

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5823663号
(P5823663)

(45) 発行日 平成27年11月25日(2015.11.25)

(24) 登録日 平成27年10月16日(2015.10.16)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 Z N A H
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/02

請求項の数 60 (全 104 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-556626 (P2008-556626)	(73) 特許権者	508265011
(86) (22) 出願日	平成19年3月5日(2007.3.5)		プロミス ニューロサイエンシズ インコ ーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2009-529498 (P2009-529498A)		カナダ国 オンタリオ州 ミシサウガ ア メリカン ドライブ 3403
(43) 公表日	平成21年8月20日(2009.8.20)	(73) 特許権者	508265055
(86) 国際出願番号	PCT/CA2007/000346		ユニバーシティー ヘルス ネットワーク
(87) 国際公開番号	W02007/098607		カナダ国 オンタリオ州 トロント エリ ザベス ストリート 190 アール. フ レーザー エリオット ビルディング ル ーム 1 エス-417
(87) 国際公開日	平成19年9月7日(2007.9.7)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成22年3月2日(2010.3.2)		弁理士 清水 初志
審判番号	不服2014-3883 (P2014-3883/J1)	(74) 代理人	100119507
審判請求日	平成26年2月28日(2014.2.28)		弁理士 刑部 俊
(31) 優先権主張番号	60/778,379		最終頁に続く
(32) 優先日	平成18年3月3日(2006.3.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	11/367,609		
(32) 優先日	平成18年3月3日(2006.3.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 ミスフォールド SOD1 媒介疾患を処置および検出するための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

処置を必要とする被験体におけるヒトスーパーオキシドジスムターゼ1(ヒトSOD1)のミスフォールド型によって媒介される医学的状態、疾患、または障害の処置における使用のための医薬であって、(1)ヒトスーパーオキシドジスムターゼ1(ヒトSOD1)のミスフォールド型において選択的に提示されるかまたは近づくことができるエピトープに選択的に結合する外因性の抗体またはその断片、または(2)ヒトSOD1のミスフォールド型において選択的に提示されるかまたは近づくことができるエピトープに選択的に結合する内因性の抗体の産生を誘発する免疫原 から選択される物質であって、エピトープが野生型配列を有し、抗体がヒトSOD1の天然のフォールド型に比べて、ヒトSOD1のミスフォールド型において選択的に提示されるかまたは近づくことができるエピトープに少なくとも2倍、より効率的に結合する、前記物質を含有する医薬。

【請求項 2】

医学的状態、疾患、または障害が、神経変性状態、疾患、または障害である、請求項1記載の医薬。

【請求項 3】

神経変性状態、疾患、または障害がALS、アルツハイマー病、またはパーキンソン病を含む、請求項2記載の医薬。

【請求項 4】

ALSが散発性ALSまたは家族性ALSである、請求項3記載の医薬。

【請求項 5】

ヒトSOD1のミスフォールド型が、ヒトSOD1単量体および/またはヒトSOD1単量体を含む凝集体を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 6】

ヒトSOD1単量体が野生型ヒトSOD1単量体を含む、請求項5記載の医薬。

【請求項 7】

抗体が、SEQ ID NO: 1または4で表されるエピトープに選択的に結合する、請求項1～6のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 8】

抗体が、SEQ ID NO: 8で表されるエピトープに選択的に結合する、請求項1～6のいずれか一項記載の医薬。

10

【請求項 9】

抗体が、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、またはヒト化抗体を含む、請求項1～8のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 10】

抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ミニボディ、ディアボディ、もしくはその多量体、または二重特異性抗体断片である、請求項1記載の医薬。

【請求項 11】

ヒトSOD1単量体またはヒトSOD1単量体を含む凝集体に選択的に結合する内因性の抗体を誘発する免疫原を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の医薬。

20

【請求項 12】

免疫原が、SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 4の全てまたはそのうちの少なくとも7個の連続したアミノ酸からなる単離ペプチドまたはその類似体を含み、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、請求項1～4または11のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 13】

免疫原が、SEQ ID NO: 8の全てまたはそのうちの少なくとも7個の連続したアミノ酸からなる単離ペプチドまたはその類似体を含み、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、請求項1～4または11のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 14】

30

ヒトSOD1のミスフォールド型がミスフォールドヒトSOD1二量体である、請求項1～4のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 15】

ミスフォールドヒトSOD1二量体が野生型ヒトSOD1二量体である、請求項14記載の医薬。

【請求項 16】

物質が、ミスフォールドヒトSOD1二量体によって提示されたエピトープに選択的に結合する外因性の抗体を含む、請求項1～4、14、または15のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 17】

外因性の抗体が、SEQ ID NO: 2、3、5、6、または7の全てまたはそのうちの少なくとも7個の連続したアミノ酸に結合する、請求項1～4、9、10、または14～16のいずれか一項記載の医薬。

40

【請求項 18】

ミスフォールド二量体ヒトSOD1によって提示されたエピトープに選択的に結合する内因性の抗体を誘発する免疫原を含む、請求項1～4または14～16のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 19】

免疫原が、SEQ ID NO: 2、3、4、5、6、または7の全てまたはそのうちの少なくとも7個の連続したアミノ酸からなる単離ペプチドまたはその類似体を含み、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、請求項1～4、14、15、または18のいずれか一項記載の医薬。

【請求項 20】

50

(2)の物質が、物質の免疫原性を増強する分子に共役される、請求項1～6または11～15、または18のいずれか一項記載の医薬。

【請求項21】

分子が、キーホールリンペットヘモシアニンを含む、請求項20記載の医薬。

【請求項22】

ヒトスーパーオキシドジスムターゼ1(ヒトSOD1)のミスフォールド型によって媒介される医学的状态、疾患、または障害を有する被験体の処置において有用な薬学的組成物であって、薬学的に許容される媒体と、(1)ヒトSOD1のミスフォールド型において選択的に提示されるかまたは近づくことができるエピトープに選択的に結合する外因性の抗体、または(2)ヒトSOD1のミスフォールド型において選択的に提示されるかまたは近づくことができるエピトープに選択的に結合する内因性の抗体の被験体による産生を誘発する免疫原から選択される物質とを含み、エピトープが野生型配列を有し、抗体がヒトSOD1の天然のフォールド型に比べて、ヒトSOD1のミスフォールド型において選択的に提示されるかまたは近づくことができるエピトープに少なくとも2倍、より効率的に結合する、薬学的組成物。

10

【請求項23】

前記物質が、請求項11～13または18～21のいずれか一項で定義される通りである、請求項22記載の薬学的組成物。

【請求項24】

前記物質が、請求項7～10、16、および17のいずれか一項で定義される通りである、請求項22記載の薬学的組成物。

20

【請求項25】

ヒトSOD1のミスフォールド型が、ヒトSOD1単量体またはヒトSOD1単量体を含む凝集体である、請求項22、23、または24のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項26】

ヒトSOD1単量体が野生型ヒトSOD1単量体である、請求項22、23、または24のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項27】

外因性の抗体が、ヒトSOD1二量体界面においてエピトープに選択的に結合する、請求項22または24記載の薬学的組成物。

30

【請求項28】

免疫原が、ヒトSOD1単量体および/またはその凝集体に選択的に結合する内因性抗体を誘発する、請求項22または23記載の薬学的組成物。

【請求項29】

免疫原が、SEQ ID NO:1の全てまたはそのうちの少なくとも7個の連続したアミノ酸からなる単離ペプチドまたはその類似体を含み、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、請求項22または23記載の薬学的組成物。

【請求項30】

免疫原が、SEQ ID NO:8の全てまたはそのうちの少なくとも7個の連続したアミノ酸からなる単離ペプチドまたはその類似体を含み、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、請求項22または23記載の薬学的組成物。

40

【請求項31】

免疫原が、SEQ ID NO:4の全てまたはそのうちの少なくとも7個の連続したアミノ酸からなる単離ペプチドまたはその類似体を含み、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、請求項22または23記載の薬学的組成物。

【請求項32】

ヒトSOD1のミスフォールド型がミスフォールドヒトSOD1二量体である、請求項22、23、または24のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項33】

ミスフォールドヒトSOD1二量体がミスフォールド野生型ヒトSOD1二量体である、請求項22

50

または23のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項34】

物質が、ミスフォールド二量体ヒトSOD1によって提示されるエピトープに選択的に結合する外因性の抗体である、請求項22または23記載の薬学的組成物。

【請求項35】

アジュバントをさらに含む、請求項22、23、または28～31のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項36】

SEQ ID NO: 1～8の全てまたはそのうちの少なくとも7個の連続したアミノ酸からなるヒトSOD1エピトープに選択的に結合する抗体を含む、ヒトスーパーオキシドジスムターゼ1(ヒトSOD1)のミスフォールド型によって媒介される医学的状態、疾患、または障害を有する被験体の処置において有用な薬学的組成物。

10

【請求項37】

カナダの国際寄託機関に寄託されているアクセッション番号280207-01、220207-01、および220207-02から選択されるハイブリドーマによって産生される外因性の抗体を含む、請求項36記載の薬学的組成物。

【請求項38】

(1) SEQ ID NO: 5、6、または8の全てまたはそのうちの少なくとも7個の連続したアミノ酸からなる単離ペプチドまたはその類似体を含む免疫原を得る段階、および (2) 非ヒト被験体をそれによって免疫する段階を含む、抗体を調製するための方法であって、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、前記方法。

20

【請求項39】

(1) SEQ ID NO: 1、4、または7の全てまたはそのうちの少なくとも7個の連続したアミノ酸からなる単離ペプチドまたはその類似体を含む免疫原を得る段階、および (2) 非ヒト被験体をそれによって免疫する段階を含む、抗体を調製するための方法であって、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、前記方法。

【請求項40】

抗体産生ハイブリドーマを形成する段階をさらに含む、請求項38または39記載の方法。

【請求項41】

SEQ ID NO: 5、6、または8の全てまたはそのうちの少なくとも7個の連続したアミノ酸からなる単離ペプチドまたはその類似体を含む、免疫原であって、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、前記免疫原。

30

【請求項42】

SEQ ID NO: 1、4、または7の全てまたはそのうちの少なくとも7個の連続したアミノ酸からなる単離ペプチドまたはその類似体を含む、免疫原であって、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、前記免疫原。

【請求項43】

SEQ ID NO: 1、4、または7のアミノ酸配列からなる単離ペプチドまたはその類似体であって、類似体が1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、前記単離ペプチドまたはその類似体。

40

【請求項44】

SEQ ID NO: 8のアミノ酸配列からなる単離ペプチド。

【請求項45】

SEQ ID NO: 5、6、および8からなる群より選択される単離ペプチドまたはその類似体に選択的に結合する、単離抗体であって、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、前記単離抗体。

【請求項46】

SEQ ID NO: 1、4、および7からなる群より選択される単離ペプチドまたはその類似体に選択的に結合する、単離抗体であって、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、前記単離抗体。

50

【請求項 47】

カナダの国際寄託機関に寄託されているアクセッション番号280207-01、220207-01、および220207-02から選択されるハイブリドーマ。

【請求項 48】

請求項47記載のハイブリドーマを培養する段階を含む、請求項46記載の抗体を産生するための方法。

【請求項 49】

SEQ ID NO: 1、4、または7からなる単離ペプチドまたはその類似体と、担体とを含む、組成物であって、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、前記組成物。

10

【請求項 50】

SEQ ID NO: 8からなる単離ペプチドまたはその類似体と、担体とを含む、組成物であって、類似体が、1つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む、前記組成物。

【請求項 51】

請求項49または50記載の組成物を投与することによって、非ヒト被験体における免疫応答を誘発する方法。

【請求項 52】

(a) 抗体が疾患特異的エピトープに結合して抗体-抗原複合体を形成する、請求項45または46記載の抗体のいずれか一つに、被験体の試験試料を接触させる段階； (b) 試験試料中の抗体-抗原複合体の量を測定する段階；および (c) 試験試料中の抗体-抗原複合体の量を対照と比較する段階を含む、被験体におけるヒトスーパーオキシドジスムターゼ(ヒトSOD1)のミスフォールド型を検出する方法であって、対照と比較して試験試料中の抗体-抗原複合体の量に差があれば、ヒトスーパーオキシドジスムターゼ(ヒトSOD1)のミスフォールド型によって媒介される医学的状態、疾患、または障害を有する被験体であることが示される、方法。

20

【請求項 53】

疾患特異的エピトープが、ヒトSOD1の非天然型において選択的に提示されるかまたは近づくことができ、かつSEQ ID NO:1、4~8のいずれか一つのアミノ酸配列を有する、請求項52記載の方法。

【請求項 54】

段階(a)の前にヒトSOD1凝集体を脱凝集する段階をさらに含む、請求項52または53記載の方法。

30

【請求項 55】

医学的状態、疾患、または障害が、アルツハイマー病、パーキンソン病、レヴィー小体病、またはALSを含む、請求項52~54のいずれか一項記載の方法。

【請求項 56】

アルツハイマー病に関する従来の診断技術を用いて被験体を評価する段階をさらに含む、請求項55記載の方法。

【請求項 57】

ヒトスーパーオキシドジスムターゼ(ヒトSOD1)のミスフォールド型によって媒介される医学的状態、疾患、または障害を有する被験体を診断するためのキットであって、請求項45または46記載の抗体のいずれか一つと、それを使用するための説明書とを含む、キット。

40

【請求項 58】

ヒトSOD1のミスフォールド型が、ヒトSOD1の非天然型において選択的に提示されるかまたは近づくことができるエピトープを含み、エピトープが、SEQ ID NO:1、4~8のいずれか一つのアミノ酸配列を有する、請求項57記載のキット。

【請求項 59】

検出可能なシグナルを産生する標識(2)に直接または間接的に付着する請求項45または46記載の抗体(1)を含む診断物質であって、標識が任意で、放射性同位体、蛍光化合物、

50

化学発光化合物、酵素、造影剤、または金属イオンを含む、診断物質。

【請求項 60】

免疫原がペプチド免疫原を含む、請求項1～6、12～15、または18～21のいずれか一項記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その全内容物が参照によりそれぞれ本明細書に組み入れられる、2006年5月9日に提出された米国特許仮出願第60/798,727号、2006年5月9日に提出された米国特許仮出願第60/798,728号、および2006年3月3日に提出された米国特許仮出願第60/778,379号の恩典を主張する。

10

【0002】

発明の分野

本発明は、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、およびパーキンソン病を含む非天然SOD1によって媒介される状態、疾患、および障害を処置および検出するための方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

タンパク質のミスフォールディングおよび凝集

20

タンパク質は、複雑で精密に詰められた構造に折り畳まれうる。フォールディングは生物活性にとって非常に重要であるのみならず、タンパク質が適切に折り畳まれないまたは折り畳まれたままであると、疾患を生じうる（48において論評）。いくつかの場合において、ミスフォールディングは、タンパク質の凝集を引き起こし、これはさらに細胞外（たとえば、プラーク）または細胞内に（サイトソルまたは核における封入体）に孤立性の沈着物を生じうる。

【0004】

アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、ハンチントン病（HD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、およびプリオン病のような神経変性疾患は、ミスフォールドされた凝集タンパク質の神経沈着を特徴とする（49において参照）。

30

【0005】

アルツハイマー病（AD）、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、およびパーキンソン病/レヴィー小体痴呆（PD、LBD）のような神経変性疾患はまた、加齢集団および健康保険システムに対する主要な難題を提起する。

【0006】

散発性AD、ALS、およびPD/LBDは全て、ADにおけるアミロイド前駆体タンパク質（APP）のアミロイド β （ $A\beta$ ）断片；ALS、AD、およびPDにおけるスーパーオキシドジスムターゼ-1（SOD1）、ならびにPDおよびLBDにおける α -シヌクレインが含まれる、ミスフォールドポリペプチドの病的多量体（これらはおそらく原線維、プロトフィラメント、および無定形凝集体となりうる）の神経蓄積に関連している。さらに、家族性アミロイド性多発神経障害（FAP）は、トランスチレチンの凝集に起因してアミロイド沈着物を形成する。プリオン疾患の場合のように、これらのポリペプチドをコードする遺伝子における変異は、AD、ALS、およびPDの常染色体優性家族型に関連する。

40

【0007】

ALSおよびタンパク質のミスフォールディング

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、北米において患者約30,000人に罹患する致死的な神経筋疾患であり、毎年5,000人の新たな症例が存在する。「ルー・ゲーリグ病」としても知られるALSでは、四肢、言語および嚥下、ならびに呼吸の筋肉が、脊髄および脳からそれらに供給する運動神経細胞の変性により弱化して萎縮する。罹患患者の半数が3年以内に死亡し、5年より長く生存するのは20%未満である。

50

【 0 0 0 8 】

ALSは、プリオン病、アルツハイマーおよびパーキンソン病が含まれる致死的な神経変性障害ファミリーに属し、それらの障害では、凝集したミスフォールドタンパク質が進行性の脳細胞の殺細胞を引き起こすと考えられている。家族性（遺伝性）ALSの約20%が、細胞内フリーラジカル防御酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ1（SOD1）をコードする遺伝子の変異に関連する（公知の変異の一覧に関して73および表1を参照されたい）。凝集したミスフォールドSOD1の細胞内沈着は、家族性ALSにおいて、同様により一般的な非家族性（散発性）ALSにおいても観察されており、SOD1凝集が全てのALSの根底にある可能性があることを示唆している。

【 0 0 0 9 】

10

細胞培養およびヒト変異体SOD1に関してトランスジェニックであるマウスにおいて行われた実験により、細胞外ミスフォールドSOD1が、部分的に局所免疫細胞（小膠細胞）による殺細胞経路の活性化によって、運動神経に対して非常に毒性が強い（1）ことが確立された。最近、ミスフォールドSOD1は分泌および構成的機構の双方によって細胞から輸出されることも同様に明白となった（1,2）。

【 0 0 1 0 】

SOD1の凝集は、プリオン病に関して提唱されている機構（4）と類似の、タンパク質に基づく鋳型特異的ミスフォールド機構（3）を通して進行する可能性がある。このように、細胞外間隙におけるミスフォールドSOD1は、運動神経に対して直接毒性であるのみならず、プリオン様の鋳型ミスフォールディングプロセスによって神経系全体の細胞から細胞

20

【 0 0 1 1 】

（表1）FALSにおいて検出されたSOD1の変異

アミノ酸	変異	アミノ酸	変異	アミノ酸	変異
4	A → S (FALSにおいて)	67	L → R (FALSにおいて)	112	I → M (FALSにおいて)
4	A → T (FALSにおいて)	72	G → S (FALSにおいて)	112	I → T (FALSにおいて)
4	A → V (FALSにおいて)	76	D → Y (FALSにおいて)	113	I → T (FALSにおいて)
6	C → F (FALSにおいて)	80	H → A (ALSにおいて)	114	G → A (FALSにおいて)
7	V → E (FALSにおいて)	84	L → F (FALSにおいて)	115	R → G (FALSにおいて)
8	L → Q (FALSにおいて)	84	L → V (FALSにおいて)	118	V → VFLQ (FALSにおいて)
8	L → V (FALSにおいて)	85	G → R (FALSにおいて)	124	D → V (FALSにおいて)
12	G → R (FALSにおいて)	86	N → S (FALSにおいて)	125	D → H (FALSにおいて)
14	V → G (FALSにおいて)	89	A → V (FALSにおいて)	126	L → S (FALSにおいて)
14	V → M (FALSにおいて)	90	D → A (FALSにおいて)	133	欠失 (ALSにおいて)
16	G → S (ALSにおいて)	90	D → V (FALSにおいて)	134	S → N (FALSにおいて)
21	E → G (FALSにおいて)	93	G → A (FALSにおいて)	139	N → K (FALSにおいて)
21	E → K (FALSにおいて)	93	G → C (FALSにおいて)	144	L → F (FALSにおいて)
37	G → R (FALSにおいて)	93	G → D (FALSにおいて)	144	L → S (FALSにおいて)
38	L → R (FALSにおいて)	93	G → R (FALSにおいて)	145	A → T (FALSにおいて)
38	L → V (FALSにおいて)	93	G → V (FALSにおいて)	146	C → R (FALSにおいて)
41	G → D (FALSにおいて)	100	E → G (FALSにおいて)	148	V → G (FALSにおいて)
41	G → S (FALSにおいて)	100	E → K (FALSにおいて)	148	V → I (FALSにおいて)
43	H → R (FALSにおいて)	101	D → G (FALSにおいて)	149	I → T (FALSにおいて)
45	F → C (FALSにおいて)	101	D → N (FALSにおいて)	151	I → T (FALSにおいて)
46	H → R (FALSにおいて)	104	I → F (FALSにおいて)		
48	H → Q (FALSにおいて)	105	S → L (FALSにおいて)		
49	E → K (FALSにおいて)	106	L → V (FALSにおいて)		
65	N → S (FALSにおいて)	108	G → V (FALSにおいて)		

【 0 0 1 2 】

アルツハイマー病

ADは、その全てがAPPのタンパク質分解産物である（50において論評）Aβ（1-40）、Aβ（1-42）、およびAβ（1-43）ペプチドで主に構成される細胞外プラークの脳の蓄積に関連する一般的な痴呆性（記憶および認知障害）の神経変性疾患である。さらに、異常にリン酸化されたタウタンパク質（神経微小管関連タンパク質）で主に構成される神経細線維もつれが、死につつあるニューロンの細胞内に蓄積する（49において論評）。家族型のADは、APP遺伝子における変異、またはそのタンパク質産物がAPPのAβへのプロセッシングに関係しているプレセニリン1もしくは2遺伝子における変異によって引き起こされうる（51において論評）。アポリポタンパク質E対立遺伝子変種も同様に、散发性および家族型ADの双方の発症年齢に影響を及ぼす（52において論評）。Aβ、タウおよびリン酸化タウは、AD患者および正常対照の血液およびCSFにおいて検出されている（53～55）。Aβによるアルツハイマー病患者の免疫は、何らかの有望な予備的処置結果を示したが、ヒトにおける自己免疫性髄膜脳炎に限定された（56～58）。

【 0 0 1 3 】

パーキンソン病

10

20

30

40

50

PDは、ADに次いで発生率が高い（100,000人に～350人；59において論評）神経変性性の運動障害である。これは、臨床的に硬直、運動緩徐および振せんを特徴とする。パーキンソン病のほとんどの症例は散発性であるが、疾患の散発性および家族型はいずれも、PDにおいて選択的に破壊される中脳ニューロンの集団（～60,000）である黒質の死につづあるニューロンにおける細胞内レヴィー小体の特徴とする。レヴィー小体は、主に α -シヌクレインで構成される（60）。 α -シヌクレインをコードする遺伝子の変異および複製は、家族性のパーキンソン病患者において見いだされている（61において論評）。常染色体劣性PDに関連するもう一つの遺伝子は、 α -シヌクレイン分解に関係するparkinである（61）。 α -シヌクレインで構成されるびまん性の皮質レヴィー小体は、レヴィー小体病（LBD）、パーキンソン様の緊張変化、幻覚、および急激な症状の変動に関連する痴呆症候群（62）において観察されている。LBDはADに次いで最も一般的な神経変性性の痴呆症である可能性があり、年齢60歳より上の人における症例の20～30%を占める。アルツハイマー病に対するワクチンアプローチ（58～60）と同様に、パーキンソン/レヴィー小体病のマウスモデルにおいて、 α -シヌクレインによる免疫によって有望な結果が得られている（63）。他の痴呆症候群には、前頭側頭性痴呆、ピック病、および皮質基底核痴呆、ならびに神経医学において公知の他の疾患が含まれる。

【0014】

SOD1はADおよびPDタンパク質凝集体において検出されている

酸化ストレスは、ALS、PDおよびADを含むいくつかの神経変性疾患に関係している。これらの環境において生成された反応性酸素および窒素種（それぞれ、ROSおよびRNS）は、タンパク質または脂質の異常な酸化が含まれる細胞損傷に関連する可能性がある。そのような疾患の他の病理的特徴には、しばしば酸化ストレスに起因する細胞骨格破片の蓄積および選択的ニューロン死、ならびに不溶性タンパク質の蓄積が含まれる（74～81）。SOD1が含まれるいくつかの酵素は抗酸化剤の役割を有する。そのような酵素の活性の変更は、神経変性疾患状態に寄与する可能性がある。

【0015】

最近、Choiら（64）は、SOD1がADおよびPDの脳における酸化損傷の主要な標的であることを報告した。彼らは、SOD1の総レベルがADおよびPDの双方において増加していること、ならびにSOD1がAD脳におけるアミロイド老人斑および神経細線維もつれに関連するタンパク質凝集体を形成することに注目した。Choiら（64）は、AD、PD、およびALSが共通の病原性メカニズムを共有する可能性があることを示唆した。同様に最近、SOD1が、ニューロンに対して毒性であるが細胞外治療物質によってより近づきやすい型で細胞外間隙に分泌されることが示されている（1）。

【0016】

細胞外のミスフォールドSOD1がALSの発病において役割を果たしていることの意味は、この区画が抗体の中和によって近づきやすいことから、神経変性疾患を抗体によって処置する機会を提供する。正常なヒトにおいて、IgGは、循環濃度の1/100～1/1000のレベルで血液脳関門を通過することができ、免疫グロブリンの漏出はしばしば血液脳関門に罹患する疾患において増加する。しかし、遍在するタンパク質上の近づくことができる細胞外エピトープを標的とする抗体またはワクチンによってヒト患者を処置すると、アルツハイマー病における $A\beta$ において見られるような有害な自己免疫効果に至る可能性がある。このように、ALS、AD、およびPDのようなミスフォールドSOD1関連疾患を診断および処置するための組成物および方法が当技術分野において必要である。

【発明の開示】

【0017】

発明の概要

ミスフォールドSOD1はニューロンに対して毒性であり（1）、ニューロンの細胞死、ならびに筋萎縮性側索硬化症および他の神経変性疾患における機能障害に関与すると考えられている。本発明は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、およびレヴィー小体病（LBD）が含まれるこれらの疾患に関するワクチン

10

20

30

40

50

または免疫療法の標的としてSOD1疾患特異的エピトープ（DSE）を用いる。本発明は、ALSおよび他の神経変性疾患のようなSOD1媒介状態、疾患および障害に関連する、SOD1の非天然型によって選択的に提示されるエピトープを単離および標的とする。これらのエピトープは、天然型のSOD1において提示されず、または近づくことができない。たとえば、ALS特異的、AD特異的、およびPD特異的エピトープのような疾患特異的エピトープは、SOD1の天然の二量体型によって提示されない。しかし、疾患特異的エピトープは、SOD1単量体はその正常なホモ二量体状態に会合することができないか、またはホモ二量体状態から解離した場合、ならびにミスフォールドSOD1単量体、ミスフォールドSOD1二量体、およびSOD1凝集体が含まれるSOD1の他の非天然型で、提示されるまたは近づくことができる。これらのエピトープは、SOD1の非天然型において選択的に提示され、または近づくことができ、非天然型SOD1関連病態、疾患、および障害の特徴である。

10

【0018】

本出願において、「ALS特異的」エピトープは、SOD1のALS関連型において提示されるエピトープを指し、「AD特異的」エピトープは、SOD1のAD関連型において提示されるエピトープを指し、および「PD特異的」エピトープは、ミスフォールディング、凝集、または解離のようなプロセスによって生じるSOD1のPD-関連型において提示されるエピトープを指す。ミスフォールドSOD1は、ALS、ADおよびPDのそれぞれにおいて多くの同じエピトープを表す。しかし、エピトープは、特定の被験体の体内で、神経変性疾患を引き起こす、その基礎となる、またはそれに関連する非天然の毒性SOD1上に限って特異的に提示されることから、本明細書において簡便のために、エピトープはその疾患に対して「特異的」とであると記述される。このように、そのような疾患特異的エピトープには、SOD1単量体とその正常なホモ二量体状態から解離する場合に出現するSOD1単量体上のエピトープ、ミスフォールドSOD1単量体、ミスフォールドSOD1二量体が含まれる非天然SOD1型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープ、およびSOD1凝集体において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープが含まれる。

20

【0019】

特定の態様において、SOD1の非天然型において提示されるまたは近づくことができるエピトープには：

DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) (WO 2005/019828);

30

NPLSRKHGGPKDEE (DSE3) (WO 2005/019828);

IKGLTEGLHGF (DSE5) (8);

HCIIGRTLTVH (DSE 6) (8); および

GLHGFHVH (DSE7)

と共に、

RLACGVIGI (DSE1); および

KAVCVLK (DSE4)

が含まれる、SOD1の単量体型に限って提示されるまたは近づくことができるさらなるエピトープが含まれる。

40

【0020】

本発明は、免疫治療的介入の標的として、これらのエピトープおよび/またはこれらのエピトープに含有される抗原性決定基、ならびにSOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができる任意のエピトープを用いる。たとえば、これらのエピトープに対応する単離されたペプチドは、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、および/またはパーキンソン病のようなミスフォールドSOD1関連障害の特徴である、SOD1凝集体における単量体、二量体、またはミスフォールドSOD1の関与を低減または阻害するために有用である。したがって、これらのエピトープに対応する単離ペプチドは、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、および/またはパーキンソン病を処置するために用いることが

50

でき、単量体、凝集またはミスフォールドSOD1分子に対して動物において選択的免疫応答を誘発するために用いることができ、ならびにニューロンに及ぼすこれらのミスフォールドSOD1種の毒性効果を阻害または中和するために用いることができる。疾患特異的エピトープに対応する単離ペプチドをワクチンにおいて用いる場合、単離ペプチドは、そのエピトープに対して内因性の抗体を生じる注目された単離ペプチドの任意の類似体となりうる。さらに、本発明者らは、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに結合する抗体および断片、アルツハイマー病特異的エピトープに結合する抗体および断片、ならびにパーキンソン病特異的エピトープに結合する抗体および断片のような結合タンパク質を提供する。これらの抗体は、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、およびパーキンソン病を検出または処置するために用いることができる。

10

【0021】

したがって、本発明には、単量体またはミスフォールドSOD1によって媒介されるSOD1凝集を阻害するために有用な、ならびに筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、および/またはパーキンソン病のような神経変性疾患が含まれるSOD1障害を処置するために有用な組成物が含まれる。

【0022】

したがって、本発明の一つの局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるもしくは近づくことができるエピトープ（任意で疾患特異的エピトープと呼ばれる）に対応する単離ペプチド、またはそのようなペプチドを含む免疫原の有効量を、薬学的に許容されるような適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体におけるALS、AD、またはPDのような神経変性疾患を処置するための組成物である。本発明のもう一つの局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるもしくは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチド、またはそのエピトープもしくはそのような単離ペプチドを含む免疫原に結合する内因性の抗体を誘発するその類似体の有効量を、薬学的に許容されるような適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体におけるALSを処置するための組成物である。本発明のさらなる局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるもしくは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチド、またはそのエピトープに結合するもしくはそのような単離ペプチドもしくは類似体を含む免疫原に結合する内因性の抗体を誘発するその類似体の有効量を、薬学的に許容されるような適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体におけるADを処置するための組成物である。本発明のなおさらなる局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるもしくは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチド、またはそのような単離ペプチドを含む免疫原の有効量を、薬学的に許容されるような適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体におけるPDを処置するための組成物である。

20

30

【0023】

好ましい態様において、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドは、表2または表2A（下記）における単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される。

【0024】

（表2）SOD1の非天然型において選択的に近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチド

40

RLACGVIGI (SEQ ID NO: 1, DSE1);
 DLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 2, DSE2);
 NPLSRKHGGPKDEE; (SEQ ID NO: 3, DSE3);
 IKGLTEGLHGF; SEQ ID NO: 5, DSE5);
 HCIIGRTLTVH; SEQ ID NO: 6, DSE6);
 RLA[システイン酸]GVIGI (DSE1a); SEQ ID NO: 8, DSE1a);
 KAVCVLK (DSE4); SEQ ID NO: 4, DSE4) および
 GLHGFHVH (DSE7) SEQ ID NO: 7, DSE7)

10

表2に記載したこれらの単離ペプチドは、本明細書では「表2単離ペプチド」と呼ぶ。

【0025】

本発明の一つの局面は、単離された筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ、またはそのようなエピトープを含む免疫原の有効量を、薬学的に許容されるような適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体における筋萎縮性側索硬化症を処置するための薬学的組成物である。一つの態様において、エピトープまたはその免疫原性型は、SOD1の単量体型において選択的に提示されるまたは近づくことができる。そのようなエピトープには、SOD1二量体界面に通常存在するSOD1単量体エピトープを認識するエピトープが含まれる。他の
 そのようなエピトープは、SOD1単量体がその通常の会合状態である場合、たとえばSOD1がその二量体型である場合、またはその凝集型である場合に、SOD1の表面において近づくことができるエピトープである。特定の態様において、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される。

20

【0026】

本発明のもう一つの局面は、単離されたアルツハイマー病特異的エピトープまたはそのようなエピトープを含む免疫原の有効量を、薬学的に許容されるような適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体におけるアルツハイマー病を処置するための薬学的組成物である。一つの態様において、エピトープまたはその免疫原性型は、SODの単量体型において選択的に提示されるまたは近づくことができる。そのようなエピトープには、SOD二量体界面に通常存在するSOD単量体エピトープを認識するエピトープが含まれる。他の
 そのようなSODエピトープは、その二量体型またはその凝集型である場合のSODの表面において近づくことができるエピトープである。特定の態様において、アルツハイマー病特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2または表2A単離ペプチドからなる群より選択される。

30

【0027】

本発明のさらなる局面は、被験体におけるパーキンソン病を処置するための本発明の薬学的組成物である。

【0028】

単離ペプチドの類似体および改変された単離ペプチドも同様に有用である。類似体および改変単離ペプチドは、SOD1の単量体、ミスフォールド型、または凝集型において対応するエピトープを特異的に認識する抗体の産生誘発能を保持する、SOD1の非天然型において提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するインビボで存在するおよび分子操作ペプチドを含む。一つの態様において、単離ペプチド類似体は、システイン酸を含む。一つの態様において、エピトープに対応する類似体単離ペプチドは、*がシステイン酸の形で酸化システインを指す、RLAC*GVIGI (DSE1a) を含む。

40

【0029】

本発明のさらなる局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドまたは類似体をコードする単離核酸の有効量を

50

、適した希釈剤または担体と混合して含む、SOD1媒介障害、疾患、または状態を処置するための組成物である。本発明のもう一つの局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、筋萎縮性側索硬化症を処置するための組成物である。本発明のさらなる局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、アルツハイマー病またはパーキンソン病を処置するための組成物である。

【0030】

好ましい態様において、核酸は、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチド、またはその類似体からなる群より選択されるエピトープに対応する単離ペプチドをコードする。

10

【0031】

本発明の一つの特定の局面は、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドが表2もしくは表2Aの単離ペプチド、またはその類似体からなる群より選択される、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドをコードする核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、筋萎縮性側索硬化症を処置するための組成物である。

【0032】

これらの組成物は、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、および/またはパーキンソン病を処置するために、ならびに筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、および/またはパーキンソン病を処置するための方法において用いることができる。

20

【0033】

組成物は、ミスフォールドSOD1において提示されるエピトープに対して向けられる免疫療法を用いて神経変性疾患を処置するために特に有用であり、処置は、能動的免疫療法、すなわちエピトープに対応する単離ペプチドが、レシピエントにおける単量体もしくはミスフォールドSOD1を認識する抗体を誘発するために免疫原において用いられるワクチンに基づく治療、またはエピトープに対応する単離ペプチドに対する抗体がレシピエントに投与される受動免疫治療のいずれかを含む。組成物は典型的に薬学的組成物である。

【0034】

したがって、本発明の一つの局面には、SOD1の非天然型において提示されるエピトープに対応する単離ペプチドの有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、動物における免疫応答を誘発するための組成物が含まれる。医学的状態、疾患、または障害には、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、およびパーキンソン病が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

30

【0035】

本発明のもう一つの局面は、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドが、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチド、またはその類似体からなる群より選択される、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドの有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、動物において免疫応答を誘発するための組成物である。

40

【0036】

一つの局面において、組成物は、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチド、または該エピトープに対応するそのような単離ペプチドを含む免疫原の有効量を、薬学的に許容される希釈剤または担体のような適した媒体と混合して含む、能動的免疫によって被験体における筋萎縮性側索硬化症を処置するための薬学的組成物である。一つの態様において、単離ペプチドまたはその免疫原性型は、SOD1の単量体型において選択的に提示され、または近づくことができるエピトープに対応する。そのようなエピトープには、SOD1二量体界面に通常存在するSOD1単量体におけるそれらのエピトープが含まれる。他のそのようなエピトープは、その二量体型である場合、またはSOD1がその凝集型である場合にSOD1の表面において近づくことができるエピトープである。特定の態様において

50

、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチド、またはその類似体からなる群より選択される。

【0037】

本発明のもう一つの局面は、アルツハイマー病特異的エピトープに対応する単離ペプチド、またはそのような単離ペプチドを含む免疫原の有効量を、薬学的に許容されるような、適した希釈剤または担体と混合して含む、能動的免疫によって被験体におけるアルツハイマー病を処置するための薬学的組成物である。一つの態様において、単離ペプチドまたはその免疫原性型は、SOD1の単量体型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する。そのようなエピトープには、SOD1二量体界面に通常存在するSOD1単量体におけるそれらのエピトープが含まれる。他のそのようなエピトープは、その二量体型である場合、またはその凝集型である場合にSOD1の表面において近づくことができるエピトープである。特定の態様において、アルツハイマー病特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチド、またはその類似体からなる群より選択される。

10

【0038】

本発明のもう一つの局面は、パーキンソン病特異的エピトープに対応する単離ペプチド、またはそのような単離ペプチドを含む免疫原の有効量を、薬学的に許容されるような、適した希釈剤または担体と混合して含む、能動的免疫によって被験体におけるパーキンソン病を処置するための薬学的組成物である。一つの態様において、単離ペプチドまたはその免疫原性型は、SOD1の単量体型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する。そのようなエピトープには、SOD1二量体界面に通常存在するSOD1単量体エピトープを認識するエピトープが含まれる。他のそのようなエピトープは、その二量体型である場合、またはその凝集型である場合にSOD1の表面において近づくことができるエピトープである。特定の態様において、パーキンソン病特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチド、またはその類似体からなる群より選択される。

20

【0039】

本発明の一つの局面には、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、動物における免疫応答を誘発するための組成物が含まれる。医学的状態、疾患、または障害は、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、およびパーキンソン病が含まれるがこれらに限定されるわけではない神経変性疾患のようなSOD1障害である。

30

【0040】

本発明のさらなる局面は、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドが、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドをコードする核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、動物における免疫応答を誘発するための組成物である。

【0041】

これらの組成物は、動物において免疫応答を誘発するために有用であり、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ、アルツハイマー病特異的エピトープ、および/またはパーキンソン病特異的エピトープに対する免疫応答が含まれる、動物においてSOD1の非天然型に対して免疫応答を誘発するための方法において有用である。

40

【0042】

これらの組成物は、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ、アルツハイマー病特異的エピトープ、および/またはパーキンソン病特異的エピトープに結合する抗体が含まれる、SOD1の非天然型に対する抗体のような結合タンパク質を生成するために有用である。

【0043】

したがって、本発明には、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ、アルツハイマー病特

50

異的エピトープ、および/またはパーキンソン病特異的エピトープが含まれる、SOD1の非天然型に対して特異的な外因性の抗体が含まれる。

【0044】

一つの態様において、SOD1の非天然型に対して特異的な抗体は、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される疾患特異的エピトープに対応する単離ペプチドを含む組成物を用いて産生される。

【0045】

一つの態様において、抗体はエピトープRLACGVIGIに結合する。もう一つの態様において、抗体は、エピトープ

DLGKGGNEESTKTGNAGS

に結合する。もう一つの態様において、抗体は

NPLSRKHGGPKDEE

に結合する。なおもう一つの態様において、抗体は

IKGLTEGLHGF

に結合する。もう一つの態様において、抗体は、エピトープ

HCIIGRTLWH

に結合する。もう一つの態様において、抗体はエピトープRLAC*GVIGIに結合する。もう一つの態様において、抗体は、エピトープKAVCVLKに結合する。なおもう一つの態様において、抗体はエピトープGLHGFHVHに結合する。

【0046】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、および/またはそのエピトープ結合断片および類似体であってもよい。本発明はさらに、DSE1a、DSE2、およびDSE5に対する抗体を産生するハイブリドーマを含む。本発明の態様には、ハイブリドーマそのものと共にその子孫、それとのもとの後の融合体、ならびにSOD1抗体をコードする内因性のDNAおよびRNAが含まれる。関連する局面において、本発明はこのようにさらに、ハイブリドーマを培養する段階を含む、SOD1抗体を産生するための方法を提供する。これらの抗体は、受動免疫によって筋萎縮性側索硬化症を処置するために有用である。もう一つの態様において、これらの抗体はアルツハイマー病を処置するために有用である。さらなる態様において、これらの抗体はパーキンソン病を処置するために有用である。たとえば、それらは、ニューロンに及ぼすこれらのミスフォールドSOD1種の毒性効果を阻害または中和する、および/またはそれらは、毒性のSOD凝集体を免疫学的に清浄化することによって、ミスフォールドSOD1によって媒介されるSOD1凝集を阻害することによって、および/またはSOD1鑄型特異的ミスフォールディングプロセスを遮断することによって、疾患の進行を予防する。このように、本発明には、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ、アルツハイマー病特異的エピトープ、および/またはパーキンソン病特異的エピトープに対して特異的な抗体の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体における筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、および/またはパーキンソン病を処置するために有用な組成物が含まれる。

【0047】

抗体に加えて、SOD1の非天然型において提示されるまたは近づくことができる、およびSOD1の天然型において提示されないまたは近づくことができないエピトープに対して特異的に結合する他の物質も同様に提供される。結合する物質には、ポリペプチド、低分子、核酸ペプチドアプタマー、アフィボディ、およびAnticalinが含まれる。

【0048】

より一般的に、本発明はこのように、薬学的に許容される媒体と、(1) SOD1の単量体またはミスフォールド型に選択的に結合する抗体またはその断片の型でのタンパク質、および/または(2) 被験体による該抗体の産生を誘発する免疫原、および/または(3) (1) もしくは(2) をコードする核酸配列、から選択される物質とを含む組成物を被験体に投与する段階を含む、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の非天然型によって媒介される医学的状態、疾患、または障害を有する被験体を処置するための方法を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 9 】

本発明の方法はこのように、疾患状態に存在するSOD1の単量体型またはミスフォールド型において近づくことができるエピトープに選択的に結合するSOD1抗体の免疫治療応用に関する。方法は、任意の一つの抗体または任意の一つのエピトープが被験体に投与される単剤療法として行うことができる。代わりの態様において、方法は、被験体がエピトープに対応する選択された抗体またはペプチドと、疾患の処置または管理において有用なもう一つの物質との双方を投与されるように処置される、併用治療として行うことができる。

【 0 0 5 0 】

これらの抗体は、SOD1の単量体、二量体、または凝集型の非天然型を検出するために有用であり、それによって筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、またはパーキンソン病を診断するために有用である。一つの態様において、本発明には、被験体における筋萎縮性側索硬化症を検出または診断する方法が含まれ、本方法は、

(a) 抗体が、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに結合して抗体-抗原複合体を産生する、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに結合に対して特異的な抗体に、被験体の試験試料を接触させる段階；

(b) 試験試料中の抗体-抗原複合体の量を測定する段階；および

(c) 試験試料中の抗体-抗原複合体の量を対照と比較する段階

を含み、対照と比較して試験試料中の抗体-抗原複合体の量に差があれば、筋萎縮性側索硬化症であることが示される。任意で、およびミスフォールドSOD1エピトープがSOD1凝集体の中に隠されている場合、方法は、段階(a)の前に標的エピトープを露出するようにSOD1凝集体の分離を促進するために試料を処置する段階を提供する。代わりの態様において、本発明は、アルツハイマー病を検出または診断する方法を提供する。もう一つの態様において、本発明は、パーキンソン病を検出または診断する方法を提供する。

【 0 0 5 1 】

これらの抗体および/またはその結合断片は、診断物質を産生するために、標識に有用に共役される。

【 0 0 5 2 】

本発明にはまた、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、およびパーキンソン病のような神経変性疾患を処置するため、たとえばSOD1凝集を阻害するため、動物における免疫応答を誘発するため、またはミスフォールドSOD1を検出するため、およびそれによって筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、またはパーキンソン病のような神経変性疾患を診断するための、本発明の組成物および抗体を含むキットが含まれる。

【 0 0 5 3 】

さらなる局面において、本発明は、新規単離ペプチドを提供する。一つの態様において、新規単離ペプチドは、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。

RLACGVIGI (SEQ ID NO: 1, DSE1)

ACGVIGI (SEQ ID NO:9, DSE1 類似体)

Ac-GG-RLACGVIG-GGKG (SEQ ID NO:10, DSE1 類似体)

CDLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 11, DSE2 類似体)

CNPLSRKHGGPKDEE (SEQ ID NO:12, DSE3 類似体)

CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:14, DSE5 類似体)

RLA[システイン酸]GVIGI (SEQ ID NO: 8, DSE1a)

A[システイン酸]GVIGI (SEQ ID NO: 13, DSE1a 類似体)

C-GGG-RLA[システイン酸]GVIGI- GSG (SEQ ID NO: 15, DSE1a 類似体)

KAVCVLK (SEQ ID NO: 4, DSE4);

SGSKAVCLK (SEQ ID NO:16 , DSE 4 類似体); および

GLHGFHVH (SEQ ID NO: 7, DSE7)

10

【 0 0 5 4 】

もう一つの態様において、本発明は、システイン残基がシステイン酸である、RLA[システイン酸]GVIGI (SEQ ID NO:8, DSE1a) を含む新規改変単離ペプチドを含む。

20

【 0 0 5 5 】

関連する局面において、これらのペプチドは、標識型、または共役体もしくは融合体として、たとえば抗体を作製するためまたはSOD1を検出するために、ならびに他の診断および治療的用途のために有用な「免疫原」として提供される。そのような免疫原は、たとえばKLHまたはMAP抗原に共役したペプチドを含む。

【 0 0 5 6 】

本発明の特定の態様は、以下の方法に関連する：i) 被験体において免疫応答を誘発する方法、および/またはii) 本発明の単離された筋萎縮性側索硬化症特異的免疫原（たとえば、ペプチド）をコードする核酸を適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を、被験体に投与する段階を含むことによって、処置を必要とする被験体におけるスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）のミスフォールド型によって媒介される医学的状態、疾患、または障害を処置する方法。当然、そのような核酸は、遺伝子コードされるアミノ酸からなるエピトープおよびペプチドの型のみをコードするが、核酸はまた、そのように発現された後、内因性の環境による硝酸化、酸化、カルボニル化のようなインビボで改変されるようになるコードされるエピトープの類似体も内因性に生じる可能性がある。適したRNAおよびDNAヌクレオチド配列は、本出願において記述される（配列同一性を有する他のDNA配列または類義のコドン同等物も同様に方法において有用である）。医学的状態、疾患、または障害の例には、ALS、パーキンソン病、レヴィー小体病、またはアルツハイマー病が含まれる。本発明にはまた、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープをコードする単離核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、アルツハイマー病を処置するための組成物が含まれる。

30

40

【 0 0 5 7 】

本発明はまた、薬学的に許容される媒体と、（1）SODのミスフォールド型に選択的に結合する単離された外因性抗体、および/または（2）SODの単量体またはミスフォールド型に選択的に結合する内因性の抗体の産生を誘発する免疫原、および/または（3）（1）もしくは（2）をコードする核酸配列、から選択される物質とを含む組成物を被験体に投与する段階を含む、i) SOD凝集体の免疫学的清浄化を増加させる方法、ii) ミスフォールドSOD1によって媒介されるSOD1凝集を低減させる方法、および/またはiii) SOD1誘型特異

50

的ミスフォールディングを低減させる方法にも関する。

【0058】

本発明のもう一つの局面は、i) SOD凝集体の免疫学的清浄化を引き起こす、ii) ミスフォールドSOD1によって媒介されるSOD1凝集を低減させる、および/またはiii) SOD1鑄型特異的ミスフォールディングを低減させる、本発明の外因性の抗体または免疫原（たとえば、ペプチド）のような物質を、処置を必要とする被験体に投与する段階を含む、処置を必要とする被験体におけるスーパーオキシジスムターゼ（SOD）のミスフォールド型によって媒介される医学的状態、疾患、または障害を処置するための方法に関する。本発明にはまた、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができる、本明細書において記述されるエピトープに対して特異的な抗体の有効量を被験体に投与することによって、本明細書において記述される医学的状態、疾患、または障害を処置する方法が含まれる。

10

【0059】

本発明の他の特色および長所は、以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかし、様々な変化および改変が本発明の趣旨および範囲に含まれることは、この詳細な説明から当業者に明らかとなるであろうことから、詳細な説明および特異的实施例は、本発明の好ましい態様を示しているが、例示的であるに過ぎないと理解されるべきである。

【0060】

発明の詳細な説明

本発明は、ミスフォールドおよび凝集したSOD1の分子表面上に露出した免疫学的エピトープ（抗体結合部位）を同定して、これを治療的に利用することによって、ALS、AD、およびPDのような神経変性疾患に関連する可能性があるSOD1コンフォーマーが含まれる、毒性SOD1種を特異的に標的とする最初の免疫治療組成物および方法を提供する。これらのエピトープは、天然の通常に折り畳まれたSOD1には存在しない。本発明は、治療もしくは診断のための化合物を設計するため、または治療もしくは診断のための抗体を誘発するための標的として有用な、これまで未知のエピトープを同定する。本発明はまた、SOD1のミスフォールドおよび凝集型において提示されるが、SOD1の天然型において提示されないとして既に同定されたエピトープの最初の免疫治療的使用を提供する（参照により本明細書に組み入れられる、3およびWO 2005/019828を参照されたい）。これらのエピトープは、疾患の進行を予防するための受動的または能動的免疫治療のための有用な標的である。理論に拘束されたくはないが、これらのエピトープは、毒性のSOD1凝集体の免疫学的清浄化または分離によって、SOD1鑄型特異的ミスフォールディングプロセスを遮断することによって、これらのミスフォールドSOD1種のニューロンに及ぼす毒性効果を中和することによって、および/またはミスフォールドSOD1によって媒介される酸化的ストレスを阻害することによって、疾患の進行を防止する。

20

30

【0061】

疾患特異的エピトープの組成物および使用

本発明者らは、単量体SOD1、または単量体、二量体、もしくは凝集型のSOD1のミスフォールド型によって選択的に提示されるまたは近づくことができるが、SOD1の天然の適切に折り畳まれたホモ二量体型では提示されないまたは存在しないエピトープが存在することを決定した。SOD1のミスフォールド型は、野生型SOD1二量体によって採用されるコンフォメーションとは異なり、および/または筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、およびパーキンソン病のような神経変性疾患が含まれるSOD1障害の特徴であるSOD1凝集体の形成に関与するコンフォメーション、特に二次または三次コンフォメーションを採用することを特徴とする。そのようなミスフォールドSOD1は、野生型配列または変異配列を有しうる。特定の態様において、エピトープは、野生型または天然の配列を有するミスフォールドSOD1において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープである。他の態様において、エピトープは、変異または非野生型配列を有するミスフォールドSOD1において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープである。他の態様において、エピトープは、SOD1単量体（野生型、変異体、ミスフォールドおよび天然が含まれる任意の

40

50

型)によって提示され、SOD1ホモ二量体から単量体に解離した場合にSOD1単量体において近づくことができるようになる。ミスフォールドSOD1のみを免疫学的に認識することは、正常な天然のSOD1に結合する抗体によって引き起こされる自己免疫の発現を低減または消失させるであろう。特に、野生型であるミスフォールドSOD1の免疫学的認識は、散発性ALSの処置において特に有用となるであろう。

【0062】

本明細書において用いられるように「SOD1」という用語は、スーパーオキシドジスムターゼ-1を意味し、これには全ての種からの全ての類似体および変異体型、特にヒトSOD1(すなわち、hSOD1)が含まれ、任意でSODと呼ばれる。ヒトSOD1のアミノ酸配列(たとえば、UniProtKB/TrEMBLアクセッション番号Q6NR85; Genbankアクセッション番号CAG46542; SEQ ID NO:17)、およびヒトSOD1のmRNAヌクレオチド配列(たとえば、Genbankアクセッション番号NM_000454; SEQ ID NO: 18)は、既に特徴付けがなされている。

10

【0063】

「野生型」とは、天然または非変異体タンパク質の一次アミノ酸配列を指し、野生型SOD1は、天然または天然に存在するアミノ酸配列を有するSOD1、および特に、任意でhSOD1とも呼ばれる可能性があるヒトSOD1を指す。ヒトSOD1のアミノ酸配列をSEQ ID NO:17に提供し、核酸配列をSEQ ID NO:18に提供する。「野生型」はまた、特異的タンパク質の正常な天然の構造を指しうる(たとえば、天然の二量体SOD1タンパク質の結晶構造の原子レベル座標は、Protein Data Bankアクセッション番号1PU0において入手可能である)。野生型の折り畳まれたSOD1は任意で、「天然の折り畳み型」SOD1、「正常な折り畳み型」SOD1、および/または「適切な折り畳み型」SOD1と呼ばれる。

20

【0064】

「変異体SOD」は、たとえば家族性ALSの特徴である置換のようなアミノ酸置換がたとえば起こる遺伝子変異の結果として起こるSODの型、特にSODの内因性型を指す。そのような置換には、表1において記載される置換が含まれる。

【0065】

本明細書において用いられる「ミスフォールド」は、タンパク質の二次および三次構造を指し、その適切に機能している状態のそのタンパク質にとって正常ではないコンフォメーションを採用することを示す。ミスフォールディングは、アミノ酸欠失、置換、または付加のようなタンパク質における変異によって引き起こされうるが、野生型配列のタンパク質も同様に、たとえば、微小環境状態、および/または硝酸化、酸化、カルボニル化のようなアミノ酸改変、または他の改変の結果として、疾患においてミスフォールドされて、疾患特異的エピトープを露出することができる。

30

【0066】

特定の態様において、非天然SOD1が、家族性ALSの特徴である配列変化を含むSOD1の型のような変異体SOD1である場合、非天然SOD1変異体は、アミノ酸A4、G37、G85、またはG93の一つまたは複数が変異している変異体以外である。

【0067】

本明細書において用いられる「エピトープ」は、B細胞もしくはT細胞受容体、または抗体もしくはその結合断片によって認識されるタンパク質の領域を意味する。エピトープは、本明細書において直線状のアミノ酸配列、または抗体によって認識されるタンパク質の領域によって表される。「エピトープに対応する単離ペプチド」は任意で、「エピトープ」と呼ばれる自身のペプチドである。

40

【0068】

エピトープは、本明細書の文脈において、抗体またはその結合断片による結合に対して近づくことができる場合に「近づくことができる」。本発明の疾患特異的エピトープは、抗体の結合に対して近づくことができる型でミスフォールドタンパク質の分子表面に部分的もしくは完全に露出されてもよく、またはタンパク質の天然の折り畳まれたイソ型において抗体認識から部分的もしくは完全に隠されもよい。該エピトープは、タンパク質のミスフォールドまたは非天然コンフォメーションにおいて選択的に提示されるまたは近づく

50

ことができ、タンパク質の天然のコンフォメーションにおいて提示されないまたは近づくことができない。「選択的に提示されるまたは近づくことができる」とは、文脈上、参照されるエピトープが、ミスフォールドSOD1における抗体または他の結合タンパク質との結合にとって利用可能であるが、SOD1の天然型における抗体結合にとっては利用可能でないことを示すために用いられる。疾患特異的エピトープは、抗体がエピトープに選択的に結合することができるように、通常そのコンフォメーションに関して、天然の適切な折り畳み型SOD1（すなわち、正常な非病原性SOD1活性を有するSOD1）の対応するタンパク質とは十分に異なる。

【0069】

エピトープは、一つまたは複数の抗原性決定基を含む。たとえば、特異的な疾患特異的エピトープに対応する単離ペプチドに対して作製された抗体は、該エピトープ配列の一部または全てを認識する。したがって、一つの態様において、抗原性決定基を保持するミスフォールドSOD1において提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドの一部を用いて、該エピトープに対する抗体を作製する。

【0070】

ALSにおいて選択的に提示されるSOD1のエピトープを参照する場合、名称の疾患の参照を容易にするために、エピトープは任意で、ALS特異的エピトープと呼ばれ、アルツハイマー病において選択的に提示されるエピトープを参照する場合、エピトープは任意でAD-特異的エピトープと呼ばれ、および同様にパーキンソン病において選択的に提示されるエピトープを参照する場合、エピトープは任意で、PD特異的エピトープと呼ばれる。しかし、SOD1のALS特異的エピトープはALSに限定されず、ADおよびPDのような他の神経変性疾患において任意で提示される；SOD1のAD特異的エピトープはADに限定されず、ALSおよびPDのような他の神経変性疾患において任意で提示される；ならびにPD特異的SOD1エピトープはPDに限定されず、ADおよびALSのような他の神経変性疾患において任意で提示されると理解される。SOD1媒介状態、疾患、および障害に関連するSOD1の型において選択的に近づくことができるエピトープは、任意で疾患特異的エピトープと呼ばれる。

【0071】

エピトープは、タンパク質の一つのコンフォメーションにおいて抗体によって選択的に認識されるが、タンパク質の第二のコンフォメーションでは認識されなくてもよい。「選択的」は、文脈上、抗体の結合特性を特徴付けするために用いられる。所定のエピトープに選択的に結合する抗体は、同じ分子によって提示される他の異なるエピトープと比較してより大きいアビディティまたはより高い特異性のいずれかでそのエピトープに結合するであろう。たとえば、疾患特異的エピトープに近づくことができるミスフォールドSOD1に抗体が結合する場合、疾患特異的エピトープに近づくことができない天然のSOD1に結合する場合より2倍効率的に、疾患特異的エピトープに選択的に結合する。他の態様において、抗体は3～5倍、5～7倍、7～10倍、10～15倍、5～15倍、または5～30倍、より効率的に結合する。

【0072】

本明細書の文脈において「疾患特異的」であるエピトープは、特定の疾患または疾患カテゴリーの特徴であるSOD1の一つまたは複数のミスフォールド型によって選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープである。

【0073】

これらのエピトープのSOD1疾患特異性のために、それらは筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、もしくはパーキンソン病のようなSOD1媒介障害、疾患および状態を処置するための、または動物において免疫応答を誘発するための有用な標的である。たとえば、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、またはパーキンソン病と診断された被験体にそれぞれ、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ、アルツハイマー病特異的エピトープ、またはパーキンソン病特異的エピトープに対応する単離ペプチドを含む組成物をワクチン接種すると、凝集プロセスにおけるミスフォールドSOD1分子種の関与を遮断することによって、および/またはSOD1鑄型特異的ミスフォールディングを遮断することによって、または

ミスフォールド神経毒性SOD1および/または凝集体の抗体結合型の免疫複合体に基づく清浄化を誘導することによって、疾患におけるSOD1凝集体の形成を阻害する。

【0074】

SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープは、神経変性疾患に関連するSOD1において見いだされ、アルツハイマー病、パーキンソン病、および/または筋萎縮性側索硬化症が含まれる、ミスフォールドSOD1関連疾患を処置、診断、または予防するために有用である。

【0075】

本明細書において用いられる「SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープ」という用語は、単量体SOD1または単量体、二量体、もしくは凝集体型のミスフォールドSOD1において選択的に提示されるまたは近づくことができるが、SOD1の天然の正しく折り畳まれたホモ二量体型の分子表面では選択的に提示されないまたは近づくことができないエピトープを指す。言い換えれば、エピトープは、SOD1の天然のホモ二量体型と比較して、アルツハイマー病、パーキンソン病、および/または筋萎縮性側索硬化症が含まれる、ミスフォールドSOD1関連疾患に関連するSOD1の型に選択的に結合する抗体を生じるエピトープとして特徴付けすることができる。

【0076】

以下の7個のエピトープは、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープとして同定されている。

RLACGVIGI (SEQ ID NO:1, DSE1);

DLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO:2, DSE2)(WO 2005/019828);

NPLSRKHGGPKDEE (SEQ ID NO:3, DSE3)(WO 2005/019828);

IKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:5, DSE5) (8);

HCIIGRTLNVH (SEQ ID NO:6, DSE6) (8)

KAVCVLK (SEQ ID NO:4, DSE4); および

GLHGFHNVH (SEQ ID NO:7, DSE7)

【0077】

当業者は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープが上記の配列の全てまたは一部となりうることを認識するであろう。本明細書において用いられる「一部」という用語は、SOD1の非天然型に対して選択的な抗体に結合するエピトープ活性を保持している配列を指し、抗体は任意で、動物において該エピトープに対応する単離ペプチドによって免疫することによって生成される。本発明にはまた、酸化システインを有するRLA[システイン酸]GVIGI (DSE1a) のような上記の配列の類似体が含まれる。

【0078】

本明細書において用いられるように、「アルツハイマー病特異的エピトープ」という用語は、単量体SOD1、または単量体、二量体、もしくは凝集体型のミスフォールドSOD1において選択的に存在するまたは近づくことができるが、SOD1の天然のホモ二量体型では選択的に存在しないまたは近づくことができないエピトープを指す。言い換えれば、エピトープは、該エピトープに対応する単離ペプチドを含む免疫原によって免疫すると、SOD1の天然のホモ二量体型と比較して、SOD1のアルツハイマー病関連型に選択的に結合する抗体を生じるエピトープとして特徴付けすることができる。

【0079】

当業者は、アルツハイマー病特異的エピトープが上記の配列の全てまたは一部となりうることを認識するであろう。本明細書において用いられるように「一部の」という用語は、SOD1の非天然型に対して選択的な抗体に結合するエピトープ活性を保持する配列を指し、抗体は任意で、動物において該エピトープの全てまたは一部に対応する単離ペプチドに

よって免疫することによって生成される。本発明にはまた、上記の配列の類似体が含まれる。

【0080】

本明細書において用いられるように、「パーキンソン病特異的エピトープ」という用語は、単量体SOD1、または単量体、二量体、もしくは凝集型のミスフォールドSOD1において存在するまたは近づくことができるが、SOD1の天然のホモ二量体型では存在しないまたは近づくことができないエピトープを指す。言い換えれば、エピトープは、該エピトープに対応する単離ペプチドを含む免疫原によって免疫すると、SOD1の天然のホモ二量体型と比較して、SOD1のパーキンソン病関連型に選択的に結合する抗体を生じるエピトープとして特徴付けることができる。

10

【0081】

当業者は、パーキンソン病特異的エピトープが上記の配列の全てまたは一部となりうることを認識するであろう。本明細書において用いられるように「一部の」という用語は、SOD1の非天然型に対して選択的な抗体に結合するエピトープ活性を保持する配列を指し、抗体は任意で、動物において該エピトープに対応する単離ペプチドによって免疫することによって生成される。本発明にはまた、上記の配列の類似体が含まれる。

【0082】

本明細書において用いられるように、「筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ」という用語は、単量体SOD1、または単量体、二量体、もしくは凝集型のミスフォールドSOD1において選択的に存在するまたは近づくことができるが、SOD1の天然のホモ二量体型では選択的に存在しないまたは近づくことができないエピトープを指す。言い換えれば、エピトープは、SOD1の天然のホモ二量体型と比較して、SOD1のALS関連型に選択的に結合する抗体を生じるエピトープとして特徴付けすることができる。当業者は、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープが上記の配列の全てまたは一部となりうることを認識するであろう。本明細書において用いられるように「一部の」という用語は、SOD1の非天然型に対して選択的な抗体に結合するエピトープ活性を保持する配列を指し、抗体は任意で、動物において該エピトープに対応する単離ペプチドによって免疫することによって生成される。本発明にはまた、上記の配列の類似体が含まれる。

20

【0083】

本明細書において用いられる「類似体」という用語には、本発明のペプチド、タンパク質、または核酸分子と実質的に同じ方法で実質的に同じ機能を行う、本発明のアミノ酸およびヌクレオチド配列の一部、伸長物、置換、変種、改変または化学的同等物およびその誘導体が含まれる。たとえば、本発明のペプチドおよびタンパク質の類似体には、保存的アミノ酸置換が含まれるがこれらに限定されない。ペプチドの類似体には、RLAC*GVIGI (DSE1a) の場合のようにアミノ酸のシステイン酸改変が含まれる。たとえば、アミノ酸は任意でアセチル化 (Ac-) される。本発明のペプチドおよびタンパク質の類似体にはまた、本発明のペプチドおよびタンパク質に対する付加および欠失が含まれる。核酸の類似体には、本発明の単離ペプチドをコードする縮重ヌクレオチド置換が含まれる。さらに、類似体ペプチドおよび類似体ヌクレオチド配列には、その誘導体が含まれる。

30

【0084】

本明細書において用いられるように、「保存的アミノ酸置換」は、ペプチドの所望の特性を破壊することなく、一つのアミノ酸残基がもう一つのアミノ酸残基に置換される置換である。

40

【0085】

「ペプチドの誘導体」という用語は、官能側鎖の反応によって化学的に誘導体化された一つまたは複数の残基を有するペプチドを指す。そのような誘導体化分子には、たとえば、遊離のアミノ基がアミン塩酸塩を形成するように誘導体化されている分子、p-トルエンスルホニル基、カルボベンゾキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基またはホルミル基が含まれる。遊離のカルボキシル基を誘導体化して塩、メチルおよびエチルエステル、または他のタイプのエステルまたはヒドラジドを形成してもよい。遊離のヒ

50

ドロキシシル基を誘導体化して、O-アシルまたはO-アルキル誘導体を形成してもよい。ヒスチジンのイミダゾール窒素を誘導体化してN-im-ベンジルヒスチジンを形成してもよい。同様に、標準的なアミノ酸20個の一つまたは複数の天然に存在するアミノ酸誘導体を含有するペプチドも誘導体として含まれる。たとえば、4-ヒドロキシプロリンをプロリンの代わりに置換してもよく；5-ヒドロキシリジンのリジンの代わりに置換してもよく；3-メチルヒスチジンをヒスチジンの代わりに置換してもよく；ホモセリンをセリンの代わりに置換してもよく；オルニチンをリジンの代わりに置換してもよい。ペプチドの誘導体にはまた、任意で、酸化されるアミノ酸の型を含むペプチドが含まれる。

【0086】

酸化ストレスによって、細胞タンパク質、DNAおよび脂質に対する損傷が起こりうる。酸化ストレスはADおよびPDにおいて報告されている(64)。本発明者らは、システイン酸の形で酸化システインを含むDSE1aに対して選択的な抗体が、ミスフォールドSOD1に対して高い親和性を有することを示した。他のアミノ酸も同様に、酸化ストレスの結果として酸化または硝酸化されうる。たとえば、ヒスチジン、アルギニン、およびリジンはカルボニル基を形成することができ、メチオニンはメチオニンスルホキシドに酸化される可能性があり、およびフェニルアラニンはニトロトリプトファンに硝酸化されうる。さらに、システインはシステインスルフィン酸に酸化されうる。

【0087】

したがって、一つの態様においてエピトープは、一つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む。本発明の特異的態様において、SOD1エピトープは、酸化または硝酸化アミノ酸、特に酸化システイン、すなわちシステイン酸を含んでもよい。

【0088】

一つの態様において、非天然SOD1において選択的に提示されるエピトープに対応する単離ペプチドは、一つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を含む。本発明の特異的態様において、SOD1エピトープは、酸化または硝酸化アミノ酸、特に酸化システイン、すなわちシステイン酸を含んでもよい。

【0089】

このように、本発明において有用であるエピトープに対応する単離ペプチドは、任意で、SODの単量体型またはミスフォールドもしくは非天然であるSOD1の任意の型に限りて選択的に近づくことができるエピトープを形成する、ヒトSOD1配列内で隣接するアミノ酸の枝に対応する配列を組み入れるペプチドである。非天然SOD1において選択的に近づくことができると同定されているエピトープは、hSOD1において以下のアミノ酸の枝を含む。

RLACGVIGI (SOD1 SEQ ID NO:17 残基 143- 151 における SEQ ID NO: 1)

DLGKGGNEESTKTGNAGS (SOD1 SEQ ID NO:17 残基 125-142

における SEQ ID NO: 2);

NPLSRKHGGPKDEE; (SOD1 SEQ ID NO:17 残基 65-78 における SEQ ID NO: 3);

IKGLTEGLHGF (SOD1 SEQ ID NO:17 残基 35-42 における SEQ ID NO: 5);

HCIIGRTLNVH (SOD1 SEQ ID NO:17 残基 110-120 における SEQ ID NO: 6);

KAVCVLK (SOD1 SEQ ID NO:17 残基 3-9 における SEQ ID NO: 4); および

GLHGFHVH (SOD1 SEQ ID NO:17 残基 41-48 における SEQ ID NO: 7)

【0090】

たとえば、能動的免疫治療のため、または受動的免疫治療において用いるための抗体を作製するために有用な免疫原として役立つために、ペプチドは望ましくは最小で約3、4、5、6、または7個のSOD1疾患特異的エピトープ残基を組み入れる。一つの態様において、エピトープに対応する単離ペプチドは、望ましくは少なくとも8個のSOD1残基を含む。典型的に、ペプチドは約50個より多いSOD1残基を必要とせず、より通常、約40残基未満であ

10

20

30

40

50

る、たとえば約30残基およびさらにより通常約20残基未満であるSOD1の枝において適合されるであろう。SOD1のさらにより大きい一部を含むペプチドを用いることが可能であり、それによっておそらく多数の抗体が得られ、ミスフォールドSOD1の特徴であるエピトープに選択的に結合する抗体の選択を必要とする。

【0091】

本発明の態様に従ってターゲティングされるために有用なSOD1配列には、残基3~9、残基35~45、残基41~48、残基65~78、残基125~142、残基143~151、および残基145~151を組み入れるhSOD1領域が含まれる。認められるように、ミスフォールドSOD1エピトープに対応するそのようなペプチド配列は、注目される領域から少なくとも任意の5、6、または7残基を組み入れるように切断することができる。たとえば、配列RLACGVIGIを有するDS E1は最初の二つのアミノ酸「RL」を除去することによって切断することができる。さらに、これらの領域は、示されるように、ペプチドまたはワクチン産生の費用と、得られた抗体の所望の特異性および他の特性とのあいだの任意の所望のバランスをとる最大数の残基にさらなる隣接SOD1残基を組み入れるように伸長させることができる。

【0092】

好ましい態様において、疾患特異的エピトープに対応する単離ペプチドは表2もしくは表2Aにおけるペプチド、またはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドの配列の全てまたは一部を含む。

【0093】

これらのエピトープに対応するペプチドはさらに、たとえば免疫応答を誘発するために有用である物質、またはペプチドの産生においてもしくはその存在をモニターするために有用なタグとして作用する物質、をペプチドに共役させるために有用となる可能性があるさらなる非SOD1アミノ酸残基を、特にそのN-およびC-末端隣接部で含む。たとえば、ペプチドはKLH等との共役を補助するためにN-末端Cys残基をさらに含んでもよい。ペプチドはさらに、形成される抗体の特異性を変化させることなく、ペプチドの長さを増加させることによって免疫応答を改善するために、一つ、二つ、三つ、またはそれより多い隣接グリシン残基、またはGSGもしくはGGKGのようなグリシン/セリンまたはグリシン/リジンの組み合わせを含んでもよい。エピトープに対応するペプチドはさらに、同じまたは異なるエピトープに対応する同じまたは異なるペプチドのもう一つのコピーに対してペプチドを縦列に共役させるために有効なリンカーを含んでもよい。または、エピトープに対応するペプチドは、さらにポリヒスチジンまたはFlagタグを含んでもよい。もう一つの態様において、ペプチドは、ペプチドの免疫原性または溶解度を増強するさらなるアミノ酸を含んでもよい。一つの態様において、さらなるアミノ酸の数は約1~約10個、好ましくは1~8個、より好ましくは1~5個である。重要なことは、さらなる残基はペプチドのコンフォメーションに実質的に影響を及ぼさない。一つの態様において、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、さらなるアミノ酸6個を含み、配列

GGRLACGVIGIGGKG

を含む。一つの態様において、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、さらなるアミノ酸4個を含み、配列

GGRLACGVIGIAQ

を含む。

【0094】

一つの態様において、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができる疾患特異的エピトープに対応する単離ペプチドの類似体アミノ酸配列は、典型的に上記の配列と少なくとも60%、70%、80%、または90%の配列同一性を有する。もう一つの態様において、ALS-特異的エピトープ、PD-特異的エピトープ、またはAD-特異的エピトープに対応する単離ペプチドの類似体アミノ酸配列は、典型的に上記の配列と少なくとも60%、70%、80%、または90%の配列同一性を有する。本明細書において用いられるように、「配列同一性」という用語は、二つのポリペプチド配列間の配列同一性の百分率を指す。二つのポリペプチド配列間の同一性の百分率を決定するために、そのような二つの配

列のアミノ酸配列を、好ましくはBLOSUM 62スコア行列(10)、およびギャップ開始ペナルティ10およびギャップ伸長ペナルティ0.1と共にClustal Wアルゴリズム(9)を用いて整列させると、配列の一つの全長の少なくとも50%がアラインメントに関係している最高次数のマッチが二つの配列のあいだで得られる。配列を整列させるために用いられる可能性がある他の方法は、最高次数のマッチが二つの配列間で得られるように、および同一アミノ酸の数が二つの配列間で決定されるようにSmith and Waterman(12)によって改訂されているNeedleman and Wunsch(11)のアラインメント法である。二つのアミノ酸配列間の同一性百分率を計算する他の方法は一般的に当該技術分野において認識され、たとえばCarrillo and Lipton(13)によって記述される方法およびComputational Molecular Biology(14)において記述される方法である。一般的に、そのような計算のためにコンピュータープログラムが用いられるであろう。この点において用いられる可能性があるコンピュータープログラムには、GCG(15)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA(16)が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

10

【0095】

このように、好ましいエピトープ標的はhSOD1において見いだされる配列を含むが、本発明はまた、先に示されるように誘導体、伸長物、切断物、改変アミノ酸等が含まれるこれらのエピトープ配列の類似体を含むと認識されるであろう。疾患特異的エピトープに対応する単離ペプチドのそのような型は、「類似体」という用語に含まれる。そのような類似体はまた、ミスフォールドまたは単量体SOD上に存在するエピトープに、たとえば本明細書において先に同定された7個のエピトープの一つに結合する抗体を作製するために有用である。

20

【0096】

このように、先に同定された好ましいエピトープと比較して、エピトープ類似体に対応する有用な単離ペプチドには、以下を含むがこれらに限定されるわけではない単離ペプチドが含まれる。

【0097】

RLACGVIGIに関して

RまたはRLのN-末端切断；たとえばアセチル-RLACGVIVIVGGKGに達するために、G、GG、またはアセチル-GGによるN-末端伸長、および/またはG、GG、GGK、またはGGKGによるC-末端伸長；

30

CGGGR^{*}LAC^{*}GVIGIGSG; RLAC^{*}GVIGIGSG および CRLAC^{*}GVIGIGSG

(C^{*}はシステイン酸を示す)が含まれるAC^{*}GVIVIVGに達するためにシステイン酸を生じるためのCの酸化を伴う、または伴わない。

【0098】

DLGKGGNEESTKTGNAGSに関して

D、DL、DLG、DLGKのN-末端切断、および/またはS、GS、AGS、NAGSのC-末端切断；C、またはG、GG、もしくはGGGによるN-末端伸長；G、GG、GS、もしくはGSGによるC-末端伸長；たとえばCDLGKGGNEESTKTGNAGSに達するために、たとえば一つまたは二つのK残基のカルボニル化による内部改変を伴うまたは伴わない；および

40

LGKGGNEESTKTGNAGS

DLGKGGNEESTKTGNAG,

GKGGNEESTKTGNAGS,

DLGKGGNEESTKTGNA,

KGGNEESTKTGNAGS,

DLGKGGNEESTKTGN, GGNEESTKTGNAGS, DLGKGGNEESTKTG,

LGKGGNEESTKTGNAG,

GKGGNEESTKTGNA,

または

KGGNEESTKTGN

のようなペプチドが含まれる。

50

【 0 0 9 9 】

NPLSRKHGGPKDEEに関して

N、NP、NPLのN-末端切断、および／またはE、EE、DEEのC-末端切断；CまたはG、GG、もしくはGGGによるN-末端伸長；G、GG、GS、またはGSGによるC-末端伸長；たとえば

CNPLSRKHGGPKDEE

に達するために、一つまたは二つのH残基のカルボニル化による内部改変を伴うまたは伴わない。

【 0 1 0 0 】

IKGLTEGLHGFに関して

CIKGLTEGLHGF

に達するためにCのN末端付加。

【 0 1 0 1 】

HCIIGRTLWVHに関して

HまたはHCのN-末端切断および／またはH、もしくはVHのC-末端切断、残基109または108/109でのSOD配列を含めるための、および／またはG、GG、またはGGGを含めるためのN-末端伸長、および／またはたとえば

GGGHCIIGRTLWVHSG

に達するように残基121または121/122のような一つまたは二つのSOD残基によるC-末端伸長。

【 0 1 0 2 】

上記のペプチドの実施例を、表2Aにおいて要約する。

【 0 1 0 3 】

(表2A) 単離されたDSEペプチドおよび類似体

ACGVIGI (SEQ ID NO:9, DSE1 類似体);

Ac-GG-RLACGVIG-GGKG (SEQ ID NO:10, DSE1 類似体);

CDLGKGGNEESTKTGNAGS (SEQ ID NO: 11, DSE2 類似体);

CNPLSRKHGGPKDEE (SEQ ID NO:12; DSE3 類似体);

CIKGLTEGLHGF (SEQ ID NO:14, DSE5 類似体);

RLA[システイン酸]GVIGI (SEQ ID NO: 8, DSE1a);

A[システイン酸]GVIGI (SEQ ID NO: 13, DSE1a 類似体);

C-GGG- RLA[システイン酸]GVIGI- GSG (SEQ ID NO: 15, DSE1a

類似体); および

GSGKAVCLK (SEQ ID NO: 16, DSE 4 類似体)

【 0 1 0 4 】

先に示したように、本発明にはまた、DSE1エピトープ、エピトープに対応する単離ペプチド、およびエピトープに対する抗体が含まれる。実験によりDSE1はさらに特徴付けされた。本発明の一つの態様において、本発明者らは、SOD1の非天然型において見いだされるエピトープに対する抗体を調製した。本発明のもう一つの態様において、本発明者らは、SED1抗体を用いる免疫沈降によってG85R、G93A、およびG37R ALSマウスモデルの脊髄組織からミスフォールドSOD1を検出した。本発明のさらなる態様において、本発明者らは、SED1抗体をプローブとして用いてG93A、G37R ALSマウスモデルおよびALSを有するヒト患者の脊髄切片においてミスフォールドSOD1を検出した。本発明のもう一つの態様において、本発明者らはSED1を用いて、ミスフォールドSOD1の細胞下局在を決定し、ミスフォールドSOD1沈着の主要部位が前角の運動ニューロン内の空胞のあるミトコンドリアであることを決定した。さらに、ミスフォールドSOD1は、ミトコンドリアおよび細胞質脊髄分画の双方

10

20

30

40

50

において検出されたが、G93Aマウスの肝臓および脳組織の類似の分画からもごく微量が免疫沈降された。G85Rマウスにおいて、ミスフォールドSOD1は、サイトソルから回収された量と比較して脊髄および脳ミトコンドリアにおいて濃縮された。本発明のもう一つの態様において、本発明者らは、ミスフォールドSOD1が当初存在しないが、疾患の発症前に検出され、ALSモデルマウスにおける運動ニューロン喪失と相関することを示した。

【0105】

エピトープ自身またはその類似体に対応する単離ペプチドが十分に免疫原性でない場合、たとえ標準的なアジュバントと共に投与する場合であっても、単離ペプチドまたは単離ペプチド類似体は、エピトープまたは類似体に対応する単離ペプチドがペプチドの免疫原性を増強する物質と融合または共役されている「免疫原」の形で投与することができる。このように、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、および/またはパーキンソン病を処置するための、または免疫応答を誘発するための組成物の免疫原性または有効性は、疾患特異的エピトープ（たとえば、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープのような）に対応する単離ペプチドを、アミド結合によるように直接、またはカルボジイミドのような化学リンカーもしくはグリシンもしくはGly4-Sが含まれるグリシン-セリン配列のような任意のペプチドスペーサー配列によって間接的に、エピトープに対応するペプチドの免疫原性を増強する物質に共役させることによって、増強されうる。たとえば、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドを、MAP抗原またはキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に共役させることができる。KLHは軟体類において見いだされる呼吸タンパク質である。その大きい大きさによりこれは非常に免疫原性であり、共役のために利用できる多数のリジン残基により、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドのようなポリペプチドに付着させるために非常に有用である。KLHの共役のためにペプチド上で他の簡便な部位が利用できない場合には、KLHの共役は、エピトープに対応する単離ペプチドに付加されるN-末端Cys残基を通して行うことができる。

【0106】

このように、免疫応答を誘発するための組成物は、免疫原を含んでもよい。本明細書において用いられる「免疫原」は、免疫応答を誘発するおよび/または抗体の産生を引き起こす物質を意味する。本明細書において記述される単離ペプチド、共役体、および融合体に加えて、SOD1の疾患特異的エピトープに対する交叉反応性抗体を誘発するペプチド模倣体は有用である（82を参照されたい）。

【0107】

当業者は、他の筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ、他のアルツハイマー病特異的エピトープ、および/または他のパーキンソン病特異的エピトープのような、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができる他のエピトープが存在する可能性があることを認識するであろう。たとえば、他の疾患特異的エピトープは、具体的に参照により本明細書に組み入れられる、WO2005/019828において記述されるエピトープ保護アッセイを用いて同定される可能性がある。もう一つの例において、他の疾患特異的エピトープは、Khare et al（8）において開示される方法によって同定される可能性がある。さらに、有用なエピトープは、変性しているSOD1、または当業者に公知であるカオトロピック剤、熱、極端なpH、もしくは洗浄剤のような変性条件に供されるSOD1、もしくはpH中性対照SOD1と比較してミスフォールドコンフォメーションの採用を誘発するように処置されるSOD1において選択的に提示されるエピトープとして同定されうる。

【0108】

一つの態様において、本発明は疾患関連非変性タンパク質における疾患特異的エピトープを同定する方法を提供する。疾患特異的エピトープを選択するための根本的理由はいくつかの検討に基づいている。選択された直線状のペプチドエピトープは、標的タンパク質の通常のイソ型において抗体が近づくことができない状態で隠されるが、疾患性のミスフォールドイソ型では、直線状のペプチドエピトープが通常隠されたエピトープに対して特異的な抗体によって結合されるように、表面に露出されなければならない。他の検討には、凝集体の形成における既定の特異的エピトープの予測されるまたは実験によって定義さ

れた役割、および免疫または免疫治療の標的としてのエピトープに対応するペプチドの適当な長さおよび免疫原性が含まれる。最適な疾患特異的エピトープは、非天然抗原に対する免疫応答の安全性、自己免疫の最小化、および治療的ワクチンのための最小のアジュバント療法の同等の有効性から恩典が得られる。最適な疾患特異的エピトープはまた、抗体結合によってミスフォールドタンパク質の毒性の鋳型特異的活性の中和および阻害の有効性からも恩典が得られる。中和はまた、細網内皮系のような系によって、および小膠細胞のような常在CNS免疫エフェクター細胞によって、ミスフォールドタンパク質種の分解を加速する可能性がある。

【0109】

SOD1媒介神経変性疾患を処置するためのエピトープを含む組成物

10

本発明の一つの局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドの有効量を、薬学的に許容されるような、適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体におけるアルツハイマー病を処置するための組成物である。本発明のもう一つの局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドの有効量を、薬学的に許容されるような、適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体におけるパーキンソン病を処置するための組成物である。本発明のさらなる局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドの有効量を、薬学的に許容されるような、適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体における筋萎縮性側索硬化症を処置するための組成物である。「単離ペプチド」という用語は、たとえば組み換えまたは合成技術によって産生されている、および組み換え型細胞または残存ペプチド合成反応物のようなペプチドを産生する起源から除去されたペプチドを指す。単離ペプチドは任意で「精製され」、これは少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%の純度および任意で薬学等級の純度を意味する。

20

【0110】

本明細書において用いられるように「エピトープに対応する単離ペプチド」は、エピトープまたはエピトープの領域を含み、非天然SOD1における疾患特異的エピトープと配列が同じまたは類似である、産生されたペプチドを指す。「エピトープ」は任意で、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるSOD1上のエピトープに対応する産生された単離ペプチドを指すために用いられる。

30

【0111】

疾患特異的エピトープに対応する単離ペプチド自身が、たとえ標準的なアジュバントと共に投与しても十分に免疫原性でない場合、単離ペプチドは、ペプチドの免疫原性を増強する物質と融合または共役されている免疫原の形で投与することができる。

【0112】

特定の態様において、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドは、本明細書において先に引用された表2または表2Aの単離ペプチドの全てまたは一部を含む。

【0113】

本明細書において用いられるように、SOD1凝集体形成を阻害または低減させる特性は、この目的のために確立されたアッセイを用いて現されるように、および本明細書において例示されるように、神経毒性SOD1凝集体の形成速度、数、または大きさの低減として現される。

40

【0114】

本発明の一つの局面は、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドの有効量を、薬学的に許容されるような、適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体における筋萎縮性側索硬化症を処置するために有用な組成物である。他の態様において、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、先に参照した表2または表2Aの単離ペプチドの配列を有するものを含む。

【0115】

50

本明細書において用いられるように、本明細書において用いられる「筋萎縮性側索硬化症を処置する」という句には、疾患を阻害する、疾患を予防する、または疾患に関連する症状を低減させることが含まれる。

【0116】

本発明のさらなる局面は、アルツハイマー病特異的エピトープに対応する単離ペプチドの有効量を、薬学的に許容されるような、適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体におけるアルツハイマー病を処置するために有用な組成物である。態様において、アルツハイマー病特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aの単離ペプチド、またはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

【0117】

本明細書において用いられるように、本明細書において用いられる「アルツハイマー病を処置する」という句には、疾患を阻害する、疾患を予防する、または疾患に関連する症状を低減させることが含まれる。

【0118】

本発明のもう一つの局面は、パーキンソン病特異的エピトープに対応する単離ペプチドの有効量を、薬学的に許容されるような、適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体におけるパーキンソン病を処置するために有用な組成物である。態様において、パーキンソン病特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aの単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

【0119】

本明細書において用いられるように、本明細書において用いられる「パーキンソン病を処置する」という句は、疾患を阻害する、疾患を予防する、または疾患に関連する症状を低減させることが含まれる。

【0120】

免疫応答を誘発するためのエピトープを含む組成物

本発明の局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができる単離ペプチドの有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、動物における免疫応答を誘発するための組成物である。好ましい態様において、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチド、またはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

【0121】

本発明の一つの局面は、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチド、またはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドの有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、動物において免疫応答を誘発するための組成物である。

【0122】

本発明のもう一つの局面は、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチド、またはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む、アルツハイマー病特異的エピトープに対応する単離ペプチドの有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、動物において免疫応答を誘発するための組成物である。

【0123】

本発明のさらなる局面は、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチド、またはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む、パーキンソン病特異的エピトープに対応する単離ペプチドの有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、動物において免疫応答を誘発するための組成物である。

【0124】

「免疫応答を誘発する」という句は、液性または細胞性のいずれかである免疫系の任意の反応を開始、誘因となる、引き起こす、増強する、改善する、または強化することとして定義される。免疫応答の開始または増強は、抗体アッセイ（たとえば、ELISAアッセイ）、抗原特異的細胞障害アッセイ、およびサイトカインの産生（たとえば、ELISPOTアッ

10

20

30

40

50

セイ)が含まれるがこれらに限定されるわけではない、当業者に公知のアッセイを用いて評価することができる。

【0125】

免疫応答を誘発するための組成物は免疫原を含んでもよい。本明細書において用いられる「免疫原」は、免疫応答を引き起こすおよび/または抗体産生を引き起こす物質を意味する。特定の態様において、免疫原は、表2または表2Aにおいて提供される単離ペプチドから選択される単離ペプチドを含む。単離ペプチドは、いくつかの態様において、KLHのような適した担体に共役される。本明細書において記述される単離ペプチドに加えて、SOD1の疾患特異的エピトープに対する交叉反応性抗体を誘発するペプチド模倣体も有用である。本明細書において用いられるように、「動物」または「被験体」という用語には、哺乳動物、好ましくはヒトを含む動物界の全てのメンバーが含まれる。

10

【0126】

本明細書において用いられるように、「有効量」という句は、所望の結果を達成するために有効な量、ならびに必要な用量および時間を意味する。有効量は、動物の疾患状態、年齢、性別、体重のような要因に従って変化する可能性がある。投与療法は、最適な治療反応を提供するように調節してもよい。

【0127】

疾患特異的エピトープに対応する単離ペプチドを含む薬学的組成物

本明細書において記述される組成物は、活性物質の有効量が薬学的に許容される媒体と混合して組み合わされるように、任意でワクチンとして被験体に投与することができる薬学的に許容される調製物の本質的に公知の調製法によって調製することができる。適した媒体は、たとえばRemington's Pharmaceutical Sciences (17)において記述される。これに基づいて、組成物には、排他的ではないが一つまたは複数の薬学的に許容される媒体または希釈剤と会合した物質の溶液、および適したpHで生理的液体と等浸透圧である緩衝液に含まれる物質の溶液が含まれる。

20

【0128】

薬学的組成物には、凍結乾燥粉末、または水溶性もしくは非水溶性滅菌注射用溶液もしくは懸濁液が含まれるがこれらに限定されるわけではなく、これらはさらに、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および組成物を意図されるレシピエントの組織または血液と実質的に適合性にする溶質を含有してもよい。そのような組成物に存在してもよい他の成分には、たとえば水、界面活性剤(Tweenのような)、アルコール、ポリオール、グリセリン、および植物油が含まれる。即時調製注射用溶液および懸濁液は、滅菌粉末、顆粒剤、錠剤、または濃縮溶液もしくは懸濁液から調製してもよい。組成物は、たとえば患者に投与する前に滅菌水または生理食塩液によって溶解される凍結乾燥粉末として供給されてもよいがこれらに限定されるわけではない。

30

【0129】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される担体を含んでもよい。適した薬学的に許容される担体には、薬学的組成物の生物活性の有効性を妨害しない本質的に化学的に不活性で非毒性の組成物が含まれる。適した薬学的担体の例には、水、生理食塩液、グリセロール溶液、エタノール、N-(1(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、ジオレシルホスファチジル-エタノールアミン(DOPE)、およびリポソームが含まれるがこれらに限定されるわけではない。そのような組成物は、患者に直接投与するための剤形を提供するために、適した量の担体と共に化合物の治療的有效量を含有すべきである。

40

【0130】

組成物は、塩酸塩、リン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、酒石酸塩等に由来する塩のような遊離のアミノ基によって形成される塩、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等に由来する塩のような遊離のカルボキシル基によって形成される塩が含まれるがこれらに限定されるわけではない、薬学的に許容される塩の剤

50

形であってもよい。

【0131】

免疫原性は、免疫物質（複数）または免疫原（たとえば、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープまたは免疫増強物質とのその融合体もしくは共役体に対応する単離ペプチド）および/または組成物が、投与剤形にかかわらず、アジュバントと共に同時免疫される場合に、有意に改善させることができる。一般的に、アジュバントはリン酸緩衝生理食塩液において0.05～1.0%溶液として用いられる。アジュバントは、免疫原の免疫原性を増強するが、必ずしもそれ自身免疫原性である必要はない。アジュバントは、免疫系の細胞に対する免疫原のゆっくりとした持続的な放出を促進する貯蔵効果をもたらすように投与部位近傍の局所に免疫原を保持することによって作用してもよい。アジュバントはまた、免疫系の細胞を免疫原貯蔵場所に誘引して、免疫応答を誘発するためにそのような細胞を刺激することができる。そのため、本発明の態様は、アジュバントをさらに含む組成物を含む。

10

【0132】

アジュバントは何年ものあいだ、たとえばワクチンに対する宿主免疫応答を改善するために用いられてきている。内在性のアジュバント（リポ多糖類のような）は通常、ワクチンとして用いられる死菌または弱毒菌の成分である。外来性のアジュバントは、典型的に抗原に非共有的に連結して、宿主免疫応答を増強するように製剤化される免疫調整剤である。このように、非経口的に送達される抗原に対する免疫応答を増強するアジュバントが同定されている。しかし、これらのアジュバントのいくつかは毒性であり、ヒトおよび多くの動物において用いるために不適となる望ましくない副作用を引き起こしうる。実際に、ヒトおよび獣医学ワクチンにおけるアジュバントとしてルーチンとして用いられているのは、水酸化アルミニウム、硫酸アルミニウム、およびリン酸アルミニウム（集散的に一般的にミョウバンと呼ばれる）のみである。ミョウバンは、MPLまたは3-DMP、QS21、およびポリグルタミン酸またはポリリジンのような単量体または重合体アミノ酸のような免疫刺激剤と共に用いてもよい。ジフテリアおよび破傷風類毒素に対する抗体の反応の増加におけるミョウバンの有効性は十分に確立されている。それにもかかわらず、ミョウバンは限界を有する。たとえばミョウバンはインフルエンザワクチン接種の場合には無効であり、他の免疫原による細胞性免疫応答の誘発は首尾一貫していない。ミョウバンアジュバント抗原によって誘発された抗体は、マウスにおいて主にIgG1アイソタイプの抗体であり、これはいくつかのワクチン物質による保護にとって最適でない可能性がある。

20

30

【0133】

広範囲の外来性のアジュバントが、免疫原に対して強力な免疫応答を誘発することができる。これらには、Stimulons（QS21, Aquila, Worcester, Mass.）のようなサポニン、または膜タンパク質抗原（免疫刺激複合体）と複合体を形成したISCOM（免疫刺激複合体）およびISCOMATRIXのようなそれから生成された粒子、鉱油とのブルロニックポリマー、死滅したマイコバクテリアおよび鉱油、フロイント完全アジュバント、ムラミルジペプチド（MDP）およびリポ多糖類（LPS）のような細菌産物と共に、リピッドAおよびリポソームが含まれる。

【0134】

本発明の一つの局面において、本明細書において記述される本発明の任意の態様において有用であるアジュバントは以下の通りである。非経口免疫のためのアジュバントには、アルミニウム化合物（水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、およびアルミニウムヒドロキシホスフェート）が含まれる。抗原は、標準的なプロトコールに従ってアルミニウム化合物と共に沈殿させる、または吸収させることができる。RIBI（ImmunoChem, Hamilton, MT）のような他のアジュバントも同様に、非経口投与において用いることができる。

40

【0135】

粘膜免疫のためのアジュバントには、細菌毒素（たとえば、コレラ毒素（CT）、大腸菌熱不安定毒素（LT）、クロストリジウム（Clostridium）の扱いにくい毒素Aおよび百日咳毒素（PT）、またはその組み合わせ、サブユニット、類毒素、もしくは変異体）が含ま

50

れる。たとえば、天然のコレラ毒素サブユニットB (CTB) の精製調製物は有用となりうる。これらの毒素の断片、相同体、誘導体、および融合体も同様に、それらがアジュバント活性を保持する限り、適している。好ましくは、毒性が低減された変異体を用いる、適した変異体が記述されている（たとえば、WO 95/17211 (Arg-7-Lys CT変異体)、WO 96/6627 (Arg-192-Gly LT変異体)、およびWO 95/34323 (Arg-9-LysおよびGlu-129-Gly PT変異体)）。本発明の方法および組成物において用いることができるさらなるLT変異体には、たとえばSer-63-Lys、Ala-69-Gly、Glu-110-Asp、およびGlu-112-Asp変異体が含まれる。他のアジュバント（様々な起源の細菌モノホスホリルリピッドA (MPLA) のような（たとえば大腸菌 (*E. coli*)、サルモネラ・ミネソタ (*Salmonella minnesota*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、またはフレクスナー赤痢菌 (*Shigella flexneri*)、サポニン、またはポリラクチドポリグリコリド (PLGA) ミクロスフェア) も同様に粘膜投与において用いることができる。

10

【0136】

他のアジュバントには、インターロイキン、たとえばIL-1、IL-2、およびIL-12、ケモカイン、たとえばCXCL10およびCCL5、マクロファージ刺激因子、および/または腫瘍壊死因子のようなサイトカインが含まれる。用いられる可能性がある他のアジュバントには、CpGオリゴヌクレオチド (Davis, Curr Top Microbiol Immunol., 247:171-183, 2000) が含まれる。

【0137】

水中油型乳剤には、スクアレン；落花生油；MF59 (WO 90/14387)；SAF (Syntex Laboratories, Palo Alto, Calif.)；およびRibi (商標) (Ribi Immunochem, Hamilton, Mont.) が含まれる。水中油型乳剤は、ムラミルペプチド（たとえば、N-アセチルムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン (thr-MDP)、アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (nor-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン (MTP-PE)、N-アセチルグルコサミニル-N-アセチルムラミル-L-Al-D-イソグル-L-Ala-ジパルミトキシプロピルアミド (DTP-DPP) theramide (商標)、または他の細菌細胞壁成分のような免疫刺激物質と共に用いてもよい。

20

【0138】

粘膜および非経口免疫の双方にとって有用なアジュバントには、ポリホスファゼン（たとえば、WO95/2415）、DC-コル(3b-(N-(N',N'-ジメチルアミノメタン)-カルバモイル)コレステロール（たとえば、米国特許第5,283,185号およびWO 96/14831）およびQS-21（たとえば、WO 88/9336）が含まれる。

30

【0139】

アジュバントは投与のために免疫原に共役させてもよい (Livingston, J Immunol., 159: 1383-1392, 1997)。たとえば、パルミチン酸のような脂質を、免疫原を含むペプチドのコンフォメーションの変化が、免疫原に対する免疫応答の性質に影響を及ぼさないように、一つまたは複数のペプチドに直接共役させてもよい。

【0140】

アジュバントの選択は、投与経路、アジュバントの有効性、投与療法、アジュバントとワクチン接種される種とを含有するワクチンの安定性が含まれる多数の要因に依存する可能性がある。アジュバントは一つの組成物として免疫原と共に投与されてもよい。さらに、アジュバントは免疫原の投与の前、同時、または後に投与されてもよい。

40

【0141】

筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、および/またはパーキンソン病を処置するため、または免疫応答を誘発するための組成物の免疫原性または有効性はまた、疾患特異的エピトープ（たとえば筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープのような）に対応する単離ペプチドを、アミド結合によるように直接、またはカルボジイミドのような化学リンカーもしくはグリシンもしくはGly4-Sが含まれるグリシン-セリン配列のような任意のペプチドスペーサー配列によって間接的に、エピトープの免疫原性を増強する物質に共役させるこ

50

とによって、増強されうる。たとえば、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドを、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に共役させることができる。KLHは軟体類において見いだされる呼吸タンパク質である。その大きい大きさによりこれは非常に免疫原性であり、共役のために利用できる多数のリジン残基により、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドのようなタンパク質に付着させるために非常に有用である。

【0142】

ペプチドワクチン接種技術に対する他の案内は、ミスフォールドプリオンタンパク質に対する疾患特異的エピトープ（6）が、プリオンに感染した神経芽腫細胞に対する標的をインビトロで提供すること（7）、およびこのエピトープによるマウスのペプチドワクチン接種が、感染性のプリオンの接種に対して保護的であることを示した研究において見いだされる。

【0143】

筋萎縮性側索硬化症特異的、アルツハイマー病特異的、およびパーキンソン病特異的エピトープが含まれる、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープまたはその類似体に対応する単離ペプチドは、当業者に公知の多様な方法を用いて容易に調製される。したがって、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープのような疾患特異的エピトープに対応するペプチドは、固相合成（18）または均一な溶液における合成（19）のようなタンパク質の化学において周知の技術を用いて化学合成によって調製されてもよい。

【0144】

筋萎縮性側索硬化症特異的、アルツハイマー病特異的、およびパーキンソン病特異的エピトープが含まれる、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドはまた、組み換えDNA技術によって産生してもよい。組み換えDNA技術によって筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応するペプチドを調製するために、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応するペプチドをコードするDNA配列を調製しなければならない。その結果、本発明にはまた、筋萎縮性側索硬化症を処置するために、または免疫応答を誘発するために、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープをコードするヌクレオチド配列を含む精製および単離核酸を用いることが含まれる。

【0145】

一つの態様において、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする核酸配列を、宿主細胞のトランスフェクションまたは形質転換のために適合させた発現ベクターに組み入れる。もう一つの態様において、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応するペプチドをコードする核酸配列を、宿主細胞のトランスフェクションまたは形質転換のために適合させた発現ベクターに組み入れる。さらなる態様において、アルツハイマー病特異的エピトープに対応するペプチドをコードする核酸配列を、トランスフェクションまたは形質転換のために適合させた発現ベクターに組み入れる。もう一つの態様において、パーキンソン病特異的エピトープに対応するペプチドをコードする核酸配列を、トランスフェクションまたは形質転換のために適合させた発現ベクターに組み入れられる。核酸分子は、タンパク質の発現を確実にする適当な発現ベクターに公知の方法で組み入れてもよい。可能性のある発現ベクターには、コスミド、プラスミド、または改変ウイルス（たとえば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）が含まれるがこれらに限定されるわけではない。発現ベクターは、用いる宿主細胞と適合性であるべきである。発現ベクターは、「宿主細胞の形質転換にとって適して」おり、このことは発現ベクターが、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ、アルツハイマー病特異的エピトープ、およびパーキンソン病特異的エピトープが含まれるSOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする核酸分子と、核酸分子に機能的に連結される、発現のために用いられる宿主細胞に基づいて選択される調節配列とを含有することを意味する。「機能的に連結される」とは、核酸の発現を可能にする方法で核酸が調

10

20

30

40

50

節配列に連結していることを意味すると意図される。

【0146】

適した調節配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳動物、または昆虫の遺伝子が含まれる多様な起源に由来してもよい（たとえば、Goeddel（20）において記述される調節配列を参照されたい）。適当な調節配列の選択は、以下に考察されるように、選択される宿主細胞に依存し、当業者によって容易に行われるであろう。そのような調節配列の例には、転写プロモーターおよびエンハンサー、またはRNAポリメラーゼ結合配列、翻訳開始シグナルが含まれるリボソーム結合配列が含まれる。さらに、選択される宿主細胞および使用されるベクターに応じて、複製開始点、さらなるDNA制限部位、エンハンサー、および転写の誘導性を付与する配列のような他の配列を、発現ベクターに組み入れてもよい。

10

【0147】

組み換え型発現ベクターはまた、本発明の組み換え分子によって形質転換またはトランスフェクトされる宿主細胞の選択を促進するマーカー遺伝子を含むしてもよい。選択マーカー遺伝子の例は、一定の薬物に対する抵抗性を付与するG418およびヒグロマイシン、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ファイアフライシルシフェラーゼ、または免疫グロブリンもしくは免疫グロブリンの好ましくはIgGのFc部分のようなその一部、のようなタンパク質をコードする遺伝子である。選択マーカー遺伝子の転写は、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、またはファイアフライシルシフェラーゼのような選択マーカータンパク質の濃度の変化によってモニターされる。選択マーカー遺伝子がネオマイシン耐性のような抗生物質耐性を付与するタンパク質をコードする場合、形質転換細胞をG418によって選択することができる。選択マーカー遺伝子を組み入れた細胞は生存するが、他の細胞は死滅する。これによって本発明の組み換え型発現ベクターの発現を可視化およびアッセイすることが可能となり、特に発現および表現型に及ぼす変異の効果を決定することが可能となる。選択マーカーは関心対象核酸とは異なるベクターに導入することができると認識されるであろう。

20

【0148】

組み換え型発現ベクターを、形質転換宿主細胞を産生するために宿主細胞に導入することができる。「形質転換宿主細胞」という用語には、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープをコードする組み換え型発現ベクターによって形質転換またはトランスフェクトされている原核細胞および真核細胞が含まれると意図される。「形質転換される」、「トランスフェクトされる」、「形質転換」、および「トランスフェクション」という用語は、当技術分野において公知の多くの可能性がある技術の一つによって、細胞に核酸（たとえば、ベクター）を導入することを含むと意図される。原核細胞は、たとえば、電気穿孔または塩化カルシウム媒介形質転換によって核酸によって形質転換されうる。核酸は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔、またはマイクロインジェクションのような通常の技術によって、哺乳動物細胞に導入することができる。宿主細胞を形質転換およびトランスフェクトするための適した方法は、Sambrook et al.（21）および他の実験のテキストにおいて見いだされうる。

30

【0149】

適した宿主細胞には、広く多様な原核および真核宿主細胞が含まれる。たとえば、本発明のタンパク質は、大腸菌のような細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルスを用いて）、酵母細胞、または哺乳動物細胞において発現されてもよい。他の適した宿主細胞はGoeddel（20）において見いだされうる。

40

【0150】

より具体的には、本発明を行うために適した細菌宿主細胞には、大腸菌、枯草菌（*B. subtilis*）、ネズミチフス菌、およびシュードモナス（*Pseudomonas*）、ストレプトミセス（*Streptomyces*）、およびブドウ球菌（*Staphylococcus*）属内の様々な種と共に当業者に周知の他の多くの細菌種が含まれる。適した細菌発現ベクターは、好ましくは、宿主細胞において機能するプロモーター、一つまたは複数の選択表現型マーカー、および細菌の複

50

製開始点を含む。代表的なプロモーターには、 β -ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）および乳糖プロモーター系（Chang et al. (22)を参照されたい）、trpプロモーター（23）、およびtacプロモーター（24）が含まれる。代表的な選択マーカーには、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子のような様々な抗生物質耐性マーカーが含まれる。適した発現ベクターには、 λ 誘導体のようなバクテリオファージまたはpBR322（Bolivar et al. (25)を参照されたい）、pUCプラスミドpUC18、pUC19、pUC118、pUC119（Messing (26)およびVieira and Messing (27)を参照されたい）、ならびにpNH8A、pNH16a、pNH18a、およびBluescript M13（Stratagene, La Jolla, Calif.）のようなプラスミドが含まれるがこれらに限定されるわけではない。用いてもよい典型的な融合発現ベクターは、先に考察されたとおりであり、たとえばpGEX（Amrad Corp., Melbourne, Australia）、pMAL（New England Biolabs, Beverly, MA）、およびpRIT5（Pharmacia, Piscataway, NJ）である。誘導型の非融合発現ベクターの例には、pTrc（28）、およびpET 11d（29）が含まれる。

10

【0151】

本発明を行うために適した酵母および真菌宿主細胞には、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、ピチア（*Pichia*）またはクルイベロミセス（*Kluyveromyces*）属、およびアスペルギルス属（*Aspergillus*）の様々な種が含まれるがこれらに限定されるわけではない。出芽酵母における発現のためのベクターの例には、pYepSec1（30）、pMFa（31）、pJRY88（32）、およびpYES2（Invitrogen Corporation, San Diego, CA）が含まれる。酵母および真菌を形質転換するためのプロトコールは当業者に周知である（Hinnen et al. (33)；Itoh et al. (34)、およびCullen et al. (35)を参照されたい）。

20

【0152】

本発明を行うために適した哺乳動物細胞には、中でも：COS（たとえば、ATCC No. CRL 1650または1651）、BHK（たとえば、ATCC No. CRL 6281）、CHO（ATCC No. CCL 61）、HeLa（たとえば、ATCC No. CCL 2）、293（ATCC No. 1573）、およびNS-1細胞が含まれる。哺乳動物細胞において発現を指示するために適した発現ベクターには、一般的にプロモーター（たとえば、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40のようなウイルス材料に由来する）と共に、他の転写および翻訳制御配列が含まれる。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8（36）、およびpMT2PC（37）が含まれる。

30

【0153】

本明細書において提供された教示を考慮すると、プロモーター、ターミネーター、および植物、鳥類、および昆虫細胞に適当なタイプの発現ベクターを導入する方法も同様に、容易に達成される可能性がある。たとえば、一つの態様において、本発明のタンパク質は、植物細胞から発現されてもよい（アグロバクテリウム・リゾゲネス（*Agrobacterium rhizogenes*）ベクターの使用を論評するSinkar et al. (38)を参照されたい；同様に中でもpAS2022、pAS2023、およびpAS2034が含まれる、植物細胞のための発現ベクターを用いることを記述するZambryski et al. (39)も同様に参照されたい）。

40

【0154】

本発明を行うために適した昆虫細胞には、カイゴカ（*Bombyx*）、またはスポドブレタ（*Spodoptera*）種の細胞および細胞株が含まれる。培養昆虫細胞（SF9細胞）におけるタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAcシリーズ（40）およびpVLシリーズ（41）が含まれる。組み換え型タンパク質を発現するために適したいくつかのバキュロウイルス-昆虫細胞発現系が、PCT/US/02442において記述されている。

【0155】

筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ、アルツハイマー病特異的エピトープ、およびパーキンソン病特異的エピトープが含まれる、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有する組み換え型発現ベクターはまた、組み換え型ペプチドの発現の増加；組み換え

50

型ペプチドの溶解度の増加；およびアフィニティ精製におけるリガンドとして作用することによって標的組み換え型ペプチドの精製における助力を提供する融合部分（すなわち「融合タンパク質」）をコードする遺伝子を含有してもよい。たとえば、組み換え型タンパク質を融合部分から分離させて、次に融合タンパク質を精製するために、タンパク質分解切断部位を標的組み換え型タンパク質に加えてもよい。典型的な融合発現ベクターには、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、マルトース結合タンパク質、またはプロテインAをそれぞれ組み換え型タンパク質に融合させる、pGEX（Amrad Corp., Melbourne, Australia）、pMAL（New England Biolabs, Beverly, MA）、およびpRIT5（Pharmacia, Piscataway, NJ）が含まれる。

【0156】

10

SOD1媒介神経変性疾患を処置するための核酸組成物

本発明の一つの局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、アルツハイマー病を処置するための組成物である。本発明のもう一つの局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、パーキンソン病を処置するための組成物である。本発明のもう一つの局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、筋萎縮性側索硬化症を処置するための組成物である。

20

【0157】

好ましい態様において、単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおけるペプチド、またはその類似体からなる群より選択される。

【0158】

本発明のもう一つの局面は、ペプチドが、表2もしくは表2Aにおけるペプチド、またはその類似体からなる群より選択される、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする核酸の有効量を、適した担体または希釈剤と混合して含む、動物における免疫応答を誘発するための組成物である。

30

【0159】

態様において、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸には、以下のRNA分子、その同義のコドン同等物、ならびにそのDNA対応物および相補体が含まれる。

RLACGVIGI|に対して;

AGGUUAGCUUGUGGUGUUAUAGGUAUA(SEQ ID NO: 19)

DLGKGGNEESTKTGNAGSに対して;

GAUUUAGGUAAGGUGGUAUGAAGAAAGUACUAAAACUGGUAA
UGCUGGUAGU (SEQ ID NO: 20)

NPLSRKHGGPKDEEに対して;

10

AAUCCUUUAAGUCGUAAACACGGAGGACCGAAGGACGAGGAG
(SEQ ID NO: 21)

IKGLTEGLHGFに対して;

AUAAAGGGGAAAACAGAAGGACUCCACGGCUUU(SEQ ID NO: 22)

HCIIGRTLTVHに対して;

CACUGUAUUUUGGCAGGACCCUCGUUGUUCAC (SEQ ID NO: 23)

20

【 0 1 6 0 】

他の有用な核酸には以下が含まれる。

RLACGVIGI(DSE1: 143-151)に対して;

CGUUUGGCUUGUGGUGUAAUUGGGAUC (SEQ ID NO: 24)

ACGVIGI(DSE1: 145-151)に対して;

GCUUGUGGUGUAAUUGGGAUC (SEQ ID NO: 25)

DLGKGGNEESTKTGNAGS(DSE2: 125-142)に対して;

GACUUGGGCAAAGGUGGAAAUGAAGAAAGUACAAAGACAGGAAA
CGCUGGAAGU (SEQ ID NO: 26)

10

NPLSRKHGGPKDEE(DSE3: 65-78)に対して;

AAUCCUCUAUCCAGAAAACACGGUGGGCCAAAGGAUGAAGAG
(SEQ ID NO: 27)

KAVCVLK(DSE4: 3-9)に対して;

AAGGCCGUGUGCGUGCUGAAG (SEQ ID NO: 28)

20

IKGLTEGLHGF(DSE5: 35-45)に対して;

AUAAAAGGACUGACUGAAGGCCUGCAUGGAUUC (SEQ ID NO: 29)

HCIIGRTLTVH(DSE6: 110-120)に対して;

CAUUGCAUCAUUGGCCGCACACUGGUGGUCCAU (SEQ ID NO: 30)

GLHGFHVH(DSE7: 41-48)に対して;

GGCCUGCAUGGAUCCAUGUUCAU (SEQ ID NO: 31)

30

核酸は本明細書において、「表2C核酸」と呼ばれる。

【0161】

本発明の一つの局面は、表2もしくは表2Aにおけるペプチド、またはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む、単離された筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープをコードする単離核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体における筋萎縮性側索硬化症を処置するための組成物である。

【0162】

本発明のもう一つの局面は、表2もしくは表2Aにおけるペプチド、またはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む、単離された筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープをコードする単離核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、動物における免疫応答を誘発するための組成物である。

40

【0163】

態様において、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸には、表2C核酸において記載される以下のRNA分子、その同義のコドン同等物、およびそのDNA相対物が含まれる。

【0164】

本発明のさらなる局面は、表2もしくは表2Aにおけるペプチド、またはその類似体からなる群より選択されるペプチドを含む、単離されたアルツハイマー病特異的エピトープを

50

コードする単離核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体におけるアルツハイマー病を処置するための組成物である。

【0165】

本発明のもう一つの局面は、表2もしくは表2Aにおけるペプチド、またはその類似体からなる群より選択されるペプチドを含む、単離されたアルツハイマー病特異的エピトープをコードする単離核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、動物における免疫応答を誘発するための組成物である。

【0166】

態様において、アルツハイマー病特異的エピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸には、表2C核酸において記載される以下のRNA分子、その同義のコドン同等物、およびそのDNA相対物が含まれる。

10

【0167】

本発明のもう一つの局面は、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチド、またはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む、パーキンソン病特異的エピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、被験体におけるパーキンソン病を処置するための組成物である。

【0168】

本発明のもう一つの局面は、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチド、またはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む、単離されたパーキンソン病特異的エピトープをコードする単離核酸の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、動物における免疫応答を誘発するための組成物である。

20

【0169】

態様において、パーキンソン病特異的エピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸には、表2C核酸において記載される以下のRNA分子、その同義のコドン同等物、およびそのDNA相対物が含まれる。

【0170】

当業者は、単離された筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ、単離されたアルツハイマー病特異的エピトープ、および単離されたパーキンソン病特異的エピトープが含まれる、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする核酸分子を含有する組成物を用いる場合に利用可能ないくつかの投与様式が存在することを認識するであろう。上記の組み換え型分子は、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびDNAウイルスベクターのような送達媒体を用いて、インビボで細胞または組織に直接導入されてもよい。それらはまた、マイクロインジェクションおよび電気穿孔のような物理的技術、または共沈殿およびリポソームへのDNAの組み込みのような化学的方法を用いて、インビボで細胞に導入されてもよい。組み換え型分子は、エアロゾルの剤形または洗浄によって送達されてもよい。本発明の核酸分子はまた、細胞への直接注入によるように、細胞外に適用されてもよい。

30

【0171】

核酸を用いる疾患の医学的処置法

本発明の核酸分子を含有するベクターは任意で、以下に記述される技術を用いる遺伝子治療において、哺乳動物、好ましくはヒトのCNSに投与される。核酸分子から産生されるポリペプチドは、哺乳動物、好ましくはヒトのCNSに容易に投与される。本発明は、本発明のベクターまたは本発明のベクターを含有する細胞を哺乳動物に投与することによって、哺乳動物、好ましくはヒトを医学的に処置する方法に関する。パーキンソン病、アルツハイマー病、および筋萎縮性側索硬化症のような神経疾患は、本出願において記述されるように、または当技術分野において公知の方法（US Patent Nos. 7175840、7157098、7141044、6,309,634；6936594；米国特許出願第2006073119号；第2004265283号；第2002107213号；第2006122116号）を用いて処置される。血液疾患または神経疾患（神経変性性）のような疾患は、本出願において記述されるように、および当技術分野において公知のように処置される。神経幹細胞移植によって処置される幹細胞神経疾患には、神経細胞の損傷

40

50

または喪失、たとえば麻痺が起こる疾患、パーキンソン病、アルツハイマー病、ALS、多発性硬化症が含まれる。本発明のベクターは、幹細胞マーカーとして、および幹細胞を分化させる遺伝子を発現するために（たとえば、増殖因子）有用である。

【0172】

遺伝子治療

本発明には、細胞における分子の発現が、コード核酸分子によってコードされるポリペプチドの生物活性をそれらの細胞に提供するように、被験体にコード核酸分子を提供するための組成物および方法が含まれる。本明細書において用いられるコード核酸は、対応するタンパク質のアミノ酸配列、またはその一部を指定するヌクレオチドを含む核酸を意味する。コード配列は、開始コドンおよび/または終止配列を含んでもよい。

10

【0173】

本発明には、細胞におけるコード核酸分子の発現が、コード核酸分子によってコードされるポリペプチドの生物活性または表現型を提供するように、個体の細胞にコード核酸分子を提供するための方法および組成物が含まれる。方法はまた、本発明の核酸分子を投与することによって、疾患、障害、または異常な身体状態を有する個体に生物活性ポリペプチドを提供するための方法に関する。方法はエキスピボまたはインピボで行ってもよい。遺伝子治療の方法および組成物は、たとえば米国特許第5,869,040号、第5,639,642号、第5,928,214号、第5,911,983号、第5,830,880号、第5,910,488号、第5,854,019号、第5,672,344号、第5,645,829号、第5,741,486号、第5,656,465号、第5,547,932号、第5,529,774号、第5,436,146号、第5,399,346号および第5,670,488号、第5,240,846号において示される。ポリペプチドの量は被験体の必要に応じて変化するであろう。ベクターの最適な用量は、経験的な技術を用いて、たとえば用量を上昇させることによって容易に決定される（用量を上昇させる例に関しては米国特許第5,910,488号を参照されたい）。

20

【0174】

遺伝子治療に対する様々なアプローチが用いられる。本発明には、その中に本発明のベクターを挿入するようにインピトロまたはエキスピボで処置され、治療的ポリペプチドの治療的有効量を該ヒトにおいてインピボで発現するヒト細胞をヒトに導入する段階が含まれる、ヒトに治療ポリペプチドを提供するためのプロセスが含まれる。

【0175】

方法はまた、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるグロビナン (globin) エピトープをコードする改変DNAを含む遺伝子治療にとって適したウイルスを産生することによって、組み換え型ウイルスの貯蔵物を産生するための方法にも関する。この方法は好ましくは、ウイルス複製を許容する細胞 (SOD1改変グロビンの非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープを含有するウイルス) をトランスフェクトする段階、および産生されたウイルスを回収する段階を伴う。インピトロおよびインピボの双方においてニューロンに遺伝子移入するための最も効率的な系は、ウイルスに基づくベクターであり、最も顕著に単純ヘルペスウイルス (Geller et al., 1995; During et al., 1994)、アデノウイルス (Davidson et al., 1993; La Gal La Salle, 1993)、アデノ随伴ウイルス (AAV) (Kaplitt and During, 1995; During and Leone, 1996)、およびレンチウイルス (Naldini et al., 1996) に基づくベクターである。ヒトにおける遺伝子送達のための代替のアプローチには、裸のプラスミドDNAと共にリポソーム-DNA複合体を用いることが含まれる (Ulrich et al., 1996; Gao and Huang, 1995)。もう一つのアプローチは、DNAが多価陽イオン濃縮され、脂質が捕獲され、脳内遺伝子送達によって脳に導入されるAAVプラスミドの使用である (Leone et al. 米国特許出願第2002076394号)。送達されたウイルスベクターによって一つより多いトランスジーンを発現させることができると理解されるべきである。または、それぞれが一つまたは複数のトランスジーンを発現する異なるベクターも同様にCNSに送達することができる。

30

40

【0176】

同時トランスフェクション (異なる分子上のDNAおよびマーカー) が任意で使用される

50

(たとえば、US 5,928,914およびUS 5,817,492)。同様に、マーカー（緑色蛍光タンパク質マーカーまたは誘導体のような）はベクター（好ましくはウイルスベクター）自身の内部において有用である。

【0177】

ALS、AD、およびPDのような神経変性疾患の処置に対する他のインビボ遺伝子治療アプローチには、芳香族L-アミノ酸デカルボキシラーゼ（ASDC）、視床下核グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）（Marutso, Nippon Naika Gakkai Zasshi, 2003, 92 (8), 1461-1466; Howard, Nature Biotechnology, 2003, 21 (10), 1117-18）を発現するウイルスによる形質導入が含まれる。

【0178】

ベクターは任意で、直接注入によって投与される。脳（特に線条体）への注入法は当技術分野で周知である（Bilang-Bleuel et al (1997) Proc. Acad. Natl. Sci. USA 94:8818-8823; Choi-Lundberg et al (1998) Exp. Neurol. 154:261-275; Choi-Lundberg et al (1997) Science 275:838-841; およびMandel et al (1997) Proc. Acad. Natl. Sci. USA 94:14083-14088）。定位注射を行ってもよい。ベクターは任意で、注入ポンプまたは浸透圧ポンプによって行われるConvection-enhanced delivery（CED）（米国特許第6,309,634号）によって、脳に送達される。Convection-enhanced delivery装置は任意で、浸透圧ポンプまたは注入ポンプ（たとえば、Alzet Corporation, Hamilton Corporation, Alza, Inc., Palo Alto, Calif.）である。ベクターを送達するために選択された被験体のCNS組織に、カテーテル、カニューレ、または他の注入装置を挿入する。当業者は、CNSのどの一般的領域がベクター送達の適当な標的であるかを容易に決定することができるであろう。たとえば、コリン作動性基底前脳（特に、基底前脳のCh4領域）は、アルツハイマー病、パーキンソン病、および筋萎縮性側索硬化症が含まれる多数の神経変性疾患の処置においてベクターを送達するための適した標的組織である。

【0179】

組成物は、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、および/またはパーキンソン病を処置するために、萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、および/またはパーキンソン病を処置するための方法において、ならびに萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、および/またはパーキンソン病を処置するための薬剤の製造において用いることができる。

【0180】

疾患特異的エピトープに対応する単離ペプチドを用いる治療法

したがって、本発明の一つの局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドを、適した希釈剤または担体と混合して被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体におけるアルツハイマー病を処置する方法である。本発明のもう一つの局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドを適した希釈剤または担体と混合して被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体におけるパーキンソン病を処置する方法である。本発明のさらなる局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドを適した希釈剤または担体と混合して被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体における筋萎縮性側索硬化症を処置する方法である。

【0181】

好ましい態様において、エピトープは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

【0182】

本発明の一つの態様は、本発明の組成物の一つを被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体における筋萎縮性側索硬化症を処置する方法である。

【0183】

本発明のもう一つの態様は、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープを適当な希釈剤または担体と混合して含む組成物を被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体に

10

20

30

40

50

おける筋萎縮性側索硬化症を処置する方法である。

【0184】

さらなる態様において、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

【0185】

本発明の一つの態様は、本発明の組成物の一つを被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体におけるアルツハイマー病を処置する方法である。

【0186】

本発明のもう一つの態様は、アルツハイマー病特異的エピトープに対応する単離ペプチドを適当な希釈剤または担体と混合して含む組成物を被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体におけるアルツハイマー病を処置する方法である。

10

【0187】

さらなる態様において、アルツハイマー病特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

【0188】

本発明の一つの態様は、本発明の組成物の一つを被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体におけるパーキンソン病を処置する方法である。

【0189】

本発明のもう一つの態様は、パーキンソン病特異的エピトープに対応する単離ペプチドを適当な希釈剤または担体と混合して含む組成物を被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体におけるパーキンソン病を処置する方法である。

20

【0190】

さらなる態様において、パーキンソン病特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

【0191】

単離核酸を用いる処置法

本発明のさらなる局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸を、適した希釈剤または担体と混合して被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体におけるアルツハイマー病を処置する方法である。本発明のさらなる局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸を、適した希釈剤または担体と混合して被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体におけるパーキンソン病を処置する方法である。本発明のさらなる局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸を、適した希釈剤または担体と混合して被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体における筋萎縮性側索硬化症を処置する方法である。特定の態様において、核酸は、表2C核酸の群から選択される核酸を含む。

30

【0192】

好ましい態様において、エピトープは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

40

【0193】

本発明の一つの態様は、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応するペプチドをコードする核酸を適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体における筋萎縮性側索硬化症を処置する方法である。一つの態様において、核酸は表2C核酸の群から選択される核酸を含む。

【0194】

さらなる態様において、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。本

50

発明のさらなる態様は、単離されたアルツハイマー病特異的エピトープをコードする核酸を適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体におけるアルツハイマー病を処置する方法である。一つの態様において、核酸は表2C核酸の群から選択される核酸を含む。

【0195】

さらなる態様において、アルツハイマー病特異的エピトープは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。本発明のもう一つの態様は、パーキンソン病特異的エピトープに対応するペプチドをコードする核酸を適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体におけるパーキンソン病を処置する方法である。一つの態様において、核酸は表2C核酸の群から選択される核酸を含む。

10

【0196】

さらなる態様において、パーキンソン病特異的エピトープは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

【0197】

一つの態様において、本発明はまた、薬学的に許容される媒体と、(1) SODのミスフォールド型に選択的に結合する抗体、および/または(2) 被験体による該抗体の産生を誘発する免疫原、および/または(3) (1) もしくは(2) をコードする核酸配列、から選択される物質とを含む組成物を被験体に投与する段階を含む、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)のミスフォールド型によって媒介される医学的状態、疾患、または障害を有する被験体を処置するための方法を提供する。

20

【0198】

疾患特異的エピトープに対応する単離ペプチドを用いて免疫応答を誘発する方法

これらの組成物は、動物において免疫応答を誘発するために用いることができ、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ、アルツハイマー病特異的エピトープ、またはパーキンソン病特異的エピトープが含まれる、非天然のSOD1において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対する免疫応答を動物において誘発する方法において用いることができる。

【0199】

本発明のもう一つの態様は、本発明の組成物の一つを用いて動物における免疫応答を誘発する方法である。本発明の局面には、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドを、適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を用いて、動物における免疫応答を誘発する方法が含まれる。好ましい態様において、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドである。

30

【0200】

一つの態様には、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドを適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を用いて、動物における免疫応答を誘発する方法が含まれる。

40

【0201】

さらなる態様において、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドである。

【0202】

もう一つの態様には、アルツハイマー病特異的エピトープに対応する単離ペプチドを適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を用いて、動物における免疫応答を誘発する方法が含まれる。

【0203】

さらなる態様において、アルツハイマー病特異的エピトープに対応する単離ペプチドは

50

、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドである。

【0204】

さらなる態様には、パーキンソン病特異的エピトープに対応する単離ペプチドに適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を用いて、動物における免疫応答を誘発する方法が含まれる。

【0205】

さらなる態様において、パーキンソン病特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドである。

10

【0206】

単離核酸を用いて免疫応答を誘発する方法

本発明のもう一つの局面には、アルツハイマー病を処置するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドをコードする核酸に適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を用いて、動物における免疫応答を誘発する方法が含まれる。本発明のさらなる局面には、パーキンソン病を処置するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドをコードする核酸に適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を用いて、動物における免疫応答を誘発する方法が含まれる。本発明のさらなる局面には、筋萎縮性側索硬化症を処置するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドをコードする核酸に適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を用いて、動物における免疫応答を誘発する方法が含まれる。

20

【0207】

好ましい態様において、エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

【0208】

本発明の一つの態様には、単離された筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープをコードする核酸に適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を用いて、動物において免疫応答を誘発する方法が含まれる。

30

【0209】

さらなる態様において、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドである。

【0210】

本発明のさらなる態様には、アルツハイマー病特異的エピトープに対応するペプチドをコードする核酸に適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を用いて、動物において免疫応答を誘発する方法が含まれる。

【0211】

さらなる態様において、アルツハイマー病特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドである。

40

【0212】

本発明のもう一つの態様には、パーキンソン病特異的エピトープに対応する単離ペプチドをコードする核酸に適した希釈剤または担体と混合して含む組成物を用いて、動物において免疫応答を誘発する方法が含まれる。

【0213】

さらなる態様において、パーキンソン病特異的エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドである。

50

【0214】

薬剤の製造における疾患特異的エピトープに対応する単離ペプチドの使用

本発明のさらなる局面は、アルツハイマー病を処置するための薬剤を製造するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドを用いることである。本発明のさらなる局面は、パーキンソン病を処置するための薬剤を製造するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドを用いることである。本発明のさらなる局面は、筋萎縮性側索硬化症を処置するための薬剤を製造するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドを用いることである。

10

【0215】

好ましい態様において、エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

【0216】

薬剤の製造における単離核酸の使用

本発明のさらなる局面は、アルツハイマー病を処置するための薬剤を製造するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸を用いることである。本発明のさらなる局面は、パーキンソン病を処置するための薬剤を製造するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸を用いることである。本発明のさらなる局面は、筋萎縮性側索硬化症を処置するための薬剤を製造するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸を用いることである。

20

【0217】

好ましい態様において、エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

【0218】

先に記述したように、ワクチンの免疫原性およびこのように有効性は、免疫物質（たとえばSOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチド）および/またはその組成物がアジュバントと共に同時免疫される場合に有意に改善されうる。したがって、本発明の方法および使用には、アジュバントの使用が含まれる。

30

【0219】

SOD1媒介神経変性疾患を処置するために疾患特異的エピトープに対応する単離核酸の使用

本発明のもう一つの局面は、アルツハイマー病を処置するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離核酸を、適した希釈剤または担体と混合して用いることである。本発明のさらなる局面は、パーキンソン病を処置するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離核酸を、適した希釈剤または担体と混合して用いることである。本発明のさらなる局面は、筋萎縮性側索硬化症を処置するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離核酸を、適した希釈剤または担体と混合して用いることである。代わりの態様において、本発明は、疾患特異的エピトープに対応するペプチドをコードする単離核酸を用いることを含む。

40

【0220】

好ましい態様において、核酸は、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択されるペプチドを含む、疾患特異的エピトープに対応するペプチドをコードする。

【0221】

本発明のもう一つの局面は、アルツハイマー病を処置するために、SOD1の非天然型にお

50

いて選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドを、適した希釈剤または担体と混合して用いることである。本発明のさらなる局面は、パーキンソン病を処置するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドを、適した希釈剤または担体と混合して用いることである。本発明のさらなる局面は、筋萎縮性側索硬化症を処置するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対応する単離ペプチドを、適した希釈剤または担体と混合して用いることである。

【0222】

好ましい態様において、エピトープに対応する単離ペプチドは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

10

【0223】

疾患特異的エピトープに対して特異的な結合物質の組成物および使用
疾患特異的エピトープに結合する物質

ミスフォールドSOD1において提示されるエピトープは、抗体、他のポリペプチド、低分子、アフィボディ (Wahlberg et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100:3185-3190, 2003) ; アンチカリン (Schlehuber and Skerra, Biophys Chem., 96:213-28, 2002) ; および核酸とタンパク質のアプタマー (Cullen et al. Cell, 58: 423-466, 1989) のような多数の異なる天然のまたは操作された物質によって結合および/または中和されてもよい。特定の態様において、物質は、非天然型SOD1において提示されるまたは近づくことができる疾患特異的エピトープまたはその類似体に選択的に結合する抗体である。

20

【0224】

抗体の作製

SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープは、抗体を作製するために用いることができる。好ましい態様において、抗体は、ミスフォールドSOD1、好ましくはアルツハイマー病、パーキンソン病、および/または筋萎縮性側索硬化症に関連するミスフォールドSOD1に対して特異的である。

【0225】

一つの態様において、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープは、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対して特異的な抗体を作製するために用いることができる。好ましい態様において、抗体はミスフォールドSOD1分子に対して特異的である。他の態様において、抗体は単離された抗体である。

30

【0226】

もう一つの態様において、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対して特異的な単離抗体は、本発明の組成物の一つを動物に投与することによって作製される。

【0227】

もう一つの態様には、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに関する単離抗体が含まれる。

【0228】

一つの態様において、アルツハイマー病特異的エピトープは、アルツハイマー病特異的エピトープに対して特異的な抗体を作製するために有用である。抗体は、典型的にミスフォールドSOD1分子に対して特異的である。

40

【0229】

もう一つの態様において、アルツハイマー病特異的エピトープに対して特異的な単離抗体は、本発明の組成物の一つを動物に投与することによって作製される。

【0230】

もう一つの態様には、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む、アルツハイマー病特異的エピトープに関する単離抗体が含まれる。

【0231】

50

一つの態様において、パーキンソン病特異的エピトープは、パーキンソン病特異的エピトープに対して特異的な抗体を作製するために有用である。好ましい態様において、抗体はミスフォールドSOD1分子に対して特異的である

【0232】

もう一つの態様において、パーキンソン病特異的エピトープに対して特異的な単離抗体は、本発明の組成物の一つを動物に投与することによって作製される。

【0233】

もう一つの態様には、抗体を生成するために用いられるパーキンソン病特異的エピトープに対応する単離ペプチドが、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む、パーキンソン病特異的エピトープに関する単離抗体が含まれる。

【0234】

本明細書において用いられるように、「抗体」という用語には、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体が含まれるモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ならびにキメラ抗体が含まれると意図される。抗体は、組み換え起源に由来してもよくおよび/またはトランスジェニック動物において産生されてもよい。本明細書において用いられる「抗体断片」という用語には、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ミニボディ、ディアボディ、その多量体、および二重特異性抗体断片が含まれると意図される。抗体は、通常の技術を用いて断片化される。たとえば、F(ab')₂断片は、抗体をペプシンによって処置することによって生成されうる。得られたF(ab')₂断片をジスルフィド架橋を還元するように処置すると、Fab'断片を生成することができる。パイン消化によってFab断片の形成が起こりうる。Fab、Fab'およびF(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ミニボディ、ディアボディ、二重特異性抗体断片および他の断片はまた、組み換え技術を用いて合成することができる。抗体は任意で、一つの態様において診断応用において用いられるIgM、ならびに一つの態様において治療応用のために用いられるIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4のようなIgGが含まれる任意の有用なアイソタイプの抗体である。

【0235】

「単離抗体」は、抗体を産生する起源、たとえば動物、ハイブリドーマ、または他の細胞株（抗体を産生する組み換え型細胞のような）から除去されているインビボまたはインビボで産生された抗体を指す。単離抗体は任意で「精製」され、このことは、少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%純度を意味し、任意で薬学等級の純度を意味する。

【0236】

「内因性の抗体」は、被験体の免疫応答の一部として、哺乳動物（たとえば、ヒト）のような被験体によって産生される抗体を指す。

【0237】

「外因性の抗体」は、哺乳動物（たとえば、ヒト）のような被験体に対して非自己または異物である抗体を指す。「外因性の抗体」という用語は、単離精製抗体と共に単離抗体を含む。モノクローナル抗体を産生するために、抗体産生細胞（リンパ球）を、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ、アルツハイマー病特異的エピトープ、またはパーキンソン病特異的エピトープが含まれるミスフォールドSOD1特異的エピトープに対応する単離ペプチドを含む免疫原によって免疫した被験体から採取して、標準的な体細胞融合技法によって骨髓腫細胞と融合させて、このようにしてこれらの細胞を不死化させて、ハイブリドーマ細胞を産生することができる。そのような技術は当技術分野において周知であり、たとえば当初Kohler and Milstein (42) によって開発されたハイブリドーマ技術と共に、ヒトB-細胞ハイブリドーマ技術(43)、ヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ技術(44)、および組み合わせ抗体ライブラリのスクリーニング(45)である。ハイブリドーマ細胞を、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対して特異的に反応する抗体の産生に関して免疫化学的にスクリーニングすることができ、モノクローナル抗体

を単離することができる。

【0238】

筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ、アルツハイマー病特異的エピトープ、またはパーキンソン病特異的エピトープが含まれるSOD1のミスフォールド型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープのような、特定の抗原または分子に対して反応性である特異的抗体または抗体断片も同様に、細胞表面成分と共に細菌において発現される免疫グロブリン遺伝子またはその一部をコードする発現ライブラリをスクリーニングすることによって生成してもよい。たとえば、完全なFab断片、VH領域およびFV領域は、ファージ発現ライブラリを用いて細菌において発現させることができる（たとえば、Ward et al. (46) : Huse et al. (45) ; およびMcCafferty et al. (47) を参照されたい）

10

【0239】

本明細書において用いられる「ヒト化抗体」という用語は、抗体または抗体断片がヒトの保存されたフレームワーク領域（または定常領域と呼ばれる）を含み、超可変領域（または抗原結合ドメインとも呼ばれる）が非ヒト起源であることを意味する。たとえば、超可変領域はマウス、ラット、または他の種に由来してもよい。非ヒト種の抗体のヒト化は文献において十分に記述されている。たとえば、EP-B1 0 239400およびCarter & Merchant 1997（その全内容物が参照により本明細書に組み入れられる、Curr Opin Biotechnol 8, 449-454, 1997）を参照されたい。ヒト化抗体はまた、購入によって容易に得られる（たとえば、Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Great Britain）

20

【0240】

齧歯類抗体のヒト化型は、CDRグラフティング（Riechmann et al. Nature, 332:323-327, 1988）によって容易に生成される。このアプローチにおいて、齧歯類モノクローナル抗体の抗原結合部位を含むCDRループ6個を、対応するヒトフレームワーク領域に連結させる。フレームワーク領域のアミノ酸は抗原認識に影響を及ぼす可能性があることから、CDRグラフティングはしばしば親和性が低減された抗体を生じる（Foote & Winter. J Mol Biol, 224: 487-499, 1992）。抗体の親和性を維持するために、しばしば部位特異的変異誘発または他の組み換え技術によって、一定のフレームワーク残基を置換することが必要であり、抗原結合部位のコンピューターモデリングの助けを借りてもよい（Co et al. J Immunol, 152: 2968-2976, 1994）。

30

【0241】

抗体のヒト化型は任意で表面再形成によって得られる（Pedersen et al. J Mol Biol, 235: 959-973, 1994）。このアプローチにおいて、齧歯類抗体の表面残基のみがヒト化される。

【0242】

本明細書において用いられるように、「ヒト抗体」という用語は、ヒト被験体において内因性に産生される抗体であるまたは抗体に対応する抗体を指すが、ヒト抗体はまた任意で生化学技術を通して外因性に産生される。特定の抗原に対して特異的なヒト抗体は、ファージディスプレイ戦略によって同定される可能性がある（Jespers et al. Bio/Technology, 12: 899-903, 1994）。一つのアプローチにおいて、特異的抗原に対する齧歯類抗体の重鎖をクローニングして、糸状ファージにおけるFab断片として表示するためにヒト軽鎖のレパートリーと対を形成させる。ファージを抗原に対する結合によって選択する。次に、選択されたヒト軽鎖を、ファージ上に表示するためにヒト重鎖のレパートリーと対を形成させて、再度ファージを抗原に対する結合によって選択する。結果は、特定の抗原に対して特異的なヒト抗体Fab断片である。もう一つのアプローチにおいて、産生されるファージのライブラリは、その外表面上で異なるヒト抗体断片（FabまたはFv）を示すメンバーであった（Dower et al., WO 91/17271、およびMcCafferty et al., WO 92/01047）。所望の特異性を有する抗体を示すファージを、特異的抗原に対するアフィニティ濃縮によって選択する。いずれかのアプローチから同定されたヒトFabまたはFv断片を、哺乳動

40

50

物細胞においてヒト抗体として発現させるために再クローニングしてもよい。

【0243】

ヒト抗体は任意で、トランスジェニック動物から得られる (US Patent Nos. 6,150,584 ; 6,114,598 ; および 5,770,429)。このアプローチでは、キメラまたは生殖系列変異体マウスにおいて重鎖接合領域 (J_H) 遺伝子を欠失させる。次に、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイをそのような変異体マウスに移入する。得られたトランスジェニックマウスは、抗原チャレンジを行うとヒト抗体の完全なレパートリーを生成することができる。

【0244】

ヒト化またはヒト抗体は、以下が含まれる免疫グロブリンのいずれかのクラスから選択される: IgM、IgG、IgD、IgA、またはIgE; ならびにIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4が含まれる任意のアイソタイプ。ヒト化またはヒト抗体には、一つまたは一つより多いアイソタイプまたはクラスからの配列が含まれてもよい。さらに、これらの抗体は典型的に、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、および単ドメイン抗体断片のような抗原結合断片として、または重鎖と軽鎖とがスパーサーによって連結している一本鎖抗体として産生される。同様に、ヒトまたはヒト化抗体は、単量体または多量体型で存在してもよい。ヒト化抗体は任意で、一つの非ヒト鎖と一つのヒト化鎖 (すなわち、一つのヒト化重鎖または軽鎖) とを含む。

【0245】

さらに、本発明のエピトープに対して特異的な抗体は、抗体ファージディスプレイライブラリをスクリーニングすることによって容易に単離される。たとえば、抗体ファージライブラリは任意で、疾患特異的なエピトープに対して特異的な抗体断片を同定するために、本発明の疾患特異的なエピトープを用いてスクリーニングされる。同定された抗体断片は任意で、本発明の異なる態様にとって有用である多様な組み換え型抗体を産生するために用いられる。抗体ファージディスプレイライブラリは、たとえばXoma (Berkeley, California) を通して購入される。抗体ファージライブラリをスクリーニングする方法は、当技術分野において周知である。

【0246】

本発明はまた、一つの態様において、表2および表2Aからの単離ペプチドならびにその類似体を含む免疫原を用いて作製された抗体と選択的に競合する抗体を含む。試験抗体が本明細書において記述される本発明の抗体を置換するか否かを決定する方法を提供するために、SOD1の非天然型において提示されるエピトープを、試験抗体および表2、表2Aからの単離ペプチドまたはその類似体を含む免疫原を用いて作製された抗体に接触させる段階、ならびに次にエピトープに対する結合に関して試験抗体が本発明の抗体を置換するか否かを決定する段階を含む、競合アッセイを行う。試験抗体は、試験抗体がエピトープに対して少なくとも1.5倍または少なくとも2倍大きい結合親和性を有する場合に、本発明の抗体を選択的に置換すると見なされる。

【0247】

SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対して特異的なこれらの抗体を用いて、アルツハイマー病、パーキンソン病、および/または筋萎縮性側索硬化症を処置することができる。一つの態様において、本発明の抗体は、筋萎縮性側索硬化症を処置するために用いることができる。さらなる態様において、本発明の抗体はアルツハイマー病を処置するために用いることができる。もう一つの態様において、本発明の抗体はパーキンソン病を処置するために用いることができる。たとえば、筋萎縮性側索硬化症特異的なエピトープに対して特異的な抗体の受動的注入は、SOD1凝集体の形成を阻害する可能性があり、および/またはSOD1鑄型特異的なミスフォールディングを遮断する可能性がある。

【0248】

抗体を含む組成物

したがって、本発明の一つの局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープまたはその類似体に対して特異的な抗体の有効量を、適

10

20

30

40

50

した希釈剤または担体と混合して含む、アルツハイマー病を処置するための組成物である。本発明のさらなる局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対して特異的な抗体の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、パーキンソン病を処置するための組成物である。本発明のさらなる局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対して特異的な抗体の有効量を、適した希釈剤または担体と混合して含む、筋萎縮性側索硬化症を処置するための組成物である。

【0249】

好ましい態様において、エピトープは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

10

【0250】

本発明の一つの局面は、筋萎縮性側索硬化症特異的なエピトープに対して特異的な抗体の有効量を適した希釈剤または担体と混合して含む、筋萎縮性側索硬化症を処置するための組成物である。

【0251】

一つの態様において、抗体はヒト化抗体である。もう一つの態様において、抗体は、筋萎縮性側索硬化症を有する被験体の血液または脊髄液に投与される。

【0252】

本発明のさらなる局面は、アルツハイマー病特異的なエピトープに対して特異的な抗体の有効量を適した希釈剤または担体と混合して含む、アルツハイマー病を処置するための組成物である。

20

【0253】

一つの態様において、抗体はヒト化抗体である。もう一つの態様において、抗体は、アルツハイマー病を有する被験体の血液または脊髄液に投与される。

【0254】

本発明のもう一つの局面は、パーキンソン病特異的なエピトープに対して特異的な抗体の有効量を適した希釈剤または担体と混合して含む、パーキンソン病を処置するための組成物である。

【0255】

一つの態様において、抗体はヒト化抗体である。もう一つの態様において、抗体は、パーキンソン病を有する被験体の血液または脊髄液に投与される。同様に、DSE1a、それが基づく免疫原と共に抗体が提供される。同様にDSE1a、DSE2、およびDSE5を産生するハイブリドーマ、抗体を産生するためのその使用が提供される。

30

【0256】

本発明にはまた、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、およびパーキンソン病を処置するための方法および抗体の使用が含まれる。

【0257】

処置法：受動免疫

本発明の一つの局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体のような結合物質を、適した希釈剤または担体と混合して被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体におけるアルツハイマー病を処置する方法である。本発明のもう一つの局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体を、適した希釈剤または担体と混合して被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体におけるパーキンソン病を処置する方法である。本発明のさらなる局面は、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体を、適した希釈剤または担体と混合して被験体に投与する段階を含む、それを必要とする被験体における筋萎縮性側索硬化症を処置する方法である。

40

【0258】

抗体に加えて、ミスフォールドSOD1において提示されるエピトープは、他のポリペプチ

50

ド、低分子、アフィボディ (Wahlberg et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100:3185-3190, 2003) ; アンチカリン (Schlehuber and Skerra, Biophys Chem., 96:213-28, 2002) ; および核酸とタンパク質のアプタマー (Cullen et al. Cell, 58: 423-466, 1989) のような、多数の異なる天然または操作された分子によって結合および/または中和されてもよい。

【0259】

アフィボディは、ブドウ球菌のプロテインAに由来するZドメインの三重らせん足場に基づく操作された結合タンパク質である (Wahlberg et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100:3185-3190, 2003) 。Zドメインは異なる種のIgGのFc部分に結合する58残基からなる (Nygren and Uhlen. Curr Opin Struct Biol., 7:463-469, 1997) 。ZドメインのFc結合面を構成する二つのらせんに存在するアミノ酸13個の位置を同時に無作為化することによって、結合タンパク質 (アフィボディ) のライブラリを作製して、これを用いてファージディスプレイ技術によって所望の標的に対する結合に関してスクリーニングする (Nord, et al. Protein Eng., 8:601-608, 1995 ; Nord et al. Nat Biotechnol. 15:772-777, 1997) 。アフィボディは、天然のZドメインと類似の二次構造を有し、そのそれぞれの標的に対してマイクロモル範囲の解離定数 (KD) を有する (Nord et al. Nat Biotechnol., 15:772-777, 1997) 。

【0260】

アンチカリンは、リボカリンタンパク質足場に由来する操作されたりガンド結合タンパク質のクラスである (Schlehuber and Skerra, Biophys Chem., 96:213-28, 2002 ; Weiss and Lowman. Chem. Biol., 7:R177-R184, 2000 ; Skerra. J Biotechnol., 74:257-275, 2001) 。アンチカリンを調製するプロセスはEP1017814において記述されている。アンチカリンのリガンド結合部位は、タンパク質の結合特異性を変更するために、アミノ酸置換または他の組み換えアプローチによって再度操作してもよい。アンチカリンは、その規定のリガンドに対する高い親和性および特異性を有するという点において抗体と類似である。しかし、アンチカリンは、抗体と比較して、より小さい大きさ；一つのペプチド組成；および容易に操作される結合部位が含まれる多数の長所を有する。

【0261】

アプタマーは、高い親和性および特異性で様々な標的分子の認識能を有する、低分子一本鎖DNAオリゴヌクレオチド、RNAオリゴヌクレオチド、またはポリペプチドである (Cullen et al. Cell, 58: 423-466, 1989) 。アプタマーは、任意で、SELEX (指数的濃縮によるリガンドの系統的進化) と呼ばれるインビトロの進化選択プロセスによって同定され、関心対象ポリペプチドに対して特異的なアプタマーを得る方法は当業者に公知である。たとえば、Brody E N, Gold L. J Biotechnol. 2000 March; 74(1):5-13を参照されたい。任意の関心対象ポリペプチドに結合するアプタマーの効率的な選択法は、米国特許出願第20050142582号において記述されている。

【0262】

抗体と同様に、アプタマーは、インビボで、標的分子に対する特異的結合を提供する特異的かつ安定な3次元形状をとり、生体反応を誘発する。さらに、アプタマーの結合親和性は、抗体の親和性と類似である (Nimjee et al. Annu Rev Med, 56: 555 - 83, 2005において論評) 。アプタマーは、80 での安定性、長い保存期間、低い免疫原性 (Retina, 22: 143-152, 2002) 、低いバッチ間変動、その大きさが小さいことによる広い組織分布、たとえばPEG化によってその組織分布およびクリアランス特性を変更するように容易に改変されること (Tucker et al. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 732: 203 - 212, 1999) が含まれる、抗体に対して多数の長所を有する。

【0263】

好ましい態様において、エピトープは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

【0264】

疾患を処置するための抗体の使用

10

20

30

40

50

本発明のさらなる局面は、アルツハイマー病を処置するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体を適した希釈剤または担体と混合して用いることである。本発明のさらなる局面は、パーキンソン病を処置するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体を適した希釈剤または担体と混合して用いることである。本発明のさらなる局面は、筋萎縮性側索硬化症を処置するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体を適した希釈剤または担体と混合して用いることである。

【0265】

好ましい態様において、エピトープは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

10

【0266】

薬剤の製造における抗体の使用

本発明のさらなる局面は、アルツハイマー病を処置するための薬剤を製造するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体を用いることである。本発明のさらなる局面は、パーキンソン病を処置するための薬剤を製造するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体を用いることである。本発明のもう一つの局面は、筋萎縮性側索硬化症を処置するための薬剤を製造するために、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体を用いることである。

20

【0267】

好ましい態様において、エピトープは、表2もしくは表2Aにおける単離ペプチドまたはその類似体からなる群より選択される単離ペプチドを含む。

【0268】

上記の開示は一般的に、本発明を記述する。より完全な理解は、以下の特異的实施例を参照することによって得ることができる。これらの例は、説明目的のために限って記述され、本発明の範囲を限定すると意図されない。状況により、好都合であると示唆されるまたは好都合となる場合には、同等物の形状の変化および置換が企図される。本明細書において専門用語が用いられるが、そのような用語は、説明的な意味であり、制限目的ではないと意図される。

30

【0269】

組成物の投与法

本発明の組成物は、たとえば、非経口、静脈内、皮下、筋肉内、頭蓋内、脳室内、鞘内、眼窩内、眼内、嚢内、脊髄内、大槽内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、または経口投与によって容易に投与される。

【0270】

特定の態様において、薬学的組成物は全身投与される。

【0271】

他の態様において、薬学的組成物は、脳またはCNSの他の部分に投与される。たとえば、そのような方法には、埋め込み可能なカテーテルおよびポンプの使用が含まれ、これはカテーテルを通して注入部位に規定量を放出するために役立つであろう。当業者はさらに、脳における望ましい投与または注入部位に隣接してカテーテルを配置するために、カテーテルを可視化することができる外科技術によってカテーテルを埋め込んでもよいことを認識するであろう。そのような技術は、参照により本明細書に組み入れられる、Elsberry et al. 米国特許第5,814,014号「Techniques of Treating Neurodegenerative Disorders by Brain Infusion」において記述される。本発明者らはまた、米国特許出願第20060129126号において記述されるような他の方法を企図した(Kaplitt and During「Infusion device and method for infusing material into the brain of a patient」)。薬物を脳およびCNSの他の部分に送達するための装置は、市販されている(たとえば、SynchroMed

40

50

(登録商標) EL Infusion System; Medtronic, Minneapolis, Minnesota)。

【0272】

もう一つの態様において、薬学的組成物は、血液脳関門を超えての受容体媒介輸送を可能にするために本発明の化合物の改変のような方法を用いて脳に投与される。

【0273】

他の態様は、血液脳関門を通しての輸送を促進することが知られている生物活性分子と共に本発明の化合物を同時投与することを企図する。

【0274】

もう一つの態様において、本発明の化合物は、血液脳関門を通してのその輸送を可能にするために融合またはキメラタンパク質として再製剤化される。そのような技術は、米国特許第4902505号、「Chimeric peptides for neuropeptide delivery through the blood-brain barrier」において記述される。

【0275】

本発明はまた、米国特許第7012061号「Method for increasing the permeability of the blood brain barrier」において記述されるように、血液脳関門の透過性を一過性に増加させることに向けられる方法のような、血液脳関門を超えて化合物を投与するさらなる方法を企図する。

【0276】

当業者は、脳に直接または血液脳関門を超えて本発明の化合物を投与するために多様な適した方法を認識して、本発明の産物を安定に投与するためにこれらの方法を改変することができるであろう。

【0277】

用量および製剤

投与剤形は任意で、液体投与剤形である。「液体投与剤形」という用語は、非経口、静脈内、皮下、筋肉内、頭蓋内、脳室内、鞘内、頭蓋内、眼内、嚢内、脊髄内、大槽内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、または経口投与にとって適しているがこれらに限定されない非固体投与剤形を指す。本発明の化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と適切に混合した水において調製されうる。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、DMSO、およびアルコールを含むまたは含まないその混合物、ならびに油において調製することができる。通常の保存および使用条件において、これらの調製物は微生物の成育を防止するために保存剤を含有する。当業者は適した処方を調製する方法を承知しているであろう。適した製剤を選択および調製するための慣例的な技法および成分は、たとえばRemington's Pharmaceutical Sciences (2003 - 20th edition) および1999年に出版されたThe United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19)において記述されている。製剤は任意で、緩衝剤、抗酸化剤、安定化剤、担体、希釈剤、およびpH調節剤が含まれるがこれらに限定されるわけではない賦形剤を含有する。

【0278】

注射での使用に適した薬学的製剤には、滅菌水溶液または分散液および滅菌注射用溶液または分散液を即時調製するための滅菌粉末が含まれる。全ての場合において、剤形は無菌的でなければならず、容易なシリンジ操作性が存在する程度に流動性でなければならない。

【0279】

当業者は、選択される投与剤形および製剤が、組成物の特徴に依存することを認識するのである。たとえば、当業者は、抗体を含む組成物が、核酸を含む組成物とは異なる製剤を必要とする可能性があることを承知しており、組成物にとって適した製剤および投与剤形を選択するのである。

【0280】

製剤の有効量に影響を及ぼすさらなる要因には、投与経路、標的部位、被験体の生理状態、被験体の種、処置が予防的または治療的であるか、他の薬剤が投与されるか否か、お

10

20

30

40

50

よび補助剤も同様に投与されるか否かが含まれる。

【0281】

免疫の時期は、任意で1日1回から1週間に1回、1ヶ月に1回、1年に1回、または10年に1回まで変化する。典型的な療法には、6週間間隔で追加免疫を行う免疫が含まれる。もう一つの療法は、1、2、および12ヶ月後に追加免疫を行う免疫からなる。または、追加注射は、被験体の免疫応答および生理状態に応じて変化するであろう。

【0282】

SOD1の非天然型に由来するエピトープに対する抗体を用いる受動免疫の場合、用量は任意で、被験体の体重の約0.0001 mg/kg ~ 約100 mg/kg、約0.01 mg/kg ~ 約5 mg/kg、約0.15 mg/kg ~ 約3 mg/kg、約0.5 mg/kg ~ 約2 mg/kg、および約1 mg/kg ~ 約2 mg/kgの範囲である。他の態様において、用量は、被験体の体重の約100 mg/kg ~ 約5 g/kg、約500 mg/kg ~ 約2 mg/kg、および約750 mg/kg ~ 約1.5 g/kgの範囲である。

10

【0283】

SOD1の非天然型の疾患特異的エピトープに対応する単離ペプチドまたは関連分子を含む免疫原を用いる能動免疫の場合、用量は、任意で約0.0001 μ g ~ 10 g、約0.01 μ g ~ 約1 g、約1 μ g ~ 約1 mg、約100 ~ 250 μ g/処置の範囲である。一つの態様において、処置を投与する時期は以下の一つまたは複数の時期である：0ヶ月、2ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、および/または12ヶ月。一つの療法において、投与は、初回免疫後2、6、9および12ヶ月後に行われる。もう一つの療法において、投与は初回免疫後2および4週間目に行われ、その後毎月行われる。代わりの療法において、投与は、被験体の生理状態および/または前回の免疫に対する被験体の反応に応じて変化する。投与経路には、任意で筋肉内および腹腔内注射が含まれるがこれらに限定されるわけではない。一つの態様において、組成物は三角筋に注射される。

20

【0284】

エピトープに対応する単離ペプチドが小さすぎて免疫原性でない場合、または免疫原性が改善される場合、ペプチドを任意で、適した担体に連結または共役させる。適した担体には、キーホールリンペットヘモシアニン、MAP抗原、血清アルブミン、免疫グロブリン分子、および病原性細菌からの類毒素が含まれるがこれらに限定されるわけではない。たとえばデンドリマーを形成するために、ペプチドを化学クロスリンクによって担体に連結してもよい。代わりの方法において、免疫原性ペプチドは担体との融合タンパク質として発現させてもよい。

30

【0285】

ヒト化mAbのようなモノクローナル抗体を静脈内注入によって用いることができる。SOD1 DSEヒト化抗体の治療的濃度はCNSにおける局所濃度が1 ~ 10 μ g/mlであろう。血液脳関門(BBB)が破壊されていない状況では、CNSに浸透するのはIgGの1/100 ~ 1/1000に過ぎない。このように、CNSにおいてこの濃度に達するために必要な末梢循環における治療抗体の濃度は、ヒト血漿におけるIgGの前治療レベルに近く、100 μ g/mlから最大で10 mg/mlの次数であろう。ヒトの血液量を約5 Lであるとする、50 gの投与が上限であり、これは多くの炎症および自己免疫障害を処置するために用いられるプールされたポリクローナル静脈内免疫グロブリン(IVIG)の用量と類似である。ヒトIgGの分解に3 ~ 4週間を要することを考慮すると、3週間に1回の投与は、有効な療法となるはずである。しかし、ヒト化抗DSEモノクローナル抗体の投与は、以下の実施例において提供されるマウス処置実験に基づいて、上記の計算よりはるかに低くなりうる。本発明者らは、DSE2抗体1 mgと共にG93Aをマウスに腹腔内投与すると、治療的に有効であることを発見した。マウスの血液量が体重100 gあたり6 ~ 7 mlであることを考慮すると、DSE2 mAbの循環中の濃度は1 mg/mlの次数であった。ALSを有するヒトに投与する場合、これは循環中の正常なIgG(通常、約10 mg/ml)の1/10に相当するであろう。ヒトの血液量は5 Lの次数であり、これはヒト化DSE2抗体の有効な治療的用量がIV注入の場合5 gの次数であることを示唆するであろう。その上、BBBの軽度の破壊がALSにおいて認められており、これはおそらく神経の炎症が最大である領域において最大であり、すなわち前角運動ニューロンおよび皮質運動ニューロンの

40

50

ような疾患が最もよく現れる領域と共に皮質運動ニューロンが寄与する一定の線維管において最大である。このように、最大の疾患領域における選択的BBB破壊は、抗DSE SOD1抗体のより低い循環中濃度に関する治療効率を許容するであろう。

【0286】

ヒト化DSE mAbは、静脈内経路によって、または鞘内経路によってCNSに直接注入するために用いることができる。この目的のために用いられる医学装置の例は、MedTronicによって製造される。CSFは毎日数回再循環することから、3~4週間の投与療法よりむしろ現行の注入法が必要である。CSFにおいて1日あたり500 ml中に5 mg/日もの多くの注入によって、最終濃度1~10 µg/mlが得られるであろう。

【0287】

併用治療

このように本発明は、ミスフォールドまたは単量体SOD1の存在を特色とする状態、障害、または疾患の処置におけるSOD1抗体の免疫治療的応用を提供する。

【0288】

罹患被験体の処置は単剤治療によって、またはまさに記述しているように、選択された抗体またはエピトープに基づくワクチンを投与することによって行うことができる。本発明の態様において、本方法はまた、一つより多い抗体種、または一つより多いエピトープ種を投与することによって行うことができる。たとえば、方法は、静電ループ構造[DSE 2]に対する抗体を投与することによって、およびSOD二量体界面[DSE1a]においてのみ近づくことができるエピトープに対する抗体を投与することによって行うことができる。一つの態様において、本発明の方法は、SOD二量体上の表面エピトープおよびSOD単量体上の界面エピトープのような、ミスフォールドSOD1上で選択的に近づくことができる少なくとも二つの異なるエピトープに選択的に結合する抗体を用いて行われる。同様に、方法は、ミスフォールドまたは単量体SOD1における二つの異なるエピトープに対する抗体を作製するために有用なワクチンの形で異なる二つのエピトープを投与することによって行うことができる。一つの態様において、方法は二つまたはそれより多いエピトープ、たとえばDSE1およびDSE2の投与を伴う。もう一つの態様において、方法は、三つまたはそれより多いエピトープ、たとえばDSE1a、DSE2、およびDSE5の投与を伴う。さらに、方法は、受動的免疫治療と能動的免疫治療の双方の組み合わせを用いて行うことができ、この場合被験体は選択された抗体と選択されたエピトープに基づくワクチンの双方を投与されるように処置される。

【0289】

方法はまた、選択されたSOD1抗体および/またはエピトープが特定の疾患の処置または管理において治療的に有用なもう一つの物質と併用して投与される併用治療として行うことができる。たとえばアルツハイマー病の場合、有用な併用治療には、Aβ凝集体、原線維、またはプロト原線維の蓄積を制御または低減させる物質の投与が含まれる。態様において、そのような物質には、AβおよびAβ断片に基づくワクチンが含まれる。アルツハイマー病の処置のために本発明の治療と併用して有用である他の物質には、デプレニル、コリンエステラーゼ阻害剤ドネペジル、リバスチグミンおよびガラチミンと共にメマンチンおよびビタミンEが含まれる。

【0290】

同様に、パーキンソン病の処置における併用治療において、本発明の治療は、それに基づくワクチンのようなαシヌクレイン凝集体の阻害剤と共に、レボドパ、カルビドパ、およびエンタカポン、ペルゴリドおよびロチゴチンのようなドーパミンアゴニスト、アマンタジン、プロサイクリジンのような抗コリン作動薬、COMT阻害剤、ならびにセレギリンおよびラサギリンのようなMOA-B阻害剤と併用して用いることができる。

【0291】

ALSの処置に関する併用治療において、本発明の治療薬は、リルゾールおよび他のグルタメート阻害剤と併用して用いることができる。

【0292】

本発明者らはまた、DSE-2免疫反応性凝集種である金属触媒酸化SOD1において銅が保持されていることを見いだした。本発明者らはまた、過酸化水素による処置によって酸化されたSOD1がDSE2免疫反応性を示すことを見いだしている（図2）。活性部位のSOD1静電ループに対して反応するDSE2抗体は、ミスフォールド種の保持された銅に対するアクセスを物理的に遮断して、このようにハーバー・ワイエス反応、フェントン反応、およびその他の反応による反応性酸素および窒素種の触媒を低減させる可能性がある。特に、CNSにおける高濃度のアスコルビン酸塩は、ミスフォールドSOD1によって結合される銅の酸化還元サイクルを促進して、ROSおよびRNSの生成能を増強する可能性がある。ニューロンから優先的に分泌されている（1）SOD1の凝集状態は、そのクレアランスおよび分解を減損して、ALSにおける運動ニューロン、ならびにADにおける海馬および他のニューロンに対して非常に近位で触媒的に活性な神経毒性型で銅を「捕獲する」。A β がADにおいて銅のこの毒性の酸化還元サイクルに寄与する可能性（83）は注目される。

【0293】

したがって、特に有用な併用治療において、本発明の治療は、ALS、AD、およびPDの処置と共に、機能障害SOD1および/またはSOD1凝集によって反応性酸素種（ROS）または反応性窒素種（RNS）の毒性の蓄積が起こる他の障害の処置のために抗酸化剤と併用して用いられる。抗酸化剤は、容易に入手可能な物質の周知の群であり、これにはビタミンであるアスコルビン酸および α -トコフェロール、ならびにN-アセチルシステインのような薬理物質が含まれる。本方法の態様において、抗酸化剤は、内因性のSODの酵素作用を模倣して、スーパーオキシドラジカルの蓄積を低減させる機能的SOD合成物質である。関連する有用な薬物には、参照により本明細書に組み入れられる、たとえばLansbury et alの米国特許出願第2006/0194821号によって記述されるように、SOD二量体を安定化させる薬物が含まれる。同じ効果を有する他の薬物も同様に有用である。特定の態様において、抗酸化剤は、ペニシラミン、クリオキノール、米国特許出願第2006/0089380号において記述されるような8-ヒドロキシキノリンおよび誘導体のような銅キレート物質、クプリゾン、ピコリン酸に基づく化合物、モリブデン化合物、L-タウリン、または銅イオンによって媒介される酸化還元サイクルの阻害効果を有する他の薬物である。なお他の有用な抗酸化剤には、スーパーオキシドスクャベンジャー、過酸化水素スクャベンジャー、およびRNSスクャベンジャーが含まれる。本発明の特定の態様において、本発明の治療物質は、赤ブドウおよびワインに存在する抗酸化剤であるレスペリトロールと併用して用いられる。特異的な態様において、DSE2抗体またはエピトープは、レスペリトロールと併用して用いられる。

【0294】

本発明の治療物質と併用して用いる場合、併用物質は、標準的な実践に従ってその物質に関して既定された方法で投与される。

【0295】

診断物質

筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープのようなSOD1疾患特異的エピトープに対して特異的な抗体はまた、筋萎縮性側索硬化症を診断するために用いることができる。このように、本発明の一つの局面は、被験体における筋萎縮性側索硬化症を検出または診断する方法であり、本方法は、

（a）被験体の試験試料を、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに結合して抗体-抗原複合体を産生する本発明の抗体に接触させる段階；
（b）試験試料中の抗体-抗原複合体の量を測定する段階；および
（c）試験試料中の抗体-抗原複合体の量を対照と比較する段階
を含み、対照と比較して試験試料中の抗体-抗原複合体の量に差があれば筋萎縮性側索硬化症であることが示される。

【0296】

任意で、エピトープがSOD1凝集体内部で隠されている場合、方法は、たとえば塩酸グアニジニウムを用いて、分離条件で試料を処置して、その後の検出のためにミスフォールドSODを放出させるさらなる段階を含む。

【0297】

「筋萎縮性側索硬化症を検出またはモニターする」という句は、被験体が筋萎縮性側索硬化症を有するか有しないか、または筋萎縮性側索硬化症の程度を決定する方法またはプロセスを指す。さらに、本発明の抗体を用いて、SOD1凝集体の出現および進行、したがって疾患の進行を検出またはモニターすることができる。抗体はさらに、本発明の方法によって処置するあいだ、疾患の進行をモニターするために有用である。

【0298】

本明細書において用いられる「対照」という用語は、筋萎縮性側索硬化症を有するまたは筋萎縮性側索硬化症を有しないことがわかっている被験体または被験体の群からの試料を指す。当業者は、抗体-抗原複合体の量の差が対照に応じて変化することを認識するであろう。たとえば、対照が筋萎縮性側索硬化症を有することがわかっている場合、対照と比較して試験試料中の測定可能な抗体-抗原複合体の量がより少なければ、被験体が筋萎縮性側索硬化症を有しない、またはより低い程度の筋萎縮性側索硬化症を有することを示している。対照が筋萎縮性側索硬化症を有することがわかっている場合、対照と比較して試験試料中の抗体-抗原複合体の量が等しいまたはそれより多ければ、被験体が筋萎縮性側索硬化症を有することを示している。対照が筋萎縮性側索硬化症を有しないことがわかっている場合、対照と比較して試験試料中の抗体-抗原複合体の量がより少ないまたは等しければ、被験体が筋萎縮性側索硬化症を有しないことを示している。対照が筋萎縮性側索硬化症を有しないことがわかっている場合、対照と比較して試験試料中の抗体-抗原複合体の量がより大きければ、被験体が筋萎縮性側索硬化症を有することを示している。

【0299】

本明細書において用いられるように、「試料」という用語は、ミスフォールドSOD1に関してアッセイされうる被験体からの任意の液体、細胞、または組織試料を指す。一つの態様において、試料は、脳脊髄液、血漿、血清、全血、脊髄組織、脳細胞、運動ニューロン、後角の一部、または赤血球、単核球、リンパ球、単球、および顆粒球のような末梢血細胞を含むがこれらに限定されない。もう一つの態様において、本発明は、被験体におけるアルツハイマー病を検出または診断する方法であり、本方法は、

(a) 被験体の試験試料を、アルツハイマー病特異的エピトープに結合して抗体-抗原複合体を産生する本発明の抗体に接触させる段階；
(b) 試験試料中の抗体-抗原複合体の量を測定する段階；および
(c) 試験試料中の抗体-抗原複合体の量を対照と比較する段階
を含み、対照と比較して試験試料中の抗体-抗原複合体の量に差があればアルツハイマー病であることが示される。

【0300】

任意で、エピトープがSOD1凝集体内部で隠されている場合、方法は、たとえば塩酸グアニジニウムを用いて、その後の検出のためにミスフォールドSODを放出させるために、分離条件で試料を処置するさらなる段階を含む。さらなる態様において、本発明は、被験体におけるパーキンソン病を検出または診断する方法であり、本方法は、

(a) 被験体の試験試料を、パーキンソン病特異的エピトープに結合して抗体-抗原複合体を産生する本発明の抗体に接触させる段階；
(b) 試験試料中の抗体-抗原複合体の量を測定する段階；および
(c) 試験試料中の抗体-抗原複合体の量を対照と比較する段階
を含み、対照と比較して試験試料中の抗体-抗原複合体の量に差があればパーキンソン病であることが示される。

【0301】

任意で、エピトープがSOD1凝集体内部で隠されている場合、方法は、たとえば塩酸グアニジニウムを用いて、その後の検出のためにミスフォールドSODを放出させるために、分離条件で試料を処置するさらなる段階を含む。

【0302】

本発明のさらなる局面は、被験体におけるレヴィー小体病を検出または診断する方法で

あり、本方法は、

(a) 抗体がエピトープに結合して抗体-抗原複合体を産生する、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体に、被験体の試験試料を接触させる段階；

(b) 試験試料中の抗体-抗原複合体の量を測定する段階；および

(c) 試験試料中の抗体-抗原複合体の量を対照と比較する段階

を含み、対照と比較して試験試料中の抗体-抗原複合体の量に差があればレヴィー小体病であることが示される。

【0303】

任意で、およびミスフォールドSOD1エピトープがSOD1凝集体内部で隠されている場合、方法は、段階(a)の前に標的エピトープを露出するようにSOD1凝集体の脱凝集を促進するために試験試料を処置する段階を提供する。

【0304】

エピトープがSOD1凝集体内部で隠されている場合、方法は、たとえば塩酸グアニジニウムを用いて、その後の検出のためにミスフォールドSOD1を放出させるために、分離条件で試料を処置するさらなる段階を含む。当業者は、「脱凝集条件」がSOD1の二量体または単量体のようなより小さい単位への凝集体の脱凝集を促進する条件を指すことを認識するであろう。これは、タンパク質の変性とは異なる。したがって、当業者はSOD1凝集体を脱凝集するが変性させない塩酸グアニジニウム(たとえば)の濃度を用いることができると認識するであろう。

【0305】

「アルツハイマー病を検出またはモニターする」という句は、被験体がアルツハイマー病を有するか有しないか、またはアルツハイマー病の程度を決定する方法またはプロセスを指す。さらに、本発明の抗体を用いて、SOD1凝集体の出現および進行、したがって疾患の進行を検出またはモニターすることができる。

【0306】

「パーキンソン病を検出またはモニターする」という句は、被験体がパーキンソン病を有するか有しないか、またはパーキンソン病の程度を決定する方法またはプロセスを指す。さらに、本発明の抗体を用いて、SOD1凝集体の出現および進行、したがって疾患の進行を検出またはモニターすることができる。

【0307】

「レヴィー小体病を検出またはモニターする」という句は、被験体がレヴィー小体病を有するか有しないか、またはレヴィー小体病の程度を決定する方法またはプロセスを指す。さらに、本発明の抗体を用いて、SOD1凝集体の出現および進行、したがって疾患の進行を検出またはモニターすることができる。

【0308】

本発明の一つの態様において、抗体を用いてミスフォールドSOD1が試料に存在するか否かを決定する。もう一つの態様において、抗体を検出マーカーによって標識する。

【0309】

もう一つの態様において、エピトープを用いて、レシピエントに導入されたまたはレシピエント内で作製された抗体の出現および力価をモニターする。この態様において、患者の試料をエピトープ、好ましくは標識エピトープと混合し、結合抗体の存在または量を決定する。

【0310】

標識は好ましくは、検出可能なシグナルを直接または間接的に産生することができる。たとえば、標識は、放射線不透過性、もしくは ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I のような放射性同位体；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリンのような蛍光(蛍光体)もしくは化学発光(発色団)化合物；アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼのような酵素；造影剤；または金属イオンであってもよい。

10

20

30

40

50

【0311】

もう一つの態様において、検出シグナルは間接的に検出可能である。たとえば、本発明の抗体に対して特異的であって、検出可能な標識を含有する二次抗体を用いて、本発明の抗体を検出することができる。

【0312】

当業者は、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、ELISA、および免疫沈降後のSDS-PAGE免疫細胞化学のようなイムノアッセイが含まれる多くの方法を用いて、本発明の抗体を用いてミスフォールドSOD1が試料中に存在するか否かを決定することができることを認識するであろう。

【0313】

10

本発明の一つの態様において、アルツハイマー病、パーキンソン病、レヴィー小体病、および/または筋萎縮性側索硬化症のようなミスフォールドSOD1関連疾患は、脳脊髄液において見いだされる赤血球、単核球、リンパ球、単球および/または顆粒球、または単核球のような末梢血細胞が含まれる、被験体の試料のフローサイトメトリーを用いて、被験体において検出またはモニターされうる。さらなる態様において、フローサイトメトリーを用いてアッセイされる細胞を、洗浄剤、エタノール、メタノール、およびパラホルムアルデヒドが含まれるがこれらに限定されるわけではない当業者に公知の試薬を用いて透過性にすることができる。

【0314】

20

本発明の一つの態様において、アルツハイマー病、パーキンソン病、および/またはレヴィー小体病のようなミスフォールドSOD1関連疾患は、脳脊髄液において見いだされる赤血球、単核球、リンパ球、単球、および/または顆粒球、または単核球のような末梢血細胞が含まれる、被験体の試料のフローサイトメトリーを用いて被験体において検出またはモニターすることができる。さらなる態様において、フローサイトメトリーを用いてアッセイされる細胞は、洗浄剤、エタノール、メタノール、およびパラホルムアルデヒドが含まれるがこれらに限定されるわけではない当業者に公知の試薬を用いて透過性にすることができる。

【0315】

30

もう一つの態様において、アルツハイマー病、パーキンソン病、および/またはレヴィー小体病のようなミスフォールドSOD1関連疾患は、2006年2月17日に米国において全国フェーズに入った「Epitope Protection Assay and Method for Detecting Protein Conformations」と題するWO 2005/019828において記述されるエピトープ保護アッセイを用いて検出またはモニターすることができる。もう一つの態様において、筋萎縮性側索硬化症は、WO 2005/019828において記述されるエピトープ保護アッセイを用いて検出またはモニターされる。

【0316】

SOD1凝集体およびミスフォールド-SOD1関連疾患の発症を診断、検出、またはモニターするための本発明の任意の方法は、ミスフォールドSOD1関連疾患に関する従来の診断技術に加えて、またはそれと組み合わせて、用いることができる。

【0317】

40

SOD1凝集体および筋萎縮性側索硬化症の発症を診断、検出、またはモニターするための本発明の任意の方法は、筋萎縮性側索硬化症に関する従来の診断技術に加えて、またはそれと組み合わせて、用いることができる。筋萎縮性側索硬化症に関する従来の診断技術には、身体および神経学的検査が含まれ、筋電図検査、神経条件速度試験、および磁気共鳴画像が含まれうる。

【0318】

アルツハイマー病に関する従来の診断技術には、身体および神経学的検査が含まれ、脳のスキャン、精神状態検査、および記憶機能検査が含まれうる。パーキンソン病に関する従来の診断技術には、身体および神経学的検査が含まれ、脳のスキャンが含まれる。レヴィー小体病に関する従来の診断技術には、身体および神経学的検査が含まれ、脳のスキャ

50

ンが含まれる。

【0319】

神経変性疾患の診断およびこれらの障害の進行のモニタリングは、この時点で不十分である。確定診断は、死後の剖検評価での組織検査または生検（神経変性疾患ではほぼ利用されることはない）によってのみ行うことができる。ALS、AD、およびPDの死亡前推定診断は、しばしば他の疾患と共有される臨床特徴に基づいて、および疑問となる疾患を模倣する他の障害を除外しようと試みることによってなされると言っても過言ではない。「除外による診断」は、神経造影（MRIおよびCATスキャン）、および混同される疾患を除外するための血液検査（甲状腺機能検査のような）を通して行われる。臨床検査と共に、個々の神経変性障害に関する特殊な試験（ADに関する神経心理学的評価、PDに関するPETスキャン、およびALSに関する筋電図検査のような）は、ADおよびPD患者の剖検時診断の70～90%、通常ALS患者の90%より多くを予測する。

10

【0320】

本発明の抗体は、診断にとって有用であり、任意で、免疫沈降のような濃縮法によって患者の体液および組織中に存在するミスフォールドタンパク質の少量を濃縮するために用いられる。一つの態様において、SOD1の非天然型において選択的に提示されるエピトープを認識する抗体は、末梢血からSOD1を免疫沈降するために用いられる。免疫沈降SOD1の存在は任意でELISAによって検出してもよい。

【0321】

本発明にはまた、本発明の抗体およびその使用説明書を含む、筋萎縮性側索硬化症を診断するためのキットが含まれる。当業者は、抗体を検出マーカーによって標識してもよいことを認識するであろう。

20

【0322】

本発明にはまた、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対して特異的なエピトープに結合する抗体、およびその使用説明書を含む、アルツハイマー病、パーキンソン病、および/またはレビー小体病のような、ミスフォールドSOD1関連疾患を診断するためのキットが含まれる。当業者は、抗体を検出マーカーによって標識してもよいことを認識するであろう。

【0323】

本発明にはさらに、疾患特異的なエピトープに対応する一つまたは複数の単離ペプチドを含む、ALS、AD、および/またはPDを診断するためのキットが含まれる。一つの態様において、キットは、DSE1、DSE1a、DSE2、DSE3、DSE4、DSE5、DSE6、およびDSE7を含む群から選択される疾患特異的なエピトープに対応する単離ペプチドを含む。該エピトープに結合する抗体に加えて、単離ペプチドが含まれてもよい。一つの態様において、単離ペプチドは陽性対照である。代替の態様において、単離ペプチドはたとえばそのようなペプチドおよび抗体に基づく能動または受動免疫治療のいずれかを受ける患者に存在する任意のDSE抗体を検出するために試料をスクリーニングするためにそれ自体有用となりうる。

30

【0324】

薬物スクリーニング

本発明の抗体はまた、筋萎縮性側索硬化症、または筋萎縮性側索硬化症に関連するミスフォールドSOD1の形成の処置または予防にとって有用な物質を同定およびスクリーニングするために用いることができる。たとえば、筋萎縮性側索硬化症を処置、阻害、または予防するための物質を同定する方法には、以下が含まれる：

40

(a) 物質によって処置した被験体からの試料を本発明の抗体のいずれか一つに接触させる段階であって、結合すれば試料中にミスフォールドSOD1が存在することが示される段階；

(b) 試料中の結合レベルを検出する段階；および

(c) 対照と比較して試料中の結合レベルが変更されれば、筋萎縮性側索硬化症の処置または予防のための物質であることが示される、試料中の結合レベルを対照における結合レベルと比較する段階。

50

【0325】

当業者は、対照が、筋萎縮性側索硬化症を処置または予防しないことがわかっている物質によって処置していない、または物質によって処置した被験体からの試料となりうることを認識するであろう。このように、「結合レベルの変更」が対照と比較して試料中の結合レベルの低減である場合、これは筋萎縮性側索硬化症の処置または予防にとって有用な物質であることを示している。さらに、対照は、同じ被験体からの試験される物質による処置の前の試料となりえて、または試験される物質による処置のあいだの異なる時点で採取した被験体からの試料となりうる。

【0326】

筋萎縮性側索硬化症を処置または予防するための物質はまた、細胞または細胞株を用いて同定することができる。たとえば、細胞または細胞株を物質に接触させることができ、細胞におけるミスフォールドSOD1の存在を、本発明の結合タンパク質を用いて検出して、対照と比較することができる。

10

【0327】

当業者は、SOD1のミスフォールドまたは疾患特異的コンフォメーションへの変換の阻害に及ぼす候補化合物の効果をモニターすることによって、分子のライブラリをスクリーニングすることができることを認識するであろう。

【0328】

本発明にはまた、筋萎縮性側索硬化症または筋萎縮性側索硬化症に関連するミスフォールドおよび/または凝集SOD1の形成の処置にとって有用である、本発明の方法を用いて同定された物質が含まれる。

20

【0329】

本発明の全ての局面に当てはまる態様において、ミスフォールドSOD1エピトープはDSE1以外のエピトープである。関連する態様において、ミスフォールドSOD1エピトープはDSE4以外である。関連する態様において、ミスフォールドSOD1エピトープはDSE7以外である。さらに関連する態様において、ミスフォールドSOD1エピトープはDSE1、DSE4、およびDSE7以外である。

【0330】

以下の非制限的な実施例は、本発明の態様を図示する。

【0331】

30

実施例

疾患特異的エピトープ、たとえばDSE1aに対応する単離ペプチドを含む免疫原は、以下の実施例において、類似体に関連するDSE番号（たとえば、DSE1）として類似体DSE配列（たとえば、さらなるN末端G配列を含むDSE1a類似体

GGGRLAC*GVIGIGSG

）と呼ばれるであろう。

【0332】

実施例1

DSE2モノクローナル抗体の生成

N-末端Cys残基を有する筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープ

40

(DLGKGGNEESTKTGNAGS)

に対応する単離ペプチドを、BALB/cマウスを免疫するためにKLHに共役させ、およびELISAスクリーニングのためにBSAに共役させた。21日間隔で各マウスに複数回の注射を行った。初回注射のためのアジュバントはフロイントの完全アジュバント（Sigma, Cat# F5881-6×10 mL）であった。フロイントの不完全アジュバント（Sigma, Cat# F5506-6×10 mL）は残りの注射のために用いたアジュバントであった。3回目の注射後7～10日目にマウスから血液を採取した。いかなるアジュバントも用いない最後の追加免疫後3～4日目に細胞融合を行った。

【0333】

50

用いた融合パートナーは、Sp 2/0-Ag14 (ATCC# CRL-1581) であった。融合パートナーS P2/0と脾細胞との融合は、予め加温したPEG (MW1450: Sigma, Cat# P7181) 1 mlにおいて1: 5の比率 (2.0×10^7 : 1.0×10^8 個) で行った。融合細胞を10%FBSを有するDMEM 50 mlに再懸濁して、96ウェルマイクロプレート5枚に100 μ l/ウェルで播種した。2 $\times$ HAT DMEM培地100 μ l/ウェルを24時間後に融合細胞に加えた。培地を5および7日目に新鮮な1 $\times$ HAT培地に交換した。10~12日目、上清50 μ lを最初のELISAスクリーニングのために各ウェルから採取した。陽性クローンを24ウェルプレートに移した。コンフルエンスに達すると、抗体上清を、マウスを免疫するために用いた抗原および非関連抗原 (ヒトトランスフェリン) によるELISAによってスクリーニングした。陽性クローンを拡大またはハイブリドーマサブクローニングのために6ウェルプレートに移した。サブクローニングは50~70個/96ウェルプレートで限界希釈によって行った。

【0334】

実施例2

大規模モノクローナル抗体産生

大規模抗体産生のために、プリスタン (Sigma, Cat# T-7640) またはIFA 0.2~0.5 mlを各マウス (BALB/c) にプライミングのためにi.p.注射した。7~14日目、対数増殖期のハイブリドーマ細胞500,000~5,000,000個を1 $\times$ PBS 0.5 mlにおいて各マウスにi.p.注射した。腹水を1~2週間蓄積させた。腹水2~5 mlを各マウスから採取したところ、IgG濃度は約1~9 mg/mlであった。IgG2および3の精製のためにプロテインAを用い、IgG1のためにプロテインGを用いた。

【0335】

IgG mAbクローンを10E11C11と表した。この抗体は、ミスフォールドSOD1に関する疾患特異的エピトープの認識と一致する特性を示す。このmAbは単量体変性SOD1 (非構造) を認識して、イムノブロットメンブレン上で変性SOD1に結合する。mAbは、イムノブロットティングにおいて二量体SOD1を認識しない。10E11C11共役磁気ビーズによって媒介される免疫沈降の際に、正常なヒト脳またはマウス脳および脊髄から天然のSOD1の検出可能な結合を認めない。mAbは低いpH、カオトロピック剤であるグアニジン、またはその双方によって意図的に放出されたSOD1を効率的に免疫沈降させる。最も重要なことは、10E11C11は、変異体SOD1 (G93A) のトランスジェニック過剰発現によって引き起こされたマウスALSモデルにおいてミスフォールドSOD1を効率的に免疫沈降させる。特に、同じ組織に存在するマウスの内因性のSOD1は免疫沈降されず、ミスフォールドヒト変異体SOD1はこの疾患モデルにおいて正常なマウスSODを「同時動員」しないことを示唆している。

【0336】

同様に、N-末端Cys残基を有するエピトープNPLSRKHGGPKDEEに対しても抗体を作製した。

【0337】

そのような抗体は容易に入手可能であり、Neil Cashman at the Brain Research Centre, UBC Hospital, 2211 Wesbrook Mall, Vancouver, British Columbia, V6T 2B5, Canada (neil.cashman@utoronto.ca) から得ることができる。

【0338】

実施例3

DSE2モノクローナル抗体生成法2

マウスモノクローナル抗体生成：雌性BALB/cマウス4匹を、フロイントの完全アジュバントにおいてマウス1匹あたりDSE2に対応するペプチド (

DLGKGGNEESTKTGNAGS

、プラスジスルフィド架橋形成によってKLHに共役させるためのN末端システイン) に共役させたKLH 25 μ gの腹腔内注射によって初回免疫した。その後4回の追加免疫を、3週間間隔で、フロイントの不完全アジュバントによって先に記述したように行った。ELISAによって決定して血清力価が免疫前血清試料の10倍より高く上昇した場合に、最高反応マウス2匹にKLH共役ペプチドタンパク質抗原10 μ gを滅菌PBS pH 7.4 100 μ lにおいて静脈内にそ

10

20

30

40

50

れぞれ追加免疫した。3日後、ドナーマウスを屠殺して、脾細胞を採取してプールした。S P2/O BALB/c親骨髓腫細胞株と脾細胞との融合は、ハイブリドーマの一段階選択およびクローニングをクローンEZ培地で行ったことを除き、既に記述されているとおりに行った（先の実施例1を参照されたい）。この半固体培地によって一段階でのHAT選択およびクローニングが可能となり、より急速に生育する、おそらく望ましくないハイブリドーマによるより遅く生育する望ましいクローンの異常生育を消失させる。クローンを融合後11日目に採取して96ウェル組織培養プレートのウェルにおいて、20%ウシ胎児血清を含有するDMEM（Invitrogen）培地200 μ lに再懸濁した。4日後、BSAに共役させたペプチド1 μ g/ウェルをコーティングしたプレートにおける抗体活性に関して、上清を間接的ELISAによってスクリーニングした。

10

【0339】

ELISA条件

スクリーニングおよび試験に関して、DSE-2-BSA抗原をdH₂Oにおいて1 μ g/ウェルでプレートにコーティングして37℃で終夜乾燥させた。

陰性対照抗原での試験：0.5 μ g/ウェルのHT（ヒトトランスフェリン）抗原をdH₂Oにおいて50 μ l/ウェルでプレートにコーティングして、37℃で終夜乾燥させた。

ブロッキング：プレートをPBS（pH 7.4）において3%スキムミルク粉末によって100 μ l/ウェルでブロックして室温で1時間インキュベートした。

1°抗体：マウス抗DSE-2ハイブリドーマ組織培養上清およびマウスモノクローナル抗体対照を、スクリーニングおよび試験に関して原液100 μ l/ウェルで加えて、振とうさせながら室温で1時間インキュベートした。

20

スクリーニングおよび試験に用いた2°抗体：用いた1/10000ヤギ抗マウスIgG Fc HRP共役をPBS-Tween（pH 7.4）において希釈し、100 μ l/ウェルで加えて、振とうさせながら37℃で1時間インキュベートした。

基質：TMB緩衝液（BioFxx cat# TMBW-1000-01）を50 μ l/ウェルで加えて、室温の暗所でインキュベートした。反応を15分後に1 M HCl 50 μ l/ウェルによって停止させて、OD_{450 nm}で読み取った。

【0340】

表3は、疾患特異的エピトープ

DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2)

30

に対して作製された抗体に関するハイブリドーマクローンのELISAスクリーニングを示す。いくつかのハイブリドーマクローンによって作製された抗体は、疾患特異的エピトープに対応するペプチドに対して非常に特異的であり、対照抗原HT（ヒトトランスフェリン）を検出可能に認識しなかった。これらの結果は、SOD1のミスフォールド型において選択的に提示されるまたは近づくことができると同定されたエピトープに対応するペプチドに対してモノクローナル抗体を産生できることを示している。

【0341】

（表3）DLGKGGNEESTKTGNAGS（DSE2）に対する抗体に関するハイブリドーマクローンのELISAスクリーニング

クローン	実験番号1 DSE-2-BSA 抗原	実験番号2 DSE-2-BSA 抗原	HT 抗原	アイソタイプ
2A11	2.624	2.000	0.086	IgG
3H1	1.982	1.908	0.081	IgG
5G5	2.712	2.014	0.068	IgG
5G12	2.072	1.755	0.064	IgG
6C3	2.527	1.889	0.071	IgG
6G12	2.093	1.982	0.069	IgG
7E10	2.586	2.047	0.068	IgG
7F8	2.317	1.961	0.079	IgG
8C9	2.087	1.929	0.072	IgG
8D1	2.238	1.931	0.067	IgG
10C12	3.032	1.909	0.061	IgG
10F2	2.599	1.699	0.059	IgG

ハイブリドーマクローン3H1（アクセッション番号220207-02）を、2007年2月22日にCanada, WinnipegにあるInternational Depository Authority of Canadaに寄託した。

【 0 3 4 2 】

実施例4

DSE1ポリクローナル抗体

抗体生成および精製

ペプチド合成をPerseptive Biosystems 9050 Plus Pepsynthesizerにおいて標準的なFmocに基づく化学を用いて行った。多数の抗原性ペプチドを、Fmoc保護アミノ酸（Advanced ChemTech; Novabiochem, San Diego, California; Applied Biosystems, Foster City, California）を用いて[Fmoc-Lys(Fmoc)]₄-Lys₂-Lys-Cys(Acm)-β-Ala-Wang樹脂（Advanced ChemTech, SM5104, Louisville, Kentucky）において合成した。配列は、

アセチル-GGRLACGVIGIGKG-

であり、組成および配列はアミノ酸分析およびペプチドシンセサイザーオンラインUV-吸光度分析によって確認した。このペプチドを切断して10 mM Tris、10 mM酢酸ナトリウム（Sigma）に対する透析によって精製し、pH 8.0で透析を行ってペプチドデンドリマーの隣接する鎖のあいだでジスルフィド結合を形成させた。MAP抗原は分子量～11 kDaを有し、これを担体タンパク質に共役させずに用いた。抗原をウサギ抗血清産生のためにSigma-Genosys (Oakville, Ontario, Canada) に送付した（製造元の「部分包装」）。抗血清産生は標準的なプロトコール（Sigma-Genosys）に従い、動物福祉条例（アメリカ）を遵守した。

【 0 3 4 3 】

抗原に対して同一の配列を有する直線状のペプチドを[非切断]TentaGel-SH樹脂（Advanced ChemTech）において合成した。この樹脂を脱保護して、抗血清を精製するために使い捨てカラム（Evergreen Scientific, Los Angeles, CA）に充填した。抗血清を遠心（16,000×g）によって予め洗浄して、精製前にtris緩衝生理食塩液（TBS）において1：10に希釈した。希釈した抗血清を、アフィニティ精製カラムにおいて結合させるために室温で～1 ml/分の流速で3回再循環させた。抗体結合カラムを、洗浄溶出液がタンパク質を含まなくなるまで（A₂₈₀=0）、最少量のTBS 100 ml（～1 ml/分）によって洗浄した。抗体分画を50 mMグリシン、pH 2.8によって容積1/5の氷冷1.5 M Tris、150 mM NaCl、pH 8.0に溶出して、混合し、直ちに氷中に入れた。これらの分画を16,000×gで遠心して、上清中の抗体濃度をε₂₈₀=220,000およびIgG分子量150,000 Daを用いて決定した。50 mMグリシン、pH 2.8によって十分に洗浄した後飽和グアニジン塩酸、50 mM Tris、pH 8.0による処置を行うことによって、精製カラムを再生した。抗血清を適用する前にカラムをTBSによって平衡にした。3回目またはそれ以降の採血からの血清のみを用いた。全ての場合において、抗体は、使用直前に精製して、抗体を安定化させるために2 mg/ml BSAと共に保存した。

【 0 3 4 4 】

SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティング

SDS-PAGEは、予め成型した4~20%ポリアクリルアミド勾配ゲル (Invitrogen, Carlsbad, CA) によってTris-グリシン緩衝系を用いて行った。部分変性ゲルの場合、ヒト赤血球SOD1 (Sigma) を、SDS-ローディング緩衝液において4% β -メルカプトエタノール (Aldrich) と共に15分間沸騰させるか、またはSDS-ローディング緩衝液において氷中で15分間維持した。SOD1 1~5 μ gをそれぞれのレーンにおいて泳動させて、同等の結果を得た。ウェスタンブロッティングの場合、ゲルをPVDFメンブレンに転写して5%ミルク-TBST (tris緩衝生理食塩液、0.05% Tween-20) によって終夜ブロックした。5%ミルク-TBSTにおいて希釈した0.2 μ g/ml (少なくとも5 μ g/mlまで同等の結果を生じた) SEDI SOD抗体 (抗DSE1ポリクローナル) を一次抗体として用い、1:5000希釈の抗ウサギIgG-HRP (Stressgen, Victoria, Canada) を二次抗体として用いた。ECL-Plus (Amersham, Buckinghamshire, UK) を用いてウェスタンブロットを展開し、コダックフィルムにおいて可視化した。ペプチド競合実験に関して、希釈したSEDI SOD抗体を、使用前に、抗原と同じ配列を有する遊離の直線状ペプチドの500 $\times$ (モル) 過剰量と共に4 で終夜または室温で1時間プレインキュベートした。

10

【 0 3 4 5 】

結果

抗体の設計およびバリデーション

インビボでのタンパク質コンフォメーションを調べることは難しい問題である。可能性
がある一つの戦略は、天然のタンパク質ではなくて、特異的ミスフォールドコンフォメーションを認識する抗体を設計することである。この仮説に基づくアプローチは、タンパク質の凝集を伴う他の神経変性障害に既に応用されているが、これらの設計は、ミスフォールドタンパク質の構造に関する低い解像度の生物物理的情報に依存している。本発明者らのアプローチは、ミスフォールドSOD1に対する抗体を設計するために詳細なX-線結晶構造データを使用している (6,71)。天然の二量体SOD1において近づくことができないが、SOD1凝集体および凝集中間体において露出されるエピトープを認識する抗体は、インビボでミスフォールドSOD1を選択的に検出することができるであろうという仮説を立てた。天然のSOD1二量体 (pdb code: 1SPD) (72) のX-線構造を調べると、残基145~151 (ACGVIGI) はSOD1二量体界面で分離され、天然のSOD1において近づくことができないことが示される。このエピトープに対する抗体は、単量体および非天然オリゴマーの場合のように、天然の二量体界面が破壊されて露出するとSOD1のミスフォールド型を認識するという仮説が立てられる。したがって、本発明者らは、これをSOD1二量体界面抗体 (SEDI抗体、抗DSE1ポリクローナル抗体とも呼ばれる) と命名した。本発明者らは、デンドリマーのそれぞれの枝が、配列ggRLACGVIGIggkgを有する多数の抗原性ペプチドを合成した; 式中、大文字の配列はSOD1配列の一部 (残基143~151位) である。その溶解性を増加するために、SOD1残基143および144位を抗原性ペプチドに加えた; エピトープを内部配列の状況に当てはめるため、溶解度を増加させるため、および免疫原性を増強させるために分子量を増加させるために、N-末端およびC-末端Gly/Lysリンカーを加えた。この抗原による免疫から産生されたウサギ抗血清を、抗原に対して同一の配列を有する固定された直線状ペプチドを用いてアフィニティ精製した。抗体が、二量体SOD1と、選択されたエピトープが露出された単量体SOD1とを識別できるか否かを調べるために、ウェスタンブロットを行った。非還元条件においてSOD1はSDS-PAGEにおいて主に二量体として泳動することから、天然のSOD1は十分に安定である。変性条件で還元されると、これは主に単量体として泳動するが、何らかの二量体もなおも検出される。これらのゲルにおいて、SEDI抗体は、単量体SOD1のみと反応して、天然の二量体SOD1とは反応しない。このようにこの抗体は、選択されたエピトープが露出する場合、SOD1コンフォーマーと反応するが天然のSOD1とは反応しないであろう。これは、天然およびミスフォールドSOD1の双方を識別せずに検出する市販のSOD1抗体とは対比をなす。抗原性ペプチドとの競合により、抗体の特異性が確認された。このように、SEDI抗体は設計基準を満たし、インビボ仮説を調べるための選択的に提示されるまた

20

30

40

50

は近づくことができるアイノル (inol) を提供する。

【 0 3 4 6 】

実施例5

DSE1モノクローナル抗体生成

マウスモノクローナル抗体生成：雌性BALB/cマウス4匹を、フロイントの完全アジュバントにおいてマウス1匹あたりタンパク質抗原25 µgの腹腔内注射によって初回免疫した。その後4回の追加免疫を、3週間間隔で、フロイントの不完全アジュバントによって先に記述したように行った。ELISAによって決定して血清力価が免疫前血清試料の10倍より高く上昇した場合に、最高反応マウス2匹にタンパク質抗原10 µgを滅菌PBS pH 7.4 100 µlにおいて静脈内にそれぞれ追加免疫する。3日後、ドナーマウスを屠殺して、脾細胞を採取してプールする。SP2/0 BALB/c親骨髄腫細胞株と脾細胞との融合は、ハイブリドーマの一段階選択およびクローニングをクローンEZ培地で行ったことを除き、先の実施例1に記述されているとおりに行う。この半固体培地によって一段階でのHAT選択およびクローニングが可能となり、より急速に生育する、おそらく望ましくないハイブリドーマによるより遅く生育する望ましいクローンの異常生育を消失させる。クローンを融合後11日目に採取して96ウェル組織培養プレートのウェルにおいて、20%ウシ胎児血清を含有するDMEM (Invitrogen) 培地200 µlに再懸濁する。4日後、1 µg/ウェルのタンパク質抗原をコーティングしたプレートにおける抗体活性に関して、上清を間接的ELISAによってスクリーニングする。

【 0 3 4 7 】

ELISA条件

スクリーニングおよび試験に関して、DSE-1-BSA抗原をdH₂Oにおいて1 µg/ウェルでプレートにコーティングして37 °Cで終夜乾燥させる。

陰性対照抗原での試験：0.5 µg/ウェルのHT (ヒトトランスフェリン) 抗原をdH₂Oにおいて50 µl/ウェルでプレートにコーティングして、37 °Cで終夜乾燥させる。

ブロッキング：プレートをPBS (pH 7.4) において3%スキムミルク粉末によって100 µl/ウェルでブロックして室温で1時間インキュベートする。

1°抗体：マウス抗DSE-1ハイブリドーマ組織培養上清およびマウスモノクローナル抗体対照を、スクリーニングおよび試験に関して原液100 µl/ウェルで加える。SP2/0組織培養上清において1/800倍に希釈したマウス抗DSE-1a免疫血清およびマウス免疫前血清を、100 µl/ウェルで加えて、振とうさせながら室温で1時間インキュベートする。

スクリーニングおよび試験に用いた2°抗体：1/10000ヤギ抗マウスIgG Fc HRP共役を用いる。二次抗体をPBS-Tween (pH 7.4) において希釈し、100 µl/ウェルで加えて、振とうさせながら37 °Cで1時間インキュベートする。

基質：TMB緩衝液 (BioFfx cat# TMBW-1000-01) を50 µl/ウェルで加えて、室温の暗所でインキュベートする。反応を15分後に1 M HCl 50 µl/ウェルによって停止させて、OD_{450 nm}で読み取る。

【 0 3 4 8 】

実施例6

DSE1a抗体産生

DSE1aエピトープ (GGGRLAC*GVIGIGSG) に対応する単離ペプチドをBALB/cマウスを免疫するためにKLHに共役させて、ELISAスクリーニングのためにBSAに共役させた。

マウスモノクローナル抗体生成：雌性BALB/cマウス4匹を、フロイントの完全アジュバントにおいてマウス1匹あたりタンパク質抗原25 µgの腹腔内注射によって初回免疫した。その後4回の追加免疫を、3週間間隔で、フロイントの不完全アジュバントによって先に記述したように行った。ELISAによって決定して血清力価が免疫前血清試料の10倍より高く上昇した場合に、最高反応マウス2匹にタンパク質抗原10 µgを滅菌PBS pH 7.4 100 µlにおいて静脈内にそれぞれ追加免疫した。3日後、ドナーマウスを屠殺して、脾細胞を採取してプールした。SP2/0 BALB/c親骨髄腫細胞株と脾細胞との融合は、ハイブリドーマの一段階選択およびクローニングをクローンEZ培地で行ったことを除き、先の実施例1におい

て記述されているとおりに行った。この半固体培地によって一段階でのHAT選択およびクローニングが可能となり、より急速に生育する、おそらく望ましくないハイブリドーマによるより遅く生育する望ましいクローンの異常生育を消失させる。クローンを融合後11日目に採取して、96ウェル組織培養プレートのウェルにおいて、20%ウシ胎児血清を含有するDMEM (Invitrogen) 培地200 μ lに再懸濁した。4日後、1 μ g/ウェルのタンパク質抗原をコーティングしたプレートにおける抗体活性に関して、上清を間接的ELISAによってスクリーニングした。

【0349】

ELISA条件

スクリーニングおよび試験に関して、DSE-1a-BSA抗原をdH₂Oにおいて1 μ g/ウェルでプレートにコーティングして37℃で終夜乾燥させた。

10

陰性対照抗原での試験：0.5 μ g/ウェルのHT (ヒトトランスフェリン) 抗原をdH₂Oにおいて50 μ l/ウェルでプレートにコーティングして、37℃で終夜乾燥させた。

ブロッキング：プレートをPBS (pH 7.4) において3%スキムミルク粉末によって100 μ l/ウェルでブロックして室温で1時間インキュベートした。

1°抗体：マウス抗DSE-1aハイブリドーマ組織培養上清およびマウスモノクローナル抗体対照を、スクリーニングおよび試験に関して原液100 μ l/ウェルで加えた。SP2/O組織培養上清において1/800倍に希釈したマウス抗DSE-1a免疫血清およびマウス免疫前血清を100 μ l/ウェルで加えて、振とうさせながら室温で1時間インキュベートした。

スクリーニングおよび試験に用いた2°抗体：1/10000ヤギ抗マウスIgG Fc HRP共役を用いた。二次抗体をPBS-Tween (pH 7.4) において希釈し、100 μ l/ウェルで加えて、振とうさせながら37℃で1時間インキュベートした。

20

基質：TMB緩衝液 (BioFxx cat# TMBW-1000-01) を50 μ l/ウェルで加えて、室温の暗所でインキュベートした。反応を15分後に1 M HCl 50 μ l/ウェルによって停止させて、OD_{450 nm}で読み取った。

【0350】

表4は、疾患特異的エピトープ

GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a)

に対応するペプチドに対して作製された抗体に関するハイブリドーマクローンのELISAスクリーニングを示す。ハイブリドーマクローンによって作製された抗体は、疾患特異的エピトープに対して非常に特異的であり、対照抗原HT (ヒトトランスフェリン) を検出可能に認識しなかった。これらの結果は、SOD1のミスフォールド型において提示されるまたは近づくことができると同定されたエピトープに対応するペプチドに対してモノクローナル抗体を産生することができることを示している。

30

【0351】

(表4) エピトープGGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a) に対して作製された抗体に関するハイブリドーマクローンのELISAスクリーニング

クローン	実験番号1 DSE-1a-BSA 抗原	実験番号2 DSE-1a-BSA 抗原	HT 抗原	アイソタイプ
3C1	0.484	0.265	0.105	IgG
3C11	0.702	0.186	0.093	IgG
3D2	1.542	1.035	0.058	IgG
3F1	3.072	2.143	0.080	IgG
4B5	0.506	0.238	0.065	IgG
4H6	1.244	0.957	0.085	IgG
5F6	0.862	0.663	0.089	IgG
6D8	2.690	2.186	0.089	IgG
9A4	2.538	2.313	0.071	IgG
9A8	1.489	0.884	0.100	IgG
10C3	2.446	2.200	0.067	IgG
10C12	2.867	2.016	0.089	IgG

10

ハイブリドーマクローン6D8（アクセッション番号220207-01）を、2007年2月22日にCanada, WinnipegにあるInternational Depository Authority of Canadaに寄託した。

【0352】

類似の技術を用いてDSE4、6、および7に対する抗体を生成する。

【0353】

実施例7

20

DSE1aに対して作製された抗体はDSE1ペプチドを認識しない。

抗DSE1a抗体がその同源のペプチド配列（DSE1a）を認識する能力を、抗DSE1a抗体が非酸化ペプチド（DSE1）を認識する能力と比較した。

【0354】

マイクロタイタープレートのウェルを、BSAに共役させたDSE1ペプチドまたはDSE1aペプチドによってコーティングした。それぞれにおける遊離の結合部位をBSAによってブロックした後、DSE1aハイブリドーマクローンからの抗体含有組織培養上清を加えて、抗体をBSA共役ペプチドに結合させた。次に、結合抗体をペルオキシダーゼ共役二次抗体によって検出した。図1および表5は、調べた全ての抗体がDSE1に対してDSE1aを優先的に認識することを示している。

30

【0355】

マウスをDSE1ペプチドによって免疫した場合、ほとんどIgMアイソタイプ抗体が形成された。IgM抗体はおそらく、先に記したように作製されたIgGアイソタイプのDSE1a抗体よりエピトープに対する親和性が低い。酸化システインを含むようにDSE1を改変すると、操作上より大きいアピディティを有する抗体が産生された。

【0356】

（表5）抗DSE1a抗体クローンが酸化DSE1aペプチドを優先的に認識することを示すELISA

クローン	ペプチド	ペプチド	クローン	ペプチド	ペプチド
	DSE1a	DSE1		DSE1a	DSE1
3C1	1.141	0.243	4H6	0.674	0.233
	1.405	0.234		0.685	0.29
平均値	1.273	0.2385	平均値	0.6795	0.2615
相対偏差	14.66%	2.67%	相対偏差	1.14%	15.41%
	DSE1a	DSE1		DSE1a	DSE1
3C11	1.165	0.197	6D8	2.303	0.366
	0.732	0.216		2.168	0.242
平均値	0.9485	0.2065	平均値	2.2355	0.304
相対偏差	32.28%	6.51%	相対偏差	4.27%	28.84%
	DSE1a	DSE1		DSE1a	DSE1
3D2	1.073	0.219	9A4	1.006	0.203
	0.93	0.209		0.687	0.343
平均値	1.0015	0.214	平均値	0.8465	0.273
相対偏差	10.10%	3.30%	相対偏差	26.65%	36.26%
	DSE1a	DSE1		DSE1a	DSE1
3D9	0.195	0.223	9A8	2.101	0.21
	0.164	0.195		2.194	0.276
平均値	0.1795	0.209	平均値	2.1475	0.243
相対偏差	12.21%	9.47%	相対偏差	3.06%	19.21%
	DSE1a	DSE1		DSE1a	DSE1
3F1	2.948	0.247	10C3	2.227	0.233
	3.005	0.269		2.087	0.22
平均値	2.9765	0.258	平均値	2.157	0.2265
相対偏差	1.35%	6.03%	相対偏差	4.59%	4.06%
	DSE1a	DSE1		DSE1a	DSE1
4B5	0.671	0.185	PBST	0.199	0.192
	0.481	0.169		0.194	0.166
平均値	0.576	0.177	平均値	0.1965	0.179
相対偏差	23.32%	6.39%	相対偏差	1.80%	10.27%

【 0 3 5 7 】

実施例8

DSE5抗体生成

マウスモノクローナル抗体生成：雌性BALB/cマウス4匹を、フロイントの完全アジュバントにおいてマウス1匹あたりNに加えたシステインとのジスルフィド形成によってKLHに共役させた、DSE5に対応するペプチド（IKGLTEGLHGF）を含む免疫原25 μgの腹腔内注射によって初回免疫した。その後4回の追加免疫を、3週間間隔で、フロイントの不完全アジュバントによって先に記述したように行った。ELISAによって決定して血清力価が免疫前血清試料の10倍より高く上昇した場合に、最高反応マウス2匹にタンパク質抗原10 μgを滅菌PBS pH 7.4 100 μlにおいて静脈内にそれぞれ追加免疫した。3日後、ドナーマウスを屠殺して、脾細胞を採取してプールした。SP2/0 BALB/c親骨髄腫細胞株と脾細胞との融合は、ハイブリドーマの一段階選択およびクローニングをクローンEZ培地で行ったことを除き、先の実施例1において既に記述されているとおりに行った。この半固体培地によって一段階でのHAT選択およびクローニングが可能となり、より急速に生育する、おそらく望ましくないハイブリドーマによるより遅く生育する望ましいクローンの異常生育を消失させる

10

20

30

40

50

。クローンを融合後11日目に採取して、96ウェル組織培養プレートのウェルにおいて、20%ウシ胎児血清を含有するDMEM (Invitrogen) 培地200 μ lに再懸濁した。4日後、1 μ g/ウェルのタンパク質抗原をコーティングしたプレートにおける抗体活性に関して、上清を間接的ELISAによってスクリーニングした。

【0358】

ELISA条件

スクリーニングおよび試験に関して、DSE-BSA抗原をdH₂Oにおいて1 μ g/ウェルでプレートにコーティングして37℃で終夜乾燥させた。

陰性対照抗原での試験：0.5 μ g/ウェルのHT (ヒトトランスフェリン) 抗原をdH₂Oにおいて50 μ l/ウェルでプレートにコーティングして、37℃で終夜乾燥させた。

ブロッキング：プレートをPBS (pH 7.4) において3%スキムミルク粉末によって100 μ l/ウェルでブロックして室温で1時間インキュベートした。

1°抗体：マウス抗DSE-5ハイブリドーマ組織培養上清およびマウスモノクローナル抗体対照を、スクリーニングおよび試験に関して原液100 μ l/ウェルで加えた。SP2/0組織培養上清において1/800倍に希釈したマウス抗DSE-1a免疫血清およびマウス免疫前血清を100 μ l/ウェルで加えて、振とうさせながら室温で1時間インキュベートした。

スクリーニングおよび試験に用いた2°抗体：1/10000ヤギ抗マウスIgG Fc HRP共役を用いた。二次抗体をPBS-Tween (pH 7.4) において希釈し、100 μ l/ウェルで加えて、振とうさせながら37℃で1時間インキュベートした。

基質：TMB緩衝液 (BioFxx cat# TMBW-1000-01) を50 μ l/ウェルで加えて、室温の暗所でインキュベートした。反応を15分後に1 M HCl 50 μ l/ウェルによって停止させて、OD_{450 nm}で読み取った。

【0359】

表6は、疾患特異的エピトープ (IKGLTEGLHGF)

に対して作製された抗体に関するハイブリドーマクローンのELISAスクリーニングを示す。ハイブリドーマクローンのいくつかによって生成された抗体は、エピトープに対応するペプチドに対して非常に特異的であり、対照抗原HT (ヒトトランスフェリン) を検出可能に認識しなかった。これらの結果は、SOD1のミスフォールド型において選択的に提示されるまたは近づくことができるとして同定されたエピトープに対応するペプチドに対してモノクローナル抗体を産生できることを示している。

【0360】

(表6) エピトープIKGLTEGLHGF (DSE5) に対して作製された抗体に関するハイブリドーマクローンのELISAスクリーニング

クローン	実験番号1 DSE-5-BSA 抗原	実験番号2 DSE-5-BSA 抗原	HT 抗原	アイソタイプ
5C6	2.779	1.787	0.079	IgG

ハイブリドーマクローン5C6 (アクセッション番号280207-01) を、2007年2月28日にCanada, WinnipegにあるInternational Depository Authority of Canadaに寄託した。

【0361】

実施例9

疾患特異的エピトープ (DSE) および/またはDSE抗原性決定基に対する抗体産生

SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープを、エピトープに反応性のB細胞を生成するために、BALB/cマウスの免疫のためにKLHに共役させる。免疫のためのエピトープは、

10

20

30

40

GGGRLACGVIGIGSG (DSE1);
 GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a); CDLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2);
 CNPLSRKHGGPKDEE (DSE3); CIKGLTEGLHGF (DSE5); GSGKAVCVLK
 (DSE4); および CGLHGFHVH (DSE7)

からなるペプチドの群から選択される。または、一つまたは複数の抗原性決定基を含み、最少で単独またはKLHと共役させた場合に免疫原性であるペプチド配列のいずれかの3または5隣接アミノ酸を含む、前述のペプチドのいずれかの一部をKLHに共役させる。

【0362】

マウスモノクローナル抗体生成：雌性BALB/cマウス4匹を、フロイントの完全アジュバントにおいてマウス1匹あたりタンパク質抗原25 µgの腹腔内注射によって初回免疫する。その後4回の追加免疫を、3週間間隔で、フロイントの不完全アジュバントによって先に記述したように行う。ELISAによって決定して血清力価が免疫前血清試料の10倍より高く上昇した場合に、最高反応マウス2匹にタンパク質抗原10 µgを滅菌PBS pH 7.4 100 µlにおいて静脈内にそれぞれ追加免疫する。3日後、ドナーマウスを屠殺して、脾細胞を採取してプールする。SP2/0 BALB/c親骨髄腫細胞株と脾細胞との融合は、ハイブリドーマの一段階選択およびクローニングをクローンEZ培地で行ったことを除き、先の実施例1において既に記述されているとおりに行う。この半固体培地によって一段階でのHAT選択およびクローニングが可能となり、より急速に生育する、おそらく望ましくないハイブリドーマによるより遅く生育する望ましいクローンの異常生育を消失させる。クローンを融合後11日目に採取して、96ウェル組織培養プレートのウェルにおいて、20%ウシ胎児血清を含有するD-MEM (Invitrogen) 培地200 µlに再懸濁する。4日後、1 µg/ウェルのタンパク質抗原をコーティングしたプレートにおける抗体活性に関して、上清を間接的ELISAによってスクリーニングする。

【0363】

ELISA条件

スクリーニングおよび試験に関して、DSE-BSA抗原をdH₂Oにおいて1 µg/ウェルでプレートにコーティングして37 °Cで終夜乾燥させる。

陰性対照抗原での試験：0.5 µg/ウェルのHT (ヒトトランスフェリン) 抗原をdH₂Oにおいて50 µl/ウェルでプレートにコーティングして、37 °Cで終夜乾燥させる。

ブロッキング：プレートをPBS (pH 7.4) において3%スキムミルク粉末によって100 µl/ウェルでブロックして室温で1時間インキュベートする。

1°抗体：マウス抗DSEハイブリドーマ組織培養上清およびマウスモノクローナル抗体対照を、スクリーニングおよび試験に関して原液100 µl/ウェルで加える。SP2/0組織培養上清において1/800倍に希釈したマウス抗DSE-1a免疫血清およびマウス免疫前血清を100 µl/ウェルで加えて、振とうさせながら室温で1時間インキュベートする。

スクリーニングおよび試験に用いた2°抗体：1/10000ヤギ抗マウスIgG Fc HRP共役を用いる。二次抗体をPBS-Tween (pH 7.4) において希釈し、100 µl/ウェルで加えて、振とうさせながら37 °Cで1時間インキュベートする。

基質：TMB緩衝液 (BioFxx cat# TMBW-1000-01) を50 µl/ウェルで加えて、室温の暗所でインキュベートする。反応を15分後に1 M HCl 50 µl/ウェルによって停止させて、OD_{450 nm}で読み取る。

【0364】

実施例10

変性SOD1に対する親和性に関するDSE1aに対する抗体のELISA試験

DSE1a

(GGGRLAC*GVIGIGSG)

に対する抗体を産生するハイブリドーマクローンを、天然の折り畳み型SOD1 (PBS中のSOD

10

20

30

40

50

1)、変性もしくはミスフォールドSOD1(6 M GdnHClを有する変性緩衝液中でのSOD1)、または天然の折り畳み型およびミスフォールドBSA対照に対する特異的反応性に関するELISAによってスクリーニングした。

【0365】

表7は、天然の折り畳み型およびミスフォールドSOD1に対するハイブリドーマクロンの親和性を示す。それぞれの試料の吸光度を450 nmで検出した(縦欄2~5)。各試料を1試料あたり2回ずつ試験した。縦欄6~9の値は、各クロンの親和性の平均値および二つの試料間の%の差を提供する。縦欄10は、天然の折り畳み型SOD1に関する抗体の特異的親和性(すなわち、SOD1に対する抗体の親和性 - 無関係なタンパク質BSAに対する非特異的結合)を表す。縦欄11は、非折り畳み型SOD1に対する抗体の特異的親和性(すなわち、SOD1に対する抗体の親和性 - BSAに関する非特異的結合)を表す。縦欄12は、天然の折り畳み型SOD1に対するミスフォールドSOD1に関する特異的親和性の増加倍率を提供する。これらの結果は、SOD1に関するDSE1aエピトープに対するモノクローナル抗体の特異的親和性を示し、抗体が、天然の折り畳み型より2~4倍高い親和性でSOD1のミスフォールド型を優先的に標的とすることを証明している。

10

【0366】

クローン4H6、6D8、10C3を、大規模産生のために選択した。

【0367】

(表7) 変性SOD1に対するDSE1aハイブリドーマクロンのELISA試験

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	SOD1		BSA		SOD1		BSA				
	PBS	Gdn HCl	PBS	Gdn HCl	PBS	Gdn HCl	PBS	Gdn HCl	S-N (F)	S-N (U)	U/F
クローン											
3C1	0.423 0.410	0.712 0.612	0.144 0.145	0.170 0.185	0.417 2%	0.662 11%	0.145 0%	0.178 6%	0.256	0.501	1.961
3C11	0.352 0.357	0.693 0.642	0.153 0.155	0.155 0.144	0.355 1%	0.668 5%	0.154 1%	0.150 5%	0.203	0.516	2.544
3D2	0.364 0.349	0.727 0.652	0.134 0.119	0.130 0.119	0.357 3%	0.690 8%	0.127 8%	0.125 6%	0.231	0.564	2.442
3D9	0.304 0.323	0.661 0.687	0.121 0.152	0.124 0.106	0.314 4%	0.674 3%	0.137 16%	0.115 11%	0.188	0.548	2.920
3F1	0.354 0.299	0.585 0.568	0.140 0.125	0.146 0.116	0.327 12%	0.577 2%	0.133 8%	0.131 16%	0.195	0.445	2.284
4B5	0.352 0.323	0.643 0.630	0.145 0.129	0.140 0.134	0.338 6%	0.637 1%	0.137 8%	0.137 3%	0.201	0.500	2.491
4H6	0.334 0.329	0.615 0.637	0.156 0.114	0.122 0.122	0.332 1%	0.626 2%	0.135 22%	0.122 0%	0.203	0.498	2.451
6D8	0.380 0.390	0.788 0.676	0.148 0.142	0.139 0.129	0.385 2%	0.732 11%	0.145 3%	0.134 5%	0.246	0.593	2.413
9A4	0.305 0.299	0.634 0.573	0.144 0.122	0.127 0.122	0.302 1%	0.604 7%	0.133 12%	0.125 3%	0.173	0.475	2.740
9A8	0.253 0.264	0.601 0.585	0.150 0.127	0.115 0.123	0.259 3%	0.593 2%	0.139 12%	0.119 5%	0.130	0.464	3.578
10C3	0.284 0.280	0.609 0.646	0.153 0.304	0.117 0.106	0.282 1%	0.628 4%	0.229 47%	0.112 7%	0.112	0.458	4.085
10C12	0.326 0.299	0.562 0.539	0.121 0.121	0.115 0.128	0.313 6%	0.551 3%	0.121 0%	0.122 8%	0.191	0.429	2.244
Bkg	0.112 0.132	0.142 0.144	0.117 0.118	0.151 0.143	0.122 12%	0.143 1%	0.118 1%	0.147 4%			

10

20

30

S = シグナル、N = ノイズ、F = 天然の折り畳み型、U = 非折り畳み型 / ミスフォールド型
【 0 3 6 8 】

実施例11

変性SOD1に対する親和性に関するDSE2に対する抗体のELISA試験
DSE2

40

(DLGKGGNEESTKTGNAGS)

に対する抗体を産生するハイブリドーマクローンを、天然の折り畳み型SOD1 (PBS中のSOD 1)、変性もしくはミスフォールドSOD1 (6 M GdnHClを有する変性緩衝液中でのSOD1)、または天然の折り畳み型およびミスフォールドBSA対照に対する特異的反応性に関するELISAによってスクリーニングした。

【 0 3 6 9 】

表8は、天然の折り畳み型および非折り畳み型SOD1に対するハイブリドーマクローンの親和性を示す。それぞれの試料の吸光度を、450 nm (縦欄2~5) で検出した。それぞれの試料を1試料あたり2回ずつ試験した。縦欄6~9の値は、それぞれのクローンの親和性の平

50

均値と二つの試料のあいだの差の%を提供する。縦欄10は天然の折り畳み型SOD1に関する抗体の特異的親和性（すなわち、SOD1に関する抗体の親和性 - BSAに対する非特異的結合）を表す。縦欄11はミスフォールドSOD1に関する抗体の特異的親和性（すなわち、SOD1に関する抗体の親和性 - BSAに対する非特異的結合）を表す。縦欄12は、天然の折り畳み型SOD1に対するミスフォールドSOD1に関する特異的親和性の増加倍率を提供する。これらの結果は、SOD1に関するDSE2エピトープに対するモノクローナル抗体の特異的親和性を証明し、および抗体がSOD1の非折り畳み型を優先的に標的とすることを証明する。

【 0 3 7 0 】

クローン3H1、5G5、および8D1を大規模産生のために選択した。

【 0 3 7 1 】

(表8) 変性SOD1に対するDSE2ハイブリドーマクローンのELISA試験

1	2 SOD1	3	4 BSA	5	6 SOD1	7	8 BSA	9	10	11	12
	PBS	GdnHCl	PBS	GdnHCl	PBS	GdnHCl	PBS	GdnHCl	S-N (F)	S-N (U)	U/F
2A9	0.321 0.31	0.593 0.584	0.125 0.107	0.137 0.145	0.316 2%	0.589 1%	0.116 11%	0.141 4%	0.187	0.460	2.460
2A11	0.345 0.348	0.71 0.727	0.119 0.108	0.124 0.156	0.347 1%	0.719 2%	0.114 7%	0.140 16%	0.220	0.592	2.693
3H1	0.257 0.563	2.189 2.101	0.161 0.15	0.165 0.162	0.410 53%	2.145 3%	0.156 5%	0.164 1%	0.251	1.986	7.926
5G5	0.308 0.306	1.032 0.725	0.22 0.122	0.145 0.152	0.307 0%	0.879 25%	0.171 41%	0.149 3%	0.147	0.719	4.881
5G1 2	0.346 0.272	0.604 0.562	0.124 0.145	0.131 0.113	0.309 17%	0.583 5%	0.135 11%	0.122 10%	0.181	0.455	2.516
6C3	0.325 0.309	0.67 0.676	0.129 0.122	0.126 0.145	0.317 4%	0.673 1%	0.126 4%	0.136 10%	0.187	0.543	2.909
6G1 2	0.29 0.295	0.414 0.701	0.125 0.099	0.114 0.107	0.293 1%	0.558 36%	0.112 16%	0.111 4%	0.181	0.446	2.462
7E10	0.34 0.321	0.787 0.735	0.199 0.142	0.179 0.137	0.331 4%	0.761 5%	0.171 24%	0.158 19%	0.166	0.597	3.589
7F8	0.366 0.288	0.605 0.619	0.131 0.138	0.121 0.121	0.327 17%	0.612 2%	0.135 4%	0.121 0%	0.199	0.484	2.430
8C9	0.354 0.339	0.701 0.724	0.131 0.113	0.132 0.138	0.347 3%	0.713 2%	0.122 10%	0.135 3%	0.218	0.584	2.679
8D1	0.516 0.413	1.626 1.909	0.185 0.161	0.167 0.192	0.465 16%	1.768 11%	0.173 10%	0.180 10%	0.288	1.591	5.520
10F2	0.263 0.563	0.632 0.689	0.119 0.116	0.172 0.175	0.413 51%	0.661 6%	0.118 2%	0.174 1%	0.268	0.515	1.925
Bkg	0.112 0.132	0.142 0.144	0.117 0.118	0.151 0.143	0.122 12%	0.143 1%	0.118 1%	0.147 4%			

S = シグナル、N = ノイズ、F = 天然の折り畳み型、U = 非折り畳み型 / ミスフォールド型

【 0 3 7 2 】

実施例12

10

20

30

40

50

変性SOD1に対する親和性に関するDSE5に対する抗体のELISA試験

DSE5

(IKGLTEGLHGF)

に対する抗体を産生するハイブリドーマクローンを、天然の折り畳み型SOD1 (PBS中のSOD1)、変性もしくはミスフォールドSOD1 (変性緩衝液GdnHClにおけるSOD1)、または天然の折り畳み型およびミスフォールドBSA対照に対する特異的反応性に関するELISAによってスクリーニングした。

【0373】

表9は、天然の折り畳み型およびミスフォールドSOD1に対するハイブリドーマクローンの親和性を示す。それぞれの試料の吸光度を、450 nm (縦欄2~5) で検出した。それぞれの試料を1試料あたり2回ずつ試験した。縦欄6~9の値は、それぞれのクローンの親和性の平均値と二つの試料のあいだの差の%を提供する。縦欄10は天然の折り畳み型SOD1に関する抗体の特異的親和性 (すなわち、SOD1に関する抗体の親和性から、BSAに対する非特異的結合をひく) を表す。縦欄11はミスフォールドSOD1に関する抗体の特異的親和性 (すなわち、SOD1に関する抗体の親和性から、BSAに対する非特異的結合をひく) を表す。縦欄12は、天然の折り畳み型SOD1に対するミスフォールドSOD1に関する特異的親和性の増加倍率を提供する。これらの結果は、SOD1に関するDSE5エピトープに対するモノクローナル抗体の特異的親和性を証明し、および抗体がSOD1の非折り畳み型を優先的に標的とすることを証明する。

【0374】

(表9) 変性SOD1に対するハイブリドーマクローンのELISA試験

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	SOD1		BSA		SOD1		BSA				
	PBS	Gdn HCl	PBS	Gdn HCl	PBS	Gdn HCl	PBS	Gdn HCl	S-N (F)	S-N (U)	U/F
DSE									0.14		
5	0.272	0.622	0.122	0.188	0.279	0.626	0.113	0.163	1	0.488	3.457
	0.286	0.629	0.104	0.138	4%	1%	11%	22%			

Bkg 0.112 0.142 0.117 0.151 0.122 0.143 0.118 0.147

0.132 0.144 0.118 0.143 12% 1% 1% 4%

S = シグナル、N = ノイズ、F = 天然の折り畳み型、U = 非折り畳み型 / ミスフォールド型

【0375】

実施例13

DSE2に対する抗体による酸化SOD1の認識

酵素の酸化的障害は、神経変性疾患において起こり、SOD1に対する酸化的障害によって、ミスフォールディングおよび凝集SOD1の形成が起こる。本発明者らは、DSE2エピトープに対する抗体 (ハイブリドーマクローン10E11C11および3H1) が、精製SOD1を100 μm10 mM H₂O₂と共に、またはアスコルビン酸塩と塩化銅の混合物と共にインキュベートすることによって、そのような酸化的に改変されたSOD1を認識することを示した。これらの処置はいずれも、SOD1におけるアミノ酸を酸化することが知られている。次に、本発明者らは、この酸化SOD1をマイクロタイタープレートウェルに結合させて、二つの異なる抗DSE2抗体の一つを加えた。比較のために、マイクロタイターウェルを無処置の通常折り畳み型SOD1の緩衝液溶液によって、またはカオトロピック剤 (塩化グアニジニウム、GdnHCl) 溶液によって変性させたSOD1によってコーティングした。図2において示されるように、抗DSE2抗体はGdnHClにおいてミスフォールドSOD1に優先的に結合するが、緩衝液における天然の折り畳み型SOD1にも非常に少ないが十分に結合する。しかし、酸化後、SOD1は抗DSE2抗体によって効率よく認識される。これは、抗DSE2 (10E11C11および3H1) 抗体が、神経変性疾患を有する患者において発生する酸化的改変SOD1の種類を認識することを証明している。結果を以下の表10に表す。

【 0 3 7 6 】

(表 1 0) DSE2に対する抗体による酸化SOD1の認識

処置		クローン		処置		クローン	
	PBST	10E11C11	3H1		PBST	10E11C11	3H1
SOD-PBS	0.088	0.357	0.34	SOD-Gnd	0.118	1.243	2.29
	0.094	0.362	0.335		0.092	1.254	2.295
	0.082	0.389			0.086	1.225	
平均値	0.088	0.3693333	0.3375	平均値	0.098666667	1.240666667	2.2925
相対標準偏差	6.82%	4.66%	1.05%	相対標準偏差	17.24%	1.18%	0.15%
	PBST	10E11C11	3H1		PBST	10E11C11	3H1
6hr CuCl	0.082	1.044	1.379	3hr CuCl	0.087	1.061	1.717
	0.093	0.987	1.489		0.101	1.06	1.621
	0.089	1.042			0.088	1.076	
平均値	0.088	1.0243333	1.434	平均値	0.092	1.065666667	1.669
相対標準偏差	6.33%	3.16%	5.42%	相対標準偏差	8.49%	0.84%	4.07%
	PBST	10E11C11	3H1		PBST	10E11C11	3H1
1hr CuCl	0.075	1.023	1.592	0hr CuCl	0.073	0.67	0.527
	0.083	1.035	1.435		0.087	0.669	0.59
	0.072	1.026			0.071	0.664	
平均値	0.076666667	1.028	1.5135	平均値	0.077	0.667666667	0.5585
相対標準偏差	7.42%	0.61%	7.34%	相対標準偏差	11.32%	0.48%	7.98%
	PBST	10E11C11	3H1		PBST	10E11C11	3H1
BSA-PBS	0.073	0.12	0.078	100uM H2O2	0.071	0.489	0.436
	0.083	0.098	0.076		0.086	0.476	0.425
	0.073	0.091			0.107	0.453	
平均値	0.076333333	0.103	0.077	平均値	0.088	0.472666667	0.4305
	PBST	10E11C11	3H1		PBST	10E11C11	3H1
1mM h2O2	0.074	0.776	0.744	10mM H2O2	0.078	0.836	0.763
	0.081	0.752	0.717		0.092	0.84	0.726
	0.074	0.781			0.083	0.878	
平均値	0.076333333	0.769666667	0.7305	平均値	0.084333333	0.851333333	0.7445
相対標準偏差	5.29%	2.01%	2.61%	相対標準偏差	8.41%	2.72%	3.51%

【 0 3 7 7 】

実施例14

ALS特異的エピトープ予測、合成、および精密化

10

20

30

40

50

ミスフォールドSOD1によって提示され、天然のSOD1によって提示されないエピトープは、SOD1の通常に折り畳まれた天然のコンフォメーションによって隠される配列領域に関して、天然のSOD1の構造を分析することによって決定される可能性がある。たとえば、DSE2およびDSE3ループはSOD1の天然の構造では抗体結合のために近づくことができないが、アミロイド原線維およびナノチューブ構造におけるSOD1活性部位から除外されることが示された(84)。このように、これらのループの露出は、SOD1ミスフォールディングのマーカーとなる可能性があるが、それらはまた、SOD1の鋳型特異的ミスフォールディングに関係するSOD1の「動員ドメイン」を構成する可能性がある。本発明者らは、SOD1ミスフォールディングの際に近づくことができるようになる推定の隠された配列としてDSE1、DSE4、およびDSE7を同定した。

10

【0378】

ミスフォールドSOD1によって提示され、天然のSOD1によって提示されないエピトープは、拘束された構造を有する配列領域を分析することによって予測される可能性がある。拘束された構造は、フォールディングの任意の変化に適合することができにくく、それによって配列領域におけるコンフォメーションの変化が起こり、および拘束構造には存在しない近づくことができるエピトープの提示が起こる。これに基づいて、エピトープDSE2、3、5、および6を予測した。

【0379】

ミスフォールド凝集SOD1のペプチド標的は、エピトープ露出の生化学的特徴付けのためのマウスモノクローナル抗体の開発のための免疫原を提供し、合成して特徴付けした。これらの標的には、配列

20

RLACGVIGI (DSE1);

DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2;

NPLSRKHGGPKDEE (DSE 3);

IKGLTEGLHGF (DSE5);

HCIIGRTLTVH (DSE6);

GSGKAVCVLK (DSE4); および

30

CGLHGFHVH (DSE7)

が含まれる。

【0380】

DSEペプチドを合成してKLH(キーホールリンペットヘモシアニン)に共役させた。内因性のシステインを有するDSEペプチド(DSE1、DSE1a、DSE4、およびDSE6)を、アミノ共役のためのDMS法(Pierceの試薬および方法)を用いてKLHに共役させた。内因性のシステイン残基を有しないDSEペプチド(DSE2、DSE3、DSE5、およびDSE7)は、チオール基共役のためのスルホ-MBS法(Pierceの試薬および方法)を用いてKLHに共役させた。

【0381】

天然の正常なSOD1の分子表面上に露出した「対照」エピトープを、任意で合成して特徴付けする。対照エピトープは任意で、天然の折り畳み型およびミスフォールドSOD1の双方において提示されるエピトープである。

40

【0382】

同定されたエピトープは、多数の抗原性決定基を有する可能性がある。エピトープをさらに分析して、免疫原性であるペプチドの小部分(たとえば、孤立性のエピトープ)を決定する。抗原性プロットが含まれるSOD1の免疫原性分析を用いて孤立性のエピトープを同定して、これらの孤立性のエピトープに対応する単離ペプチドを合成して、これらの孤立性のエピトープの一つまたは複数に対応する単離ペプチドを含む免疫原を用いて抗体を生成する。抗体は、他の実施例において記述されるように生成および試験する。

【0383】

50

抗原性プロットの例を図3に提供する。SOD1アミノ酸配列を、タンパク質抗原性決定基の位置を予測するための公共に入手可能なHopps and Woodsコンピューター化法に供した(図3A)。さらに、SOD1配列を抗原性決定予測に関するKolaskar and Tongaonkar法(85)に供した(図3B)。この後者の方法は、抗原性であるとしてSOD1(SEQ ID NO:15)のアミノ酸4~11位(AVCVLKGD)、アミノ酸27~33位(GPVKVG)、アミノ酸42~48位(LHGFHVH)、アミノ酸93~121位

GVADVSIEDSVISLSGDHCHIGRTLWVHE

およびアミノ酸142~149位(SRLACGVI)を同定した。

【0384】

免疫原性を増強するために、本発明のエピトープに対応する単離ペプチド配列または同定された孤立性のエピトープに対するさらなる改変を行う。たとえば、単離ペプチド内のシステイン残基をシステイン酸に酸化してもよい。例は、DSE1に存在するシステインがシステイン酸の形で酸化システインに置換され、抗体を作製するために用いられるDSE1aである。

【0385】

実施例15

類似体エピトープ

以下の一覧に従って、一つまたは複数の酸化または硝酸化アミノ酸を組み入れて類似体エピトープペプチドを合成する。DSE1におけるシステイン(C)残基をシステインスルフィン酸またはシステイン酸に酸化する(すなわち、DSE1a)。DSE2におけるリジン(K)残基をカルボニル基に酸化する。DSE3におけるアルギニン(R)、リジン(K)、およびヒスチジン(H)残基の一つまたは複数の酸化して、カルボニル基を形成する。DSE4において、リジン(K)をカルボニル基に酸化して、および/またはシステイン(C)をシステインスルフィン酸またはシステイン酸に酸化する。DSE5において、KおよびHの一つまたは複数のカルボニル基に酸化して、および/またはフェニルアラニンにニトロトリプトファンに硝酸化する。DSE6において、HまたはRの一つまたは複数のカルボニル基に酸化して、および/またはCをシステインスルフィン酸またはシステイン酸に酸化する。DSE7において、Hをカルボニル基に酸化して、および/またはFをニトロトリプトファンに硝酸化する。

DSE1: 145-151, RLACGVIGI: C

DSE2: 125-142, DLGKGGNEESTKTGNAGS: K

DSE3: 65-78, NPLSRKHGGPKDEE: R, K, H

DSE4: 3-9, KAVCVLK: K, C

DSE5: 35-45, IKGLTEGLHGF: K, H, F

DSE6: 110-120, HCIIGRTLWVH: H, C, R

DSE7: 41-48, GLHGFHVH: H, F

C: システインをシステインスルフィン酸に酸化して、次にさらにシステイン酸に酸化する。

H、R、K: カルボニル形成

M: 酸化、メチオニンスルホキシド

F: 硝酸化、ニトロトリプトファン

【0386】

合成ペプチド類似体は、モノクローナル抗体のような抗体を作製するための免疫原として用いられ、ならびにALS、AD、および/またはPDのようなミスフォールドSOD-1媒介疾患を有する個体を処置するために用いられる。抗体の特異性に関して免疫ペプチド類似体に対してスクリーニングする。陽性クローンをミスフォールドSOD1のその認識能に関してさらに試験する。SOD1を特異的に認識する抗体をヒト化して、ALS、AD、および/またはPDのようなミスフォールドSOD-1媒介疾患を有する個体を処置するために用いる。

【 0 3 8 7 】

実施例16

脳組織の免疫沈降

アルツハイマー病、パーキンソン病、またはALSと診断された患者、およびマッチさせた対照からの脳組織を得る。試料をドライアイスにおいて直ちに凍結する。凍結組織をより小さい小片に切断して、溶解緩衝液（100 mM NaCl、10 mM EDTA、10 mM Tris、0.5%デオキシコール酸塩、0.5%NP-40、pH 7.4）および1×Roche EDTA非含有完全プロテアーゼ阻害剤（Roche）溶液において乳棒乳鉢ホモジナイザーによってホモジナイズ（10%w/v）する。このホモジネートを2000×gで遠心して、上清を「可溶性分画」と呼び、沈降物分画を「不溶性分画」と呼ぶ。組織ホモジネートを直ちにアリコートにして、使用するまで

10

【 0 3 8 8 】

SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体には、米国特許出願第60/741,462号において開示されるSEDI SOD（抗DSE1）抗体が含まれる。この抗体は、配列RLACGVIGIを含むエピトープに対して特異的である。

20

【 0 3 8 9 】

簡単に説明すると、SEDI SOD IgG 100 µgを3回交換したPBSに対して透析する。これをPBSにおいて予め加温した保存磁気ビーズ300 µlと共に4 で少なくとも96時間インキュベートする。次に、これを0.2 M Tris、pH 8.5において0.1%BSAによって4 で24時間ブロックする。代替りのプロトコールにおいて、プロテインGセファロースビーズ（Sigma）を用いてSEDI SOD IgGを沈殿させる。

【 0 3 9 0 】

代替りのプロトコールにおいて、WO2005/019828において開示されるエピトープ(DLGKGGNEESTKTGNAGS および NPLSRKHGGPKDEE)

30

、たとえば2006年3月3日に提出された米国特許出願第60/778,379号において記述されるように作製されたそれに対する抗体、およびKhare et al. (8)において開示されるエピトープ

(IKGLTEGLHGF および HCLIGRTLVDH)

が含まれる、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する他の抗体を免疫沈降実験において用いる。

【 0 3 9 1 】

実施例17

脳組織からのミスフォールドSOD1の免疫沈降および検出

40

正常ヒト患者、野生型マウス、野生型ヒトSOD1を過剰発現するトランスジェニックマウス、およびSOD1のミスフォールド型を発現するALSのG93Aモデルマウスからの脳組織を得た。試料をドライアイスにおいて直ちに凍結して重量を測定した。凍結組織をより小さい小片に切断して、溶解緩衝液（100 mM NaCl、10 mM EDTA、10 mM Tris、0.5%デオキシコール酸塩、0.5%NP-40、pH 7.4）および1×Roche EDTA非含有完全プロテアーゼ阻害剤（Roche）溶液において乳棒乳鉢ホモジナイザーによってホモジナイズ（10%w/v）した。このホモジネートを2000×gで遠心して、上清を「可溶性分画」と呼び、沈降物分画を「不溶性分画」と呼んだ。組織ホモジネートを直ちにアリコートにして、使用するまで-80で凍結した。不溶性分画による実験に関して、沈降物を溶解緩衝液に再懸濁した。タンパク質濃度をBCAタンパク質アッセイ（Pierce）を用いて決定した。1×プロテアーゼ阻害剤

50

を含有するPBSによって1 mlに希釈したタンパク質100 µgを、製造元の説明書に従って、Dynabeads M-280トシル-活性化磁気ビーズ (Dynal Biotech, Oslo, Norway) に共役させた、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープ

DLGKGGNEESTKTGNAGS

に結合するモノクローナル抗体5～10 µgによって免疫沈降させた。

【0392】

イムノプロットिंगの場合、

DLGKGGNEESTKTGNAGS

に対する抗体を用いて、ゲル電気泳動によって分離されている脳組織試料の細胞タンパク質からSOD1を検出した。

【0393】

図4において証明されるように、

DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2)

に対する抗体は、G93A変異体マウスの脳組織においてSOD1のミスフォールド型を免疫沈降させて、かなり低い程度であるが過剰発現された野生型ヒトSOD1を免疫沈降させた。この抗体はマウスまたはヒトSOD1の天然型を免疫沈降させなかった。しかし、DSE2に対する抗体は、直接イムノプロットングにより、変性したヒトおよびマウスSOD1を認識した。

【0394】

代わりのプロトコールにおいて、WO2005/019828において開示されるエピトープ (NPLSRKHGGPKDEE)

、たとえば2006年3月3日に提出された米国特許出願第60/778,379号において記述されるように作製されたそれに対する抗体、およびKhare et al. (8)において開示されるエピトープ

(IKGLTEGLHGF および HCIIGRTLVDH)

が含まれる、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する他の抗体を免疫沈降実験において用いる。

【0395】

実施例18

脳組織の免疫組織化学

アルツハイマー病、パーキンソン病、またはALSと診断された患者およびそのマッチさせた対照から脳組織を得る、試料を10%無メタノールリン酸緩衝ホルマリン (Fisher Scientific) と共にインキュベートする。組織試料を解剖して、パラフィン抱埋し、ロータリーミクロトームを用いて縦方向または横方向のいずれかに6 µm切片を作製する。免疫組織化学のための切片は全て、標識前に3% H₂O₂ (v/v) および10 mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0によって処置する。SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体を用いる。全ての場合において、一次抗体を4

で終夜反応させる。色素原として3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) を用いてDakoCytomation Envision (商標) システムを用いて製造元の説明書に従って切片を顕色させる。二重標識の場合、DakoCytomation Envision (商標) 二重染色キットを、色素原としてニトロ-ブルーテトラゾリウム (NBT) と共に用いる。染色した切片をLeica DM 6000顕微鏡を用いて可視化して、Micropublisher 3.3 RTVデジタルカラーカメラ (Qimaging) によってデジタル画像を得る。

【0396】

実施例19

アルツハイマー病の脳組織の免疫組織化学

組織をホルマリン固定によって調製してパラフィンに抱埋した。組織を切片 (4ミクロン) にして、充填した顕微鏡スライドガラスに載せて、組織乾燥器において60 °Cで45分間加熱した。スライドガラスをキシレン (3×5分) において洗浄することによって、スライドガラスのパラフィンを除去した後、アルコールの減少濃度 (100%アルコールを用いて3

10

20

30

40

50

×3分；95%アルコールを用いて2×3分；80%アルコールを用いて1×3分）および蒸留水においてスライドガラスを洗浄することによって水和させた。スライドガラスを0.01 Mクエン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0において99～100 で20分間蒸気をあてて、RTで20分間インキュベートした。Tweenを含む1×TBS（TBST）においてスライドガラスをRTで1分間再度すすいだ。

【0397】

スライドガラスをタンパク質ブロックと共に20分間インキュベートして、一次抗体によって45分間ブローピングして、TBSTによってすすいだ。スライドガラスをビオチン化二次抗体と共に30分間インキュベートした後TBSTによってすすいだ。次に、スライドガラスをアルカリホスファターゼストレプトアビジンにおいて30分間インキュベートして、TBSTにおいてすすぎ、基質と共に30分間インキュベートした。蒸留水においてすすいだ後、スライドガラスを顕微鏡によって調べた。

【0398】

アルツハイマー病と診断された78歳女性の剖検から得られた脳海馬組織および52歳女性の対照の正常な海馬組織を得た。試料を10%無メタノールリン酸緩衝ホルマリン（Fisher Scientific）と共にインキュベートする。組織試料を解剖して、パラフィン抱埋し、ロータリーミクロトームを用いて縦方向または横方向のいずれかに6μm切片を作製した。免疫組織化学のための切片は全て、標識前に3% H_2O_2 （v/v）および10 mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0によって処置した。アルツハイマー病特異的なエピトープ

DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2)

に結合する抗体を一次抗体として用いて、組織切片を5μg/mlの濃度で染色した（図5）。抗体を4 で終夜放置した。色素原として3,3'-ジアミノベンジジン（DAB）を用いてDakoCytomation Envision（商標）システムを用いて製造元の説明書に従って切片を顕色させた。二重標識の場合、DakoCytomation Envision（商標）二重染色キットを、色素原としてニトロ-ブルーテトラゾリウム（NBT）と共に用いた。染色した切片をLeica DM 6000顕微鏡を用いて可視化して、Micropublisher 3.3 RTVデジタルカラーカメラ（Qimaging）によってデジタル画像を得た。末期アルツハイマー病を有する78歳女性から得た海馬の切片は、正常な海馬（図5A）と比較して、DSE2に対する抗体によって、アルツハイマー病脳における老人斑の強い染色を示すと共に（図5B、左のパネル）、アルツハイマー病海馬切片においてニューロンのサブセット内に染色の増加（図5B、右のパネル）を示した。

【0399】

これらのデータは、ミスフォールドSOD1がアルツハイマー病患者の脳の細胞内および細胞外に存在すること、ならびにDSE2エピトープ

CDLGKGGNEESTKTGNAGS

に対する抗体がアルツハイマー病患者の脳において見いだされるミスフォールドSOD1タンパク質を認識することを証明している。

【0400】

実施例20

パーキンソン病の脳組織の免疫組織化学

組織をホルマリン固定によって調製してパラフィンに抱埋した。組織を切片（4ミクロン）にして、充填した顕微鏡スライドガラスに載せて、組織乾燥器において60 で45分間加熱した。スライドガラスをキシレン（3×5分）において洗浄することによって、スライドガラスのパラフィンを除去した後、アルコールの減少濃度（100%アルコールを用いて3×3分；95%アルコールを用いて2×3分；80%アルコールを用いて1×3分）および蒸留水においてスライドガラスを洗浄することによって水和させた。スライドガラスを0.01 Mクエン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0において99～100 で20分間蒸気をあてて、RTで20分間インキュベートした。Tweenを含む1×TBS（TBST）においてスライドガラスをRTで1分間すすいだ。

【0401】

スライドガラスをタンパク質ブロックと共に20分間インキュベートして、一次抗体によ

って45分間ブローピングして、TBSTによってすすいだ。スライドガラスをビオチン化二次抗体と共に30分間インキュベートした後TBSTによってすすいだ。次に、スライドガラスをアルカリホスファターゼストレプトアビジンにおいて30分間インキュベートして、TBSTにおいてすすぎ、基質と共に30分間インキュベートした。蒸留水においてすすいだ後、スライドガラスを顕微鏡によって調べた。

【0402】

認知症の79歳女性から脳試料を得た。H&E染色切片（図6、パネルA）は、パーキンソン病と一貫するレヴィー小体を時に示すドーパミン作動性ニューロンを有する黒質を示した。抗DSE2抗体は、黒質内の色素沈着および非色素沈着ニューロンにおいて、ほぼ陰性からまれにかすかな染色を示した（図6、パネルB、C、DおよびE）。レヴィー小体は陰性であった（図6、パネルB）。隣接する神経網はかすかに陽性であり、星状細胞はかすかから時に中等度に陽性であった。アミロイド小体は強く陽性であった。この試料は、強く陽性である隣接する灰白質においてまれな老人斑を示した（図6、パネルF）。隣接する連続切片を、対照として一次抗体の非存在下で評価したところ、全て陰性であった。

10

【0403】

これらのデータは、ミスフォールドSOD1がパーキンソン病患者の脳に存在すること、およびDSE2エピトープ

DLGKGGNEESTKTGNAGS

に対する抗体がパーキンソン病患者の脳において見いだされるミスフォールドSOD1タンパク質を認識することを証明している。

20

【0404】

実施例21

疾患におけるSOD1 DSE2の免疫反応性

本発明者らは、全てのタイプのALS（散発型と共にSOD1家族性ALSおよびSOD1変異を伴わない家族性ALS）においてDSE2免疫反応性を検出した。免疫反応性は、前根における運動神経軸索と共に脊髄前角内の細胞外穿刺沈着物、および運動路軸索内が含まれる、いくつかの脊髄運動ニューロン内の孤立性の密な沈着物として検出可能である。

【0405】

その上、DSE2免疫反応性は、ADにおける海馬ニューロンにおいて細胞内に検出可能であるが、正常な年齢をマッチさせた個体では検出されない。その上、DSE2免疫反応性はまた、老人斑および海馬における細胞外穿刺沈着物においても限局的に散在して認められる。神経変性疾患における細胞外のミスフォールドSOD1は、明らかに免疫療法の標的であり、これは小膠細胞による分解を加速することによって、および/またはこのミスフォールドタンパク質の異常な酵素活性を遮断することによって、ミスフォールド種の毒性活性を「中和する」可能性がある。

30

【0406】

実施例22

ALSモデルマウスのALS特異的エピトープ免疫

本研究は、酵素スーパーオキシジスムターゼ1（SOD1）の特異的ペプチド配列によるワクチン接種が、神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）を予防することを示す。

40

【0407】

ヒト変異体SOD1 G93AおよびG37Rを発現するトランスジェニックマウスを、運動ニューロン疾患が発症する前（それぞれ、4ヶ月および6ヶ月）、KLH共役筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープおよび対照ペプチドによって毎月IP免疫する。SOD凝集体および疾患発症の遅延または消失が治療活性エピトープに関して起こり、筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープおよび対照エピトープに関する可能性がある自己免疫発現をモニターする。

【0408】

これらの方法はG93AおよびG37Rモデルマウスについて用いられる。G93AおよびG37Rモデルマウスは、ヒトSOD1タンパク質の一定の変異体型を発現し、ALS様疾患を臨床的および

50

神経病理学的に発症する。それぞれのモデルマウスの72匹を本試験に用いる。SOD1の非変性型に対する異なる7つのALS特異的ペプチドエピトープを試験して、2つの対照群（無処置1群およびアジュバント単独によって処置した1群）と比較する。各群は動物8匹からなった。

【0409】

4週齢の半接合トランスジェニックマウス（トランスジーンおよびコピー数をPCRおよびサザンブロットによって確認）を、免疫のために9群の一つに無作為化する：免疫なし（NI）；キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）単独プラスアジュバント；または7つのSOD1 DSEペプチド配列の一つ。ペプチドは全て、合成、精製して、およびSMCC-Sulfolinkを用いてKLHに共役させる。マウスは全て、フロイントの完全アジュバント（FCA）において1：1で乳化したKLH-共役ペプチドまたはKLH単独100 μgの全量100 μlの腹腔内注射（IP）によって初回免疫する。3週間後、マウスにフロイントの不完全アジュバント（IFA）において乳化したKLH-共役ペプチドの皮下注射を行う。その後、マウスにIFAにおいて乳化したKLH-共役ペプチドの皮下注射を毎月行う。4回免疫後、血液100 μlを伏在静脈から採取して、血漿の抗体価を決定する。

【0410】

動物の体重を1週間に2～3回測定する。動物を尾の基底部で持ち上げて、体重測定のためにケージから取り出す際に脚の伸展反射を評価する。脚伸展の低減は、変異体SOD1トランスジェニックマウスにおいて観察される最初の欠損である。マウスの行動をオープンフィールド試験（EthoVision, Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA）を用いて毎週モニターし、歩行分析をDigiGaitを用いて毎週行う。初回行動および歩行評価を、初回免疫の直前に完了し、ベースラインデータとして役立てる。

【0411】

脳、脊髄、および他の非CNS臓器系を神経変性の形態学的および生化学的指標に関して死後に分析する。

【0412】

動物の体重を測定して、免疫の結果である可能性がある疼痛および窮迫の徴候のような有害効果に関して定期的にモニターする。自己免疫も同様にモニターする。

【0413】

ALS特異的ペプチドエピトープによるワクチン接種は、神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）を予防する。SOD凝集および疾患発症の遅延または消失は、治療活性エピトープに関して起こるが、対照の場合は起こらない。

【0414】

実施例23

ALSモデルマウスのALS-特異的エピトープ免疫

4週齢のG93AまたはG37Rモデルを免疫のために7群の一つに無作為化する：生理食塩液、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）；DSE1；DSE1a；DSE2；DSE5；およびDSE1a + DSE2 + DSE5。ペプチドは全てKLHに共役させる。免疫は全て薬学的に許容される賦形剤と共に投与される。

【0415】

動物を脚伸展反射、行動および歩行の変化に関して評価する。脳、脊髄、および他の非CNS臓器系を、神経変性の形態学的および生化学的指標に関して死後に分析する。

【0416】

ALS特異的エピトープをコードする核酸によるワクチン接種は、神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）を予防する。SOD凝集および疾患発症の遅延または消失は、治療活性核酸に関して起こるが、対照の場合は起こらない。

【0417】

実施例24

核酸によるALSモデルマウスの免疫

4週齢のG93AおよびG37Rモデルマウスを、ALS特異的エピトープをコードする核酸、また

は無関係な対照核酸によって免疫するために無作為化する。核酸は全て、薬学的に許容される賦形剤と共に投与される。

【0418】

動物を脚伸展反射、行動および歩行の変化に関して評価する。脳、脊髄、および他の非CNS臓器系を、神経変性の形態学的および生化学的指標に関して死後に分析する。

【0419】

ALS特異的エピトープをコードする核酸によるワクチン接種は、神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）を予防する。SOD凝集および疾患発症の遅延または消失は、治療活性核酸に関して起こるが、対照の場合は起こらない。

【0420】

実施例25

ALSモデルマウスのALS-特異的エピトープ抗体注入

G93AおよびG37Rマウスに、ALS免疫療法をより厳密にモデルとするために疾患の発症時に筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対するモノクローナル抗体を静脈内注入（IV）する。SOD凝集および疾患進行の遅延または停止が治療活性抗体に関して起こるが、アイソタイプ対照抗体では効果は認められない。筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープおよび天然の露出されたエピトープが含まれる対照抗体に関して、自己免疫をモニターする。

【0421】

G93AおよびG37Rモデルマウスは、ヒトSOD1タンパク質の一定の変異型を発現して、ALS様疾患を臨床的および神経病理学的に発症する。それぞれの系統のマウス32匹を本試験に使い、8匹をSOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対する抗体処置群2群および対照群2群のそれぞれに対して無作為化する。8週齢のマウスを4群の一つに無作為化する：1．腹腔内に注射した（IP）SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対する抗体；2．脳室内（ICV）に注入されたSOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対する抗体；3．IP注射したPBS（対照）；および4．ICV注射したリン酸緩衝生理食塩液（PBS）（対照）。

【0422】

マウスに、PBS（250 μ l/ml）における精製抗体1 ml、またはPBS単独のIP注射を毎週行う。ICV注入の場合、マウスを、ノースピースによって送達したイソフルランガスによって麻酔して、ミニ浸透圧ポンプ（Alzetモデル番号2004；長さ：3 cm、全量：200 μ l、流速：0.25 μ l/時間）を埋め込む。このポンプは、少なくとも4週間のあいだ0.125 μ g/時間（全量25 μ g/週）の一定の注入を提供する。精製DSE2抗体またはPBSのいずれかを含有するポンプを、第3脳室に留置したカニューレを用いて脳注入キット（Alzet脳注入キット3）に適合させる。ポンプを4週間使用後交換する。

【0423】

IP注射の前またはポンプの埋め込み前に、ベースラインデータとして役立てるために、マウスの体重を測定して、運動機能および行動に関して評価する。次に、これらの試験を週に1回行う。試験には以下が含まれる：

a) 後肢伸展反射：動物を尾で持ち上げた場合の後肢伸展の低減は、変異体SOD1トランスジェニックマウスにおいて観察される初期欠損である。動物を尾の基底部で持ち上げて後肢伸展および姿勢反射を採点する。スコア3は、完全な伸展および正常な姿勢反射を示す。スコア2は、中等度の伸展および正常な姿勢反射を示す。スコア1は、不良な伸展および姿勢反射を示す。スコア0は後肢の運動なしを示す。

b) オープンフィールド試験：オープンフィールド試験は、EthoVision Pro Version 3.1 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA) を用いて毎週行う。動物を、上部が開口した閉鎖円形アリーナ（直径50 cm）に入れて、頭上からのデジタルビデオカメラによって約5分間記録する。多数の行動学パラメータをオフラインで定量する。動物4匹を異なるアリーナで同時にモニターする。

c) 歩行分析：歩行分析はDigiGait (Mouse Specifics, Boston, MA, USA) を用いて毎

10

20

30

40

50

週行う。前足の置き方およびストライド距離の変化は、DigiGaitを用いて評価した場合に、G93A B6.Cg-Tg SOD1トランスジェニックマウスにおいて観察される最も初期の機能的変化であると報告される。

【0424】

12週齢で、血液100 μ lをマウスの伏在静脈から採取して、血漿の抗体力価を決定する。ICV処置マウスの場合、ポンプを交換する際に麻酔下で血液を採取する。IP処置マウスも同様に、採血を容易にするためにイソフルランによって麻酔する。

【0425】

動物の体重を測定して、試験期間中疼痛および窮迫の徴候のような有害効果に関して定期的にモニターする。痛がっているように思われる動物にはブプレノルフィンを投与する。

10

【0426】

脳、脊髄、および他の非-CNS臓器系を神経変性の形態学的および生化学的指標に関して死後に分析する。

【0427】

SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対する抗体の注射または注入は、神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)の処置において有効である。G93AおよびG37Rモデルマウスの処置 SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに対する抗体の注入または注射によって、これらのマウスは：変異体SOD1を中和および清浄化した；SOD1凝集体の形成を予防した；疾患の発症を遅延させた；および/または疾患の進行を遅らせた。

20

【0428】

実施例26

DSE2抗体によるG93Aマウスの処置

G93AモデルマウスにDSE2ペプチド配列に対するモノクローナル抗体を注入した。G93AモデルマウスはヒトSOD1タンパク質の変異体型を発現して、臨床的および神経病理学的にALS様疾患を発症する。抗体を、脳カテーテル(Alzet(登録商標)カテーテル)および皮下に埋め込まれたポンプ(Alzet(登録商標)浸透圧ポンプ)を用いて脳室内(ICV)注入によって、または抗DSE2抗体の腹腔内注入のいずれかによって投与した。

【0429】

30

ICV注入の場合、動物8匹を処置群(動物4匹)または対照群(動物4匹)のいずれかに無作為割付した。処置に関してAlzetポンプに抗体の生理食塩液溶液(0.5~0.6 mg/ml)または対照として生理食塩液単独200 μ lを充填した。抗体を流速0.125 μ g/時間で4週間送達した。さらに2匹のマウスに抗DSE2抗体1 mgの腹腔内(IP)注射の後に、1週間間隔で抗DSE2抗体1 mgの生理食塩液溶液の注射をさらに3回行った。マウス2匹は、抗体を含まない生理食塩液を注射した対照であった。

【0430】

処置および無処置マウスにおける疾患の進行を歩行分析(DigiGait, Mouse Specifics Inc, Boston, MA)を用いてモニターした。Digigait分析によってこのマウスモデルにおける歩行パラメータの変化を非常に正確に測定することができ、疾患進行の非常に正確かつ客観的な評価が可能となる(Wooley CM, Sher RB, Kale A, Frankel WN, Cox GA, Sebum KL.; Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. Muscle Nerve. 2005 Jul;32(1):43-50)。疾患が進行すると、ストライド時間が増加する。本発明者らは、ストライド時間が、疾患進行を測定するための感度のよいパラメータであることを見いだした。

40

【0431】

表11は、処置後25日目(IP注射)および処置後28~35日目(ICV注入)の処置動物のDigigait分析を用いたストライド時間測定の結果を示す。ストライド時間を秒で測定し、試験期間および四肢全てに対して平均する。ストライド時間は対照ICV注入群では平均で0.3238秒であった。ストライド時間によって測定すると、疾患の進行は処置後35日目で有意

50

に遅延する。ストライド時間は処置動物においてより短く、0.2988秒に低減される。ストライド時間はまた、IP注射マウスにおいても改善する。ストライド時間は対照動物に関して平均で0.3366秒であり、処置後28日目では0.3206秒に改善された。

【 0 4 3 2 】

疾患進行の効果を比較および証明するために、平均で66および122日齢（処置群と同じ範囲の動物の日齢）での無処置マウスのストライド時間を決定した。66日では無処置マウスは平均ストライド時間0.3254秒（STDEV 0.0313）を有する。122日目、ストライド時間は0.3492秒に増加した（STDEV 0.0288）。明らかに、処置の非存在下では、このパラメータは高い統計学的有意性で増加する。本発明者らは、いずれの処置法も、無処置動物において観察されるストライド時間の経時的な延長を逆転させることを発見した。このことは、ALSマウスモデルの疾患関連表現型を逆転させる本発明の抗体の処置の有効性を証明する。

【 0 4 3 3 】

（表 1 1）疾患進行の遅延：疾患特異的SOD1抗体によって処置した動物のストライド時間

試験	群	ストライド 時間（秒）	
ICV注入	処置	平均値	0.2988s
		STDEV	0.0044
	対照	平均値	0.3238s
		STDEV	0.0449
	P値		4.30E-02
IP注射	処置	平均値	0.3206s
		STDEV	0.0044
	対照	平均値	0.3366s
		STDEV	0.0148
	P値		1.82E-02
疾患の進行	66日	平均値	0.3254s
		STDEV	0.0313
	122日	平均値	0.3492s
		STDEV	0.0288
	P値		1.04E-05

【 0 4 3 4 】

実施例27

TgCRND8トランスジェニックマウスの免疫

TgCRND8マウスは、マウスアルツハイマー病モデルである。これらのマウスは、C3H/B6系統バックグラウンドにおいてシリアンハムスタープリオンプロモーターの調節下で変異体（K670N/M671LおよびV717F）ヒトβAPP695トランスジーンを発現する。これらのマウスは、3ヶ月齢で空間的学習欠損を有し、これは脳におけるSDS-可溶性Aβレベルの増加とAβ含有アミロイド斑の数の増加を伴う。Janus C et al.(65)を参照されたい。

【 0 4 3 5 】

TgCRND8マウスを、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに共役したKLHまたは対照ペプチドによって6、8、12、16、および20週目にIP免疫する。

【 0 4 3 6 】

マウスをモリスの水迷路試験の参照記憶版において11、15、19、および23週目に試験する (Janus C et al. (65) ; Janus C (66) ; Gass P et al. (67) ; およびWehner JM (68) を参照されたい)。

【0437】

SOD1凝集および疾患発症の遅延または消失は、治療活性エピトープに関して起こり、自己免疫発現をモニターする。

【0438】

SOD1凝集に加えて、脳の前線維A β の沈着を評価する (Janus C et al. (65) を参照されたい)。

【0439】

10

実施例28

TgCRND8トランスジェニックマウスの抗体注入

TgCRND8マウスに、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体またはアイソタイプ対照抗体を注入する。先に記述したように、マウスをモリスの水迷路試験の参照記憶版において試験する。

【0440】

SOD1凝集および疾患進行の遅延または停止が治療活性抗体に関して起こり、アイソタイプ対照抗体では効果を認めない。自己免疫をモニターする。SOD1凝集に加えて、脳の前線維A β の沈着を評価する (Janus C et al. (65) を参照されたい)。

【0441】

20

実施例29

核酸によるTgCRND8トランスジェニックマウスの免疫

TgCRND8マウスは、マウスアルツハイマー病モデルである。これらのマウスは、C3H/B6系統バックグラウンドにおいてシリアンハムスタープリオンプロモーターの調節下で変異体 (K670N/M671LおよびV717F) ヒト β APP695トランスジーンを発現する。これらのマウスは、3ヶ月齢で空間的学習欠損を有し、これは脳におけるSDS-可溶性A β レベルの増加とA β 含有アミロイド斑の数の増加を伴う。Janus C et al. (65) を参照されたい。

【0442】

TgCRND8マウスを、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープをコードする核酸に共役したKLHまたは対照核酸によって6、8、12、16、および20週目にIP免疫する。

30

【0443】

マウスをモリスの水迷路試験の参照記憶版において11、15、19、および23週目に試験する (Janus C et al. (65) ; Janus C (66) ; Gass P et al. (67) ; およびWehner JM (68) を参照されたい)。SOD1凝集に加えて、脳の前線維A β の沈着を評価する (Janus C et al. (65) を参照されたい)。

【0444】

SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープをコードする核酸によるワクチン接種は、アルツハイマー病を予防する。SOD1の凝集および疾患発症の遅延または消失は、治療活性核酸に関して起こり、対照では起こらない。

40

【0445】

実施例30

H α -Syn Tgマウスの免疫

血小板由来増殖因子 β プロモーターの調節制御下でh α -synを発現するヘテロ接合トランスジェニックマウスを用いる (Masliah E et al. (69))。これらの動物は、パーキンソン病およびレヴィー小体病のモデルであることから用いられる (Masliah E et al. (70))。

【0446】

h α -syn tgマウスをSOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに共役したKLHまたは対照ペプチドによって2、6、8、12、16および20週目

50

にIP免疫する。

【0447】

SOD1凝集および疾患発症の遅延または消失は、治療的活性エピトープについて起こり、自己免疫発現をモニターする。疾患の進行をマウスの脳におけるh α -synの蓄積および神経学的関与の臨床特徴をモニターすることによって評価する(Masliah E et al.(70)を参照されたい)。

【0448】

実施例31

H α -Syn Tgマウスの核酸による免疫

血小板由来増殖因子 β プロモーターの調節制御下でh α -synを発現するヘテロ接合トランスジェニックマウスを用いる(Masliah E et al.(69))。これらの動物は、パーキンソン病およびレヴィー小体病のモデルであることから用いられる(Masliah E et al.(70))。

【0449】

h α -syn トランスジェニックマウスをSOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープをコードする核酸または対照核酸によって2、6、8、12、16および20週目にIP免疫する。

【0450】

疾患の進行をマウスの脳におけるh α -synの蓄積および神経学的関与の臨床特徴をモニターすることによって評価する(Masliah E et al.(70)を参照されたい)。

【0451】

SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープをコードする核酸によるワクチン接種は、パーキンソン病を予防する。SOD1凝集および疾患発症の遅延または消失は、治療活性核酸について起こり、対照核酸では起こらない。

【0452】

実施例32

H α -syn tgマウスの抗体注入

h α -syn tgマウスに、SOD1の非天然型において選択的に提示されるまたは近づくことができるエピトープに結合する抗体、またはアイソタイプ対照抗体を注入する。

【0453】

SOD1凝集および疾患の進行の遅延または停止は、治療活性抗体について起こるが、アイソタイプ対照抗体では効果を認めない。自己免疫をモニターする。

【0454】

疾患の進行をマウスの脳におけるh α -synの蓄積および神経学的関与の臨床特徴をモニターすることによって評価する(Masliah E et al.(70)を参照されたい)。

【0455】

実施例33

ALS患者に対する単離ペプチドの投与

GGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a), DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) および IKGLTEGLHGF (DSE5)

のようなALS特異的エピトープを含む組成物をヒトALS患者に投与する。組成物をALS患者に投与する。

【0456】

患者をSOD凝集および疾患の進行の遅延または停止の指標に関してモニターする。

【0457】

被験体を免疫の結果である可能性がある疼痛および窮迫の徴候のような有害な効果に関して定期的にモニターする。自己免疫発現をモニターする。

【0458】

ALS特異的エピトープ

GGGRLAC*GVIGIGSG

(DSE1a), DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) および IKGLTEGLHGF (DSE5)

の投与はALSの進行を遅らせる。SOD1凝集の遅延または停止および疾患進行の消失は治療活性エピトープについて起こる。

【 0 4 5 9 】

実施例34

ALS患者に対する投与：抗体

GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a), DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) および
IKGLTEGLHGF (DSE5)

10

を含むALS特異的エピトープに対する抗体をヒトALS患者に投与する。抗体は被験体に6、8、12、16、および20週目に投与される。

【 0 4 6 0 】

患者をSOD凝集および疾患の進行の遅延または停止の指標に関してモニターする。自己免疫発現も同様にモニターする。

【 0 4 6 1 】

被験体を免疫の結果である可能性がある疼痛および窮迫の徴候のような有害効果に関して定期的にモニターする。自己免疫発現をモニターする。

【 0 4 6 2 】

20

ALS特異的エピトープ

GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a), DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) および
IKGLTEGLHGF (DSE5)

に対する抗体投与はALSの進行を遅らせる。SOD1凝集の遅延または停止および疾患進行の消失は治療活性抗体について起こる。

【 0 4 6 3 】

実施例35

ALS患者へのヒト化抗体の投与

筋萎縮性側索硬化症特異的エピトープに対するヒト化抗体をヒトALS患者に投与する。患者をSOD凝集および疾患の進行の遅延または停止の指標に関してモニターする。ALS疾患特異的エピトープに対するヒト化抗体の投与は、患者におけるALS疾患の進行を遅らせる。SOD1凝集の遅延または停止および疾患進行の消失は、治療活性抗体について起こる。

30

【 0 4 6 4 】

GGGRLAC*GVIGIGSG (DSE1a), DLGKGGNEESTKTGNAGS
(DSE2) および IKGLTEGLHGF (DSE5)

ペプチドを含むALS特異的エピトープに対するヒト化抗体をヒトALS患者に投与する。ヒト化抗体1~140 g (2 g/kgまで) を含む薬学的組成物をCNSにおいて1 mlあたり1~10 µgの範囲である局所濃度が産生されるように静脈内注入によって投与する。一つの療法において、製剤は一つのALS特異的エピトープに対する抗体を含む。もう一つの療法において、製剤は、それぞれが異なるALS特異的エピトープに対する二つまたはそれより多いヒト化抗体を含む。投与療法は、患者の生理状態および処置に対する患者の反応に依存するであろう。一つの投与療法において、投与は3または4週間に1回である。他の療法において、投与は1週間に1回、1週間に2回、1週間に3回、または2週間に1回である。

40

【 0 4 6 5 】

実施例36

ALS患者に対するヒト化抗体の脳室内または鞘内投与

ALS-特異的エピトープに対するヒト化抗体を、MedTronics (Minneapolis, MN, USA) によって製造される注入ポンプのような注入ポンプを用いて、脳室内または鞘内に注入する

50

ことによって、ALS患者のCNSに直接投与する。ALS患者に、最高速度1 ml/hで注入してCNSにおいて1~10 µg/mlの最終濃度を得るためにヒト化抗体を1日あたり0.5~5 mg注入する。一つの療法において、製剤はALS特異的エピトープに対する抗体を含む。もう一つの療法において、製剤は、それぞれが異なるALS特異的エピトープに対する二つまたはそれより多いヒト化抗体を含む。

【0466】

ヒト化抗体を鞘内注射によってALS患者に投与する場合、注射容積による圧力の増加を回避するために、注射のために用いる同じ針を通して脳脊髄液の等量を採取する。被験体に、対応する全身用量の1%~10%の範囲の用量を投与する。被験体は、ヒト化抗体製剤の1回量を投与される。または、被験体はヒト化抗体製剤の複数用量を投与される。一つの療法において、製剤は一つのALS特異的エピトープに対する抗体を含む。もう一つの療法において、製剤は、それぞれが異なるALS特異的エピトープに対する、二つまたはそれより多いヒト化抗体を含む。代わりの態様において、投与は1週間に1回、1週間に2回、1週間に3回、2週間に1回、3週間に1回、または1ヶ月に1回である。もう一つの療法において、用量は、被験体の生理状態および処置に対する被験体の反応に応じて変化する。

【0467】

患者をSOD凝集および疾患進行の遅延または停止の指標に関してモニターする。ALS疾患特異的エピトープに対するヒト化抗体の投与は、患者におけるALS疾患の進行を遅らせる。SOD1凝集の遅延もしくは停止または疾患進行の消失は、治療活性抗体の場合に起こる。

【0468】

実施例37

アルツハイマー病患者への投与：エピトープ

アルツハイマー病特異的エピトープDLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2) をヒトアルツハイマー病患者に投与する。エピトープを投与する。

【0469】

患者をSOD凝集および疾患進行の遅延または停止の指標に関してモニターする。特に、被験体の記憶を試験して、その行動をモニターする。自己免疫発現も同様にモニターする。

【0470】

被験体を免疫の結果である可能性がある疼痛および窮迫の徴候のような有害な効果に関して定期的にモニターする。自己免疫も同様にモニターする。

【0471】

アルツハイマー病特異的エピトープ
DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2)

の投与はアルツハイマー病の進行を遅らせる。SOD1凝集の遅延もしくは停止または疾患進行の消失は、治療活性エピトープについて起こる。

【0472】

実施例38

アルツハイマー病患者への投与：抗体

アルツハイマー病特異的エピトープ
DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2)

に対する抗体をヒトアルツハイマー病患者に投与する。

【0473】

患者をSOD凝集および疾患進行の遅延または停止の指標に関してモニターする。特に、被験体の記憶を試験して、その行動をモニターする。自己免疫発現も同様にモニターする。

【0474】

被験体を免疫の結果である可能性がある疼痛および窮迫の徴候のような有害な効果に関して定期的にモニターする。自己免疫も同様にモニターする。

10

20

30

40

50

【0475】

アルツハイマー病特異的エピトープ

DLGKGGNEESTKTGNAGS (DSE2)

に対する抗体の投与はアルツハイマー病の進行を遅らせる。SOD1凝集の遅延もしくは停止または疾患進行の消失は、治療活性エピトープについて起こる。

【0476】

実施例39

アルツハイマー病患者に対するヒト化抗体の投与

アルツハイマー病特異的エピトープに対するヒト化抗体を、ヒトアルツハイマー病患者に投与する。ヒト化抗体は、CNSにおける局所濃度が1 mlあたり1~10 µgの範囲となる濃度で静脈内注入によって投与する。一つの療法において、製剤は一つのアルツハイマー病特異的エピトープに対する抗体を含む。もう一つの療法において、製剤は、それぞれが異なるアルツハイマー病特異的エピトープに対する、二つまたはそれより多いヒト化抗体を含む。一つの投与療法において、投与は3週間に1回である。他の療法において、投与は1週間に1回、1週間に2回、1週間に3回、または2週間に1回である。または、投与は、患者の生理状態および処置に対する患者の反応に応じて変化する。

10

【0477】

または、アルツハイマー病特異的エピトープに対するヒト化抗体は、脳室内または鞘内注入によって、アルツハイマー病患者のCNSに直接投与される。MedTronics (Minneapolis, MN, USA) は、本実施例において用いられる医学装置を提供する。最終濃度1~10 µg/mlは、最高速度1 ml/hで1日に5 mgもの多くのヒト化抗体を注入することによって得られる。一つの療法において、製剤は一つのアルツハイマー病特異的エピトープに対する抗体を含む。もう一つの療法において、製剤は、それぞれが異なるアルツハイマー病特異的エピトープに対する、二つまたはそれより多いヒト化抗体を含む。

20

【0478】

ヒト化抗体は鞘内注射によってアルツハイマー病患者に投与される。注射容積による圧力の増加を回避するために、注射のために用いる同じ針を通して脳脊髄液の等量を採用する。被験体に、対応する全身用量の1%~10%の範囲の用量を投与する。被験体は、ヒト化抗体製剤の1回量を投与される。または、被験体は複数回のヒト化抗体製剤を投与される。一つの療法において、製剤は一つのアルツハイマー病特異的エピトープに対する抗体を含む。もう一つの療法において、製剤は、それぞれが異なるアルツハイマー病特異的エピトープに対する、二つまたはそれより多いヒト化抗体を含む。代わりの態様において、投与は1週間に1回、1週間に2回、1週間に3回、2週間に1回、3週間に1回、または1ヶ月に1回である。もう一つの療法において、用量は、被験体の生理状態および処置に対する被験体の反応に応じて変化する。

30

【0479】

患者をSOD凝集および疾患進行の遅延または停止の指標に関してモニターする。アルツハイマー病特異的エピトープに対するヒト化抗体の投与は、患者におけるアルツハイマー病の進行を遅らせる。SOD1凝集の遅延もしくは停止または疾患進行の消失は、治療活性抗体の場合に起こる。

40

【0480】

実施例40

パーキンソン病患者に対する投与：エピトープ

パーキンソン病特異的エピトープをヒトパーキンソン病患者に投与する。

【0481】

患者をSOD凝集および疾患の進行の遅延または停止の指標に関してモニターする。特に、被験体の歩行、反射、および行動をモニターする。自己免疫発現も同様にモニターする。

【0482】

被験体を、免疫の結果である可能性がある疼痛および窮迫の徴候のような有害効果に関

50

して定期的にモニターする。

【0483】

パーキンソン病特異的エピトープの投与は、パーキンソン病の進行を遅らせる。SOD1凝集の遅延もしくは停止または疾患進行の消失は治療活性エピトープについて起こる。

【0484】

実施例41

パーキンソン病患者に対する投与：抗体

パーキンソン病特異的エピトープに対する抗体をヒトパーキンソン病患者に投与する。

【0485】

患者をSOD凝集および疾患の進行の遅延または停止の指標に関してモニターする。特に、被験体の歩行、反射、および行動をモニターする。自己免疫発現も同様にモニターする。

10

【0486】

被験体を、免疫の結果である可能性がある疼痛および窮迫の徴候のような有害効果に関して定期的にモニターする。パーキンソン病特異的エピトープに対する抗体の投与は、パーキンソン病の進行を遅らせる。SOD1凝集の遅延もしくは停止または疾患進行の消失は治療活性抗体について起こる。

【0487】

実施例42

パーキンソン病に対するヒト化抗体の投与

20

パーキンソン病特異的エピトープに対するヒト化抗体を、ヒトパーキンソン病患者に投与する。ヒト化抗体は、CNSにおける局所濃度が1~10 µg/mlの範囲となる濃度で静脈内注入によって投与する。一つの療法において、製剤は一つのパーキンソン病特異的エピトープに対する抗体を含む。もう一つの療法において、製剤は、それぞれが異なるパーキンソン病特異的エピトープに対する、二つまたはそれより多いヒト化抗体を含む。一つの投与療法において、投与は3週間に1回である。他の療法において、投与は1週間に1回、1週間に2回、1週間に3回、または2週間に1回である。または、投与は、患者の生理状態および処置に対する患者の反応に応じて変化する。

【0488】

または、パーキンソン病特異的エピトープに対するヒト化抗体は、脳室内または鞘内注入によって、パーキンソン病患者のCNSに直接投与される。MedTronics (Minneapolis, MN, USA) は、本実施例において用いられる医学装置を提供する。最終濃度1~10 µg/mlは、最高速度1 ml/hで1日あたり5 mgもの多くのヒト化抗体を注入することによって得られる。一つの療法において、製剤は、1つのパーキンソン病特異的エピトープに対する抗体を含む。もう一つの療法において、製剤は、それぞれが異なるパーキンソン病特異的エピトープに対する、二つまたはそれより多いヒト化抗体を含む。

30

【0489】

パーキンソン病特異的エピトープに対するヒト化抗体を、鞘内注射によってパーキンソン病患者に投与する。注射容積による圧力の増加を回避するために、注射のために用いる同じ針を通して脳脊髄液の等量を採取する。被験体に、対応する全身用量の1%~10%の範囲の用量を投与する。被験体は、ヒト化抗体製剤の1回量を投与される。または、被験体はヒト化抗体製剤の複数用量を投与される。一つの療法において、製剤は、1つのパーキンソン病特異的エピトープに対する抗体を含む。もう一つの療法において、製剤は、それぞれが異なるパーキンソン病特異的エピトープに対する、二つまたはそれより多いヒト化抗体を含む。代わりの態様において、投与は1週間に1回、1週間に2回、1週間に3回、2週間に1回、3週間に1回、または1ヶ月に1回である。もう一つの療法において、用量は、被験体の生理状態および処置に対する被験体の反応に応じて変化する。

40

【0490】

患者をSOD凝集および疾患進行の遅延または停止の指標に関してモニターする。パーキンソン病特異的エピトープに対するヒト化抗体の投与は、患者におけるパーキンソン病の

50

進行を遅らせる。SOD1凝集の遅延もしくは停止または疾患進行の消失は、治療活性抗体の場合に起こる。

【0491】

実施例43

ALSマウスモデルG93AおよびG37Rの採血

創始半接合雄性G93AおよびG37R動物を同じバックグラウンド系統（C57BL/6）の野生型雌性マウスと交配する。雌性動物は6回より多く交配しない。ヘテロ接合G93A雄性動物は、3ヶ月齢で種畜として引退させ、ヘテロ接合G37Rマウスを6ヶ月齢で種畜として引退させた。

【0492】

半接合G93A（またはG37R）雄性マウス15匹およびC57BL/6雌性マウス30匹が15の交配トリオを形成した。雌性動物2匹を最初に共に収容して、交配相手の汚れた床に雌性動物を曝すことによって発情を誘発した（Whitten効果）。翌日、雌性動物を雄性動物のケージに入れた（雌性動物2匹／雄性動物1匹）。雌性動物を毎朝粘液栓に関してチェックした。

【0493】

子孫を3週齢で耳の打ち抜きによって同定し、打ち抜いた組織を遺伝子タイピングのために用いてトランスジーンのコピー数を決定した。耳の打ち抜きが遺伝子タイピングおよびトランスジーンのコピー数の試験にとって十分な材料を提供しない場合、尾の切り取りを行った。

【0494】

子孫が3週齢になると離乳が起こり、半接合マウスを実験処置群に無作為化した。離乳後、動物を4匹／ケージで収容した。

【0495】

類似の繁殖プログラムを、疾患表現型を発症する半接合動物の生存に関して適当に調節して、双方の系統について用いた（G93Aの生存～145日、G37Rの生存～335日）。

【0496】

G93Aヘテロ接合マウスは、約100日齢で後肢の優勢な虚弱を発症した。虚弱は後肢の完全麻痺点まで進行し、動物は食べることも飲むこともできなくなった（すなわち、餌と水に近づくことができない）。この点は145日周辺で観察された。この時点で、動物を安楽死させた。動物の体重が20%減少した場合、または動物が他の重度の罹患徴候を示した場合にも、動物を早期に安楽死させた。

【0497】

G37Rトランスジーンは、G93Aトランスジーンと類似の臨床徴候を引き起こしたが、虚弱の発生時日齢は約300日であり、その時点から虚弱は後肢麻痺まで進行した。エンドポイントはG93Aマウスについて同じであったが、G37R（系統29）トランスジェニックではエンドポイントは通常335日付近であった。

【0498】

飼育マウスの体重を毎週測定して、体重の15%またはそれより多くが失われた場合、マウスを安楽死させた。しかし、15%未満の体重喪失であっても、他の重篤な罹患徴候、すなわち逆毛、丸くなった外観、明らかな脱水等を伴う場合には、これらの動物に関する人道的なエンドポイントであると見なされた。

【0499】

実施例44

ALS伝搬モデルの開発

ALSにおいて、プリオン病の場合と同様に、ニューロンの死は、神経軸索を通して「広がり」、細胞間の病的プロセスの伝搬に関する病的機構が存在することを示唆している。無細胞系、インビトロでの細胞アッセイ、およびプリオン病における類似のモデルシステムに基づく動物において、SOD1ミスフォールディングの伝搬に関するモデルを開発する。これらのモデルは、免疫療法を試験するためにより「疾患に関連する」系を提供し、現在のモデルの起こりうる偽陰性および偽陽性転帰を回避するであろう。

10

20

30

40

50

【 0 5 0 0 】

ハイブリドーマ細胞株の生物学的寄託は、ブダペスト条約に従って行われ、International Depository Authority of Canada 1015 Arlington Street Winnipeg, Canada R3E 3R2から入手可能である。

【 0 5 0 1 】

本発明は、現在好ましい実施例であると思なされるものを参照して記述してきたが、本発明は開示の実施例に限定されないと理解される。逆に、本発明は、添付の特許請求の範囲の趣旨および範囲内に含まれる様々な改変および同等の組み合わせかたを含むと意図される。

【 0 5 0 2 】

10

全ての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれの個々の刊行物、特許、または特許出願が具体的および個々にその全内容物が参照により本明細書に組み入れられるのと同程度に、その全内容物が参照により本明細書に組み入れられる。

【 0 5 0 3 】

明細書において参照された参考文献の完全な引用

1. Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Julien JP. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*. 2006 Jan;9(1):108-18.
2. Turner BJ, Atkin JD, Farg MA, Zang da W, Rembach A, Lopes EC, Patch JD, Hill AF, Cheema SS Impaired extracellular secretion of mutant superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis *J Neurosci*. 2005 Jan 5;25(1):108-17).
3. Cashman NR, Griffin JK, Zou W-Q, Allele-selective recruitment and disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 2002. 10
4. Cashman NR and Caughey B. Prion diseases--close to effective therapy? *Nature Reviews in Drug Discovery*. 2004 Oct;3(10):874-84.
5. Rakhit R, Robertson J, Vande Velde C, Horne P, Ruth DM, Griffin J, Cleveland DW, Cashman NR, Chakrabartty A. An immunological epitope selective for pathological monomer/misfolded SOD1 in ALS. *Nature Medicine*, 2007 (in the press) 20
6. Paramithiotis E, Pinard M, Lawton T, LaBoissiere S, Leathers VL, Zou W-Q, Estey LA., Kondejewski LH, Francoeur GP, Papadopoulos M, Haghighat A, Spatz SJ, Tonelli Q, Ledebur HC, Chakrabartty A, Cashman NR. A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nature Medicine* 9:893-9, 2003.
7. Lehto, M. T., Ashman, D. A. & Cashman, N. R. Treatment of ScN2a cells with prion-specific YYR antibodies. *Proc. First Intl Conf. Network Excellence: Neuropion* (Paris, 2004).
8. Khare et al, PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics, 61:617-632 (2005). 30
9. Thompson, JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994, *Nucleic Acids Res*. 22(22): 4673-4680.
10. Henikoff S. and Henikoff J.G., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915–10919.
11. Needleman and Wunsch. *J. Mol. Biol.*, 1970, 48:443. 40
12. Smith and Waterman. *Adv. Appl. Math*. 1981, 2:482.

13. Carillo and Lipton *SIAM J. Applied Math.* 1988, 48:1073.
14. Computational Molecular Biology, Lesk, e.d. Oxford University Press, New York, 1988, *Biocomputing: Informatics and Genomics Projects*.
15. Devereux et al., *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12:387.
16. Altschul et al., *J. Molec. Biol.*, 1990: 215:403.
17. Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA, 2000. 10
18. Merrifield, *J. Am. Chem. Assoc.* 85:2149-2154 (1964).
19. Houbenweyl, *Methods of Organic Chemistry*, ed. E. Wansch, Vol. 15, pts. I and II, Thieme, Stuttgart (1987).
20. Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA 1990.
21. Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989). 20
22. Chang et al., *Nature* 275:615 (1978).
23. Nichols and Yanofsky, *Meth. in Enzymology* 101:155, 1983.
24. Russell et al., *Gene* 20: 231, 1982.
25. Bolivar et al., *Gene* 2:9S, 1977.
26. Messing, *Meth in Enzymology* 101:20-77, 1983. 30
27. Vieira and Messing, *Gene* 19:259-268 (1982).
28. Amann et al., *Gene* 69:301-315 (1988).
29. Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California, 60-89 (1990).
30. Baldari et al., *Embo J.* 6:229-234 (1987). 40
31. Kurjan and Herskowitz, *Cell* 30:933-943 (1982).
32. Schultz et al., *Gene* 54:113-123 (1987).
33. Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929 (1978).

34. Itoh et al., *J. Bacteriology* 153:163 (1983).
35. Cullen et al. *Bio/Technology* 5:369 (1987).
36. Seed, B., *Nature* 329:840 (1987).
37. Kaufman et al., *EMBO J.* 6:187-195 (1987).
38. Sinkar et al., *J. Biosci (Bangalore)* 11:47-58 (1987).
39. Zambryski et al., Genetic Engineering, Principles and Methods, Hollaender and Setlow (eds.), Vol. VI, pp. 253-278, Plenum Press, New York (1984).
40. Smith et al., *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165 (1983).
41. Lucklow, V.A., and Summers, M.D., *Virology* 170:31-39 (1989).
42. Kohler and Milstein *Nature* 256:495-497 (1975).
43. Kozbor et al., *Immunol. Today* 4:72 (1983).
44. Cole et al., *Methods Enzymol*, 121:140-67 (1986).
45. Huse et al., *Science* 246:1275 (1989).
46. Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989).
47. McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990).
48. Dobson CM. (2004) Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods.* 34(1):4-14. Review.
49. Prusiner SB. (2001) Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med.* 344:1516-26.
50. Selkoe DJ, Schenk D. (2003) Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43:545-84.
51. St George-Hyslop PH, Petit A. (2005) Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *C R Biol.* 328(2):119-30.
52. Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. (2003) Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci.* 6:345-51.
53. Mehta PD, Pirttila T, Mehta SP. (2000) Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 57:100-5.

54. Clark CM, Xie S, Chittams J et al. (2003) Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch Neurol.* 60:1696-702.
55. Green AJ. (2002) Cerebrospinal fluid brain-derived proteins in the diagnosis of Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 28:427-40.
56. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandever C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature.* 400(6740):173-7.
57. Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F, Orgogozo JM; AN1792(QS-21)-201 Study Team. (2005) Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology.* 64(9):1553-62.
58. Fox NC, Black RS, Gilman S, Rossor MN, Griffith SG, Jenkins L, Koller M; AN1792(QS-21)-201 Study Team. (2005) Effects of Abeta immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease. *Neurology.* 64(9):1563-72.
59. Olanow CW. (2004) The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease. *Annu Rev Med* 55:41-60.
60. Iwatsubo T. (2003) Aggregation of alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol* 250 Suppl 3:III11-4.
61. Eriksen JL, Dawson TM, Dickson DW, Petrucelli L. (2003) Caught in the act: alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease. *Neuron* 40:453-6.
62. McKeith I, Mintzer J, Aarsland D et al. (2004) Dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol* 3:19-28.
63. Masliah E, Rockenstein E, Adame A, Alford M, Crews L, Hashimoto M, Seubert P, Lee M, Goldstein J, Chilcote T, Games D, Schenk D. (2005) Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron.* 46(6):857-68.
64. Choi J, Rees HD, Weintraub ST, et al. (2005) Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J. Bio. Chem.*; 280(12): 11648-11655.

10

20

30

40

65. Janus, C. et al. (2000) *Nature* 408:979-982.
66. Janus, C. (2000) *Neurobiology of Aging* 21: 541-549.
67. Gass, P. et al. (1998) *Learn Mem.* 5:274-288.
68. Wehner, J. M. (1990) *Brain Research* 523: 181-187).
69. Masliah, E. et al. (2000) *Science* 287:1265-1269.
70. Masliah, E. et al. (2005) *Neuron* 46:857-868. 10
71. Kaye, R. et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486-9 (2003).
72. Deng, H. X. et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261, 1047-51 (1993).
73. Andersen PM. Genetics of sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Schler Other Motor Neuron Disord. Suppl*1:S37-41 (2001). 20
74. Trojanowski et al 2000 *Ann NY Acad Sci* 924:62-7.
75. Calne et al 1989; *Can J Neurol Sci* 16:547-50.
76. Shaw et al., 2002. *Cell Mol Bioll* 48:127-36.
77. Olivieri et al 2001. *J Neurochem* 76:224-33.
78. Shimohama et al 1999. *Rinsho Shinkeigaku* 39:4-6.
79. Keller et al 1998. *Rev Neurosci* 9:105-16. 30
80. Simonian et al 1996. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:83-106.
81. Imam et al 2001. *Ann NY Acad Sci* 939:366-80).
82. Lazoura, E and Apostolopoulos, V. Rational Peptide-based vaccine design for cancer immunotherapeutic applications *Curr Med Chem.* (2005) 12:629-39.
83. Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA. A model for b-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: Relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3270-3274 (1994). 40
84. Elam JS, Taylor AB, Strange R, Antonyuk S, Doucette PA, Rodriguez JA, Hasnain SS, Hayward LJ, Valentine JS, Yeates TO, Hart PJ. *Nat Struct Biol* (2003) 10:461-7.
85. Kolaskar, AS and Tongaonkar PC, *FEBS Lett.* (1990) 276:172-4 50

【図面の簡単な説明】

【 0 5 0 4 】

本発明の態様を以下の図面に関連して記述する：

【図 1】 DSE1に対して優先的にDSE1aを認識する抗DSE1a抗体を示すグラフである。

【図 2】 抗DSE2抗体が酸化SOD1タンパク質を認識することを示すELISAデータを図示するグラフである。

【図 3 A】 Hopp and Woods法を用いたSOD1の抗原性プロットである。

【図 3 B】 Kolaskar and Tongaonkar法を用いたSOD1の抗原性プロットである。

【図 4 A】 DSE2が変性ヒトおよびマウスSOD1を認識することを示すイムノプロットである。

【図 4 B】 抗DSE2抗体が天然のSOD1を免疫沈降しないことを証明する、正常なヒトおよびマウス脳から免疫沈降したSOD1のイムノプロットである。

【図 4 C】 野生型および変異体ヒトSOD1を過剰発現するトランスジェニックマウスからの免疫沈降SOD1のイムノプロットである。

【図 5 A】 DSE2に対する抗体によって染色した52歳女性の正常な海馬のヒト脳切片である。

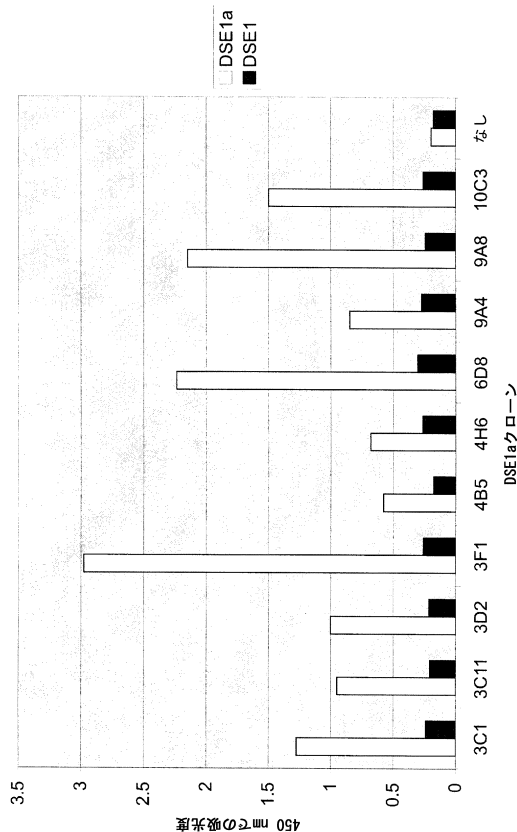
【図 5 B】 抗DSE2モノクローナル抗体によってプローブした、後期アルツハイマー病を有する78歳女性からのヒト海馬切片の合成物である。

【図 6】 (A~F) は、抗DSE2モノクローナル抗体によってプローブした痴呆を有する79歳女性の脳切片の合成物である。

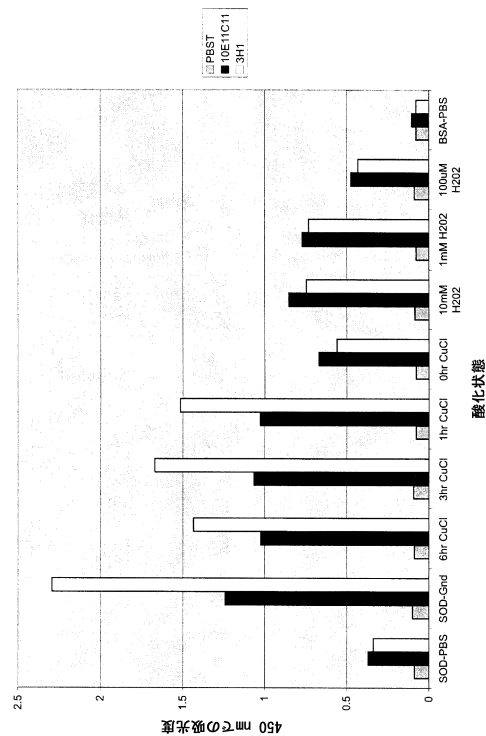
10

20

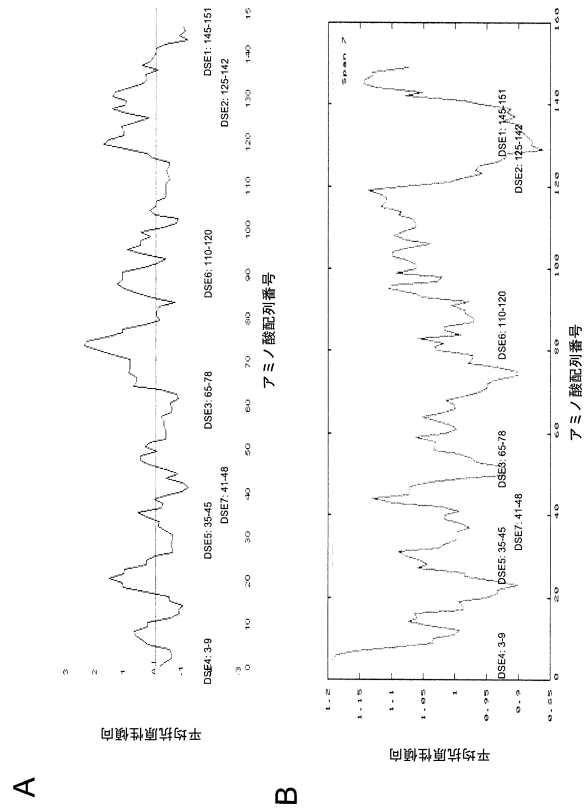
【図 1】



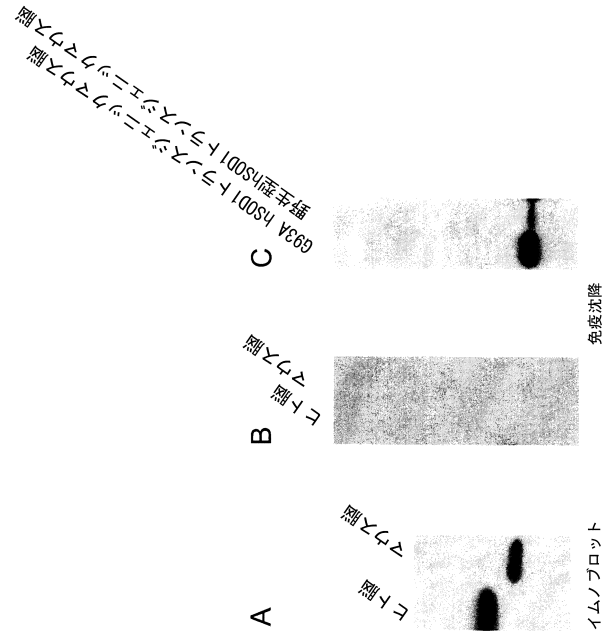
【図 2】



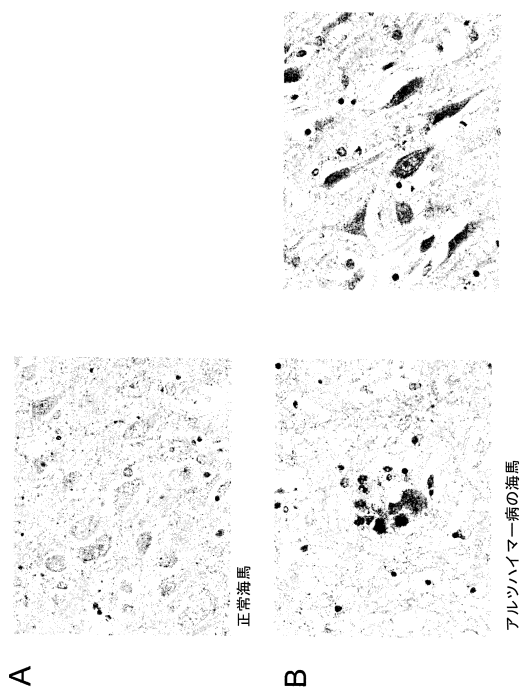
【図 3】



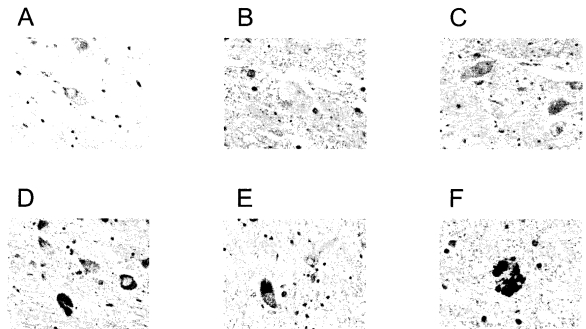
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

0005823663000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
C 0 7 K 7/06	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	
C 0 7 K 7/08	(2006.01)	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 16/18	(2006.01)	C 0 7 K 7/08	
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 2
G 0 1 N 33/573	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	Z N A
		G 0 1 N 33/573	A

- (31)優先権主張番号 60/798,728
 (32)優先日 平成18年5月9日(2006.5.9)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/798,727
 (32)優先日 平成18年5月9日(2006.5.9)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 11/565,967
 (32)優先日 平成18年12月1日(2006.12.1)
 (33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 IDAC 220207-01
 微生物の受託番号 IDAC 220207-02
 微生物の受託番号 IDAC 280207-01

- (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
 (74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一
 (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
 (72)発明者 カシマン ニール アール .
 カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ウェスト キング エドワード アベ
 ニュー 3 7 9 3
 (72)発明者 シャクラパーティー アビジット
 カナダ国 オンタリオ州 ボーガン ポイント オー'ウッズ ドライブ 7 7
 (72)発明者 ラキート リシ
 カナダ国 オンタリオ州 トロント デュボン ストリート 4 3 5
 (72)発明者 オスターマン ヨアキム バーンハード
 カナダ国 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ウェスタン パークウェイ 2 3 3 8
 アpartment 2 0 3

合議体

審判長 大宅 郁治

審判官 内藤 伸一

審判官 川口 裕美子

- (56)参考文献 米国特許第5849290(US,A)
国際公開第2005/019828(WO,A1)
特開2013-091648(JP,A)
Brain, 2004年, Vol. 127, p. 73-88
Science, 1993年, Vol. 261, p. 1047-1051

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N15/09-15/90
C07K16/40
A61K39/00
A61K39/395
A61P25/28
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
CA/REGISTRY(STN)
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)
JST7580(JDreamII)
UniProt/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq