

(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2007-522119

(P2007-522119A)

(43) 公表日 平成19年8月9日(2007.8.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/385 (2006.01)	A 6 1 K 39/385 Z N A	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 H O 4 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
C O 7 K 14/33 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-549876 (P2006-549876)
 (86) (22) 出願日 平成17年1月28日 (2005.1.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年7月20日 (2006.7.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2005/000067
 (87) 国際公開番号 W02005/072777
 (87) 国際公開日 平成17年8月11日 (2005.8.11)
 (31) 優先権主張番号 PA200400117
 (32) 優先日 平成16年1月28日 (2004.1.28)
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(71) 出願人 506250022
 キュリックス エービーエス
 C U R I X A P S
 デンマーク、ディーケー-2500 ヴァ
 ルビー、ストリンデルベルグスヴェイ 50
 S t r i n d b e r g s v e j 5 0, D
 K - 2 5 0 0 V a l b y, D E N M A R
 K
 (74) 代理人 100065248
 弁理士 野河 信太郎
 (72) 発明者
 オルセン, オレ, フライレヴ
 デンマーク、ディーケー-2500 ヴァ
 ルビー、ストリンデルベルグスヴェイ 50

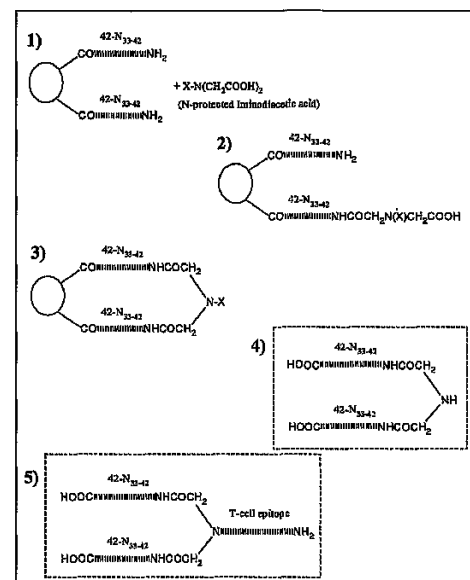
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロイド関連疾患用ワクチンとしてのアミロイドタンパク質のコンジュゲート

(57) 【要約】

アミロイドタンパク質の沈着に關係する疾患、例えばアルツハイマー病の治療、予防及び/又は寛解のためのワクチンに使用できる、アミロイドタンパク質のフラグメントを含んでなる新たなコンジュゲート。アミロイドタンパク質のフラグメントを含んでなるコンジュゲートをそれを必要とする患者に投与し、そのことにより患者で抗体の産生を可能にすることによって、アミロイド関連疾患を治療、予防及び/又は寛解するための方法。アミロイドタンパク質内の病理学的領域と相互作用することができ、そのことにより、例えばアミロイドの原線維、斑及び/又は沈着物の形成を予防する抗体、並びに上記の抗体をそれを必要とする患者に投与する受動免疫法。更に、哺乳動物に投与したとき、可溶性形態の高度にアミロイド形成性のアミロイドβ(1-42)を特異的に標的する抗体を生成するアミロイドβ(142)のC末端部分の特異的フラグメントを提供する。

【選択図】 図1

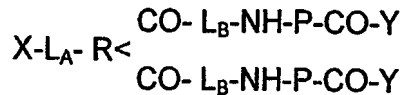


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造

【化 1】



(式中、

Rは $-\text{N}(\text{CH}_2-)_2$ 、 $-\text{NHCH}<$ 、又は $-\text{NHCH}(\text{CH}_2-)_2$ を表し、

Xは水素又はペプチド基を表し、

L_A は任意に存在して、アミノ酸又は少なくとも2つのアミノ酸残基を含有するペプチドであり、

L_B は任意に存在して、アミノ酸又は少なくとも2つのアミノ酸残基を含有するペプチドであり、

Pは、アミロイドタンパク質又はアミロイドタンパク質に実質的類似性を有するタンパク質の完全長のもの又はフラグメントから選択されるペプチドであり、

YはOH又は NH_2 である)

を有するコンジュゲート及びその医薬的に許容し得る塩。

【請求項 2】

哺乳動物への投与の際に、コンジュゲート自体に対する特異性を有する抗体の産生を誘発し、哺乳動物で免疫応答を誘導し、それによりアミロイド誘導細胞毒性、及び/又はアミロイド原線維、斑及び/又は沈着物の形成を予防又は低減することができる請求項1に記載のコンジュゲート。

【請求項 3】

産生される抗体がコンジュゲートの1以上のC末端提示Pペプチドに対する特異性を有する請求項2に記載のコンジュゲート。

【請求項 4】

Pがアミロイドタンパク質の少なくとも1つの領域を含んでなるフラグメントである請求項1～3のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

前記領域が、C末端領域、 β シート領域、細胞毒性領域、GAG結合部位領域、又はマクロファージ接着領域を含んでなる群から選択される請求項4に記載のコンジュゲート。

【請求項 6】

アミロイドタンパク質が、血清アミロイドAタンパク質(ApoSSA)、免疫グロブリン軽鎖、免疫グロブリン重鎖、ApoA1、トランスサイレチン、リゾチーム、フィブリノゲン α 鎖、ゲルソリン、シスタチンC、アミロイド β タンパク質前駆体(β -APP)、 β_2 ミクログロブリン、プリオン前駆体タンパク質(PrP)、心房性ナトリウム利尿因子、ケラチン、膵島アミロイドポリペプチド及びシヌクレイン又は前記のいずれかのものに実質的類似性を有する任意のポリペプチドを含んでなる群から選択されるアミロイド前駆体タンパク質に由来する請求項1～5のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

【請求項 7】

アミロイドタンパク質が、アミロイド β (1-43)、アミロイド β (1-42)、アミロイド β (1-41)、アミロイド β (1-40)、アミロイド β (1-39)及びアミロイド β (1-38)から選択される請求項1～5のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

【請求項 8】

Pが、アミロイド β (1-43)、アミロイド β (1-42)、アミロイド β (1-41)、アミロイド β (1-40)、アミロイド β (1-39)又はアミロイド β (1-38)のフラグメントである請求項7に記載のコンジュゲート。

【請求項 9】

Pがアミロイド β のC末端を含有する請求項8に記載のコンジュゲート。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

PがアミロイドβのC末端からの10アミノ酸のフラグメントである請求項8に記載のコンジュゲート。

【請求項 11】

PがアミロイドβのC末端からの9アミノ酸のフラグメントである請求項8に記載のコンジュゲート。

【請求項 12】

PがアミロイドβのC末端からの8アミノ酸のフラグメントである請求項8に記載のコンジュゲート。

【請求項 13】

PがアミロイドβのC末端からの7アミノ酸のフラグメントである請求項8に記載のコンジュゲート。

【請求項 14】

PがアミロイドβのC末端からの6アミノ酸のフラグメントである請求項8に記載のコンジュゲート。

【請求項 15】

PがアミロイドβのC末端からの5アミノ酸のフラグメントである請求項8に記載のコンジュゲート。

【請求項 16】

PがアミロイドβのC末端からの4アミノ酸のフラグメントである請求項8に記載のコンジュゲート。

【請求項 17】

PがアミロイドβのC末端からの3アミノ酸のフラグメントである請求項8に記載のコンジュゲート。

【請求項 18】

Pがアミロイドβ(1-42)のフラグメント35-42である請求項12に記載のコンジュゲート。

【請求項 19】

Pがアミロイドβ(1-42)のフラグメント36-42である請求項13に記載のコンジュゲート。

【請求項 20】

Pがアミロイドβ(1-42)のフラグメント37-42である請求項14に記載のコンジュゲート。

【請求項 21】

Pがアミロイドβ(1-42)のフラグメント38-42である請求項15に記載のコンジュゲート。

【請求項 22】

Pがアミロイドβ(1-42)のフラグメント39-42である請求項16に記載のコンジュゲート。

【請求項 23】

Pがアミロイドβ(1-42)のフラグメント40-42である請求項17に記載のコンジュゲート。

【請求項 24】

XがT細胞エпитープである請求項1～23のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

【請求項 25】

Xが、完全長破傷風トキソイド、破傷風トキソイドフラグメントFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE及び破傷風トキソイドフラグメントYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGTを包含するヒトT細胞エпитープ、又はQYIKANSKFIGITELを包含するげっ歯類T細胞エпитープである請求項24に記載のコンジュゲート。

【請求項 26】

10

20

30

40

50

Xがキーホールリンペットヘモシアニン又はBSAである請求項1～23のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

【請求項27】

哺乳動物に、抗原性量の請求項1～26のいずれか1項に記載のコンジュゲートを投与することを含んでなり、コンジュゲートが、コンジュゲート自体に対する特異性を有する抗体の産生を誘発し、哺乳動物で免疫応答を誘導し、それによりアミロイド誘導細胞毒性、及び/又は原線維、斑及び/又はアミロイド沈着物の形成を予防又は低減する、哺乳動物におけるアミロイド関連疾患の治療、寛解及び/又は防御の方法。

【請求項28】

産生される抗体が請求項1～26のいずれか1項に記載のコンジュゲートの1以上のC末端提示Pペプチドに対して特異的である請求項27に記載の方法。 10

【請求項29】

コンジュゲートと共にアジュバントを投与することを更に含んでなる請求項27又は28に記載の方法。

【請求項30】

アジュバントが、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、QS21、水酸化アルミニウムゲル、MF59及びリン酸カルシウムを含んでなる群より選択される請求項29に記載の方法。

【請求項31】

アミロイド関連疾患がアルツハイマー病、ダウン症候群、血管性痴呆又は認知障害である請求項27～30のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項32】

哺乳動物におけるアミロイド関連疾患の治療及び/又は防御用の医薬組成物の製造のための、請求項1～26のいずれか1項に記載のコンジュゲートの使用。

【請求項33】

請求項1～26のいずれか1項に記載のコンジュゲートをアジュバントと共に含んでなるワクチン。

【請求項34】

アジュバントが、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、QS21、水酸化アルミニウムゲル、MF59及びリン酸カルシウムを含んでなる群から選択される請求項33に記載のワクチン。 30

【請求項35】

哺乳動物に、抗原性量の請求項1～26のいずれか1項に記載のコンジュゲートを投与することを含んでなり、コンジュゲートが、コンジュゲート自体に対する特異性を有する抗体の産生を誘発する、哺乳動物において抗体を産生する方法。

【請求項36】

産生される抗体が請求項1～26のいずれか1項に記載のコンジュゲートの1以上のC末端提示Pペプチドに対して特異的である請求項35に記載の方法。

【請求項37】

モノクローナル又はポリクローナルの抗体の産生のために、体性細胞ハイブリダイゼーションによりハイブリドーマ細胞を作製する工程を更に含んでなる請求項35又は36に記載の方法。 40

【請求項38】

哺乳動物がマウス又はヒト化マウスである請求項35～37のいずれか1項に記載の方法。

【請求項39】

請求項1～26のいずれか1項に記載のコンジュゲートに対する特異性を有する抗体。

【請求項40】

請求項1～26のいずれか1項に記載のコンジュゲート中の1以上のC末端提示Pペプチドに対する特異性を有する抗体。 50

【請求項 4 1】

モノクローナル抗体である請求項 3 9 又は 4 0 に記載の抗体。

【請求項 4 2】

ヒト化又はキメラである請求項 3 9 ～ 4 1 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 4 3】

請求項 3 5 ～ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法により産生される請求項 3 9 ～ 4 2 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 4 4】

哺乳動物に、請求項 3 9 ～ 4 3 のいずれか 1 項に記載の抗体を投与し、それによりアミロイド誘導細胞毒性、及び/又は原線維、斑及び/又はアミロイド沈着物の形成を予防又は低減することからなる、哺乳動物におけるアミロイド関連疾患の治療及び/又は防御の方法 10

【請求項 4 5】

アミロイド関連疾患がアルツハイマー病、ダウン症候群、血管性痴呆又は認知障害である請求項 4 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、アミロイドタンパク質のフラグメントを含んでなる新たなコンジュゲート(c 20 onjugate)に関する。このコンジュゲートは、アミロイドタンパク質の沈着に関係する疾患、例えばアルツハイマー病の治療、予防及び/又は寛解のためのワクチンに使用できる。本発明はまた、アミロイドタンパク質のフラグメントを含んでなるコンジュゲートをそれを必要とする患者に投与し、そのことにより患者で抗体の産生を可能にすることによって、アミロイド関連疾患を治療、予防及び/又は寛解するための方法を提供する。本発明はまた、アミロイドタンパク質内の病理学的領域と相互作用することができ、そのことにより、例えばアミロイドの原線維、斑及び/又は沈着物の形成を予防する抗体、並びに上記の抗体をそれを必要とする患者に投与する受動免疫法を包含する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景 30

アミロイド疾患又はアミロイドーシスは、広範な外観症状を有する多くの疾患状態を含む。これら障害は、共通して、直径が通常約10～100nmであり特異器官又は組織領域に局在する、「アミロイド原線維」、「アミロイド沈着物」又は「アミロイド斑」として知られる、タンパク質原線維の異常な細胞外沈着物の存在を有する。斑は、主として、天然に存在する可溶性タンパク質又はペプチドから構成される。不溶性沈着物は、一般に、直径が約10～15nmである原線維の側方凝集体(lateral aggregate)から構成される。その出現は多様であるが、全てのアミロイド沈着物は、共通の形態学的性質を有し、特定の顔料(例えば、チオフラビンT、コンゴアレッド)で染色され、染色後の偏光下に特徴的な赤緑の複屈折が現れる。 40

【0 0 0 3】

アミロイド関連疾患は、沈着物中に存在するタンパク質の型により特徴付けられる。例えば、神経変性疾患、例えばスクラピー、ウシ海綿状脳症、クロイツフェルト-ヤコブ病などは、中枢神経系でのプロテアーゼ耐性形態のプリオンタンパク質(AScr又はPrP-27と呼ぶ)の出現及び蓄積により特徴付けられる。同様に、別の神経変性障害であるアルツハイマー病は、アミロイド斑の沈着及び神経細線維もつれにより特徴付けられる。この場合、斑及び血管アミロイドは、原線維アミロイドβタンパク質の沈着によって形成される。他の疾患、例えば成人発症糖尿病(II型糖尿病)は、膵臓におけるアミロイドの局在化した蓄積により特徴付けられる。

【0 0 0 4】

各々のアミロイド形成性タンパク質は、 β シートにフォールディングし、不溶性原線維を形成する能力を有する。この不溶性原線維は細胞外又は細胞内に沈着する。各々のアミロイド形成性タンパク質は、アミノ酸配列が異なるが、原線維を形成し、他のエレメント、例えばプロテオグリカン、アミロイドP及び補体成分に結合するという同じ特性を有する。更に、各々のアミロイド形成性タンパク質は、 β シート構造の形成を触媒できるアミノ酸配列を有する(しかし配列は異なる)。

【0005】

特定の場合、アミロイド形成性タンパク質、プロト原線維及びアミロイド性原線維は、周囲の細胞に対して毒性であり得る。例えば、アミロイド β 原線維は、アルツハイマー病の患者で死んだニューロン細胞及び小神経膠細胞症に関係していた。インビトロで試験した場合、アミロイド β ペプチドは、小神経膠細胞(脳マクロファージ)の活性化プロセスをトリガーすることができることが示された。このことは、アルツハイマー病の患者の脳で見出された小神経膠細胞症及び脳炎症の存在を説明できる。

10

【0006】

II型糖尿病の患者で見られる別の型のアミロイドーシスでは、アミロイド形成性タンパク質IAPPは、インビトロで β -膵島細胞毒性を誘導することが示されている。したがって、II型糖尿病患者の膵臓におけるIAPP原線維の出現は、 β 膵島細胞(ランゲルハンス)の喪失及び器官の機能不全に寄与し得る。

【0007】

最も顕著なアミロイド疾患の1つはアルツハイマー病であり、この疾患は、西洋世界の全人口の約0.5~1%が罹患している進行性の神経変性疾患である。アルツハイマー病は、脳での多数のアミロイド斑の沈着によって特徴付けられる。この沈着は、この疾患の病理を引き起こすと考えられており、アルツハイマー病を予防するためのほとんどのアプローチは、アミロイド斑の形成を低減させること、除去すること、又は予防することを目指す。アミロイド斑の主な構成成分は、アミロイド前駆体タンパク質(APP)の切断により生成される40~42アミノ酸タンパク質であるアミロイド β ペプチド($A\beta$)である。

20

【0008】

$A\beta$ (1-42)ペプチドに対する免疫学的応答は、アルツハイマー病(ADで示す)のトランスジェニックマウスモデルで $A\beta$ の沈着を低減させることができることが示されている。Schenkら(Nature, 1999)は、 $A\beta$ (1-42)での免疫が脳における $A\beta$ 沈着物の蓄積を減少又は予防することができることを証明する最初の証拠を提供した。フロイントアジュバント中の凝集した合成 $A\beta$ (1-42)での非経口免疫は、脳における $A\beta$ 沈着物の数及び密度を有意に低下させ、同時に神経炎ジストロフィー及びグリオシスの改善を伴った。Morganら(Nature, 2000)は、 $A\beta$ (1-42)での免疫がトランスジェニックマウスにおける記憶喪失を予防することを証明することによって、この種の一連の証拠を拡張した。以来、これら観察は、幾つかの研究により、異なるトランスジェニックマウスモデルで、鼻ワクチン接種(Weinerら、Ann Neurol. 2000)を含む種々の免疫ストラテジーを用いて確認されている。基礎となる生物学的機序は、未だ明らかではないが、免疫に際する抗 $A\beta$ 抗体の形成が明らかに主要な役割を演じている。したがって、 $A\beta$ に対する抗体の受動移入は、トランスジェニックマウスモデルにおける能動免疫と同様な様式で、 $A\beta$ の沈着を低減させることができる(Bardら、Nature Med., 2000)。

30

40

【0009】

このことは、必ずしも互いを排除しない2つの広い仮説に結実している。第1の仮説は、脳における活性化された小神経膠細胞による $A\beta$ -抗体複合体のFc媒介取込み及びクリアランスを提案している。これには、血液-脳関門を横切る血清抗 $A\beta$ 抗体の幾らかの拡散が必要である。第2の仮説は、末梢の抗体が $A\beta$ の血漿レベルを低減させ、このことが血漿とCNSとの間の $A\beta$ の平衡を変化させることを示唆している。これにより、脳からの $A\beta$ の正味の移動が生じ、したがって血漿抗体は $A\beta$ の末梢の「吸い込み装置(sink)」として作用する。

【0010】

50

マウスモデルの並外れた見込みある結果は、素早く、アジュバント QS21 中で乳化させた、合成の予め凝集した A β (1-42) からなるヒトワクチン AN1792 の形で表された。小規模の第 I 相試験により、このヒトワクチンの非経口投与による安全の懸念がないことが明らかとなったので、臨床評価が、第 IIa 相の臨床試験において、穏やか～中程度の AD の患者で継続された。この研究で、有効レベルの A β 抗体を発現した患者は、コントロールより緩慢な速度での認知減退を示した (Hockら、Neuron, 2003)。

【0011】

しかし、AN1792 の臨床試験は、概ね 6 % の患者が髄膜脳炎を発症した時点で未完のまま中断された。前臨床試験の間にワクチンに曝露されたげっ歯類も他の動物のいずれもこの問題を示していない。このことは異なる観察により説明できる。第 1 に、動物には、不完全フロイントアジュバント (IFA) を用いてワクチンを追加免疫したが、ヒトワクチンは QS21 に乳化されていた。IFA は Th2 型の免疫応答を誘導する一方、QS21 は Th1 応答を優勢に誘導する。第 2 に、AN1792 に使用したような完全長の凝集した A β 分子は、神経毒性であり得、補体活性化配列を含む幾つかの免疫学的特徴を含有し、したがって急性免疫応答の発症を誘発するかもしれない。したがって、完全長 A β は、抗原性量でさえ、非特異的な免疫学的反応を誘発するか又は煽るのかもしれない。第 3 に、トランスジェニックマウスは内因性 A β の産生が亢進されている。このことが T 細胞寛容を引き起こし、免疫に対する低下した応答を引き起こすのかもしれない。したがって、完全長 A β でのワクチン接種により、トランスジェニック動物では、ヒトより弱い免疫応答が誘導されるのかもしれない。

【0012】

例えば AN1792 のように、内因性タンパク質 (又はワクチン接種する動物に天然に存在するタンパク質) をワクチンとして使用することは、他の欠点にも関係している。これには、「自己」タンパク質に対する抗体の生成に起因する自己免疫疾患の発症の可能性、及び宿主免疫系が「自己」抗原を認識しないことに起因する免疫応答の誘発の困難性が含まれる。

【0013】

神経学的欠損とアミロイド沈着物を有していることとの間に直接的な相関関係は存在しないことは長年知られている。相関関係の欠如は、ヒト AD 患者及び AD のトランスジェニックマウスモデルの両方で明白である。幾つかの一連の証拠もまた、固定化したアミロイド斑は比較的害がない構造である一方、可溶性 A β オリゴマーは、A β に関係する神経毒性及び炎症性の損傷のほとんどを担っていることを示している (Walsh、Nature 2000; Gongら、PNAS USA 2003)。可溶性 A β オリゴマーはまた、シナプスの物理的変性に関係付けられている (Mucke、Neurosci. 2000)。能動ワクチン接種アプローチによる AD を予防又は治療しようとする初期の試みは、可溶性 A β 及び固定化した A β の両方に対する免疫応答を生じた。したがって、これらの試みは、より高いレベルの可溶性で毒性であり潜在的に炎症性の A β オリゴマーで実際に生じ得る比較的非特異性の免疫応答に不備があった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明においては、病理学的形態のアミロイドタンパク質に対する強力で高度に特異的な免疫応答を惹起することにより、現存するハードルを克服することができる新たなコンジュゲート及び方法を考案した。

【課題を解決するための手段】

【0015】

発明の要旨

本発明は、アミロイド関連疾患の治療、予防及び/又は寛解のための能動及び/又は受動のワクチン接種戦略に使用する新たなコンジュゲートを提供すること。このコンジュゲートは、P ペプチド (アミロイドタンパク質の完全長のもの又はフラグメント) が C 末端に提示されるように、N 末端部を介して、下記で規定するリガンド提示アセンブリ (LPA) に連結された P ペプチドを含んでなる。

10

20

30

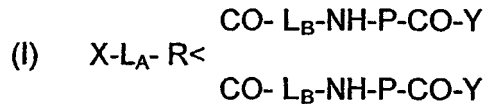
40

50

【0016】

本発明によるコンジュゲートは、以下の構造(I)：

【化1】



(式中、

Rは、 $-\text{N}(\text{CH}_2-)_2$ 、 $-\text{NHCH}<$ 、又は $-\text{NHCH}(\text{CH}_2-)_2$ から選択されるLPA骨格を表し、

Xは水素又はペプチド基を表し、そして

L_A は任意に存在して、アミノ酸又は少なくとも2つのアミノ酸残基を含有するペプチドであり得、

L_B は任意に存在して、アミノ酸又は少なくとも2つのアミノ酸残基を含有するペプチドであり得、

Pは、アミロイドタンパク質又はアミロイドタンパク質に実質的に類似するタンパク質の完全長のもの又はフラグメントから選択されるペプチドであり、そして

YはOH又は NH_2 である)

及びその医薬的に許容し得る塩を有していてもよい。

【0017】

本発明はまた、その必要がある患者にアミロイドタンパク質のフラグメントを含んでなるコンジュゲートを投与し、これにより患者で抗体の産生を誘発し哺乳動物で免疫応答を誘導し、このことによってアミロイド誘導細胞毒性、及び/又は原線維、斑及び/又はアミロイド沈着物の形成を予防又は低減することによる、哺乳動物においてアミロイド関連疾患を治療、予防及び/又は寛解する方法に関する。

【0018】

本発明はまた、アミロイドタンパク質内の病理学的領域と相互作用し、このことにより例えばアミロイド原線維、斑及び/又は沈着物の形成を予防することができる抗体、並びに上記抗体をその必要がある患者に投与する受動免疫の方法に関する。

【0019】

更に、本発明者らは、哺乳動物に投与したとき、可溶性形態の高度にアミロイド形成性のアミロイド β (1-42)を特異的に標的する抗体を生成するアミロイド β (1-42)のC末端部分の非常に特異的なフラグメントを同定した。

【0020】

発明の説明

本発明は、動物への投与に際して、コンジュゲート自体に対して特異性を有する抗体の産生を誘発し、哺乳動物で免疫応答を誘導し、これによりアミロイド誘導細胞毒性、及び/又はアミロイド原線維、斑及び/又は沈着物の形成を予防又は低減することができるコンジュゲートを開発することを目的とする。より具体的には、産生される抗体は、このコンジュゲートの1以上のC末端提示Pペプチドに対して特異的であるべきである。概念は、惹起されてC末端提示Pペプチドに対して特異性を有する抗体がまた、アミロイドタンパク質内の病理学的領域と相互作用し、そのことにより、例えばアミロイド原線維、斑及び/又は沈着物の形成、関係する細胞毒性及び神経変性を予防することもできることである。

【0021】

本発明の個々の段階の詳細に入る前に、本発明に関して使用される特定用語の一覧を以下に挙げる

【0022】

定義

用語「アミロイドタンパク質」又は「アミロイド形成性タンパク質」は、原線維、斑及び/又はアミロイド沈着物自体の一部であるか、又は原線維、斑及び/又はアミロイド沈着物の形成を導く生合成経路の一部であるかのいずれかにより、原線維、斑及び/又はアミ

10

20

30

40

50

ロイド沈着物の形成に関与するタンパク質を指すものとする。アミロイドタンパク質は、或る形態のアミロイド疾患に関係することが知られている前駆体タンパク質から誘導することができ、モノマー及びオリゴマーの両方のタンパク質を包含する。前駆体アミロイドタンパク質としては、血清アミロイドAタンパク質(ApoSSA)、免疫グロブリン軽鎖、免疫グロブリン重鎖、ApoA1、トランスサイレチン、リゾチーム、フィブリノゲン α 鎖、ゲルソリン、シスタチンC、アミロイド β タンパク質前駆体(β -APP)、 β_2 ミクログロブリン、プリオン前駆体タンパク質(PrP)、心房性ナトリウム利尿因子、ケラチン、膵島アミロイドポリペプチド(islet amyloid polypeptide)、ペプチドホルモン、及びシヌクレイン(synuclein)が挙げられるが、これらに限定されない。この用語はまた、アミロイドタンパク質に実質的類似性(下記で規定する)を有するタンパク質、例えば構造的変種などを包含する。このタンパク質は天然に存在していてもよいし、合成的に構築されてもよい。

10

【0023】

本発明に関して、用語「P」、「Pペプチド」又は「ペプチド」は、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アミノ酸残基より多いポリペプチド、及び完全長タンパク質のいずれをも意味するものとする。具体的には、Pペプチドは、アミロイドタンパク質、例えば β アミロイドなどの少なくとも3アミノ酸からなる。この用語はまた、アミロイドタンパク質に実質的類似性(下記で規定する)を有するペプチド、例えば構造的変種などをも包含する。このタンパク質は天然に存在していてもよいし、合成的に構築されてもよい。

【0024】

20

用語「実質的類似性」は、2つのペプチド配列が、最適に整列されたとき、少なくとも50パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも60パーセントの配列同一性、より好ましくは少なくとも70パーセントの配列同一性、より好ましくは少なくとも80パーセントの配列同一性、より好ましくは少なくとも90パーセントの配列同一性、より好ましくは少なくとも95パーセントの配列同一性、又はそれ以上(例えば99パーセントの配列同一性)を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換で異なっている。保存的アミノ酸置換は、同様な側鎖を有する残基の互換性をいう。例えば、脂肪族側鎖アミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンであり；脂肪族-ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群は、セリン及びスレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギン及びグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸の群は、リシン、アルギニン、及びヒスチジンであり；そしてイオウ含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システイン及びメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換群は：バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、及びアスパラギン-グルタミンである。同一ではない残基位置はまた、非天然アミノ酸又はその誘導体を含むペプチドアナログから構成されてもよい。アナログは、典型的には、1、2又は数箇所の位置で、多くは保存的置換によって、天然に存在するペプチドと異なっている。1、2又は数箇所の位置に、非天然アミノ酸又はN若しくはC末端アミノ酸の改変を含むアナログもある。非天然アミノ酸の例は、D-アミノ酸、 α, α -二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、4-ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタメート、 ϵ -N,N,N-トリメチルリシン、 ϵ -N-アセチルリシン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリシン、 ω -N-メチルアルギニン、及びイソアスパラギン酸である。

30

40

【0025】

用語「アミロイド誘導細胞毒性」は、アミロイドタンパク質又はそのフラグメントへの曝露に際して、インビトロ又はインビボで、細胞の集団又は亜集団で誘導されるアポトーシス性又は壊死性の細胞死のプロセスを表現する。この細胞死は、代表的には、組織学的染色法を用いてインビボで、又は代謝アッセイ、例えばMTT又はLDHを用いてインビトロで測定される。

【0026】

50

用語「原線維、斑及び/又はアミロイド沈着物」は、凝集したアミロイドタンパク質、すなわち離解したか又はモノマーのペプチド単位として存在していないタンパク質を意味する。凝集したアミロイドは、モノマー単位が非共有結合により一緒になったオリゴマーの混合物である。原線維及び斑では、アミロイドタンパク質の全て又は一部が、例えばコンゴーレッド又はチオフラビンSを使用する原線維アミロイドの染色により可視化され得るようなβシートにフォールディングしている。

【0027】

用語「免疫学的」又は「免疫応答」は、哺乳動物における、アミロイドペプチドを指向する有益な体液性(抗体媒介性)及び/又は細胞性(抗原特異的T細胞又はその分泌産物により媒介される)の応答の発現である。このような応答は、免疫原の投与により誘導される能動応答、又は抗体若しくはプライムしたT細胞の投与により誘導される受動応答であり得る。細胞性免疫応答は、クラスI又はクラスIIのMHC分子と組み合わせたポリペプチドエピトープの提示により誘発され、抗原特異的なCD4⁺Tヘルパー細胞及び/又はCD8⁺細胞傷害性T細胞を活性化する。免疫原の防御効果又は治療効果に対する、体液性及び細胞性の応答の相対的寄与は、免疫した同系動物から抗体及びT細胞を別々に単離し、第2の患者で防御効果又は治療効果を測定することにより区別できる。

10

【0028】

用語「アミロイド関連疾患」は、アミロイドの蓄積に関係する疾患を含む。アミロイド蓄積は、1つの器官に限定されていることもあり(すなわち「局在化したアミロイドーシス」)、又は幾つかの器官に広がっていることもある(「全身性アミロイドーシス」と呼ばれる)。続発性アミロイドーシスは、慢性感染(例えば結核)又は慢性炎症(例えば慢性関節リウマチ)と関係し得、これには家族性地中海熱(FMF)に見られる家族性形態の続発性アミロイドーシス、及び長期血液透析患者に見られる別の型の全身性アミロイドーシスが含まれる。局在化した形態のアミロイドーシスには、限定されないが、II型糖尿病及びその関連障害、神経変性疾患、例えばスクラピー、ウシ海綿状脳症、クロイツフェルト-ヤコブ病、アルツハイマー病、脳アミロイド脈管障害、及びプリオンタンパク質関連障害が含まれる。上記のように、アミロイド疾患の証明は、原線維から主になるアミロイド斑の器官における沈着である。原線維は、特徴的な原線維タンパク質又はペプチドから構成される。

20

【0029】

用語「抗体」は、特異抗原に結合特異性を示すタンパク質を表現する。この用語は、最も広義で使用され、モノクローナル及びポリクローナルの抗体並びに抗体フラグメントを網羅する。

30

【0030】

用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から取得可能である抗体を意味するものとする。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の決定基を指向する。

用語「ポリクローナル抗体」は、異なる決定基を指向する種々の抗体を表現する。

【0031】

用語「キメラ抗体」は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種に由来するか又は特定の抗体クラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか該配列に相同である一方で、当該鎖の残りの部分は、別の種に由来するか又は別の抗体クラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか該配列に相同である抗体を意味するものとする。一例は、抗原結合部位はマウス抗体に由来し、残りの部分はヒト抗体に由来する抗体である。

40

【0032】

用語「ヒト化抗体」により、相補性決定領域(抗原結合及び特異性を担う)のみが非ヒト種に由来し、残りはヒト抗体に由来する抗体が理解される。

【0033】

用語「エピトープ」とは、B細胞及び/又はT細胞が反応する抗原上の部位をいう。B細胞エピトープは、連続するアミノ酸、又はタンパク質の三次元フォールディングにより

50

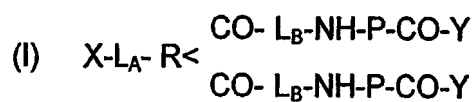
隣り合った不連続アミノ酸の両方から形成されることがある。連続アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒への曝露に際して保持される一方、三次元フォールディングにより形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒での処理に際して喪失する。エピトープは、独特な空間コンフォメーションで、代表的には少なくとも3アミノ酸、より通常には少なくとも5アミノ酸、又は8~10アミノ酸を含む。

【0034】

アミロイドタンパク質の病理学的領域を標的するに適切なコンジュゲート(これは、また能動ワクチン及び受動ワクチンの両方のストラテジーを開発するために使用できる)は、WO 00/18791に記載されるリガンド提示アセンブリ(Ligand Presenting Assembly)(LPA)技術に基づいてもよい。この技術は、共通の骨格に付着させたダイマーのC末端提示ペプチドフラグメントを作製することができる点で独特である(下記の式I、及び具体的詳細については図1を参照)。この型のコンジュゲートは、高度に免疫原性であり、特異的免疫応答を誘導することができる。能動ワクチン接種ストラテジーにおけるこのようなコンジュゲートの使用は、治療レベルの免疫応答を生じるはずである。

10

【化2】



【0035】

RはLPAリンカーを表し、 $-N(CH_2-)_2$ 、 $-NHCH<$ 、及び $-NHCH(CH_2-)_2$ から選択され得る。特定の実施形態では、Rは $-N(CH_2-)_2$ である。

20

【0036】

Xは水素又はペプチド基を表す。特に該当する本発明によるペプチド基は、コンジュゲートを投与する哺乳動物で免疫応答を増強し得るものである。適切なペプチド基の例は、MHC分子に結合し得るペプチドであり、動物種でT細胞を刺激するTヘルパー細胞エピトープである。

【0037】

特定の実施形態では、Xは、完全長破傷風トキソイド、破傷風トキソイドフラグメント FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE及び破傷風トキソイドフラグメント YNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGTを包含するヒトT細胞エピトープであり得、又はQYIKANSKFIGITELを包含するげっ歯類T細胞エピトープであり得る。Xはまた、例えばキーホールリンペットヘモシアニン又はBSAの中から選択されてもよい。

30

【0038】

Xは上記で水素又はペプチド基と規定されているが、或る場合には、Xはまた、以下の化学基の1種の中から選択されてもよい： $C_1\sim_8$ アルキル、 $C_2\sim_8$ アルケニル、 $C_2\sim_8$ アルキニル、 $C_3\sim_{10}$ シクロアルキル、 $C_5\sim_{10}$ シクロアルケニル、 $C_3\sim_7$ ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $C_1\sim_8$ アルコキシ、 $C_1\sim_8$ アルキルチオ、 $C_1\sim_8$ アルキルカルボキシ、 $C_1\sim_8$ アルキルカルボニル、 $C_1\sim_8$ アルキルホスホニル、アリールオキシ、アリールチオ、アリールスルホニル、アリールスルホネート、アリールカルボキシ、アリールカルボニル、又はアロイル。Xはまた、二環式モノカルボン酸、例えばビオチンなどであり得る。

40

【0039】

Xが水素又は上記化学基の1種である場合、適切なTヘルパー細胞エピトープが別途ではあるが、コンジュゲートと同じワクチン療法の一部として投与され得る。

【0040】

リンカー L_A は、任意に存在して、XとR基を連結し得る。 L_A は、アミノ酸又は少なくとも2つのアミノ酸残基を含有するペプチドであり得る。特定の実施形態では、 L_A は β -アラニンである。

【0041】

PのN末端部は、リンカー L_B (これもまたアミノ酸又は少なくとも2つのアミノ酸残基

50

を含有するペプチドを表す)を介してRに連結されていてもよい。このアミノ酸又はペプチドは、Pに特定の有益な特性を付与するものであり得る。特定の実施形態では、 L_B は、Pの溶解性を向上させるための、2つのリシンからなるジペプチド(KK)である。

【0042】

Pは、アミロイドタンパク質又はアミロイドタンパク質に実質的類似性を有するタンパク質の完全長のもの又はフラグメントから選択されるペプチドである。上記式から明らかのように、PのN末端部は、アミド結合によりR又は存在する場合には L_B に連結されており、その結果PはC末端に提示される。したがって、 L_B とPとの間の-NH基は、Pの配向を説明するためのものであり、PのN末端として解釈されるべきであり、追加の-NH基として解釈されるべきではない。同じことが、PとYとの間のカルボニル(-CO)基についても言え、これは、PのC末端基として解釈されるべきであり、追加の-CO基として解釈されるべきではない。

10

【0043】

Pは同じペプチドであっても異なるペプチドであってもよいが、ほとんどの場合、2つのペプチドは同じである。公知のワクチンで使用されるペプチドと比較すると、本発明によるペプチドは、凝集させて効力を有させるか又は免疫原性とする必要がない。

【0044】

Pは、少なくとも1つの特定の機能領域を含んでなるアミロイドタンパク質のフラグメントであり得る。このような領域は、C末端領域、 β シート領域、細胞毒性領域、GAG結合部位領域、又はマクロファージ接着領域を含んでなる群から選択され得る。コンジュゲートは、これにより、アミロイドタンパク質又はアミロイドタンパク質の原線維により形成される特定の領域又はエピトープを指向する免疫応答の誘導において有効となり得る。

20

【0045】

コンジュゲート中の2つのPペプチドが異なる稀な場合では、それらは、同じアミロイドタンパク質の異なるフラグメントであり得、その異なる領域を含んでなることができる。別の可能性は、Pペプチドが異なるアミロイドタンパク質の異なる領域又はフラグメントであることである。

【0046】

ほとんどの場合では、PのC末端の末端基はカルボン酸基である。すなわち、YはOHである。しかし、Yが NH_2 であり得る場合もある。

30

【0047】

上記のように、本発明は、種々の疾患特異的なアミロイドタンパク質の1又は複数の成分に対する免疫応答を刺激するように働くペプチドを投与することによりアミロイド疾患を治療できるという発見に基づく。下記のセクションは、主要な形態のアミロイドーシス、及び本発明によるコンジュゲート又は方法で使用し得る関連するアミロイドタンパク質又は前駆体タンパク質を例示するためのものであり、如何なる様式であっても本発明を制限するためのものではない。

【0048】

アミロイド沈着物を形成するペプチド又はタンパク質は、しばしば、より大きな前駆体タンパク質から産生される。より具体的には、アミロイド原線維沈着物の病因としては、一般に、前駆体タンパク質のフラグメントへのタンパク質分解性切断が含まれる。これらフラグメントは、一般に、逆平行 β -プリーツシート(pleated sheet)に凝集する；しかし、或る非分解形態の前駆体タンパク質は、家族性アミロイド多発ニューロパシー(変種トランスサイレチン原線維)及び透析関連アミロイドーシスで、凝集し原線維を形成することが報告されている。

40

【0049】

該当するアミロイド前駆体タンパク質は、血清アミロイドAタンパク質(ApoSSA)、免疫グロブリン軽鎖、免疫グロブリン重鎖、ApoA1、トランスサイレチン、リゾチーム、フィブリノゲン α 鎖、ゲルソリン、シスタチンC、アミロイド β タンパク質前駆体(β -APP)、 β_2 ミクログロブリン、プリオン前駆体タンパク質(PrP)、心房性ナトリウム利尿因子、ケ

50

ラチン、腓島アミロイドポリペプチド及びシヌクレイン、又は上記のいずれかと実質的類似性を有する任意のポリペプチドを含んでなる群より選択される。以下で、これら前駆体タンパク質が特定のアミロイド関連疾患に如何にして関与しているかを説明する。

【0050】

AA(反応性)アミロイドーシス

一般に、AAアミロイドーシスは、持続性急性期応答を誘発する多くの疾患の症状発現である。このような疾患には、慢性炎症性障害、慢性の局所又は全身性の細菌感染、及び悪性新生物が含まれる。

【0051】

AA原線維は、一般に、血清アミロイドAタンパク質(apoSSA)(HDL複合体中に存在し、IL-1、IL-6及びTNFのようなサイトカインに応答して肝細胞で合成される循環アポリポタンパク質である)のタンパク質分解性切断により形成される8000ダルトンフラグメント(AAペプチド又はタンパク質)から構成される。沈着は身体中に広がり得るが、実質器官が好まれる。脾臓は、通常、沈着部位であり、腎臓もまた罹患し得る。沈着はまた、心臓及び胃腸管にも一般的である。

【0052】

AAアミロイド疾患には、炎症性疾患、例えば慢性関節リウマチ、若年性慢性関節炎、強直性脊椎炎、乾癬、乾癬性関節症、ライター症候群、成人スティル病、ベーチェット症候群、及びクローン病が含まれるがこれらに限定されない。AA沈着物はまた、慢性細菌感染、例えば、らい、結核、気管支拡張症、褥瘡性潰瘍、慢性腎盂腎炎、骨髄炎、及びウィッブル病の結果としても生じる。或る種の悪性新生物もまた、AA原線維アミロイド沈着物を生じることがある。これらには、ホジキンリンパ腫、腎臓ガン、消化管、肺及び尿生殖路のガン、基底細胞ガン、及びヘアリーセル白血病のような状態が含まれる。

【0053】

ALアミロイドーシス

ALアミロイド沈着は、一般に、プラズマ細胞の悪性疾患(多発性骨髄腫)から良性のモノクローナル免疫グロブリン血症に及ぶBリンパ球系列のほとんどの悪液質に関係する。アミロイド沈着物の存在は、時に、基礎となる悪液質の一次的な指標となり得る。

【0054】

ALアミロイド沈着物の原線維は、モノクローナル免疫グロブリン軽鎖又はそのフラグメントから構成される。より具体的には、このフラグメントは、軽鎖(κ 又は λ)のN末端領域に由来し、その可変(V_L)ドメインの全て又は一部を含有する。沈着物は、一般に、間葉組織で生じ、末梢性及び自律性のニューロパシー、手根管症候群、巨舌症、拘束型心筋症、大型の関節の関節症、免疫悪液質、骨髄腫、並びに潜在性悪液質を引き起こす。しかし、ほとんどの組織、特に内臓器官、例えば心臓が含まれることに留意すべきである。

【0055】

遺伝性全身性アミロイドーシス

多くの形態の遺伝性全身性アミロイドーシスが存在する。これらは比較的稀な状態であるが、症状の成人発症及びその遺伝パターン(通常、常染色体優性)は、一般的な集団におけるこのような障害の持続性を導く。一般に、この症候群は、変種のアミロイド形成性ペプチド又はタンパク質の産生を導く、前駆体タンパク質中の点変異に帰される。本発明の範囲を制限するものではないが、この群の幾つかの顕著な例を以下に記載する。

【0056】

トランスサイレチン遺伝子中の40より多い別々の点変異が記載されており、その全てが臨床的に類似する形態の家族性アミロイド多発ニューロパシーを生じる。トランスサイレチン(TTR)は、時にプレアルブミンとも呼ばれる、14キロダルトンタンパク質である。これは肝臓及び脈絡叢により産生され、甲状腺ホルモン及びビタミンAの輸送に機能する。このタンパク質の少なくとも50の変種形態(各々単一アミノ酸変化によって特徴付けられる)が、種々の形態の家族性アミロイド多発ニューロパシーの原因である。例えば、55位でのロイシンからのプロリンの置換は、特に進行性である形態のニューロパシーを生じる

；111位でのロイシンからのメチオニンの置換は、デンマーク人患者で重篤な心臓障害を生じた。全身性アミロイドーシスの患者の心臓組織から単離されたアミロイド沈着物により、その沈着物がTTRとそのフラグメントとの不均質な混合物(まとめてATTRと呼ぶ)から構成されていることが明らかになり、その完全長配列が特徴付けられた。ATTR原線維成分は、当該分野において公知の方法により、このような斑から抽出することができ、その構造及び配列は決定することができる。

【0057】

分子アポリポタンパク質AI中に点変異(例えば、Gly.fwdarw.Arg26；Trp 4.fwdarw.Arg50；Leu.fwdarw.4 Arg60)を有するヒトは、タンパク質アポリポタンパク質AI又はそのフラグメント(AApoAI)の沈着物により特徴付けられる或る種の形態のアミロイドーシス(「stertag型」)を示す。これら患者は、低レベルの高密度リポタンパク質(HDL)を有し、末梢性ニューロパシー又は腎不全を示す。 10

【0058】

酵素であるリゾチームの α 鎖中の変異(例えば、Ile.fwdarw.Thr56又はAsp.fwdarw.His57)は、イギリス人家族で報告された別の形態のstertag型非ニューロパシー遺伝性アミロイドの基礎である。ここで、変異体リゾチームタンパク質(Alys)の原線維が沈着し、患者は一般に、障害した腎機能を示す。このタンパク質は、本明細書に記載の原線維形成性タンパク質のほとんどとは異なり、通常は、全体(非フラグメント化)形態で存在する。

【0059】

アミロイド β (A β)は、 β アミロイド前駆体タンパク質(β APP)として既知の大きなタンパク質からタンパク質分解により誘導される39～43アミノ酸ペプチドである。 β APP中の変異は、 β P原線維と他の成分から構成される斑の脳沈着により特徴付けられる家族性形態のアルツハイマー病を生じる。これらは、下記で更に詳細に記載する。アルツハイマー病に関係するAPP中の既知の変異は、 β -又は γ -セクレターゼの切断部位の近位、又はA β 内に生じる。例えば、717位は、そのA β へのプロセッシング中に、APPの γ -セクレターゼ切断部位の近位であり、670/671位は、 β -セクレターゼ切断部位に近位である。これらの残基のいずれかでの変異は、おそらくはAPPから生成される高度にアミロイド形成性の42/43アミノ酸形態のA β の量の増加を引き起こすことによって、アルツハイマー病を生じ得る。種々の長さのA β ペプチドの構造及び配列は当該分野において周知である。このようなペプチドは、当該分野において公知の方法により製造することができる。加えて、種々の 30 形態のこのペプチドが市販されている。

【0060】

シヌクレインは、アポリポタンパク質に似たシナプス関連タンパク質であり、ニューロンの細胞質ゾル及びシナプス前末端に豊富である。 α -シヌクレインに由来するペプチドフラグメント(NACと呼ばれる)もまた、アルツハイマー病のアミロイド斑の成分である。この成分はまた、下記で詳述するように、本発明の免疫学ベースの治療の標的として働く。完全長シヌクレイン及びNACの原線維はまた、パーキンソン病に関係するレヴィー小体の内在性の成分である。

【0061】

ゲルソリンは、フラグメント及びアクチンフィラメントに結合するカルシウム結合タンパク質である。このタンパク質の187位での変異(例えば、Asp.fwdarw.Asn；Asp.fwdarw.Tyr)は、フィンランド出身の患者、並びにオランダ及び日本出身のヒトに通常見られるある種の形態の遺伝性の全身性アミロイドーシスを生じる。罹患した個体では、ゲルソリンフラグメント(Age1)から形成された原線維は、通常、アミノ酸173～243(68kDaのカルボキシ末端フラグメント)からなり、血管及び基底膜に沈着し、角膜ジストロフィ、及び末梢性ニューロパシーに進行する頭部ニューロパシー、ジストロフィ性の皮膚変化、及びその他の器官での沈着を生じる。 40

【0062】

他の変異したタンパク質、例えばフィブリノゲンの変異体 α 鎖(AfibA)及び変異体シスタチンC(Acys)もまた、原線維を形成し、特徴的な遺伝性障害を生じる。AfibA原線維は 50

、腎臓疾患を伴う非ニューロパシー性の遺伝性アミロイドに特徴的な沈着物を形成する；Acys沈着物は、アイスランドで報告された遺伝性の脳アミロイド脈管障害に特徴的である。少なくとも幾つかの場合で、脳アミロイド脈管障害(CAA)の患者は、 β タンパク質と結合して非変異体形態のシスタチンCを含有するアミロイド原線維を有することが示されている。

【0063】

或る種の形態のプリオン疾患は、今では、遺伝性であると考えられており、以前は自然界で感染すると考えるのが有力であった症例の15%までを占める。このようなプリオン障害では、患者は、正常プリオンタンパク質(PrP_{Sc})の異常イソ型から構成される斑を発現する。優勢な変異体イソ型 PrP_{Sc} (A Scr とも呼ばれる)は、正常な細胞性タンパク質と、プロテアーゼ分解に対する抵抗性、界面活性剤抽出後の不溶性、二次リソソーム中の沈着、翻訳後合成、及び高い β -プリーツシート含量が異なる。遺伝子連鎖は、クロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン-シュトラッサー-シャインカー症候群(Gerstmann-Strussler-Scheinker syndrome)(GSS)、及び致死性の家族性不眠症(FFI)を生じる少なくとも5つの変異について確立されている。スクラピー原線維から原線維ペプチドを抽出し配列を決定し、そのようなペプチドを作る方法は、当該分野において公知である。

10

【0064】

老人性の全身性アミロイドーシス

アミロイド沈着(全身性又は局所性のいずれも)は年齢と共に増加する。例えば、野生型トランスサイレチン(TTR)の原線維は、高齢の個体の心臓組織に共通して見出される。これらは、無症候性又は臨床的にサイレントであることもあり、或いは心不全を生じることもある。無症候性原線維局所沈着物はまた、脳($\text{A}\beta$)、前立腺のアミロイド小体($\text{A}\beta_2$ ミクログロブリン)、関節及び精囊でも生じ得る。

20

【0065】

脳アミロイドーシス

アミロイドの局所沈着は、特に高齢者の個体において、脳で一般的である。脳で最も頻繁な型のアミロイドは、主に、 $\text{A}\beta$ ペプチド原線維から構成され、痴呆又は散発性(非遺伝性)アルツハイマー病を生じる。事実、散発性アルツハイマー病の発生率は、遺伝性であることが示されている形態を大きく超える。これら斑を形成する原線維ペプチドは、遺伝形態のアルツハイマー病(AD)を参照にして、上記のものと非常に類似している。

30

【0066】

透析関連アミロイドーシス

β_2 ミクログロブリン($\text{A}\beta_2\text{M}$)原線維から構成される斑は、通常、長期の血液透析又は腹膜透析を受けている患者で発現する。 β_2 ミクログロブリンは、11.8キロダルトンポリペプチドであり、すべての有核細胞上に存在するクラスI MHC抗原の軽鎖である。正常な状況下では、これは、継続的に細胞膜から落ち、正常には腎臓により濾過される。例えば障害した腎機能の場合の、クリアランスの不全は、腎臓及び他の部位(主に、関節のコラーゲン豊富な組織)での沈着を導く。他の原線維タンパク質とは異なり、 $\text{A}\beta_2\text{M}$ 分子は、一般に、原線維中で非フラグメント化形態で存在する。

【0067】

ホルモン由来アミロイドーシス

内分泌器官は、特に高齢の個体で、アミロイド沈着物を匿い得る。ホルモン分泌性腫瘍もまた、ホルモン由来アミロイド斑を含有し得る。その原線維は、ポリペプチドホルモン、例えばカルシトニン(甲状腺髄様ガン)、膵島アミロイドポリペプチド(アミリン；II型糖尿病のほとんどの患者で発生)、及び心房性ナトリウム利尿ペプチド(孤立心房性アミロイドーシス)から作られる。これらタンパク質の配列及び構造は、当該分野において周知である。

40

【0068】

その他のアミロイドーシス

通常は局在化したアミロイド沈着物として発現する種々の他の形態のアミロイド疾患が

50

存在する。一般に、これら疾患は、おそらく、特定の原線維前駆体の局在化した産生及び/又は異化作用の欠如、又は原線維沈着についての特定組織(例えば関節)の素因の結果である。このような特発性沈着の例には、結節性ALアミロイド、皮膚アミロイド、内分泌アミロイド、及び腫瘍関連アミロイドが挙げられる。

【0069】

したがって、治療(例えば上記のような遺伝形態のアミロイドーシスの治療)に使用するためのコンジュゲートは、以下：遺伝性全身性アミロイドーシスの治療のためにはゲルソリンフラグメント、遺伝性ニューロパシーの治療のためには変異体リゾチームタンパク質(Alys)、腎臓疾患として発現する非ニューロパシー形態のアミロイドーシスには、フィブリノゲンの変異体 α 鎖(AfibA)、及びアイスランドで報告されたある種の形態の遺伝性脳脈管障害の治療には変異体シスタチンC(Acys)を含有し、このことによりそれに対して抗体を生成し得る。加えて、或る種の遺伝形態のプリオン疾患(例えば、クロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン-シュトラッサー-シャインカー症候群(GSS)、及び致死性の家族性不眠症(FFI))は、変異体イソ型のプリオンタンパク質PrP_{Sc}によって特徴付けられ、このタンパク質は、本発明によるPrP斑の沈着の治療及び予防のためのコンジュゲートに使用できる。

10

【0070】

制限ではなく更なる例として、本発明によるコンジュゲートで使用する候補である多くの追加の非遺伝形態のアミロイド疾患が存在する。 β_2 ミクログロブリン原線維斑は、長期の血液透析又は腹膜透析を受けている患者で一般に発現する。このような患者は、本発明による、 β_2 ミクログロブリン、より好ましくはその免疫原性エピトープを指向するコンジュゲートで治療され得る。

20

【0071】

ホルモン分泌腫瘍もまた、ホルモン由来アミロイド斑を含有し得る。その組成は、一般に、罹患した特定の内分泌器官に特徴的である。したがって、このような原線維は、ポリペプチドホルモン、例えばカルシトニン(甲状腺髄様ガン)、膵島アミロイドポリペプチド(II型糖尿病のほとんどの患者で発生)、及び心房性ナトリウム利尿ペプチド(孤立心房性アミロイドーシス)から作られ得る。アテローム性動脈硬化症で大動脈峡部に形成するアミロイド沈着物を指向するコンジュゲートもまた、本発明により企図される。

【0072】

以下で、本発明をアミロイドタンパク質アミロイド β で例証する。
アミロイド β は、アミロイド斑及び沈着物、例えばアルツハイマー病(AD)で形成されるものの主要な構成成分である。アルツハイマー病は、神経炎斑の沈着及び神経細線維もつれにより特徴付けられる。

30

【0073】

神経学的欠陥とアミロイド沈着物を有することとの間に直接相関は存在しない。相関の欠如は、ヒトAD患者及びADのトランスジェニックマウスモデルの両方で明白である。幾つかの一連の証拠もまた、固定化したアミロイド斑は比較的害がない構造である一方、可溶性アミロイド β オリゴマーは、アミロイド β に関係する神経毒性及び炎症性の損傷のほとんどを担っていることを示している。可溶性アミロイド β オリゴマーはまた、シナプスの物理的変性に関係付けられている。

40

【0074】

したがって、AD及び他のアミロイド β 関連疾患の治療は、可溶性アミロイド β オリゴマーを取り除くことを目標とすべきである可能性が最も高い一方、アミロイド斑中の固定化し、したがって害がないアミロイド β は、無処置のままにすることができ得る。アミロイド β のオリゴマー化は、モノマーの β シート構造の形成で始まる。このプロセスは、アミロイド β のC末端の存在によって強力に増強される。したがって、アルツハイマー病の防御治療の一義的なゴールは、アミロイド β の病理学的C末端を特異的に標的し、以前のワクチン接種療法にみられた望ましくない炎症特性を有しない能動及び/又は受動のワクチン接種ストラテジーを開発することであり得る。

50

【0075】

したがって、本発明によるコンジュゲート中のPペプチドは、ヒト形態アミロイドβの完全長のもの又はフラグメントから選択され得る。これらは、アミロイドβ(1-43)、アミロイドβ(1-42)、アミロイドβ(1-41)、アミロイドβ(1-40)、アミロイドβ(1-39)及びアミロイドβ(1-38)と呼ばれる。

【0076】

アミロイドβ(1-42)は、以下の配列を有する：

H2N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH

10

【0077】

アミロイドβ(1-41)、アミロイドβ(1-40)及びアミロイドβ(1-39)は、C末端部からそれぞれAla、Ala-Ile及びAla-Ile-Valを削除されていることが、アミロイドβ(1-42)と異なる。アミロイドβ(1-43)は、C末端にスレオニン残基が存在していることが、アミロイドβ(1-42)と異なる。

【0078】

好ましい実施形態では、PはアミロイドβのC末端、例えばアミロイドβのC末端から10、9、8、7、6、5、4又は3アミノ酸を含有し得る。

【0079】

具体的には、アミロイドβ(1-42)は、アミロイド原線維を迅速に形成する強い傾向を示すことが知られている一方、より短い形態のアミロイドβペプチドは、原線維を形成する傾向が顕著により弱い。したがって、アミロイドβ(1-42)は、アルツハイマー病においてアミロイド原線維の形成を触媒している可能性があり、可溶性アミロイドβ(1-42)を特異的に免疫学的に排除することによって、アルツハイマー病の病理を予防又は緩和することができる。

20

【0080】

本発明者らは、哺乳動物に投与したとき、シナプス毒性である可溶性形態のアミロイドβ(1-42)を特異的に標的する抗体を生成するアミロイドβ(1-42)のC末端部分の非常に特異的なフラグメントを同定した。小さなC末端アミロイドβペプチドを含んでなるコンジュゲートを免疫原として使用することで幾つかの利点がある。第1に、他のワクチンで知られているものより制御可能な免疫応答を作り出せる。なぜなら、本発明のコンジュゲート中のB細胞エпитープは、アミロイドβ(1-42)の遊離C末端に依存するからである。このことは、完全長APP又は固定化したアミロイドβペプチドに交差反応性を有する抗体を生じる危険を排除する。このことは、アミロイド斑中で結合しているアミロイドβの大きなプールを放出することによって引き起こされる非特異的な炎症応答を刺激する危険を顕著に低減させる。第2に、この免疫原は、その小さなサイズのためCD8細胞エпитープを含有する可能性はない。更に、本発明者らは、ワクチンアプローチでAβ₂₅₋₃₅セグメントを回避することができ、これにより望ましくない神経毒性又は炎症性の効果を排除することができる。なぜなら、アミロイドβの神経毒特性は、主に、デカペプチドAβ₂₅₋₃₅内に局在しているからである。このデカペプチドはまた、C1qに結合して補体カスケードをトリガーすることができる。

30

40

【0081】

したがって、特定の実施形態では、本発明は、Pがアミロイドβ(1-42)のフラグメント35-42であるコンジュゲートに関する。本発明はまた、Pがアミロイドβ(1-42)のフラグメント36-42であるコンジュゲートに関する。更に、本発明は、Pがアミロイドβ(1-42)のフラグメント37-42であるコンジュゲートに関する。なお別の観点では、Pはアミロイドβ(1-42)のフラグメント38-42である。更に、本発明は、Pがアミロイドβ(1-42)のフラグメント39-42であるコンジュゲートに関する。本発明はまた、Pがアミロイドβ(1-42)のフラグメント40-42であるコンジュゲートを包含する。

【0082】

50

A β_{1-42} のC末端に相当する小さなペプチドは、単独で実質的な免疫応答を誘導する可能性がない、比較的貧弱な免疫原である。このことを補償するため、本発明者らは、W0 00/18791に記載のLPA技術を使用した。この型のコンジュゲートは、本明細書中で、高度に免疫原性であり、特異的免疫応答を誘導し得ることが示されている。能動ワクチン接種ストラテジーにおけるこのようなコンジュゲートの使用は、A β_{1-42} の病原性C末端部分を特異的に標的する治療レベルの免疫応答を生じるはずである。

【0083】

好ましい実施形態では、式(I)中のRは-N(CH₂-)₂であり、Pはアミロイド β (1-42)のフラグメント36-42であり、Xは適切なTヘルパー細胞エпитープ、例えば完全長破傷風トキソイドである。更に、L_Bは、存在する場合、2つのリシン残基(KK)であり、L_Aは、存在する場合、 β アラニンであり、YはOHである。 10

【0084】

別の好ましい実施形態では、Rは-N(CH₂-)₂であり、Pはアミロイド β (1-42)のフラグメント37-42であり、Xは適切なTヘルパー細胞エпитープ、例えば完全長破傷風トキソイドである。更に、L_Bは、存在する場合、2つのリシン残基(KK)であり、L_Aは、存在する場合、 β アラニンであり、YはOHである。

【0085】

なお別の好ましい実施形態では、Rは-N(CH₂-)₂であり、Pはアミロイド β (1-42)のフラグメント38-42であり、Xは適切なTヘルパー細胞エпитープ、例えば完全長破傷風トキソイドである。更に、L_Bは、存在する場合、2つのリシン残基(KK)であり、L_Aは、存在する場合、 β アラニンであり、YはOHである。 20

【0086】

本発明によるPペプチドは、固相ペプチド合成又は組換え発現により合成することができ、又は天然の供給源から取得することができる。自動ペプチド合成機が多くの供給業者、例えばApplied Biosystems(Foster City, Calif.)から市販されている。組換え発現は、細菌、例えばE.coli、酵母、昆虫細胞又は哺乳動物細胞中で行うことができる。組換え発現の手順は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H.P. Press, NY 2d ed., 1989)により記載されている。

【0087】

コンジュゲートは、W0 00/18791に記載され本明細書中の図1に示されている方法により合成されてもよい。 30

【0088】

本発明はまた、哺乳動物におけるアミロイド関連疾患、例えばアルツハイマー病、ダウン症候群、血管性痴呆又は認知障害の治療、寛解及び/又は防御のための能動免疫法に関する。この方法は、哺乳動物に、抗原性量の上記で規定したコンジュゲートを投与することを含んでなる。ここで、コンジュゲートは、コンジュゲート自体に対する特異性を有する抗体の産生を誘発し、哺乳動物で免疫応答を誘導し、このことによりアミロイド誘導細胞毒性、及び/又は原線維、斑及び/又はアミロイド沈着物の形成を予防又は低減する。

【0089】

特定の実施形態では、産生される抗体は、上記コンジュゲートの1以上のC末端提示Pペプチドに対する特異性を有し、したがってアミロイドタンパク質内の病理学的領域と相互作用し得る。好ましい実施形態では、前記コンジュゲートは、アミロイド β (1-42)のフラグメントを含んでなる上記の特異的コンジュゲートの1つである。本発明はまた、コンジュゲートと共にアジュバント(例えば下記で規定するもの)を投与することを更に含んでなる方法に関する。 40

【0090】

本発明による方法では、コンジュゲートは、患者が罹患しているアミロイド障害に特徴的な該当するアミロイドペプチドに対する適切な免疫応答を生じるに十分効果的な投薬量で投与すべきである。1つの実施形態では、免疫学的応答は、アミロイドタンパク質(免疫原性ペプチドはこれを指向する)に関して少なくとも1:1000の血清力価により特徴付け 50

られる。なお更なる実施形態では、血清力価は、アミロイドタンパク質に関して少なくとも1:5000である。関連する実施形態によれば、免疫応答は、治療前コントロールの血清サンプルで測定した免疫反応性の血清レベルより約4倍を超えて高い免疫反応性の血清量により特徴付けられる。この後者の特徴付けは、血清免疫反応性がELISA技法により測定される場合に特に適切であるが、血清免疫反応性の任意の相対的測定又は絶対的測定に適用することができる。好ましい実施形態によれば、免疫反応性は約1:100の血清希釈率で測定する。

【0091】

当業者は、それを必要とする哺乳動物に適切な投薬量を、使用するコンジュゲート、治療すべき状態、及び問題の哺乳動物の体重、年齢及び性別に基づいて決定することができる。適切な投薬量は、ng~mg/日の範囲であると企図される。 10

【0092】

本発明はまた、上記のコンジュゲートをアジュバントと共に含んでなるワクチンに関する。本発明によるワクチンは、ワクチン接種した宿主において有効な抗アミロイド形成性抗体の生成を引き起こす。

【0093】

アジュバントは、免疫応答を増強するため、又は抗原性コンジュゲートの抗原性を増大させるために投与する。アジュバントは、その免疫調節特性を幾つかの機序、例えばリンパ系細胞の動員及びサイトカイン誘導を通じて発揮する。サイトカインアジュバントとしては、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン-12、GM-CSF、合成ムラミルジペプチドアナログ又はモノホスホリルリピドAが挙げられるがこれらに限定されない。アジュバントの更なる例は、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、QS21、水酸化アルミニウムゲル、MF59、リン酸カルシウム、リポシン(liposyn)、サポニン、スクアレン、L121、EmulsigenモノホスホリルリピドA (MPL)、ポリソルベート80、コレラ毒素(CT)、LTK及びLTK63を含んでなる群から選択される。 20

【0094】

特定の実施形態では、アジュバントは、ヒトへの投与について認可されているもの、例えば水酸化アルミニウムゲル、リン酸カルシウム及びMF59である。

【0095】

別の実施形態では、アジュバントは、Th2型の免疫応答を刺激する型のもの、例えば水酸化アルミニウムゲル及びCTなどである。Th2型応答を引き起こすことにより、抗炎症性サイトカイン、例えばIL-4、IL-10及びTGF- β の産生、並びにIgG₁及びIgG_{2b}抗体クラスの産生に有利である。Th2型応答は、AD患者の脳での主要な炎症応答が回避され、IgG₁はヒトで穏やかにのみ補体を活性化するので、本発明では好ましくあり得る。より安全なアルツハイマーワクチンのためには、抗体は補体を活性化しないことが必須である。なぜなら、そのような免疫応答は、抗体がコートした細胞の溶解を媒介することがあるからである。 30

【0096】

ワクチンはまた適切なキャリアを含んでなり得る。適切なキャリアとしては、経口、非経口、血管内(IV)、鼻内(IN)、動脈内(IA)、筋肉内(IM)、経皮及び皮下(SC)の投与経路に適切な任意の非免疫原性物質、例えばリン酸緩衝生理食塩水(PBS)が挙げられるがこれらに限定されない。 40

キャリアはまた、抗原を抗原提示細胞に運ぶビヒクルであり得る。ビヒクルの例は、リポソーム、免疫刺激性複合体、微小流動化した水中スクアレンエマルジョン、ポリ(乳酸/グリコール酸)(PLGA)から構成され得るミクロスフェアである。

【0097】

上記の記載は、能動ワクチン接種アプローチの開発に焦点を当てたが、受動免疫療法アプローチも同様に開発され得る。上記のものと同一コンジュゲートを使用して、高度に特異的な、例えばモノクローナル抗体を生成させることができる。引き続いて、ヒトにおける受動ワクチン接種ストラテジーでの更なる使用のために、遺伝子操作を使用してこのよ 50

うな抗体をヒト化することができる。アプローチとして受動免疫を使用することは、自明のことではあるが、安全性についての利点を追加できる。なぜなら、これは、望ましくない炎症応答を誘導する危険を更に排除するからである。

【0098】

したがって、本発明はまた、哺乳動物におけるアミロイド関連疾患、例えばアルツハイマー病、ダウン症候群、血管性痴呆又は認知障害の治療、寛解及び/又は防御のための受動免疫ストラテジーを包含する。ここで、哺乳動物が罹患している疾患に関係するアミロイドタンパク質と相互作用する抗体が、有効用量で、哺乳動物に投与され、これによりアミロイド誘導細胞毒性、及び/又は原線維、斑及び/又はアミロイド沈着物の形成を予防又は低減する。

10

【0099】

抗体は、カルボキシル末端で露出する1以上の上記のペプチドを含んでなるコンジュゲートに対して惹起され得る。特定の実施形態では、抗体は、アミロイド β (1-42)のカルボキシル末端、例えば残基35~42、36~42、37~42又は38~42に結合する。

【0100】

抗体はまた、モノクローナル抗体であり得る。好ましい実施形態では、モノクローナル抗体は、標準的な免疫学的技法を使用して、哺乳動物対象をアミロイドペプチド、例えばLPA骨格に連結したアミロイド β (1-42)又はそのフラグメントで免疫し、続いて例えば体性細胞ハイブリダイゼーションによりハイブリドーマ細胞を作製することによって抗体産生細胞株を樹立して産生する。

20

【0101】

抗体はヒト化されていてもよいし、キメラであってもよい。キメラ抗体及びヒト化抗体は、マウス又は他の非ヒト抗体と同じか又はこれらに類似の結合特異性及び親和性を有する。哺乳動物非ヒト抗体は、キメラ抗体の構築のための出発材料を提供する。キメラ抗体は、軽鎖及び重鎖の遺伝子が、典型的には遺伝子操作により、異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから構築された抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体の遺伝子の可変(V)セグメントは、ヒト定常(C)セグメント、例えばIgG1及びIgG4に繋がれてもよい。ヒトアイソタイプIgG1が好ましい。典型的なキメラ抗体は、このように、マウス抗体のV又は抗原結合ドメインとヒト抗体のC又はエフェクタードメインからなるハイブリッドタンパク質抗体である。

30

【0102】

ヒト化抗体は、2つの異なる経路を使用して、哺乳動物の非ヒト抗体の分子操作によるか又はヒト化マウス、すなわちヒト様免疫系を有するトランスジェニックマウスで免疫応答を惹起することによるかのいずれかで作製することができる。分子操作した抗体は、哺乳動物非ヒト抗体を出発材料として使用する。これらは、ヒト抗体(アクセプター抗体と呼ばれる)に実質的に由来する可変領域フレームワーク残基及びマウス抗体(ドナー免疫グロブリンと呼ばれる)に実質的に由来する相補性決定領域を有する。定常領域もまた、存在する場合には、実質的に又は全体的にヒト免疫グロブリンに由来する。ヒト可変ドメインは、通常、CDRが由来するマウス可変領域ドメインと高度の配列同一性を示すフレームワーク配列を有するヒト抗体から選択される。重鎖及び軽鎖の可変領域フレームワーク残基は、同じか又は異なるヒト抗体配列に由来することができる。ヒト抗体配列は、天然に存在するヒト抗体の配列であることができ、又は幾つかのヒト抗体のコンセンサス配列であることもできる。ヒト可変領域フレームワーク残基の或るアミノ酸は、置換について、CDRコンフォメーション及び/又は抗原への結合に対する可能性のある影響に基づいて選択される。そのような可能性のある影響の研究は、モデリング、特定の位置でのアミノ酸の特性の検査、又は特定アミノ酸の置換若しくは変異誘発の効果の経験的観察による。

40

【0103】

置換の他の候補は、その位置でヒト免疫グロブリンにとって通常でないアクセプターのヒトフレームワークアミノ酸である。これらアミノ酸は、マウスドナー抗体の等価位置からか又はより典型的なヒト免疫グロブリンの等価位置からのアミノ酸で置換することがで

50

きる。置換の他の候補は、その位置でヒト免疫グロブリンにとって通常でないアクセプターのヒトフレームワークアミノ酸である。ヒト化免疫グロブリンの可変領域フレームワークは、通常、ヒト可変領域フレームワーク配列又はそのような配列のコンセンサスに少なくとも85%の配列同一性を示す。

【0104】

本発明による、Pがアミロイドβのフラグメントであるワクチン及び受動免疫戦略は、2つの可能なシナリオを通じて脳アミロイドーシスの発症を予防することができる：1)アミロイド沈着の部位での抗アミロイドβ抗体の効果、及び2)血漿アミロイド濃度に対する高い循環抗アミロイドレベルの全身性効果。

【0105】

具体的には、上昇した血漿抗アミロイドβ抗体レベルは、正常アミロイドβ血漿レベルを低下させ、このことにより正常アミロイドβレベルに全身性の不均衡を生じることによって全身性に作用し得る。このような不均衡は、脳と血漿との間のアミロイドβレベルの正常な均衡を再度確立するために、脳からのアミロイドβレベルのクリアランスを担う機序の活性化を導き得る。

【0106】

したがって、この可能性は、能動又は受動免疫後の異なる時点で、例えばアミロイドβ(1-40)及びアミロイドβ(1-42)の血漿及び脳のレベルに対するその免疫の効果を決定的により活用することができ得る。アミロイドβ免疫はまた、脳アミロイドーシスの発現に対する全身性の保護効果を発揮することができる。血漿及び脳のアミロイドβレベルの比は、免疫したトランスジェニック動物では一定のままであるはずである一方、コントロール動物では低下するはずである。加えて、免疫したトランスジェニック動物から無処置のトランスジェニック動物へのB細胞又は骨髄細胞の移入は、抗アミロイドβ抗体を使用する受動免疫と同じ効果を有するはずである。

【0107】

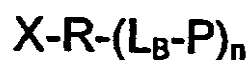
本発明によるワクチン及び抗体は、通例、非経口的に、例えば血管内に(IV)、動脈内に(IA)、筋肉内に(IM)、皮下(SC)などで投与される。幾つかの例では、ワクチンの性質により血管系への移行が可能である場合、投与は、経口、鼻、直腸、経皮又はエアロゾルであり得る。通常、単回注入が用いられるが、所望であれば1回より多い注入を使用してもよい。ワクチンは、シリンジ、トロカール、カテーテルなどを含む都合のよい任意の手段により投与され得る。導入部位が本発明にとって重要でない場合、好ましくは、投与は血管内に、好ましくは血流が速い部位、例えば静脈内に、末梢静脈又は中心静脈にされる。投与が徐放技法又は保護マトリクスと共役される場合、他の経路の使用も見出され得る。また、鼻投与を介する粘膜免疫は、このような投与経路がTh2型応答に好ましいので、適切な方法である。

【0108】

本発明の代替の実施形態では、1以上のPペプチドとX基を繋ぐリンカーRは上記で規定したものと異なってもよい。このような場合、Pは、以下の項目で規定する非常に制限された数のペプチドを表す：

1. 以下の構造：

【化3】



(式中、

Xは水素又はペプチド基であり、

Rは少なくとも2つの付着点を有し、PのN末端部への、該当する場合には L_B を介する共有結合を形成することができるリンカーであり、

nは1又はそれより大きい整数であり、

PはアミロイドβのC末端を含有するペプチドであり、

ここで、PのN末端部は、PがC末端に提示されるように、共有結合によりLに、存在す

10

20

30

40

50

る場合にはXに連結され、nが2以上である場合、Pは同じであるか又は異なる)
を有するコンジュゲート及びその医薬的に許容し得る塩。

【0109】

2. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβのC末端からの10アミノ酸のフラグメントである項目1によるコンジュゲート。

【0110】

3. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβのC末端からの9アミノ酸のフラグメントである項目1によるコンジュゲート。

【0111】

4. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβのC末端からの10
8アミノ酸のフラグメントである項目1によるコンジュゲート。

【0112】

5. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβのC末端からの7アミノ酸のフラグメントである項目1によるコンジュゲート。

【0113】

6. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβのC末端からの6アミノ酸のフラグメントである項目1によるコンジュゲート。

【0114】

7. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβのC末端からの5
アミノ酸のフラグメントである項目1によるコンジュゲート。

【0115】

8. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβのC末端からの4アミノ酸のフラグメントである項目1によるコンジュゲート。

【0116】

9. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβのC末端からの3アミノ酸のフラグメントである項目1によるコンジュゲート。

【0117】

10. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβ(1-42)のフラグ
メント35-42である項目1によるコンジュゲート。

【0118】

11. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβ(1-42)のフラグ
メント36-42である項目1によるコンジュゲート。

【0119】

12. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβ(1-42)のフラグ
メント37-42である項目1によるコンジュゲート。

【0120】

13. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβ(1-42)のフラグ
メント38-42を含んでなる項目1によるコンジュゲート。

【0121】

14. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβ(1-42)のフラグ
メント39-42を含んでなる項目1によるコンジュゲート。

【0122】

15. P又はnが2以上である場合Pのうち少なくとも1つがアミロイドβ(1-42)のフラグ
メント40-42を含んでなる項目1によるコンジュゲート。

【0123】

16. nが2でありPが同じペプチドである項目1～15のいずれか1項によるコンジュゲ
ート。

【0124】

17. リンカーYがAslam(Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, (1998))に記載されるような任意の適切な型から選択される項目1～16のいずれか1項によ
50

るコンジュゲート。

【0125】

18. RがT細胞エピトープである項目1～17のいずれか1項によるコンジュゲート。

【0126】

19. Rが、完全長破傷風トキソイド、破傷風トキソイドフラグメントFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE及び破傷風トキソイドフラグメントYNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGTを包含するヒトT細胞エピトープであるか、又はQYIKANSKFIGITELを包含するげっ歯類T細胞エピトープである項目18によるコンジュゲート。

【0127】

20. Rがキーホールリンペットヘモシアニン又はBSAである項目1～17のいずれか1項によるコンジュゲート。 10

【0128】

21. 哺乳動物に抗原性量の項目1～20のいずれか1項で規定したコンジュゲートを投与することを含んでなり、コンジュゲートがコンジュゲート自体に対する特異性を有する抗体の産生を誘発する、哺乳動物において抗体を産生する方法

【0129】

22. 産生される抗体が項目1～20で規定したコンジュゲートの1以上のC末端提示ペプチドに対して特異的である項目21による方法。

【0130】

23. モノクローナル又はポリクローナルの抗体の産生のために、体性細胞ハイブリダイゼーションによりハイブリドーマ細胞を作製する工程を更に含んでなる項目21又は22による方法。 20

【0131】

24. 哺乳動物がマウス又はヒト化マウスである項目21～23のいずれか1項による方法。

【0132】

25. 項目1～20で規定したコンジュゲートに対する特異性を有する抗体。

【0133】

26. 項目1～20のいずれか1項で規定したコンジュゲート中の1以上のC末端提示ペプチドに対する特異性を有する抗体。

【0134】

27. モノクローナルである項目25又は26による抗体。 30

【0135】

28. ヒト化又はキメラである項目25～27のいずれか1項による抗体。

【0136】

29. 項目21～24で規定した方法により産生される項目25～28のいずれか1項による抗体。

【0137】

30. 哺乳動物に項目25～29で規定した抗体を投与し、それによりアミロイド誘導細胞毒性、及び/又は原線維、斑及び/又はアミロイド沈着物の形成を予防又は低減することを含んでなる、哺乳動物におけるアミロイド関連疾患の治療及び/又は防御の方法。

【0138】

図面の説明 40

図1は、共通の骨格に付着したダイマーのC末端提示ペプチドフラグメントの作製を説明する。1)Aβペプチド配列を合成樹脂上で組み立てた。この鎖は、親水性増強用の2つのN末端リシンを更に含んでなる。多くの鎖のうち2つのみが示されている。2)1/2当量のFmoc-イミノ二酢酸を、カップリング試薬としてTBTU、HOBt及びDIEAを用いて、このペプチド鎖のN末端にカップリングした。3)TBTUを使用して環化を実施した。4)脱保護及び樹脂からの切断により、C末端で提示される生物学的に増強されたダイマーを生じる。5)(3)のN末端脱保護、続くmoc-βAla-OHとスペーサーのイミノ基(NH基)とのカップリングにより、NH基でのT細胞エピトープの継続合成のためのペプチド樹脂が提供される。脱保護及び樹脂からの切断によりダイマーが生じる。

【0139】

図2は増殖応答のヒストグラムを示す。マウスを、Alヒドロゲル、Alヒドロゲル中のp30ex、又はAlヒドロゲル中の破傷風トキソイドで免疫し、脾臓細胞を取得し、p30ex(青)又は破傷風トキソイド(赤)で刺激した。

【0140】

図3は増殖応答のヒストグラムを示す。個体からの末梢血単核細胞(PBMC)を破傷風ワクチンで免疫し、PBMCを取得して、破傷風トキソイド、p30ex又は抗原なしで刺激した。

【0141】

図4は、1:50の血清希釈率を使用し、抗原として $A\beta_{33-42}$ を用いたELISAを示す。マウスを、P30ex:LPA-KK: $(^{33}GLMVGGVVIA^{42})_2$ (IgG aa 33-42)、P30ex:LPA-KK: $(^{35}MVGGVVIA^{42})_2$ (IgG aa 35-42)、P30ex:LPA-KK: $(^{36}VGGVVIA^{42})_2$ (IgG aa 36-42)、P30ex:LPA-KK: $(^{37}GGVVIA^{42})_2$ (IgG aa 37-42)、P30ex:LPA-KK: $(^{38}GVVIA^{42})_2$ (IgG aa 38-42)及びAlヒドロゲル(IgG Alヒドロゲル)で免疫した。

【0142】

図5は、抗原として $A\beta_{33-42}$ を用いたELISAを示す。マウスをKLH:LPA-KK: $(^{37}GGVVIA^{42})_2$ (IgG aa 37-42 KLH)で免疫した。

【0143】

図6は、P30ex:LPA-KK: $(^{33}GLMVGGVVIA^{42})_2$ 群のIgG₁/IgG_{2a}サブクラスELISAである。

【0144】

図7は、P30ex:LPA-KK: $(^{35}MVGGVVIA^{42})_2$ 群のIgG₁/IgG_{2a}サブクラスELISAである。

【0145】

図8は、KLH:LPA-KK: $(^{37}GGVVIA^{42})_2$ 群のIgG₁/IgG_{2a}サブクラスELISAである。

【0146】

図9は、コーティング抗体として $A\beta_{33-42}$ 及び $A\beta_{33-44}$ を使用する、P30ex:LPA-KK: $(^{33}GLMVGGVVIA^{42})_2$ 抗原に対する免疫応答の選択性を決定するためのELISAを示す。

【0147】

図10は、コーティング抗体として $A\beta_{33-42}$ 及び $A\beta_{33-44}$ を使用する、P30ex:LPA-KK: $(^{35}MVGGVVIA^{42})_2$ 抗原に対する免疫応答の選択性を決定するためのELISAを示す。

【0148】

図11は、コーティング抗体として $A\beta_{33-42}$ 及び $A\beta_{33-44}$ を使用する、KLH:LPA-KK: $(^{37}GGVVIA^{42})_2$ 抗原に対する免疫応答の選択性を決定するためのELISAを示す。

【0149】

図12は脾臓細胞の増殖を示す。KLH:LPA-KK: $(^{37}GGVVIA^{42})_2$ で免疫したマウスからの脾臓細胞を、KLH(青)及び $A\beta_{1-42}$ (赤)でインビトロで再刺激した。バックグラウンドの増殖を黄色で示す。

【実施例】

【0150】

実施例

実施例1

抗原構築物の作製

下記に記載のLPA技術を使用して、5つの抗原構築物を設計した。構築物は全て、T細胞エピトープ、LPA骨格、2つのリシン(K)及び2つの $A\beta_{1-42}$ C末端ペプチドフラグメントから構成した(表I参照)。抗原構築物中の $A\beta$ 配列は、長さが10アミノ酸から5アミノ酸まで減少している($A\beta_{33/35/36/37/38-42}$)。

【0151】

【表 1】

表I: 作製した抗原構築物の概要

抗 原	
P30ex:LPA-KK:(³³ GLMVGGVVIA ⁴²) ₂ (NSA)	
P30ex:LPA-KK:(³⁵ MVGGVVIA ⁴²) ₂ (NSB)	
P30ex:LPA-KK:(³⁶ VGGVVIA ⁴²) ₂ (NSC)	
P30ex:LPA-KK:(³⁷ GGVVIA ⁴²) ₂ (NSD)	
P30ex:LPA-KK:(³⁸ GVVIA ⁴²) ₂ (NSE)	

10

【0152】

ペプチド合成

ペプチドを、完全自動ABI 433ペプチド合成装置(Applied Biosystems)で、Fmoc-アミノ酸(Fluka)を使用し、カップリング剤としてTBTU(N,N,N',N'-テトラメチル-0-ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウム テトラフルオロボレート(Fluka))、HOBt(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール ハイドレート(Fluka))及びDIEA(N,N-ジイソプロピルエチルアミン(Aldrich))を、溶媒としてNMP(N-メチルピロリドン)(HCl Nordic AS)を用いて合成した。Fmoc-

20

【0153】

所望のペプチド配列の組み立て又はLPA法(リガンド提示アセンブリ; WO 00/18791)による連続的なペプチド合成の後、ペプチドを、TFA(トリフルオロ酢酸(AppliChem))、水及びTIS(トリイソプロピルシラン(Aldrich))で樹脂から切断し、凍結乾燥に付した。

【0154】

ペプチドの純度を、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)及びMS(エレクトロスプレー質量分析)で検査した。

【0155】

抗体の特異性を検出するために、Aβ₃₃₋₄₂及びAβ₃₃₋₄₄のELISA抗原を合成した。マウスモノクローナル抗体(MAb 35.2 [Birkelundら、1994])の既知の8アミノ酸リニアエピトープを有する抗原を構築し、標準的な手順を使用して、二官能性リンカーとしてSPDP(N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(Sigma))を用いて、付加したN末端(又は所望によりC末端)システインを通じてBSA(ウシ血清アルブミン(Sigma))にカップリングした。このエピトープを、免疫グロブリン定量についての内部コントロールとなるようにELISAに含ませた：

30

BSA-システイン-(MAbのエピトープ)-Aβ配列

BSA-C₃₆₀NKGVN PDE₃₆₇₋₃₃GLMVGGVVIA₄₂

BSA-C₃₆₀NKGVN PDE₃₆₇₋₃₃GLMVGGVVIATV₄₄

【0156】

LPA技術

アミロイドペプチド配列を記載のように組み立て、親水性増強のために更に2つのリシンを当該配列にカップリングした。N末端脱保護の後、1/2当量のFmoc-イミノ二酢酸(Fluka)をアミロイド樹脂にカップリングし、続いて残存する遊離のアミノ基とカルボキシ基との間で環化した。イミノ基Fmoc-脱保護の後、上記のように、TFA、水及びTISで所望のLPAを樹脂から切断した。ペプチドの純度をHPLC及びMSで検査した。

LPA技術を使用するのダイマーポリペプチドの作製の例示的記載については図1を参照のこと。

【0157】

T細胞エピトープの合成

50

或いは、Fmoc- β Ala-OHをFmoc-脱保護後のイミノ基にカップリングして(上記LPA技術を参照)、継続T細胞エピトープ合成用のFmoc- β Ala-LPA-アミロイド-ペプチド樹脂を与える。上記のように、Tヘルパー細胞破傷風エピトープをFmoc- β Ala-LPA-アミロイドペプチド-樹脂の全てで組み立て、続いてFmoc-脱保護及び樹脂からの切断を行った。

ペプチドの純度をHPLC及びMSで検査した。

【0158】

本発明で使用した破傷風毒素のヒトTヘルパー細胞エピトープは、本発明者らにより、マウスで免疫原性であることが以前に示されている。エピトープp30は21アミノ酸長であり、破傷風毒素中でアミノ酸947~967に位置する。このエピトープは、ヒトMHCクラスII分子に無差別に結合すると記載されている。これはまたT細胞により認識される。すなわち、このエピトープは、ヒト及びマウスの両方で免疫原性であるはずである。このエピトープがマウスで認識される確率を増大させるため、N末端部及びC末端部の両方で4アミノ酸伸ばし、これをp30exと名付けた。このエピトープがマウスで機能することを確認するため、3群のC57/blackマウスをそれぞれ、Alヒドロゲル中の25 μ gのp30ex、50 μ lの破傷風ワクチン(陽性コントロール)(SSI, Denmark)、及び50 μ lの0.1%Alヒドロゲル(陰性コントロール)で免疫した。このワクチン接種は1週間間隔で3回、筋肉内注射により行った。

【0159】

3週間後、脾臓細胞を採集し、続いて下記のようにp30ex及び破傷風トキシノイドで刺激した。

【0160】

増殖アッセイ

脾臓をホモジナイザー内で10%FCSを有するRPMI 1640培地中で破壊することにより、脾臓細胞を取得した。細胞を計数し、10⁶細胞/mlに希釈した。各ウェルに200 μ l(200,000細胞)を加え、3回の測定を行った。抗原を加えた(1~0.001 μ g/ml最終濃度)。細胞を37°C、5%CO₂及び85%湿度にてインキュベートした。2日後、1ウェル当たり1 μ Ciの[³H]-チミジンを加えた。18時間後、細胞をTomtecデバイスで採集し、Wallac trilux 1450 microbetaカウンタで[³H]-チミジンの取り込みを測定した。

【0161】

p30exはそれ自体で有意な免疫応答を誘発できなかったが、マウスを破傷風トキシノイドで免疫すると、良好な応答が観察された(図2を参照)。

【0162】

p30exもまたヒトで機能するかを決定するために、3ヶ月前に破傷風ワクチンで免疫した個体から末梢血単核細胞(PBMC)を取得した。破傷風トキシノイドは良好な増殖応答を与え、p30exもまた、破傷風ワクチン接種マウスで観察されるものと同様な応答を与えた(図3を参照)。実験条件は、上記のように、脾臓細胞の代わりにPBMCを使用した以外は、マウス実験と同一であった。

【0163】

これら知見により、p30exエピトープが抗体産生に実質的なT細胞の助けを与える機会を増大させるために、p30exエピトープを有する抗原構築物を与える10日前に、破傷風トキシノイドでマウスを予め刺激することを決定した。

【0164】

実施例2

抗原構築物の免疫原性

抗原構築物を1mg/mlに希釈し、最終濃度が0.5mg/mlの抗原及び0.1%のAlヒドロゲルとなるように0.2%のAlヒドロゲルを段階的に加えた(Brenntag Productインサートにより)。60匹の10週齢C57/blackマウスに、p30exエピトープに対してTヘルパー細胞応答を発現させるために、50 μ lの破傷風ワクチン(SSI, Denmark)を四頭筋の筋肉内にワクチン接種した。マウスは1群10匹とした。10日目、20日目、及び30日目に、各群に50 μ lを筋肉内にワクチン接種した。50日目に、眼穿刺により血清サンプルを採取した。

【0165】

ELISA

ペプチドA β_{33-42} でのELISAアッセイを行って、異なる抗原構築物により誘発される抗体応答を測定した。A β_{33-42} ペプチドをELISAアッセイにおける標的として使用した。なぜなら、これは、免疫群で使用した全ての抗原をカバーし、したがって異なる免疫群の結果を直接比較することが可能になるからである。

【0166】

ELISA用に、N末端システイン、続いてマウスモノクローナル抗体(MAb 35.2)(Birkelundら、1994)のエピトープを構成する8アミノ酸を有する抗原を合成し、最後にA β_{33-42} ペプチドをC末端に付加した。N末端システインで、このペプチドをウシ血清アルブミン(BSA)に接合した。抗原をPBS中に最終濃度4 $\mu\text{g/ml}$ に希釈し、1ウェル当たり60 μl をmaxysorbプレート(Nunc, Denmark)に加えた。プレートを4 $^{\circ}\text{C}$ にて20時間インキュベートした。プレートを空にし、PBS中に希釈した75 μl の15% (vol/vol)胎仔ウシ血清(FCS)を加えた。プレートを37 $^{\circ}\text{C}$ にて1時間インキュベートし、その後プレートを0.05% Tween-20を含むPBSで3回洗浄した。マウス抗体を抗体緩衝液(PBS中15% FCS、0.05% Tween-20)中で1:50に希釈した。

【0167】

抗体をプレートに2連で(in duplicates)加え、陽性コントロールとしてMAb 35.2を使用し、陰性コントロールとしてAlヒドロゲル群の血清を使用した。プレートを37 $^{\circ}\text{C}$ にて1時間インキュベートし、次いで3回洗浄した。二次抗体として、抗体緩衝液中に1:4,000に希釈した、HRPを接合したヤギ抗マウスIgG(BioRad, Ca.)を使用した。トレイを37 $^{\circ}\text{C}$ にて1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、50 μl のTMB(KemEnTec, Denmark)を加えた。37 $^{\circ}\text{C}$ にて30分間のインキュベーション後、反応を100 μl の1 M HClで停止した。プレートをSunrise(Tecan, Austria)装置で、620nmを参照として450nmで読み取った。

【0168】

図4は、得られた全ての免疫応答をまとめたものである。簡潔には、P30ex:LPA-KK:($^{33}\text{GLMVGGVVIA}^{42}$)₂で、10匹中6匹のマウスが良好な抗体応答を有した。P30ex:LPA-KK:($^{35}\text{MVGGVVIA}^{42}$)₂で免疫したマウスもまた、9匹中6匹のマウスで良好な応答を示した。しかし、A $\beta_{36/37/38-42}$ を含有する抗原構築物は、Alヒドロゲル群に対して有意な反応を示さなかった。

【0169】

まとめると、本発明者らは、p30exペプチドに連結したA β_{1-42} のペプチドが、A β_{1-42} のC末端セグメントを認識する抗体の産生を刺激することができることを示した。しかし、最も長いペプチド、aa 33~42及びaa 35~42のみが、上記の免疫ストラテジーを使用して、体性免疫応答を誘発した。A $\beta_{36/37/38-42}$ を含有する抗原構築物は、A β_{33-42} に対する有意な抗体応答を誘発しなかった。

【0170】

実施例3

A $\beta_{36/37/38-42}$ に対する免疫応答の生成

抗体応答がより小さいA $\beta_{36/37/38-42}$ フラグメントによって生成され得るかを研究するために、P30exより複雑なキャリアタンパク質及びより強力なアジュバントを使用することによって、免疫原性を増大させた。本発明者らは、A β_{37-42} フラグメントに焦点を当てることを決定し、この新しい設定で、下記のように、LPA-KK-($^{37}\text{GGVVIA}^{42}$)₂を、マウス及びウサギの両方で強力なTヘルパー細胞応答を与えることが知られているキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)(Sigma-Aldrich, USA)に接合した(Aslam, M and Dent A)。更に、フロント(Difco, USA)不完全アジュバントを使用した。

【0171】

LPA A $\beta_{36/37/38-42}$ 抗原の調製

使用したアジュバント：Alヒドロゲル(Brenntag, Denmark)、フロント不完全、及びQS21(Cambridge Biotech, USA)

400 μ l のペプチド (1 mg/ml) と 50 μ l の 0.2% Al ヒドロゲルとを混合し、1 分後及び 2 分後に 50 μ l の追加の 0.2% Al ヒドロゲルを加え、3 分後に 100 μ l を、4 分後に 150 μ l を加えることにより、Al ヒドロゲルを有する抗原を調製した。ワクチンの最終の組成は、0.5mg/ml ペプチド及び 1 mg/ml Al ヒドロゲルであった。

【0172】

タンパク質 (KLH、破傷風トキソイド) にカップリングした 400 μ l (1 mg/ml) のペプチドと 400 μ l のフロイント不完全アジュバントとを混合することにより、フロイント不完全アジュバント中の抗原を調製した。

【0173】

以下の構築物を使用した：

10

破傷風トキソイド p30ex- β アラニン-LPA-KK-アミロイド 33-42：
H-YNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGT- β A-N(CH₂COKKGLMVGGVVIA-OH)₂

破傷風トキソイド p30ex- β アラニン-LPA-KK-アミロイド 35-42：
H-YNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGT- β A-N(CH₂COKKMVGGVVIA-OH)₂

破傷風トキソイド p30ex- β アラニン-LPA-KK-アミロイド 36-42：
H-YNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGT- β A-N(CH₂COKKVGGVVIA-OH)₂

破傷風トキソイド p30ex- β アラニン-LPA-KK-アミロイド 37-42：
H-YNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGT- β A-N(CH₂COKKGGVVIA-OH)₂

20

破傷風トキソイド p30ex- β アラニン-LPA-KK-アミロイド 38-42：
H-YNDMFNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGT- β A-N(CH₂COKKGVVIA-OH)₂

KLH-C-LPA-KK-アミロイド 37-42：

キーホールリンペットヘモシアニン-C- β アラニン-N(CH₂COKKGGVVIA-OH)₂

破傷風トキソイド-C-LPA-KK-アミロイド 37-42：

破傷風トキソイド-C- β アラニン-N(CH₂COKKGGVVIA-OH)₂

30

【0174】

KLH 構築物及び破傷風トキソイド構築物のために、 β アラニン-LPA-KK-アミロイド配列を、上記のように製造したが、p30ex 配列の代わりに、1 つのシステインを β アラニンにカップリングした。ペプチドを樹脂と分割し、HPLC で精製し、凍結乾燥させた。質量を MS により検証した。このシステイン含有ペプチドを、SPDP(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート)(Sigma-Aldrich) で活性化した KLH 又は破傷風トキソイド (SSI) にカップリングした。カップリングの効率を決定した。

【0175】

凍結乾燥 $A\beta_{1-42}$ を H₂O に溶解して最終濃度 2 mg/ml とした。 $A\beta_{1-42}$ の重合のために、この溶液を 4 °C にて一晩インキュベートした。Cribbs ら (2003) に従い、ワクチンは、640 μ l の $A\beta_{1-42}$ 、65 μ l の 10 $\times$ PBS 及び 160 μ l の QS21 (1 mg/ml) を混合した。抗原を NSH 標識した。コントロール抗原 (NSQ 標識)：640 μ l の H₂O、65 μ l の 10 $\times$ PBS 及び 160 μ l の QS21 (1 mg/ml)。

40

【0176】

ワクチン接種プロトコル

抗原群 NSA-E (表 I) 及び陰性コントロール群 (NS0 と名付ける) 用の 60 匹の 10 週齢 C57/balck マウスに、p30ex エピトープに対して T ヘルパー細胞応答を発現させるために、50 μ l の破傷風ワクチン (SSI, Denmark) を四頭筋の筋肉内にワクチン接種した。マウスは 1 群 10 匹とした。10 日目、20 日目、及び 30 日目に、各群に 50 μ l の上記のワクチンの 1 つを筋肉内にワクチン接種した。50 日目に血清サンプルを採取した。10 匹のマウスに、0 日目、10 日

50

目及び20日目にNSGをワクチン接種し、45日目に血清サンプルを採取した。

【0177】

この免疫法により、10匹中7匹のマウスが有意な応答を有した(図5を参照)。このことにより、P30ex:LPA-KK:(³⁶VGGVVIA⁴²)₂、P30ex:LPA-KK:(³⁷GGVVIA⁴²)₂、P30ex:LPA-KK:(³⁸GVVIA⁴²)₂で免疫したマウスで応答を欠いたのは、C57/blackマウスに正しい特異性を有するB細胞がなかったことに起因するのではなく、その特異性を有するB細胞が極僅かに存在し、したがってフロイントアジュバントを使用してKLHにより提供される強力なTヘルパー細胞応答が必要であったことが示される。

【0178】

実施例4

Aβ_{33/35/37-42}に対するTヘルパー応答の方向の特徴付け

Tヘルパー細胞は異なるインターロイキンを分泌することができる。Th1細胞はγ-インターフェロンを分泌し、これはマウスにおいてCD8+細胞を刺激し、IgG_{2a}サブクラスの体液性応答を生じる。IgG_{2a}のFc部分は補体を活性化する。Th1応答は、ウイルス感染及び細胞内細菌での感染に典型的である。Th2細胞は、IL-10及びトランスフォーミング増殖因子-β(TGF-β)を分泌する。これは、体液性免疫系を刺激してIgG₁サブクラス抗体を産生させる。IgG₁はマウスでは補体を活性化しないが、ヒトで僅かに活性化する。より安全なアルツハイマーワクチンのためには、抗体は補体を活性化しないことが必須である。なぜなら、そのような免疫応答は、抗体によりコートされた細胞の溶解を媒介することがあるからである。

【0179】

抗原構築物がどの方向に免疫応答を導いたかを決定するために、抗マウスIgG₁及びIgG_{2a}でのELISAアッセイを実施例2に記載のように行ったが、二次抗体として、HRPを接合したヤギ抗マウスIgG₁(1:2,000)及びIgG_{2a}(1:4000)(Caltag(USA))を使用した。P30ex:LPA-KK:(³³GLMVGGVVIA⁴²)₂、P30ex:LPA-KK:(³⁵MVGGVVIA⁴²)₂及びKLH:LPA-KK:(³⁷GGVVIA⁴²)₂により誘導された唯一の検出可能な抗体サブクラスはIgG₁であった(図6~8を参照)。このことは、免疫応答がTh2細胞によって駆動されることを示す。

【0180】

実施例5

Aβ_{33/35/37-42}に対する免疫応答の特異性

免疫応答の特異性を決定するため、ELISAアッセイを、2つのコーティング抗原(Aβ₃₃₋₄₂及びAβ₃₃₋₄₄)を使用して、実施例2に記載のように行った。Aβ₁₋₄₂のC末端基を含有するエピトープに対する抗体は、Aβ₃₃₋₄₂ ELISAでのみ陽性である一方、Aβ₃₃₋₄₄を使用するELISAは低減したか又は完全に消失した。Aβ₁₋₄₂のC末端基以外の他のエピトープを認識する抗体は、両方のELISAアッセイで結合すると予測される。Aβ₁₋₄₂及びAPPに直接向けた選択性の取り組みは、これら最初の選択性研究に従う。

【0181】

図9は、P30ex:LPA-KK:(³³GLMVGGVVIA⁴²)₂で免疫したマウスが、Aβ₃₃₋₄₂及びAβ₃₃₋₄₄の両方に対する抗体を生成したことを示す。

【0182】

マウスをP30ex:LPA-KK:(³⁵MVGGVVIA⁴²)₂で免疫した場合、1匹のマウス(NS25)がAβ₁₋₄₂のC末端について選択的な抗体を生成した一方、4匹の動物がAβ₃₃₋₄₂及びAβ₃₃₋₄₄の両方に対する抗体を発現し、4匹の動物が弱い抗体応答を発現するか又は抗体応答を全く発現しなかった(図10を参照)。KLH:LPA-KK:(³⁷GGVVIA⁴²)₂抗原を用いた場合、全ての抗体が、Aβ₃₃₋₄₂に選択的であり、Aβ₃₃₋₄₄に対しては結合しないか又は無視し得る結合しか有さなかった(図11を参照)。KLH:LPA-KK:(³⁷GGVVIA⁴²)₂抗原では、本発明者らは、マウスにおいて、Aβ₃₃₋₄₂のC末端を特異的に指向する免疫応答を生成することができた。

【0183】

実施例6

KLH:LPA-KK:(³⁷GGVVIA⁴²)₂のT細胞プロフィールについての研究

将来の臨床研究で使用するべき最適な抗原構築物は、 $A\beta_{1-42}$ に対するT細胞応答を生成しない可能性が最も高くあるべきである。なぜなら、 $A\beta_{1-42}$ に対する特異的T細胞応答は潜在的にCNSで炎症応答をトリガーすることがあると想像されるからである。したがって、KLH:LPA-KK: $(^{37}\text{GGVVIA}^{42})_2$ 抗原構築物が $A\beta_{1-42}$ 特異的T細胞応答を生じるかを予備的に試験した。そうするため、KLH:LPA-KK: $(^{37}\text{GGVVIA}^{42})_2$ 構築物に対する抗体で応答した5匹のマウスに、最後の免疫の6週間後に、追加の用量のワクチンを与えた。4日後、これらマウスからの脾臓細胞を $A\beta_{1-42}$ で、そして陽性コントロールとしてKLHで、実施例1に記載のように刺激した(図12を参照)。

【0184】

KLHに対する良好な応答は見られた一方で、 $A\beta_{1-42}$ に対する応答はバックグラウンドより有意には大きくなかった。このことにより、T細胞の活性化されたプールは、 $A\beta_{1-42}$ よりむしろT細胞エピトープと反応するようにプライムされていることが示される。 $A\beta_{1-42}$ 特異的T細胞を欠いているにもかかわらず、このように、 $A\beta_{37-42}$ に特異的な抗体の生成に対する実質的なT細胞のサポートが存在する。このことは、効果的であるが安全な免疫応答の生成に必須である。

【0185】

実施例7

新たな抗原性構築物 破傷風トキシノイド:LPA-KK: $(^{37}\text{GGVVIA}^{42})_2$ の設計

上記のように、構築物KLH:LPA-KK: $(^{37}\text{GGVVIA}^{42})_2$ は、Th2型の強力な特異的な免疫応答を与えた一方で、p30ex:LPA-KK: $(^{37}\text{GGVVIA}^{42})_2$ は、現行の免疫療法では、有意な応答を生成することができなかった。このことは、p30exがT細胞エピトープとして不十分であることを示している。したがって、新しい回の合成では、本発明者らは、p30exを、ヒトでの使用にまた適切である十分なT細胞エピトープで置換することに焦点を当てた。最初の実験は、完全長破傷風トキシノイド(TT)が、ヒトでの使用に対して安全で強力なT細胞エピトープであり得ることを示している。

【0186】

以下の構築物を合成した：

TT:LPA-KK: $(^{37}\text{GGVVIA}^{42})_2$ 、並びにバックアップとして

TT:LPA-KK: $(^{36}\text{VGGVVIA}^{42})_2$ 及び

TT:LPA-KK: $(^{38}\text{GVVIA}^{42})_2$

【0187】

異なるアジュバント(例えばフロイント、Alヒドロゲル)中のTT:LPA-KK: $(^{37}\text{GGVVIA}^{42})_2$ の免疫原性を確認する。マウス群を以下で免疫する：

0.1% Alヒドロゲル破傷風TT:LPA- $(^{37}\text{GGVVIA}^{42})$

フロイントアジュバントTT:LPA-KK: $(^{37}\text{GGVVIA}^{42})$ 。

【0188】

TT:LPA-KK: $(^{37}\text{GGVVIA}^{42})$ により惹起された免疫応答を、以下のペプチドに対する結合についてELISAにより分析する：

$A\beta_{1-40}$

$A\beta_{1-42}$

$A\beta_{1-33}$

$A\beta_{33-42}$

$A\beta_{33-44}$

【0189】

免疫グロブリン産生の比 IgG2a(Th1インジケーター)対IgG1(Th2インジケーター)

TT:LPA-KK: $(^{37}\text{GGVVIA}^{42})$ でマウスを免疫後、2つの方法を使用して、Tヘルパー細胞応答の方向を決定する：

TT又は $A\beta$ で刺激後に、 $\text{INF}\gamma$ 産生Tヘルパー細胞(Th1)及びIL-4産生Tヘルパー細胞(Th2)を測定することにより、ELISpotアッセイを実施する。

IgG₁抗体及びIgG_{2a}抗体と $^{37}\text{GGVVIA}^{42}$ との比を測定することにより、免疫後の免疫応答

の方向の指標が得られる。この比がIgG₁のものであれば、Tヘルパー細胞応答はTH2型である。

【0190】

実施例 8

ADに対するアミロイドβの防御効力

本実施例は、以下のコンジュゲート：

KLH:LPA-KK:(³⁷GGVVIA⁴²)₂

TT:LPA-KK:(³⁷GGVVIA⁴²)₂

の、アルツハイマー病様神経病理を発現するような素因になる717位での変異を有するAPPを過剰発現するトランスジェニックマウス(Gamesら、Natureに記載のようなPDAPPマウス)への投与を記載する。15ヶ月齢までに、これらマウスは、アルツハイマー病で見られるレベルと等しいレベルのアミロイドβ沈着を示す。 10

【0191】

1. マウスの供給源

60匹のPDAPP異種遺伝子型雌性マウスを無作為に以下の群に分ける：2つの異なるアジュバント中の各々のコンジュゲート構築物を注射される10匹のマウス、PBS/アジュバント又はPBSを注射される5匹のマウス、及び注射されない10匹のコントロール。

【0192】

2. 免疫原の調製及び注射

400μlのコンジュゲート(1mg/ml)を50μlの0.2%Alヒドロゲルと混合することにより、免疫用の抗原を調製する。2分後、追加の50μlの0.2%Alヒドロゲルを加え、3分後に100μlを、4分後に150μlを加える。ワクチンの最終の組成は、0.5mg/mlペプチド及び1mg/ml Alヒドロゲルである。 20

【0193】

400μl(1mg/ml)の各コンジュゲートを400μlのフロイント不完全アジュバントと混合することにより、フロイント不完全アジュバント中の抗原を調製する。

【0194】

各注射には、50μlの上記ワクチンの1つを0日目に筋肉内に与え、続いて2週間目及び4週間目に、Alヒドロゲル又は不完全フロイントアジュバント(IFA)のいずれかで同量の免疫原のブーストを与える。それぞれのアジュバントでの5つの追加の投薬を、1ヶ月間隔で与える。PBS注射を同じスケジュールで行い、マウス1匹当たり50μlのPBS/アジュバントの1:1混合物、又はマウス1匹当たり50μlのPBSをマウスに注射する。 30

【0195】

3. マウス血液の滴定、組織調製及び免疫組織化学

免疫したマウスから採血し、アミロイドβ1-42のC末端部分に特異的なマウスの力価を、前記実施例に記載のようにELISAを使用して1カ月おきにモニターする。マウスを13ヶ月目に屠殺し、組織学的検査及び免疫組織化学的検査に付して動物におけるアルツハイマー様病理の進行を比較する。組織学的検査及び免疫組織化学的検査は、材料及び方法の一般的記載に従って行う。

【0196】

検査には、脳、特に海馬並びに前頭皮質及び帯状皮質におけるアミロイド沈着物のパターン及び量の記述を含む。これは、アミロイドβ特異抗体、例えばモノクローナル抗体(mAb)3D6を使用して行う。トランスジェニックマウスにおける神経炎斑の沈着は、典型的には、ヒトAPP抗体8E5で可視化される。 40

【0197】

星状細胞増加(これは斑に関係する炎症に特徴的である)のレベルを、標準的な免疫組織化学的方法論を使用して、GFAP陽性星状細胞の数を定量することにより測定する。GFAP陽性星状細胞は、アミロイドβ沈着物との共存を検出するために、更にチオフラビンSで対照染色してもよい。

【0198】

また、マウス脳の切片を、細胞表面タンパク質であるMAC-1に特異的なモノクローナル抗体と反応させる。MAC-1(CD11b)はインテグリンファミリーのメンバーであり、CD18とのヘテロダイマーとして存在する。CD11b/CD18複合体は単球、マクロファージ、好中球及びナチュラルキラー細胞上に存在する(Mak and Simard)。脳中の常在するMAC-1反応性細胞型は、MAC-1免疫反応切片中での同様な表現型形態に基づいて、小神経膠細胞である可能性が高い。斑に関係するMAC-1標識は、アミロイド β 誘導炎症応答の欠如に起因して、PBSコントロール群と比較して、有効なワクチンで治療したマウスの脳でより低い。

【0199】

上記分析は、活性な免疫原の1つを与えられたマウスの脳では、アミロイドが沈着しないか又はアミロイドの沈着が非常に少ないことを示す。また、付随する病理学的結果、例えばグリオシス及び神経炎病理も、有意に低減しているか又は見られない。ワクチン接種したマウスは、コントロールの非ランスジェニックマウスと本質的に同様に、病理を欠いていることを示す。

10

【0200】

実施例9

受動ワクチン接種ストラテジー

免疫原性キャリアタンパク質(例えば、KLH、破傷風トキソイド又はその他)及びA β 1-42のC末端部分(33~42)を含んでなるペプチドと接合したLPA複合体でマウスを免疫する。ここで、C末端部分は、A β 1-42の33~37で始まりアミノ酸位置42で終わる一続きのアミノ酸として規定され、好ましくはA β 37-42である。

20

【0201】

数回の免疫後、免疫したマウスから脾臓細胞を単離する。脾臓B細胞を適切な不死化B細胞融合細胞株と融合し、B細胞ハイブリドーマを作製する。作製したB細胞ハイブリドーマをマイクロタイタープレート中でプールしたクローンとして培養し、A β 1-42のC末端部分の選択性についてスクリーニングする。選択性のプールのB細胞ハイブリドーマを、単一細胞クローニングし、続いてA β 1-42のC末端部分の選択性について分析する。

【0202】

A β 1-42のC末端部分について選択性であるB細胞ハイブリドーマクロンの選択性プロフィールを、ELISA及び免疫組織学を使用して、1-40、1-42、1-33、33-42、37-42及び、33-44、A β 原線維、A β 斑及びアミロイド前駆体タンパク質に対してインビトロで分析する。

30

【0203】

モノクローナル抗体を異なる系統のマウスで試験する：全身及びCNSでの炎症増強性サイトカインの変化を測定し、CNSの組織学的変化を測定する。

【0204】

A β 1-42のC末端部分に特異的な抗体の効力プロフィールを、インビトロでアミロイド斑の溶解を測定することにより、そしてアルツハイマー病のマウストラランスジェニック疾患モデルにおいてインビボで認知改善及びCNS中のアミロイド量の低下を測定することにより評価する。

【0205】

最適な効能を有する抗体は、臨床試験用に、ヒト化される(野生型マウス由来のB細胞ハイブリドーマの分子操作によるか又は「ヒト様」免疫系を有するトランスジェニックマウスモデルを使用して新しいハイブリドーマを構築するかのいずれかによる)。

40

【0206】

実施例10

非ヒト抗体及びマウスヒト化抗体の産生

抗体、例えばヒト化マウス、マウス、モルモット、霊長類、ウサギ又はラット抗体の産生は、例えば、動物をコンジュゲート 破傷風トキソイド:LPA-KK:(³⁷GGVVIA⁴²)₂で免疫することにより達成することができる。アミロイド β のカルボキシル末端を含んでなるより大きなコンジュゲート又はアミロイド β (1-40)又は(1-43)のカルボキシル末端を含んでな

50

る免疫原性フラグメントもまた使用することができる。前記の実施例に記載のようにコンジュゲートを合成することができる。随意に、免疫原はアジュバントと共に投与することができる。幾つかの型のアジュバントは、下記のように使用することができる。完全フロイントアジュバントに続く不完全アジュバントが、実験室動物の免疫に好ましい。ウサギ又はモルモットは、典型的には、ポリクローナル非ヒト抗体の作成に使用される。マウスは、典型的には、モノクローナル非ヒト抗体の作成に使用される。ヒト化マウスは、典型的には、ヒト化モノクローナル抗体の作成に使用される。抗体は、抗原性コンジュゲート中に使用されるような該当するアミロイドβペプチド、例えばアミロイドβ(1-42)のカルボキシル末端への特異的結合についてスクリーニングされる。随意に、抗体は、更に、アミロイドβの他の領域又は他の一般的なタンパク質への非結合についてスクリーニングされる。スクリーニングは、例えばウェスタンブロット又はELISAにより、達成することができる。或いは、エピトープ特異性は、試験抗体及び参照抗体がアミロイドβのカルボキシル末端への結合について競合する競合アッセイにより決定することができる。試験抗体及び参照抗体が競合する場合、これらは、同じエピトープ、又は一方の抗体の結合が他方の抗体の結合に干渉するに十分に近位の複数のエピトープに結合する。このような抗体に好ましいアイソタイプはマウスアイソタイプIgG2a又は他の種における等価のアイソタイプである。マウスアイソタイプIgG2aはヒトアイソタイプIgG1の等価物である。

10

【0207】

参考文献

Aslam, M and Dent A. Bioconjugation, Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, Macmillan Reference Ltd. (1998).

20

Bard, F.ら、Nature Med. (2000) 6, 916.

Birkelund Sら、Infect Immun. 62:2051-2057 (1994).

Cribbs DH、Int Immunol. 15:505-14 (2003).

Decision Resources (in the report 「Outlook for Neurodegenerative Disease Therapy Markets」)

30

Gong, Yら、Proc. Natl Acad. Sci. USA (2003), 100, 18, 10417-10422

Hockら、Neuron 38, 547 (2003)

Morganら、Nature (2000), 408: 982-985

Mucke, Lら、J. Neurosci. 20, 4050-4058 (2000)

Neuberger MS、Eur J Immunol. 11:1012-6 (1981).

40

Panina-Bordignon P、Eur J Immunol. 19:2237-42 (1989).

Schenk, D.ら、Nature 400 (1999), 173

Walsh, DMら、Nature (2002), 416, 535-539;

Weiner, HLら、Ann Neurol. 2000, 48, 567-579

【図面の簡単な説明】

【0208】

【図1】図1は、共通の骨格に付着したダイマーのC末端提示ペプチドフラグメントの作

50

製を説明する。1) $A\beta$ ペプチド配列を合成樹脂上で組み立てた。この鎖は、親水性増強用の2つのN末端リシンを更に含んでなる。多くの鎖のうち2つのみが示されている。2) 1/2当量のFmoc-イミノ二酢酸を、カップリング試薬としてTBTU、HOBt及びDIEAを用いて、このペプチド鎖のN末端にカップリングした。3) TBTUを使用して環化を実施した。4) 脱保護及び樹脂からの切断により、C末端で提示される生物学的に増強されたダイマーを生じる。5) (3)のN末端脱保護、続くmoc- β Ala-OHとスパーサーのイミノ基(NH基)とのカップリングにより、NH基でのT細胞エピトープの継続合成のためのペプチド樹脂が提供される。脱保護及び樹脂からの切断によりダイマーが生じる。

【図2】図2は増殖応答のヒストグラムを示す。マウスを、Alヒドロゲル、Alヒドロゲル中のp30ex、又はAlヒドロゲル中の破傷風トキソイドで免疫し、脾臓細胞を取得し、p30ex (青)又は破傷風トキソイド(赤)で刺激した。 10

【図3】図3は増殖応答のヒストグラムを示す。個体からの末梢血単核細胞(PBMC)を破傷風ワクチンで免疫し、PBMCを取得して、破傷風トキソイド、p30ex又は抗原なしで刺激した。

【図4】図4は、1:50の血清希釈率を使用し、抗原として $A\beta_{33-42}$ を用いたELISAを示す。マウスを、P30ex:LPA-KK:(^{33} GLMVGGVVIA ^{42}) $_2$ (IgG aa 33-42)、P30ex:LPA-KK:(^{35} MVGGVVIA ^{42}) $_2$ (IgG aa 35-42)、P30ex:LPA-KK:(^{36} VGGVVIA ^{42}) $_2$ (IgG aa 36-42)、P30ex:LPA-KK:(^{37} GGVVIA ^{42}) $_2$ (IgG aa 37-42)、P30ex:LPA-KK:(^{38} GVVIA ^{42}) $_2$ (IgG aa 38-42)及びAlヒドロゲル(IgG Alヒドロゲル)で免疫した。

【図5】図5は、抗原として $A\beta_{33-42}$ を用いたELISAを示す。マウスをKLH:LPA-KK:(^{37} GGVVIA ^{42}) $_2$ (IgG aa 37-42 KLH)で免疫した。 20

【図6】図6は、P30ex:LPA-KK:(^{33} GLMVGGVVIA ^{42}) $_2$ 群のIgG $_1$ /IgG $_{2a}$ サブクラスELISAである。

【図7】図7は、P30ex:LPA-KK:(^{35} MVGGVVIA ^{42}) $_2$ 群のIgG $_1$ /IgG $_{2a}$ サブクラスELISAである。

【図8】図8は、KLH:LPA-KK:(^{37} GGVVIA ^{42}) $_2$ 群のIgG $_1$ /IgG $_{2a}$ サブクラスELISAである。

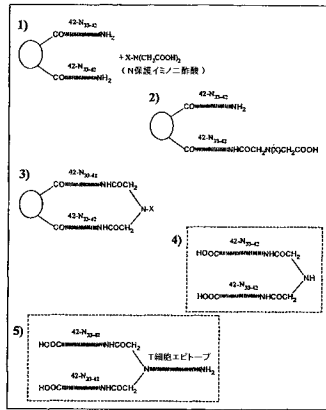
【図9】図9は、コーティング抗体として $A\beta_{33-42}$ 及び $A\beta_{33-44}$ を使用する、P30ex:LPA-KK:(^{33} GLMVGGVVIA ^{42}) $_2$ 抗原に対する免疫応答の選択性を決定するためのELISAを示す。

【図10】図10は、コーティング抗体として $A\beta_{33-42}$ 及び $A\beta_{33-44}$ を使用する、P30ex:LPA-KK:(^{35} MVGGVVIA ^{42}) $_2$ 抗原に対する免疫応答の選択性を決定するためのELISAを示す。 30

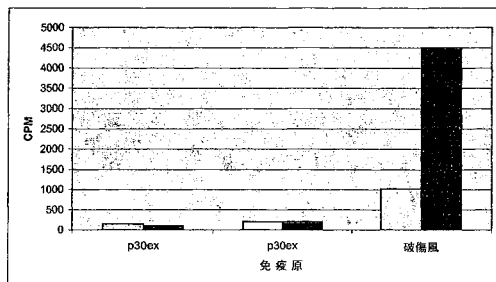
【図11】図11は、コーティング抗体として $A\beta_{33-42}$ 及び $A\beta_{33-44}$ を使用する、KLH:LPA-KK:(^{37} GGVVIA ^{42}) $_2$ 抗原に対する免疫応答の選択性を決定するためのELISAを示す。

【図12】図12は脾臓細胞の増殖を示す。KLH:LPA-KK:(^{37} GGVVIA ^{42}) $_2$ で免疫したマウスからの脾臓細胞を、KLH(青)及び $A\beta_{1-42}$ (赤)でインビトロで再刺激した。バックグラウンドの増殖を黄色で示す。

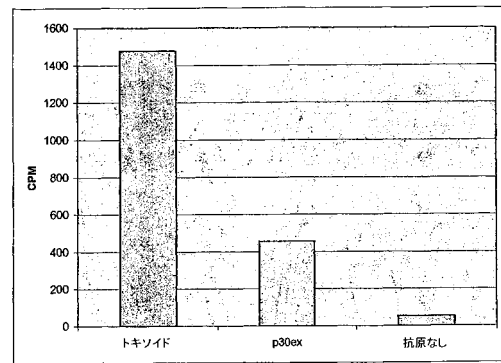
【図 1】



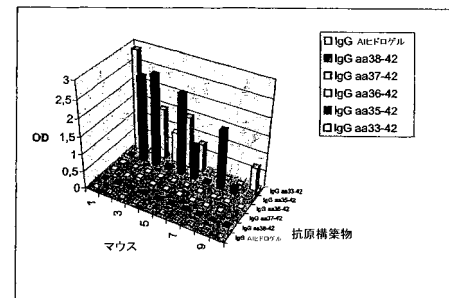
【図 2】



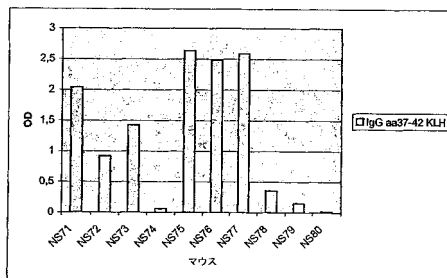
【図 3】



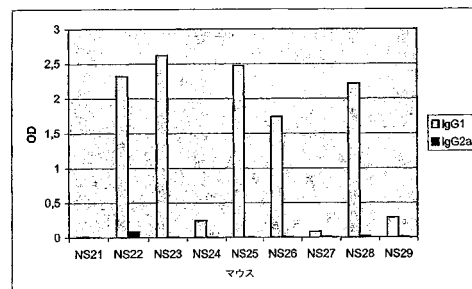
【図 4】



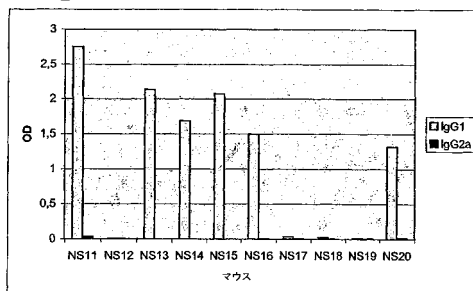
【図 5】



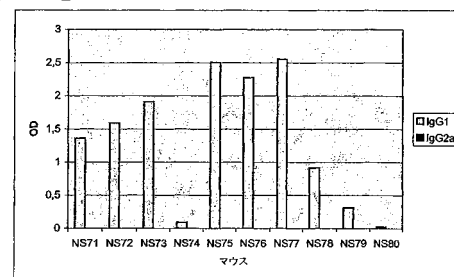
【図 7】



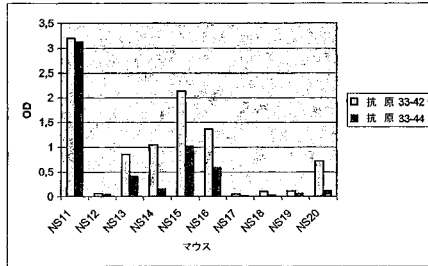
【図 6】



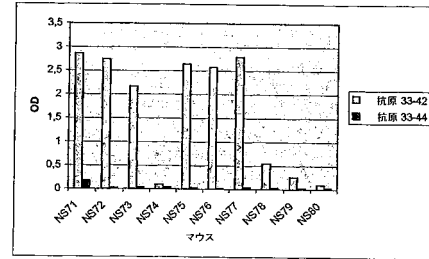
【図 8】



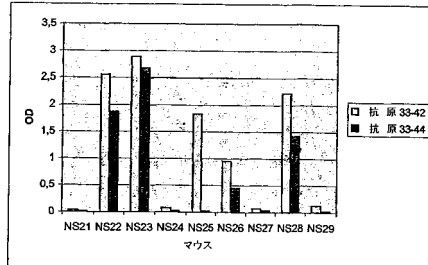
【図 9】



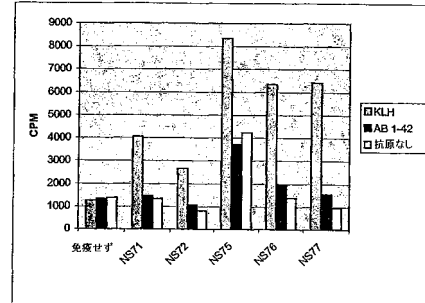
【図 11】



【図 10】



【図 12】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DK2005/000067

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K47/48

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)
A61K

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, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/074004 A (CHOU, SZU-YI) 12 September 2003 (2003-09-12) page 37, paragraphs 2,3; sequence 15 page 51, paragraph 3 - page 52, paragraph 1 page 53, paragraph 3; claims 167,168; figure 3; examples 15,22 -----	1-8, 26-34
Y	WO 02/096350 A (UNITED BIOMEDICAL, INC) 5 December 2002 (2002-12-05) page 2, paragraph 3 abstract page 16, paragraph 3; claim 41; example 3 -----	1-34
Y	WO 00/18791 A (STATENS SERUM INSTITUT; HOLM, ARNE; JOERGENSEN, RIKKE, MALENE; OESTERG) 6 April 2000 (2000-04-06) page 38; claims 7,23,24,28,38; example 12 ----- -/-	1-34

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ 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

23 September 2005

Date of mailing of the international search report

09.02.2006

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Gonzalez Ramon, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DK2005/000067

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MAY R. J. ET AL: "Antibodies to Keyhole limpet hemocyanin cross-react with an epitope of the polysaccharide capsule of <i>Cryptococcus neoformans</i> and other carbohydrates: implications for vaccine development" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 171, 2003, pages 4905-4912, XP008052843 abstract; figure 8 page 4911, column 1 -----	1-34
P,X	WO 2004/013172 A (INNOGENETICS N.V; DELACOURTE, ANDRE; SERGEANT, NICOLAS) 12 February 2004 (2004-02-12) page 8; claims 14,19 page 9, lines 16,17 page 20, lines 24-26 page 21, lines 14,15 -----	1-9, 24-34
E	WO 2005/058941 A (ELAN PHARMACEUTICALS, INC; WYETH; ARUMUGHAM, RASAPPA, G; PRASAD, A., K) 30 June 2005 (2005-06-30) page 13; claims 153,162,176,177,180,187,207-209,217,232,23 6,242; example 8; table 8; sequences 17,18 page 27, paragraph 2 page 39, paragraph 2 claims 377-379 -----	1-14,18, 24-34
P,Y	WO 2004/062556 A (MATTFNER, FRANK) 29 July 2004 (2004-07-29) page 6 page 9, paragraph 1; claims 1,4 -----	1-34
T	LEMERE C A ET AL: "P4-416 Novel formulations for an Alzheimer's disease vaccine" NEUROBIOLOGY OF AGING, TARRYTOWN, NY, US, vol. 25, July 2004 (2004-07), page S592, XP004626586 ISSN: 0197-4580 abstract -----	1-8, 24-34
T	BROWN M. E. ET AL: "Refining and Alzheimer's vaccine to avoid an inflammatory response" EXPERT OPIN BIOL THER, vol. 5, no. 6, 2005, pages 809-816, XP008052838 page 812 - page 813 -----	1-8, 24-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK2005/000067**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 27-31 as far as related to the first invention 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.
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 III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

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.:
1-34 in part

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/ DK2005/ 000067

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-34 in part

A conjugate having the structure as depicted by claim 1 and its use for the prevention or reduction of amyloid related diseases (Alzheimer, Down's syndrome, vascular dementia or cognitive impairment). Vaccine comprising said conjugate together with an adjuvant. Excluding the subject matter of inventions 2.

2. claims: 1-34 in part; 35-45 complete

An antibody having specificity towards a conjugate having the structure as depicted by claim 1 and its use for the prevention or reduction of amyloid related diseases (Alzheimer, Down's syndrome, vascular dementia or cognitive impairment). Method of preparation of said antibody. Excluding the subject matter of invention 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter... Application No

PCT/DK2005/000067

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03074004	A	12-09-2003	AU 2003213718 A1	16-09-2003
WO 02096350	A	05-12-2002	BR 0210010 A	25-10-2005
			CA 2448171 A1	05-12-2002
			CN 1568329 A	19-01-2005
			EP 1497313 A2	19-01-2005
			JP 2005506311 T	03-03-2005
			US 2004247612 A1	09-12-2004
			US 2003068325 A1	10-04-2003
			ZA 200308767 A	25-07-2005
WO 0018791	A	06-04-2000	AT 254137 T	15-11-2003
			AU 6078399 A	17-04-2000
			DE 69912827 D1	18-12-2003
			DE 69912827 T2	21-10-2004
			EP 1117677 A1	25-07-2001
WO 2004013172	A	12-02-2004	AU 2003250102 A1	23-02-2004
			CA 2487528 A1	12-02-2004
WO 2005058941	A	30-06-2005	NONE	
WO 2004062556	A	29-07-2004	AT 14642003 A	15-11-2005
			AU 2004204349 A1	29-07-2004
			CA 2513218 A1	29-07-2004
			EP 1583774 A2	12-10-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/33	
C O 7 K 16/44 (2006.01)	C O 7 K 14/47	
C O 7 K 14/765 (2006.01)	C O 7 K 16/44	
C O 7 K 14/795 (2006.01)	C O 7 K 14/765	
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 14/795	
	C O 7 K 19/00	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 バーケルンド アンデルセン, スヴェンド
デンマーク、ディーケー—8 2 4 0 リッスコヴ、シンダルスヴェイ 1 7

(72)発明者 ホルム、アーネ、ヴァルデマー
デンマーク、ディーケー—2 9 4 2 スコッツボルグ、スコッツボルグパーケン 2 0

Fターム(参考) 4C085 AA03 AA13 AA14 BB07 CC32 DD86 DD88 EE06 FF03 FF20
GG01
4H045 AA10 AA30 BA10 BA40 CA11 CA40 DA76 DA83 EA20 EA50
FA20