

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 523402

(P2003 - 523402A)

(43)公表日 平成15年8月5日(2003.8.5)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
A 6 1 K 39/00	ZNA	A 6 1 K 39/00	ZNA H 4 B 0 2 4
35/12		35/12	4 B 0 6 4
35/66		35/66	4 B 0 6 5
35/76		35/76	4 C 0 8 4
38/00		39/39	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全108数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 561348(P2001 - 561348)

(86)(22)出願日 平成13年2月19日(2001.2.19)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月20日(2002.8.20)

(86)国際出願番号 PCT/DK01/00113

(87)国際公開番号 W001/062284

(87)国際公開日 平成13年8月30日(2001.8.30)

(31)優先権主張番号 PA 2000 00265

(32)優先日 平成12年2月21日(2000.2.21)

(33)優先権主張国 デンマーク(DK)

(31)優先権主張番号 60/186,295

(32)優先日 平成12年3月1日(2000.3.1)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ファーメクサ エイ / エス
デンマーク、ディーケー - 2970 ホーショ
ルム、コグレ アレ 6

(72)発明者 パーク, ベーター
デンマーク、ディーケー - 2970 ホーショ
ルム、コグレ アレ 6、ファーメクサ エ
イ / エス

(72)発明者 ジェンセン, マーティン, ローランド
デンマーク、ディーケー - 2970 ホーショ
ルム、コグレ アレ 6、ファーメクサ エ
イ / エス

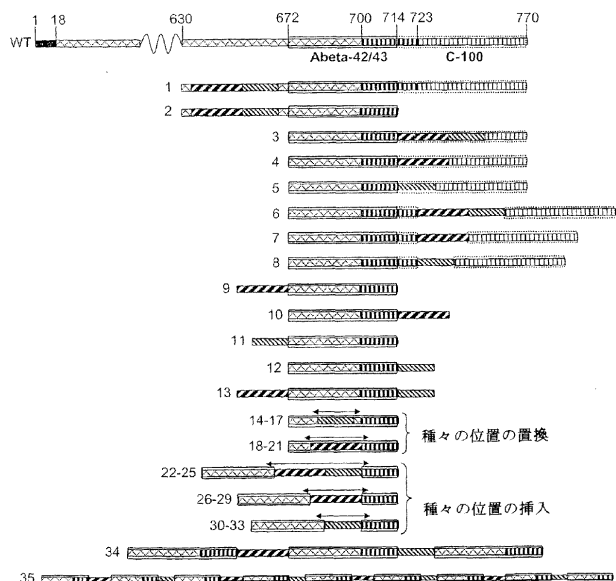
(74)代理人 弁理士 野河 信太郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アミロイドの新規なダウン - レギュレート方法

(57)【要約】

アミロイドの沈着によって特徴付けられる疾患に対する新規な方法を開示する。方法は、一般にβアミロイド(Aβ)のようなアミロイド産生タンパク質(アミロイド形成に寄与するタンパク質)に対する免疫化に依存している。免疫化は、オートロガスアミロイド産生ポリペプチドに対し抗体産生を誘発し得る、オートロガスアミロイド産生ポリペプチドの類似体の投与により行うことが好ましい。免疫原として特に好ましいのは、多数のAβのB-細胞エпитープを実質的に保持しながら、1つ又は数個の外来の免疫優勢かつ乱交雑T-細胞エпитープの導入により修飾された、オートロガスAβである。アミロイド産生ポリペプチドに対する核酸ワクチン注射及び生ワクチンを用いるワクチン注射ならびにワクチン注射に有用な方法と手段も開示される。そのような方法と手段には、アミロイド産生タンパク質の有用な免疫原性類似体の同定方法、類似体及び医薬製剤の製造方法、ならびに核酸フラグメント、ベクター、形質転換細胞、ポリペプチド及び医薬製剤が含まれる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 - アミロイド産生ポリペプチド又はそのサブ配列での動物の免疫化でアミロイド産生ポリペプチドに対する抗体産生を誘発するように処方された、少なくとも1つのアミロイド産生ポリペプチド又はそのサブ配列、及び/又は

- アミロイド産生ポリペプチドのアミノ酸配列に少なくとも1つの修飾が導入されているアミロイド産生ポリペプチドの少なくとも1つの類似体であって、この類似体での動物の免疫化により、結果としてアミロイド産生ポリペプチドに対する抗体産生が誘発される、少なくとも1つの類似体

の免疫学的に有効な量を、ヒトを含む動物の免疫系に提示することからなる、動物におけるアミロイドタンパク質をインビボでダウン-レギュレートする方法。

【請求項2】 アミロイド産生ポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも1つの修飾を有する類似体を提示する請求項1による方法。

【請求項3】 修飾の結果として、アミロイド産生ポリペプチドのB-細胞エпитープの実質的なフラクションが保存され、

- 少なくとも1つの外来Tヘルパーリンパ球エпитープ(T_H エпитープ)が導入され、及び/又は

- 抗原提示細胞(APC)又はB-リンパ球に修飾分子を標的化する少なくとも1つの第一部分が導入され、及び/又は

- 免疫系を刺激する少なくとも1つの第二部分が導入され、及び/又は

- 免疫系への修飾アミロイド産生ポリペプチドの提示を最適化する少なくとも1つの第三部分が導入される請求項2による方法。

【請求項4】 修飾が、外来 T_H エпитープ及び/又は第一及び/又は第二及び/又は第三の部分のアミロイド産生ポリペプチドもしくはそのサブ配列中の適当な化学基への共有又は非共有的な結合による側基としての導入を含む請求項3による方法。

【請求項5】 修飾が、アミノ酸の置換及び/又は欠失及び/又は挿入及び/又は付加を含む請求項3又は4による方法。

【請求項6】 修飾により、融合ポリペプチドが生じる請求項5による方法

。

【請求項7】 アミノ酸の置換及び/又は欠失及び/又は挿入及び/又は付加の導入により、アミロイド産生ポリペプチドの全体的な三次構造が実質的に保存される請求項5又は6による方法。

【請求項8】 修飾が、少なくとも1つのアミロイド産生ポリペプチドのB-細胞エピトープの複製及び/又はハプテンの導入を含む請求項2～7のいずれか1つによる方法。

【請求項9】 外来T-細胞エピトープが動物において免疫優勢である請求項3～8のいずれか1つによる方法。

【請求項10】 外来T-細胞エピトープが乱交雑であり、例えば天然の乱交雑T-細胞エピトープ及び人為的なMHC-II結合ペプチド配列から選択される外来T-細胞エピトープである請求項3～9のいずれか1つによる方法。

【請求項11】 天然のT-細胞エピトープが、P2又はP30のような破傷風トキシノイドエピトープ、ジフテリアトキシノイドエピトープ、インフルエンザウイルス血球凝集素エピトープ及びピー・ファルシパルムCSエピトープから選択される請求項10による方法。

【請求項12】 第一部分が、B-リンパ球特異的表面抗原又はAPC特異的表面抗原に実質的に特異的な結合パートナー、例えばB-リンパ球もしくはAPCに受容体があるハプテン又は炭水化物である請求項3～11のいずれか1つによる方法。

【請求項13】 第二部分が、サイトカイン、例えばインターフェロン γ (IFN- γ) もしくはその有効部分、Flt3Lもしくはその有効部分、インターロイキン1 (IL-1) もしくはその有効部分、インターロイキン2 (IL-2) もしくはその有効部分、インターロイキン4 (IL-4) もしくはその有効部分、インターロイキン6 (IL-6) もしくはその有効部分、インターロイキン12 (IL-12) もしくはその有効部分、インターロイキン13 (IL-13) もしくはその有効部分、インターロイキン15 (IL-15) もしくはその有効部分と顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) もしくはその有効部分；ホルモン；及び熱ショックタンパク質、例え

ばHSP70もしくはその有効部分、HSP90もしくはその有効部分、HSC70もしくはその有効部分、GRP94もしくはその有効部分とカルレチクリン(CRT)もしくはその有効部分から選択される請求項3～12のいずれか1つによる方法。

【請求項14】 第三部分が、パルミトイル基、ミリスチル基、ファルネシル基、ゲラニル-ゲラニル基、GPI-アンカー及びN-アシルグリセリド基のような脂質性であるか、又は第三部分が多糖類のようなポリヒドロキシポリマーである請求項3～13のいずれか1つによる方法。

【請求項15】 多糖類が、アミロイド産生ポリペプチドと外来T-細胞エпитープが個別に結合している担体骨格として役立つ請求項14による方法。

【請求項16】 アミロイド産生ポリペプチドと外来T細胞エпитープがアミド結合を介して多糖類に結合している請求項15による方法。

【請求項17】 アミロイド産生ポリペプチド又はそのサブ配列が、アミロイド産生ポリペプチドに対する前駆体ポリペプチドの細胞結合型に存在するときに、細胞外相に曝されないB-細胞エпитープを保存するように修飾されている前記請求項のいずれかひとつによる方法。

【請求項18】 アミロイド産生ポリペプチドが、前駆体ポリペプチドの細胞結合型に存在するときに、細胞外相に曝されるB-細胞エпитープを少なくとも1つ欠くように修飾されている請求項17による方法。

【請求項19】 類似体に外来T_Hエпитープを生じる、長さが同じか異なるアミノ酸配列で、アミロイド産生ポリペプチド内の少なくともひとつのアミノ酸配列を置換することを含む前記請求項のいずれかによる方法。

【請求項20】 アミロイド産生ポリペプチドが、 β -アミロイド(A β)、アミロイド前駆体タンパク質(APP)、ApoE4、プレセニリン、プリオンポリペプチド、 α 1-抗キモトリプシン(ACT)、 α 2-マクログロブリン、ABAD (A β -ペプチド結合アルコール脱水素酵素)、APLP1 及び -2 (アミロイド前駆体様タンパク質1 及び-2)、AMY117、Bax、Bcl-2、ブレオマイシンヒドロラーゼ、BRI/ABRI、クロモグラニンA、クルステリン/apoJ、CRF (コルチコトロピン放出因子)結合タンパク質、EDTF (内皮由来毒性因子)、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ヒトコラプシン反応媒介タンパク質-2、ハンチントン、ICAM-1、IL-6、リソソーム-関連抗原C

D68、P21 ras、PLC-デルタ1 (ホスホリパーゼCイソ酵素デルタ1)、血清アミロイドP成分(SAP)、シナプトフィシン、シヌクライン(α -シヌクラインつまりNACP)、TGF- β 1 (トランスフォーミング成長因子 β 1)、Ig軽鎖のVドメインの全長又はフラグメント、アミロイドAタンパク質の76-残基N-末端フラグメント、トランスレチン変異体の全長又はフラグメント、ApoA1 変異体のN-末端フラグメント、リゾチーム変異体全長、鳥のアミロイドポリペプチドの37-残基フラグメント、野生型インシュリン全長、プリオンタンパク質の全長又はフラグメント、カルシトニンのフラグメント、トランスレチンの全長又はフラグメント、野生型 β -2マイクログロブリン全長、心房ナトリウム排泄増加因子、シスタチン変異体の110-残基フラグメント、ゲルソリン変異体の71-残基フラグメント及びフィブリノーゲン α -鎖変異体フラグメントからなる群から選択される、前記請求項のいずれかによる方法。

【請求項21】 アミロイド産生ポリペプチドが(A β)である前記請求項のいずれかによる方法。

【請求項22】 外来T_Hエпитープを含むアミノ酸配列が、図1にP2及びP30エпитープを概略的に示すアミロイド産生ポリペプチドに導入されている請求項21による方法。

【請求項23】 アミロイド産生ポリペプチドが、SEQ ID NO:2の700～714アミノ酸に相当するアミノ酸配列、例えばSEQ ID NO:2の672～714アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含む、請求項22による方法。

【請求項24】 アミロイド産生ポリペプチドが、類似体に外来T_Hエпитープを生じるアミノ酸配列を導入するSEQ ID NO:2の672～714アミノ酸に相当するアミノ酸からなるか、又はアミロイド産生ポリペプチドが、少なくともひとつのアミノ酸配列が、外来T_Hエпитープを生じる、長さが同じか異なるアミノ酸配列で置換される、SEQ ID NO:2の672～714アミノ酸に相当するアミノ酸からなる請求項23による方法。

【請求項25】 免疫系への提示が、抗原決定基の複数のコピーを提示し得る担体分子に共有的又は非共有的に結合しているアミロイド産生ポリペプチド、そのサブ配列又は修飾アミロイド産生ポリペプチドの少なくとも2つのコピーを

有することによって行われる、前記請求項のいずれかひとつによる方法。

【請求項26】 アミロイド産生ポリペプチド、そのサブ配列又は修飾アミロイド産生ポリペプチドが、自己抗原に対する自己耐性の破壊を促進するアジュバントを用いて製剤化される前記請求項のいずれかによる方法。

【請求項27】 有効量のアミロイド産生ポリペプチド又はアミロイド産生ポリペプチド類似体が、非経口経路、例えば表皮内、表皮下、真皮内、真皮下及び筋肉内経路；腹腔内経路；経口経路；口腔経路；舌下経路；硬膜外経路；脊髄経路；肛門経路；及び頭蓋内経路から選択される経路を介して動物に投与される前記請求項のいずれか1つによる方法。

【請求項28】 アミロイド産生ポリペプチド、そのサブ配列又はその類似体の有効量が、0.5～2,000 µgである請求項27による方法。

【請求項29】 アミロイド産生ポリペプチド又は類似体が、仮想リンパ節(VLN)装置に含まれる請求項27又は28による方法。

【請求項30】 免疫系への修飾アミロイド産生ポリペプチドの提示が、動物細胞に修飾アミロイド産生ポリペプチドをエンコードする核酸を導入し、次いで導入された核酸について細胞によるインビボ発現をさせることで行われる請求項1～21のいずれか1つによる方法。

【請求項31】 導入された核酸が、裸のDNA、荷電又は非荷電脂質で製剤化したDNA、リポソームで製剤化したDNA、ウイルスベクターに含めたDNA、トランスフェクション促進タンパク質又はポリペプチドで製剤化したDNA、標的タンパク質又はポリペプチドで製剤化したDNA、カルシウム沈殿剤で製剤化したDNA、不活性担体分子に結合したDNA、キチン又はキトサンでカプセル化したDNA、ならびにアジュバントで製剤化したDNAから選択される請求項30による方法。

【請求項32】 核酸が、VLN装置に含まれる請求項31による方法。

【請求項33】 1年に少なくとも1回の投与/導入、例えば少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも6回及び少なくとも12回の投与/導入が含まれる請求項22～32のいずれか1つによる方法。

【請求項34】 アミロイドの全量を低下するか、又はアミロイド形成速度を臨床上有意に低下させる程度に、請求項1～33のいずれかひとつによる方法

にしたがってアミロイドをダウン-レギュレーションすることからなる、アルツハイマー疾患又はアミロイドの沈着によって特徴付けられる他の疾患及び症状の治療及び/又は予防及び/又は緩和方法。

【請求項35】 類似体での動物の免疫化によりアミロイド産生ポリペプチドに対する抗体産生を誘発させる修飾が導入された動物のアミロイド産生ポリペプチドから得られるアミロイド産生ポリペプチド類似体。

【請求項36】 修飾が、請求項1～19及び22～24のいずれかひとつに定義される請求項35による類似体。

【請求項37】 - アミロイド産生ポリペプチドに対する動物の自己耐性を破壊するように、免疫学的に許容されるアジュバントとともに処方され、さらに医薬的ならびに免疫学的に許容される担体及び/又は賦形剤を含む、動物において免疫学的に有効な量のアミロイド産生ポリペプチドのオートロガス、又は
- 請求項35又は36による免疫学的に有効な量の類似体からなり、さらに医薬的ならびに免疫学的に許容される担体及び/又は賦形剤、任意にアジュバントを含む免疫原性組成物。

【請求項38】 請求項35又は36による類似体をエンコードする核酸フラグメント。

【請求項39】 自律複製しうるような、請求項38による核酸フラグメントを有するベクター。

【請求項40】 プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ染色体及びウイルスからなる群から選択される請求項39によるベクター。

【請求項41】 5'→3'方向及び操作可能な連鎖において、請求項38による核酸フラグメントの発現を駆動するプロモーター、ポリペプチドフラグメントの分泌又は膜への組み込みを可能にするリーダーペプチドをエンコードする任意の核酸配列、請求項38による核酸フラグメント及び任意の転写終結区からなる、請求項39又は40によるベクター。

【請求項42】 宿主細胞に導入する場合に、宿主細胞ゲノムに組みこむことができるか、又は組み込むことができない請求項39～41のいずれか1つによるベクター。

【請求項43】 プロモーターが、真核細胞及び/又は原核細胞での発現を駆動する請求項41又は42によるベクター。

【請求項44】 請求項38による核酸フラグメントを複製しうる形質転換細胞のような、請求項39～43のいずれか1つのベクターを有する形質転換細胞。

【請求項45】 微生物が、細菌、酵母、原生動物、又は真菌、S₂もしくはSF細胞のような昆虫細胞、植物細胞及び哺乳動物細胞から選択される多細胞生物由来細胞から選択される請求項44による形質転換細胞。

【請求項46】 請求項35又は36による類似体を分泌するかその表面で担持する形質転換細胞のような、請求項38による核酸フラグメントを発現する請求項44又は45による形質転換細胞。

【請求項47】 免疫系への提示が、アミロイド産生ポリペプチド又は類似体をエンコードして発現する核酸フラグメントを有する非病原性微生物又はウイルスを投与して行われる請求項1～19及び22～24のいずれか1つによる方法。

【請求項48】 - 請求項38による核酸フラグメント又は請求項39～43のいずれか1つによるベクター、及び
- 医薬的及び免疫学的に受容な担体及び/又はビヒクル及び/又はアジュバントからなる、アミロイド産生ポリペプチドに対する抗体産生を誘発する組成物。

【請求項49】 請求項39～43のいずれか1つによるベクターを有し、請求項38による核酸フラグメントを発現し、請求項35又は36による類似体を任意に分泌するか、その表面に担持する安定な細胞系。

【請求項50】 請求項38による核酸フラグメント又は請求項39～43のいずれか1つによるベクターで宿主細胞を形質転換することからなる、請求項44～46のいずれか1つによる細胞の調製方法。

【請求項51】 - 動物種のアミロイド産生ポリペプチドのアミノ酸配列にアミノ酸が付加され、挿入され、それから欠失されているか、又は置換されている、相互に異なる修飾アミロイド産生ポリペプチドのセットをペプチド合成又は遺伝子工学的な技術により調製し、それにより、動物種に外来のT-細胞エピト

ープからなるセットでアミノ酸配列を生じるか、又は相互に異なる修飾アミロイド産生ポリペプチドのセットをエンコードする核酸フラグメントのセットを調製し、

- 非修飾アミロイド産生ポリペプチドに対する動物種による抗体産生を誘発する能力について修飾アミロイド産生ポリペプチド又は核酸フラグメントのセットのメンバーを試験し、かつ

- 上記の種における非修飾アミロイド産生ポリペプチドに対する抗体産生を有意に誘発する修飾アミロイド産生ポリペプチドのセットのメンバーを同定し、任意に単離するか、又は動物種における非修飾アミロイド産生ポリペプチドに対する抗体産生を有意に誘発する核酸フラグメントのセットのメンバーでエンコードされるポリペプチド発現産物を同定に、任意に単離する

ことからなる、非修飾アミロイド産生ポリペプチドが自己タンパク質の動物種で非修飾アミロイド産生ポリペプチドに対する抗体を誘発し得る修飾アミロイド産生ポリペプチドの同定方法。

【請求項52】 - 動物種のアミロイド産生ポリペプチドのアミノ酸配列にアミノ酸が付加され、挿入され、それから欠失されているか、又は置換されている、相互に異なる修飾アミロイド産生ポリペプチドのセットをペプチド合成又は遺伝子工学的な技術により調製し、それにより、動物に外来のT-細胞エピートープからなるセットでアミノ酸配列を生じ、

- 非修飾アミロイド産生ポリペプチドに対する動物種による抗体産生を誘発する能力についてセットのメンバーを試験し、かつ

- アミロイド産生ポリペプチドと反応性の動物種において抗体の産生を有意に誘発するセットのメンバーを、医薬的及び免疫学的に許容される担体及び/又は賦形剤と、任意に少なくともひとつの医薬的及び免疫学的に許容されるアジュバントと組合わせて混合する

ことからなる、非修飾アミロイド産生ポリペプチドが自己タンパク質の動物種で非修飾アミロイド産生ポリペプチドに対する抗体を誘発し得る少なくともひとつの修飾アミロイド産生ポリペプチドからなる、免疫原性組成物の製造方法。

【請求項53】 セットのメンバーの調製が、各配列が請求項38による核

酸配列である相互に異なる核酸配列の調製、適当な発現ベクターへの核酸配列の挿入、ベクターでの適当な宿主細胞又は宿主動物の形質転換と核酸配列の発現、任意にその後の発現生成物の単離からなる請求項51又は52による方法。

【請求項54】 PCRのような分子増幅技術によって、又は核酸合成によって、核酸配列及び/又はベクターの調整が行われる請求項53による方法。

【請求項55】 動物におけるアミロイドをダウン-レギュレートするためのアジュバントからなる免疫原性組成物の調製のためのアミロイド産生ポリペプチド又はそのサブ配列の使用。

【請求項56】 アルツハイマー疾患又はアミロイドの沈着によって特徴付けられる他の症状の治療、予防又は緩和のための、アジュバントを含む疫原性組成物を製造するためのアミロイド産生ポリペプチド又はそのサブ配列の使用。

【請求項57】 動物でアミロイドをダウン-レギュレートするための、アジュバントを任意に含む免疫原性組成物を製造するための、アミロイド産生ポリペプチドの類似体の使用。

【請求項58】 アルツハイマー疾患又はアミロイドの沈着によって特徴付けられる他の症状の治療、予防又は緩和のための、アジュバントを任意に含む疫原性組成物を製造するためのアミロイド産生ポリペプチドの類似体の使用。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

この発明は、アルツハイマー病(AD)、及びアミロイドの沈着によって特徴付けられる、例えば中枢神経系(CNS)でのアミロイドの沈着によって特徴付けられる、他の疾患の治療ならびに予防における改善に関する。より具体的には、この発明は、アミロイドの沈着に関わる病状の疾患に罹患しているか、又は罹患する危険性がある被験者における関連タンパク質又はその成分に対する抗体の産生を可能にすることによる、アミロイドの(望ましくない)沈着のダウン-レギュレート法を提供する。また、この発明は、この方法に有用なポリペプチドの産生方法ならびに修飾ポリペプチドそれ自体を提供する。また、修飾ポリペプチドをエンコードする核酸フラグメントならびにこれらの核酸フラグメントを導入したベクター、及びそれで形質転換した宿主細胞ならびに細胞系が、本発明に包含される。また、この発明は、本発明の方法で有用な沈着ポリペプチドの類似体の同定方法ならびに修飾ポリペプチドからなるか、もしくは修飾ポリペプチドをエンコードする核酸からなる組成物についての方法を提供する。

【0002】**発明の背景**

アミロイド症は、不溶性タンパク質原線維の細胞外沈着で、組織の損傷と疾患をもたらす(Pepys, 1996; Tanら, 1995; Kelly, 1996)。原線維は、通常可溶性のタンパク質及びペプチドが異常な方法で自己会合する際に生じる(Kelly, 1997)。

アミロイドは、全身性アミロイド症、AD、成人発症型糖尿病、パーキンソン病、ハンチントン病、前頭側頭骨痴呆及びプリオン関連伝染性海綿状脳症(ヒトでのクールー及びクロイツフェルト-ヤコブ病ならびにヒツジや畜牛それぞれにおけるスクレイピー及びBSE)を含む深刻な疾患に関連しており、例えばアルツハイマーでのアミロイドのプラーク形成は、ヒトの疾患の進行に密接に関わっていると考えられる。動物モデルにおいて、 β -アミロイドタンパク質のような沈着が認められるタンパク質の過剰発現、又は修飾形態の発現は、種々の疾患症状、例

えばアルツハイマー様症状を誘発することが明らかにされている。アミロイドの沈着に特定の治療法はなく、これらの疾患は通常死に至る。

【0003】

アミロイドの原線維のサブユニットは、野生型、変異体又は切頭(truncated)タンパク質であってもよく、同様の原線維は、オリゴペプチド及び変性タンパク質からインビトロで形成することができる(Bradburyら, 1960; Filshieら, 1964; Burke & Rougvie, 1972)。原線維のポリペプチド成分の性質は、アミロイド症の特徴を明らかにしている。アミロイドタンパク質の大きさ、天然の構造と機能に大きな違いがあるにもかかわらず、全てのアミロイドの原線維は、不確定な長さで、分枝しておらず、70~120 の直径であり、コンゴレッドで染色する特徴を示す(Pepys, 1996)。それらは、ポリペプチド鎖が β -シートに組織化されている架橋- β 構造の特性を示す(Pauling & Corey, 1951)。アミロイドタンパク質は極めて多様な前駆体構造を有するが、それらは全て、おそらくは同様の経路に沿って、 β -シートヘリックスプロトフィラメントの構築阻害であるミスフォールド形態への構造転化を受けることができる。

【0004】

この特徴的な線維パターンは、 β -小繊維(fibrillose)(Glenner, 1980a,b)と称されるアミロイド症をもたらす、ADの原線維タンパク質は、その二次構造が知られる前に β -タンパク質と命名された(Glenner & Wong, 1984)。特徴的な架橋- β の回折パターンは、原線維の外観及び染色特性とともに、現在アミロイドについて許容される診断上の特徴であり、原線維が、かなり異なるタンパク質前駆体から形成されるが、その前駆体タンパク質の性質に関係なく、構造上の類似性のある程度共有し、構造的なスーパーファミリーからなることを示唆している(Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CCFJ Mol Biol 1997 Oct 31; 273(3):729-739)。

最も広まり、周知であり、中枢神経系でのアミロイドの沈着が疾患の進行に中心的な役割を果たしていることが示唆されている疾患のひとつは、ADである。

【0005】

AD

アルツハイマー病(AD)は不可逆的な進行性の脳障害で、徐々に発症し、記憶喪失、挙動ならびに人格の変化、及び精神能力の低下をもたらす。これらの損失は、脳細胞の死及び細胞間の接合部の崩壊に関連している。この症状の進行は、低下速度にしたがい、人によって異なる。平均して、AD患者は、症状は20年まで続くことができるが、診断されてから8～10年の間生存する。

ADは、初期の緩やかな健忘症から、深刻な精神機能の喪失まで、徐々に進行する。この喪失は、痴呆として知られる。大部分のADの人では、症状は最初に60歳以後で現れるが、より早く徴候が現れても珍しくはない。最も初期の症状には、しばしば、最近の記憶、誤った点の判断力の喪失及び人格の変化が含まれる。しばしば、ADの初期段階にある人は、明らかに考えなくなり、親しい人々の名前や一般的な事柄を忘れる。障害の後半には、簡単な課題であっても、その方法を忘れることがある。ついには、ADの人は論究能力を全て失い、毎日のケアを他の人に依存することになる。最後に、疾患はかなり衰弱化させるので、患者は寝たきりになり、他の病気と感染症を発症する可能性がある。もっとも一般的には、ADの人は、肺炎によって死亡する。

【0006】

ADを発症する危険性は年齢とともに高まるが、ADと痴呆症は、正常な加齢の一部ではない。ADと他の痴呆性疾患は、脳に影響を及ぼす傷害によって起こされる。正常な加齢では、脳の神経細胞は大量には損失されない。対照的に、ADは3つの主要な過程:神経細胞の伝達、代謝及び修復を崩壊させる。この崩壊は、最終的には多くの神経細胞に機能の停止を引起し、他の神経細胞との連結を失わせ、死亡させる。

最初に、ADは、記憶を制御する脳の部分、特に海馬及び関連構造のニューロンを破壊する。海馬の神経細胞が適当に機能を停止すると、短期の記憶が喪失され、しばしば簡単でなじみのある課題を行う人の能力が低下し始める。ADは、大脳皮質、特に言語及び論究を司る領域をも攻撃する。ついに、脳の多くの他の領域が巻き込まれ、全てのこれらの脳の領域が衰退(萎縮)し、AD患者が寝たきりで、失禁しがちで、全く無力になり、外の世界に対する感受性が鈍くなる(出典: National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999)。

【0007】

ADの影響

ADは、65歳以降の人の痴呆の最も一般的な原因である。それは、全体として個人、家族、ヘルスケアシステム及び社会に対する影響が莫大であるために、主要な健康問題となっている。科学者は、この疾患に現在罹患している人は400万人までと見積もっており、罹患率は65歳を超えると5歳ごとに2倍になる。また、この数は加齢につれて増すが、約360,000件の新たな症例(発症率)が毎年生じるものと見積もられている(Brookmeyerら, 1998)。

ADは、社会に重い経済的責務を課す。合衆国での最近の研究は、ひとりのAD患者のケアにかかる一年の費用は、軽度のAD患者に対し18,408ドル、中程度のAD患者に対し30,096ドル及び深刻なAD患者に対し36,132ドルと判断した。米国でのAD患者のケアにかかる一年の国家費用は、500億ドルをわずかに越えるものと見積もられている(Leonら, 1998)。

【0008】

約400万人のアメリカ人が85歳以上であり、大部分の先進国では、この年齢群が人口の最も急激に増えた区分のひとつである。この群は、米国で2030年までにほぼ850万に達するものと推断される。人口の動向を研究している専門家のなかには、その数がさらに増加すると示唆する者もいる。人が長く生存すればするほど、ADを含む、加齢の疾患で影響を受ける人の数は増え続ける。例えば、85歳以上の全ての人のうちほぼ半数が、何らかの形態の痴呆を有していることを示す研究もある(National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999)。

【0009】

ADの主要な特徴

脳における2つの異常な構造：アミロイドプラーク及び神経細線維もつれ(NFT)は、ADの顕著な特徴である。プラークは、脳のニューロンの外部及び周囲の、密集し、大部分が不溶性のタンパク質及び細胞物質の沈着物である。もつれは、ニューロン内部を構築する不溶性の撚り線維である。

2種のAD:ある遺伝パターン伝にしたがう家族性AD (FAD)、及び明確な遺伝パタ

ーンが認められない散発性ADが存在する。発症年齢が違っているために、ADは、さらにより早期の発症(65歳より若い人で発症)又は後期の発症(65歳以上の人での発症)として記載される。早期-発症ADは稀であり(症例の約10%)、一般に30～60歳の人に影響を及ぼす。幾つかの形態の早期-発症ADは遺伝し、家族に伝わる。また、早期-発症ADは、より一般的な後期-発症形態よりもしばしば早く進行する。

【0010】

これまでに知られているFADは全て早期-発症性で、FAD症例の50%ほどが、3つの異なる染色体に局在する3つの遺伝子の欠損によって引き起こされることが現在知られている。これらは、第21染色体のAPP遺伝子における突然変異;プレセニリン(presenilin) 1と称される、第14染色体の遺伝子における突然変異;及びプレセニリン2と称される、第1染色体の遺伝子における突然変異である。いまだ立証はされていないが、これらの突然変異は、より一般的な散発性又は非家族性形態の後期-発症ADで主要な役割を果たしている(National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999)。

【0011】

アミロイドプラーク

ADでは、アミロイドプラークは、記憶及び他の認識機能に用いられる脳の領域に最初に生じる。それらは、ニューロンの一部及び小神経膠細胞ならびに星細胞のような非神経細胞と混ざり合った、大部分が不溶性の β -アミロイド(以降、 $A\beta$ と示す)-アミロイド前駆体タンパク質(APP、SEQ ID NO: 2で記載されるアミノ酸配列)と称される大きなタンパク質のタンパク質フラグメント-の沈着からなる。アミロイドプラーク自体がADの腫瘍原因であるのか、あるいはそれらがAD過程の副産物であるのかは、不明である。確かに、APPタンパク質の変化は、APP遺伝子の突然変異によって生じるADの遺伝形態で示されるように、ADを引き起こすことができ、 $A\beta$ プラーク形成は、ヒトの疾患の進行に密接に関わっていると考えられる(Lippa C. F.ら、1998)。

【0012】

APP

APPは、細胞膜と結合している多くのタンパク質のひとつである。APPは、調製された後、部分的には細胞内、部分的には細胞外で神経細胞膜に埋め込まれる。トランスジェニックマウスを用いる最近の研究は、APPが、ニューロンの成長と存続に重要な役割を果たしている可能性があることを立証している。例えば、ある形態と量のAPPは、短期及び長期双方の損傷に対してニューロンを保護でき、損傷したニューロンが自身をより良く修復できるようにし、脳損傷後のニューロンの成長の一部を助ける。

【0013】

APPは細胞膜に埋め込まれているが、プロテアーゼはAPPの特定部位で作用し、APPをタンパク質フラグメントに切断する。あるプロテアーゼはAPPを切断してA β の形成に役立ち、別のプロテアーゼは、A β が形成されないようにアミロイドフラグメントの中央でAPPを切断する。長さの異なる2つのA β 、比較的可溶性で、ゆっくりと集合する短い40(又は41)アミノ酸A β と、わずかに長く、迅速に不溶性凝集塊を生じる42アミノ酸の「粘着性」A β とが形成される。A β が形成されるあいだ、A β が神経細胞によって又はその周囲でどのように動いているかは、まだ正確には知られていない。この過程の最終段階で、「粘着性」A β は細胞外で長いフィラメントに凝集し、死んだニューロン及び死にかけているニューロンのフラグメント及び小神経膠細胞ならびに星細胞とともに、脳組織のADに特徴的なプラークを形成する。

【0014】

APPの突然変異が、A β がAPP前駆体から切出される可能性を高くし、この結果、多くの全体的なA β 又は比較的多い「粘着性」形態のいずれかを生じさせていることは、幾つかの証拠が支持している。また、プレセニリン遺伝子の突然変異は、少なくとも2つの方法:A β 産生の修飾又はより直接的な細胞死の誘発によってニューロンの変性に寄与していると思われる。他の研究者は、突然変異されたプレセニリン1及び2が、アポトーシス速度の加速に関与していることを示唆している。

疾患が進行するにつれて、多くのプラークが形成され、脳を満たしていくものと予測される。研究は、A β が一種の動的平衡で同時に凝集し、ばらばらになる

可能性があることを示唆している。これは、形成後でさえ、プラークを崩壊できる可能性があるとの望みを示している(National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999)。

【0015】

A β はニューロンに毒性であると考えられる。組織培養研究では、研究者は、正常なヒトAPPを過剰発現するニューロンに比較して、突然変異形態のヒトAPPを過剰発現するように設計された海馬ニューロン細胞の死は増加することを認めた(Luoら, 1999)。さらに、修飾形態のA β タンパク質の過剰発現又は発現は、アルツハイマー-様症状を誘発することが動物モデルで立証されている(Hsiao K.ら, 1998)。

A β 生産の増加、そのプラークへの凝集及びそれにより生じる神経毒性はADをもたらすので、プラークへのA β の凝集が減速されるか、又は阻害される条件を研究することは、治療上、興味深い。

【0016】

プレセニリン

プレセニリン-1の突然変異(S-180)は、初期-発症家族性AD (FAD)の全症例のほぼ50%を占める。ADを生じる約30個の突然変異が、同定されている。ADの発症は、突然変異によって変化する。プレセニリン-2の突然変異は、FAD症例のかなり少ない部分を占めるが、依然として重要な因子である。プレセニリンが散発性非家族性ADに関与しているか否かは、不明である。プレセニリンの機能は未知であるが、それらはAPPのプロセシングに関わって、A β -42 (長い粘着形態のペプチド、SEQ ID NO: 2、残基673-714)を生じるものと考えられる。というのは、プレセニリン突然変異を有するAD患者は、このペプチドレベルが増しているからである。プレセニリンがNFTの生産を引起すのにも役割を果たしているかどうかは、不明である。プレセニリンは、ニューロンの生産とニューロンの死により直接的な役割を有している可能性も示唆されている。プレセニリン-1は第14染色体に位置するが、プレセニリン-2は第1染色体に関連している。これらの遺伝子の1個のみについて突然変異型を持てば、ほぼ確実に早期-発症ADが発症される。

プレセニリン-1が、APPのプロセシングに関わる仮説上のガンマ-セクレターゼ

(secretase)と同一であるかどうかは、幾分、不確定である(Naruseら, 1998)。

【0017】

アポ脂質タンパク質E

アポ脂質タンパク質Eは、通常コレステロールと結合しているが、AD脳のプラーク及びもつれでも認められる。アレレ1~3はADに関与していないと思われるが、APOE-e4 アレレの存在と後期ADの発症とには重要な相関関係がある(Strittmatterら, 1993)。しかし、それは危険因子であって、プレセニリン及びAPP突然変異の場合のように直接的な原因ではなく、家族性ADに限定されない。

ApoE e4 タンパク質がADの発症の見込みを増す方法は、正確には知られていないが、ひとつの可能性のある理論は、それがA β の蓄積を促進し、これがADの発症年齢の低下に影響しているか、又は特定のAPOEアレレの存在もしくは不在が障害に対するニューロンの応答方法に影響しているというものである(Buttiniら, 1999)。

【0018】

また、Apo A1は、アミロイドを生成する(amyloigenic)ことが分かっている。無傷のapo A1は、コンゴレッド陽性のアミロイド-様原線維をインビトロでそれ自体形成できる(Am J Pathol 147 (2): 238-244 (Aug 1995), Wisniewski T, Golabek AA, Kida E, Wisniewski KE, Frangione B)。

精神の喪失症状の低下に他のアレレと比較してAPOE-e4アレレがポジティブに影響していることを示す幾つかの矛盾した結果があるように思われる(Stern, Brandt, 1997, Annals of Neurology 41)。

【0019】

神経細線維もつれ

ADのこの第二の特徴は、神経細胞内にみられる撚り糸の異常なあつまりからなる。もつれの主成分は、タウ(t)と称されるある形態のタンパク質である。中枢神経系では、タウタンパク質は、細胞内部の支持構造、つまり骨格の一要素である微小管に結合し、その安定化を図る能力について最も良く知られている。しかし、ADにおいて、タウは化学的に変化し、この変化したタウはもはや微小管を安定化できず、微小管を崩壊させる。輸送システムのこの崩壊は、最初に神経細胞

間の伝達に機能不全を生じ、後にニューロンの死をもたらす。

【0020】

ADでは、化学的に変化したタウは、一對のらせんフィラメントに撚れ、タウの2本の糸は互いに撚られている。これらのフィラメントは、神経細線維もつれで認められる主要物質である。最近の研究で、研究者らは、健常者の脳の海馬の特定部分ではニューロンの6%未満に、また中程度のADで死亡した人のこれらのニューロンの43%以上に、そして深刻なADで死亡した人のこれらのニューロンの71%に、神経細線維の変化を認めた。ニューロンの損失を研究したところ、同様の経過が確認された。この種の証拠は、もつれの形成とニューロンの損失がADの進行に伴っているとの考えを支持している(National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999)。

【0021】

タウ症(tauopathies)ともつれ

AD以外の幾つかの神経変性疾患は、機能障害及び死をもたらす、ニューロンやグリアの不溶性フィラメントへのタウの凝集によって特徴付けられる。ごく最近、AD以外の種々の遺伝性痴呆を有する家族を研究していた数グループの研究者が、タウ遺伝子の最初の突然変異が第17染色体上にあることを見出した(Clarkら, 1998; Huttonら, 1998; Poorkajら, 1998; Spillantiniら, 1998)。これらの家族で、タウ遺伝子の突然変異は、神経細胞の痴呆を引起す。ADと幾つかの特徴を共有するが、幾つかの重要な点で異なっているこれらの疾患は、集約して「第17染色体関連性前頭側頭骨痴呆及びパーキンソン症候群」(FTDP-17)と称されている。それらは、パーキンソン症疾患、何らかの形態の筋萎縮性側索硬化症(ALS)、皮質基底変性、進行性核上麻痺及びピック疾患のような疾患で、全て、タウタンパク質の異常な凝集によって特徴付けられる。

【0022】

他のAD-様神経疾患

ADと、プリオン疾患(例えばクールー、クロイツフェルト-ヤコブ病及び牛海綿状脳炎)、パーキンソン疾患、ハンチントン病及び前頭側頭骨痴呆を含む他の神経疾患とには、重要な相似点がある。全てが、脳における異常タンパク質の沈着

を伴っている。ADとプリオン疾患は痴呆と死をもたらし、いずれも、不溶性のアミロイドフィブリルの形成を伴うが、互いに異なる膜タンパク質に由来する。

ADの次にもっとも一般的な神経変性疾患であるパーキンソン病を研究している科学者は、第一遺伝子が疾患に関連していることを発見した。この遺伝子は、シヌクレイン(synuclein)と称されるタンパク質をコードしており、このタンパク質は、興味深いことに、AD患者の脳のアミロイドプラークでも認められている (Lavedan C, 1998, Genome Res. 8(9): 871-80)。また、研究者は、ハンチントン病、痴呆を引起す別の進行性神経変性疾患における遺伝欠陥は、ハンチントンタンパク質を、ADのA β 原線維にきわめて似た不溶性原線維及びプリオン疾患のタンパク質原線維に形成させることを発見した(Scherzinger E ら, 1999, PNAS U.S.A. 96(8): 4604-9)。

【0023】

また、科学者らは、突然変異した時に、深刻な挙動疾患及びADに見られるのと同様な進行性の痴呆を引起す珍しい遺伝性疾患である、家族性英国痴呆(familial British dementia (FBD))の原因の新規遺伝子を発見した。FBDプラークで見られるアミロイド原線維の生化学的分析において、Abriと称されるユニークなペプチドが認められた(Vidalら, 1999)。この遺伝子に沿った特定部位での突然変異は、通常よりも長いBriタンパク質を産生する。Bri タンパク質の突然変異末端から切り取られたABriペプチドは、アミロイド原線維として沈着される。これらのプラークは、FBDを特徴付ける神経の機能障害及び痴呆をもたらすものと考えられる。

【0024】

A β での免疫化

免疫系は、通常、生物における外来タンパク質及びタンパク様粒子の一掃に関与しているが、上記疾患に伴う沈着物は主に自己タンパク質からなり、そのために、これらの疾患の制御における免疫系の役割があまり明らかになっていない。さらに、沈着物は、通常免疫系から分離される区分(CNS)に位置しており、それらの事実は、ワクチン又は免疫治療方法が不成功に終わるであろうことを示唆している。

それにもかかわらず、科学者らは、異種ヒトA β 及び免疫系を誘発することが知られている物質からなるワクチンでマウスを免疫化することを最近試みた(Schenkら, 1999 及びWO 99/27944)。ワクチンは、マウスDNAに挿入されたAPPに対するヒト突然変異遺伝子を用いてADの部分的なトランスジェニックマウスモデルで試験した。マウスは修飾APPタンパク質を生産し、成長するにつれてアミロイドプラークを生じた。このマウスモデルを用い、修飾トランスジェニックヒトAPPに対するワクチン注射がプラークの構築に影響するかどうかを試験した。最初の実験では、1群のトランスジェニックマウスにワクチンを毎月注射して6週齢で開始し、11ヶ月で終了した。第2群のトランスジェニックマウスには注射せず、対照群とした。13月齢まで、対照群のマウスは、脳の2~6%をカバーするプラークを有した。これに対し、免疫化マウスは、視覚的にはプラークを有しなかった。

【0025】

第二実験で、研究者らは、幾つかのプラークがすでに生じている11ヶ月目に注射を開始した。7ヶ月にわたって、対照のトランスジェニックマウスは脳のプラーク量を17倍に増したが、ワクチンを与えたマウスは、18月齢の対照のトランスジェニックマウスに比較して99%低下させた。何匹かのマウスでは、予め存在する幾つかのプラークの沈着は治療で除けるものと思われる。他のプラーク関連損傷、例えば炎症及び異常な神経細胞プロセスは、免疫化の結果を弱めることも見出された。

したがって、上記はマウスにおける予備研究で、例えば科学者は、ワクチン接種したマウスが他の点で依然として健康であるか、またワクチン接種したマウスの記憶が依然として正常であるかを見出す必要がある。さらに、マウスモデルはADを完全には現してはいない(動物は神経細線維もつれを生じず、多くのニューロンを死なせもしない)ので、さらなる研究で、ヒトがマウスと同様の反応をするのか、あるいは異なる反応をするのかを決定する必要がある。別の論点は、方法がアミロイドの沈着をおそらくは「治癒」するが、痴呆の発症は止められない点を考慮することである。

【0026】

技術的な問題は、抗原投与が何回もあることにある。例えば、この技術を用い

て、自己タンパク質に対する抗体をヒトに生じさせることのできるワクチンをつくることすら、不可能であると考えられる。このように非常に多くの安全性及び有効性の問題は、ヒトでの試験を考慮する前に、解決する必要がある。

したがって、Schenkらによる研究は、ADで形成されるプラークのような中枢神経系におけるタンパク様沈着において自己タンパク質に対し強力な免疫応答を生ずることができるのであれば、沈着形成を妨げることができ、またすでに形成したプラークを排除できる可能性があることを示している。

【0027】

発明の目的

この発明の目的は、アミロイドの沈着によって特徴付けられる症状、例えばADに対する新たな治療を提供することである。さらなる目的は、AD及びアミロイドの沈着を伴う他の病理疾患に新たな処置を講ずるため、アミロイドに対する自己ワクチンを開発することである。

【0028】

発明の要約

病状に関連するアミロイド沈着に含まれる、他の点では非免疫原性の自己タンパク質に対する強力な免疫応答を生じるための自家ワクチン療法技術の使用が、ここに開示される。それにより、アミロイド、沈着物に含まれる1以上の成分、又はアミロイド形成の原因となる1以上のタンパク質のいずれかに対して、強力な免疫応答が生じる。また、アミロイド沈着を伴うかかる疾患の症状の予防、可能であれば治癒又は緩和のためのかかるワクチンの製造が記載される。

したがって、最も広くかつ最も一般的な範囲において、この発明は、

- アミロイド産生(amyloidogenic)ポリペプチド又はそのサブ配列での動物の免疫化でアミロイド産生ポリペプチドに対する抗体産生を誘発するように処方された、少なくとも1つのアミロイド産生ポリペプチド又はそのサブ配列、及び/又は
- アミロイド産生ポリペプチドに修飾が導入されている少なくとも1つの アミロイド類似体であって、この類似体での動物の免疫化により、結果としてアミロイド産生ポリペプチドに対する抗体産生が誘発される、少なくとも1つの アミロイド類似体

の免疫学的に有効な量を、ヒトを含む動物の免疫系に提示することからなる、動物におけるアミロイドをインビボでダウン-レギュレートする方法に関する。

【0029】

この結果、1)免疫応答を誘発するように処方された天然に存在する抗原及びそのフラグメントの使用、ならびに2)交差反応性の免疫応答を誘発し得る、そのような天然に存在する抗原の類似体の使用が本発明に包含される。

また、この発明は、アミロイド産生ポリペプチド類似体ならびにこれらのサブセットをエンコードする核酸フラグメントに関する。類似体又は核酸フラグメントからなる免疫原性組成物も、この発明の一部である。

この発明は、免疫学的に有効なアミロイド産生ポリペプチド類似体の同定方法ならびに該類似体からなる組成物の製造方法にも関する。

【0030】

図面の説明

図1: A β タンパク質A β -43(又はC-100)に対し抗体を反応させるための、アミロイド前駆体タンパク質から誘導されるAutovac変異体の概略図。APPは図の上に概略的に示しており、残りの概略的な構築物は、モデルエピトープP2及びP30が置換されているか、又はAPPの種々の切頭型に挿入されていることを示している。図において、黒色のパターンはAPPシグナル配列を示し、2方向の斜交平行線模様はAPPの細胞外部分、黒色の垂直な陰影はAPPのトランスメンブランドメイン、薄い垂直な陰影はAPPの細胞内ドメイン、目の粗い斜交平行線模様はP30エピトープ、そして細い斜交平行線模様はP2エピトープを示す。実線のボックスはA β -42/43を示し、実線のボックスと点線のボックスはともにC-100を示す。「Abeta」は、A β を示す。

【0031】

発明の詳細な説明

定義

以下に、本発明の境界を明確にするために、本明細書及び請求項において使用する用語を幾つか定義し、詳細に説明する。

ここで互換的に用いられる用語「アミロイド」及び「アミロイドタンパク質」

は、長さが不確定なタンパク質の非分枝原線維の群を示す。アミロイド原線維は、コンゴレッドで染色する特徴を示し、ポリペプチド鎖が β -シートに組織化される架橋- β 構造を共有する。アミロイドは、極めて多様な前駆体構造を有するが、 β -シートヘリックスプロトフィラメントの構築を阻害するミスフォールド形態への構造転化を受けることができるアミロイド産生タンパク質から一般に得られる。通常、アミロイド原線維の直径は、約70～約120 のあいだである。

【0032】

用語「アミロイド産生タンパク質」は、それ自体沈着物の一部であることによって、又は沈着物の形成をもたらす生合成経路の一部であることによって、アミロイドの沈着形成に関わるポリペプチドを示すことを意図する。したがって、アミロイド産生タンパク質の例はAPP 及び $A\beta$ であるが、これらの代謝に関わるタンパク質もアミロイド産生タンパク質である可能性がある。幾つかのアミロイド産生ポリペプチドを、以下に詳述する。

【0033】

「アミロイドポリペプチド」は、ここで、ヒト又は他の哺乳動物由来の上記アミロイド産生タンパク質のアミノ酸配列からなるポリペプチド(又は無傷のアミロイド産生タンパク質と実質的な量のB-細胞エピトープを共有するその切頭型)を意味する。したがって、アミロイド産生ポリペプチドは、例えばアミロイド産生ポリペプチドの前駆体の実質的な部分($A\beta$ の場合には、可能性のあるアミロイドポリペプチドはAPPから誘導され得る)からなることができる。また、原核生物系で調製される非グリコシル化型アミロイド産生ポリペプチドは、例えば酵母又は他の非哺乳動物の真核の発現系の使用により様々なグリコシル化パターンを有する型のように、この用語の境界内に含まれる。しかし、「アミロイド産生ポリペプチド」の用語を用いる場合、当該ポリペプチドは治療される動物に提示される際に通常非免疫原性であることが意味されることに留意すべきである。言い換えれば、アミロイド産生ポリペプチドは自己タンパク質であるか、又は当該動物のアミロイド産生に対する免疫応答を通常は生じないような自己タンパク質の類似体である。

【0034】

「アミロイド産生ポリペプチド類似体」は、その一次構造において変化が付されているアミロイド産生ポリペプチドである。このような変化は、例えば適当な融合パートナーへのアミロイドポリペプチドの融合形態(つまり、アミノ酸残基のC-及び/又はN-末端付加をもっぱら伴う一次構造における変化)であってもよく、及び/又はアミロイド産生ポリペプチドアミノ酸配列における挿入及び/又は欠失及び/又は置換形態であってもよい。誘導化アミロイド産生分子も、用語に含まれる(アミロイド産生ポリペプチドの修飾に関する以下の論議参照)。アミロイド産生ポリペプチドがアミロイド又はその前駆体である場合、類似体は、アミロイドの正常な前駆体タンパク質に対し抗体を誘発する能力が低い、又は誘発することすらできず、それにより、アミロイドタンパク質前駆体であるポリペプチドの(生理学的に正常な)非凝集形態との望ましくない干渉が避けられるように構築してもよい。

【0035】

ヒトのアミロイド産生ポリペプチドの外来-類似体(例えばイヌ科又はブタの類似体)をヒトでワクチンとして使用することは、アミロイド産生ポリペプチドに対する所望の免疫性を生じるものと想像されることに留意すべきである。免疫化にこのような外来-類似体を使用することも、本発明の一部であるとみなされる。

「ポリペプチド」という用語は、本文において、アミノ酸残基が2~10の短いペプチド、アミノ酸残基が11~100のオリゴペプチド、ならびにアミノ酸残基が100より多いポリペプチドを意味する。さらに、この用語はタンパク質、すなわち少なくとも1つのポリペプチドからなり、少なくとも2つのポリペプチドからなる場合には複合体を形成するか、共有結合するか、又は非共有結合する機能的生体分子をも含む。タンパク質中のポリペプチドはグリコシル化及び/又は脂質化されていてもよく、及び/又は補欠分子団を含んでいてもよい。

【0036】

「T-リンパ球」及び「T-細胞」という用語は、様々の細胞介在免疫応答ならびに体液性免疫応答におけるヘルパー活性の原因となる胸腺由来リンパ球と互換可能に使用される。同様に、「B-リンパ球」及び「B-細胞」という用語は、抗体産

生リンパ球と互換可能に使用される。

「サブ配列」という用語は、それぞれ天然に存在するアミロイドアミノ酸配列又は核酸配列から直接誘導される、少なくとも3つのアミノ酸、又は関連するときは少なくとも3つのヌクレオチドのいずれかの連続的なストレッチを意味する。

【0037】

用語「動物」は、本文において一般にホモ・サピエンス、カニス・ドメスティカス (Canis domesticus) などの動物種 (好ましくは哺乳動物) を意味し、ただ1種の動物ではない。しかし、この用語は、そのような動物種の個体群も意味する。なぜなら、この発明の方法によって免疫化された個体は全て、同じ免疫原での動物の免疫化を可能にする、実質的に同一のアミロイド産生ポリペプチドを有することが重要であるからである。例えばアミロイド産生ポリペプチドの遺伝変異型が異なるヒト個体群で存在する場合には、各群におけるアミロイド産生ポリペプチドに対する自己耐性を最適な方法で破壊できるように、これらの異なる個体群で異なる免疫原を使用する必要がある。本文における動物が免疫系を有する生物であることは、当業者には明らかであろう。動物は脊椎動物、例えば哺乳動物であることが好ましい。

【0038】

「アミロイドのインビボのダウン-レギュレーション」という用語は、ここで生物における沈着した関連型アミロイドの全量の低下を意味する。ダウンレギュレーションは、いくつかの機序によって生じることができる。これらのうち、誤った凝集を回避するように抗体結合によってアミロイドとの単純な干渉を行うことが最も簡単である。しかし、抗体結合により、スカベンジャー細胞 (例えばマクロファージ及びその他の食細胞) でアミロイドを除き、抗体がアミロイドの形成をもたらす他のアミロイド産生ポリペプチドに抵触することも、本発明の範囲内である。

【0039】

「免疫系に...提示する」という表現は、動物の免疫系が制限された方法で免疫原性の抗原投与に付されるところを意味する。下記の開示から明らかであるよう

に、このような免疫系の抗原投与は多くの方法によって行うことができる。そのなかで最も重要なものは、「ファーマシン (pharmaccines)」を含有するポリペプチドでのワクチン注射(すなわち進行中の疾患を治療又は改善するために投与されるワクチン)、又は核酸「ファーマシン」のワクチン注射である。達成されるべき重要な結果は、動物中の免疫受容細胞が免疫学的に有効な方法で抗原と相対することであって、この結果に達する方法そのものは、この発明の基礎をなす発明的な思想ほど重要ではない。

「免疫学的に有効な量」という用語は、当該技術において通常の意味を有する。

つまり、免疫学的特徴を免疫原と共有する発病剤を著しく連動させる免疫応答を誘発し得る免疫原の量である。

【0040】

アミロイド産生ポリペプチドが「修飾」されたという表現を使用するときは、ここではアミロイド産生ポリペプチドの骨格を構成するポリペプチドの化学的修飾を意味する。そのような修飾は、例えばアミロイド産生ポリペプチド配列中のあるアミノ酸残基の誘導 (例えばアルキル化)である。しかし、以下の開示から明らかであるように、好ましい修飾は、アミノ酸配列の一次構造の変更からなる。

「アミロイド産生ポリペプチドに対する自己耐性」を論じるときは、アミロイド産生ポリペプチドがワクチン注射される個体群で自己タンパク質であるため、個体群の正常な個体がアミロイド産生ポリペプチドに対する免疫応答を増さないことが理解される。しかし、動物個体群において、例えば自家免疫異常の一部として、天然のアミロイド産生ポリペプチドに対する抗体を産生できる偶発的な個体があり得ることは否定できない。いずれにしても、動物は通常、それ自身のアミロイド産生ポリペプチドに対してのみ自己耐性であるが、その他の動物種又は表現型が異なる個体群に由来する類似体もまた、その動物により耐性であろうことは否定できない。

【0041】

「外来T-細胞エピトープ」(又は「外来T-リンパ球エピトープ」)は、MHC分子

に結合でき、かつ動物種でT-細胞を刺激するペプチドである。この発明において好ましい外来T-細胞エピトープは「乱交雑」エピトープ、すなわち動物種又は個体群における特定のMHC分子クラスの実質的なフラクションに結合するエピトープである。そのような乱交雑T-細胞エピトープは、ごく限られた数しか知られていないが、それらについては以下に詳細に論じる。乱交雑T-細胞エピトープは、「万能(universal)」T-細胞エピトープも意味する。本発明に基づいて使用される免疫原が動物個体群のできるだけ大きいフラクションで有効となるためには、1)数個の外来T-細胞エピトープを同一類似体に挿入するか、又は2)それぞれに異なる乱交雑エピトープが挿入された数個の類似体を製造する必要があることは理解されたい。外来T-細胞エピトープの概念が、クリプティックT-細胞エピトープ、すなわち自己タンパク質に由来するエピトープであって、当該自己タンパク質の一部ではなく、単離した形態で存在するときのみ免疫原性挙動を発揮するエピトープの使用をも包含することは理解されたい。

【0042】

「外来Tヘルパーリンパ球エピトープ」(外来 T_H エピトープ)は、MHCクラスII分子に結合し、MHCクラスII分子に結合した抗原提示細胞(APC)の表面に提示される外来T細胞エピトープである。

(生体)分子の「機能的部分」とは、本文においては、分子によって発揮される生化学的又は生理学的作用の少なくともひとつの原因となる分子の一部を意味する。多くの酵素及び他のエフェクター分子が、当該分子によって発揮される作用の原因となる活性部位を有することは、当該技術において周知である。その分子の他の部分は、安定化又は可溶性の増強目的に役立っている可能性がある。したがって、これらの目的が本発明の特定の実施例に関連がない場合は、排除され得る。例えば、アミロイド産生ポリペプチドにおいて特定のサイトカインを修飾部分として使用することができる(下記の詳細な論述を参照)。そのような場合には、アミロイド産生ポリペプチドへの結合は必要な安定性を生ずるので、安定性の問題は無関係であるかもしれない。

【0043】

「アジュバント」という用語は、ワクチン技術の分野において通常の意味を有

する。つまり、1)それ自体ではワクチンの免疫原に対する特異的な免疫応答を増加することはできないが、2)それにもかかわらず、免疫原に対する免疫応答を高めることができる物質又は組成物である。つまり、言い換えれば、アジュバントのみのワクチン注射は免疫原に対する免疫応答を生じない。免疫原でのワクチン注射は免疫原に対する免疫応答を生じさせるかもしれないし、させないかもしれない。しかし、免疫原とアジュバントとのワクチン注射の組み合わせは、免疫原のみで誘発されるよりも強い免疫原への免疫応答を誘発する。

【0044】

分子の「標的化」とは、本文において、動物に導入される分子が特定組織で優先的に現れるか、又は特定の細胞又は細胞型に優先的に結合している状態を意味する。これは、標的化を促進する組成物に分子を処方することを含む多くの方法、又は標的化を促進する基を分子に導入することによって達成することができる。これらの問題は以下に詳細に論述する。

「免疫系の刺激」とは、物質又は組成物が一般に非特異免疫刺激作用を示すことを意味する。多くのアジュバント及び推定上のアジュバント（例えば特定のサイトカイン）は、免疫系を刺激する能力を共有する。免疫刺激剤を使用すると、免疫系の「機敏性(alertness)」が増加する。これは免疫源を用いた同時又はその後の免疫化が、免疫原のみの使用と比較して、著しく有効な免疫応答を誘発することを意味する。

【0045】

アミロイドのダウン-レギュレーションの好ましい実施態様

この発明の方法で免疫原として用いられるアミロイド産生ポリペプチドは、少なくとも1つの変更がアミロイド産生ポリペプチドのアミノ酸配列に存在する修飾分子であることが好ましい。というのは、アミロイド産生ポリペプチドに対する自己耐性に関して極めて重要な破壊を生じさせる機会はあるようかなり容易化されているからである。これは、例えば野生型A β での免疫化がA β 変異体分子での免疫化に匹敵する実施例2に示す結果から、明らかである。修飾分子の使用が、アミロイド産生ポリペプチドに対する自己耐性の破壊をさらに容易にする剤型、例えばアジュバントを含む剤型でかかる修飾アミロイド産生ポリペプチドを

用いる可能性を排除しないことは、留意すべきである。

【0046】

潜在的に自己反応性のB-リンパ球を認識する自己-タンパク質が正常な個体において生理学的に存在することが分かっている(Dalum 1ら、1996, J. Immunol. 157: 4796-4804)。しかし、これらのB-リンパ球が、関連する自己-タンパク質と反応性の抗体を実際に産生するよう誘発するためには、サイトカイン産生T-ヘルパーリンパ球(T_H -細胞又は T_H -リンパ球)からの補助が必要である。通常、この助力は、提供されない。なぜなら、T-リンパ球は、一般に、抗原提示細胞(APC)によって提示される場合に、自己タンパク質由来のT-細胞エピトープを認識しないからである。しかし、自己-タンパク質に「外来」要素を生ずることによって(つまり、免疫学的に有意な修飾を導入することによって)、外来要素を認識するT-細胞は、APC(例えば、最初は単核細胞)上で外来エピトープを認識することによって活性化される。修飾自己タンパク質で自己エピトープを認識し得るポリクローナルB-リンパ球(APCでもある)も抗原を内在化し、次いでその外来T-細胞エピトープを提示し、活性化されたT-リンパ球が、その後、これらの自己反応性ポリクローナルB-リンパ球へのサイトカインの助力を提供する。これらのポリクローナルB-リンパ球で産生される抗体は、天然のポリペプチドに存在するものも含めて修飾ポリペプチドで種々のエピトープと反応性であるので、非修飾自己タンパク質と交差反応性の抗体が誘発される。結論として、T-リンパ球は、あたかもポリクローナルB-リンパ球の群が完全に外来抗原を認識するかのように作用するに至るのであるが、実際は、挿入されたエピトープが宿主に外来であるにすぎない。こうして、非修飾自己抗原と交差反応しうる抗体が誘発される。

【0047】

自己耐性を破壊させるためにペプチド自己抗原を修飾する方法は、幾つか当業者に知られている。つまり、この発明によれば、修飾は、

- 少なくとも1つの外来T-細胞エピトープを導入し、及び/又は
- 少なくとも1つの第一部分(first moiety)を導入し、抗原提示細胞(APC)に修飾分子を標的化し、及び/又は
- 少なくとも1つの第二部分を導入し、免疫系を刺激し、及び/又は

- 少なくとも1つの第三部分を導入し、免疫系に対して修飾アミロイド産生ポリペプチドの提示を最適化することを含み得る。

しかし、これらの修飾は、全て活性なアミロイド産生ポリペプチドに本来のB-リンパ球エピトープの実質的なフラクションを維持しているあいだに行われるべきである。というのは、天然分子のB-リンパ球の認識は、それにより増強されるからである。

【0048】

ひとつの好ましい具体例において、(外来T-細胞エピトープ又は上記の第一、第二及び第三部分の形態の)側基(side group)は、共有的又は非共有的に導入される。これは、アミロイド産生ポリペプチドから誘導されるアミノ酸残基のストレッチが、主たるアミノ酸配列を変更することなく、あるいは少なくとも鎖内の個々のアミノ酸間のペプチド結合に変更を加えることなく、誘導されることを意味する。

代替的かつ好ましくは、具体例は、アミノ酸の置換及び/又は欠失及び/又は挿入及び/又は付加を利用する(組換え手段又はペプチド合成の手法により行っても良い: 長いアミノ酸のストレッチを伴う修飾は、融合ポリペプチドを生じ得る)。この具体例の特に好ましい変形は、WO 95/05849に記載される技術である。これは、多数のアミノ酸配列が免疫優勢の外来T-細胞エピトープからそれぞれなる相当数のアミノ酸配列で置換されているが、同時に類似体における自己タンパク質の全体的な三次構造を維持している自己タンパク質類似体での免疫化によって自己タンパク質をダウン-レギュレートする方法を開示している。しかし、この発明の目的には、修飾(挿入、付加、欠失又は置換)により外来のT-細胞エピトープが生じ、同時にアミロイド産生ポリペプチドにおいて実質的な数のB-細胞エピトープが保持されれば、十分である。しかし、誘発される免疫応答の効率を最大限にするためには、アミロイド産生ポリペプチドの全体的な三次構造を修飾分子内で維持することが好ましい。

【0049】

以下の式は、この発明で全体的に包含される分子構築物を記載している:

$(MOD_1)_{s_1}(\text{アミロイド}_{e_1})_{n_1}(MOD_2)_{s_2}(\text{アミロイド}_{e_2})_{n_2}\dots(MOD_x)_{s_x}(\text{アミロイド}_{e_x})_{n_x}(I)$

- ここで、 アミロイド_{e_1} - アミロイド_{e_x} は、 x のB-細胞エピトープを含有するアミロイド産生ポリペプチドのサブ配列で、個々に同一であるか又は非同ーであり、外来側基を含んでいてもよく含まなくてもよい。 x は3以上の整数で、 n_1 - n_x は0以上の x の整数(少なくとも1つは1以上)であり、 MOD_1 - MOD_x は保存されたB-細胞エピトープ間に挿入された x の修飾で、かつ s_1 - s_x は0以上の x の整数である(側基が アミロイド_{e_x} 配列に導入されないならば、少なくとも1つは1以上である)。

したがって、全般的な機能が構築物の免疫原性を制限するので、この発明は本来のアミロイド産生ポリペプチド配列のあらゆる種類の置換及びそれにおけるあらゆる種類の修飾を可能にする。つまり、例えばインビボで副作用を示すアミロイド産生ポリペプチド配列の一部を省くか、あるいは普通は細胞内にあり、この結果、望ましくない免疫学的反応を生じる部分を省いて得られる修飾アミロイド産生ポリペプチドは、本発明に含まれる。

【0050】

適用できる時には、上記構築物のひとつの好ましい変形は、アミロイドタンパク質のサブ配列を含むB-細胞エピトープが、アミロイドが由来する前駆体ポリペプチドで細胞外で暴露されない形態である。アミロイドエピトープをこのように選択することによって、アミロイド前駆体の産生細胞と反応性の抗体が生産されないことが保証され、それにより、生じる免疫応答が、望ましくないアミロイド沈着物に対する免疫応答に制限される。同様の選択は、適用できる時には、アミロイドより他のアミロイド産生ポリペプチドに対して行うことができる。これらの場合、例えば、産生細胞に全く結合していない時にのみ細胞外相に暴露されるアミロイド産生ポリペプチドのエピトープに対して免疫を誘発することは、可能であろう。

【0051】

B-細胞エピトープの実質的なフラクション又は上記の修飾に付されるタンパク質の全体的な三次構造の維持は、幾通りかの方法によって達成することができる。ひとつは、単にアミロイド産生ポリペプチドに対するポリクローナル抗血清(

例えばウサギで調製した抗血清)を調製し、その後この抗血清を、製造した修飾タンパク質に対する試験薬として(例えば競合ELISAで)使用する方法である。アミロイド産生ポリペプチドと同程度まで抗血清と反応する修飾形(類似体)は、アミロイド産生ポリペプチドと同じ全体的な三次構造を有しているとみなさなければならない。しかし、そのような抗血清に対して制限された(それでも依然として有意かつ特異的な)反応性を示す類似体は、本来のB-細胞エピトープの実質的なフラクションを維持しているものとみなされる。

あるいは、アミロイド産生ポリペプチドでの異なるエピトープと反応性のモノクローナル抗体の選択は、テストパネルとして用意し、使用することができる。この方法は、1)アミロイド産生ポリペプチドのエピトープマッピング、及び2)調製した類似体に維持されるエピトープのマッピングを可能にするという利点がある。

【0052】

当然のことながら、第三の方法は、アミロイド産生ポリペプチド又は生物学的に活性な切断型(上記参照)の三次元構造を解析し、これを、調製した類似体について解析した三次元構造と比較することである。三次元構造は、X線回折研究及びNMR分光法によって解析することができる。三次構造に関するさらなる情報は、ある程度までは、純粋型のポリペプチドを要するという利点があるにすぎない円偏光二色性研究から得ることができ(X線回折では結晶化ポリペプチドの準備、NMRではポリペプチドの同位体変異型の準備を要する)、所定の分子の三次構造についての有用な情報が提供される。しかしながら、最終的には、X線回折及び/又はNMRが確実なデータを得るために必要である。なぜなら、円二色性は、二次構造要素の情報を介すると正確な三次元構造については間接的な証拠しか提供できないからである。

【0053】

この発明の1つの好ましい具体例は、アミロイド産生ポリペプチドのB-リンパ球エピトープ(つまり、少なくとも1つのB-細胞エピトープが2つの位置に存在する式I)の複数提示を利用している。このことは、様々な方法、例えば、単に構造(アミロイド産生ポリペプチド)_m(式中mは2以上の整数)からなる融合ポリペプ

チドを調製し、次いでここに論ずる修飾をアミロイド配列の少なくとも1つに導入することによって達成することができる。導入された修飾は、B-リンパ球エпитーブの少なくとも1つの複製及び/又はハプテンの導入を含むことが好ましい。選択されたエピトープの複数の提示を含むこれらの具体例は、アミロイド産生ポリペプチドの単なる少数部分がワクチン剤の成分として有用な状況で特に好ましい。

【0054】

上記のように、外来T-細胞エピトープの導入は、少なくとも1つのアミノ酸の挿入、付加、欠失又は置換の導入によって完成される。当然ながら、正常な状況は、アミノ酸配列における1以上の変更の導入(例えば、完全なT-細胞エピトープの挿入又はそれによる置換)であろうが、達成されるべき重要な目標は、抗原提示細胞(APC)によって処理される際に、類似体が、APC表面にMHCクラスII分子の状況で提示されるような免疫優勢の外来T-細胞エピトープを生じることである。したがって、適当な位置でのアミロイド産生ポリペプチドのアミノ酸配列が外来 T_H エピトープでも見られるアミノ酸残基を幾つか含むならば、外来 T_H エピトープの導入は、アミノ酸の挿入、付加、欠失及び置換で外来エピトープの残りのアミノ酸を生じることによって達成され得る。言い換えれば、本発明の目的を満たすために挿入又は置換で完全な T_H エピトープを導入することは、必ずしも必要ではない。

【0055】

アミノ酸の挿入、欠失、置換又は付加の数は、好ましくは少なくとも2、例えば3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20及び25の挿入、置換、付加又は欠失である。アミノ酸の挿入、置換、付加又は欠失の数は、150を超えないことがさらに好ましく、例えば多くても100、多くても90、多くても80、ならびに多くても70である。置換、挿入、欠失又は付加の数は、60を超えないことが特に好ましく、とりわけその数は50又は40を超えるべきではない。最も好ましいのは、30以下の数である。アミノ酸付加に関して、得られた構築物が融合ポリペプチドの形態である場合には、これらはしばしば150よりもかなり多いことに留意すべきである。

【0056】

本発明の好ましい実施態様は、少なくとも1つの免疫優勢な外来T-細胞エピトープの導入による修飾を含む。T-細胞エピトープの免疫優勢の問題が当該の動物種に依存することは、理解されたい。ここで使用する限り、"免疫優勢"という用語は単に、ワクチン注射した個体/群において顕著な免疫応答をもたらすエピトープを意味する。しかし、一個体/群において免疫優勢なT-細胞エピトープが、同一種の別の個体においてMHC-II分子を結合できるからといって、必ずしも後者の個体において免疫優勢であるとは限らないことは周知の事実である。したがって、この発明の目的のために、免疫優性なT-細胞エピトープは、抗原に存在する際にT-細胞を助けるのに有効なT-細胞エピトープである。一般的には、免疫優性なT-細胞エピトープは、それらが現れるポリペプチドに関係なく、MHCクラスII分子に実質的に常に結合して提示されていることを固有の特徴として有する。

【0057】

もう一つの重要な点は、T-細胞エピトープのMHC制限の問題である。一般に、天然に存在するT-細胞エピトープはMHC制限性である。すなわち、T-細胞エピトープを構成するあるペプチドのみがMHCクラスII分子のサブセットに効果的に結合する。これはその結果、多くの場合において、1つの特異的なT-細胞エピトープの使用が個体群のフラクシオンにのみ有効なワクチン成分を生じるという効果を有する。また、フラクシオンのサイズ次第でより多くのT-細胞エピトープを同一分子内に必然的に含めることができ、あるいは導入されたT-細胞エピトープの性質によって互いに識別されるアミロイド産生ポリペプチド変異体が成分である多成分ワクチンを調製することができる。

【0058】

使用するT-細胞のMHC制限が全く未知である場合（例えばワクチン注射した動物があまり確定されていないMHC組成を有している場合）、特異的なワクチン組成によってカバーされる個体群のフラクシオンは以下の式によって決定することができる。

【数1】

$$f_{\text{個体群}} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - p_i) \quad (\text{II})$$

[式中、 p_i はワクチン組成中に存在する i の外来T-細胞エピトープに対して応答する個体群における頻度、 n はワクチン組成中の外来T-細胞エピトープの総数である]。この結果、個体群において0.8、0.7及び0.6の応答頻度をそれぞれ有する3個の外来T-細胞エピトープを含むワクチン組成は

$$1 - 0.2 \times 0.3 \times 0.4 = 0.976$$

となり、すなわち、個体群のうち97.6%がMHC-IIを介したワクチンへの応答を統計的に高める。

【0059】

上記の式は、使用されるペプチドについて多少とも正確なMHC制限パターンが知られている場合には適用されない。例えば、あるペプチドのみがHLA-DRアレレDR1、DR3、DR5及びDR7によってエンコードされるヒトMHC-II分子に結合する場合には、このペプチドを、HLA-DRアレレによってエンコードされる残りのMHC-II分子に結合する別のペプチドとともに使用することにより、当該個体群で100%の到達範囲が達成される。同様に、第二のペプチドがDR3及びDR5のみに結合する場合には、このペプチドの付加は到達範囲を全く増加させない。個体群応答の算出の基礎を完全にワクチン中のT-細胞エピトープのMHC制限におく場合、特異的なワクチン組成物でカバーされる個体群のフラクションは以下の式によって決定される：

【数2】

$$f_{\text{個体群}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 \quad (\text{III})$$

[式中、 ψ_j はワクチン中のT-細胞エピトープのいずれか1つを結合し、かつ j の3つの公知のHLA座(DP、DR及びDQ)に属するMHC分子をエンコードするアレルハプロタイプの個体群における頻度の合計である。実際には、どのMHC分子がワクチン中の各T-細胞エピトープを認識するかをまず測定し、その後、これらを型(DP、DR及びDQ)によってリストする。次いで、リストした種々のアレルハプロ

タイプの個々の頻度を型ごとに合計し、 ψ_1 、 ψ_2 及び ψ_3 を得る]。

【0060】

式IIの値 p_i は対応する理論値 p_i を超えることがあるかもしれない。

【数3】

$$\pi_i = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - v_j)^2 \quad (IV)$$

[式中、 v_j はワクチン中の i のT-細胞エピトープを結合し、かつ j の3つの公知のHLA座(DP、DR及びDQ)に属するMHC分子をエンコードするアレルハプロタイプの個体群における頻度の合計である。これは、 $1 - p_i$ の個体群では、応答頻度は $f_{\text{誤差(residual)-}i} = (p_i - p_i)/(1 - p_i)$ となることを意味する。したがって、式IIを調整して式Vとすることができる:]

【数4】

$$f_{\text{個体群}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 + \left(1 - \prod_{i=1}^n (1 - f_{\text{誤差-}i}) \right) \quad (V)$$

[式中、用語 $1 - \psi_{\text{誤差-}i}$ は、負のときは0に設定される]。式Vにより、全てのエピトープが同一セットのハプロタイプにハプロタイプマップ(haplotype mapped)される必要のあることに留意されたい。

【0061】

したがって、類似体に導入されるT細胞エピトープを選択するときは、エピトープに関する利用可能な全ての知識：1)個体群における各エピトープへの応答頻度、2)MHC制限データ及び3)関連するハプロタイプ個体群における頻度を含めることが重要である。

動物種の個体又は動物個体群の大部分において活性な、天然に存在する“乱交雑”T-細胞エピトープが多量に存在する。これらは好ましくはワクチンに導入され、それによって同一ワクチンにおける極めて多量の異なる類似体の必要性を低減する。

本発明によれば、乱交雑エピトープは、破傷風トキソイド(例えばP2及びP30エ

ピトープ)、ジフテリアトキソイド、インフルエンザウイルス血球凝集素(HA)及びピー・ファルシパルム(*P. falciparum*) CS抗原由来エピトープのような天然に存在するヒトT-細胞エピトープであってもよい。

【0062】

長年にわたり、その他の乱交雑T-細胞エピトープが多数同定されている。特に、異なるHLA-DRアレレによってエンコードされるHLA-DR分子の大部分を結合するペプチドが同定されており、これらは全て本発明にしたがって使用される類似体に導入される可能性のあるT-細胞エピトープである。すべてここに引用して組み込まれる以下の文献に記載のエピトープも参照のこと：WO 98/23635 (Frazer IH ら、The University of Queenslandに譲渡)；Southwood S ら、1998, *J. Immunol.* 160: 3363-3373；Sinigaglia F ら、1988, *Nature* 336: 778-780；Chicz RM ら、1993, *J. Exp. Med* 178: 27-47；Hammer J ら., 1993, *Cell* 74: 197-203；及びFalk K ら、1994, *Immunogenetics* 39: 230-242。最後の文献は、HLA-DQリガンド及びHLA-DPリガンドについても論じている。これら5文献に挙げられるエピトープは、全て本発明で使用する天然エピトープと共通のモチーフを共有するため、その候補として適切である。

【0063】

あるいは、エピトープはMHCクラスII分子の大部分を結合するいずれかの人為的なT-細胞エピトープであってもよい。この明細書において、WO 95/07707及び対応する論文Alexander J ら、1994, *Immunity* 1: 751-761 (両者ともここに引用して組み込む)に記載のpan DR エピトープペプチド("PADRE")が、本発明にしたがって使用されるエピトープの候補として興味深い。これらの論文に開示される最も有効なPADREペプチドは、投与時の安定性を改善するためにC-末端及びN-末端にD-アミノ酸を担持することに留意されたい。しかしながら、本発明は第一に、適切なエピトープを修飾アミロイド産生ポリペプチドの一部として組み込むことを目的とする。これはその後、APCのリソソーム分画内で酵素的に破壊し、続いてMHC-II分子に関連して提示を行う。したがって、本発明において使用されるエピトープにD-アミノ酸を組み込むことは得策ではない。

【0064】

特に好ましいIPADREペプチドのひとつは、アミノ酸配列AKFVAAWTLKAAA 又は免疫学的に有効なそのサブ配列を有するペプチドである。これと、同じMHC制限を欠いている他のエピトープが、本発明の方法で使用される類似体に存在すべき好ましいIT-細胞エピトープである。このような超-乱交雑エピトープは、ワクチン注射した動物の免疫系に単一の修飾アミロイド産生ポリペプチドのみを提示する、本発明の最も簡単な実施態様を可能にする。

【0065】

上記のように、アミロイド産生ポリペプチドの修飾は、修飾アミロイド産生ポリペプチドをAPC又はB-リンパ球に標的化する第一部分の導入を含んでもよい。例えば、第一部分は、B-リンパ球の特異的な表面抗原又はAPC特異的な表面抗原に特異的な結合パートナーであってもよい。そのような特異的な表面抗原の多くは、当該技術において公知である。例えば、部分はB-リンパ球又はAPCに受容体がある炭水化物であってもよい(例えばマンナン又はマンノース)。又は、第二部分はハプテンであってもよい。APC又はリンパ球で表面分子を特異的に認識する抗体フラグメントも、第一部分として使用することができる(表面分子は、例えばFC γ RIのようなマクロファージ及び単球のFC γ 受容体、あるいはCD40又はCTLA-4等のようないずれかの他の特異的な表面マーカーであってもよい)。これら全ての代表的な標的化分子は、アジュバントの一部としても使用できることは理解されたい(以下を参照のこと)。

【0066】

免疫応答を増強するために修飾アミロイド産生ポリペプチドをある細胞型に標的化することの代案又は補足として、免疫系を刺激する上記第二部分を含むことによって免疫系の応答レベルを増すことができる。このような第二部分の一般的な例は、サイトカイン、熱ショックタンパク質又は分子シャペロン、ならびにそれらの有効な部分である。

本発明にしたがって使用される適切なサイトカインは、通常ワクチン組成物でアジュバントとしても機能するもの、例えばインターフェロン γ (IFN- γ)、インターロイキン1(IL-1)、インターロイキン2(IL-2)、インターロイキン4(IL-4)、インターロイキン6(IL-6)、インターロイキン12(IL-12)、インターロイキン13(I

L-13)、インターロイキン15(IL-15)及び顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)である。あるいは、サイトカイン分子の機能的部分が第二部分として十分である。このようなサイトカインのアジュバント物質としての使用に関しては、下記の記載を参照のこと。

【0067】

本発明によれば、第二部分として使用される適当な熱ショックタンパク質又は分子シャペロンは、HSP70、HSP90、HSC70、GRP94(gp96としても公知、Wearsch P Aら、1998, Biochemistry 37: 5709-19参照)ならびにCRT(カルレチクリン(calreticulin))であってもよい。

あるいは、第二部分はリステリオリシン(listeriolysin)(LL0)、脂質A及び非耐熱性エンテロトキシンのような毒素であってもよい。また、MDP(ムラミルジペプチド)、CFA(完全フロイントアジュバント)及びトレハロースジエステルTDM及びTDEなどの多数のマイコバクテリア誘導体が、興味深い可能性のあるものである。

【0068】

免疫系への修飾アミロイド産生ポリペプチドの提示を高める第三部分を導入しうることもまた、本発明の重要な実施態様である。この原理のいくつかの例が当該技術において示されている。例えば、*Borrelia burgdorferi* タンパク質OspAのパルミトイル脂質化アンカーを利用して、自己アジュバント化ポリペプチドを提供できることが知られている(例えばWO 96/40718を参照)。脂質化したタンパク質は、ポリペプチドの脂質化アンカー部分とそこから突出する残りの分子部分からなる核を有するミセル状構造を形成し、その結果、抗原決定基を多数提示するものと考えられる。したがって、これの使用及び異なる脂質化アンカー(例えばミリスチル基、ミリスチル基、ファルネシル基、ゲラニル-ゲラニル基、GPIアンカー及びN-アシルジグリセライド基)を用いた関連の研究は、特に、組換えて製造したタンパク質内の脂質化アンカーの供給がかなり簡単で、例えば天然に存在するシグナル配列を修飾アミロイド産生ポリペプチドの融合パートナーとして使用することを要求するにすぎないため、本発明の好ましい実施態様である。もう一つの可能性として、相補因子C3のC3dフラグメント又はC3自体の使用が挙げら

れる(Dempsey ら、1996, Science 271, 348-350及びLou & Kohler, 1998, Nature Biotechnology 16, 458-462参照)。

【0069】

結果として、アミロイド産生ポリペプチドの重要なエピトープ領域の多数(例えば少なくとも2つ)のコピーを免疫系に好ましく提示する本発明の別の実施態様として、ある分子に対するアミロイド産生ポリペプチド、そのサブ配列又は変異型の共有結合がある。例えば、デキストランのような炭水化物などのポリマーが使用可能である(例えば、Lees A ら、1994, Vaccine 12: 1160-1166; Lees A ら、1990, J Immunol. 145: 3594-3600を参照のこと)。しかし、マンノースやマンナンも有用な代替手段である。例えば、大腸菌及び他の細菌からの膜内在性タンパク質も、有用な接合パートナーである。キーホールリンペットヘモシニアン(KLH)、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド及びウシ血清アルブミン(BSA)のような従来の担体分子も好ましく、有用な接合パートナーである。

【0070】

炭水化物のようなポリヒドロキシポリマーに対するアミロイド産生ポリペプチドの共有結合の好ましい具体例は、個別にポリヒドロキシポリマーに結合する、少なくとも1つのアミロイド産生ポリペプチド及び少なくとも1つの外来T-ヘルパーエピトープの使用を伴う(つまり、外来T-ヘルパーエピトープとアミロイド産生ポリペプチドは、互いに融合していないが、ポリヒドロキシポリマーに結合し、担体骨格として役立つ)。また、このような具体例は、アミロイド産生ポリペプチドの適当なB-細胞エピトープ保有領域が短いペプチドストレッチで構築されている場合に、もっとも好ましい。これは、この方法が、得られた免疫原性剤において選択したエピトープを複数提示し得る極めて簡便な方法のひとつだからである。

外来T-ヘルパーエピトープとアミロイド産生(ポリ)ペプチドの結合は、ペプチダーゼによって切断されるアミド結合によっていることが特に好ましい。このストラテジは、APCが接合体に応じて、同時に接合体を処理し、その後、MHCクラスIIの状況に外来T-細胞エピトープを提示できるよう作用する。

【0071】

ペプチド(アミロイド産生ポリペプチド及び外来エピトープの双方)の結合をなす方法のひとつは、トレシル基で適当なポリヒドロキシポリマーを活性化することである。例えば、WO 00/05316 及びUS 5,874,469 (ともにここで引用により導入)に記載されるように、トレシル化多糖類を製造し、これらを、従来の固相もしくは液相ペプチド合成技術で製造したアミロイド産生ペプチド及びT-細胞エピトープに結合させることができる。得られた生成物は、そのN-末端又は他の利用可能な窒素分子によって、アミロイド産生ポリペプチド及び外来T-細胞エピトープを結合しているポリヒドロキシポリマー骨格(例えばデキストラン骨格)からなる。望ましい場合には、N-末端の1つの基以外の全ての利用可能なアミノ基を保護し、次いでトレシル化デキストラン分子に得られた保護ペプチドを結合させ、最後に得られた接合体を脱保護するように、アミロイド産生ポリペプチドを合成することができる。この方法の具体例を以下の実施例に記載する。

【0072】

WO 00/05316 及びUS 5,874,469に記載されているように、水溶性の多糖類分子を用いる代わりに、架橋多糖類分子を利用して、それによってポリペプチドと多糖類間に特定の接合を同様にして生じることができる。これは、2つの目的を達成するので、ポリペプチドの免疫系に対する提示を改善し、すなわち、接合体の注射時に局所的な沈着作用を生じ、APCに魅力的な標的である粒子を生ずることができるものと考えられる。このような特定の系を用いる方法も、実施例に記載する。

アミロイド産生ポリペプチドに修飾を導入する領域を選択する場合の基礎となる考察は、a) 既知の、及び推測されるB-細胞エピトープの保存、b) 第三構造の保存、c) 「産生細胞」などに存在するB-細胞エピトープの回避である。いずれにせよ、上記のように、異なる位置でT-細胞エピトープの導入に付された全ての修飾アミロイド産生分子のセットをスクリーンすることは、かなり容易である。

【0073】

この発明の最も好ましい具体例はヒトA β のダウン-レギュレーションに関わるので、その結果、上記のアミロイドポリペプチドがヒトA β ポリペプチドであることが好ましい。この具体例で、ヒトアミロイド産生ポリペプチドは、SEQ ID N

0: 2 の少なくとも1つのアミノ酸配列を、長さが同じか異なり、外来 T_H エピトープを含む少なくとも1つのアミノ酸配列で置換することにより修飾されていることが特に好ましい。修飾アミロイド産生APP及び $A\beta$ の好ましい例を、例としてP2及びP30エピトープを用いて図1に概略的に示す。このような構築物の背景の理論的解釈は、実施例で詳細に述べる。

【0074】

より具体的には、SEQ ID NO: 2 に導入される T_H 含有(又は完備)アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2のどのアミノ酸に導入されてもよい。つまり、導入はSEQ ID NO: 2のアミノ酸1-770のいずれの後にも可能であるが、671、672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713及び714アミノ酸のいずれかの後であることが好ましい。これは、アミノ酸1-671のいずれかもしくは全て、又はアミノ酸715-770のいずれかもしくは全ての欠失と組み合わせさせていてもよい。さらに、置換技術を利用する際には、SEQ ID NO: 2のアミノ酸671、672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713及び714のいずれか1つが、導入と組み合わせたり、欠失していてもよい。

【0075】

アミロイド産生ポリペプチド及び修飾アミロイド産生ポリペプチドの処方

動物に投与することによってアミロイド産生ポリペプチド又はアミロイド産生修飾ポリペプチドを動物の免疫系に提示するとき、ポリペプチドの処方は、当該技術において一般に承認されている原理に基づく。

ペプチド配列を有効成分として含有するワクチンの調製法は、ここに引用してすべて組み込まれる米国特許第4,608,251号；第4,601,903号；第4,599,231号；第4,599,230号；第4,596,792号及び4,578,770号に例示されるように、一般に当該技術においてよく理解されている。通常、このようなワクチンは液体溶液又は懸濁液のいずれかのような注射剤；溶液又は懸濁液に入れるのに適した固体、注

射前の液体として調製されてもよい。製剤は乳化されていてもよい。有効な免疫原性成分は、しばしば医薬的に受容され有効成分に和合する賦形剤と混合される。適当な賦形剤は、例えば水、塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等及びそれらの組み合わせである。また、望ましい場合には、ワクチンは少量の補助物質、例えば湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝薬、又はワクチンの有効性を高めるアジュバントを含んでいてもよい(アジュバントについての下記の詳細な記述を参考のこと)。

【0076】

ワクチンは従来、例えば、表皮下、表皮内、真皮内、真皮下又は筋肉内のいずれかの注射によって非経口的に投与される。他の投与方法に適した追加的な処方としては坐剤があり、時に経口、口腔内、舌下、腹腔内、鞘膜内、肛門、硬膜外、脊髄及び頭蓋内処方が含まれる。坐剤については、従来の結合剤及び担体、例えばポリアルカレングリコール又はトリグリセライドが含まれていてもよい。このような坐剤は有効成分を0.5-10%、好ましくは1-2%の範囲で含有する混合物から形成してもよい。経口処方は、例えば医薬等級のマニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の通常使用される賦形剤を含む。これらの組成物は溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、持続放出处方又は粉剤の形状をとり、10-95%、好ましくは25-70%の有効成分を含有する。経口処方については、コレラ毒素が興味深い処方パートナーである(可能性のある接合パートナーでもある)。

ポリペプチドは、中性又は塩の形態としてワクチンに処方してもよい。医薬的に受容な塩には、酸付加塩(ペプチドの遊離アミノ基で形成される)及び例えば塩酸又はリン酸のような無機酸、又は酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸で形成される塩が含まれる。遊離カルボキシル基で形成される塩は、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム又は水酸化第二鉄のような無機塩基、ならびにイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導されてもよい。

【0077】

ワクチンは、用量処方に適合する方法で、治療的に有効かつ免疫原性となる量

で投与される。投与量は、例えば免疫応答を増加させる個体の免疫系の能力、及び所望の防御の程度を含めて、治療される被験者に依存する。適当な用量範囲は、1回のワクチン注射あたりで有効成分が数百 μg のオーダーであり、好ましい範囲は(1-10 mg範囲でのより多い量を考慮しても)約0.1 μg ~ 2,000 μg であり、例えば約0.5 μg ~ 1,000 μg 、好ましくは1 μg ~ 500 μg 、特に約10 μg ~ 100 μg の範囲である。初回投与のための適当な養生法及び追加注射も変えられるが、典型的には初回投与の後に続けて接種するか、又はその他の投与が行われる。

適用方法は、広く異なっているがよい。いずれの従来のワクチン投与方法も適用可能である。これらは生理的に受容な固体の基剤での経口適用、又は注射等による生理的に受容な分散液の非経口的適用を含む。ワクチンの用量は投与経路に依存し、ワクチン注射を受ける人の年齢及び抗原処方に応じて変化する。

ワクチンのポリペプチドには、ワクチン内で十分に免疫原性のものもあるが、その他の幾つかにおいては、ワクチンがアジュバント物質をさらに含む場合に免疫応答を高める。

【0078】

ワクチンへのアジュバント効果を達成するための様々の方法が公知である。一般的な原理及び方法は、ともに引用してここに組み込まれる "The Theory and Practical Application of Adjuvants", 1995, Duncan E.S. Stewart-Tull (編集), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-95170-6及び "Vaccines: New Generation Immunological Adjuvants", 1995, Gregoriadis G ら (編集), Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9に詳細に述べられている。

自己抗原に対する自己耐性の破壊の促進が立証され得るアジュバントを使用することが特に好ましい。実際、これは、自家ワクチンにおいて非修飾アミロイド産生ポリペプチドを有効成分として用いる場合に必須である。適当なアジュバントの非制限的な例は、免疫標識化アジュバント；毒素、サイトカイン及びマイコバクテリア誘導体などの免疫調節アジュバント；油製剤；ポリマー；ミセル形成アジュバント；サポニン；免疫刺激複合体マトリクス (ISCOMマトリクス)；粒子；DDA；アルミニウムアジュバント；DNAアジュバント； γ -イヌリン；及びカプセル化アジュバントからなる群より選択される。一般に、類似体において第一、

第二及び第三の部分として有用な化合物及び薬剤に関する上記の開示は、本発明のワクチンのアジュバントにおけるそれらの使用にも必要な変更を加えて言及することに留意されたい。

【0079】

アジュバントの適用は、通常、緩衝食塩水中0.05～0.1%溶液として使用される水酸化アルミニウム又はリン酸アルミニウム(alum)等の薬剤、0.25%溶液として使用される糖の合成ポリマー（例えばカルボプル（登録商標））との混和物の使用を含み、70～101 の温度範囲でそれぞれ30秒～2分熱処理することによるワクチン内でのタンパク質の凝集、ならびに架橋剤による凝集も可能である。ペプシンで処理した抗体(Fabフラグメント)での再活性化によるアルブミンへの凝集、シー・パルブム(*C. parvum*)、内毒素又はグラム陰性細菌のリポ多糖類成分などの細菌細胞との混合、マンニッドモノ-オレエート(AraceI A)のような生理的に受容な油性ビヒクル中の乳化、又は阻害基体として使用されるパーフルオロカーボン(Fluosol-DA)の20%溶液との乳化も、用いることができる。スクアレン及びIFAなどの油との混和も好ましい。

本発明によれば、DDA（ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド）はDNAや γ -イヌリンと同様、アジュバントの候補として興味深い。しかし、フロイント完全アジュバント及び不完全アジュバント、ならびにQui I A及びQS21のようなキラヤサポニンもまたRIBIであるので興味深い。さらなる可能性としては、モノホスホリルリピドA(MPL)、上記のC3とC3d及びムラミルジペプチド(MDP)がある。

【0080】

リポソーム処方もまたアジュバント効果を与えることが知られている。したがってリポソームアジュバントは本発明において好ましい。

免疫刺激複合体マトリクス型(ISCOM（登録商標）マトリクス)アジュバントも、本発明において好ましい選択肢である。なぜなら特にこの種のアジュバントがAPCによるMHCクラスIIの発現をアップレギュレートできることが分かっているからである。ISCOM（登録商標）マトリクスは、キラヤ・サポナリア(*Quillaja saponaria*)由来の(任意に分画した)サポニン(トリテルペノイド)、コレステロール、及びリン脂質からなる。免疫原性タンパク質と混和した場合、得られる粒状処

方は、サポニンが60-70% w/wを構成し、コレステロール及びリン脂質10-15% w/w及びタンパク質10-15% w/wのISCOM粒子として既知のものである。免疫刺激複合体の組成及び使用に関する詳細は例えばアジュバントに関する上記教本にみられるが、Morein B ら、1995, Clin. Immunother. 3: 461-475ならびにBarr IG 及び Mitchell GF, 1996, Immunol. and Cell Biol. 74: 8-25 (両者とも引用してここに組み込まれる)にも完全な免疫刺激複合体の製法に関する有用な教示が示されている。

【0081】

アジュバント効果を達成するもう一つの非常に興味深い(ゆえに好ましい)可能性は、Gosselinら、1992(ここに引用して組み込まれる)に記載の技術を採用することである。要約すると、本発明の抗原のような関連抗原の提示は、単球/マクロファージのFc γ 受容体に対する抗体(又は抗原結合抗体フラグメント)に抗原を接合することによって高められる。特に、抗原と抗-Fc γ RIの接合体がワクチン注射を目的とした免疫原性を高めることが証明されている。

その他の可能性としては、上記した標的化物質及び免疫調節物質(とりわけサイトカイン)を、アミロイド産生ポリペプチドの修飾変異型で第一及び第二の部分の候補物として使用することが含まれる。これに関して、ポリI:Cのようなサイトカインの合成誘導物質もまた可能性がある。

適切なマイコバクテリア誘導体は、ムラミルジペプチド、完全フロイントアジュバント、RIBI、ならびにTDM及びTDEなどのトレハロースジエステルからなる群より選択される。

適切な免疫標的化アジュバントは、CD40リガンド及びCD40抗体、又はその特異的結合フラグメント(上記論述を参照)、マンノース、Fabフラグメント及びCTLA-4からなる群より選択される。

【0082】

適切なポリマーアジュバントは、デキストラン、PEG、澱粉、マンナン及びマンノース等の炭水化物；プラスチックポリマー自体；及びラテックスビーズ等のラテックスからなる群より選択される。

免疫応答を調節するさらに別の興味深い方法は、免疫原を(任意にアジュバン

ト及び医薬的に受容な担体及びビヒクルとともに)"仮想リンパ節(virtual lymph node)" (VLN) (ImmunoTherapy, Inc., 360 Lexington Avenue, New York, NY 10017-6501により開発された特許医療装置)に含めることである。VLN(細管状装置)は、リンパ節の構造と機能を模倣している。VLNを皮膚下に挿入することにより、サイトカイン及びケモカインを増加させた滅菌炎症部位が形成される。T-細胞及びB-細胞ならびにAPCは、危険信号に迅速に応答し、炎症箇所に戻り、VLNの多孔質マトリクス内部に蓄積する。抗原に対する免疫応答を増加させるために要求される必要抗原用量はVLNを使用すると減少すること、VLNを使用したワクチン注射によって付与される免疫防御はRibiをアジュバントとして使用する従来の免疫化を凌ぐものであることが、分かっている。この技術はとりわけ"From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts, October 12th - 15th 1998, Seasc ape Resort, Aptos, California"中のGelber C ら、1998, "Elicitation of Rob us T-cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of Immunogen s Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node"に簡潔に記載されている。

【0083】

ワクチンの微粒子製剤は、タンパク質抗原の免疫原性を増すことが多くの場合で明らかにされており、したがって本発明の別の好ましい具体例である。微粒子は、ポリマー、脂質、炭水化物又は粒子をつくるのに適当な他の分子を用いて抗原の共製剤として製造され、あるいは微粒子は、抗原自体のみからなる均一な粒子であってもよい。

ポリマーベースの微粒子の例は、ポリマーと抗原が固形粒子に濃縮されているPLGAとPVP ベースの粒子(Gupta, R.K.ら、1998)である。脂質ベースの粒子は、ミセル内に抗原を捕捉している脂質のミセル(いわゆるリポソーム)としてつくることができる(Pietrobon, P.J. 1995)。炭水化物ベースの粒子は、一般に澱粉又はキトサンのような適当な分解性の炭水化物からつくられる。炭水化物と抗原は、ポリマー粒子に用いられるのと同様の方法で混合され、粒子に濃縮される(Kas , H.S.ら、1997)。

【0084】

抗原のみからなる粒子は、種々の噴霧及び凍結乾燥技術によってつくることができる。サイズをコントロールした極めて均質の粒子をつくるために用いられる臨界超過技術は、この発明の目的に特に好ましい(York, P. 1999 & Shekunov, B. ら、1999)。

ワクチンは一年に1-6回、例えば一年に1、2、3、4、5又は6回、必要に応じて個体に投与することが期待される。本発明による好ましい自家ワクチンの使用によって誘発される記憶免疫性が永続的ではないことは、先に示されている。したがって、免疫系をアミロイド産生ポリペプチド又はアミロイド産生修飾ポリペプチドで定期的に抗原投与する必要がある。

【0085】

遺伝的変異のため、異なる個体は、同一ポリペプチドに異なる強度の免疫応答で反応する可能性がある。したがって、本発明のワクチンは、免疫応答を増加するために数個の異なるポリペプチドから構成されていてもよい(外来T-細胞エピートープ導入の選択に関する上記記載も参照のこと)。ワクチンは、2以上のポリペプチドから構成されていてもよい。その場合、全てのポリペプチドは上記で定義したものである。

したがって、ワクチンは3-20個の異なる修飾又は非修飾ポリペプチド、例えば、3-10個の異なるポリペプチドで構成されていてもよい。

【0086】

核酸ワクチン注射

ペプチドベースワクチンの標準的な投与の代替案として、核酸ワクチン注射技術("核酸免疫化"、"遺伝的免疫化"及び"遺伝子免疫化"としても知られる)は、多くの興味ある特徴を提供する。

まず、従来のワクチン法と対比して、核酸ワクチン注射は、免疫原性剤の資源を消費するような大規模製造(例えば、修飾アミロイド産生ポリペプチドを製造する微生物の産業規模の発酵形態)を必要としない。さらに、装置の清浄化及び免疫原の再生スキームの必要がない。最後に、核酸ワクチン注射は、ワクチン注射した個体の生化学的器官に依存して導入した核酸の発現生成物を生ずるため、発現生成物について最適な翻訳後プロセッシングが起こることが期待される。これ

は、自家ワクチン注射の場合には特に重要である。なぜなら、上記したように、最初のB-細胞エピトープに関し有意なフラクションは修飾分子で保持されるべきであり、B-細胞エピトープは原則としていずれかの(生体)分子の部分(例えば炭水化物、脂質、タンパク質など)によって構成できるからである。したがって、免疫原の天然のグリコシル化及び脂質化パターンは免疫原性全体に極めて重要であり、これは宿主に免疫原を生じさせることによって最も確実となる。

【0087】

したがって、本発明の好ましい実施態様は、修飾アミロイド産生ポリペプチドをエンコードする核酸を動物細胞に導入し、それにより、導入された核酸に関し細胞でインビボ発現をさせることによる、免疫系への修飾アミロイド産生ポリペプチドの提示からなる。

この実施態様において、導入された核酸は、裸のDNA、荷電又は非荷電脂質で製剤化したDNA、リポソームで製剤化したDNA、ウイルスベクターに含めたDNA、トランスフェクション促進タンパク質又はポリペプチドで製剤化したDNA、標的タンパク質又はポリペプチドで製剤化したDNA、カルシウム沈殿剤で製剤化したDNA、不活性担体分子に結合したDNA、ポリマー、例えばPLGA(WO98/31398に記載のマイクロカプセル化技術参照)又はキチンもしくはキトサンでカプセル化したDNAならびにアジュバントで製剤化したDNAの形態になり得るDNAであることが好ましい。本文において、従来のワクチン処方におけるアジュバントの使用に関するほとんど全ての考察が、DNAワクチンの処方に適用されることに留意されたい。したがって、ポリペプチドベースワクチンに関連したアジュバントの使用に関するここでの全ての開示は、必要な変更を加えて、核酸ワクチン注射技術におけるその使用に適用される。

【0088】

上記のポリペプチドベースワクチンの投与経路及び投与スキームに関する限りは、本発明の核酸ワクチンにも適用可能であり、ポリペプチドについての投与経路及び投与スキームに適する上記の論議は全て、必要な変更を加えて核酸に適用される。このことに、核酸ワクチンが静脈内及び動脈内で適当に投与され得ることが追記される。さらに、核酸ワクチンがいわゆる遺伝子銃の使用で投与でき、

それ故に、この方法及び等価な投与方法が本発明の一部としてみなされることは、当該分野で周知である。最後に、核酸の投与でVLNを使用することも良い結果をもたらすことが報告されており、したがって、この特異的な投与方法が特に好ましい。

さらに、免疫化剤として使用される核酸は、例えば有用なアジュバントとして論じたサイトカインのような上記免疫調節物質の形態で、第一、第二及び/又は第三の部分をエンコードする領域を含むことができる。この実施態様の好ましい例には、異なるリーディングフレーム中又は少なくとも異なるプロモーターの制御下で類似体をコードする領域と免疫調節物質をコードする領域を有することが包含される。これにより、類似体又はエピトープが免疫調節物質に対する融合パートナーとして生産されることが回避される。あるいは、2つの異なるヌクレオチドフラグメントを使用することができるが、これは両方のコード領域が同一分子に含まれる際に確実に同時発現されるという利点から、あまり好ましくない。

【0089】

したがって、本発明は、

- 本発明の核酸フラグメント又はベクター(後述のベクターの論述参照)、及び
- 上述の、医薬的かつ免疫学的に受容なビヒクル及び/又は担体及び/又はアジュバント

からなる、アミロイド産生ポリペプチドに対する抗体の産生を誘発する組成物にも関する。

通常の状態では、変異体をエンコードする核酸は、発現がウイルスプロモーター制御下にあるベクターの形態で導入される。本発明によるベクターについてのさらに詳細な論述については、下記の記載を参照のこと。また、核酸ワクチンの処方及び使用に関する詳細な記載も利用可能である：Donnelly JJ ら、1997, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 617-648及びDonnelly JJ ら、1997, *Life Sciences* 60: 163-172を参照のこと。これらの文献は両者ともここに引用して組み込まれる。

【0090】

生ワクチン

免疫系への修飾アミロイド産生ポリペプチドの提示をもたらす第三の代替例は、生ワクチン技術の使用である。生ワクチン注射において、免疫系への提示は、修飾アミロイド産生ポリペプチドをエンコードする核酸フラグメント又はそのような核酸フラグメントを挿入したベクターで形質転換した非病原性微生物を動物に投与することによって行われる。非病原性微生物は、いずれかの適当な弱毒化細菌株(継代培養又は組換えDNA技術による病原性発現生成物の除去によって弱毒化)であってもよく、例えばマイコバクテリウム・ボビスBCG、非病原性ストレプトコッカス種、大腸菌、サルモネラ種、ビブリオ・コレラ、シゲラなどが挙げられる。最先端技術を用いた生ワクチンの調製法に関する考察は、例えば両者ともここに引用して組み込まれるSaliou P, 1995, Rev. Prat. 45: 1492-1496 及び Walker PD, 1992, Vaccine 10: 977-990に見ることができる。このような生ワクチンで使用される核酸フラグメント及びベクターの詳細については、以下の記載を参照のこと。

【0091】

細菌性生ワクチンの別の例として、後述する本発明の核酸フラグメントを非毒性ウイルスワクチンベクター、例えばワクシニア株又はいずれかの他の適当なボックスウイルスに組み込むことができる。

通常、非病原性の微生物又はウイルスは、動物に対して1回だけ投与される。しかし、ある場合においては、免疫保護を維持するために、微生物を一生のうちに1回以上投与する必要があるかもしれない。ポリペプチドワクチン注射について上述したような免疫化スキームは、生ワクチン又はウイルスワクチンを使用する場合に有用であることさえ予期される。

【0092】

あるいは、生又はウイルスのワクチン注射は、前述あるいは後述のポリペプチド及び/又は核酸のワクチン注射と組合わせられる。例えば、ポリペプチド又は核酸のアプローチを用いて、生もしくはウイルスのワクチンで一次免疫化し、次いでブースター免疫化を行うことができる。

微生物又はウイルスは、例えば有用なアジュバントとして記載したサイトカインなどの上記の免疫調節物質の形態で、第一、第二及び/又は第三の部分をエン

コードする領域を含む核酸で形質転換することができる。この実施態様の好ましい例は、異なるリーディングフレームにおいて、又は少なくとも異なるプロモーターの制御下で、類似体のコード領域と免疫調節物質のコード領域を有することを包含する。これにより、類似体又はエピトープが免疫調節物質の融合パートナーとして調製されることが回避される。あるいは、2つの異なるヌクレオチドフラグメントを形質転換剤として使用することができる。当然ながら、本発明の類似体は、発現生成物として同じリーディングフレーム中に第一及び/又は第二及び/又は第三の部分を生じることができるので、このような実施態様は、本発明によれば特に好ましい。

【0093】

疾患治療における本発明の方法の使用

上記から明らかであるように、この発明の方法により、アミロイドの沈着で特徴付けられる疾患を制御することができる。この明細書において、ADはこの発明の方法の主たる目標であるが、アミロイドの沈着によって特徴付けられる他の疾患も実行可能な目標である。つまり、アミロイド活性をダウン-レギュレートするためのこの発明の方法の重要な具体例は、アミロイドの量が有意に低下される程度に、この発明によってアミロイドをダウン-レギュレートすることからなる、AD又はアミロイドの沈着によって特徴付けられる他の疾患を治療及び/又は予防及び/又は緩和することからなる。

アミロイドの低下により、アミロイドの形成とアミロイドの分解/除去との均衡を逆にすること、つまりアミロイドの分解/除去の割合がアミロイド形成の割合を超えることが特に好ましい。必要のある個体の免疫化に関し回数及び免疫学的衝撃を注意深く制御することによって、時間をかけて平衡を獲得し、その結果、過剰な副作用なしにアミロイドの沈着について正味の低下を生じることができる。

【0094】

あるいは、個体において、この発明の方法が既存のアミロイドの沈着を除いたり、又は低下させることができなければ、この発明の方法を用いて、新たなアミロイドの形成を臨床上有意に低下させ、それにより、疾患状態が衰弱させない時

間を有意に延長することができる。(沈着物質と平衡していると考えられる)アミロイドの血清濃度を測定するか、又はポジトロン放射形断層撮影法(PET)走査を用いることにより、アミロイドの沈着速度をモニターすることができるはずである(Small GWら、1996, Ann N Y Acad Sci 802: 70-78参照)。

この手段及び方法が同様の方法で治療又は緩和に用いられる他の疾患及び症状は、「発明の背景」に上記しているか(全身性アミロイド症、成人発症型糖尿病、パーキンソン病、ハンチントン病、前頭側頭骨痴呆及びプリオン関連伝染性海綿状脳症)、又は「関連する他のアミロイド疾患及びタンパク質」と題する項目に示している。

【0095】

本発明のペプチド、ポリペプチド及び組成物

上記から明らかであるように、本発明は、病状に関連するアミロイドの沈着量を低下させるため、アミロイド産生抗原に対して個体を免疫化するとの概念に基づいている。このような免疫化を生ずるのに好ましい方法は、アミロイド産生ポリペプチドの修飾変異型を使用し、それにより当該分野でこれまでに開示されていない分子を提供することである。

ここで論じられる修飾分子はそれ自体が発明であり、それ故に、本発明の重要な部分は、修飾が導入された、動物のアミロイド産生ポリペプチド由来の類似体に関するものと考えられる。結果として、類似体での動物の免疫化により非修飾アミロイド産生ポリペプチドと特異的に反応性の抗体の産生が誘発される。好ましくは、修飾の性質は、修飾アミロイド産生ポリペプチドを用いる際の本発明の方法の種々の実施態様を論じる場合の上記修飾型に適合している。したがって、修飾アミロイド産生分子に関してここに示す開示は、いずれも本発明のアミロイド産生類似体を記載する目的に関連しており、このような開示はいずれも、これらの類似体の記載に変更を加えて適用される。

【0096】

好ましい修飾アミロイド産生分子は、アミロイド産生タンパク質又は少なくとも10アミノ酸長のそのサブ配列と配列が少なくとも70%同一のポリペプチドを生じる修飾を含むことに留意されたい。配列同一性はより高いことが好ましく、例

例えば少なくとも75%又は少なくとも80%、85%、90%もしくは95%でさえある。タンパク質及び核酸の配列同一性は、 $(N_{ref} - N_{dif}) \cdot 100 / N_{ref}$ (式中、 N_{dif} は、アラインしている際の2つの配列における非同一致残基総数、 N_{ref} は一方の配列における残基数) として計算され得る。従って、DNA配列AGTCAGTCは、配列AATCAATC ($N_{dif}=2$ 及び $N_{ref}=8$)と75%の配列同一性を有するであろう。

また、本発明は、本発明の方法の実行に有用な組成物に関する。したがって、本発明は、動物で自己タンパク質であるアミロイド産性ポリペプチドの免疫学的に有効な量からなる免疫原性組成物にも関する。このアミロイド産性ポリペプチドは、アミロイド産性ポリペプチドに対する動物の自己耐性を破壊するように、免疫学的に受容なアジュバントとともに処方される。組成物は、さらに、医薬的及び免疫学的に受容な希釈剤及び/又はビヒクル及び/又は担体及び/又は賦形剤からなる。言い換えれば、本発明のこの一部は、本発明の方法の実施態様に関連して記載される天然に存在するアミロイド産性ポリペプチドの処方に関する。

【0097】

また、本発明は、免疫学的に有効な量の上記類似体からなる免疫原性組成物に関する。この組成物は、さらに医薬的及び免疫学的に受容な希釈剤及び/又はビヒクル及び/又は担体及び/又は賦形剤及び任意のアジュバントからなる。言い換えれば、本発明のこの一部は、本質的に上述するように、修飾アミロイド産性ポリペプチドの処方に関する。したがって、アジュバント、担体及びビヒクルの選択は、アミロイドをダウン-レギュレーションするために発明の方法で用いられる修飾及び非修飾のアミロイド産性ポリペプチドの処方に言及する際に上述したことと一致する。

ポリペプチドは、当該分野で周知の方法にしたがって調製される。通常は、類似体をエンコードする核酸配列の適当なベクターへの導入、ベクターでの適当な宿主細胞の形質転換、核酸配列の宿主細胞による発現、宿主細胞又はそれらの培養上清からの発現生成物の回収、その後の精製及び任意のさらなる修飾、例えば再生又は誘導化を含む組換え遺伝子技術により、より長いポリペプチドが調製される。

好ましくは、固相又は液相のペプチド合成の周知技術によって、より短いペプ

チドが調製される。しかし、この技術での近年の進歩により、これらの手段による全長ポリペプチド及びタンパク質の生産が可能となっており、したがって、合成手段による長い構築物の調製も本発明の範囲内である。

【0098】

発明の核酸フラグメント及びベクター

修飾アミロイド産生ポリペプチドが組換え遺伝子技術のみならず化学合成又は半合成によっても調製できることが上記の開示から理解できるであろう。この後者2つの選択肢は、修飾がタンパク質担体（例えばKLH、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド及びBSA）及び炭水化物ポリマーのような非タンパク質分子に結合することからなる場合、また、当然のことながら修飾が側鎖又は側基のアミロイド産生ポリペプチド由来ペプチド鎖への付加からなる場合、特に適切である。

遺伝子組換え技術のために、また当然のことながら核酸免疫化のために、修飾アミロイド産生ポリペプチドをエンコードする核酸フラグメントは重要な化学生成物である。従って、発明の重要な部分は、アミロイド産生ポリペプチドの類似体をエンコードする核酸フラグメント、つまり融合パートナーを加えるか、もしくはこれを挿入した天然の配列からなるアミロイド産生ポリペプチド由来ポリペプチド、好ましくは、挿入及び/又は付加、好ましくは置換及び/又は欠失によって外来T-細胞エпитープを導入したアミロイド産生ポリペプチド由来ポリペプチドに関する。発明の核酸フラグメントは、DNA又はRNAフラグメントのいずれかである。

【0099】

本発明の核酸フラグメントは、通常適切なベクターに挿入されて発明の核酸フラグメントを有するクローニング又は発現ベクターを形成する。このような新規なベクターもまた発明の一部である。本発明のこれらのベクターの構築に関する詳細は、形質転換細胞及び微生物との関連で下記に記載する。ベクターは用途の目的及び種類に応じてプラスミド、ファージ、コスミド、ミニ染色体又はウイルスの形態であってよいが、ある種の細胞で一時的に発現されるにすぎない裸のDNAも重要なベクターである。本発明の好ましいクローニング及び発現ベクターは

自律複製でき、後のクローニング用の高レベルの発現又は高レベルの複製のために高いコピー数を可能にする。

【0100】

本発明のベクターの概要は、5'→3'方向及び操作可能な連鎖において次の特徴を含む：本発明の核酸フラグメントの発現を駆動するプロモーター、ポリペプチドフラグメントの(細胞外相又は適用可能な場合には、細胞周辺腔への)分泌あるいは膜への組み込みを可能にするリーダーペプチドをエンコードする任意の核酸配列、本発明の核酸フラグメント、及び任意に転写終結区をエンコードする核酸配列。産生株あるいは細胞系で発現ベクターを操作する場合、宿主細胞への導入時にベクターを宿主細胞ゲノムに組み込むことが、形質転換細胞の遺伝的安定性のために好ましい。一方、動物でのインビボ発現を行うために使用されるベクターを用いて操作する場合(即ち、DNAワクチン注射にベクターを用いる場合)は、ベクターが宿主細胞ゲノムに組込まれ得ないことが安全性のため好ましい。通常、裸のDNA又は非組込み型ウイルスベクターが用いられる。これらの選択は当業者には周知である。

【0101】

本発明のベクターは、宿主細胞を形質転換し、本発明の修飾アミロイド産生ポリペプチドを産生するのに用いられる。そのような形質転換細胞も発明の一部であり、本発明の核酸フラグメント及びベクターの増殖に用いられるか又は本発明の修飾アミロイド産生ポリペプチドの組換え産生に用いられる培養細胞あるいは細胞系であってもよい。あるいは、形質転換細胞は、細菌膜や細胞壁への修飾アミロイド産生ポリペプチドの分泌又は組込みを行うように核酸フラグメント(単コピーあるいは多コピー)が挿入された適切な生ワクチン株であってもよい。

本発明の好ましい形質転換細胞は、細菌(エシェリキア種(例えば大腸菌)、バチルス(例えば、バチルス・ズブチリス)、サルモネラ菌又はマイコバクテリウム(好ましくは非病原性のもの、例えば、エム・ボビスBCG))、酵母(例えばサッカロマイセス・セレビジエ)等の微生物及び原生動物である。あるいは、形質転換細胞は、真菌、昆虫細胞、植物細胞又は哺乳動物細胞等の多細胞生物由来のものである。ヒト由来の細胞が、極めて好ましい(以下の細胞系及びベクターについて

の議論参照)。最近の結果は、出願人の研究のポリペプチドの組換え産生には、市場で入手可能な*Drosophila melanogaster*細胞系(Invitrogenより入手可能なScneider 2 (S₂)細胞系及びベクター系)の使用がかなり有望であることを示しており、したがって、この発現系が特に好ましい。

【0102】

クローニング及び/又は最適発現のために、形質転換細胞が本発明の核酸配列を複製できることが好ましい。核酸フラグメントを発現する細胞は、本発明の好ましい有用な実施態様である。それらは、修飾アミロイド産生ポリペプチドの小規模あるいは大規模調製や、非病原性細菌の場合には、生ワクチンのワクチン成分として用いることができる。

形質転換細胞によって本発明の修飾分子を産生する場合、発現生成物を培養培地に運び出すか形質転換細胞表面に保持することが便利であるが、かならずしも必須ではない。

有効な産生細胞を同定した際には、それに基づいて、本発明のベクターを担持し、修飾アミロイド産生ポリペプチドをエンコードする核酸フラグメントを発現する安定な細胞系を確立することが好ましい。この安定な細胞系は、本発明の類似体を分泌あるいは担持することによってその精製を簡単にするのが好ましい。

【0103】

一般に、宿主細胞と和合性の種由来のレプリコン及びコントロール配列を含むプラスミドベクターが、宿主と組み合わせて用いられる。ベクターは元来複製部位と、形質転換細胞に表現型の選択を与えることができるマーキング配列とを有する。例えば、大腸菌は、通常大腸菌種由来のプラスミドpBR322を用いて形質転換される(例えば、Bolivarら、1977参照)。pBR322プラスミドはアンピシリン及びテトラサイクリン耐性遺伝子を含み、このために形質転換細胞の同定に簡単な手段を提供している。pBRプラスミド又は他の微生物プラスミドもしくはファージも、発現のために原核微生物によって用いられるプロモーターを含むか、あるいは含むように修飾する必要がある。

【0104】

組換えDNAの構築に最も一般的に用いられるプロモーターには、 β -ラクタマー

ゼ(ペニシリナーゼ)及びラクトースプロモーター系(Changら、1978; Itakuraら、1977; Goeddelら、1979)及びトリプトファン(trp)プロモーター系が含まれる(Goeddelら、1979; EP-A-0 036 776)。これらが最も普通に用いられる一方、他の微生物プロモーターが発見され利用されている。それらのヌクレオチド配列については詳細が公表されており、当業者はそれらをプラスミドベクターと機能的に結合することができる(Siebenlistら、1980)。原核生物由来のある種の遺伝子は人工的な手段で別のプロモーターを付加する必要がなく、それ自体のプロモーター配列から大腸菌中で効率的に発現され得る。

【0105】

原核生物に加えて酵母培養物のような真核微生物もまた使用でき、ここでもプロモーターが発現を駆動できるはずである。サッカロマイセス・セレビジエあるいは通常のパン酵母が真核微生物の中で最も普通に用いられるが、いくつかの他の株も一般に利用可能である。サッカロマイセスでの発現には、例えばプラスミドYRp7が通常用いられる(Stinchcombら、1979; Kingsmanら、1979; Tschemperら、1980)。このプラスミドはtrp1遺伝子をすでに含んでおり、これにより例えばATCC No. 44076あるいはPEP4-1のようなトリプトファン中で成長できる能力を欠く酵母変異株に選択的なマーカーを提供している(Jones, 1977)。酵母宿主細胞ゲノムの特徴としてのtrp1欠陥の存在は、次いで、トリプトファン不在下での成長によって形質転換を検出する有効な環境となる。

【0106】

酵母ベクター中の適切なプロモーター配列には、3-ホスホグリセレートキナーゼ(Hitzmanら、1980)又は他の解糖酵素(Hessら、1968; Hollandら、1978)、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルベートキナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼのプロモーターが含まれる。適切な発現プラスミドの構築では、mRNAのポリアデニル化と終結を生じるように、これらの遺伝子に関連する終結配列も発現が望まれる配列の発現ベクター3'に結合される。

成長条件によって転写が制御されるという別の利点を有する他のプロモーターには、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシトクロームC、酸ホスファターゼ、窒素代謝関連分解酵素、及び上記のグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、マルトース及びガラクトース利用を担う酵素のプロモーター領域がある。酵母和合性プロモーター、複製起点及び終結配列を含むプラスミドベクターは、いずれも適切である。

【0107】

微生物に加えて、多細胞生物由来の細胞培養物を宿主として用いてもよい。原則として、そのような細胞培養物は、脊椎動物の培養物であれ無脊椎動物の培養物であれ、いずれも使用可能である。しかしながら、脊椎動物細胞に対する関心が大きく、培養での脊椎動物の増殖(組織培養)は近年常套手段となっている(Tissue Culture, 1973)。そのような有益な宿主細胞系の例は、VERO及びHeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞系、及びW138、BHK、COS-7 293、Spodoptera frugiperda(SF)細胞(Protein Sciences, 1000 Research Parkway, Meriden, CT 064450, U.S.A.及びInvitrogenから完全な発現系として市場で入手可能)及びMDCK細胞系である。本発明において、特に好ましい細胞系はInvitrogen (PO Box 2312, 9704 CH Groningen, オランダ)から入手可能なS₂である。

このような細胞用の発現ベクターは、通常(必要であれば)複製起点、発現すべき遺伝子の前に位置するプロモーター、いずれかの必要なリボソーム結合部位と共に、RNAプライス部位、ポリアデニル化部位及び転移終結配列を含む。

【0108】

哺乳動物細胞で用いるため、コントロール機能がウイルス性の材料によって発現ベクターにしばしば付与される。例えば、通常使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウィルス2、最も頻繁にはシミアンウィルス40 (SV40)由来である。SV40ウィルスの初期及び後期プロモーターは、いずれもSV40ウィルスの複製起点も含むフラグメントとしてウイルスから簡単に得ることができるので、特に有用である(Fiers ら, 1978)。HindIII部位からウイルスの複製起点に位置するBglII部位に向かって伸びる約250bpの配列を含む場合には、より小さいかより大きいSV40フラグメントを使用してもよい。さらに、所望の遺伝子配列と通常結合し

ているプロモーターあるいはコントロール配列を利用することも、そのようなコントロール配列が宿主細胞系と和合性であれば、可能であるし、利用することがしばしば望ましい。

複製起点は、ベクターを構築して外来の起点、例えばSV40やその他のウイルス(例えばポリオーマ、アデノ、VSV、BPV)由来であり得る起点を含むように生じてもよいし、宿主細胞染色体複製機構により生じてもよい。ベクターが宿主細胞染色体に組み込まれるのであれば、後者で十分であることがよくある。

【0109】

有用な類似体の同定

天然に存在するアミロイド産生ポリペプチドの潜在的な変異体又は修飾体の全てが天然型と交差反応性の動物で抗体を誘発する能力を有しているとは限らないことは、当業者には明らかであろう。しかし、ここに論じる免疫学的反応性の最小限の要件を満たす修飾アミロイド産生分子について有効な標準的なスクリーンを行うことは、難しくはない。つまり、本発明の別の観点は、非修飾アミロイド産生ポリペプチドが(非免疫原性の)自己タンパク質である動物種で非修飾アミロイド産生ポリペプチドに対する抗体を誘発し得る修飾アミロイド産生ポリペプチドの同定方法に関する。その方法は、

- 動物種のアミロイド産生ポリペプチドのアミノ酸配列にアミノ酸が付加され、挿入され、それから欠失されているか、又は置換されている、相互に異なる修飾アミロイド産生ポリペプチドのセットをペプチド合成又は遺伝子工学的な技術により調製し、それにより、動物種に外来のT-細胞エピトープからなるセットでアミノ酸配列を生じるか、又は相互に異なる修飾アミロイド産生ポリペプチドのセットをエンコードする核酸フラグメントのセットを調製し、
- 非修飾アミロイド産生ポリペプチドに対する動物種による抗体産生を誘発する能力について修飾アミロイド産生ポリペプチド又は核酸フラグメントのセットのメンバーを試験し、かつ
- 上記の種における非修飾アミロイド産生ポリペプチドに対する抗体産生を有意に誘発する修飾アミロイド産生ポリペプチドのセットのメンバーを同定し、任意に単離するか、又は動物種における非修飾アミロイド産生ポリペプチドに対す

る抗体産生を有意に誘発する核酸フラグメントのセットのメンバーでエンコードされるポリペプチド発現産物を同定し、任意に単離することからなる。

【0110】

本文で、「相互に異なる修飾アミロイド産生ポリペプチドのセット」は、例えば上記の基準(例えば円二色、NMRスペクトル及び/又はX-線回折パターン研究との組合わせ)に基づいて選択される非同一の修飾アミロイド産生ポリペプチドの集団である。このセットはごくわずかなメンバーからなっているが、数100のメンバーを含むことも考えられる。

セットのメンバーの試験は最終的にはインビボで行うことができるが、数回のインビトロ試験により、本発明の目的に役立つと思われる修飾分子数を絞り込むことができる。

【0111】

外来T-細胞エピトープを導入する目的はT-細胞の助力でB-細胞の応答を支持することであるので、T-細胞の増殖が修飾アミロイド産生ポリペプチドによって誘発されることが必須要件である。T-細胞の増殖は、インビトロで標準的な増殖アッセイによって試験することができる。手短に言えば、T-細胞を増強した試料は被験者から得て、その後培養して保持される。培養したT-細胞を、修飾分子を予め回収(take up)している被験者のAPCと接触させ、処理して、そのT-細胞エピトープを提示する。T-細胞の増殖をモニターし、適当な対照(例えば無傷で天然のアミロイド産生ポリペプチドを処理したAPCと接触した培養中のT-細胞)と比較する。あるいは、増殖は、外来T-細胞の認識に応じてT-細胞によって放出される関連するサイトカインの濃度を計測して測定することができる。

【0112】

どちらかのタイプのセットの少なくとも1つの修飾アミロイド産生ポリペプチドがアミロイド産生ポリペプチドに対する抗体産生を誘発できる可能性はかなり高いので、非修飾アミロイド産生ポリペプチドが自己タンパク質である動物種において非修飾アミロイド産生ポリペプチドに対する抗体を誘発できる修飾アミロイドポリペプチドの少なくとも1つからなる免疫原性組成物を調製することがで

きる。その方法は、アミロイド産生ポリペプチドと反応性の動物種における抗体産生を有意に誘発するセットのメンバーを、医薬的及び免疫学的に受容なアジュバントの少なくとも1つと任意に組合わせて、医薬的及び免疫学的に受容な担体及び/又はビヒクル及び/又は希釈剤及び/又は賦形剤と混合することからなる。

ポリペプチドのセットの試験に関する本発明の上記の観点は、本発明の相互に異なる核酸配列又はベクターを幾つか最初に調製し、これらを適当な発現ベクターに挿入し、適当な宿主細胞(又は宿主動物)をベクターで形質転換し、かつ本発明の核酸配列を発現させて簡便に行われる。これらの工程に続いて、発現生成物を単離してもよい。核酸配列及び/又はベクターは、PCRのような分子増幅技術の実施からなる方法又は核酸合成の手段により調製することが好ましい。

【0113】

特異的なアミロイド産生標的

アルツハイマーにもっともしばしば関連するタンパク質、APP、ApoE4 及びタウに加えて、AD脳のプラーク又は神経細線維もつれに直接存在することによって、又は進行中のADの危険性の増加を伴う明らかな遺伝上の関連性によって、ADに幾らか関連している他のタンパク質に関し長いリストがある。全てではなくとも、これらの抗原の大部分は、上記の $A\beta$ 、APP、プレセニリン及びApoE4とともに本発明の推定上の標的タンパク質である。

$\alpha 1$ -抗キモトリプシン(ACT)はSPの主成分で、AD及び脳血管アミロイド症(CA)の病変の病因において重要な役割を果たすことが示唆されている(Acta neuropathol, 1998, 96: 628-36)。それはインビトロで $A\beta$ と相互作用し、 $A\beta$ -42原線維の形成と崩壊の双方を刺激する(JBC, 1998, 273: 28360-4)。

【0114】

$\alpha 2$ -マクログロブリンは、AD脳のプラークコアを免疫染色することによって認められた。 β -サブユニットからのトランスメンブランフラグメントはプラークコアで認められるが、可溶性の α フラグメントはプラークでは細胞外で認められた(Acta neuropathol, 1998, 96: 628-36 及びBrain Res., 1997, 777: 223-227)。

ABAD ($A\beta$ -ペプチド結合アルコール脱水素酵素)は、細胞内で $A\beta$ と結合する。そ

れは、正常な細胞に存在する神経酵素であるが、ADの影響を受けたニューロンで過剰発現される。 $A\beta$ は、ABADを過剰発現する細胞に毒性が高い。ABADは、X-染色体に関連している(Yan, 1997, Nature 389)。

APLP1 及び -2 (アミロイド前駆体様タンパク質1 及び -2): いずれのタンパク質もAPP 同族体スーパー-ファミリータンパク質に属するが、 $A\beta$ ペプチド領域を欠いている。それにもかかわらず、神経炎のプラークのAPPIは著しく染色される(Acta Neuropathol, 1997, 94: 519-524)。

【0115】

AMY117は、ADの人の脳のプラーク様病変で新たに発見されたタンパク質で、数が多く、はびこっており、疾患に「高度に特異的」であると思われる。タンパク質

AMY117は、これらのプラークを形成することによってADの発症と進行に重要な役割を果たしていると考えられる。興味深いことに、AMY117を含むプラークは $A\beta$ を含むプラークと同時に局在せず、この結果、周知の $A\beta$ を含むプラーク及びタウを含む神経細線維もつれに加えて、ADの新たな特徴を明確にしている。AMY117-陽性のプラークは、ADの海綿状症例の脳やダウン症候群の人の脳には多く見られるが、対照及び他の神経変性疾患の脳では「稀であるか、全くない」(Am J Pathol 1997; 151: 69,80)。

Bax: モノクローナル抗体により、ADの脳の老人性プラークの成分としてBaxが検出された。これも、異栄養性神経突起で過剰発現される(Acta Neuropathol. 1998, 95: 407-412)。

【0116】

Bcl-2 は、役割が不明である。プラークの周囲のグリア細胞で過剰発現される(Acta Neuropathol. 1998, 95: 407-412)。

プレオマイシンヒドロラーゼは、おそらく β -セクレターゼである。抗プレオマイシンヒドロラーゼの免疫反応性は、ADのSPで認められている(Brain Res. 1999, 830: 200-202)。あるプレオマイシンヒドロラーゼの遺伝子型は、幾つかの場合でADを発症させる危険性を増加させるが、他の場合には、相関関係が認められない(Ann Neurol, 1998, 44: 808-811 及びAnn Neurol, 1999, 46: 136-137)。

BRI/ABRI: ABRI は、家族性英国痴呆(FBD)の人のアミロイドプラークで認められ

る第13染色体のBRI遺伝子によってエンコードされる、推定上のトランスメンブランタンパク質の4 kDフラグメントである。これらの患者は、長いオープンリーディングフレームを生じるBRI遺伝子について停止コドンに突然変異を有する。改変されたタンパク質の34カルボキシ末端アミノ酸の放出は、ABRI アミロイドサブユニットを生じる。ABRIに対する抗体は、FBD患者の脳の実質細胞と血管双方の病変を認識する。ABRIペプチドはアミロイド原線維として沈着し、生じるプラークは、神経機能障害とFBDを特徴付ける痴呆をもたらすと考えられる(Vidal, R ら、1999, Nature 399)。

【0117】

クロモグラニンAは、幾つかの広汎性のアミロイド沈着及びこれらの周辺の異栄養性の神経突起で認められている(Brain Res, 1991, 539: 143-50)。

クルステリン(Clusterin)/apoJ: これは、AD及びスクレイピーのような変性疾患の多くの症例で過剰発現されるため、分子生物学の種々の領域の研究室で特異的にスクリーニングすることにより頻繁に単離された遺伝子である(Biochem J 1997 Nov 15;328(1):45-50 Michel D, Chatelain G, North S, Brun G)。

CRF (コルチコトロピン放出因子)結合タンパク質は、脳におけるストレス応答の重要な制御因子である41 aa CRF ペプチドを結合する。大部分のCRFはCRF 結合タンパク質によって結合されるので、CRF結合タンパク質を(免疫療法によって)除去することは、遊離CRFのレベルを増し、ADに対しポジティブな作用を有すると考えられる(Behan, 1997, J. Neurochemistry, 68: 2053-2060)。

【0118】

EDTF (内皮由来毒性因子): AD患者の微細血管によって産生されるタンパク質。神経細胞に特異的に毒性(WO 99/24468)。

ヘパラン硫酸プロテオグリカンは、SPのA β と同時に局在することが明らかにされている。ラットの研究から、ヘパラン硫酸グリコサミノグリカンは、アミロイド線維の形成に必要なことが示されている(Neuron, 1994, 12: 219-234 及び Acta neuropathol, 1998, 96: 628-36)。

ヒトコラプシン反応媒介タンパク質-2は、モノクローナル抗体によって神経細線維もつれで認識される65 kDaのタンパク質である。神経細線維もつれへの編入は

可溶性タンパク質を涸渇させ、異常な神経炎の進行をもたらし、この結果、神経の変性を加速する(JBC, 1998, 273: 9761-8)。

ハンチントン(ハンチントン病タンパク質): HDにおいて、ハンチントンタンパク質は、ポリグルタミンでN-末端を拡大されている。この形態のハンチントンは、ADの脳のNFTやピック症でも認められる(Exp. Neurol, 1998, 150: 213-222)。

【0119】

ICAM-1は、SPに蓄積される(Acta neuropathol, 1998, 96: 628-36 及びAm. J Pathol. 1994, 144: 104-16)。

IL-6は、神経原線維の変化に関連し、プラークの中心で認められる。ADでの誘発事象であることが提案されている。A β の活性ペプチド25-35 によって星細胞で強力に増幅される(Brain Res., 1997, 777: 223-227 及び Behav Brain Res, 1996, 78: 37-41)。

リソソーム-関連抗原CD68は、NFTとSPで抗体KP-1 によって認識される。したがって、リソソームは、神経細線維もつれとプラークの形成で役割を果たしていると思われる(Dement Geriatr Cogn Disord, 1998, 9: 13-19)。

P21 rasは、ADの発症の初期段階でみられる増殖因子とマイトジェンの増加の一次段階として関与する(Neuroscience, 1999, 91: 1-5)。

【0120】

PLC-デルタ1 (ホスホリパーゼC イソ酵素デルタ1)は、NFTとプラークコア周辺の神経突起に異常に蓄積される。細胞内である(Alzheimer Dis Assoc Disord, 1995, 9: 15-22)。

血清アミロイドP 成分(SAP)は、ADを含む、全てのタイプのアミロイド沈着に存在する正常な血漿要素である(JBC, 1995, 270: 26041-4)。それは、SPとNFTの双方に認められる。幾つかの研究では、A β の凝集を促進し、原線維のタンパク質分解を妨げることが示されている(Biochem Biophys Res commun, 1995, 211: 349v - 53 及びPNAS, 1995, 92: 4299-4303)が、別の研究は、SAPがA β 原線維形成を阻害することを示している(JBC, 1995, 270: 26041 - 4)。

シナプトフィシンは、幾つかの広汎性のアミロイド沈着及びこれらの周囲の異栄養性神経突起で認められている(Brain Res, 1991, 539: 143-50)。

【0121】

シヌクライン(Synuclein) (α -シヌクラインつまりNACP): ADアミロイドの非-A β 成分(NAC)を、AD患者の脳組織から精製したアミロイド中の第二主成分として生化学的に同定した。140アミノ酸長の前駆体、NACPから誘導されるNACは、そのアミノ末端が明らかに決定されていないが、少なくとも35アミノ酸長(NAC35)である。NACモノクローナル抗体はAD脳のSPを免疫染色するが、NACPとは反応しない (Biochemistry 34 (32): 10139-10145 (Aug 15 1995) Iwai A, Yoshimoto M, Masliah E, Saitoh T)。A β 存在下のNAC 自己-オリゴマー。新たな証拠は、アミロイド様の原線維形成とミトコンドリアの機能不全を介したシナプス損傷と神経毒性におけるこの分子の潜在的な役割を指摘している (Brain Pathol 1999 Oct ;9(4):707-20. FEBS Lett, 1998, 421:73-76)。一部のNACPIは、APPのC-末端アミロイドフラグメントとスクレイピープリオンタンパク質(PrPSc)の領域に高いホモロジーを有する。シヌクラインは、パーキンソンの主要な原因因子である (Chem Biol, 1995, 2: 163-9)。

【0122】

TGF- β 1 (トランスフォーミング成長因子 β 1): TGマウスにおける突然変異APPを有するTGF- β 1の過剰発現は、A β の沈着を促進する。したがって、TGF- β 1は、アミロイドプラークの形成を開始又は促進することに関与していると考えられる (Wys-
s-Coray, 1997, Nature 389)。

関連する他のアミロイド疾患及びタンパク質

AD及びAD様疾患(ハンチントン、パーキンソン、FBD 及び他の形態の痴呆)に関与している可能性のある上記タンパク質に加えて、アミロイド形成が疾患を誘発したり、疾患の症状を引き起こすのに関わっているAD以外の疾患は、比較的多数ある。これらの疾患に関わるタンパク質は、性質上は異なるが、アミロイドを特徴付ける同じ性質を共有している(上記参照)。以下の表に、これらのアミロイド疾患と、それらを引き起こすタンパク質を幾つか例示する。

【0123】

【表1】

アミロイド原線維タンパク質の多様性

臨床上の徴候	原線維サブユニット	前駆体構造
脳アミロイドアンギオパチー (CAA)	A β	全て β
モノクローナルタンパク質全身性 (AL) アミロイド症	IG 軽鎖の V ドメインの全長又はフラグメント	全て β
反応性全身性 (AA) アミロイド症	アミロイド A タンパク質の 76-残基 N-末端フラグメント	α/β
家族性アミロイド多発ニューロパシー	トランスチレチン変異体の全長又はフラグメント	全て β
遺伝性 ApoA1 アミロイド症	ApoA1 変異体の N-末端フラグメント (~90 残基)	(α/β)
遺伝性リゾチームアミロイド症	リゾチーム変異体全長	$\alpha + \beta$
II 型真性糖尿病	鳥のアミロイドポリペプチドの 37-残基フラグメント	不明
インシュリン-関連性アミロイド	野生型インシュリン全長	$\alpha + \beta$
伝染性海綿状脳症	プリオンタンパク質の全長又はフラグメント	$\alpha + \beta$
甲状腺髄様癌	カルシトニンのフラグメント	不明
老人性全身性 アミロイド症	トランスチレチンの全長又はフラグメント	全て β
血液透析-関連性アミロイド症	全長, マイクログロブリン野生型 β -2	全て β
単離心房性アミロイド症	心房ナトリウム排泄増加因子	不明
遺伝性脳アミロイドアンギオパチー	シスタチン変異体の 110-残基フラグメント	$\alpha + \beta$
フィンランド遺伝性 アミロイド症	ゲルソリン変異体の 71-残基フラグメント	α/β
遺伝性 フィブリノーゲン a-鎖アミロイド症	フィブリノーゲン a-鎖変異体フラグメント	不明

【0124】

これらのタンパク質は全て、ADに関与するタンパク質のように、ここに提案される免疫化ストラテジの潜在的な標的である。

アミロイド産生ポリペプチドに対する免疫化の多くの方法は、天然のアミロイド産生ポリペプチドと交差反応性の抗体を生じる免疫化に限定されるはずである

と考えられる。それにもかかわらず、幾つかの場合に、アミロイド産生ポリペプチドからMHCクラスIエピトープを提示する細胞に対してCTL応答形態の細胞免疫化を誘発することが興味深い。これは、アミロイド産生ポリペプチド産生細胞の数の低下により、深刻な副作用が生じない場合に好都合であり得る。CTL応答が望ましいような場合には、本出願人のPCT/DK99/00525 (USSN 09/413,186に対応)の示唆を利用することが好ましい。これらの2文献の開示は、ここで参照により導入される。

以下の非限定的な例では、ADに対するA β ベースの自家ワクチンの開発に焦点が絞られている。しかし、ここに記載する原則は、いずれのアミロイドタンパク質にも等しく適用される。

【0125】

実施例1

ADに対する免疫化のための自家ワクチン療法の手法

A β タンパク質ノックアウトマウスが異常性や副作用を全く示さないという事実は、A β の除去又はその量の低下が安全であることを示唆している(Zheng H. (1996))。

トランスジェニック動物をトランスジェニックのヒトA β タンパク質に対して免疫化する公表実験は、自己耐性を破壊できる場合に、A β が自己反応性ワクチンによってダウン-レギュレーションされることを示唆している。これらの実験は、さらに、そのようなA β のダウン-レギュレーションがプラーク形成を妨げ、既に形成されているA β プラークを脳から一掃しさえする可能性があることを示唆している(Schenk ら、(1999)参照)。しかし、伝統的には、自己タンパク質に対して抗体を生ずることはできない。

【0126】

したがって、公表されたデータは、真性の自己タンパク質に対して真性の自己耐性を破壊する手段を提供していない。また、データは、免疫反応が、単独で又は優勢にA β 沈着物に対するもので、必要と思われる場合には、細胞膜結合A β 前駆体タンパク質(APP)に対してはいないことを確実にする方法について情報を提供してもない。既存の技術を用いて得られる免疫反応は、おそらく制御されな

い方法で自己タンパク質に対する免疫応答を生じており、このために、望ましくない過剰な自己反応性がA β タンパク質部分に対して生じる可能性がある。したがって、既存の免疫化ストラテジを用いると、自己タンパク質に対して強力な免疫応答を生じることができない可能性が高く、さらに、CNSにおいて多数の細胞に存在する膜結合APPに対する交差反応性が潜在的に強力であるため、安全でない。

【0127】

この発明は、CNS又は身体の他の部分でプラークを形成し、深刻な疾患を引き起こす可能性のある、真性の自己タンパク質に対し強力な制御された免疫応答を効果的に生じる手段を提供している。安全で効果的なヒトA β タンパク質治療ワクチンは、ADの治療のためにこの技術を用いて開発される。

この観点から、次世紀の健康ケアシステムを損なうと予想される疾患であるADは治癒でき、あるいは記載されるようなワクチンは、症状の治療及びこの疾患の進行に対する有効な治療上の手法を少なくとも構成できると予想される。この技術は、AD及び他の神経変性疾患におけるアミロイド沈着を阻害する完全に新たな免疫学的手法をも示している。

【0128】

以下の表に、35個の考えられる構築物を示す。表に示す位置は全て、APPの開始メチオニン(SEQ ID NO: 2の第一アミノ酸)に対するもので、開始アミノ酸と終了アミノ酸の双方を含む。例えば、672 - 714フラグメントは、672 と714のアミノ酸の双方を含む。P2 とP30についての開始位置及び終了位置は、示した位置(置換に含まれる位置の双方)でのAPPフラグメントの一部をエピトープが置換していることを示す。多くの構築物で、導入されたエピトープは、エピトープ長のフラグメントを置換している。表の*は、以下の意味を有する：

*) P2とP30に唯一の位置は、エピトープが示した位置でAPP誘導体に挿入されていることを示す(エピトープは、所定の位置に隣合うアミノ酸C-末端で開始する)。

**) 構築物34は、P30 とP2それぞれによって分離した3つの同一のAPPフラグメントを含む。

***) 構築物35は、P30 及びP2エピトープを交互にすることによって分離した9つの同一のAPPフラグメントを含む。

【0129】

【表2】

APP AutoVac 構築物					
変異型 No.	APP の laa に対する APP セグメントの開始	APP の laa に対する APP セグメントの終了	APP の laa に対する P2 エピトープの位置	APP の laa に対する P30 エピトープの位置	分子長
1	630	770	656 - 670	635 - 655	141
2	630	714	656 - 670	635 - 655	85
3	672	770	735 - 749	714 - 728	99
4	672	770		714 - 728	99
5	672	770	714 - 728		99
6	672	770	723*	723*	135
7	672	770		723*	120
8	672	770	723*		114
9	672	714		672*	64
10	672	714		714*	64
11	672	714	672*		58
12	672	714	714*		58
13	672	714	714*	672*	58
14	672	714			79
15	672	714	680 - 694	672*	43
16	672	714	685 - 799		43
17	672	714	690 - 704		43
18	672	714	695 - 709		43
19	672	714		675 - 695	43
20	672	714		680 - 700	43
21	672	714		685 - 705	43
22	672	714		690 - 710	43
23	672	714	680*	680*	79
24	672	714	690*	690*	79
25	672	714	700*	700*	79
26	672	714	710*	710*	79
27	672	714		680*	64
28	672	714		690*	64
29	672	714		700*	64
30	672	714	680*	710*	64
31	672	714	690*		58
32	672	714	700*		58
33	672	714	710*		58
34	672	714	反復後 1**	反復後 2**	165
35	672	714	34 x 3*	34 x 3**	165

【0130】

反応を生じるために最も興味深いAPPの部分は、ADの脳においてアミロイドβ

ラークの主要要素である43アミノ酸のA β コアペプチド(A β -43、SEQ ID NO: 2に相当、残基672-714)である。このAPPフラグメントは、上記の全構築物の一部である。

変異型1及び2は、モデルエピトープP2 とP30 が配置するA β -43のAPP上流部位を含む。変異型1 及び3-8 は、全て神経毒性であることが明らかにされているC-100 フラグメント(C-100 フラグメントはSEQ ID NO: 2のアミノ酸残基714-770に相当)を含む。変異型3-5では、エピトープはC-100フラグメントの一部を置換しているが、変異型6-8ではC-100に挿入されている。

【0131】

変異型9-35は、コアのA β -43タンパク質のみを含む。変異型9-13では、P2及びP30はA β -43のいずれかの末端に融合している；14-21では、P2及びP30はA β -43の一部を置換している；22-33では、P2とP30はA β -43に挿入されている；34は、P30とP2によってそれぞれ区切られた3つの同一なA β -43フラグメントを含む；35は、P2 及びP30エピトープを交互にすることによって区切られた9個のA β -43繰り返し体を含む。

詳細については、図1及び上記の表を参照のこと。

さらにあるタイプの構築物が、特に好ましい。この発明のひとつの目的はAPP産生細胞の破壊を避ける一方、A β の除去が望ましいことであるので、APPに存在する場合に、細胞外相に曝されない部分のA β のみからなる自家ワクチン構築物は調製しやすいと思われる。したがって、そのような構築物は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸700-714によって規定されるアミノ酸フラグメントから誘導される少なくとも1つのB-細胞エピトープを含む必要がある。

【0132】

このような短いポリペプチドフラグメントはごく弱い免疫原性であると予想されるので、そのような自家ワクチン構築物は、例えばこの発明の詳細な説明の式Iに示す構造を有する構築物の形態で、B-細胞エピトープの幾つかのコピーからなることが好ましい(上記参照)。式Iの変形で、用語アミロイド_{e1}-アミロイド_{ex}は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸700-714 から得られるアミノ酸配列を含むxのB-細胞エピトープである。好ましい代替例は、アミロイド産生(ポリ)ペプチドと選択

された外来T-ヘルパーエピトープを、多糖類担体分子に結合させるために、アミド結合を介してカップリングさせる上記の可能性であり、SEQ ID NO: 2のアミノ酸700-714によって構築される「弱い」エピトープの複数提示は、こうして実現でき、B-細胞とT-細胞エピトープ間の最適な比率を選択することもできる。

【0133】

実施例2

A β 及びこの発明による修飾タンパク質でのトランスジェニックマウスの免疫化
hAB43+-34をエンコードするDNAの構築 hAB43+-34遺伝子は、数工程で構築した。最初にPCRフラグメントを、鋳型としてプライマーME#800 (SEQ ID NO: 9)を用いてプライマーME#801 (SEQ ID NO: 10)とME#802 (SEQ ID NO: 11)で得た。ME#800は、大腸菌の最適化コドンを含むヒトabeta-43フラグメントをエンコードする。ME#801 と802 により、フラグメントに適切な制限部位を追加する。

PCRフラグメントを精製し、NcoI とHindIIIで消化し、再度精製し、NcoI-HindIII消化し、精製したpET28b+ 大腸菌発現ベクターにクローンする。野生型ヒトA β -43をエンコードする得られたプラスミドを、pAB1と称する。

次工程で、T-ヘルパーエピトープ、P2を分子のC-末端に追加する。プライマーME#806 (SEQ ID NO: 12)は、P2エピトープをエンコードする配列を含み、この結果、PCR反応によってP2 及びAbeta-43の融合物を得る。

【0134】

クローニングは、鋳型としてpAB1を用いてプライマーME#178 (SEQ ID NO: 8)とME#806を含むPCR フラグメントを作成して行った。フラグメントを精製し、NcoIとHindIIIで消化し、再度精製して、NcoI-HindIII消化して精製したpET28b+ベクターにクローンした。得られたプラスミドをpAB2と称する。

同様の方法で、別のT-ヘルパーエピトープ、P30がN-末端に付加したA β -43をエンコードする配列を別のプラスミドにより作成した。これは、鋳型としてpAB1を用いるME#105 (SEQ ID NO: 7) とME#807 (SEQ ID NO: 13)でPCRフラグメントを作成して行った。

フラグメントを精製し、NcoIとHindIIIで消化し、再度精製し、NcoI-HindIII消化して精製したpET28b+ ベクターにクローンした。得られたプラスミドをpAB3

と称する。

【0135】

第三工程で、第二のA β -43繰り返し体を、プライマーME#809 (SEQ ID NO: 14) によりプラスミド pAB2 のP2エピトープにC-末端で付加する。同時に、ME#809により、A β -43繰り返し体の直後にBamHI部位を生じる。PCRフラグメントは、鋳型としてpAB2を用いるプライマーME#178 とME#809で作成した。フラグメントをNcoI と HindIIIで消化し、精製し、NcoI-HindIII消化して精製したpET28b+ ベクターにクローンする。このプラスミドをpAB4と称する。

最後に、pAB3からのP30エピトープ- A β -43繰り返し配列を、pAB4プラスミドにクローンした。これは、鋳型としてpAB3 を用いるプライマーME#811 (SEQ ID NO: 16) 及びME#105でPCRフラグメントを作成して行った。フラグメントを精製し、鋳型としてpAB3を用いるME#810 (SEQ ID NO: 15)で次のPCRでプライマーとして用いた。得られたフラグメントを精製し、BamHI とHindIIIで消化し、BamHI-HindIII消化して精製したpAB4プラスミドにクローンした。得られたプラスミドpAB5は、hAB43+-34 分子をエンコードする。

【0136】

全てのPCR及びクローニング手法は、本質的にSambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989 "Molecular cloning: a laboratory manual". 第2版. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.に記載されるようにして行った。

全てのクローニング方法について、大腸菌K-12 細胞、株Top-10 F' (Stratagene, USA)を用いた。ベクターpET28b+ は、Novagen, USAから購入した。全プライマーをDNA Technology, Denmarkで合成した。

【0137】

hAB43+-34の発現と精製 pAB5によってエンコードされるhAB43+-34 タンパク質を、pET28b+ システム(Novagen)の供給者によって記載されるようにBL21-ゴールド (Novagen)大腸菌細胞で発現させた。

封入体を洗浄し、次いで6 M ユレアの存在下でBioCad 精製ワークステーション(PerSeptive Biosystems, USA)を用いるカチオン交換クロマトグラフィーによって、発現したhAB43+-34 タンパク質を85%以上の純度に精製した。その後、ユ

レアを、ユレアの量を少なくさせた溶液に対する段階透析で除いた。最終的な緩衝液は、10 mM Tris, pH 8.5であった。

免疫化研究 ヒトAPP(アルツハイマー前駆体タンパク質)のトランスジェニックマウスを研究に用いた。TgRND8+と称されるこれらのマウスは突然変異形態のAPPを発現し、マウスの脳で高濃度のA β -40及びA β -42を生じた(Janus, C. ら)。

【0138】

マウス(群当たり8-10マウス)を、Abeta-42 (SEQ ID NO: 2、残基673-714、標準的なFmocストラテジで合成)又はhAB43+-34 変異型(実施例1の表の構築物34、組み換えて生成)のいずれかで2週間隔で4回免疫化した。用量は、A β は100 mgあるいはhAB43+-34は50mgであった。マウスを43日目(3回の注射後)と52日後(4回の注射後)に出血させ、血清を用い、直接的なA β -42 ELISAを用いて抗-A β -42特異的力価のレベルを測定した。

以下の表は、相対的な抗-Abeta-42 力価の平均を示す。

【0139】

【表3】

免疫原	43 日目 (3 回免疫化後)	52 日目 (4 回免疫化後)
A β -42	4000	3000
hAB43+-34	16000	23000

【0140】

明らかであるように、hAB43+-34 A β 変異型で免疫化した際に得られる抗体力価は、3回及び4回の各免疫化後に、免疫原として非変性野生型A β -42 を用いて得られる力価より、それぞれ約4倍及び7.5倍高くなる。この事実は、免疫化に用いる変異型の量が免疫化に用いる野生型配列量の50%にすぎない事実を考慮すれば、さらに正しく理解される。

【0141】

実施例3

架橋剤として活性化ポリ-ヒドロキシポリマーを用いるA β ペプチドコポリマーワクチンの合成

序文 伝統的なワクチン接合体は、担体タンパク質に共有結合した(ポリ)ペプチ

ドからなる。ペプチドはB-細胞エピトープを含み、担体タンパク質はT-ヘルパーエピトープを生じる。しかし、担体タンパク質の大部分は通常T-ヘルパーエピトープの源としては無関係である。というのは、全配列の少数の部分が関連するT-ヘルパーエピトープを含んでいるにすぎないからである。このようなエピトープは、例えば12-15アミノ酸のペプチドとして定義し合成することができる。これらのペプチドがB-細胞エピトープを含むペプチドに、例えば多価活性化ポリ-ヒドロキシポリマーに共有結合していれば、関連部分のみを含むワクチン分子が得られる。さらに、B-細胞とT-細胞のエピトープ間の比が最適化されたワクチン接合体を生ずることができる。

【0142】

アクチケート化(activated)ポリ-ヒドロキシポリマーの合成 デキストラン、澱粉、アガロースなどのポリ-ヒドロキシポリマーは、N-メチルピロリドン(NMP)に溶解した均一な合成物(デキストラン)又は例えばアセトン中の異種合成物(澱粉、アガロース、架橋デキストラン)によって、2,2,2-トリフルオロエタンスルホンクロライド(トレシルクロライド)で活性化することができる。

225 mlの乾燥N-メチルピロリドン(NMP)を、攪拌用の磁気を備えた500mlの丸底フラスコ中の凍結乾燥した水溶性デキストラン(4.5 g, 83 mmol, 臨床用グレード、Mw(avg) 78000)に乾燥条件下で加える。フラスコを、磁気攪拌機を有する60の油浴中に入れる。温度を20分かけて92℃まで上げる。デキストランが溶解したら、フラスコを油浴からすぐに除き、浴中の温度を40℃まで下げる。フラスコを、依然として磁気攪拌機を用いて油浴(oil bath agnom)に入れ、トレシルクロライド(2.764 ml, 25 mmol)を滴下する。15分後、乾燥ピリジン(無水物、2.020 ml, 25 mmol)を滴下する。フラスコを油浴から除き、室温で1時間攪拌する。生成物(トレシル活性化デキストラン、TAD)を1200 mlの冷エタノール(99.9%)中で沈澱させる。上清をデカントし、50 mlのポリプロピレンチューブに2000 rpmの遠心分離で沈殿物を集める。沈殿物を50 mlの0.5%酢酸に溶解し、2回5000 mlの0.5%酢酸に透析し、凍結乾燥する。TADは、凍結乾燥粉末として-20℃で貯蔵することができる。

【0143】

不溶性ポリ-ヒドロキシポリマー、例えばアガロース又は架橋デキストランは、例えばアセトン中でポリ-ヒドロキシポリマー懸濁物を作成して活性化されるトレスルであってもよく、固相合成として合成を行うことができる。活性化ポリ-ヒドロキシポリマーは、濾過で回収することができる。適当な方法は、例えばNilsson K とMosbach K (1987), *Methods in Enzymology* 135, p. 67 及びHermansson GT ら(1992)、"Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, Inc., p. 87に報告されている。

【0144】

A Beta ペプチドコポリマーワクチンの合成 TAD (10 mg)を100 μ lのH₂Oに溶解し、5 mgのA β -42 (SEQ ID NO: 2, 残基673-714)、2.5 mgのP2 (SEQ ID NO: 4) 及び 2.5 mgのP30 (SEQ ID NO: 6)を含む1000 μ l の炭酸緩衝液pH 9.6を加える。A β -42とP2 ならびにP30エピトープは全て保護されたリシン基を含む：これらは、1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキシ-1-イルイデン)エチル(Dde) 保護リシン基の形態である。ペプチドは、従来のFmoc-Lys(Boc)-OH がFmoc-Lys(Dde)-OH (Novabiochemから得られる、カタログ番号04-12-1121)で置換された、つまりリシンの ϵ -アミノ基がBocの代わりにDdeで保護される標準的なFmocストラテジで調製される。

【0145】

pH値を測定し、1 M HClを用いて9.6に調整する。室温で2.5時間後、80%溶液からのヒドラジンを最終ヒドラジン濃度8%に加え、溶液を室温でさらに30分インキュベートし、直後に凍結乾燥する。凍結乾燥品をH₂Oに溶解し、最終的に凍結乾燥する前にH₂Oに対して徹底的に透析する。

最終生成物におけるB-細胞エピトープ(A β)とT-ヘルパーエピトープ(P2及びP30)との比は、合成工程で濃度の異なるこれらのペプチドを用いることによって変えることができる。さらに、最終生成物は、合成工程で炭酸緩衝液にアミン化(aminated)マンノースを加えることによって、(接合体をAPCに標的化するように)例えばマンノースでタグ標識することができる。

不溶性の活性化ポリ-ヒドロキシポリマーを、B-細胞エピトープとT-ヘルパーエピトープを含むペプチドの組合わせに用いる場合には、ポリマーへのカップリ

ングを固相合成として行うことができ、最終生成物は、集めて洗浄と濾過で精製される。

【0146】

引用文献のリスト

- Brookmeyer, R.; Gray, S.; Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer's Disease in the United States and the Public Health Impact of Delaying Disease Onset. *American Journal of Public Health*, 88(9), 1337-1342.
- Buttini, M.; Orth, M.; Belliosta, S.; Akeefe, H.; Pitas, R.E.; Wyss-Coray, T.; Mucke, L.; Mahley, R.W. (1999). Expression of Human Apolipoprotein E3 or E4 in the Brains of Apoe^{-/-} Mice: Isoform-Specific Effects on Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 19, 4867-4880.
- Clark, L.N.; Poorkaj, P.; Wszolek, Z.; Geschwind, D.H.; Nasreddine, Z.S.; Miller, B.; Li, D.; Payami, H.; Awert, F.; Markopoulou, K.; Andreadis, A.; D'Souza, I.; Lee, V.M.; Reed, L.; Trojanowski, J.Q.; Zhukareva, V.; Bird, T.; Schellenberg, G.; Wilhelmsen, K.C. (1998). Pathogenic Implications of Mutations in the Tau Gene in Pallido-Ponto-Nigral Degeneration and Related Neurodegenerative Disorders Linked to Chromosome 17. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 95(22), 13103-13107.
- Gupta, R. K. (1998), *Dev Biol Stand.* 92: 63-78.
- Hsiao K. (1998) Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins", *Exp. Gerontol.* 33 (7-8), 883-889
- Hutton, M.; Lendon, C.L.; Rizzu, P.; Baker, M.; Froelich, S.; Houlden, H.; Pickering-Brown, S.; Chakraborty, S.; Isaacs, A.; Grover, A.; Hackett, J.; Adamson, J.; Lincoln, S.; Dickson, D.; Davies, P.; Petersen, R.C.; Stevens, M.; de Graaff, E.; Wauters, E.; van Baren, J.; Hillebrand, M.; Joosse, M.; Kwon, J.M.; Nowotny, P.; Che, L.K.; Norton, J.; Morris, J.C.; Reed, L.E.; Trojanowski, J.; Basun, H.; Lannfelt, L.; Neystat, M.; Fahn, S.; Dark, F.; Tannenberg, T.; Dodd, P.; Hayward, N.; Kwok, J.B.J.; Schofield, P.R.; Andreadis, A.; Snowden, J.; Craufurd, D.; Neary, D.; Owe

n, F.; Oostra, B.A.; Hardy, J.; Goate, A.; van Swieten, J.; Mann, D.; Lynch, T.; Heutink, P. (1998). Association of Missense and 5'-Splice-Site Mutations in Tau with the Inherited Dementia FTDP-17. *Nature*, 393, 702-705.

Janus, C. (2000), *Nature* 408: 979-982.

Kas, H.S. (1997) *J Microencapsul* 14: 689-711

Leon, J.; Cheng, C.K.; Neumann, P.J. (1998). Alzheimer's Disease Care: Costs and Potential Savings. *Health Affairs*, 17(6), 206-216.

Lippa C. F. (1998) Ab-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. *Lancet* 352, 1117-1118

Luo, J.-J.; Wallace, W.; Riccioni, T.; Ingram, D.K.; Roth, G.S.; Kusiak, J.W. (1999). Death of PC12 Cells and Hippocampal Neurons Induced by Adenoviral-Mediated FAD Human Amyloid Precursor Protein Gene Expression. *Journal of Neuroscience Research*, 55(5), 629-642.

Naruse, S.; Thinakaran, G.; Luo, J.-J.; Kusiak, J.W.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Qian, X.; Ginty, D.D.; Price, D.L.; Borchelt, D.R.; Wong, P.C.; Sisodia, S.S. (1998). Effects of PS1 Deficiency on Membrane Protein Trafficking in Neurons. *Neuron*, 21(5), 1213-1231.

National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999, NIH Publication No. 99-4664.

Pietrobon, P.J. (1995), *Pharm Biotechnol.* 6: 347-61 Poorkaj, P.; Bird, T. D.; Wijsman, E.; Nemens, E.; Garruto, R.M.; Anderson, L.; Andreadis, A.; Wiederhold, W.C.; Raskind, M.; Schellenberg, G.D. (1998). Tau Is a Candidate Gene for Chromosome 17 Frontotemporal Dementia. *Annals of Neurology*, 43, 815-825.

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.; Vandeventer, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games

, D.; Seubert, P. (1999). Immunization with A-beta Attenuates Alzheimer's Disease-Like Pathology in the PDAPP Mouse. *Nature*, 400(6740), 173-177.

Shekunov, B.ら(1999), *J. Crystal Growth* 198/199: 1345 - 1351.

Spillantini, M.G.; Murrell, J.R.; Goedert, M.; Farlow, M.R.; Klug, A.; Ghetti, B. (1998). Mutation in the Tau Gene in Familial Multiple System atrophy with Presenile Dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 95(13), 7737-7741.

Strittmatter, W.J.; Saunders, A.M.; Schmechel, D.; Pericak-Vance, M.; Enghild, J.; Salvesen, G.S.; Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: High-Affinity Binding to AB and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late-Onset Familial Alzheimer Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 90, 1977-1981.

Vidal, R.; Frangione, B.; Rostagno, A.; Mead, S.; Revesz, T.; Plant, G.; Ghiso, J. (1999). A Stop-Codon Mutation in the BRI Gene Associated with Familial British Dementia. *Nature*, 399: 776-781.

Zheng H. (1996) "Mice deficient for the amyloid precursor protein gene. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 777, 421-426.

York, P. (1999), *PSTT* 11: 430-440

【図面の簡単な説明】

【図1】

Aβタンパク質Aβ-43(又はC-100)に対し抗体を反応させるための、アミロイド前駆体タンパク質から誘導されるAutovac変異体の概略図。APPは図の上に概略的に示しており、残りの概略的な構築物は、モデルエピトープP2及びP30が置換されているか、又はAPPの種々の切頭型に挿入されていることを示している。図において、黒色のパターンはAPPシグナル配列を示し、2方向の斜交平行線模様はAPPの細胞外部分、黒色の垂直な陰影はAPPのトランスメンブランドメイン、薄い垂直な陰影はAPPの細胞内ドメイン、目の粗い斜交平行線模様はP30エピトープ、そして細い斜交平行線模様はP2エピトープを示す。実線のボックスはAβ-42/43を示し、実線のボックスと点線のボックスはともにC-100を示す。「Abeta」は、A

βを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> M&E Biotech A/S

<120> Novel Method For Down-Regulation Of Amyloid

<130> F1009PC1

<140>

<141>

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 3.0

<210> 1

<211> 2313

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2313)

<220>

<221> misc_feature

<222> (2098)..(2169)

<223> nucleotides encoding transmembrane region

<220>

<221> misc_feature

<222> (2014)..(2313)

<223> Nucleotides encoding C-100

<220>

<221> misc_feature

<222> (2016)..(2144)

<223> Abeta 42/43

<220>

<221> misc_feature

<222> (2014)..(2142)

<223> Abeta 42/43

<400> 1

atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg ctg gcc gcc tgg acg gct cgg 48

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg

1

5

10

15

ggc ctg gag gta ccc act gat ggt aat gct ggc ctg ctg gct gaa ccc 96

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro

20

25

30

cag att gcc atg ttc tgt ggc aga ctg aac atg cac atg aat gtc cag 144

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln

35

40

45

aat ggg aag tgg gat tca gat cca tca ggg acc aaa acc tgc att gat 192

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp

50

55

60

acc aag gaa ggc atc ctg cag tat tgc caa gaa gtc tac cct gaa ctg 240

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu

65

70

75

80

cag atc acc aat gtg gta gaa gcc aac caa cca gtg acc atc cag aac 288

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn

85

90

95

tgg tgc aag cgg ggc cgc aag cag tgc aag acc cat ccc cac ttt gtg 336

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val

100

105

110

att ccc tac cgc tgc tta gtt ggt gag ttt gta agt gat gcc ctt ctc 384

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu

115

120

125

gtt cct gac aag tgc aaa ttc tta cac cag gag agg atg gat gtt tgc 432

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys

130

135

140

gaa act cat ctt cac tgg cac acc gtc gcc aaa gag aca tgc agt gag	480
Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu	
145 150 155 160	
aag agt acc aac ttg cat gac tac ggc atg ttg ctg ccc tgc gga att	528
Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile	
165 170 175	
gac aag ttc cga ggg gta gag ttt gtg tgt tgc cca ctg gct gaa gaa	576
Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu	
180 185 190	
agt gac aat gtg gat tct gct gat gcg gag gag gat gac tcg gat gtc	624
Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val	
195 200 205	
tgg tgg ggc gga gca gac aca gac tat gca gat ggg agt gaa gac aaa	672
Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys	
210 215 220	
gta gta gaa gta gca gag gag gaa gaa gtg gct gag gtg gaa gaa gaa	720
Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu	
225 230 235 240	
gaa gcc gat gat gac gag gac gat gag gat ggt gat gag gta gag gaa	768
Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu	
245 250 255	
gag gct gag gaa ccc tac gaa gaa gcc aca gag aga acc acc agc att	816
Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile	
260 265 270	
gcc acc acc acc acc acc acc aca gag tct gtg gaa gag gtg gtt cga	864
Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg	
275 280 285	
gag gtg tgc tct gaa caa gcc gag acg ggg ccg tgc cga gca atg atc	912
Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile	
290 295 300	

tcc cgc tgg tac ttt gat gtg act gaa ggg aag tgt gcc cca ttc ttt	960
Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe	
305 310 315 320	
tac ggc gga tgt ggc ggc aac cgg aac aac ttt gac aca gaa gag tac	1008
Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr	
325 330 335	
tgc atg gcc gtg tgt ggc agc gcc atg tcc caa agt tta ctc aag act	1056
Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr	
340 345 350	
acc cag gaa cct ctt gcc cga gat cct gtt aaa ctt cct aca aca gca	1104
Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala	
355 360 365	
gcc agt acc cct gat gcc gtt gac aag tat ctc gag aca cct ggg gat	1152
Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp	
370 375 380	
gag aat gaa cat gcc cat ttc cag aaa gcc aaa gag agg ctt gag gcc	1200
Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala	
385 390 395 400	
aag cac cga gag aga atg tcc cag gtc atg aga gaa tgg gaa gag gca	1248
Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala	
405 410 415	
gaa cgt caa gca aag aac ttg cct aaa gct gat aag aag gca gtt atc	1296
Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile	
420 425 430	
cag cat ttc cag gag aaa gtg gaa tct ttg gaa cag gaa gca gcc aac	1344
Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn	
435 440 445	
gag aga cag cag ctg gtg gag aca cac atg gcc aga gtg gaa gcc atg	1392
Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met	
450 455 460	

ctc aat gac cgc cgc ctc ggc ctg gag aac tac atc acc gct ctg	1490
Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu	
465 470 475 480	
cag gct gtt cct cct cgg cct cgt cac gtg ttc aat atg cta aag aag	1488
Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys	
485 490 495	
tat gtc cgc gca gaa cag aag gac aga cag cac acc cta aag cat ttc	1536
Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe	
500 505 510	
gag cat gtg cgc atg gtg gat ccc aag aaa gcc gct cag atc cgg tcc	1584
Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser	
515 520 525	
cag gtt atg aca cac ctc cgt gtg att tat gag cgc atg aat cag tct	1632
Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser	
530 535 540	
ctc tcc ctg ctc tac aac gtg cct gca gtg gcc gag gag att cag gat	1680
Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp	
545 550 555 560	
gaa gtt gat gag ctg ctt cag aaa gag caa aac tat tca gat gac gtc	1728
Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val	
565 570 575	
ttg gcc aac atg att agt gaa cca agg atc agt tac gga aac gat gct	1776
Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala	
580 585 590	
ctc atg cca tct ttg acc gaa acg aaa acc acc gtg gag ctc ctt ccc	1824
Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro	
595 600 605	
gtg aat gga gag ttc agc ctg gac gat ctc cag ccg tgg cat tct ttt	1872
Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe	
610 615 620	

ggg gct gac tct gtg cca gcc aac aca gaa aac gaa gtt gag cct gtt	1920
Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val	
625 630 635 640	
gat gcc cgc cct gct gcc gac cga gga ctg acc act cga cca ggt tct	1968
Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser	
645 650 655	
ggg ttg aca aat atc aag acg gag gag atc tct gaa gtg aag atg gat	2016
Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp	
660 665 670	
gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa ttg	2064
Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu	
675 680 685	
gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa ggt gca atc att gga	2112
Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly	
690 695 700	
ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg aca gtg atc gtc atc acc ttg	2160
Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu	
705 710 715 720	
gtg atg ctg aag aag aaa cag tac aca tcc att cat cat ggt gtg gtg	2208
Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val	
725 730 735	
gag gtt gac gcc gct gtc acc cca gag gag cgc cac ctg tcc aag atg	2256
Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met	
740 745 750	
cag cag aac ggc tac gaa aat cca acc tac aag ttc ttt gag cag atg	2304
Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met	
755 760 765	
cag aac tag	2313
Gln Asn	
770	

<210> 2

<211> 770

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
 1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
 20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
 35 40 45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
 50 55 60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65 70 75 80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 85 90 95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 100 105 110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
 115 120 125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu			
180	185	190	
Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val			
195	200	205	
Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys			
210	215	220	
Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu			
225	230	235	240
Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu			
245	250	255	
Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile			
260	265	270	
Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg			
275	280	285	
Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile			
290	295	300	
Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe			
305	310	315	320
Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr			
325	330	335	
Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr			
340	345	350	
Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala			
355	360	365	
Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp			
370	375	380	

Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
 385 390 395 400

Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
 405 410 415

Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
 420 425 430

Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
 435 440 445

Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
 450 455 460

Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
 465 470 475 480

Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
 485 490 495

Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
 500 505 510

Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
 515 520 525

Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser
 530 535 540

Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
 545 550 555 560

Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
 565 570 575

Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
 580 585 590

Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
 595 600 605

Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
 610 615 620

Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
 625 630 635 640

Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
 645 650 655

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
 660 665 670

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
 675 680 685

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
 690 695 700

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
 705 710 715 720

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
 725 730 735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
 740 745 750

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
 755 760 765

Gln Asn
 770

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Clostridium tetani

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(45)

<223> DNA encoding P2 epitope

<400> 3

cag tac atc aaa gct aac tcc aaa ttc atc ggt atc acc gag ctg 45
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 4

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 63

<212> DNA

<213> Clostridium tetani

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(63)

<223> DNA encoding P30 epitope

<400> 5

ttc aac aac ttc acc gta agc ttc tgg ctg cgt gtt ccg aaa gtt agc 48
 Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15

gct agc cac ctg gaa

63

Ala Ser His Leu Glu

20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 6

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

1

5

10

15

Ala Ser His Leu Glu

20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Synthetic

<400> 7

caactcagct tcttttcggg c

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Synthetic

<400> 8

agatctcgat cccgcgaaat t

21

<210> 9

<211> 135

<212> DNA

<213> Synthetic

<400> 9

atggatgcag aattccgtca cgactccggt tacgaagttc accaccagaa actggttttc

60

ttcgcagaag atgttggttc caacaaaggt gcaatcatcg gtctgatggt tggcgggtgtt 120
gttatcgcga cctag 135

<210> 10
<211> 31
<212> DNA
<213> Synthetic

<400> 10
gcgggccatg gatgcagaat tccgtcacga c 31

<210> 11
<211> 39
<212> DNA
<213> Synthetic

<400> 11
gcgggaagct tctaggtcgc gataacaaca ccgccaacc 39

<210> 12
<211> 84
<212> DNA
<213> Synthetic

<400> 12
ccggcaagct tctacagctc ggtgataccg atgaatttgg agttagcttt gatgtactgg 60
gtcgcgataa caacaccgcc aacc 84

<210> 13
<211> 101
<212> DNA
<213> Synthetic

<400> 13
gcgggccatg gggttcaaca acttcaccgt tagcttctgg ctgcgtgttc cgaaagttag 60
cgcgagccac ctggaagatg cagaattcgc tcacgactcc g 101

<210> 14
<211> 172

<212> DNA

<213> Synthetic

<400> 14

```

gggccaagct tggatccggt cgcgataaca acaccgcca ccatcagacc gatgattgca      60
cctttgttgg aaccaacatc ttctgcgaag aaaaccagtt tctgggggtg aacttcgtaa      120
ccggagtcgt gacggaactc tgcattccagc tcggtgatac cgatgaattt gg              172

```

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Synthetic

<400> 15

```

ctggaagatg cagagttccg tcaagactcc                                     30

```

<210> 16

<211> 35

<212> DNA

<213> Synthetic

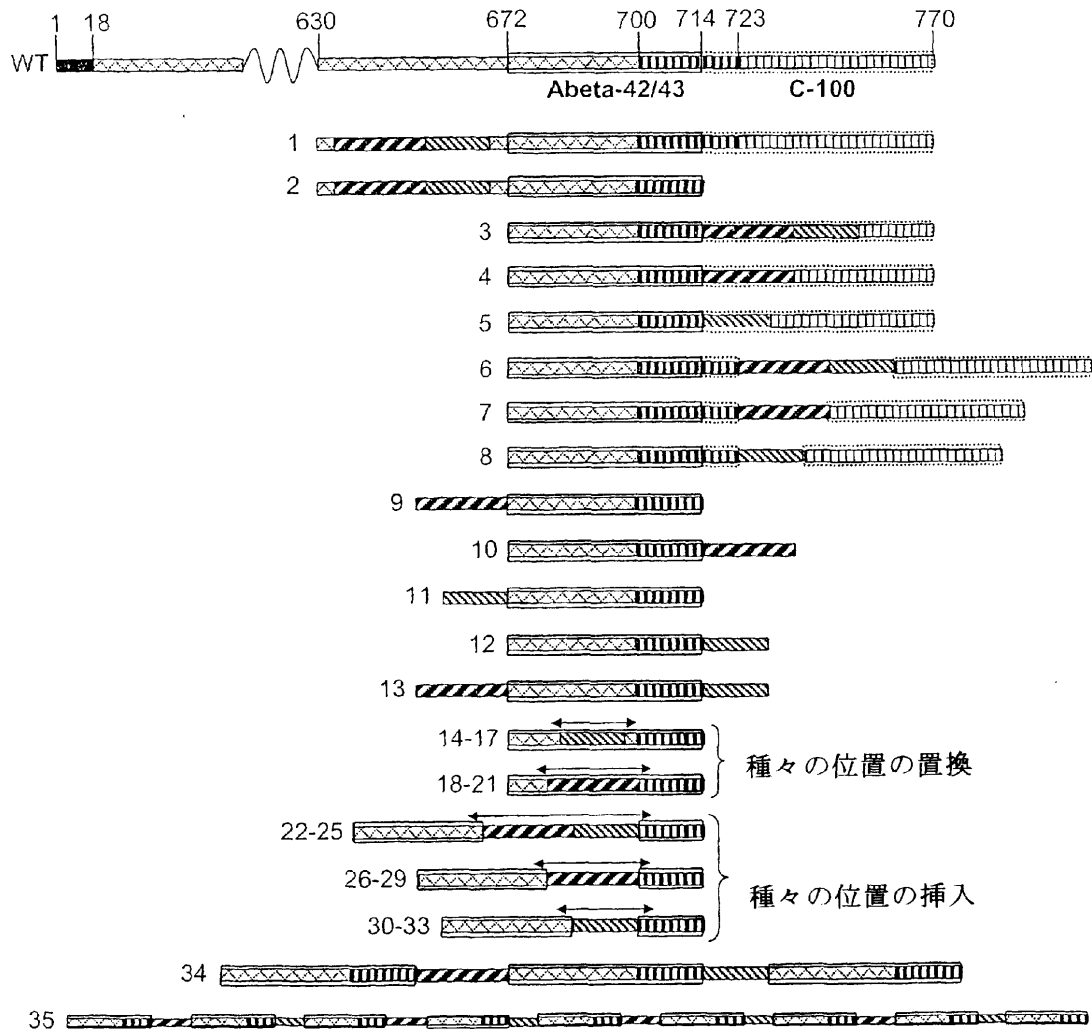
<400> 16

```

gcgcgggata cttcaacaac ttcaccgtta gcttc                                     35

```

【図1】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成14年4月5日(2002.4.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトを含む動物におけるオートロガス β アミロイド($A\beta$)タンパク質又はオートロガスアミロイド前駆体タンパク質(APP)をインビボでダウン-レギュレートする方法であって、挿入、付加、欠失もしくは置換によって、又は外来Tヘルパーエпитープ(T_H エピトープ)及び $A\beta$ 又はAPP由来ペプチド配列のポリヒドロキシポリマー担体骨格に個別にカップリングすることによって、少なくとも1つの単離された外来 T_H エピトープを導入した動物のオートロガス $A\beta$ 又はオートロガスAPPの少なくとも1つの類似体の免疫学的に有効な量を、動物の免疫系に提示することからなり、類似体での動物の免疫化により、動物でオートロガス $A\beta$ 又はオートロガスAPPに対する抗体産生を誘発し、外来 T_H エピトープを図1のP2及びP30エピトープに概略的に示すように $A\beta$ 又はAPPに導入するか、あるいは外来 T_H エピトープを、 $A\beta$ またはAPP由来ペプチド配列をも有するポリヒドロキシポリマー担体骨格にカップリングさせる、動物において $A\beta$ タンパク質又はAPPをインビボでダウン-レギュレートする方法。

【請求項2】 導入の結果として、 $A\beta$ 又はAPPのB-細胞エピトープの実質的画分が保存され、

- 抗原提示細胞(APC)又はB-リンパ球に類似体を標的化する少なくとも1つの第一部分が導入され、及び/又は
 - 免疫系を刺激する少なくとも1つの第二部分が導入され、及び/又は
 - 免疫系への類似体の提示を最適化する少なくとも1つの第三部分が導入される
- 請求項1による方法。

【請求項3】 類似体が、第一及び/又は第二及び/又は第三の部分の $A\beta$ 、A

PP又はそのサブ配列中の適当な化学基への共有又は非共有的な結合による側基としての導入によって修飾される請求項2による方法。

【請求項4】 アミノ酸の置換及び/又は欠失及び/又は挿入及び/又は付加の導入により、アミロイド産生ポリペプチドの全体的な三次構造が実質的に保存される前記請求項のいずれか1つによる方法。

【請求項5】 類似体が、少なくとも1つのアミロイド産生ポリペプチドのB-細胞エピトープの複製及び/又はハプテンの導入を含む前記請求項のいずれか1つによる方法。

【請求項6】 外来T-細胞エピトープが動物において免疫優勢である前記請求項のいずれか1つによる方法。

【請求項7】 外来T-細胞エピトープが乱交雑であり、例えば天然の乱交雑T-細胞エピトープ及び人為的なMHC-II結合ペプチド配列から選択される外来T-細胞エピトープである前記請求項のいずれか1つによる方法。

【請求項8】 天然のT-細胞エピトープが、P2又はP30のような破傷風トキソイドエピトープ、ジフテリアトキソイドエピトープ、インフルエンザウイルス血球凝集素エピトープ及びピー・ファルシパルムCSエピトープから選択される請求項7による方法。

【請求項9】 第一部分が、B-リンパ球特異的表面抗原又はAPC特異的表面抗原に実質的に特異的な結合パートナー、例えばB-リンパ球もしくはAPCに受容体があるハプテン又は炭水化物である請求項2～8のいずれか1つによる方法。

【請求項10】 第二部分が、サイトカイン、例えばインターフェロン γ (IFN- γ) もしくはその有効部分、Flt3Lもしくはその有効部分、インターロイキン1 (IL-1) もしくはその有効部分、インターロイキン2 (IL-2) もしくはその有効部分、インターロイキン4 (IL-4) もしくはその有効部分、インターロイキン6 (IL-6) もしくはその有効部分、インターロイキン12 (IL-12) もしくはその有効部分、インターロイキン13 (IL-13) もしくはその有効部分、インターロイキン15 (IL-15) もしくはその有効部分と顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) もしくはその有効部分；ホルモン；及び熱ショックタンパク質、例えばHSP70もしくはその有効部分、HSP90もしくはその有効部分、HSC70もしくはそ

の有効部分、GRP94もしくはその有効部分とカルレチクリン（CRT）もしくはその有効部分から選択される請求項2～9のいずれか1つによる方法。

【請求項11】 第三部分が、パルミトイル基、ミリスチル基、ファルネシル基、ゲラニル-ゲラニル基、GPI-アンカー及びN-アシルグリセリド基のような脂質性であるか、又は第三部分が多糖類のようなポリヒドロキシポリマーである請求項2～10のいずれか1つによる方法。

【請求項12】 多糖類が、A β 又はAPP由来ペプチドと外来T-細胞エピトープが個別に結合している担体骨格として役立つ請求項11による方法。

【請求項13】 A β 又はAPP由来ペプチドと外来T-細胞エピトープがアミド結合を介して多糖類に結合している請求項12による方法。

【請求項14】 オートロガスA β 又はAPPが、オートロガスAPPの細胞結合型に存在するときに、細胞外相に曝されないB-細胞エピトープを保存するように修飾されている前記請求項のいずれかひとつによる方法。

【請求項15】 アミロイド産生ポリペプチドが、オートロガスAPPの細胞結合型に存在するときに、細胞外相に曝されるB-細胞エピトープを少なくとも1つ欠くように修飾されている請求項14による方法。

【請求項16】 類似体に外来T_Hエピトープを生じる、長さが同じか異なるアミノ酸配列で、オートロガスA β またはAPP内の少なくともひとつのアミノ酸配列を置換することを含む前記請求項のいずれかによる方法。

【請求項17】 類似体が、類似体に外来T_Hエピトープを生じるアミノ酸配列を導入するSEQ ID NO:2の672～714アミノ酸に相当するアミノ酸からなるか、又は類似体が、少なくともひとつのアミノ酸配列が、外来T_Hエピトープを生じる、長さが同じか異なるアミノ酸配列で置換される、SEQ ID NO:2の672～714アミノ酸に相当するアミノ酸配列からなる前記請求項のいずれか1つによる方法。

【請求項18】 免疫系への提示が、抗原決定基の複数のコピーを提示し得る担体分子に共有的又は非共有的に結合している類似体の少なくとも2つのコピーを有することによって行われる、前記請求項のいずれかひとつによる方法。

【請求項19】 類似体が、自己抗原に対する自己耐性の破壊を促進するアジュバントを用いて製剤化される前記請求項のいずれかによる方法。

【請求項20】 有効量の類似体が、非経口経路、例えば真皮内、真皮下及び筋肉内経路；腹腔内経路；経口経路；口腔経路；舌下経路；硬膜外経路；脊髄経路；肛門経路；及び頭蓋内経路から選択される経路を介して動物に投与される前記請求項のいずれか1つによる方法。

【請求項21】 類似体の有効量が、0.5～2,000 µgである請求項20による方法。

【請求項22】 類似体が、仮想リンパ節(VLN)装置に含まれる請求項20又は21による方法。

【請求項23】 免疫系への修飾アミロイド産生ポリペプチドの提示が、動物細胞に類似体をエンコードする核酸を導入し、次いで導入された核酸について細胞によるインビボ発現をさせることで行われる請求項1～17のいずれか1つによる方法。

【請求項24】 導入された核酸が、裸のDNA、荷電又は非荷電脂質で製剤化したDNA、リポソームで製剤化したDNA、ウイルスベクターに含めたDNA、トランスフェクション促進タンパク質又はポリペプチドで製剤化したDNA、標的タンパク質又はポリペプチドで製剤化したDNA、カルシウム沈殿剤で製剤化したDNA、不活性担体分子に結合したDNA、キチン又はキトサンでカプセル化したDNA、ならびにアジュバントで製剤化したDNAから選択される請求項23による方法。

【請求項25】 核酸が、VLN装置に含まれる請求項24による方法。

【請求項26】 1年に少なくとも1回の投与/導入、例えば少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも6回及び少なくとも12回の投与/導入が含まれる請求項20～25のいずれか1つによる方法。

【請求項27】 アミロイドの全量を低下するか、又はアミロイド形成速度を臨床上有意に低下させる程度に、請求項1～26のいずれかひとつによる方法にしたがってオートロガスAβ又はAPPをダウン-レギュレーションすることからなる、アルツハイマー疾患又はAβの沈着によって特徴付けられる他の疾患及び症状の治療及び/又は予防及び/又は緩和方法。

【請求項28】 図1のP2及びP30エピトープに概略的に示すように少なくとも1つの単離された外来T_Hエピトープが導入されているか、又はAβもしくはA

PP由来ペプチドをも有するポリヒドロキシポリマー担体骨格に少なくとも1つの外来 T_H エピトープが結合され、類似体での動物の免疫化により、アミロイド産生ポリペプチドに対する抗体の産生が誘発される、動物の $A\beta$ 又はAPPから得られるアミロイド産生ポリペプチドの類似体。

【請求項29】 修飾が、請求項2～17のいずれかひとつに定義される請求項28による類似体。

【請求項30】 請求項28又は29による類似体の免疫学的に有効な量、さらに医薬的ならびに免疫学的に許容される担体及び/又は賦形剤、任意にアジュバントを含む免疫原性組成物。

【請求項31】 請求項28又は29による類似体をエンコードする核酸フラグメント。

【請求項32】 自律複製しうるような、請求項31による核酸フラグメントを有するベクター。

【請求項33】 プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ染色体及びウイルスからなる群から選択される請求項32によるベクター。

【請求項34】 5'→3'方向及び操作可能な連鎖において、請求項31による核酸フラグメントの発現を駆動するプロモーター、ポリペプチドフラグメントの分泌又は膜への組み込みを可能にするリーダーペプチドをエンコードする任意の核酸配列、請求項31による核酸フラグメント及び任意の転写終結区からなる、請求項32又は33によるベクター。

【請求項35】 宿主細胞に導入する場合に、宿主細胞ゲノムに組みこむことができるか、又は組み込むことができない請求項32～34のいずれか1つによるベクター。

【請求項36】 プロモーターが、真核細胞及び/又は原核細胞での発現を駆動する請求項34又は35によるベクター。

【請求項37】 請求項31による核酸フラグメントを複製しうる形質転換細胞のような、請求項32～36のいずれか1つのベクターを有する形質転換細胞。

【請求項38】 微生物が、細菌、酵母、原生動物、又は真菌、 S_2 もしくは

SF細胞のような昆虫細胞、植物細胞及び哺乳動物細胞から選択される多細胞生物由来細胞から選択される請求項37による形質転換細胞。

【請求項39】 請求項28又は29による類似体を分泌するかその表面で担持する形質転換細胞のような、請求項31による核酸フラグメントを発現する請求項37又は38による形質転換細胞。

【請求項40】 免疫系への提示が、類似体をエンコードして発現する核酸フラグメントを有する非病原性微生物又はウイルスを投与して行われる請求項1～17のいずれか1つによる方法。

【請求項41】 - 請求項31による核酸フラグメント又は請求項32～36のいずれか1つによるベクター、及び
- 医薬的及び免疫学的に受容な担体及び/又はビヒクル及び/又はアジュバントからなる、 $A\beta$ 又はAPPに対する抗体産生を誘発する組成物。

【請求項42】 請求項32～36のいずれか1つによるベクターを有し、請求項31による核酸フラグメントを発現し、請求項28又は29による類似体を任意に分泌するか、その表面に担持する安定な細胞系。

【請求項43】 請求項31による核酸フラグメント又は請求項32～36のいずれか1つによるベクターで宿主細胞を形質転換することからなる、請求項37～39のいずれか1つによる細胞の調製方法。

【請求項44】 動物におけるアミロイドをダウン-レギュレートするためのアジュバントを任意に含む免疫原性組成物の調製のための請求項28又は29による類似体の使用。

【請求項45】 アルツハイマー疾患又はアミロイドの沈着によって特徴付けられる他の症状の治療、予防又は緩和のための、アジュバントを任意に含む免疫原性組成物を製造するための請求項28又は29による類似体の使用。

【国際調査報告】

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/DK 01/00113		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: A61K 38/17, A61K 39/00, C07K 14/435, C07K 19/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: A61K, C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, BIOSIS, CHEM.ABS.DATA, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9927944 A1 (ATHENA NEUROSCIENCES, INC.), 10 June 1999 (10.06.99), page 3, line 1 - page 7, line 9, abstract --	1-58
A	WO 9523166 A1 (DEAKIN RESEARCH LIMITED), 31 August 1995 (31.08.95), page 6, line 1 - line 35, abstract --	3-29, 52
A	WO 9505849 A1 (MOURITSEN & ELSNER A/S), 2 March 1995 (02.03.95), claims 1-2, abstract -- -----	3-29, 52
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 July 2001		14.08.2001
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Patrick Andersson/MP Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK01/00113**Box I** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **1-34, 47**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
See extra sheet
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK01/00113

Claims 1-34, 47 relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy/ diagnostic methods practised on the human or animal body/Rule 39.1.(iv). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds/compositions.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

SA 327450

02/07/01

International application No.

PCT/DK 01/00113

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9927944 A1	10/06/99	AU 4087999 A	06/12/99
		BG 104562 A	31/01/01
		BR 9815357 A	24/10/00
		CN 1281366 T	24/01/01
		DE 1033996 T	07/06/01
		EP 1033996 A	13/09/00
		EP 1079701 A	07/03/01
		HR 20000443 A	31/10/00
		NO 20002784 A	31/07/00
		WO 9959427 A	25/11/99
		AU 1706199 A	16/06/99
WO 9523166 A1	31/08/95	AU 699757 B	17/12/98
		AU 1748695 A	11/09/95
		AU PM411994 D	00/00/00
		CA 2183977 A	31/08/95
		EP 0751960 A	08/01/97
		JP 9509182 T	16/09/97
		ZA 9501591 A	08/12/95
WO 9505849 A1	02/03/95	AT 162723 T	15/02/98
		AU 707083 B	01/07/99
		AU 7009198 A	30/07/98
		AU 7608094 A	21/03/95
		CA 2170236 A	02/03/95
		DE 69408342 D, T	14/05/98
		DK 96493 D	00/00/00
		DK 752886 T	04/05/98
		EP 0752886 A, B	15/01/97
		ES 2112559 T	01/04/98
		GR 3026419 T	30/06/98
		JP 9505031 T	20/05/97

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁷ (参考)
A 6 1 K	39/39	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
	48/00	A 6 1 P 25/28	4 H 0 4 5
A 6 1 P	25/28	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K	14/47	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N	1/15		
	1/19		
	1/21		
	5/10	C 1 2 P 21/02	C
	15/09	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P	21/02	A 6 1 K 37/02	A
G 0 1 N	33/53	C 1 2 N 15/00	A
		5/00	
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(72)発明者	ジェンセン , マーティン , ローランド デンマーク、ディーケー - 2970 ホーショ ルム、コグレ アレ 6、ファーマクサ エイ / エス		
(72)発明者	ニールセン , クラウス , グレゴリウス デンマーク、ディーケー - 2970 ホーショ ルム、コグレ アレ 6、ファーマクサ エイ / エス		

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 CA06
DA01 DA02 DA05 DA11 DA12
EA01 EA02 EA03 EA04 EA06
EA10 FA02 FA17 GA11 GA25
HA11 HA17
4B064 AG01 CA02 CA05 CA06 CA10
CA11 CA19 CC01 CC24 DA01
DA13
4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X
AA93Y AB01 AC14 BA02
BA16 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA14
BA01 BA08 BA22 BA23 BA35
BA42 CA18 CA53 CA56 CA59
DA01 DA12 DA13 DA14 DA16
DA18 DA19 DA24 DB01 DB31
DB34 DC01 MA02 MA05 NA13
NA14 ZA162
4C085 AA03 AA13 BB11 CC03 CC21
CC32 DD22 DD86 DD88 EE06
FF24 GG01
4C087 AA01 AA02 BC30 BC83 CA12
CA13 CA16 MA02 MA05 MA66
NA13 NA14 ZA16
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40
EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003523402A5	公开(公告)日	2008-03-27
申请号	JP2001561348	申请日	2001-02-19
[标]申请(专利权)人(译)	法麦克萨有限公司		
申请(专利权)人(译)	Famekusa EI / ES		
当前申请(专利权)人(译)	Famekusa EI / ES		
[标]发明人	パークベーター ジェンセンマーティンローランド ニールセンクラウドグレゴリウス		
发明人	パーク,ベーター ジェンセン,マーティン,ローランド ニールセン,クラウド,グレゴリウス		
IPC分类号	A61K39/00 A61K35/12 A61K35/66 A61K35/76 A61K39/39 A61K48/00 A61P25/28 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 G01N33/53 A61K38/00 C12N15/09 C12N5/10		
CPC分类号	C07K14/4711 A61K39/385 G01N33/6896 A61K2039/6037 C07K2319/00 A61K38/00 A61K2039/6087 A61K2039/53 A61K38/19 A61K2039/64 G01N2333/4709 G01N2500/04 A61K38/1709 A61K39/00 A61K47/4833 A61K39/0007 A61K47/646 A61P25/00 A61P25/28 Y02A50/412 A61K2300/00		
FI分类号	A61K39/00.ZNA.H A61K35/12 A61K35/66 A61K35/76 A61K39/39 A61K48/00 A61P25/28 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D A61K37/02 C12N15/00.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA06 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA01 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/EA06 4B024/EA10 4B024/FA02 4B024/FA17 4B024/GA11 4B024/GA25 4B024/HA11 4B024/HA17 4B064/AG01 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA16 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA14 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA35 4C084/BA42 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/DA01 4C084/DA12 4C084/DA13 4C084/DA14 4C084/DA16 4C084/DA18 4C084/DA19 4C084/DA24 4C084/DB01 4C084/DB31 4C084/DB34 4C084/DC01 4C084/MA02 4C084/MA05 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA162 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/CC21 4C085/CC32 4C085/DD22 4C085/DD86 4C085/DD88 4C085/EE06 4C085/FF24 4C085/GG01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC30 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/CA13 4C087/CA16 4C087/MA02 4C087/MA05 4C087/MA66 4C087/NA13 4C087/NA14 4C087/ZA16 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	200000265 2000-02-21 DK 60/186295 2000-03-01 US		
其他公开文献	JP2003523402A JP5025871B2		

摘要(译)

公开了以淀粉样蛋白沉积为特征的疾病的新方法。该方法通常依赖于针对诸如 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 的淀粉样蛋白原蛋白 (有助于淀粉样蛋白形成的蛋白) 的免疫。所述免疫优选通过施用能够诱导针对所述自体淀粉样蛋白的多肽的抗体产生的自体淀粉样蛋白的多肽的类似物来进行。特别优选作为免疫原的是自体 $A\beta$, 其通过引入一种或几种外来免疫优势和混杂的T细胞表位而被修饰, 同时基本上保留了大量的 $A\beta$ B细胞表位。是的。还公开了针对淀粉样蛋白生成的多肽的核酸疫苗接种和活疫苗的疫苗接种以及可用于

疫苗接种的方法和手段。这样的方法和手段包括鉴定有用的淀粉样蛋白的免疫原性类似物的方法，制备类似物和药物制剂的方法，以及核酸片段，载体，转化的细胞，多肽和药物制剂。 做好