(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6689993号
(P6689993)

(45)発行日　令和2年4月28日(2020.4.28)　(24)登録日　令和2年4月10日(2020.4.10)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	H
A61K 38/08	(2019.01)	A61K	38/08	ZNA
A61K 47/64	(2017.01)	A61K	47/64	
A61K 39/39	(2006.01)	A61K	39/39	
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47	

請求項の数 17　(全 17 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-537651(P2018-537651)
(86)(22)出願日　平成29年2月14日(2017.2.14)
(65)公表番号　特表2019-512001(P2019-512001A)
(43)公表日　令和1年5月9日(2019.5.9)
(86)国際出願番号　PCT/EP2017/053242
(87)国際公開番号　WO2017/140656
(87)国際公開日　平成29年8月24日(2017.8.24)
審査請求日　平成31年2月18日(2019.2.18)
(31)優先権主張番号　P201630173
(32)優先日　平成28年2月15日(2016.2.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
スペイン(ES)

(73)特許権者　512151193
アラクロン・ビオテック・エセ・エレ
スペイン・サラゴサ・５０００９・サラゴサ・ビア・イスパニダー・２１
(74)代理人　100108453
弁理士　村山　靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広　信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部　達彦
(72)発明者　マヌエル・サラサ・バリオ
スペイン・５０００８・サラゴサ・パセオ・デ・ラ・インデペンデンシア・３０・２・アー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アミロイドコンジュゲート並びにその使用及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

i)キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に連結した少なくとも1つのCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)を含むコンジュゲート、及びii)水酸化アルミニウムゲルを含む医薬組成物であって、コンジュゲートのキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に各CysAβ(33-40)ペプチドを接続している架橋剤がマレイミド酪酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SM)であり、組成物のpHが5.8から7.0の範囲内にある、医薬組成物。

【請求項２】

組成物のpHが6.2から7.0の範囲内にある、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項３】

組成物のpHが5.8から6.2の範囲内にある、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項４】

医薬組成物中のCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)の濃度が少なくとも100μgである、請求項1から3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項５】

医薬組成物中のCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)の濃度が少なくとも150μgである、請求項1から3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項６】

医薬組成物中のCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)の濃度が150μgから400μgである、請求項1から3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項７】
医薬組成物中のCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)の濃度が160μgから240μgである、請求項1から3のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項８】
コンジュゲートが、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)1個に対して少なくとも45個の比で連結したCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項９】
請求項1から8のいずれか一項に記載の医薬組成物を含むガラスアンプル。
【請求項１０】
医薬組成物を製造する方法であって、
a. 7.0から9の間のpHの緩衝液中にキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)を含む組成物にマレイミド酪酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SM)を添加する工程、
b. 工程a)の溶液から余剰分のマレイミド酪酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを除去する工程、
c. 6.6から7.0の間のpHの工程b)の溶液にDMSO中のCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)を添加して、コンジュゲートを生じさせる工程、
d. 工程c)から遊離ペプチドを除去する工程、
e. 任意選択で、工程d)の溶液をろ過する工程、
f. 工程d)又は工程e)の溶液のpHを5.8から6.2の間の範囲に調整する工程、及び、
g. 工程f)の溶液のpHが調整されると、溶液に水酸化アルミニウムゲルを添加する工程を含む方法。
【請求項１１】
工程b)の余剰分が、約6.6から7.0のpHの0.02Mリン酸ナトリウム緩衝液を使用することにより除去される、請求項10に記載の方法。
【請求項１２】
工程d)の余剰分が、6.6から7.0のpHの0.01M PBS緩衝液を使用することにより除去される、請求項10又は11に記載の方法。
【請求項１３】
工程e)において、約0.2μmのフィルターを使用することにより溶液がろ過される、請求項10から12のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
工程f)のpHが約6.0のpH範囲に調整される、請求項10から13のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
アミロイド疾患の治療又は予防における使用のための、請求項1から8のいずれか一項に記載の医薬組成物又は請求項9に記載のガラスアンプル。
【請求項１６】
アミロイド疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳アミロイドアンギオパチー、アミロイド起源の血管性認知症、封入体筋炎、及びレヴィー小体を伴う認知症からなる群から選択される、請求項15に記載の使用のための医薬組成物。
【請求項１７】
アミロイド疾患がアルツハイマー病である、請求項16に記載の使用のための医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は生化学の分野に関し、より詳細には、タンパク質コンジュゲーションの領域の分野に関する。本発明はまた、アミロイド疾患の治療における医学及び獣医学の分野において応用を有する。

【背景技術】
【０００２】
アミロイド疾患、根本的にはアルツハイマー病の患者の能動又は受動免疫化に有用な複数のコンジュゲートが先行技術において報告されている。前記先行技術のほとんどでは、患者において好適な免疫応答を生成できるペプチド又は輸送タンパク質の選択に焦点が当てられており、使用される架橋剤にはあまり重要性も関連性も与えられていないということは指摘されるべきである。前記架橋剤は、現在までに利用可能又は既知である全ての架橋剤のいずれも同等に使用可能であると述べるか、又は単純にそれすら述べることなく、それらの架橋剤の一覧の形式で表されることが多い。
【０００３】
例えば、公開番号ES2246105のスペイン特許出願には、Ａβ33-40ペプチドと輸送タンパク質キーホールリンペットヘモシアニン(以下、KLH; Protein Data Bankアクセッション番号4BED)とによって形成されたコンジュゲートを用いて患者を能動免疫化することによるアミロイド疾患、とりわけアルツハイマー病の予防又は治療が開示されている。生成後にアミロイド疾患、とりわけアルツハイマー病の予防又は治療用の受動免疫法において使用される抗体を(例えば、前記コンジュゲートを用いて哺乳動物又は鳥を免疫化することにより)生成するための前記コンジュゲートの使用も企図されている。前記特許文献では、使用する架橋剤は特定されていない。
【０００４】
該コンジュゲートにて生じる免疫応答において架橋剤が重要であると考えている、本発明者らが認識している唯一の先行技術文献は、公開番号WO2005/072777のPCT特許出願である。前記文献には、架橋剤LPAに基づく患者の能動又は受動免疫化用コンジュゲートが開示されており、架橋剤LPAに関して、同時に2つのペプチドに結合するか、又は同時に2つのペプチドを有する能力が強調され、この能力により架橋剤LPAは患者において好適な免疫応答を生成するのに適していることが開示されている。LPAベースのコンジュゲートの一般的説明において、使用されるペプチドはＡβ42又はＡβ40のC末端断片であり得ることが企図されており、33～42、35～42、36～42、37～42、38～42、及び39～42の断片が具体的に言及され、例示されている。更に、前記文献には、輸送タンパク質はKLHであり得ることが言及されている。この同じ文献には、異なる架橋剤(一般にSPDPとして知られるN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート)を用いて他のコンジュゲートを生成することが記載されている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００５】
【特許文献１】ES2246105
【特許文献２】WO2005/072777
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００６】
広範且つ徹底的な実験により、本発明者らは驚くべきことに以下のことを発見した。即ち、その各分子がペプチドを輸送タンパク質に結合させるヘテロ二官能性架橋剤であるマレイミド酪酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(以下、SM)を、CysＡβ(33-40)ペプチド(配列番号1)とKLHとのコンジュゲートを調製するための架橋剤として使用すると、同様にペプチドを輸送タンパク質に結合させるSPDP等の先行技術の他のホモ又はヘテロ二官能性架橋剤を用いて生成されたコンジュゲートにより生じる免疫応答と比べて、向上した免疫応答の生成を可能とするコンジュゲートが得られる。このような向上は、本明細書の実施例1～4において明確に示されている。加えて、前記実施例は、前記新たなコンジュゲート又は前記コンジュゲートを含む医薬組成物が、
- (予防的又は治療的)ワクチン処置に付随する副作用を最小化する目的から、可能な限り特異的な免疫応答、

- 患者の効果的な免疫化を確実に行い、免疫原性コンジュゲートの必要量を低減する目的から、可能な限り強い免疫応答
を生じさせることを示している。

【０００７】

よって第1の態様において、本発明は、架橋剤がSMであることを特徴とするコンジュゲートに関する。

【０００８】

別の態様において、本発明は、本発明のコンジュゲートを含む組成物に関する。

【０００９】

本発明の更なる態様において、医薬品、より具体的には、アミロイド疾患の治療又は予防を目的とする医薬品を製造するための前記コンジュゲートの使用が企図される。

【００１０】

本発明が関連する別の態様は、医薬品、より具体的にはアミロイド疾患の治療又は予防において使用するための医薬品として使用するための、本発明のコンジュゲートを含む組成物である。

【００１１】

更には、本発明はまた、本発明のコンジュゲートを含む組成物を送達することによりアミロイド疾患を治療又は予防する方法に関する。

【００１２】

更に別の態様において、本発明は、本発明のコンジュゲートの使用に基づいて抗体を製造する方法に関する。

【発明を実施するための形態】

【００１３】

定義

本明細書で使用する場合、「アミロイド疾患(amyloid disease)」及びその複数形は、βアミロイドの蓄積に付随する疾患を指す。前記蓄積は根本的に脳で起こり得て、中でもアルツハイマー病、パーキンソン病、脳アミロイドアンギオパチー、アミロイド起源の血管性認知症、及びレヴィー小体を伴う認知症等の疾患を生じ得る。βアミロイドの蓄積は根本的に骨格筋においても起こり得て、封入体筋炎を生じ得る。

【００１４】

本明細書で使用する場合、「受動免疫化(passive immunization)」及びその複数形は、患者に免疫を与える目的で抗体又はその断片を前記患者に送達することを指す。

【００１５】

本明細書で使用する場合、「能動免疫化(active immunization)」及びその複数形は、患者に免疫を与える目的で免疫原(即ち、抗体生成を可能とするもの)として作用する(コンジュゲート形態の)ペプチドを前記患者に送達することを指す。

【００１６】

本明細書で使用する場合、「アジュバント(adjuvant)」及びその複数形は、患者において免疫応答を増加させる、改善させる、又はそうでなければ調節するために本発明のコンジュゲートと組み合わせることができる免疫調節物質を指す。

【００１７】

本明細書で使用する場合、「患者(patient)」及びその複数形は、アミロイド疾患を治療又は予防する目的から本発明のコンジュゲート又はそれを含む組成物を投与できる任意の哺乳動物、好ましくはヒトを指す。

【００１８】

本明細書で使用する場合、「CysAβ(33-40)」とは、N末端にシステインを付加したAβ40(配列番号2)の33～40番目の位置の配列をいう。前記配列は配列番号1に反映されており、CGLMVGGVVである。

【００１９】

説明

第1の態様において、本発明は、少なくとも1つのCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)及びキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)を含むコンジュゲートであって、コンジュゲートの構成要素のそれぞれを(前記少なくとも1つのペプチドのそれぞれをKLHに)接続している架橋剤がマレイミド酪酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SM)であることを特徴とするコンジュゲートに関する。

【００２０】

前記コンジュゲートは、Aβ40に対する効果的且つ特異的な免疫応答を可能とする又は生じさせること(生じる抗体が、Aβ42に顕著に結合することなくAβ40に特異的であること)に加えて、同様にCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)及びKLHを含み、同様に輸送タンパク質へのペプチドの結合を可能とする別の架橋剤により前記要素が結合した又はコンジュゲーションした他のコンジュゲートにより生じる応答と比べて、前記応答を増加させる。

【００２１】

第2の態様において、本発明は、本発明のコンジュゲートを含む組成物に関する。

【００２２】

好ましい実施形態において、組成物は、1つ又は複数のアジュバントを更に含み、1つ又は複数のアジュバントは、好ましくは、無機塩(例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、又はリン酸カルシウム等)、微粒子及び活性表面剤(active surface agents)[例えば、非イオン性ブロックポリマー界面活性剤、ビロソーム、サポニン、髄膜炎菌性外膜タンパク質(プロテオソーム)、免疫刺激複合体、コクリエート、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、アブリジン、ビタミンA又はビタミンE等]、細菌産物[例えば、Mycobacterium phleiの細胞壁骨格、ムラミルジペプチド及びトリペプチド(スレオニル-MDP、MDP-ブチルエステル、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンMTP)、モノホスホリルリピドA、Klebsiella pneumoniaeの糖タンパク質、Bordetella pertussis、Bacillus Calmette-Guerin、コレラ菌(V. Cholerae)及び大腸菌(E. coli)の熱不安定性エンテロトキシン、トレハロースジミコール酸、CpGオリゴデオキシヌクレオチド等]、ホルモン及びサイトカイン(例えば、インターロイキン-2、インターフェロン-α、インターフェロン-β、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、デヒドロエピアンドロステロン、Flt 3リガンド、1,25-ジヒドロキシビタミンD_3、インターロイキン-1、インターロイキン-6、インターロイキン-12、ヒト成長ホルモン、β-ミクログロブリン、及びリンホタクチン等)、単一抗原コンストラクト(例えば、リジンコア(lysine nucleus)に結合した複数のペプチド抗原、又はヘルパーT細胞エピトープに結合し且つN末端がパルミトイル化された細胞毒性T細胞エピトープ等)、ポリアニオン(例えば、デキストラン、又は二本鎖ポリヌクレオチド等)、ポリアクリル酸(例えば、ポリメチルメタクリレート、又はアリルスクロースで架橋されたアクリル酸等)、キャリア[例えば、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、B群髄膜炎菌性外膜タンパク質(プロテオソーム)、シュードモナス(Pseudomonas)のエキソトキシンA、コレラ毒素Bサブユニット、熱不安定突然変異性腸管毒素原性大腸菌エンテロトキシン、B型肝炎ウイルスのコア、コレラ毒素A融合タンパク質、CpGジヌクレオチド、熱ショックタンパク質、又は脂肪酸等]、生ベクター(例えば、ワクシニアウイルス、カナリア痘ウイルス、アデノウイルス、弱毒化チフス菌(Salmonella typhi)、Bacillus Calmette-Guerin、Streptococcus gordonii、単純ヘルペスウイルス、ワクチン由来ポリオウイルス、ライノウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、Yersinia enterocolitica、Listeria monocytogenes、赤痢菌(Shigella)、Bordetella pertussis、又はSaccharomyces cerevisiae等)、ビヒクル[例えば、W/Oエマルジョン(例えば、完全フロイントアジュバント又は不完全フロイントアジュバント等の鉱油、植物油、スクアレン又はスクアラン等)、O/Wエマルジョン(例えば、スクアレン、ツイーン80(Tween-80)、及びスパン85(Span 85)の混合物等)、リポソーム、又は生分解性ポリマーのミクロスフェア(例えば、ラクチド及びグリコリド、ポリフォスファゼン(polyphosphazones)、βグルカン(betal-glucans)、又はプロテノイドのもの)等]、その他のもの(例えば、N-アセチル-グルコサミン-3イル-アセチル-L-アラニル-D-イソグルタミン、ガンマインスリン、及び水酸化アルミニウム

、トランスジェニック植物、ヒト樹状細胞、リゾホスファチジルグリセロール、ステアリル-チロシン、又はトリパルミトイルペンタペプチド等)、又はこれらの組み合わせから選択される。

【００２３】

本発明の第2の態様の好ましい実施形態において、前記アジュバントは水酸化アルミニウムであり、より好ましくは水酸化アルミニウムゲルである。したがって、本発明の第2の態様の好ましい実施形態は、i)キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に連結した少なくとも1つのCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)を含むコンジュゲート、及びii)水酸化アルミニウムゲルを含み、コンジュゲートのキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に各CysAβ(33-40)ペプチドを接続している架橋剤がマレイミド酪酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SM)である組成物、好ましくは医薬組成物に関する。

【００２４】

実施例5に示すように、前記好ましい組成物の水酸化アルミニウムゲルへのコンジュゲートの吸着率はpHに依存することに留意されたい。実際、吸着率は、より低いpH値において増加する。pH 7.4からpH 7.2へ、又は更にはpH 7.0への低減は、顕著により高い吸着率をもたらさない。pH 6.8での吸着は約90%の吸着率を示す。pH 6.0で吸着率は最も高くなる。200μg/mLの正味のペプチドに基づくコンジュゲート濃度及びpH 6では、コンジュゲートの7%は未だ遊離している。

【００２５】

これらの分析に基づけば、医薬組成物の免疫原性能力を高めるためには、アジュバントへのコンジュゲートの吸着率を高めてその免疫原性能力を顕著に増加させるために5.8から7.0の間のpH値を用いるべきである。

【００２６】

したがって、本発明の第2の態様の別の好ましい実施形態は、i)キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に連結した少なくとも1つのCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)を含むコンジュゲート、及びii)水酸化アルミニウムゲルを含み、コンジュゲートのキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に各CysAβ(33-40)ペプチドを接続している架橋剤がマレイミド酪酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SM)であり、組成物のpHが5.8から7.0の範囲、好ましくは6.2から7.0の範囲、より好ましくは5.8から6.2の範囲にある組成物、好ましくは医薬組成物に関する。

【００２７】

本発明の第2の態様又はその好ましい実施形態のいずれかの更なる好ましい実施形態において、医薬組成物中のCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)の濃度は、少なくとも100μg、好ましくは少なくとも150μg、より好ましくは150μgから400μg、更により好ましくは160μgから240μg、更により好ましくは約200μgである。

【００２８】

本発明の第2の態様又はその好ましい実施形態のいずれかのまた更なる好ましい実施形態において、医薬組成物中に存在するKLH-SM-CysAβ(33-40)コンジュゲートは、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)タンパク質1個に対して少なくとも45個の比でCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)を含む。

【００２９】

本発明の第2の態様又はその好ましい実施形態のいずれかの更に別の好ましい実施形態において、医薬組成物はガラスアンプル中、好ましくは1ml又は1.2mlのガラスアンプル中に含まれる。

【００３０】

上記で考察したように、本発明の第2の態様の組成物中での水酸化アルミニウムゲルへのコンジュゲートの吸着率(水酸化アルミニウムゲルを使用した場合)はpHに依存することに更に留意されたい。更に、驚くべきことに、医薬組成物の製造後の保管の間にpHが増加するので、このような増加が7.0を上回るpH値、又は好ましくは6.8を上回るpH値に達すれば吸着率を低下させる。医薬組成物の免疫原性能力に明らかに影響を及ぼすこのような欠

点を軽減するために、医薬組成物の製造時に医薬組成物のpHを5.5から6.5の間、好ましくは5.8から6.2の間、より好ましくは5.9から6.1の間の範囲内に調整することにより、保管が組成物の免疫原性能力に影響しないか、又は影響が最小になるようにすることが重要である。

【００３１】

したがって、本発明の第2の態様のまた別の好ましい実施形態は、医薬組成物を製造する方法であって、

a. 7.0から9の間のpHの緩衝液中にキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)を含む組成物にマレイミド酪酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SM)を添加する工程、

b. 約6.6から7.0のpHの0.02Mリン酸ナトリウム緩衝液を好ましくは使用することにより、工程a)の溶液から余剰分のマレイミド酪酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを除去する工程、

c. 6.6から7.0の間のpHの工程b)の溶液にDMSO中のCysAβ(33-40)ペプチド(配列番号1)を添加して、コンジュゲートを生じさせる工程、

d. 6.6から7.0のpHの0.01M PBS緩衝液を好ましくは使用することにより、工程c)から遊離ペプチドを除去する工程、

e. 任意選択で、約0.2μmのフィルターを好ましくは使用することにより、工程d)の溶液をろ過する工程、

f. 工程d)又は工程e)の溶液のpHを5.5から6.5の間、好ましくは5.8から6.2の間、より好ましくは5.9から6.1の間、更により好ましくは約6.0の範囲に調整する工程、及び、

g. 工程f)の溶液のpHが調整されると、溶液に水酸化アルミニウムゲルを添加する工程

を含む方法に関する。

【００３２】

第3の態様において、本発明は、医薬品を製造するための本発明のコンジュゲートを含む組成物の使用を開示する。好ましくは、前記組成物は、本発明の第2の態様において又はその好ましい実施形態のいずれかにおいて特定される組成物である。また、好ましい実施形態において、前記医薬品は、アミロイド疾患、より好ましくは、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳アミロイドアンギオパチー、アミロイド起源の血管性認知症、封入体筋炎、及びレヴィー小体を伴う認知症から選択されるアミロイド疾患の治療又は予防における使用のためのものである。最も好ましい実施形態において、前記医薬品はアルツハイマー病の予防又は治療のために使用される。

【００３３】

第4の態様において、本発明は、治療有効量の本発明のコンジュゲートを含む組成物を送達することを含む、それを必要とする患者におけるアミロイド疾患を治療又は予防する方法に関する。好ましくは、前記組成物は、本発明の第2の態様において又はその好ましい実施形態のいずれかにおいて特定される組成物である。また、好ましい実施形態において、前記アミロイド疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳アミロイドアンギオパチー、アミロイド起源の血管性認知症、封入体筋炎、及びレヴィー小体を伴う認知症から選択されるアミロイド疾患であり、よりいっそう好ましくはアルツハイマー病である。

【００３４】

最後の態様において、本発明は、本発明のコンジュゲートを含む組成物を用いて哺乳動物又は鳥を免疫化する免疫化工程を含むことを特徴とする、抗体を製造する方法を開示する。好ましくは、前記組成物は、本発明の第2の態様において又はその好ましい実施形態のいずれかにおいて特定される組成物である。このような方法において使用される哺乳動物は、反すう動物、ウマ科動物、ウサギ目動物、霊長類動物(好ましくはヒト)、又は十分な量の抗体を抽出又は取得するために好適な量の血清を取得できる他のあらゆる哺乳動物であり得ることが企図される。本発明の方法において使用される鳥は、任意の鶏類の鳥、水鳥、ハト(pigeon)、及び鳩(dove)、又は、十分な量の抗体を抽出又は取得するために好適な量の血清を取得できる他のあらゆる鳥であることが企図される。本発明の最後の態様

の方法によって得られた又は得ることができる抗体の保護、並びにアルツハイマー病、パーキンソン病、脳アミロイドアンギオパチー、アミロイド起源の血管性認知症、封入体筋炎、及びレヴィー小体を伴う認知症から選択されるアミロイド疾患、よりいっそう好ましくはアルツハイマー病の治療において使用するための医薬組成物を製造するためのそれらの使用が更に企図される。

【００３５】

したがって、本発明は、先行技術の他の架橋剤を用いて生成されたコンジュゲートと比べてより強い免疫応答の生成を可能とする、架橋剤SMを使用して生成されたコンジュゲート及び該コンジュゲートを含む組成物を提供する。

【００３６】

更に、本発明の前記コンジュゲート又は前記コンジュゲートを含む組成物によって生成された免疫応答はAβ40に特異的であり、即ち、抗Aβ42抗体を生成することなく抗Aβ40特異的抗体を生成することができる。

【００３７】

より良い理解のために、例示としての、説明用の非限定的な実施例を参照して提示する添付の図面を参照して、本発明を以下において更に詳細に説明する。

【実施例１】

【００３８】

KLH-SM-CysAβ(33-40)コンジュゲートの調製

これらのコンジュゲートを調製するために、KLHを輸送タンパク質として、SMを架橋剤として、そしてCysAβ(33-40)(配列番号1)を免疫原性ペプチド(N末端にシステインを付加したアミロイドペプチドの残基33～40を有するペプチド)として使用した。

【００３９】

結合は、KLHの利用可能なリジン残基とペプチドのN末端に付加したシステインとの間で起こった。この場合、最初に架橋剤をKLHに結合させ(KLH活性化工程)、第2の工程で、コンジュゲーションが起こるように免疫原性ペプチドを活性化KLHに添加した。

【００４０】

以上で従ったプロトコールは以下の通りである。

・　680μLの乾燥DMSO中に100mgのSMを溶解することによりSMの250mMストック溶液を調製した。前記ストック溶液のアリコートを作り、-20℃で保管した。

・　PBS/5mM EDTA(pH 7.4)中に5mg/mLの濃度でKLHを溶解した。

・　コンジュゲーションされるKLH 1ミリリットルあたり16μLのSMのストック溶液を添加した。

・　前記溶液を穏やかに撹拌しながら室温で2時間30分反応させた。

・　次に、反応緩衝液を変更して反応副生成物及び余剰分の未反応SMを除去した。この目的のために、PD10カラム(GE Healthcare社;リファレンス17-0851-01)を以下の通りに用いた。

工程a):　25mL(5mL、5回)のPBS(80mMリン酸水素ナトリウム二水和物(sodium hydrogenophosphate dihydrate)、20mMリン酸二水素ナトリウム一水和物(sodium dihydrogenophosphate monohydrate)、100mM塩化ナトリウム)/5mM EDTA(pH 7.4)を用いてカラムを平衡化した。

工程b):　2.5mLの既に反応した溶液をカラム中に添加し、前記溶液を透過させ、溶出液を廃棄した。

工程c):　3.5mLのPBSをカラム中に添加し、溶出液を回収した。

工程d):　工程a)で上述したように、25mL(5mL、5回)の5mM EDTA(pH 7.4)を用いてカラムを再平衡化した。

工程b)から工程d)を繰り返した。毎回、反応した溶液の量に応じた必要量とした。その後、カラムを平衡化した。

工程e):　同じペプチドコンジュゲートを同様に用いる他の機会でカラムを使用するために、カラムを4℃で保管した。プロトコールに先行する。

・　次に、活性化KLHと混合すべきペプチドを計算した。このために、ペプチドの分子量及びKLHの分子量の両方、更にはその活性部位(ジチオトレイトールで活性化KLH溶液を処理する前及び後に343nmの吸光度を測定し、必要な変換を行うことに基づく、先行技術で既知の方法に従って測定)を考慮に入れた。例えば、1724の活性部位を有する10mgのKLHの場合:

10/6725000(KLHの平均分子量) = 1.48×10^{-6}mmolのKLH

1.48×10^{-6}mmolのKLH×1724の活性部位 = 2.55×10^{-3}mmolのペプチドが全ての活性部位を覆うために必要

コンジュゲーション反応を促すために、3倍のペプチド過剰とする。

$2.55\times10^{-3}\times3 = 7.65\times10^{-3}$mmolのペプチドが必要

7.65×10^{-3}×ペプチドの分子量(834.4Da) = 必要なペプチドのmg(6.38mgのペプチド)(必要な変換係数を適用)

・　ペプチド/活性化KLH(即ち、結合したSMを有するKLH)の比を決定したら、以下の反応液、即ち、SMを有する活性化KLHとペプチドとの好適な比率の混合液を調製した。そのために、ペプチドをDMSO中に6mg/mLで調製し、活性化KLHにゆっくりと添加した。最終反応液中のDMSOの比率は30%を超えてはならない。いずれにしてもそれより高くなったら、その量が30%未満の値に減少するまでPBS/5mM EDTA(pH7.4)を添加する。

・　室温で撹拌しながら該溶液を18～24時間反応させた。

・　最後に、得られた溶液を4℃で保管した。KLHとコンジュゲーションせず、したがって遊離しているペプチドは除去してもよいし、しなくてもよい。前記遊離のペプチドを除去しない場合、最終生成物中のペプチド濃度は、天然KLHに結合したペプチドだけでなく、反応に使用した総ペプチドと、最終反応液の量とにより決定される。

【実施例２】

【００４１】

異なる架橋剤を使用して生成されたKLH-架橋剤-CysAβ(33-40)コンジュゲートの免疫応答の比較

この場合において、以下のコンジュゲートを用いてマウス(群あたり4匹)で生成された免疫応答強度を比較した。

・　KLH-SM-CysAβ(33-40)(実施例1に従って製造)

・　KLH-SPDP-CysAβ(33-40):このコンジュゲートは、先行技術でよく用いられる架橋剤であるスクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)を使用し、実施例1(必要な適合を行った)に記載のプロトコールに非常に類似した先行技術で既知のプロトコールにより製造した。

【００４２】

免疫応答強度試験をBALB/c系統マウスで行った。従ったプロトコールは以下の通りである。

1．最初の接種の1週間前に、本研究に参加する全てのマウスから血液を採取し、免疫前血清を取得した。

2．各マウスに割り当てた群に応じて(異なる分析群についてはTable 1(表1)を参照)、3週連続で週に1回、対応するワクチンを各マウスに接種した。

3．3回目の接種の1週間後、本研究に参加するマウスのそれぞれから再び血液を採取し、血清で得られた応答を測定した。

【００４３】

【表１】

Table 1. 本研究に使用した群及び各群に投与したコンジュゲートの説明

群	輸送タンパク質	架橋剤	アジュバント
1	KLH, 製造者1	SM	Alhydrogel(登録商標) (水酸化アルミニウムゲル)
2	KLH, 製造者1	SPDP	Alhydrogel(登録商標) (水酸化アルミニウムゲル)
3	KLH, 製造者2	SM	Alhydrogel(登録商標) (水酸化アルミニウムゲル)
4	KLH, 製造者2	SM	なし
5	KLH, 製造者2	SPDP	Alhydrogel(登録商標) (水酸化アルミニウムゲル)
6	KLH, 製造者3 (GMP)	SM	Alhydrogel(登録商標) (水酸化アルミニウムゲル)

【００４４】

Table 1(表1)に示す各群のマウスに投与したペプチドの量を下記Table 2(表2)に示す。

【００４５】

【表２】

Table 2. 本研究の各群のマウスのそれぞれに投与した全ペプチド及びKLHにコンジュゲーションしたペプチドの両方を含む、ペプチドの量

群	ペプチドの総量(遊離のペプチド及びKLH結合ペプチドの合計)(単位μg)	KLH結合ペプチドの量(単位μg)
1	120	40
2	120	40
3	120	40
4	120	40
5	120	40
6	60	60

【００４６】

Table 3(表3)は、異なる群について得られた免疫応答強度の結果(本実施例で説明した治療的又はワクチン接種レジメンの終了から1週間後に得られたマウスの血清を分析)を、免疫応答において観察された増加(免疫応答前に対する、治療的レジメン終了から1週間後の免疫応答の増加の倍数)と共に表形式の要約として示す。先行技術で既知のプロトコールに従って、各マウスから取得した血清について間接ELISAにより免疫応答を測定した。該プロトコールに関して、ELISAプレートにAβ40ペプチドを固定した(sieved)ことを指摘すべきである。洗浄、ブロッキング、引き続いての洗浄、分析すべき血漿/血清(1:30の希釈で開始する1:3の段階希釈)試料とのインキュベーション、及び追加的な洗浄という対応する工程を行ってから、各ウェルを抗マウスIgG (H+L)抗体HRP(二次抗体の希釈はpH 8のビヒクル溶液中、1:2000であった)と共にインキュベートした。前記抗体とのインキュベート及びウェルの洗浄後、ABTS緩衝液(Roche社;リファレンス: 11 112 597 001)中0.375m

g/mLでウェルあたり100μLのABTS溶液(ジアンモニウム2,2'-アジノビス-[3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート];Roche社;リファレンス:102 946 001)を添加することにより、プレートを顕色させた。この基質は、二次抗体に結合したペルオキシダーゼと反応すると緑色になる。色の強度はプレートに結合した抗体の量に依存した。反応液を暗闇中、室温で55分間インキュベートした後、ELISAプレートリーダーにおいて405nmの吸光度を読み取った。得られた吸光度の結果をGraphPad Prism 3.02プログラムを用いて解析した。解析には「1サイト競合(One Site Competition)」の式を用いた。

【００４７】

【数１】

$$Y = \text{最小値} + \frac{(\text{最大値} - \text{最小値})}{1+10^{x-LogEC50}}$$

【００４８】

曲線の変曲点、即ち観察される最大の効果の50%が生じる点であるEC_{50}のデータが、上述の解析により得られた。今回の場合、ウェル中に存在するペプチドの50%が血清中に存在する抗体に結合した血清希釈として解釈した。

【００４９】

【表３】

Table 3. 本研究の各群について得られた平均の免疫応答の結果。これは、ワクチン処置後(本実施例に記載のプロトコールによる3回の注射から1週間後)の血清についての結果、及び前記時点と免疫応答前(治療レジメンの開始前)との間で観察された増加を含む。免疫前の平均EC_{50}は18.11であった。

群	3回の接種後のEC_{50}	EC_{50}の増加(倍数)
1	12974.95	716.33
2	580.35	32.04
3	6325.50	349.22
4	924.97	51.07
5	1.87	0.10
6	5056.00	279.14

【００５０】

Table 3(表3)に示す結果及び本研究の各群で使用したコンジュゲートを考慮すると、以下の通りに結論することができる。

・　輸送タンパク質として使用した異なるKLH(異なる製造者由来)は、免疫応答に対してある程度の効果を有してはいたが、免疫応答の大きさの決定において関連性を示さなかった(群1、3、4及び6、即ち50以上のEC_{50}の増加を伴う群において免疫応答は強く、これに対して、群2及び5、即ち50未満のEC_{50}の増加を伴う群において免疫応答は弱い又は存在しない)。

・　強い免疫応答が得られたことと、それが弱かった又は存在しなかったこととの相違は、使用した架橋剤にある。得られた実験結果に基づけば、SMを使用したコンジュゲートはSPDPを使用したコンジュゲートについて観察されたよりも顕著に強い免疫応答を生じると導出される。実際、架橋剤SMを有するコンジュゲートで処置した群は強い免疫応答を生成できるのに対し、SPDPを使用したコンジュゲートで処置した群ははるかに弱い免疫応答を示したか、又は免疫応答がなかった。

・　上記に加えて、群4について得られた結果は強調されるべきである。というのも、SM

を使用して生成されたコンジュゲートの応答は、アジュバントさえも使用せずに、SPDPを使用して生成されたコンジュゲートについて観察された応答よりもまだ強いことをこの結果は明確に示しているからである。

【００５１】

以上のことは、KLH-架橋剤-CysAβ(33-40)コンジュゲートを調製するための架橋剤としてSMを使用することで、前記コンジュゲートをアジュバントと共に使用するのか、それともアジュバントなしで使用するのかによらず、驚く程により強い免疫応答を有するワクチンが提供されることを示している。

【実施例３】

【００５２】

異なる架橋剤を使用して生成されたKLH-架橋剤-CysAβ(33-40)コンジュゲートのコンジュゲーション(KLHへのペプチドの結合)の程度の比較

実施例2の場合と同様、コンジュゲーションの程度、又は輸送タンパク質(KLH)1分子あたりに結合したペプチドの数を比較したコンジュゲートは、

・ KLH-SM-CysAβ(33-40)(実施例1に従って製造)
・ KLH-SPDP-CysAβ(33-40)(実施例2に示す通りに製造)

である。

【００５３】

Table 4(表4)は、行った輸送タンパク質へのペプチドの結合実験について得られた実験結果の表形式の要約を示す。

【００５４】

【表４】

Table 4. 分析したコンジュゲート、及び、質量分析により観察された各KLH分子に結合したペプチド分子の数の説明。前記結合に関して、この表は、対応するコンジュゲートの1つのバッチを分析したのか、それとも2つのバッチを分析したのかに応じて1つ又は2つの値を示している。

輸送タンパク質	架橋剤	各KLH分子に結合したペプチド分子の数
KLH, 製造者1	SM	81
KLH, 製造者1	SPDP	35/33
KLH, 製造者2	SM	70/68
KLH, 製造者2	SPDP	44/31

【００５５】

Table 4(表4)に見られるように、異なる製造者由来のこれらのKLHは、得られた結果において結合に影響しなかった。対照的に、SMが2倍以上の数の結合を得ることを可能にしたこと、即ち、SMを架橋剤として使用することにより2倍の数のペプチド分子が各KLH分子に結合することを考慮すれば、架橋剤は、得られる結果に対して実に甚大な影響を有していた。使用したペプチドは架橋剤と反応するためにN末端にシステインを組み込んでいることを考慮すれば、この結果は驚くべきで予想外なものである。先行技術によれば、前記システインの組み込みは、ペプチドのコンジュゲーションを効率的且つ先行技術で既知のいずれの架橋剤とも同等にすることを可能とするはずである。しかしながら、この場合、SMはSPDPよりも効率的なコンジュゲーション反応を可能とすることが観察された。

【００５６】

これらの結合結果は、実施例2に示す結果の一部(即ち、免疫応答の誘導及びその後の抗体生成において観察された改善の部分)を説明することを可能とする。とはいえ、前記免疫応答の結果は、得られた結合結果と完全には同等のものではなく、これもまた、前記得られた結果を考慮すれば驚くべきことであり、架橋剤が免疫応答の増加に寄与するのは輸

送タンパク質へのペプチドのより強い結合を媒介することのみによるのではないことを示唆している。

【実施例４】

【００５７】

ウサギでの免疫応答アッセイ及び生成された抗体の特異性

KLH-SM-CysAβ(33-40)コンジュゲートを含むワクチンのポテンシーアッセイをウサギで行った。この場合、輸送タンパク質に結合した計200μg(事前の研究に応じて選択した量)の結合ペプチドをウサギにワクチン接種した。2% Alhydrogel(登録商標)(水酸化アルミニウムゲル)をアジュバントとして使用して、予め特定した量で1mLのワクチンを各ウサギに接種した。

【００５８】

3週連続の週1回のワクチンの皮下注射により以前に示した量で該動物を処置し、ワクチン接種プロトコールの開始の1週間前及びその終了の1週間後に採血した。

【００５９】

生成された抗体のタイトレーション及びそれらの特異性の分析は、下記の相違点と共に、先行技術で既知且つ実施例2で簡潔に示したプロトコールに従ってELISAにより行った。

・　特異的抗体、即ちそれぞれAβ40若しくはAβ42に結合する特異的抗体を検出しようとするのかどうかに応じて、ELISAプレートにAβ40又はAβ42ペプチド(配列番号3に含まれる)を固定した(sieved)。

・　分析した血清中の抗体の存在を検出するために使用した抗体は、Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP(Invitrogen社;リファレンス: 65-6120)(二次抗体の希釈はpH 8のビヒクル溶液中1:2000)であった。

【００６０】

顕色試薬は実施例2で示したものであり、したがってまた、プレートの読み取りを405nmで行い、結果に対して同じ式を適用した。曲線の変曲点、即ち観察される最大の効果の50%が生じる点であるEC_{50}のデータが分析により得られた。実施例2に示したように、前記結果は、ウェル中に存在するペプチドの50%が血清中に存在する抗体に結合した血清希釈として解釈した。

【００６１】

上述のタイトレーションプロトコールに従って、得られた全ての試料をタイトレーションし、Aβ40及びAβ42ペプチド抗体を検出した。得られた結果をTable 5(表5)及びTable 6(表6)に表形式で示す。

【００６２】

【表５】

Table 5. ワクチン接種プロトコールの前及び後のウサギにおける抗Aβ40特異的抗体の量。処置の結果として観察された増加に関係する列も含めている。

ウサギの識別番号	免疫前のEC_{50}	3回の接種後のEC_{50}	EC_{50}の増加(倍数)
71	36.17	47406	1310.64
72	7.483	4021	537.35
73	14.07	73421	5218.27
74	4.482	12467	2781.57
75	45.48	5173	113.74
76	20.5	98381	4799.07

【００６３】

【表６】

Table 6. ワクチン接種プロトコールの前及び後のウサギにおけるAβ42特異的抗体の量。処置の結果として観察された増加に関係する列も含めている。

ウサギの識別番号	免疫前のEC_{50}	3回の接種後のEC_{50}	EC_{50}の増加(倍数)
71	53.88	0.049	0.00
72	29.24	0.069	0.00
73	22.49	2.761	0.12
74	24.05	15.49	0.64
75	73.18	0.063	0.00
76	23.37	34.04	1.46

【００６４】

Table 5(表5)及びTable 6(表6)に示すことに基づいて、本発明のコンジュゲート(KLH-SM-CysAβ(33-40))は、ウサギにおいて強い免疫応答を得ることを可能にするだけでなく、前記応答はAβ40に特異的である(Aβ42に対する有意な液性応答がない)、即ち、Aβ42に結合しない抗Aβ40特異的抗体が免疫応答において生成されることが導出される。

【００６５】

実施例1から4に含まれる結果は、本明細書中で上述した技術的な長所及び効果を証明し且つ確認し、架橋剤としてSMを使用することで、先行技術の別の架橋剤を使用した時と比べてより強い免疫応答を生成するKLH-架橋剤-CysAβ(33-40)コンジュゲートを生成することが可能となることを証明している。更に、KLH-SM-CysAβ(33-40)コンジュゲートは、マウス及びウサギにおいて、Aβ40に特異的な(Aβ42に対して有意な液性応答がない)強い免疫応答を生成すること、即ちAβ42に結合しない抗Aβ40特異的抗体が前記免疫応答において生成されることを可能とする。前記実施例は、哺乳動物、好ましくはヒトにおけるアミロイド疾患、好ましくはアルツハイマー病の治療における本発明のコンジュゲートの有用性を立証している。

【実施例５】

【００６６】

水酸化アルミニウムゲルへのKLH-SM-CysAβ(33-40)コンジュゲートの吸着試験

1.35mg/mlのペプチドは14.4mg/mlのコンジュゲートKLH-SM-CysAβ(33-40)に相当する。

【００６７】

【表７】

Table 7.

正味のペプチドに基づくμg/mL	上清の正味のペプチドのμg/mL	上清のAbeta-X40-KLH相当量[mg/mL]	溶液中に遊離したコンジュゲートの%	吸着した%
100	12	0.128	12	88
125	15	0.160	12	88
150	19	0.203	13	87
175	25	0.267	14	86
200	35	0.373	18	83

研究2: 規定の濃度における吸着のpH依存性

試験1: 220μgの正味のペプチド

pH	上清の正味のペプチドのμg/mL	上清のAbeta-X40-KLH相当量[mg/mL]	溶液中に遊離したコンジュゲートの%	吸着した%
7.4	38	0.41	17	83
7.2	37	0.39	17	83
7.0	33	0.35	15	85
6.8	25	0.27	11	89
6.5	21	0.22	10	90
6.0	15	0.16	7	93

試験2: 150μgの正味のペプチド

pH	上清の正味のペプチドのμg/mL	上清のAbeta-X40-KLH相当量[mg/mL]	溶液中に遊離したコンジュゲートの%	吸着した%
7.4	18	0.19	12	88
7.2	18	0.19	12	88
7.0	15	0.16	10	90
6.8	10	0.11	7	93
6.5	11	0.12	7	93
6.0	0	0.00	0	100

試験3: 100μgの正味のペプチド

pH	上清の正味のペプチドのμg/mL	上清のAbeta-X40-KLH相当量[mg/mL]	溶液中に遊離したコンジュゲートの%	吸着した%
7.4	13	0.14	13	87
7.2	13	0.14	13	87
7.0	12	0.13	12	88
6.8	9	0.10	9	91
6.5	0	0.00	0	100
6.0	0	0.00	0	100

【００６８】

これらの試験では、吸着率に対するコンジュゲートの濃度の影響、及び吸着率に対するpHの影響を決定した。第1の実験では、規定量の水酸化アルミニウム(単回用量あたり1.25 mgのAlという許容量に対応する0.35%)及び規定されたpH 7.4(生理的pH)での異なる濃度のコンジュゲートの吸着率を試験した。生理的試験条件(pH 7.4)では12～18%の遊離のコンジュゲートが上清中に検出された。ペプチドの量を100μgのペプチドまで低下させることは、より高い吸着率を生じない。

【００６９】

第2の試験では、吸着率に対するpHの影響を決定した。規定のコンジュゲート濃度(正味

のペプチドに基づいて100μg、150μg及び220μg/mL)においてpHを変化させた(pH 6.0からpH 7.4)。上記の結果に示されるように、吸着率はpHに依存する。実際、吸着率はより低いpH値で増加する(表を参照)。pH 7.4からpHを7.2まで、又は更に7.0まで低下させることは、顕著により高い吸着率をもたらさない。pH 6.8での吸着は、約90%の吸着率を示す。pH 6.0で吸着率は最高になる。正味のペプチドに基づいて200μg/mLのコンジュゲート濃度及びpH 6では、コンジュゲートの7%は未だ遊離している。

【００７０】

これらの分析に基づいて、本発明の医薬組成物の免疫原性能力を増大させるために、好ましくは、5.8から7.0の間のpH値をアジュバントへのコンジュゲートの吸着率を増加させるために使用するべきである。

【００７１】

好ましい実施形態を参照して本発明を説明したが、好ましい実施形態が本発明を限定するものと考えてはならない。本発明は、添付の特許請求の範囲の最も広い解釈により定義されるものである。

【配列表】

0006689993000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI	
A61P	***25/00***	***(2006.01)***	A61P	25/00
A61P	***25/28***	***(2006.01)***	A61P	25/28
A61P	***25/16***	***(2006.01)***	A61P	25/16
A61P	***21/00***	***(2006.01)***	A61P	21/00

審査官　渡邉　潤也

(56)参考文献　特表２０１２－５２８１１１（ＪＰ，Ａ）
細胞，２００１年，33(2)，p.20-21

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３９／００
Ａ６１Ｋ　３８／００
Ａ６１Ｋ　４７／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）