

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6208319号
(P6208319)

(45) 発行日 平成29年10月4日 (2017. 10. 4)

(24) 登録日 平成29年9月15日 (2017. 9. 15)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006. 01)

C O 7 K 19/00 Z N A

C O 7 K 7/08 (2006. 01)

C O 7 K 7/08

C O 7 K 14/435 (2006. 01)

C O 7 K 14/435

A 6 1 P 25/28 (2006. 01)

A 6 1 P 25/28

A 6 1 K 39/00 (2006. 01)

A 6 1 K 39/00

H

請求項の数 7 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-500078 (P2016-500078)
 (86) (22) 出願日 平成25年4月23日 (2013. 4. 23)
 (65) 公表番号 特表2016-513638 (P2016-513638A)
 (43) 公表日 平成28年5月16日 (2016. 5. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/037865
 (87) 国際公開番号 W02014/143087
 (87) 国際公開日 平成26年9月18日 (2014. 9. 18)
 審査請求日 平成28年4月22日 (2016. 4. 22)
 (31) 優先権主張番号 13/843, 883
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

早期審査対象出願

前置審査

(73) 特許権者 591015142
 ユナイテッド・バイオメディカル・インコーポレーテッド
 UNITED BIOMEDICAL INCORPORATED
 アメリカ合衆国、ニューヨーク 11788、
 ホーボーグ、デービッズ・ドライブ 25
 (74) 代理人 100094640
 弁理士 紺野 昭男
 (74) 代理人 100103447
 弁理士 井波 実
 (74) 代理人 100111730
 弁理士 伊藤 武泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー型認知症の予防用及び免疫療法用ペプチドワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 6 2 及び 6 3 で表される全てのアミノ酸配列からなる A ペプチド免疫原構築物の組合せを有する組成物。

【請求項 2】

C p G オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) をさらに有する請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

アジュバントをさらに有する請求項 1 又は 2 記載の組成物。

【請求項 4】

a) 配列番号 6 2 及び 6 3 で表される全てのアミノ酸配列からなる A ペプチド免疫原構築物の組合せ；

b) C p G オリゴデオキシヌクレオチド (ODN)；及び

c) 医薬上許容可能なデリバリビヒクル及び / 又はアジュバント；

を有する医薬組成物。

【請求項 5】

a) 配列番号 6 2 及び 6 3 で表される全てのアミノ酸配列からなる A ペプチド免疫原構築物の組合せ；

b) C p G オリゴデオキシヌクレオチド (ODN)；及び

c) 医薬上許容可能なデリバリビヒクル及び / 又はアジュバント；

から本質的になる医薬組成物。

【請求項 6】

前記 A ペプチド免疫原構築物の組合せが等モル比で存在し、前記 A ペプチド免疫原構築物及び前記 C p G オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) が安定化免疫刺激複合体の形態である請求項 4 又は 5 記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記 A ペプチド免疫原構築物の組合せが等モル比で存在し、前記 A ペプチド免疫原構築物及び前記 C p G オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) が安定化免疫刺激複合体の形態であり、前記医薬上許容可能なデリバリビヒクル及び / 又はアジュバントがリン酸アルミニウム (AlPO₄) である請求項 4 又は 5 記載の医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2013年3月15日出願の米国特許出願番号13/843,883 (該内容はすべて本願に参照として含まれる) の優先権を主張する。

【0002】

本開示は、アルツハイマー型認知症の予防用及び免疫療法用のペプチド系ワクチン及び製剤に関する。

【背景技術】

【0003】

20

アルツハイマー病 (AD) は、認知症の最も一般的な形態であって、認知能力の喪失、重度の行動異常及び死によって特徴付けられる慢性の神経変性疾患である。これは、65歳以上人口のおよそ10%、85歳以上人口のおよそ40%に影響を及ぼす。心疾患、癌及び卒中等の死の他の主要原因とは異なり、医療技術の進歩により、多くの人が認知症の危険性がある年齢に達することが可能となるので、アルツハイマー病による死亡率は今後20~30年で劇的に高まるだろう。米国において、今日、全ての医療費の7~8%が認知症に関連している。現在、ADと共に生きている患者は、米国に250~400万人、全世界に1700~2500万人、存在する。この重篤な疾患のための決定的な処置又は治療法は存在しない。

【0004】

30

アロイス・アルツハイマーによって1907年に最初に定義されたように、2種の微小な沈着物、即ち、神経原線維濃縮体及び老人性アミロイドプラークが疾患の病理学的特徴である。アルツハイマー病の確定診断には、従来、生検又は死後の病理組織診断のいずれかが必要とされてきた。最近の陽電子放出同位体を有するアミロイドプラーク標識リガンドの導入と、認知力検査及び脊髄液中の特定の分子の測定とを組み合わせることにより、現在、この疾患のより確定的な診断が病理組織診断を行わずとも可能になっている。

【0005】

アミロイド (A) ペプチド - 老人性アミロイドプラークの主要成分 - がADにおいて重要な役割を果たしていることを示唆する多数の証拠が蓄積されてきた。アミロイド (A) ペプチドの最新の概説 (2013年2月13日) はウィキペディアから入手できる (http://en.wikipedia.org/wiki/Beta_amyloid#cite_note-wales2010-41、このリンクは参照によって本明細書に含まれる)。ADの疾患改変療法の成功は、脳内のアミロイドの沈着に影響を及ぼす製品を含む可能性が高い。Morgan, D. による最近の出版物 (Immunotherapy for Alzheimer's Disease (Morgan D., J Int Med 2011;269:54-63)) は本発明に関連し、これは本分野における概説として参照により含まれる。

40

【0006】

誘発因子 (アルツハイマー病にとって必要であるが、十分ではない) は、A ペプチドからなるアミロイド凝集体の蓄積である。家族型のアルツハイマー病及びダウン症候群の症例 (早発性アルツハイマーの病状が生じる) の遺伝学によれば、共通要素として、より長いC末端形状のA ペプチド (42アミノ酸長) を過剰産生している。このA₁₋₄

50

2 ペプチドは、シート構造を形成し、オリゴマー及び原線維に凝集する傾向がある。これらのアミロイドの沈着物は、疾患の認知症状が始まる前に、脳内に10年以上存在し得る。疾患の発病における第二段階は、高度にリン酸化された微小管結合タウタンパク質から神経細胞内での神経原線維濃縮体の形成である。他の神経変性疾患はアミロイド沈着物の不存在下でタウ病理によっても形成され得るが、臨床症状及び脳内の局所性の病理部位の両方でアルツハイマー病とは異なる。タウ遺伝子導入マウスモデルにおいて、タウ沈着物は、アミロイドの頭蓋内注射又はA_β沈着物産生マウスを育てることによって沈着させることができる。また、抗A_β免疫療法によってアミロイド沈着を妨げると、複数の導入遺伝子を発現するマウスにおいてタウ病理の進行を減少させることができる。タウ病理は、精神機能障害のより近因であることと一致して、アミロイド病理よりも認知状態とのより良い相関があると思われる。不確かな機構によって、これらの病理は、シナプス機能の減少、シナプスの減少及び最終的には著しい脳の萎縮につながるニューロンの減少をもたらす。

10

【0007】

関連する機構的な段階に関する複数の仮説が存在する。アミロイド及び/又はタウの中間的なサイズの凝集体（オリゴマーと呼ばれる）がより直接的な毒性の原因であると考えられる。疾患の初期段階である「軽度認知障害」（MCI）段階においてさえ、プラーク及び濃縮体病理の著しい蓄積、並びにニューロンの減少が見られる。これらの観察から、心疾患で行われているのと同様に、できる限り初期段階で疾患を処置することがアルツハイマー病の管理に必須であろうことが示唆される。

20

【0008】

1999年、ワクチンアプローチによって、アミロイド前駆体タンパク質を過剰産生する遺伝子導入マウスにおいてアミロイド沈着物が減少することが見いだされた。その後、A_βを標的とするワクチン又は受動免疫療法が、これらのマウスを記憶障害から救うことが見いだされた。免疫系によって活発に産生されるか、又は受動的に投与される、A_β特異的抗体は、A_βアミロイドーシスに対する異なる遺伝子導入マウスモデルにおけるプラーク負荷を一貫して減少させる。動物モデルにおけるワクチン投与の成功、及びアルツハイマー病の疾患改変療法の任意の代替法が存在しないことを前提として、AD患者の免疫系を刺激してA_β抗体を産生するための最初の臨床的試みは、AN1792と呼ばれるワクチンで惹起することであった。このワクチンは、B及びT細胞エピトープの両方を含む全長A_β₁₋₄₂ペプチドからなり、原線維に凝集した。第I相安全性試験において、1以上の用量のワクチンで約60人の患者を処置した。初期観察の1つは、標的のA_βペプチド抗原に対する検出可能な抗体価を生じないワクチン接種された多くの患者での、可変性の抗体反応であった。多くの患者において、免疫応答がないため、ワクチン製剤を変更し、第II相安全性及び免疫原性の試験において、アジュバントとしてQS-21を含有させ、AN1792ワクチン製剤の免疫原性を増強する試みを行った。目標は、複数回の接種を通じてプリセットした抗体価まで患者を免疫化することであった。しかしながら、中枢神経系（CNS）の炎症反応である無菌性の髄膜脳炎が少数の患者（～6%）で発生したため、臨床試験の開始から短期間で免疫は中止された。CNS炎症のこれらの症状を発症した2人の患者が死亡し、その後の検死で髄膜の炎症の明らかな徴候であるCNSのT細胞浸潤が明らかになった。AN1792ワクチン製剤の有害な応答は、ワクチンによって引き起こされた自己免疫反応であったと結論が出された（Orgogozo JMら、Neurology 2003;61:46-54）。有効性の観点からは、MRIによる脳の収縮割合又は認知能力の差異は、ワクチンとそのプラセボワクチン接種との間で観察されなかった。

30

40

【0009】

AN1792ワクチンの後退にもかかわらず、アルツハイマー病の免疫療法用のA_βペプチドに対する新規なワクチン戦略及びアジュバントの開発は、非常に強い創造性の分野になっている。ほとんどの場合、目標は、AN1792の症例で認められたような全長A_β₁₋₄₂ペプチドに対するワクチンを用いるヒトの試験で見いだされた有害事象が原因で、最小限のT細胞の関与（少なくともA_βに対して）で、B細胞の活性化及び抗体産生

50

を発現させることであった。

【 0 0 1 0 】

現在、発明者及び彼女のチームによって管理されている本発明の製品とは別に、A フラグメントを標的とする各種のワクチン設計及び製剤を使用する能動免疫の第Ⅰ相/第ⅠⅠ相臨床試験が4件ある。これらの試験として、ジフテリアトキソイドタンパク質と複合化したA₁₋₇ アミノ末端ペプチドフラグメントを免疫原として使用するACC-001 (エラン・コーポレーション社 (Elan Corporation Inc.) 及びワイス社 (Wyeth)) ; Q ウイルス様粒子と結合したA₁₋₅ アミノ末端ペプチドフラグメントを免疫原として使用するCAD106 (Immunodrug (商標)) ; サイトス・バイオテクノロジー社 (Cytos Biotechnology AG) 及びノバルティスファーマ社 (Novartis Pharma AG)) ; ISCO-MATRIXと複合化したA アミノ末端ペプチドを免疫原として使用するV950 (メルク社) ; 及び担体分子と複合化したA ペプチド模倣薬を免疫原として使用するGSK/アフィリス (GSK/Affiris) ; が挙げられる。更に、Tabira Tによる概説 (Tohoku J Exp Med 2010;220:95-106) に記載されているようなA を標的とする他のワクチンアプローチがある。

10

【 0 0 1 1 】

ヒトの試験において、現在A を標的とする全てのワクチン設計及び製剤は、上述したように、これらのワクチンを接種された患者の30%から約70~80%のみが標的のA ペプチドに対する抗体を生じさせるといふ、可変性の抗体反応を伴う弱い免疫原性に悩まされており、より複雑な抗A 抗体を産生するワクチンによる有効性の任意の更なる分析を行っている。ほとんどのワクチン設計は複雑で、非常に短いA ペプチドフラグメントと巨大タンパク質又はウイルス粒子様担体との複合化を必要とし、それ故に、短い標的ペプチドよりもむしろ望まない担体に対してほとんどの抗体反応を向かわせ；複雑なワクチン設計は詳細な製造手順を指示し、それ故に、品質管理を難しくし、且つ費用対効果を悪くする。これらのワクチンは、使用されるアジュバント及び製剤の潜在的なTh1活性化特性のため、それらの安全特性は不明確である。また、現時点で、これらのワクチンは、ワクチンを接種した患者の認知機能における改善のような任意の臨床的有効性を示していない。

20

【 0 0 1 2 】

先進国では、ADは社会的に最も費用のかかる疾患の1つである。ADを予防するか、その発症を遅らせるか、又はその進行を遅らせるための新たな治療法を見出さなければならない。ADマウスにおける免疫学的処置の有望な知見にも関わらず、アルツハイマー型認知症の予防及び処置のためのA を標的とする安全で有効なヒトワクチンには課題が残されている。上述のように、前臨床又は臨床試験における現在のワクチン設計及び製剤に限界があるという観点から、アルツハイマー型認知症の予防及び処置のための、幅広い応答性の免疫療法を提供する、安全で有効なワクチン製剤の開発の緊急のニーズであって未だ満たされていないニーズが存在する。このようなワクチン製剤がアルツハイマー病理に対して成功したら、疾患を予防する標準的なアプローチになるだろう。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

40

【 0 0 1 3 】

発明の概要

本開示は、アルツハイマー病の危険性があるか又はアルツハイマー病である患者に防御免疫応答を提供するA ペプチドのN末端に対する高度に特異的な抗体の産生を刺激するために共に作用する、病原性タンパク質に由来する異種ヘルパーT細胞 (Th) エピトープとスパーサー残基を介して結合するB細胞 (B) エピトープとしてA ペプチドのN末端を有する、独自のA ペプチド免疫原構築物を有する、独自のA ペプチド免疫原構築物、これらA ペプチド免疫原構築物及びその混合物を有するペプチド組成物、これらA ペプチド免疫原構築物を有するワクチン製剤を含む医薬組成物に関する。

【 0 0 1 4 】

50

ある態様において、A ペプチド免疫原構築物は、老人斑中の全長 A₁₋₄₂ ペプチド（配列番号 1）と交差反応性の高度に特異的な抗体の産生を刺激するために共に作用する、麻疹ウイルス融合（MVF）タンパク質（配列番号 34）のような病原性タンパク質に由来する異種 Th エピトープと結合する A₁₋₄₂ ペプチド（例えば、A₁₋₁₀、A₁₋₁₂、A₁₋₁₄）のアミノ末端から 10 ~ 14 アミノ酸長の間に B 細胞抗原部位を持つ複合 A ペプチドを有することができる。他の態様において、A ペプチド免疫原構築物は、老人斑中の全長 A₁₋₄₂ ペプチドと交差反応性の抗体を誘発する能力のある各種の病原性タンパク質（配列番号 33 ~ 47）に由来する異種 Th エピトープと結合する B 細胞抗原部位の A₁₋₁₄ ペプチドを持つ複合ペプチドを含む。B 細胞抗原部位の A₁₋₁₄ ペプチドを増強するために使用される異種 Th エピトープのうち、天然の病原体、ジフテリア毒素（配列番号 37）、熱帯熱マラリア原虫（配列番号 38）、コレラ毒素（配列番号 40）に由来する Th エピトープ、並びに麻疹ウイルス融合タンパク質（MVF 1 ~ 5）及び B 型肝炎表面抗原（HBsAg 1 ~ 3）に由来する理想的な人工 Th エピトープの単一配列又は組み合わせ配列、例えば配列番号 34 及び 41 ~ 47 のいずれかの形態が、免疫原性のスクリーニング試験によって、このような B 細胞の抗原性の増強に特に有用であることが見いだされる。他の態様において、A ペプチド免疫原構築物と異なる病原体に由来する異種 Th エピトープとの混合物を有するペプチド組成物を用いて、アルツハイマー型認知症の処置及び予防のためのワクチン免疫化でより高い割合のレスポンスをもたらす患者の遺伝的背景の範囲を幅広くすることを可能にする。ある態様において、組み合わせの形態（配列番号 44 及び 45）における MVF 及び HBsAg に由来する異種 Th エピトープを有する A ペプチド免疫原構築物（配列番号 62 及び 63）を、ワクチン製剤用に、等モル比で混合し、多様な遺伝的背景を持つワクチン宿主人口の範囲を最大にすることができた。A ペプチド免疫原構築物における相乗的増強が本発明のペプチド組成物において観察され、抗体反応は、全長 A₁₋₄₂ に対する所望の交差反応性にほぼ（> 90 %）集中し、免疫原性の増強に使用される異種 Th エピトープには、もしあったとしても、ほとんどなかった。これは、このようなペプチド抗原性を増強するために使用される従来のタンパク質又は他の生物学的担体とは対照的である。別の態様において、単一配列の形態（配列番号 46 及び 47）の MVF 及び HBsAg に由来する異種 Th エピトープを有する高精製 A ペプチド免疫原構築物（配列番号 64 及び 65）を、ワクチン製剤用に、必要に応じて等モル比で混合し、多様な遺伝的背景を持つワクチン宿主人口の範囲を最大にすることができた。

【0015】

本開示は、アルツハイマー型認知症の処置及び予防のためのワクチン製剤を含む医薬組成物にも関する。ある態様において、安定化免疫刺激複合体を有する医薬組成物は、CpG オリゴマーを A ペプチド免疫原構築物の混合物を含有するペプチド組成物と混合して静電会合（electrostatic association）によって形成され、老人斑中に存在する全長 A₁₋₄₂

との所望の交差反応性を目的とする A ペプチド免疫原性を更に増強する。他の態様において、アジュバントとしてアラム（Alum）ゲル（アルハイドロゲル（Alhydrogel））又はリン酸アルミニウム（アジュホス（Adjuphos））を含む鉱物塩と接触してワクチン製剤懸濁液を形成する、A ペプチド免疫原構築物の混合物のペプチド組成物を有する医薬組成物は、ワクチン宿主への投与に使用された。更に他の態様において、CpG オリゴマーと安定化免疫刺激複合体を形成する A ペプチド免疫原構築物の混合物のペプチド組成物を有する医薬組成物を、高い安全因子のアジュバントとしてのアラムゲル（アルハイドロゲル（Alhydrogel））又はリン酸アルミニウム（アジュホス（Adjuphos））を含む鉱物塩と任意に混合し、ワクチン宿主への投与のためのワクチン製剤懸濁液を形成する。

【0016】

本開示は、アルツハイマー型認知症の処置及び予防のための方法も含む。開示する方法は医薬組成物を利用し、該組成物は CpG オリゴマーと安定な免疫刺激複合体を任意に形成する本発明の A ペプチド免疫原構築物を有するワクチン製剤懸濁液を含有し、さらに

10

20

30

40

50

、アルツハイマー病の危険性があるか又はアルツハイマー病である患者に投与するためのアジュバントとしての鉱物塩が追加されてもよい。これらの態様において、A₁₋₄₂ペプチドに対する抗体を誘発することができ、インビトロで原線維の形成を阻害し、且つ凝集したA₁₋₄₂オリゴマーによってもたらされる、PC12細胞株の細胞によって示されるような、神経細胞に対する細胞毒性をインビトロで低減できる。ある態様において、A₁₋₄₂ペプチド免疫原構築物に由来するワクチン製剤を接種した動物又は患者は、全長A₁₋₄₂ペプチドに対する抗体を顕著に産生し、ワクチン宿主の血漿及び血清中のA₁₋₄₂レベルの上昇に示される、中枢神経系から末梢への毒性のあるA₁₋₄₂ペプチドを引き込むことが見出された。

10

【0017】

本発明の別の面において、驚くべきことに、A₁₋₄₂ペプチド免疫原構築物を有するワクチン製剤が、アルツハイマー型認知症を患う温血動物、特にヒトの筋肉内に有利に適用できることが見いだされた。本発明の更に別の面において、2つのA₁₋₄₂ペプチド免疫原構築物（配列番号64及び65）の筋肉内投与用の剤形を提供する。筋肉内注射用の好ましい剤形は、30 µg ~ 1000 µg / 0.5 mL、好ましくは100 µg ~ 400 µg / 0.5 mL、より好ましくは300 µg / 0.5 mLのCpGオリゴマーと複合化したペプチド免疫原構築物と、アジュバントとして0.5 mLの鉱物塩を追加して含有するワクチン製剤である。剤形は2年を超えて安定で、使用直前まで2 ~ 8 °Cで保管できる。剤形は、好ましくは、温血動物に、特に腕に、注射器を用いる筋肉内注射によって投与される。剤形を温めるために、剤形は、周囲温度に、約15 ~ 45分間、例えば30分間、維持することができる。好ましくは、薬剤物質を吸い上げる前に、潜在的な半可視化（subvisual）粒子の分散のためにバイアルを穏やかに数回反転する。

20

【0018】

本発明の別の面において、驚くべきことに、A₁₋₄₂ペプチド免疫原構築物を有するワクチン製剤が、アルツハイマー型認知症を患う温血動物、特にアカゲザル（rhesus macaque）及びヒトの筋肉内に有利に適用でき、微細エピトープマッピング研究で示されるように、A₁₋₄₂ペプチドオリゴマー、凝集体又は老人斑の外側部分に露出するアミノ酸「アスパラギン酸（D）」を有するA₁₋₁₀ペプチドに代表されるA₁₋₄₂ペプチドのN末端に主に対する高度に特異的な抗体を誘発することが見いだされた。本発明の更に別の面において、驚くべきことに、A₁₋₄₂ペプチド免疫原構築物を有するワクチン製剤が、アルツハイマー型認知症を患う温血動物、特にアカゲザル及びヒトの筋肉内に有利に適用でき、このようなワクチン製剤を接種された全ての動物及び全ての患者において、A₁₋₄₂ペプチドのN末端に主に対する高度に特異的な抗体を誘発するため、ワクチン開発の歴史において非常に珍しい100%の抗体反応率を達成することが見出された。本発明の更に別の面において、驚くべきことに、本発明のA₁₋₄₂ペプチド免疫原構築物を有するワクチン製剤が、60歳以上の臨床的に軽度アルツハイマー病の範疇の患者の筋肉内に有利に適用でき、アルツハイマー病患者の免疫療法が最初に検討されてから前例のない認知スコア（ADAS-Cog、ADCS-CGIC、MMSE）の著しい改善を示すことが見いだされた。

30

40

【0019】

本発明の更に別の面において、本発明は、ヒト患者のアルツハイマー型認知症の予防及び処置の方法に関し、該方法は、30 µg ~ 750 µg、好ましくは100 µg ~ 400 µg、より好ましくは約300 µgを、それを必要とするヒト患者に、初期免疫後0、4及び8週の3回の注射による初回刺激後、全長A₁₋₄₂ペプチドに対する患者の抗体反応に応じて、12週毎に約1回、好ましくは26週毎に約1回、特に52週毎に約1回投与することを有する。

【0020】

上記疾患の処置におけるワクチン製剤及びA₁₋₄₂ペプチド免疫原構築物の有用性は、適切な臨床研究、例えば実施例に記載されたもの、例えば、9カ月を超える期間にわたって各

50

回 300 μ g / 0.5 mL / 用量のワクチン製剤を、0、4 及び 12 週に合計 3 用量を投与すること、において更に確認できる。抗体価に従って、3 カ月毎、6 カ月毎又は 12 カ月毎に 1 回、フォローアップ免疫が可能である。

【0021】

適切な臨床研究は、アルツハイマー病の危険性があるか又はアルツハイマー病の症状を有する患者に対しての、オープンラベル試験、又は、特に無作為化、二重盲検、プラセボコントロールの並行試験である。

【0022】

本開示は、A ペプチド免疫原構築物の低コストの製造方法及び品質管理方法を提供すると共に、アルツハイマー病の危険性があるか又はアルツハイマー病である動物及び患者を保護することができるデリバリシステムをも提供する。

10

【0023】

さらなる面において、本発明は、本発明の A ペプチド免疫原構築物のワクチン製剤を接種した患者によって誘発される A₁₋₄₂ に対するヒトモノクローナル抗体を提供する。ヒト患者の血液から単離された B 細胞からヒトモノクローナル抗体を製造する効率的な方法は、Elisabetta Traggiai ら、Nature Medicine 10,871-875(2004)に記載されており、この文献は参照により含まれる。

【0024】

参考文献

Green RC, Schneider LS, Amato DA, et al., "Effect of Tarenflurbil on Cognitive Decline and Activities of Daily Living in Patients with Mild Alzheimer Disease." Journal of the American Medical Association 2009; 302(23):2557-2564.

20

Hardy J. Amyloid, "The Presenilins, and Alzheimer's Disease." Trends in Neurosciences 1997; 20(4):154-159.

Hartmann T, Bieger SC, Bruhl, et al. "Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease Abeta40/42 amyloid peptides." Nature Medicine 1997; 3(9):1016-1020.

Katyal RK, Sachanandani D, Pinney C, Lieberman MM. "Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent hosts." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 1998; 5(1):78-81.

30

Lacor PN. "Advances on the understanding of the origins of synaptic pathology in Alzheimer's disease." Current Genomics 2007; 8(8):486-508.

Moore V, Chapter 2. In: Synthetic Peptides: A Users Guide. Grant GA, ed. New York: WH Freeman and Company: 1992; 63-67.

Morgan D. "Immunotherapy for Alzheimer's Disease." Journal of Internal Medicine 2011; 269(1):54-63.

Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, et al. "Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization." Neurology 2003; 61(1):46-54.

Rockenstein EM, McConlogue L, Tan H, et al. "Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease." Journal of Biological Chemistry. 1995; 270(47):28257-28267.

40

Rockenstein E, Mallory M, Mante M, et al. "Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of A-beta (1-42)." Journal of Neuroscience Research 2001; 66(4):573-582.

Sokol KK. "Stabilized synthetic immunogen delivery system," In U.S. Patent Application Publication No US 2004/0009897 A1. United States: United Biomedical Inc.; 2004.

Solomon B, Koppel R, Frankel D, Hanan-Aharon E. "Disaggregation of Alzheimer be

50

ta-amyloid by site directed mAb. " Proceedings National Academy of Sciences USA. 1997; 94(8):4109-4112.

Tabira, T. " Immunization therapy for Alzheimer disease: a comprehensive review of active immunization strategies. " Tohoku Journal of Experimental Medicine 2010; 220(2):95-106.

Traggiai E, Becker S, Subbarao K, et al. " An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells. " Nature Medicine 2004; 10(8): 871-875.

Wang CY. " Artificial T helper epitopes as immune stimulators for synthetic peptide immunogens. " U.S. Patent No. 6,713,301 B1. United States: United Biomedical Inc.; 2004.

Wang CY. " Immunogenic peptide composition comprising measles virus F protein T helper cell epitope (MVHTh1-16) and N-terminus of beta-amyloid peptide. " U.S. Patent No. 6,906,169, United States: United Biomedical Inc.; 2005.

Wang CY. " Immunogenic peptide composition comprising a promiscuous helper T cell epitope and an N-terminal fragment of Abeta(1-42) peptide. " U.S. Patent No. 7,951,909, United States: United Biomedical Inc.; 2011.

Wang CY. " Immunogenic peptide composition for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. " U.S. Patent No. 8,232,373, United States: United Biomedical Inc.; 2012.

Wang CY, Finstad CL, Walfield AM, et al. " Site-specific UB1Th amyloid-beta vaccine for immunotherapy of Alzheimer's disease. " Vaccine 2007; 25(16):3041-3052.

Wang CY, Looney DJ, Li ML, et al. " Long-term high-titer neutralizing activity induced by octameric synthetic HIV-1 antigen. " Science 1991; 254(5029):285-288.

Wang CY, Walfield AM. " Site-specific peptide vaccines for immunotherapy and immunization against chronic diseases, cancer, infectious diseases, and for veterinary applications. " Vaccine 2005; 23(17-19):2049-2056.

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 5 】

【図 1】図 1 は、本明細書開示の特定の態様によるワクチン製剤についての、発見から商業化（工業化）までの開発プロセスを示すフローチャートである。本開示は、このチャートにまとめた、ペプチド免疫原の設計、ペプチド組成物の設計、ワクチン製剤の設計、インビトロでの機能的抗原性の設計、インビボでの免疫原性及び有効性研究の設計、投与計画の設計、及び臨床プロトコルの設計を含む。合理的な設計に基づく高度に安全で有効なワクチンの商業化の最終的な成功をもたらす、嬉しい驚き及び嬉しくない驚きを伴う、各段階での詳細な評価は本明細書に更に記載する。

【図 2 A】図 2 A は、溶出時間が 20 分の高精製 A ペプチド免疫原構築物（配列番号 65）の HPLC プロファイルを示す。

【図 2 B】図 2 B は、溶出時間が 21 分の高精製 A ペプチド免疫原構築物（配列番号 64）の HPLC プロファイルを示す。

【図 2 C】図 2 C は、A ペプチド免疫原構築物（配列番号 65）について、分子量が 3892.274 であると測定された質量分析（MALDI-TOF）プロファイルであり、これは理論分子量が 3892.52 であって、UB1 AD ワクチン（UB-311）製剤中の有効医薬成分として使用される分子の性質の高い精度を示す。

【図 2 D】図 2 D は、A ペプチド免疫原構築物（配列番号 64）について、分子量が 4374.568 であると測定された質量分析（MALDI-TOF）プロファイルであり、これは理論分子量が 4374.07 であって、UB1 AD ワクチン（UB-311）製剤中の有効医薬成分として使用される分子の性質の高い精度を示す。

【図 2 E】図 2 E は、溶出時間がそれぞれ 20 分及び 21 分の高精製 A ペプチド免疫原構築物（配列番号 65 及び 64）の HPLC プロファイルを示す。2 つの A ペプチド免

疫原構築物（配列番号 6 4 及び 6 5）を、2 ～ 8 で 3 年以上保管後の U B - 3 1 1 ワクチン製剤調製物から抽出し、このように合理的に設計されたワクチン製剤の性質の高い精度を示す、以前に混合されたような等モル比での溶出時間を有する、予想 H P L C プロファイルを示す。

【図 3 A】図 3 A は、広範な文献検索に基づく配列番号 4 6 の T h ペプチドの H L A クラス I I 結合モチーフを示す。ワクチンを接種された患者の遺伝的背景の範囲を最大にして免疫応答を広げるために、2 つの A ペプチド免疫原構築物（配列番号 6 4 及び 6 5）の組み合わせを使用するために決定された。

【図 3 B】図 3 B は、広範な文献検索に基づく配列番号 4 7 の T h ペプチドの H L A クラス I I 結合モチーフを示す。ワクチンを接種された患者の遺伝的背景の範囲を最大にして免疫応答を広げるために、2 つの A ペプチド免疫原構築物（配列番号 6 4 及び 6 5）の組み合わせを使用するために決定された。

【図 4】図 4 は、一定量の鉱物塩と組み合わせ、A ペプチド免疫原構築物（配列番号 6 4 及び 6 5）が様々な量で（0 . 5 m L 投与当たり 0、1 0、3 0、1 0 0 ～ 3 0 0 μ g）組み込まれたワクチン製剤に対する、モルモットの 2 6 週にわたる抗体反応の反応速度論（Kinetics）を示す。

【図 5 A】図 5 A は、A ペプチド免疫原構築物及び C p G オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）間の、静電会合 / 中和による、安定なペプチド / C p G 免疫刺激複合体の調製のための概略図である。

【図 5 B】図 5 B は、図 5 A に続く、このような免疫刺激複合体及びアルミニウム系鉱物塩を含有する鉱物塩系のワクチン懸濁液の調製のための概略図である。

【図 6】図 6 は、異なるアジュバント（アルハイドロゲル（Alhydrogel） / N a C l + C p G ODN；アジュホス（Adjuphos） / N a C l + C p G ODN；及び N a C l + C p G ODN）の存在下、3 0 0 μ g / 0 . 5 m L / 用量の A ペプチド免疫原構築物のワクチン製剤の、ヒビにおける 1 0 週にわたる抗体反応の反応速度論を示す。

【図 7】2 ～ 8 で 2 年保管後の A ペプチド免疫原構築物（配列番号 6 4 及び 6 5、等モル比）を有する U B I A D ワクチンのモルモットにおける免疫原性試験。標準の抗原刺激及び追加免疫（3 w p i）プロトコル後、U B I A D ワクチンは高い免疫原性及び安定性を維持していた。

【図 8】図 8 A：ヒト A D 脳の大脳の血管は、免疫前のヒビ血清の I g G 分画によって免疫組織化学的に染色されない。図 8 B：ヒト A D 脳の大脳の血管は、A ペプチド免疫原構築物、等モル比の配列番号 6 2 及び 6 3 で免疫化したヒビの過免疫の血清の精製 I g G による免疫組織化学染色を示す。図 8 C：ヒト A D 脳の大脳の血管は、A₁₋₁₄ ペプチドと共にブレインキュベートした図 8 B に記載の過免疫の血清の精製 I g G によって免疫組織化学的に染色されない。この図から、A₁₋₁₄ ペプチドとのブレインキュベーションが過免疫の血清の精製 I g G による大脳の血管の全ての免疫反応性を吸収することがわかり、A ペプチド免疫原構築物（配列番号 6 2 及び 6 3）を有するワクチン製剤のワクチン接種による過免疫の血清の高い特異性を示す。図 8 D：ヒト A D 脳の大脳の血管は、非関連ペプチドと共にブレインキュベーションした図 8 B に記載の過免疫の血清の精製 I g G による免疫組織化学染色を示す。図 8 E：ヒト A D 脳のアミロイドプラークは、免疫前のヒビ血清の I g G 分画で免疫組織化学的に染色されない。図 8 F：ヒト A D 脳のアミロイドプラークは、A ペプチド免疫原構築物、等モル比の配列番号 6 2 及び 6 3 で免疫化したヒビの過免疫の血清の精製 I g G による免疫組織化学染色を示す。

図 8 G：ヒト A D 脳のアミロイドプラークは、A₁₋₁₄ ペプチドと共にブレインキュベートした図 8 B に記載の過免疫の血清の精製 I g G によって免疫組織化学的に染色されない。この図から、A₁₋₁₄ ペプチドとのブレインキュベーションが過免疫の血清の精製 I g G による大脳の血管の全ての免疫反応性を吸収することがわかり、A ペプチド免疫原構築物（配列番号 6 2 及び 6 3）を有するワクチン製剤のワクチン接種による過免疫の血清の高い特異性を示す。図 8 H：ヒト A D 脳のアミロイドプラークは、非関連ペプチドと共にブレインキュベーションした図 8 B に記載の過免疫の血清の精製 I g G に

10

20

30

40

50

よる免疫組織化学染色を示す。

【図 9】成体ヒヒ (P. anubis) に対する UBI AD ワクチンの免疫原性試験。(パート A) 鉱物塩 (、 、) で製剤化した 1 投与当たり $300 \mu\text{g}$ の UBI AD ワクチンで 0、3、6 週 (矢印) にそれぞれのヒヒを免疫化し、ELISA によって抗 A 抗体価をアッセイした。初回免疫後、4 頭のヒヒの 3 頭は抗 A 抗体価を生じたことに留意すべき。(パート B) 鉱物塩で製剤化した $300 \mu\text{g}$ (低用量、) 又は $1200 \mu\text{g}$ (高用量、) の UBI AD ワクチンで、72 週の休薬期間後、78、81、及び 104 週 (矢印) にそれぞれのヒヒを免疫化し、抗 A 抗体価をアッセイした。単回のワクチンで追加免疫化後、4 頭のヒヒ全てが強い抗 A 抗体反応を生じたことに留意すべき。2 年の研究期間の最後において、4 頭のヒヒ全て健康で活発であった。

10

【図 10 A】hAPP751 を過剰発現する若齢の遺伝子導入マウスの皮質の脳形態学に対する予防モードにおける UBI AD ワクチンの効果。アジュバント単独で処置した遺伝子導入マウスから得た脳試料、UBI AD ワクチンで処置したマウスのレスポンド (Responder) から得た脳試料、及び無処置マウスから得た脳試料をアミロイドベータプラーク負荷について分析し、無処置及びアジュバント単独処置のものと比較して、UBI AD 処置レスポンドマウスにおけるプラーク数の減少及び「 μm^2 当たりのより低い平均プラークサイズ」を見出した。

【図 10 B】hAPP751 を過剰発現する若齢の遺伝子導入マウスの海馬の脳形態学に対する予防モードにおける UBI AD ワクチンの効果。アジュバント単独で処置した遺伝子導入マウスから得た脳試料、UBI AD ワクチンで処置したマウスのレスポンドから得た脳試料、及び無処置マウスから得た脳試料をアミロイドベータプラーク負荷について分析し、無処置及びアジュバント単独処置のものと比較して、UBI AD 処置レスポンドマウスにおけるプラーク数の減少及び「 μm^2 当たりのより低い平均プラークサイズ」を見出した。

20

【図 11 A】hAPP751 を過剰発現する若齢の遺伝子導入マウスの脳組織抽出物中のアミロイド ペプチド (A_{1-42}) の濃縮に対する予防モードにおける UBI AD ワクチンの効果。小さなプロトフィブリルを脳組織の生化学的抽出物のトリトン X - 100 分画から得た。UBI AD ワクチンで処置した遺伝子導入レスポンドマウスが、無処置の遺伝子導入マウスのトリトン X - 100 分画から得た脳組織抽出物と比較して、はるかに少ないプロトフィブリルを有することを見出した。

30

【図 11 B】hAPP751 を過剰発現する若齢の遺伝子導入マウスの脳組織抽出物中のアミロイド ペプチド (A_{1-42}) の濃縮に対する予防モードにおける UBI AD ワクチンの効果。大きなオリゴマー及びフィブリルを脳組織の生化学的抽出物の SDS デタージェント分画から得た。UBI AD ワクチンで処置した遺伝子導入レスポンドマウスが、無処置の遺伝子導入マウスの SDS デタージェント分画から得た脳組織抽出物と比較して、はるかに少ない大きなオリゴマー及びフィブリルを有することを見出した。

【図 12】患者における UBI AD ワクチン処置後の平均抗 A_{1-14} 抗体価。2 組のデータについて、1 つは試験期間中の 0 ~ 24 / 26 週 ($n = 17$ 、実線) に得られたデータ、他方は 0 ~ 48 週のフォローアップ観察期間 ($n = 13$ 、破線) を含んで得られたデータをプロットした。 A_{1-14} の \log_{10} 抗体価は時間の経過と共に減少したが、全ての被験者が研究の最後 (48 週) において陽性を維持していた。

40

【図 13】UBI AD ワクチンの試験を受けた、被験者 (年齢が > 60 歳でベースライン MMSE スコアが > 20) における 0 ~ 48 週の平均の ADAS - Cog (黒丸)、MMSE (白丸) スコア及び抗 A_{1-14} 抗体価 (黒のバー)。

【図 14】年齢が 60 歳を超えた軽度 AD に対する UBI AD ワクチンの 12 カ月にわたる平均 ADAS - Cog スコアの変化 (黒丸)、及びタレンフルビルの試験における軽度 AD のプラセボ群のもの (黒三角)。6 人の被験者 (年齢が > 60 歳の軽度 AD) は、タレンフルビルの試験 (Green ら、JAMA 2009; 302(23):257-2564) においてプラセボを接種され、同期間にわたってスコア上昇 (3.81 の変化) を伴う不十分な応答を示した軽度 AD の被験者と比較して、0、4、12 週に UBI AD ワクチンで免疫化後、4

50

、6、12カ月の評価でスコアの減少を伴う改善を示した（-3.00の変化）。

【図15A】第Ⅰ相臨床試験におけるUBI ADワクチンを接種した患者の免疫原性試験。軽度～中等度のアルツハイマー病の19人全てからの血清試料を、抗A抗体について、処置前（V1/V2；薄い灰色のバー）及び免疫化後16週（V7；黒のバー）で評価した。A₁₋₂₈モノマーに対する抗体価（log₁₀）を、処置前の来診、及び0、4及び12週に与えられたUBI ADワクチンの3回の最後のワクチン投与後4週である16週に採取した血清試料を使用して、ELISA試験によって評価した。処置前の試料において殆ど又は全く抗体反応性を認めなかった（したがって、対応するデータのほとんどの比較においてバーは見えない）。全ての個人は、図16に示すように、AペプチドのN末端に局在するA₁₋₂₈モノマーへの処置後に、高力価の抗A抗体を産生した。

10

【図15B】第Ⅰ相臨床試験におけるUBI ADワクチンを接種した患者の免疫原性試験。軽度～中等度のアルツハイマー病の19人全てからの血清試料を、抗A抗体について、処置前（V1/V2；薄い灰色のバー）及び免疫化後16週（V7；黒のバー）で評価した。A₁₋₄₂モノマーに対する抗体価（log₁₀）を、処置前の来診、及び0、4及び12週に与えられたUBI ADワクチンの3回の最後のワクチン投与後4週である16週に採取した血清試料を使用して、ELISA試験によって評価した。処置前の試料において殆ど又は全く抗体反応性を認めなかった（したがって、対応するデータのほとんどの比較においてバーは見えない）。全ての個人は、図16に示すように、AペプチドのN末端に局在するA₁₋₄₂モノマーへの処置後に、高力価の抗A抗体を産生した。

20

【図15C】第Ⅰ相臨床試験におけるUBI ADワクチンを接種した患者の免疫原性試験。軽度～中等度のアルツハイマー病の19人全てからの血清試料を、抗A抗体について、処置前（V1/V2；薄い灰色のバー）及び免疫化後16週（V7；黒のバー）で評価した。A₁₋₄₂オリゴマーに対する抗体価（log₁₀）を、処置前の来診、及び0、4及び12週に与えられたUBI ADワクチンの3回の最後のワクチン投与後4週である16週に採取した血清試料を使用して、ELISA試験によって評価した。処置前の試料において殆ど又は全く抗体反応性を認めなかった（したがって、対応するデータのほとんどの比較においてバーは見えない）。全ての個人は、図16に示すように、AペプチドのN末端に局在するA₁₋₄₂オリゴマーへの処置後に、高力価の抗A抗体を産生した。

30

【図16】免疫化したアルツハイマー病患者の血清によるA₁₋₄₂のN末端での微細な特異性分析のためのエピトープマッピング。UBI ADワクチンで免疫化した患者から16週に採取された血清試料中の抗体によって認識される主たるエピトープはA₁₋₁₀ペプチドに特異的である。このグラフは、3用量のUBI ADワクチンを接種し、A₁₋₁₄ペプチドに対する抗A抗体のlog₁₀力価が2.198を生じた1人（P210）からの典型的な陽性的エピトープマッピング応答を表す。エピトープマッピング用に血清を1:50に希釈した。ピークの高さは、異なる10アミノ酸長Aペプチド（配列番号6、8～30）に対する被験者の試料の半最大阻害濃度（IC₅₀）を示す。アミノ末端A配列（配列番号6（A₁₋₁₀：DAEFRHDSGY））に対して高度に特異的な免疫反応性に応じて、単一の主要ピークが観察される。

40

【発明を実施するための形態】

【0026】

発明の詳細な説明

本開示は、アルツハイマー病の危険性があるか又はアルツハイマー病である患者に防御免疫応答を提供するA₁₋₄₂ペプチドのN末端に対する特異的抗体の産生を刺激するために共に作用する、病原体タンパク質からの異種ヘルパーT細胞（Th）エピトープとスパーサー残基を介して結合したB細胞（B）エピトープとしてAペプチド（A₁₋₁₀～A₁₋₁₄）のN末端を持つ独自のAペプチド免疫原構築物を有する、独自のAペプチド免疫原構築物、これらAペプチド免疫原構築物及びその混合物を有するペ

50

プチド組成物、ワクチン製剤中にこれらペプチド組成物を有する医薬組成物に関する。

【0027】

本開示はアルツハイマー病の処置及び予防のための方法も含む。開示の方法はアルツハイマー病の危険性があるか又はアルツハイマー病である患者に投与するための医薬組成物を利用し、該医薬組成物はワクチン製剤懸濁液を含み、該ワクチン製剤懸濁液は、CpGオリゴマーのような高度に負に帯電するオリゴヌクレオチドとの静電会合による安定な免疫刺激複合体を任意に形成するA ペプチド免疫原構築物を有する。この複合体には、更に、アジュバントとして鉍物塩が追加されてもよい。本開示は、ワクチン製剤、具体的には、アルツハイマー病の危険性があるか又はアルツハイマー病である患者の予防及び処置のためのA ペプチド免疫原構築物を有するワクチン製剤の投与のための、投与計画、投与形式及び剤形を利用する方法も含む。

10

【0028】

本開示は、アルツハイマー病の危険性があるか又はアルツハイマー病である動物及び患者を保護することができるA ペプチド免疫原構築物及びワクチン製剤の、低コストの製造方法及び品質管理方法も提供する。本発明は、安定化免疫刺激複合体及び該安定化免疫刺激複合体を調製する方法に関する。より具体的には、本発明は、インビボで免疫応答を改善するワクチンデリバリシステムに有用である、A ペプチド免疫原構築物と、CpGオリゴマーのような高度に負に帯電するオリゴヌクレオチドとを有する安定化合成免疫刺激複合体を提供する。これらの免疫刺激複合体は、放出制御用デボー剤として機能するように設計されたワクチン製剤の調製にも有用である。

20

【0029】

さらなる面において、本発明は、本発明のA ペプチド免疫原構築物のワクチン製剤を以前に接種した患者の血液から単離されたB細胞によって誘発されるA₁₋₄₂に対するヒトモノクローナル抗体を提供する。

【0030】

(a) アミロイドベータ(A_β) ペプチド

「ベータアミロイド」という表題のウィキペディア内の記事は、対象の最新の概説を提供する(http://en.wikipedia.org/wiki/Beta_amyloid)。この記事へのインターネットリンクは、参照として本明細書に提供される。

【0031】

アミロイドベータ(A_β又はAベータ)は、アミロイド前駆体タンパク質からプロセシングされたアミノ酸36~43個のペプチドである。A_βは、アルツハイマー病患者の脳内に見られる沈着物の主成分である。A_βは、著しく非病理学的な活性を有する、非常に多機能のペプチドであるという証拠も見出されている。

30

【0032】

A_βは、機能が未確定の膜貫通型糖タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質(APP)の連続的な切断後に形成される。APPは、 α -、 β -及び γ -セクレターゼによってプロセシングされ得；A_βタンパク質は、 α -及び β -セクレターゼの連続的作用により産生する。A_βペプチドのC末端を生成する γ -セクレターゼは、APPの膜貫通領域内で切断し、長さが36~43アミノ酸残基のアイソフォームを多数産生することができる。最も一般的なアイソフォームは、A₁₋₄₀(配列番号2)及びA₁₋₄₂(配列番号1)であり；より長い形態が典型的には小胞体内で生じる切断によって生成する一方、より短い形態がトランスゴルジネットワーク内での切断によって生成する(Hartmann Tら, 1997; Nature Medicine 3:1016-1020)。A₁₋₄₀型は2種類の中でより一般的であるが、A₁₋₄₂(配列番号1)はより原線維形成性であるため、病態に関連する。

40

【0033】

APPにおける常染色体優位の突然変異は、遺伝性の早期発症型アルツハイマー病(家族性AD又はFAD)の原因である。この型のADは、全症例のわずか10%を占めるに過ぎず、大部分のADはこのような突然変異を付随しない。しかしながら、家族性アルツ

50

ハイマー病は、代わりのタンパク分解プロセッシングによって生じる可能性がある。全 A レベル、又は A₁₋₄₀ 及び A₁₋₄₂ の両方の相対濃度（前者は脳血管プラーク中で、後者は老人斑中で、より濃縮されている）のいずれかの上昇は、家族性及び孤発性アルツハイマー病の両方の発病に関係している。

【0034】

A₁₋₄₂ は、そのより疎水性の性質のために、ペプチドの最もアミロイド形成性の型である。しかしながら、中心配列：KLVFFAE（A₁₆₋₂₂）（配列番号 31）は、それ自身がアミロイドを形成することが知られており、おそらく原線維のコアを形成する。

【0035】

プラークがアルツハイマー病の病理の原因であるとする「アミロイド仮説」は、大半の研究者に受け入れられている。対立仮説は、プラークよりもむしろアミロイドオリゴマーが疾患の原因であるというものである。オリゴマーを発現するがプラークを発現しない遺伝子改変マウス（APP^{E693Q}）は疾患を発症する。なお、オリゴマーをプラークに変換するよう更に改変したマウス（APP^{E693Q} × PS1^{E9}）は、オリゴマーのみのマウスよりも損なわれない。ナノスケールの分子表面を可視化できる原子間力顕微鏡法を用いて、インビトロで A ペプチドの凝集状態（オリゴマー）を測定することができる。

【0036】

アミロイドベータを測定するための多くの異なる方法が存在する。それは免疫組織化学染色を用いて半定量的に測定でき、部位の決定も可能にする。A は、主に、脳アミロイド血管症のような血管、又は老人斑中及び血管領域に存在するだろう。

【0037】

A を測定する高感度な方法の 1 つは、定量的酵素イムノアッセイ法（qELISA）によるもので、これは A を認識する抗体のペアを利用する。

【0038】

画像化合物、特にピッツバーグ化合物 B（6-OH-BTA-1、チオフラビン（thioflavin））及びフロルベタピル（florbetapir）F18（18F-AV-45）は、インビトロ及びインビボでアミロイドベータと選択的に結合することができる。ポジトロン放出断層撮影（PET）イメージングと組み合わせるこの手法は、アルツハイマー病患者におけるプラーク沈着物の領域を画像化するために使用されている。

【0039】

（b）B 細胞エピトープ：A ペプチドの N 末端

本発明は、AD 患者の脳内の可溶性 A₁₋₄₂ 及びプラークへの交差反応性を有する、A ペプチドの N 末端に特異的な高力価のオリゴクローナル抗体を産生するための新規なペプチド組成物に関する。合理的設計の努力によるペプチド組成物の部位特異性は、担体タンパク質上の不適切な部位に対する抗体の産生を最小化する。

【0040】

表 1 は、A₁₋₄₂ の N 末端からのペプチドフラグメントを含む、短い直鎖状の多数のペプチドを提供する。A₁₋₄₂（配列番号 1）及び A₁₋₂₈（配列番号 3）のペプチドは担体タンパク質を必要とせずに免疫応答を誘発するのに十分な長さである。しかしながら、A₁₋₁₄、A₁₋₁₂、A₁₋₁₀（配列番号 4～6）のようなより短い N 末端 A ペプチドは、実施例 7 の表 4 に示されるように（免疫原性の研究において、群 3 を群 1 及び 2 と比較）、それら自身は非免疫原性である。この結果から、A₁₋₂₈ ペプチドを免疫原性にする 15～28 番目のアミノ酸の自己のヘルパー T 細胞エピトープ（Th）の存在が確認される。短い A フラグメントは、担体タンパク質、例えば、実施例 7 の表 6 の群 4 に示されるようなキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）との化学的カップリングによって免疫を増強できる。このような「A ペプチド-担体」ワクチンの主な欠陥は、組み合わせによって産生する抗体のほとんど（>90%）が、実施例 7 の表 6 の群 4 及びエピトープ抑制の可能性に示されるように、担体タンパク質であ

10

20

30

40

50

る K L H に対する非機能性の抗体であることである。

【 0 0 4 1 】

本発明のペプチド免疫原は、位置 1 のアミノ酸 A s p (D) から開始する A ペプチドの N 末端フラグメントの 1 0 ~ 1 4 個のアミノ酸 (1 0 ~ 1 4 アミノ酸長) を含む。これらの A ペプチドフラグメントを有する完全合成のペプチド免疫原は、多重の M H C クラス I I 結合モチーフを持つ選ばれたヘルパー T 細胞エпитープ (T h) (例えば、配列番号 3 3 ~ 4 7) も含有し、これは A D 患者の脳内の A _{1 - 4 2} ペプチド及び老人斑に対する高い交差反応性を有する A _{1 - 4 2} ペプチド上の N 末端標的部位に独占的に集中した免疫応答を誘発する。

【 0 0 4 2 】

(c) 異種ヘルパー T 細胞エピトープ (T h エピトープ)

T 細胞エピトープは、それらが M H C 分子と結合する抗原提示細胞の表面上に存在する。M H C クラス I 分子によって提示される T 細胞エピトープは典型的には 8 ~ 1 1 アミノ酸長のペプチドである一方、M H C クラス I I 分子はより長い 1 3 ~ 1 7 アミノ酸長のペプチドを提示し、非古典的 M H C 分子は糖脂質のような非ペプチド性のエピトープも提示する。

【 0 0 4 3 】

ヘルパー T 細胞 (T h 細胞) は、リンパ球のサブグループで、白血球の一種であり、免疫系、特に獲得免疫系において重要な役割を果たしている。これらは、T 細胞サイトカインを放出することによって、他の免疫細胞の活動を助ける。これらは、B 細胞抗体のクラススイッチ、細胞傷害性 T 細胞の活性化及び増殖、並びにマクロファージのような貪食細胞の殺菌活性の最大化に不可欠である。

【 0 0 4 4 】

ヘルパー T 細胞エピトープ (T h エピトープ) は、抗原提示細胞の表面に存在する T 細胞エピトープであって、それらは、M H C クラス I I 分子と結合し、長さが 1 3 ~ 1 7 個のアミノ酸であり、上述したように、ヘルパー T 細胞によって特異的に認識される。

【 0 0 4 5 】

主要組織適合抗原複合体 (M H C) クラス I I 分子に結合するペプチドは、免疫応答の開始及び調節に重要である。特異的 M H C 分子に結合するペプチドを予測することは、有望なワクチン候補を決定するのに重要な役割を果たす。クラス I I M H C における結合溝は、9 アミノ酸長より長いペプチドが結合できるように両端が開いている。結合するペプチドの異なる長さ及び 9 アミノ長の結合コアの位置が変化するため、ペプチドの M H C クラス I I 分子への結合を促進するコンセンサスモチーフを探索するのは困難である。該分子が非特異的 (promiscuous) で多数の低親和性ペプチドと結合する場合、難易度は高くなる。

【 0 0 4 6 】

過去 2 0 年間にわたって、本発明者及び彼女のチームは、合理的設計 (5 , 6) によって B 細胞エピトープに対する特異的な高力価抗体を産生する増強された免疫原性を目的として、特異的な標的 B 細胞エピトープ (例えば、A ペプチドフラグメント) がこのような T h エピトープに N 末端又は C 末端のいずれかで結合するペプチド免疫原構築物 (米国特許第 6 , 7 1 3 , 3 0 1 B 1 号及び Wang CY , 2005 ; 米国特許第 6 , 9 0 6 , 1 6 9 号) の設計用の異種 T h エピトープとして使用するために、多くの病原体のタンパク質から、異なる種 (例えば、ヒト、ブタ、ウシ等) の M H C クラス I I 分子に非特異的に (promiscuous) 結合するモチーフを有する多くの有望な T h エピトープを特定してきた。ワクチンに使用する、合理的に設計された全ての免疫原は、ワクチン製剤で使用される最適な T h エピトープを選ぶためのスクリーニング方法 (例えば、実施例 7、表 4、5、6 及び 7) の一部として、実験的な免疫処置を通じてこのような T h エピトープの有効性を検証するためのものであることを強調する。理想的な T h エピトープは、免疫応答の開始及び調節をもたらすヘルパー T 細胞の活性を最大にする複数の非特異的 (promiscuous) M H C クラス I I 結合モチーフを有し、且つそれら自身は、通常、免疫応答しない (即ち、

10

20

30

40

50

Thエピトープ（例えば、実施例7の表6の群1、2及び3；並びに実施例8及び9の表7の群1）に対するであろう免疫原構築物によって抗体を産生しない）ため、主に標的のB細胞エピトープに対する免疫応答に非常に集中させる。

【0047】

Thは、Thエピトープを有するアミノ酸（天然又は非天然アミノ酸）の配列を意味する。対象ペプチドのThドメインは、約9～約25個のアミノ酸、好ましくは約13～約17個のアミノ酸である。Thセグメント及びその機能的免疫学的類似体は、約10～約14個のアミノ酸残基である、A₁₋₄₂ペプチドのN末端フラグメント（配列番号4～6）に対する免疫応答を増強又は刺激するのに十分なThエピトープの連続的な部分を有する。

10

【0048】

本発明のThエピトープとして、表2（配列番号33～41）で例示したような外来病原体に由来するものが挙げられるが、これに限定されない。また、Thエピトープとして、理想的な人工Th及び理想的な人工コンビナトリアルTh（配列番号42～47）が挙げられる。コンビナトリアルThを有するペプチドは、N末端A₁₋₄₂ペプチド配列に直列する、単一の固相ペプチド合成で同時に生成する。Th部位は、免疫学的類似体も含む。免疫学的Th類似体として、免疫が増強された類似体、交差反応性の類似体及びそれらのThエピトープの任意のセグメントが挙げられる。機能的免疫学的Th類似体として、また、麻疹ウイルス融合タンパク質MV F1～5Th（配列番号34、41、42、44及び46）及びB型肝炎表面抗原HBsAg1～3Th（配列番号43、45、47）に由来するThエピトープの幾つかの型で最もよく示されるThエピトープのTh刺激機能が実質的に改変されていないThエピトープの1～約5個のアミノ酸残基が保存的置換、付加、欠失及び挿入されたものが挙げられる。

20

【0049】

本発明のA₁₋₄₂ペプチド免疫原構築物は約13～約20個のアミノ酸残基のThエピトープを有し、該Thエピトープは、「スペーサーA」を介して、A₁₋₄₂ペプチドのN末端フラグメント及びその交差反応性類似体又は機能的類似体のC末端に共有結合する。本発明のA₁₋₄₂ペプチド免疫原構築物（例えば、配列番号48～65）の交差反応性類似体及び機能的類似体は、1～約5個のアミノ酸残基の保存的置換、付加、欠失又は挿入をさらに有してよいが、該ペプチド類似体は、A₁₋₄₂ペプチドと交差反応する免疫応答を誘発できることとする。保存的置換、付加及び挿入は、本明細書に定義される天然又は非天然アミノ酸で行うことができる。

30

【0050】

本発明の好ましいペプチド免疫原は、A₁₋₄₂ペプチドのN末端フラグメント（配列番号4～6）又はその交差反応性の免疫学的類似体；スペーサー（例えば、-Lys、Gly又は-Lys-Lys-Lys-Lys）；及び表2のものから選ばれるThエピトープ（配列番号34、37、38、40～47）を含むペプチドである（実施例7の表4の免疫原性試験の結果を参照）。

【0051】

Thエピトープペプチドの機能的免疫学的類似体（例えば、MV F₁₋₅Th（配列番号34、41、42、44及び46）；並びにHBsAg₁₋₃Th（配列番号43、45、47）の各種の配列）も有効であり、本発明の一部に含まれる。A₁₋₄₂ペプチド免疫原構築物の機能的免疫学的類似体として、元のペプチド、配列番号51及び60と同じ免疫原性を実質的に維持する、変異体、配列番号49～51、54～55、57～65及び/又は相同体、配列番号49～51、54～55、57～65が挙げられる。例えば、機能的類似体である変異体は、アミノ酸位置における保存的置換；全体の電荷の変化；別の部分との共有結合；又はアミノ酸の付加、挿入若しくは欠失；及び/又は、その任意の組み合わせを有することができる。

40

【0052】

保存的置換とは、1つのアミノ酸残基が、類似の化学的性質を有する別のアミノ酸残基

50

で置換される場合である。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸として、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンが挙げられ；極性の中性アミノ酸として、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンが挙げられ；正電荷の（塩基性）アミノ酸として、アルギニン、リジン及びヒスチジンが挙げられ；負電荷の（酸性）アミノ酸として、アスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられる。

【 0 0 5 3 】

特定の態様において、機能的類似体は、元のアミノ酸配列の少なくとも 5 0 % の同一性を有する。別の態様において、機能的類似体は、元のアミノ酸配列の少なくとも 8 0 % の同一性を有する。更に他の態様において、機能的類似体は、元のアミノ酸配列の少なくとも 8 5 % の同一性を有する。また別の態様において、機能的類似体は、元のアミノ酸配列の少なくとも 9 0 % の同一性を有する。

10

【 0 0 5 4 】

ある態様において、ある特定のペプチドの機能的免疫学的類似体は、元のペプチドと同じアミノ酸配列を含有し、且つペプチドのアミノ末端に 3 個のリジン（L y s - L y s - L y s）を更に含む。この態様において、元のペプチド配列への 3 個のリジンの包含は、元のペプチドの全体の電荷を変化させるが、M V F T h ペプチド系（表 2 ~ 7）で示したように、元のペプチドの機能は改変しない。

【 0 0 5 5 】

表 2 は、T h エピトープペプチドのための機能的類似体の別の変形例を明らかにする。特に、配列番号 3 4 及び 4 1 の M V F 1 T h 及び M V F 2 T h は、各 N 末端及び C 末端の 2 個のアミノ酸の欠失（配列番号 3 4 及び 4 1）又は包含（配列番号 4 4 及び 4 6）によってアミノ酸骨格が相違する、配列番号 4 4 及び 4 6 の M V F 4 T h 及び M V F 5 T h の機能的類似体である。これら 2 種の類似体配列間の相違は、これらの配列内に含まれる T h エピトープの機能に影響を与えないだろう（例えば、実施例 7 の表 4 の群 7、8、1 4 対実施例 7 の表 5 の群 1 及び実施例 8 の表 7 の群 1）。

20

【 0 0 5 6 】

他の変形例において、異種 T h エピトープペプチドは組み合わせ配列として存在することもでき、これは、特定のペプチドの相同体の可変残基に基づくペプチド骨格内の特定の位置にあるアミノ酸残基の混合物を含む。コンビナトリアルペプチドのアッセムブリーは、合成プロセス中に、特定の位置の 1 個の特定のアミノ酸の代わりに、指定の保護されたアミノ酸の混合物を添加することにより、1 工程で合成できる。このようなコンビナトリアル異種 T h エピトープペプチドのアッセムブリーは、多様な遺伝的背景を持つ動物に対する T h エピトープの範囲を広くすることができる。異種 T h エピトープペプチドの代表的な組み合わせ配列として、表 2 に示された配列番号 4 2 ~ 4 5 が挙げられる。本発明の T h エピトープペプチドは、遺伝的に多様な集団からの動物及び患者に対する広い反応性及び免疫原性を提供する。

30

【 0 0 5 7 】

一般的に、本発明の A ペプチド免疫原構築物は、下記式によって表される。

(A _{1 - 4 2} ペプチドの N 末端フラグメント) - (A) o - (T h) - X

40

式中、(A _{1 - 4 2} ペプチドの N 末端フラグメント) は、配列番号 4 ~ 6 からなる群から選ばれる約 1 0 ~ 約 1 4 個のアミノ酸残基を有する B 細胞エピトープであり；

各 A は、独立に、アミノ酸、L y s -、G l y -、L y s - L y s - L y s -、(, - N) L y s、又は - N - L y s - L y s - L y s - L y s（配列番号 3 2）からなる群から選ばれるアミノ酸又は結合基であり；

各 T h は、配列番号 3 4、3 7、3 8、4 0 ~ 4 7 及びその機能的免疫学的類似体からなる群から選ばれるヘルパー T 細胞エピトープを構成するアミノ酸配列を有し；

X は、アミノ酸の - C O O H 又は - C O N H ₂ であり；且つ

o は 0 ~ 約 4 である。

【 0 0 5 8 】

50

本発明の A ペプチド免疫原構築物は、約 20 ~ 約 50 個のアミノ酸残基、好ましくは約 25 ~ 約 40 個のアミノ酸残基を有する。

【0059】

スパーサー (A) によって提供される立体構造の分離により、提示された A ペプチド免疫原構築物と適切な T h 細胞及び B 細胞との間のより効率的な相互作用が可能となり、これにより、A ペプチド免疫原構築物又はその交差反応性の機能的免疫学的類似体の免疫原性が増強される。

【0060】

(d) 組成物

(i) ペプチド組成物

本開示の組成物は 1 つ又はそれ以上の A ペプチド免疫原構築物を含有することができる。2 つ以上の T h エピトープを有する A ペプチド免疫原構築物の混合物を有するペプチド組成物は、広い MHC クラス II の範囲のために、幅広い遺伝的集団における免疫活性の相乗的増強を可能にする医薬製剤 / ワクチン製剤に調製することができる。このような組成物は A₁₋₄₂ ペプチドフラグメントに対する改善された免疫応答を提供することができる。

【0061】

例えば、組成物は、表 3 に示される A ペプチド免疫原構築物 (配列番号 48 ~ 65)、その相同体、類似体及び / 又は組み合わせを含むことができる。より具体的には、ペプチド組成物は、配列番号 62、63、64 及び 65 から選ばれる配列を持つ A ペプチド免疫原構築物、その相同体、類似体及び又は組み合わせ (例えば、実施例 7 に示される配列番号 62 及び 63 の等モル混合物、又は実施例 8、9 及び 10 における配列番号 64 及び 65 の別の等モル混合物) を含むことができる。

【0062】

(ii) 医薬組成物

本開示は、AD の危険性があるか又は AD である患者におけるアルツハイマー型認知症を処置及び / 又は予防するための医薬組成物である、A ペプチド免疫原構築物の混合物を含有する組成物にも関する。

【0063】

組成物は液剤 (例えば、溶液又は懸濁液) に調製できる。典型的には、組成物は溶液又は懸濁液のいずれかの注射剤として調製される。注射前に液状ビヒクルを調製することもできる。他の投与モードに適したさらなる製剤として、経口投与及び鼻腔内投与が挙げられる。上記の状態の処置のための本発明の組成物の有効投与量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒト又は動物であるか、投与される他の薬剤、処置が予防的又は治療的であるかを含む多くの異なる因子に応じて変わる。通常、患者はヒトであるが、遺伝子改変哺乳動物を含む非ヒト哺乳動物にも処置できる。

【0064】

医薬組成物は、有効量の A ペプチド免疫原構築物及び医薬上許容可能な担体を含むように製剤化される。医薬組成物はまた、体重 1 kg 当たりの免疫原約 0.5 µg ~ 約 1 mg を通常含む適切な単位投与形態に製剤化される。複数回投与で送達する場合、医薬組成物は単位投与形態当たりの適切な量に便宜上分割されてもよい。投与量は、ワクチン及び治療分野において周知のように、対象の年齢、体重及び健康状態に依存する。

【0065】

(iii) 医薬ワクチン製剤

ある態様において、A ペプチド免疫原構築物を有する医薬組成物は、ワクチン宿主における A ペプチドの N 末端に対する免疫応答を誘発するのに用いられる。本発明の A ペプチド免疫原構築物を含有する医薬組成物は、ワクチン宿主又は AD の危険性があるか若しくは AD である患者に対して、アルツハイマー型認知症の予防及び処置のためのワクチンとして用いることができる。

【0066】

10

20

30

40

50

また、組成物は、医薬上許容可能なデリバリシステム中に、担体及び／又は他の添加物を含むことができる。したがって、A ペプチド免疫原構築物を含む組成物は、アジュバント、医薬上許容可能な担体又はワクチン製剤で通常提供される免疫学的アジュバントを含む他の成分を用いる医薬ワクチン製剤として製剤化することができる。免疫アジュバントは、「特異的ワクチン抗原と組み合わせて使用された場合、それ自身は任意の特異的な抗原効果を持つことはなく、抗原特異的な免疫応答を促進、延長又は増強するように作用する任意の物質」として定義される。油、アルミニウム塩及びピロソームを含む、広範囲に使用される多くの公知のアジュバントが存在する。リン酸アルミニウム（例えば、アジュホス（Adjuphos））及び水酸化アルミニウム（例えば、アルハイドロゲル（Alhydrogel））を含む２つの一般的な塩が、ヒトワクチン中で最も一般的なアジュバントである。鉱物塩を選ぶ方法及び使用する鉱物塩又はその組み合わせの好ましい濃度を決定する方法は、当業者に周知である。

10

【 0 0 6 7 】

本発明においてアジュバントとしても使用できる他の成分として、リポシン、サポニン、スクアレン、L 1 2 1、エマルシゲン、モノホスホリルリピド A（MPL）、QS 2 1、ISA 3 5、ISA 2 0 6、ISA 5 0 V、ISA 5 1 及び ISA 7 2 0、並びに他の有効なアジュバント及び乳化剤が挙げられる。ある特定の態様において、デリバリビヒクル及びアジュバントは、モンタニド（商標）（MontanideTM）ISA 5 1（油中水型乳剤製造用の、植物油及びオレイン酸マンニド（mannide oleate）から構成される油性ワクチンアジュバント組成物）、ツイーン（登録商標）（TweenR）8 0（ポリソルベート 8 0 又はモノオレイン酸ポリオキシエチレン（2 0）ソルビタンとしても知られる）、CpG オリゴヌクレオチド及び／又はその任意の組み合わせである。別の態様において、医薬組成物は、アジュバントとしてエマルシゲン（Emulsigen）又はエマルシゲン D を有する水中油中水型（即ち、w / o / w）乳剤である。

20

【 0 0 6 8 】

ワクチンとしての医薬組成物は、速放性製剤又は徐放性製剤として製剤化することができる。また、医薬組成物は、全身又は局在粘膜への導入、封入された免疫原による免疫及び微粒子を用いる同時投与のために製剤化できる。このようなデリバリシステムは当業者によって簡単に見つけ出される。

【 0 0 6 9 】

本開示の A ペプチド免疫原構築物を含む各種のワクチン製剤は、ワクチン宿主又は A D の危険性があるか若しくは A D である患者におけるアルツハイマー型認知症の保護及び処置に有効である。

30

【 0 0 7 0 】

（ i v ） A ペプチド免疫刺激複合体

ある態様において、医薬組成物は、（ a ） CpG オリゴヌクレオチド及び（ b ） A ペプチド免疫原構築物を有する免疫刺激複合体を含むことができる。このような免疫刺激複合体は、アジュバントとして及びペプチド免疫原安定化剤として作用するように特に適応される。免疫刺激複合体は粒子状形態であり、これは、免疫応答を生じさせる免疫系細胞に A ペプチド免疫原構築物を効率的に提示することができる。免疫刺激複合体は、非経口投与用の懸濁液として製剤化することができる。免疫刺激複合体は、非経口投与に続いて、ワクチン宿主の免疫系細胞へ A ペプチド免疫原構築物を効率的に送達し、予防効果を有する抗 A 免疫応答を生じさせるために、鉱物塩と、又はその場でゲル化するポリマーと組み合わせた懸濁液として、W / O 乳剤の形態に製剤化してもよい。本発明は、カチオン性 A ペプチド免疫原構築物とアニオン性分子又はオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド及びその組み合わせとを有する安定化免疫刺激複合体、並びに、静電会合によるアニオン性分子又はオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドとの複合化によってカチオン性 A ペプチド免疫原構築物を安定化させる方法に関する。安定化免疫刺激複合体は、免疫原のデリバリシステムとして医薬組成物に組み込むことができる。

40

【 0 0 7 1 】

50

本明細書に記載の「カチオン性ペプチド」である A ペプチド免疫原構築物は、5.0 ~ 8.0 の範囲内の pH で正電荷のペプチドを意味する。ペプチド又はペプチド混合物の正味の電荷は、リジン (K)、アルギニン (R) 又はヒスチジン (H) にそれぞれ +1 の電荷、アスパラギン酸 (D) 又はグルタミン酸 (E) にそれぞれ -1 の電荷、及び配列中の他のアミノ酸に 0 の電荷を割り当てることによって計算される。無置換の場合、各ペプチドの末端基である N 末端のアミン (+1) 及び C 末端のカルボン酸塩 (-1) からの電荷の寄与は、効果的に互いに相殺する。電荷は各ペプチドについて合計し、正味の平均電荷として示される。適切なペプチド免疫原は正味の平均正電荷が +1 である。好ましくは、ペプチド免疫原は、正味の正電荷が +2 より大きい範囲である。

【0072】

本明細書に記載の「アニオン性分子」は、5.0 ~ 8.0 の範囲内の pH で負電荷の分子を意味する。オリゴマー又はポリマーの正味の負電荷は、オリゴマー中のリン酸ジエステル基又はホスホロチオエート基にそれぞれ -1 の電荷を割り当てることによって計算される。適切なアニオン性オリゴヌクレオチドは、CpG モチーフの繰り返し数が 1 ~ 10 の範囲内で、8 ~ 64 個の核酸塩基を有する一本鎖 DNA 分子である。好ましくは、CpG 免疫刺激一本鎖 DNA 分子は、CpG モチーフの繰り返し数が 3 ~ 8 の範囲内で 18 ~ 48 個の核酸塩基を含む。

【0073】

より好ましくは、アニオン性オリゴヌクレオチドは、式： $5' - X^1 C G X^2 - 3'$ (式中、C 及び G はメチル化されておらず； X^1 は A (アデニン)、G (グアニン) 及び T (チミン) からなる群から選ばれ；及び X^2 は C (シトシン) 又は T (チミン) である) によって表される。或いは、アニオン性オリゴヌクレオチドは、式： $5' - (X^3)_2 C G (X^4)_2 - 3'$ (式中、C 及び G はメチル化されておらず； X^3 は A、T 又は G からなる群から選ばれ；並びに X^4 は C 又は T である) によって表される。

【0074】

得られる免疫刺激複合体は、典型的には 1 ~ 50 ミクロンの範囲内のサイズの粒子状態であり、相互作用する化学種の相対的な電荷の化学量論及び分子量を含む多くの因子の機能である。粒子状の免疫刺激複合体は、アジュバント作用の提供及びインビボで特異的な免疫応答の増加という追加的な利点を有する。また、安定化免疫刺激複合体は、油中水型乳剤、鉱物塩懸濁液及びポリマーゲルを含む各種プロセスによってワクチン製剤を調製するのに適切である。

【0075】

(e) 製造方法

本開示は、免疫応答を誘発し、AD の危険性があるか又は AD である患者を保護するための、A ペプチド免疫原構築物、組成物及び医薬組成物、ワクチン製剤の製造方法にも関する。

【0076】

(i) A ペプチド免疫原構築物の製造方法

本発明のペプチド免疫原は当業者に周知の化学合成法によって製造することができる。例えば、Moore V. 「Synthetic Peptides: A User's Guide」第 2 章、GA Grant, W.H. 編、Freeman & Co., ニューヨーク, NY, 1992, p.63-67 を参照のこと。したがって、ペプチドは、例えば、アプライド・バイオシステム・ペプチド合成機 (モデル 430A 又は 431) で、側鎖を保護したアミノ酸を使用する t-Boc 又は Fmoc 化学のいずれかにより保護された $-NH_2$ を用いる固相合成の自動メリーフィールド法を使用して合成することができる。Th エピトープのためのコンビナトリアルライブラリーペプチドを有するペプチド構築物の調製は、与えられた可変位置でカップリング用の代替アミノ酸の混合物を提供することによって達成することができる。

【0077】

所望のペプチド免疫原のアッセンブリーの完成後、樹脂を標準の手順に従って処理してペプチドを樹脂から切断し、アミノ酸側鎖上の官能基を脱ブロック化する。遊離ペプチド

10

20

30

40

50

は、HPLCにより精製され、生化学的、例えばアミノ酸分析又は配列決定によって特性が明らかにされる。ペプチドの精製法及び特性評価法は、当業者に周知である。

【0078】

本発明の免疫原は、分岐状ポリリシルコア樹脂上に直接所望のペプチド構築物を合成することにより、分岐状ポリマーとして調製してもよい(Wangら、Science, 1991; 254: 285-288)。

【0079】

この化学的方法によって製造されるペプチドの品質を制御及び定義することができ、結果として、抗原性、免疫原性及び収率の再現性を保証することができる。固相ペプチド合成によるペプチド又はペプチド免疫原構築物に関するAの製造の詳細な説明を実施例1に示す。

【0080】

25年にわたる合成ペプチドの免疫学的応用における経験の間に、出願人は、意図する免疫学的活性の保持を可能にする構造的変性の範囲が、低分子薬物による特定の薬物活性の保持を可能にする又は生物学的に誘導される薬物と共に生成する高分子において認められる所望の活性及び望ましくない毒性の保持を可能にする構造的変性の範囲よりも、はるかに適応することを見出した。したがって、意図的に設計されたか、又は意図するペプチドと類似のクロマトグラフィー特性及び免疫学的特性を持つ配列が欠失した副生成物の混合物として合成プロセスの誤りによって必然的に生成する、いずれかのペプチド類似体は、しばしば、所望のペプチドの精製調製物と同様に有効である。これらのペプチドを使用する最終製品の再現性及び有効性を保証するような、製造方法及び製品の評価方法の両方を監視するための識別力のあるQC手法が開発される限り、設計された類似体及び意図しない類似体混合物は有効である。

【0081】

ペプチドは、核酸分子、ベクター及び/又は宿主細胞を含む組み換えDNA技術を使用して作製することもできる。このように、Aペプチド免疫原構築物及びAペプチド免疫原構築物の免疫学的機能的類似体、並びにその類似体/相同体をコードする核酸分子もまた、本発明の一部として本開示に含まれる。同様に、核酸分子を有するベクター(発現ベクターを含む)だけでなく、ベクターを含む宿主細胞もまた、本発明の一部として本開示に含まれる。

【0082】

各種の例示的な態様は、Aペプチド免疫原構築物及びAペプチド免疫原構築物の免疫学的機能的類似体の製造方法も含む。例えば、該方法はAペプチド免疫原構築物及び/又はその免疫学的機能的類似体をコードする核酸分子を含む発現ベクターを含む宿主細胞を、ペプチド及び/又は類似体が発現するような条件下で培養する工程を含むことができる。より長い合成ペプチド免疫原は、周知の組み換えDNA技術により合成することができる。このような技術は、詳細なプロトコルを含む周知の標準マニュアルにおいて提供される。本発明のペプチドをコードする遺伝子を構築するために、アミノ酸配列を逆翻訳して、アミノ酸配列をコードする核酸配列(好ましくは、遺伝子を発現する生物体に最適なコドンを含む)を得る。次に、典型的にはペプチド及び必要に応じて任意の調節エレメントをコードするオリゴヌクレオチドを合成することによって合成遺伝子を作製する。合成遺伝子を適切なクローニングベクターに挿入し、宿主細胞に遺伝子導入する。次いで、選ばれた発現系及び宿主にふさわしい適切な条件下でペプチドを発現する。ペプチドを精製し、標準的な方法により特性を明らかにする。

【0083】

(ii) 免疫刺激複合体の製造方法

各種の例示的な態様は、Aペプチド免疫原構築物及びCpGオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)分子を有する免疫刺激複合体(ISC)を製造する方法も含む。ある態様において、図5Aに示すように、安定化免疫刺激複合体はカチオン性ペプチド及びポリアニオン性CpG ODN分子に由来する。図5Aは、電荷の静電中和により引き起こされ

10

20

30

40

50

る自己組織化システムを示す。アニオン性オリゴマーに対するカチオン性ペプチドのモル電荷比の化学量論が会合の程度を決める。ペプチド免疫原及びCpG ODNの非共有結合性の静電会合は、完全に再現性のあるプロセスである。ペプチド/CpG ODN免疫刺激複合体は、自己凝集し、免疫系の「プロフェッショナル」抗原提示細胞（APC）への提示が促進されるため、さらに複合体の免疫原性が増強される。これらの複合体は、製造中の品質管理のために容易に特徴付けられる。ペプチド/CpG ISCはインビボで十分に許容される。

【0084】

ある態様において、ワクチン製剤（UBI ADワクチン）は、2つのA ペプチド免疫原構築物（配列番号64及び65）を用い、等モル比で調製し、独占的所有権を有する（proprietary）CpG ODNと混合して、実施例8及び9に記載するように、溶液中で免疫刺激複合体の自発的な形成がもたらされる。CpG ODN及びA ペプチド免疫原構築物を有するこの新規な粒子系は、CpG ODNの使用に関連する一般的なB細胞の分裂促進性を有利にし、バランスのとれたTh-1/Th-2型応答を更に促進するために設計された。

【0085】

開示するワクチン製剤中のCpG ODNは、反対の電荷の静電中和を介するプロセスで免疫原と100%結合し、ミクロンサイズの粒子の形成がもたらされる。粒子形態は、CpG アジュバントの通常の使用からCpGの投与量を大幅に低減することを可能にし、不利な自然免疫応答の可能性をより減らし、抗原提示細胞（APC）を含む代替的な免疫プロセッシング経路を促進する。したがって、開示する製剤（UBI ADワクチン）は、概念的に新規であり、代替的な機構によって免疫応答の刺激を促進することにより利点を提供する。

【0086】

（iii）ワクチン製剤の製造方法

各種の例示的な態様は、図5Bに示すように、鉍物塩を有する油中水型乳剤及び懸濁液を使用するワクチン製剤も含む。投与の目標の一部でもある予防を伴って、多くの人々によって使用されるように設計されたワクチンのためには、安全性は考慮される別の重要な因子になる。臨床試験における多くのワクチン製剤のためのヒトへの油中水型乳剤の使用にもかかわらず、アラムは、その数十年にわたる安全性試験によって、依然としてワクチン製剤での使用のための主要なアジュバントである。実施例8及び9に示すように、アラム又はその鉍物塩であるアジュホス（Adjuphos）アラム（リン酸アルミニウム）を臨床適用のための調製物中でアジュバントとして使用した。

【0087】

（f）アルツハイマー病の処置及び予防のための方法

（i）処置の体系的計画（regime）

予防的な適用において、医薬組成物を、アルツハイマー病に影響されやすいか、又はアルツハイマー病の危険性がある患者に、危険性を取り除くかもしくは軽減させるか、重篤度を軽減させるか、又は（生化学的、組織学的及び/又は行動学的に）疾患の発症を遅らせる（疾患の進行中でのその合併症及び中間の病理学的表現型を含む）のに十分な量で、投与する。

【0088】

治療的な適用において、組成物を、このような疾患の疑いがあるか又は既にこのような疾患に罹患している患者に、治療、又は（生化学的、組織学的及び/又は行動学的に）疾患の症状を少なくとも部分的に抑制する（疾患の進行中でのその合併症及び中間の病理学的表現型を含む）のに十分な量で、投与する。

【0089】

ある方法において、薬剤の投与は、まだ特徴的なアルツハイマー病理を発症していない患者における軽度認知障害を軽減又は解消する。治療的又は予防的処置を達成するのに適切な量は、治療的又は予防的に有効な投与量として定義される。予防的及び治療的体系的

10

20

30

40

50

計画の両方において、薬剤を、通常、十分な免疫応答を達成するまで、幾つかの投与量で投与する。典型的には、免疫応答を監視し、免疫応答が減少し始めたら反復投与する。

【 0 0 9 0 】

(i i) 処置に適している患者

処置に適している患者として、アルツハイマー病発症の危険性はあるが症状は示していない者、及び現在症状を示している患者が挙げられる。

【 0 0 9 1 】

本明細書で使用される用語「予防的処置」は、疾患をもたらす発症プロセスの停止を目的とする処置に関する。

【 0 0 9 2 】

本明細書で使用される用語「処置」は、疾患の進行をもたらすか及び／又は対症的な効果を有する発症プロセスの停止を目的とする処置に関する。

【 0 0 9 3 】

十分に長く生きている人の場合、全ての人がアルツハイマー病を患う危険性があると言ってもよい。したがって、本方法は、対象患者（即ち、生きている人は誰でも患者としての資格があり得る）の危険性の任意の評価は必要とせずに、一般の人々に対して予防的に投与することができる。本方法は、アルツハイマー病の公知の遺伝的危険性を持つ人に対して特に有用である。そのような人としては、この疾患を経験した親類を持つ人、及び遺伝又は生物学的マーカーの分析により危険性が確定した人が挙げられる。アルツハイマー病に対する危険性の遺伝マーカーとしては、A P P 遺伝子の変異（特に、ハーディ及びスウェーデン変異とそれぞれ呼ばれる、7 1 7 番目並びに6 7 0 及び6 7 1 番目での変異）が挙げられる（Hardy J. Trends in Neurosciences 1997;20:154-159を参照のこと）。危険性の他のマーカーとして、プレセニリン遺伝子 P S 1 及び P S 2、並びに A p o E 4 における変異、A D の家族歴、高コレステロール血症又はアテローム性動脈硬化症がある。

【 0 0 9 4 】

一般に、患者は、軽度認知障害がある患者、アルツハイマー病に関連する公知の遺伝子型を有する患者、2 1 トリソミーを有する患者（即ち、潜在的なダウン症候群患者）、アルツハイマー病の危険性を示す代替マーカーを有する患者からなる危険群の対象から選ばれる。

【 0 0 9 5 】

無症状の患者において、処置は任意の年齢（例えば、1 0、2 0、3 0 歳）で開始することができる。患者が4 0、5 0、6 0 又は7 0 歳に達するまで処置を開始する必要はない。潜在的なダウン症候群の患者の症例では、出生前に母親に又は出生後すぐに治療薬を投与することによって処置を開始することができる。

【 0 0 9 6 】

現在アルツハイマー病に罹患している人は特徴的な認知症から認識でき、これは本明細書で使用されるように、特に、精神疾患の診断・統計マニュアル（Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders、第4版）（D S M - I V）基準及び上記の危険因子の存在に従って定義される疾患に関する。また、多くの診断テストがA D の人を識別するために利用できる。これらは、C S F タウ及びA₁₋₄₂レベルの測定を含む。タウの上昇及びA₁₋₄₂レベルの低下は、A D の存在を表す。アルツハイマー病に罹患している人は、N I N C D S - A D R D A アルツハイマー基準によって診断することもできる。

【 0 0 9 7 】

処置は、典型的には一定期間にわたる複数回投与を必要とする。処置は、治療薬に対する抗体又は活性化T細胞若しくはB細胞の応答をアッセイすることにより（例えばA₁₋₄₂ E L I S A）、長時間にわたって監視できる。応答が低下したら追加免疫投与量が指示される。

【 0 0 9 8 】

老人性アミロイドブラークの主成分であるA_β アミロイドペプチドがA D の原因となる

役割を果たしていることを示唆する、考慮すべき証拠が蓄積されてきた。ADの成功した疾患改変療法は、脳内の アミロイドの沈着に影響を与える製品を含む可能性がある。免疫系によって積極的に産生するか又は受動的に投与されるA 特異的抗体は、異なる遺伝子導入マウスモデルにおけるプラークの負荷を一貫して低減する。抗A 抗体を産生するAD患者の免疫系を刺激する最初の臨床的試みは、しかしながら、許容できない副作用のために中断されなければならなかった（処置した患者の6%に髄膜脳炎、Orgogozo JMら、Neurology 2003;61:46-54）。

【0099】

驚くべきことに、有害な免疫反応又は微小出血の発生率は、麻疹ウイルス融合（MV F）タンパク質及びB型肝炎表面抗原（HBsAg）にそれぞれ由来する、2つの理想的な人工ヘルパーTエピトープと等モル比で結合した、2つのA₁₋₁₄ペプチド免疫原構築物（配列番号64及び65）を使用する本開示の製剤（UBI ADワクチン）では観察されない。

【0100】

開示する方法のある面において、驚くべきことに、A ペプチド免疫原構築物は、認知症に罹患した温血動物、特にヒトの筋肉内に有利に適用できることが見出された。

【0101】

第2の面において、本発明は、A ペプチド免疫原構築物を筋肉内に投与するための剤形を提供する。A ペプチド免疫原構築物の筋肉内用の好ましい剤形は、アジュバントとしての鉱物塩の存在中でCpG ODNと複合化したペプチド免疫原構築物を30μg～1000μg/0.5mL/用量、好ましくは100μg～400μg/0.5mL/用量、より好ましくは300μg/0.5mL/用量で含有するワクチン製剤である。剤形は使用直前まで2～8で保管できる。剤形は、好ましくは、温血動物、特にその腕に注射器を用いる筋肉内注射によって投与される。剤形を温めるために、剤形は、周囲温度に、約15分～45分間、例えば30分間、維持することができる。好ましくは、薬剤物質を吸い上げる前に、潜在的な半可視化粒子の分散のためにバイアルを穏やかに数回反転する。

【0102】

第3の面において、本発明は、1投与当たり30μg～1000μg/0.5mL、好ましくは1投与当たり100μg～400μg/0.5mL、より好ましくは1投与当たり約300μg/0.5mLで、それを必要とするヒト患者に、初回免疫後0週、4週及び8週の初回抗原刺激後、12週毎に約1回、好ましくは26週毎に約1回、特に52週に約1回、投与することを有する、ヒト患者における認知症の予防及び処置方法に関する。注射の頻度は、患者の応答に応じて変更できる。例えば、注射が抗体価に従って投与されなければならない場合、投与頻度は変更できる。

【0103】

上記疾患の処置におけるA ペプチド免疫原構築物の有用性は、適切な臨床研究、例えば、実施例に記載されたもののよう、0週、4週及び12週の全部で3回、各回1投与当たり300μg/0.5mLのワクチン製剤を投与し、続いて9カ月にわたって追跡する研究において確認することができる。抗体力価に従って、3カ月、6カ月又は12カ月毎に1回、フォローアップ免疫が可能である。

【0104】

適切な臨床研究は、アルツハイマー病の危険性があるか又はアルツハイマー病の症状を有する患者に対する、オープンラベル試験または、特に、無作為化、二重盲検、プラセボコントロールの並行試験である。

【0105】

特定の態様は、AN-1792ワクチン（凝集化A₁₋₄₂、エラン/ワイス）を接種した患者における同種Thエピトープの類似体で観察された毒性作用を持たない、ヘルパーT（Th）エピトープ（配列番号46及び47）と合成的に結合した、A₁₋₄₂ペプチドのN末端（A₁₋₁₄、配列番号4）をそれぞれ有する2つのA ペプチド免

10

20

30

40

50

疫原構築物（配列番号 64 及び 65）の混合物を含有するワクチン製剤（UBI AD ワクチン）を含む。インビトロ研究、及び小動物、ヒヒ及びマカク（macaque）におけるインビボ研究から、予想される N 末端部位特異的な抗体が産生し、これらの抗体が、A の毒性作用を中和し、プラークの除去を促進する機能的免疫原性を持つことがわかる。抗体は CNS から、末梢循環へ A₁₋₄₀ を導くように見える。結果から、ワクチンが抗 A₁₋₄₂ 細胞内応答を惹起しないことがわかる。UBI AD ワクチンは、カニクイザルにおける反復投与での急性毒性試験及び慢性毒性試験で良好な忍容性を示した。実施例 8 及び 9 に具体化した UBI AD ワクチン製剤の安全性及び免疫原性は、軽度～中程度 AD の患者に対する第 I 相試験において更に試験され、19 人の患者全てにおいて A₁₋₁₄ ペプチドの N 末端に特異的な抗体を誘発することが見いだされ、これにより、重篤な又は許容できない任意の有害事象を引き起こすことなく、0、4 及び 12 週に筋肉内に免疫化した後、前例のない 100% の応答率を達成した。軽度 AD の高齢の被験者群（n = 6、年齢が 60 歳、MMSE のベースラインが 20）は、UBI AD ワクチン製剤に対する高い抗体反応、並びに、6 カ月の中心的試験中及び 6 カ月のフォローアップ期間の観察後にベースラインスコアと比較して、(i) ADAS-Cog（アルツハイマー病評価尺度 - 認知（AD Assessment Scale-Cognitive））；(ii) ADCS-CGIC（アルツハイマー病共同研究 - 変化に対する医師の包括的印象（Alzheimer's Disease Cooperative Study-Clinical Global Impressions of Change））；及び (iii) MMSE（ミニメンタルステート検査（Mini-Mental State Exam））スコアによって評価される認知及び機能転帰の改善を示した。ADAS-Cog は、臨床試験で使用される最も一般的な認知力検査の手法である。ADAS-Cog は、記憶、言語、習慣、注意及び他の認知能力の障害を測定する 11 タスク（70 ポイント）からなり、これはしばしば AD のコア症状を示す（スコアの上昇は増悪を示す）。ADCS-CGIC は、ベースラインからの変化の単一の国際的な評価である（スコアの低下は増悪を示す）。MMSE は認知機能をスクリーニングするために最も一般的に使用される手法であり、見当識、記銘、短期記憶、言語機能の尺度を提供する（スコアの低下は増悪を示す）。第 I Ia 相試験において、バイオマーカー（分子診断法、脳画像診断、遺伝子タイピング）を使用して、脳内の毒性 A オリゴマーの濃度をおそらくは低下させる、循環中の抗 A₁₋₁₄ 抗体を能動免疫を通じて上昇させることによる疾患の進行の軽減の評価を含む、軽度 AD の患者に対するワクチン製剤の有効性を評価する。

【0106】

(g) 具体的な態様

本発明の具体的な態様として、次のものを含むが、これらに限定されない。

(1) 下記式を有する A ペプチド免疫原構築物：

(A₁₋₄₂ ペプチドの N 末端フラグメント) - (A) o - (Th) - X

式中、(A₁₋₄₂ ペプチドの N 末端フラグメント) は、配列番号 4、5 及び 6 からなる群から選ばれる約 10 ～ 約 14 個のアミノ酸残基を有する A 由来の B 細胞エピトープであり；

各 A は、独立に、アミノ酸、Lys -、Gly -、Lys - Lys - Lys -、(, -N) Lys、及び -N - Lys - Lys - Lys - Lys (配列番号 32) からなる群から選ばれるアミノ酸又は結合基であり；

各 Th は、配列番号 34、37、38、40 ～ 47 及びその機能的免疫学的類似体からなる群から選ばれるヘルパー T 細胞エピトープを構成するアミノ酸配列を有し；

X は、アミノ酸の -COOH 又は -CONH₂ であり；且つ

o は 0 ～ 約 4 である。

(2) (A₁₋₄₂ ペプチドの N 末端フラグメント) が A₁₋₁₄ (配列番号 4) である、(1) の A ペプチド免疫原構築物。

(3) A が -N - Lys - Lys - Lys - Lys (配列番号 32) である、(1) の A ペプチド免疫原構築物。

(4) Th エピトープが配列番号 45 又は 46 である、(1) の A ペプチド免疫原構築

10

20

30

40

50

築物。

(5) 配列番号48～65のアミノ酸配列を有する、(1)のA ペプチド免疫原構築物。

(6) 配列番号62～65のアミノ酸配列から本質的になる、(1)のA ペプチド免疫原構築物。

(7) 配列番号62、63、64、及び/又は65である、(1)のA ペプチド免疫原構築物。

(8) 請求項1のA ペプチド免疫原構築物を有する組成物。

(9) a. (1)のA ペプチド免疫原構築物；及び

b. 医薬上許容可能なデリバリビヒクル及び/又はアジュバント；
を有する医薬組成物。

10

(10) a. (1)のA ペプチド免疫原構築物；及び

b. 医薬上許容可能なデリバリビヒクル及び/又はアジュバント；
を有するアルツハイマー病ワクチン組成物。

(11) a. (7)のA ペプチド免疫原構築物；及び

b. 医薬上許容可能なデリバリビヒクル及び/又はアジュバント；
を有するアルツハイマー病ワクチン組成物。

(12) (b)のアジュバントが、アルハイドロゲル(Alhydrogel)($Al(OH)_3$)又はアジュホス(Adjuphos)($AlPO_4$)からなる群から選ばれるアルミニウムの鉱物塩である、(10)のアルツハイマー病ワクチン組成物。

20

(13) (a)のペプチド免疫原が、CpGオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)と混合して安定化免疫刺激複合体を形成する、(10)のアルツハイマー病ワクチン組成物。

(14) (1)のA ペプチド免疫原構築物の(A_{1-42} ペプチドのN末端フラグメント)成分と結合する、単離抗体又はそのエピトープ結合フラグメント。

(15) A_{1-10} (配列番号6)と特異的に結合する、(14)の単離抗体又はそのエピトープ結合フラグメント。

(16) 請求項1のA ペプチド免疫原構築物と結合した、(14)の単離抗体又はそのエピトープ結合フラグメント。

(17) 配列番号6と結合した、(15)の単離抗体又はそのエピトープ結合フラグメント。

30

(18) (14)の単離抗体又はそのエピトープ結合フラグメントを有する組成物。

(19) (10)のワクチン製剤を投与することを有する、ヒト患者の認知症の重篤度を軽減する方法又はヒト患者の認知症の発病を遅らせる方法。

(20) ADの危険性があるか又はADである患者に、前記ワクチン製剤を1投与当たり $10\mu g \sim 1000\mu g$ を有する水溶液を投与する、(19)の方法。

【0107】

(h) さらなる態様

(1) 本発明のA ペプチド免疫原構築物は、下記式によって表される：

(A_{1-42} ペプチドのN末端フラグメント) - (A)o - (Th) - X

40

式中、(A_{1-42} ペプチドのN末端フラグメント)は、配列番号4～6からなる群から選ばれる約10～約14アミノ酸残基を有するB細胞エピトープであり；

各Aは、独立に、アミノ酸、Lys-、Gly-、Lys-Lys-Lys-、(, -N)Lys、及び -N-Lys-Lys-Lys-Lys(配列番号32)からなる群から選ばれるアミノ酸又は結合基であり；

各Thは、配列番号34、37、38、40～47及びその機能的免疫学的類似体を有する群から選ばれるヘルパーT細胞エピトープを構成するアミノ酸配列を有し；

Xは、アミノ酸の -COOH又は -CONH₂であり；且つ

oは0～約4である。

(2) アルツハイマー病(AD)ワクチン組成物であって、

50

- a. (1) の A ペプチド免疫原構築物；
- b. (a) の機能的免疫学的類似体；
- c. (a) 又は (b) のいかなる組合せ；及び
- d. 許容可能なデリバリビヒクル又はアジュバント；

を有する上記組成物。

(3) (d) のアジュバントが、アルハイドロゲル ($Al(OH)_3$) 又はアジュホス ($AlPO_4$) であるアルミニウムの鉱物塩である、(2) の AD ワクチン。

(4) (a) のペプチド抗原が、CpG オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) と混合して安定化免疫刺激複合体を形成する、(2) の AD ワクチン。

【0108】

10

(5) アルツハイマー病 (AD) ワクチン組成物であって、

- a. 配列番号 49 ~ 51、54、55、及び 57 ~ 65 を有する群から選ばれる A ペプチド免疫原構築物；
- b. (a) の機能的免疫学的類似体；
- c. (a) 又は (b) のいかなる組合せ；及び
- d. 許容可能なデリバリビヒクル又はアジュバント；

を有する上記組成物。

(6) アルツハイマー病 (AD) ワクチン組成物であって、

- a. (5) の A ペプチド免疫原構築物；
- b. (a) の機能的免疫学的類似体；
- c. (a) 又は (b) のいかなる組合せ；及び
- d. 許容可能なデリバリビヒクル又はアジュバント；

を有する上記組成物。

(7) (d) のアジュバントが、アルハイドロゲル ($Al(OH)_3$) 又はアジュホス ($AlPO_4$) であるアルミニウムの鉱物塩である、(5) の AD ワクチン。

(8) (a)、(b)、又は (c) のペプチド抗原が、CpG オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) と混合して安定化免疫刺激複合体を形成する、(5) の AD ワクチン。

(9) (a)、(b)、又は (c) のペプチド抗原が、CpG オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) と混合して安定化免疫刺激複合体を形成し、(d) のアジュバントが、アルハイドロゲル ($Al(OH)_3$) 又はアジュホス ($AlPO_4$) であるアルミニウムの鉱物塩である、(5) の AD ワクチン。

30

【0109】

(10) アルツハイマー病 (AD) ワクチン組成物であって、

- a. 配列番号 62 + 63、64 + 65 を有する群から選ばれる A ペプチド免疫原構築物；
- b. (a) の機能的免疫学的類似体；
- c. (a) 又は (b) のいかなる組合せ；及び
- d. 許容可能なデリバリビヒクル又はアジュバント；

を有する上記組成物。

(11) a. 配列番号 64 及び配列番号 65 の混合物を有する A ペプチド免疫原構築物；及び

40

- b. CpG ODN とさらに混合した (a) の混合物；

を有する組成物。

(12) a. 配列番号 64 及び配列番号 65 の混合物を有する A ペプチド免疫原構築物；

- b. CpG ODN とさらに混合した (a) の混合物；及び
- c. アジュホス；

を有する医薬組成物。

【0110】

(13) a. 配列番号 64 及び配列番号 65 の混合物を有する A ペプチド免疫原構築

50

物；

b．C p G O D Nとさらに混合した（a）の混合物；及び

c．アルハイドロゲル；

を有する医薬組成物。

（14）（13）の医薬組成物をヒトに投与することを有する、ヒトの認知症の重篤度を軽減する方法又はヒトの認知症の発病を遅らせる方法。

（15）（13）の医薬組成物をヒトに300 μ g / 0.5 mL / 投与で投与することを有する、ヒトの認知症の重篤度を軽減する方法又はヒトの認知症の発病を遅らせる方法。

（16） a．（13）の医薬組成物をヒトに300 μ g / 0.5 mL / 投与で投与すること；及び

b．初期として0週、4週及び12週に投与すること；

を有する、ヒトの認知症の重篤度を軽減する方法又はヒトの認知症の発病を遅らせる方法。

（17） a．（13）の医薬組成物をヒトに300 μ g / 0.5 mL / 投与で投与すること；

b．初期として0週、4週及び12週に投与すること；及び

c．（b）の工程後、3カ月毎に1回、及び／又は6カ月毎に1回、及び／又は12カ月毎に1回、追加投与すること；

を有する、ヒトの認知症の重篤度を軽減する方法又はヒトの認知症の発病を遅らせる方法。

（18）投与が筋肉注射による（14）～（17）のいずれかの方法。

【0111】

（19）ヒトが軽度AD、MCIであるか、又はADの徴候又は症状を示さないが、年齢が60を越えている（14）～（18）のいずれかの方法。

（20）ヒトへの投与が以下である（19）の方法：

a．ヒトが軽度ADである場合、投与がADの処置のためである；

b．ヒトがMCIである場合、投与が認知症の重篤度の予防及び／又は軽減のためであるか及び／又は認知症の発病の遅延のためである；

c．ヒトがADの徴候又は症状を示さないが、年齢が60を越えている場合、投与が認知症の重篤度の予防及び／又は軽減のためであるか及び／又は認知症の発病の遅延のためである。

（21）（a）のペプチド抗原が、オリゴデオキシヌクレオチドC p Gと混合して安定化免疫刺激複合体を形成する（2）～（10）のいずれかのADワクチン。

（22）（a）のA ペプチド免疫原構築物が配列番号17～20のアミノ酸配列を有する上記のADワクチン。

（23）（a）のA ペプチド免疫原構築物が配列番号19及び20のアミノ酸配列を有する上記のADワクチン。

（24）（a）のペプチド抗原の全量が投与当たり約10 μ g～約1mgである上記のADワクチン。

（25）デリバリビヒクル又はアジュバントが、モンタニドISA50V、モノオレイン酸ポリオキシエチレン（20）ソルピタン、エマルシゲン、エマルシゲンD、及びC p Gオリゴヌクレオチドからなる群から選ばれる上記のADワクチン。

【0112】

（26）上記のいずれかのワクチン製剤を投与することを有する、ヒト患者の認知症の重篤度を軽減する方法又はヒト患者の認知症の発病を遅らせる方法。

（27）認知症が、アルツハイマー型の認知症又はアミロイド血管障害を伴う血管認知症である上記のいずれかの方法。

（28）認知症が、パーキンソン病又はレビー小体型認知症を伴う認知症である上記のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

(29) 前記ワクチン製剤を、投与当たり $10 \mu\text{g} \sim 1000 \mu\text{g}$ を有する水溶液で、ADの危険性があるか又はADである患者に投与する上記のいずれかの方法。また、許容可能なのは、投与当たり $100 \sim 750 \mu\text{g}$ 又は投与当たり $300 \mu\text{g}$ である。 $300 \mu\text{g}$ は、臨床試験で効能よく用いられるターゲットの投与量とすることができる。

(30) 投与は、3カ月毎に1回及び/又は6カ月毎に1回及び/又は12カ月毎に1回とすることができる。

(31) 投与は、抗体力価に基づいてワクチン投与の頻回を決定することができる。

【0113】

(32) 患者はアルツハイマー病が進行する危険性があり、さらに、患者は、軽度認知障害がある患者、アルツハイマー病に関連する公知の遺伝子型を有する患者、21トリソミーを有する患者、及びアルツハイマー病の危険性を示す代替マーカーを有する患者からなる群から選ばれる上記のいずれかの方法。

10

(33) アルツハイマー病に関連する公知の遺伝子型を有する患者がApoE4遺伝子型を有する患者を有する上記のいずれかの方法。

(34) (a)のAペプチド免疫原構築物及びその組合せを有するワクチン製剤を、0週、4週及び12週に3回投与による初回刺激のために、投与当たり $300 \mu\text{g} / 0.5 \text{ mL}$ で投与する上記のいずれかの方法。

(35) ワクチン製剤を、3カ月毎に約1回、その後6カ月毎に1回、及びその後12カ月毎に1回、投与する上記のいずれかの方法。

(36) 以前にワクチン製剤の接種を受けた患者の血液由来のB細胞を、ADの予防及び処置のためにAペプチドのN末端をターゲットとするヒトモノクローナル抗体の調製及び選択に用いる上記のいずれかの方法。

20

(37) 初期注射から0週、4週及び12週で初期免疫化を提供し、ついで3カ月に1回、6カ月に1回、最も好ましくは12カ月に1回、追加免疫化を行うことを有する対象者における免疫応答を誘発させる方法。

(38) 投与は、投与当たり $10 \mu\text{g} \sim 1000 \mu\text{g}$ 、好ましくは $100 \mu\text{g} \sim 750 \mu\text{g}$ 、より好ましくは投与当たり $300 \mu\text{g}$ で行うのがよい。

(39) 上記の投与の経路は、当業界で公知の標準の経路、例えば筋肉内経路、皮下経路、経口などによるのがよい。

【0114】

30

Aペプチド免疫原構築物ワクチン製剤として有用である医薬組成物は、Aペプチド免疫原構築物及び許容可能なデリバリビヒクル又はアジュバントを含み、該Aペプチド免疫原構築物は、

a) 配列番号49～51、54、55、及び57～65；

b) (a)のホモログ；

c) (a)又は(b)の抗原性及び免疫学的機能的類似体；

d) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換、アミノ酸付加、及び/又はアミノ酸欠失を有する(a)、(b)又は(c)；

e) (a)～(d)のいかなる組合せ；

からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する。

40

【0115】

ある特異な製剤において、Aペプチド免疫原構築物は、配列番号62及び63並びにそれらの混合物からなる群から選ばれる。

他の特異な製剤において、Aペプチド免疫原構築物は、配列番号64及び65並びにそれらの混合物からなる群から選ばれる。

他の製剤は、特異な製剤の等モル比混合物をさらに含み、該Aペプチド免疫原構築物が配列番号62及び63からなる群から選ばれる。他の製剤は、特異な製剤の等モル比混合物をさらに含み、該Aペプチド免疫原構築物が配列番号64及び65からなる群から選ばれる。

ある特異な製剤において、配列番号62及び63(又は64及び65)の等モル比混合

50

物の量は、投与当たり約 1 μ g ~ 約 1 0 0 0 μ g である。

ある特異な製剤において、配列番号 6 2 及び 6 3 (又は 6 4 及び 6 5) の等モル比混合物の量は、投与当たり約 1 0 0 μ g ~ 約 7 5 0 μ g である。

ある特異な製剤において、配列番号 6 2 及び 6 3 (又は 6 4 及び 6 5) の等モル比混合物の量は、投与当たり約 3 0 0 μ g である。

【0116】

本発明のペプチド組成物の効能は、動物、例えばモルモット、ヒヒ、カニクイザル、又はヒトに、本発明のペプチドを有する免疫原性組成物で注射することによって確立することができる。表 4、5、6、7 及び 8、並びに配列番号 4 8 ~ 6 5 を参照のこと。液性免疫応答は、約 1 0 ~ 約 1 4 のアミノ酸残基である A₁₋₄₂ ペプチドの N 末端フラグメントに向けられている。用いた手順の詳細な記述は、実施例で提供する。

10

以下の実施例は、本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲を限定するために用いられるべきでない。

【0117】

実施例 1

アミロイドベータ (A β) 関連ペプチドの合成

効能ある標的の A β ワクチンの設計及び製剤を目的とする開発の試みに含まれるデザイナー A β 関連ペプチド構築物を合成する方法を記載する。ペプチドは、研究室のパイロット試験及び現場での試験に有用である少量で合成できるだけでなく、ワクチン製剤及び血清学的アッセイの工業的商業生産のために有用である大量 (キログラム) でも合成できる。

20

【0118】

長さが約 1 0 ~ 4 0 個のアミノ酸の配列を持つ、豊富な A β 関連抗原性ペプチドのレパートリーを、効能ある A β ワクチン中で使用する最適のペプチド構築物をスクリーニング及び選択するために、設計した。各種の血清学的アッセイにおけるエピトープマッピングに使用される代表的な A₁₋₄₀、A₁₋₄₂ ペプチド、N 末端 A β ペプチドフラグメント A₁₋₂₈、A₁₋₁₄、A₁₋₁₀、A₁₅₋₄₂、及び 1 0 アミノ酸長のペプチドを表 1 (配列番号 1 ~ 3 2) で特定する。A β ペプチドフラグメント (A₁₋₁₀ ~ A₁₋₁₄) を含有する各構築物は、病原タンパク質 (麻疹ウイルス融合タンパク質 (MVF) 及び B 型肝炎表面抗原タンパク質 (HBsAg) を含む) に由来する慎重に設計されたヘルパー T 細胞 (Th) エピトープに合成的に結合し、表 2 (配列番号 3 3 ~ 4 7) に、そのそれぞれの A β ペプチド免疫原構築物の免疫原性を増強するための、単一配列 (配列番号 3 3 ~ 4 1、4 6、4 7) 又はコンビナトリアルライブラリー (配列番号 4 2 ~ 4 5) のいずれかを特定する。1 0 0 を超えるペプチド構築物から選ばれた 1 8 個の代表的な A β ペプチド免疫原構築物を表 3 (配列番号 4 8 ~ 6 5) で特定する。

30

【0119】

抗 A β 抗体の検出及び / 又は測定のための免疫原性試験又は関連する血清学的試験で使用する全てのペプチドは、ペプチド合成機 (アブライド・バイオシステムズ、4 3 0 A、4 3 1 及び / 又は 4 3 3 モデル) による Fmoc 化学を使用して少量で合成した。N 末端の Fmoc 保護及び三官能アミノ酸の側鎖保護基を有する固相担体上で、独立して合成することによって、各ペプチドを製造した。完成したペプチドを固相担体から切断し、側鎖保護基を 9 0 % トリフルオロ酢酸 (TFA) によって除去した。合成ペプチド調製物を、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 質量分析計によって評価し、正確なアミノ酸含量を決定した。各合成ペプチドを逆相 HPLC (RP-HPLC) によっても評価し、合成プロファイル及び調製物の濃度を確認した。

40

【0120】

合成プロセスの微細な制御 (カップリング効率の逐次モニタリングを含む) にもかかわらず、アミノ酸の挿入、欠失、置換、及び早期終了を含む、伸長サイクル中の意図しない現象が原因でペプチド類似体も生成した。したがって、合成された調製物は、典型的には、標的ペプチドと共に多数のペプチド類似体を含んでいた。このような意図しないペプチ

50

ド類似体を含んでいたにもかかわらず、得られた合成されたペプチド調製物は、免疫診断（抗体捕捉抗原として）及びワクチン投与（ペプチド免疫原として）を含む、免疫学的応用における使用に適していた。典型的には、意図的に設計したか、又は合成プロセスを通じて副生物の混合物として生じたかの、いずれかによるこのようなペプチド類似体は、これらのペプチドを使用する最終製品の再現性及び有効性を保証するような、製造方法及び製品の評価方法の両方を監視するための識別力のあるQC手法が開発される限り、所望のペプチドの精製調製物と同様にしばしば有効である。数百グラムからキログラム量での大量のペプチド合成は、15ミリモル～50ミリモルスケールで、特別注文の自動ペプチド合成機UBI2003で行った。

【0121】

10

臨床試験用の最終ワクチン製剤で使用される有効成分として、A ペプチド構築物を、浅い濃度勾配下の分取RP-HPLCによって精製し、MALDI-TOF質量分析計、アミノ酸分析及びRP-HPLCによって、純度及び同一性を特徴付けた。

【0122】

実施例2

血清学的アッセイ及び試薬

合成ペプチド構築物及びその製剤の機能的免疫原性を評価するための血清学的アッセイ及び試薬を以下に詳述する。

【0123】

a. 抗体の特異性分析のための、A₁₋₄₂、A₁₋₄₀、A₁₋₂₈又はA₁₋₁₄ペプチドに基づくELISA試験

20

以下の実施例に記載の免疫血清試料を評価するためのELISAアッセイを開発した。次に説明する。

【0124】

96ウェルプレートのウェルを、2 µg/mL（特に断りのない限り）標的ペプチド（A₁₋₄₂、A₁₋₄₀、A₁₋₂₈又はA₁₋₁₄（配列番号1～4））の10 mM NaHCO₃緩衝剤溶液（pH 9.5（特に断りのない限り））100 µLで、1時間、37 °Cでそれぞれコートした。

【0125】

ペプチドでコートしたウェルを3重量%ゼラチンのPBS溶液250 µLと共に培養して、37 °Cで1時間、非特異的タンパク質の結合部位をブロックし、0.05体積%ツウィーン（登録商標）20を含有するPBSで3回洗浄し、乾燥した。分析する血清を、20体積%正常ヤギ血清、1重量%ゼラチン及び0.05体積%ツウィーン（登録商標）20を含有するPBSで1:20（特に断りのない限り）に希釈した。希釈試料（例えば、血清、血漿）100マイクロリットル（100 µL）を各ウェルに添加し、37 °Cで60分間反応させた。

30

【0126】

次いで、未結合の抗体を除去するために、ウェルを0.05体積%ツウィーン（登録商標）20のPBS溶液で6回洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）複合化種（例えば、マウス、モルモット又はヒト）特異的ヤギ抗IgGを、陽性ウェル中で形成した抗体/ペプチド抗原複合体と結合する標識化トレーサーとして使用した。ペルオキシダーゼ標識化ヤギ抗IgG 100 µLを、予備滴定での最適希釈で、PBS中0.05体積%ツウィーン（登録商標）20を有する1体積%正常ヤギ血清中、各ウェルに添加し、37 °Cで更に30分間培養した。ウェルを0.05体積%ツウィーン（登録商標）20のPBS溶液で6回洗浄して未結合抗体を除去し、0.04重量% 3',3',5',5'-テトラメチルベンジジン（TMB）及び0.12体積%過酸化水素のクエン酸ナトリウム緩衝剤溶液を含む基質混合物100 µLと更に15分間反応させた。この基質混合物は着色生成物を形成することによってペルオキシダーゼ標識を検出するのに用いた。1.0 M H₂SO₄ 100 µLを添加して反応を停止し、450 nm（A₄₅₀）での吸光度を測定した。ヒヒ及びマカクのIg/IgG検出のため、霊長類のIgGに対して高

40

50

い交差反応性を有するHRP複合化ヤギ抗ヒトTgG試薬をトレーサーとして使用した。試験中の患者からの臨床試料について、検証済のELISAテストキットで最適に力価測定された、HRP複合化タンパク質A/G試薬を、血清の力価を決定するために使用した。各種Aペプチドワクチン製剤を接種したワクチン接種動物の抗体価を決定するために、10倍段階希釈の1:100~1:10,000の血清を試験し、 \log_{10} で表される試験血清の力価を、カットオフ A_{450} を0.5に設定した A_{450} の線形回帰分析によって計算した。

【0127】

b. 担体タンパク質上のヘルパーT細胞エピトープ、特異的な担体タンパク質によるThペプチド又はThコンピナトリアルペプチドライブラリー、ELISA試験に基づくThペプチド又はThコンピナトリアルライブラリーに対する抗体反応性の評価

10

上述と同様のELISA及び上述と同様にして、96ウェルELISAプレートのウェルを、 $2\mu\text{g/mL}$ (特に断りのない限り) K_{LH} (キーホールリンペットヘモシアニン) のような担体タンパク質、Thペプチド又はThコンピナトリアルペプチドライブラリー (配列番号44~47) の 10mM NaHCO₃ 緩衝剤溶液 (pH9.5 (特に断りのない限り)) $100\mu\text{L}$ で、1時間、37℃でそれぞれコートした。各種Aペプチドワクチン製剤を接種したワクチン接種動物の抗体価を決定するために、10倍段階希釈の1:100~1:10,000の血清を試験し、 \log_{10} で表される試験血清の力価を、カットオフ A_{450} を0.5に設定した A_{450} の線形回帰分析によって計算した。

【0128】

20

c. B細胞エピトープクラスターの10アミノ酸長ペプチドに基づくELISA試験による、A₁₋₁₀及びhAPP (ヒトアミロイド前駆体タンパク質) に対する、微細な特異性分析及びエピトープマッピングの評価

免疫化した宿主又はワクチンにおける抗A₁₋₁₀抗体の微細な特異性分析をエピトープマッピングによって測定した。簡潔には、96ウェルプレートのウェルを、 $0.5\mu\text{g}/0.1\text{mL}$ /ウェルのhAPP10アミノ酸長ペプチド (配列番号6、8~30) でそれぞれコートし、次いで、血清試料 (PBS中1:100希釈) $100\mu\text{L}$ を、上述の抗体ELISA法の重複する次の工程で、10アミノ酸長のプレートウェル中で培養した。ワクチンのB細胞エピトープ、並びに免疫化した宿主におけるヒビ、マカク及びヒト抗A₁₋₁₀抗体に関連する微細な特異性分析も、A₁₋₁₀ペプチド (DAEFRHDSGY、配列番号6)、N末端での置換を有するA₁₋₁₀ 改変合成ペプチド又は非関連コントロールペプチドで予備吸収し、次いで、更なる特異性確認のために抗A₁₋₂₈ ELISA試験によって試験した。

30

【0129】

d. 免疫原性の評価

ヒト被験者又は動物由来の免疫前血清試料及び免疫化血清試料を、実験ワクチン投与プロトコルに従って採取し、56℃で30分間加熱して血清の補体因子を不活性化した。ワクチン製剤の投与に続き、プロトコルに従って血液サンプルを入手し、特異的な標的部位に対するそれらの免疫原性を評価した。連続希釈した血清を試験し、陽性の力価を相互希釈の \log_{10} として表した。特定のワクチン製剤の免疫原性を、所望のB細胞応答を増強するのに用いられる「ヘルパーT細胞エピトープ」に対する抗体の反応性を無視できるほど低く維持しながら、標的抗原内の所望のエピトープ特異性に対する高力価のB細胞抗体反応の誘発能によって評価する。

40

【0130】

e. 血液及び脳脊髄液 (CSF) 中のA₁₋₄₀ 関連ペプチド抗原を検出するための固相の酵素結合イムノアッセイ

高感度A₁₋₄₀ イムノアッセイ (インビトロジェン (Invitrogen) (商標)、バイオソース (BioSource) (商標) Cytokines & Signaling、カマリロ、CA、米国) を使用して、キットの指示書に従って、カニクイザルの血清、血漿及びCSF中のA₁₋₄₀ 濃度を測定した。A₁₋₄₂ レベルは正常なカニクイザルでは検出限界以下であった。

50

h A P P 7 5 1 遺伝子導入マウスの脳組織の血漿、C S F 及び化学抽出物中の A₁₋₄₀ 及び A₁₋₄₂ レベルを、A₁₋₄₀ 及び A₁₋₄₂ イムノアッセイ (Genentics Company Inc.、チューリッヒ・シュリーレン、スイス) の指示書に従って測定した。軽度～中程度アルツハイマー病の人の血漿中の A₁₋₄₀ レベルの定量化を、キット指示書 (ヒトアミロイド (1-40) アッセイキット、IBL、27714) に従って測定した。ヒト血漿中の A₁₋₄₂ レベルは検出限界以下であった。

【0131】

実施例 3

免疫組織化学的分析

正常成人ヒト組織 (PhenoPath Laboratories Inc. 社、シアトル、WA、米国) 及びアルツハイマー病症例の脳標本 (Dr. Felicia Gaskin、バージニア大学、バージニア、シャーロットビル、VA、米国) を、死後及び/又は外科病理標本から入手した。カニクイザル組織標本 (Beijing Jo-Inn New Drug Research Center、北京、中国) 及び h A P P 遺伝子導入マウスの脳標本 (JSW-Rearch GmbH、グラーツ、オーストリア) を剖検にて入手した。組織は、液体窒素中でスナップ凍結、冷 OCT 包埋化合物中に浸漬及び凍結切片的いずれかであるか、或いはホルマリン固定、パラフィン包埋及び標準的な手法によって調製した切片であった。

【0132】

凍結保存組織切片の間接的免疫蛍光分析を、モルモット、h A P P 遺伝子導入マウス、ヒヒ及びマカクの、免疫前及び過免疫の血清又は精製 IgG を用いて、又は市販のマウスモノクローナル抗体と蛍光色素との複合化二次抗体を用いて、行った。アビジン-ビオチンが増強された市販キットを使用する間接的免疫ペルオキシダーゼ染色を、精製モルモット抗 A₁₋₄₀ IgG を使用する正常成体組織の凍結保存組織切片に、又は、CD3、CD4、CD8 (Tリンパ球分画)、CD11b (マイクログリア細胞活性化マーカー)、GFAP (アストロサイト) 及び特異的 A₁₋₄₂ エピトープを検出する市販のモノクローナル抗体を使用するコントロール及び UBI AD ワクチン (UB-311) で処置したマカクの脳切片に、行った。標準的な病理学検査室の手順に従って免疫組織化学的分析を行った。

【0133】

実施例 4

リンパ球増殖及びサイトカイン産生に対する T 細胞機能アッセイ

T 細胞の活性化を評価するためのリンパ球増殖及びサイトカイン産生を含む T 細胞機能アッセイの手順を以下に詳述する。

【0134】

a. 末梢血単核球 (P B M C) の単離、凍結及び解凍

ヘパリン処置血液を採取し、P B M C をフィコール - ハイパーク (Ficoll-Hypaque) 密度勾配遠心分離によって単離した。リン酸緩衝食塩水 (P B S) で 2 回洗浄後、10% ウシ胎児血清 (F C S) を補充した R P M I 1 6 4 0 からなる細胞培地で P B M C を再懸濁した。いくつかの実験では、単離 P B M C を凍結し、液体 N₂ 中で保管し、続くインビトロでの培養のために解凍した。

【0135】

b. T 細胞及び末梢血単核球 (P B M C) の増殖アッセイ

ワクチン接種した動物の P B M C を、選択したワクチン免疫組成物 10.0 µg の存在下、24 ウェル培養プレート (Nunc) のそれぞれのウェルに 2.5 × 10⁶ cells/mL で培養した。抗原を刺激しない P B M C のみを含有するネガティブコントロールの培養物も培養した。全ての培養物を 5.0% CO₂ インキュベータ中 37 °C で 3 日間保った。培養開始から 3 日後、上清を採取し、上記の定量アッセイを使用してそれぞれのサイトカインを測定した。

【0136】

ヒヒ及びカニクイザル由来の末梢血単核球 (P B M C) をフィコール - ハイパーク勾配遠心分離によって単離した。ペプチド誘発増殖及びサイトカイン産生のために、細胞 (2

10

20

30

40

50

$\times 10^5$ cells / ウェル) を、そのみで又はそれぞれのペプチドドメイン (A_{1-42} 、 A_{1-14} 、 A_{15-42} 、Th ペプチド、及びネガティブコントロールとして非関連ペプチドを含む) を添加して、培養した。マイトジェン (Mitogen) (PHA 、 PWM 、 $Con A$) をポジティブコントロールとして使用した。6 日目に、 3H -チミジン (3H -TdR) $1 \mu Ci$ を、3 つの各複製細胞培養ウェルに添加した。18 時間培養後、細胞を採取し、 3H -TdR 取り込みを測定した。刺激指数 (S.I.) は、抗原存在下の 1 分当たりのカウント (cpm) を抗原不存在下の cpm で割ったものを表し; S.I. が > 3.0 は有意であると考えられる。

【0137】

c. UBI AD ワクチンでの免疫前後の PBMC 培養物によって産生するサイトカインの評価

10

カニクイザルの PBMC 培養物のサイトカイン分析 ($IL-2$ 、 $IL-6$ 、 $IL-10$ 、 $IL-13$ 、 TNF 、 IFN) を、培地のみ、又は各種 A ペプチドドメイン又はマイトジェン存在下のアリコートで行った。サル特異的サイトカインサンドイッチ ELISA 試験キット (U-CyTech Biosciences 社、ユトレヒト、オランダ) を使用して、キットの指示書に従ってそれぞれのサイトカイン濃度を測定した。

【0138】

実施例 5

安全性、免疫原性、毒性及び有効性研究で使用した動物

モルモット: 免疫原性試験は、成熟した無感作の、成体の雄性及び雌性ダンカン - ハートレー系モルモット ($300 \sim 350 g / BW$) で実施した。実験は 1 群当たり少なくとも 3 頭のモルモットを用いた。ダンカン - ハートレー系モルモット (8 ~ 12 週齢; Covance Research Laboratories、デンバー、PA、米国) が関わるプロトコルを、IACUC 申請の承認の下、契約した動物施設だけでなく、スポンサーの UBI においても行った。

20

【0139】

アヌビスヒヒ: 成体の雄性ヒヒ (*Papio anubis*、8 ~ 10 歳齢; オクラホマ大学ヘルス・サイエンス・センター、オクラホマシティ、OK、米国) における免疫原性試験を、IACUC 申請の承認の下、契約した動物施設だけでなく、スポンサーの UBI においても実施した。

【0140】

30

カニクイザル: 成体の雄性及び雌性サル (*Macaca fascicularis*、約 4 歳齢; Beijing Jo-Inn New Drug Research Center、北京、中国) における免疫原性及び反復投与毒性の研究を、IACUC 申請の承認の下、契約した動物施設だけでなく、スポンサーの UBI においても実施した。

【0141】

hAPP751 遺伝子導入マウス: 若齢の hAPP751 遺伝子導入 ($t g +$) マウス及びその同腹仔 (14 ± 2 週齢) における免疫原性及び有効性研究を、アルツハイマー病の予防モデルで使用し、老齢の $t g +$ マウス及びその同腹仔 (52 ± 2 週齢) を治療モデルで使用した。両研究は、IACUC 申請の承認の下、契約した動物施設 (JSW - リサーチ社、グラーツ、オーストリア) だけでなく、スポンサーの UBI においても実施した。

40

【0142】

hAPP751 $t g +$ マウスは、マウスの $Thy-1$ プロモーターの調節管理の下、ロンドン ($V717I$) 及びスウェーデン $K670M / N671L$) の二重変異を含むヒトアミロイド前駆体タンパク質 (hAPP) を構造的に過剰発現する (Rockenstein E ら、1995 及び 2001)。 A_{1-42} 沈着は、前頭皮質中に成熟したプラークの出現を伴って、早ければ 3 ~ 4 月齢で生じ、5 ~ 7 月齢になると、プラーク形成は hAPP751 $t g +$ マウスの海馬、視床及び嗅部に広がる。16 週にわたる筋肉へのワクチン投与の効果は、血清の ELISA アッセイによる抗体反応、脳のアミロイド沈着及び脳のプラーク負荷、並びに、免疫染色及び生化学的抽出により、脳内の細胞反応性 (例えば、T 細胞の浸潤、ミクログリア細胞の活性化) のレベル上昇の証拠を観察した。

50

【 0 1 4 3 】

免疫前に、この実施例で上記した方法に従って、それぞれの動物の血清及び／又は血漿試料について、A 標的ペプチドの存在を試験した。各動物は、種及びプロトコルに応じて、ワクチン製剤の1投与当たりのA 標的ペプチド構築物で免疫化した。

【 0 1 4 4 】

実施例 6

モルモット及びヒヒに対するA ペプチド構築物の免疫原性の初回順位のための一般的なワクチン製剤

各実験で用いる医薬組成物及びワクチン製剤を下記の実施例においてより詳述する。簡潔には、各研究群で特定した製剤は、通常、異なる型のスペーサー（例えば、K又はペプチド構築物の溶解度を向上するKKKを有するK）、並びにデザイナーペプチド構築物のN末端で結合したA ペプチドフラグメントを有する麻疹ウイルス融合タンパク質及びB型肝炎表面抗原に由来する人工ヘルパーTエピトープの2つのセットを含有する非特異的（promiscuous）ヘルパーT細胞エピトープの変異体を介して結合するA ペプチドのフラグメントを有する、全ての型のデザイナーA ペプチド構築物を含有する。100を超えるデザイナーA ペプチド構築物は、全長A₁₋₄₂に対するそれらの相対的な免疫原性を最初にモルモットで評価し、更にAD患者の脳切片からの天然ブラークとのそれらの交差反応性を評価した。A ペプチド構築物を、特定のペプチド構築物の様々な量で、鉍物塩又はアルハイドロゲル（Alhydrogel）（アラム）と混合した、ヒトワクチン用に承認された油としてセピック・モンタニド（Seppic Montanide）（商標）ISA51を有する油中水型乳剤に調製した。ワクチンは、通常、A ペプチド構築物を水に約20～800 µg/mLで溶解することによって調製し、モンタニド（商標）ISA51で油中水型乳剤（体積で1：1）に、又は鉍物塩若しくはアルハイドロゲル（Alhydrogel）（アラム）（体積で1：1）と共に製剤化した。ワクチン製剤を室温で約30分間保ち、免疫前に約10～15秒間ボルテックスによって混合した。

【 0 1 4 5 】

数体の動物は、特定のワクチン製剤で2～3回の投与で免疫化し、筋肉内経路で、時間0（抗原刺激）及び3週後に初回免疫（wpi）（追加免疫）を、2回目の追加免疫として任意に5又は6wpiに投与した。これらの免疫化した動物を、次いで、ワクチン製剤中に存在する各種合成A ペプチド免疫原の免疫原性、並びにA₁₋₂₈及び全長A₁₋₄₂とのそれらの交差反応性を評価するために試験した。免疫プロトコルによって指示されるような特定の期間にわたる投与計画で、モルモットの一次スクリーニングにおいて強力な免疫原性を有するA ペプチド免疫原を、次いで油中水型乳剤、鉍物塩及びアラム系製剤の両方をヒヒにおいて更に試験し、この種はヒトと類似の免疫応答プロファイルを持つように校正した。

【 0 1 4 6 】

新薬臨床試験開始届の提出及びアルツハイマー病患者に対する臨床試験のための準備として、GLPに沿った前臨床研究における免疫原性、持続性、毒性及び有効性研究用の最終ワクチン製剤に組み込まれる前に、最も有望なA ペプチド免疫原候補のみを更に広く評価した。

【 0 1 4 7 】

実施例 7

アルツハイマー型認知症の予防及び処置のための、A₁₋₁₄ペプチド免疫原構築物を組み込む多成分ワクチン製剤の設計原理、スクリーニング、同定及び最適化

設計の歴史：各ワクチン又は免疫療法製品は、特定の疾患の機構及び治療介入に必要な標的タンパク質に基づく独自設計の焦点とアプローチが必要である。後に設計がモデル化された標的は、疾患経路に関与する細胞タンパク質又は病原体の幾つかのタンパク質が関与してよい感染因子を含むことができる。研究から商業化へのプロセスは、達成までに典型的には10年以上を必要とする非常に長いプロセスである。

【 0 1 4 8 】

標的分子が選ばれると、血清学的検証の広範なプロセスが必要になる。標的分子内のB細胞及びT細胞エピトープの同定及び分布は分子ワクチン設計に重要である。標的B細胞が認識されると、小動物における継続的なパイロット免疫原性試験が行われ、デザイナーペプチドのワクチン製剤によって誘発される抗体の機能的特性を評価する。次いで、ワクチン免疫原性及び誘発した抗体の機能的特性をさらに検証するために、標的の種の動物でこのような血清学的適用を行う。評価用に免疫化した宿主から採取した血清を用いる複数の並行群で全ての研究を実施する。ヒトワクチンの場合での標的の種又は非ヒト霊長類に対する初期の免疫原性試験も実施して、免疫原性及び設計の方向性をさらに検証する。次いで、混合物を変えて標的ペプチドを調製し、それぞれの製剤設計で調製した組み合わせで使用する場合の、ペプチド構築物の中でのそれぞれの相互作用に関する機能的特性におけるわずかな相違を評価する。更なる評価の後、最終的なペプチド構築物、ペプチド組成物及びその製剤を、製剤のそれぞれの物理的パラメータと共に確立し、最終製品開発プロセスに至る。

【0149】

幅広い設計経験は、図1に示す加速されたペースでの商業化に向けて、発見から次世代のワクチン製品の開発を可能にする。

【0150】

a. アルツハイマー病患者を処置する可能性を有するワクチン製剤のための適切な A₁₋₁₄ 由来ペプチド構築物の設計及び検証

本発明者によって開示された以前の発明 (Wang CY、米国特許第 6,906,169 号 (米国、ユナイテッド・バイオメディカル社、2005); Wang CY、米国特許第 7,951,909 号 (米国、ユナイテッド・バイオメディカル社、2001); Wang CY、米国特許第 8,232,373 号 (米国、ユナイテッド・バイオメディカル社、2012) に続くものとして、髄膜脳炎のような重篤な副作用を引き起こす、アルツハイマー病患者にしばしば存在するヘルパーTエピトープ類似体を発現する配列のC末端ドメインが欠損した A₁₋₁₄ ペプチド上に沈着した A₁₋₁₄ 分子からのB細胞エピトープの更なる改良物を、ワクチン製剤に組み込まれる設計中の標的B細胞エピトープとして選択した。

【0151】

ワクチン製剤に組み込まれる最も潜在能力のあるペプチド構築物を得るために、麻疹ウイルス融合 (MV F) タンパク質配列又はB型肝炎表面抗原 (HBsAg) タンパク質から更に設計された、各種の病原体又は人工ヘルパーTエピトープに由来する、豊富な非特異的 (promiscuous) ヘルパーTエピトープのレパートリーを、モルモットに対する免疫原性試験にて作製した。表3 (配列番号48、51~65) に示すように、16個の A₁₋₁₄ 由来ペプチド構築物の代表的な研究で、A₁₋₁₄ ペプチドは、スパーサーとしての K を介して、それぞれの非特異的 (promiscuous) ヘルパーTエピトープと結合した。ペプチド免疫原構築物をモンタニド (商標) ISA51 油中水型乳剤で製剤化し、0 w p i に抗原刺激、及び 3 w p i に追加免疫のために、標準化 ISA51 乳剤で 100 µg / 0.5 mL に調製したそれぞれのワクチン製剤を投与することによって、それらの免疫原性それぞれをモルモットで試験した。予備的な免疫原性分析で、A₁₋₁₄ 配列の 15~28 番目のアミノ酸のペプチド配列の欠失が、A₁₋₁₄ 配列自身を非免疫原性にする (表4、群1~3)、A₁₋₄₂ のC末端におけるヘルパーT細胞エピトープの構造の特徴の存在を確認した。A₁₋₁₄ ペプチドの免疫原性の免疫原性を還元及び増強するのに用いられるヘルパーTエピトープの昇順での予備的な順位を、最も弱いペプチド構築物が最初に記載される表4に示す: MV F (配列番号51、58、59) 及び HBsAg (配列番号60) に由来する人工ヘルパーTエピトープの間で順位付けすると、 Manson 住血吸虫 Th (配列番号56) < 破傷風菌 1 Th (配列番号48) < 百日咳菌 Th (配列番号52) < 破傷風菌 2 Th (配列番号53) < ジフテリア Th (配列番号54) < コレラ毒素 Th (配列番号57) を有する熱帯熱マラリア原虫 Th (配列番号55)。A₁₋₁₄ 由来ペプチド構築物 (配列番号51) は、潜在能力あるペプチド免疫原構築物として (配列番号61) に示す分枝状の4量体構造として設計することもできる。要約すると

10

20

30

40

50

、上記免疫原性試験は、A D 患者の老人斑の主要な生化学的成分である、全長 A₁₋₄₂ ペプチドの N 末端に対して抗体を誘発するための最終的なワクチン製剤の設計において使用される免疫原としての、特異的な A₁₋₁₄ 由来構築物（配列番号 51、57～61）の適合性を検証した。

【0152】

b. 異なる非特異的 (promiscuous) ヘルパー T エピトープを有する A₁₋₁₄ 由来構築物を用いることによる MHC の広範囲化

多様な遺伝的背景の患者を処置するワクチンを設計する場合、多様な遺伝的背景を有する人口の範囲を最大にする設計とすることが重要である。したがって、そのような組合せのために A₁₋₁₄ 由来ペプチド免疫原構築物の相乗的な免疫原性効果を探索した。M V F 及び H B s A g に由来する非特異的 (promiscuous) ヘルパー T エピトープは、このような免疫原性の増強を提供するための最も潜在能力あるものの代表であるので、これら 2 つのヘルパー T エピトープを含むペプチド構築物の組み合わせをこのような探索のために設計した。M V F 及び H B s A g（配列番号 44 及び 45）両方のためのヘルパー T エピトープのコンビナトリアルライブラリーの形態を、表 2 に示すように、最大の MHC 結合モチーフ範囲を考慮して、A₁₋₁₄ 由来構築物（配列番号 62 及び 63）に対して設計し、それらは、個々に又は組み合わせて、続いて、1 投与当たり 100 µg / 0.5 mL で抗原刺激 (O w p i) 及び 2 回の追加免疫 (3 及び 5 w p i) の予定で、モルモットに対する免疫原性を評価した。表 5 に示すように、2 つの免疫原の等重量比混合物は、個々のペプチド構築物それぞれによって誘発されるものと比較して、かなりの免疫応答を誘発した。

【0153】

c. B 細胞エピトープのみを標的することに集中し且つ明らかな免疫応答をもたらす、複数の MHC 結合モチーフを有する慎重に選ばれたヘルパー T エピトープと結合する標的的 B エピトープを組み込む簡便な免疫原の設計

B エピトープ免疫原性を増強するために使用されるそれぞれのヘルパー T エピトープを試験するために、初回免疫後 8 週 (w p i) の過免疫の血清を免疫化した宿主から採取した。同様に免疫化した宿主の過免疫の血清は、A₁₋₁₄ ペプチドの N 末端にシステイン残基を付加する化学的カップリングによって調製された K L H 結合 A₁₋₁₄ ペプチドの同様の抗原刺激及び追加免疫の免疫の予定によって得られた。表 6 から明らかなように、単独又は組み合わせのいずれかのデザイナー A₁₋₁₄ ペプチド免疫原構築物（配列番号 62 及び 63）で免疫化した全ての宿主は、標的的 A₁₋₄₂ の交差反応性に対する抗 A₁₋₁₄ 抗体の交差反応性に所望の高い力価をもたらした一方、2 つのヘルパー T エピトープ（配列番号 44 及び 45）に対しては、反応性はわずかであるか又は全く生じなかった。対照的に、A₁₋₁₄ エピトープ (L o g₁₀ 力価が 2.2 ~ 3.9) に対する慣用の担体タンパク質 K L H によって生じる相対的な免疫原性にもかかわらず、担体タンパク質 K L H に対する非常に高い抗体反応が、非常に高い力価 (G e o M e a n の L o g₁₀ 力価が 6.2) を有する全ての動物によって生じ、「標的 B 細胞エピトープ」に対して特異な「集中した」応答が、B 細胞及び T 細胞エピトープの構造及び機能の理解に基づいて、これらの合理的に設計されたペプチド免疫原構築物での免疫化の結果であるという以前の知見が再度検証された。

【0154】

d. I S A 51 油中水型乳剤中及びアラム中に A₁₋₁₄ 構築物（配列番号 62 及び 63）を様々な量で含むワクチン製剤の抗原刺激 (O w p i) 及び追加免疫 (3 及び 6 w p i) 後のヒヒにおける免疫原性の評価

これらの A₁₋₁₄ ペプチド免疫原構築物によって誘発される抗体の機能的特性を調査する、さらなる開発事業に移行する前に、ヒトの試験で最も頻繁に使用される 2 つの異なる製剤にこれらのペプチド構築物（配列番号 62 及び 63、等モル比）を様々な量で組み込んだワクチン製剤の相対的な免疫原性の評価をヒヒにおいて評価した。ヒヒは、尺度がヒトのものと最も似ている免疫応答を生じる動物種である。全てのワクチン製剤を、1

10

20

30

40

50

投与当たり 0.5 mL で動物に投与した。将来の使用のための本来の標的用量は 100 µg/mL であるので、この用量で 3 頭の動物に投与した。より弱い最も頻繁に使用されるアジュバントであるアラムに対する、より潜在能力のある ISA51 油中水型製剤の相対的な免疫原性の評価を、同じ 100 µg で行った。試験した油中水型乳剤系において、1 投与当たり、25 µg、100 µg 及び 400 µg で用量漸増試験を評価した。この試験の最初の観察では、1 投与当たり 0.5 mL 中 100 µg を与える同じペプチド免疫原含量を有する ISA 油中水型乳剤の製剤と比較して、アラム系製剤では低下した免疫応答 (1 Log_{10} 以上の抗体価) が生じた。1 投与当たり 100 µg が免疫化した宿主に対する将来のワクチン製剤投与のための本来の標的用量であったが、表 7 に示すように、25 µg から、100 µg、400 µg それぞれに投与量を増加すると、免疫応答の上昇が観察された。したがって、デザイナー A₁₋₁₄ ペプチド免疫原構築物 (配列番号 62 及び 63) 又はそれらの類似体のペプチド免疫原構築物は、100 µg を超える用量が更に検討されるだろう。

【0155】

実施例 8

アルツハイマー型認知症処置用の成功裡の免疫治療ワクチンの開発の基準

免疫治療ワクチンを開発するための UBI の戦略は、「自己」バリア、及び遺伝的多様性の制限、並びに安全な (Safe)、独特の (Unique)、特徴的な (Characterizable)、費用対効果の高い (Cost-effective)、有効で (Efficacious)、安定 (Stable) 且つスケラブルな (Scalable) (造語としての SUCCESS)、最適なペプチド系ワクチン製剤の開発を克服するための基盤技術に基づく標的の B 配列と結合する独占的所有権を有する非特異的 (promiscuous) Th エピトープの設計を含む (Wang CY ら、2005 ; Sokol K K, 2004)。特別な注意を初期設計段階に払うことで、このワクチンとしての規制当局の承認の観点から特徴付けられるワクチン製剤のためのプログラムの開発段階に入るであろうペプチド免疫原を選ぶことを可能にし、第 I I I 相試験後に患者への効能が証明されたとき、これまでの人類の歴史において、数百万の用量基準で、患者に投与される最初の完全な合成ペプチド系ワクチンになるだろう。かなりの所望の免疫応答が生じることが既に証明された多くの中から選ばれたペプチドの品質設計への特別な注意が、細部にわたるとき、使用されるそれぞれのペプチドの「溶解性」、合成化学収率、及び配列設計に固有の精製ハードルに対してはらわれる。高い安全因子を有する十分に許容されるアジュバントもまた、多くの許容される選択の中で、考慮する重要な因子になるだろう。免疫原性の安全因子とスケール間のバランスを考慮しなければならない。また、免疫原性が安全因子によって妥協される場合、免疫応答をさらに高めるために、他のワクチン製剤のいかなる特徴をも組み込むことができる。再び、ワクチンの成功は、多様な遺伝的背景を有する、可能な限り多くの幅広い人口において、所望の免疫応答を生じるその能力に帰し、主要組織適合抗原複合体 (MHC) の幅広い範囲はまた、考慮における非常に重要な因子でなければならない。

【0156】

A 分子の N 末端を標的とする SUCCESS ワクチンを達成するための上記の考慮を踏まえると、コンビナトリアルライブラリーの形式におけるそれらのカウンターパートと比較して、コンビナトリアル形状の代わりに単一配列のペプチドが、それらの相対的に弱い免疫原性にもかかわらず選ばれるだろう。ヘルパー T エピトープが増強する高度に強力な免疫原性は、通常、疎水性のアミノ酸残基の長い区間を有し、これは対応するペプチドを不溶性にする傾向があるので、ペプチドの溶解性もまた試験における重要な因子である。Asp、Glu、Lys 及び Arg のように高荷電の残基がペプチドの溶解性を高めるために特定の位置に付加されるか否かについて、特別な注意を払わなければならない。合成における高収率を達成するために、中間体の生成を伴う全ての合成プロセスに関する化学が広範囲に全て評価され、ワクチン製剤の重要な成分として想定されるであろう最終ペプチドの最適配列に到達した。免疫原性の面からの全ての高度に制限されたペプチド候補のバランスのよい考慮の後、MV F 系列のペプチド (配列番号 64)、及び HBsAg 系

列のペプチド（配列番号 65）を有する、2つの A₁₋₁₄ ペプチド免疫原構築物（配列番号 64 及び 65）を選択し、ワクチン製剤の更なる探索のために更に分析した。

【0157】

これらのペプチドを合成し、図 2A、2B、2E に示すように高純度に精製した。浅い濃度勾配の逆相分析下、配列番号 65 及び 64 の両方のペプチドの HPLC プロファイルは、それぞれ 20 分及び 21 分の溶出時間を示した。これらの精製ペプチドの MALDI-TOF 分析は、図 2C 及び 2D に示すように、両方とも高精度で、配列番号 65 のペプチドが 3892.274（理論値は 3892.52）、配列番号 64 のペプチドが 4374.568（理論値は 4374.04）の分子量を与えた。

【0158】

双方共に A₁₋₁₄ の免疫原性を増強するのに用いられる配列番号 46 及び 47 の「Th」ペプチドは、図 3A 及び 3B に示すように、各種の集合においてそれらの結合モチーフを広く評価した。すべての患者の遺伝的背景の範囲を最大にするために、ワクチン設計に 2 つの非特異的ヘルパー T エピトープを組み込むことが安全である。範囲の割合の分析から、このワクチンは、ワクチンを接種する患者全てではないが多くの人口、大規模な試験を正当化する重要因子及びワクチンの高い臨床的価値を拡大する開発努力をカバーする非常に合理的な機会を有するだろう。

【0159】

投与の目標の一部として予防も含む多くの人口によって使用されるワクチン設計のために、安全性は考慮される別の重要因子になる。臨床試験における多くのワクチン製剤のためのヒトへの油中水型乳剤の使用にもかかわらず、アラムは、その数十年にわたる安全性試験によって、依然としてワクチン製剤での使用のための主要なアジュバントである。アラム又はその鉍物塩であるアジュホス（リン酸アルミニウム）を臨床適用のための調製物中でアジュバントとして使用することを検討した。

【0160】

a. 一定量の鉍物塩と共に高精製 A₁₋₁₄ ペプチド免疫原構築物（配列番号 64 及び 65）を様々な量で含むワクチン製剤の抗原刺激（0 w p i）及び追加免疫（3 及び 6 w p i）後のモルモットにおける免疫原性の評価

前臨床及び臨床試験用の UBI AD ワクチンの開発のための多くの免疫原候補の中から 2 つの高精製 A₁₋₁₄ ペプチド免疫原構築物（配列番号 64 及び 65）を選択した後、これら 2 つのペプチドの等モル比混合物を、図 4 に示すように、モルモットに対する投薬研究において、一定量（0.5 mL）のアラム / 鉍物塩の存在下でそれらの免疫原性を試験した。上記の 2 つの A₁₋₁₄ ペプチド免疫原構築物（配列番号 64 及び 65）を含むペプチド混合物の様々な量として、0.5 mL の鉍物塩（リン酸アルミニウム、アジュホス（Adjuphos））中、0 µg、10 µg、30 µg、100 µg ~ 300 µg を、26 週間にわたる免疫原性の観察を伴う 0、3 及び 5 w p i（初回免疫後の週）の免疫の予定に基づき、モルモットで試験した。初回免疫後 5 週あたりの免疫応答のピークで、1 投与当たり 300 µg を接種した動物は最も高い免疫応答を与え、100 µg 及び 30 µg を接種したものと続き、次いで 10 µg 用量であり、続く 26 週間を通じて同様の免疫応答の順位であった。したがって、0.5 mL アジュホス当たり 300 µg での最高用量は免疫の最適条件であると考えられ、異なる種での他の関連する製剤において、免疫原性を研究するための手引きとして使用されるだろう。

【0161】

b. ペプチド及びオリゴヌクレオチド間の免疫刺激複合体（ISC）の形成によってワクチン製剤の免疫原性を更に上昇させる手段

アジュバントとしてアラム又はその関連する鉍物塩の使用に内在する、関連するワクチン製剤の免疫原性は、それらの標的の A₁₋₁₄ B 細胞エピトープの力価も約 1 Log₁₀ まで低下するだろう（実施例 7 における類似の研究から推測される）。したがって、ワクチン製剤の免疫原性を更に上昇させる手段を検討する。

【0162】

10

20

30

40

50

より具体的には、図 5 A に示す U B I 製剤において、安定化免疫刺激複合体 (I S C) はカチオン性ペプチド及びポリアニオン性 C p G オリゴデオキシヌクレオチド (O D N) 分子に由来する (上段) (Sokol I K K , 2004) 。これは、電荷の静電中和によって駆動する自己組織化システムである。アニオン性オリゴマーに対するカチオン性ペプチドのモル電荷比の化学量論が会合の程度を決める。ペプチド免疫原及び C p G O D N の非共有結合的な静電会合は、完全に再現性のあるプロセスである。免疫系の「プロフェッショナル」抗原提示細胞 (A P C) への提示を促進するペプチド / C p G O D N 免疫刺激複合体の凝集体は、これにより複合体の免疫原性を更に増強する。これらの複合体は、製造中の品質管理のために容易に特徴付けられる。ペプチド / C p G I S C はインビボで十分に許容される。

10

【 0 1 6 3 】

次いで、図 5 B の下段に示すように、免疫刺激複合体は、水性懸濁液を形成する鉱物 / アルミニウム塩アジュバントと組み合わせることができる。

【 0 1 6 4 】

C p G モチーフは、樹状細胞 (p D C) 及び B 細胞のサブセットで見いだされるツール様受容体 9 (T L R 9) のアゴニストとして特徴付けられている。ツール様受容体は、細菌、ウイルス及び寄生虫のような一般的な外来性の侵入者の個々の分子パターンの特徴を認識する能力を持つ。具体的にはメチル化されていない、合成 C p G 配列は、T L R 9 に結合し、活性化することができる。潜在能力のある B 細胞のマイトジェンとして、T L R 9 アゴニストは、強い抗体免疫応答を誘導するのに有効である。C p G の作用のメカニズムは、それらの中で、持続性の抗原特異的抗体の産生に關与する。

20

【 0 1 6 5 】

標的の A₁₋₄₂ 凝集性ワクチンに対して患者の抗体が 30 % しか誘発しない免疫原性、及び 6 % の患者に生じた髄膜脳炎様の副作用の両方で失敗した A N 1 7 9 2 (A₁₋₄₂ ペプチドワクチン) の臨床試験の観点から、U B I A D ワクチンのために本発明で使用するアルミニウム系アジュバントは、T h - 2 型の免疫応答 (即ち、I L - 4 及び I L - 5 サイトカイン) を刺激することが知られている。また、A ペプチド免疫原構築物 / C p G O D N 免疫刺激複合体は粒子状である。粒子状の免疫原のプロセッシングは、T h - 2 型の応答の傾向がある A P C によって促進される。

【 0 1 6 6 】

要約すると、C p G オリゴヌクレオチドは、幾つかのヒト臨床試験 (> 1 , 0 0 0 の患者) において安全に (Safely) 使用されている。ペプチド / C p G O D N 由来免疫刺激複合体は容易に特徴付けられる (Characterized) 。生理的条件下にて安定で (Stable) 、インビボで十分に許容される。多数のペプチド免疫原に由来する C p G 系複合体の単独又は鉱物塩との組み合わせは、最小限の有害事象の報告を伴って、マウス、モルモット、ブタ、イヌ、ウシ、ヒヒ及びマカクでの効能 (Efficacious) が証明されている。アルミニウム系鉱物塩は、米国において現在承認されているワクチンに含有される唯一のアジュバントである。これらのアジュバントを使用するワクチン組成物は費用対効果が高く (Cost-effective) 、スケール (Scale) 効率も知られている。特定のワクチン / アジュバント製剤は、対アジュバント単独として承認される。U B I は独特の (Unique) 組成物を探索し、開発してきた。認知症の処置のための U B I A D ワクチンの上記した特徴は S U C C E S S に向けての必要な全ての要素を持つ。

30

40

【 0 1 6 7 】

実施例 9

筋肉内注射用の U B I A D ワクチン製剤

A₁₋₁₄-K-KKK-MvF5 T h ペプチド免疫原構築物 (配列番号 6 4) 及び A₁₋₁₄-K-HBsAg3 T h ペプチド免疫原構築物 (配列番号 6 5) は、生理学的な pH においてカチオン性である。図 2 A 、 2 B 、 2 C (左側) は、2 つのペプチド単独及び等モル比混合物の H P L C プロファイルを示す。図 2 D 及び 2 E (右側) は、それぞれ分子量 (D a) が 3 8 9 2 及び 4 3 7 4 の 2 つのペプチドの M A L D I - T

50

OF 質量分析によって特徴付けられるプロファイルを示す。ポリアニオン性 CpG ODN の添加は、電荷の中和、溶液中での免疫刺激複合体 (ISC) の即時の「自己集合」を生じさせる。カチオン性ペプチド：アニオン性 CpG のモル電荷比の化学量論が会合の程度を決める。UBI AD ワクチンを段階的に調製した：おおよそ等しい CpG ODN に対するモル電荷比を有する、2つのA ペプチド免疫原構築物の等モル混合物を用いて注射用水でISCを調製した。

【0168】

a. アジュバントとしてアラム又はアジュホスの不存在下又は存在下でCpGオリゴマーと免疫刺激複合体を形成する300 µg / 0.5 mLの高精製A₁₋₁₄ペプチド免疫原構築物 (配列番号64及び65) を含むワクチン製剤の抗原刺激 (0 wpi) 及び追加免疫 (3及び6 wpi) 後のヒヒにおける、10週にわたる免疫原性の評価

高精製A₁₋₁₄ペプチド免疫原構築物 (配列番号64及び65) を用いるモルモットの免疫原性の初期レベル及び投薬研究に基づき、2つのA₁₋₁₄ペプチド免疫原構築物 (配列番号64及び65) を等モル比で含む混合物300 µgを、上述のように、CpGオリゴマーを有する免疫刺激複合体として調製した。次いで、10週にわたって特異的抗体レベルを観察する0、3、6週の免疫プロトコルに基づいて、筋肉注射用の1投与当たり300 µgのペプチドをヒヒに免疫化するために、それらをアラム若しくはアジュホスのいずれかを有するか、又はアジュバントなしで製剤化した。この動物種は尺度が人のものと最も似ている免疫応答を生じるので、このような免疫原性評価及びヒト試験の導入前の最終製剤の評価のためにヒヒを使用した。全てのワクチン製剤を1群当たり2頭の動物で、1投与当たり0.5 mLで動物に与えた。図6に示すように、1投与当たり0.5 mL中300 µgにおいて、アジュバントとしてアラム若しくはアジュホスが存在するか又は不存在の3つの製剤全てが、A₁₋₁₄ペプチドに対するELISAによって示すように、0.5 Log₁₀スケールの範囲内で約同等レベルの免疫原性を示した。ISC製剤はペプチド単独によって発現する免疫原性を著しく増強させた。しかしながら、8~10週にわたる観察後、アジュホスによって支持されている製剤は、他の2群と比較して、応答スケールが0.5~1 Log₁₀に拡大した、著しく高い免疫応答を維持していた (即ち、約3~10倍更に強力)。3つの密接に関連する製剤であって、アジュバントからの任意の複雑な要因がないように非常に集中し且つ所望の免疫応答を生じる高精製の合理的に設計されたペプチドを使用することによる高い安全因子であるように設計された製剤でヒヒの免疫原性をこのように慎重に較正することによって、UBI AD ワクチン製剤は、以下の実施例に示すように、免疫原性、特異性、誘発抗体に関する機能的特性、急性及び慢性毒性、並びに最終的に臨床的有効性のための、霊長類及びヒトにおける更なる探索のために最終化される。

【0169】

b. 免疫原性、急性毒性、慢性毒性、効能、及び臨床的安全性、忍容性及び効能研究用のUBI AD ワクチン製剤の調製

CpG ODNに対するペプチドのおおよそ等しいモル電荷比でCpGと更に混合した2つのA ペプチド免疫原構築物 (配列番号64及び65) の等モル比混合物を用いて、注射用水でISCを調製した。反対の電荷の静電中和を介するプロセスにおいて、UBI

AD ワクチン製剤中のCpG ODNはペプチド免疫原構築物と100%結合し、ミクロンサイズの粒子の形成をもたらした。この粒子状態により、CpG アジュバントの通常の使用からCpG ODNの投与量を著しく低減すること、有害な自然免疫応答の可能性を低減すること、且つプロフェッショナル抗原提示細胞 (APC) を含む代替の免疫原のプロセッシング経路を促進することが可能となる。予め形成したISCに、アルミニウム鉍物塩、浸透圧のための生理的食塩水、及び保存剤を連続して添加した。アルミニウム鉍物塩のうち、リン酸アルミニウムを、免疫原性の更により維持 (sustenance) に対するヒヒの免疫原性試験の結果に基づき、アラムゲルに代えて、使用した。

【0170】

c. UBI AD ワクチン製剤の安定性研究及び免疫原性試験

アジュバントとして20%の過剰でリン酸アルミニウム（アジュホス）を有する1投与当たり0.5mL中300μgで調製したUBI ADワクチン製剤を上述したように調製し、1mL無菌ガラスバイアルに充填し、2～8℃で2年間保管した。安定性試験のプロトコルに従って試料を回収した。すべての物理的パラメータは品質管理（QC）規格に適合していた。A₁₋₁₄ペプチド免疫原構築物は、CpGオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）及びアジュホスアジュバントから脱複合化して、各ペプチド用の分析規格に従ってHPLCにより分析した。図2Cの左下側に示すように、2つのA₁₋₁₄ペプチド免疫原構築物（配列番号64及び65）は、HPLC分析における予想溶出時間で、2つのペプチドそれぞれの等モル混合物であることが明らかになった。

【0171】

モルモットにおける免疫原性試験のために、UBI ADワクチン製剤を含むバイアルを回収した。各6頭ずつ有する2群について、1つは1投与当たり300μgのワクチン群に0及び3wpiで投与し、他の群はプラセボワクチン製剤（即ち、2つのペプチド免疫原構築物を含まない同じ製剤）を投与し、試験した。図7に示すように、著しい免疫原性を、3wpiでの追加免疫後、5wpiまでに応答のピークに達する単回投与で、全ての動物で達成した。8wpiで採取した免疫血清は、免疫原性の増強を提供するのに用いられるそれぞれのThペプチドとのそれらの反応性について更に試験した。表8に示すように、これら2つのThペプチドの「免疫応答しない（Immunosilent）」性質を更に確認するために、任意の反応性がThペプチドに対してわずかな場合、これにより、A₁₋₁₄ペプチドのN末端に独占的に向けられた非常に集中した免疫応答を可能にする。したがって、UBI ADワクチン製剤は、十分に特徴付けられていない生物学的材料を独占的に扱う歴史的なワクチン業界とは違って、設計したように集中した免疫応答を生じる、十分に定義された化学物質で構成され、モノクローナル抗体よりもより幅広い反応性を有し、これにより、通常のペプチド-担体複合型のワクチンよりも明らかに、有効性においてより効果的であるため、高い安全因子が得られる。

【0172】

実施例10

UBI ADワクチンの血清学的特異性及び安全性を評価するための、アルツハイマー病のヒトの脳の免疫組織化学染色

実施例7に記載の等モル比のA₁₋₁₄ペプチド免疫原構築物（配列番号62及び63）で免疫化した群3及び群4のヒトから過免疫の血清を精製IgG分画として貯蔵し、ヒトAD脳とのそれらの反応性を試験した。図8に示すように、大脳の血管及びアミロイドプラーク両方の染色は、過免疫血清からの精製IgGによって認められたが、免疫前の血清から同様のIgG分画からは認められなかった。A₁₋₁₄ペプチドでの免疫血清のプレインキュベーションは、脳の血管及びアミロイドプラーク両方との全ての免疫反応性を吸収するが、非関連ペプチドによっては吸収せず、A₁₋₁₄ペプチド免疫原構築物（配列番号62及び63）を有するワクチン製剤でのワクチン投与による免疫血清における抗A₁₋₁₄抗体の反応性の高い特異性を示す。

【0173】

免疫前及び過免疫のモルモットIgGを使用する別の免疫病理組織学研究を、特異性及び望ましくない抗体の自己反応性を監視するために、正常成人ヒト組織の凍結切片で行った。ヒト組織のパネル（N=32）を、UBI AD免疫治療ワクチンで免疫化したモルモットの精製抗A₁₋₁₄IgGでの免疫反応性についてスクリーニングし、同じ動物の免疫前の精製IgGと比較した。正常成体組織の切片で観察された免疫染色パターンをPhenoPath Laboratoriesの認定臨床病理学者によって検討した。幾つかの筋肉組織（例えば、子宮内膜）の弱い陽性免疫反応性を除き、試験した全ての成人ヒト組織は、3つの成体の脳検体の1つにおける老人斑に対する強い陽性反応性及び脊髄試料中の脳脊髄液の陽性の免疫染色以外は陰性であった。

【0174】

実施例11

成体ヒヒにおけるプロトタイプのUBI ADワクチン製剤の免疫原性試験

プロトコルのパートAにおいて、独占的所有権を有する免疫刺激複合体 (ISC) に複合化し、アルミニウム鉍物塩アジュバントで製剤化したA₁₋₁₄ ペプチド免疫原 (1投与当たり300 µgの全ペプチド) で、4頭の成体雄ヒヒを0、3及び6週に免疫化した。ISC / 鉍物塩製剤は強い抗A 抗体反応を全ての動物にもたらした (図9A)。有害な注射部位反応は認められなかった。

【0175】

プロトコルのパートBの目的は：(1) 標的の臨床用量及び4倍の高用量で反復曝露による安全性及び注射部位の反応性を監視すること、(2) 用量漸増試験における免疫原性を監視すること、及び(3) リコール抗体反応の反応速度論を評価すること、であった。次いで、これらの動物を72週間休薬した。暫定では、抗A 抗体の血清レベルは10～100倍まで減少していた。初回注射後78及び81週で (図9B)、4頭の動物に、動物番号564及び565に300 µgのペプチド用量を、又は動物番号556及び561に1200 µgの用量のいずれかのワクチンを投与した。リコール応答は4頭のヒヒ全てにおいて抗体価のピークを迅速に回復した。104週までに抗体価は減少し始め、104週での追加免疫投与によって、動物は再び力価のピークを回復した。血清の抗A 抗体反応の反応速度論を、抗A₁₋₂₈ ペプチドELISAによって、0週、2週、5週、6週、8週、10週、78週、81週、84週、88週、92週、96週、100週、104週、107週及び111週で測定した。300 µg用量を接種した動物において注射部位反応は認められなかった。しかしながら、78週のみ高用量 (1200 µg) を接種したヒヒの注射部位に、幾らかの赤み及び炎症が認められ；この一過性の反応は1週間以内に完全に回復した。他の有害な事象及び安全性の懸念は、ヒヒを評価した2年を通じて報告されなかった。

【0176】

実施例12

抗A 抗体による原線維形成の阻害及びA₁₋₄₀ が介する毒性からの保護のためのインビトロでの神経毒性アッセイ

神経毒性アッセイは、Solomon Bら (Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:4109-4112) によって以前に記載されたように、ラット褐色細胞腫株PC-12及びA₁₋₄₀ ペプチドの熟成溶液を使用した。ペプチド溶液は、コンゴレッドバインディング (Congo Red Binding) により、原線維の形成によって特徴付けられた。6日及び9日目に、A_{540nm} で吸収を示す等量の染料と溶液を結合した。この観察は、有毒なA₁₋₄₀ 凝集体の形成の証拠を提供し；9日の調製物をPC-12細胞に対する毒性について試験した。

【0177】

PC-12細胞を組織培養液中で増殖させ、アッセイ培地に懸濁し、96ウェルの丸底組織培養プレートのウェルに、100 µL中5×10³ cells / ウェルで入れた。37℃で培養したペプチド (即ち、凝集したA₁₋₄₀) 及び新たに調製したペプチド (即ち、非凝集) の毒性を、25及び6.5 µMで繰り返し試験した。アッセイ培地のみのPC-12細胞をコントロールとした。プレートを、37℃で48時間、CO₂ インキュベータで培養した。細胞に対する毒性を、プロメガサイトトックス (Promega CytoTox) 96 (登録商標) 細胞毒性アッセイによって測定した。溶解をA_{492nm} での吸収によって測定し、結果を100%溶解に対する細胞毒性の百分率として表した。

【0178】

機能的免疫原性のためのUBI ADワクチンのインビトロでの評価

ラット褐色細胞腫株PC-12及び毒性を特徴付けるA₁₋₄₀ ペプチドの熟成溶液を使用する神経毒性アッセイを用いて、UBI ADワクチンの抗体反応の機能的効能を評価した。A₁₋₄₀ ペプチドの熟成溶液を、動物の免疫プロトコルからのモルモット又はヒヒの抗A 血清の存在中で1時間のプレインキュベーションに続いて、PC-12細胞に対する毒性について、試験した。抗A 血清を1:30及び1:90希釈で試験した。最終的な結果を、A₁₋₄₀ 原線維凝集の抑制割合及びA₁₋₄₀ 原線維が媒介

する細胞毒性からのPC-12細胞の保護割合として表した。両方の免疫実験の0週の予備免疫血清をコントロールとして含めた。5及び8週の免疫性のモルモット血清及びヒヒ血清の1:30及び1:90の両方の希釈液は、相当する希釈液の予備免疫血清の5~10%のバックグラウンド阻害と比較して、著しい阻害を提供し(それぞれ、5及び8週の両方で採血されたモルモット血清の1:30及び1:90の両方の希釈液で、50~70%);且つ原線維の阻害アッセイにおける免疫前のヒヒ血清の15%のバックグラウンド阻害と比較して、著しい阻害を提供した(それぞれ、5及び8週の両方で採血されたヒヒ血清の1:30及び1:90の希釈液で、75及び50%)。同様に、モルモット及びヒヒの両方の予備免疫血清から得られたバックグラウンドの結果と比較して、60~80%の範囲内でA₁₋₄₀が媒介する毒性からのPC-12細胞の保護がこれらの条件で認められた。これらの結果から、UBITh(登録商標)アミロイドペプチド免疫原での免疫化によって惹起される抗体のための有毒なA₁₋₄₀ペプチドに対する機能的中和活性が確立される。

10

【0179】

実施例13

hAPP751を過剰発現する若齢の遺伝子導入マウスの脳試料における、脳形態学上の予防モード及びアミロイドペプチド(A₁₋₄₂)濃度に対するUBITADワクチンの効果

我々は、スウェーデン及びロンドン変異を有するhAPP751を過剰発現する若齢の遺伝子導入(tg+)マウス並びにその非遺伝子導入(ntg)同腹仔(Rockenstein EMら、1995及び2001)の脳試料における、脳形態学上の予防モード及びアミロイドペプチド(A₁₋₄₂)濃度に対するUBITADワクチンの効果を評価した。

20

【0180】

若齢の遺伝子導入(tg+)マウスを~14週齢で、UBITADワクチンで、予防モードで免疫化した。アミロイドプラークを測定するために脳組織を抗A₁₋₄₂抗体で免疫組織化学的に染色した場合、これらの応答性の若齢のtg+マウスの結果は、プラーク負荷が減少することがわかった。ワクチン接種した若齢のtg+マウスの脳組織を生化学的に抽出し、定量的アッセイによってA₁₋₄₂レベルを評価した場合、若齢のtg+レスポンドマウスの結果はA₁₋₄₂沈着の減少を示した。これらのパラメータは両方とも、A₁₋₄₂負荷の減少がUBITADワクチンに対する抗体反応に相関することを示す。

30

【0181】

更に、抗CD11b抗体を使用するミクログリア細胞の活性化及び抗CD3抗体を使用するT細胞の浸潤の相対パーセントの測定は、無処置のtg+コントロール動物と比較して、ADワクチン処置の若齢のtg+動物の脳における免疫細胞活性化の増加の証拠がないことを明らかにした。

【0182】

a. 全体的な目的:

脳アミロイド沈着及び脳プラーク負荷、並びに血漿中のヒトアミロイドペプチド(A₁₋₄₂)レベルに対する、12~16週にわたるUBITAD免疫治療ワクチンの筋肉内ワクチン投与の効果の評価すること

40

【0183】

遺伝子導入動物は、マウスのThy-1プロモーターの調節管理の下、ロンドン(717)及びスウェーデン(670/671)変異を有するヒトアミロイド前駆体タンパク質(hAPP)を恒常的に過剰発現する(Rockenstein EMら、1995及び2001)。A₁₋₄₂沈着は、前頭皮質中に成熟したプラークの出現を伴って、早ければ3~4月齢で生じ、5~7月齢になると、プラーク形成はhAPP751tg+マウスにおける海馬、視床及び嗅覚の流れ(stream)の皮質突起部に広がる。

【0184】

b. 予防モードのためのプロトコルの概要

50

h A P P 7 5 1 遺伝子導入 (t g +) マウス及びそれらの非遺伝子導入 (n t g) 同腹仔 (1 4 + 2 週齢) を選び、脳 A 沈着及び脳 A プラーク負荷に対する U B I A D ワクチンの効果を評価した。全部で 3 3 頭の t g + マウス及び 1 0 頭の n t g マウスを 4 群に分けた： t g + プラセボコントロールマウス (n = 1 0) にアジュバントのみを注射した； t g + 実験マウス (n = 1 3) に U B I A D ワクチン (1 5 0 μ L 投与当たり 9 0 μ g) を注射した；無処置 t g + コントロールマウス (n = 1 0) ；及び無処置 n t g コントロールマウス (n = 1 0) 。全部で 3 用量を 0 、 3 、 1 2 週に投与し、追加用量を 1 6 週に投与した。 2 5 . 5 週にて、全てのマウスについて、モリスの水迷路試験によって空間学習を観察した。マウスを更に 4 週間追跡し、その後屠殺した。

【 0 1 8 5 】

10

c . 抗 A _{1 - 2 8} 抗体価の測定

全ての t g + 及び n t g マウスについて、0、3、6、9、12、16、19、22 及び 29 週に採血した。A _{1 - 2 8} E L I S A を使用して抗 A _{1 - 2 8} 抗体価を測定するために血清を分離した。プラセボ処置 t g + マウス及び無処置 t g + マウスでは抗 A _{1 - 2 8} 抗体価は検出不能であった。しかしながら、U B I A D ワクチン注射を少なくとも 2 回受けた若齢の t g + マウスでは検出可能な抗体価を有していた。

【 0 1 8 6 】

d . アミロイド沈着及びプラーク負荷の脳形態学及び分析

生存中の研究の最後にマウスを死なせ、マウスを生理的 (0 . 9 %) 食塩水で経心的灌流し、脳を素早く取り出し、半切除し、更なる分析用に調製した。左半球を凍結し、後で以下の項目 e で記載するようにして分析した。右半球は、新鮮な 4 % パラホルムアルデヒドの P B S 溶液、p H 7 . 4 で 1 時間、浸漬固定した。次いで凍結保護用の 1 5 % ショ糖溶液に半球を移した。翌日、脳をドライアイス上で凍結し、組織学的検査で使用するまで - 8 0 ° C で保管した。凍結切片 (1 0 n m 厚さ) を H & E で染色し、記録し、神経細胞層の完全性及び肉眼で形態を評価した。モノクローナル抗体 4 G 8 (抗 A _{1 7 - 2 4}) を用いてクライオカット (cryocut) 組織切片を評価し、皮質及び海馬における A 沈着及びプラーク負荷を測定した。プラーク数及びプラークで覆われた面積を定量化し、各動物の矢状の脳を横断する 5 つの異なる層からの 9 組織切片の平均値を、動物について統計的に関連する値で構築した。U B I A D ワクチン処置群の 7 頭の t g + マウス、及び無処置コントロール群の 7 頭の t g + マウスを評価した。結果を、U B I A D ワクチン処置 (n = 7) 対無処置 (n = 7) 動物の A _{1 - 2 8} プラーク負荷のパーセントとして表し (図 1 0 A 、 1 0 B) 、免疫組織化学的検査による 9 組織切片で検出された相対的なプラーク負荷の平均を表す。U B I A D ワクチンレスポンダー t g + マウス対無処置動物の比較は、大脳皮質 (0 . 2 2 % 対 0 . 3 2 %) 及び海馬 (0 . 2 0 % 対 0 . 2 9 %) も含み；プラーク負荷の平均の減少が、高度に応答性のワクチン処置動物で示された。

20

30

【 0 1 8 7 】

e . 脳組織の生化学的分画による A _{1 - 4 2} の測定

動物を死なせ、以下の項目で記載するようにして脳を準備した。左脳半球を別々に凍結し、その後、4 つの脳抽出物の可溶性分画について、ジェネティクス社 (スイス) によって製造されている抗原検出用の高感度 A _{1 - 4 2} E L I S A キットを使用して A _{1 - 4 2} ペプチドレベルを評価し；製造者から提供されている標準と比較して A _{1 - 4 2} レベルを測定した。4 つの脳の分画から得られた結果は「n g / g w e t 脳」として示す。各動物の左脳半球 (嗅球を含む) を特徴付けるために T R I S 緩衝食塩水 (T B S) 、トリトン X - 1 0 0 界面活性剤、S D S 界面活性剤及びギ酸 (F A) で抽出し、A _{1 - 4 2} 及び分画の評価を繰り返して試験した。簡潔には、T B S 抽出物は脳組織の水溶性 A _{1 - 4 0} 及び A _{1 - 4 2} 分画を含有する。残存する アミロイドペプチドを溶解するために、界面活性剤及び酸が必要である。トリトン X - 1 0 0 は、2 つの性質を有するオリゴ - エチレングリコール誘導体であり；ベンゼン環を有するイソオクチル残基が無極性のファンデルワールス力を破壊し、且つ - O - C H ₂ - C H ₂ - 残基の繰り返しが生水素結合を分解する。S D S は類似する二面の効果を持つが、それは強く、全体の二次構造を破

40

50

壊し；A ペプチドは直鎖状を獲得し、ペプチド鎖が伸ばされるだろう。ギ酸は最強の溶媒で、主に水素結合を破壊する。TBSがオリゴマー構造を可溶化することが推測できる。トリトンはプロトフィブリル様の低分子ポリマーを可溶化する。SDSは残存する構造の全体を破壊し、強く複合化した不溶性の原線維を有する残存部分は、FA中で主にモノマーとして分離できる。したがって、ベータアミロイドの重合状態及び抗アミロイド生成性の試験化合物の効果を評価するために、4分画全てを調査する。

【0188】

ワクチン処置 (UBI AD ワクチン) レスポンダー t g + マウスが抗 A 抗体反応するか否かの A 定量的 ELISA 及び生化学的抽出試験は、無処置 t g + マウスと比較して、減少した A 負荷と関連する。特に注目すべきは、脳組織の4つの生化学的抽出物それぞれの A₁₋₄₂ レベルを無処置 t g + コントロール動物 (図 11A、11B) の結果と比較して、UBI AD ワクチンレスポンダー t g + マウスにおける A₁₋₄₂ の全体的なレベルの減少である。

10

【0189】

f. ミクログリア細胞の活性化の測定

クライオカット組織切片について、CD11b 抗体を使用して活性化ミクログリア細胞を評価し；対象の平均サイズを、ミクログリア細胞のクラスターの平均測定値として各切片中の対象の数による面積を指数として評価し；各動物の矢状の脳を横断する5つの異なる層からの9切片の平均値を、動物について統計的に関連する値で構築した。

20

【0190】

ワクチン処置 t g + マウス (n = 7) 対無処置 t g + マウス (n = 7) の結果を、大脳皮質及び海馬中の染色された CD11b 陽性細胞の面積の割合として表し、無処置 t g + コントロール動物と比較して、処置動物は染色面積の低い平均割合を示した。これらの結果は、無処置の遺伝子導入マウスと比較して、ワクチン処置動物は活性化ミクログリア細胞の数の増加を示さないことを示す。

【0191】

g. 脳組織における T 細胞浸潤の測定

クライオカット組織切片を評価して、大脳皮質、海馬及び血管内の T 細胞の数を検出し、細胞の計数のみを行った。各動物の矢状の脳を横断する5つの異なる層からの9組織切片の平均値を、動物について統計的に関連する値で構築した。ワクチン処置 t g + マウス (n = 7) 対無処置 t g + コントロールマウス (n = 7) の結果を、大脳皮質及び海馬中の染色された CD3 陽性 T 細胞数として表し、血管内の染色された T 細胞数は、無処置 t g + コントロール動物と比較して、ワクチン処置動物が大脳皮質、海馬及び血管中で計数された免疫染色 T 細胞の平均数のわずかな減少を示すことを示す。

30

【0192】

h. 結論

hAPP751 遺伝子導入マウスに、16週間にわたって、UBI AD ワクチン又はプラセボワクチンを筋肉内経路により3又は4回注射した。動物はUBI AD ワクチンに対して全体的に良好な忍容性を示し、特に、これら動物に対してUBI A₁₋₁₄ ペプチド免疫原構築物が1投与当たり90 µg / 150 µL の高濃度での投与が考慮された。レスポンダーにおいて、これら動物の4脳組織抽出物においてA プラーク負荷の減少及びA₁₋₄₂ レベルの減少が見出された。A 沈着及びプラークの減少も免疫組織化学的検査により示された。ワクチン処置 t g + hAPP751 マウスの脳内のミクログリア細胞の活性化又は T 細胞の浸潤の証拠は存在しなかった。

40

【0193】

実施例 14

安全性のための UBI AD ワクチンに対する抗体反応のエピトープマッピング

固相抗原として A₁₋₁₄ (配列番号4)、A₁₋₂₈ (配列番号3)、A₁₇₋₄₂ (配列番号67)、MvF5 Th (配列番号46)、HBsAg3 Th (配列番号47) ペプチドでコートしたプレートを用いる ELISA 試験で、免疫化したモルモ

50

ット及びヒヒの血清中のUBI ADワクチンに対する抗体反応の特異性を評価した。ワクチンによって惹起された高力価の抗A抗体がA₁₋₁₄及びA₁₋₂₈抗原で検出され(表1);しかしながら、A₁₋₂₈ペプチドについて、潜在的に有害な交差反応性の原因である14アミノ酸を超える「B細胞エピートープ伝播」による追加抗体も検出されたことが懸念された。

【0194】

この懸念に立ち向かうために、過免疫のモルモットの抗血清及び過免疫のヒヒの抗血清をELISAによるA₁₋₇₋₄₂ペプチドでも試験した。ELISA力価から、試験した過免疫の試料においてエピートープ伝播が検出されなかったことがわかる。過免疫の血清は、A₁₋₂₈ペプチドへの増強された結合を示したが、A₁₋₇₋₄₂とは反応しなかった。過免疫の血清はMvF5 Th(配列番号46)又はHBsAg3 Th(配列番号47)ペプチドドメインのいずれとも反応しなかった。標的領域内の特定の残基に対する主な抗体結合部位を局在化させるための微細エピートープマッピング法において、24番目が重複する10アミノ酸長ペプチドをA₁₋₁₄ペプチド配列のN末端アスパラギン酸残基「D」及びヒトアミロイドペプチド前駆体タンパク質(hAPP)の隣接領域の周囲に合成し、A₁₋₁₄に加えて隣接するhAPP部位全体の長さをカバーした(表9)。これらのネステッド(nested)ペプチドを、ELISA試験用の固相免疫吸着剤としてマイクロタイターウェルをそれぞれコートするのに用いた。ポジティブコントロールのELISAプレートをA₁₋₂₈でコートした。それらを、0、10、84及び111週に、4頭の免疫化したヒヒの血清と結合する抗体について試験した。ヒヒ血清を連続希釈し、5µg/mLの10アミノ酸長ペプチドでコートされたプレートでアッセイした。予想通り、A₁₋₁₄(配列番号4)のN末端の10アミノ酸長を表す配列番号6のペプチド(DAEFRHDSGY)は、4頭のヒヒ全ての免疫血清と強く反応した。A₁₋₁₄の1番目の「D」は抗体特異性の主要部であった。「D」の欠失又は1番目の「E」(グルタミン酸)への改変は、10アミノ酸長ペプチドに対する結合の激しい減少をもたらし、A₁₋₁₀(配列番号6)に対するヒヒ抗体の高い特異性、及びA₁₋₄₂ペプチド又はその前駆体の他にA₁₋₁₄ペプチド免疫原構築物に対する交差反応性の抗体の認識部位が出現する可能性が低いことを示す。また、免疫血清によって認識される微細な特異性に対するエピートープマッピングを、表10に示す競合的阻害ELISAによって更に確認した。要するに、これらの抗体エピートープの知見から、UBI AD免疫治療ワクチン候補によって誘導される抗体が、14残基を超える部位でもMvF5 Th又はHBsAg3 Thドメインでもなく、A₁₋₁₄のN末端ドメインに特異的であることがわかった。

【0195】

実施例15

UBI ADワクチンで複数回免疫化したカニクイザルの血清及びCSF中の抗体反応及びA₁₋₄₀レベル

ワクチン応答の反応速度論から、低用量群2(0.25mL当たり150µg)の6頭のカニクイザルのうちの4頭が、及び高用量群3(1.25mL当たり750µg)の6頭のカニクイザル全てが、初回免疫後、A₁₋₄₂との交差反応性のA₁₋₁₄ペプチド免疫原構築物に対する抗体を産生したことがわかった。

【0196】

表11に示すように、低用量及び高用量の動物両方で、研究の間(27週を通じて)、高力価の抗体が持続した。UBI ADワクチンの高用量(750µg)又は低用量(150µg)のいずれかで3回(9wpi)及び5回(15wpi)免疫化した、1群当たり4頭のカニクイザルの血清によるエピートープマッピング(表12)による抗体反応の微細な特異性は、先のヒヒの研究(表9)の免疫血清における観察と同様に、1群当たり4頭の動物全てにおいてN末端A₁₋₁₀ペプチド(DAEFRHDSGY)(配列番号6)への強い特異性を示した。ヒヒにおいて観察された反応性パターンとは異なり、幾つかの中程度の反応性が、A₁₋₄₂ペプチドのN末端の4、5及び6番目のRHD残基

の周囲の配列番号 20 ~ 22 のペプチドについて、4 頭の動物全てで観察された。上述の 4 頭では、他の 10 アミノ酸長ペプチド以外に対する更なる反応性は、試験したカニクイザル試料のいずれにおいても示さない。

【0197】

血清及び C S F 中の A₁₋₄₀ レベルに対する U B I A D ワクチンの効果を市販のイムノアッセイキットを使用して測定した。表 13 に示すように、ワクチン投与後の A₁₋₄₀ 濃度を、0、15、21 及び 25.5 週の血清、並びに屠殺時 (15 週 + 1 日又は 27 週) の C S F で測定した。血清中の A₁₋₄₀ レベルは U B I A D ワクチンを接種したマカクにおいて上昇したが、プラセボワクチンを接種した動物は正常レベルを示した。対照的に、A₁₋₄₀ レベルはプラセボ又は U B I A D ワクチンのいずれかを接種したカニクイザルの脳脊髄液 (C S F) 中で定常状態を維持した。これらの結果は抗 A 抗体の作用機序として「末梢シンク (Peripheral Sink) 仮説」を支持し、それによって抗体は脳から末梢循環系への A ペプチドの排出を促進する。

【0198】

実施例 16

U B I A D ワクチンで複数回免疫化したカニクイザルの細胞免疫応答

末梢血単核球 (P B M C) 試料を 15、21 及び 25.5 週に採取した全血から単離し、次いで各種 A ペプチドの存在中で培養した。表 14 に示すように、A₁₋₁₄ ペプチドを培地に添加した場合、リンパ球による増殖応答は観察されなかった。しかしながら、A₁₋₄₂ 又は A₁₇₋₄₂ (配列番号 67) ペプチドを幾つかの P B M C 培養物に添加した場合、陽性の増殖応答を示した。

【0199】

15、21 及び 25.5 週に採取された P B M C 試料について、A ペプチド又は P H A マイトジェンの存在中でサイトカイン分泌も試験した。表 15 に示すように、3 つのサイトカイン (I L - 2、I L - 6、T N F -) は、全長 A₁₋₄₂ ペプチドへの応答に対して検出可能な分泌を示したが、A₁₋₁₄ ペプチドへは示さず；サイトカイン分泌の増加は、プラセボワクチン試料と比較して、U B I A D ワクチン処置試料において検出されなかった。A ペプチド存在中で試験した 3 つの他のサイトカイン (I L - 10、I L - 13、I F N -) は全ての P B M C 培養物においてアッセイの検出限界以下であった。

【0200】

外来のヘルパー T エピトープを有し、A₁₇₋₄₂ ペプチドドメイン有さない N 末端 A₁₋₁₄ ペプチド免疫原のみを持つ U B I A D ワクチンでカニクイザルを免疫化し、A₁₋₄₂ ペプチドが存在する P B M C 培養物中で示した陽性の増殖の結果は U B I A D ワクチン応答に関連しないが、むしろ天然の A に対するバックグラウンドの応答であることを示した。

【0201】

これらの結果から、A₁₋₁₄ 及び外来のヘルパー T エピトープのみを持つ U B I A D ワクチンの安全性を支持し、正常カニクイザルにおける A ペプチドへの潜在的な炎症性の抗自己細胞性免疫応答を生じないことがわかった。対照的に、A N - 1792 ワクチンの臨床試験研究における脳炎に関連する有害事象は、ワクチンの原線維 / 凝集した A₁₋₄₂ 免疫原内の T 細胞エピトープの包含に部分的に起因する。

【0202】

実施例 17

モルモット、マカク及びヒヒの異なるレベルでの U B I A D ワクチンの免疫原性の比較

A D ワクチンの主要成分としてのそれらの適合性に対する各種 A ペプチド免疫原構築物の詳細な試験の後、配列番号 64 及び 65 を有するペプチド構築物を選択し、ワクチン製剤を考案及び設計した。C p G オリゴマーと免疫刺激複合体を形成する 2 つのペプチド免疫原構築物を有し、鉍物塩のアジュホスで補充した、選択したワクチン製剤 (U B I A D ワクチン) を、実施例 8 ~ 15 に記載されたように詳細に試験し、複数の種 (モルモ

10

20

30

40

50

ット、マカク及びヒヒ)におけるその免疫原性、及び臨床試験でのその使用のための調製物における投与の管理体制を較正した。表16に、1又は2回投与後のペプチド用量対レスポンスの割合(陽性の力価を有する動物数/試験した全動物数)、及びUBI ADワクチンの投与予定の評価のための各種の体重をまとめる。分析からは、追加免疫において高い又はほぼ完全な応答率を可能にするであろう単回注射後のかなりの応答率を達成するために、関係する全ての種のデータに基づき、用量レベル当たり100 µgより高く設定することが好ましい。0.5 mL用量当たり300 µgのUBI ADワクチンをヒト被験者での研究のために選んだ。第I相臨床試験において、個人を0、4、12週に免疫化した。1回目投与後4週で、登録された19人の被験者のうち2人が陽性の抗A抗体価を示し; 8週での2回目投与後4週で、19人の被験者のうち17人が陽性であり; 16週での3回目投与後4週で、19人の被験者の全てが陽性であり、24~26週の第I相試験終了まで陽性を維持した。

10

【0203】

実施例18

UBI ADワクチン(UB-311)による治療効果を示唆する第I相臨床試験

A ペプチドは、疾患過程におけるその役割を支持する、病理学的、生化学的及び遺伝的証拠に基づくADの主要な治療標的である。UBI ADワクチン(UB-311)のような活性A免疫療法は、免疫応答を刺激し、循環から過剰のAペプチドを補足し且つ認知機能低下を予防するか又は遅らせる頑強な抗A抗体を産生することである。

20

【0204】

「軽度~中程度のアルツハイマー病の患者に対するUBI AD免疫治療ワクチン(UB-311)の安全性、忍容性及び免疫原性を評価するための第I相オープンラベル試験」という表題のUB-311の第I相臨床試験を、承認された最終的な臨床プロトコルに基づき実施した。全部で19人の軽度~中程度のAD患者を登録した。各患者は0、4及び12週に、試験薬(UB-311)の筋肉内注射を3回受けた。全試験期間は24~26週であった。

【0205】

安全性の評価に加えて、忍容性、免疫原性及び効能データをUB-311第I相臨床試験から収集し、探索目的で研究被験者の抗体結合エピトープ、Aペプチドレベル及び免疫機能の研究の分析を記載する。血清学的及び免疫原性分析用の末梢血単核球(PBMC)及び血清/血漿試料を単離するための、0、4、8、12、16及び24/26週でのUB-311免疫前後に採取した血液の結果は、(1)抗A抗体価、(2)エピトープマッピング、(3)血漿A₁₋₄₀レベル、及び(4)インビトロでのリンパ球増殖及びサイトカイン分析を含む。

30

【0206】

全部で19人の軽度~中程度のアルツハイマー病(AD)の被験者を試験に登録し、0、4及び12週に、UBI AD免疫治療ワクチン(UB-311)の筋肉内注射を3回接種した。

【0207】

臨床的に実証された軽度~中程度のADの患者に投与した場合、UB-311は十分な安全性及び忍容性プロファイルを示した。恐らく又は多分UB-311に関連することが明確な有害事象(AE)の発生率を、UB-311処置の安全性を評価するための一次評価項目として設計した。試験期間中、16の処置関連のAEのエピソードが19人の被験者のうち9人で報告された。処置関連のAEのうち、軽度の注射部位反応(5被験者)、中程度の興奮(2被験者)、及び軽度の赤血球沈降速度の増加(2被験者)であった。全ての処置関連のAEは、重篤度のグレード1(軽度)又はグレード2(中程度)として評価され、これらのエピソードについての措置は取らなかった。強直性脊椎炎及び糖尿病の病歴を有する1人の被験者について、追跡調査期間中に、帯状疱疹の重篤有害事象(SAE)が報告された。被験者は事象の発生時にすぐに入院させ、適切な処置を行った。SAE

40

50

Eは因果関係がある可能性は低いと判定され、被験者は状態の改善により2週間後病院から退院した。

【0208】

UB-311の忍容性を評価した。19人の被験者全て処置を終了し、AEの発生にもかかわらず、試験の早期中止はなかった。したがって、忍容性は100%であった。

【0209】

実施例19

全ての被験者に対するA₁₋₁₄ドメインのN末端に特異的なUB-311ワクチン誘発抗体の投与

表12に示すように、抗A₁₋₁₄抗体レベルの変化を、0、4、8、12、16及び24～26週で測定し、UB-311ワクチンの免疫原性を評価した。0週（処置前）の全ての被験者についてlog₁₀に変換した抗A₁₋₁₄抗体レベルの平均値が1.14であり、4週で1.21にわずかに上昇し、8及び12週で2.00及び1.91に顕著に上昇し、16週（3回目免疫後4週）に2.7のピークに達し、24～26週で2.28に減少した。

【0210】

抗体価をlog₁₀に変換し、0週でのそれらの値をベースラインとして使用した。比較可能な傾向が3つの特異的抗体価の全てで観察された。抗体価の変化の平均値は、抗A₁₋₄₂モノマー抗体を除いて、被験者が0週に既にUB-311の初回投与を受け、2回目投与前の時点である4週でわずかに上昇した。抗体価は、被験者が4週に2回目投与を受けた後8週でも上昇した。12週での3回目投与後、抗体価の平均変化のピークを16週に検出した。

【0211】

実施例20

軽度～中程度のアルツハイマー病に対するUB-311ワクチンの効能を評価する神経学的、認知及び機能試験

UB-311の効能を、19人の患者におけるADAS-Cogスコア、MMSEスコア及びADCS-CGICの変化の測定することによって評価した。ADAS-Cogスコア及びADCS-CGICを0週（V2）、16週（V7）及び24～26週に評価した。MMSEスコアを事前検査（V1）、16週及び24～26週に測定した。被験者のうち、1.42及び0.79のADAS-Cogスコアの上昇が、0週から16週、及び16週から24～26週でそれぞれ観察された。ベースラインでの平均ADAS-Cogスコアは被験者で26.26であり、16週に27.68に上昇し、24～26週に28.47にわずかに上昇した。更に、MMSEスコアの0.32及び0.79の減少が、事前検査来診から16週、及び16週から24～26週で認められた（図13）。

【0212】

事前検査来診での被験者の平均MMSEスコアは19.16であった。16週で18.84に、24～26週の最終来診で18.05にスコアが減少した。特に、2つのスケールの平均スコアの変化にもかかわらず、それぞれの被験者のスコア分布は完全に分散しており、2つのスケールの傾向は安定的であると思われた。

【0213】

ADCS-CGOC評点として、35%超の被験者が、最後の処置（3回目投与）後4週である16週で改善を示した。これらの改善率は、24～26週での処置の長い休止後、患者群の18%以下で減少した。16週において、被験者の半分弱はADCS-CGICの変化がなく、このカテゴリーの被験者は、16週後の更に8～10週の無処置の追跡調査期間後、全被験者の50%超にまで穏やかに増加した。悪化に対して改善した被験者の割合を比較すると、16週で試験薬に有利な陽性の結果を示したが、24～26週では示さなかった（最後のワクチン投与後12週）。

【0214】

サブグループの分析において、結果から、軽度AD（年齢が>60歳、ベースラインM

10

20

30

40

50

MSE が > 20) の高齢被験者は、(1) 平均 ADAS - Cog が 3 ポイント減少 (12 カ月にわたるタレンフルビル第 I 相試験のプラセボ群における 3.81 ポイントの上昇と比較して)、(2) 安定な平均の MMSE スコア (12 カ月にわたるタレンフルビル第 I 相試験のプラセボ群における 2.04 ポイントの減少と比較して)、並びに、図 14 に示すように、(3) 改善の高い割合、及び ADCS - CGI C の比率の変化なし、であることがわかり、UB - 311 ワクチンに対してより良い応答を有していた。年齢が > 60 歳の軽度 AD 患者における 3 つの認知スコアについて、3 人に対してこのような改善が報告されたことはなく、最も熱狂的に受け取られた。

【 0215 】

実施例 21

A₁₋₂₈ モノマー、A₁₋₄₂ モノマー又は A₁₋₄₂ オリゴマーに対するヒト抗体の検出用の酵素免疫アッセイ (ELISA)

アルツハイマー病の研究から、A_β 凝集体及び A_β 由来オリゴマーが AD 発病において中心的な役割を果たしていることがわかる。N - メチル - D - アスパラギン酸 (NMDA) 型グルタミン酸受容体 (NMDA - R) サブユニット NR1 及び NR2B を発現するニューロンとの A_β オリゴマーの結合は Lacor PN によって Current Genomics 2007; 8:486-508 に報告されている。海馬のニューロン細胞における NR1 及び NR2B に A_β オリゴマーが結合すると、このリガンド - 受容体結合はシナプス終末数の著しい減少をもたらし、これは記憶及び認知障害及び認知症に関連する。最近、細胞でのインビトロ研究及び臨床試験の結果から、抗 A_β オリゴマー抗体が、この結合を遮断でき、A_β オリゴマー毒性からニューロンを保護することがわかった。UBI AD ワクチン (UB - 311) は、各ペプチドが異なる Th2 - バイアス N 末端ペプチドエピトープと合成的に結合した短鎖の N 末端 A_β ペプチド (A₁₋₁₄) を含む、2 つのペプチド免疫原を含む。UBI AD ワクチン応答の免疫原性を評価するために、A₁₋₂₈ モノマー、A₁₋₄₂ モノマー及び A₁₋₄₂ オリゴマーに対する抗体をインビトロで検出するための抗 A_β 抗体酵素免疫アッセイ (ELISA) 試験を開発した。

【 0216 】

A₁₋₂₈ モノマー、A₁₋₄₂ モノマー又は A₁₋₄₂ オリゴマーを、固定化抗原としてマイクロプレートのウェル上にプレコートした。アッセイの過程で、血清試料を 1 : 10 で、1 : 100 ~ 1 : 1000 に連続希釈し、プレコートしたマイクロプレートに添加した。抗 A₁₋₂₈ モノマー、抗 A₁₋₄₂ モノマー又はオリゴマー抗体は、存在するならば、固定化抗原に結合する。ウェルを洗浄して非結合抗体及び他の血清成分を除去した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ複合化組み換えタンパク質 A / G の標準調製物を各ウェルに添加し、結合抗体と反応させた。ウェルを洗浄することによって非結合複合体を除去し、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB) 及び過酸化水素を含む基質溶液を各ウェルに添加した。試験した血清試料中に、もし存在するならば、存在する A_β 特異的抗体の量に比例して黄色が強くなった。酵素 - 基質反応を、希硫酸溶液の添加により停止した。次いで、各ウェル中で生じた色の变化を、波長 450 nm (A₄₅₀) にてマイクロプレートリーダーで吸光度を分光光度測定することによって測定した。UBI (登録商標) ELISA 力価計算プログラムを使用して、相対的な抗体価を計算した。

【 0217 】

A_β オリゴマーは、A_β モノマー又はアミロイドブラークと比較して、ニューロンに対して最も毒性があることを示す。活性免疫療法の目標は、A_β モノマーだけでなく A_β オリゴマーにも特異的な抗体の産生を誘発することである。8、16 及び 24 週に UB - 311 をそれぞれ注射する前の 0 (ベースライン)、4 及び 12 週に軽度 ~ 中程度の 19 人の AD 患者から採取した血清試料について、抗 A_β 抗体価を分析した。図 15 は、19 人の登録被験者それぞれについて、スクリーニング来院時 (V1 / V2)、及び最後の UB - 311 免疫後 4 週である 16 週 (V7) における、抗 A₁₋₂₈ モノマー、抗 A₁₋₄₂ モノマー及び抗 A₁₋₄₂ オリゴマーの抗体価を示す。

10

20

30

40

50

【 0 2 1 8 】

実施例 2 2

エピトープマッピング：N末端ペプチドに対するヒト抗体の検出用の競合的結合阻害酵素イムノアッセイ（EIA）

エピトープマッピングを用いて、結合部位、又はA ペプチド（A 上の9残基～24残基の間）の10アミノ酸長のアミノ酸配列と重複する直鎖状の抗A₁₋₁₄抗体のエピトープを、ELISA試験で特定した。被験者19人の試験の血清試料を評価した。0、4及び12週での3回の免疫後である、16週における結果を以下に示す（図16）。

【 0 2 1 9 】

合成A₁₋₂₈ペプチドを固定化抗原として選択し、マイクロプレートのウェル上に2 µg/mLの濃度でプレコートした。実験前に、各血清試料を1：50、1：100、1：200及び1：400で希釈し、試験して、最適な希釈を決定した。最適希釈の抗A血清試料を、液相免疫吸着剤としてそれぞれ設計したアミノ酸長ペプチドと混合した。A₁₋₂₈でプレコートされたプレートに移す前に、混合物を最適希釈の血清で1：5で連続希釈した。最適希釈の抗A血清単独をコントロールとして用いた。アッセイの過程で、10アミノ酸長ペプチドは主たる抗体結合部位に特異的に結合し、抗A抗体及び固定化抗原の結合を競合的に阻害した。ウェルを洗浄して非結合抗体及び他の血清成分を除去した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ複合化組み換えタンパク質A/Gの標準調製物を各ウェルに添加し、結合抗体と反応させた。ウェルを洗浄して非結合複合体を除去した後、過酸化水素及び3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）を含む基質溶液を各ウェルに添加した。試験した血清試料中に、もし存在するなら、存在するA特異的抗体の量に比例して黄色が強くなった。酵素-基質反応を、希硫酸溶液の添加により停止した。次いで、各ウェル中で生じた色の変化を、IC₅₀ 5 Xプログラム（分子デバイス）を使用することによって、波長450 nm（A₄₅₀）にてマイクロプレートリーダーで分光光度測定した。コントロールウェル中の抗A抗体と固定化抗原との結合を最大の結合（100%）で表し、10アミノ酸長ペプチドの半数最大阻害濃度（IC₅₀）をエピトープ特異性の指標として使用した。

【 0 2 2 0 】

実施例 2 3

UB-311で免疫化した患者の血清試料中の抗体によって認識される主なエピトープはA₁₋₁₀ペプチドに特異的であった

標的領域（表17）内の特定の残基に対する主な抗体結合部位を局在化させるための微細なエピトープマッピング法において、24番目が重複する10アミノ酸長ペプチド（配列番号6、8～30）をA₁₋₁₄ペプチド配列（配列番号4）及びヒトアミロイドペプチド前駆体タンパク質（hAPP）の隣接領域の周囲に合成し、隣接するhAPP部位に加えてN末端アスパラギン酸残基「D」で始まるA₁₋₁₄の全体の長さをカバーした（図16）。被験者19人から採取した血清試料を、免疫前及びUB-311を3回投与後16週に試験した。処置前の試料をベースライン抗A抗体レベルとした（データは示さない）。予想通り、陽性のエピトープマップをもたらした19人全ての試料における主たる抗体反応は、図16及び表17に示すように、A（配列番号6）の遊離アミノ末端に対するものであった。より具体的には、N末端の10アミノ酸長のA₁₋₁₄で表されるペプチド（DAEFRHDSGY）が19人の患者全ての免疫化した血清と最も強く反応した。他のAの10アミノ酸長ペプチドに対する弱い反応性を有する更なる抗体反応を、被験者19人のうち8人で検出した。全てではなく幾人かの被験者から、4、8、12及び24～26週に採取した血清試料も試験し、一致した結果を示した（データは示さない）。要約すれば、これらのデータから、UB-311によって誘発された抗体の大部分は、14個の残基を超える部位ではなく、AのN末端ドメインに特異的に向けられたことがわかる。

【 0 2 2 1 】

実施例 2 4

10

20

30

40

50

UBI ADワクチン(UB-311)の3回の免疫後の血漿中で増加したA₁₋₄₀ペプチド

現在のところ、A₁₋₄₀(配列番号2)、A₁₋₄₂(配列番号1)の血漿濃度の変化、又はA₁₋₄₂:A₁₋₄₀の比率について、疾患修飾処置の臨床試験における設定、又はコリンエステラーゼ阻害剤で処置したAD患者のいずれかの処置への応答との有意な関連は見いだされていない。それにもかかわらず、血漿A₁₋₄₀レベルは可能性のあるADのバイオマーカーとして提案されている。

【0222】

我々の以前の研究において、UBI ADワクチンを接種したマカクで血清中のA₁₋₄₀レベルが上昇したが、プラセボワクチンを接種した動物では正常レベルを示した。これらの結果から、「末梢シンク仮説」が抗A₁₋₄₀抗体の作用機序であるかもしれないことがわかった。抗A₁₋₄₀抗体価は、3回の免疫後のヒト被験者における抗体価よりも、6回のUB-311免疫後のマカクの方がずっと高かったが、この現象は現在の研究においても観察された。表18に示すように、UB-311処置前及び16週(3回目の免疫後4週)に試験したA₁₋₄₀血漿試料の12組の症例の血漿A₁₋₄₀レベルを、16週の血清A₁₋₂₈抗体濃度と比較した。すべての抗体価は、UB-311免疫前、陰性であった。log₁₀が2.4を超える抗A₁₋₂₈抗体価を有する8人は、UBI ADワクチン(UB-311)を接種後、A₁₋₄₀力価が上昇した;一方、log₁₀が2.0未満の抗体レベルを有する4人のうち3人は処置後、上昇しなかった。A₁₋₄₀レベルの上昇は、1つの例外を除いて(被験者P109)、ほとんどの症例において小さく、免疫前の血漿中の異常に高いA₁₋₄₀レベル、及び免疫後著しく高いレベル(1031.9 pg/mL)が示された。非常に高いA₁₋₄₀の理由は不明のままである。血漿中のA₁₋₄₂ペプチドが測定可能なレベルの被験者はいなかった。

【0223】

実施例25

A₁₋₁₄又はA₁₋₄₂ペプチド存在下でヒトリンパ球(PBMC)を刺激しないUB-311の免疫用量

新たなワクチンの出現及び特定の免疫及び自己免疫疾患の間の関連を主張する広く公表された報告の数の増加は、免疫の危険性を越えた社会的関心となっている。抗原刺激に回答したリンパ球増殖及びサイトカインの産生は、ワクチン投与に続いて免疫系が過剰に活性化されるか否か、もしあればどの経路が関与するかを評価するために使用することができる。本研究の目的は、A₁₋₄₀ペプチド又はポジティブコントロールとしてPHAマイトジェンの不存在下又は存在下でのリンパ球増殖の刺激指数(SI)、並びに16週の3回のUB-311免疫の前後のAD患者の培養リンパ球におけるサイトカイン濃度を測定することによって、UB-311の免疫原(A₁₋₁₄)の安全性を評価することであった。

【0224】

AD患者の末梢血単核球(PBMC)をフィコール-ハイパーク勾配遠心分離により単離した。ペプチド誘発増殖及びサイトカイン産生について、細胞(2.5×10⁵/ウェル)を3連で、単独又はそれぞれのペプチドドメイン(A₁₋₁₄(配列番号4)、A₁₋₁₆(配列番号は含まない)、A₁₋₂₈(配列番号3)、A₁₋₇₋₄₂(配列番号(IDN)は含まない)、A₁₋₄₂(配列番号1)及び非関連38アミノ酸長ペプチド(p1412)を含む)を添加して(最終濃度10 µg/mLで)培養した。培養物を、37、5%CO₂にて72時間培養し、次いで上清100 µLを各ウェルから取り出し、サイトカイン分析用に-70で凍結した。³H-チミジン(³H-TdR、アマシャム社、カタログNo. TRK637)0.5 µCiを含む培地100 µLを各ウェルに添加し、18時間培養し、続いて液体シンチレーション計数により放射性同位体の取り込みを検出した。マイトジェンである植物性血球凝集素(PHA)をリンパ球増殖のポジティブコントロールとして使用した。A₁₋₄₀ペプチド又はPHAマイトジェンなしで培養した細胞をネガティブ及びポジティブコントロールとして使用した。3連のA₁₋₄₀ペプチド

を有する実験培養物の1分当たりの平均カウント(c p m)を3連のネガティブコントロールの培養物の平均c p mによって割ることによって刺激指数(S I)を計算し; S I > 3.0は有意な増殖応答と考えられた。

【0225】

0週(ベースライン)及び16週(3回目投与後4週)に採取した全血から末梢血単核球試料を単離し、次いで各種A ペプチドの不存在下又は存在下で培養した。表19に示すように、A₁₋₁₄、他のA ペプチド又はp1412(非関連コントロールペプチド)を培地に添加した場合、リンパ球による有意な増殖応答は観察されなかった。予想通り、PHAマイトジェンを培地に添加した場合、陽性の増殖応答を示した。UB-311の免疫前後でのPHAに対する類似の応答の観察(P=0.87)から、被験者の免疫機能の研究において、有意な変化がないことが示唆される(表19)。

10

【0226】

実施例26

A₁₋₁₄ ペプチド存在下でのヒトサイトカインを刺激しないUB-311の免疫用量PBMC培養物のサイトカイン分析(IL-2、IL-6、IL-10、TNF-、IFN-)を、細胞のみ又はA ペプチドドメイン若しくはPHAの存在下で培地のアリコートで行った。ヒト特異的サイトカインのサンドイッチELISAキット(U-CyTech Biosciences社、ユトレヒト、オランダ)を使用して、製造者の指示書に従ってそれぞれのサイトカイン濃度(pg/mL)を測定した。0週及び16週に採取したPBMC試料についても、細胞のみ(ネガティブコントロール)又はA ペプチド、p1412(非関連ペプチド)若しくはPHAマイトジェン(ポジティブコントロール)の存在下のいずれかで3日間培養後、サイトカイン分泌を試験した。キットの定量範囲は5~320 pg/mLである。5 pg/mL未満、又は320 pg/mLを上回って測定された任意の濃度は、定量限界未満(BQL)又は定量限界超(AQL)として、それぞれ示した。しかしながら、統計的な考慮のために、BQL又はAQLを、それぞれ定量限界より低い(5 pg/mL)又は上回る(320 pg/mL)に置き換えた。0週及び16週での各サイトカインの平均濃度を表20に示す。予想通り、ポジティブコントロールであるPHAの存在中において、IL-2を除き、サイトカインの産生は有意に上昇した。A₁₋₁₄又は他のA ペプチドの刺激による応答に対するサイトカインの産生をベースライン(0週)及び16週で観察したが、ほとんどの値は、相当するネガティブコントロール(細胞のみ)と同様に見えた。

20

30

【0227】

免疫後、細胞性免疫応答の変化を評価するために、ベースラインから16週の平均サイトカイン濃度の変化をネガティブコントロールのものと比較し、対応ウィルコクソンの符号順位検定によって検討した。4つのサイトカイン(IFN-、IL-6、IL-10、TNF-)は、全長A₁₋₄₂ペプチドに応答する分泌の著しい上昇を示し; この観察は、A₁₋₄₂凝集体の高次構造的なエピトープに起因するものであろう。サイトカイン分泌の増加は、A₁₋₁₄又は他のA ペプチドで検出されなかった。

【0228】

要約: UBI ADワクチンは、遊離N末端A₁₋₁₄ペプチドがMvF5 Th及びHBsAg3Thエピトープそれぞれと合成的に結合した、2つのペプチド免疫原を含有する。インビトロのリンパ球増殖及びサイトカイン分析を使用して、細胞免疫応答に対するUBI ADワクチンの免疫の影響を評価した。表19に示すように、A₁₋₁₄ペプチド又は任意の他のA ペプチドを培地に添加した場合、リンパ球による増殖応答は観察されなかった。A₁₋₁₄及び他のA ペプチド(A₁₋₄₂を除く)での処置において、UBI ADワクチン免疫患者のリンパ球によるサイトカイン分泌の増加は検出されず、処置前の0週のレベルと比較して、16週でUB-311免疫後、4つのサイトカイン(IFN-、IL-6、IL-10、TNF-)のかなりの増加を誘発した(表20)。Th2型T細胞の応答によるサイトカイン放出の増加は、A₁₋₁₄のみで増加が検出されなかったため、UBI ADワクチン応答に無関係の可能性が高い

40

50

。A₁₋₄₂に対する応答は、A₁₋₄₂上で識別される天然ヘルパーTエピートープに関係し得る天然Aに対するバックグラウンド応答であると疑われる。PHAに対する応答におけるIL-2産生の欠如が観察され、これは、正常ヒトPBMCを使用する類似の実験条件下、Katial RKらによって報告された知見(Clin Diagn Lab Immunol 1998;5:78-81)と一致する。結論として、これらの結果から、第I相臨床試験に参加した軽度～中程度のアルツハイマー病の患者において、UBI ADワクチンが潜在的な炎症性の抗自己細胞性免疫応答を生じさせないことがわかり、さらにUBI AD ワクチン(UB-311)の安全性が実証された。

【0229】

【表 1】

表 1
血清学的アッセイで用いる $A\beta_{1-42}$ ペプチド及びそのセグメント

A β 又は APP 内の アミノ酸位置	配列 番号	配列
A β_{1-42} 又は APP 770 (D672-A713)	1	DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGVV IA
A β_{1-40} 又は APP 770 (D672-V711)	2	DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGVV
A β_{1-28} 又は APP 770 (D672-K699)	3	DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNK
A β_{1-14} 又は APP 770 (D672-H685)	4	DAEFR HDSGY EVHH
A β_{1-12} 又は APP 770 (D672-Y683)	5	DAEFR HDSGY EV
A β_{1-10} 又は APP 770 (D672-Y681)	6	DAEFR HDSGY
A β_{15-42} 又は APP 770 (Q686-A711)	7	QKLVF FAEDV GSNKG AIIGL MVGGV VIA
A β_{9-1} 又は APP 770 (T663-D672)	8	TEEIS EVKMD
A β_{8-2} 又は APP 770 (E664-A673)	9	EEISE VKMDA
A β_{7-3} 又は APP 770 (E665-E674)	10	EISEV KMDAE
A β_{6-4} 又は APP 770 (I666-F675)	11	ISEVK MDAEF
A β_{5-5} 又は APP 770 (S667-R676)	12	SEVKM DAEFR
A β_{4-6} 又は APP 770 (E668-H677)	13	EVKMD AEFRH
A β_{3-7} 又は APP 770 (V669-D678)	14	VKMDA EFRHD
A β_{2-8} 又は APP 770 (K670-S679)	15	KMDAE FRHDS
A β_{1-9} 又は APP 770 (M671-R680)	16	MDAEF RHD SG
A β_{1-10} 又は APP 770 (D672-Y681)	6	DAEFR HDSGY
A β_{2-11} 又は APP 770 (A673-E682)	17	AEFRH DSGYE
A β_{3-12} 又は APP 770 (E674-V683)	18	EFRHD SGYEV
A β_{4-13} 又は APP 770 (F675-H684)	19	FRHDS GYEVH
A β_{5-14} 又は APP 770 (R676-H685)	20	RHD SG YEVHH
A β_{6-15} 又は APP 770 (H677-Q686)	21	HDSGY EVHHQ
A β_{7-16} 又は APP 770 (D678-K687)	22	DSGYE VHHQK
A β_{8-17} 又は APP 770 (S679-L688)	23	SGYEV HHQKL
A β_{9-18} 又は APP 770 (G680-V689)	24	GYEVH HQKLV
A β_{10-19} 又は APP 770 (Y681-F690)	25	YEVHH QKLVF
A β_{11-20} 又は APP 770 (E682-F691)	26	EVHHQ KLVFF
A β_{12-21} 又は APP 770 (V683-A692)	27	VHHQK LVFFA
A β_{13-22} 又は APP 770 (H684-E693)	28	HHQKL VFFAE
A β_{14-23} 又は APP 770 (H685-D694)	29	HQKLV FFAED
A β_{15-24} 又は APP 770 (Q686-V695)	30	QKLVF FAEDV
A β_{16-22} 又は APP 770 (D687-E693)	31	KLVFFAE
スベータ A	32	ϵ K-KKK
A β 又は APP 770 (D672-K687)	66	DAEFR HDSGY EVHHQ K
A β 又は APP 770 (L688-A713)	67	LVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGVV IA

【 0 2 3 0 】

【表 2】

表 2

$A\beta_{1-42}$ 由来ペプチド免疫原構築物の設計に用いるために選択された
非特異的ヘルパーTエピトープ

説明	配列 番号	配列
破傷風菌 1 Th	33	KKQYIKANSKFIGITEL
MvF1 Th	34	LSEIKGVIVHRLEGV
百日咳菌 Th	35	GAYARCPNGTRALTVAELRGNAEL
破傷風菌 2 Th	36	WVRDIIDDFTNESSQKT
ジフテリア Th	37	DSETADNLEKTVAALSILPGHGC
熱帯熱マラリア原虫 Th	38	DHEKKHAKMEKASSVFNVVNS
マンソン住血吸虫 Th	39	KWFKTNAPNGVDEKHRH
コレラ毒素 Th	40	ALNIWDRFDVFCTLGATTGYLKGN
MvF2 Th	41	ISEIKGVIVHKIEGI
KKKMvF3 Th	42	KKKISISEIKGVIVHKIEGILF T RT TR T
HBsAg1 Th	43	KKKLFLLTkLLTLpQSLD RRRIKII RII I L IR VRVV VV V I V F FF FF F V F F
MvF4 Th	44	ISISEIKGVIVHKIETILF T RT TR
HBsAg2 Th	45	KKKIITITRIITIPQSLD FFLL L ITTI
MvF5 Th	46	ISITEIKGVIVHRIETILF
HBsAg3 Th	47	KKKIITITRIITITTTID

【 0 2 3 1 】

【表 3】

表 3

Aβペプチド免疫原構築物の設計におけるAβ₁₋₄₂ペプチドのN末端に対する特異的抗体を誘発するための、理想的な人工Thエпитープを含む病原性タンパク質由来ThエピトープによるAβ₁₋₁₄ペプチドの免疫原性の増強

説明	配列番号	配列
Aβ ₁₋₁₄ -εK-破傷風菌 1 Th	48	DAEFRHDSGYEVHH-εK-KKQYIKANSKFIGITEL
Aβ ₁₋₁₀ -εK-MvF1 Th	49	DAEFRHDSGY-εK-LSEIKGVIVHRLEGV
Aβ ₁₋₁₂ -εK-MvF1 Th	50	DAEFRHDSGYEV-εK-LSEIKGVIVHRLEGV
Aβ ₁₋₁₄ -εK-MvF1 Th	51	DAEFRHDSGYEVHH-εK-LSEIKGVIVHRLEGV
Aβ ₁₋₁₄ -εK-百日咳菌 Th	52	DAEFRHDSGYEVHH-εK-GAYARCPNGTRALTVAELRGNAEL
Aβ ₁₋₁₄ -εK-破傷風菌 2 Th	53	DAEFRHDSGYEVHH-εK-WVRDIIDDFTNESSQKT
Aβ ₁₋₁₄ -εK-ジフテリア Th	54	DAEFRHDSGYEVHH-εK-DSETADNLEKTVAALSILPGHGC
Aβ ₁₋₁₄ -εK-熱帯熱マラリア原虫 Th	55	DAEFRHDSGYEVHH-εK-DHEKKHAKMEKASSVFNVVNS
Aβ ₁₋₁₄ -εK-マンソン住血吸虫 Th	56	DAEFRHDSGYEVHH-εK-KWFKTNPNGVDEKHRH
Aβ ₁₋₁₄ -εK-コレラ毒素 Th	57	DAEFRHDSGYEVHH-εK-ALNIWDRFDVFCTLGATTGYLKGNS
Aβ ₁₋₁₄ -εK-MvF2 Th	58	DAEFRHDSGYEVHH-εK-ISEIKGVIVHKIEGI
Aβ ₁₋₁₄ -εK-KKKMvF3 Th	59	DAEFRHDSGYEVHH-εK-KKK-ISEIKGVIVHKIEGILF T RT TR T
Aβ ₁₋₁₄ -εK-HBsAg1 Th	60	DAEFRHDSGYEVHH-εK-KKKLFLTLTKLLTLPSLD RRRIKII RII I L IR VRVV VV V I V F FF FF F V F F
(Aβ ₁₋₁₄) ₄ -(εK) ₂ -εK-MvF1 Th	61	(DAEFRHDSGYEVHH) ₄ -εK ₂ -εK-LSEIKGVIVHRLEGV
Aβ ₁₋₁₄ -εK-KKK-MvF4 Th	62	DAEFRHDSGYEVHH-εK-KKK-ISEIKGVIVHKIETILF T RT TR
Aβ ₁₋₁₄ -εK-HBsAg2 Th	63	DAEFRHDSGYEVHH-εK-KKK-IITITRIITIPQSLD FFLL L ITTI
Aβ ₁₋₁₄ -εK-KKK-MvF5 Th	64	DAEFRHDSGYEVHH-εK-KKK-ISITEIKGVIVHRIETILF
Aβ ₁₋₁₄ -εK-HBsAg3 Th	65	DAEFRHDSGYEVHH-εK-KKK-IITITRIITITITID

【 0 2 3 2 】

【表 4】

表 4

各種 A β 由来ペプチド免疫原構築物を有するワクチン製剤での抗原刺激（0 wpi）及び追加免疫（4 wpi）におけるモルモットの免疫原性の評価

群 番号	ワクチン製剤中の A β 由来ペプチド 免疫原構築物の説明	配列 番号	動物 ID	0 wpi	4 wpi	6 wpi	8 wpi
				A β ₁₋₄₂ ELISA	A β ₁₋₄₂ ELISA	A β ₁₋₄₂ ELISA	A β ₁₋₄₂ ELISA
				ELISA Log ₁₀ 力価	ELISA Log ₁₀ 力価	ELISA Log ₁₀ 力価	ELISA Log ₁₀ 力価
1	A β ₁₋₄₂ ペプチド	1	2723	0.438	3.574	3.460	3.744
			2724	0.570	2.582	2.684	2.649
			2725	0.630	3.232	3.279	2.958
			幾何平均	0.540	3.101	3.123	3.084
2	A β ₁₋₂₈ ペプチド	3	2726	0.330	3.768	3.572	3.369
			2727	0.440	3.690	3.688	3.759
			2728	0.350	3.683	3.879	3.960
			幾何平均	0.370	3.713	3.711	3.688
3	A β ₁₋₁₄ ペプチド	4	2729	0.620	1.235	1.212	1.241
			2730	0.570	1.142	1.113	1.151
			2731	0.420	1.211	1.114	1.189
			幾何平均	0.529	1.195	1.145	1.193
4	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-破傷風菌 Th	48	2763	0.591	1.736	2.532	2.920
			2764	0.582	1.943	0.968	1.511
			2765	0.514	0.890	1.591	2.435
			幾何平均	0.561	1.443	1.574	2.207
6	A β ₁₋₁₀ - ϵ K-MVF1 Th	49	2757	0.424	4.124	4.622	4.523
			2758	0.649	4.034	4.322	4.372
			2759	0.753	4.275	4.555	4.364
			幾何平均	0.592	4.143	4.498	4.419
7	A β ₁₋₁₂ - ϵ K-MVF1 Th	50	2760	0.342	4.356	4.732	4.534
			2761	0.563	4.574	4.352	4.623
			2762	0.733	4.356	4.623	4.733
			幾何平均	0.521	4.427	4.566	4.629
5	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-MVF1 Th	51	2766	0.342	4.744	4.854	4.878
			2767	0.647	4.500	5.337	4.777
			2768	0.182	5.074	4.791	4.601
			幾何平均	0.343	4.767	4.988	4.751
8	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-百日咳菌 Th	52	2769	0.648	2.235	3.571	2.686
			2770	0.415	2.284	4.203	3.799
			2771	0.488	1.331	2.541	2.202
			幾何平均	0.508	1.894	3.366	2.822
9	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-破傷風菌 2 Th	53	2772	0.714	1.843	2.818	2.761
			2773	1.165	3.370	1.297	1.828
			2774	0.886	1.398	3.112	3.165
			幾何平均	0.903	2.055	2.249	2.518
10	A β ₁₋₁₄ - ϵ K-ジフテリア ア Th	54	2775	0.314	3.674	4.675	4.358
			2776	0.233	0.780	1.587	1.695
			2777	0.780	3.629	4.473	3.718
			幾何平均	0.385	2.183	3.214	3.017

【表 5】

11	$A\beta_{1-14}$ - ϵ K-熱帯熱マラリア原虫 Th	55	2778	0.868	3.941	3.856	3.382
			2779	0.464	1.926	2.549	2.633
			2780	0.627	4.350	3.723	3.218
			幾何平均	0.632	3.208	3.320	3.060
12	$A\beta_{1-14}$ - ϵ K-マンスン住血吸虫 Th	56	2781	0.968	0.395	2.475	2.583
			2782	0.754	1.101	2.554	2.692
			2783	0.680	1.882	0.881	1.250
			幾何平均	0.792	0.935	1.773	2.056
13	$A\beta_{1-14}$ - ϵ K-コレラ毒素 Th	57	2784	0.836	4.218	4.735	4.287
			2785	1.111	4.704	5.357	5.347
			2786	0.497	4.252	4.698	4.600
			幾何平均	0.773	4.386	4.921	4.724
14	$A\beta_{1-14}$ - ϵ K-MVF2 Th	58	2787	1.333	5.347	5.398	4.791
			2788	0.546	5.495	5.409	4.931
			2789	0.705	5.658	5.745	4.822
			幾何平均	0.801	5.498	5.515	4.848
15	$A\beta_{1-14}$ - ϵ K-MVF3 Th	59	2790	0.701	4.943	5.678	5.569
			2791	0.360	3.468	5.745	5.658
			2792	0.494	4.759	5.319	5.347
			幾何平均	0.500	4.337	5.577	5.523
16	$A\beta_{1-14}$ - ϵ K-HBsAg1 Th	60	2793	0.880	3.199	4.561	4.431
			2794	0.911	4.817	4.303	4.788
			2795	0.761	4.567	5.328	5.495
			幾何平均	0.848	4.129	4.711	4.885
17	$(A\beta_{1-14})_4$ -(ϵ K) $_2$ - ϵ K-MVF1 Th	61	2796	0.479	5.041	5.585	4.696
			2797	0.973	4.385	4.831	4.751
			2798	0.345	3.919	4.698	3.922
			幾何平均	0.544	4.425	5.023	4.439

【 0 2 3 4 】

【表 6】

表 5

2つの $A\beta_{1-14}$ 由来ペプチド免疫原構築物及びその組合せを有するワクチン製剤での抗原刺激（0 w p i）及び追加免疫（4 w p i）における、

モルモットの免疫原性の評価

群 番号	ワクチン製剤中の $A\beta_{1-14}$ ペプチド構 築物の説明	配列 番号	動物 ID	0 wpi	3 wpi	5 wpi	8 wpi
				$A\beta_{1-42}$ ELISA	$A\beta_{1-42}$ ELISA	$A\beta_{1-42}$ ELISA	$A\beta_{1-42}$ ELISA
				ELISA Log ₁₀ 力価	ELISA Log ₁₀ 力価	ELISA Log ₁₀ 力価	ELISA Log ₁₀ 力価
1	$A\beta_{1-14}$ - ϵ K- KKK-MvF4 Th	62	1935	0.587	4.362	4.579	4.447
			1936	0.414	3.684	4.543	4.217
			1937	0.390	4.393	3.652	4.358
			1938	0.179	3.768	3.648	4.283
			1939	0.331	3.726	3.673	4.163
			1940	0.350	3.732	4.787	3.813
			幾何平均	0.354	3.932	4.117	4.208
2	$A\beta_{1-14}$ - ϵ K- HBsAg2 Th	63	1929	0.288	2.720	3.502	3.596
			1930	0.507	2.817	3.559	3.653
			1931	0.721	2.860	3.575	3.696
			1932	0.548	2.315	3.776	3.681
			1933	0.619	2.322	3.742	3.836
			1934	0.234	2.687	3.459	3.744
			幾何平均	0.450	2.610	3.600	3.700
3	$A\beta_{1-14}$ - ϵ K- KKK-MvF4 Th + $A\beta_{1-14}$ - ϵ K-HBsAg2 Th 等モル比	62+63	1923	0.298	4.759	4.880	4.803
			1924	0.554	4.619	4.979	4.702
			1925	0.299	4.835	4.791	4.955
			1926	0.635	4.831	4.710	5.150
			1927	0.911	5.097	4.278	4.313
			1928	0.890	5.188	4.721	5.206
			幾何平均	0.542	4.884	4.721	4.845

【 0 2 3 5 】

【表 7】

表 6

モルモットにおける、2つの $A\beta_{1-14}$ 由来ペプチド免疫原構築物及びその組合せを有するワクチン製剤での抗原刺激（0 w p i）及び追加免疫（4 w p i）における免疫原のThペプチド又は担体タンパク質要素に対する抗体の評価

群 番号	ワクチン製剤 中の $A\beta_{1-14}$ ペ プチド構築物 の説明	配列 番号	動物 ID	8 wpi			
				$A\beta_{1-42}$ ELISA (配列番号 1)	MvF4 Th ELISA (配列番号 44)	HBsAg2 Th ELISA (配列番号 45)	KLH-ELISA
				ELISA Log ₁₀ 力価	ELISA Log ₁₀ 力価	ELISA Log ₁₀ 力価	ELISA Log ₁₀ 力価
1	$A\beta_{1-14}$ -εK- KKK-MvF4 Th	62	1935	4.447	0.268	0.288	N/A
			1936	4.217	0.216	0.504	N/A
			1937	4.358	0.196	0.621	N/A
			1938	4.283	0.179	0.360	N/A
			1939	4.163	0.332	0.519	N/A
			1940	3.813	0.286	0.233	N/A
			幾何平均	4.208	0.240	0.397	N/A
2	$A\beta_{1-14}$ -εK- HBsAg2 Th	63	1929	3.596	0.575	0.431	N/A
			1930	3.653	0.423	0.257	N/A
			1931	3.696	0.380	0.345	N/A
			1932	3.681	0.279	0.563	N/A
			1933	3.836	0.336	0.365	N/A
			1934	3.744	0.425	0.354	N/A
			幾何平均	3.700	0.393	0.375	N/A
3	$A\beta_{1-14}$ -εK- KKK-MvF4 Th + $A\beta_{1-14}$ -εK-HBsAg2 Th 等重量比	62+63	1923	4.803	0.350	0.631	N/A
			1924	4.702	0.724	0.350	N/A
			1925	4.955	0.324	0.391	N/A
			1926	5.150	0.394	0.452	N/A
			1927	4.313	0.520	0.368	N/A
			1928	5.206	0.528	0.364	N/A
			幾何平均	4.845	0.455	0.417	N/A
4	KLH-(C)- $A\beta_{1-14}$	4	1968	3.626	N/A	N/A	7.006
			1969	3.981	N/A	N/A	7.167
			1970	2.227	N/A	N/A	4.658
			1971	3.005	N/A	N/A	5.593
			1974	2.527	N/A	N/A	7.000
			1975	2.599	N/A	N/A	7.000
			幾何平均	2.931	N/A	N/A	6.326

【 0 2 3 6 】

【表 8】

表 7

ISA51のw/oエマルション及びアラム中に $A\beta_{1-42}$ 由来ペプチド免疫原構築物(配列番号62+63)を様々な量で有するワクチン製剤での抗原刺激(0 wpi)及び追加免疫(3及び6 wpi)におけるヒヒの免疫原性の評価

群 番号	ワクチン製剤の 説明	動物 ID	0 wpi	5 wpi	8 wpi	10 wpi	14 wpi
			$A\beta_{1-42}$ ELISA Log_{10} 力価	$A\beta_{1-42}$ ELISA Log_{10} 力価	$A\beta_{1-42}$ ELISA Log_{10} 力価	$A\beta_{1-42}$ ELISA Log_{10} 力価	$A\beta_{1-42}$ ELISA Log_{10} 力価
1	配列番号 62 + 配列番号 63 等モル比 @ アルム (ア ルハイドロゲ ル)0.5mL 中 100 μ g	X798	1.397	2.463	2.985	2.337	1.478
2	配列番号 62+配 列番号 63 等モル比 @ 0.5mL ISA51 (w/o)エ マルシヨ ン 中 25 μ g	X1498	1.394	3.462	3.236	2.422	1.774
3	配列番号 62+配 列番号 63 等モル比 @0.5mL ISA51 (w/o)エ マルシヨ ン 中 100 μ g	X299	1.140	3.038	3.427	3.345	2.205
		X1098	1.610	3.987	4.460	4.662	3.666
		X398	1.541	3.926	4.353	4.095	2.972
		幾何平均	1.414	3.623	4.052	3.997	2.885
4	配列番号 62+配 列番号 63 等モル比 @0.5mL ISA51 (w/o)エ マルシヨ ン 中 400 μ g	X1198	1.696	3.696	5.051	5.115	4.531

【表 9】

表 8

2つの $A\beta_{1-14}$ ペプチド免疫原構築物を有するワクチン製剤での抗原刺激（0 w p i）及び追加免疫（4 w p i）における $A\beta$ ペプチド免疫原構築物のThペプチドに対する（モルモットの8 w p iの血清からの）抗体の評価

群 番号	ワクチン製剤 中の $A\beta_{1-14}$ ペ プチド構築物 の説明	配列 番号	動物 ID	8 wpi		
				$A\beta_{1-42}$ ELISA (配列番号 1)	MvF 5 Th ELISA (配列番号 46)	HBsAg3 Th ELISA (配列番号 47)
				ELISA Log ₁₀ 力価	ELISA Log ₁₀ 力価	ELISA Log ₁₀ 力価
1	$A\beta_{1-14}$ -EK- KKK-MvF5 Th + $A\beta_{1-14}$ -EK- HBsAg3 Th 等モル比	64+65	2123	4.683	0.210	0.314
			2124	3.884	0.325	0.421
			2125	3.923	0.433	0.311
			2126	3.578	0.542	0.554
			2127	3.348	0.520	0.381
			2128	3.482	0.403	0.415
			幾何平均	3.792	0.387	0.392

【 0 2 3 8 】

【表 10】

表 9

免疫期間（0～111wpi）に採取したワクチンを接種したヒヒの血清による $A\beta_{1-42}$ の N 末端での微細な特異性分析用のエピーマップ

ペプチド配列番号	ペプチド配列	ELISA 力価 (Log_{10}) 免疫化後の週			
		0	10	84	111
8	TEEISEVKMD	0.23	0.26	0.16	0.15
9	EEISEVKMDA	0.24	0.30	0.21	0.22
10	EISEVKMDAE	0.23	0.25	0.16	0.14
11	ISEVKMDAEF	0.20	0.20	0.15	0.13
12	SEVKMDAEFR	0.21	0.24	0.16	0.13
13	EVKMDAEFRH	0.19	0.23	0.16	0.14
14	VKMDAEFRHD	0.27	0.46	0.48	0.55
15	KMDAEFRHDS	0.26	0.36	0.41	0.51
16	MDAEFRHDSG	0.26	0.32	0.16	0.17
6	DAEFRHDSGY	0.26	3.26	3.65	3.21
17	AEFRHDSGYE	0.25	0.35	0.25	0.19
18	EFRHDSGYEV	0.24	0.30	0.18	0.18
19	FRHDSGYEVH	0.20	0.40	0.22	0.30
20	RHDSGYEVHH	0.23	0.34	0.27	0.41
21	HDSGYEVHHQ	0.21	0.40	0.18	1.14
22	DSGYEVHHQK	0.32	0.78	0.64	0.76
23	SGYEVHHQKL	0.13	0.49	0.51	0.78
24	GYEVHHQKLV	0.13	0.27	0.19	0.12
25	YEVHHQKLVF	0.16	0.43	0.15	0.22
26	EVHHQKLVFF	0.17	0.26	0.13	0.13
27	VHHQKLVFFA	0.16	0.23	0.12	0.11
28	HHQKLVFFAE	0.19	0.22	0.13	0.12
29	HQKLVFFAED	0.18	0.21	0.13	0.13
3	$A\beta_{1-28}$ DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK	0.12	3.26	3.57	3.32

【0239】

【表 1 1】

表 1 0

ヒヒの過免疫の血清での競合的阻害 ELISA によるエピトープマッピング

ペプチド濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	血清のペプチドブレ吸収後の阻害 ELISA パーセント(%)					
	$A\beta_{1-28}$ (配列番号 3)	$A\beta_{1-10}$ (配列番号 6)	$A\beta_{[-1]-9}$ (配列番号 16)	$A\beta_{2-11}$ (配列番号 17)	$A\beta_{3-12}$ (配列番号 18)	$A\beta_{17-43}$ (配列番号: 67)
32	99	97	39	19	3	7
8	93	93	17	6	0	0
2	72	82	8	0	0	5
1	63	72	4	0	0	10
0.5	50	55	9	0	1	9
0.25	34	37	8	3	1	5
0	0	0	0	0	0	0

$A\beta_{1-10}$ ペプチドの 50% 阻害は約 $0.3 \mu\text{g/mL}$ である。ヒヒ抗 $A\beta$ 抗体特異性は N 末端のアスパラギン酸 (D) を主たる標的とする。

ヒヒ免疫血清試料によって検出されたヒトアミロイド前駆体タンパク質 (hAPP) の 10 アミノ酸長 $A\beta$ ペプチドを使用するエピトープマッピングは N 末端 $A\beta_{1-10}$ ペプチドへの特異性を示す。

【 0 2 4 0 】

10

20

【表 1 2】

表 1 1
カニクイザルの抗体力価(Log₁₀)における UBI AD ワクチンの繰返し投与の効果

群 μg/投与	時間 (週)							
	0	3	6	9	12	15	21	27 週後
0	0.838 ±0.410	1.249 ±0.190	1.169 ±0.206	1.790 ±0.408	1.382 ±0.392	1.199 ±0.261	1.068 ±0.142	0.860 ±0.257
150	1.056 ±0.186	2.252 ±0.702	3.507 ±0.493	3.714 ±0.461	3.287 ±0.577	3.905 ±0.669	3.580 ±0.315	3.644 ±1.403
750	0.829 ±0.185	3.169 ±0.487	4.217 ±0.415	4.316 ±0.416	3.784 ±0.278	3.977 ±0.125	4.027 ±0.222	3.596 ±0.080

N = 群ごとに 6 頭のカニクイザル (0, 3, 6, 9, 12 及び 15 週); N = 群ごとに 3 頭のカニクイザル (weeks 21, 27 週)

【表 1 3】

表 1 2

プラセボワクチン ($0 \mu\text{g}$ / 用量) 又は UBI AD ワクチン ($150 \mu\text{g}$ / 投与
又は $750 \mu\text{g}$ / 投与) で免疫化したカニクイザルから 9 週及び 15 週に採取した
抗血清の特異性分析

配列 番号	配列	0 μg /投与		150 μg /投与		750 μg /投与	
		9 WPI	15 WPI	9 WPI	15 WPI	9 WPI	15 WPI
8	TEEISEVKMD	0.065	0.054	0.075	0.084	0.061	0.078
9	EEISEVKMDA	0.061	0.060	0.082	0.092	0.081	0.076
10	EISEVKMDAE	0.053	0.070	0.060	0.056	0.064	0.053
11	ISEVKMDAEF	0.059	0.055	0.055	0.058	0.063	0.062
12	SEVKMDAEFR	0.045	0.047	0.056	0.053	0.054	0.050
13	EVKMDAEFRH	0.047	0.041	0.046	0.047	0.054	0.047
14	VKMDAEFRHD	0.050	0.043	0.068	0.053	0.061	0.054
15	KMDAEFRHDS	0.056	0.055	0.065	0.031	0.069	0.062
16	MDAEFRHDSG	0.049	0.041	0.056	0.061	0.051	0.056
6	DAEFRHDSGY N-末端	0.051	0.053	0.691	0.725	0.972	1.682
17	AEFRHDSGYE	0.045	0.054	0.058	0.059	0.054	0.060
18	EFRHDSGYEV	0.054	0.046	0.047	0.060	0.042	0.052
19	FRHDSGYEVH	0.051	0.060	0.085	0.076	0.066	0.096
20	RHDSGYEVHH	0.054	0.060	0.296	0.400	0.453	0.461
21	HDSGYEVHHQ	0.059	0.052	0.266	0.494	0.419	0.332
22	DSGYEVHHQK	0.042	0.051	0.270	0.289	0.405	0.197
23	SGYEVHHQKL	0.051	0.048	0.097	0.071	0.077	0.082
24	GYEVHHQKLV	0.042	0.047	0.055	0.067	0.052	0.059
25	YEVHHQKLVF	0.042	0.036	0.092	0.069	0.069	0.058
26	EVHHQKLFFF	0.034	0.034	0.044	0.051	0.042	0.044
27	VHHQKLFFFA	0.037	0.039	0.046	0.082	0.057	0.083
28	HHQKLFFFAE	0.038	0.040	0.044	0.052	0.046	0.032
29	HQKLFFFAED	0.048	0.051	0.050	0.058	0.047	0.050
30	QKLFFFAEDV	0.044	0.047	0.043	0.055	0.062	0.059
3	A β_{1-28} DAEFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNK	NA	0.087	NA	3.107	NA	3.069

NA = 入手不可

【 0 2 4 2 】

10

20

30

【表 1 4】

表 1 3

UBI ADワクチン化前後のカニクイザルの
血清（上段）及び脳脊髄液（下段）中の $A\beta_{1-40}$ 濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

 $A\beta_{1-40}$ 血清

ワクチン投与量	0 wpi (n=6)	15 wpi (n=6)	21 wpi (n=3)	26 wpi (n=3)
0 μg (コントロール)	61.7 \pm 12.7	63.0 \pm 16.8	63.7 \pm 12.2	52.7 \pm 2.5
150 μg	53.9 \pm 6.3	127.4 \pm 23.8	144.8 \pm 17.3	158.0 \pm 38.1
750 μg	56.8 \pm 7.7	138.2 \pm 18.9	144.5 \pm 22.5	118.0 \pm 20.9

10

 $A\beta_{1-40}$ 脳脊髄液

ワクチン投与量	15 wpi (n=3)	28 wpi (n=3)
0 μg (コントロール)	56.4 \pm 6.0	59.7 \pm 5.9
150 μg	63.9 \pm 6.5	67.6 \pm 5.4
750 μg	57.5 \pm 5.9	54.3 \pm 2.9

20

【 0 2 4 3】

【表 1 5】

表 1 4

各種 $A\beta$ ペプチドを有する共培養におけるカニクイザルの
末梢血単核球による刺激指数として表された増殖

ペプチド ドメイン	刺激指数(S.I.) 【陽性 S.I. > 4.0】		
	グループ 1 プラセボワ クチンコントロール	グループ 2 UBITH® AD ワクチン(低用量)	グループ 3 UBITH® AD ワクチン(高用量)
$A\beta_{1-14}$	-- (1.5)	-- (0.2)	-- (1.2)
$A\beta_{1-16}$	++ (12.7)	+	+
$A\beta_{17-42}$	++++ (83.7)	++++ (46.9)	++++ (56.6)
$A\beta_{1-42}$	++ (16.0)	++ (15.1)	++ (15.5)

30

 $A\beta_{1-14}$ (配列番号 4) DAEFRHDSGYEVHH $A\beta_{1-16}$ (配列番号 66) DAEFRHDSGYEVHHQK $A\beta_{17-42}$ (配列番号 67) LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA $A\beta_{1-42}$ (配列番号 1) DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

40

【 0 2 4 4】

【表 1 6】

表 1 5

$A\beta_{1-14}$ 、 $A\beta_{1-42}$ ペプチド又は PHA（植物性血球凝集素）
マイトジェン^aでの刺激におけるカニクイザルの
末梢血単核球（PBMC）中のサイトカイン濃度の測定

サイトカイン	ワクチン投与量	サイトカイン濃度 ^b (pg/mL)		
		$A\beta_{1-14}$	$A\beta_{1-42}$	PHA
IL-2	プラセボ	BDL ^c	23.3 ± 13.1	90.6 ± 12.4
	150 µg	BDL	19.4 ± 9.7	96.1 ± 13.3
	750 µg	BDL	25.2 ± 11.8	97.5 ± 6.6
IL-6	プラセボ	BDL	23.1 ± 11.7	69.1 ± 12.0
	150 µg	BDL	15.0 ± 9.1	70.6 ± 15.7
	750 µg	BDL	23.4 ± 10.5	66.2 ± 7.3
TNF-α	プラセボ	BDL	9.2 ± 5.3	91.0 ± 29.1
	150 µg	BDL	7.9 ± 4.8	96.1 ± 22.2
	750 µg	BDL	7.8 ± 5.9	89.0 ± 13.7

^a $A\beta$ ペプチド又は PHA マイトジェンの不存在下又は存在下、6 頭のカニクイザルの末梢血単核球（PBMC）を、最後の免疫後（15 w p i）24 時間培養した。培養物の上清を、市販の ELISA 試験（U-CyTech Biosciences 社、ユトレヒト、オランダ）によって各サイトカイン（IL2、IL6 及び TNF α）の検出可能濃度について試験した。

^b 平均 ± 標準偏差として結果を示した。

^c BDL、検出レベル以下。

【0 2 4 5】

【表 17】

表 16
モルモット、アカゲザル及びヒヒの異なる投与レベルでの
UBI ADワクチンの免疫原性の比較

動物種 [BW]	ペプチド投与量 (μg) ²		抗体力価 $\text{Log}_{10}>2^3$	
	動物当たり	BW kg 当たり	1 回投与後 3 週	2 回投与後 3 週
モルモット [300 - 400 グラム]	1	2.5 - 3.3	0 / 3 ⁴	0 / 3
	3	7.5 - 10	0 / 3	0 / 3
	10	25 - 33	0 / 6	5 / 6
	30	75 - 100	1 / 6	6 / 6
	100	250 - 333	2 / 3	3 / 3
	300	750 - 1000	2 / 3	3 / 3
アカゲザル [4 - 5 kg]	150	30 - 37.5	4 / 6	6 / 6
	750	150 - 187.5	6 / 6	6 / 6
ヒヒ [10 - 15 kg]	300 - A ¹	20 - 30	3 / 4	4 / 4
	300 - B ¹	20 - 30	2 / 2	2 / 2
	1200	80 - 120	2 / 2	2 / 2

¹ 0 及び 3 週にパート A で、及び 7 8 及び 8 1 週（7 2 週の休薬期間後）にパート B で免疫化したヒヒ。

² 600 μg ペプチドからなる、各 1 mL 用量。

³ Log_{10} 値が > 2 は、陽性の抗 A β 力価としてのスコアである。

⁴ 数字は、陽性の力価を有する動物の数 / 試験した全動物数を表す。

BW : 体重

【0246】

10

20

30

【表 18】

表 17
全てのワクチン化患者由来の血清(16wpi)による AB₁₋₄₂ の N 末端での微細特異性分析のエピトープマッピング

配列番号	ペプチド配列	A8 位置	被験者																		
			P101	P102	P103	P104	P105	P106	P107	P108	P109	P201	P202	P203	P204	P205	P206	P207	P208	P209	P210
8	TEEISEVKMD	-9 to 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	EEISEVKMDA	-8 to 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	EISEVKMDAE	-7 to 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	ISEVKMDAEF	-6 to 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	SEVKMDAEFR	-5 to 5	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	EVKMDAEFRH	-4 to 6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	58	0	0	0	0	0	1	0	0	0
14	VKMDAEFRHD	-3 to 7	31	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	0	12	0	0	0	0	0	13
15	KMDAEFRHDS	-2 to 8	94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52
16	MDAEFRHDSG	-1 to 9	420	12	0	0	0	0	0	0	0	19	116	0	17	0	0	2	6	0	121
6	DAEFRHDSGY N-末端	1 to 10	1983	1669	36	1721	3840	5193	2838	948	1675	1034	42313	1284	274	81	1797	6024	4093	27596	20968
17	AEFRHDSGYE	2 to 11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	EFRHDSGYEV	3 to 12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	FRHDSGYEVH	4 to 13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	RHDSGYEVHH	5 to 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	HDSGYEVHHQ	6 to 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	DSGYEVHHQK	7 to 16	214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	SGYEVHHQKL	8 to 17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	GYEVHHQKLV	9 to 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0
25	YEVHHQKLVF	10 to 19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
26	EVHHQKLVFF	11 to 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	VHHQKLVFFA	12 to 21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	0	0
28	HHQKLVFFAE	13 to 22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	HQKLVFFAED	14 to 23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	QKLVFFAEDV	15 to 24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNIK	1 to 28	685	161	220	295	450	715	1163	478	430	339	509	279	284	39	226	906	1157	893	1321

【0247】

10

20

30

【表 19】

表 18
UBI ADワクチンでの免疫前後のAD患者の血漿中の
 $A\beta_{1-40}$ 濃度 (pg/mL) の分析、及び
降順の抗 $A\beta_{1-28}$ 抗体価 (Log_{10}) の関係

被験者 ID (n = 12)	抗 $A\beta_{1-28}$ Ab (Log_{10}) 16 週	$A\beta_{1-40}$ (pg/mL) 0 週	$A\beta_{1-40}$ (pg/mL) 16 週	$A\beta_{1-40}$ (pg/mL) 16 週 - 0 週
P207	3.504	72.6	114.5	41.9
P105	3.164	53.5	75.1	21.6
P106	3.048	124.9	145.8	20.9
P109	2.778	492.9	1031.9	639.0
P108	2.622	29.3	44.4	15.1
P208	2.594	85.2	129.9	44.7
P206	2.462	90.2	102.1	11.9
P204	2.420	30.7	45.1	14.4
P205	1.989	77.7	72.0	-5.7
P107	1.790	147.0	92.7	-54.3
P209	1.467	58.6	87.7	29.1
P210	1.449	44.4	32.6	-11.8

太字のデータは、0、4 及び 12 週に UBI AD ワクチンの免疫後 16 週での
 $A\beta_{1-40}$ のレベルが上昇している。

【0 2 4 8】

10

20

【表 20】

表 19
 各種 A β ペプチドでの共培養における
 0 週及び 16 週に採取した患者被験者由来の
 末梢血単核球 (PBMC) による平均刺激指数

ペプチド (配列番号)	0 週	16 週	差	対応 t 差検定
	平均(SD)	平均(SD)	平均(SD)	p 値
A β_{1-14} (配列番号 4)	0.93 (0.36)	0.90 (0.22)	-0.03 (0.39)	0.73
A β_{1-16} (配列番号 66)	0.92 (0.30)	0.98 (0.25)	0.06 (0.40)	0.54
A β_{1-28} (配列番号 3)	0.96 (0.30)	1.04 (0.34)	0.08 (0.56)	0.55
A β_{17-42} (配列番号 67)	0.96 (0.34)	1.04 (0.29)	0.08 (0.49)	0.47
A β_{1-42} (配列番号 1)	0.97 (0.38)	1.08 (0.49)	0.10 (0.53)	0.40
p1412*	0.87 (0.22)	0.99 (0.33)	0.11 (0.34)	0.18
PHA	28.73 (14.24)	27.75 (32.85)	-0.98 (26.57)	0.87

* p 1 4 1 2 は非関連コントロールペプチドである。

統計分析：0 週～16 週のリンパ球増殖の差を対応 t 検定により検討した。A β ペプチド及びコントロールに対して応答した平均サイトカイン濃度変化の差（16 週－0 週）を対応ウィルコクソン符号順位検定によって検討した。統計的に有意性レベルを両側検定（ $p < 0.05$ ）によって決定した。R（バージョン 2.13.0）を全ての統計分析で使用した。

【0249】

10

20

【表 2 1】

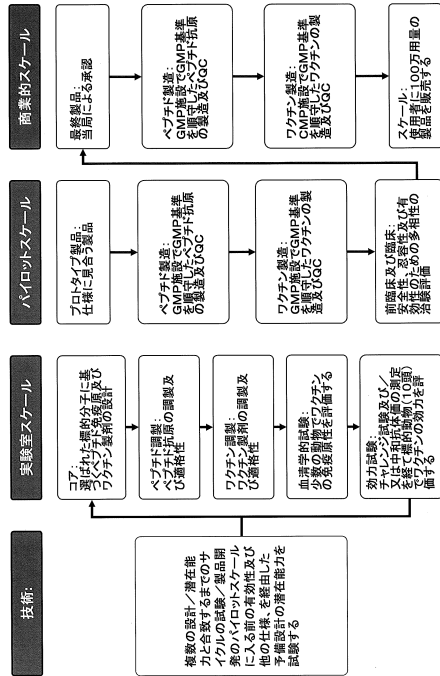
表 2 0
各種 A β ペプチドでの共培養における
0 週及び 16 週に採取した患者被験者由来の
末梢血単核球 (P BMC) によって産生した
サイトカインの平均濃度 (SD) (pg/mL)¹

ペプチド (配列番号)	Th1				Th2				両方	
	IL-2		IFN- γ		IL-6		IL-10		TNF- α	
	0 週	16 週	0 週	16 週	0 週	16 週	0 週	16 週	0 週	16 週
A β ₁₋₁₄ (4)	31.06 (32.48)	31.20 (24.29)	13.52 (16.88)	16.07 (12.88)	31.34 (29.67)	50.74 (51.97)	5.67 (1.56)	5.62 (1.58)	36.82 (62.84)	39.84 (51.69)
A β ₁₋₁₆ (66)	31.42 (31.38)	35.98 (23.93)	14.95 (16.14)	13.76 (14.19)	52.50 (31.68)	50.35 (42.63)	5.70 (1.63)	5.81 (1.78)	47.42 (72.17)	47.25 (69.73)
A β ₁₋₂₈ (3)	36.73 (34.29)	40.55 (27.99)	15.99 (23.57)	20.68 (24.39)	31.74 (25.38)	42.27 (41.84)	5.61 (1.52)	6.17 (2.46)	41.59 (66.53)	51.20 (67.78)
A β ₁₇₋₄₂ (67)	24.59 (-25.68)	29.15 (21.17)	9.67 (9.74)	13.58 (15.63)	>44.55 (70.86) ³	46.90 (51.30)	5.34 (0.86)	5.56 (1.54)	15.60 (18.44)	24.78 (39.26)
A β ₁₋₄₂ (1)	23.06 (17.65)	27.34 (16.86)	13.42 (16.12)	>44.84 (77.34)	>141.25 (130.11) ⁴	>202.02 (121.32) ⁵	11.13 (22.68)	31.90 (50.21)	>31.63 (71.46) ³	>88.78 ⁶ (132.91)
p1412	30.88 (27.42)	39.96 (25.97)	14.40 (18.39)	21.72 (29.89)	31.81 (52.12)	60.69 (95.80)	5.25 (0.64)	5.18 (0.53)	17.14 (23.50)	20.85 (29.26)
PHA	10.38 ⁷ (11.34)	12.84 ⁷ (6.49)	>320.00 (0.00) ²	>318.91 (4.77) ²	>320.00 (0.00) ²	>320.00 (0.00) ²	173.83 (84.75)	>162.77 (99.70)	>313.01 (30.48) ²	>300.87 (46.51) ²
細胞 コントロ ール	33.36 (24.91)	38.83 (33.08)	13.81 (12.29)	17.84 (18.24)	45.86 (41.93)	65.31 (76.54)	5.88 (2.45)	5.73 (1.59)	44.32 (70.90)	46.72 (67.76)

1. アッセイの定量可能範囲は 5 ~ 320 pg/mL である。
2. 90%以上の被験者の濃度は定量上限値を超えていた (AQL)、即ち 320 pg/mL を超えた。
3. 1 人の患者が AQL 値であった。
4. 6 人の患者が AQL 値であった。
5. 8 人の患者が AQL 値であった。
6. 4 人の患者が AQL 値であった。
7. PHA マイトジェンへの応答において観察された IL-2 産生の欠如は、Katial ら、Al らによって 1998 年に報告された類似の実験条件下での知見と一致する。

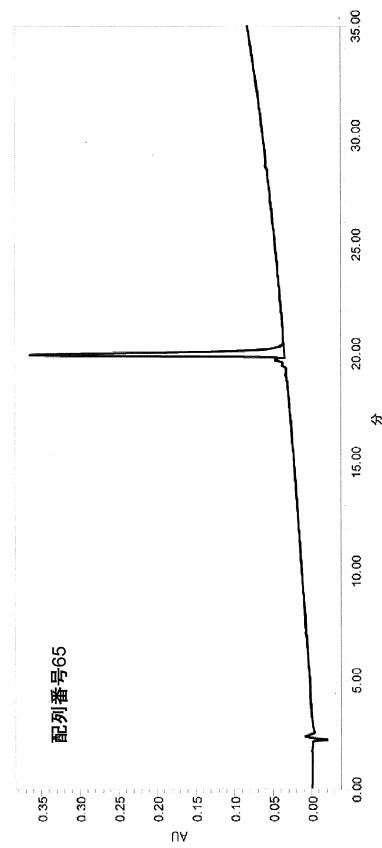
【図 1】

図 1



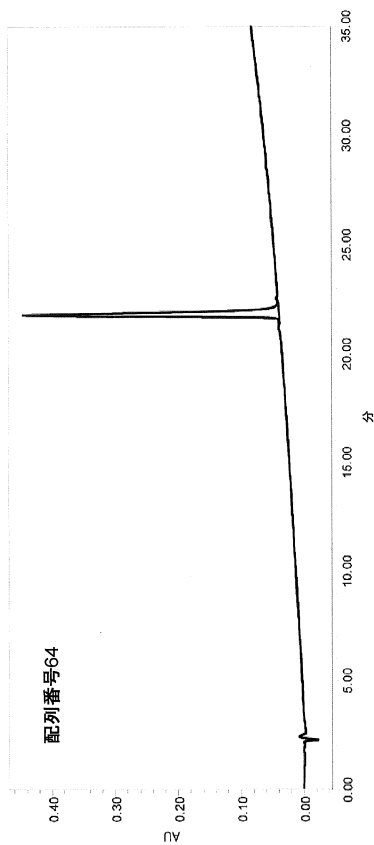
【図 2 A】

図2A



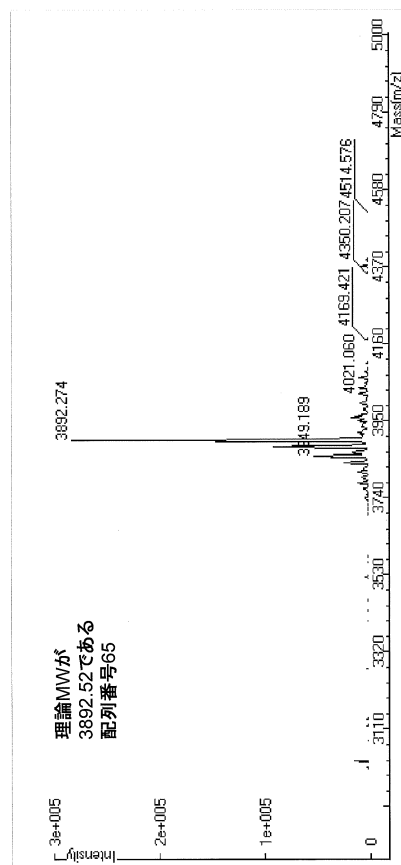
【図 2 B】

図2B



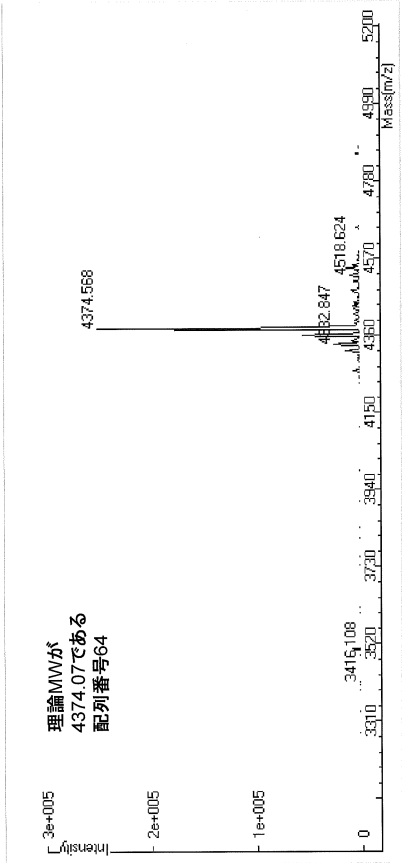
【図 2 C】

図2C



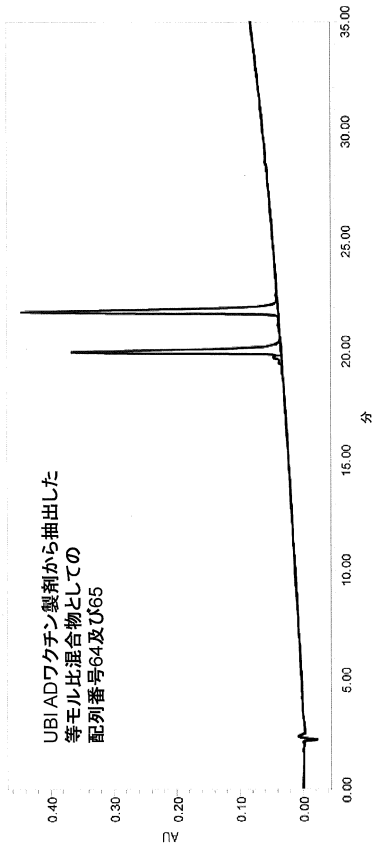
【図 2 D】

図2D



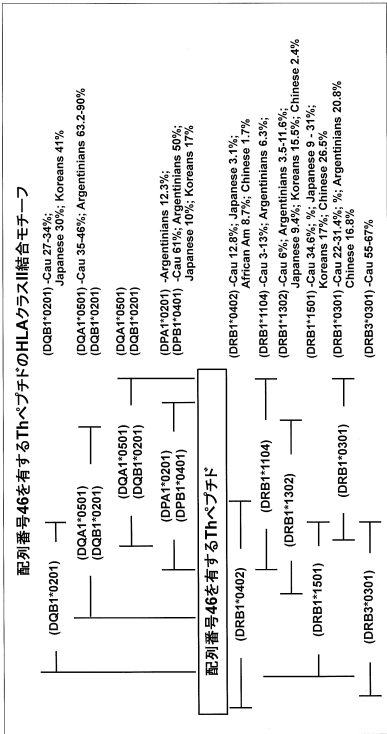
【図 2 E】

図2E



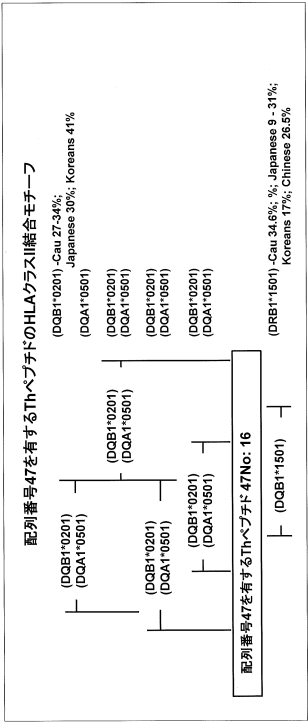
【図 3 A】

図3A

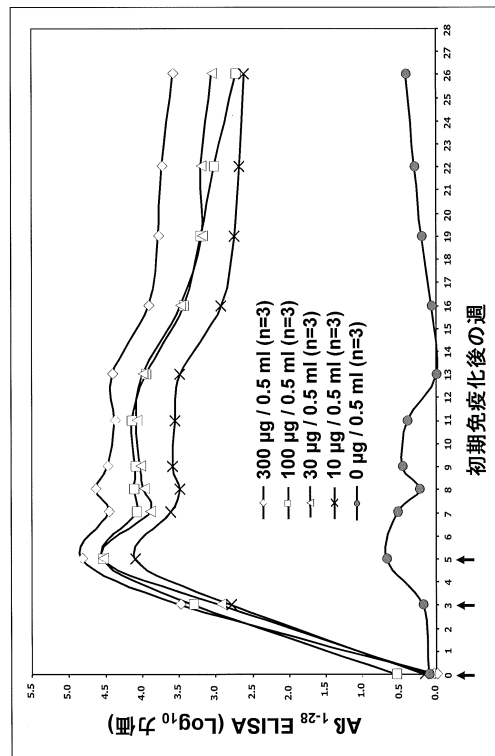


【図 3 B】

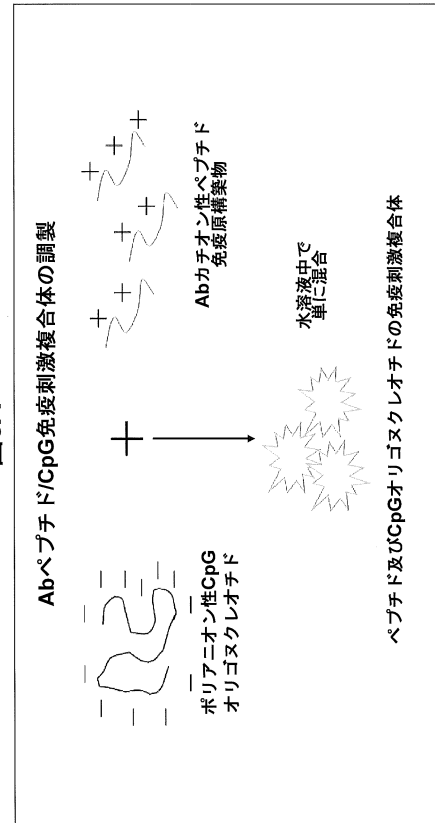
図3B



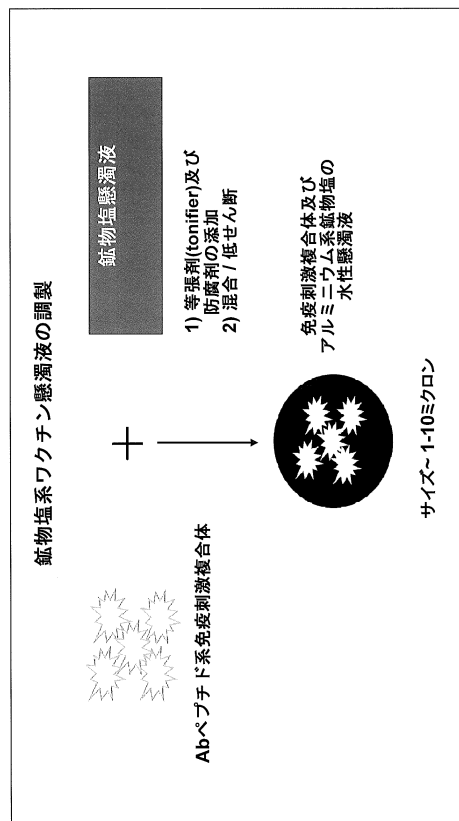
【図 4】



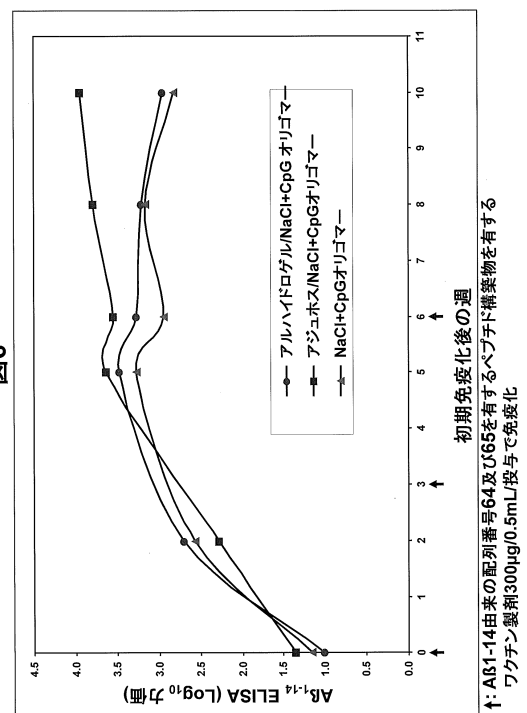
【図 5 A】



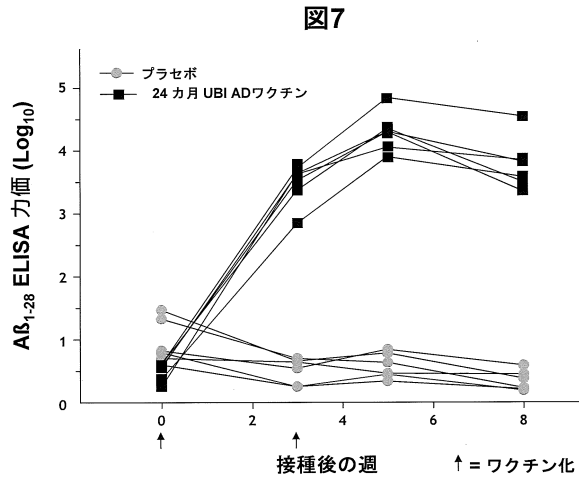
【図 5 B】



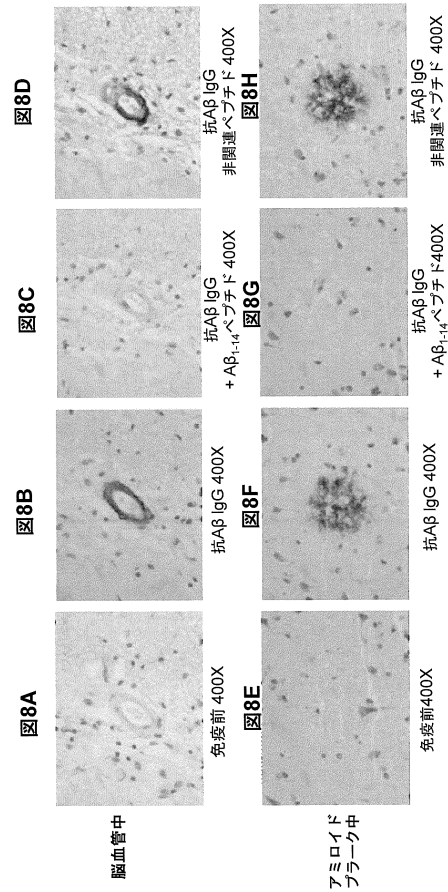
【図 6】



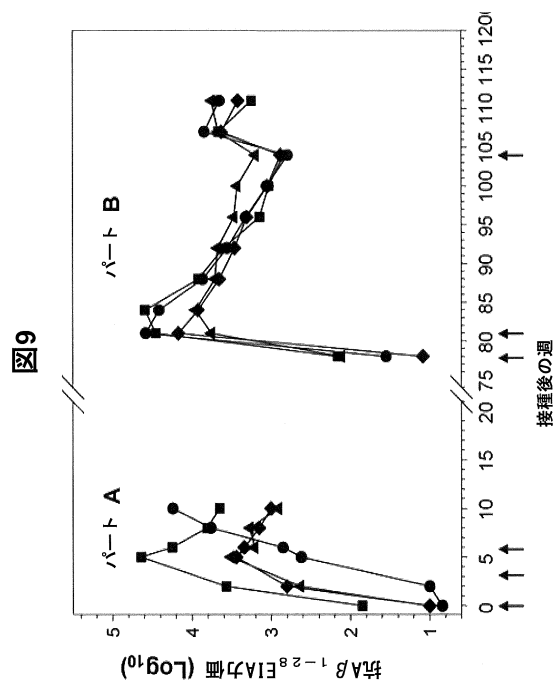
【図 7】



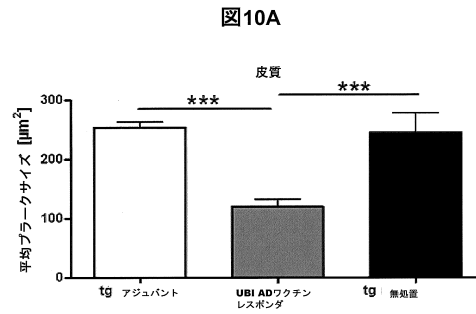
【図 8】



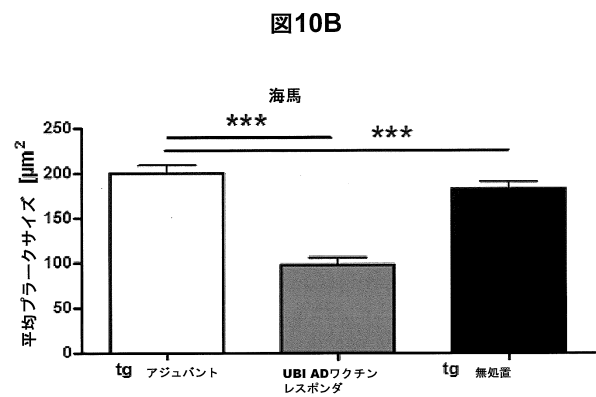
【図 9】



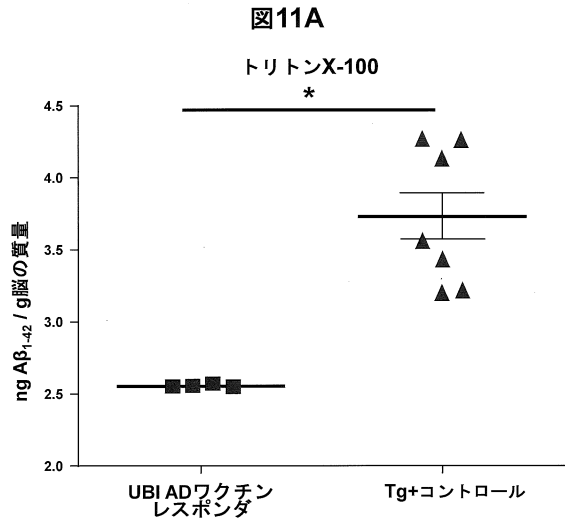
【図 10 A】



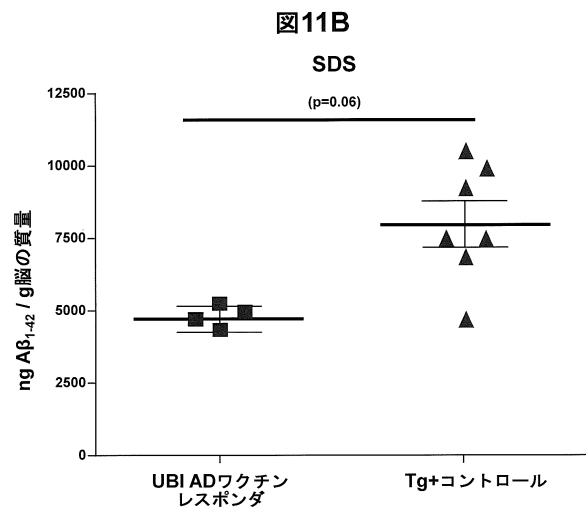
【図 10 B】



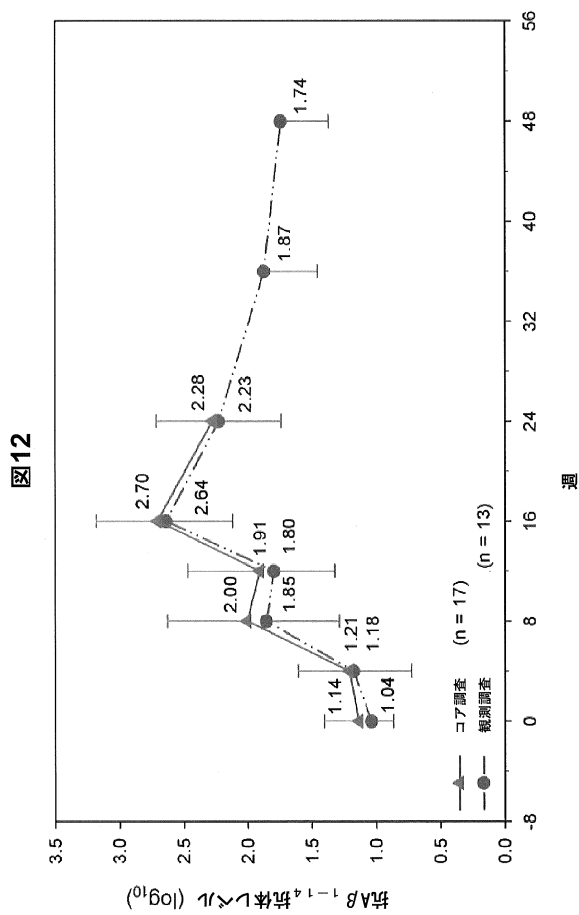
【図 1 1 A】



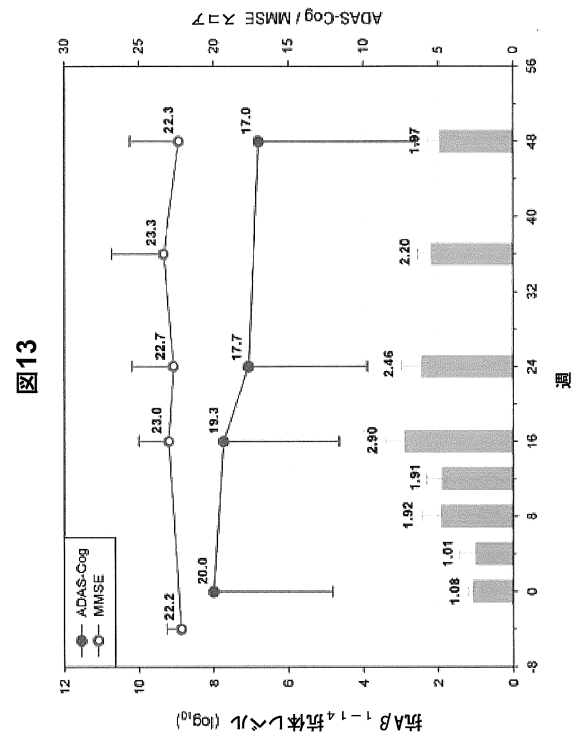
【図 1 1 B】



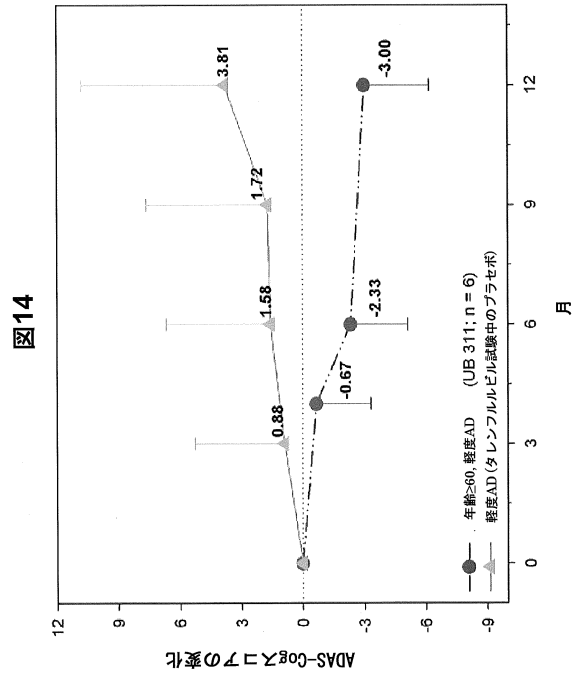
【図 1 2】



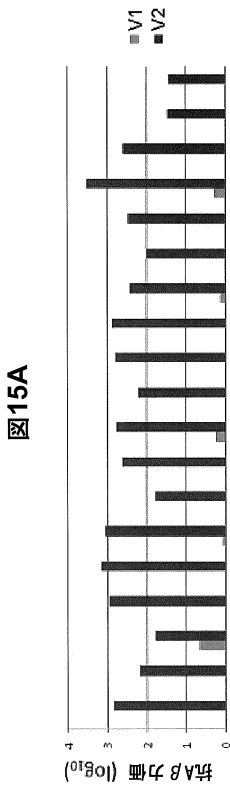
【図 1 3】



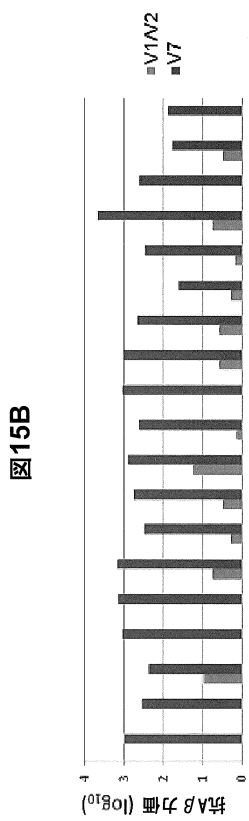
【 図 1 4 】



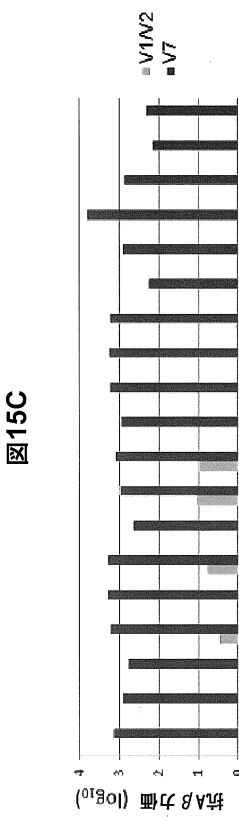
【 図 1 5 A 】



【 図 1 5 B 】

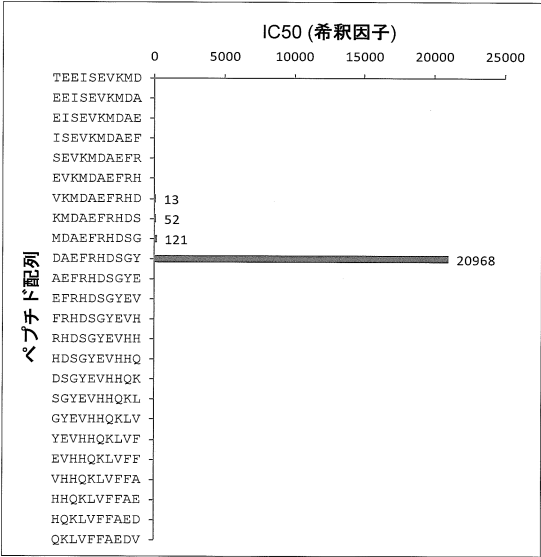


【 図 1 5 C 】



【図 16】

図16



【配列表】

0006208319000001.app

0006208319000002.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 39/385 (2006.01) A 6 1 K 39/385
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(74)代理人 100180873

弁理士 田村 慶政

(72)発明者 ワン、チャン イ

アメリカ合衆国ニューヨーク州 11724、コールド スプリング ハーバー、47 スネーク
ヒル ロード

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 特表2005-506311(JP,A)
特表2011-522840(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q