to utilise cross-linked polysaccharide molecules, thereby obtaining a particulate conjugate between polypeptides and polysaccharide - this is believed to lead to an improved presentation to the immune system of the polypeptides, since two goals are reached, namely to obtain a local deposit effect when injecting the conjugate and to obtain particles which are attractive targets for APCs. The approach of using such particulate systems is also detailed in the examples.

Considerations underlying chosen areas of introducing modifications in APP or Aβ are a) preservation of known and predicted B-cell epitopes, b) preservation of tertiary structure, c) avoidance of B-cell epitopes present on "producer cells" etc. At any rate, as discussed above, it is fairly easy to screen a set of analogues which have all been subjected to introduction of a T-cell epitope in different locations.

Since the most preferred embodiments of the present invention involve down-regulation of human Aβ, it is consequently preferred that the APP or Aβpolypeptide discussed above is a human Aβ polypeptide. In this embodiment, it is especially preferred that the APP or Aβ polypeptide has been modified by substituting at least one amino acid sequence in SEQ ID NO: 2 with at least one amino acid sequence of equal or different length and containing a foreign T_H epitope. Preferred examples of modified amyloidogenic APP and Aβ are shown schematically in Fig. 1 using the P2 and P30 epitopes as examples. The rationale behind such constructs is discussed in detail in the examples.

More specifically, a T_H containing (or completing) amino acid sequence which is introduced into SEQ ID NO: 2 may be introduced at any amino acid in SEQ ID NO: 2. That is, the introduction is possible after any of amino acids 1-770, but preferably after any of amino acids 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, and 714 in SEQ ID NO: 2. This may be combined with deletion of any or all of amino acids 1-671, or any of all of amino acids 715-770. Furthermore, when utilising the technique of substitution, any one of amino acids 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, and 714 in SEQ ID NO: 2 may be deleted in combination with the introduction.

Another embodiment of the present invention is the presentation of the analogues which do not include any subsequence of

of SEQ ID NO: 2 that binds productively to MHC class II molecules initiating a T-cell response.

The rationale behind such a strategy for design of the immunogen that engages the immune system to induce e.g. an anti-Aβ immune response is the following: It has been noted that when immunizing with abundant autologous proteins such as Aβ formulated in an adjuvant which is sufficiently strong to break the body's tolerance towards the autologous protein, there is a danger that in some vaccinated individuals the immune response induced cannot be discontinued simply by discontinueing the immunisation. This is because the induced immune response in such individuals is most likely driven by a native T_H epitope of the autologous protein, and this has the adverse effect that the vaccinated individual's own protein will be able to function as an immunizing agent in its own right: An autoimmune condition has thus been established.

The preferred methods including use of foreign T_H epitopes have to the best of the inventors' knowledge never been observed to produce this effect, because the anti-self immune response is driven by a *foreign* T_H epitope, and it has been repeatedly demonstrated by the inventors that the induced immune response invoked by the preferred technology indeed declines after discontinuation of immunizations. However, in theory it could happen in a few individuals that the immune response would also be driven by an autologous T_H epitope of the relevant self-protein one immunises against) - this is especially relevant when considering self-proteins that are relatively abundant, such as Aβ, whereas other therapeutically relevant self-proteins are only present locally or in so low amounts in the body, that a "self-immunization effect" is not a possibility. One very simple way of avoiding this is hence to altogether

avoid inclusion in the immunogen of peptide sequences that *could* serve as T_H epitopes (and since peptides shorter than about 9 amino acids cannot serve as T_H epitopes, the use of shorter fragments is one simple and feasible approach). Therefore, this embodiment of the invention also serves to ensure that the immunogen does not indlude peptide sequences of the target APP or Aβ that could serve as "self-stimulating T_H epitopes" including sequences that merely contain conservative substitutions in a sequence of the target protein that might otherwise function as a T_H epitope.

Preferred embodiments of the immune system presentation of the analogues of the APP or Aβ involve the use of a chimeric peptide comprising at least one APP or Aβ derived peptide, which does not bind productively to MHC class II molecules, and at least one foreign T-helper epitope. Moreover, it is preferred that the APP or Aβ derived peptide harbours a B-cell epitope. It is especially advantageous if the immunogenic analogue is one, wherein the amino acid sequences comprising one or more B-cell epitopes are represented either as a continuous sequence or as a sequence including inserts, wherein the inserts comprise foreign T-helper epitopes.

Again, such an embodiment is most preferred when the suitable B-cell epitope carrying regions of the APP or Aβ are constituted by short peptide stretches that in no way would be able to bind productively to an MHC Class II molecule. The selected B-cell epitope or -epitopes of the amyloidogenic polypeptide should therefore comprise at most 9 consecutive amino acids of SEQ ID NO: 2. Shorter peptides are preferred, such as those having at most 8, 7, 6, 5, 4, or 3 consecutive amino acids from the amyloidogenic polypeptide's amino acid sequence.

It is preferred that the analogue comprises at least one subsequence of SEQ ID NO: 2 so that each such at least one subsequence independently consists of amino acid stretches from the APP or Aβ selected from the group consisting of 9 consecutive amino acids, 8 consecutive amino acids, 7 consecutive amino acids, 6 consecutive amino acids, 5 consecutive amino acids, 4 consecutive amino acids, and 3 consecutive amino acids.

It is especially preferred that the consecutive amino acids begins at an amino acid residue selected from the group consisting of residue 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, and 714 of SEQ ID NO: 2.

Protein/peptide vaccination; formulation and administration of the analogues

When effecting presentation of the analogue to an animal's immune system by means of administration thereof to the animal, the formulation of the polypeptide follows the principles generally acknowledged in the art.

Preparation of vaccines which contain peptide sequences as active ingredients is generally well understood in the art, as exemplified by U.S. Patents 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792; and 4,578,770, all incorporated herein by reference. Typically, such vaccines are prepared as injectables either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection may also be prepared. The preparation may also be emulsified. The active immunogenic ingredient is often mixed with excipients which are pharmaceutically acceptable and com-

patible with the active ingredient. Suitable excipients are, for example, water, saline, dextrose, glycerol, ethanol, or the like, and combinations thereof. In addition, if desired, the vaccine may contain minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, or adjuvants which enhance the effectiveness of the vaccines; cf. the detailed discussion of adjuvants below.

The vaccines are conventionally administered parenterally, by injection, for example, either subcutaneously, intracutaneously, or intramuscularly. Additional formulations which are suitable for other modes of administration include suppositories and, in some cases, oral, buccal, sublinqual, intraperitoneal, intravaginal, anal, epidural, spinal, and intracranial formulations. For suppositories, traditional binders and carriers may include, for example, polyalkalene glycols or triglycerides; such suppositories may be formed from mixtures containing the active ingredient in the range of 0.5% to 10%, preferably 1-2%. Oral formulations include such normally employed excipients as, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, and the like. These compositions take the form of solutions, suspensions, tablets, pills, capsules, sustained release formulations or powders and contain 10-95% of active ingredient, preferably 25-70%. For oral formulations, cholera toxin is an interesting formulation partner (and also a possible conjugation partner).

The polypeptides may be formulated into the vaccine as neutral or salt forms. Pharmaceutically acceptable salts include acid addition salts (formed with the free amino groups of the peptide) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic a-

cids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups may also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine, procaine, and the like.

The vaccines are administered in a manner compatible with the dosage formulation, and in such amount as will be therapeutically effective and immunogenic. The quantity to be administered depends on the subject to be treated, including, e.g., the capacity of the individual's immune system to mount an immune response, and the degree of protection desired. Suitable dosage ranges are of the order of several hundred micrograms active ingredient per vaccination with a preferred range from about 0.1 μg to 2,000 μg (even though higher amounts in the 1-10 mg range are contemplated), such as in the range from about 0.5 μg to 1,000 μg, preferably in the range from 1 μg to 500 μg and especially in the range from about 10 μg to 100 μg. Suitable regimens for initial administration and booster shots are also variable but are typified by an initial administration followed by subsequent inoculations or other administrations.

The manner of application may be varied widely. Any of the conventional methods for administration of a vaccine are applicable. These include oral application on a solid physiologically acceptable base or in a physiologically acceptable dispersion, parenterally, by injection or the like. The dosage of the vaccine will depend on the route of administration and will vary according to the age of the person to be vaccinated and the formulation of the antigen.

Some of the polypeptides of the vaccine are sufficiently immunogenic in a vaccine, but for some of the others the immune response will be enhanced if the vaccine further comprises an adjuvant substance.

Various methods of achieving adjuvant effect for the vaccine are known. General principles and methods are detailed in "The Theory and Practical Application of Adjuvants", 1995, Duncan E.S. Stewart-Tull (ed.), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-95170-6, and also in "Vaccines: New Generationn Immunological Adjuvants", 1995, Gregoriadis G *et al.* (eds.), Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9, both of which are hereby incorporated by reference herein.

It is especially preferred to use an adjuvant which can be demonstrated to facilitate breaking of the autotolerance to autoantigens; in fact, this is essential in cases where unmodified amyloidogenic polypeptide is used as the active ingredient in the autovaccine. Non-limiting examples of suitable adjuvants are selected from the group consisting of an immune targeting adjuvant; an immune modulating adjuvant such as a toxin, a cytokine, and a mycobacterial derivative; an oil formulation; a polymer; a micelle forming adjuvant; a saponin; an immunostimulating complex matrix (ISCOM matrix); a particle; DDA; aluminium adjuvants; DNA adjuvants; γ-inulin; and an encapsulating adjuvant. In general it should be noted that the disclosures above which relate to compounds and agents useful as first, second and third moieties in the analogues also refer *mutatis mutandis* to their use in the adjuvant of a vaccine of the invention.

The application of adjuvants include use of agents such as aluminum hydroxide or phosphate (alum), commonly used as 0.05

to 0.1 percent solution in buffered saline, admixture with synthetic polymers of sugars (e.g. Carbopol®) used as 0.25 percent solution, aggregation of the protein in the vaccine by heat treatment with temperatures ranging between 70° to 101°C for 30 second to 2 minute periods respectively and also aggregation by means of cross-linking agents are possible. Aggregation by reactivation with pepsin treated antibodies (Fab fragments) to albumin, mixture with bacterial cells such as *C. parvum* or endotoxins or lipopolysaccharide components of gram-negative bacteria, emulsion in physiologically acceptable oil vehicles such as mannide mono-oleate (Aracel A) or emulsion with 20 percent solution of a perfluorocarbon (Fluosol-DA) used as a block substitute may also be employed. Admixture with oils such as squalene and IFA is also preferred.

According to the invention DDA (dimethyldioctadecylammonium bromide) is an interesting candidate for an adjuvant as is DNA and γ-inulin, but also Freund's complete and incomplete adjuvants as well as *quillaja* saponins such as QuilA and QS21 are interesting as is RIBI. Further possibilities are monophosphoryl lipid A (MPL), the above mentioned C3 and C3d, and muramyl dipeptide (MDP).

Liposome formulations are also known to confer adjuvant effects, and therefore liposome adjuvants are preferred according to the invention.

Also immunostimulating complex matrix type (ISCOM® matrix) adjuvants are preferred choices according to the invention, especially since it has been shown that this type of adjuvants are capable of up-regulating MHC Class II expression by APCs. An ISCOM® matrix consists of (optionally fractionated) saponins (triterpenoids) from *Quillaja saponaria*, cholesterol, and

phospholipid. When admixed with the immunogenic protein, the resulting particulate formulation is what is known as an ISCOM particle where the saponin constitutes 60-70% w/w, the cholesterol and phospholipid 10-15% w/w, and the protein 10-15% w/w. Details relating to composition and use of immunostimulating complexes can e.g. be found in the above-mentioned text-books dealing with adjuvants, but also Morein B *et al.*, 1995, Clin. Immunother. **3**: 461-475 as well as Barr IG and Mitchell GF, 1996, Immunol. and Cell Biol. **74**: 8-25 (both incorporated by reference herein) provide useful instructions for the preparation of complete immunostimulating complexes.

Another highly interesting (and thus, preferred) possibility of achieving adjuvant effect is to employ the technique described in Gosselin *et al.*, 1992 (which is hereby incorporated by reference herein). In brief, the presentation of a relevant antigen such as an antigen of the present invention can be enhanced by conjugating the antigen to antibodies (or antigen binding antibody fragments) against the Fcγ receptors on monocytes/macrophages. Especially conjugates between antigen and anti-FcγRI have been demonstrated to enhance immunogenicity for the purposes of vaccination.

Other possibilities involve the use of the targeting and immune modulating substances (*i.a.* cytokines) mentioned above as candidates for the first and second moieties in the modified versions of amyloidogenic polypeptides. In this connection, also synthetic inducers of cytokines like poly I:C are possibilities.

Suitable mycobacterial derivatives are selected from the group consisting of muramyl dipeptide, complete Freund's adjuvant, RIBI, and a diester of trehalose such as TDM and TDE.

Suitable immune targeting adjuvants are selected from the group consisting of CD40 ligand and CD40 antibodies or specifically binding fragments thereof (cf. the discussion above), mannose, a Fab fragment, and CTLA-4.

Suitable polymer adjuvants are selected from the group consisting of a carbohydrate such as dextran, PEG, starch, mannan, and mannose; a plastic polymer such as; and latex such as latex beads.

Yet another interesting way of modulating an immune response is to include the immunogen (optionally together with adjuvants and pharmaceutically acceptable carriers and vehicles) in a "virtual lymph node" (VLN) (a proprietary medical device developed by ImmunoTherapy, Inc., 360 Lexington Avenue, New York, NY 10017-6501). The VLN (a thin tubular device) mimics the structrue and function of a lymph node. Insertion of a VLN under the skin creates a site of sterile inflammation with an upsurge of cytokines and chemokines. T- and B-cells as well as APCs rapidly respond to the danger signals, home to the inflamed site and accumulate inside the porous matrix of the VLN. It has been shown that the necessary antigen dose required to mount an immune response to an antigen is reduced when using the VLN and that immune protection conferred by vaccination using a VLN surpassed conventional immunization using Ribi as an adjuvant. The technology is *i.a.* described briefly in Gelber C *et al.*, 1998, "Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of Immunogens Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node", in: "From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts, October 12th - 15th 1998, Seascape Resort, Aptos, California".

Microparticle formulation of vaccines has been shown in many cases to increase the immunogenicity of protein antigens and is therefore another preferred embodiment of the invention. Microparticles are made either as co-formulations of antigen with a polymer, a lipid, a carbohydrate or other molecules suitable for making the particles, or the microparticles can be homogeneous particles consisting of only the antigen itself.

Examples of polymer based microparticles are PLGA and PVP based particles (Gupta, R.K. et. al. 1998) where the polymer and the antigen are condensed into a solid particle. Lipid based particles can be made as micelles of the lipid (so-called liposomes) entrapping the antigen within the micelle (Pietrobon, P.J. 1995). Carbohydrate based particles are typically made of a suitable degradable carbohydrate such as starch or chitosan. The carbohydrate and the antigen are mixed and condensed into particles in a process similar to the one used for polymer particles (Kas, H.S. et. al. 1997).

Particles consisting only of the antigen can be made by various spraying and freeze-drying techniques. Especially suited for the purporses of the present invention is the super critical fluid technology that is used to make very uniform particles of controlled size (York, P. 1999 & Shekunov, B. et. al. 1999).

It is expected that the vaccine should be administered 1-6 times per year, such as 1, 2, 3, 4, 5, or 6 times a year to an individual in need thereof. It has previously been shown that the memory immunity induced by the use of the preferred autovaccines according to the invention is not permanent, and therefore the immune system needs to be periodically chal-

lenged with the amyloidogenic polypeptide or modified amyloidogenic polypeptides.

Due to genetic variation, different individuals may react with immune responses of varying strength to the same polypeptide. Therefore, the vaccine according to the invention may comprise several different polypeptides in order to increase the immune response, cf. also the discussion above concerning the choice of foreign T-cell epitope introductions. The vaccine may comprise two or more polypeptides, where all of the polypeptides are as defined above.

The vaccine may consequently comprise 3-20 different modified or unmodified polypeptides, such as 3-10 different polypeptides.

Nucleic acid vaccination

As an alternative to classic administration of a peptide-based vaccine, the technology of nucleic acid vaccination (also known as "nucleic acid immunisation", "genetic immunisation", and "gene immunisation") offers a number of attractive features.

First, in contrast to the traditional vaccine approach, nucleic acid vaccination does not require resource consuming large-scale production of the immunogenic agent (e.g. in the form of industrial scale fermentation of microorganisms producing modified amyloidogenic polypeptides). Furthermore, there is no need to device purification and refolding schemes for the immunogen. And finally, since nucleic acid vaccination relies on the biochemical apparatus of the vaccinated individual in order to produce the expression product of the nucleic acid introduced, the optimum post-translational processing of

the expression product is expected to occur; this is especially important in the case of autovaccination, since, as mentioned above, a significant fraction of the original B-cell epitopes should be preserved in the modified molecule, and since B-cell epitopes in principle can be constituted by parts of any (bio)molecule (e.g. carbohydrate, lipid, protein etc.). Therefore, native glycosylation and lipidation patterns of the immunogen may very well be of importance for the overall immunogenicity and this is best ensured by having the host producing the immunogen.

Hence, a preferred embodiment of the invention's variants a-c comprises effecting presentation of the analogue to the immune system by introducing nucleic acid(s) encoding the analogue into the animal's cells and thereby obtaining *in vivo* expression by the cells of the nucleic acid(s) introduced.

In this embodiment, the introduced nucleic acid is preferably DNA which can be in the form of naked DNA, DNA formulated with charged or uncharged lipids, DNA formulated in liposomes, DNA included in a viral vector, DNA formulated with a transfection-facilitating protein or polypeptide, DNA formulated with a targeting protein or polypeptide, DNA formulated with Calcium precipitating agents, DNA coupled to an inert carrier molecule, DNA encapsulated in a polymer, e.g. in PLGA (cf. the microencapsulation technology described in WO 98/31398) or in chitin or chitosan, and DNA formulated with an adjuvant. In this context it is noted that practically all considerations pertaining to the use of adjuvants in traditional vaccine formulation apply for the formulation of DNA vaccines. Hence, all disclosures herein which relate to use of adjuvants in the context of polypeptide based vaccines apply *mutatis mutandis* to their use in nucleic acid vaccination technology.

As for routes of administration and administration schemes of polypeptide based vaccines which have been detailed above, these are also applicable for the nucleic acid vaccines of the invention and all discussions above pertaining to routes of administration and administration schemes for polypeptides apply *mutatis mutandis* to nucleic acids. To this should be added that nucleic acid vaccines can suitably be administered intraveneously and intraarterially. Furthermore, it is well-known in the art that nucleic acid vaccines can be administered by use of a so-called gene gun, and hence also this and equivalent modes of administration are regarded as part of the present invention. Finally, also the use of a VLN in the administration of nucleic acids has been reported to yield good results, and therefore this particular mode of administration is particularly preferred.

Furthermore, the nucleic acid(s) used as an immunization agent can contain regions encoding the 1st, 2nd and/or 3rd moieties, e.g. in the form of the immunomodulating substances described above such as the cytokines discussed as useful adjuvants. A preferred version of this embodiment encompasses having the coding region for the analogue and the coding region for the immunomodulator in different reading frames or at least under the control of different promoters. Thereby it is avoided that the analogue or epitope is produced as a fusion partner to the immunomodulator. Alternatively, two distinct nucleotide fragments can be used, but this is less preferred because of the advantage of ensured co-expression when having both coding regions included in the same molecule.

Accordingly, the invention also relates to a composition for inducing production of antibodies against APP or Aβ, the composition comprising

- a nucleic acid fragment or a vector of the invention (cf. the discussion of vectors below), and

- a pharmaceutically and immunologically acceptable vehicle and/or carrier and/or adjuvant as discussed above.

Under normal circumstances, the variant-encoding nucleic acid is introduced in the form of a vector wherein expression is under control of a viral promoter. For more detailed discussions of vectors according to the invention, cf. the discussion below. Also, detailed disclosures relating to the formulation and use of nucleic acid vaccines are available, cf. Donnelly JJ *et al*, 1997, Annu. Rev. Immunol. **15**: 617-648 and Donnelly JJ *et al.*, 1997, Life Sciences **60**: 163-172. Both of these references are incorporated by reference herein.

Live vaccines

A third alternative for effecting presentation of the analogues as these are defined in variants a-c to the immune system is the use of live vaccine technology. In live vaccination, presentation to the immune system is effected by administering, to the animal, a non-pathogenic microorganism which has been transformed with a nucleic acid fragment encoding an analogue or with a vector incorporating such a nucleic acid fragment. The non-pathogenic microorganism can be any suitable attenuated bacterial strain (attenuated by means of passaging or by means of removal of pathogenic expression products by recombinant DNA technology), e.g. *Mycobacterium bovis* BCG., non-pathogenic *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Shigella*, etc. Reviews dealing with preparation of state-of-the-art live vaccines can e.g. be found in Saliou P, 1995, Rev. Prat. **45**: 1492-1496 and Walker PD, 1992, Vaccine **10**: 977-990, both incorporated by reference herein.

For details about the nucleic acid fragments and vectors used in such live vaccines, cf. the discussion below.

As an alternative to bacterial live vaccines, the nucleic acid fragment of the invention discussed below can be incorporated in a non-virulent viral vaccine vector such as a vaccinia strain or any other suitable poxvirus.

Normally, the non-pathogenic microorganism or virus is administered only once to the animal, but in certain cases it may be necessary to administer the microorganism more than once in a lifetime in order to maintain protective immunity. It is even contemplated that immunization schemes as those detailed above for polypeptide vaccination will be useful when using live or virus vaccines.

Alternatively, live or virus vaccination is combined with previous or subsequent polypeptide and/or nucleic acid vaccination. For instance, it is possible to effect primary immunization with a live or virus vaccine followed by subsequent booster immunizations using the polypeptide or nucleic acid approach.

The microorganism or virus can be transformed with nucleic acid(s) containing regions encoding the 1st, 2nd and/or 3rd moieties, e.g. in the form of the immunomodulating substances described above such as the cytokines discussed as useful adjuvants. A preferred version of this embodiment encompasses having the coding region for the analogue and the coding region for the immunomodulator in different reading frames or at least under the control of different promoters. Thereby it is avoided that the analogue or epitopes are produced as fusion partners to the immunomodulator. Alternatively, two distinct nucleotide fragments can be used as transforming agents. Of

course, having the 1st and/or 2nd and/or 3rd moieties in the same reading frame can provide as an expression product, an analogue of the invention, and such an embodiment is especially preferred according to the present invention.

Use of the method of the invention in disease treatment

As will be appreciated from the discussions above, the provision of the method of the invention allows for control of diseases characterized by amyloid deposits. In this context, AD is the key target for the inventive method but also other diseases characterized by Aβ containing amyloid deposits are feasible targets. Hence, an important embodiment of the method of the invention for down-regulating amyloid activity comprises treating and/or preventing and/or ameliorating AD or other diseases characterized by amyloid deposition, the method comprising down-regulating APP or Aβ according to the method of the invention to such an extent that the amount of amyloid is significantly decreased.

It is especially preferred that the reduction in amyloid results in an inversion of the balance between amyloid formation and amyloid degradation/removal, *i.e.* that the rate of amyloid degradation/removal is brought to exceed the rate of amyloid formation. By carefully controlling the number and immunological impact of immunizations of the individual in need thereof it will be possible to obtain a balance over time which results in a net reduction of amyloid deposits without having excessive adverse effects.

Alternatively, if in an individual the method of the invention cannot remove or reduce existing amyloid deposits, the method of the invention can be used to obtain a clinically signifi-

cant reduction in the formation of new amyloid, thereby significantly prolonging the time where the disease condition is non-debilitating. It should be possible to monitor the rate of amyloid depositing by either measuring the serum concentration of amyloid (which is believed to be in equilibrium with the deposited material), or by using positron-emission tomography (PET) scanning, cf. Small GW, *et al.*, 1996, Ann N Y Acad Sci 802: 70-78.

Other diseases and conditions where the present means and methods may be used in treatment or amelioration in an analogous way have been mentioned above in the "Background of the invention" or are listed below in the section headed "other amyloidic diseases and proteins associated therewith".

Peptides, polypeptides, and compositions of the invention

As will be apparent from the above, the present invention is based on the concept of immunising individuals against the APP or Aβ antigen in order to obtain a reduced amount of pathology-related amyloid deposits. The preferred way of obtaining such an immunization is to use the analogues described herein, thereby providing molecules which have not previously been disclosed in the art.

It is believed that the analogues discussed herein are inventive in their own right, and therefore an important part of the invention pertains to an analogue as described above. Hence, any disclosure presented herein pertaining to modified APP or Aβ are relevant for the purpose of describing the amyloidogenic analogues of the invention, and any such disclosures apply *mutatis mutandis* to the description of these analogues.

It should be noted that preferred modified APP or Aβ molecules comprise modifications which results in a polypeptide having a sequence identity of at least 70% with APP or Aβ or with a subsequence thereof of at least 10 amino acids in length. Higher sequence identities are preferred, e.g. at least 75% or even at least 80, 85, 90, or 95%. The sequence identity for proteins and nucleic acids can be calculated as $(N_{ref} - N_{dif})\cdot 100/N_{ref}$, wherein N_{dif} is the total number of non-identical residues in the two sequences when aligned and wherein N_{ref} is the number of residues in one of the sequences. Hence, the DNA sequence AGTCAGTC will have a sequence identity of 75% with the sequence AATCAATC (N_{dif}=2 and N_{ref}=8).

The invention also pertains to compositions useful in exercising the method of the invention. Hence, the invention also relates to an immunogenic composition comprising an immunogenically effective amount of an analouge as described above, said composition further comprising a pharmaceutically and immunologically acceptable diluent and/or vehicle and/or carrier and/or excipient and optionally an adjuvant. In other words, this part of the invention concerns formulations of analogues, essentially as described above. The choice of adjuvants, carriers, and vehicles is accordingly in line with what has been discussed above when referring to formulation of modified and unmodified amyloidogenic polypeptide for use in the inventive method for the down-regulation of APP or Aβ.

The polypeptides are prepared according to methods well-known in the art. Longer polypeptides are normally prepared by means of recombinant gene technology including introduction of a nucleic acid sequence encoding the analogue into a suitable vector, transformation of a suitable host cell with the vector, expression by the host cell of the nucleic acid sequence, re-

covery of the expression product from the host cells or their culture supernatant, and subseqeunt purification and optional further modification, e.g. refolding or derivatization.

Shorter peptides are preferably prepared by means of the well-known techniques of solid- or liquid-phase peptide synthesis. However, recent advances in this technology has rendered possible the production of full-length polypeptides and proteins by these means, and therefore it is also within the scope of the present invention to prepare the long constructs by synthetic means.

Nucleic acid fragments and vectors of the invention

It will be appreciated from the above disclosure that poly-amino acid analogues can be prepared by means of recombinant gene technology but also by means of chemical synthesis or semisynthesis; the latter two options are especially relevant when the modification consists in coupling to protein carriers (such as KLH, diphtheria toxoid, tetanus toxoid, and BSA) and non-proteinaceous molecules such as carbohydrate polymers and of course also when the modification comprises addition of side chains or side groups to an APP or Aβ derived peptide chain.

For the purpose of recombinant gene technology, and of course also for the purpose of nucleic acid immunization, nucleic acid fragments encoding analogues are important chemical products. Hence, an important part of the invention pertains to a nucleic acid fragment which encodes an analogue of the invention, *i.e.* an APP or Aβ derived polypeptide which either comprises the natural sequence to which has been added or inserted a fusion partner or, preferably an APP or Aβ derived

polypeptide wherein has been introduced a foreign T-cell epitope by means of insertion and/or addition, preferably by means of substitution and/or deletion. The nucleic acid fragments of the invention are either DNA or RNA fragments.

The nucleic acid fragments of the invention will normally be inserted in suitable vectors to form cloning or expression vectors carrying the nucleic acid fragments of the invention; such novel vectors are also part of the invention. Details concerning the construction of these vectors of the invention will be discussed in context of transformed cells and microorganisms below. The vectors can, depending on purpose and type of application, be in the form of plasmids, phages, cosmids, mini-chromosomes, or virus, but also naked DNA which is only expressed transiently in certain cells is an important vector. Preferred cloning and expression vectors of the invention are capable of autonomous replication, thereby enabling high copy-numbers for the purposes of high-level expression or high-level replication for subsequent cloning.

The general outline of a vector of the invention comprises the following features in the 5'→3' direction and in operable linkage: a promoter for driving expression of the nucleic acid fragment of the invention, optionally a nucleic acid sequence encoding a leader peptide enabling secretion (to the extracellular phase or, where applicable, into the periplasma) of or integration into the membrane of the polypeptide fragment, the nucleic acid fragment of the invention, and optionally a nucleic acid sequence encoding a terminator. When operating with expression vectors in producer strains or cell-lines it is for the purposes of genetic stability of the transformed cell preferred that the vector when introduced into a host cell is integrated in the host cell genome. In contrast, when working

with vectors to be used for effecting *in vivo* expression in an animal (*i.e.* when using the vector in DNA vaccination) it is for security reasons preferred that the vector is incapable of being integrated in the host cell genome; typically, naked DNA or non-integrating viral vectors are used, the choices of which are well-known to the person skilled in the art

The vectors of the invention are used to transform host cells to produce the analogue of the invention. Such transformed cells, which are also part of the invention, can be cultured cells or cell lines used for propagation of the nucleic acid fragments and vectors of the invention, or used for recombinant production of the analogues of the invention. Alternatively, the transformed cells can be suitable live vaccine strains wherein the nucleic acid fragment (one single or multiple copies) have been inserted so as to effect secretion or integration into the bacterial membrane or cell-wall of the analogue.

Preferred transformed cells of the invention are microorganisms such as bacteria (such as the species *Escherichia* [e.g. *E.coli*], *Bacillus* [e.g. *Bacillus subtilis*], *Salmonella*, or *Mycobacterium* [preferably non-pathogenic, e.g. *M. bovis* BCG]), yeasts (such as *Saccharomyces cerevisiae*), and protozoans. Alternatively, the transformed cells are derived from a multicellular organism such as a fungus, an insect cell, a plant cell, or a mammalian cell. Most preferred are cells derived from a human being, cf. the discussion of cell lines and vectors below. Recent results have shown great promise in the use of a commercially available *Drosophila melanogaster* cell line (the Schneider 2 (S_2) cell line and vector system available from Invitrogen) for the recombinant production of polypep-

tides in applicants' lab, and therefore this expression system is particularly preferred.

For the purposes of cloning and/or optimized expression it is preferred that the transformed cell is capable of replicating the nucleic acid fragment of the invention. Cells expressing the nucleic fragment are preferred useful embodiments of the invention; they can be used for small-scale or large-scale preparation of the analogue of the invention or, in the case of non-pathogenic bacteria, as vaccine constituents in a live vaccine.

When producing the analogues of the invention by means of transformed cells, it is convenient, although far from essential, that the expression product is either exported out into the culture medium or carried on the surface of the transformed cell.

When an effective producer cell has been identified it is preferred, on the basis thereof, to establish a stable cell line which carries the vector of the invention and which expresses the nucleic acid fragment encoding the modified amyloidogenic polypeptide. Preferably, this stable cell line secretes or carries the analogue of the invention, thereby facilitating purification thereof.

In general, plasmid vectors containing replicon and control sequences which are derived from species compatible with the host cell are used in connection with the hosts. The vector ordinarily carries a replication site, as well as marking sequences which are capable of providing phenotypic selection in transformed cells. For example, *E. coli* is typically transformed using pBR322, a plasmid derived from an *E. coli* species (see, e.g., Bolivar *et al.*, 1977). The pBR322 plasmid contains

genes for ampicillin and tetracycline resistance and thus provides easy means for identifying transformed cells. The pBR plasmid, or other microbial plasmid or phage must also contain, or be modified to contain, promoters which can be used by the prokaryotic microorganism for expression.

Those promoters most commonly used in recombinant DNA construction include the B-lactamase (penicillinase) and lactose promoter systems (Chang *et al.*, 1978; Itakura *et al.*, 1977; Goeddel *et al.*, 1979) and a tryptophan (trp) promoter system (Goeddel *et al.*, 1979; EP-A-0 036 776). While these are the most commonly used, other microbial promoters have been discovered and utilized, and details concerning their nucleotide sequences have been published, enabling a skilled worker to ligate them functionally with plasmid vectors (Siebwenlist *et al.*, 1980). Certain genes from prokaryotes may be expressed efficiently in *E. coli* from their own promoter sequences, precluding the need for addition of another promoter by artificial means.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes, such as yeast cultures may also be used, and here the promoter should be capable of driving expression. *Saccharomyces cerevisiase*, or common baker's yeast is the most commonly used among eukaryotic microorganisms, although a number of other strains are commonly available. For expression in *Saccharomyces*, the plasmid YRp7, for example, is commonly used (Stinchcomb *et al.*, 1979; Kingsman *et al.*, 1979; Tschemper *et al.*, 1980). This plasmid already contains the trpl gene which provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan for example ATCC No. 44076 or PEP4-1 (Jones, 1977). The presence of the trpl lesion as a characteristic of the yeast host cell genome then provides an effec-

tive environment for detecting transformation by growth in the absence of tryptophan.

Suitable promoting sequences in yeast vectors include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase (Hitzman *et al.*, 1980) or other glycolytic enzymes (Hess *et al.*, 1968; Holland *et al.*, 1978), such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase. In constructing suitable expression plasmids, the termination sequences associated with these genes are also ligated into the expression vector 3' of the sequence desired to be expressed to provide polyadenylation of the mRNA and termination.

Other promoters, which have the additional advantage of transcription controlled by growth conditions are the promoter region for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, and the aforementioned glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Any plasmid vector containing a yeast-compatible promoter, origin of replication and termination sequences is suitable.

In addition to microorganisms, cultures of cells derived from multicellular organisms may also be used as hosts. In principle, any such cell culture is workable, whether from vertebrate or invertebrate culture. However, interest has been greatest in vertebrate cells, and propagation of vertebrate in culture (tissue culture) has become a routine procedure in recent years (Tissue Culture, 1973). Examples of such useful host

cell lines are VERO and HeLa cells, Chinese hamster ovary (CHO) cell lines, and W138, BHK, COS-7 293, *Spodoptera frugiperda* (SF) cells (commercially available as complete expression systems from *i.a.* Protein Sciences, 1000 Research Parkway, Meriden, CT 06450, U.S.A. and from Invitrogen), and MDCK cell lines. In the present invention, an especially preferred cell line is S_2 available from Invitrogen, PO Box 2312, 9704 CH Groningen, The Netherlands.

Expression vectors for such cells ordinarily include (if necessary) an origin of replication, a promoter located in front of the gene to be expressed, along with any necessary ribosome binding sites, RNA splice sites, polyadenylation site, and transcriptional terminator sequences.

For use in mammalian cells, the control functions on the expression vectors are often provided by viral material. For example, commonly used promoters are derived from polyoma, Adenovirus 2, and most frequently Simian Virus 40 (SV40). The early and late promoters of SV40 virus are particularly useful because both are obtained easily from the virus as a fragment which also contains the SV40 viral origin of replication (Fiers *et al.*, 1978). Smaller or larger SV40 fragments may also be used, provided there is included the approximately 250 bp sequence extending from the *Hind*III site toward the *Bgl*I site located in the viral origin of replication. Further, it is also possible, and often desirable, to utilize promoter or control sequences normally associated with the desired gene sequence, provided such control sequences are compatible with the host cell systems.

An origin of replication may be provided either by construction of the vector to include an exogenous origin, such as may

be derived from SV40 or other viral (e.g., Polyoma, Adeno, VSV, BPV) or may be provided by the host cell chromosomal replication mechanism. If the vector is integrated into the host cell chromosome, the latter is often sufficient.

Identification of useful analogues

It will be clear to the skilled person that not all possible variants or modifications of naturally occurring APP or Aβ will have the ability to elicit antibodies in an animal which are cross-reactive with the natural form. It is, however, not difficult to set up an effective standard screen for modified amyloidogenic molecules which fulfill the minimum requirements for immunological reactivity discussed herein. Hence, it is possible to utilise a method for the identification of a modified amyloidogenic polypeptide which is capable of inducing antibodies against unmodified amyloidogenic polypeptide in an animal species where the unmodified amyloidogenic polypeptide is a (non-immunogenic) self-protein, the method comprising

- preparing, by means of peptide synthesis or genetic engineering techniques, a set of mutually distinct analogue of the invention wherein amino acids have been added to, inserted in, deleted from, or substituted into the amino acid sequence of an APP or Aβ of the animal species thereby giving rise to amino acid sequences in the set which comprise T-cell epitopes which are foreign to the animal species, or preparing a set of nucleic acid fragments encoding the set of mutually distinct analogues,

- testing members of the set of analogues or nucleic acid fragments for their ability to induce production of anti-

bodies by the animal species against the unmodified APP or Aβ, and

- identifying and optionally isolating the member(s) of the set of analogues which significantly induces antibody production against unmodified APP or Aβ in the species or identifying and optionally isolating the polypeptide expression products encoded by members of the set of nucleic acid fragments which significantly induces antibody production against unmodified APP or Aβ in the animal species.

In this context, the "set of mutually distinct modified amyloidogenic polypeptides" is a collection of non-identical analouges which have e.g. been selected on the basis of the criteria discussed above (e.g. in combination with studies of circular dichroism, NMR spectra, and/or X-ray diffraction patterns). The set may consist of only a few members but it is contemplated that the set may contain several hundred members.

The test of members of the set can ultimately be performed *in vivo*, but a number of *in vitro* tests can be applied which narrow down the number of modified molecules which will serve the purpose of the invention.

Since the goal of introducing the foreign T-cell epitopes is to support the B-cell response by T-cell help, a prerequisite is that T-cell proliferation is induced by the analogue. T-cell proliferation can be tested by standardized proliferation assays *in vitro*. In short, a sample enriched for T-cells is obtained from a subject and subsequently kept in culture. The cultured T-cells are contacted with APCs of the subject which have previously taken up the modified molecule and processed

it to present its T-cell epitopes. The proliferation of T-cells is monitored and compared to a suitable control (e.g. T-cells in culture contacted with APCs which have processed intact, native amyloidogenic polypeptide). Alternatively, proliferation can be measured by determining the concentration of relevant cytokines released by the T-cells in response to their recognition of foreign T-cells.

Having rendered highly probable that at least one analogue of either type of set is capable of inducing antibody production against APP or Aβ, it is possible to prepare an immunogenic composition comprising at least one analouge which is capable of inducing antibodies against unmodified APP or Aβ in an animal species where the unmodified APP or Aβ is a self-protein, the method comprising admixing the member(s) of the set which significantly induces production of antibodies in the animal species which are reactive with the APP or Aβ with a pharmaceutically and immunologically acceptable carrier and/or vehicle and/or diluent and/or excipient, optionally in combination with at least one pharmaceutically and immunologically acceptable adjuvant.

The above-described tests of polypeptide sets are conveniently carried out by initially preparing a number of mutually distinct nucleic acid sequences or vectors of the invention, inserting these into appropriate expression vectors, transforming suitable host cells (or host animals) with the vectors, and effecting expression of the nucleic acid sequences of the invention. These steps can be followed by isolation of the expression products. It is preferred that the nucleic acid sequences and/or vectors are prepared by methods comprising exercise of a molecular amplification technique such as PCR or by means of nucleic acid synthesis.

Specific amyloidogenic targets

In addition to the proteins most often associated with Alzheimer's, APP, ApoE4 and Tau, there is long list of other proteins that have somehow been linked to AD, either by their direct presence in plaques or tangles of AD brains or by their apparent genetic association with increased risk of developing AD. Most, if not all, of these antigens are together with the above-discussed Aβ, APP, presenilin and ApoE4, putative target proteins in certain embodiment of the present invention. These putative targets are already discussed thoroughly in WO 01/62284. Hence, these putative targets will only be mentioned briefly here, whereas a more thorough background discussion can be be found in WO 01/62282 which is hereby incorporated by reference herein:

Alpha1-antichymotrypsin (ACT); Alpha2-macroglobulin; ABAD (Aβ-peptide binding alcohol dehydrogenase); APLP1 and -2 (amyloid precursor like protein 1 and -2); AMY117; Bax; Bcl-2; Bleomycin hydrolase; BRI/ABRI; Chromogranin A; Clusterin/apoJ; CRF (corticotropin releasing factor) binding protein; EDTF (endothelial-derived toxic factor); Heparan sulfate proteoglycans; Human collapsin response mediator protein-2; Huntingtin (Huntington's disease protein); ICAM-I; IL-6; Lysosome-associated antigen CD68; P21 ras; PLC-delta 1 (phospholipase C isoenzyme delta 1); Serum amyloid P component (SAP); Synaptophysin; Synuclein (alpha-synuclein or NACP); and TGF-b1 (transforming growth factor b1).

The presently described means and methods for down-regulation of APP or Aβ can be combined with therapies, e.g. active specific immunotherapy, against any of these other amyloidogenic polypeptides.

Apart from Alzheimer's disease, also cerebral amyloid angiopathy is a disease that would be a suitable target for the presently disclosed technology.

It is contemplated that most methods for immunizing against APP or Aβ should be restricted to immunization giving rise to antibodies cross-reactive with the native APP or Aβ. Nevertheless, in some cases it will be of interest to induce cellular immunity in the form of CTL responses against cells which present MHC Class I epitopes from the amyloidogenic polypeptides - this can be expedient in those cases wherein reduction in the number of cells producing APP or Aβ does not constitute a serious adverse effect. In such cases where CTL responses are desired it is preferred to utilise the teachings of Applicant's WO 00/20027. The disclosures of these two documents are hereby incorporated by reference herein.

IMMUNOGEN CARRIERS

Molecules comprising a T helper epitope and APP or Aβ peptides representing or including B-cell epitopes linked covalently to a non-immunogenic polymer molecule acting as a vehicle, e.g. a multivalent activated poly-hydroxypolymer, will, as mentioned above, function as a vaccine molecule that only contains the immunologically relevant parts, can be obtained, and are interesting embodiments in variants d and e disclosed above. Promiscuous or so-called universal T-helper epitopes can be used if e.g. the target for the vaccine is a self-antigen such as APP or Aβ. Furthermore, elements that enhance the immunological response could be also co-coupled to the vehicle and thereby act as an adjuvant. Such elements could be mannose, tuftsin, muramyl dipeptide, CpG motifs etc. In that case, sub-

sequent adjuvant formulation of the vaccine product might be unnecessary and the product could be administered in pure water or saline.

By coupling cytotoxic T cell (CTL) epitopes together with the T-helper epitopes it will also be possible to generate CTL's specific for the antigen from which the CTL epitope was derived. Elements that promote uptake of the product to the cytosol, such as mannose, of the APC, e.g. a macrophage, could also be co-coupled to the vehicle together with the CTL- and the T helper epitope and enhance the CTL response.

The ratio of B-cell epitopes and T-helper epitopes (P2 and P30) in the final product can be varied by varying the concentration of these peptides in the synthesis step. As mentioned above, the immunogenic molecule can be tagged with e.g. mannose, tuftsin, CpG-motifs or other immune stimulating substances (described herein) by adding these, if necessary by using e.g. aminated derivatives of the substances, to the carbonate buffer in the synthesis step.

If an insoluble activated polyhydroxy polymer is used to combine the peptides containing the APP or Aβ B-cell epitope and the T-helper epitopes it can, as mentioned above be performed as a solid phase synthesis and the final product can be harvested and purified by wash and filtration. The elements to be coupled to a tresyl activated polyhydroxypolymer (peptides, tags etc) can be added to the polyhydroxypolymer at low pH, e.g. pH 4-5, and allowed to be equally distributed in the "gel" by passive diffusion. Subsequently, the pH can be raised to pH 9-10 to start the reaction of the primary amino groups on the peptides and tags to the tresyl groups on the polyhydroxy polymer. After coupling of peptides and e.g. immune

stimulating elements the gel is grinded to form particles of suitable size for immunization.

Such an immunogen therefore comprises

a) at least one first amino acid sequence derived from APP or Aβ, wherein the at least one first amino acid sequence contains at least one B-cell and/or at least one CTL epitope, and

b) at least one second amino acid sequence that includes a foreign T helper cell epitope,

wherein each of the at least first and at least second amino acid sequences are coupled to a pharmaceutically acceptable activated polyhydroxypolymer carrier.

In order for the amino acid sequences to couple to the polyhydroxypolymer it is normally necessary to "activate" the polyhydroxypolymer with a suitable reactive group that can form the necessary link to the amino acid sequences.

The term "polyhydroxypolymer" is intended to have the same meaning as in WO 00/05316, *i.e.* the polyhydroxypolymer can have exactly the same characteristics as is specifically taught in that application. Hence, the polyhydroxypolymer can be water soluble or insoluble (thus requiring different synthesis steps during preparation of the immunogen). The polyhydroxypolymer can be selected from naturally occurring polyhydroxy compounds and synthetic polyhydroxy compounds.

Specific and preferred polyhydroxypolymers are polysaccharides selected from acetan, amylopectin, gum agar-agar, agarose, alginates, gum Arabic, carregeenan, cellulose, cyclodextrins,

dextran, furcellaran, galactomannan, gelatin, ghatti, glucan, glycogen, guar, karaya, konjac/A, locust bean gum, mannan, pectin, psyllium, pullulan, starch, tamarine, tragacanth, xanthan, xylan, and xyloglucan. Dextran is especially preferred.

However, the polyhydroxypolymer can also be selected from highly branched poly(ethyleneimine)(PEI), tetrathienylene vinylene, Kevlar (long chains of poly-paraphenyl terephtalamide), Poly(urethanes), Poly(siloxanes), polydimethylsiloxane, silicone, Poly(methyl methacrylate) (PMMA), Poly(vinyl alcohol), Poly(vinyl pyrrolidone), Poly(2-hydroxy ethyl methacrylate), Poly(N-vinyl pyrrolidone), Poly(vinyl alcohol), Poly(acrylic acid), Polytetrafluoroethylene (PTFE), Polyacrylamide, Poly(ethylene-co-vinyl acetate), Poly(ethylene glycol) and derivatives, Poly(methacrylic acid), Polylactides (PLA), Polyglycolides (PGA), Poly(lactide-co-glycolides) (PLGA), Polyanhydrides, and Polyorthoesters.

The (weight) average molecular weight of the polyhydroxypolymer in question (i.e. before activation) is typically at least 1,000, such as at least 2,000, preferably in the range of 2,500-2,000,000, more preferably in the range of 3,000-1,000,000, in particular in the range of 5,000-500,000. It has been shown in the examples that polyhydroxypolymers having an average molecular weight in the range of 10,000-200,000 are particularly advantageous.

The polyhydroxypolymer is preferably water soluble to an extent of at least 10 mg/ml, preferably at least 25 mg/ml, such as at least 50 mg/ml, in particular at least 100 mg/ml, such as at least 150 mg/ml at room temperature. It is known that dextran, even when activated as described herein, fulfils the requirements with respect to water solubility.

For some of the most interesting polyhydroxypolymers, the ratio between C (carbon atoms) and OH groups (hydroxy groups) of the unactivated polyhydroxypolymers (i.e. the native polyhydroxypolymer before activation) is in the range of 1.3 to 2.5, such as 1.5-2.3, preferably 1.6-2.1, in particular 1.85-2.05. Without being bound to any specific theory, it is believed that such as a C/OH ratio of the unactivated polyhydroxypolymer represents a highly advantageous level of hydrophilicity. Polyvinylalcohol and polysaccharides are examples of polyhydroxypolymers which fulfil this requirement. It is believed that the above-mentioned ratio should be roughly the same for the activated polyhydroxypolymer as the activation ratio should be rather low.

The term "polyhydroxypolymer carrier" is intended to denote the part of the immunogen that carries the amino acid sequences. As a general rule, the polyhydroxypolymer carrier has its outer limits where the amino acid sequences can be cleaved of by a peptidase, e.g. in an antigen presenting cell that is processing the immunogen. Hence, the polyhydroxypolymer carrier can be the polyhydroxypolymer with an activation group, where the bond between the activation group and the amino acid sequence is cleavable by a peptidase in an APC, or the polyhydroxypolymer carrier can be a polyhydroxypolymer with activation group and e.g. a linker such as a single L-amino acid or a number of D-amino acids, where the last part of the linker can bond to the amino acid sequences and be cleaved by a peptidase in an APC.

As mentioned above, the polyhydroxypolymers carry functional groups (activation groups), which facilitate the anchoring of peptides to the carrier. A wide range of applicable functional groups are known in the art, e.g. tresyl (trifluoroethylsul-

phonyl), maleimido, p-nitrophenyl cloroformate, cyanogenbromide, tosyl (p-toluenesulfonyl), triflyl (trifluoromethanesulfonyl), pentafluorobenzenesulfonyl, and vinyl sulphone groups. Preferred examples of functional groups within the present invention are tresyl, maleimido, tosyl, triflyl, pentafluorobenzenesulfonyl, p-nitrophenyl cloroformate, and vinylsulphone groups, among which tresyl, maleimido, and tosyl groups are particularly relevant.

Tresyl activated polyhydroxypolymers can be prepared using tresyl chloride as described for activation of dextran in Example 1 in WO 00/05316 or as described in Gregorius et al., J. Immunol. Meth. 181 (1995) 65-73.

Maleimido activated polyhydroxypolymers can be prepared using *p*-maleimidophenyl isocyanate as described for activation of dextran in Example 3 of WO 00/05316. Alternatively, maleimido groups could be introduced to a polyhydroxypolymer, such as dextran, by derivatisation of a tresyl activated polyhydroxypolymer (such as tresyl activated dextran (TAD)) with a diamine compound (generally $H_2N-C_nH_{2n}-NH_2$, where n is 1-20, preferably 1-8), e.g. 1,3-diaminopropane, in excess and subsequently react the amino groups introduced in TAD with reagents such as succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), sulfo-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC), succinimidyl 4-(*p*-maleimidophenyl)butyrate (SMPB), sulfo-succinimidyl 4-(*p*-maleimidophenyl)butyrate (sulfo-SMPB), N-γ-maleimidobutyryloxy-succinimide ester (GMBS) or N-γ-maleimidobutyryloxy-sulfosuccinimide ester. Although the different reagents and routes for activation formally results in slightly different maleimide activated products with respect to the linkage between the maleimide functionality and the remainder of the parent

hydroxy group on which activation is performed, all and every are considered as "maleimide activated polyhydroxypolymers".

Tosyl activated polyhydroxypolymers can be prepared using tosyl chloride as described for activation of dextran in Example 2 in WO 00/05316. Triflyl and pentafluorobenzenesulfonyl activated polyhydroxypolymers are prepared as the tosyl or tresyl activated analogues, e.g. by using the corresponding acid chlorides.

Cyanogenbromide activated polyhydroxypolymer can be prepared by reacting the polyhydroxypolymer with cyanogenbromide using conventional methods. The resulting functional groups are normally cyanate esters with two hydroxy groups of the polyhydroxypolymer.

The degree of activation can be expressed as the ratio between the free hydroxy groups and the activation groups (i.e. functionalised hydroxy groups). It is believed that a ratio between the free hydroxy groups of the polyhydroxypolymer and the activation groups should be between 250:1 and 4:1 in order to obtain an advantageous balance between the hydrophilicity and the reactivity of the polyhydroxypolymer. Preferably the ratio is between 100:1 and 6:1, more preferably between 60:1 and 8:1, in particular between 40:1 and 10:1.

Especially interesting activated polyhydroxypolymers for use in the method for producing the generally applicable immunogen according to the invention are tresyl, tosyl and maleimido activated polysaccharides, especially tresyl activated dextran (TAD), tosyl activated dextran (TosAD), and maleimido activated dextran (MAD).

It is preferred that the bond between the polyhydroxypolymer carrier and the amino acid sequences attached thereto are cleavable by a peptidase, e.g. as a peptidase active in the processing of antigens in an APC. It is therefore preferred that the at least first and at least second amino acid sequences are coupled to the activated polyhydroxypolymer carrier via an amide bond or a peptide bond. It is especially preferred that the at least first and at least second amino acid sequences each provide for the nitrogen moiety of their respective amide bond.

The polyhydroxypolymer carrier may be substantially free of amino acid residues, necessitating that the activation group provides for part of a peptidase cleavable bond, but as mentioned above, the carrier may also simply include a spacer including at least one L-amino acid. Nevertheless, the at least first and at least second amino acid sequences are normally bound to the activated version of the polyhydroxypolymer via the nitrogen at the N-terminus of the amino acid sequence.

The above-described generally applicable immunogen of the present invention can be used in immunization methods essentially as described herein for polypeptide vaccines. That is, all disclosures relating to dosages, mode of administration and formulation of polypeptide vaccines for down-regulating the amyloidogenic polypeptides discussed herein apply *mutatis mutandis* to the generally applicable immunogens.

GENERALLY APPLICABLE SAFE VACCINATION TECHNOLOGY

As discussed above, one preferred embodiment of the present invention entails the use of variants of amyloidogenic polypeptides that are incapable of providing self-derived T_H epi-

topes that may drive an immune response against the amyloidogenic polypeptide.

However, it is believed by the present inventors that this strategy for designing anti-self vaccines and for effecting anti-self immunity, is a generally applicable technology that is inventive in its own right. It should prove especially suited in cases where the self-antigen it is sought to down-regulate is sufficiently abundant in the body so that it is possible that self-stimulation of an immune response could happen. Hence, all disclosures above of this embodiment insofar as it relates to the provision of an anti-self immune response against APP or Aβ applies mutatis mutandis to immunization against other self-polypeptides, especially those that are present in sufficient amounts for them to maintain the immune response in the form of an uncontrolled autoimmune condition because autologous T_H epitopes of the relevant self-polypeptide are driving the immune response.

EXAMPLE 1

The Auto Vaccination approach for Immunizing against AD

The fact that Aβ protein knock out mice does not show any abnormalities or adverse side effects, suggest that removal or lowering the amounts of Aβ will be safe, Zheng H. (1996).

Published experiments where transgenic animals are immunized against the transgenic human Aβ protein suggest that if it was possible to break the self tolerance, down-regulation of Aβ could be obtained by auto-reactive antibodies. These experiments further suggest that such down regulation of Aβ poten-

tially would both prevent the formation of plaques, and even clear already formed Aβ plaques from the brain, cf. Schenk et al. (1999). But, traditionally it is not possible to raise antibodies against self-proteins.

The published data does thus not provide the means for breaking true self-tolerance towards true self-proteins. Nor does the data provide information on how to ensure that the immune reaction is directed solely or predominantly towards the Aβ deposits, and not towards the cell membrane bound Aβ precursor protein (APP), if this is deemed necessary. An immune response generated using the existing technology would presumably generate an immune response towards self-proteins in an unregulated way so unwanted and excessive auto-reactivity towards parts the Aβ protein may be generated. Hence, using existing immunization strategies will most likely be unable to generate strong immune responses towards self-proteins and will furthermore be unsafe due to potential strong cross-reactivity towards membrane bound APP which is present on a large number of cells in the CNS.

The present invention provides the means of effectively generating a strong regulated immune response towards true self-proteins which potentially could form plaques and cause serious disease in the CNS or in other compartments of the body. A safe and efficacious human Aβ protein therapeutic vaccine will be developed by using this technology for the treatment of AD.

In light of this, it is possible to anticipate that AD, a disease predicted to cripple the health care system in the next century, could be cured, or such vaccines described could at least constitute an effective therapeutical approach for

treatment of the symptoms and progression of this disease. This technique represents a entirely new immunological approach to blocking amyloid deposition in AD and other neurologic diseases as well.

In the following table, 35 contemplated constructs are indicated. All positions given in the table are relative to the starting Methionine of APP (first amino acid in SEQ ID NO: 2) and include both the starting and ending amino acid, e.g. the 672 - 714 fragment includes both amino acid 672 and 714. The starting and ending positions for P2 and P30 indicate that the epitope substitutes a part of the APP fragment at the positions indicated (both positions included in the substitution) - in most constructs, the introduced epitopes substitutes a fragment of the length of the epitope. The asterisks in the table have the following meaning:

*) Only one position for P2 and P30 indicates that the epitope has been *inserted* into the APP derivative at the position indicated (the epitope begins at the amino acid C-terminally adjacent to the given position).

**) Construction 34 contains three identical APP fragments separated by P30 and P2, respectively.

***) Construction 35 contains nine identical APP fragments separated by alternating P30 and P2 epitopes.

APP AutoVac constructions

Var. No.	Start of APP segment relative to aa 1 of APP	End of APP segment relative to aa 1 of APP	Position of P2 epitope relative to aa 1 of APP	Position of P30 epitope relative to aa 1 of APP	Molecule length
1	630	770	656 - 670	635 - 655	141
2	630	714	656 - 670	635 - 655	85
3	672	770	735 - 749	714 - 728	99
4	672	770		714 - 728	99
5	672	770	714 - 728		99
6	672	770	723*	723*	135
7	672	770		723*	120
8	672	770	723*		114
9	672	714		672*	64
10	672	714		714*	64
11	672	714	672*		58
12	672	714	714*		58
13	672	714	714*	672*	79
14	672	714	680 - 694		43
14	672	714	685 - 799		43
16	672	714	690 - 704		43
17	672	714	695 - 709		43
18	672	714		675 - 695	43
19	672	714		680 - 700	43
20	672	714		685 - 705	43
21	672	714		690 - 710	43
22	672	714	680*	680*	79
23	672	714	690*	690*	79
24	672	714	700*	700*	79
25	672	714	710*	710*	79
26	672	714		680*	64
27	672	714		690*	64
28	672	714		700*	64
29	672	714		710*	64
30	672	714	680*		58
31	672	714	690*		58
32	672	714	700*		58
33	672	714	710*		58
34	672	714	After rep. 1**	After rep. 2**	165
35	672	714	34 x 3*	34 x 3***	165

The part of APP, against which it most interesting to generate a response, is the 43 amino acid Aβ core peptide (Aβ-43, corresponding to SEQ ID NO: 2, residues 672-714) that is the main constituent of amyloid plaques in AD brains. This APP fragment is part of all constructions listed above.

Variants 1 and 2 comprise a portion of APP upstream of Aβ-43 where the model epitopes P2 and P30 have been placed. Variants 1 and 3-8 all comprise the C-100 fragment which has been shown to be neurotoxic - the C-100 fragment corresponds to amino acid residues 714-770 of SEQ ID NO: 2. In variants 3-5 the epitopes substitutes a part of the C-100 fragment while the in variants 6-8 have been inserted into C-100.

Variants 9-35 contain only the core Aβ-43 protein. In variants 9-13, P2 and P30 are fused to either end of Aβ-43; in 14-21 P2 and P30 substitutes part of Aβ-43; in 22-33 P2 and P30 are inserted into Aβ-43; 34 contains three identical Aβ-43 fragments spaced by P30 and P2, respectively; 35 contains 9 Aβ-43 repeats spaced by alternating P2 and P30 epitopes.

Truncated parts of the above-discussed Aβ-43 protein can also be employed in immunogenic analogues according to the present invention. Especially preferred are the truncates Aβ(1-42), Aβ(1-40), Aβ(1-39), Aβ(1-35), Aβ(1-34), Aβ(1-34), Aβ(1-28), Aβ(1-12), Aβ(1-5), Aβ(13-28), Aβ(13-35), Aβ(17-28), Aβ(25-35), Aβ(35-40), Aβ(36-42), and Aβ(35-42) (where the numbers in the parentheses indicate the amino acid stretches of Aβ-43 that constitute the relevant fragment - Aβ(35-40) is e.g. identical to amino acids 706-711 in SEQ ID NO: 2). All these variants with truncated parts of Aβ-43 can be made with the Aβ fragments

described herein, in particular with variants 9, 10, 11, 12, and 13.

In some cases, it is preferred that the Aβ-43 or fragments thereof are mutated. Especially preferred are substitution variants where the methionine in position 35 in Aβ-43 has been substituted, preferably with leucine or isoleucine, or simply deleted. Especially preferred analogues contain one single methionine that is located in the C-terminus, either because it is naturally occurring in the amyloidogenic polypeptide or foreign T_H epitope, or because it has been inserted or added. Hence, it also preferred that the part of the analogue that includes the foreign T_H epitope is free from methionine, except from the possible C-terminal location of a methionine.

In fact, it is generally preferred that all analogues of APP or Aβ that are used according to the present invention share the characteristic of merely including one single methionine that is positioned as the C-terminal amino acid in the analogue and that other methionines in either the amyloidogenic polypeptide or the foreign T_H epitope are deleted or substituted for another amino acid.

One further interesting mutation is a deletion or substitution of the phenylalanine in position 19 in Aβ-43, and it is especially preferred that the mutation is a substitution of this phenylalanine residue with a proline.

The following table sets forth a group of especially preferred constructs that operate with truncates or mutations of Aβ-43:

Variant No.	Aβ segment used in molecule relative to aa 1 of Aβ (1-42/43)	Position of Aβ segment relative to aa 1 of molecule	Position of P2 epitope relative to aa 1 of molecule	Position of P30 epitope relative to aa 1 of molecule	Total length of mole-cule (aa)
36	1-28	22-49	50-64	1-21	64
37	1-12 (a) + 13-28 (b)	1-12 (a) + 49-64 (b)	34-48	13-33	64
38	1-12 (x 3)	1-12, 34-45, 61-72	46-60	13-33	72
39	13-28 (x 3)	1-16, 38-53, 69-84	54-68	17-37	84
40	1-12 (a) + 13-35 (b) + 36-42 (c)	1-12 (a) + 34-56 (b) + 72-78 (c)	57-71	13-33	78
41	1-28 (x 3)	1-28, 50-77, 93-120	78-92	29-49	120
42	1-43 (F19P/M35K)	1-43	65-79	44-64	79

In this table, the Aβ segment used in the molecule is indicated by amino acid numbers relative to aa 1 of the Aβ(1-42/43) molecule, i.e. 1-28 means that fragment 1-28 of Aβ(1-42/43) is used in the molecule. If two or more different segments are used, both are indicated in the table, i.e. 1-12 (a) + 13-28 (b) means that both fragment 1-12 and fragment 13-28 of Aβ(1-42/43) are used in the molecule.

Also, if the same segment is present in more than one copy in the construction it is indicated in the table, i.e. 1-12 (x3) shows that fragment 1-12 of Aβ(1-42/43) is present in three copies in the construction.

Further, the position of the Aβ segment in the molecule is shown by amino acid positions relative to the first amino acid of the molecule, i.e. 22-49 shows that the Aβ fragment in question is positioned from amino acid 22 to amino acid 49 in the molecule, both positions included. Positions of the P2 and P30 epitopes are indicated equivalently. If two or more different Aβ fragments are used in the molecule, their positions are all shown, i.e. 1-12 (a) + 49-64 (b) means that fragment (a) is

positioned from aa 1-12 in the molecule and fragment (b) from aa 49-64.

Moreover, if more than one copy of the same fragment is present in the molecule, positions for all copies are shown, i.e. 1-12, 34-45, 61-72 shows that the three copies of the Aβ fragment are placed from position 1-12, 34-45 and 61-72, respectively, in the molecule.

Finally, the total length indication of each molecule includes both the Aβ fragment(s) and the P2 and P30 epitopes.

Variant 42 contains two amino acid substitutions at positions 19 (phe to pro) and 35 (met to lys) as it is indicated in the column showing the Aβ fragments.

See Fig. 1 and the tables above for details on particular points for introduction of the foreign T-cell epitopes.

One further type of construct is especially preferred. Since one goal of the present invention is to avoid destruction of the cells producing APP whereas removal of Aβ is desired, it seems feasible to prepare autovaccine constructs comprising only parts of Aβ which are not exposed to the extracellular phase when present in APP. Thus, such constructs would need to contain at least one B-cell epitope derived from the amino acid fragment defined by amino acids 700-714 in SEQ ID NO: 2. Since such a short polypeptide fragment is predicted to be only weakly immunogenic it is preferred that such an autovaccine construct consists of several copies of the B-cell epitope, e.g. in the form of a construct having the structure shown in Formula I in the detailed disclosure of the present invention, cf. above. In that version of Formula I, the terms

amyloid$_{e1}$-amyloid$_{ex}$ are x B-cell epitope containing amino acid sequences derived from amino acids 700-714 of SEQ ID NO: 2. A preferred alternative is the above-detailed possibility of coupling the amyloidogenic (poly)peptide and the selected foreign T-helper epitope to via an amide bond to a polysaccharide carrier molecule - in this way multiple presentaions of the "weak" epitope constituted by amino acids 700-714 of SEQ ID NO: 2 become possible, and it also becomes possible to select an optimum ratio between B-cell and T-cell epitopes.

EXAMPLE 2

Immunisation of transgenic mice with Aβ and modified proteins according to the invention

Construction of the hAB43+-34 encoding DNA. The hAB43+-34 gene was constructed in several steps. First a PCR fragment was generated with primers ME#801 (SEQ ID NO: 10) and ME#802 (SEQ ID NO: 11) using primer ME#800 (SEQ ID NO: 9) as template. ME#800 encodes the human abeta-43 fragment with E. coli optimised codons. ME#801 and 802 adds appropriate restriction sites to the fragment.

The PCR fragment was purified, digested with *Nco*I and *Hind*III, purified again and cloned into *Nco*I-*Hind*III digested and purified pET28b+ *E. coli* expression vector. The resulting plasmid encoding wildtype human Aβ-43 is named pAB1.

In the next step the T-helper epitope, P2, is added to the C-terminus of the molecule. Primer ME#806 (SEQ ID NO: 12) contains the sequence encoding the P2 epitope, thus generating a fusion of P2 and Abeta-43 by the PCR reaction.

The cloning was performed by making a PCR fragment with primers ME#178 (SEQ ID NO: 8) and ME#806 using pAB1 as template. The fragment was purified, digested with *Nco*I and *Hind*III, purified again and cloned into an *Nco*I-*Hind*III digested and purified pET28b+ vector. The resulting plasmid is called pAB2.

In an analogous manner, another plasmid was made harbouring the Aβ-43 encoding sequence with another T helper epitope, P30, added to the N-terminus. This was done by making a PCR fragment with primers ME#105 (SEQ ID NO: 7) and ME#807 (SEQ ID NO: 13) using pAB1 as template.

The fragment was purified, digested with *Nco*I and *Hind*III, purified again and cloned into an *Nco*I-*Hind*III digested and purified pET28b+ vector. The resulting plasmid is called pAB3.

In the third step, a second Aβ-43 repeat is added C-terminally to the P2 epitope of plasmid pAB2 by primer ME#809 (SEQ ID NO: 14). ME#809 at the same time creates a *Bam*HI site immediately after the Aβ-43 repeat. A PCR fragment was made with primers ME#178 and ME#809 using pAB2 as template. The fragment was digested with *Nco*I and *Hind*III, purified and cloned into *Nco*I-*Hind*III digested and purified pET28b+ vector. This plasmid is named pAB4.

Finally, the P30 epitope - Aβ-43 repeat sequence from pAB3 was cloned into pAB4 plasmid. This was done by making a PCR fragment with primers ME#811 (SEQ ID NO: 16) and ME#105 using pAB3 as template. The fragment was purified and used as primer in a subsequent PCR with ME#810 (SEQ ID NO: 15) using pAB3 as template. The resulting fragment was purified, digested with *Bam*HI and *Hind*III and cloned into *Bam*HI-*Hind*III digested and

purified pAB4 plasmid. The resulting plasmid, pAB5, encodes the hAB43+-34 molecule.

All PCR and cloning procedures were done essentially as described by Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989 "Molecular cloning: a laboratory manual". 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

For all cloning procedures *E. coli* K-12 cells, strain Top-10 F' (Stratagene, USA), were used. The pET28b+ vector was purchased from Novagen, USA. All primers were synthesised at DNA Technology, Denmark.

Expression and purification of hAB43+-34. The hAB43+-34 protein encoded by pAB5 was expressed in BL21-Gold (Novagen) *E. coli* cells as described by the suppliers of the pET28b+ system (Novagen).

The expressed hAB43+-34 protein was purified to more than 85% purity by washing of inclusion bodies followed by cation-exchange chromatography using a BioCad purification workstation (PerSeptive Biosystems, USA) in the presence of 6 M urea. The urea was hereafter removed by stepwise dialysis against a solution containing decreasing amounts of urea. The final buffer was 10 mM Tris, pH 8.5.

Immunisation study. Mice transgenic for human APP (Alzheimer's precursor protein) were used for the study. These mice, called TgRND8+, express a mutated form of APP that results in high concentration of Aβ-40 and Aβ-42 in the mouse brains (Janus, C. *et. al.*)

The mice (8-10 mice per group) were immunised with either Abeta-42 (SEQ ID NO: 2, residues 673-714, synthesised by means

of a standard Fmoc strategy) or the hAB43+-34 variant (construct 34 in the table in Example 1, recombinantly produced) four times at two-week intervals. Doses were either 100 mg for Aβ or 50 mg for hAB43+-34. Mice were bled at day 43 (after three injections) and after day 52 (after four injections) and the sera were used to determine the level of anti-Aβ-42 specific titres using a direct Aβ-42 ELISA.

The following tabel shows the mean relative anti-Abeta-42 titres.

Immunogen	Day 43 (after 3 immunizations)	Day 52 (after 4 immunizations)
Aβ-42	4000	3000
hAB43+-34	16000	23000

As will be clear, the antibody titers obtained when immunizing with the hAB43+-34 Aβ variant are approximately 4 times and 7.5 times higher after 3 and 4 immunizations, respectively, than the titers obtained when using the unaltered wild-type Aβ-42 as an immunogen. This fact is put further in perspective, when considering the fact that the amount of variant used for immunization was only 50% of the amount of wild-type sequence used for immunization.

EXAMPLE 3

Synthesis of an Aβ Peptide Copolymer Vaccine using activated poly-hydroxypolymer as the cross-linking agent.

Introduction. A traditional conjugate vaccine consists of a (poly)peptide coupled covalently to a carrier protein. The peptide contains the B-cell epitope(s) and the carrier protein provides T-helper epitopes. However, most of the carrier pro-

tein will normally be irrelevant as a source for T-helper epitopes, since only a minor part of the total sequence contains the relevant T-helper epitopes. Such epitopes can be defined and synthesized as peptides of e.g. 12-15 amino acids. If these peptides are linked covalently to peptides containing the B-cell epitopes, e.g. via a multivalent activated poly-hydroxypolymer, a vaccine molecule that only contains the relevant parts can be obtained. It is further possible to provide a vaccine conjugate that contains an optimized ratio between B-cell and T-cell epitopes.

Synthesis of the acticated poly-hydroxypolymer. Poly-hydroxypolymers such as dextran, starch, agarose etc. can be activated with 2,2,2-trifluoroethanesulfonyl chloride (tresyl chloride), either by means of a homogenous synthesis (dextran) dissolved in N-methylpyrrolidinone (NMP) or by means of a heterogeneous synthesis (starch, agarose, cross-linked dextran) in e.g. acetone.

225 ml dry N-methyl pyrrolidinone (NMP) is added under dry conditions to freeze dried, water-soluble dextran (4.5 g, 83 mmol, clinical grade, Mw(avg) 78000) in a 500 ml round bottom flask supplied with a magnet for stirring. The flask is placed in a 60°C oil bath with magnetic stirring. The temperature is raised to 92°C over a period of 20 min. When the dextran is dissolved the flask is immediately removed from the oil bath and the temperature in the bath is lowered to 40°C. The flask is placed into the oil bath agaom, still with magnetic stirring, and tresyl chloride (2.764 ml, 25 mmol) is added drop-wise. After 15 min, dry pyridine (anhydrous, 2.020 ml, 25 mmol) is added drop-wise. The flask is removed from the oil bath and stirred for 1 hour at room temperature. The product (Tresyl Activated Dextran, TAD) is precipitated in 1200 ml cold ethanol

(99.9%). The supernatant is decanted and the precipitate is harvested in 50 ml polypropylene tubes in a centrifuge at 2000 rpm. The precipitate is dissolved in 50 ml 0.5% acetic acid, dialyzed 2 times against 5000 ml 0.5% acetic acid and freeze dried. TAD can be stored as a freeze dried powder at -20°C.

An insoluble poly-hydroxypolymer, such as agarose or croos-linked dextran can be tresyl activated by making a suspension of the poly-hydroxypolymer in e.g. acetone and perform the synthesis as a solid phase synthesis. The activated poly-hydroxypolymer can be harvested by filtration. Suitable methods are reported in e.g. Nilsson K and Mosbach K (1987), Methods in Enzymology **135**, p. 67, and in Hermansson GT *et al.* (1992), in "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, Inc., p. 87.

Synthesis of the A Beta Peptide Copolymers Vaccines. TAD (10 mg) is dissolved in 100 μl H_2O and 1000 μl carbonate buffer, pH 9.6, containing 5 mg Aβ-42 (SEQ ID NO: 2, residues 673-714), 2.5 mg P2 (SEQ ID NO: 4) and 2.5 mg P30 (SEQ ID NO: 6) is added. The Aβ-42 and the P2 and P30 peptides all contain protected lysine groups: these are in the form of 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl (Dde) protected lysine groups. The peptides are prepared by means of a standard Fmoc strategy, where the conventional Fmoc-Lys(Boc)-OH has been substituted with Fmoc-Lys(Dde)-OH (obtained from Novabiochem , cat. no. 04-12-1121), *i.e.* the ε-amino group in lysine is protected with Dde instead of Boc.

The pH value is measured and adjusted to 9.6 using 1 M HCl. After 2.5 hours at room temperature, hydrazine from an 80% solution is added to a final hydrazine koncentration of 8% and the solution is incubated for another 30 min. at room tempera-

ture and freeze-dried immediately hereafter. The freeze-dried product is dissolved in H_2O and dialysed extensively against H_2O before the final freeze-drying.

The ratio between B-cell epitopes (Aβ) and T-helper epitopes (P2 and P30) in the final product can be varied by using different concentrations of these peptides in the synthesis step. Furhermore, the final product can be tagged with e.g. mannose (so as to target the conjugate to APCs) by adding aminated mannose to the carbonate buffer in the synthesis step.

If an insoluble activated poly-hydroxypolymer is used to combine the peptides containing the B-cell epitope and the T-helper epitopes, the coupling to the polymer can be performed as a solid phase synthesis and the final product is harvested and purified by wash and filtration.

As mentioned in the general description, the presently described approach for preparing a peptide based vaccine may be applied to any other polypeptide antigen where it would be convenient to prepare a purely synthetic peptide vaccine and where the polypeptide antigen in question provides a sufficient immunogenicity in one single peptide:

EXAMPLE 4

Synthesis Peptide Copolymer Vaccines

TAD (10 mg) is dissolved in 100 µl H_2O and 1000 µl carbonate buffer, pH 9.6, containing 1-5 mg peptide A (any immunogenic peptide of interest!), 1-5 mg P2 (diphtheria toxoid P2 epitope) and 1-5 mg P30 (diphtheria toxoid P30 epitope) is added. The pH value is measured and adjusted to 9.6 using 0.1 M HCl.

After 2.5 hours at room temperature the solution is freeze dried immediately hereafter. The freeze-dried product is dissolved in H_2O and dialysed extensively against H_2O or desalted on a gelfiltration column before the final freeze-drying. In case the peptides have lysine in the sequence the ε-amine in the lysine side chain should be protected by Dde using the Fmoc-Lys(Dde)-OH derivative in the synthesis (Gregorius and Theisen 2001, submitted). After coupling, hydrazine from an 80% solution is added to a final hydrazine concentration between 1-20% and the solution is incubated for another 30 min at room temperature, freeze dried immediately hereafter and dialysed extensively against H_2O or desalted on a gelfiltration column before the final freeze-drying. The principle is set forth in schematic form in Fig. 2.

Such immunogens have been utilised by the inventors with a short C-terminal fragment of the *Borrelia burgdorferi* protein OspC as "peptide A" and a diptheria toxoid epitope (P2 or P30) as a peptide B. The results of immunization studies with this antigen revealed that only the immunogen of the invention including the OspC fragment and a foreign diptheria epitope matching the MHC haplotype of the vaccinated mice were capable of inducing antibodies reactive with OspC in these mice. In contrast, a molecule containing only the OspC peptide was unable to induce antibody production and the same was true for a mixture of 2 immunogens where one contained the OspC and the other the epitope. It is therefore concluded that the inclusion in the same polyhydroxypolymer carrier is superior, if not essential, in order to induce antibody production against a short peptide hapten as OspC.

LIST OF REFERENCES

Brookmeyer, R.; Gray, S.; Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer's Disease in the United States and the Public Health Impact of Delaying Disease Onset. American Journal of Public Health, 88(9), 1337-1342.

Buttini, M.; Orth, M.; Bellosta, S.; Akeefe, H.; Pitas, R.E.; Wyss-Coray, T.; Mucke, L.; Mahley, R.W. (1999). Expression of Human Apolipoprotein E3 or E4 in the Brains of Apoe-/- Mice: Isoform-Specific Effects on Neurodegeneration. Journal of Neuroscience, 19, 4867-4880.

Clark, L.N.; Poorkaj, P.; Wszolek, Z.; Geschwind, D.H.; Nasreddine, Z.S.; Miller, B.; Li, D.; Payami, H.; Awert, F.; Markopoulou, K.; Andreadis, A.; D'Souza, I.; Lee, V.M.; Reed, L.; Trojanowski, J.Q.; Zhukareva, V.; Bird, T.; Schellenberg, G.; Wilhelmsen, K.C. (1998). Pathogenic Implications of Mutations in the Tau Gene in Pallido-Ponto-Nigral Degeneration and Related Neurodegenerative Disorders Linked to Chromosome 17. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 95(22), 13103-13107.

Gupta, R. K. *et. al.* (1998), Dev Biol Stand. 92: 63-78.

Hsiao K. et al. (1998) Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins", Exp. Gerontol. 33 (7-8), 883-889

Hutton, M.; Lendon, C.L.; Rizzu, P.; Baker, M.; Froelich, S.; Houlden, H.; Pickering-Brown, S.; Chakraverty, S.; Isaacs, A.; Grover, A.; Hackett, J.; Adamson, J.; Lincoln, S.; Dickson, D.; Davies, P.; Petersen, R.C.; Stevens, M.; de Graaff, E.; Wauters, E.; van Baren, J.; Hillebrand, M.; Joosse, M.; Kwon, J.M.; Nowotny, P.; Che, L.K.; Norton, J.; Morris, J.C.; Reed, L.E.; Trojanowski, J.; Basun, H.; Lannfelt, L.; Neystat, M.; Fahn, S.; Dark, F.; Tannenberg, T.; Dodd, P.; Hayward, N.; Kwok, J.B.J.; Schofield, P.R.; Andreadis, A.; Snowden, J.; Craufurd, D.; Neary, D.; Owen, F.; Oostra, B.A.; Hardy, J.; Goate, A.; van Swieten, J.; Mann, D.; Lynch, T.; Heutink, P. (1998). Association of Missense and 5'-Splice-Site Mutations in Tau with the Inherited Dementia FTDP-17. Nature, 393, 702-705.

Janus, C. *et. al.* (2000), Nature **408**: 979 - 982.

Kas, H.S. (1997) J Microencapsul **14**: 689-711

Leon, J.; Cheng, C.K.; Neumann, P.J. (1998). Alzheimer's Disease Care: Costs and Potential Savings. Health Affairs, 17(6), 206-216.

Lippa C. F. et al. (1998) Ab-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. Lancet 352, 1117-1118

Luo, J.-J.; Wallace, W.; Riccioni, T.; Ingram, D.K.; Roth, G.S.; Kusiak, J.W. (1999). Death of PC12 Cells and Hippocampal Neurons Induced by Adenoviral-Mediated FAD Human Amyloid Precursor Protein Gene Expression. Journal of Neuroscience Research, 55(5), 629-642.

Naruse, S.; Thinakaran, G.; Luo, J.-J.; Kusiak, J.W.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Qian, X.; Ginty, D.D.; Price, D.L.; Borchelt, D.R.; Wong, P.C.; Siso-

dia, S.S. (1998). Effects of PS1 Deficiency on Membrane Protein Trafficking in Neurons. Neuron, 21(5), 1213-1231.

National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999, NIH Publication No. 99-4664.

Pietrobon, P.J. (1995), Pharm Biotechnol. 6: 347-61Poorkaj, P.; Bird, T.D.; Wijsman, E.; Nemens, E.; Garruto, R.M.; Anderson, L.; Andreadis, A.; Wiederhold, W.C.; Raskind, M.; Schellenberg, G.D. (1998). Tau Is a Candidate Gene for Chromosome 17 Frontotemporal Dementia. Annals of Neurology, 43, 815-825.

Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandevert, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games, D.; Seubert, P. (1999). Immunization with A-beta Attenuates Alzheimer's Disease-Like Pathology in the PDAPP Mouse. Nature, 400(6740), 173-177.

Shekunov, B. *et. al.* (1999), J. Crystal Growth **198/199**: 1345 - 1351.

Spillantini, M.G.; Murrell, J.R.; Goedert, M.; Farlow, M.R.; Klug, A.; Ghetti, B. (1998). Mutation in the Tau Gene in Familial Multiple System Tauopathy with Presenile Dementia. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 95(13), 7737-7741.

Strittmatter, W.J.; Saunders, A.M.; Schmechel, D.; Pericak-Vance, M.; Enghild, J.; Salvesen, G.S.; Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: High-Avidity Binding to Aβ and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late-Onset Familial Alzheimer Disease. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 90,1977-1981.

Vidal, R.; Frangione, B.; Rostagno, A.; Mead, S.; Revesz, T.; Plant, G.; Ghiso, J. (1999). A Stop-Codon Mutation in the BRI Gene Associated with Familial British Dementia. Nature, 399: 776-781.

Zheng H. (1996) "Mice deficient for the amyloid precursor protein gene. Ann. N Y Acad. Sci., 777, 421-426.

York, P. (1999), PSTT **11**: 430-440

CLAIMS

1. A method for *in vivo* down-regulation of amyloid precursor protein (APP) or beta amyloid (Aβ) in an animal, including a human being, the method comprising effecting presentation to the animal's immune system of an immunogenically effective amount of at least one analogue of APP or Aβ that incorporates into the same molecule at least one B-cell epitope of APP and/or Aβ and at least one foreign T-helper epitope (T_H epitope) so that immunization of the animal with the analogue induces production of antibodies against the animal's autologous APP or Aβ, wherein the analogue

a) is a polyamino acid that consists of at least one copy of a subsequence of residues 672-714 in SEQ ID NO: 2, wherein the foreign T_H epitope is incorporated by means of amino acid addition and/or insertion and/or deletion and/or substitution, wherein the subsequence is selected from the group consisting of residues 1-42, residues 1-40, residues 1-39, residues 1-35, residues 1-34, residues 1-28, residues 1-12, residues 1-5, residues 13-28, residues 13-35, residues 17-28, residues 25-35, residues 35-40, residues 36-42 and residues 35-42 of the amino acid sequence consisting of amino acid residues 673-714 of SEQ ID NO: 2; and/or

b) is a polyamino acid that contains the foreign T_H epitopes and a disrupted APP or Aβ sequence so that the analogue does not include any subsequence of SEQ ID NO: 2 that binds productively to MHC class II molecules initiating a T-cell response; and/or

c) is a polyamino acid that comprises the foreign T_H epitope and APP or Aβ derived amino acids, and comprises 1 single methionine residue located in the C-terminus of the analogue, wherein other methionine residues in APP or Aβ and in the foreign T_H epitope have been substituted or deleted, and preferably have been substituted by leucin or isoleucine; and/or

d) is a conjugate comprising a polyhydroxypolymer backbone to which is separately coupled a polyamino acid as defined in a) and/or a polyamino acid as defined in b) and/or a polyamino acid as defined in c); and/or

e) is a conjugate comprising a polyhydroxypolymer backbone to which is separately coupled 1) the foreign T_H epitope and 2) a polyamino acid selected from the group consisting of a subsequence as defined in a), a disrupted sequence of APP or Aβ as defined in b), and an APP or Aβ derived amino acid sequence that comprises 1 single methionine residue located in the C-terminus, wherein other methionine residues in APP or Aβ and in the foreign T_H epitope have been substituted or deleted, and preferably have been substituted by leucin or isoleucine.

2. The method according to claim 1, wherein a substantial fraction of B-cell epitopes of APP or Aβ are preserved in the analogue and that

- at least one first moiety is introduced which effects targeting of the analogue to an antigen presenting cell (APC) or a B-lymphocyte, and/or

- at least one second moiety is introduced which stimulates the immune system, and/or
- at least one third moiety is introduced which optimizes presentation of the analogue to the immune system.

3. The method according to claim 2, wherein the first and/or of the second and/or of the third moiety is/are attached as side groups by covalent or non-covalent binding to suitable chemical groups in the APP or Aβ sequence.

4. The method according to any one of the preceding claims, wherein the analogue comprises a fusion polypeptide.

5. The method according to any one of the preceding claims, wherein introduction of the amino acid substitution and/or deletion and/or insertion and/or addition results in a substantial preservation of the overall tertiary structure of APP or Aβ.

6. The method according to any one of the preceding claims, wherein the analogue includes duplication of at least one B-cell epitope of APP or Aβ and/or introduction of a hapten.

7. The method according to any one of the preceding claims, wherein the foreign T-cell epitope is immunodominant in the animal.

8. The method according to any one of the preceding claims, wherein the foreign T-cell epitope is promiscuous, such as a foreign T-cell epitope which is selected from a natural promiscuous T-cell epitope and an artificial MHC-II binding peptide sequence.

9. The method according to claim 8, wherein the natural T-cell epitope is selected from a Tetanus toxoid epitope such as P2 or P30, a diphtheria toxoid epitope, an influenza virus hemagluttinin epitope, and a *P. falciparum* CS epitope.

10. The method according to any one of the preceding claims, wherein the analogue comprises B-cell epitopes which are not exposed to the extracellular phase when present in a cell-bound form of the precursor polypeptide Aβ.

11. The method according to any one of the preceding claims, wherein the analogue lacks at least one B-cell epitope which is exposed to the extracellular phase when present in a cell-bound form of the precursor polypeptide.

12. The method according to any one of the preceding claims, wherein the analogue comprises at most 9 consecutive amino acids of SEQ ID NO: 2., such as at most 8, at most 7, at most 6, at most 5, at most 4, and at most 3 consecutive amino acids.

13. The method according to claim 12, wherein the analogue comprises at least one subsequence of SEQ ID NO: 2 so that each such at least one subsequence of SEQ ID NO: 2 independently consists of amino acid stretches selected from the group consisting of 9 consecutive amino acids of SEQ ID NO: 2, 8 consecutive amino acids of SEQ ID NO: 2, 7 consecutive amino acids of SEQ ID NO: 2, 6 consecutive amino acids of SEQ ID NO: 2, 5 consecutive amino acids of SEQ ID NO: 2, 4 consecutive amino acids of SEQ ID NO: 2, and 3 consecutive amino acids of SEQ ID NO: 2.

14. The method according to claim 22 or 23, wherein the consecutive amino acids begin at an amino acid residue selected from the group consisting of residue 672, 673, 674, 675, 676,

677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, and 714.

15. The method according to any one of the preceding claims, wherein presentation to the immune system is effected by having at least two copies of an Aβ derived fragment or the analogue covalently of non-covalently linked to a carrier molecule capable of effecting presentation of multiple copies of antigenic determinants.

16. The method according to any one of the preceding claims, variants d or e, wherein the polyamino acid and T_H epitope are attached to the polyhydroxypolymer by means of an amide bond.

17. The method according to any one of the preceding claims , variants d or e, wherein the the polyhydroxypolymer is a polysaccharide.

18. The method according to any one of the preceding claims, wherein the analogue has been formulated with an adjuvant which facilitates breaking of autotolerance to autoantigens.

19. The method according to any one of the preceding claims, wherein an effective amount of the analogue is administered to the animal via a route selected from the parenteral route such as the intracutaneous, the subcutaneous, and the intramuscular routes; the peritoneal route; the oral route; the buccal route; the sublinqual route; the epidural route; the spinal route; the anal route; and the intracranial route.

20. The method according to claim 19, wherein the effective amount is between 0.5 μg and 2,000 μg of the analogue.

21. The method according to any one of claims 1-14, variants a-c, wherein presentation of the analogue to the immune system is effected by introducing nucleic acid(s) encoding the analogue into the animal's cells and thereby obtaining *in vivo* expression by the cells of the nucleic acid(s) introduced.

22. The method according to claim 21, wherein the nucleic acid(s) introduced is/are selected from naked DNA, DNA formulated with charged or uncharged lipids, DNA formulated in liposomes, DNA included in a viral vector, DNA formulated with a transfection-facilitating protein or polypeptide, DNA formulated with a targeting protein or polypeptide, DNA formulated with Calcium precipitating agents, DNA coupled to an inert carrier molecule, DNA encapsulated in chitin or chitosan, and DNA formulated with an adjuvant.

23. The method according to any one of claims 19-22, which includes at least one administration/introduction per year, such as at least 2, at least 3, at least 4, at least 6, and at least 12 administrations/introductions.

24. A method for treating and/or preventing and/or ameliorating Alzheimer's disease or other diseases and conditions characterized by amyloid deposits, the method comprising down-regulating APP or Aβ according to the method of any one of the preceding claims to such an extent that the total amount of amyloid is decreased or that the rate of amyloid formation is reduced with clinical significance.

25. An analogue of APP or Aβ which is derived from an animal APP or Aβ wherein is introduced a modification which has as a result that immunization of the animal with the analogue induces production of antibodies against the animal's autologous

APP or Aβ, and wherein the analogue is as defined in any one of claims 1-17.

26. An immunogenic composition comprising an immunogenically effective amount of an analogue according to claim 25, the composition further comprising a pharmaceutically and immunologically acceptable carrier and/or vehicle and optionally an adjuvant.

27. A nucleic acid fragment which encodes an analogue according to claim 25.

28. A vector carrying the nucleic acid fragment according to claim 27, such as a vector that is capable of autonomous replication.

29. The vector according to claim 28 which is selected from the group consisting of a plasmid, a phage, a cosmid, a minichromosome, and a virus.

30. The vector according to claim 28 or 29, comprising, in the 5'→3' direction and in operable linkage, a promoter for driving expression of the nucleic acid fragment according to claim 27, optionally a nucleic acid sequence encoding a leader peptide enabling secretion of or integration into the membrane of the polypeptide fragment, the nucleic acid fragment according to claim 27, and optionally a terminator.

31. The vector according to any one of claims 28-30 which, when introduced into a host cell, is capable or incapable of being integrated in the host cell genome.

32. The vector according to claim 30 or 31, wherein the promoter drives expression in a eukaryotic cell and/or in a prokaryotic cell.

33. A transformed cell carrying the vector of any one of claims 28-32, such as a transformed cell which is capable of replicating the nucleic acid fragment according to claim 27.

34. The transformed cell according to claim 33, which is a microorganism selected from a bacterium, a yeast, a protozoan, or a cell derived from a multicellular organism selected from a fungus, an insect cell such as an S_2 or an SF cell, a plant cell, and a mammalian cell.

35. The transformed cell according to claim 33 or 34, which expresses the nucleic acid fragment according to claim 28, such as a transformed cell, which secretes or carries on its surface, the analogue according to claim 25.

36. The method according to any one of claims 1-14, variants a-c, wherein presentation to the immune system is effected by administering a non-pathogenic microorganism or virus which is carrying a nucleic acid fragment which encodes and expresses the analogue.

37. A composition for inducing production of antibodies against amyloid, the composition comprising

- a nucleic acid fragment according to claim 27 or a vector according to any one of claims 28-32, and

- a pharmaceutically and immunologically acceptable carrier and/or vehicle and/or adjuvant.

38. A stable cell line which carries the vector according to any one of claims 28-32 and which expresses the nucleic acid fragment according to claim 27, and which optionally secretes or carries the analogue according to claim 25 on its surface.

1/2

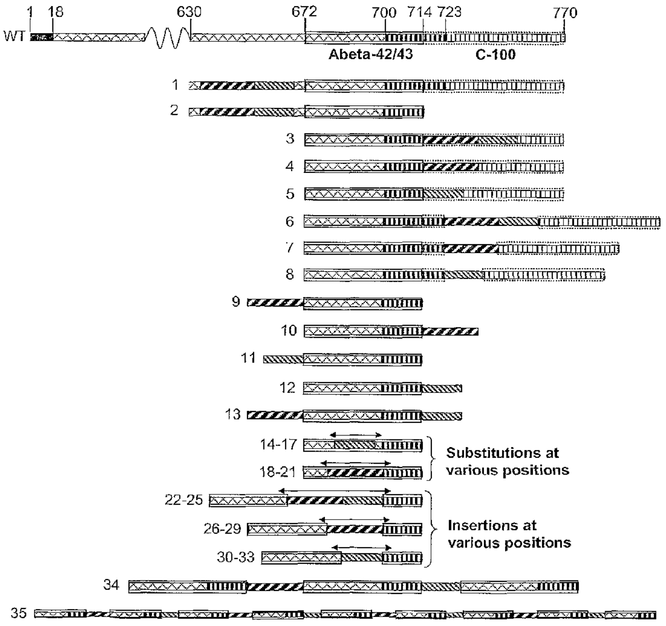

1
18
630
672
700
714
723
770
WT
Abeta-42/43
C-100
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14-17
18-21
Substitutions at various positions
22-25
26-29
30-33
Insertions at various positions
34
35

Fig. 1

2/2

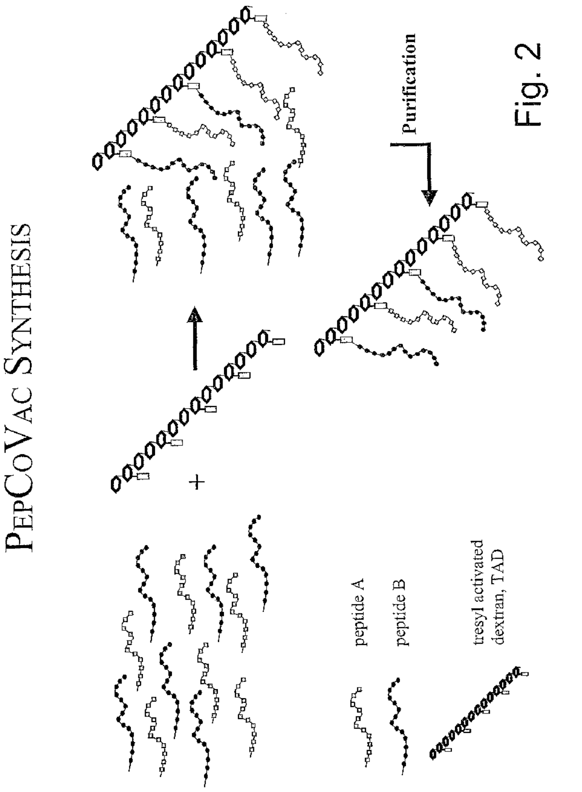

PepCoVac Synthesis
+
Purification
peptide A
peptide B
tresyl activated
dextran, TAD

Fig. 2

SEQUENCE LISTING

<110> Pharmexa A/S

<120> Novel Method For Down-Regulation Of Amyloid

<130> P1014PC1

<140>
<141>

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1
<211> 2313
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2313)

<220>
<221> misc_feature
<222> (2098)..(2169)
<223> nucleotides encoding transmembrane region

<220>
<221> misc_feature
<222> (2014)..(2313)
<223> Nucleotides encoding C-100

<220>
<221> misc_feature
<222> (2016)..(2144)
<223> Abeta 42/43

<220>
<221> misc_feature
<222> (2014)..(2142)
<223> Abeta 42/43

<400> 1

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

gcg ctg gag gta ccc act gat ggt aat gct ggc ctg ctg gct gaa ccc     96
Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
            20                  25                  30

cag att gcc atg ttc tgt ggc aga ctg aac atg cac atg aat gtc cag    144
Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
        35                  40                  45
```

```
aat ggg aag tgg gat tca gat cca tca ggg acc aaa acc tgc att gat     192
Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
     50                  55                  60

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

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

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

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

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

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

aag agt acc aac ttg cat gac tac ggc atg ttg ctg ccc tgc gga att     528
Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
                165                 170                 175

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

agt gac aat gtg gat tct gct gat gcg gag gag gat gac tcg gat gtc     624
Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
        195                 200                 205

tgg tgg ggc gga gca gac aca gac tat gca gat ggg agt gaa gac aaa     672
Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
    210                 215                 220

gta gta gaa gta gca gag gag gaa gaa gtg gct gag gtg gaa gaa gaa     720
Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
225                 230                 235                 240

gaa gcc gat gat gac gag gac gat gag gat ggt gat gag gta gag gaa     768
Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
                245                 250                 255

gag gct gag gaa ccc tac gaa gaa gcc aca gag aga acc acc agc att     816
Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
            260                 265                 270

gcc acc acc acc acc acc acc aca gag tct gtg gaa gag gtg gtt cga     864
Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
        275                 280                 285
```

gag gtg tgc tct gaa caa gcc gag acg ggg ccg tgc cga gca atg atc 912
Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
290 295 300

tcc cgc tgg tac ttt gat gtg act gaa ggg aag tgt gcc cca ttc ttt 960
Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
305 310 315 320

tac ggc gga tgt ggc ggc aac cgg aac aac ttt gac aca gaa gag tac 1008
Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
325 330 335

tgc atg gcc gtg tgt ggc agc gcc atg tcc caa agt tta ctc aag act 1056
Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
340 345 350

acc cag gaa cct ctt gcc cga gat cct gtt aaa ctt cct aca aca gca 1104
Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
355 360 365

gcc agt acc cct gat gcc gtt gac aag tat ctc gag aca cct ggg gat 1152
Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp
370 375 380

gag aat gaa cat gcc cat ttc cag aaa gcc aaa gag agg ctt gag gcc 1200
Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
385 390 395 400

aag cac cga gag aga atg tcc cag gtc atg aga gaa tgg gaa gag gca 1248
Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
405 410 415

gaa cgt caa gca aag aac ttg cct aaa gct gat aag aag gca gtt atc 1296
Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
420 425 430

cag cat ttc cag gag aaa gtg gaa tct ttg gaa cag gaa gca gcc aac 1344
Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
435 440 445

gag aga cag cag ctg gtg gag aca cac atg gcc aga gtg gaa gcc atg 1392
Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
450 455 460

ctc aat gac cgc cgc cgc ctg gcc ctg gag aac tac atc acc gct ctg 1440
Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
465 470 475 480

cag gct gtt cct cct cgg cct cgt cac gtg ttc aat atg cta aag aag 1488
Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
485 490 495

tat gtc cgc gca gaa cag aag gac aga cag cac acc cta aag cat ttc 1536
Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
500 505 510

```
gag cat gtg cgc atg gtg gat ccc aag aaa gcc gct cag atc cgg tcc   1584
Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
        515                 520                 525

cag gtt atg aca cac ctc cgt gtg att tat gag cgc atg aat cag tct   1632
Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser
    530                 535                 540

ctc tcc ctg ctc tac aac gtg cct gca gtg gcc gag gag att cag gat   1680
Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
545                 550                 555                 560

gaa gtt gat gag ctg ctt cag aaa gag caa aac tat tca gat gac gtc   1728
Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
                565                 570                 575

ttg gcc aac atg att agt gaa cca agg atc agt tac gga aac gat gct   1776
Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
            580                 585                 590

ctc atg cca tct ttg acc gaa acg aaa acc acc gtg gag ctc ctt ccc   1824
Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
        595                 600                 605

gtg aat gga gag ttc agc ctg gac gat ctc cag ccg tgg cat tct ttt   1872
Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
    610                 615                 620

ggg gct gac tct gtg cca gcc aac aca gaa aac gaa gtt gag cct gtt   1920
Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
625                 630                 635                 640

gat gcc cgc cct gct gcc gac cga gga ctg acc act cga cca ggt tct   1968
Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
                645                 650                 655

ggg ttg aca aat atc aag acg gag gag atc tct gaa gtg aag atg gat   2016
Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
            660                 665                 670

gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa ttg   2064
Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
        675                 680                 685

gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa ggt gca atc att gga   2112
Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
    690                 695                 700

ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg aca gtg atc gtc atc acc ttg   2160
Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
705                 710                 715                 720

gtg atg ctg aag aag aaa cag tac aca tcc att cat cat ggt gtg gtg   2208
Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
                725                 730                 735

gag gtt gac gcc gct gtc acc cca gag gag cgc cac ctg tcc aag atg   2256
Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
            740                 745                 750
```

```
cag cag aac ggc tac gaa aat cca acc tac aag ttc ttt gag cag atg     2304
Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
        755                 760                 765

cag aac tag                                                         2313
Gln Asn
    770


<210> 2
<211> 770
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
305                 310                 315                 320

Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
                325                 330                 335

Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
            340                 345                 350

Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
        355                 360                 365

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

Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
385                 390                 395                 400

Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
                405                 410                 415

Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
            420                 425                 430

Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
        435                 440                 445

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

Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
465                 470                 475                 480

Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
                485                 490                 495

Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
            500                 505                 510

Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
        515                 520                 525

Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser
    530                 535                 540
```

```
Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
545                 550                 555                 560

Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
                565                 570                 575

Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
            580                 585                 590

Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
        595                 600                 605

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

Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
625                 630                 635                 640

Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
                645                 650                 655

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
            660                 665                 670

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
        675                 680                 685

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
    690                 695                 700

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
705                 710                 715                 720

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
                725                 730                 735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
            740                 745                 750

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
        755                 760                 765

Gln Asn
    770

<210> 3
<211> 45
<212> DNA
<213> Clostridium tetani

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(45)
<223> DNA encoding P2 epitope
```

```
<400> 3
cag tac atc aaa gct aac tcc aaa ttc atc ggt atc acc gag ctg        45
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
  1               5                  10                  15


<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Clostridium tetani

<400> 4
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
  1               5                  10                  15



<210> 5
<211> 63
<212> DNA
<213> Clostridium tetani

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(63)
<223> DNA encoding P30 epitope

<400> 5
ttc aac aac ttc acc gta agc ttc tgg ctg cgt gtt ccg aaa gtt agc    48
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
  1               5                  10                  15

gct agc cac ctg gaa                                                63
Ala Ser His Leu Glu
             20


<210> 6
<211> 21
<212> PRT
<213> Clostridium tetani

<400> 6
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
  1               5                  10                  15

Ala Ser His Leu Glu
             20

<210>  7
<211>  21
<212>  DNA
<213>  Synthetic
<223>  Synthetic PCR primer

<400>  7
caactcagct tcctttcggg c                                                21

<210>  8
```

```
<211>  21
<212>  DNA
<213>  Synthetic
<223>  Synthetic PCR primer

<400>  8
agatctcgat cccgcgaaat t                                              21

<210>  9
<211>  135
<212>  DNA
<213>  Synthetic
<223>  Synthetic PCR primer

<400>  9
atggatgcag aattccgtca cgactccggt tacgaagttc accaccagaa actggttttc     60
ttcgcagaag atgttggttc caacaaaggt gcaatcatcg gtctgatggt tggcggtgtt    120
gttatcgcga cctag                                                     135


<210>  10
<211>  31
<212>  DNA
<213>  Synthetic
<223>  Synthetic PCR primer

<400>  10
gccggccatg gatgcagaat tccgtcacga c                                   31

<210>  11
<211>  39
<212>  DNA
<213>  Synthetic
<223>  Synthetic PCR primer

<400>  11
gccggaagct tctaggtcgc gataacaaca ccgccaacc                           39

<210>  12
<211>  84
<212>  DNA
<213>  Synthetic
<223>  Synthetic PCR primer

<400>  12
ccggcaagct tctacagctc ggtgataccg atgaatttgg agttagcttt gatgtactgg     60
gtcgcgataa caacaccgcc aacc                                           84

<210>  13
<211>  101
<212>  DNA
<213>  Synthetic
<223>  Synthetic PCR primer

<400>  13
gccggccatg ggtttcaaca acttcaccgt tagcttctgg ctgcgtgttc cgaaagttag     60
cgcgagccac ctggaagatg cagaattccg tcacgactcc g                        101

<210>  14
```

<211> 172
<212> DNA
<213> Synthetic
<223> Synthetic PCR primer

<400> 14
gggccaagct tggatccggt cgcgataaca acaccgccaa ccatcagacc gatgattgca 60
cctttgttgg aaccaacatc ttctgcgaag aaaaccagtt tctggtggtg aacttcgtaa 120
ccggagtcgt gacggaactc tgcatccagc tcggtgatac cgatgaattt gg 172

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Synthetic
<223> Synthetic PCR primer

<400> 15
ctggaagatg cagagttccg tcacgactcc 30

<210> 16
<211> 35
<212> DNA
<213> Synthetic
<223> Synthetic PCR primer

<400> 16
gcgccggatc cttcaacaac ttcaccgtta gcttc 35

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> Synthetic
<223> Synthetic HLA DR binding sequence

<400> 17
Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/015812 A3

(51) International Patent Classification⁷: A61K 39/00, 39/385, C07K 14/47, A61P 25/28

(21) International Application Number: PCT/DK2002/000547

(22) International Filing Date: 20 August 2002 (20.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

PA 2001 01231	20 August 2001 (20.08.2001)	DK
60/337,543	22 October 2001 (22.10.2001)	US
PA 2002 00558	16 April 2002 (16.04.2002)	DK
60/373,027	16 April 2002 (16.04.2002)	US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): **PHARMEXA A/S** [DK/DK]; Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **RASMUSSEN, Peter, Birk** [DK/DK]; Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK). **JENSEN, Martin, Roland** [DK/DK]; Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK). **NIELSEN, Klaus, Gregorius** [DK/DK]; Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK). **KOEFOED, Peter** [DK/DK]; Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK). **DEGAN, Florence, Dal** [FR/DK]; Pharmexa A/S, Kogle Allé 6, DK-2970 Hørsholm (DK).

(74) Agent: **KOEFOED, Peter**; c/0 Inspicos A/S, Bøge Allé 3, P.O. Box 45, DK-2970 Hørsholm (DK).

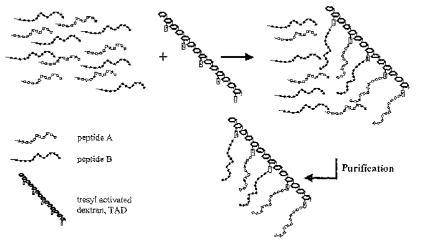
(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

[Continued on next page]

(54) Title: BETA-AMYLOID-ANALOGUE-T-CELL EPITOP VACCINE

PEPCOVAC SYNTHESIS



(57) Abstract: Disclosed are novel methods for combatting diseases characterized by deposition of amyloid. The methods generally rely on immunization against amyloid precursor protein (APP) or beta amyloid (Aβ). Immunization is preferably effected by administration of analogues of autologous APP or Aβ, said analogues being capable of inducing antibody production against the autologous amyloidogenic polypeptides. Especially preferred as an immunogen is autologous Aβ which has been modified by introduction of one single or a few foreign, immunodominant and promiscuous T-cell epitopes. Also disclosed are nucleic acid vaccination against APP or Aβ and vaccination using live vaccines as well as methods and means useful for the vaccination. Such methods and means include methods for the preparation of analogues and pharmaceutical formulations, as well as nucleic acid fragments, vectors, transformed cells, polypeptides and pharmaceutical formulations.

WO 2003/015812 A3

WO 2003/015812 A3

Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report: 25 March 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【手続補正書】
【提出日】平成15年10月24日(2003.10.24)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
アナログが
a) 少なくとも1つの外来Tヘルパーエピトープ(T_Hエピトープ)および破壊されたアミロイド前駆体タンパク質(APP)またはβアミロイド(Aβ)配列を含むポリアミノ酸であることにより、該アナログが、T細胞応答を開始するMHCクラスII分子に生産的に結合する、SEQ ID NO: 2のいずれの配列をも含まないか；および／または
b) a)で定義したポリアミノ酸が別個に結合しているポリヒドロキシポリマー骨格を含むコンジュゲートであるか；および／または
c) 1) 少なくとも1つの外来T_Hエピトープおよび2) b)で定義した破壊されたAPPもしくはAβ配列が別個に結合しているポリヒドロキシポリマー骨格を含むコンジュゲートである、
APPもしくはAβに対して作成したポリクローナル血清にAPPまたはAβが反応するのと同じ程度にアナログが反応するように、APPおよび／またはAβのB細胞エピトープの実質的なフラクションを同じ分子に組み込む、APPまたはAβの少なくとも1つのアナログと、少なくとも1つの外来T_Hエピトープとの免疫原的有効量を、アナログによる動物の免疫化が動物の自己APPまたはAβに対する抗体産生を誘導するように、動物の免疫系に提示することを含む、ヒトを含む動物におけるAPPまたはAβのインビボダウンレギュレーション方法。
【請求項２】
－抗原提示細胞(APC)もしくはBリンパ球へのアナログの標的化をもたらす、少なくとも1つの第一成分を導入するか、および／または
－免疫系を刺激する、少なくとも1つの第二成分を導入するか、および／または
－免疫系へのアナログの提示を最適化する、少なくとも1つの第三成分を導入する、
請求項1に記載の方法。
【請求項３】
第一および／または第二および／または第三成分が、APPもしくはAβ配列における適切な化学群への共有もしくは非共有結合により側鎖として結合している、請求項2に記載の方法。
【請求項４】
アナログが融合ポリペプチドを含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項５】
アナログが、APPもしくはAβの少なくとも1つのB細胞エピトープの重複、および／またはハプテンの導入を含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項６】
外来T細胞エピトープが動物において免疫優性である、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項７】
外来T細胞エピトープが、天然乱交雑T細胞エピトープおよび人工MHC-II結合ペプチド配列から選択される外来T細胞エピトープのように乱交雑である、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項８】
天然T細胞エピトープが、P2またはP30のような破傷風トキソイドエピトープ、ジフテリアトキソイドエピトープ、インフルエンザウイルスヘマグルチニンエピトープ、およびピー

・ファルシパルムCSエピトープから選択される、請求項7に記載の方法。
【請求項９】
アナログが、前駆体ポリペプチドAβの細胞結合形態に存在する場合に細胞外の相に露出しないB細胞エピトープを含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１０】
アナログが、前駆体ポリペプチドの細胞結合形態に存在する場合に細胞外の相に露出する少なくとも1つのB細胞エピトープを有さない、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１１】
アナログが、最大で8、最大で7、最大で6、最大で5、最大で4および最大で3の連続したアミノ酸のようなSEQ ID NO: 2の最大で9の連続したアミノ酸を含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１２】
アナログがSEQ ID NO: 2の少なくとも1つのサブシークエンスを含むことにより、SEQ ID NO: 2の少なくとも1つのサブシークエンスがそれぞれ独立して、SEQ ID NO: 2の9の連続したアミノ酸、SEQ ID NO: 2の8の連続したアミノ酸、SEQ ID NO: 2の7の連続したアミノ酸、SEQ ID NO: 2の6の連続したアミノ酸、SEQ ID NO: 2の5の連続したアミノ酸、SEQ ID NO: 2の4の連続したアミノ酸、およびSEQ ID NO: 2の3の連続したアミノ酸からなる群より選択されるアミノ酸範囲からなる、請求項11に記載の方法。
【請求項１３】
連続したアミノ酸が、残基672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713および714からなる群より選択されるアミノ酸残基から始まる、請求項11または12に記載の方法。
【請求項１４】
少なくとも2コピーのAβ由来断片、または抗原決定基の多コピーを提示することができる担体分子に共有的もしくは非共有的に結合したアナログを有することにより、免疫系への提示が行われる、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１５】
変形b)またはc)で、ポリアミノ酸およびT_Hエピトープが、アミド結合によりポリヒドロキシポリマーに結合している、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１６】
変形b)またはc)で、ポリヒドロキシポリマーが多糖類である、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１７】
アナログが、自己抗原への自己寛容を破壊するのを促進するアジュバントとともに処方される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１８】
アナログの有効量が、皮内、皮下および筋肉内のような非経口経路；腹膜経路；経口経路；バッカル経路；舌下経路；硬膜外経路；脊髄経路；肛門経路；頭蓋内経路から選択される経路を経て動物に投与される、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１９】
有効量が、0.5μg～2,000μgのアナログである、請求項18に記載の方法。
【請求項２０】
変形a)で、免疫系へのアナログの提示が、アナログをエンコードする核酸を動物細胞に導入し、それにより導入された核酸の該細胞によるインビボ発現を得ることによりもたらされる、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。
【請求項２１】
導入された核酸が、裸のDNA、荷電または非荷電の脂質とともに処方されたDNA、リポソーム中に処方されたDNA、ウイルスベクターに包含されたDNA、トランスフェクション促進タンパク質またはポリペプチドとともに処方されたDNA、標的化タンパク質またはポリペプ

チドとともに処方されたDNA、カルシウム沈殿剤とともに処方されたDNA、不活性担体分子に結合したDNA、キチンまたはキトサン中に被包されたDNA、およびアジュバントとともに処方されたDNAから選択される、請求項20に記載の方法。
【請求項２２】
少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも6、少なくとも12の投与/導入のような、1年あたり少なくとも1の投与/導入を含む、請求項18～21のいずれか1項に記載の方法。
【請求項２３】
アミロイドの全量が減少するか、もしくはアミロイド形成の速度が臨床上有意義に減少する程度に、APPまたはAβがダウンレギュレーションされることを含む、アルツハイマー病またはアミロイド沈着を特徴とする他の疾患および症状を治療および／または予防および／または改善するために使用する、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。
【請求項２４】
アナログを用いた動物の免疫化が、動物の自己APPもしくはAβに対する抗体の産生を誘導する結果となる修飾が導入されており、該アナログが請求項1～16のいずれか1項に定義される、動物のAPPもしくはAβに由来するAPPまたはAβのアナログ。
【請求項２５】
医薬上および免疫学上許容される担体および／または賦形剤ならびに任意にアジュバントを含む、請求項24に記載のアナログの免疫原的有効量を含む免疫原性組成物。
【請求項２６】
請求項24に記載のアナログをエンコードする、核酸断片。
【請求項２７】
自立複製可能なベクターのような、請求項26に記載の核酸断片を有するベクター。
【請求項２８】
プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ染色体、およびウイルスからなる群より選択される、請求項27に記載のベクター。
【請求項２９】
請求項26に記載の核酸断片の発現を推進するプロモーター、ポリペプチド断片の分泌もしくは膜への組み込みを可能にするリーダーペプチドをエンコードする、任意の核酸配列、請求項26に記載の核酸断片、および任意のターミネーターを、5'→3'方向に実施可能な連鎖で含む、請求項27または28に記載のベクター。
【請求項３０】
宿主細胞に導入された場合に、宿主細胞のゲノムに組み込まれることが可能であるか、または不可能である、請求項27～29のいずれか1項に記載のベクター。
【請求項３１】
プロモーターが、真核細胞および／または原核細胞における発現を推進する、請求項29または30に記載のベクター。
【請求項３２】
請求項26に記載の核酸断片を複製することができる形質転換細胞のような、請求項27～31のいずれか1項に記載のベクターを有する形質転換細胞。
【請求項３３】
細菌、酵母、原虫、または真菌、S_2もしくはSF細胞のような昆虫細胞、植物細胞および哺乳動物細胞から選択される多細胞生物に由来する細胞から選択される微生物である、請求項32に記載の形質転換細胞。
【請求項３４】
請求項24に記載のアナログを分泌するか、またはその表面に有する形質転換細胞のような、請求項27に記載の核酸断片を発現する、請求項32または33に記載の形質転換細胞。
【請求項３５】
変形a)で、免疫系への提示が、アナログをエンコードして発現する核酸断片を有する非病原性微生物またはウイルスを投与することによりもたらされる、請求項1～13のいずれか1

項に記載の方法。
【請求項３６】
ー請求項26に記載の核酸断片もしくは請求項27～31のいずれか1項に記載のベクター、ならびに
ー医薬上および免疫学上許容される担体および／または賦形剤および／またはアジュバント
を含む、アミロイドに対する抗体産生を誘導する組成物。
【請求項３７】
請求項7～31のいずれか1項に記載のベクターを有し、請求項26に記載の核酸断片を発現し、その表面に請求項24に記載のアナログを任意に分泌するか、または有する、安定な細胞ライン。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DK 02/00547

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/00 A61K39/385 C07K14/47 A61P25/28

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 72880 A (SCHENK DALE B ;YEDNOCK TED (US); BARD FREDERIQUE (US); NEURALAB LT) 7 December 2000 (2000-12-07) page 2, line 28 - line 30 page 5, line 5 - line 8 page 10, line 4 - line 10 page 14, line 9 -page 16, line 25 page 28, line 13 -page 33, line 33	1-38
X	WO 01 42306 A (CHAIN BENJAMIN ;MINDSET BIOPHARMACEUTICALS USA (US)) 14 June 2001 (2001-06-14) page 11, line 14 -page 19, line 34 page 20, line 25 -page 21, line 6 page 22, line 28 - line 34 page 23, line 35 -page 24, line 22 claims 1-3,6-8,10,13-15	1-4, 7-15, 18-38

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 May 2003	02/06/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Hars, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern ıl Application No
PCT/DK 02/00547

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 27944 A (SCHENK DALE B ;ATHENA NEUROSCIENCES INC (US)) 10 June 1999 (1999-06-10) cited in the application page 3, line 8 - line 33 page 4, line 32 -page 5, line 12 page 19, line 33 -page 20, line 7 page 20, line 33 - line 37 claims 44-46,48	1-9,15, 18-32, 36,37
P,X	WO 01 62284 A (NIELSEN KLAUS GREGORIUS ;BIRK PETER (DK); JENSEN MARTIN ROLAND (DK) 30 August 2001 (2001-08-30) cited in the application claims	1-38
A	LEES A ET AL: "Enhanced immunogenicity of protein-dextran conjugates: I. rapid stimulation of enhanced antibody responses to poorly immunogenic molecules" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 12, no. 13, 1994, pages 1160-1166, XP002082853 ISSN: 0264-410X cited in the application abstract	16,17

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ational application No.
PCT/DK 02/00547

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: -
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/DK 02 /00547

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 1-24,36 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern al Application No
PCT/DK 02/00547

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 0072880	A	07-12-2000	AU	5303100	A	18-12-2000
			BG	106241	A	30-08-2002
			BR	0011000	A	19-02-2002
			CA	2370311	A1	07-12-2000
			CN	1359301	T	17-07-2002
			CZ	20013824	A3	13-11-2002
			DE	10084643	T0	11-07-2002
			EE	200100626	A	17-02-2003
			EP	1185298	A2	13-03-2002
			GB	2368794	A	15-05-2002
			HU	0201250	A2	28-08-2002
			NO	20015773	A	25-01-2002
			SK	16982001	A3	06-11-2002
			TR	200103447	T2	22-04-2002
			TR	200202231	T2	21-11-2002
			WO	0072880	A2	07-12-2000
WO 0142306	A	14-06-2001	AU	2725601	A	18-06-2001
			CA	2393763	A1	14-06-2001
			CN	1414976	T	30-04-2003
			EP	1237930	A2	11-09-2002
			WO	0142306	A2	14-06-2001
WO 9927944	A	10-06-1999	BG	104562	A	31-01-2001
			BR	9815357	A	24-10-2000
			CA	2312920	A1	10-06-1999
			CN	1281366	T	24-01-2001
			DE	1033996	T1	07-06-2001
			EE	200000379	A	16-04-2001
			EP	1033996	A1	13-09-2000
			HR	20000443	A1	31-10-2000
			HU	0100627	A2	28-06-2001
			JP	2002502802	T	29-01-2002
			NO	20002784	A	31-07-2000
			PL	342649	A1	18-06-2001
			TR	200001608	T2	23-07-2001
			WO	9927944	A1	10-06-1999
			AU	1706199	A	16-06-1999
			ZA	9810932	A	02-07-1999
WO 0162284	A	30-08-2001	AU	3362001	A	03-09-2001
			BR	0108566	A	19-11-2002
			CA	2400838	A1	30-08-2001
			WO	0162284	A2	30-08-2001
			EP	1259251	A2	27-11-2002
			NO	20023961	A	20-08-2002
			US	2003086938	A1	08-05-2003
			US	2002187157	A1	12-12-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 39/12	Ａ６１Ｋ 39/12		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ 39/39	Ａ６１Ｋ 39/39		
Ａ６１Ｋ 39/395	Ａ６１Ｋ 39/395	Ｄ	
Ａ６１Ｋ 48/00	Ａ６１Ｋ 48/00		
Ａ６１Ｐ 3/10	Ａ６１Ｐ 3/10		
Ａ６１Ｐ 25/00	Ａ６１Ｐ 25/00		
Ａ６１Ｐ 25/14	Ａ６１Ｐ 25/14		
Ａ６１Ｐ 25/16	Ａ６１Ｐ 25/16		
Ａ６１Ｐ 25/28	Ａ６１Ｐ 25/28		
Ｃ０７Ｋ 14/47	Ｃ０７Ｋ 14/47		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ０７Ｋ 19/00	ＺＮＡ	
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ	
Ｃ１２Ｎ 15/09	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	

(31)優先権主張番号 60/373,027
(32)優先日 平成14年4月16日(2002.4.16)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジェンセン，マーティン，ローランド
デンマーク、ディーケーー２９７０ ホーショルム、コグレ アレ ６、ファーメクサ エイ／エス
(72)発明者 ニールセン，クラウス，グレゴリウス
デンマーク、ディーケーー２９７０ ホーショルム、コグレ アレ ６、ファーメクサ エイ／エス
(72)発明者 コエフォエド，ペター
デンマーク、ディーケーー２９７０ ホーショルム、コグレ アレ ６、ファーメクサ エイ／エス
(72)発明者 デガン，フローレンス，ダル
デンマーク、ディーケーー２９７０ ホーショルム、コグレ アレ ６、ファーメクサ エイ／エス

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA01 GA11 HA20
4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45
4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA14 BA01 BA08 BA16 BA17 BA18
BA19 BA22 BA23 BA35 CA18 NA01 NA13 NA14 NA15 ZA022
ZA162 ZA222 ZC352
4C085 AA02 BB11 CC03 CC21 EE01 EE06 GG08 GG10
4C087 AA01 AA02 BC30 BC83 CA09 CA12 CA20 MA05 MA52 MA55
MA56 MA60 MA66 MA67 NA01 NA13 NA14 NA15 ZA02 ZA16

ZA22 ZC35
4H045 AA11 BA10 BA41 CA40 DA86 EA31 FA74