

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-503475

(P2014-503475A)

(43) 公表日 平成26年2月13日(2014.2.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 B 0 6 4
<b>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/18	4 C 0 7 6
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 9/127 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00 H	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-535421 (P2013-535421)	(71) 出願人	506027491
(86) (22) 出願日	平成23年10月26日 (2011.10.26)		エーシー イミュン ソシエテ アノニ ム
(85) 翻訳文提出日	平成25年5月31日 (2013.5.31)		スイス連邦共和国 ローザンヌ イーピー エフエル イノベーション パーク ビル ディング ビー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/068797	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02012/055933		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成24年5月3日 (2012.5.3)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	10188832.9		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成22年10月26日 (2010.10.26)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 疎水性部分によって修飾されたペプチドを含むリポソームベースの構築物

## (57) 【要約】

本発明は、疎水性部分によって修飾されリポソーム中で再構成された関心対象のペプチド、詳細には抗原性ペプチドを含む、リポソームベースの構築物を調製する方法、および該方法によって得られる抗原性構築物に関する。本発明はさらに、アルツハイマー病などの、プロテオパシー(proteopathy)によって引き起こされるかまたはこれと関連した疾患および障害の処置における治療および診断用途のための該構築物の使用に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

以下の段階を含む、疎水性部分によって修飾されリボソーム中で再構成されたペプチドを含む、リボソームベースの構築物を調製する方法：

- i 溶液中でリボソームを調製する段階；
- ii ペプチド分子のN末端および/またはC末端に少なくとも1つの疎水性部分を付加することにより、修飾ペプチドを調製する段階；
- iii 界面活性物質の存在下で前記修飾ペプチドを可溶化する段階；
- iv 前記可溶化されたペプチドを前記界面活性物質の臨界ミセル濃度未満に希釈する段階；
- v 予備形成されたりボソーム調製物に前記希釈された可溶化されたペプチドを添加し、該添加されたペプチドを該リボソームの外層中に可溶化することにより、予備形成されたりボソームに、希釈された可溶化されたペプチドを負荷する段階。

10

**【請求項 2】**

前記ペプチドが抗原性ペプチドである、請求項1記載の方法。

**【請求項 3】**

予備形成されたりボソームにアジュバントをさらに負荷する、請求項2記載の方法。

**【請求項 4】**

アジュバント負荷が、希釈された可溶化された抗原性ペプチドをリボソームに負荷する(a) 前；(b) 同時；または(c) 後に行われる、請求項3記載の方法。

20

**【請求項 5】**

前記アジュバントが、リピドA、詳細にはモノホスホリルまたはジホスホリルリピドAなどの解毒化リピドA、ミョウバン、Pam2CSK4、Pam3CSK4、Pam3CAG、サポニン、CpG、ホスホロチオエート化PS-CpG-ODN、脂質化CpG、例えばCpG-A、CpG-B、またはCpG-CなどのCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)、陽イオン性脂質である、請求項3または4記載の方法。

**【請求項 6】**

疎水性部分により脂質二重層中に挿入された再構成されたペプチドの少なくとも72%がリボソームの外表面上に存在する、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 7】**

再構成されたペプチドの少なくとも80%がリボソームの外表面上に存在する、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

30

**【請求項 8】**

再構成されたペプチドの少なくとも90%がリボソームの外表面上に存在する、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 9】**

再構成されたペプチドの100%がリボソームの外表面上に存在する、請求項7記載の方法。

**【請求項 10】**

前記ペプチドが、脂肪酸、トリグリセリド、ジグリセリド、ステロイド、スフィンゴ脂質、糖脂質、またはリン脂質の付加によって修飾される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

40

**【請求項 11】**

前記疎水性部分がパルミチン酸である、請求項10記載の方法。

**【請求項 12】**

前記ペプチドが、共有結合しているパルミトイル化アミノ酸残基によって、詳細には該ペプチドのN末端およびC末端にそれぞれ共有結合している2~4個、より詳細には4個の残基によって修飾される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 13】**

前記ペプチドが4つのパルミトイル化アミノ酸残基によって修飾され、そのうちの2つが

50

該ペプチドのN末端およびC末端にそれぞれ共有結合している、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

前記請求項のいずれか一項記載の方法によって得られる、疎水性部分によって修飾されリポソーム中で再構成されたペプチドを含むリポソームベースの構築物であって、該再構成されたペプチドの少なくとも72%がリポソームの外表面上に存在し、該ペプチドが、いかなる化学反応または付加的な分子修飾の助けも借りずに、その疎水性部分により脂質二重層中に挿入されている、リポソームベースの構築物。

【請求項15】

前記ペプチドが、共有結合によってリポソーム膜に結合していない、請求項14記載の構築物。 10

【請求項16】

前記ペプチドが抗原性ペプチドである、請求項14または15記載の構築物。

【請求項17】

再構成されたペプチドの少なくとも80%がリポソームの外表面上に存在する、請求項14~16のいずれか一項記載の構築物。

【請求項18】

再構成されたペプチドの少なくとも90%がリポソームの外表面上に存在する、請求項14~16のいずれか一項記載の構築物。

【請求項19】

再構成されたペプチドの100%がリポソームの外表面上に存在する、請求項14~16のいずれか一項記載の構築物。 20

【請求項20】

リポソーム中で再構成されたアジュバントを含む、前記請求項のいずれか一項記載の構築物。

【請求項21】

再構成されたアジュバントの少なくとも72%がリポソームの外表面上に存在する、請求項20記載の構築物。

【請求項22】

再構成されたアジュバントの少なくとも80%がリポソームの外表面上に存在する、請求項20記載の構築物。 30

【請求項23】

再構成されたアジュバントの少なくとも90%がリポソームの外表面上に存在する、請求項20記載の構築物。

【請求項24】

再構成されたアジュバントの100%がリポソームの外表面上に存在する、請求項20記載の構築物。

【請求項25】

前記アジュバントが、リピドA、詳細にはモノホスホリルまたはジホスホリルリピドAなどの解毒化リピドA、ミョウバン、Pam2CSK4、Pam3CSK4、Pam3CAG、サポニン、CpG、脂質化CpG、陽イオン性脂質、ホスホロチオエート化PS-CpG-ODN、例えばCpG-A、CpG-B、またはCpG-CなどのCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)である、前記請求項のいずれか一項記載の構築物。 40

【請求項26】

前記ペプチドが、脂肪酸、トリグリセリド、ジグリセリド、ステロイド、スフィンゴ脂質、糖脂質、またはリン脂質の付加によって修飾されている、前記請求項のいずれか一項記載の構築物。

【請求項27】

前記疎水性部分がパルミチン酸である、請求項26記載の構築物。

【請求項28】

前記ペプチドが、共有結合しているパルミトイル化アミノ酸残基によって、詳細には該ペプチドのN末端およびC末端にそれぞれ共有結合している2~4個、より詳細には4個の残基によって修飾されている、前記請求項のいずれか一項記載の構築物。

【請求項29】

前記ペプチドが4つのパルミトイル化アミノ酸残基によって修飾され、そのうちの2つが該ペプチドのN末端およびC末端にそれぞれ共有結合している、前記請求項のいずれか一項記載の構築物。

【請求項30】

請求項14~29のいずれか一項記載の抗原性構築物を含む、組成物。

【請求項31】

治療有効量の前記抗原性構築物を薬学的に許容される担体と共に含む薬学的組成物である、請求項30記載の組成物。

【請求項32】

請求項14~29のいずれか一項記載の構築物または請求項30もしくは31記載の組成物を哺乳動物に投与する段階を含む、哺乳動物において免疫応答を誘導する方法。

【請求項33】

請求項14~29のいずれか一項記載の抗原性構築物または請求項31もしくは32記載の組成物を哺乳動物に投与する段階、および該哺乳動物によって産生された抗体を単離する段階を含む、抗体を生成する方法。

【請求項34】

免疫化した哺乳動物から得られた脾臓細胞からハイブリドーマ細胞を調製する段階、および該ハイブリドーマ細胞によって産生された抗体を単離する段階をさらに含む、請求項33記載の方法。

【請求項35】

請求項33または34記載の方法によって生成された抗体。

【請求項36】

ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体またはそれらの機能的誘導体である、請求項35記載の抗体。

【請求項37】

感染症、CNS関連疾患もしくは障害、腫瘍学、アレルギー、II型糖尿病、または炎症の分野における、哺乳動物、詳細にはヒトの治療的または予防的処置のための、請求項14~29のいずれか一項記載の抗原性構築物または請求項30もしくは31記載の組成物の使用。

【請求項38】

前記処置が哺乳動物、詳細にはヒトのワクチン接種を含む、請求項37記載の使用。

【請求項39】

プロテオパシー(proteopathy)に関連した疾患もしくは障害、タンパク質の誤った折りたたみを伴う疾患、および/またはタンパク質の蓄積もしくは凝集を伴う疾患に罹患している哺乳動物、詳細にはヒトの治療的または予防的処置のための、請求項14~29のいずれか一項記載の抗原性構築物または請求項30もしくは31記載の組成物の使用。

【請求項40】

感染症、CNS関連疾患もしくは障害、腫瘍学、アレルギー、II型糖尿病、または炎症の分野における、哺乳動物、詳細にはヒトの治療的または予防的処置のための、請求項35または36記載の抗体の使用。

【請求項41】

プロテオパシーに関連した疾患もしくは障害、タンパク質の誤った折りたたみを伴う疾患、および/またはタンパク質の蓄積もしくは凝集を伴う疾患に罹患している哺乳動物、詳細にはヒトの治療的または予防的処置のための、請求項35または36記載の抗体の使用。

【請求項42】

感染症、CNS関連疾患もしくは障害、腫瘍学、アレルギー、II型糖尿病、または炎症の分野における疾患または障害を検出または診断する上での、請求項35または36記載の抗体

10

20

30

40

50

の使用。

【請求項 4 3】

プロテオパシーに関連した疾患もしくは障害、タンパク質の誤った折りたたみを伴う疾患、および/またはタンパク質の蓄積もしくは凝集を伴う疾患を検出または診断する上で、請求項35または36記載の抗体の使用。

【請求項 4 4】

感染症、CNS関連疾患もしくは障害、腫瘍学、アレルギー、II型糖尿病、または炎症の分野における疾患または障害の検出または診断において使用するための、請求項35または36記載の抗体を含む、診断キット。

【請求項 4 5】

プロテオパシーに関連した疾患もしくは障害、タンパク質の誤った折りたたみを伴う疾患、および/またはタンパク質の蓄積もしくは凝集を伴う疾患の検出または診断において使用するための、請求項35または36記載の抗体を含む、診断キット。

【請求項 4 6】

疾患または障害を示すタンパク質マーカーの検出において使用するための、請求項44または45記載の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、疎水性部分によって修飾されリポソーム中で再構成された関心対象のペプチド、詳細には抗原性ペプチドを含む、リポソームベースの構築物を調製するための改良された方法、および該方法によって得られる抗原性構築物に関する。本発明はさらに、治療および診断目的のための該構築物の使用、詳細には、アルツハイマー病などの、プロテオパシー(proteopathy)によって引き起こされるかまたはこれと関連した疾患および障害の処置における使用に関する。

【背景技術】

【0002】

リポソームは、生物物理学的研究の単なる新奇な対象物であることから遠く離れて、多くの実際的適用に選択される薬学的担体となった(Torchilin, Nature Reviews, 2005, 4, 145-160(非特許文献1))。リポソームは、主に(リン)脂質で作られた人工的小胞であり、その内部の水性容積中に薬物もしくは可溶性抗原を含めることができ、または膜タンパク質などの両親媒性抗原を二重層中に組み入れることができる。多くの微生物および腫瘍細胞由来の抗原が、詳細な特徴づけおよびインビボ試験を伴って、このようなリポソーム中に組み入れられている。抗原含有リポソームを用いた臨床試験から、それらが安全であり、一般的に重篤な有害作用を誘導しないことが示された(Kersten and Crommelin, Biochimica et Biophysica Acta 1995, 1241, 117-138(非特許文献2))。

【0003】

抗原を提示するための媒体としてリポソームを用いる考えは、30年以上も前に試験された(Allison and Gregoriadis, Nature, 1974, 252, 252(非特許文献3))。例えば、リポソーム中に組み入れられたジフテリアトキソイドは、その遊離型よりも免疫原性が高いことが示された。リポソームによって提示された抗原は、体液性および細胞性免疫応答を誘導し得る。これまでに開発されたリポソームワクチンの大部分は、リポソームの水性内腔中に抗原を捕捉することによって調製された。加えて、その表面上にランダムに分布した疎水性または両親媒性抗原(すなわち、内部または外部の水溶液のいずれかに偶発的に向けられている抗原)を保有するリポソームの使用に関する最近の報告が、文献中に存在する(Muhs et al., PNAS, 2007, 104, 9810-9810(非特許文献4); Nicolau et al., PNAS, 2002, 99, 2332-2337(非特許文献5); WO2007/068411(特許文献1))。Frischらは、封入されたペプチドと対照的に、モノホスホリルリピドA(MPLA)をアジュバントとして含む小胞の表面における小さなB細胞エプトープの発現が、強力でかつ特異的な体液性応答(抗体の産生)を誘導し得ることを観察した(Frisch, Eur J Immunol 1991; 21:185; Alving et al., I

10

20

30

40

50

mmunol Rev 1995; 145:5(非特許文献6))。よって、リポソームの表面上に提示された抗原は、非炎症性応答が求められる治療ワクチンにおいてより望ましいであろう。したがって、リポソーム形成後に抗原を添加し、その後リポソーム中にそれを組み込むことは、外部リポソーム脂質層中への抗原の単一分布を提供すると考えられる。実際に、抗原とリポソームの外部脂質表面上の反応物との結合、またはペグ化ペプチドの使用時に再開され得る事後挿入法が開発され、文献において幅広く報告されている(Allen et al., Cellular & Molecular Biology Letters, 2002, 7, 217-219(非特許文献7); Guan et al., Bioconjugate Chem, 1998, 9, 451-458(非特許文献8); Moreira et al., Pharmaceutical Research, 2002, 19, 265-269(非特許文献9))。しかしながら、当技術分野において記載されている、化学的結合(例えば、安定したチオエーテル結合または生物還元性ジスルフィド結合)を用いる事後挿入法の主な限界は、位置特異性の欠如、リポソーム中への反応基の挿入およびさらなる下流工程の必要性である。このようにして生成されたりポソームベースの構築物は、滅菌濾過することができない。さらに、外部リポソーム層へのペプチドの共有結合は、疎水性ペプチドなどの異なる種類の抗原にまだ適用不可能である。

10

20

30

40

50

#### 【0004】

一般的に用いられる1つの方法は、ペプチド-PEG-リン脂質複合物によるミセルの形成(場合により、付加的な界面活性物質の助けを借りる)に基づいたペグ化ペプチドの使用に関連する。予備形成されたりポソームと共にインキュベートすると、この方法により、最適条件下で、ペプチド複合物のリポソームの外膜小葉中への自発的移行(分子移行)が起こる。しかしながら、この方法は小胞の不安定化を起こしやすく(付加的な界面活性物質が必要とされる場合)、副次的な免疫応答を誘導し得る(PEGが免疫原性であり得るため)。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0005】

【特許文献1】WO2007/068411

#### 【非特許文献】

#### 【0006】

【非特許文献1】Torchilin, Nature Reviews, 2005, 4, 145-160

【非特許文献2】Kersten and Crommelin, Biochimica et Biophysica Acta 1995, 1241, 117-138

【非特許文献3】Allison and Gregoriadis, Nature, 1974, 252, 252

【非特許文献4】Muhs et al., PNAS, 2007, 104, 9810-9810

【非特許文献5】Nicolau et al., PNAS, 2002, 99, 2332-2337

【非特許文献6】Frisch, Eur J Immunol 1991; 21:185; Alving et al., Immunol Rev 1995; 145:5

【非特許文献7】Allen et al., Cellular & Molecular Biology Letters, 2002, 7, 217-219

【非特許文献8】Guan et al., Bioconjugate Chem, 1998, 9, 451-458

【非特許文献9】Moreira et al., Pharmaceutical Research, 2002, 19, 265-269

#### 【発明の概要】

#### 【0007】

したがって、リポソームベースの構築物を提供する方法であって、先行技術の方法の不利点の大部分またはすべてを克服することを可能にし、以下の点で望ましい特性を示す改良された抗原性構築物を提供する方法には、いまだ満たされていない必要性が存在する。

- ・収率、
- ・小胞安定性、
- ・均一性、
- ・位置特異性(トポロジー、ペプチドの外側および内側分布)、
- ・濾過性、
- ・リポソーム表面上での大部分の抗原の提示、等。

## 【0008】

この満たされていない必要性は、独立請求項の特徴によって規定される方法および構築物を提供することによって、本発明により対処および解決される。好ましい態様は従属請求項の対象である。

## 【0009】

本発明による方法によりここで、予備形成されたりポソームの外層に様々なペプチド(例えば、抗原)型および/またはアジュバント型を様々な濃度で事後挿入することが可能になる。本発明による方法は、溶液中でのリポソームの予備形成、および修飾ペプチドがミセル形態で得られるような、疎水性部分によるペプチド、詳細には抗原性ペプチドの修飾を含む。本方法は、ミセル分解を誘導することによってミセルからペプチドを放出させた後に、予備形成されたりポソーム中に組み込む段階をさらに含む。この組み込み工程は、修飾ペプチド、抗原、および/またはアジュバントとリポソームの(リン)脂質二重層との疎水性相互作用によって推進される。特に、修飾ペプチド、詳細には修飾された抗原性ペプチド、および/またはアジュバントの、リポソームの外層中への可溶化は、可溶化されたペプチド、詳細には可溶化された抗原性ペプチド、またはアジュバント(最初はミセル形態中に存在する)を界面活性物質の臨界ミセル濃度未満に希釈することにより、いかなる化学反応または付加的な分子修飾の助けも借りずに達成される。次に、遊離型のペプチド、詳細には遊離型の抗原性ペプチド、および/またはアジュバントは、リン脂質のアシル部分内の疎水性ドメインの可溶化に起因して、リポソームの外層中に組み込まれる。したがって、本発明による方法は、それぞれの必要性に応じて負荷するために使い捨てである「空リポソーム」の貯蔵物を提供する。

10

20

## 【0010】

有利なことには、本明細書において開示されかつ特許請求される方法および構築物により、リポソーム二重層の外層に向かってリポソーム上で特有の分子提示がなされた、高収率のペプチドおよび/またはアジュバント取り込みが生じる。本発明の方法によりさらに、0.2~0.6、詳細には0.22~0.35の範囲の、詳細には0.25の多分散指数を伴った均一なサイズ分布を示すリポソーム調製物が得られる。さらに、本方法および構築物により、免疫系に対するペプチドおよび/アジュバントの高い生物学的利用能が得られ、その結果として、改善された免疫応答が得られる。本発明による方法において、アジュバント分解、例えばMPLA分解は起こらず、したがってバッチ再現性の増加が提供される。本発明の方法によって調製される構築物は、安定であり、滅菌濾過することができ(粒子サイズ<200 nm)、副次的な免疫応答を誘導しない。

30

## 【0011】

特に、本発明の方法によって調製される構築物は、0 ~ 10 °C、詳細には2 ~ 6 °C という温度で、しかしとりわけ5 °C で貯蔵することができ、1ヵ月~6ヵ月またはそれ以上、詳細には2ヵ月~4ヵ月の期間、しかしとりわけ3ヵ月間、安定なままである。

## 【0012】

さらに、本明細書において様々な態様で記載されている本発明の方法により、調製工程中のペプチド(<25%)およびアジュバント(<25%)の損失の少ない、構築物の迅速かつ工業規模の製造が可能となり、その結果、製造中のコストが減少する。

40

## 【0013】

特に、ペプチドおよび/またはアジュバントの損失は、30%未満、詳細には25%未満、しかしとりわけ20%未満またはそれよりも低い。

## 【0014】

特に、本発明は、i) 溶液中でリポソームを調製する段階; ii) ペプチド分子のN末端および/またはC末端に少なくとも1つの疎水性部分を付加することにより、修飾ペプチド、詳細には修飾された抗原性ペプチドを調製する段階; iii) 界面活性物質の存在下で、前記修飾されたペプチドまたは抗原性ペプチドを可溶化する段階; iv) 前記可溶化されたペプチドおよび任意でアジュバントを、前記界面活性物質の臨界ミセル濃度(CMC)未満に希釈する段階; ならびにv) 詳細には、例えばリポソームの外部脂質表面上の反応物との結

50

合またはペグ化ペプチドの使用によるいかなる化学反応または付加的な分子修飾の助けも借りずに、予備形成されたリポソーム調製物に前記ペプチドおよび任意でアジュバントを添加し、添加されたペプチドおよび任意で添加されたアジュバントをリポソームの外層中に可溶化することにより、予備形成されたリポソームに、希釈された可溶化されたペプチドおよび任意でアジュバントを負荷する段階を含む、本明細書において様々な態様で記載されている本発明による関心対象のペプチド、詳細には関心対象の抗原性ペプチドを含むリポソームベースの構築物を調製する方法に関し、該ペプチドは疎水性部分により修飾され、リポソーム中で再構成される。

【0015】

1つの態様において、本発明は、可溶化されたペプチド、詳細には可溶化された抗原性ペプチド、および任意で可溶化されたアジュバントの希釈が、予備形成されたリポソームを含むリポソーム溶液に前記ペプチドおよび任意で前記アジュバントを添加する工程で起こる、本明細書において様々な態様で記載されている方法に関する。

10

【0016】

1つの態様において、本発明は、可溶化されたペプチド、詳細には可溶化された抗原性ペプチド、および任意で可溶化されたアジュバントを含む溶液が、界面活性物質の臨界ミセル濃度(CMC)の50%、詳細には40%、30%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%未満に到達するまで希釈される、本明細書において様々な態様で記載されている方法に関する。

【0017】

1つの態様において、本発明は、段階v)において、予備形成されたリポソームに、1つまたは複数の異なる希釈された可溶化されたペプチド、詳細には可溶化された抗原性ペプチド、および/または本明細書に規定されるアジュバントが負荷される、本明細書において様々な態様で記載されている本発明によるリポソームベースの構築物、詳細にはリポソームベースの抗原性構築物を調製する方法に関する。

20

【0018】

1つの態様において、本発明は、例えばオクチル-D-グルコピラノシド(B-OG)またはTween-20などの、陰イオン性、陽イオン性、非イオン性、および両性イオン性界面活性物質からなる群より選択される界面活性剤を調製物に添加することにより、ペプチドが、予備形成されたリポソームに添加される前に可溶化される、本明細書において様々な態様で記載されている本発明によるリポソームベースの構築物、詳細にはリポソームベースの抗原性構築物を調製する方法に関する。

30

【0019】

1つの態様において、本発明は、予備形成されたリポソームにアジュバントが負荷される、前記態様のいずれか1つの方法に関する。

【0020】

1つの態様において、アジュバントは、リポソームの形成後に、予備形成されたリポソームに添加することができ、すなわち、最初に、希釈された可溶化された抗原性ペプチドを予備形成されたリポソーム調製物に添加し、その後アジュバント、詳細には可溶化されたアジュバントを添加する。あるいは、最初に、アジュバント、詳細には可溶化されたアジュバントを予備形成されたリポソーム調製物に添加し、その後またはそれと同時に、希釈された可溶化された抗原性ペプチドを添加することもできる。

40

【0021】

したがって、本発明は、アジュバント負荷が、希釈された可溶化された抗原性ペプチドをリポソームに負荷する(a)前；(b)同時；または(c)後に行われる、前記態様のいずれか1つの方法を提供する。

【0022】

本発明の1つの態様では、2つまたはそれ以上の種類のリポソームを組み合わせ、本明細書において様々な態様で記載されている方法において使用することができる。非限定的な例として、リポソームの2つの集団を混合することができ、すなわち、一方の集団は、抗

50

原性ペプチドを含むリポソームを含み、もう一方の集団は、哺乳動物において免疫応答を誘導するためのアジュバントを単独で含むリポソームを含む。

【0023】

代替的態様では、様々な抗原性ペプチドおよび/またはアジュバントを含むリポソームの様々な集団を混合することができる。例えば、リポソームの1つの集団は、アジュバントを伴うかまたは伴わない例えばタウタンパク質断片などの第1の抗原性ペプチドをその外表面上に含むリポソームを含んでよく、リポソームの第2集団は、アジュバントを伴うかまたは伴わない例えば アミロイドペプチド断片などの第2の異なる抗原性ペプチドを含んでよい。そして、リポソームの第3集団は、アジュバントを単独で含むリポソームを含んでよい。

10

【0024】

1つの態様において、本方法は、サイズ設定段階、詳細には、ホモジナイズ、押し出し、マイクロフルイディクス、および超音波処理；またはこれらの方法の任意の組み合わせからなる群より選択される方法を伴うサイズ設定段階を含む。

【0025】

本発明の1つの態様において、本明細書において様々な態様で記載されている本発明による方法において調製されるリポソーム粒子のサイズ設定は、ホモジナイズおよび押し出しを含み、これらは互いに独立して行われてもよいし、またはサイズ設定法において1段階で再開されてもよい。さらに、リポソーム粒子のサイズ設定はまたマイクロフルイディクスおよび超音波処理を含んでもよく、これらは独立して、または別の粒子サイズ設定法と併用して用いられてよい。

20

【0026】

リポソームは、300 nmよりも小さい、詳細には250 nmよりも小さい、詳細には200 nmよりも小さいサイズのものである。

【0027】

特に、リポソームは、20 nm~300 nmのサイズ範囲、詳細には40 nm~250 nmのサイズ範囲、詳細には50 nm~200 nmのサイズ範囲、詳細には100 nm~200 nmのサイズ範囲である。

【0028】

1つの態様において、本発明は、アジュバントが、リピドA、モノホスホリルまたはジホスホリルリピドAなどの解毒化リピドA、ミョウバン、Pam2CSK4、Pam3CSK4、Pam3CAG、サポニン、CpG、脂質化CpG、陽イオン性脂質、脂質化CpG、ホスホロチオエート化PS-CpG-ODN、例えばCpG-A、CpG-B、またはCpG-CなどのCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)からなる群より選択される、前記態様のいずれか1つの方法に関する。本発明による方法と共に使用され得るさらなるアジュバントは、限定を意図するものではないが、リン酸アルミニウムまたは水酸化(Al(OH)<sub>3</sub>、AlPO<sub>4</sub>)、カルシウム、鉄、またはジルコニウムの塩、QuilA、QS-21、トレハロースジミコレート(TDM)、リポテイコ酸(黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)から精製される)、DDAB(ジメチルジオクタデシルアンモニウム(臭化物塩))、MF59、L18-MDPおよびB30-MDP(疎水性ムラミルジペプチド誘導体)、C12-iE-DAP(ジアミノピメリン酸)である。

30

40

【0029】

1つの態様において、本発明は、その疎水性部分により脂質二重層中に挿入された、再構成されたペプチド、詳細には再構成された抗原性ペプチドの少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%がリポソームの外表面上に存在する、前記態様のいずれか1つの方法に関する。

【0030】

特に、その疎水性部分により脂質二重層中に挿入された、再構成されたペプチド、詳細には再構成された抗原性ペプチドの100%が、リポソームの表面上に存在する。

【0031】

50

1つの態様において、本発明は、ペプチド、詳細には抗原性ペプチドが、脂肪酸、トリグリセリド、ジグリセリド、ステロイド、スフィンゴ脂質、糖脂質、またはリン脂質の付加によって修飾される、前記態様のいずれか1つの方法に関する。

【0032】

特に、ペプチド、詳細には抗原性ペプチドは、脂肪酸、詳細には少なくとも6個の炭素原子の炭素骨格を有する脂肪酸の付加によって修飾される。

【0033】

特定の態様において、疎水性部分はパルミチン酸である。

【0034】

さらに別の態様において、本発明は、ペプチド、詳細には抗原性ペプチドが、脂質化ポリエチレングリコールまたは改変脂質化ポリエチレングリコールを用いたペグ化によりさらに修飾される、前記態様のいずれか1つの方法に関する。

【0035】

特に、ポリエチレングリコールまたは改変ポリエチレングリコールは、8~150000個、詳細には10~80000個、詳細には10~10000個または8~5000個、詳細には2~1000個、詳細には5~500個、詳細には10~200個のエチレンオキシド部分を含む。

【0036】

特に、PEG鎖は、 $n=45$ 以下のエチレンオキシド部分、詳細には $n=5\sim n=40$ 、より詳細には $n=10\sim n=30$ 、およびさらにより詳細には $n=10$ のエチレンオキシド部分を含む。

【0037】

1つの態様において、本発明は、ペプチド、詳細には抗原性ペプチドが、共有結合しているパルミトイル化アミノ酸残基によって、詳細には該ペプチドのN末端またはC末端のいずれか、詳細には該ペプチドのN末端およびC末端に共有結合している、2~4個、より詳細には4個の残基によって修飾される、前記態様のいずれか1つの方法に関する。

【0038】

特定の態様において、ペプチド、詳細には抗原性ペプチドは、4つのパルミトイル化アミノ酸残基によって修飾され、そのうちの2つは該ペプチドのN末端およびC末端にそれぞれ共有結合している。

【0039】

1つの態様において、本発明は、前記態様のいずれかの方法によって得られる、疎水性部分によって修飾されリポソーム中で再構成された関心対象のペプチド、詳細には抗原性ペプチドを含む、リポソームベースの構築物、詳細にはリポソームベースの抗原性構築物に関し、ここで、再構成された抗原性ペプチドの少なくとも70%がリポソームの外表面上に存在し、該ペプチドが、例えばリポソームの外部脂質表面上の反応物との結合またはペグ化ペプチドの使用によるいかなる化学反応または付加的な分子修飾の助けも借りずに、その疎水性部分により脂質二重層中に挿入されている。

【0040】

ペプチド、詳細には抗原性ペプチドは、リポソーム二重層の(リン)脂質と弱く相互作用するがリポソーム二重層の成分のいずれとも強力な共有的化学結合を形成しないその疎水性または親油性伸長部を介して、リポソームの脂質二重層中に繫留および安定化される。

【0041】

特に、本発明は、再構成されたペプチド、詳細には再構成された抗原性ペプチドの少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%がリポソームの表面上に存在する、前記態様のリポソームベースの構築物、詳細にはリポソームベースの抗原性構築物に関する。

【0042】

1つの態様において、本発明は、再構成されたペプチド、詳細には再構成された抗原性ペプチドの少なくとも80%がリポソームの外表面上に存在する、前記態様のいずれか1つのリポソームベースの構築物、詳細にはリポソームベースの抗原性構築物に関する。

10

20

30

40

50

## 【0043】

1つの態様において、本発明は、再構成されたペプチド、詳細には再構成された抗原性ペプチドの少なくとも85%がリポソームの外表面上に存在する、前記態様のいずれか1つのリポソームベースの構築物、詳細にはリポソームベースの抗原性構築物に関する。

## 【0044】

1つの態様において、本発明は、再構成されたペプチド、詳細には再構成された抗原性ペプチドの少なくとも90%がリポソームの外表面上に存在する、前記態様のいずれか1つのリポソームベースの構築物、詳細にはリポソームベースの抗原性構築物に関する。

## 【0045】

1つの態様において、本発明は、再構成されたペプチド、詳細には再構成された抗原性ペプチドの少なくとも100%がリポソームの外表面上に存在する、前記態様のいずれか1つのリポソームベースの構築物、詳細にはリポソームベースの抗原性構築物に関する。

10

## 【0046】

1つの態様において、本発明は、リポソーム中で再構成されたアジュバントを含む、前記態様のいずれか1つのリポソームベースの抗原性構築物に関する。

## 【0047】

1つの態様において、本発明は、再構成されたアジュバントの少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%がリポソームの外表面上に存在する、前記態様の抗原性構築物に関する。

20

## 【0048】

1つの態様において、本発明は、再構成されたアジュバントの少なくとも80%がリポソームの外表面上に存在する、前記態様のいずれか1つの抗原性構築物に関する。

## 【0049】

1つの態様において、本発明は、再構成されたアジュバントの少なくとも85%がリポソームの外表面上に存在する、前記態様のいずれか1つの抗原性構築物に関する。

## 【0050】

1つの態様において、本発明は、再構成されたアジュバントの少なくとも90%がリポソームの外表面上に存在する、前記態様のいずれか1つの抗原性構築物に関する。

## 【0051】

1つの態様において、本発明は、再構成されたアジュバントの少なくとも100%がリポソームの外表面上に存在する、前記態様のいずれか1つの抗原性構築物に関する。

30

## 【0052】

1つの態様において、本発明は、アジュバントが、リピドA、モノホスホリルもしくはジホスホリルリピドAなどの解毒化リピドA、ミョウバン、Pam3CSK4、Pam3CAG、またはCpG、脂質化CpG、ホスホロチオエート化PS-CpG-ODN、例えばCpG-A、CpG-B、もしくはCpG-CなどのCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)からなる群より選択される、前記態様のいずれか1つの抗原性構築物に関する。本発明による方法と共に使用され得るさらなるアジュバントは、限定を意図するものではないが、リン酸アルミニウムまたは水酸化(Al(OH)<sub>3</sub>、AlPO<sub>4</sub>)、カルシウム、鉄、またはジルコニウムの塩、QuilA、QS-21、トレハロースジミコレート(TDM)、リポテイコ酸(黄色ブドウ球菌から精製される)、DDAB(ジメチルジオクタデシルアンモニウム(臭化物塩))、MF59、L18-MDPおよびB30-MDP(疎水性ムラミルジペプチド誘導体)、C12-iE-DAP(ジアミノピメリン酸)である。

40

## 【0053】

1つの態様において、本発明は、ペプチド、詳細には抗原性ペプチドが、脂肪酸、トリグリセリド、ジグリセリド、ステロイド、スフィンゴ脂質、糖脂質、またはリン脂質、詳細には少なくとも6個の炭素原子の炭素骨格を有する脂肪酸、しかしとりわけパルミチンサンの付加によって修飾されている、前記態様のいずれか1つのリポソームベースの構築物、詳細にはリポソームベースの抗原性構築物に関する。

## 【0054】

50

1つの態様において、本発明は、ペプチド、詳細には抗原性ペプチドが、脂質化ポリエチレングリコールまたは改変脂質化ポリエチレングリコールを用いたペグ化により修飾されている、前記態様のいずれか1つのリポソームベースの構築物、詳細にはリポソームベースの抗原性構築物に関する。

【0055】

特に、ポリエチレングリコールまたは改変ポリエチレングリコールは、8~150000個、詳細には10~80000個、より詳細には10~10000個または8~5000個、詳細には2~1000個、詳細には5~500個、詳細には10~200個のエチレンオキシド部分を含む。特に、PEG鎖の長さは、 $n=45$ 以下、詳細には $n=5\sim n=40$ 、より詳細には $n=10\sim n=30$ 、およびさらにより詳細には $n=10$ のエチレンオキシド部分である。

10

【0056】

1つの態様において、本発明は、ペプチド、詳細には抗原性ペプチドが、共有結合しているパルミトイル化アミノ酸残基によって、詳細には該ペプチドのN末端またはC末端のいずれか、詳細には該ペプチドのN末端およびC末端に共有結合している、2~4個、より詳細には4個の残基によって修飾されている、前記態様のいずれか1つのリポソームベースの構築物、詳細にはリポソームベースの抗原性構築物に関する。

【0057】

特定の態様において、前記態様のいずれか1つによるペプチド、詳細には抗原性ペプチドは、4つのパルミトイル化アミノ酸残基によって修飾され、そのうちの2つは該ペプチドのN末端およびC末端にそれぞれ共有結合している。

20

【0058】

本発明のさらに別の態様において、前記態様のいずれかの構築物、詳細には抗原性構築物を含む組成物が提供される。

【0059】

1つの態様において、前記態様の組成物は、治療有効量の本発明の構築物、詳細には抗原性構築物を、薬学的に許容される担体と共に含む、薬学的組成物である。

【0060】

リポソームは、腫瘍または炎症組織などの疾患部位における「活性」薬物の選択的標的化を達成することを目的とした薬物の送達系として使用することができる。リポソームが標的細胞を認識し、選択的にそれらに結合し、これらの細胞によって内部に取り入れられ得るか、または酵素的加水分解もしくは超音波照射などの工程によって分解されて細胞表面の近傍で薬物を放出し、これが標的細胞によって取り込まれ得るように、選択的標的化はリポソーム表面上に標的化装置(抗体、受容体リガンド等)を必要とする。

30

【0061】

本発明の1つの態様において、薬学的組成物は、ペプチドが標的化機能を有し、抗体もしくはその機能的部分、受容体リガンド、または抗原、受容体、特異的組織、もしくは特異的細胞型を認識しそれらに結合し得る任意の他のペプチドによって表され得る、前記態様のいずれか1つによる構築物を含む。

【0062】

本発明の1つの局面において、本明細書に記載の本発明によるリポソームベースの構築物中に封入されて提供される活性薬物は、例えばドキソルビシン、パクリタキセル、ビンクリスチン、もしくはラルトテカンなどの細胞毒性薬、アンホテリシンBなどの抗真菌薬、全身適用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはプラスミドDNA(pDNA)、RNAなどの核酸ベースの薬物、または例えばラパマイシン、パクリタキセル、アクチノマイシンD、C-Mycアンチセンス、デキサメタゾン、もしくはマトリックスメタロプロテイナーゼ阻害薬などの炎症もしくは再狭窄の予防に適した薬物であってよい。

40

【0063】

本発明の別の局面において、本明細書に記載の本発明によるリポソームベースの構築物中に封入されて提供される活性薬物は、封入ヘモグロビンなどの人工的な酸素運搬体であってよい。

50

## 【0064】

本発明の別の態様において、前記態様のいずれかの構築物または組成物を哺乳動物に投与する段階を含む、哺乳動物において免疫応答を誘導する方法が提供される。

## 【0065】

さらに別の態様において、本発明は、前記態様のいずれかの抗原性構築物または組成物を哺乳動物に投与する段階、および該哺乳動物によって産生された抗体を単離する段階を含む、抗体を生成する方法に関する。特定の態様において、本方法は、免疫化した哺乳動物から得られた脾臓細胞からハイブリドーマ細胞を調製する段階、および該ハイブリドーマ細胞によって産生された抗体を単離する段階をさらに含む。

## 【0066】

1つの態様において、本発明は、前記態様のいずれか1つの態様による方法によって生成された抗体、詳細にはポリクローナルまたはモノクローナル抗体に関する。

## 【0067】

代替的態様において、本発明は、哺乳動物、詳細にはヒトの治療的または予防的処置のための、特に、哺乳動物、詳細にはヒトの治療的または予防的ワクチン接種のための、前記態様のいずれかの構築物、詳細には抗原性構築物、組成物、または抗体の使用に関する。

## 【0068】

本発明の特定の態様において、前記態様のいずれかの構築物、詳細には抗原性構築物、組成物、または抗体は、哺乳動物、詳細にはヒト、詳細には、感染症、CNS関連疾患、または腫瘍学もしくはアレルギーの分野における疾患および障害、または炎症に関連した疾患、障害、または病態に罹患している哺乳動物またはヒト、詳細にはプロテオパシーに関連した疾患、障害、もしくは病態、タンパク質の誤った折りたたみを伴う疾患、および/またはタンパク質の蓄積もしくは凝集を伴う疾患に罹患している哺乳動物またはヒトの治療的または予防的処置において、特に治療的または予防的ワクチン接種において用いることができる。

## 【0069】

さらに別の態様において、本発明は、疾患、障害、または病態、詳細には感染症、CNS関連疾患、または腫瘍学もしくはアレルギーの分野における疾患および障害、または炎症に関連した疾患、障害、または病態、詳細にはプロテオパシーに関連した疾患もしくは障害、タンパク質の誤った折りたたみを伴う疾患、および/またはタンパク質の蓄積もしくは凝集を伴う疾患を検出または診断するための方法における、本発明の抗体の使用に関する。

## 【0070】

1つの態様において、本発明は、疾患、障害、または病態、詳細には感染症、CNS関連疾患、または腫瘍学もしくはアレルギーの分野における疾患および障害、または炎症に関連した疾患、障害、または病態、詳細にはプロテオパシーに関連した疾患もしくは障害、タンパク質の誤った折りたたみを伴う疾患、および/またはタンパク質の蓄積もしくは凝集を伴う疾患を検出または診断するための方法において使用するための、本発明の抗体を含む診断キットに関する。

## 【0071】

1つの態様において、本発明は、治療有効量の本発明のリポソームベースの構築物、詳細にはリポソームベースの抗原性構築物を、薬学的に許容される担体と共に含む、薬学的組成物を提供する。

## 【0072】

適切な薬学的担体、希釈剤、および/または賦形剤は当技術分野で周知であり、これには、例えば、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、油/水乳濁液などの乳濁液、様々な種類の湿潤剤、滅菌溶液等が含まれる。

## 【0073】

本発明のリポソームベースの抗原性構築物を用いて生成された抗体、詳細にはモノクロー

10

20

30

40

50

ーナル抗体およびその活性断片を含む本発明のリポソームベースの抗原性構築物は、公知の技法を用いて、生理学的に許容される製剤に調製することができ、薬学的に許容される担体、希釈剤、および/または賦形剤を含み得る。例えば、本発明のリポソームベースの抗原性構築物を用いて生成された抗体、特に、任意の機能的に同等の抗体またはその機能的部分を含む本発明のモノクローナル抗体を含む、本発明のリポソームベースの抗原性構築物を、薬学的に許容される担体、希釈剤、および/または賦形剤と組み合わせ、治療組成物を形成させる。適切な薬学的担体、希釈剤、および/または賦形剤は当技術分野で周知であり、これには、例えば、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、油/水乳濁液などの乳濁液、様々な種類の湿潤剤、滅菌溶液等が含まれる。

【0074】

本発明による薬学的組成物の処方、当業者に公知の標準的な方法論に従って達成することができる。

【0075】

本発明の組成物は、適切な薬学的有効用量で、固体、液体、またはエアロゾルの形態で対象に投与することができる。固体組成物の例には、丸剤、クリーム剤、および埋め込み型投与単位が含まれる。丸剤は経口投与され得る。治療用クリーム剤は局所投与され得る。埋め込み型投与単位は、例えば腫瘍部位において限局的に投与することができ、または治療組成物の全身放出のために例えば皮下に埋め込むことができる。液体組成物の例には、筋肉内、皮下、静脈内、動脈内注射用に適合化された製剤、ならびに局所および眼内投与用の製剤が含まれる。エアゾル製剤の例には、肺に投与するための吸入器製剤が含まれる。

【0076】

組成物は、標準的な投与経路によって投与することができる。一般的に、組成物は、局所、経口、直腸内、鼻腔内、皮膚間(interdermal)、腹腔内、または非経口(例えば、静脈内、皮下、または筋肉内)経路により投与することができる。

【0077】

加えて、組成物を生分解性ポリマーなどの徐放性マトリックス中に組み入れ、このポリマーを、例えば腫瘍部位などの送達所望される部位の近傍に埋め込むことができる。本方法は、単回投与、所定の時間間隔での反復投与、および所定の期間にわたる持続的投与を含む。

【0078】

本明細書で用いられる徐放性マトリックスは、酵素もしくは酸/塩基加水分解により、または溶解により分解可能な材料、通常ポリマーで作られたマトリックスである。体内に挿入されると、マトリックスに対して酵素および体液が作用する。徐放性マトリックスは、望ましくは、リポソーム、ポリラクチド(ポリ乳酸)、ポリグリコリド(グリコール酸のポリマー)、ポリラクチドコ-グリコリド(乳酸およびグリコール酸のコポリマー)、ポリ酸無水物、ポリ(オルト)エステル、ポリペプチド、ヒアルロン酸、コラーゲン、コンドロイチン硫酸、カルボン酸、脂肪酸、リン脂質、多糖、核酸、ポリアミノ酸、例えばフェニルアラニン、チロシン、イソロイシンなどのアミノ酸、ポリヌクレオチド、ポリビニルピロピレン、ポリビニルピロリドン、およびシリコンなどの生体適合性材料より選択される。好ましい生分解性マトリックスは、ポリラクチド、ポリグリコリド、またはポリラクチドコ-グリコリド(乳酸およびグリコール酸のコポリマー)のうちのいずれか1つのマトリックスである。

【0079】

組成物の投与量が、例えば、処置される病態、用いられる特定の組成物、ならびに他の臨床的因子、例えば、患者の体重、体格、性別、および全般的健康状態、体表面積、投与される特定の化合物または組成物、同時に投与される他の薬物、および投与経路などの様々な因子に依存することは、関連分野の当業者に周知である。

【0080】

本発明による組成物は、例えば、プロテオバシー、タンパク質の誤った折りたたみを伴

10

20

30

40

50

う疾患、およびタンパク質の蓄積または凝集を伴う疾患、タウオパシーおよび/またはアミロイドーシス、アルツハイマー病に關与するアミロイド タンパク質などのアミロイドまたはアミロイド様タンパク質と關連した疾患および障害の一群の薬物療法において用いられる公知の化合物などの生物活性物質または化合物を含む他の組成物と併用して投与することができる。

【0081】

他の生物活性物質または化合物は、本発明による治療組成物と同じかもしくは類似の機構により、または非關連の作用機構により、または多数の關連および/もしくは非關連の作用機構により、その生物学的効果を發揮し得る。

【0082】

本発明による薬学的組成物は、他の1つまたは複数の生物活性物質と同時に、断続的に、または連続して投与することができる。例えば、本発明による薬学的組成物は、第1の付加的な生物活性物質と同時に、または該薬学的組成物の投与後もしくは投与前に連続して投与することができる。2つ以上の付加的な生物活性物質を本発明による少なくとも1つの薬学的組成物と共に投与する適用計画が選択される場合、化合物または物質は様々な組み合わせで一部同時に、一部連続して投与することができる。

【0083】

一般的に、他の生物活性化合物には、中性子透過促進剤、精神治療薬、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬、カルシウムチャネル遮断薬、生体アミン、ベンゾジアゼピン系精神安定薬、アセチルコリンの合成、貯蔵、または放出の促進剤、アセチルコリンシナプス後受容体作動薬、モノアミンオキシダーゼAまたはモノアミンオキシダーゼB阻害薬、N-メチル-D-アスパラギン酸グルタミン酸受容体拮抗薬、非ステロイド性抗炎症薬、抗酸化薬、およびセロトニン受容体拮抗薬が含まれ得る。

【0084】

特に、生物活性薬剤または化合物は、本発明のリポソームベースの抗原性構築物を用いて生成された抗体、詳細にはモノクローナル抗体およびその活性断片を含む本発明のリポソームベースの抗原性構築物と共に、酸化ストレスに対する化合物、抗アポトーシス化合物、金属キレート剤、ピレンゼピンおよび代謝産物などのDNA修復阻害剤、3-アミノ-1-プロパンスルホン酸(3APS)、1,3-プロパンスルホン酸(1,3PDS)、セクレターゼ活性化薬、  
[ ]セクレターゼおよび7セクレターゼ阻害薬、タウタンパク質、神経伝達物質、シート破壊剤、抗炎症分子、例えばクロザピン、ジブラジドン、リスベリドン、アリピプラゾール、もしくはオランザピンなどの「非定型抗精神病薬」、または例えばタクリン、リバスチグミン、ドネペジル、および/もしくはガラントミンなどのコリンエステラーゼ阻害薬(ChEI)、ならびに例えばビタミンB<sub>12</sub>、システイン、アセチルコリン前駆体、レシチン、コリン、イチョウ(Ginkgo biloba)、アセチル-L-カルニチン、イデベノン、プロペントフィリン、もしくはキサンチン誘導体などの他の薬物および栄養補助剤からなる群より選択される少なくとも1つの化合物、ならびに任意で薬学的に許容される担体および/または希釈剤および/または賦形剤、ならびに疾患を処置するための説明書を含み得る。

【0085】

さらなる態様において、本発明による組成物は、本発明のリポソームベースの抗原性構築物を用いて生成された抗体、詳細にはモノクローナル抗体およびその活性断片を含む本発明のリポソームベースの抗原性構築物と共に、ナイアシンまたはメマンチン、ならびに任意で薬学的に許容される担体および/または希釈剤および/または賦形剤を含み得る。

【0086】

本発明のさらに別の態様において、本発明のリポソームベースの抗原性構築物を用いて生成された抗体、詳細にはモノクローナル抗体およびその活性断片を含む本発明のリポソームベースの抗原性構築物と共に、幻覚、妄想、思考障害(顕著な思考散乱、脱線、脱線思考を呈する)、および奇異なまたは混乱した行動、ならびに快感消失、感情鈍麻、無気力、および社会的引きこもりを含む陽性および陰性の精神病症状を処置するための、例えばクロザピン、ジブラジドン、リスベリドン、アリピプラゾール、またはオランザピンな

10

20

30

40

50

どの「非定型抗精神病薬」、ならびに任意で薬学的に許容される担体および/または希釈剤および/または賦形剤を含む組成物が提供される。

【0087】

本発明による結合ペプチドに加えて、組成物中で適切に用いられ得る他の化合物は、WO 2004/058258(とりわけページ16および17ページを参照)に開示されているものであり、例えば、治療薬標的(36~39ページ)、アルカンスルホン酸およびアルカノール硫酸(39~51ページ)、コリンエステラーゼ阻害薬(51~56ページ)、NMDA受容体拮抗薬(56~58ページ)、エストロゲン(58~59ページ)、非ステロイド性抗炎症薬(60~61ページ)、抗酸化剤(61~62ページ)、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(PPAR)作動薬(63~67ページ)、コレステロール低下薬(68~75ページ);アミロイド阻害薬(75~77ページ)、アミロイド形成阻害薬(77~78ページ)、金属キレート剤(78~79ページ)、抗精神病薬および抗鬱薬(80~82ページ)、栄養補助剤(83~89ページ)、ならびに脳内での生物活性物質の生物学的利用能を高める化合物(89~93ページを参照)、ならびにプロドラッグ(93および94ページ)を含む。この文書は参照により本明細書に組み入れられるが、化合物はとりわけ上記のページで言及されている化合物である。

10

【0088】

組成物の投与量は、処置される病態、用いられる特定の組成物、ならびに他の臨床的因子、例えば、患者の体重、体格、および状態、体表面積、投与される特定の化合物または組成物、同時に投与される他の薬物、および投与経路などに依存する。

【0089】

タンパク質性の薬学的活性物質は、1用量当たり1 ng~10 mgの量で存在し得る。一般的に、投与計画は、本発明による抗体の0.1 μg~10 mgの範囲、詳細には1.0 μg~1.0 mgの範囲、およびより詳細には1.0 μg~100 μgの範囲にあるべきであり、これらの範囲内に入るすべての個々の数字もまた本発明の一部である。投与が連続注入によって行われる場合、より適切な投与量は0.01 μg~10 mg単位/キログラム体重/時間の範囲にあってよく、これらの範囲内に入るすべての個々の数字もまた本発明の一部である。

20

【0090】

本発明の特定の態様において、前記態様のいずれかの抗原性構築物、または治療有効量の該抗原性構築物を含む組成物は、1週間~20週間の時間間隔で、詳細には1~10週間の時間間隔で、詳細には1~6週間の時間間隔で、より詳細には1~4週間の時間間隔で、およびさらにより詳細には2~3週間の時間間隔で、反復用量で、特に1~15回の用量で、より詳細には2~10回の用量で、より詳細には3~5回の用量で、およびさらにより詳細には3回の用量で投与される。追加免疫後の適切な時点で、詳細には追加免疫の3~10日後、より詳細には追加免疫の4~8日後、およびより詳細には追加免疫の7日後に血清/血漿試料を採取し、公知の方法論、詳細には例えばELISAアッセイなどの通常用いられる免疫測定法の1つを用いて抗原性構築物の免疫原性を決定することにより、免疫応答をモニターすることができる。

30

【0091】

投与は一般的に、非経口的、例えば静脈内である。非経口投与用の調製物には、滅菌の水性または非水性溶液が含まれる。組成物の投与量は、処置される病態、用いられる特定の組成物、ならびに他の臨床的因子、例えば、患者の体重、体格、および状態、体表面積、投与される特定の化合物または組成物、同時に投与される他の薬物、および投与経路などに依存する。

40

【0092】

非水性溶媒には、これらに限定されることはないが、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが含まれる。水性溶媒は、生理食塩水および緩衝培地を含む、水、アルコール/水溶液、乳濁液、または懸濁液からなる群より選択され得る。非経口媒体には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル、または固定油が含まれる。静脈内媒体には、液体および栄養補充液、電解質補

50

充液(リンゲルデキストロースに基づくものなど)等が含まれる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガス等などの保存剤も同様に存在してもよい。

【0093】

薬学的組成物は、詳細にはヒト起源の、例えば血清アルブミンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質性担体をさらに含み得る。意図される用途に応じて、本発明の薬学的組成物中にさらなる生物活性薬剤が存在してもよい。

【0094】

結合標的が脳内に位置する場合、本発明のある種の態様は、血液脳関門を越えるための、本発明のリポソームベースの抗原性構築物を用いて生成された抗体、詳細にはモノクローナル抗体およびその活性断片を含む本発明のリポソームベースの抗原性構築物を提供する。ある種の神経変性疾患は、血液脳関門の透過性の増加と関連しており、そのため、本発明のリポソームベースの抗原性構築物を用いて生成された抗体、詳細にはモノクローナル抗体またはその活性断片を含む本発明のリポソームベースの抗原性構築物を脳に容易に導入することができる。血液脳関門が無傷のままである場合には、物理的方法、脂質に基づく方法、ならびに受容体およびチャネルに基づく方法を含むがこれらに限定されない、血液脳関門を越えて分子を輸送するためのいくつかの当技術分野で公知のアプローチが存在する。

10

【0095】

本発明のリポソームベースの抗原性構築物を用いて生成された抗体、詳細にはモノクローナル抗体またはその活性断片を含む本発明のリポソームベースの抗原性構築物を血液脳関門を越えて輸送する物理的方法には、血液脳関門を完全に回避するもの、または血液脳関門に開口部を作出することによるものが含まれるが、これらに限定されない。回避方法には、脳内への直接注射(例えば、Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398-406 (2002)を参照されたい)、および脳内に送達装置を埋め込むこと(例えば、Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003); およびGliadel Wafers(商標)、Guildford Pharmaceuticalを参照されたい)が含まれるが、これらに限定されない。関門に開口部を作出する方法には、超音波(例えば、米国特許出願公開第2002/0038086号を参照されたい)、浸透圧(例えば、高張マンニトールの投与による(Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y (1989))), 例えばブラジキニンまたは透過剤A-7による透過処理(例えば、米国特許第5,112,596号、第5,268,164号、第5,506,206号、および第5,686,416号を参照されたい)、ならびに結合ペプチドまたは抗原結合断片をコードする遺伝子を含むベクターによる血液脳関門にまたがるニューロンのトランスフェクション(例えば、米国特許出願公開第2003/0083299号を参照されたい)が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0096】

本発明のリポソームベースの抗原性構築物を用いて生成された抗体、詳細にはモノクローナル抗体またはその活性断片を含む本発明のリポソームベースの抗原性構築物を血液脳関門を越えて輸送する脂質に基づく方法には、血液脳関門の血管内皮上の受容体に結合する活性断片に結合させたリポソーム中に該分子を封入すること(例えば、米国特許出願公開第20020025313号を参照されたい)、および本発明のリポソームベースの抗原性構築物を用いて生成された抗体、詳細にはモノクローナル抗体またはその活性断片を含む本発明のリポソームベースの抗原性構築物を、低密度リポタンパク質粒子(例えば、米国特許出願公開第20040204354号を参照されたい)またはアポリポタンパク質E(例えば、米国特許出願公開第20040131692号を参照されたい)でコーティングすることが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0097】

本発明のリポソームベースの抗原性構築物を用いて生成された抗体、詳細にはモノクローナル抗体またはその活性断片を含む本発明のリポソームベースの抗原性構築物を血液脳関門を越えて輸送する受容体およびチャネルに基づく方法には、グルコシルチコイド遮断薬を用いて血液脳関門の透過性を増加させること(例えば、米国特許出願公開第2002/0065

50

259号、第2003/0162695号、および第2005/0124533号を参照されたい) ; カリウムチャネルを活性化すること(例えば、米国特許出願公開第2005/0089473号を参照されたい)、ABC薬物輸送体を阻害すること(例えば、米国特許出願公開第2003/0073713号を参照されたい) ; 抗体をトランスフェリンでコーティングし、1つまたは複数のトランスフェリン受容体の活性を調節すること(例えば、米国特許出願公開第2003/0129186号を参照されたい)、および抗体を陽イオン化すること(例えば、米国特許第5,004,697号)が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0098】

さらなる態様において、本発明は、疾患、障害、または病態、詳細には感染症、CNS関連疾患、または腫瘍学もしくはアレルギーの分野における疾患および障害に関連した疾患、障害、または病態、詳細にはプロテオパシーに関連した疾患、障害、もしくは病態、タンパク質の誤った折りたたみを伴う疾患、および/またはタンパク質の蓄積もしくは凝集を伴う疾患を検出および診断するための方法およびキットを提供する。

10

#### 【0099】

さらに、本発明は、疾患、障害、または病態、詳細には感染症、CNS関連疾患、または腫瘍学もしくはアレルギーの分野における疾患および障害に関連した疾患、障害、または病態、詳細にはプロテオパシーに関連した疾患、障害、もしくは病態、タンパク質の誤った折りたたみを伴う疾患、および/またはタンパク質の蓄積もしくは凝集を伴う疾患の素因を診断するため、または患者における微小残存病変をモニターするため、または抗体、詳細にはモノクローナル抗体およびその活性断片を含む本発明によるリボソームベースの抗原性構築物、もしくは本明細書において様々な態様で記載されている本発明による組成物による処置に対する患者の応答性を予測するための方法およびキットを提供する。これらの方法には、生体試料中またはインサイチュー条件において物質を検出または定量するために通常用いられる公知の免疫学的方法が含まれる。

20

#### 【0100】

対象、詳細には哺乳動物、より詳細にはヒトにおける疾患、障害、もしくは病態の診断、詳細には感染症、CNS関連疾患、もしくは腫瘍学もしくはアレルギーの分野における疾患および障害に関連した疾患、障害、もしくは病態の診断、詳細にはプロテオパシーに関連した疾患、障害、もしくは病態、タンパク質の誤った折りたたみを伴う疾患、および/もしくはタンパク質の蓄積もしくは凝集を伴う疾患の診断、またはそのような疾患もしくは病態の素因の診断は、試料中またはインサイチューでの、疾患の原因となるタンパク質領域中のエピトープに対する本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体またはその活性断片の免疫特異的結合を検出することによって達成され得、これは、疾患原因のタンパク質またはタンパク質凝集物を含むことが疑われる試料または特定の身体部分もしくは身体部位を、疾患の原因となる該タンパク質の領域中のエピトープに結合する抗体と接触させる段階、該抗体を該タンパク質と結合させて免疫学的複合体を形成させる段階、該免疫学的複合体の形成を検出する段階、および該免疫学的複合体の有無を、該試料または特定の身体部分もしくは部位における該疾患原因のタンパク質またはタンパク質凝集物の有無と相関づける段階、任意で該免疫学的複合体の量を正常対照値と比較する段階を含み、正常対照値と比較して該免疫学的複合体の量が増加していることにより、該対象が、プロ

30

40

#### 【0101】

抗体、詳細にはモノクローナル抗体およびその活性断片を含む本発明によるリボソームベースの抗原性構築物、または本明細書において様々な態様で記載されている本発明による組成物による処置後の、対象、詳細には哺乳動物、より詳細にはヒトにおける微小残存病変をモニターすることは、試料中またはインサイチューでの、疾患の原因となるタンパク質領域中のエピトープに対する本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体またはその活性断片の免疫特異的結合を検出することによって達成され得、これは、疾患原因の

50

タンパク質またはタンパク質凝集物を含むことが疑われる試料または特定の身体部分もしくは身体部位を、疾患の原因となる該タンパク質の領域中のエピトープに結合する抗体と接触させる段階、該抗体を該タンパク質と結合させて免疫学的複合体を形成させる段階、該免疫学的複合体の形成を検出する段階、および該免疫学的複合体の有無を、該試料または特定の身体部分もしくは部位における該疾患原因のタンパク質またはタンパク質凝集物の有無と関連づける段階、任意で該免疫学的複合体の量を正常対照値と比較する段階を含み、正常対照値と比較して該免疫学的複合体の量が増加していることにより、該対象がなお微小残存病変に罹患している可能性があることが示される。

【0102】

抗体、詳細にはモノクローナル抗体およびその活性断片を含む本発明によるリボソームベースの抗原性構築物、もしくは本明細書において様々な態様で記載されている本発明による組成物による処置に対する対象、詳細には哺乳動物、より詳細にはヒトの応答性を予測することは、試料中またはインサイチューでの、疾患の原因となるタンパク質領域中のエピトープに対する結合ペプチド、詳細にはモノクローナル抗体またはその活性断片の免疫特異的結合を検出することによって達成され得、これは、疾患原因のタンパク質またはタンパク質凝集物を含むことが疑われる試料または特定の身体部分もしくは身体部位を、疾患の原因となる該タンパク質の領域中のエピトープに結合する抗体と接触させる段階、該抗体を該タンパク質と結合させて免疫学的複合体を形成させる段階、該免疫学的複合体の形成を検出する段階、および該免疫学的複合体の有無を、該試料または特定の身体部分もしくは部位における該疾患原因のタンパク質またはタンパク質凝集物の有無と関連づける段階、任意で疾患の発症前と後の該免疫学的複合体の量を比較する段階を含み、該免疫学的複合体の量が減少していることにより、該患者が該処置に反応する高い可能性を有することが示される。

【0103】

特に、本明細書で先に報告された診断法において検出される疾患もしくは病態、ならびに/または本明細書で先に報告された抗原性構築物および/もしくは抗体を用いることにより治療的もしくは予防的に処置される疾患もしくは病態は、詳細には、AAアミロイドーシス、AH(重鎖)アミロイドーシス、AL(軽鎖)アミロイドーシス、アレクサンダー病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、大動脈中膜アミロイドーシス、apoA1アミロイドーシス、apoA2アミロイドーシス、apoA4アミロイドーシス、大動脈中膜アミロイドーシス、CADASIL、心房アミロイドーシス、白内障、脳アミロイド血管症、角膜ラクトフェリンアミロイドーシス、重症疾患ミオパシー、皮膚苔癬アミロイドーシス、嚢胞性線維症、透析アミロイドーシス、家族性アミロイドニューロパシー、家族性英国型認知症、家族性デンマーク型認知症、家族性内臓アミロイドーシス、フィブリノーゲンアミロイドーシス、フィンランド型遺伝性アミロイドーシス、前頭側頭葉認知症、緑内障、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血-オランダ型、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血-アイスランド型、ハンチントン病および他のトリプレット障害、遺伝性格子状角膜ジストロフィー、封入体筋炎/ミオパシー、リゾチームアミロイドーシス、マロリー体、髄様甲状腺癌、歯原性(ピンクトボルグ)腫瘍アミロイド、パーキンソン病、下垂体プロラクチノーマ、原発性全身性アミロイドーシス、原発性皮膚アミロイドーシス、プリオン病、肺胞蛋白症、緑内障における網膜神経節細胞変性、プリオン病、精嚢アミロイド、セリピノパシー、老人性全身性アミロイドーシス、セリピノパシー、鎌状赤血球病、シヌクレイン病、タウオパシー、および2型糖尿病、または炎症からなる群より選択される疾患または病態である。

【0104】

そのような疾患もしくは病態の診断、そのような疾患もしくは病態の素因の診断、または患者における微小残存病変をモニターすること、または抗体、詳細にはモノクローナル抗体およびその活性断片を含む本発明によるリボソームベースの抗原性構築物、もしくは本明細書において様々な態様で記載されている本発明による組成物による処置に対する患者の応答性を予測することに使用され得る生体試料は、例えば、血清、血漿、唾液、胃分泌液、粘液、脳脊髄液、リンパ液等の体液、または神経、脳、心臓、もしくは血管組織な

10

20

30

40

50

どの、生物から得られる組織もしくは細胞試料である。試料中の疾患原因のタンパク質またはタンパク質凝集物の有無を判定するためには、当業者に公知の任意の免疫測定法、例えば、検出用の二次試薬を用いる間接的検出法を利用するアッセイ、ELISA、ならび免疫沈降および凝集アッセイが使用され得る。これらのアッセイの詳細な説明は、例えば、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612、Maertens and Stuyverに対するWO96/13590、Zrein et al. (1998)、およびWO96/29605に提供されている。

#### 【0105】

インサイチュー診断のために、本発明による抗体と疾患原因のタンパク質またはタンパク質凝集物上のエピトープ領域との特異的結合が起こり得るように、例えば、静脈内、鼻腔内、腹腔内、脳内、動脈内注射などの当技術分野で公知の方法によって、本発明の抗体、詳細にはモノクローナル抗体およびその活性断片を含む本発明による結合ペプチド、またはその任意の活性のある機能的部分を、診断される生物に投与することができる。結合ペプチド/抗原複合体は、抗体、詳細にはモノクローナル抗体もしくはその機能的断片を含む本発明による結合ペプチドに付着させた標識、または当技術分野で公知の任意の他の検出方法によって簡便に検出することができる。

#### 【0106】

診断的適用において、またはプロテオパシー、タンパク質の誤った折りたたみを伴う疾患、および/またはタンパク質の蓄積もしくは凝集を伴う疾患を含むタンパク質関連疾患または病態の素因を診断するため、または患者における微小残存病変をモニターするため、または抗体、詳細にはモノクローナル抗体およびその活性断片を含む本発明によるリポソームベースの抗原性構築物、もしくは本明細書において様々な態様で記載されている本発明による組成物による処置に対する患者の応答性を予測するための適用において用いられる免疫測定法は、典型的には、標識された抗原、結合ペプチド、または検出用の二次試薬に依存する。これらのタンパク質または試薬は、酵素、放射性同位体、ならびにコロイド金およびラテックスビーズなどの着色粒子を含むがこれらに限定されない蛍光、発光、および発色物質を含む、当業者に一般的に公知の化合物で標識することができる。これらのうち、放射性標識は、最も多くの変化を伴って、ほぼすべての種類のアッセイに使用することができる。酵素結合標識は、放射能を避けなければならない場合、または迅速な結果が求められる場合に、特に有用である。蛍光色素は、その使用のために高価な装備を要するが、非常に感度の高い検出方法を提供する。これらのアッセイにおいて有用な結合ペプチドは、抗体、詳細にはモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、およびアフィニティ精製されたポリクローナル抗体を含む、本明細書において開示された特許請求されるものである。

#### 【0107】

あるいは、本発明の抗体、詳細にはモノクローナル抗体およびその活性断片は、プロテインAもしくはGまたは二次抗体などの、免疫グロブリンに対する親和性を有する標識物質との反応によって間接的に標識することもできる。本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体およびその活性断片を第2物質と結合させ、該抗体と結合している第2物質に対して親和性を有する標識された第3物質で検出することもできる。例えば、本発明による抗体、詳細にはモノクローナル抗体およびその活性断片をビオチンと結合させ、標識されたアビジンまたはストレプトアビジンを用いて結合ペプチド/ビオチン複合物を検出することができる。同様に、結合ペプチドをハプテンと結合させ、標識された抗ハプテン結合ペプチドを用いて結合ペプチド/ビオチン複合物を検出することもできる。

#### 【0108】

当業者は、本発明に従って使用され得るこれらおよび他の適切な標識を把握していると考えられる。抗体またはその断片に対するこれらの標識の結合は、当業者に一般的に公知である標準的技法を用いて達成することができる。典型的な技法は、Kennedy, J. H., et al., 1976 (*Clin. Chim. Acta* 70:1-31)、およびSchurs, A. H. W. M., et al. 1977 (*Clin. Chim Acta* 81:1-40)によって記載されている。後者で言及されている結合技法は、

10

20

30

40

50

グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、ジマレイミド法、およびその他であり、これらのすべてが参照により本明細書に組み入れられる。

【0109】

現在の免疫測定法は、分析物の存在を検出するために二重抗体法を利用し、この方法では、抗体は、検出可能な標識で標識された二次抗体との反応性によって間接的に標識される。二次抗体は、好ましくは、モノクローナル抗体の由来となった動物の抗体に結合するものである。換言すると、モノクローナル抗体がマウス抗体である場合には、標識された二次抗体は抗マウス抗体である。本明細書に記載されているアッセイにおいて用いられる抗体に関して、この標識は好ましくは抗体でコーティングされたビーズ、詳細には磁性ビーズである。本明細書に記載されている免疫測定法において使用される抗体に関して、標識は好ましくは、放射性、蛍光、または電気化学発光物質などの検出可能な分子である。

10

【0110】

分析物の存在の速やかな判定に適合化されているために高速フォーマットシステムと称されることの多い代替的な二重抗体システムを、本発明の範囲内で使用することもできる。本システムは、抗体と分析物との間の高い親和性を必要とする。本発明の1つの態様によれば、疾患原因のタンパク質またはタンパク質凝集物の存在は、それぞれが該タンパク質に対して特異的である一対の抗体を用いて判定される。該抗体対の一方は本明細書で「検出抗体」と称され、該抗体対のもう一方は本明細書で「捕捉抗体」と称される。本発明のモノクローナル抗体は、捕捉抗体または検出抗体のいずれかとして用いることができる。本発明のモノクローナル抗体はまた、捕捉抗体および検出抗体の両方として単一のアッセイで一緒に用いることもできる。このように、本発明の1つの態様は、生体液の試料中の疾患原因のタンパク質またはタンパク質凝集物を検出するために、二重抗体サンドイッチ法を用いる。この方法では、分析物(アミロイドタンパク質)は検出抗体と捕捉抗体との間にサンドイッチ状に挟まれ、捕捉抗体は固体支持体上に不可逆的に固定化される。検出抗体は、抗体-分析物サンドイッチの存在、ひいては分析物の存在を同定するために、検出可能な標識を含む。

20

【0111】

例示的な固相物質には、放射免疫測定法および酵素免疫測定法の分野で周知であるマイクロタイプレート、ポリスチレンの試験管、磁性、プラスチック、またはガラスのビーズおよびスライドが含まれるが、これらに限定されない。抗体を固相に結合させるための方法もまた、当業者に周知である。さらに最近では、ナイロン、ニトロセルロース、酢酸セルロース、グラスファイバー、および他の多孔性ポリマーなどのいくつかの多孔性材料が固体支持体として使用されている。

30

【0112】

本発明はまた、生体試料中の疾患原因のタンパク質またはタンパク質凝集物を検出するための、上記で定義された組成物を含む診断キットに関する。さらに、本発明は、上記で定義された組成物に加えて、上記で定義された検出試薬もまた含む後者の診断キットに関する。「診断キット」という用語は、一般的に、当技術分野で公知の任意の診断キットを指す。より具体的には、後者の用語は、Zrein et al. (1998)に記載されているような診断キットを指す。

40

【0113】

本発明による抗体を含む、プロテオパシーに関連した疾患および病態、タンパク質の誤った折りたたみを伴う疾患、および/またはタンパク質の蓄積もしくは凝集を伴う疾患を検出および診断するための新規な免疫プローブおよび検査キットを提供することは、本発明のさらに別の目的である。免疫プローブに関しては、抗体を適切なレポーター分子、例えば酵素または放射性核種に直接的または間接的に付着させる。検査キットは、本発明による1つまたは複数の抗体を保持する容器、および疾患原因の抗原に結合させて免疫学的複合体を形成させ、該免疫学的複合体の有無が該疾患原因のタンパク質またはタンパク質凝集物の有無と相関するような該免疫学的複合体の形成を検出する目的で抗体を使用するための説明書を含む。

50

## 【0114】

## 定義

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられる場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その」は、特に文脈によって明白に指示されていない限り、その対象物の複数形も含む。したがって、例えば、「1つのペプチド」への言及は、1つまたは複数のペプチドを含む。

## 【0115】

特質または値に関連した「本質的に」、「約」、「およそ」等という用語は、詳細には、それぞれまさにその特質またはまさにその値もまた規定する。

## 【0116】

さらに、特許請求の範囲において「含む」という語は、他の要素または段階を排除しない。一つの段階は、特許請求の範囲に列挙されるいくつかの特徴の複数の機能を満たし得る。

## 【0117】

本明細書で用いられる「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は互換的であり、ペプチド結合により連結された2つまたはそれ以上のアミノ酸から構成される生体分子を意味すると定義される。

## 【0118】

「ペプチド」という用語は、その炭素が、1つのアミノ酸の炭素のカルボキシル基と、別のアミノ酸の炭素のアミノ基との間の縮合反応によって形成されるペプチド結合を介して連結された、アミノ酸(典型的にはL-アミノ酸)の鎖である。鎖の一方の端(すなわち、アミノ末端)の末端アミノ酸は遊離アミノ基を有し、鎖のもう一方の端(すなわち、カルボキシ末端)の末端アミノ酸は遊離カルボキシル基を有する。したがって、「アミノ末端」(N末端と略記)という用語は、ペプチドのアミノ末端におけるアミノ酸上の遊離のアミノ基、またはペプチド内の任意の他の位置におけるアミノ酸のアミノ基(ペプチド結合に関与する場合はイミノ基)を指す。同様に、「カルボキシ末端」(C末端と略記)という用語は、ペプチドのカルボキシ末端におけるアミノ酸上の遊離のカルボキシル基、またはペプチド内の任意の他の位置におけるアミノ酸のカルボキシル基を指す。

## 【0119】

典型的に、ペプチドを構成するアミノ酸は、アミノ末端から開始して、ペプチドのカルボキシ末端方向に向かって増えていくように、順番に番号がつけられる。したがって、1つのアミノ酸が別のアミノ酸に「続く」と表現される場合、そのアミノ酸は、先行するアミノ酸よりもペプチドのカルボキシ末端側に近接して位置する。

## 【0120】

「残基」という用語は、アミド結合によりペプチド中に取り込まれたアミノ酸を指すために本明細書で用いられる。したがって、アミノ酸は天然アミノ酸であってよく、または特に限定されない限り、天然アミノ酸と同様の様式で機能する天然アミノ酸の公知の類似体(すなわち、アミノ酸模倣体)も包含し得る。さらに、アミド結合模倣体は、当業者に周知のペプチド骨格の修飾を含む。

## 【0121】

「修飾ペプチド」という用語は、修飾ペプチドがミセル形態で得られるように、疎水性部分の付加により修飾された任意のペプチドを指すために本明細書で用いられる。ペプチドは標的化機能を有してよく、したがって抗体もしくは抗体の結合断片、リガンド、抗原、受容体、担体タンパク質、または抗原、受容体、組織、もしくは例えば線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、血液細胞、腫瘍細胞等を含む細胞型を認識して結合し得る任意の他のタンパク質もしくはペプチドを指し得る。特に、修飾ペプチドは、リポソームを腫瘍組織または腫瘍細胞に標的化することができると考えられる。本明細書において様々な態様で記載されている本発明のリポソーム構築物中で使用するための修飾ペプチドはまた、固形腫瘍の血管系を標的化するペプチドであってもよい。

## 【0122】

10

20

30

40

50

1つの局面において、本明細書において様々な態様で記載されている本発明のリボソーム構築物中で使用するための修飾ペプチドは、受容体-リガンド相互作用などのタンパク質間相互作用における認識成分として機能する標的化ペプチドである。

【0123】

1つの局面において、本明細書において様々な態様で記載されている本発明のリボソーム構築物中で使用するための修飾ペプチドは、本明細書において以下に記載されているような抗原性ペプチドである。

【0124】

別の局面において、本明細書において様々な態様で記載されている本発明のリボソーム構築物中で使用するための修飾ペプチドは、RGDペプチド、ソマトスタチン、走化性ペプチド、血管作動性腸管ペプチド、およびそれらの模倣体である。一般的に、これらのペプチドは、親和性の高いリガンド-受容体会合により標的細胞に結合し、受容体媒介性エンドサイトーシスにより細胞内区画に進入する(さらなる情報についてはUS20030229013を参照されたい)。

10

【0125】

さらに別の局面において、本明細書において様々な態様で記載されている本発明のリボソーム構築物中で使用するための修飾ペプチドは、抗体、詳細には、例えば米国特許第5,620,689号に記載されているようなB細胞またはT細胞エピトープに対する特異的認識を有する抗体または抗体断片などの、モノクローナル抗体または抗体断片である。例えば、抗体は、B細胞エピトープCD19、CD20、CD22、またはCD77を認識するものであってよい。抗体は、T細胞エピトープCD4、CD7、またはCD8を認識するものであってよい。

20

【0126】

リボソームの外表面上に包埋されたペプチドの標的化機能性は、治療薬および/またはオリゴヌクレオチドなどの小さな生物活性分子を送達するために使用することができる。送達特異性は、限定された細胞型に対するリボソームペプチド結合能によって限定される。

【0127】

治療薬には、天然および合成の化合物、詳細には、抗関節炎活性、抗不整脈活性、抗菌活性、抗コリン活性、抗凝固活性、抗利尿活性、解毒活性、抗てんかん活性、抗真菌活性、抗炎症活性、代謝拮抗活性、抗片頭痛活性、抗腫瘍活性、抗寄生虫活性、解熱活性、抗けいれん活性、抗血清活性、鎮痙活性、鎮痛活性、麻酔活性、遮断活性、生体応答修飾活性、骨代謝調節活性、心血管活性、利尿活性、酵素活性、受精能増強活性、成長促進活性、止血活性、ホルモン活性、ホルモン抑制活性、高カルシウム血症軽減活性、低カルシウム血症軽減活性、低血糖軽減活性、高血糖軽減活性、免疫抑制活性、免疫増強活性、筋弛緩活性、神経伝達活性、副交感神経作動活性、交感神経作動血漿増量活性、血漿増補活性、向精神活性、血栓溶解活性、または血管拡張活性を有する化合物が含まれる。

30

【0128】

特に、本明細書において様々な態様で記載されている本発明によるリボソーム上で用いられる修飾ペプチドは、治療組成物を形成するために抗腫瘍化合物をその中に捕捉して含むリボソームの外表面上に包埋された腫瘍標的化ペプチドであってよい。抗腫瘍化合物は、DNA構成要素合成を停止させる化合物(例えば、メトトレキサート、フルオロウラシル、ヒドロキシウレア、およびメルカプトプリン)、DNAに直接損傷を与える化合物(例えば、ダウノルピシン、ドキソルピシン、エピルピシン、およびイダルピシン、ならびにエピルピジンおよびミトキサントロンのようなこれらの類似体などのアントラサイクリン系抗生物質、またはシスプラチン、カルボプラチン、オルマプラチン、オキサリプラチン、ゼニプラチン、エンロプラチン、ロバプラチン、スピロプラチン、((-)-(R)-2-アミノメチルピロリジン(1,1-シクロブタンジカルボキシラート)プラチナ)(DWA2114R)、(SP-4-3(R)-1,1-シクロブタン-ジカルボキシラート(2-)-(2-メチル-1,4-ブタンジアミン-N,N'))プラチナ)(CI-973)、ネダプラチン(254-S)、および(ビス-アセタト-アミン-ジクロロ-シクロヘキシルアミン-プラチナ(IV))(JM-216)(Weiss, R. B., et al., Drugs, 46(3): 360-377 (

40

50

1993)) などのエトポシドおよび白金化合物、紡錘体の合成または分解に影響を及ぼす化合物(例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンレウロシン(vinleurosine)、ビンロジシン(vinrodisine)、ビノレルピン、およびビンデシンからなる群より選択されるビンカルカロイド、またはパクリタキセル)、または血管新生を破壊する化合物(例えば、抗VEGF抗体、アンジオスタチン、エンドスタチン、タムスタチン、およびTNF[ ])などの化学療法薬および/または細胞毒性薬であってよい。あるいは、抗腫瘍薬は、カンプトテシンおよびその類似体などのトポイソメラーゼI阻害薬、または放射線療法薬(例えば、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{111}\text{In}$  DTPA、または $^{131}\text{I}$ ヨウ化ナトリウム)であってよい。

#### 【0129】

捕捉される生物活性分子はまた、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはリポザイム、siRNA、または標的細胞によって内部に取り入れられた場合に、治療遺伝子の発現を達成して、例えば、嚢胞性線維症、アデノシンデアミナーゼ欠損症、およびエイズなどのウイルス性、悪性、および炎症性の疾患および病態を処置するための治療遺伝子産物を産生する治療遺伝子を含むプラスミドなどの核酸であってよい。1つの局面において、オリゴヌクレオチドは、癌の処置に用いられる、APC、DPC4、NF-1、NF-2、MTS1、RB、p53、WT1、BRCA1、BRCA2、およびVHLなどの腫瘍抑制遺伝子であってよい(さらなる情報についてはUS2010119444を参照されたい)。

#### 【0130】

本発明の1つの局面において、本明細書において様々な態様で記載されている本発明によるリポソーム上で用いられるペプチドは、固形腫瘍の血管系を標的化するペプチドであってよい。例示的な血管標的剤(VTA)は、米国特許第5,855,866号、第5,965,132号、第6,261,535号、第6,051,230号、および第6,451,312号に記載されており、これらは腫瘍血管系のマーカーに対する抗細胞剤および毒素の標的化送達について記載している。

#### 【0131】

血管標的化アプローチの別の効果的な型は、腫瘍の血管系または間質内に発現または吸着されるマーカーに対して凝固因子を標的化することである(Huang et al., 1997; 米国特許第6,093,399号、第6,004,555号、第5,877,289号、および第6,036,955号)。

#### 【0132】

本発明の別の局面において、本明細書において様々な態様で記載されている本発明によるリポソーム上で用いられるペプチドは、抗体、詳細には、例えばB細胞またはT細胞エпитープに対する特異的認識を有する抗体または抗体断片などのモノクローナル抗体または抗体断片であってよく、捕捉される生物活性分子は、血液障害の処置のためのドキシソルピシン、ビンクリスチン、ロムスチン、インターフェロン、メルファラン、シクロホスファミド、プレドニゾン、クロラムブシル、カルムスチン、およびデキサメタゾンであってよい。

#### 【0133】

「抗原性ペプチド」または「関心対象の抗原性ペプチド」という用語は、哺乳動物、詳細にはヒトへの投与に際して、該哺乳動物またはヒトにおいて免疫応答をもたらすことができる任意のペプチドに関する。本発明の特定の局面において、抗原性ペプチドは、例えば、プリオンタンパク質、タウタンパク質、シヌクレイン、ハンチンチン、アミリン、もしくはアミロイド、または上記ペプチドの1つもしくは複数の組み合わせなどのアミロイドタンパク質またはアミロイド様タンパク質に由来するペプチドに関する。

#### 【0134】

A 抗原性ペプチド断片は、A ペプチドのN末端部分、詳細にはA 1-15断片またはA 1-16断片由来の少なくとも5個、詳細には少なくとも6個、詳細には少なくとも7個、詳細には少なくとも8個、詳細には少なくとも9個、詳細には少なくとも10個、詳細には少なくとも11個、詳細には少なくとも12個、詳細には少なくとも13個、詳細には少なくとも14個、詳細にはすべてのアミノ酸残基を含むN末端部分に相当し得る。

#### 【0135】

A 抗原性ペプチド断片はさらに、A 1-16断片、A 1-17断片、A 1-18断片、A 1-19

10

20

30

40

50

断片、A<sub>1-20</sub>断片、A<sub>1-22</sub>断片、A<sub>1-23</sub>断片、A<sub>1-24</sub>断片、A<sub>1-25</sub>断片、もしくはA<sub>1-26</sub>断片、またはA<sub>3-15</sub>断片由来の少なくとも5個、詳細には少なくとも6個、詳細には少なくとも7個、詳細には少なくとも8個、詳細には少なくとも9個、詳細には少なくとも10個、詳細には少なくとも11個、詳細には少なくとも12個、詳細には少なくとも13個、詳細には少なくとも14個、詳細には少なくとも15個、詳細にはすべてのアミノ酸残基を含む、AペプチドのN末端部分に相当し得る。

【0136】

A抗原性ペプチド断片はさらに、A<sub>20-40</sub>もしくはA<sub>20-42</sub>断片、A<sub>21-40</sub>もしくはA<sub>21-42</sub>断片、A<sub>22-40</sub>もしくはA<sub>22-42</sub>断片、A<sub>23-40</sub>もしくはA<sub>23-42</sub>断片、A<sub>24-40</sub>もしくはA<sub>24-42</sub>断片、A<sub>25-40</sub>もしくはA<sub>25-42</sub>断片、A<sub>26-46</sub>もしくはA<sub>27-42</sub>断片、またはA<sub>27-40</sub>もしくはA<sub>27-42</sub>断片、またはA<sub>29-40</sub>由来の少なくとも5個、詳細には少なくとも6個、詳細には少なくとも7個、詳細には少なくとも8個、詳細には少なくとも9個、詳細には少なくとも10個、詳細には少なくとも11個、詳細には少なくとも12個、詳細には少なくとも13個、詳細には少なくとも14個、詳細には少なくとも15個、詳細にはすべてのアミノ酸残基を含む、AペプチドのC末端部分に相当し得る。

10

【0137】

1つの局面において、A抗原性ペプチド断片は、A<sub>15-35</sub>、詳細にはA<sub>20-35</sub>断片由来の少なくとも5個、詳細には少なくとも6個、詳細には少なくとも7個、詳細には少なくとも8個、詳細には少なくとも9個、詳細には少なくとも10個、詳細には少なくとも11個、詳細には少なくとも12個、詳細には少なくとも13個、詳細には少なくとも14個、詳細には少なくとも15個、詳細にはすべてのアミノ酸残基を含む、Aペプチドの中央部分に相当し得る。

20

【0138】

本発明の別の局面では、本明細書に記載の本発明による構築物内で、全長A<sub>1-39</sub>、A<sub>1-40</sub>、またはA<sub>1-42</sub>断片を使用することができる。

【0139】

本発明のある種の局面において、本明細書に開示されるA抗原性ペプチド断片は、1つまたは複数の改変されたまたは非天然のアミノ酸残基を含み得る。

【0140】

本発明のある種の態様において、A抗原性ペプチド断片の使用は、AペプチドのN末端部分に由来する13~15個の連続したアミノ酸残基の単一のまたは反復したひと続き、詳細には、13~15個のアミノ酸残基の連続したひと続きがAペプチドのN末端断片1-16または1-17から得られる、詳細には残基1-15、1-14、および1-13からなる、詳細にはWO 2007/068411に開示されるSEQ ID NO: 1に示されるA<sub>1-15</sub>ペプチド抗原およびSEQ ID NO: 3に示されるA<sub>1-16(14)}</sub>からなる群より選択されるAペプチドのN末端部分から得られる断片からなることが企図される。

30

【0141】

特に、アミロイドタンパク質またはアミロイド様タンパク質に由来する抗原性ペプチドは、Aペプチド、具体的にはAペプチドのN末端部分に由来するAペプチド断片、しかし詳細には1-15、2-15、3-15、1-14、2-14、1-13; 1-16(2)、1-16(4)、1-16(5)、1-16(6)、1-16(8)、1-16(9)、1-16(10); 1-16(12)、16(13)、16(14)、1-16(15)、1-15(2)、1-15(4)、1-15(5)、1-15(6)、1-15(8)、1-15(9)、1-15(10); 1-15(12)、15(13)、15(14)からなる群より選択されるアミノ酸残基からなるAペプチド断片、詳細にはA<sub>1-16(15)}</sub>ペプチド抗原、より詳細にはA<sub>1-16(14)}</sub>またはA<sub>1-16(13)}</sub>ペプチド抗原、さらにより詳細にはA<sub>1-14}</sub>ペプチド抗原、具体的にはA<sub>1-15}</sub>ペプチド抗原、しかしとりわけ、抗原性ペプチドが、例えば小胞、粒子体、または粒子状分子、しかし詳細にはリポソームなどの担体に結合して、またはその中に取り込まれてもしくは再構成されて提示される場合の、アミノ酸残基1-15からなるAペプチド断片などのペプチドであってよい。

40

説明	ワクチン	配列
Ac 1-15: リポソーム中に封入されたアセチルA $\beta$ 1-15 (ペプチド提示に関する対照)	<b>ACI-16</b>	H-K(Ac)K(Ac)-DAEFRHDSGYEVHHQ-K(Ac)K(Ac)-OH (SEQ ID NO: 11)
テトラパルミトイル化A $\beta$ ペプチドを含むワクチン	<b>ACI-24</b>	H-K(Pal)K(Pal)-DAEFRHDSGYEVHHQ-K(Pal)K(Pal)-OH (SEQ ID NO: 12)

## 【 0 1 4 2 】

10

あるいは、「関心対象の抗原性ペプチド」はまた、ワクチン開発のための抗原として設計されるリン酸化タウタンパク質、または本明細書において様々な態様で上記されているA ペプチド抗原と、それぞれの必要性に応じたリン酸化タウタンパク質との混合物であってもよい。このようなリン酸化タウタンパク質は、以下の表に示される以下の配列(T5~T11)の1つまたは複数によって表され得る。以前に用いられた免疫原性ペプチドを対照として用いることができる(Asuni et al., 2007)。

説明	ワクチン	配列
<b>T5:</b> 対照配列: タウ379-408 [pS396, pS404]	<b>ACI-37</b>	RENAKAKTDHGAEIVYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL (n = 30) (SEQ ID NO: 1)
<b>T1:</b> タウ 5-20 [pY18]	<b>ACI-33</b>	RQEFVEMEDHAGTY(p)GL (n = 16) (SEQ ID NO: 2)
<b>T8:</b> タウ 206-221 [pT212, pS214]	<b>ACI-39</b>	PGSRRT(p)PS(p)LPTPPTR (n = 16) (SEQ ID NO: 3)
<b>T9:</b> タウ 196-211 [pS202, pT205]	<b>ACI-40</b>	GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRRT (n = 16) (SEQ ID NO: 4)
<b>T8:</b> タウ 206-221 [pT212, pS214] および <b>T9:</b> タウ 196-211 [pS202, pT205]	<b>ACI-41</b>	PGSRRT(p)PS(p)LPTPPTR (n = 16) (SEQ ID NO: 3) および GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRRT (n = 16) (SEQ ID NO: 4)
<b>T3:</b> タウ 393-408 [pS396, pS404]	<b>ACI-35</b>	VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL (n = 16) (SEQ ID NO: 5)
<b>T4:</b> タウ 401-418 [pS404, pS409]	<b>ACI-36</b>	GDTS(p)PRHLS(p)NVSSTGSID (n = 18) (SEQ ID NO: 6)
<b>T2:</b> タウ 200-216 [pS202+ pT205 & pT212+pS214]	<b>ACI-34</b>	PGS(p)PGT(p)PGSRRT(p)PS(p)LP (n = 17) (SEQ ID NO: 7)
<b>T10:</b> タウ 407-418 [pS409]	<b>ACI-42</b>	HLS(p)NVSSTGSID (n = 12) (SEQ ID NO: 8)
<b>T11:</b> タウ 399-408 [pS404]	<b>ACI-43</b>	VSGDTS(p)PRHL (n = 10) (SEQ ID NO: 9)

20

30

40

## 【 0 1 4 3 】

50

本発明によるペプチドまたは抗原性ペプチドは、脂質二重層中へのリポソーム担体/免疫アジュバントの挿入を促進する親油性または疎水性部分により、詳細には、脂肪酸、トリグリセリド、ジグリセリド、ステロイド、スフィンゴ脂質、糖脂質、またはリン脂質を含むがこれらに限定されない親油性または疎水性部分、しかしとりわけ脂肪酸炭素骨格が、リポソーム二重層においてペプチドのアンカーとして機能し、ペプチドをリポソーム表面にごく近接して位置させ安定化させる寸法を有する少なくとも6個の炭素原子を有する脂肪酸、トリグリセリド、またはリン脂質により、修飾される。詳細には、親油性または疎水性部分は、少なくともおよそ14個の炭素原子でかつ最大およそ24個の炭素原子までの炭素骨格を有する脂肪酸であり、この範囲内に入る個々の炭素原子数もまた本発明の一部である。より詳細には、親油性または疎水性部分は、少なくとも14個の炭素原子、しかしとりわけ16個の炭素原子の炭素骨格を有する。疎水性部分の例には、パルミチン酸、ステアリン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸、オレイン酸、リノール酸、およびリノレン酸、コレステロール、または1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン(DSPE)が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

#### 【0144】

本発明のなおさらなる態様において、疎水性部分はパルミチン酸である。リポソーム調製物は、例えば、リピドA、ミョウバン、リン酸カルシウム、インターロイキン1、ならびに/または多糖およびタンパク質のマイクロカプセルなどのアジュバント、しかし詳細には、モノホスホリルもしくはジホスホリルリピドAなどの解毒化リピドA、ミョウバン、Pam3CSK4、Pam3CAG、CpG、脂質化CpG、ホスホロチオエート化PS-CpG-ODN、または例えばCpG-A、CpG-B、もしくはCpG-CなどのCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)をさらに含み得る。

#### 【0145】

したがって、本明細書において様々な態様で記載されている本発明のリポソーム構築物中で使用するためのアジュバンドは、CpG-A、CpG-B、またはCpG-CなどのCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)である。オリゴヌクレオチドで修飾されたCpGは、ウイルス感染時に大量の抗ウイルス性サイトカインI型インターフェロンを誘導するか、またはToll様受容体(TLR)過剰発現を誘導する合成刺激薬として作用し得る。

#### 【0146】

本発明によるペプチド、詳細には抗原性ペプチドの修飾は、ペプチド分子のN末端および/もしくはC末端に位置するアミノ酸残基の脂質化、または代替的にはペプチド分子のN末端もしくはC末端に付加されたアミノ酸残基における脂質化によって行われる。アミノ酸残基の付加は、天然ペプチド配列が脂質化による修飾に適したN末端および/またはC末端アミノ酸を提供しない場合に、必要となり得る。あるいは、ペプチド断片のN末端および/またはC末端における2番目または3番目のアミノ酸残基が、修飾工程の一部として脂質化されてもよい。

#### 【0147】

予備形成された空のリポソームが用いられる場合、本発明によるペプチド、詳細には抗原性ペプチドは、リポソーム形成時にリポソーム膜内に挿入する疎水性尾部を提供するように修飾される。加えて、ペプチドは、リポソーム内に挿入され得るように、疎水性尾部を含むよう修飾することができる。

#### 【0148】

本発明の抗原性構築物は、一般的に、抗原性効果を増強するように修飾されたペプチドを含み、そのようなペプチドは、本明細書において様々な態様で先に記載されたパルミチン酸、ポリアミノ酸(例えば、ポリグリシン、ポリヒスチジン)、多糖(例えば、ポリガラクトロン酸、ポリ乳酸、ポリグリコリド、キチン、キトサン)、合成ポリマー(ポリアミド、ポリウレタン、ポリエステル)、もしくはコポリマー(例えば、ポリ(メタクリル酸)およびN-(2-ヒドロキシ)プロピルメタクリルアミド)等により修飾することができ、またはペグ化(ポリエチレングリコールまたは改変ポリエチレングリコールを使用する)によりさらに修飾することができる。

## 【0149】

本発明による「リポソームベースの構築物」において、リポソームは、本明細書において様々な態様で先に記載された本発明の修飾ペプチドを脂質二重層中に再構成して含む担体として使用することができ、それと同時に、活性薬剤または化合物の送達系として機能し得る点で、二重機能を有し得る。本発明による「リポソームベースの抗原性構築物」の場合には、リポソームは、治療ワクチンで処置される標的動物またはヒトにおいて免疫応答を増加させるまたは促進するためのアジュバントとしてさらに機能し得る。本発明のリポソームベースの抗原性構築物が、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)、ならびに例えば、リポドA、ミョウバン、リン酸カルシウム、インターロイキン1、ならびに/または多糖およびタンパク質のマイクロカプセルなどの他のアジュバントを含むがこれらに限定されない付加的なアジュバント、しかし詳細には、モノホスホリルもしくはジホスホリルリポドAなどの解毒化リポドA、またはミョウバン、Pam3CSK4、Pam3CAG、CpG、脂質化CpG、ホスホロチオエート化PS-CpG-ODN、または例えばCpG-A、CpG-B、もしくはCpG-CなどのCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG-ODN)、既知であり先行技術のワクチンに使用されているさらなる保存剤、希釈剤、乳化剤、安定剤、ならびに他の成分をさらに含むこともまた理解される。さらに、当技術分野で公知の任意のアジュバント系を、本発明の組成物中で使用することができる。このようなアジュバントには、フロイントの不完全アジュバント、フロイントの完全アジュバント、多分散型-(1,4)結合アセチル化マンナン(「エースマンナン」)、Titermax(登録商標)(CytRx Corporation製のポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーアジュバント)、Chiron Corporation製の改変脂質アジュバント、Cambridge Biotech製のサポニン誘導体アジュバント、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)死菌、グラム陰性細菌のリポ多糖(LPS)、硫酸デキストランなどの大型ポリマー陰イオン、および例えばミョウバン、水酸化アルミニウム、またはリン酸アルミニウムなどの無機ゲルが含まれるが、これらに限定されない。

10

20

## 【0150】

「免疫原性有効量」という用語は、ヒトまたは動物に投与された場合に免疫応答を誘発する抗原性/免疫原性組成物の量を指す。有効量は、常法に従って当業者によって容易に決定される。

## 【0151】

「治療有効量」または「薬学的有効量」という用語は、ヒトまたは動物に投与された場合に該ヒトまたは動物において治療効果をもたらすのに十分な、修飾ペプチド、詳細には修飾された抗原性ペプチドを含む、本明細書に記載の本発明による構築物、詳細には抗原性構築物の量を指す。有効量は、常法に従って当業者によって容易に決定される。

30

## 【0152】

本明細書で用いられる場合、CMCとしても知られる「臨界ミセル濃度」という用語は、それを超えるとミセルが自発的に形成されるという界面活性物質の濃度と定義される。界面活性物質(または任意の界面活性材料)を系に導入すると、界面活性物質によって最初に界面が分割し、a) 界面のエネルギー(面積×表面張力として算出される)が減少し、b) 界面活性物質の疎水性部分が水との接触から離れることにより、ひいては系の自由エネルギーが減少する。続いて、界面活性物質による表面被覆率が増加し、表面自由エネルギー(表面張力)が減少し、かつ界面活性物質がミセルに凝集し始めると、界面活性物質の疎水性部分の水との接触面積が減少することにより、系の自由エネルギーが再度減少する。CMCに到達すると、界面活性物質の任意のさらなる添加により、ミセルの数が単に増加する。(IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).)

40

## 【0153】

「本質的に～からなる」という語句は、この語句が指すペプチドの本質的な特性を実質的に変化させる任意の要素を排除するように本明細書で用いられる。したがって、「本質的に～からなる」ペプチドという記述は、そのペプチドの生物活性を実質的に変化させる任意のアミノ酸置換、付加、または欠失を排除する。

50

## 【0154】

さらに、当業者は、上記したように、コード配列中の単一アミノ酸または少数アミノ酸(典型的には5%未満、より典型的には1%未満)を変化させる、付加する、または欠失させる個々の置換、欠失、または付加が、その変更によって化学的に類似したアミノ酸によるアミノ酸の置換が生じる保存的改変変化であることを認識するであろう。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は、当技術分野において周知である。以下の6つの群はそれぞれ、相互に保存的置換であるアミノ酸を含む：

- 1) アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)；
- 2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；
- 3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；
- 4) アルギニン(R)、リジン(K)；
- 5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；および
- 6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)。

10

## 【0155】

「単離された」または「生物学的に純粋な」という語句は、天然状態で認められる通常付随する成分を実質的または本質的に含まない物質を指す。したがって、本明細書に記載されているペプチドは、インサイチュー環境で通常会合している物質を含まない。典型的には、本明細書に記載されている単離された免疫原性ペプチドおよび/または抗体は、銀染色したゲル上のバンド強度により測定して、少なくとも約80%純粋、通常は少なくとも約90%純粋、および好ましくは少なくとも約95%純粋である。

20

## 【0156】

本明細書で用いられる「溶液」という用語は、本発明による方法においてリポソームを調製するために用いられる溶液に関する。例えば、溶液は、エタノール、リン酸緩衝液(PBS)、またはその両方からなる。リポソームは、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン(DMPEA)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)、およびコレステロールから作られる。詳細には、リポソームは、例えばエタノール中で、詳細には9.0:1.0:7.0のモル比で混合されたDMPC、DMPG、およびコレステロールから作られる。あるいは、リポソームは、例えばエタノール中で、詳細にはそれぞれ9.0:1.0:1.0:7.0モル濃度のモル比で混合されたジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン(DMPEA)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)、およびコレステロールから作られる。

30

## 【0157】

本明細書で用いられる「リポソーム」という用語は、典型的にリン脂質およびステロールから構成される脂質二重層によって取り囲まれた内部水性区分を含む、自己組織化した球状構造を指すことが意図される。リポソームは、細胞膜のモデル系として、および薬物送達系における薬物担体として広く用いられている。

## 【0158】

本発明の組成物に用いられ得るリポソームには、当業者に公知のリポソームが含まれる。リポソームの作製に有用な標準的な脂質のいずれかを用いることができる。標準的な二重層および多層のリポソームを用いて、本発明の組成物を作製することができる。当業者に公知のリポソームを作製する任意の方法を用いることができるが、最も好ましいリポソームは、参照により本明細書に組み入れられるAlving et al., Infect. Immun. 60:2438-2444, 1992の方法に従って作製される。

40

## 【0159】

リポソームは、本明細書において様々な態様で記載されているように、リポソーム外表面上に修飾ペプチドを提示するためのプラットフォームとして使用することができ、それと同時に、本明細書において様々な態様で記載されている本発明による抗原性構築物での処置に際して、標的動物またはヒトにおいて免疫応答を増加させるまたは促進するためのアジュバントとして機能し得る点で、二重機能を有し得る。

## 【0160】

50

リポソームは、親水性頭部基および疎水性尾部を含む(リン)脂質分子から構成される。(リン)脂質分子は、疎水性部分が水相と接触するのを回避するよう互いに向かって配向され、親水性頭部基が水性の周囲と最大限接触するよう配向されるように、水性溶液中で組織化する。これにより、脂質二重層によって取り囲まれた内部水性区画を含む球状構造への自発的自己組織化が生じる。

【0161】

したがってリポソームは、リポソームを取り囲む水性溶液に向かって配向された外表面、および内部水性区画を覆う内表面を有する。

【0162】

したがって本明細書で用いられるリポソームの「外表面」という用語は、リポソームを取り囲む水相に向かって配向されたリポソームの表面を指すことが意図される。

10

【0163】

リポソームは、アジュバントまたは免疫調節物質またはその両方を含み得る。好ましいアジュバントは、ミョウバン、Pam3CSK4、Pam3CAG、CpG、リピドA、詳細には例えばモノホスホリルまたはジホスホリルリピドAなどの解毒化リピドAである。モノホスホリルリピドA(MPLA)は、適切な濃度で、詳細には1~10 mg/mmol、より詳細には5 mg/mmolリン脂質の濃度で添加することができる。

【0164】

MPLAは、オクチル-β-D-グルコピラノシド(B-OG)と混合することができ、該混合物をリポソーム調製物に添加することができる。本発明による方法においてこの段階の代替として、アジュバントを、エタノールなどの溶液中に他の脂質(DMPC; DMPG、およびコレステロール)と共に組み入れることもできる。

20

【0165】

本明細書で用いられる場合、「可溶性」または「可溶化された」という用語は、水性溶液中に部分的にまたは完全に溶解されることを意味する。詳細には、本発明の方法において、修飾ペプチドは、B-OGなどの界面活性物質、PBS、またはそれらの混合物の存在下で可溶化され得る。特定の可溶化条件は、pH、緩衝液、界面活性物質、濃度、および温度などの様々なパラメータに依存する。

【0166】

本明細書で用いられる「検出すること」または「検出された」という用語は、免疫化学的または組織学的方法などの、生体分子を検出するための公知の技法を用いることを意味し、調査している生体分子の存在または濃度を質的または量的に決定することを指す。

30

【0167】

本明細書で用いられる「抗体(antibody)」、「抗体(antibodies)」、または「その機能的部分」という用語は、当技術分野で認められている用語であり、公知の抗原に結合する分子または分子の活性断片、詳細には免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、すなわち抗原と免疫特異的に結合する結合部位を含む分子を指すものと理解される。本発明による免疫グロブリンは、免疫グロブリン分子の任意の型(IgG、IgM、IgD、IgE、IgA、およびIgY)またはクラス(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2)またはサブクラスのものであってよい。

40

【0168】

「抗体」は、本発明の範囲において、モノクローナル抗体、ポリクローナル、キメラ、一本鎖、二重特異性、サル化、ヒト、およびヒト化抗体、ならびにそれらの活性断片を含むことが意図される。公知の抗原に結合する分子の活性断片の例には、Fab免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含むFabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片、ならびに上記の抗体および断片のいずれか1つのエピトープ結合断片が含まれる。

【0169】

これらの活性断片は、いくつかの技法により本発明の抗体から導出することができる。例えば、精製モノクローナル抗体をペプシンなどの酵素で切断し、HPLCゲル濾過に供することができる。次いで、Fab断片を含む適切な画分を回収し、膜濾過等により濃縮するこ

50

とができる。抗体の活性断片を単離するための一般的技法のさらなる記載については、例えば、Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986を参照されたい。

【0170】

「ヒト化抗体」とは、非ヒトドナー免疫グロブリン由来のCDRを有し、分子の残りの免疫グロブリン由来部分が1つ(または複数)のヒト免疫グロブリンに由来する、改変抗体の1つの種類を指す。

【0171】

ヒト化抗体とは、そのフレームワーク領域の1つまたは複数がヒトまたは霊長動物アミノ酸を有する可変領域を有する抗体をさらに指し得る。加えて、結合親和性を保持するように、フレームワーク支持残基を変更することができる。「ヒト化抗体」を得るための方法は、当業者に周知である。(例えば、Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989)、Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)を参照されたい)。

【0172】

「ヒト化抗体」はまた、例えばウサギなどの大型動物において親和性成熟ヒト様ポリクローナル抗体の産生を可能にする新規な遺伝子改変アプローチによって得ることもできる(<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php>)。

【0173】

「モノクローナル抗体」という用語もまた当技術分野において十分に認められており、実験室において単クローンから大量生産され、1つの抗原のみを認識する抗体を指す。モノクローナル抗体は典型的に、通常は寿命の短い抗体産生B細胞を、癌細胞などの増殖の速い細胞(場合により「不死」細胞と称される)に融合することによって作製される。得られたハイブリッド細胞、すなわちハイブリドーマは、迅速に増殖し、大量の抗体を産生するクローンを生じる。

【0174】

「抗原」という用語は、生物、詳細には動物、より詳細にはヒトを含む哺乳動物において免疫応答を誘導し得る実体またはその断片を指す。この用語には、免疫原、および抗原性または抗原決定基に關与する領域が含まれる。

【0175】

同様に本明細書で用いられる場合、「免疫原性の」という用語は、免疫原に対する抗体、T細胞、および他の反応性免疫細胞の産生を誘発または増強し、ヒトまたは動物における免疫応答に寄与する物質を指す。

【0176】

個体が、投与された本発明の免疫原性組成物に対する十分な抗体、T細胞、および他の反応性免疫細胞を産生する場合に免疫応答が起こり、処置される障害が緩和または軽減される。

【0177】

「ハイブリドーマ」または「ハイブリドーマ細胞」という用語は当技術分野で認められており、抗体産生細胞と不死細胞、例えば多発性骨髄腫細胞との融合によって作製された細胞を指すことが当業者によって理解される。このハイブリッド細胞は、抗体の継続的な供給をもたらし得る。融合方法のより詳細な説明については、上記の「モノクローナル抗体」の定義を参照されたい。

【0178】

本発明の別の特定の態様において、本明細書において様々な態様で先に記載された本発明による修飾された抗原性ペプチドは、本明細書において様々な態様で先に記載されたように疎水性相互作用が有効となり得るよう、担体/アジュバント中に挿入し、それによってペプチドを担体/アジュバントに固定し、ペプチドを担体/アジュバント分子の表面上に、または表面に近接して提示させ得るアンカー型分子に共有結合させて提供される。

【0179】

本明細書で用いられる場合、「疾患または障害」という用語は基本的に、本明細書において様々な態様で記載されている本発明によるリポソームベースの構築物によって処置され得る任意の疾患に関する。

【0180】

特に、「疾患または障害」という用語は、そのような処置を必要とする動物またはヒト患者における、例えば、AAアミロイドーシス、AH(重鎖)アミロイドーシス、AL(軽鎖)アミロイドーシス、アレクサンダー病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、大動脈中膜アミロイドーシス、apoA1アミロイドーシス、apoA2アミロイドーシス、apoA4アミロイドーシス、大動脈中膜アミロイドーシス、CADASIL、心房アミロイドーシス、白内障、脳アミロイド血管症、角膜ラクトフェリンアミロイドーシス、重症疾患ミオパシー、皮膚苔癬アミロイドーシス、嚢胞性線維症、透析アミロイドーシス、家族性アミロイドニューロパシー、家族性英国型認知症、家族性デンマーク型認知症、家族性内臓アミロイドーシス、フィブリノーゲンアミロイドーシス、フィンランド型遺伝性アミロイドーシス、前頭側頭葉認知症、緑内障、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血-オランダ型、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血-アイスランド型、ハンチントン病および他のトリプレット障害、遺伝性格子状角膜ジストロフィー、封入体筋炎/ミオパシー、リゾチームアミロイドーシス、マロリー体、髄様甲状腺癌、歯原性(ピンドボルグ)腫瘍アミロイド、パーキンソン病、下垂体プロラクチノーマ、原発性全身性アミロイドーシス、原発性皮膚アミロイドーシス、プリオン病、肺胞蛋白症、緑内障における網膜神経節細胞変性、プリオン病、精嚢アミロイド、セリピノパシー、老人性全身性アミロイドーシス、セリピノパシー、鎌状赤血球病、シヌクレイン病、タウオパシー、および2型糖尿病、真菌感染症(例えば、真菌症、カンジダ症、白癬症、リーシュマニア症)、または炎症からなる群より選択され得る疾患または障害などの、プロテオパシー、タンパク質の誤った折りたたみを伴う疾患、および/またはタンパク質の蓄積もしくは凝集を伴う疾患に関する。

10

20

30

40

50

【0181】

「疾患または障害」という用語はさらに、多発性骨髄腫、ならびに例えば、結腸直腸癌、黒色腫；IL-2、癌、とりわけ乳癌、肺癌、肝臓癌、胃癌、および脾臓癌、ならびに腫瘍；IL-4、癌；TNF、癌；IGF-1アンチセンス、脳腫瘍；IFN、神経芽細胞腫；GM-CSF、腎細胞癌；MDR-1、癌、とりわけ進行癌、乳癌、および卵巣癌；ならびにHSVチミジンキナーゼ、脳腫瘍、頭頸部腫瘍、中皮腫、卵巣癌、白血病などの他の癌を含む細胞増殖性疾患および障害に関する。「疾患または障害」という用語はまた、真菌症、カンジダ症、白癬症、およびリーシュマニア症など真菌感染症に関する。

【図面の簡単な説明】

【0182】

【図1】L16工程のフローチャートを示す。

【図2】薄膜法(工程A)または工程L15のいずれかで製造されたACI-33ワクチンを受容後のC5BL/6マウスの血漿中の抗タウ5-20 [pY18] IgG抗体の解析を示す。最初の免疫の-7日目(7日前)に事前採血を行い、続いて免疫後7日目、21日目、および35日目に採血を行った。結果は、マウス10匹の群で得られた平均値+標準偏差として表す。

【図3】薄膜法(工程A)または工程L15のいずれかで製造されたACI-35ワクチンを受容後のC5BL/6マウスの血漿中の抗タウ396-408 [pS396/pS404] IgG抗体の解析を示す。最初の免疫の-7日目に事前採血を行い、続いて免疫後7日目、21日目、および35日目に採血を行った。結果は、マウス10匹の群で得られた平均値+標準偏差として表す。

【図4】工程D(ACI-24 工程D#2)または工程L15のいずれかで製造されたPal 1-15ワクチンを受容後のC5BL/6マウスの血漿中の抗A IgG抗体の解析を示す。最初の免疫の-7日目に事前採血を行い、続いて免疫後7日目、21日目、および35日目に採血を行った。結果は、マウス10匹の群で得られた平均値+標準偏差として表す。

【図5】工程D(ACI-24 工程D#1)、工程L15(ACI-24 工程L15A；L15B、およびL15C)、またはACI-24 工程L16のいずれかで製造されたPal 1-15ワクチンを受容後のC5BL/6マウスの血漿中の抗A IgG抗体の解析を示す。最初の免疫の-7日目に事前採血を行い、続いて免疫

後7日目、21日目、および35日目に採血を行った。結果は、マウス10匹の群で得られた平均値 + 標準偏差として表す。

【図6】図6aは、L15工程で製造されたACI-41(ペプチドT8およびT9)ワクチンを受容後のC5BL/6マウスの血漿中の抗T8 IgG抗体の解析を示す。最初の免疫の-7日目に事前採血を行い、続いて免疫後7日目、21日目、および35日目に採血を行った。結果は、マウス10匹の群で得られた平均値 + 標準偏差として表す。図6bは、L15工程で製造されたACI-41(ペプチドT8およびT9)ワクチンを受容後のC5BL/6マウスの血漿中の抗T9 IgG抗体の解析を示す。最初の免疫の-7日目に事前採血を行い、続いて免疫後7日目、21日目、および35日目に採血を行った。結果は、マウス10匹の群で得られた平均値 + 標準偏差として表す。

【図7】PBS中または2.25% SDS中のいずれかで可溶化した後のAc1-15ペプチドのピシニコニン酸タンパク質定量アッセイ(BCA)標準曲線を示す。

【図8】PBSまたはSDSのいずれかの存在下における、BCA試薬ありまたはなしでのACI-24の吸光度スペクトルを示す。

【図9】BCA試薬で処理し、かつ固有のリポソーム吸光度を補正した場合の、ACI-24吸光度スペクトルの比較を示す。

【図10】ペプチドを欠いたリポソーム(空リポソーム、ACI-24E)の吸光度スペクトルを示す。

【図11】封入されたAc1-15ペプチドのみを含むリポソーム(ワクチンACI-16)の吸光度スペクトルを示す。

【図12】工程D(ACI24098-A)または工程L15(ACI-24-100316-A)で調製されたACI-24のバッチの吸光度スペクトルの比較を示す。

【図13】工程L15またはL20のいずれかで作製されたACI-35ワクチンによる免疫の-7日目；免疫後7日目；21日目、および35日目におけるIgG力価を示す。

【図14】ワクチンACI-17(MPLAを脂質化CpGアジュバントで置換した工程L15)またはワクチンACI-18(MPLAをPam2CSK4アジュバントで置換した工程L15)のいずれかをマウスに注射してから7日目、21日目、または35日目に得られた全抗A 力価を示す。

【発明を実施するための形態】

【0183】

表の説明

(表1~3) Pal 1-15ワクチンを生成するL15工程のバッチを記載する。これらのバッチは、工程L15で作製されたACI-24ワクチンの物理化学的およびインビボ再現性を評価するために作製された：ACI-24-100316-A；ACI-24-100316-B、およびACI-24-100316-C。3つのワクチンは独立して作製された。

(表4) Pal 1-15ワクチンを生成する、通常MPLA濃度を用いたL16工程のバッチを記載する。このバッチは、工程L16(リポソーム形成後に抗原およびアジュバントを添加)で製造された ACI-24-091127-A。

(表5) Pal 1-15ワクチンを生成する、高いMPLA濃度を用いたL16工程のバッチを記載する。このバッチは、工程L16(リポソーム形成後に抗原およびアジュバントを添加)で製造された ACI-24-091127-B。

(表6) T1ワクチンを生成するL15工程のバッチ ACI-33-091127を記載する。

(表7) T1ワクチンを生成する薄膜工程のバッチ ACI-33-091808-Aを記載する。

(表8) T3ワクチンを生成するL15工程のバッチ ACI-35-091127を記載する。

(表9) T3ワクチンを生成する薄膜工程のバッチ ACI-35-091820-Aを記載する。

(表10) T8/T9ワクチンを生成するL15工程のバッチ ACI-41-100531を記載する。

(表11および12) Pal 1-15ワクチンを生成するための、クロスフローエタノール注入法(工程D)によって作製された2つの独立したバッチ それぞれACI-24 工程D#1およびD#2を記載する。

(表13) BCAアッセイを用いたACI-24-100316-Aの3つ組解析についての吸光度値を示す。

(表14) 異なるACI-24の工程およびバッチの解析結果の要約を示す。

10

20

30

40

50

## 【0184】

前述の説明は、以下の実施例を参照して、より十分に理解されるであろう。しかしながら、このような実施例は、本発明を実行する方法を例示するものであり、本発明の範囲を限定することは意図されていない。

## 【0185】

以下の実施例は本発明を例証する。

## 【実施例】

## 【0186】

実施例1：リポソームベースの抗原性構築物の調製(工程L15；L16、およびL20)

## 1.1. 工程L16

## 1.1.1 リポソーム調製：

リン脂質、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)、およびコレステロール(Avanti Polar Lipids、Alabaster、Alabama)を、エタノール(100 ml)中でそれぞれ9.0、1.0、および7.0のモル比で混合した。60で15分間連続して攪拌した後、完全に透明な溶液が形成された(図1を参照されたい)。次に、1600 mlのリン酸緩衝液(PBS) pH 7.4中に該溶液(100 ml)を注入することによってこの脂質混合物を希釈し(17×)、多層小胞の形成を可能にした(多層小胞 段階1)。次に、得られた調製物を限外濾過(流速200 ml/分でのVivaflow 200 100000 MWCOポリエーテルスルホン)によって濃縮し、反応用量を1700 mlから250 mlに減少させた(限外濾過段階)。濃縮溶液を、PBS pH 7.4による10×容量の交換が行われるVivaflow 200装置での透析にさら

## 【0187】

## 1.1.2 アジュバント溶液の調製：

MPLAの765 ug/ml溶液を、1.6%(wt/v)オクチル-β-D-グルコピラノシド(B-OG)を含む20 mlのPBS pH 7.4中で調製した。得られた溶液は、臨界ミセル濃度(CMC)0.73%(wt/v)を超える濃度の界面活性剤(B-OG)を含んだ。次に、この溶液を60で30分間加熱し、空リポソームの調製物250 ml中に手動で注入した。希釈段階中に、界面活性剤濃度は希釈されて13.5×下がり、そのCMCよりも低いB-OGの濃度である最終濃度0.12%(wt/v)が得られる(第1希釈段階)。次いで、1450 mlのPBS pH 7.4を注入することにより、アジュバント(MPLA)を含むリポソーム溶液を希釈する(×7)(第2希釈段階)。

## 【0188】

## 1.1.3 ペプチド溶液の調製：

1.33 mg/mlのペプチドA<sub>1-15</sub>-Palを、2.0%(wt/v) B-OGを含むPBS pH 11.8(全量45 ml)中で調製した。得られた溶液は、臨界ミセル濃度(CMC)0.73%(wt/v)を超える界面活性剤濃度を含んだ。この溶液を60で加熱して攪拌し、透明な溶液が形成されるまで15分間攪拌した。次に、このペプチド溶液(45 ml)を、アジュバントを含むリポソームの溶液(1700 ml)に添加し、60で1時間攪拌して、界面活性剤のCMC(0.73%)よりもはるかに低い(0.05%)の最終B-OG濃度を有する溶液を得た(希釈段階)。次に、得られた溶液を限外濾過(上記と同じ条件)により濃縮し、最終ワクチン用量を100 mlに設定した。濃縮溶液を透析濾過によって透析し、PBS pH 7.4による10×容量の交換を行った。

## 【0189】

最終段階において、ワクチン溶液を0.2 μmポリエーテルスルホン膜フィルター(Sartorius 16541-K)を通して滅菌濾過した。各フィルターを用いて、5 mlのワクチン溶液を15 ml Falconチューブ中に滅菌濾過した。この最終工程段階は、滅菌環境(層流フード)において行う。

## 【0190】

10

20

30

40

50

## 1.2. 工程L15

工程L15は、リポソーム形成およびサイズ設定段階の前に、アジュバント(例えば、MPLA)が脂質と共にエタノール溶液中に添加される点で、工程L16と唯一異なる。したがって、リポソーム形成後にアジュバントを添加する工程が削除される。

【0191】

## 1.3. 工程L20

### 1.3.1 リポソーム調製：

リン脂質、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)、およびコレステロール(Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama)を、エタノール(8.55 ml)中でそれぞれ9.0、1.0、および7.0のモル比で混合した。60 10  
で15分間連続して攪拌した後、完全に透明な溶液が形成された。MPLA(7.5 mg)をtert-ブタノール0.45 ml中で60 にて可溶化し、エタノール溶液に添加した。次に、90 mlのリン酸緩衝液(PBS) pH 7.4中に該溶液(9.0 ml)を注入することによってこの脂質混合物を希釈し(10×)、多層小胞の形成を可能にした。次に、Avestin製のEmulsiflex C5装置またはNorthern Lipids製のLipex Extruderを用いて、得られた調製物を、0.08 μmのポアサイズを有する3枚のポリカーボネート膜のパックを通して押し出し、PBS pH 7.4で最終量425 mlになるように希釈した。

【0192】

### 1.3.2. ペプチド溶液の調製：

1.33 mg/mlのタウペプチドT3を、5.0% (wt/v) B-OGを含むPBS pH 11.8(全量22.5 ml)中 20  
で調製した。得られた溶液は、臨界ミセル濃度(CMC)0.73% (wt/v)を超える界面活性剤濃度を含んだ。この溶液を60 で加熱して攪拌し、透明な溶液が形成されるまで15分間攪拌した。次に、このペプチド溶液(22.5 ml)を、アジュバントを含むリポソームの溶液(425 ml)に添加し、60 で30分間攪拌して、界面活性剤のCMC(0.73%)よりもはるかに低い(0.20%)の最終B-OG濃度を有する溶液を得た(希釈段階)。次に、得られた溶液を限外濾過(上記と同じ条件)により濃縮し、最終ワクチン用量を50 mlに設定した。濃縮溶液を透析濾過によって透析し、PBS pH 7.4による10×容量の交換を行った。

【0193】

最終段階において、ワクチン溶液を0.2 μm酢酸セルロースフィルター(Minisart 16534)を通して滅菌濾過した。各フィルターを用いて、5 mlのワクチン溶液を15 ml Falconチューブ中に滅菌濾過した。この最終工程段階は、滅菌環境(層流フード)において行う。 30

【0194】

工程L20の拡張性は、異なる容量(50および150 ml)で、かつ同一の生物物理学的および免疫学的特性を有するバッチを作製することによって実証された。

【0195】

## 1.4 結果

表4は、Pal 1-15ワクチンを生成する、通常MPLA濃度を用いたL16工程のバッチ(ACI-24-091127-A)を記載する。このバッチは、実施例1に記載されている工程L16(リポソーム形成後に抗原およびアジュバントを添加)で製造された ACI-24-091127-A。通常MPLA濃度とは、上記の段落に記載されている工程L15に採用されたのと同じMPLA取り込みを意味する。 40

【0196】

表5は、Pal 1-15ワクチンを生成する、高いMPLA濃度を用いたL16工程のバッチ(ACI-24-091127-B)を記載する。このバッチは、実施例1に記載されている工程L16(リポソーム形成後に抗原およびアジュバントを添加)で製造された。高いMPLA濃度とは、最終ワクチン製剤中に、工程L15よりもおよそ8倍高いMPLAが負荷されることを意味する。このような高いMPLA収率は、クロスフローエタノール注入法(工程D)で得ることはできない。

【0197】

Pal 1-15ワクチンを生成するためのL16/L15工程の利点は、Pal 1-15ワクチンを生成するための工程Dの結果と比較した場合に明らかである(それぞれ表1~3、11および12を参照 50

されたい)。表から分かるように、MPLA加水分解(同族体Bの形成によって報告される)は、工程Dと比較して工程L15/L16において有意に減少した。さらに、工程L15/L16によるペプチド分布から、工程Dと比較した場合の、外部水面に向いている抗原露出の増加が報告された(表14)。

【0198】

図13は、工程L15またはL20のいずれかで作製されたタウワクチンで免疫化したマウスのIgG力価を示す。観察され得るように、2つの工程について同一の力価収率が得られる。

【0199】

工程L20の拡張性は、異なる容量(50および150 ml)で、かつ同一の生物物理学的および免疫学的特性を有するパッチを作製することによって実証された。

10

【0200】

本発明者らはL20工程のデータのみを有するが、本発明者が作業した工程はすべて理論的に安定している。

【0201】

実施例2：ACI-33ワクチンを生成するL15法と薄膜法との比較

表6および7は、ACI-33ワクチンを生成するための、それぞれL15工程および薄膜法(W02007/068411に記載されている工程A)のパッチを記載する。図2において、薄膜法(工程A)または工程L15のいずれかで製造されたACI-33ワクチンを受容後のC5BL/6マウスの血漿中の抗タウ5-20 [pY18] IgG抗体力価を示す。工程L15で製造されたACI-33ワクチンを負荷されたマウスは、工程Aのワクチンを負荷されたマウスよりも高い抗体力価を示した。この効果は、排他的なペプチド分布を伴いより高いペプチド負荷を示すL15ワクチン特性ばかりでなく、L15工程が薄膜法により作製されたりポソームよりも小さいリポソーム(<200 nm)を生じるという事実にも起因すると考えられる。

20

【0202】

実施例3：ACI-35ワクチンを生成するL15法と薄膜法との比較

表8および9は、ACI-35ワクチンを生成するための、それぞれL15工程および薄膜法(W02007/068411に記載されている工程A)のパッチを記載する。図3において、薄膜法または工程L15のいずれかで製造されたACI-35ワクチンを受容後のC5BL/6マウスの血漿中の抗タウ396-408 [pS396/pS404] IgG抗体力価を示す。工程L15によって製造されたACI-35ワクチンを負荷されたマウスは、工程Aのワクチンを負荷されたマウスよりも高い抗体力価を示した。この効果は、排他的なペプチド分布を伴いより高いペプチド負荷を可能にするL15ワクチン特性ばかりでなく、L15工程が薄膜法よりも小さいリポソーム(<200 nm)を生じるという事実にも起因すると考えられる。

30

【0203】

実施例4：T1ワクチンを生成するL15法とクロスフローエタノール注入(工程D)法との比較

図4は、工程D(ACI-24 工程D #2)または工程L15のいずれかで製造されたPal 1-15ワクチンを受容後のC5BL/6マウスの血漿中の抗A IgG抗体力価を示す。結果から、2つのワクチンの抗体力価が同一であることが明らかになる。しかしながら、L15工程は、MPLA加水分解が非制御様式ではるかに膨大な程度まで起こるもう一方の方法(工程D)と比較して、ごく少量のMPLA加水分解産物(例えば、MPLA同族体B)を含むのみである。異なるMPLA同族体(例えば、その非加水分解型に相当する同族体A、および同族体A加水分解産物の1つである同族体B)の免疫原性は不明である。MPLA加水分解産物を含まない工程は、高いパッチ再現性の利点を有し、そのような工程によって生成されたワクチンは改善された品質および安定性を示す。

40

【0204】

実施例5：方法L15とL16とのインビボ比較、ならびに工程L15の免疫再現性

図5は、工程D(ACI-24 工程D #1)で製造されたPal 1-15ワクチン、独立して作製された3つのL15ワクチン、およびL16工程で作製された1つのワクチンのいずれかを受容後のC5BL/6マウスの血漿中の抗A IgG抗体力価を示す。結果から、3つの個々のL15ワクチンについて同一の抗体力価が示され、インビボの免疫学的再現性が明らかになる。免疫後35日目に

50

において、L15ワクチンと工程Dワクチンとの間で抗体力価に大きな差はなかった。しかしながら、L15またはL16工程と比較してエタノールクロソフロー注入法(工程D)では、MPLAがはるかにより高い程度まで加水分解された。

#### 【0205】

L16工程で得られた抗体力価は、L15バッチと比較した場合に、35日目においてわずかに低い。この結果は、工程L15と比較した場合の、外部リン脂質二重層上のMPLAの過剰に起因すると考えられる。免疫応答に及ぼすアジュバント濃度の影響に対するより明白な反応を得るために、両方法において異なる用量のMPLAを試験すべきである。しかしながら、リポソーム形成後にMPLAを添加することができるという事実は、必要な時にのみ、貯蔵された空リポソーム中にアジュバントを組み入れるという利点を提供する。このアプローチにより、リポソーム製剤における貯蔵中のMPLA加水分解が妨げられ得る。

10

#### 【0206】

実施例6：L15工程で、2種類の抗原(ACI-41ワクチンにおけるT8およびT9抗原)を含むリポソームを作製することによる、2種類の異なる抗体のインビボ生成

表10は、T8およびT9ペプチド配列の混合物を含むワクチンを生成するための、L15工程のバッチを記載する。T8およびT9ペプチドの溶解度および純度の差は、ワクチン製剤における最終抗原収率に影響し得る。図6aおよび6bにおいて、ACI-41ワクチン(2種類の異なる抗原 T8およびT9を含む)が、同じリポソーム上に提示された2種類のエピトープに対する特異的抗体応答を誘導し得ることが示される。

20

#### 【0207】

実施例7：L15工程で、MPLAとは異なるアジュバント：脂質化CpGアジュバント(ワクチンACI-17)またはPam2CSK4(ワクチンACI-18)を含むリポソームを作製することによる、抗体のインビボ生成

アジュバントの選択が異なる以外は実施例1.2に前述されたのと同様に、工程L15によって製造されたワクチンACI-17およびACI-18を調製した。ワクチンACI-17およびACI-18において用いられたアジュバントは、それぞれ脂質化CpGおよびPam2CSK4であった。

#### 【0208】

図14は、MPLAを脂質化CpGアジュバント(ワクチンACI-17)またはPam2CSK4(ワクチンACI-18)で置換して工程L15で製造されたPal1-15ワクチンを受容後のC5BL/6マウスの血漿中の抗A IgG抗体力価を示す。結果から、MPLAとは異なるアジュバントをリポソームに負荷する上で、およびさらにA に結合する抗体を生じる免疫応答を誘導する上での、本技術の柔軟性が明らかになる。

30

#### 【0209】

実施例8：BCA比色アッセイを用いた、ACI-24におけるPal1-15の膜トポロジーの決定

ピシンコニン酸タンパク質定量アッセイ(BCA)を開発し、直線性、特異性、および精度について試験した。最終的に、このアッセイを実行して、異なる工程によって調製されたACI-24の異なるバッチにおけるペプチドトポロジーを解析した。BCAアッセイは2段階反応に基づいており、最初に、塩基性条件下でペプチドの存在下において、銅(II)が銅(I)に還元される(ビウレット反応)。第2段階では、銅(I)が試薬ピシンコニン酸とキレート化して紫色の複合体を生じ、これを吸光度によって測定することができ、これはペプチド含有量と比例する。銅(II)およびピシンコニン酸の電荷のために、これらの試薬はリポソーム二重層を通過しないと予測され、そのため外膜上のペプチドのみが定量されると考えられる。全ペプチド含有量を定量するためには、界面活性剤の存在下でリポソームを溶解した後、BCA試薬を用いて定量を行うことができる。次いで、外表面上のペプチドと全ペプチドとの比率から、外表面上のPal1-15の割合を決定することができる。特異性の対照として、ペプチドを欠いたリポソーム(空リポソーム)を使用した。同様に、外表面上のペプチドが定量され得ること、ならびにピシンコニン酸および銅がリポソーム膜を越えないことを確実にするために、リポソームの内部に完全に封入された水溶性ペプチドAc1-15から構成された対照バッチを試験した。

40

#### 【0210】

50

シグナル/ノイズ比および反応特異性を最適化するために、標準的なBCAアッセイ条件を改変した。最適化されたパラメータには、i) ビシンコニン酸および銅(II)の濃度、ii) A CI-24の濃度、iii) 反応温度、ならびにiv) 反応時間が含まれる(データは表示せず)。

【0211】

#### 8.1 外部リポソーム表面上のペプチド

リポソームをPBSで2倍希釈し、240 μLを96ウェル平底透明プレートに添加した。60 μLの4×濃縮BCA試薬(micro-BCAタンパク質アッセイキット、試薬A 1.88 mL、試薬B 1.80 mL、試薬C 256 μL)を添加し、試料を混合し、光の非存在下でRTにて90分間放置した。

【0212】

#### 8.2 全ペプチド含有量

リポソームを溶解して全ペプチド含有量を定量するため、2.25%(v/v)の最終SDS濃度を生じるようにリポソームをSDSで2倍希釈した。次に、SDS中のリポソーム300 μLを、密封したプラスチックエッペンドルフ中で70 °Cにて2時間加熱し、その後2時間かけてRTまで冷却した。溶解の効率は、320~600 nmの範囲で吸光度をモニターすることによって追跡され得た。次に、この透明な溶液240 μLを96ウェル平底透明プレートに添加した。60 μLの4×濃縮BCA試薬を添加し、試料を混合し、光の非存在下でRTにて90分間放置した。

【0213】

#### 8.3 吸光度解析

410~700 nmの範囲にわたって吸光度測定を行い、562 nmにおける吸光度を用いて、外部リポソーム表面上のペプチドの割合を算出した。リポソームはサイズが大きいせいで光を散乱させるため、このバックグラウンド吸光度は、以下の式：

外膜上のペプチドの% = (リポソーム + BCAの吸光度) - (リポソームの吸光度) / (溶解されたリポソーム + BCAの吸光度) - (溶解されたリポソームの吸光度)

に従って、BCAアッセイで測定されたリポソームの吸光度から減算することにより補正される。

【0214】

#### 8.4 結果

##### 8.4.1 直線性

アッセイの直線範囲を決定するため、水溶性ペプチドAc1-15(Polypeptides, France)の標準物質をPBS中に溶解して、6.25~100 μM最終ペプチド濃度の範囲において、BCAアッセイを用いて解析した。この範囲にわたって良好な直線性が見出された( $R^2 > 0.97$ )(図7)。A CI-24試料は、したがってアッセイの直線範囲内に十分に入る60 μMの理論的ペプチド濃度を意味する2倍希釈で解析される。

【0215】

##### 8.4.2 特異性

###### 8.4.2.1 SDSの影響：

2.25% SDS界面活性剤の存在がアッセイを妨げないことを確実にするために、Ac1-15ペプチドの標準物質を、リポソーム試料と同様にSDS中で調製した。図7から分かるように、SDS中で可溶化されたAc1-15は、PBS中で可溶化されたものと比較して同様の検量線をもたらした。

【0216】

###### 8.4.2.2 ACI-24リポソーム試料の影響：

ACI-24バッチ(工程L15)の吸光度スペクトルを図8に示す。PBSまたはSDSの存在下のいずれかでBCA試薬で処理したACI-24の両方について、強い吸光度がBCA-Cu(I)複合体に特有の562 nmにおいて見られる。BCA試薬による処理なしでは、PBSまたはSDS中のリポソームについてピークは観察されなかった。予測通り、PBS単独中のリポソームは562 nmでバックグラウンド吸光度を生じるのに対して、ミセルをもたらすためにSDSで溶解したリポソームは、410~700 nmの範囲にわたってごくわずかな吸光度を示す。バックグラウンド吸光度を補正した場合、PBSまたはSDS中のACI-24の吸光度スペクトルは類似しているが、562 nmの近傍でのシグナル強度のみが異なる(図9)。

10

20

30

40

50

## 【0217】

## 8.4.2.3 リポソームマトリックスの影響：

リポソームマトリックスがBCAアッセイを妨げ得るかどうかを判定するために、ACI-24と同一であるがペプチドを欠いているリポソームのバッチ(ACI-24E-100316)を解析した。図10から分かるように、562 nmにおいてピークは観察されず、ACI-24リポソームについて観察された562 nmにおける吸光度ピークがペプチドの存在によるものであることが実証される。

## 【0218】

## 8.4.2.4 外膜上のペプチドのみに対する特異性：

PBSで希釈されたリポソームを用いて行われたBCAアッセイが、外部リポソーム膜上に存在するペプチドとのみ特異的に反応するかどうかを試験するために、封入された水溶性ペプチドAc1-15を含むリポソームのバッチ(ACI-16)を用いてアッセイを行った。図11から分かるように、562 nmにおいて本質的にピークは観察されず、したがって、BCA反応が二重層外表面上に露出されたペプチドに対してのみ起こることが確認される。

## 【0219】

## 8.4.3 精度

アッセイの精度を評価するため、工程L15で調製されたACI-24のバッチ(ACI-24-100316-A)を用いて3つ組の解析を行った。結果から、PBS中およびSDS中の両方の吸光度読み取りが、それぞれ1.77%および0.57%の変動係数(CV)を有することが示される(表13)。

## 【0220】

## 8.4.4 バッチ解析

## 異なる工程で調製されたリポソームの比較

リポソーム中のペプチドの膜トポロジーに及ぼす、異なるリポソーム生成工程の影響を判定するために、ACI-24の異なるバッチを解析した。選択されたバッチの吸光度スペクトルを図12に示し、表14に要約する。

## 【0221】

表14中に提供される結果から、本発明の工程において用いられ得る

- ・容量
- ・アジュバント(2種類以上のアジュバント)
- ・抗原(2種類以上の抗原)
- ・脂質組成

に関して、「工程の柔軟性」が実証される。

## 【0222】

バッチ解析のためのアッセイの実行から、異なる工程によって調製されたリポソームが、外膜表面上に提示されるペプチドの異なる特性を有することが明らかになった。特に、工程L15で調製されたリポソームは、薄膜工程Aで調製されたリポソームよりもほぼ30%多くのペプチドを外表面上に提示することが判明した。

## 【0223】

図面および前述の説明において本発明を詳細に図示および記載してきたが、このような図示および記載は例証的または例示的であって、限定的ではないと見なされるべきである。添付の特許請求の範囲および精神の範囲内で、当業者により変更および修正がなされ得ることが理解されよう。特に、本発明は、上記および下記の様々な態様からの特徴を任意に組み合わせたさらなる態様を網羅する。

## 【0224】

本発明はまた、前記または以下の説明に記載されていないかもしれないが、図面において個々に示されるさらなる特徴をすべて網羅する。

## 【0225】

表

## 【0226】

10

20

30

40

【表 1】

ACI-24-100316-A

特徴	試験法	結果
外観	目視検査	白く乳濁した懸濁液
Pal1-15含有量	HPLC	424 ug/ml
膜結合型Pal1-15含有量	HPLC	98%
MPLA含有量	HPLC	101 ug/ml
- 同族体A	HPLC	99 ug/ml
- 同族体B	HPLC	2 ug/ml
サイズ	DLS	110 nm
多分散性	DLS	0.25

10

【 0 2 2 7 】

【表 2】

ACI-24-100316-B

特徴	試験法	結果
外観	目視検査	白く乳濁した懸濁液
Pal1-15含有量	HPLC	482 ug/ml
膜結合型Pal1-15含有量	HPLC	110%
MPLA含有量	HPLC	103 ug/ml
- 同族体A	HPLC	100 ug/ml
- 同族体B	HPLC	3 ug/ml
サイズ	DLS	110 nm
多分散性	DLS	0.25

20

30

【 0 2 2 8 】

【表 3】

ACI-24-100316-C

特徴	試験法	結果
外観	目視検査	白く乳濁した懸濁液
Pal1-15含有量	HPLC	406 ug/ml
膜結合型Pal1-15含有量	HPLC	93%
MPLA含有量	HPLC	102 ug/ml
- 同族体A	HPLC	99 ug/ml
- 同族体B	HPLC	3 ug/ml
サイズ	DLS	110 nm
多分散性	DLS	0.25

40

50

【 0 2 2 9 】

【 表 4 】

ACI-24-091127-A

特徴	試験法	結果
外観	目視検査	白く乳濁した懸濁液
Pal1-15含有量	HPLC	647 ug/ml
膜結合型Pal1-15含有量	HPLC	73%
MPLA含有量	HPLC	250 ug/ml
- 同族体A	HPLC	214 ug/ml
- 同族体B	HPLC	36 ug/ml
サイズ	DLS	109 nm
多分散性	DLS	0.29

10

【 0 2 3 0 】

【 表 5 】

ACI-24-091127-B

特徴	試験法	結果
外観	目視検査	白く乳濁した懸濁液
Pal1-15含有量	HPLC	543 ug/ml
膜結合型Pal1-15含有量	HPLC	88%
MPLA含有量	HPLC	884 ug/ml
- 同族体A	HPLC	818 ug/ml
- 同族体B	HPLC	66 ug/ml
サイズ	DLS	117 nm
多分散性	DLS	0.30

20

30

【 0 2 3 1 】

【表 6】  
ACI-33-091127

特徴	試験法	結果
外観	目視検査	白く乳濁した懸濁液
T1含有量	HPLC	348 ug/ml
膜結合型T1含有量	HPLC	87%
MPLA含有量	HPLC	96 ug/ml
- 同族体A	HPLC	81 ug/ml
- 同族体B	HPLC	15 ug/ml
サイズ	DLS	106 nm
多分散性	DLS	0.18

10

【 0 2 3 2 】

【表 7】  
ACI-33-091808-A

特徴	試験法	結果
外観	目視検査	白く乳濁した懸濁液
T1含有量	HPLC	63 ug/ml
膜結合型T1含有量	HPLC	ND
MPLA含有量	HPLC	79 ug/ml
- 同族体A	HPLC	79 ug/ml
- 同族体B	HPLC	0 ug/ml
サイズ	DLS	ND
多分散性	DLS	ND

20

30

【 0 2 3 3 】

【表 8】  
ACI-35-091127

特徴	試験法	結果
外観	目視検査	白く乳濁した懸濁液
T3含有量	HPLC	321 ug/ml
膜結合型T3含有量	HPLC	109%
MPLA含有量	HPLC	101 ug/ml
- 同族体A	HPLC	96 ug/ml
- 同族体B	HPLC	5 ug/ml
サイズ	DLS	102 nm
多分散性	DLS	0.25

40

50

【 0 2 3 4 】

【 表 9 】

ACI-35-0910820-A

特徴	試験法	結果
外観	目視検査	白く乳濁した懸濁液
T3含有量	HPLC	61 ug/ml
膜結合型T3含有量	HPLC	ND
MPLA含有量	HPLC	141 ug/ml
- 同族体A	HPLC	141 ug/ml
- 同族体B	HPLC	0 ug/ml
サイズ	DLS	ND
多分散性	DLS	ND

10

【 0 2 3 5 】

【 表 1 0 】

ACI-41-100531

20

特徴	試験法	結果
外観	目視検査	白く乳濁した懸濁液
T8含有量	HPLC	362 ug/ml
T9含有量	HPLC	189 ug/ml
MPLA含有量	HPLC	93 ug/ml
- 同族体A	HPLC	88 ug/ml
- 同族体B	HPLC	5 ug/ml
サイズ	DLS	79 nm
多分散性	DLS	0.25

30

【 0 2 3 6 】

【表 1 1】  
ACI-24 工程 D#1

特徴	試験法	結果
外観	目視検査	白く乳濁した懸濁液
Pal1-15含有量	HPLC	388 ug/ml
膜結合型Pal1-15含有量	HPLC	ND
MPLA含有量	HPLC	58 ug/ml
- 同族体A	HPLC	12 ug/ml
- 同族体B	HPLC	46 ug/ml
サイズ	DLS	115 nm
多分散性	DLS	0.14

10

【 0 2 3 7 】

【表 1 2】  
ACI-24 工程 D#2

特徴	試験法	結果
外観	目視検査	白く乳濁した懸濁液
Pal1-15含有量	HPLC	375 ug/ml
膜結合型Pal1-15含有量	HPLC	ND
MPLA含有量	HPLC	52 ug/ml
- 同族体A	HPLC	11 ug/ml
- 同族体B	HPLC	41 ug/ml
サイズ	DLS	105 nm
多分散性	DLS	0.15

20

30

【 0 2 3 8 】

【表 1 3】

試料条件	吸光度	吸光度	吸光度	平均值	S.D.	CV (%)
	1	2	3			
SDS、BCAあり	1.174	1.152	1.157	1.115	0.006	0.57
SDS、BCAなし	0.052	0.042	0.045			
差	1.122	1.110	1.112			
PBS、BCAあり	1.315	1.313	1.281	0.847	0.015	1.77
PBS、BCAなし	0.464	0.454	0.451			
差	0.852	0.859	0.830			

40

【 0 2 3 9 】

【表 1 4】

生成工程	ペプチドを リポソーム 形成の前に 添加するか 後に添加 するか	バッチ名	相対的な 外膜上の ペプチド(%)	サイズ(nm)	MPLA 加水分解	濾過性	拡張可能	工程の 柔軟性	リポソーム 形成後の 抗原添加	リポソーム 形成後の アジュバント 添加
W02007/068411 に記載のA(薄膜)	前	ACI-24- 090813-A	54	>500 nm	無	無	無	低	無	無
D(クロスフロー エタノール注入)	前	ACI24010 8-B	62	96	有	有	有	低	無	無
		ACI24070 9-A	58	115	有	有	有	低	無	無
		ACI24100 8-A	67	97	有	有	有	低	無	無
		ACI24090 8-A	64	105	有	有	有	低	無	無
L15	後	ACI-24- 091016-B	81	116	無	有	有	高	有	無
		ACI-24- 100316-A	81	110	無	有	有	高	有	無
L16	後	ACI-24- 091127-A	82	109	無	有	有	高	有	有
		ACI-24- 091127-B	84	117	無	有	有	高	有	有
		ACI-24- 100317-C	72	113	無	有	有	高	有	有
L20	後	ACI001J	84	101	無	有	有	高	有	無

10

20

「工程の柔軟性」とは、様々な

- ・ 容量
- ・ アジュバント(2種類以上のアジュバント)
- ・ 抗原(2種類以上の抗原)
- ・ 脂質組成

に関して、その工程を使用することができることを意味する。

【0240】

参考文献リスト

30

- Allen et al., Cellular & Molecular Biology Letters, 2002, 7, 217-219
- Allison and Gregoriadis, Nature, 1974, 252, 252
- Alving et al., Immunol Rev 1995; 145:5
- Frisch, Eur J Immunol 1991; 21:185
- Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003)
- Guan et al., Bioconjugate Chem, 1998, 9, 451-458 10
- Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612
- Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)
- Huang et al., 1997, Carcinogenesis 18, 83-88
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. 20
- Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31)
- Kersten and Crommelin, Biochimica et Biophysica Acta 1995, 1241, 117-138
- Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982)
- Moreira et al., Pharmaceutical Research, 2002, 19, 265-269
- Muhs et al., PNAS, 2007, 104, 9810-9810 30
- Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989))
- Nicolau et al., PNAS, 2002, 99, 2332-2337; WO2007/068411
- Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989)
- Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398-406 (2002)
- Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986 40
- Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 (Clin. Chim Acta 57:1-40)
- Torchilin, Nature Reviews, 2005, 4, 145-160
- Weiss, R. B., et al., Drugs, 46(3): 360-377 (1993)
- Zrein et al. (1998), Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Vol. 5, No. 1: 45-49
- 【 0 2 4 1 】 50

特許文献：

U.S. Pat. Nos. 5,855,866, 5,965,132, 6,261,535, 6,051,230 および 6,451,312  
 U.S. Pat. Nos. 6,093,399, 6,004,555, 5,877,289, および 6,036,955  
 U.S. Pat. Nos. 5,112,596, 5,268,164, 5,506,206, および 5,686,416  
 U.S. Pat. No. 5,004,697  
 U.S. Pat. No. 5,620,689  
 U.S. Pat. No. 5,620,689

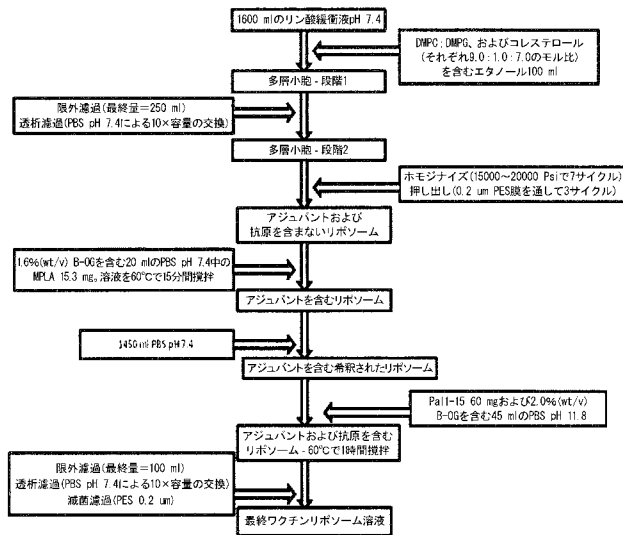
US20020065259, 2003/0162695, および 2005/0124533  
 US 20100119444  
 US20020038086  
 US20020025313  
 US20030083299  
 US20030229013  
 US20030073713  
 US20030129186  
 US20030229013  
 US20050089473

10

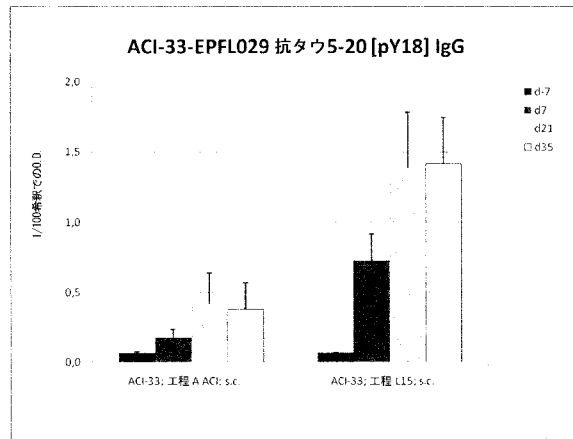
WO96/13590  
 WO96/29605  
 WO 2004/058258  
 WO 2007/068411

20

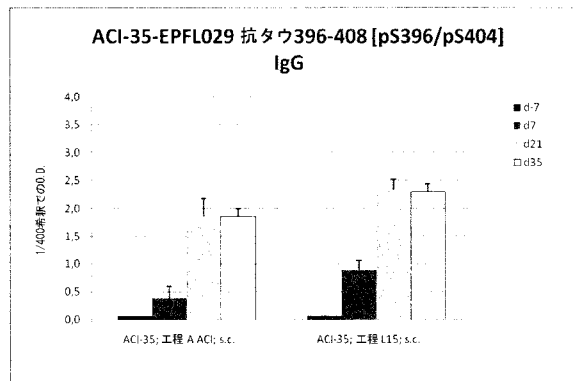
【 図 1 】



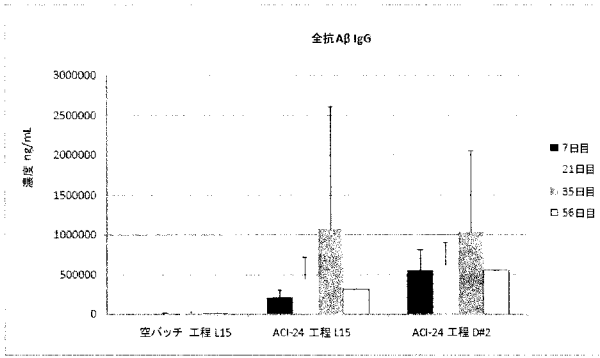
【 図 2 】



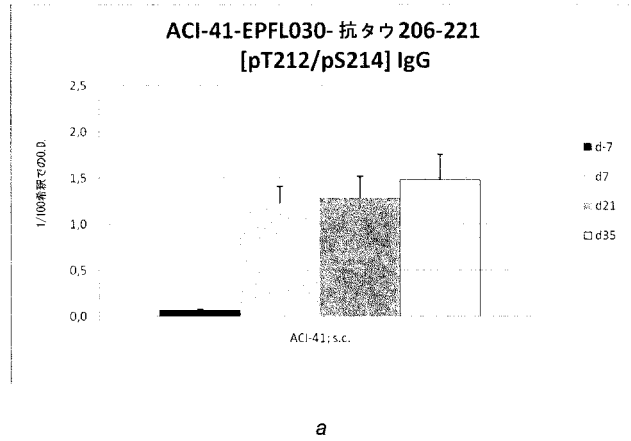
【 図 3 】



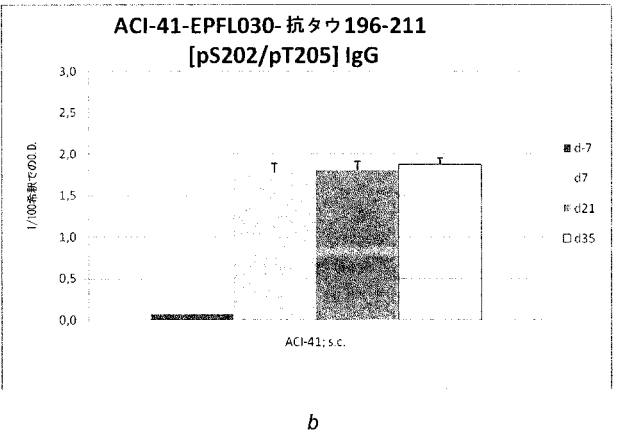
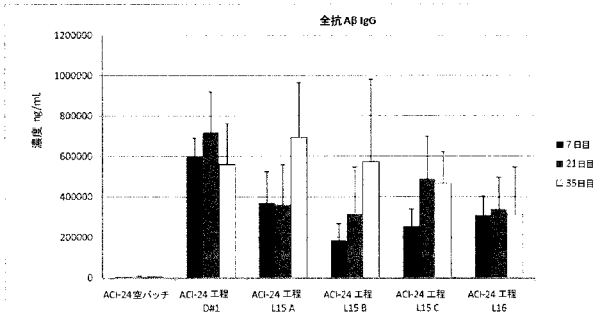
【 図 4 】



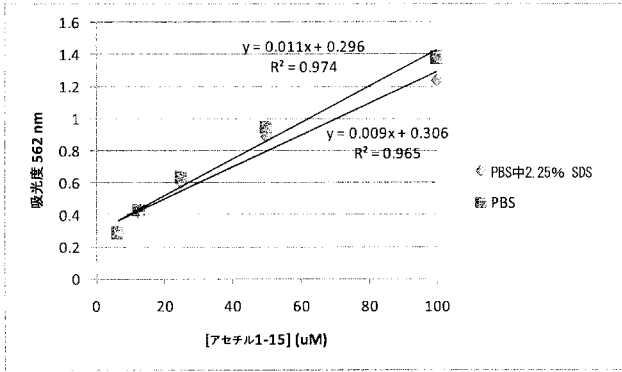
【 図 6 】



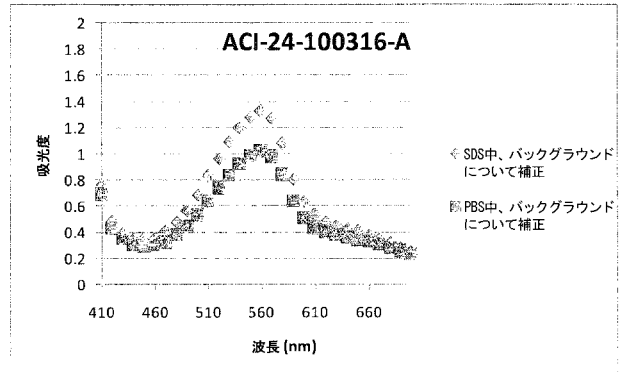
【 図 5 】



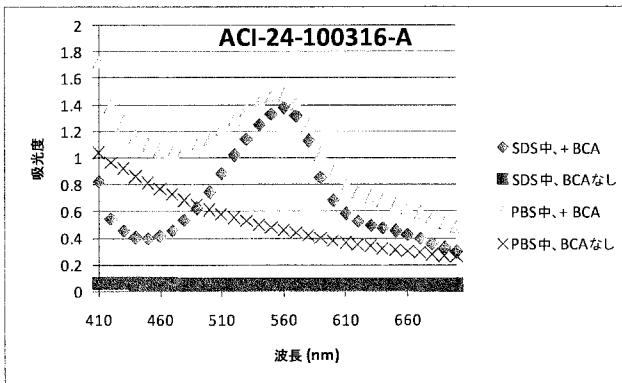
【 図 7 】



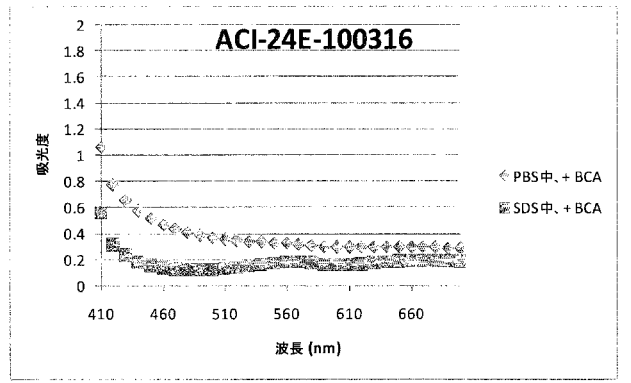
【 図 9 】



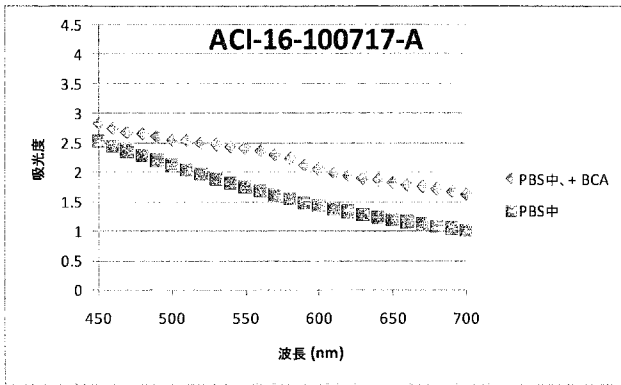
【 図 8 】



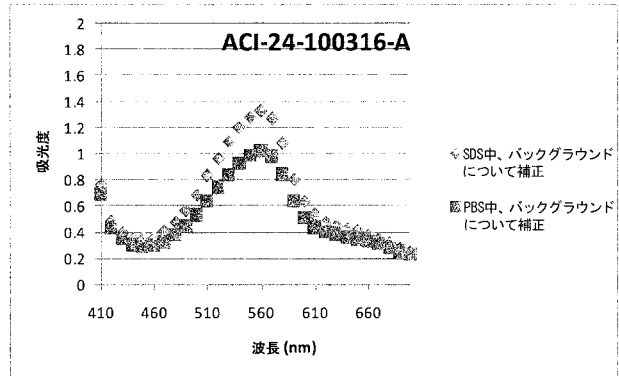
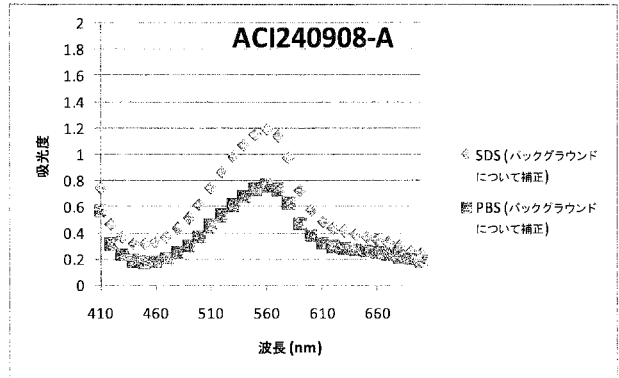
【 図 10 】



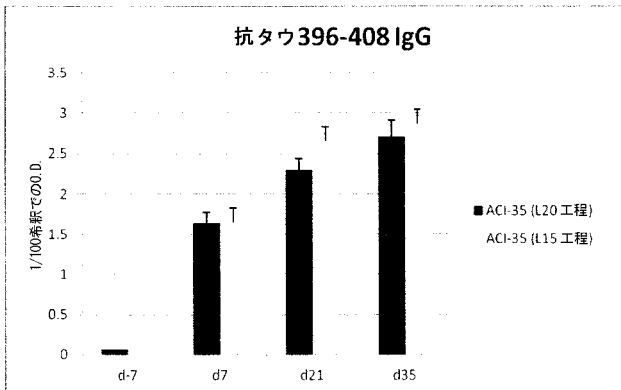
【 図 1 1 】



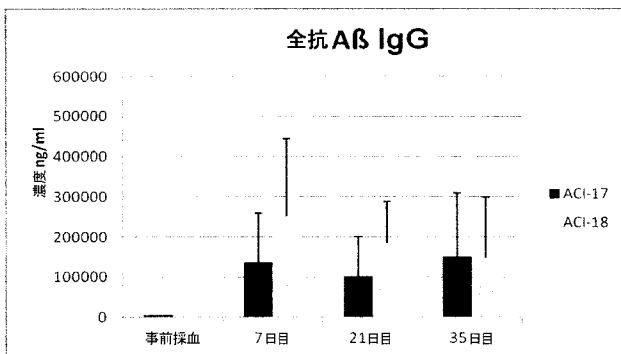
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【配列表】

2014503475000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2011/068797

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV.	A61K9/127 A61K9/00 A61K38/00 A61K39/00 A61K47/48	
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K		
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 practical, search terms used)		
EP0-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94/10198 A1 (NICOLAU YVES CLAUDE [US]; TOSI PIERRE FRANCOIS [US]) 11 May 1994 (1994-05-11) claims 1-45	1-46
X	WO 2005/081872 A2 (AC IMMUNE SA [CH]; NICOLAU YVES CLAUDE [CH]; GREFERATH RUTH [DE]; HICK) 9 September 2005 (2005-09-09) page 15, line 13 - page 28, line 21	1-46
X	EP 0 203 676 A2 (WISTAR INST [US]) 3 December 1986 (1986-12-03) paragraph [0017] - paragraph [0025]	1-46
X	US 2008/233181 A1 (NAGY JON O [US] ET AL) 25 September 2008 (2008-09-25) examples 4, 14	1-46
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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		*T* 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
8 March 2012		16/03/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Schiffener, Hermann

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2009)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2011/068797

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/248799 A1 (HOLADAY JOHN W [US] ET AL) 9 December 2004 (2004-12-09) paragraph [0115] - paragraph [0133] -----	1-46

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/068797

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9410198	A1	11-05-1994	AU 5420494 A EP 0669941 A1 WO 9410198 A1	24-05-1994 06-09-1995 11-05-1994
WO 2005081872	A2	09-09-2005	AU 2005216100 A1 CA 2556479 A1 EP 1763364 A2 JP 2007527870 A JP 2011251964 A KR 20060134110 A US 2006073158 A1 US 2007281006 A1 WO 2005081872 A2	09-09-2005 09-09-2005 21-03-2007 04-10-2007 15-12-2011 27-12-2006 06-04-2006 06-12-2007 09-09-2005
EP 0203676	A2	03-12-1986	CA 1265054 A1 DE 3683688 D1 EP 0203676 A2	30-01-1990 12-03-1992 03-12-1986
US 2008233181	A1	25-09-2008	NONE	
US 2004248799	A1	09-12-2004	NONE	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP2011/068797

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
	G 0 1 N 33/53	D

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

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845  
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ライス ベドロ  
スイス連邦 エパランジュ ル グラン シュマン 9 0

(72)発明者 ヒックマン デビッド  
スイス連邦 サン シュルピス ルート ド ヴァレール 1

(72)発明者 ビルグレン ポッシュ マリア  
スイス連邦 モント スール ローザンヌ シュマン ドュ ティチーノ 6 ビー

(72)発明者 ムース アンドレアス  
スイス連邦 キュジー シュマン デ アルエツツ 1 2

(72)発明者 ファイファー アンドリア  
スイス連邦 サン レジエール ルート ド フェニル 1 6 エイ

Fターム(参考) 4B064 AG26 AG27 CA10 CA20 DA01 DA13

4C076	AA19	CC01	CC04	CC21	CC27	CC31	DD24	DD69	EE30	
4C084	AA02	BA44	CA18	NA14	ZA022	ZB112	ZB132	ZB262	ZB322	ZC352
4C085	AA03	AA13	AA14	AA38	BA01	BB01	BB11	DD86	EE01	EE06
	FF01	FF11	FF14	FF18	FF21	FF24				
4H045	AA11	AA30	BA10	BA50	CA40	DA75	DA76	EA20	EA50	FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014503475A5</a>	公开(公告)日	2014-10-16
申请号	JP2013535421	申请日	2011-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	AC免疫有限公司		
申请(专利权)人(译)	应用细胞免疫兴业ANONYME		
[标]发明人	ライスベドロ ヒックマンデビッド ピルグレンボッシュマリア ムースアンドレアス ファイファーアンドリア		
发明人	ライス ベドロ ヒックマン デビッド ピルグレン ボッシュ マリア ムース アンドレアス ファイファー アンドリア		
IPC分类号	A61K38/00 C07K16/18 C12P21/08 A61K9/127 A61K39/00 A61P37/04 A61K39/39 A61K39/395 A61P31/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/08 A61P3/10 A61P29/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K9/0019 A61K9/127 A61K39/0007 A61K39/385 A61K39/39 A61K47/542 A61K47/62 A61K47/6911 A61K2039/55555 A61K2039/55561 A61K2039/55572 A61P3/10 A61P25/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/08 Y02A50/41 A61K47/50 A61K9/1271 A61K9/1278 C07K16/18 G01N33/6896		
FI分类号	A61K37/02.ZNA C07K16/18 C12P21/08 A61K9/127 A61K39/00.H A61P37/04 A61K39/39 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P31/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/08 A61P3/10 A61P29/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4C076/AA19 4C076/CC01 4C076/CC04 4C076/CC21 4C076/CC27 4C076/CC31 4C076/DD24 4C076/DD69 4C076/EE30 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084/ZC352 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA38 4C085/BA01 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF01 4C085/FF11 4C085/FF14 4C085/FF18 4C085/FF21 4C085/FF24 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	2010188832 2010-10-26 EP		
其他公开文献	JP2014503475A JP6027011B2		
摘要(译)			

本发明涉及制备基于脂质体的构建体的方法，所述构建体包含通过在脂质体中重构的疏水部分修饰的目的肽，特别是抗原肽，以及用所述方法获得的抗原构建体。本发明进一步涉及所述构建体在治疗和诊断用于治疗由蛋白病如阿尔茨海默氏病引起或与之相关的疾病和病症中的用途。