

(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2016-526044
(P2016-526044A)

(43) 公表日 平成28年9月1日(2016.9.1)

(51) Int.Cl.	F 1			テーマコード (参考)
C07K 14/00 (2006.01)	C07K 14/00	Z N A		4 B 0 6 4
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	A		4 B 0 6 5
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10			4 C 0 8 4
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00			4 H 0 4 5
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 16/00			

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-516776 (P2016-516776)	(71) 出願人	514131179 ニューロファージ ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成26年5月28日 (2014.5.28)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月26日 (2015.11.26)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/039760	(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(87) 國際公開番号	W02014/193935	(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(87) 國際公開日	平成26年12月4日 (2014.12.4)		
(31) 優先権主張番号	61/828,004		
(32) 優先日	平成25年5月28日 (2013.5.28)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	61/828,497		
(32) 優先日	平成25年5月29日 (2013.5.29)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】低減された免疫原性を有する修飾されたバクテリオファージG3Pアミノ酸配列を含むポリペプチド

(57) 【要約】

本発明は、アミロイドに結合する、及び/またはアミロイドを脱凝集させるのに十分な纖維状バクテリオファージ遺伝子3タンパク質(g3p)の一部分、例えば、g3pのN1～N2部分ならびにその突然変異体及び断片を含むポリペプチドであって、そのg3pアミノ酸配列が、インビボで使用されるときに、対応する野生型g3pアミノ酸配列よりも実質的に免疫原性が低くなるようにアミノ酸置換を通じて修飾されている、ポリペプチドに関する。本発明のポリペプチドは、アミロイドに結合する、及び/またはアミロイドを脱凝集させるそれらの能力を保持する。本発明はさらに、アミロイドの誤った折り畳みまたは凝集に関連付けられる疾患の治療及び/または予防における、これらの変異型g3p-ポリペプチドの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

開始アミノ酸配列の変異型を含むポリペプチドであって、前記開始アミノ酸配列は、以下の修飾：アミノ酸 43～45におけるAAAによるVVVの置換、置換C53W、アミノ酸96～103の欠失、アミノ酸212～214におけるAGAによるQPPの置換、置換W181A、F190A、及びF194A、アミノ酸1の欠失、ならびにアミノ酸1及び2の欠失、のうちの1つ以上を有する、配列番号1のアミノ酸1～217、配列番号3のアミノ酸1～217、配列番号7のアミノ酸1～217、及び前述のもののいずれかの突然変異体から選択され、

(a) 前記ポリペプチドは、アミロイドに結合する、及び/またはアミロイドを脱凝集させ、

(b) 前記ポリペプチドは、前記開始アミノ酸配列を含む対応するポリペプチドと比較して低減された免疫原性を有し、

(c) 前記変異型は、前記開始アミノ酸配列と比較して1～9つのアミノ酸置換を有し、各アミノ酸置換は、下記のアミノ酸置換の群から選択され、

【表 15-1】

アミノ酸番号	前記開始アミノ酸配列中に存在するアミノ酸	アミノ酸置換
48	G	H、K、R、P、S、T、D、P
50	E	G、H、K、P、R
51	T	G、H、K、R、P、Q、N、W
53	C	F、H、K、N、Q、R、W、Y
54	Y	G、H、K、R、P
56	T	G、H、K、R、P
135	M	A、D、G、K、N、T、H、R、C、E、P、Q、S
137	Q	D、E
138	N	D、E、G、H、P、Q、S、T
140	R	D、E、H、Q、A、G、M、N、P、S、Y
141	F	D、E
143	N	A、G
173	S	G、P、K、D、H、R、T
174	K	R
175	A	G、H、K、P、R
176	M	G、H、K、N、R、P、Q、W
178	D	G、N、Q、S、T、F、H、

10

20

30

40

【表15-2】

		K、R、W、Y
179	A	H、K、P、R
181	W	G、H、K、R、P

(d) 前記開始アミノ酸配列が配列番号1のアミノ酸1～217であるとき、前記1～9つのアミノ酸置換のいずれかは、下記のアミノ酸置換の群から任意にさらに選択される、前記ポリペプチド。

【表16】

10

アミノ酸番号	前記開始アミノ酸配列中に存在するアミノ酸	アミノ酸置換
215	V	S、T、C、D、E、F、H、K、N、P、Q、R
218	G	C、E、N、P、Q、S、T、A、H、W
220	G	E、D、F、W、M、Y
221	S	D、E、G
223	G	D、P、E、K、N、R、T

20

【請求項2】

前記開始アミノ酸配列内の1～9つのアミノ酸置換の各々は、下記のアミノ酸置換の群から選択される、請求項1に記載の前記ポリペプチド。

【表17】

30

アミノ酸番号	前記開始アミノ酸配列中に存在するアミノ酸	アミノ酸置換
48	G	H、K、R、S、T
51	T	G、H、K、R、P、Q、N
54	Y	G、H、K、R、P
56	T	G、H、K、R、P
135	M	A、D、G、K、N、T、H、R
140	R	D、E、H、Q、A、G
141	F	D、E
143	N	A、G
173	S	G、P、K
174	K	R
176	M	G、H、K、N、R
178	D	G、N、Q、S、T
181	W	G、H、K、R

40

【請求項3】

前記開始アミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸1～217、配列番号3のアミノ酸1～217、及び配列番号7のアミノ酸1～217から選択される、請求項1または請求項2に記載の前記ポリペプチド。

【請求項4】

50

前記変異型アミノ酸配列は、前記開始アミノ酸配列に対して2～9つのアミノ酸置換を有し、少なくとも1つの置換が、配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸48～56を含むエピトープ1、配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸135～143を含むエピトープ2、及び配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸173～181を含むエピトープ3、のうちの少なくとも2つの中に存在する、請求項1～3のいずれか一項に記載の前記ポリペプチド。

【請求項5】

前記修飾されたアミノ酸配列は、2つのアミノ酸置換のみを有し、前記置換は、下記の2つのアミノ酸置換の群から選択される、請求項4に記載の前記ポリペプチド。

【表18】

10

Y 5 4 K及びM 1 3 5 K	Y 5 4 K及びM 1 3 5 T	Y 5 4 K及びR 1 4 0 Q	Y 5 4 R及びM 1 3 5 K
Y 5 4 R及びM 1 3 5 T	Y 5 4 R及びR 1 4 0 Q	T 5 6 H及びM 1 3 5 K	T 5 6 H及びM 1 3 5 T
T 5 6 H及びR 1 4 0 Q	T 5 6 K及びM 1 3 5 K	T 5 6 K及びM 1 3 5 T	T 5 6 K及びR 1 4 0 Q
Y 5 4 K及びD 1 7 8 N	Y 5 4 K及びW 1 8 1 H	Y 5 4 K及びW 1 8 1 R	Y 5 4 K及びK 1 7 4 R
Y 5 4 R及びD 1 7 8 N	Y 5 4 R及びW 1 8 1 H	Y 5 4 R及びW 1 8 1 R	Y 5 4 R及びK 1 7 4 R
T 5 6 H及びD 1 7 8 N	T 5 6 H及びW 1 8 1 H	T 5 6 H及びW 1 8 1 R	T 5 6 H及びK 1 7 4 R
T 5 6 K及びD 1 7 8 N	T 5 6 K及びW 1 8 1 H	T 5 6 K及びW 1 8 1 R	T 5 6 K及びK 1 7 4 R
M 1 3 5 K及びD 1 7 8 N	M 1 3 5 K及びW 1 8 1 H	M 1 3 5 K及びW 1 8 1 R	M 1 3 5 K及びK 1 7 4 R
M 1 3 5 T及びD 1 7 8 N	M 1 3 5 T及びW 1 8 1 H	M 1 3 5 T及びW 1 8 1 R	M 1 3 5 T及びK 1 7 4 R
R 1 4 0 Q及びD 1 7 8 N	R 1 4 0 Q及びW 1 8 1 H	R 1 4 0 Q及びW 1 8 1 R	R 1 4 0 Q及びK 1 7 4 R

20

30

【請求項6】

前記変異型アミノ酸配列は、前記開始アミノ酸配列に対して3～9つのアミノ酸置換を有し、少なくとも1つの置換が、配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸48～56を含むエピトープ1、配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸135～143を含むエピトープ2、及び配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸173～181を含むエピトープ3の各々の中にある、請求項1～3のいずれか一項に記載の前記ポリペプチド。

40

【請求項7】

前記変異型アミノ酸配列は、前記開始アミノ酸配列と比較して3つのアミノ酸置換のみを有し、前記置換は、以下の組のアミノ酸置換：T 5 6 H、M 1 3 5 K、及びD 1 7 8 N、T 5 6 K、M 1 3 5 K、及びD 1 7 8 N、T 5 6 K、M 1 3 5 T、及びD 1 7 8 N、T 5 6 H、M 1 3 5 K、及びW 1 8 1 R、T 5 6 H、M 1 3 5 T、及びW 1 8 1 R、Y 5 4 K、M 1 3 5 T、及びK 1 7 4 R、Y 5 4 R、M 1 3 5 K、及びK 1 7 4 R、Y 5 4 R、M 1 3 5 T、及びK 1 7 4 R、T 5 6 H、M 1 3 5 K、及びK 1 7 4 R、ならびにT 5 6 H、M 1 3 5 T、及びK 1 7 4 R、のいずれかから選択される、請求項5に記載の前記ポリペプチド。

【請求項8】

50

ペプチドリンカーを介してか、または直接的にかのいずれかで前記変異型アミノ酸配列のC末端に融合されるヒトまたはヒト化免疫グロブリンFcポリペプチド配列から本質的に成る、請求項1～7のいずれか一項に記載の前記ポリペプチド

【請求項9】

前記免疫グロブリンFcポリペプチド配列は、ヒトIgGのFc部分である、請求項8に記載の前記ポリペプチド。

【請求項10】

前記ペプチドリンカー及びヒトIgGのFc部分の前記アミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸218～488、配列番号3のアミノ酸218～486、及び配列番号7のアミノ酸218～488から選択される、請求項9に記載の前記ポリペプチド。

10

【請求項11】

修飾された開始配列から成るポリペプチド変異型であって、前記開始配列は、配列番号3または配列番号7から選択され、前記修飾は、2つまたは3つのアミノ酸置換であり、前記ポリペプチドは、下記のポリペプチドのうちのいずれか1つから選択される、前記ポリペプチド変異型。

【表19-1】

ポリペプチド番号	開始配列	エピトープ1置換	エピトープ2置換	エピトープ3置換
63	配列番号3	Y54K	M135K	無し
64	配列番号3	Y54K	M135T	無し
65	配列番号3	Y54K	R140Q	無し
66	配列番号3	Y54R	M135K	無し
67	配列番号3	Y54R	M135T	無し
68	配列番号3	Y54R	R140Q	無し
69	配列番号3	T56H	M135K	無し
70	配列番号3	T56H	M135T	無し
71	配列番号3	T56H	R140Q	無し
72	配列番号3	T56K	M135K	無し
73	配列番号3	T56K	M135T	無し

20

30

【表 19 - 2】

ポリペプチ ド番号	開始配列	エピトープ1置 換	エピトープ2置 換	エピトープ3置 換
7 4	配列番号3	T 5 6 K	R 1 4 0 Q	無し
7 5	配列番号3	Y 5 4 K	無し	D 1 7 8 N
7 6	配列番号3	Y 5 4 K	無し	W 1 8 1 H
7 7	配列番号3	Y 5 4 K	無し	W 1 8 1 R
7 8	配列番号3	Y 5 4 K	無し	K 1 7 4 R
7 9	配列番号3	Y 5 4 R	無し	D 1 7 8 N
8 0	配列番号3	Y 5 4 R	無し	W 1 8 1 H
8 1	配列番号3	Y 5 4 R	無し	W 1 8 1 R
8 2	配列番号3	Y 5 4 R	無し	K 1 7 4 R
8 3	配列番号3	T 5 6 H	D 1 7 8 N	
8 4	配列番号3	T 5 6 H	無し	W 1 8 1 H
8 5	配列番号3	T 5 6 H	無し	W 1 8 1 R
8 6	配列番号3	T 5 6 H	無し	K 1 7 4 R
8 7	配列番号3	T 5 6 K	無し	D 1 7 8 N
8 8	配列番号3	T 5 6 K	無し	W 1 8 1 H
8 9	配列番号3	T 5 6 K	無し	W 1 8 1 R
9 0	配列番号3	T 5 6 K	無し	K 1 7 4 R
9 1	配列番号3	無し	M 1 3 5 K	D 1 7 8 N
9 2	配列番号3	無し	M 1 3 5 K	W 1 8 1 H
9 3	配列番号3	無し	M 1 3 5 K	W 1 8 1 R
9 4	配列番号3	無し	M 1 3 5 K	K 1 7 4 R
9 5	配列番号3	無し	M 1 3 5 T	D 1 7 8 N
9 6	配列番号3	無し	M 1 3 5 T	W 1 8 1 H
9 7	配列番号3	無し	M 1 3 5 T	W 1 8 1 R
9 8	配列番号3	無し	M 1 3 5 T	K 1 7 4 R
9 9	配列番号3	無し	R 1 4 0 Q	D 1 7 8 N
1 0 0	配列番号3	無し	R 1 4 0 Q	W 1 8 1 H
1 0 1	配列番号3	無し	R 1 4 0 Q	W 1 8 1 R
1 0 2	配列番号3	無し	R 1 4 0 Q	K 1 7 4 R
1 1 0	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	D 1 7 8 N
1 1 1	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	W 1 8 1 H
1 1 2	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	W 1 8 1 R
1 1 3	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	K 1 7 4 R
1 1 4	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	D 1 7 8 N
1 1 5	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	W 1 8 1 H
1 1 6	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	W 1 8 1 R
1 1 7	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	K 1 7 4 R
1 1 8	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 K	D 1 7 8 N
1 1 9	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 K	W 1 8 1 H
1 2 0	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 K	W 1 8 1 R

10

20

30

40

【表19-3】

ポリペプチド番号	開始配列	エピトープ1置換	エピトープ2置換	エピトープ3置換
121	配列番号7	T56K	M135K	K174R
122	配列番号7	T56K	M135T	D178N
123	配列番号7	T56K	M135T	W181H
124	配列番号7	T56K	M135T	W181R
125	配列番号7	T56K	M135T	K174R
126	配列番号7	Y54K	M135K	K174R
127	配列番号7	Y54K	M135T	K174R
128	配列番号7	Y54R	M135K	K174R
129	配列番号7	Y54R	M135T	K174R
130	配列番号7	T56H	無し	D178N
131	配列番号7	T56H	無し	W181H
132	配列番号7	T56H	無し	W181R
133	配列番号7	T56H	無し	K174R
134	配列番号7	T56K	無し	D178N
135	配列番号7	T56K	無し	W181H
136	配列番号7	T56K	無し	W181R
137	配列番号7	T56K	無し	K174R

【請求項12】

ポリペプチド番号110、112、113、116、117、118、122、127、128、または129のうちのいずれか1つから選択される、請求項11に記載の前記ポリペプチド。

【請求項13】

請求項1～12のいずれか一項に記載の前記ポリペプチドと薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項14】

前記組成物は、患者の血流中への注射または注入のために製剤化される、請求項13に記載の前記薬学的組成物。

【請求項15】

前記組成物は、脳またはCNSへの直接投与のために製剤化される、請求項13に記載の前記薬学的組成物。

【請求項16】

アミロイドまたはタウタンパク質凝集体の低減を必要とする患者において、アミロイドまたはタウタンパク質凝集体を低減させる方法であって、前記患者に、有効量の請求項1～12のいずれか一項に記載の前記ポリペプチドまたは請求項13～15のいずれか一項に記載の前記薬学的組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項17】

前記患者は、アミロイドまたはタウタンパク質凝集体の存在に関連付けられる神経変性疾患の症状を示す、請求項16に記載の前記方法。

【請求項18】

前記患者は、バイオマーカーフロルベタビルが陽電子放出断層撮影において造影剤として使用されるときに、そのバイオマーカーに関して陽性である、請求項16または請求項17に記載の前記方法。

【請求項19】

前記患者は、アルツハイマー病（早発性アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、

10

20

30

40

50

及び発症前アルツハイマー病を含む)、パーキンソン病、S A A アミロイド症、シスタチンC、遺伝性アイスランド病、老衰、多発性骨髓腫、プリオン病(クールー、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病(GSS)、致死性家族性不眠症(FFI)、スクラピー、及び牛海綿状脳症(BSE)を含むがそれらに限定されない)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、脊髄小脳失調(SCA1、SCA3、SCA6、またはSCA7)、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(dentatorubral-pallidoluysian atrophy)、球脊髓性筋萎縮症、遺伝性脳アミロイド血管症、家族性アミロイド症、イギリス型/デンマーク型認知症、家族性脳症、筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン病・認知症複合病、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、ボクサー認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病、ダウン症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハラー・ホルデン・スパツツ病、筋強直性ジストロフィー、ニーマン・ピック病C型、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患(Non-Guamanian motor neuron disease with neurofibrillary tangles)、ピック病、脳炎後パーキンソン病、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性汎脳炎、神経原線維型認知症、前頭側頭葉変性症(FTLD)、及び前頭側頭葉型認知症(FTD)(以下の臨床症候群のうちの1つ以上を有する患者を含む:行動障害型FTD(bvFTD)、進行性非能弁的失語症(PNFA)、17番染色体に関連付けられるパーキンソン病を伴う前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺(Progressive Supranuclear Palsy)(PSP)、及び意味性認知症(SD))から選択される神経変性疾患に罹患する、請求項16~18のいずれか一項に記載の前記方法。10

【請求項20】

前記神経変性疾患は、パーキンソン病、アルツハイマー病、またはハンチントン病である、請求項19に記載の前記方法。20

【請求項21】

前記神経変性疾患は、アルツハイマー病である、請求項20に記載の前記方法。

【請求項22】

前記患者は、クロイツフェルト・ヤコブ病、クールー、致死性家族性不眠症、またはゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群から選択されるプリオン媒介疾患に罹患する、請求項19に記載の前記方法。30

【請求項23】

請求項1~12に記載の前記ポリペプチドのうちのいずれか1つをコードする核酸配列。40

【請求項24】

前記ポリペプチドコード配列にかつインフレームで融合された哺乳類シグナル配列をさらにコードする、請求項23に記載の前記核酸配列。

【請求項25】

請求項23または24に記載の核酸配列を含むベクターであって、前記核酸配列は、前記ベクター内の発現制御配列に作動可能に連結される、前記ベクター。40

【請求項26】

請求項25に記載の前記ベクターを含有する、宿主細胞。

【請求項27】

請求項1~12のいずれか一項に記載のポリペプチドを作製する方法であって、請求項23または24に記載の前記核酸配列によってコードされるタンパク質を発現させるステップと、前記発現されたポリペプチドを単離するステップと、を含む、前記方法。

【請求項28】

請求項1~12のいずれか一項に記載のポリペプチドを作製する方法であって、前記ポリペプチドの発現を可能にするのに十分な条件下で、請求項26に記載の前記宿主細胞を培養するステップと、前記発現されたポリペプチドを単離するステップと、を含む、前記50

方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アミロイドに結合する、及び／またはアミロイドを脱凝集させるのに十分な纖維状バクテリオファージ遺伝子3タンパク質(g3p)の一部分、例えば、g3pのN1～N2部分ならびにその突然変異体及び断片を含むポリペプチドであって、そのg3pアミノ酸配列が、インビボで使用されるときに、対応する野生型g3pアミノ酸配列よりも実質的に免疫原性が低くなるようにアミノ酸置換を通じて修飾されている、ポリペプチドに関する。本発明のポリペプチドは、アミロイドに結合する、及び／またはアミロイドを脱凝集させるそれらの能力を保持する。本発明はさらに、アミロイドの誤った折り畳みまたは凝集に関連付けられる疾患の治療及び／または予防における、これらのg3p修飾されたポリペプチドの使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

纖維状バクテリオファージg3pタンパク質、及び具体的には、g3pのN1～N2領域を含むそのポリペプチド部分は、-アミロイド、タウタンパク質、及びブリオンタンパク質などの種々のアミロイドに結合し、それらを脱凝集させることが実証されている。その各々の開示が参考により本明細書に援用される、同時係属PCT出願PCT/US第2012/066793号、ならびに米国仮出願US第61/801,349号、及びUS第61/801,849号を参考されたい。同様に、R.Krishnan et al., J.Mol.Biol.(2014)も参考されたい。その有効性にもかかわらず、g3pまたはそのN1～N2領域を含むポリペプチドのヒトへの全身投与は、有害な免疫応答を引き起こし得ることが予想される。しかしながら、これらの教示のうちもいずれも、g3pの免疫原性特性をもたらす特定のT細胞エピトープを同定しておらず、また、本明細書に提供される特定の修飾がこれらの免疫原性特性を低減させるかまたは排除することを示唆していない。

20

【0003】

多くの組換えの、さもなくば非天然の治療用タンパク質またはポリペプチドの有効性は、該治療用タンパク質またはポリペプチドに対する患者の不必要的免疫反応によって制限されることがある。タンパク質による免疫応答の誘発の主要因は、タンパク質内のT細胞エピトープの存在、即ち、主組織適合複合体(MHC)II型分子上の提示を介してT細胞の活性を刺激することができるアミノ酸配列である。T細胞エピトープは一般的に、MHC II型分子に結合する能力を有する任意のアミノ酸残基配列として定義される。MHC分子に結合すると、T細胞エピトープは、T細胞受容体(TCR)によって認識されることができ、T細胞受容体に関与してT細胞応答を促進することによってT細胞の活性化を引き起こすことができる。しかしながら、概して、MHC II型分子に結合する特定のT細胞エピトープは、これらのペプチドが、タンパク質が投与される有機体内で「自己」として認識されるため、T細胞応答を刺激しないことが理解されている。

30

【0004】

いくつかのT細胞エピトープは、細胞内での治療用タンパク質またはポリペプチドの分解中にペプチドとして放出され、次にMHCの分子によって提示されて、T細胞の活性化を引き起こすことができる。MHC II型分子によって提示されるペプチドに関して、T細胞のかかる活性化は次に、例えば、B細胞の直接刺激によって抗体応答を生じさせて、かかる抗体を産生することができる。

40

【0005】

MHC II型分子は、ヘルパーT細胞の選択及び活性化において重要な役割を果たす、高度に多型のタンパク質の群である。ヒト白血球抗原群DR(HLA-DR)は、このタンパク質群の顕著なアイソタイプである。しかしながら、アイソタイプHLA-DQ及びHLA-DPは、類似の機能を果たす。ヒトにおいて、約70のDRアイソタイプの異

50

なるアロタイプが知られており、D Q に関しては 3 0 の異なるアロタイプが、また D P に関しては 4 7 の異なるアロタイプが知られている。各個体は、2 ~ 4 つの D R 対立遺伝子、2 つの D Q 及び 2 つの D P 対立遺伝子を担持する。

個体におけるタンパク質またはポリペプチドに対する免疫応答は、T 細胞エピトープ認識に大きく影響を受け、それはその個体の H L A - D R アロタイプのペプチド結合特異性の関数である。世界人口の文脈においてタンパク質またはポリペプチド内の T 細胞エピトープを同定するために、可能な限り多様な一連の H L A - D R アロタイプの結合特性を考慮し、したがって可能な限り高い割合の世界人口を網羅することが望ましい。

T 細胞エピトープ同定は、エピトープ排除の最初のステップである。T 細胞エピトープの検出を可能にする方法は、当該技術分野において周知であり、WO 第 9 8 / 5 2 9 7 6 号、WO 第 0 0 / 3 4 3 1 7 号、U S 第 2 0 0 7 / 0 2 6 9 4 3 5 号、U S 第 7 , 2 0 8 , 1 4 7 号、Kern et al. , *Nature Medicine* 4 : 9 7 5 - 9 7 8 (1 9 9 8)、及び Kwok et al. , *Trends in Immunology* 2 2 : 5 8 3 - 5 8 8 (2 0 0 1) に開示される。これらのアプローチでは、予想または同定された T 細胞エピトープは、治療用タンパク質またはポリペプチドの一次配列内の賢明なアミノ酸置換の使用によって除去される。これらの参考文献は T 細胞エピトープの推定同定を可能にするが、生物学的活性への悪影響を回避するアミノ酸置換の選択を合理的に予想することはできない。それは、かかる活性に関して修飾されたポリペプチドの各々を試験することによってのみ決定することができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0 0 0 6】

【特許文献 1】国際公開第 9 8 / 5 2 9 7 6 号

【特許文献 2】国際公開第 0 0 / 3 4 3 1 7 号

【特許文献 3】米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 2 6 9 4 3 5 号明細書

【特許文献 4】米国特許第 7 , 2 0 8 , 1 4 7 号明細書

【非特許文献】

【0 0 0 7】

【非特許文献 1】R . Krishnan et al. , *J . Mol . Biol .* (2 0 1 4)

【非特許文献 2】Kern et al. , *Nature Medicine* 4 : 9 7 5 - 9 7 8 (1 9 9 8)

【非特許文献 3】Kwok et al. , *Trends in Immunology* 2 2 : 5 8 3 - 5 8 8 (2 0 0 1)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 8】

したがって、その N 1 ~ N 2 部分を含むポリペプチドを治療及び / または診断目的のために慢性的に全身投与することができるよう、そのアミロイド結合 / 脱凝集特性を損なうことなく g 3 p の N 1 ~ N 2 部分の免疫原性を検査し、低減させることができることによって、この必要を満たす。本発明は、N 1 ~ N 2 配列内の潜在的 T 細胞エピトープを同定することによって、この必要を満たす。本発明はさらに、その T 細胞エピトープの免疫原性を低減または排除するであろう変異型 N 1 ~ N 2 配列を、アミロイドに結合する、アミロイド凝集を予防する、及び / またはアミロイド斑の脱凝集をもたらす変異型 N 1 ~ N 2 の能力を損なうことなく产生するような、これらの潜在的 T 細胞エピトープ内の特定のアミノ酸置換を同定する。

【0 0 0 9】

一実施形態では、本発明はまた、同定された T 細胞エピトープのうちの 1 つ以上の中の 1 つ以上のアミノ酸置換に起因する低減された免疫原性を有する、N 1 ~ N 2 アミノ酸配列の変異型、またはその突然変異体もしくは断片を含む、ポリペプチドも提供する。一態

10

20

30

40

50

様では、本発明は、ヒト免疫グロブリン F c 領域に融合される変異型 N 1 ~ N 2 配列を含む融合タンパク質を提供する。

【 0 0 1 0 】

別の実施形態では、本発明は、本発明のポリペプチドを含む薬学的組成物、ならびに誤って折り畳まれた、及び / または凝集されたアミロイド本発明タンパク質に関連付けられる疾患を、かかる疾患に罹患するか、またはその疑いのある対象にかかる薬学的組成物を投与することによって治療または予防する方法を提供する。

【 0 0 1 1 】

さらなる実施形態では、本発明は、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子、ならびにそれらの核酸分子を含むベクター及びかかるベクターを有する細胞を提供する。

10

【 0 0 1 2 】

別の実施形態では、本発明は、本発明のポリペプチドを產生するための方法を提供する。具体的には、かかる方法は、核酸分子及び / またはかかる核酸分子を含むベクターを有する細胞を用いる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 3 】

【図 1】太文字及び下線によって特定される 5 つの T 細胞エピトープを有する、N 1 - N 2 - h I g G 1 - F c 融合タンパク質（配列番号 1 ）のアミノ酸配列を提示する。アミノ酸 1 ~ 2 1 7 は、野生型 g 3 p 配列の N 1 ~ N 2 部分を構成する。アミノ酸 2 1 8 ~ 2 5 6 は、M 1 3 バクテリオファージ内に存在する野生型 g 3 p グリシン豊富 N 2 - C 末端リ 20 ンカーから成るリンカー領域を表す。この領域は、網掛けによって特定される。アミノ酸 2 5 7 ~ 2 6 1 は、融合タンパク質をコードする核酸分子を構築するために使用される複数のクローニング部位によってコードされるアミノ酸を表す。タンパク質の I g G - F c 部分は、アミノ酸 2 6 2 から開始する。

【図 2】下線によって特定される 4 つの T 細胞エピトープを有する、g 3 p - h I g G 1 - F c 融合タンパク質（配列番号 2 ）の代替的実施方法のアミノ酸配列を提示する。第 5 の T 細胞エピトープは、配列番号 1 のアミノ酸 2 5 8 及び 2 5 9 に対応するアミノ酸の欠失によって排除されている。

【図 3】太文字及び下線によって特定される 3 つの T 細胞エピトープを有する、g 3 p - h I g G 1 - F c 融合タンパク質（配列番号 3 ）の別の代替的実施方法のアミノ酸配列を提示する。第 4 の T 細胞エピトープは、配列番号 1 と比較して V 2 1 5 A 及び G 2 2 0 E の置換によって排除されており、第 5 の T 細胞エピトープは、配列番号 1 のアミノ酸 2 5 8 及び 2 5 9 に対応するアミノ酸の欠失によって排除されている。

30

【図 4 A】N 末端哺乳類シグナル配列を有する、配列番号 1 の g 3 p - h I g G 1 - F c 融合タンパク質をコードする D N A 配列（配列番号 4 ）を提示する。

【図 4 B】N 末端哺乳類シグナル配列を有する、配列番号 2 の g 3 p - h I g G 1 - F c 融合タンパク質をコードする D N A 配列（配列番号 5 ）を提示する。

【図 5】N 末端哺乳類シグナル配列を有する、配列番号 3 の g 3 p - h I g G 1 - F c 融合タンパク質をコードする D N A 配列（配列番号 6 ）を提示する。

【図 6】実施例 1 に説明される研究において発現されたドナー・アロタイプの頻度の比較を提供する。

40

【図 7】太文字及び下線によって特定される 3 つの T 細胞エピトープを有する、g 3 p - h I g G 1 - F c 融合タンパク質（配列番号 7 ）の別の代替的実施形態のアミノ酸配列を提示する。第 4 の T 細胞エピトープは、配列番号 1 と比較して V 2 1 5 G 置換によって排除されている。

【図 8】N 末端哺乳類シグナル配列を有する、配列番号 7 の g 3 p - h I g G 1 - F c 融合タンパク質をコードする D N A 配列（配列番号 8 ）を提示する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

本出願において、用語「修飾された」（及びその同族語）は、基準（修飾されていない

50

) アミノ酸または核酸配列に関して、1つ以上のアミノ酸置換または対応するコドンの置換を含有する配列を指す。修飾は、基準配列の物理的な操作を必ずしも必要とするわけではない。配列が基準配列と比較してかかる置換を含有する限り、それがどのように合成されたかにかかわらず、それは「修飾された」と見なされる。用語「変異型」は、基準配列と比較して免疫原性を低減させるように修飾されているアミノ酸または核酸配列を指す。本明細書で使用されるとき、「変異型g 3 p」または「変異型N 1 ~ N 2」は、アミノ酸配列(またはそれをコードする核酸配列)であって、(a)纖維状バクテリオファージg 3 pタンパク質のN 1 ~ N 2部分(例えば、配列番号1のアミノ酸1 ~ 217)、または(b)アミロイドに結合する、及び/もしくはアミロイドを脱凝集させる、そのアミノ酸配列の突然変異体もしくは断片(例えば、配列番号3のアミノ酸1 ~ 217)を含み、該アミノ酸配列(またはそれをコードする核酸配列)が、基準(修飾されていない)アミノ酸配列と比較して免疫原性を低減させるように修飾されており、該修飾は、表1、表2、表6、もしくは表7のいずれかに記載されるアミノ酸置換、または対応する置換の群から選択される1 ~ 9つのアミノ酸置換から成る、アミノ酸配列(もしくはそれをコードする核酸配列)を指す。用語「対応する置換」は、本明細書で使用されるとき、かかる突然変異体または断片が配列番号1のアミノ酸1 ~ 217と整列されたときに、表1、表2、表6、または表7内の同等のアミノ酸置換に対応する、配列番号1のアミノ酸1 ~ 217の突然変異体または断片における置換を意味する。

10

【0015】

アミロイドに結合する、及び/またはアミロイドを脱凝集させる配列番号1のアミノ酸1 ~ 217の断片の例としては、配列番号1のアミノ酸1 ~ 67を含む任意の断片が挙げられるが、これらに限定されない。アミロイドに結合する、及び/またはアミロイドを脱凝集させる配列番号1のアミノ酸1 ~ 217の突然変異体の例としては、(1)配列番号3のアミノ酸1 ~ 217、(2)アミノ酸43 ~ 45におけるAAAによるVVVの置換を担持する、配列番号1のアミノ酸1 ~ 217、配列番号3のアミノ酸1 ~ 217、または配列番号7のアミノ酸1 ~ 217、(3)置換C53Wを有する、配列番号1のアミノ酸1 ~ 217、配列番号3のアミノ酸1 ~ 217、または配列番号7のアミノ酸1 ~ 217、(4)アミノ酸96 ~ 103の欠失を有する、配列番号1のアミノ酸1 ~ 217、配列番号3のアミノ酸1 ~ 217、または配列番号7のアミノ酸1 ~ 217、(5)アミノ酸212 ~ 214におけるAGAによるQPPの置換を担持する、配列番号1のアミノ酸1 ~ 217、配列番号3のアミノ酸1 ~ 217、または配列番号7のアミノ酸1 ~ 217、(6)置換W181A、F190A、及びF194Aを有する、配列番号1のアミノ酸1 ~ 217、配列番号3のアミノ酸1 ~ 217、または配列番号7のアミノ酸1 ~ 217、(7)PCT/US第2012/066793号に開示される他の活性突然変異体及び断片、(8)配列番号7のアミノ酸1 ~ 217、(9)配列番号1のアミノ酸2 ~ 217、配列番号3のアミノ酸2 ~ 217、または配列番号7のアミノ酸2 ~ 217、(10)配列番号1のアミノ酸3 ~ 217、配列番号3のアミノ酸3 ~ 217、または配列番号7のアミノ酸3 ~ 217、が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0016】

纖維状バクテリオファージg 3 pタンパク質のN 1 ~ N 2部分は、アミロイド結合及び脱凝集特性を有することがこれまでに示されている(PCT/US第2012/066793号を参照)。天然のM13ファージのN 1 ~ N 2部分は、配列番号1のアミノ酸1 ~ 217によって表される。同一のN 1 ~ N 2アミノ酸配列はまた、fd及びf1纖維状バクテリオファージ内にも提示される。配列番号1のアミノ酸218 ~ 256もまた、天然のg 3 p配列の一部であり、典型的には、g 3 pのN 2領域を、N 3ドメインとしても周知であるg 3 pのC末端ドメイン(CT)に接続するグリシン豊富リンカーと称されることが理解されるべきである。配列番号1のアミノ酸257 ~ 261は、配列番号1の融合タンパク質をコードする核酸分子を構築するために使用される複数のクローニング部位によってコードされるアミノ酸を表す。

30

【0017】

40

50

ポリペプチド

したがって、一実施形態では、本発明は、変異型 g 3 p または変異型 N 1 ~ N 2 を含むポリペプチドを提供する。本発明のより具体的な実施形態は、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 2 1 7、配列番号 3 のアミノ酸 1 ~ 2 1 7、及び配列番号 7 のアミノ酸 1 ~ 2 1 7 から選択される開始アミノ酸配列の変異型を含むポリペプチドであって、(a) 該ポリペプチドは、アミロイドに結合する、及び / またはアミロイドを脱凝集させ、(b) 該ポリペプチドは、開始アミノ酸配列を含む対応するポリペプチドと比較して低減された免疫原性を有し、また (c) 該変異型は、開始アミノ酸配列と比較して 1 ~ 9 つのアミノ酸置換を有し、各アミノ酸置換は、表 1 及び表 2 に記載されるアミノ酸置換の群から選択される、ポリペプチドを提供する。用語「開始アミノ酸配列を含む対応するポリペプチド」は、本明細書で使用されるとき、置換 (単数または複数) を除いて、開始アミノ酸配列を含むポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。

【表 1 - 1】

表 1. 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、または配列番号 7 のアミノ酸 1 ~ 2 1 7 に対する脱免疫化するアミノ酸置換

エピトープ	アミノ酸番号	配列番号 1 の指示されるアミノ酸番号に存在するアミノ酸*	置換
1	4 8	G	H、K、R、S、T
1	5 1	T	G、H、K、R、P、Q、N
1	5 4	Y	G、H、K、R、P
1	5 6	T	G、H、K、R、P
<hr/>			
2	1 3 5	M	A、D、G、K、N、T、H、R
2	1 4 0	R	D、E、H、Q、A、G
2	1 4 1	F	D、E
2	1 4 3	N	A、G

【表 1 - 2】

3	1 7 3	S	G、P、K
3	1 7 4	K	R
3	1 7 6	M	G、H、K、N、R
3	1 7 8	D	G、N、Q、S、T
3	1 8 1	W	G、H、K、R

10

20

30

40

【表2】

表2. 配列番号1、配列番号2、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸1～217に対する代替的または追加的な脱免疫化するアミノ酸置換

エピトープ	アミノ酸番号	配列番号1の指示されるアミノ酸番号に存在するアミノ酸*	置換
1	48	G	D、P
1	50	E	G、H、K、P、R
1	51	T	W
1	53	C	F、H、K、N、Q、R、W、Y
<hr/>			
2	135	M	C、E、P、Q、S
2	137	Q	D、E
2	138	N	D、E、G、H、P、Q、S、T
2	140	R	M、N、P、S、Y
2	141	F	G、N、P、Q、Y
<hr/>			
3	173	S	D、H、R、T
3	175	A	G、H、K、P、R
3	176	M	P、Q、W
3	178	D	F、H、K、R、W、Y
3	179	A	H、K、P、R
3	181	W	P

*表1及び2において、指示されるアミノ酸の各々は配列番号1、3、及び7において同一である。

10

20

30

40

【0018】

表1及び2に記載されるアミノ酸置換は、完全にN1～N2アミノ酸配列内に存在するT細胞エピトープを同定することによって抽出された。これは、HLA-DRアロタイプの世界人口を最もよく表す地域の血液ドナーのコホートに由来する末梢血単核細胞(PBMC)に対して、N1～N2配列の異なる重複ペプチド部分を定温放置して、潜在的T細胞エピトープを同定することによって行われた。この情報を次に、既知のT細胞エピトープのデータベースに対してソフトウェア分析に供して、それらの潜在的エピトープ内の最適なアミノ酸置換を同定した。これらの手順は、実施例にて詳細に説明される。

【0019】

これらの実施形態の一態様では、1～9つのアミノ酸置換は、表1に記載のものから選択される。上記の実施形態のより具体的な態様では、ポリペプチドは、特定の単一のアミノ酸置換のみを有するアミノ酸1～217配列番号1の変異型、または配列番号3のアミノ酸1～217の変異型、またはアミノ酸1～217配列番号7の変異型を含み、該置換は、表3に記載される置換のうちの1つから選択される。

【表3】

表3. 配列番号1のアミノ酸1～217、配列番号3のアミノ酸1～217、または配列番号7のアミノ酸1～217内の特定の脱免疫化する单一のアミノ酸置換

G 4 8 H	G 4 8 K	G 4 8 R	G 4 8 S
G 4 8 T	T 5 1 G	T 5 1 H	T 5 1 K
T 5 1 P	T 5 1 R	T 5 1 Q	T 5 1 N
Y 5 4 G	Y 5 4 H	Y 5 4 K	Y 5 4 P
Y 5 4 R	T 5 6 G	T 5 6 H	T 5 6 K
T 5 6 P	T 5 6 R	M 1 3 5 A	M 1 3 5 D
M 1 3 5 G	M 1 3 5 H	M 1 3 5 K	M 1 3 5 N
M 1 3 5 R	M 1 3 5 T	R 1 4 0 A	R 1 4 0 D
R 1 4 0 E	R 1 4 0 G	R 1 4 0 H	R 1 4 0 Q
F 1 4 1 D	F 1 4 1 E	N 1 4 3 A	N 1 4 3 G
S 1 7 3 G	S 1 7 3 P	M 1 7 6 G	M 1 7 6 H
M 1 7 6 K	M 1 7 6 N	D 1 7 8 G	D 1 7 8 N
D 1 7 8 Q	D 1 7 8 S	W 1 8 1 G	W 1 8 1 H
W 1 8 1 K	W 1 8 1 R	S 1 7 3 K	K 1 7 4 R
M 1 7 6 R	D 1 7 8 T		

【0020】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、2～9つのアミノ酸置換を有するアミノ酸1～217配列番号1の変異型、または配列番号3のアミノ酸1～217の変異型、または配列番号7のアミノ酸1～217の変異型を含み、該置換は、エピトープ1、2、及び3のうちの少なくとも2つ中にあり、また該置換は、表1及び2に記載のものから選択される。より具体的な態様では、アミノ酸1～217配列番号1の変異型または配列番号3のアミノ酸アミノ酸1～217の変異型または配列番号7のアミノ酸1～217の変異型内の少なくとも2つの置換は、表1に記載のものから選択される。さらにより具体的な態様では、ポリペプチドは、2つのアミノ酸置換のみを有する配列番号1または配列番号3または配列番号7の変異型を含み、該置換は、表4に記載の特定2つのアミノ酸置換のいずれかから選択される。

10

20

30

【表4】

表4. 配列番号1のアミノ酸1～217、配列番号3のアミノ酸1～217、または配列番号7のアミノ酸1～217内の特定の脱免疫化する2つのアミノ酸置換：

Y 5 4 K及びM 1 3 5 K	Y 5 4 K及びM 1 3 5 T	Y 5 4 K及びR 1 4 0 Q	Y 5 4 R及びM 1 3 5 K
Y 5 4 R及びM 1 3 5 T	Y 5 4 R及びR 1 4 0 Q	T 5 6 H及びM 1 3 5 K	T 5 6 H及びM 1 3 5 T
T 5 6 H及びR 1 4 0 Q	T 5 6 K及びM 1 3 5 K	T 5 6 K及びM 1 3 5 T	T 5 6 K及びR 1 4 0 Q
Y 5 4 K及びD 1 7 8 N	Y 5 4 K及びW 1 8 1 H	Y 5 4 K及びW 1 8 1 R	Y 5 4 K及びK 1 7 4 R
Y 5 4 R及びD 1 7 8 N	Y 5 4 R及びW 1 8 1 H	Y 5 4 R及びW 1 8 1 R	Y 5 4 R及びK 1 7 4 R
T 5 6 H及びD 1 7 8 N	T 5 6 H及びW 1 8 1 H	T 5 6 H及びW 1 8 1 R	T 5 6 H及びK 1 7 4 R
T 5 6 K及びD 1 7 8 N	T 5 6 K及びW 1 8 1 H	T 5 6 K及びW 1 8 1 R	T 5 6 K及びK 1 7 4 R
M 1 3 5 K及びD 1 7 8 N	M 1 3 5 K及びW 1 8 1 H	M 1 3 5 K及びW 1 8 1 R	M 1 3 5 K及びK 1 7 4 R
M 1 3 5 T及びD 1 7 8 N	M 1 3 5 T及びW 1 8 1 H	M 1 3 5 T及びW 1 8 1 R	M 1 3 5 T及びK 1 7 4 R
R 1 4 0 Q及びD 1 7 8 N	R 1 4 0 Q及びW 1 8 1 H	R 1 4 0 Q及びW 1 8 1 R	R 1 4 0 Q及びK 1 7 4 R

【0021】

別の実施形態では、ポリペプチドは、3～9つのアミノ酸置換を有するアミノ酸1～217配列番号1の変異型または配列番号3のアミノ酸1～217の変異型または配列番号7のアミノ酸1～217の変異型を含み、少なくとも1つのアミノ酸置換はエピトープ1、2、及び3の各々の中にあり、また該置換は、表1及び表2に記載の置換から選択される。より具体的な態様では、アミノ酸1～217配列番号1の変異型または配列番号3のアミノ酸1～217の変異型または配列番号7のアミノ酸1～217の変異型内の少なくとも3つのアミノ酸置換は、表2に記載の置換から選択される。さらにより具体的な態様では、アミノ酸1～217配列番号1の変異型または配列番号3のアミノ酸1～217の変異型または配列番号7のアミノ酸1～217の変異型を含むポリペプチドは、3つのアミノ酸置換のみを有し、該置換は、表5に記載の特定の3つのアミノ酸置換のいずれかから選択される。

【表5-1】

表5. 配列番号1のアミノ酸1～215、配列番号3のアミノ酸1～217、または配列番号7のアミノ酸1～217内の特定の脱免疫化する3つのアミノ酸置換：

Y 5 4 K、M 1 3 5 K、及びD 1 7	Y 5 4 K、M 1 3 5 T、及びD 1 7 8 N	Y 5 4 K、R 1 4 0 Q、及びD 1 7 8 N	Y 5 4 R、M 1 3 5 K、及びD 1 7 8 N
------------------------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------

【表5-2】

8N			
Y54R、M13 5T、及びD17 8N	Y54R、R140 Q、及びD178N	T56H、M135 K、及びD178N	T56H、M135 T、及びD178N
T56H、R14 0Q、及びD17 8N	T56K、M135 K、及びD178N	T56K、M135 T、及びD178N	T56K、R140 Q、及びD178N
Y54K、M13 5K、及びW18 1H	Y54K、M135 T、及びW181H	Y54K、R140 Q、及びW181H	Y54R、M135 K、及びW181H
Y54R、M13 5T、及びW18 1H	Y54R、R140 Q、及びW181H	T56H、M135 K、及びW181H	T56H、M135 T、及びW181H
T56H、R14 0Q、及びW18 1H	T56K、M135 K、及びW181H	T56K、M135 T、及びW181H	T56K、R140 Q、及びW181H
Y54K、M13 5K、及びW18 1R	Y54K、M135 T、及びW181R	Y54K、R140 Q、及びW181R	Y54R、M135 K、及びW181R
Y54R、M13 5T、及びW18 1R	Y54R、R140 Q、及びW181R	T56H、M135 K、及びW181R	T56H、M135 T、及びW181R
T56H、R14 0Q、及びW18 1R	T56K、M135 K、及びW181R	T56K、M135 T、及びW181R	T56K、R140 Q、及びW181R
Y54K、M13 5K、及びK17 4R	Y54K、M135 T、及びK174R	Y54K、R140 Q、及びK174R	Y54R、M135 K、及びK174R
Y54R、M13 5T、及びK17 4R	Y54R、R140 Q、及びK174R	T56H、M135 K、及びK174R	T56H、M135 T、及びK174R
T56H、R14 0Q、及びK17 4R	T56K、M135 K、及びK174R	T56K、M135 T、及びK174R	T56K、R140 Q、及びK174R

【0022】

別の実施形態では、本発明は、g3p変異型を含むポリペプチドであって、1~9つの置換のうちの1つが、V215A、V215S、V215GもしくはV215T、V215C、V215D、V215E、V215F、V215H、V215K、V215N、V215P、V215Q、またはV215Rから選択されるエピトープ4内の置換である、ポリペプチドを提供する。また別の実施形態では、本発明は、配列番号1のアミノ酸1~217の変異型を含むポリペプチドであって、1~9つの置換のうちの1つが、V215A、V215S、V215G、V215T、V215C、V215D、V215E、V215F、V215H、V215K、V215N、V215P、V215Q、またはV215Rから選択されるエピトープ4内の置換である、ポリペプチドを提供する。N1~N2配列の重複する潜在的T細胞エピトープペプチド部分の試験を通じて、本出願は、配列番

10

20

30

40

50

号 1 内の V 215 は、配列番号のアミノ酸 215 - 223 にわたる潜在的 T 細胞エピトープ（図 1 内のエピトープ 4）の一部分（グリシン豊富リンカーの一部分の通る N 2 の末端）であることを決定した。エピトープ 4 内の V 215 A 及び G 220 E 置換（配列番号 3 参照）は、アミロイドに結合するポリペプチドの能力に影響を及ぼさないが、後の分析は、これらの置換のうちの一方または両方は、エピトープ 1、2、及び 3 の各々において表 1 及び 2 内に示される特定の変化と組み合わされたときに、アミロイドを脱凝集させる得られるポリペプチドの能力を低減させることを示唆している。配列番号 1 と比較して、エピトープ 4 内の単一の V 215 G 置換（配列番号 7 参照）は、アミロイドに結合するか、またはアミロイドを脱凝集させるポリペプチドの能力に影響を及ぼさなかった。これらのエピトープ 4 置換の各々は、T 細胞エピトープを排除するためのソフトウェア及びデータベース分析によって予想した。上記の V 215 に関する他の置換の各々は、同様に T 細胞エピトープを排除するように予想されるが、アミロイド結合に対して効果をほとんどまたは全く有さない。

10

【0023】

より具体的な態様では、アミノ酸 1 ~ 217 配列番号 1 の変異型を含むポリペプチドは、上記の V 215 置換のうちのいずれか 1 つ、及び表 1 または表 2 に記載のアミノ酸置換のうちの 1 ~ 8 つを有する。さらにより具体的な実施形態では、1 ~ 8 つのアミノ酸置換は、表 1 に記載のものから選択される。さらにより具体的な態様では、ポリペプチドは、上記の V 215 置換のうちのいずれか 1 つ、及び表 3 に記載のものから選択される 1 つの追加の単一のアミノ酸置換を有する。より具体的な態様では、アミノ酸 1 ~ 217 配列番号 1 の変異型を含むポリペプチドは、上記の V 215 置換のいずれか 1 つ及び 2 ~ 8 つの追加のアミノ酸置換を有し、該追加の置換は、エピトープ 1、2、及び 3 のうちの少なくとも 2 つの中にあり、該置換は、表 1 または表 2 に記載のものから選択される。さらにより具体的な実施形態では、エピトープ 1、2、及び 3 のうちの少なくとも 2 つの中の少なくとも 1 つの置換は、表 1 に記載の置換から選択される。またより具体的な実施形態では、ポリペプチドは、上記の V 215 置換のうちの 1 つ、及び表 4 に記載の特定の 2 つのアミノ酸置換のうちの 1 つを有する。

20

【0024】

より具体的な態様では、アミノ酸 1 ~ 217 配列番号 1 の変異型を含むポリペプチドは、上記の V 215 置換のいずれか 1 つ、及び表 1 または表 2 に記載のものから選択される 3 ~ 8 つの追加のアミノ酸置換を有し、エピトープ 1、2、及び 3 の各々は、追加の置換のうちの 1 つを含む。さらにより具体的な実施形態では、エピトープ 1、2、及び 3 の各々の中の置換は、表 1 に記載のものから選択される。またより具体的な実施形態では、ポリペプチドは、上記の V 215 置換のうちの 1 つ、及び表 5 に記載の特定の 3 つのアミノ酸置換のうちの 1 つを有する。さらにより具体的な実施形態では、ポリペプチドは、V 215 G 置換と、T 56H、M 135K、及び D 178N；T 56K、M 135K、及び D 178N；T 56K、M 135T、及び D 178N；T 56H、M 135K、及び W 181R；T 56H、M 135T、及び W 181R；Y 54K、M 135T、及び K 174R；Y 54R、M 135K、及び K 174R；Y 54R、M 135T、及び K 174R；T 56H、M 135K、及び K 174R；ならびに T 56H、M 135T、及び K 174R から選択される 3 つのアミノ酸置換とを有する。

30

【0025】

別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、ペプチドリンカーを介して、または直接的に変異型 g 3 p アミノ酸配列の C 末端に融合されるヒトまたはヒト化免疫グロブリン Fc ポリペプチド配列から本質的に成る融合タンパク質である。用語「ペプチドリンカー」は、本明細書で使用されるとき、ポリペプチドの機能を妨げないであろう一連の連続アミノ酸を指す。上記の通り、配列番号 1 ~ 3 及び 7 において、アミノ酸 218 ~ 256 は、M 13 g 3 p タンパク質内に通常存在するグリシン豊富リンカーを表す。本発明のポリペプチドにおいて、そのリンカーが使用されてもよく、または異なるリンカーがそれに置換されてもよい。別法として、Fc ポリペプチド配列は、N 2 をコードする最後のアミノ酸

40

50

(例えば、配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸 217) に直接連結されてもよい。リンカー配列及び / またはその不在の選択は、本発明のポリペプチドの組換え発現に利用可能なベクター、及びかかるリンカーがポリペプチドに付与することができる任意の二次または三次構造を考慮に入れて、当業者によって行われ得る。この実施形態の一態様では、Fc ポリペプチドは、ヒト IgG のFc部分である。より具体的な態様では、ポリペプチドは、その中に表1、表2、または下記の表6、もしくは表7に記載のアミノ酸置換の群から選択される1 ~ 9つのアミノ酸残基置換を有する、配列番号1、配列番号2、配列番号3、または配列番号7の変異型である。

【表6】

表6. 配列番号1のアミノ酸215~223に対する脱免疫化するアミノ酸置換。

エピトープ	アミノ酸番号	配列番号1のアミノ酸1~215中に存在するアミノ酸	置換
4	215	V*	A*、S、G**、T
4	218	G	C、E、N、P、Q、S、T
4	220	G*	E*、D、F、W
4	221	S	D、E、G
4	223	G	D、P

10

20

【表7】

表7. 配列番号1または配列番号2のアミノ酸215~223に対する代替的及び追加的な脱免疫化するアミノ酸置換。

エピトープ	アミノ酸番号	配列番号1~3のアミノ酸1~215中に存在するアミノ酸	置換
4	215	V*,**	C、D、E、F、H、K、N、P、Q、R
4	218	G	A、H、W
4	220	G*	M、Y
4	223	G	E、K、N、R、T

30

*V215A及びG220Eは、配列番号3の変異型がこれらのアミノ酸残基においてさらなる置換を含有しないように、配列番号3中で既に置換されている。

**V215G置換は、配列番号7の変異型がこれらのアミノ酸残基においてさらなる置換を含有しないように、配列番号7中に既に存在している。

40

【0026】

さらにより具体的な態様では、ポリペプチドは、2 ~ 9つのアミノ酸置換を有する配列番号1または配列番号2の変異型であり、該置換のうちの1つは、表6及び表7に記載の置換であり、該置換のうちの少なくとも1つは、表1及び表2に記載の置換である。より具体的な態様では、ポリペプチドは、配列番号1または配列番号2の変異型であり、2 ~ 9つのアミノ酸置換を有し、該置換のうちの少なくとも1つは表6に記載され、該置換のうちの少なくとも1つは表1に記載される。別のより具体的な態様では、ポリペプチドは、配列番号1または配列番号2の変異型であり、3 ~ 9つのアミノ酸置換を有し、該置換のうちの少なくとも1つは、表6及び表7に記載の置換から選択され、エピトープ1、2

50

、及び3のうちの少なくとも2つは、表1及び表2に記載の置換から選択される少なくとも1つの置換を含有する。より具体的な態様では、ポリペプチドは、配列番号1または配列番号2の変異型であり、表6に記載の置換のうちの少なくとも1つと、表1に記載の置換から選択される、エピトープ1、2、及び3のうちの少なくとも2つの中の少なくとも1つの置換とを有する。別のより具体的な態様では、ポリペプチドは、配列番号1または配列番号2の変異型であり、4～9つのアミノ酸置換と、表6及び表7に記載の置換のうちの少なくとも1つと、表1及び表2に記載の置換から選択される、エピトープ1、2、及び3の各々の中の少なくとも1つの置換とを有する。より具体的な態様では、ポリペプチドは、配列番号1または配列番号2の変異型であり、表6に記載の置換のうちの少なくとも1つと、表3、表4、または表5にそれぞれ記載の1つ、2つ、または3つのアミノ酸置換から選択される、特定の置換のうちの少なくとも1つと有する。この実施形態のまた別のより具体的な態様では、ポリペプチドは、配列番号1または配列番号2の変異型であり、表6に記載のアミノ酸置換のうちの1つのみと、表3、表4、または表5にそれぞれ記載の特定の1つ、2つ、または3つのアミノ酸置換のうちの1つから選択される、1つのみ、2つ、または3つの追加のアミノ酸置換とを有する。

【0027】

代替的実施方法では、ポリペプチドは、配列番号3または配列番号7の変異型であり、表1及び表2に記載のアミノ酸置換の群から選択される1～9つのアミノ酸残基置換を有する。より具体的な態様では、少なくとも1つの置換は、表1に記載される。別のより具体的な態様では、ポリペプチドは、配列番号3または配列番号7の変異型であり、表1及び2に記載の置換のいずれかから選択されるエピトープ1、2、及び3のうちの少なくとも2つの中の2～9つのアミノ酸置換及び少なくとも1つの置換を有する。より具体的な態様では、エピトープ1、2、及び3のうちの少なくとも2つの中の少なくとも1つの置換は、表1に記載のものから選択される。別のより具体的な態様では、ポリペプチドは、配列番号3または配列番号7の変異型であり、3～9つのアミノ酸置換を有し、少なくとも1つの置換は、エピトープ1、2、及び3の各々の中にあり、表1及び2に記載の置換のいずれかから選択される。より具体的な態様では、エピトープ1、2、及び3の各々の中の少なくとも1つの置換は、表1に記載のものから選択される。さらにより具体的な実施形態では、ポリペプチドは、配列番号3または配列番号7の変異型であり、表3、表4、または表5にそれぞれ記載の特定の1つ、2つ、または3つのアミノ酸置換のうちの1つから選択される、1つのみ、2つ、または3つのアミノ酸置換を有する。

【0028】

別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、表4に記載の特定の2つのアミノ酸置換のいずれかから選択される2つのアミノ酸置換のみを有する、配列番号3または配列番号7の変異型である。別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、表5に記載の特定の3つのアミノ酸置換のいずれかから選択される3つのアミノ酸置換のみを有する、配列番号3または配列番号7の変異型である。より具体的な実施形態では、本発明のポリペプチドは、以下の組の特定の3つのアミノ酸置換：T56H、M135K、及びD178N、T56K、M135K、及びD178N、T56H、M135K、及びW181R、T56H、M135T、及びW181R、Y54K、M135T、及びK174R、Y54R、M135K、及びK174R、Y54R、M135T、及びK174R、T56H、M135K、及びK174R、ならびにT56H、M135T、及びK174R、のいずれかから選択される3つのアミノ酸置換のみを有する、配列番号7の変異型である。

【0029】

10

20

30

40

50

核酸分子、配列、ベクター、及び宿主細胞

他の実施形態では、本発明は、上記の g 3 p 変異型を含むポリペプチドまたは融合タンパク質のいずれかをコードする核酸配列を含む単離された核酸分子を提供する。この実施形態の一態様では、単離された核酸分子は、配列番号 4 のヌクレオチド 6 4 ~ 7 1 4 の変異型を含み、それは 1 ~ 9 つのコドン置換によって修飾され、各コドン置換は、表 1 及び表 2 に記載の置換と、以下の V 2 1 5 アミノ酸置換：V 2 1 5 A、V 2 1 5 S、V 2 1 5 G または V 2 1 5 T、V 2 1 5 C、V 2 1 5 D、V 2 1 5 E、V 2 1 5 F、V 2 1 5 H、V 2 1 5 K、V 2 1 5 N、V 2 1 5 P、V 2 1 5 Q、及び V 2 1 5 R のうちのいずれか 1 つとから選択されるアミノ酸置換に対応する。これらの実施形態のさらにより具体的な態様では、変異型核酸配列は、上記の V 2 1 5 アミノ酸置換のうちのいずれか 1 つをコードするように、かつ 1 ~ 8 つの追加のコドン置換から選択される 1 つのコドン置換によって修飾され、該追加のコドン置換の各々は、表 1 に記載のアミノ酸置換をコードするように選択される。これらの実施形態のまたより具体的な態様では、変異型核酸配列は、上記の V 2 1 5 アミノ酸置換のうちのいずれか 1 つをコードするように、かつ 2 ~ 8 つの追加のコドン置換から選択される 1 つのコドン置換によって修飾され、各追加のコドン置換は、表 1 に記載のアミノ酸置換をコードし、コドン置換は、エピトープ 1、2、及び 3 のうちの少なくとも 2 つの各々の中に存在する。またより具体的な実施形態では、変異型核酸配列は、上記の V 2 1 5 アミノ酸置換のうちのいずれか 1 つをコードするように、かつ 3 ~ 8 つの追加のコドン置換から選択される 1 つのコドン置換によって修飾され、各追加のコドン置換は、表 1 に記載のアミノ酸置換をコードし、コドン置換は、エピトープ 1、2、及び 3 の各々の中に存在する。またより具体的な実施形態では、変異型核酸配列は、V 2 1 5 A アミノ酸置換をコードするように選択される 1 つのコドン置換と、表 3 に記載の単一のアミノ酸置換のうちの 1 つをコードするように選択される 1 つの追加のコドン置換とによって修飾される。またより具体的な実施形態では、変異型核酸配列は、V 2 1 5 G アミノ酸置換をコードするように選択される 1 つのコドン置換と、表 3 に記載の単一のアミノ酸置換のうちの 1 つをコードするように選択される 1 つの追加のコドン置換とによって修飾される。別の具体的な実施形態では、変異型核酸配列は、上記の V 2 1 5 A アミノ酸置換をコードするように選択される 1 つのコドン置換と、表 4 に記載の特定の 2 つのアミノ酸置換のうちの 1 つをコードするように選択される 2 つの追加のコドン置換とによって修飾される。別の具体的な実施形態では、変異型核酸配列は、上記の V 2 1 5 G アミノ酸置換をコードするように選択される 1 つのコドン置換と、表 4 に記載の特定の 2 つのアミノ酸置換のうちの 1 つをコードするように選択される 2 つの追加のコドン置換とによって修飾される。またより具体的な実施形態では、変異型核酸配列は、上記の V 2 1 5 アミノ酸置換をコードするように選択される 1 つのコドン置換と、表 5 に記載の特定の 3 つのアミノ酸置換のうちの 1 つをコードするように選択される 3 つの追加のコドン置換とによって修飾される。またより具体的な実施形態では、変異型核酸配列は、上記の V 2 1 5 G アミノ酸置換をコードするように選択される 1 つのコドン置換と、表 5 に記載の特定の 3 つのアミノ酸置換のうちの 1 つをコードするように選択される 3 つの追加のコドン置換とによって修飾される。

【 0 0 3 0 】

また他の実施形態では、単離された核酸分子は、配列番号 4 のヌクレオチド 6 4 ~ 1 5 3 0 または配列番号 5 のヌクレオチド 6 4 ~ 1 5 2 4 の変異型を含み、該配列は、1 ~ 9 つのコドン置換によって修飾され、各コドン置換は、表 1、表 2 に記載の置換と、以下の V 2 1 5 アミノ酸置換：V 2 1 5 S、V 2 1 5 G または V 2 1 5 T、V 2 1 5 C、V 2 1 5 D、V 2 1 5 E、V 2 1 5 F、V 2 1 5 H、V 2 1 5 K、V 2 1 5 N、V 2 1 5 P、V 2 1 5 Q、及び V 2 1 5 R のうちのいずれか 1 つとから選択されるアミノ酸置換に対応する。より具体的な実施形態では、各コドン置換は、表 1 に記載の置換、及び上記の V 2 1 5 置換のうちのいずれか 1 つから選択されるアミノ酸置換に対応する。さらにより具体的な実施形態では、変異型核酸配列は、上記の V 2 1 5 アミノ酸置換のうちのいずれか 1 つをコードするように、かつ 1 ~ 8 つの追加のコドン置換から選択される 1 つのコドン置換

10

20

30

40

50

によって修飾され、該追加のコドン置換の各々は、表1に記載の置換から選択されるアミノ酸置換に対応する。より具体的な態様では、変異型は、表3に記載の特定の1つのアミノ酸置換に対応する1つの追加のコドン置換を有する。またより具体的な実施形態では、配列番号4のスクレオチド64～1530または配列番号5のスクレオチド64～1524の変異型は、上記のV215アミノ酸置換のうちのいずれか1つをコードするように、かつ2～8つの追加のコドン置換から選択される1つのコドン置換から成る修飾を有し、各追加のコドン置換は、表1に記載のアミノ酸置換に対応し、コドン置換は、エピトープ1、2、及び3のうちの少なくとも2つの各々の中に存在する。より具体的な態様では、変異型は、表4に記載の特定の2つのアミノ酸置換のうちの1つに対応する2つの追加のコドン置換を有する。またより具体的な実施形態では、配列番号4のスクレオチド64～1530または配列番号5のスクレオチド64～1524のうちのいずれか1つの変異型は、上記のV215アミノ酸置換のうちのいずれか1つをコードするように、かつ3～8つの追加のコドン置換から選択される1つのコドン置換から成る修飾を有し、各追加のコドン置換は、表1に記載のアミノ酸置換に対応し、コドン置換は、エピトープ1、2、及び3の各々の中に存在する。より具体的な態様では、変異型は、表5に記載の特定の3つのアミノ酸置換のうちの1つに対応する3つの追加のコドン置換を有する。

10

20

30

40

【0031】

また他の実施形態では、単離された核酸分子は、配列番号6のスクレオチド64～1524または配列番号8のスクレオチド64～1524の変異型を含み、該変異型核酸配列は、1～9つのコドン置換によって修飾され、各コドン置換は、表1または表2に記載の置換から選択されるアミノ酸置換に対応する。より具体的な実施形態では、各コドン置換は、表1に記載の置換から選択されるアミノ酸置換に対応する。さらにより具体的な実施形態では、変異型は、表3に記載の特定の1つのアミノ酸置換のうちの1つに対応する1つのコドン置換を有する。またより具体的な実施形態では、配列番号6のスクレオチド64～1524または配列番号8のスクレオチド64～1524の変異型は、2～8つのコドン置換によって修飾され、各コドン置換は、表1に記載のアミノ酸置換に対応し、コドン置換は、エピトープ1、2、及び3のうちの少なくとも2つの各々の中に存在する。より具体的な態様では、変異型は、表4に記載の特定の2つのアミノ酸置換のうちの1つに対応する2つの追加のコドン置換を有する。またより具体的な実施形態では、配列番号6のスクレオチド64～1524または配列番号8のスクレオチド64～1524の変異型は、3～8つのコドン置換によって修飾され、各コドン置換は、表1に記載のアミノ酸置換に対応し、コドン置換は、エピトープ1、2、及び3の各々の中に存在する。より具体的な態様では、変異型は、表5に記載の特定の3つのアミノ酸置換のうちの1つに対応する3つの追加のコドン置換を有する。さらにより具体的な態様では、変異型は、以下の特定の組の3つのアミノ酸置換：T56H、M135K、及びD178N、T56K、M135K、及びD178N、T56K、M135T、及びD178N、T56H、M135K、及びW181R、T56H、M135T、及びW181R、Y54K、M135T、及びK174R、Y54R、M135K、及びK174R、Y54R、M135T、及びK174R、T56H、M135K、及びK174R、ならびにT56H、M135T、及びK174Rのうちの1つに対応する、3つの追加のコドン置換を有する。

【0032】

本発明の核酸分子のまた他の実施形態では、核酸分子は、変異型g3pをコードする核酸配列の5'末端に同相でかつ直接融合されるシグナル配列をコードする核酸配列をさらに含む。これらの実施形態の一態様では、シグナル配列をコードする核酸配列は、配列番号4のスクレオチド1～63である。

【0033】

本発明の核酸分子は、退行性であるが、上記の核酸分子のいずれかによってコードされるものと同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列を包含する。

【0034】

組換え産生のために、本発明の核酸分子のいずれかは、挿入されるコード配列の転写及び

50

翻訳のための必須要素か、またはRNAウイルスベクターの場合、複製及び翻訳のための必須要素を含有する、適切な発現ベクター内に挿入され得る。コード核酸は、適切なリーディングフレーム内でベクター内に挿入される。したがって、本発明は、本発明の核酸分子及び配列を含むベクターを提供する。かかるベクターとしては、DNAベクター、ファージベクター、ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の核酸分子及び配列をクローニングするための適切なベクターの選択は、発現を実行するために選択される宿主細胞とのベクターの適合性に関する周知の知識を使用して、当業者によって行うことができる。これは、哺乳類細胞、植物細胞、昆虫細胞、細菌細胞、酵母細胞などのいずれかで行うことができる。これらの細胞型の各々のための適切なベクターは、当該技術分野において周知であり、概して市販されている。

10

【0035】

別の実施形態では、本発明は、本発明の核酸分子または核酸配列を含有するベクターを有する宿主細胞を提供する。本発明のベクターを宿主細胞内へ形質移入または形質転換するか、ないしは別 の方法で獲得する方法は、当該技術分野において既知である。本ベクターを有する細胞は、適切な条件下で培養されるときに、本発明のポリペプチドを産生する。本発明のポリペプチドの組み換え産生に使用されるベクター及び細胞の具体的な例は、下記の実施例の章に記載される。

【0036】

薬学的組成物

いくつかの実施形態では、本発明は、変異型g3pを含む任意のポリペプチドまたは融合タンパク質を、任意に、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と共に含む、薬学的組成物を提供する。「薬学的組成物」は、生理学的に好適な担体及び/または賦形剤を伴う、治療的有効量の本明細書に説明される組成物を指す。薬学的組成物は、有機体に対して著しい炎症を引き起こさない。語句「生理学的に好適な担体」及び「薬学的に許容される担体」は、互換的に使用され、有機体に対して著しい炎症を引き起こさず、投与される組成物の生物学的活性及び特性を抑制しない担体または希釈剤を指す。用語「賦形剤」は、活性成分の投与をさらに促進するために薬学的組成物に添加される不活性物質を指す。例としては、限定されるものではないが、例えば、生理食塩水、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖類及び種々の種類の澱粉、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ポリエチレングリコール、ならびに例えば、ポリソルベート20を含む界面活性剤が挙げられる。

20

【0037】

本発明に従う使用のための薬学的組成物は、薬学的に使用することができる組成物中への活性成分の処理を促進する賦形剤及び補助剤を含む1つ以上の生理学的に許容される担体を使用して、従来の様式で製剤化することができる。適切な製剤化は、選択される投与の経路、及び送達される組成物の性質(例えば、ポリペプチドの大きさ及び可溶性)に依存する。これらの実施形態の一態様では、薬学的組成物は、患者の血流中への注射または注入用に製剤化される。これらの実施形態の別の態様では、薬学的組成物は、例えば、直接髄内注射、髄膜注射、または脳室内注射による、患者の脳または中枢神経系への直接投与用に製剤化される。

30

【0038】

非経口投与用の薬学的組成物としては、水溶性形態の組成物の水溶液が挙げられる。それに加えて、活性成分の懸濁液を油性または水性注射懸濁液として調製することができる。それに加えて、活性成分の懸濁液を油性または水性注射懸濁液として調製することができる。好適な親油性溶媒またはビヒクルとしては、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチル、トリグリセリド、もしくはリポソームなどの合成脂肪酸エステルが挙げられる。水性注射懸濁液は、カルボキシルメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランなどの、懸濁液の粘度を増加させる物質を含有してもよい。任意に、懸濁液はまた、好適な安定剤、または高濃度溶液の調製を可能にするために活性成分の可溶性を増加させる薬剤(例えば、ポリソルベート(Tween 20)などの界面活性剤)を含有

40

50

してもよい。例えば、アルブミンなどのタンパク質ベースの薬剤は、送達表面（即ち、I V バッグ、カテーテル、針など）への本発明のポリペプチドの吸着を予防するために使用することができる。

【0039】

経口投与に関して、組成物は、活性化合物を当該技術分野において周知である薬学的に許容される担体と組み合わせることによって、容易に製剤化することができる。

【0040】

製剤は、例えば、バイアル、アンプル内に単位剤形でか、または任意に添加された防腐剤と共に、反復用量容器内に提示することができる。組成物は、懸濁液、溶液、または油性もしくは水性ビヒクル内の乳剤であってもよく、また懸濁化剤、安定剤、及び／または分散剤などの製剤化剤を含有してもよい。単一剤形は、液体または固形であってもよい。単一剤形は、変更を伴わずに患者に直接投与されてもよく、または投与前に希釈もしくは再構築されてもよい。特定の実施形態では、単一剤形は、ボーラス形式で、例えば、単一注射、複数の錠剤、カプセル、丸剤などを含む経口用量を含む単一経口用量で投与することができる。代替的実施方法では、単一剤形は、例えば、注入によってか、または例えば、I C V ポンプなどの埋め込み式ポンプを介して、経時的に投与することができる。後者の実施形態では、単一剤形は、適切な量の変異型 g 3 p を含むポリペプチドまたは融合タンパク質で予め充填された注入バッグまたはポンプ容器であり得る。別法として、注入バッグまたはポンプ容器は、適切な用量の変異型 g 3 p を注入バッグまたはポンプ容器液と混合することによって患者に投与される直前に調製することができる。

10

20

【0041】

本発明の別の態様は、本発明の薬学的組成物を調製するための方法を含む。薬物の製剤化のための技術は、例えば、その全体が参照により本明細書に援用される「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Mack Publishing Co., Easton, Pa., 最新版に見出すことができる。

【0042】

本発明の文脈における使用に好適な薬学的組成物は、活性成分が意図される目的を達成するのに有効な量で含有される組成物を含む。

【0043】

治療的または診断的有効量の決定は、特に、本明細書に提供される詳細な開示を考慮すれば、十分に当業者の能力の範囲内である。

30

【0044】

投薬の量及び間隔は、特定の脳疾患、障害、または病態を治療または診断するのに十分であるファージディスプレイビヒクルの脳内レベル（最小有効濃度、M E C）を提供するように、個別に調節することができる。M E C は調製毎に変動するであろうが、インピトロデータから推定することができる。M E C を達成するのに必要な投薬量は、個々の特徴に依存するであろう。

【0045】

投薬間隔もまた、M E C 値を使用して決定することができる。調製物は、10～90% の時間、好ましくは30～90%、より好ましくは50～90% の時間、脳内レベルをM E C より上に維持する治療計画を使用して投与されるべきである。

40

【0046】

治療されるべき病態の重篤度及び応答性に応じて、投薬は、数日～数週間、または治癒がもたらされるかもしくは疾患状態の減退が達成されるまで継続する一連の治療を伴う、単回または複数回の投与であり得る。

【0047】

勿論、投与されるべき組成物の量は、治療または診断されている対象、病気の重篤度、処方医師の判断などに依存するであろう。

【0048】

本発明の組成物は、所望により、F D A 認可キットなどの、活性成分を含有する1つ以

50

上の単位剤形を含有し得るパックまたはディスペンサー装置中に提示されてもよい。パックは、例えば、プリスター・パックなどの金属またはプラスチック箔を含むことができる。パックまたはディスペンサー装置は、投与に関する使用説明書が添付されることができる。パックまたはディスペンサーはまた、調剤の製造、使用、または販売を規制する政府機関によって規定される形式で、容器に関する注意書きを備えてもよく、該注意書きは、該機関による組成物またはヒトもしくは動物投与の形式の認可を反映する。かかる注意書きは、例えば、処方薬に関して米国食品医薬品局によって認可されているラベル、または認可されている製品挿入物 (product insert) であってもよい。適合性のある薬学的な担体内に製剤化された本発明の調製物を含む組成物も、上記にさらに詳細にある通り、調製され、適切な容器内に定置され、指示される病態の治療のためにラベル付けされてもよい。

10

【0049】

前述及び以下の説明のどちらも、単に例示的及び説明的なものであり、請求項に記載される本発明を制限するものではないことが理解されるべきである。

【0050】

治療の使用

本発明の別の本発明は、f A 42、f syn、f NM、または f tau に関する疾患が挙げられるがそれらに限定されない、タンパク質の誤った折り畳みによる疾患 (protein misfolding disease) の治療における、本発明のポリペプチド、核酸分子、または組成物のいずれかの使用に関する。

20

【0051】

治療の文脈において、用語「患者」、「対象」、及び「受容者」は、互換的に使用され、ヒト及び他の哺乳類を含む。いくつかの実施形態では、患者は、タンパク質の誤った折り畳みによる疾患に関連付けられるバイオマーカーに関して陽性のヒトである。一実施形態では、患者は、フロルベタピルを用いた PET 画像法によって検出されるときに、-アミロイド沈着を示す。

【0052】

用語「治療する」及びその同族語は、疾患の 1 つ以上の臨床症状を示す患者における疾患の進行の低減、減速、または逆転を意味することを意図される。「治療する」はまた、疾患の 1 つ以上の臨床症状を示す患者における疾患の症状低減、減速、または逆転を意味することも意図される。一実施形態では、患者は、フロルベタピルを用いた PET 画像法によって検出されるときに -アミロイド沈着を示し、-アミロイド沈着の数は治療によって低減される。一実施形態では、患者は、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド組成物によって検出されるときに -アミロイド沈着を示し、-アミロイド沈着の数は、治療によって低減または維持される。別の実施形態では、患者は、PET 画像法によって検出されるときに任意の種類のアミロイド沈着を示し、患者の認知機能は治療によって改善される。認知機能の改善は McKhann et al., Alzheimer's & Dementia 7 (3) : 263 - 9 (2011) の方法及び試験によって分析することができる。

30

【0053】

「予防」は、治療することとは異なり、任意の臨床症状の開始前の個体への組成物の投与を指す。本発明のポリペプチドまたはその組成物のいずれかを使用する予防が、含まれられる。予防は、専ら 1 つ以上の遺伝子マーカーに基づいて、疾患の増加した危険性があることが知られているか、または疾患を発症することが必至と思われる個体に関与することができる。多くの遺伝子マーカーが、種々のタンパク質の誤った折り畳みによる疾患に関して同定されている。例えば、ヒトアミロイド前駆体タンパク質 (hAPP) 中にスウェーデン突然変異、インド突然変異、またはロンドン突然変異のうちの 1 つ以上の有する個体は、早発性アルツハイマー病を発症する増加した危険性を有し、したがって予防の候補者である。同様に、ハンチントン遺伝子中にトリヌクレオチド CAG 反復を有する個体、特に、36 以上の反復を有する個体は、後にハンチントン病を発症することになり、した

40

50

がって予防の候補者である。

【0054】

用語「タンパク質の誤った折り畳み」は、限定されるものではないが、¹⁰ - アミロイド、血清アミロイドA、シスタチンC、IgG 軽鎖、またはブリオンタンパク質などのタンパク質（アミロイド形成ペプチド）を凝集させることによる、アミロイドタンパク質の形成によって特徴付けられる疾患を指す。誤って折り畳まれた、及び／または凝集されたアミロイドタンパク質に関連付けられることが知られている疾患としては、アルツハイマー病（早発性アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、及び発症前アルツハイマー病を含む）、パーキンソン病、SAAアミロイド症、シスタチンC、遺伝性アイスランド病、老衰、多発性骨髄腫、ブリオン病（クールー、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病（GSS）、致死性家族性不眠症（FFI）、スクラピー、及び牛海綿状脳症（BSE）を含むがそれらに限定されない）、筋委縮性側索硬化症（ALS）、脊髄小脳失調（SCA1）、（SCA3）、（SCA6）、（SCA7）、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（entatorubral-pallidoluysian atrophy）、球脊髄性筋萎縮症、遺伝性脳アミロイド血管症、家族性アミロイド症、前頭側頭葉型認知症、イギリス型／デンマーク型認知症、進行性核上性麻痺（Progressive Supranuclear Palsy）（PSP）、及び家族性脳症が挙げられる。本発明のポリペプチド及び組成物は、「タンパク質の誤った折り畳みによる」疾患を治療するために使用することができる。²⁰

【0055】

これらの誤って折り畳まれた、及び／または凝集されたアミロイドタンパク質による疾患の多くは、中枢神経系（CNS）で生じる。CNSで生じる疾患のいくつかの例は、パーキンソン病、アルツハイマー病、前頭側頭葉型認知症（FTD）（以下の臨床症候群を有する患者を含む：行動障害型FTD（b v FTD）、進行性非能弁的失語症（PNA）、及び意味性認知症（SD））、前頭側頭葉変性症（FTLD）、及びハンチントン病である。本発明のポリペプチド及び組成物は、中枢神経系（CNS）で生じる誤って折り畳まれた、及び／または凝集されたアミロイドタンパク質によって特徴付けられる疾患を治療するために使用することができる。³⁰

【0056】

タンパク質の誤った折り畳み及び／または凝集はまた、CNSの外部でも生じことがある。アミロイド症A（AA）（前駆体タンパク質が血清急性相アボリポタンパク質である、SAA）及び多発性骨髄腫（前駆体タンパク質免疫グロブリン軽及び／または重鎖）は、2つの広範に知られているCNSの外部で生じるタンパク質誤った折り畳み及び／または凝集されたタンパク質による疾患である。他の例としては、⁴⁰ 2-ミクログロブリン、トランスチレチン（家族性アミロイド性末梢神経障害[FAP]、家族性アミロイド性心筋症[FAC]、及び老人性全身性アミロイド症[SSA]）、（アボ）血清AA、アボリポタンパク質AI、AII、及びAIV、ゲルゾリン（家族性アミロイド性末梢神経障害のフィンランド型）、リゾチーム、フィブリノゲン、シスタチンC（脳アミロイド血管症、アミロイド症を伴う遺伝性脳出血、アイスランド型）、（プロ）カルシトニン、島アミロイドボリペプチド（IAPPアミロイド症）、心房性ナトリウム利尿因子、プロラクチン、インスリン、ラクタヘドリン（lactahedrin）、ケラトエピセリン、ラクトフェリン、歯性エナメル芽細胞関連タンパク質、ならびにセメノゲリン（semenogelin）Iによって形成されるアミロイドに関与する疾患が挙げられる。本発明のポリペプチド及び組成物は、CNSの外部で生じるタンパク質の誤った折り畳み及び／または凝集に関与する疾患を治療するために使用することができる。

【0057】

神経変性疾患はまた、タウ病変に関する。Lee et al., Ann. Rev. Neurosci. 24: 1121-159 (2001) で考察される。タウタンパク質は、中枢及び末梢神経系の両方のニューロンの軸索内で発現される微小管関連タンパク質⁵⁰

である。神経変性タウオパチー（タウオパチーと称されることもある）が包含される。タウオパチーの例としては、アルツハイマー病、筋委縮性側索硬化症／パーキンソン病・認知症複合病、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクサー認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病、ダウン症、17番染色体に関連付けられるパーキンソン病を伴う前頭側頭型認知症を含む前頭側頭型認知症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハラー・ホルデン・スパツ病、筋強直性ジストロフィー、ニーマン・ピック病C型、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患（Non-Guamanian motor neuron disease with neurofibrillary tangles）、ピック病、脳炎後パーキンソン病、プリオントンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性汎脳炎、及び神経原線維型認知症が挙げられる。これらの疾患のいくつかはまた、線維状アミロイドペプチドの沈着を含む場合がある。例えば、アルツハイマー病は、アミロイド沈着及びタウ病変の両方を示す。同様に、クロイツフェルト・ヤコブ病、プリオントンパク質脳アミロイド血管症、及びゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群などのプリオントン媒介疾患もまた、タウ病変を有する場合がある。したがって、疾患が「タウオパチー」であることを示す兆候は、単に便宜上、提供される他の神経変性疾患分類または群化から、該疾患を排除するように解釈されるべきではない。本発明のポリペプチド及び組成物は、神経変性疾患、及びタウ病変に関与する疾患を治療するために使用することができる。

10

20

【0058】

一実施形態では、薬学的組成物または製剤は、アミロイドの存在に関連する症状を示すか、またはフロルベタピル（AV-45、Eli Lilly）などのタンパク質の誤った折り畳みによる疾患に関連付けられるバイオマーカーに関して陽性である患者における、アミロイドを低減させる方法であって、患者に有効量の本明細書に説明される薬学的組成物または製剤を投与することを含む方法における使用のためである。一実施形態では、投与の経路は、髄膜注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入、または静脈内注射もしくは注入から選択される。

30

【0059】

一実施形態では、薬学的組成物または製剤は、アミロイドの存在に関連する症状を示すか、またはフロルベタピル（AV-45、Eli Lilly）などのタンパク質の誤った折り畳みによる疾患に関連付けられるバイオマーカーに関して陽性である患者における、アミロイドのレベルを維持する方法であって、患者に有効量の本明細書に説明される薬学的組成物または製剤を投与することを含む方法における使用のためである。一実施形態では、投与の経路は、髄膜注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入、または静脈内注射もしくは注入から選択される。

40

【0060】

一実施形態では、薬学的組成物または製剤は、患者におけるアミロイドを脱凝集させる方法であって、アミロイドを有する患者に有効量の本明細書に説明される薬学的組成物または製剤を投与することを含む方法における使用のためである。一実施形態では、投与の経路は、髄膜注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入、または静脈内注射もしくは注入から選択される。

50

一実施形態では、本発明の薬学的組成物または製剤は、脳内の - アミロイド沈着の脱凝集を引き起こす方法であって、それを必要とする患者の脳内に有効量の本明細書に説明される薬学的組成物を直接注射し、それによって脳内の - アミロイド沈着の低減を引き起こすことを含む方法における使用のためである。代替的実施方法では、本発明の薬学的組成物または製剤は、脳内の - アミロイド沈着の脱凝集を引き起こす方法であって、それを必要とする患者に、有効量の本明細書に説明される薬学的組成物を静脈内送達で注射し、それによって脳内の - アミロイド沈着の低減を引き起こすことを含む方法における使用のためである。

【0062】

一実施形態では、薬学的組成物または製剤は、脳内のアミロイド形成を低減させる方法における使用のためである。脳内のアミロイド形成の低減は、タンパク質の誤った折り畳みまたは神経変性疾患の症状または重篤度を防止、治療、または低減させることができる。一実施形態では、投与の経路は、髄膜注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入、または静脈内注射もしくは注入から選択される。

【0063】

一実施形態では、本発明の薬学的組成物または製剤は、脳内のアミロイドクリアランスを促進するための方法における使用のためである。アミロイドクリアランスの促進は、タンパク質の誤った折り畳みまたは神経変性疾患の症状または重篤度を防止、治療、または低減させることができる。一実施形態では、投与の経路は、髄膜注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入、または静脈内注射もしくは注入から選択される。

10

【0064】

一実施形態では、本発明の薬学的組成物または製剤は、脳内のアミロイド凝集を阻害するための方法における使用のためである。脳内のアミロイド凝集の阻害は、タンパク質の誤った折り畳みまたは神経変性疾患の症状または重篤度を防止、治療、または低減させることができる。一実施形態では、投与の経路は、髄膜注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入、または静脈内注射もしくは注入から選択される。

20

【0065】

一実施形態では、本発明の薬学的組成物または製剤は、脳内の毒性アミロイドオリゴマーを除去するための方法における使用のためである。脳内の毒性アミロイドオリゴマーの除去は、タンパク質の誤った折り畳みまたは神経変性疾患の症状または重篤度を防止、治療、または低減させることができる。一実施形態では、投与の経路は、髄膜注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入、または静脈内注射もしくは注入から選択される。

【0066】

一実施形態では、本発明の薬学的組成物または製剤は、脳内の毒性アミロイドオリゴマーの形成を防止するための方法における使用のためである。脳内の毒性オリゴマーの形成の防止は、タンパク質の誤った折り畳みまたは神経変性疾患の症状または重篤度を防止、治療、または低減させることができる。一実施形態では、投与の経路は、髄膜注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入、または静脈内注射もしくは注入から選択される。

30

【0067】

一実施形態では、本発明の薬学的組成物または製剤は、アミロイド損傷からニューロンを保護するための方法における使用のためである。アミロイド損傷からのニューロンの保護は、タンパク質の誤った折り畳みまたは神経変性疾患の症状または重篤度を防止、治療、または低減させることができる。一実施形態では、投与の経路は、髄膜注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入、または静脈内注射もしくは注入から選択される。一実施形態では、アミロイド損傷からのニューロンの保護における使用のための本発明の薬学的組成物または製剤は、予防的に付与される。

40

【0068】

いくつかの実施形態では、患者は、タンパク質の誤った折り畳み及び／または凝集による疾患に関連付けられるバイオマーカーに関して陽性である。一実施形態では、バイオマーカーは、フロルベタピル (AV45、Elisililly) である。

【0069】

いくつかの実施形態では、患者は、アミロイドの存在に関連付けられる神経変性疾患の症状を示している。種々の実施形態では、アミロイドは、fA42、fsyn、fNM、またはftauのいずれかである。

50

【0070】

特定の実施形態では、神経変性疾患は、パーキンソン病、アルツハイマー病、またはハンチントン病である。一実施形態では、神経変性疾患は、アルツハイマー病である。一実施形態では、神経変性疾患は、アルツハイマー病であり、患者は、造影剤フロルベタビル (AV-45、E1i L11y) によって検出されるときに - アミロイドを示す。

【0071】

いくつかの実施形態では、患者は、プリオン媒介疾患の症状を示している。

【0072】

特定の実施形態では、プリオン媒介疾患は、クロイツフェルト・ヤコブ病、クールー、致死性家族性不眠症、またはゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群から選択される。

10

【0073】

いくつかの実施形態では、患者は、アルツハイマー病以外の神経変性タウオパチーの症状を示している。特定の実施形態では、治療される疾患は、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、ボクサー認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病、ダウン症、17番染色体に関連付けられるパーキンソン病を伴う前頭側頭型認知症を含む前頭側頭型認知症、ハラー・ホルデン・スパツツ病、筋強直性ジストロフィー、ニーマン・ピック病C型、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、ピック病、脳炎後パーキンソン病、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性汎脳炎、及び神経原線維型認知症から選択される。

20

【0074】

別の実施形態では、上記の疾患病態のいずれかは、本発明の核酸分子（即ち、低減された免疫原性を示し、アミロイドに結合する、アミロイド斑を脱凝集させる、及び／またはアミロイドの凝集を防止する能力を有する変異型g3pをコードするもの）を、単独で、または例えば、脂質ナノ粒子、ポリマー担体、またはウイルスベクターなどのベクターなどの好適な担体と関連付けて、例えば、吸入及び静脈内注入などの任意の好適な経路によって、患者に直接的に投与することによって治療することができる。この治療に好適な本発明の変異型g3pをコードする核酸分子は、DNAまたはRNAであり得る。

【0075】

30

診断法

本発明の別の態様では、本明細書に説明されるポリペプチド及び組成物は、本明細書に説明される種々の疾患に関連付けられる診断用途に使用される。例えば、インビボかまたはインビトロかのいずれかで造影剤として使用されるとき、本発明の組成物の結合は、説明されるタンパク質の誤った折り畳みによる疾患のうちの1つの診断の一部となり得る。診断薬として使用されるとき、本発明のポリペプチドは、検出可能な標識をさらに含んでもよく、ないしは別の方法で、インビボで検出されてもよい。種々の標識は、タンパク質を標識するための標準的な技術を使用して、診断用組成物のアミロイド結合構成成分に付着させることができる。標識の例としては、蛍光標識及び放射性標識が挙げられる。使用され得る多様な放射性標識が存在するが、概して標識は、¹⁸F、¹¹C、及び¹²³Iを含むがそれらに限定されない、放射性標識から選択されることが多い。これらの及び他の放射性同位体は、周知の化学を使用してタンパク質に付着させることができる。一実施形態では、標識は、陽電子放出断層撮影（PET）を使用して検出される。しかしながら、放射性同位体の検出のための任意の他の好適な技術も、放射性追跡子を検出するために使用されてもよい。

40

【0076】

本発明のポリペプチド及び組成物は、診断用造影剤として、 - アミロイドに特異的な造影剤、例えば、F18-AV-45、E1i L11yと組み合わせて使用することができる。非 - アミロイド凝集体のための既知の造影剤は現在存在しないため、 - アミロイド特異的造影剤との本発明の診断用組成物の使用は、分別検出に基づく非 - アミロイド凝集体の検出をもたらすであろう。したがって、一実施形態では、本発明の診断用

50

組成物は、非 - アミロイド凝集体を検出するために造影剤として - アミロイド造影剤と組み合わせて使用される。

【0077】

別の実施形態では、本発明のポリペプチドまたは組成物は、脳を含む、CNS内で - アミロイドを検出するための診断用造影剤として使用される。

【0078】

本発明の診断用組成物は、治療用組成物に関して説明されるものと同一の経路を使用して投与することができる。一実施形態では、投与の経路は、髄膜注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入、または静脈内注射もしくは注入から選択される。

10

【実施例】

【0079】

実施例1：g 3 p 内のCD4+T細胞エピトープのマッピング

配列番号1のアミノ酸1～240の配列にわたる87個の重複ペプチド（12のアミノ酸重複を有する15のアミノ酸の長さ）を合成し、ヒトCD4+T細胞からの応答についてT細胞エピトープマッピング分析にて試験した。個々のペプチドを、6連のPBM C培養で試験し、エピトープの場所及びそれらの相対的有効性を同定するためにT細胞応答を評価した。

【0080】

PBMC（末梢血単核細胞）を、英国国営輸血サービス（Addenbrooke's Hospital, Cambridge、英国）から得た健康な地域のドナーの（24時間以内に採取した血液に由来する）軟膜から、Addenbrooke病院地域研究倫理委員会による認可に従って、Lymphoprep（Axis-shield, Dundee、英国）密度遠心分離によって単離した。CD8+T細胞を、CD8+RosetteSep（商標）（StemCell Technologies Inc, London、英国）を使用して欠失させた。ドナーは、HLA SSP-PCRベース組織分類キット（Biostest, Solihull、英国）を使用してHLA-DRハプロタイプを同定することによって特徴付けた。対照新抗原タンパク質（IFV及びEBVから抽出したKLHタンパク質（Pierce（Perbio）, Cramlington、英国）及びペプチド）に対するT細胞応答も決定した。次に、PBM Cを凍結させ、必要になるまで液体窒素中で保管した。

20

【0081】

55人のドナーのコホートを、世界人口において発現されるHLA-DRアロタイプの数及び頻度を最もよく表すような分析のために選択した。該コホートにおいて発現されるアロタイプの世界人口において発現されるものに対する分析は、>80%のカバレージが達成されたこと、及び全ての主要なHLA-DR対立遺伝子（世界人口において発現された>5%の頻度を有する個々のアロタイプ）がよく表されたことを示した。個々のドナーハプロタイプの詳細、ならびに世界人口及び標本人口において発現されるMHC II型ハプロタイプの頻度の比較は、表8及び図3にそれぞれ示される。

30

【表8-1】

表8. ドナーの詳細及びハプロタイプ

ドナー番号	ハプロタイプ
1	DRB1*04:01, DRB1*16:01; DRB4*01:03; DQB1*03:02; DQB1*05:02
2	DRB1*01:01, DRB1*13:02; DRB3*03:01; DQB1*05:01; DQB1*06:04
3	DRB1*03:01, DRB1*07:01; DRB3*01:01; DRB4*01:03; DQB1*02:01; DQB1*03:03
4	DRB1*09:01, DRB1*13:01; DRB3*02:02; DQB1*04:01

【表 8 - 2】

ドナー番号	ハプロタイプ
	R B 4 * 0 1 : 0 3 ; D Q B 1 * 0 3 : 0 3 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 3
5	D R B 1 * 1 3 : 0 1 , D R B 1 * 1 3 : 0 2 ; D R B 3 * 0 1 : 0 1 ; D R B 3 * 0 3 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 3 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 4
6	D R B 1 * 0 4 : 0 1 , D R B 1 * 0 4 : 0 7 ; D R B 4 * 0 1 : 0 3 ; D Q B 1 * 0 3 : 0 1
7	D R B 1 * 1 3 : 0 1 ; D R B 3 * 0 1 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 3
8	D R B 1 * 1 3 : 0 1 , D R B 1 * 1 5 : 0 1 ; D R B 3 * 0 2 : 0 2 ; D R B 5 * 0 1 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 2 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 3
9	D R B 1 * 0 4 : 0 1 , D R B 1 * 1 1 : 0 1 ; D R B 3 * 0 2 : 0 2 ; D R B 4 * 0 1 : 0 3 ; D Q B 1 * 0 3 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 3 : 0 2
10	D R B 1 * 0 4 : 0 4 , D R B 1 * 1 2 : 0 1 ; D R B 3 * 0 2 : 0 2 ; D R B 4 * 0 1 : 0 3 ; D Q B 1 * 0 3 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 3 : 0 2
11	D R B 1 * 1 3 : 0 2 , D R B 1 * 1 5 : 0 1 ; D R B 3 * 0 1 : 0 1 ; D R B 5 * 0 1 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 2 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 4
12	D R B 1 * 0 4 : 0 1 , D R B 1 * 1 5 : 0 1 ; D R B 4 * 0 1 : 0 3 ; D R B 5 * 0 1 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 3 : 0 2 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 2
13	D R B 1 * 0 4 : 0 2 , D R B 1 * 0 7 : 0 1 ; D R B 4 * 0 1 : 0 1 ; D R B 4 * 0 1 : 0 3 ; D Q B 1 * 0 2 : 0 1
14	D R B 1 * 0 3 : 0 1 , D R B 1 * 1 6 : 0 1 ; D R B 3 * 0 1 : 0 1 ; D R B 5 * 0 2 : 0 2 ; D Q B 1 * 0 2 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 5 : 0 2
15	D R B 1 * 0 3 : 0 1 , D R B 1 * 1 3 : 0 1 ; D R B 3 * 0 2 : 0 2 ; D Q B 1 * 0 2 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 3
16	D R B 1 * 0 1 : 0 1 , D R B 1 * 1 5 : 0 1 ; D R B 5 * 0 1 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 5 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 2
20	D R B 1 * 0 1 : 0 1 , D R B 1 * 0 7 : 0 1 ; D R B 4 * 0 1 : 0 3 ; D Q B 1 * 0 3 : 0 1
17	D R B 1 * 0 1 : 0 1 , D R B 1 * 0 9 : 0 1 ; D R B 4 * 0 1 : 0 3 ; D Q B 1 * 0 3 : 0 3 ; D Q B 1 * 0 5 : 0 1
18	D R B 1 * 0 1 : 0 1 , D R B 1 * 0 9 : 0 1 ; D R B 4 * 0 1 : 0 3 ; D Q B 1 * 0 3 : 0 3 ; D Q B 1 * 0 5 : 0 1
19	D R B 1 * 0 3 : 0 1 , D R B 1 * 1 1 : 0 2 ; D R B 3 * 0 1 : 0 1 ; D R B 3 * 0 2 : 0 2 ; D R B 3 * 0 2 : 0 2 ; D Q B 1 * 0 2 : 0 2 ; D Q B 1 * 0 2 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 3 : 0 1
20	D R B 1 * 1 3 : 0 1 ; D R B 3 * 0 1 : 0 1 ; D R B 3 * 0 2 : 0 2 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 3
21	D R B 1 * 0 1 : 0 1 , D R B 1 * 1 3 : 0 2 ; D R B 3 * 0 3 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 5 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 4
30	D R B 1 * 0 4 : 0 1 , D R B 1 * 0 4 : 0 3 ; D R B 4 * 0 1 : 0 3 ; D Q B 1 * 0 3 : 0 2
22	D R B 1 * 0 8 : 0 1 , D R B 1 * 1 3 : 0 1 ; D R B 3 * 0 1 : 0 1 ; D R B 3 * 0 1 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 4 : 0 2 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 3
23	D R B 1 * 0 3 : 0 1 , D R B 1 * 1 5 : 0 1 ; D R B 3 * 0 1 : 0 1 ; D R B 5 * 0 1 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 2 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 2
24	D R B 1 * 0 3 : 0 1 , D R B 1 * 1 5 : 0 1 ; D R B 3 * 0 1 : 0 1 ; D R B 5 * 0 1 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 2 : 0 1 ; D Q B 1 * 0 6 : 0 2

【表 8 - 3】

ドナー番号	ハプロタイプ
25	DRB1*03:01, DRB4*01:01; DRB3*01:01; DRB4*01:03; DQB1*02:01; DQB1*03:01
26	DRB1*01:01, DRB1*15:01; DRB5*01:01; DQB1*05:01; DQB1*06:02
27	DRB1*04:04, DRB1*07:01; DRB4*01:01; DRB4*01:03; DQB1*02:02; DQB1*03:02
28	DRB1*11:01, DRB1*15:01; DRB3*02:01; DRB5*01:01; DQB1*03:01; DQB1*06:01
29	DRB1*08:01, DRB1*15:01; DRB5*01:01; DQB1*04:02; DQB1*06:02
30	DRB1*13:02, DRB1*15:01; DRB3*03:01; DRB5*01:01; DQB1*06:02; DQB1*06:09
31	DRB1*04:01, DRB1*16:01; DRB4*01:03; DRB5*02:02; DQB1*03:02; DQB1*06:03
32	DRB1*13:02, DRB1*15:01; DRB3*03:01; DRB5*01:01; DQB1*06:02; DQB1*06:04
33	DRB1*07:01, DRB1*11:04; DRB3*02:02; DRB4*01:01; DQB1*02:02; DQB1*03:01
34	DRB1*01:03, DRB1*15:01; DRB5*01:01; DQB1*03:01; DQB1*06:02
35	DRB1*03:01, DRB1*14:01; DRB3*01:01; DRB3*02:02; DQB1*02:01; DQB1*05:03
36	DRB1*03:01, DRB1*08:01; DRB3*01:01; DQB1*02:01; DQB1*04:02
37	DRB1*03:01, DRB1*11:01; DRB3*01:01; DRB3*02:02; DQB1*02:01; DQB1*03:01
38	DRB1*07:01, DRB1*15:01; DRB4*01:03; DRB5*01:01; DQB1*02:02; DQB1*06:02
39	DRB1*03:01, DRB1*13:02; DRB3*02:02; DRB3*03:01; DQB1*02:01; DQB1*06:09
40	DRB1*01:01, DRB1*13:02; DRB3*01:01; DQB1*05:01; DQB1*06:04
41	DRB1*04:07, DRB1*15:01; DRB4*01:03; DRB5*01:01; DQB1*03:01; DQB1*06:02
42	DRB1*07:01; DRB4*01:03; DQB1*02:02; DQB1*03:03
43	DRB1*03:01, DRB1*15:01; DRB3*01:05; DRB5*01:01; DQB1*02:01; DQB1*06:02
44	DRB1*07:01, DRB1*11:04; DRB3*02:02; DRB4*01:01; DQB1*02:02; DQB1*03:01

【表8-4】

ドナー番号	ハプロタイプ
45	DRB1*03:01, DRB1*04:04; DRB3*01:01; DRB4*01:03; DQB1*02:01; DQB1*03:02
46	DRB1*04:04, DRB1*13:01; DRB3*02:02; DRB4*01:03; DQB1*03:02; DQB1*06:03
47	DRB1*04:01, DRB1*11:01; DRB3*02:02; DRB4*01:03; DQB1*03:01
48	DRB1*03:01, DRB1*04:01; DRB3*01:06; DRB4*01:03; DQB1*02:01; DQB1*03:02
49	DRB1*01:02, DRB1*13:03; DRB3*01:01; DQB1*03:01; DQB1*05:01
50	DRB1*04:07, DRB1*15:01; DRB4*01:03; DRB5*01:01; DQB1*03:01; DQB1*06:02
51	DRB1*04:07, DRB1*13:02; DRB3*03:01; DRB4*01:03; DQB1*03:01; DQB1*06:04
52	DRB1*03:01; DRB3*01:05; DQB1*02:01
53	DRB1*03:01, DRB1*07:01; DRB3*01:01; DRB4*01:01; DQB1*02:01; DQB1*02:02
54	DRB1*04:04, DRB1*15:01; DRB4*01:03; DQB1*03:02; DQB1*06:02
55	DRB1*03:01, DRB1*04:01; DRB3*01:01; DRB4*01:03; DQB1*02:01; DQB1*03:01

【0082】

各ドナーに由来するPBMCを解凍して計数し、生存率を評価した。細胞を、細胞密度を $2 \sim 3 \times 10^6$ PBMC / ml (増殖細胞ストック) に調節する前に、室温のAIM-V (登録商標) 培地 (Invitrogen, Paisley、英国) で復活させた。5個のアミノ酸の長さのペプチドを、遊離N末端アミン及びC末端カルボン酸を有する1~3mgスケール上で合成した。ペプチドを、DMSO中で10mMの濃度に溶解させ、ペプチド培養ストックを、AIM-V (登録商標) 培地内へ5μMのウェル内最終濃度に希釈することによって調製した。各ペプチド及び各ドナーに関して、6連培養を平底96ウェルプレート内で確立した。正及び陰性対照培養物も6連で試験した。各ドナーに関して、3つの対照 (IFV及びEBVから抽出したKLHタンパク質及びペプチド) も含まれた。陽性対照のために、PHA (Sigma, Dorset、英国) を $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度で使用した。

【0083】

培養物を、合計で6日間定温放置した後、 $0.75 \mu\text{Ci}^3[\text{H}]$ -チミジン (Perkin Elmer (登録商標) , Beaconsfield、英国) を各ウェルに添加した。培養物を、さらに18時間定温放置した後、TomTec Mach III細胞採取器を使用して濾過マット上で採取した。各ウェルに関するCpmを、MeltiLex (商標) (Perkin Elmer (登録商標) , Beaconsfield、英国) シンチレーション計数によって、パララックス、低バックグラウンド計数モードでMicroplate Beta Counter (Perkin Elmer (登録商標) , Beaconsfield、英国) 上で決定した。

【0084】

10

20

30

40

50

データ分析のために、S I 2 . 0 0 以上の刺激指標 (S I) の閾値を使用した (ボーダーライン S I 1 . 9 0 ~ 1 . 9 9 応答を考慮)。陽性応答は、以下の統計的及び経験的閾値によって定義した。

1 . 独立 2 標本スチュードント *t* 検定を使用して試験ウェルの c p m を培地対照ウェルと比較することによる、応答の有意性 (p < 0 . 0 5)。

2 . 2 . 0 0 超の刺激指標 (S I 2 . 0 0)、S I = 試験ウェルの平均 c p m / 平均 c p m 培地対照ウェルである。この方法で提示されるデータは、S I 2 . 0 0、p < 0 . 0 5 として示される。

【0085】

それに加えて、分析間変動を、同型培養のローデータの C V 及び S D を算出することによって評価した。増殖分析は、6 連培養において設定した (「非調節データ」)。分析間変動性が低かったことを確実にするために、データを、最大及び最小 c p m 値を除去した後にも分析し (「調節データ」)、ドナー応答の S I を、両データセットを使用して比較した。T 細胞エピトープを、本研究における全ペプチドに対する陽性応答 (上記に定義される) の平均頻度、及びバックグラウンド応答率を付与するために S D を算出することによって同定した。調節及び非調節データの両方における、バックグラウンド応答率を上回る増殖性応答を誘発した任意のポリペプチドを、T 細胞エピトープを含有すると見なした。2 個の重複ペプチドが増殖性応答率を誘発した場合、T 細胞エピトープは、重複領域内にあると見なした。これに基づき、以下の T 細胞エピトープを試験ポリペプチドにおいて同定した：

エピトープ 1 : C T G D E T Q C Y G T W (配列番号 1 のアミノ酸 4 6 ~ 5 7)

エピトープ 2 : T F M F Q N N R F R N R (配列番号 1 のアミノ酸 1 3 3 ~ 1 4 4)

エピトープ 3 : S S K A M Y D A Y W N G (1 9 4 ~ 2 0 5 配列番号 1 のアミノ酸)

エピトープ 4 : P V N A G G G S G G G S (配列番号 1 のアミノ酸 2 1 4 ~ 2 2 5)

エピトープ 5 : S G S G A M V R S D K T H T C (配列番号 1 のアミノ酸 2 5 3 ~ 2 6 7)

【0086】

実施例 2 : インシリコ分析による T 細胞エピトープ 4 及び 5 の中の突然変異の設計

T 細胞分析において陽性であるペプチドの配列を、i T o p e (商標) 及び T C E D (商標) インシリコ技術を使用して、エピトープ領域からの重複 9 - m e r を使用して分析した。 [P e r r y e t a l . , D r u g s R D 9 (6) : 3 8 5 - 9 6 (2 0 0 8)。] 各 9 - m e r を、M H C I I 型対立遺伝子のデータベース (合計 3 4) に対して試験し、M H C I I 型分子との適合及び相互作用に基づいてスコア化した。それに加えて、各 9 - m e r を、既知の C D 4 + T 細胞エピトープのデータベースに対して B L A S T 検索して、9 - m e r のものと、先行の T 細胞分析において T 細胞応答を刺激した非関連タンパク質に由来するデータベースペプチドのものとの間の任意の高配列相同を同定した。インシリコ分析からの情報に基づき、突然変異を、同定されたエピトープからの C D 4 + T 細胞エピトープ活性の潜在的除去に関して同定した。

【0087】

エピトープ 5 は、天然 N 2 - C T G 1 y 豊富リンカーの C 末端、配列番号 1 の N 1 - N 2 - ヒト I g F c 融合タンパク質を産生するために使用される p F U S E ベクターの複数のクローニング部位 (「M C S」) によってコードされるアミノ酸、及びヒト I g F c 領域の N 末端にわたる。インシリコ分析は、配列番号 1 の M 2 5 8 及び V 2 5 9 に P 1 アンカー応答性 T 細胞活性として関与した。N 1 - N 2 コード領域の外部のそれらの場所に基づき、これらの 2 つのアミノ酸の除去は、機能の損失を引き起こさないようには予測されなかった。これらの 2 つのアミノ酸は、M C S によってコードされた。したがって、M

10

20

30

40

50

C S を修飾し、配列番号 1 の M 2 5 8 及び V 2 5 9 をコードするスクレオチドを排除した二本鎖 D N A 分子が、適切なオリゴスクレオチドプライマーを使用した部位特異的突然変異生成によって產生された。その後、M C S 内の E c o R I 及び B g l I I 制限部位を使用して使用して、得られた突然変異 D N A 配列を p F U S E ベクター内へ戻して再クローニングした。得られた成熟（シグナル配列を欠失する）融合タンパク質は、M 2 5 8 及び V 2 5 9 を除外した。そのアミノ酸配列は、配列番号 2 に記載され、配列番号 5 によってコードされる。その融合タンパク質は、下記の分析において、A に結合する、配列番号 1 融合タンパク質と同じ能力を保持した。

【0088】

エピトープ 4 は、N 2 ドメイン及び天然 G 1 y 豊富リンカーに重複する。g 3 p タンパク質の結晶構造（図示無し）は、エピトープ 4 は、アミロイド結合領域から離れて位置し、したがって活性に影響を及ぼすことなくアミノ酸置換に耐性であろうことを示唆した。P 1 アンカーとして同定された V 2 1 5（配列番号 2）は、タンパク質コアに向かって側鎖の僅かな配向を伴って露出される表面である。構造的分析から、表 6 及び 7 に記載の V 2 1 5 に関する置換のいずれも、エピトープを除去するはずである。それに加えて、表 6 及び 7 に記載のこのエピトープ内の他のアミノ酸の置換のいずれかもまた、含まれるはずである。V 2 1 5 A 置換（配列番号 6）を含む N 1 - N 2 - I g F c をコードする核酸を、適切なオリゴスクレオチドプライマーを使用した部位特異的突然変異生成によって、配列番号 5 から抽出した。得られる成熟融合タンパク質（配列番号 3）は、結合分析において、配列番号 1 かまたは配列番号 2 かのいずれかのアミノ酸配列を有する融合タンパク質と比較して増加した A への結合を実証した。配列番号 6 の核酸配列は、エピトープ 1、2、及び 3 中に全ての修飾を組み込む遺伝子を作製するための親配列として使用した。

【0089】

実施例 3：インシリコ分析による T 細胞エピトープ 1、2、及び 3 の中の突然変異の設計
エピトープ 1 は、N 1 ~ N 2 の推定上の A 結合部分に対してちょうど C 末端に存在する。エピトープ 1 のインシリコ分析は、アミノ酸置換及び T 細胞エピトープの除去のための領域として配列番号 1 のアミノ酸 4 8 ~ 5 6 を強調した。この 9 - m e r 内のアミノ酸を、g 3 p の X 線結晶構造から解釈して、既存のアミノ酸の性質、表面曝露、及び g 3 p のアミロイド結合領域との相互作用に基づいて、置換に関して標的した。具体的には、G 4 8、T 5 1、Y 5 4、及び T 5 6 を、表 1 に指示される変化による置換に関して標的した。この領域内の他の潜在的アミノ酸置換は、表 2 に記載される。

【0090】

エピトープ 2 の i T o p e（商標）分析は、配列番号 1 のアミノ酸 1 3 5 ~ 1 4 3 を、そのエピトープ低減または排除するための標的として指した。X 線結晶構造に基づくと、配列番号 1 のアミノ酸 1 3 6 ~ 1 3 9 は、N 1 ~ N 2 のヒンジ領域との結合を形成するループ領域を形成し、したがってアミロイド結合活性にとって重要であり得る。これらのアミノ酸に対する変化は、より好ましくなく、表 2 にのみ提示される。より好ましい変化は、M 1 3 5、R 1 4 0、F 1 4 1、及び N 1 4 3 に対するものであり、また表 1 に記載される。この 9 つのアミノ酸領域に対する他の潜在的変化は、表 2 に記載される。

【0091】

配列番号 1 のアミノ酸 1 7 3 ~ 1 8 2 は、インシリコ分析によって置換のための標的としてエピトープ 3 内に同定された。エピトープ 3 は、N 2 ドメインの 螺旋状部分内に位置し、したがって戦略は、疎水性残基及び小さい極性非荷電残基の導入を回避することであった。それに加えて、我々は、このエピトープの C 末端に向かった極性残基酸性残基の導入を回避することを望んだ。X 線結晶学的データに基づき、我々は、S 1 7 3、D 1 7 4、M 1 7 6、D 1 7 8、及び W 1 8 2 を、表 1 に指示される変化を有する置換に関して標的した。この領域内の他の潜在的アミノ酸置換は、表 2 に記載される。

【0092】

実施例 4：低減された T 細胞エピトープを有する N 1 - N 2 - ヒト I g G F c ポリペプチドの生成

10

20

30

30

40

50

各々、表3に記載の異なる単一のアミノ酸置換を含有するN1-N2-ヒトIgGFc融合タンパク質をコードする、58個の異なる核酸分子を調製した。これは、適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、所望の置換を導入した後、PCR増幅突然変異配列をpFUSE-hIgG1-Fc2ベクター(Invivogen(登録商標)、Toulouse, フランス、カタログ番号pfuse-hg1fc2)内に再クローニングする、配列番号6の部位特異的突然変異生成によって達成された。

【0093】

これらの「脱免疫化」Fc融合ポリペプチドをコードする遺伝子を、FreeStyle 293-F細胞(Invitrogen, Paisley, Scotland、カタログ番号R790-07)中で個々のpFUSE-hIgG1-Fc2ベクター内で一時的に発現させた。形質移入の日、細胞を、FreeStyle 293培地(Invitrogen, カタログ番号12338)中で 1×10^6 / mLに希釈して、>90%の生存率を確実にした。プラスミドDNA及びポリエチレンイミン(PEI)を、Optimem(Invitrogen、カタログ番号31985)中で別々に希釈し、5分間定温放置した後、PEIをゆっくりとDNAに添加し、DNA/PEI混合物を室温で5分間定温放置した。定温放置後、DNA/PEI混合物を、フラスコを回転させながら293-F細胞に滴下した。形質移入した培養物を、135 rpmで回転するオービタルシェーカーブラットフォーム上で37、8%CO₂で6~7日間定温放置した後、採取した。

【0094】

ポリペプチドを含有する培地を遠心分離によって採取し、10×PBSを使用してpH調節した。タンパク質を、4で一晩回転させることによってProtein A Sepharoseビーズ(Sigma Dorset、英国)に結合させた。ビーズを1×PBSで2回洗浄し、Sigma Prepスピンカラム(Sigma)に移した。試料を、0.1MのグリシンpH3.0を使用して遠心分離によって溶出させ、1/10の容積の1MのTris-HCl pH8.0を使用して収集管内で中和した。溶出液を、2mLのZeba Spinカラム(Pierce, Cramlington、英国、カタログ番号89890)を使用して1×PBS中へ緩衝液交換した。試料を、濾過滅菌し、280nmでの吸収度を各試料に関して測定した。

【0095】

実施例5：脱免疫化ポリペプチドのA結合分析

A.A(A)線維調製。A42(1mg、rペプチドA-1002-2)を、ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP、1mL)中へ溶解させ、完全にボルテックスし、透明な溶液が現れるまで2~18時間室温で定温放置した。アリコート(100μl、100μg)を、1.5mLのEppendorf管内に定置し、真空下で2~3時間乾燥させた(speed Vac, Eppendorf, Concentrator 5301)。得られたモノマーを、20μLのDMSO中で再懸濁し、ピペットで採取し、完全に溶解するまで完全にボルテックスした。溶液を、260μLの10mMのHCl溶液で希釈し(最終A42濃度は80μMである)、20秒間ボルテックスした。透明な溶液を、37で3日間(振盪せずに)定温放置して、凝集を可能にする。分析における使用のため、得られたストック溶液からのA42線維を、1.6μMの最終濃度にPBS中で50倍に希釈した。

【0096】

B.ELISAプレート調製。96-ウェルプレート(F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE、カタログ番号442404、ロット125436及び128158、デンマーク)の各ウェルに、200μLの1%BSA溶液を添加した。プレートを密封し、7で3時間定温放置した。次に、プレートをPBS(250μL/ウェル)で3回洗浄した。50μLの希釈したA42線維溶液(1.6μM)を各ウェルに添加し、蓋をせずに37で一晩定温放置して完全に乾燥させた。PBS(50μL/ウェル)を対照ウェル(A42線維を有さない)に添加した。次に、プレートを水で2回、PBSで1回洗浄した(各洗浄に関して250μL/ウェル)。

10

20

30

40

50

【0097】

C. E L I S A 分析。50 μ L 中の種々の濃度の各ポリペプチド（及び、配列番号 3 のポリペプチド）を、各ウェル、及び非 A 42 線維でコーティングしたウェルに添加し、37 で 1 時間定温放置した。次に、プレートを P B S - T (P B S 中の 0.05% Tween 20) で 3 回、及び P B S で 3 回洗浄した（各洗浄に関して 250 μ L / ウェル）。次に、各ウェルに 50 μ l の H R P 共役ヤギ抗ヒト抗 Fc (Jackson Labs 、カタログ番号 109-035-008 、ロット番号 106617) を添加し、P B S - T + 1% Milk (Difco (商標) Skim Milk , Becton , Dickinson and Company 、米国、カタログ番号 232100 、ロット番号 7320448) 中で 1 : 2500 (最終 0.32 μ g / mL) に希釈し、37 で 40 分間定温放置した。次に、プレートを P B S - T で 6 回、及び P B S で 2 回洗浄した（各洗浄に関して 250 μ L / ウェル）。次に、50 μ l / ウェルの O P D 溶液を添加し (15 mg / 7.5 mL 、 0.05 M のクエン酸塩緩衝液、 pH - 5.5 / 3 μ l の H₂O₂) 、 3 ~ 6 分間着色させた。次に、25 μ l / ウェルの 4 N HCl 溶液を添加して、反応を停止した。プレートを、492 nm 及び 405 nm での吸光度に関して読み取った。405 nm での吸収度を、492 nm での吸収度から減算し、結果をポリペプチド濃度の関数としてプロットした。次に、各脱免疫化ポリペプチドの結合に関する I C₅₀ を算出し、配列番号 3 のポリペプチドに関して算出した I C₅₀ と比較した。結果は下記の表 9 に示される。

【表9-1】

表9. 配列番号3のポリペプチドと比較してエピトープ1、2、または3中の单一の追加のアミノ酸置換を有するポリペプチドに関する、A_β結合IC₅₀の相対的变化

アミノ酸置換	配列番号3に対するIC ₅₀ *
エピトープ1 G48H	1. 8
エピトープ1 G48K	1. 1
エピトープ1 G48R	1. 9
エピトープ1 G48S	1. 2
エピトープ1 G48T	1. 0
エピトープ1 T51G	0. 8
エピトープ1 T51H	1. 5
エピトープ1 T51K	2. 5
エピトープ1 T51P	0. 2
エピトープ1 T51R	2. 0
エピトープ1 T51Q	0. 8
エピトープ1 T51N	0. 5
エピトープ1 Y54G	0. 02/0. 2
エピトープ1 Y54H	0. 3
エピトープ1 Y54K	0. 13/0. 32
エピトープ1 Y54P	0. 07
エピトープ1 Y54R	0. 15/0. 25
エピトープ1 T56G	0. 1
エピトープ1 T56H	0. 47/0. 77
エピトープ1 T56K	0. 5/0. 66
エピトープ1 T56P	0. 1/0. 09
エピトープ1 T56R	0. 8
エピトープ2 M135A	0. 4
エピトープ2 M135D	0. 5
エピトープ2 M135G	0. 2
エピトープ2 M135H	0. 1
エピトープ2 M135K	0. 4/0. 2
エピトープ2 M135N	0. 3
エピトープ2 M135R	0. 1
エピトープ2 M135T	0. 14/0. 3
エピトープ2 R140A	0. 2
エピトープ2 R140D	0. 3
エピトープ2 R140E	0. 3
エピトープ2 R140G	0. 2
エピトープ2 R140H	0. 2

【表9-2】

アミノ酸置換	配列番号3に対するIC ₅₀ *
エピトープ2 R140Q	0. 28 / 0. 22
エピトープ2 F141D	0. 2
エピトープ2 F141E	0. 2
エピトープ2 N143A	1. 9 / 1. 1
エピトープ2 N143G	0. 19 / 0. 08
エピトープ3 S173G	0. 2
エピトープ3 S173P	0. 4
エピトープ3 M176G	0. 3
エピトープ3 M176H	0. 4
エピトープ3 M176K	0. 2
エピトープ3 M176N	0. 5
エピトープ3 D178G	0. 2
エピトープ3 D178N	0. 5 / 0. 4
エピトープ3 D178Q	0. 6
エピトープ3 D178S	0. 3
エピトープ3 W181G	0. 5
エピトープ3 W181H	0. 47 / 0. 87
エピトープ3 W181K	0. 3
エピトープ3 W181R	0. 5 / 0. 8
エピトープ3 S173K	0. 17 / 0. 07
エピトープ3 K174R	1. 2 / 1. 0
エピトープ3 M176R	0. 2
エピトープ3 D178T	0. 4

*数は、IC₅₀（置換ポリペプチド）/IC₅₀（配列番号3のポリペプチド）を反映している。

複数の値は、結合分析における二重反復試験を反映している。

【0098】

実施例6：全タンパク質CD4+T細胞応答の分析

本発明のポリペプチドのいずれかからのCD4+T細胞応答を配列番号1と比較して分析するために、全タンパク質T細胞分析を実施した。PBM Cを、実施例1の通りに調製した20個の健康なヒトドナー軟膜から単離した。PBM Cを、AIM-V（登録商標）培地中での凍結から復活させ、CD14⁺細胞をMiltenyi CD14 Microbeads及びLSカラム（Miltenyi Biotech, Oxford、英国）を使用して単離した。単球を、1000U/mlのIL-4及び1000U/mlのGM-CSFを補充した（「DC培地」）AIM-V（登録商標）中で4~6×10⁶のPBM C/mlに再懸濁し、次に24ウェルプレートに分配した（最終培養体積2ml）。2日目に、DC培地の体積の半分を取り換えることによって細胞に栄養を供給した。3日目までに、単球は半成熟樹枝状細胞（DC）に分化し、それは40ug/mlの試験ポリペプチドか、もしくは40ug/mlの配列番号1のポリペプチド及び100μg/mlのKLHかのいずれかを含む抗原と共に、または培地のみで予備定温放置された。半成熟DCを、抗原と共に24時間定温放置した後、細胞を2回洗浄することによって過剰抗原を除去し、50ng/mlのTNF-（Protech, London、英国）を補充したDC培地中に再懸濁した。7日目に、50ng/mlのTNF-を補充したDC培地の体積の半分を取り換えることによってDCに栄養を供給し、8日目に、成熟DCを

10

20

30

40

50

採取した。採取した成熟DCを計数し、トリパンブルー色素排除を使用して生存率を評価した。次に、DCを線照射(4000rad)し、1ml当たり 2×10^5 個の細胞でAIM-V培地中に再懸濁した後、下記のT細胞増殖の分析及びELISpot分析に使用した。それに加えて、8日目に、新鮮なCD4+T胞も調製した。CD4+T細胞を精製するために、PBMCをAIM-V(登録商標)培地で復活させ、Milltenyi CD4 Microbeads及びLSカラム(Milltenyi Biotech, Oxford、英国)を使用してCD4+細胞を単離し、 2×10^6 細胞/mlでAIM-V(登録商標)培地で再懸濁した。

【0099】

8日目に、T細胞増殖分析を確立し、それによって、 1×10^5 個の自己CD4+T細胞を、200ul/ウェルの最終体積に添加されたAIM-V(登録商標)培地を伴う96ウェルU底プレート内で 1×10^4 個の抗原負荷DC(10:1の比)に添加した。14日目に、分析プレートを、25ulのAIM-V(登録商標)中で6時間、1ウェル当たり1uのCi [3 H](Perkin Elmer, Beaconsfield、英国)でパルス化した後、TomTec Mach III(Hamden CT、米国)細胞採取器を使用して濾過マット(Perkin Elmer)上に採取した。全てのポリペプチドは、6連培養で試験した。各ウェルの毎分当りの計数(cpm)を、Milliplex(商標)(Perkin Elmer)シンチレーション計数によって、パララックス、低バックグラウンド計数で1450 Milliplex Wallac Trillux Liquid Scintillation Counter(Perkin Elmer)上で決定した。各抗原の毎分当りの計数を、AIM-V(登録商標)培地のみ対照に対して正規化した。

【0100】

ELISpot分析のために、ELISpotプレート(Millipore, Watsford、英国)を、100ul/ウェルのIL-2捕捉抗体(R&D Systems, Abingdon、英国)で、PBS中でコーティングした。次に、プレートをPBS中で2回洗浄し、プロック緩衝液(PBS中の1%BSA(Sigma))中で一晩定温放置し、AIM-V(登録商標)培地で洗浄した。8日目に、 1×10^5 個の自己CD4+T細胞を、96ウェルELISpotプレート中の 1×10^4 個の抗原負荷DC(10:1の比)に添加した。全てのポリペプチド調製物は、6連培養で試験した。各ドナーPBMCに関して、陰性対照(AIM-V(登録商標)培地単独)、無細胞対照、及びPHA(10ug/ml)陽性対照も含まれた。

【0101】

さらに7日の定温放置期間の後、ELISpotプレートを、dH₂O及びPBS中の3回の連続的洗浄によって発展させた後、100ulの濾過ビオチン化検出抗体(R&D Systems, Abingdon、英国)をPBS/1%BSA中で添加した。37、1.5時間の定温放置後、プレートをPBS中でさらに3回洗浄し、PBS中の100ulの濾過ストレプトアビジン-AP(R&D Systems)/1%BSAを1時間添加した(室温で定温放置)。ストレプトアビジン-APを廃棄し、プレートをPBS中で4回洗浄した。BCIP/NBT(R&D Systems)を各ウェルに添加し、室温で30分間定温放置した。ウェル及びウェルの背面をdH₂Oで3回洗浄することによって、スポットの発展を停止した。乾燥させたプレートをImmunoscan(商標)Analyser上でスキャンし、1ウェル当りのスポット(spw)をImmunoscan(商標)Version 4ソフトウェアを使用して決定した。

【0102】

増殖及びIL-2 ELISpot分析の両方に関して、結果は、陽性T細胞応答に関する2以上のSI閾値(SI 2.0)を使用して、試験ポリペプチドのcpm(増殖分析)またはスポット(ELISpot分析)の培地のみ対照に対する比として定義される、刺激指標(SI)として表した。

【0103】

10

20

30

40

50

実施例 7 : T 細胞エピトープ 1、2、及び 3 のうちの 2 つ以上のうちの二重及び三重突然変異の設計。

結合分析の結果に基づいて、以下の置換を、エピトープ 1、2、及び 3 において、配列番号 3 と比較して 2 つのアミノ酸置換を含有するポリペプチド中に存在し、各置換は異なるエピトープ中にあるように選択した。

【表 10】

表 10. 2 つのエピトープ及び 3 つのエピトープ修飾を含む変異型に関するアミノ酸置換。

エピトープ	アミノ酸	配列番号 3 内の元のアミノ酸	置換アミノ酸
1	5 4	Y	K, R
1	5 6	T	H, K
2	1 3 5	M	K, T
2	1 4 0	R	Q
3	1 7 4	K	R
3	1 7 8	D	N
3	1 8 1	W	H, R

10

【0104】

表 10 に記載のアミノ酸置換のうちの 2 つを各々が異なるエピトープ中にある状態で有する N1 - N2 - ヒト I G F c 融合タンパク質をコードする DNA を、適切な開始 DNA (典型的には、実施例 3 に記載される通りに調製される 2 つの突然変異のうちの 1 つをコードする DNA) の部位特異的突然変異生成を使用することによって調製した。得られたこれらの融合タンパク質をコードする DNA を使用して、細胞を形質転換し、実施例 4 に記載される通りに発現させ、精製し、実施例 5 に記載される通り結合に関して試験した。次に、エピトープ 1、2、及び 3 の各々の中に 1 つの置換を有するポリペプチドを、2 つのアミノ酸置換ポリペプチドの結合分析の結果に基づいて設計した。エピトープ 1、2、及び 3 の各々の中に 1 つの置換を有するポリペプチドを、実施例 6 に記載される通り、A 結合及び T 細胞応答の両方に関して分析する。具体的には、以下の二重及び三重エピトープ変異型を、下記の表 11 に指示される通り、配列番号 3 または配列番号 7 中の特定のアミノ酸を置換することによって作製した。

20

30

【表 11-1】

表 11. 本発明の二重及び三重エピトープ変異型ポリペプチド。

ポリペプチド番号	開始配列	エピトープ 1 置換	エピトープ 2 置換	エピトープ 3 置換
6 3	配列番号 3	Y 5 4 K	M 1 3 5 K	
6 4	配列番号 3	Y 5 4 K	M 1 3 5 T	
6 5	配列番号 3	Y 5 4 K	R 1 4 0 Q	
6 6	配列番号 3	Y 5 4 R	M 1 3 5 K	
6 7	配列番号 3	Y 5 4 R	M 1 3 5 T	
6 8	配列番号 3	Y 5 4 R	R 1 4 0 Q	
6 9	配列番号 3	T 5 6 H	M 1 3 5 K	
7 0	配列番号 3	T 5 6 H	M 1 3 5 T	
7 1	配列番号 3	T 5 6 H	R 1 4 0 Q	
7 2	配列番号 3	T 5 6 K	M 1 3 5 K	
7 3	配列番号 3	T 5 6 K	M 1 3 5 T	
7 4	配列番号 3	T 5 6 K	R 1 4 0 Q	
7 5	配列番号 3	Y 5 4 K		D 1 7 8 N
7 6	配列番号 3	Y 5 4 K		W 1 8 1 H
7 7	配列番号 3	Y 5 4 K		W 1 8 1 R
7 8	配列番号 3	Y 5 4 K		K 1 7 4 R
7 9	配列番号 3	Y 5 4 R		D 1 7 8 N
8 0	配列番号 3	Y 5 4 R		W 1 8 1 H
8 1	配列番号 3	Y 5 4 R		W 1 8 1 R
8 2	配列番号 3	Y 5 4 R		K 1 7 4 R
8 3	配列番号 3	T 5 6 H	D 1 7 8 N	
8 4	配列番号 3	T 5 6 H		W 1 8 1 H

10

20

30

【表 11-2】

ポリペプチド番号	開始配列	エピトープ1置換	エピトープ2置換	エピトープ3置換
8 5	配列番号3	T 5 6 H		W 1 8 1 R
8 6	配列番号3	T 5 6 H		K 1 7 4 R
8 7	配列番号3	T 5 6 K		D 1 7 8 N
8 8	配列番号3	T 5 6 K		W 1 8 1 H
8 9	配列番号3	T 5 6 K		W 1 8 1 R
9 0	配列番号3	T 5 6 K		K 1 7 4 R
9 1	配列番号3		M 1 3 5 K	D 1 7 8 N
9 2	配列番号3		M 1 3 5 K	W 1 8 1 H
9 3	配列番号3		M 1 3 5 K	W 1 8 1 R
9 4	配列番号3		M 1 3 5 K	K 1 7 4 R
9 5	配列番号3		M 1 3 5 T	D 1 7 8 N
9 6	配列番号3		M 1 3 5 T	W 1 8 1 H
9 7	配列番号3		M 1 3 5 T	W 1 8 1 R
9 8	配列番号3		M 1 3 5 T	K 1 7 4 R
9 9	配列番号3		R 1 4 0 Q	D 1 7 8 N
1 0 0	配列番号3		R 1 4 0 Q	W 1 8 1 H
1 0 1	配列番号3		R 1 4 0 Q	W 1 8 1 R
1 0 2	配列番号3		R 1 4 0 Q	K 1 7 4 R
1 1 0	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	D 1 7 8 N
1 1 1	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	W 1 8 1 H
1 1 2	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	W 1 8 1 R
1 1 3	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	K 1 7 4 R
1 1 4	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	D 1 7 8 N
1 1 5	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	W 1 8 1 H
1 1 6	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	W 1 8 1 R
1 1 7	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	K 1 7 4 R
1 1 8	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 K	D 1 7 8 N
1 1 9	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 K	W 1 8 1 H
1 2 0	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 K	W 1 8 1 R
1 2 1	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 K	K 1 7 4 R
1 2 2	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 T	D 1 7 8 N
1 2 3	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 T	W 1 8 1 H
1 2 4	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 T	W 1 8 1 R
1 2 5	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 T	K 1 7 4 R
1 2 6	配列番号7	Y 5 4 K	M 1 3 5 K	K 1 7 4 R
1 2 7	配列番号7	Y 5 4 K	M 1 3 5 T	K 1 7 4 R
1 2 8	配列番号7	Y 5 4 R	M 1 3 5 K	K 1 7 4 R
1 2 9	配列番号7	Y 5 4 R	M 1 3 5 T	K 1 7 4 R
1 3 0	配列番号7	T 5 6 H		D 1 7 8 N
1 3 1	配列番号7	T 5 6 H		W 1 8 1 H

10

20

30

40

【表 1 1 - 3】

ポリペプチド番号	開始配列	エピトープ1置換	エピトープ2置換	エピトープ3置換
132	配列番号7	T 5 6 H		W 1 8 1 R
133	配列番号7	T 5 6 H		K 1 7 4 R
134	配列番号7	T 5 6 K		D 1 7 8 N
135	配列番号7	T 5 6 K		W 1 8 1 H
136	配列番号7	T 5 6 K		W 1 8 1 R
137	配列番号7	T 5 6 K		K 1 7 4 R

10

上記のポリペプチドを、実施例5に記載のELISA分析を使用して - アミロイドへの結合に関して分析した。結果は、表12及び13に記載される。相対的結合値は、IC₅₀（配列番号3のポリペプチド）/ IC₅₀（試験ポリペプチド）を反映する（例えば、値が低ければ低いほど、該ポリペプチドの結合は配列番号3のポリペプチドと比較して大きい）。複数の値は、結合分析における二重反復試験を反映している。

【表 1 2 - 1】

表12. 配列番号3のポリペプチドの本発明の例示的なポリペプチドに対する相対的結合値。

ポリペプチド番号	相対的結合値
6 3	0. 1 2
6 4	0. 1 4
6 5	0. 1 8
6 6	0. 0 8
6 7	0. 1
6 8	0. 1 9
6 9	0. 2 9, 0. 3 7
7 0	0. 4 3, 0. 4 5
7 1	0. 4 2
7 2	0. 4 0, 0. 2 7
7 3	0. 2 5, 0. 3 9
7 4	0. 2 6
7 5	0. 1 1
7 6	0. 1 3
7 7	0. 1 8, 0. 1 6
7 8	0. 2 4, 0. 2 0
7 9	0. 0 8
8 0	0. 1 6

20

30

40

【表 1 2 - 2】

ポリペプチド番号	相対的結合値
8 1	0. 1 4
8 2	0. 2
8 3	0. 1 8, 0. 3 6
8 4	0. 2 6, 0. 4 8
8 5	0. 2 4, 0. 7 9
8 6	0. 5 1, 1. 0 8
8 7	0. 5 1, 0. 8 3
8 8	0. 6 5, 1. 3 0
8 9	0. 7 1, 1. 0 5
9 0	1. 4 3, 1. 6 4
9 1	0. 1 4
9 2	0. 2 4
9 3	0. 3 4
9 4	0. 5 3, 0. 4 8
9 5	0. 0 7
9 6	0. 1 5
9 7	0. 1 4
9 8	0. 2 1, 0. 6 1
9 9	0. 1 1
1 0 0	0. 3 6
1 0 1	0. 2
1 0 2	0. 2 3

10

20

30

40

【表 1 3 - 1】

表 1 3. 配列番号 7 のポリペプチドの本発明の例示的なポリペプチドに対する相対的結合値。

ポリペプチド番号	相対的結合値
1 1 0	0. 6 7 1
1 1 1	0. 3 4 8
1 1 2	0. 5 6 4
1 1 3	0. 4 0 7
1 1 4	0. 4 4 7
1 1 5	0. 8 7 1

50

【表13-2】

ポリペプチド番号	相対的結合値
116	0.7
117	0.913
118	0.35
119	0.63
120	0.755
121	0.488
122	0.493
123	0.88
124	0.538
125	0.575
126	0.391
127	0.44
128	0.72
129	0.648

10

20

【0105】

実施例8：酢酸セルロース濾過遅延分析。

この分析は、アミロイド線維の不安定化（脱凝集）、または非アミロイド生成性もしくは可溶性の凝集体への再構築を観察するために使用した。分析は主に、Chang, E. and Kuret, J., Anal Biochem 373, 330-6, (2008) 及び Wanker, E. E. et al., Methods Enzymol 309, 375-86, (1999) から改作された。具体的には、fA アミロイド線維の 2.5 μ M の調製物を、異なる濃度の本発明の変異型融合ポリペプチド (1 nM ~ 2 μ M) と共に 37 度 3 日間予備定温放置した。定温放置後、融合ポリペプチドを伴う及び伴わない線維を、希釈し、真空プロット機の酢酸セルロース膜上に点状配置した。膜を、PBS で十分に洗浄し、A の N 末端に特異的な抗体を用いて 1 時間プロープした。HRP 共役二次 Ab を使用して、膜上に保持された線維状凝集体を定量化した。スポット色を分析し、デンシトメトリースキャナを使用してデジタル化した。EC₅₀（最大半量有効濃度）を、各スポットに添加した融合ポリペプチドの濃度に対する各スポットのシグナルの強度に基づいて算出した。

30

【0106】

配列番号3のポリペプチドをこの分析において試験したとき、EC₅₀は、2 μ M 超と決定され、このポリペプチドが低い脱凝集活性を有することを示した。また、配列番号1及び配列番号7のポリペプチドもこの分析において試験し、各々 100 nM の EC₅₀を実証し、顕著な脱凝集活性を示した。この結果に基づき、エピトープ1、2、及び3の各々の中に脱免疫化置換を含有する変異型ポリペプチドの全てを含む、ポリペプチド102以降の全ての後続番号のポリペプチドは、開始アミノ酸配列を修飾する際に配列番号7のポリペプチドを使用して作製した。試験ポリペプチドの EC₅₀ 値は、表14に記載される。

40

【表14】

表14. 本発明の例示的な変異型ポリペプチドの f A β アミロイド線維脱凝集活性。

ポリペプチド番号	f A β アミロイド線維脱凝集活性 (EC ₅₀)
110	100 nM
111	100 nM
112	100 nM
113	100 nM
114	nd*
115	> 2 μ M
116	100 nM
117	100 nM
118	100 nM
119	100 nM
120	nd
121	100 nM
122	100 nM
123	nd
124	nd
125	100 nM
126	100 nM
127	100 nM
128	100 nM
129	100 nM
130	nd
131	100 ~ 400 nM
132	nd
133	400 ~ 800 nM
134	nd
135	200 nM
136	400 ~ 800 nM

* n d = ポリペプチドの濃度範囲は EC₅₀ を決定するために試験されなかった。これらポリペプチドを試験した最高濃度は、顕著な EC₅₀ を実証しなかった。

【0107】

上記の実施例から分かる通り、本発明の変異型ポリペプチドは全て、ELISA 分析によって決定されるときに、A₁ に対する結合を示した。試験された変異型ポリペプチドの大部分は、ドットプロット分析によって決定されるときに、A₁ の脱凝集も示した。

10

20

30

40

【 図 1 】

【図1】

(配列番号1)

1 A E T V E S C L A K P H T E N S F T N V V W K
23 D D K T L D R Y A N Y E G C L W N A T G V V
45 V C T G D E T O C Y G T W V P I G L A I P E
67 N E C G G G S E G C G G S E G G G S E G G G T K
89 P P E Y G D T P I P G Y T Y I N P L D G T Y
111 P P G T E Q N P A N P N P S L E E S Q P L N
133 T F M F Q O N N R F R N R Q G A L T V Y T G T
155 F T Q G T D P V K T Y Y Q Y T P V S SKAM
177 Y D A Y W N G K F R D C A F H S G F N E D P
199 F V C E Y Q G Q S S D L P Q P P V N A G G G
221 S G G G S G G G G S E G G G S E G G G S E G G
243 G S E G G G G S G G G S G S G A M V R S D K T
265 H T C P P C P A P E I D G G P S V F I F P P
287 K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S
309 H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T
331 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q
353 D W I N G K E Y Y K C K V S N K A L P A P I E
375 K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P E S R
397 E D M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D E
419 A V E W E S M G Q P E N N Y K I T T P E V L D
441 S D G S F E F L Y S K I L T V D K S R W Q Q G N
463 V F S C S V U M H E A L H N H Y T Q K S L S L
485 S P G K

【図3】

[圖3]

(配列番号3)

1 A E T V E S C L A K P H T E N S F T N V W K
 23 D D K T L D R Y A N Y E G C L W N A T G V Y
 45 V C T G D E T O C Y G T W V P I G L A I P E
 67 N E G G G S E G G G G S E G G G G S E G G G T K
 89 P P E Y G D T P I P G Y T Y I N P L D G T Y
 111 P P G T E Q N P A N P N P S L E E S Q P L N
 133 T F M F Q O N N R F R N R Q G A L T V Y T G T
 155 F T Q G T D P V K T Y Y Q Y T P V S S K A M
 177 Y D A Y W N G K F R D C A F H S G F N E D P
 199 F V C E Y Q G Q S S D L P Q P P A N A G G E
 221 S G G G S G G G S E G G G S E G G G S E G G
 243 G S E G G G S G G G S G S G A R S D K T
 263 H T C P P C P A P E L L G G G P S V F L F P P
 285 K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S
 307 H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T
 329 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q
 351 D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E
 373 K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P P S R
 395 E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I
 417 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 439 S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
 461 V F F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L
 483 S P G K

【 図 2 】

【図2】

(配列番号2)

1 A E T V E S C L A K P H T E N S F T N V W K 22
 23 D D K T L D R Y A N Y E G C L W N A T G V 44
 45 V C T G D E T Q C Y G T W V P I G L A I P E 66
 67 N E G G G S E G G G S E G G G S E G G G T K 88
 89 P P E Y G D T P I P G Y T Y I N P L D G T Y 110
 111 P P G T E Q N P A N P N P S L E E S Q P L N 132
 133 T F M F Q N N R F R N R Q G A L T V Y T G T 154
 155 F T Q G T D P V K T Y Y Q Y T P V S S K A M 176
 177 Y D A Y W N G K F R D C A F H S G F N E D 198
 199 F V C E Y Q G Q S S D L P Q P P V N A G G G 220
 221 S G G G S G G G S E G G G S E G G G S E G G 242
 243 G S E G G G S G G G S G S G A R S D K T 262
 263 H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P 284
 285 306
 K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S 328
 307 H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T 350
 329 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q 372
 351 D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E 394
 373 K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R 416
 395 E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I 438
 417 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D 460
 439 S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N 482
 461 V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L 483
 483 S P G K

【図4A】

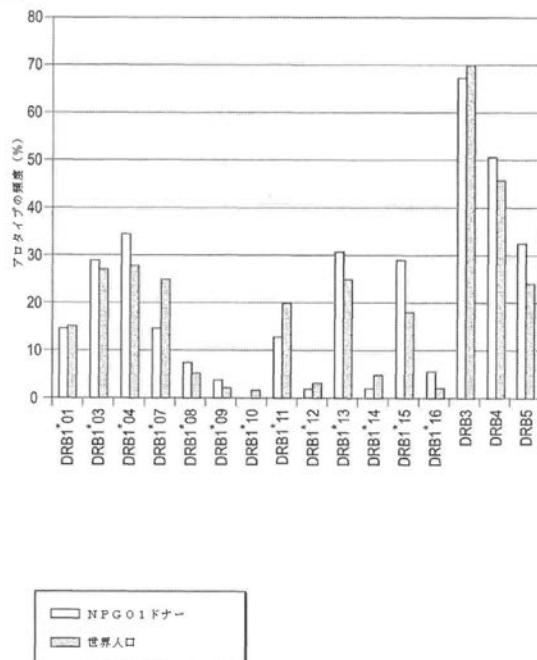
【図4A】

【 図 4 B 】

【图4B】

【 図 6 】

【図6】



【 図 5 】

【図5】

【 図 7 】

[図7]

(配列番号 7)

1 A E T V E S C L A K P H T E N S F T N V W K
 23 D D K T L D R Y A N Y E G C L W N A T G V
 44 45 V C T G D E T Q C Y G T W V P I G L A I P E
 66 67 N E G G G S E G G G S E G G G S E G G G T
 88 89 P P E Y G D T P I P G Y T Y I N P L D G T
 110 111 132 P P G T E Q N P A N P N P S L E E S Q P L N
 133 154 T F M F Q O N N R F R N R Q G A L T V Y T G T
 176 155 F T Q G T D P V K T Y Y Q Y T P V S S K A
 198 177 Y D A Y W N G K F R D C A F H S G F N E D P
 220 199 F V C E Y Q G Q S S D L P Q P P G N A G G G
 221 S G G S G G G S E G G G S E G G G S E G G
 242 243 G S E G G G S G G G S G S G A M V R S D K T
 264 265 H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P
 308 287 K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S
 309 330 H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T
 331 352 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
 353 374 D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E
 375 396 K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
 397 418 E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I
 419 440 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 441 462 S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
 463 484 V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L
 485 496 S P G K

【 図 8 】

【図8】

【配列表】

201652604400001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年1月6日(2016.1.6)

【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】
開始アミノ酸配列の変異型を含むポリペプチドであって、前記開始アミノ酸配列は、以下の修飾：アミノ酸43～45におけるAAAによるV V Vの置換、置換C53W、アミノ酸96～103の欠失、アミノ酸212～214におけるAGAによるQ P Pの置換、置換W181A、F190A、及びF194A、アミノ酸1の欠失、ならびにアミノ酸1及び2の欠失、のうちの1つ以上を有する、配列番号1のアミノ酸1～217、配列番号3のアミノ酸1～217、配列番号7のアミノ酸1～217、及び前述のもののいずれかの突然変異体から選択され、

(a) 前記ポリペプチドは、アミロイドに結合する、及び / またはアミロイドを脱凝集させ

(b) 前記ポリペプチドは、前記開始アミノ酸配列を含むポリペプチドと比較して低減された免疫原性を有し、

(c) 前記変異型は、前記開始アミノ酸配列と比較して1~9つのアミノ酸置換を有し、各アミノ酸置換は、下記のアミノ酸置換の群から選択され。

【表 15 - 1】

アミノ酸番号	前記開始アミノ酸配列中に存在するアミノ酸	アミノ酸置換
4 8	G	H、K、R、P、S、T、D、P
5 0	E	G、H、K、P、R
5 1	T	G、H、K、R、P、Q、N、W
5 3	C	F、H、K、N、Q、R、W、Y
5 4	Y	G、H、K、R、P
5 6	T	G、H、K、R、P
1 3 5	M	A、D、G、K、N、T、H、R、C、E、P、Q、S
1 3 7	Q	D、E
1 3 8	N	D、E、G、H、P、Q、S、T
1 4 0	R	D、E、H、Q、A、G、M、N、P、S、Y
1 4 1	F	D、E
1 4 3	N	A、G
1 7 3	S	G、P、K、D、H、R、T
1 7 4	K	R
1 7 5	A	G、H、K、P、R
1 7 6	M	G、H、K、N、R、P、Q、W
1 7 8	D	G、N、Q、S、T、F、H、

【表 15 - 2】

		K、R、W、Y
1 7 9	A	H、K、P、R
1 8 1	W	G、H、K、R、P

(d) 前記開始アミノ酸配列が配列番号1のアミノ酸1～217であるとき、前記変異型は、下記のアミノ酸置換の群から選択される1～9つのさらなるアミノ酸置換を任意に有する、前記ポリペプチド。

【表16】

アミノ酸番号	前記開始アミノ酸配列中に存在するアミノ酸	アミノ酸置換
215	V	S、T、C、D、E、F、H、K、N、P、Q、R
218	G	C、E、N、P、Q、S、T、A、H、W
220	G	E、D、F、W、M、Y
221	S	D、E、G
223	G	D、P、E、K、N、R、T

【請求項2】

前記開始アミノ酸配列内の1~9つのアミノ酸置換の各々は、下記のアミノ酸置換の群から選択される、請求項1に記載の前記ポリペプチド。

【表17】

アミノ酸番号	前記開始アミノ酸配列中に存在するアミノ酸	アミノ酸置換
48	G	H、K、R、S、T
51	T	G、H、K、R、P、Q、N
54	Y	G、H、K、R、P
56	T	G、H、K、R、P
135	M	A、D、G、K、N、T、H、R
140	R	D、E、H、Q、A、G
141	F	D、E
143	N	A、G
173	S	G、P、K
174	K	R
176	M	G、H、K、N、R
178	D	G、N、Q、S、T
181	W	G、H、K、R

【請求項3】

前記開始アミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸1~217、配列番号3のアミノ酸1~217、及び配列番号7のアミノ酸1~217から選択される、請求項1または請求項2に記載の前記ポリペプチド。

【請求項4】

前記変異型アミノ酸配列は、前記開始アミノ酸配列に対して2~9つのアミノ酸置換を有し、少なくとも1つの置換が、配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸48~56を含むエピトープ1、配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸135~143を含むエピトープ2、及び配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸173~181を含むエピトープ3、のうちの少なくとも2つの中に存在する、請求項1~3のいずれか一項に記載の前記ポリペプチド。

【請求項5】

前記修飾されたアミノ酸配列は、2つのアミノ酸置換のみを有し、前記置換は、下記の2つのアミノ酸置換の群から選択される、請求項4に記載の前記ポリペプチド。

【表18】

Y 5 4 K及びM 1 3 5 K	Y 5 4 K及びM 1 3 5 T	Y 5 4 K及びR 1 4 0 Q	Y 5 4 R及びM 1 3 5 K
Y 5 4 R及びM 1 3 5 T	Y 5 4 R及びR 1 4 0 Q	T 5 6 H及びM 1 3 5 K	T 5 6 H及びM 1 3 5 T
T 5 6 H及びR 1 4 0 Q	T 5 6 K及びM 1 3 5 K	T 5 6 K及びM 1 3 5 T	T 5 6 K及びR 1 4 0 Q
Y 5 4 K及びD 1 7 8 N	Y 5 4 K及びW 1 8 1 H	Y 5 4 K及びW 1 8 1 R	Y 5 4 K及びK 1 7 4 R
Y 5 4 R及びD 1 7 8 N	Y 5 4 R及びW 1 8 1 H	Y 5 4 R及びW 1 8 1 R	Y 5 4 R及びK 1 7 4 R
T 5 6 H及びD 1 7 8 N	T 5 6 H及びW 1 8 1 H	T 5 6 H及びW 1 8 1 R	T 5 6 H及びK 1 7 4 R
T 5 6 K及びD 1 7 8 N	T 5 6 K及びW 1 8 1 H	T 5 6 K及びW 1 8 1 R	T 5 6 K及びK 1 7 4 R
M 1 3 5 K及びD 1 7 8 N	M 1 3 5 K及びW 1 8 1 H	M 1 3 5 K及びW 1 8 1 R	M 1 3 5 K及びK 1 7 4 R
M 1 3 5 T及びD 1 7 8 N	M 1 3 5 T及びW 1 8 1 H	M 1 3 5 T及びW 1 8 1 R	M 1 3 5 T及びK 1 7 4 R
R 1 4 0 Q及びD 1 7 8 N	R 1 4 0 Q及びW 1 8 1 H	R 1 4 0 Q及びW 1 8 1 R	R 1 4 0 Q及びK 1 7 4 R

【請求項6】

前記変異型アミノ酸配列は、前記開始アミノ酸配列に対して3～9つのアミノ酸置換を有し、少なくとも1つの置換が、配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸48～56を含むエピトープ1、配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸135～143を含むエピトープ2、及び配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸173～181を含むエピトープ3の各々の中にある、請求項1～3のいずれか一項に記載の前記ポリペプチド。

【請求項7】

前記変異型アミノ酸配列は、前記開始アミノ酸配列と比較して3つのアミノ酸置換のみを有し、前記置換は、以下の組のアミノ酸置換：T 5 6 H、M 1 3 5 K、及びD 1 7 8 N、T 5 6 K、M 1 3 5 K、及びD 1 7 8 N、T 5 6 K、M 1 3 5 T、及びD 1 7 8 N、T 5 6 H、M 1 3 5 K、及びW 1 8 1 R、T 5 6 H、M 1 3 5 T、及びW 1 8 1 R、Y 5 4 K、M 1 3 5 T、及びK 1 7 4 R、Y 5 4 R、M 1 3 5 K、及びK 1 7 4 R、Y 5 4 R、M 1 3 5 T、及びK 1 7 4 R、T 5 6 H、M 1 3 5 K、及びK 1 7 4 R、ならびにT 5 6 H、M 1 3 5 T、及びK 1 7 4 R、のいずれかから選択される、請求項5に記載の前記ポリペプチド。

【請求項8】

ペプチドリンカーを介してか、または直接的にかのいずれかで前記変異型アミノ酸配列のC末端に融合されるヒトまたはヒト化免疫グロブリンF cポリペプチド配列から本質的に成る、請求項1～7のいずれか一項に記載の前記ポリペプチド

【請求項9】

前記免疫グロブリンF cポリペプチド配列は、ヒトIgGのFc部分である、請求項8に記載の前記ポリペプチド。

【請求項10】

前記ペプチドリンカー及びヒトIgGのFc部分の前記アミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸218～488、配列番号3のアミノ酸218～486、及び配列番号7のアミ

ノ酸 2 1 8 ~ 4 8 8 から選択される、請求項 9 に記載の前記ポリペプチド。

【請求項 11】

修飾された開始配列から成るポリペプチド変異型であって、前記開始配列は、配列番号 3 または配列番号 7 から選択され、前記修飾は、2 つまたは 3 つのアミノ酸置換であり、前記ポリペプチドは、下記のポリペプチドのうちのいずれか 1 つから選択される、前記ポリペプチド変異型。

【表 19-1】

ポリペプチド番号	開始配列	エピトープ 1 置換	エピトープ 2 置換	エピトープ 3 置換
6 3	配列番号 3	Y 5 4 K	M 1 3 5 K	無し
6 4	配列番号 3	Y 5 4 K	M 1 3 5 T	無し
6 5	配列番号 3	Y 5 4 K	R 1 4 0 Q	無し
6 6	配列番号 3	Y 5 4 R	M 1 3 5 K	無し
6 7	配列番号 3	Y 5 4 R	M 1 3 5 T	無し
6 8	配列番号 3	Y 5 4 R	R 1 4 0 Q	無し
6 9	配列番号 3	T 5 6 H	M 1 3 5 K	無し
7 0	配列番号 3	T 5 6 H	M 1 3 5 T	無し
7 1	配列番号 3	T 5 6 H	R 1 4 0 Q	無し
7 2	配列番号 3	T 5 6 K	M 1 3 5 K	無し
7 3	配列番号 3	T 5 6 K	M 1 3 5 T	無し

【表 19 - 2】

ポリペプチド番号	開始配列	エピトープ1置換	エピトープ2置換	エピトープ3置換
7 4	配列番号3	T 5 6 K	R 1 4 0 Q	無し
7 5	配列番号3	Y 5 4 K	無し	D 1 7 8 N
7 6	配列番号3	Y 5 4 K	無し	W 1 8 1 H
7 7	配列番号3	Y 5 4 K	無し	W 1 8 1 R
7 8	配列番号3	Y 5 4 K	無し	K 1 7 4 R
7 9	配列番号3	Y 5 4 R	無し	D 1 7 8 N
8 0	配列番号3	Y 5 4 R	無し	W 1 8 1 H
8 1	配列番号3	Y 5 4 R	無し	W 1 8 1 R
8 2	配列番号3	Y 5 4 R	無し	K 1 7 4 R
8 3	配列番号3	T 5 6 H	D 1 7 8 N	
8 4	配列番号3	T 5 6 H	無し	W 1 8 1 H
8 5	配列番号3	T 5 6 H	無し	W 1 8 1 R
8 6	配列番号3	T 5 6 H	無し	K 1 7 4 R
8 7	配列番号3	T 5 6 K	無し	D 1 7 8 N
8 8	配列番号3	T 5 6 K	無し	W 1 8 1 H
8 9	配列番号3	T 5 6 K	無し	W 1 8 1 R
9 0	配列番号3	T 5 6 K	無し	K 1 7 4 R
9 1	配列番号3	無し	M 1 3 5 K	D 1 7 8 N
9 2	配列番号3	無し	M 1 3 5 K	W 1 8 1 H
9 3	配列番号3	無し	M 1 3 5 K	W 1 8 1 R
9 4	配列番号3	無し	M 1 3 5 K	K 1 7 4 R
9 5	配列番号3	無し	M 1 3 5 T	D 1 7 8 N
9 6	配列番号3	無し	M 1 3 5 T	W 1 8 1 H
9 7	配列番号3	無し	M 1 3 5 T	W 1 8 1 R
9 8	配列番号3	無し	M 1 3 5 T	K 1 7 4 R
9 9	配列番号3	無し	R 1 4 0 Q	D 1 7 8 N
1 0 0	配列番号3	無し	R 1 4 0 Q	W 1 8 1 H
1 0 1	配列番号3	無し	R 1 4 0 Q	W 1 8 1 R
1 0 2	配列番号3	無し	R 1 4 0 Q	K 1 7 4 R
1 1 0	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	D 1 7 8 N
1 1 1	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	W 1 8 1 H
1 1 2	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	W 1 8 1 R
1 1 3	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	K 1 7 4 R
1 1 4	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	D 1 7 8 N
1 1 5	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	W 1 8 1 H
1 1 6	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	W 1 8 1 R
1 1 7	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	K 1 7 4 R
1 1 8	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 K	D 1 7 8 N
1 1 9	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 K	W 1 8 1 H
1 2 0	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 K	W 1 8 1 R

【表19-3】

ポリペプチド番号	開始配列	エピトープ1置換	エピトープ2置換	エピトープ3置換
121	配列番号7	T56K	M135K	K174R
122	配列番号7	T56K	M135T	D178N
123	配列番号7	T56K	M135T	W181H
124	配列番号7	T56K	M135T	W181R
125	配列番号7	T56K	M135T	K174R
126	配列番号7	Y54K	M135K	K174R
127	配列番号7	Y54K	M135T	K174R
128	配列番号7	Y54R	M135K	K174R
129	配列番号7	Y54R	M135T	K174R
130	配列番号7	T56H	無し	D178N
131	配列番号7	T56H	無し	W181H
132	配列番号7	T56H	無し	W181R
133	配列番号7	T56H	無し	K174R
134	配列番号7	T56K	無し	D178N
135	配列番号7	T56K	無し	W181H
136	配列番号7	T56K	無し	W181R
137	配列番号7	T56K	無し	K174R

【請求項12】

ポリペプチド番号110、112、113、116、117、118、122、127、128、または129のうちのいずれか1つから選択される、請求項11に記載の前記ポリペプチド。

【請求項13】

請求項1～12のいずれか一項に記載の前記ポリペプチドと薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項14】

前記組成物は、患者の血流中への注射または注入のために製剤化される、請求項13に記載の前記薬学的組成物。

【請求項15】

前記組成物は、脳またはCNSへの直接投与のために製剤化される、請求項13に記載の前記薬学的組成物。

【請求項16】

アミロイドまたはタウタンパク質凝集体の低減を必要とする患者において、アミロイドまたはタウタンパク質凝集体を低減させるための、請求項13～15のいずれか一項に記載の薬学的組成物、または請求項1～12のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む薬学的組成物。

【請求項17】

前記患者は、アミロイドまたはタウタンパク質凝集体の存在に関連付けられる神経変性疾患の症状を示す、請求項16に記載の薬学的組成物。

【請求項18】

前記患者は、バイオマーカーフロルベタビルが陽電子放出断層撮影において造影剤として使用されるときに、そのバイオマーカーに関して陽性である、請求項16または請求項17に記載の薬学的組成物。

【請求項19】

前記患者は、アルツハイマー病（早発性アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、

及び発症前アルツハイマー病を含む)、パーキンソン病、S A A アミロイド症、シスタチンC、遺伝性アイスランド病、老衰、多発性骨髄腫、プリオン病(クールー、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病(GSS)、致死性家族性不眠症(FFI)、スクラピー、及び牛海綿状脳症(BSE)を含むがそれらに限定されない)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、脊髄小脳失調(SCA1、SCA3、SCA6、またはSCA7)、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(dentatorubral-pallidoluysian atrophy)、球脊髓性筋萎縮症、遺伝性脳アミロイド血管症、家族性アミロイド症、イギリス型/デンマーク型認知症、家族性脳症、筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン病・認知症複合病、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、ボクサー認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病、ダウン症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハラー・ホルデン・スパツツ病、筋強直性ジストロフィー、ニーマン・ピック病C型、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患(Non-Guamanian motor neuron disease with neurofibrillary tangles)、ピック病、脳炎後パーキンソン病、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性汎脳炎、神経原線維型認知症、前頭側頭葉変性症(FTLD)、及び前頭側頭葉型認知症(FTD)(以下の臨床症候群のうちの1つ以上を有する患者を含む:行動障害型FTD(bvFTD)、進行性非能弁的失語症(PNFA)、17番染色体に関連付けられるパーキンソン病を伴う前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺(Progressive Supranuclear Palsy)(PSP)、及び意味性認知症(SD))から選択される神経変性疾患に罹患する、請求項16~18のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項20】

前記神経変性疾患は、パーキンソン病、アルツハイマー病、またはハンチントン病である、請求項19に記載の薬学的組成物。

【請求項21】

前記神経変性疾患は、アルツハイマー病である、請求項20に記載の薬学的組成物。

【請求項22】

前記患者は、クロイツフェルト・ヤコブ病、クールー、致死性家族性不眠症、またはゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群から選択されるプリオン媒介疾患に罹患する、請求項19に記載の薬学的組成物。

【請求項23】

請求項1~12に記載の前記ポリペプチドのうちのいずれか1つをコードする核酸配列。

【請求項24】

前記ポリペプチドコード配列にかつインフレームで融合された哺乳類シグナル配列をさらにコードする、請求項23に記載の前記核酸配列。

【請求項25】

請求項23または24に記載の核酸配列を含むベクターであって、前記核酸配列は、前記ベクター内の発現制御配列に作動可能に連結される、前記ベクター。

【請求項26】

請求項25に記載の前記ベクターを含有する、宿主細胞。

【請求項27】

請求項1~12のいずれか一項に記載のポリペプチドを作製する方法であって、請求項23または24に記載の前記核酸配列によってコードされるタンパク質を発現させるステップと、前記発現されたポリペプチドを単離するステップと、を含む、前記方法。

【請求項28】

請求項1~12のいずれか一項に記載のポリペプチドを作製する方法であって、前記ポリペプチドの発現を可能にするのに十分な条件下で、請求項26に記載の前記宿主細胞を培養するステップと、前記発現されたポリペプチドを単離するステップと、を含む、前記

方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

別の実施形態では、本発明は、本発明のポリペプチドを产生するための方法を提供する。具体的には、かかる方法は、核酸分子及び／またはかかる核酸分子を含むベクターを有する細胞を用いる。

例えば、本発明は以下を提供する。

(項目1)

開始アミノ酸配列の変異型を含むポリペプチドであって、前記開始アミノ酸配列は、以下の修飾：アミノ酸43～45におけるAAAによるV V Vの置換、置換C53W、アミノ酸96～103の欠失、アミノ酸212～214におけるAGAによるQ P Pの置換、置換W181A、F190A、及びF194A、アミノ酸1の欠失、ならびにアミノ酸1及び2の欠失、のうちの1つ以上を有する、配列番号1のアミノ酸1～217、配列番号3のアミノ酸1～217、配列番号7のアミノ酸1～217、及び前述のもののいずれかの突然変異体から選択され、

(a) 前記ポリペプチドは、アミロイドに結合する、及び／またはアミロイドを脱凝集させ、

(b) 前記ポリペプチドは、前記開始アミノ酸配列を含む対応するポリペプチドと比較して低減された免疫原性を有し、

(c) 前記変異型は、前記開始アミノ酸配列と比較して1～9つのアミノ酸置換を有し、各アミノ酸置換は、下記のアミノ酸置換の群から選択され、

【表 15 - 1】

アミノ酸番号	前記開始アミノ酸配列中に存在するアミノ酸	アミノ酸置換
4 8	G	H、K、R、P、S、T、D、P
5 0	E	G、H、K、P、R
5 1	T	G、H、K、R、P、Q、N、W
5 3	C	F、H、K、N、Q、R、W、Y
5 4	Y	G、H、K、R、P
5 6	T	G、H、K、R、P
1 3 5	M	A、D、G、K、N、T、H、R、C、E、P、Q、S
1 3 7	Q	D、E
1 3 8	N	D、E、G、H、P、Q、S、T
1 4 0	R	D、E、H、Q、A、G、M、N、P、S、Y
1 4 1	F	D、E
1 4 3	N	A、G
1 7 3	S	G、P、K、D、H、R、T
1 7 4	K	R
1 7 5	A	G、H、K、P、R
1 7 6	M	G、H、K、N、R、P、Q、W
1 7 8	D	G、N、Q、S、T、F、H、

【表 15 - 2】

		K、R、W、Y
1 7 9	A	H、K、P、R
1 8 1	W	G、H、K、R、P

(d) 前記開始アミノ酸配列が配列番号1のアミノ酸1～217であるとき、前記1～9つのアミノ酸置換のいずれかは、下記のアミノ酸置換の群から任意にさらに選択される、前記ポリペプチド。

【表16】

アミノ酸番号	前記開始アミノ酸配列中に存在するアミノ酸	アミノ酸置換
215	V	S、T、C、D、E、F、H、K、N、P、Q、R
218	G	C、E、N、P、Q、S、T、A、H、W
220	G	E、D、F、W、M、Y
221	S	D、E、G
223	G	D、P、E、K、N、R、T

(項目2)

前記開始アミノ酸配列内の1～9つのアミノ酸置換の各々は、下記のアミノ酸置換の群から選択される、項目1に記載の前記ポリペプチド。

【表17】

アミノ酸番号	前記開始アミノ酸配列中に存在するアミノ酸	アミノ酸置換
48	G	H、K、R、S、T
51	T	G、H、K、R、P、Q、N
54	Y	G、H、K、R、P
56	T	G、H、K、R、P
135	M	A、D、G、K、N、T、H、R
140	R	D、E、H、Q、A、G
141	F	D、E
143	N	A、G
173	S	G、P、K
174	K	R
176	M	G、H、K、N、R
178	D	G、N、Q、S、T
181	W	G、H、K、R

(項目3)

前記開始アミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸1～217、配列番号3のアミノ酸1～217、及び配列番号7のアミノ酸1～217から選択される、項目1または項目2に記載の前記ポリペプチド。

(項目4)

前記変異型アミノ酸配列は、前記開始アミノ酸配列に対して2～9つのアミノ酸置換を有し、少なくとも1つの置換が、配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸48～56を含むエピトープ1、配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸135～143を含むエピトープ2、及び配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸173～181を含むエピトープ3、のうちの少なくとも2つの中に存在する、項目1～3のいずれか一項に記載の前記ポリペプチド。

(項目5)

前記修飾されたアミノ酸配列は、2つのアミノ酸置換のみを有し、前記置換は、下記の2つのアミノ酸置換の群から選択される、項目4に記載の前記ポリペプチド。

【表18】

Y 5 4 K及びM 1 3 5 K	Y 5 4 K及びM 1 3 5 T	Y 5 4 K及びR 1 4 0 Q	Y 5 4 R及びM 1 3 5 K
Y 5 4 R及びM 1 3 5 T	Y 5 4 R及びR 1 4 0 Q	T 5 6 H及びM 1 3 5 K	T 5 6 H及びM 1 3 5 T
T 5 6 H及びR 1 4 0 Q	T 5 6 K及びM 1 3 5 K	T 5 6 K及びM 1 3 5 T	T 5 6 K及びR 1 4 0 Q
Y 5 4 K及びD 1 7 8 N	Y 5 4 K及びW 1 8 1 H	Y 5 4 K及びW 1 8 1 R	Y 5 4 K及びK 1 7 4 R
Y 5 4 R及びD 1 7 8 N	Y 5 4 R及びW 1 8 1 H	Y 5 4 R及びW 1 8 1 R	Y 5 4 R及びK 1 7 4 R
T 5 6 H及びD 1 7 8 N	T 5 6 H及びW 1 8 1 H	T 5 6 H及びW 1 8 1 R	T 5 6 H及びK 1 7 4 R
T 5 6 K及びD 1 7 8 N	T 5 6 K及びW 1 8 1 H	T 5 6 K及びW 1 8 1 R	T 5 6 K及びK 1 7 4 R
M 1 3 5 K及びD 1 7 8 N	M 1 3 5 K及びW 1 8 1 H	M 1 3 5 K及びW 1 8 1 R	M 1 3 5 K及びK 1 7 4 R
M 1 3 5 T及びD 1 7 8 N	M 1 3 5 T及びW 1 8 1 H	M 1 3 5 T及びW 1 8 1 R	M 1 3 5 T及びK 1 7 4 R
R 1 4 0 Q及びD 1 7 8 N	R 1 4 0 Q及びW 1 8 1 H	R 1 4 0 Q及びW 1 8 1 R	R 1 4 0 Q及びK 1 7 4 R

(項目6)

前記変異型アミノ酸配列は、前記開始アミノ酸配列に対して3~9つのアミノ酸置換を有し、少なくとも1つの置換が、配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸4 8~5 6を含むエピトープ1、配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸1 3 5~1 4 3を含むエピトープ2、及び配列番号1、配列番号3、または配列番号7のアミノ酸1 7 3~1 8 1を含むエピトープ3の各々の中にある、項目1~3のいずれか一項に記載の前記ポリペプチド。

(項目7)

前記変異型アミノ酸配列は、前記開始アミノ酸配列と比較して3つのアミノ酸置換のみを有し、前記置換は、以下の組のアミノ酸置換：T 5 6 H、M 1 3 5 K、及びD 1 7 8 N、T 5 6 K、M 1 3 5 K、及びD 1 7 8 N、T 5 6 K、M 1 3 5 T、及びD 1 7 8 N、T 5 6 H、M 1 3 5 K、及びW 1 8 1 R、T 5 6 H、M 1 3 5 T、及びW 1 8 1 R、Y 5 4 K、M 1 3 5 T、及びK 1 7 4 R、Y 5 4 R、M 1 3 5 K、及びK 1 7 4 R、Y 5 4 R、M 1 3 5 T、及びK 1 7 4 R、T 5 6 H、M 1 3 5 K、及びK 1 7 4 R、ならびにT 5 6 H、M 1 3 5 T、及びK 1 7 4 R、のいずれかから選択される、項目5に記載の前記ポリペプチド。

(項目8)

ペプチドリンカーを介してか、または直接的にかのいずれかで前記変異型アミノ酸配列のC末端に融合されるヒトまたはヒト化免疫グロブリンF cポリペプチド配列から本質的に成る、項目1~7のいずれか一項に記載の前記ポリペプチド

(項目9)

前記免疫グロブリンF cポリペプチド配列は、ヒトIgGのFc部分である、項目8に記載の前記ポリペプチド。

(項目10)

前記ペプチドリンカー及びヒトIgGのFc部分の前記アミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸218～488、配列番号3のアミノ酸218～486、及び配列番号7のアミノ酸218～488から選択される、項目9に記載の前記ポリペプチド。

(項目11)

修飾された開始配列から成るポリペプチド変異型であって、前記開始配列は、配列番号3または配列番号7から選択され、前記修飾は、2つまたは3つのアミノ酸置換であり、前記ポリペプチドは、下記のポリペプチドのうちのいずれか1つから選択される、前記ポリペプチド変異型。

【表19-1】

ポリペプチド番号	開始配列	エピトープ1置換	エピトープ2置換	エピトープ3置換
63	配列番号3	Y54K	M135K	無し
64	配列番号3	Y54K	M135T	無し
65	配列番号3	Y54K	R140Q	無し
66	配列番号3	Y54R	M135K	無し
67	配列番号3	Y54R	M135T	無し
68	配列番号3	Y54R	R140Q	無し
69	配列番号3	T56H	M135K	無し
70	配列番号3	T56H	M135T	無し
71	配列番号3	T56H	R140Q	無し
72	配列番号3	T56K	M135K	無し
73	配列番号3	T56K	M135T	無し

【表 19 - 2】

ポリペプチ ド番号	開始配列	エピトープ1置 換	エピトープ2置 換	エピトープ3置 換
7 4	配列番号3	T 5 6 K	R 1 4 0 Q	無し
7 5	配列番号3	Y 5 4 K	無し	D 1 7 8 N
7 6	配列番号3	Y 5 4 K	無し	W 1 8 1 H
7 7	配列番号3	Y 5 4 K	無し	W 1 8 1 R
7 8	配列番号3	Y 5 4 K	無し	K 1 7 4 R
7 9	配列番号3	Y 5 4 R	無し	D 1 7 8 N
8 0	配列番号3	Y 5 4 R	無し	W 1 8 1 H
8 1	配列番号3	Y 5 4 R	無し	W 1 8 1 R
8 2	配列番号3	Y 5 4 R	無し	K 1 7 4 R
8 3	配列番号3	T 5 6 H	D 1 7 8 N	
8 4	配列番号3	T 5 6 H	無し	W 1 8 1 H
8 5	配列番号3	T 5 6 H	無し	W 1 8 1 R
8 6	配列番号3	T 5 6 H	無し	K 1 7 4 R
8 7	配列番号3	T 5 6 K	無し	D 1 7 8 N
8 8	配列番号3	T 5 6 K	無し	W 1 8 1 H
8 9	配列番号3	T 5 6 K	無し	W 1 8 1 R
9 0	配列番号3	T 5 6 K	無し	K 1 7 4 R
9 1	配列番号3	無し	M 1 3 5 K	D 1 7 8 N
9 2	配列番号3	無し	M 1 3 5 K	W 1 8 1 H
9 3	配列番号3	無し	M 1 3 5 K	W 1 8 1 R
9 4	配列番号3	無し	M 1 3 5 K	K 1 7 4 R
9 5	配列番号3	無し	M 1 3 5 T	D 1 7 8 N
9 6	配列番号3	無し	M 1 3 5 T	W 1 8 1 H
9 7	配列番号3	無し	M 1 3 5 T	W 1 8 1 R
9 8	配列番号3	無し	M 1 3 5 T	K 1 7 4 R
9 9	配列番号3	無し	R 1 4 0 Q	D 1 7 8 N
1 0 0	配列番号3	無し	R 1 4 0 Q	W 1 8 1 H
1 0 1	配列番号3	無し	R 1 4 0 Q	W 1 8 1 R
1 0 2	配列番号3	無し	R 1 4 0 Q	K 1 7 4 R
1 1 0	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	D 1 7 8 N
1 1 1	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	W 1 8 1 H
1 1 2	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	W 1 8 1 R
1 1 3	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 K	K 1 7 4 R
1 1 4	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	D 1 7 8 N
1 1 5	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	W 1 8 1 H
1 1 6	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	W 1 8 1 R
1 1 7	配列番号7	T 5 6 H	M 1 3 5 T	K 1 7 4 R
1 1 8	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 K	D 1 7 8 N
1 1 9	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 K	W 1 8 1 H
1 2 0	配列番号7	T 5 6 K	M 1 3 5 K	W 1 8 1 R

【表 19 - 3】

ポリペプチド番号	開始配列	エピトープ1置換	エピトープ2置換	エピトープ3置換
121	配列番号7	T56K	M135K	K174R
122	配列番号7	T56K	M135T	D178N
123	配列番号7	T56K	M135T	W181H
124	配列番号7	T56K	M135T	W181R
125	配列番号7	T56K	M135T	K174R
126	配列番号7	Y54K	M135K	K174R
127	配列番号7	Y54K	M135T	K174R
128	配列番号7	Y54R	M135K	K174R
129	配列番号7	Y54R	M135T	K174R
130	配列番号7	T56H	無し	D178N
131	配列番号7	T56H	無し	W181H
132	配列番号7	T56H	無し	W181R
133	配列番号7	T56H	無し	K174R
134	配列番号7	T56K	無し	D178N
135	配列番号7	T56K	無し	W181H
136	配列番号7	T56K	無し	W181R
137	配列番号7	T56K	無し	K174R

(項目12)

ポリペプチド番号110、112、113、116、117、118、122、127、128、または129のうちのいずれか1つから選択される、項目11に記載の前記ポリペプチド。

(項目13)

項目1~12のいずれか一項に記載の前記ポリペプチドと薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

(項目14)

前記組成物は、患者の血流中への注射または注入のために製剤化される、項目13に記載の前記薬学的組成物。

(項目15)

前記組成物は、脳またはCNSへの直接投与のために製剤化される、項目13に記載の前記薬学的組成物。

(項目16)

アミロイドまたはタウタンパク質凝集体の低減を必要とする患者において、アミロイドまたはタウタンパク質凝集体を低減させる方法であって、前記患者に、有効量の項目1~12のいずれか一項に記載の前記ポリペプチドまたは項目13~15のいずれか一項に記載の前記薬学的組成物を投与することを含む、前記方法。

(項目17)

前記患者は、アミロイドまたはタウタンパク質凝集体の存在に関連付けられる神経変性疾患の症状を示す、項目16に記載の前記方法。

(項目18)

前記患者は、バイオマーカーフロルベタビルが陽電子放出断層撮影において造影剤として使用されるときに、そのバイオマーカーに関して陽性である、項目16または項目17に記載の前記方法。

(項目19)

前記患者は、アルツハイマー病（早発性アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、及び発症前アルツハイマー病を含む）、パーキンソン病、S A A アミロイド症、シスタチンC、遺伝性アイスランド病、老衰、多発性骨髄腫、プリオン病（クールー、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病（GSS）、致死性家族性不眠症（FFI）、スクラピー、及び牛海綿状脳症（BSE）を含むがそれらに限定されない）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄小脳失調（SCA1、SCA3、SCA6、またはSCA7）、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（dentatorubral-pallidolysian atrophy）、球脊髓性筋萎縮症、遺伝性脳アミロイド血管症、家族性アミロイド症、イギリス型／デンマーク型認知症、家族性脳症、筋萎縮性側索硬化症／パーキンソン病・認知症複合病、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、ボクサー認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病、ダウン症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハラー・ホルデン・スパツツ病、筋強直性ジストロフィー、ニーマン・ピック病C型、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患（Non-Guamanian motor neuron disease with neurofibrillary tangles）、ピック病、脳炎後パーキンソン病、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上性麻痺、亜急性硬化性汎脳炎、神経原線維型認知症、前頭側頭葉変性症（FTLD）、及び前頭側頭葉型認知症（FTD）（以下の臨床症候群のうちの1つ以上を有する患者を含む：行動障害型FTD（b v FTD）、進行性非能弁的失語症（PNFA）、17番染色体に関連付けられるパーキンソン病を伴う前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺（Progressive Supranuclear Palsy）（ PSP）、及び意味性認知症（SD））から選択される神経変性疾患に罹患する、項目16～18のいずれか一項に記載の前記方法。

（項目20）

前記神経変性疾患は、パーキンソン病、アルツハイマー病、またはハンチントン病である、項目19に記載の前記方法。

（項目21）

前記神経変性疾患は、アルツハイマー病である、項目20に記載の前記方法。

（項目22）

前記患者は、クロイツフェルト・ヤコブ病、クールー、致死性家族性不眠症、またはゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群から選択されるプリオン媒介疾患に罹患する、項目19に記載の前記方法。

（項目23）

項目1～12に記載の前記ポリペプチドのうちのいずれか1つをコードする核酸配列。

（項目24）

前記ポリペプチドコード配列にかつインフレームで融合された哺乳類シグナル配列をさらにコードする、項目23に記載の前記核酸配列。

（項目25）

項目23または24に記載の核酸配列を含むベクターであって、前記核酸配列は、前記ベクター内の発現制御配列に作動可能に連結される、前記ベクター。

（項目26）

項目25に記載の前記ベクターを含有する、宿主細胞。

（項目27）

項目1～12のいずれか一項に記載のポリペプチドを作製する方法であって、項目23または24に記載の前記核酸配列によってコードされるタンパク質を発現させるステップと、前記発現されたポリペプチドを単離するステップと、を含む、前記方法。

（項目28）

項目1～12のいずれか一項に記載のポリペプチドを作製する方法であって、前記ポリペプチドの発現を可能にするのに十分な条件下で、項目26に記載の前記宿主細胞を培養するステップと、前記発現されたポリペプチドを単離するステップと、を含む、前記方法

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0085

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0085】

それに加えて、分析間変動を、同型培養のローデータのC V及びS Dを算出することによって評価した。増殖分析は、6連培養において設定した（「非調節データ」）。分析間変動性が低かったことを確実にするために、データを、最大及び最小c p m値を除去した後にも分析し（「調節データ」）、ドナー応答のS Iを、両データセットを使用して比較した。T細胞エピトープを、本研究における全ペプチドに対する陽性応答（上記に定義される）の平均頻度、及びバックグラウンド応答率を付与するためにS Dを算出することによって同定した。調節及び非調節データの両方における、バックグラウンド応答率を上回る増殖性応答を誘発した任意のポリペプチドを、T細胞エピトープを含有すると見なした。2個の重複ペプチドが増殖性応答率を誘発した場合、T細胞エピトープは、重複領域内にあると見なした。これに基づき、以下のT細胞エピトープを試験ポリペプチドにおいて同定した：

エピトープ1：C T G D E T Q C Y G T W（配列番号1のアミノ酸46～57）
エピトープ2：T F M F Q N N R F R N R（配列番号1のアミノ酸133～144）
エピトープ3：S S K A M Y D A Y W N G（配列番号1のアミノ酸172～183）
エピトープ4：P V N A G G S G G G S（配列番号1のアミノ酸214～225）
エピトープ5：S G S G A M V R S D K T H T C（配列番号1のアミノ酸253～267）

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2014/039760									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/16 A61K47/48 C07K14/01 A61P25/28 ADD.											
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 C07K A61P											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 2011/084714 A2 (BIOGEN IDEC INC; MILLER BRIAN ROBERT; MICHAELSON JENNIFER; DEMAREST ST) 14 July 2011 (2011-07-14) claim 1 -----</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-28</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 2006/083795 A1 (UNIV RAMOT [IL]; GERAGHTY ERIN [US]; SOLOMON BEKA [IL]; GOREN ORNA [IL]) 10 August 2006 (2006-08-10) page 2 - page 36 -----</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-28</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	WO 2011/084714 A2 (BIOGEN IDEC INC; MILLER BRIAN ROBERT; MICHAELSON JENNIFER; DEMAREST ST) 14 July 2011 (2011-07-14) claim 1 -----	1-28	A	WO 2006/083795 A1 (UNIV RAMOT [IL]; GERAGHTY ERIN [US]; SOLOMON BEKA [IL]; GOREN ORNA [IL]) 10 August 2006 (2006-08-10) page 2 - page 36 -----	1-28
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
A	WO 2011/084714 A2 (BIOGEN IDEC INC; MILLER BRIAN ROBERT; MICHAELSON JENNIFER; DEMAREST ST) 14 July 2011 (2011-07-14) claim 1 -----	1-28									
A	WO 2006/083795 A1 (UNIV RAMOT [IL]; GERAGHTY ERIN [US]; SOLOMON BEKA [IL]; GOREN ORNA [IL]) 10 August 2006 (2006-08-10) page 2 - page 36 -----	1-28									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt 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											
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report									
24 October 2014		03/11/2014									
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stoyanov, Borislav									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2014/039760

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2011084714	A2	14-07-2011		NONE
WO 2006083795	A1	10-08-2006	AT 501723 T CN 101166536 A DK 1853285 T3 EP 1853285 A2 ES 2363203 T3 HK 1110790 A1 JP 5096169 B2 JP 2008528688 A PT 1853285 E SI 1853285 T1 US 2009180991 A1 US 2011142803 A1 US 2013177533 A1 WO 2006083795 A1	15-04-2011 23-04-2008 27-06-2011 14-11-2007 26-07-2011 25-11-2011 12-12-2012 31-07-2008 06-06-2011 29-07-2011 16-07-2009 16-06-2011 11-07-2013 10-08-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F	I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P	21/00	C
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14	

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 フィッシャー, リチャード エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, フェイバー・ウェザーストリート 130

(72)発明者 ホルゲート, ロバート ジョージ エドワード

イギリス国 エスジー8 5ディーウー ハートフォードシャー, ロイストン, ガワー ロード 34

(72)発明者 カー, フランシス ジョセフ

イギリス国 エービー23 8ダブリューユー アバディーン, パルミディ, ザ ホールディングス, バーチリー

(72)発明者 ジョーンズ, ティモシー デイビッド

イギリス国 シービー22 3エージェイ ケンブリッジ, パブラハム, ブリック ロウ 27

Fターム(参考) 4B064 AG01 BJ12 CA02 CA06 CA10 CA19 DA01

4B065 AA01X AA57X AA72X AA93Y AA98Y AB01 BA02 CA24 CA44

4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 BA41 CA01 CA53 DC50

MA17 MA66 NA14 ZA021 ZA151 ZA161 ZA221

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA01 EA21 FA74