

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5722770号  
(P5722770)

(45) 発行日 平成27年5月27日 (2015. 5. 27)

(24) 登録日 平成27年4月3日 (2015. 4. 3)

(51) Int. Cl.	F I				
<b>C07K 14/47 (2006.01)</b>	C O 7 K	14/47	Z N A		
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C O 7 K	7/06			
<b>A61K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K	37/02			
<b>A61K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K	39/00	H		
<b>A61P 25/28 (2006.01)</b>	A 6 1 P	25/28			

請求項の数 9 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-516186 (P2011-516186)	(73) 特許権者	511002939
(86) (22) 出願日	平成21年7月1日 (2009. 7. 1)		デ スタート デル ネダーランデン、フ
(65) 公表番号	特表2011-526885 (P2011-526885A)		ェルト、ドール デ ミニスター ファン
(43) 公表日	平成23年10月20日 (2011. 10. 20)		フォルクスヘーゾンドハイド、フェルジ
(86) 国際出願番号	PCT/NL2009/050387		イン アン スポルト
(87) 国際公開番号	W02010/002251	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開日	平成22年1月7日 (2010. 1. 7)		特許業務法人浅村特許事務所
審査請求日	平成24年6月11日 (2012. 6. 11)	(72) 発明者	ホーヘルホウト、ペーター
(31) 優先権主張番号	08159385.7		オランダ国、ビルトーフエン、ブルヘメー
(32) 優先日	平成20年7月1日 (2008. 7. 1)		スター ファビウスパーク 28
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	61/077, 264		
(32) 優先日	平成20年7月1日 (2008. 7. 1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロイド折りたたみ中間体に対するワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式  $X_2 X_3 V G S N K - Z$  又は  $X_3 V G S N K G - Z$  からなる環状ペプチド (式中、 $X_2$  は E、G、Q 又は K であり、 $X_3$  は D 又は N であり、Z はペプチド配列  $X_2 X_3 V G S N K$  又は  $X_3 V G S N K G$  内に存在するペンドを安定化させる因子である) であって、

Z が、Y N G K、T C G V、C G N T、L C G T、L K G T、G A I K、G A I C、A I I K、A I I C、T c G V、C G N T、L c G T 及び L k G T (式中、 $c = D - C y s$  及び  $k = D - L y s$  である) からなる群から選択されるペプチド断片である、或いは Z が、胆汁酸又はその誘導体である、上記環状ペプチド。

【請求項 2】

前記胆汁酸又はその誘導体が、コール酸、デオキシコール酸及びメチル 7 - - アセトキシ - 3 - アミノ - 1 2 - アミノ - 5 - コラン - 2 4 - オエートからなる群から選択される、請求項 1 に記載の環状ペプチド。

【請求項 3】

前記ペプチドが免疫原性担体分子に共役されている、請求項 1 又は 2 に記載のペプチド。

【請求項 4】

前記ペプチドが、Z の前記免疫原性担体分子への選択的共有結合により前記免疫原性担体分子に共役されている、請求項 3 に記載のペプチド。

【請求項 5】

前記免疫原性担体分子が破傷風類毒素である、請求項 3 又は 4 に記載のペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 までのいずれか一項に記載のペプチドを有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 7】

アルツハイマー病を治療又は予防するための、請求項 1 から 5 までのいずれか一項に記載のペプチドを有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 8】

( a ) 配列  $X_2 X_3 V G S N K - Z$  又は  $X_3 V G S N K G - Z$  ( 式中、 $X_2$  は E、G、Q 又は K であり、 $X_3$  は D 又は N であり、Z はペプチド配列  $X_2 X_3 V G S N K$  又は  $X_3 V G S N K G$  内に存在するペンドを安定化させる因子である ) からなる環状ペプチドを合成するステップであって、

前記ペプチドが、前記ペプチド配列の N 末端のアミノ酸と Z とを共有結合的に結合させることによって環状化し、

Z が、Y N G K、T C G V、C G N T、L C G T、L K G T、G A I K、G A I C、A I I K、A I I C、T c G V、C G N T、L c G T 及び L k G T ( 式中、c = D - C y s 及び k = D - L y s である ) からなる群から選択されるペプチド断片である、

上記ステップ、及び

( b ) 任意選択で、( a ) で得られる前記環状ペプチドに免疫原性担体分子を共役させるステップを

含む、請求項 1 から 5 までのいずれか一項に記載の環状ペプチドを生成するための方法。

【請求項 9】

前記免疫原性担体分子が、Z の前記免疫担体分子への結合により前記環状ペプチドと共役する、請求項 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病を治療するために使用することができる改良ワクチンに関する。

【背景技術】

【0002】

世界保健機構による推定では世界中で 1 8 0 0 万の人がアルツハイマー病に罹患している ( V a s ら、2 0 0 1 )。オランダでは、およそ 2 5 万人がアルツハイマー病に罹患している。この問題は、人口の平均年齢が高くなるにつれて拡大している。療養施設の患者一人に対するケアは、年間 3 0 , 0 0 0 から 6 0 , 0 0 0 ユーロの費用がかかると推定される ( M c D o n n e l l ら、2 0 0 1 )。ワクチン接種は費用効果があるであろう。

【0003】

アルツハイマー病は、立体配座の神経変性障害 ( S a d o w s k i & W i s n i e w s k i 2 0 0 4、B l e n n o w ら、2 0 0 6、E d i t o r i a l s、N a t u r e M e d、2 0 0 6 ) である。アルツハイマー病の特徴は、脳内又は脳血管内のプラーク形成である。これらのプラークは、神経細胞の膜結合型タンパク質である、アミロイド前駆体タンパク質に由来する。3 8 から 4 3 ( 一般に 4 2 ) 個のアミノ酸残基からなるらせん状断片が該タンパク質から酵素的に切断され、可溶性 A と呼ばれるペプチドが形成される。はおそらく、まず拡張立体配座を取り、すべての体液中に存在する。可溶性 A が高濃度になると、その立体配座が変化して凝集体を形成することになる。多数の単量体の配座異性体、様々なタイプのオリゴマー、A 由来の拡散性リガンド、プロト原線維、原線維及びスフェロイドを含む多くの凝集体が *i n v i t r o* 又は *i n v i v o* において見出されている ( K l e i n ら、2 0 0 4 から採用 )。原線維 A は、交差性ペータのスパイン構造を有し ( S a w a y a ら、2 0 0 7 )、最終的に脳内に沈着して神経変性プラークを形成する。

10

20

30

40

50

## 【0004】

遺伝子導入マウス (Schenkら、1999) 及び第 I 相臨床試験におけるヒト患者 (Hockら、2002) を「前凝集した」A 1-42 の懸濁液で免疫にすることは有益であるように思われた。ヒト免疫血清中の抗体は脳血管内におけるプラーク、A 沈着物及び アミロイドを認識した。該抗体はアミロイド前駆体タンパク質及び可溶性 A は認識しなかった。

## 【0005】

「前凝集した」A 1-42 の懸濁液の欠点は、この物質の物理的性質が明確に定義されていないことである。しかし、これよりはるかに重大な問題は、第 II 相臨床試験の間に患者の 6% においてワクチン関連の副作用として髄膜脳炎が誘発されたことであった (Check、2002、Gilmanら、2005)。この副作用は、A 1-42 の中心部及び C 末端部に位置するエピトープに対する Th1 細胞応答に起因する細胞の炎症反応によって引き起こされる (McLaurinら、2002、Gelinasら、2004)。

## 【0006】

A 1-42 により誘発された有益な抗体は N 末端に対するものであることが実証されている (McLaurinら、2002、Leeら、2005)。したがって、C 末端が切断された A ペプチドを免疫原として使用することが提案されている (Sigurdssonら、2004、Lemereら、2006、Gevorkianら、2004、Lemereら、2007)。このような短いペプチドは免疫原性が不十分である。免疫原性を高めるために、ペプチドの複数のコピーを、非免疫原性担体 (IgM を誘発する目的で) 又は外来 T 細胞エピトープを提供する担体 (Agadjanyanら、2005、Ghochikyanaら、2006、Maierら、2006、Movsesyanら、2008) に結合させる必要がある。これらの結合体のいずれにおいてもペプチドが アミロイドオリゴマー又は前原線維に曝される残基 4 ~ 10 の立体配座を取らないと考えられる。このように、切断されたペプチド結合体で誘発された抗体は、オリゴマー又は前原線維に対する特異性が低いと考えられる。

## 【0007】

したがって、有効な医薬、好ましくはアルツハイマー病に対するワクチンが今もなお必要とされている。本発明は、既存のワクチンの欠点のすべては有さない、すなわち、毒性がより低いかほとんど無いが、なお免疫付与に対して有効な抗体応答を誘発することができる改良ワクチンを提供する。本発明において提案されるワクチンは アミロイドペプチドの新規な類似物である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0008】

本発明のペプチド

本発明の第 1 の態様において、配列  $X_1 X_2 X_3 VGSN-Z$ 、 $X_2 X_3 VGSNK-Z$  又は  $X_3 VGSNKG-Z$  を含むペプチドが提供され、ここで、 $X_1$  は A 又は G であり、 $X_2$  は E、G、Q 又は K であり、 $X_3$  は D 又は N であり、Z は  $X_1 X_2 X_3 VGSN-Z$ 、 $X_2 X_3 VGSNK-Z$  又は  $X_3 VGSNKG-Z$  の該ペプチド配列内に存在するペンドを安定化させる因子である。本発明のペプチドは、本明細書において天然の A 1-42 ではないペプチドと理解されるべき修飾ペプチドである。Z はまた、A 1-42 内に取り入れられることが見込まれる、好ましくは A 1-42 内に取り入れられる、 $X_1 X_2 X_3 VGSN$  (配列番号 1)、 $X_2 X_3 VGSNK$  (配列番号 2) 又は  $X_3 VGSNKG$  (配列番号 3) の立体配座を安定させる因子と定義することができる。上述のように特定された  $X_1 X_2 X_3 VGSN$ 、 $X_2 X_3 VGSNK$  及び  $X_3 VGSNKG$  のペプチド配列は、それぞれ A 1-42 のアミノ酸 22 ~ 28 及び 23 ~ 29 に対応する。好ましいペプチド配列は、A 1-42 のアミノ酸 22 ~ 28 に対応する  $X_2 X_3 VGSNK$  である。本明細書において示される  $X_1$ 、 $X_2$  及び  $X_3$  に対して考えられる様々な種類は、ヒト集団における A 1-42 の配列において、いくつかの既知の変異体が存在すること

によるものであり、 $X_2$ は、アミノ酸22でありこの集団において主にEである。しかしながら、北極型(E22G)、オランダ型(E22Q)及びイタリア型(E22K)変異体も既知である。最近、別の変異体(E22 )が同定された(Tomiyamaら、2008)。 $X_3$ はアミノ酸23であり、大部分がDである。しかし、アイオワ型変異体が既に同定されている(D23N)。したがって、仮に、いずれかの他の変異体が今後、本明細書において特定されたA 1 - 42の特定の部分、すなわちアミノ酸21~27、22~28又は23~29において同定されるようであれば、本発明のペプチドの配列は、おそらく、この後に同定される変異体を考慮するように構成されることは当業者にとって明白である。

#### 【0009】

いくつかの重複したペプチド配列を試験した(例参照)。本発明者らの知る限り、試験したペプチド配列のうち2つ(aa22~28又は23~29)は、マウスにおいて抗体応答を誘発することができ、この抗体が、単量体、可溶性オリゴマー(Haass and Selkoe、2007、Lambertら、2007、and Wash and Selkoe、2007)原線維又は神経変性プラークに発現するA 1 - 42の立体配座エピトープを特異的に認識できることが見出された。オリゴマーAbは神経細胞に対してより毒性があることから、オリゴマーAbを認識することは、原線維又はプラークを認識することよりもさらにより重大であるように思われる。可溶性オリゴマーを除去すると、プラークがまだ存在している間に速やかに認知が改善する。本発明のペプチドの機能は、例2のELISAにおいて示されるように試験するのが好ましい。ELISAにおいてペプチド-BSA結合体を被覆抗原として使用することで、抗ペプチド値の決定が可能になり、一方、オリゴマー及び原線維のA 1 - 42を被覆することで特異的な交差反応の検出が可能になる。A 1 - 42由来であり本発明に記載のペプチドに組み込まれ、またA 1 - 42で取ると思われる $X_1 X_2 X_3 VGSN$ 、 $X_2 X_3 VGSNK$ 又は $X_3 VGSNKG$ の立体配座を取ることができる、任意の他のペプチド配列も本発明に含まれることは当業者には理解されるであろう。

#### 【0010】

一実施形態において、本発明のペプチドは、式 $X_1 X_2 X_3 VGSN - Z$ 、 $X_2 X_3 VGSNK - Z$ 又は $X_3 VGSNKG - Z$ からなり、式中、 $X_1$ はA又はGであり、 $X_2$ はE、G、Q又はKであり、 $X_3$ はD又はNであり、Zは $X_1 X_2 X_3 VGSN$ 、 $X_2 X_3 VGSNK$ 又は $X_3 VGSNKG$ のペプチド配列内に存在するペンドを安定させる因子である。

#### 【0011】

本発明者らは、単量体の、可溶性オリゴマー、原線維又は神経変性のプラークに発現する折りたたみ構造のA 1 - 42に存在する立体配座エピトープによく似ているペプチドを設計することを目的としているので、本発明のペプチドにおいて、 $X_1 X_2 X_3 VGSN$ 、 $X_2 X_3 VGSNK$ 又は $X_1 X_2 X_3 VGSN$ 内に存在するペンドを安定化させることは重要である。この安定化を達成する任意の方法は本発明に包含されている。当業者は本発明のこのようなペプチドを合成した後、当技術分野における既知の方法により、例えば、例1において言及したNMRによってその立体配座を試験することができる。

#### 【0012】

好ましい一実施形態において、この安定化を達成する第1の方法は、本発明のペプチドを環化することである。したがって、本発明の好ましいペプチドは環状ペプチドである。当業者はペプチドの環化方法を知っている。実際の環化反応は、その配列内にZを含む、連続するいずれかの位置の間で行うことができる。さらに、実際の環化反応はまた、Zをまだ含有していない前駆体の配列上で行うことができ、環化の結果Zが生成される。環化は、ペプチド配列のN末端のアミノ酸、好ましくは $X_1 X_2 X_3 VGSN - Z$ 、 $X_2 X_3 VGSNK - Z$ 又は $X_3 VGSNKG - Z$ それぞれの $X_1$ 、 $X_2$ 又は $X_3$ とZとの結合によって、好ましくは共有結合によって達成することができる。この方法において、 $X_1 X_2 X_3 VGSN$ 、 $X_2 X_3 VGSNK$ 又は $X_3 VGSNKG$ のペプチド配列のC末端のア

10

20

30

40

50

ミノ酸は、環化に関与しない。環化は固相で行うと便利である。例えば、固相に結合された側鎖であるD23を、E22に環化させ、炭酸リンカー上でシクロ-E22-D23を生成することができる。別の選択肢の固相に結合された側鎖では、D27をK28に環化させ、アミドリリンカー上でシクロ-N27~K28を産生することができる。好ましくは、環化は、例えば、DからG(N-Gになる)又はZがYNGKであればGからK\*のように、逆ループZ内のアミノ酸の間で環化するのが好ましい。また、例えば、G25からS26又はZがYNGKであればGからK\*のように溶液中で環化することも可能である。環化は、 $X_1 X_2 X_3 VGSN$ 、 $X_2 X_3 VGSNK$ 又は $X_3 VGSNKG$ 内に存在するペンドを安定化させるのに重要であると考えられる。

#### 【0013】

ペプチドの環化の別の好ましい方法は、ペプチド配列のN末端及びC末端においてシステインを加えることであり、又は該ペプチド配列のN末端においてシステイン及び別のシステインをZに加えることによるものである。2つのシステインが存在することで、当業者にとって既知のジスルフィド環化を達成することができる。

#### 【0014】

別の好ましい実施形態において、この安定化を達成する第2の方法はZを使用することである。本明細書において先に示したように、Zは、本発明のペプチドにおいて $X_1 X_2 X_3 VGSN$ 、 $X_2 X_3 VGSNK$ 又は $X_3 VGSNKG$ 内に存在するペンドを安定化させる因子である。好ましい実施形態において、Zは、 $X_1 X_2 X_3 VGSN$ 、 $X_2 X_3 VGSNK$ 又は $X_3 VGSNKG$ 内に存在するペンドを安定化させ、該ペプチドが折りたたみ構造のA1-42の立体配座を取るで見込みがあることを確実にする。さらにより好ましい実施形態において、Zは、 $X_1 X_2 X_3 VGSN$ 、 $X_2 X_3 VGSNK$ 又は $X_3 VGSNKG$ 内に存在するペンドを安定化させ、これらのペプチドが折りたたみ構造のA1-42の立体配座を取ることを確実にする。いくつかの試験から、折りたたみ構造のA1-42の立体配座内にペンドが存在すると考えられ、このペンドは $X_1 X_2 X_3 VGSN$ 、 $X_2 X_3 VGSNK$ 又は $X_3 VGSNKG$ 内にあるS及びNの間の位置に対応する位置に存在すると予想される。

#### 【0015】

Zは、ペンド、ターン又はループを安定化させると当業者に既知である任意の因子でよい。Zは、ターンを形成する可能性が高い「逆ターン」因子と定義することができる(Hutchinsonら、1998、Woolfsonら、1993)。Zは、アミノ酸、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗原、単糖又はオリゴ糖、及び/又はステロイドでよい。好ましい実施形態において、Zは、8、7、6、5又は4個のアミノ酸からなるペプチド断片であり、長さが短くなるにつれて優先される。好ましくは、4から8個のアミノ酸のペプチドは、-ターンの立体配座の性向が強い「逆ターン」因子である。好ましいペプチド断片は、YNGK、TCGV、CGNT、LCGT、LKGT、GAIK、GAIC、AIIK及びAIIICからなる群から選択されるテトラペプチドである。より好ましくは、該テトラペプチドは、YNGK、TCGV、CGNT、LCGT及びLKGTからなる群から選択される。最も好ましくは、該テトラペプチドは、YNGK、TcGV、CGNT、LcGT及びLkGT(ここでc=D-Cysであり、またk=D-Lysである)からなる群から選択される(例えば、Oomenら、2003;及びOomenら2005参照)。Zとして使用できるタンパク質の例は、HSA、IgG及び他の血清タンパク質である。抗原の例は、(細菌性)毒素及びウイルス様粒子である。Zは、例えばBodeら(2007、J. Pept. Sci., 13:702~708)に記載されているようなステロイドの足場でよい。Zとして使用するのに適したステロイドの足場としては、例えば、胆汁酸、及び、例えば、コール酸、デオキシコール酸及びメチル7- -アセトキシ-3- -アミノ-12- -アミノ-5- -コラン-24-オエートなどの、この誘導体が挙げられる。好ましくは、本発明のペプチドにおいて、ペプチド配列は、例えば、Bodeら(2007、前掲)により記載されているようにステロイドの足場のC-3位及びC-12位に結合される。

10

20

30

40

50

## 【0016】

Zは、環化の前にペプチド配列に結合してよく、場合によっては該ペプチド配列の残りの部分と一緒に環化してもよい。この実施形態において、Zは、好ましくは、オリゴペプチド、すなわちアミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペントペプチドのような比較的短い分子である。この好ましい実施形態において、アミノ酸の総数(A<sub>1-42</sub>起源のペプチド配列から及びZから)は、好ましくは10又は11である。この数が11であるのがさらにより好ましい。Zは、該対応するA<sub>1-42</sub>配列内に存在するアミノ酸を含み又はから成り、該対応するX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSN、X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK又はX<sub>3</sub>VGSNKGの配列と並んでもよい。

## 【0017】

或いは、Zは、環化されたペプチド配列に結合してもよい。この実施形態において、Zは、前の実施形態におけるよりも、比較的大きい分子、すなわち、例えばポリペプチド又はタンパク質であってもよい。

## 【0018】

両方の方法(環化及びZの存在)を組み合わせると、最も良い結果が得られた。さらにより好ましくは、Zをペプチド配列に結合させ、続いてペプチド配列の残り部分と一緒に環化させる。或いはZが環化反応の結果として形成される。この好ましい実施形態において、Zを、例えばYNGKなどの、上記に定義したテトラペプチドとすると最も良い結果が得られた。好ましくは、テトラペプチドは、下記のように該ペプチドの担体分子への選択的な共役が可能であるように少なくとも1つのシステイン及びリシンを含む。リシンは、好ましくはN-(S-アセチルメルカプトアセチル)リシン(Lys-SAMA)などの修飾リシンである。テトラペプチド内の少なくとも1つのシステイン及びLys-SAMA残基の存在は、本発明のペプチドの担体タンパク質などのスルフヒドリル-反応担体への選択的な共役を可能にする。

## 【0019】

最も好ましい実施形態において、式X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK-Z(ここで、X<sub>2</sub>はE、G、QまたはKであり、X<sub>3</sub>はD又はNであり、ZはX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNK内に存在するペンドを安定化させる因子である)からなるペプチドが提供される。好ましくは、Zは、YNGKであり、ここで、さらにより好ましくはYNGK内のKがペプチドの選択的な共役を可能にする修飾リシン(Lys-SAMA)である。

## 【0020】

別の最も好ましい実施形態において、配列X<sub>3</sub>VGSNKG-Z(ここで、X<sub>3</sub>はD又はNであり、ZはX<sub>3</sub>VGSNKG内のペンドを安定化させる因子である)を含むペプチドが提供される。好ましくは、ZはYNGKであり、ここで、さらにより好ましくはYNGK内のKがペプチドの選択的な共役ができるようにする修飾リシン(Lys-SAMA)である。

## 【0021】

配列X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>VGSNKGAI-Z(ここで、X<sub>2</sub>はEであり、X<sub>3</sub>はDであり、Zは修飾リシン(Lys-SAMA)である)を含むペプチド及び配列VGSNKG-Z(Zは修飾リシン(Lys-SAMA)である)を含むペプチドはいずれも、免疫を与えるペプチド自体に抗体応答が生じることが見出されたが、このように生じる抗体はオリゴマー又は原線維A<sub>1-42</sub>と交差反応することができなかった。

## 【0022】

本発明のペプチドは、単一のペプチドとして存在する、又は融合タンパク質などの融合分子に組み込むことができる。ペプチドは、1つ又は複数のアミノ酸の欠失又は置換により、N末端及び/又はC末端における追加のアミノ酸又は官能基による拡張により、さらに修飾することができ、T細胞を標的にながら生物学的利用能を改善させ、或いは、アジュバント又は(共)刺激作用をもたらす免疫修飾物質を含む又は放出することができる。これらの修飾の影響は、好ましくは、該合成ペプチドの立体配座について試験される。これは、例えばNMRにより行うことができる。このように得られたペプチドにおいて、A

10

20

30

40

50

1 - 4 2 が取り入れる見込みのある、好ましくは A<sub>1</sub> - 4 2 が取り入れる、X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> V G S N、X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> V G S N K 又は X<sub>3</sub> V G S N K G の立体配座が修飾されていないことが重要である。N 末端及び / 又は C 末端における任意選択の追加のアミノ酸は、好ましくは、それが由来するタンパク質のアミノ酸配列、すなわち A<sub>1</sub> - 4 2 アミノ酸配列内の対応する位置に存在しない。したがって、さらにより好ましい実施形態において、本発明のペプチドの免疫原性を改善するため、このペプチド、好ましくは上記の環状ペプチドは、好ましくは、Z と免疫原性担体分子との結合によって選択的に該免疫原性担体分子に共役される。このようなペプチドは共役ペプチドと呼ばれる。したがって、好ましい実施形態において、本発明のペプチドは共役ペプチドであり、より好ましくは共役環状ペプチドである。免疫原性担体分子は、好ましくは本発明のペプチドに共役されると哺乳動物などの対象に投与するときに、本発明のペプチドに免疫応答を誘発する担体である。該免疫原性担体は、本明細書において後に定義されるようにアジュバント活性を有することもできる。多くの免疫原性担体分子は当業者に既知である (Hermanson, G. T.、1996、Bioconjugate techniques、Academic Press、San Diego; Drijfhout and Hoogerhout、2000)。適当な免疫原性担体分子としては、例えば、外毒素などの菌体毒素又は類毒素及び毒性が少ないそれらの変異体が挙げられる。好ましい免疫原性担体分子としては、ジフテリア類毒素 (CRM<sub>197</sub>)、血清アルブミン (例えばヒト血清アルブミン) 及び破傷風類毒素 (Beuvery ら、1986、Classon ら、2005) が挙げられる。

10

20

## 【0023】

## 組成物

別の態様において、本明細書において定義されるペプチドを含む組成物が提供される。このような組成物は医薬組成物すなわち医薬であってよい。

## 【0024】

別の好ましい実施形態において、ペプチド又はペプチド組成物は、医薬用賦形剤及び / 又は薬学的に許容される担体及び / 又は免疫修飾物質をさらに含んでよい。任意の既知の不活性な薬学的に許容される担体及び / 又は賦形剤を組成物に添加してもよい。医薬の製剤及び薬学的に許容される賦形剤は、当技術分野において既知の通常のものであり、例えば、レミントンの「The Science and Practice of Pharmacy、21<sup>st</sup> Edition 2005、University of Science in Philadelphia」に記載されている。

30

## 【0025】

医薬組成物は、薬学的に許容される安定化剤、浸透物質、緩衝剤、分散剤等をさらに含んでもよい。医薬組成物の好ましい形態は、目的とする投与様式及び治療適応に依存する。医薬担体は、活性成分、すなわちペプチドを患者に送達するのに適した任意の適合する毒性のない物質でよい。薬学的に許容される鼻内送達のための担体は、水、緩衝生理食塩溶液、グリセリン、ポリソルベート 20、クレモファー EL、及びカプリル / カプリングリセリド水性混合液が例として挙げられ、また緩衝して中性の pH 環境にしてもよい。非経口送達のための薬学的に許容される担体は、例えば滅菌した 0.9% NaCl 緩衝液又は場合により 20% アルブミンを補った 5% グルコースが例として挙げられる。非経口投与のための製剤は無菌でなければならない。活性物質の投与のための経路は、例えば、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内又は病変経路による注射又は注入などの、既知の方法に従う。本発明の組成物は、好ましくはポラス注射により投与される。筋肉注射のための一般的な医薬組成物は、例えば、1 から 10 ml のリン酸緩衝生理食塩水、及び 1 から 100 µg、好ましくは 15 から 45 µg の修飾された共役ペプチドを含有するように構成されることになる。経口投与の場合、活性成分は、エリキシル剤、シロップ剤及び懸濁液などの液体の剤形で投与することができる。経口投与のための液体の剤形は、患者が飲み込みやすいように着色剤及び香味剤を含有してもよい。

40

## 【0026】

50

非経口の、経口又は筋肉内の投与が可能な組成物を調製するための方法は、当技術分野において既知であり、例えばレミントンの医薬科学(15th ed.、Mack Publishing、Easton、PA、1980)を含む、様々な出典により詳しく記載されている(すべての目的のため参照によりその全体が組み込まれている)。

【0027】

任意の既知の免疫修飾物質、特に、リン酸アルミニウム又は水酸化アルミニウムのように、つり合いのとれたTh2/Th1応答を生じさせる修飾物質を組成物に加えてもよい。好ましくは、免疫修飾物質はアジュバントである。該組成物が本明細書において前に定義されたペプチド及び少なくとも1つのアジュバントを含むことがより好ましい。アジュバントは、本明細書において、ペプチドと組み合わせて使用する場合に、哺乳動物、好ましくはヒトを免疫にするために免疫系を刺激し、このことにより、好ましくはアジュバント自体に特異的な免疫応答を発生させることなくペプチドに対する免疫応答を誘発、増強又は促進する任意の物質又は化合物を含むと定義される。好ましいアジュバントは、同様の条件であるがアジュバントが非存在の下で、該ペプチドに対し発生させた免疫応答と比べて、所与の抗原に対する免疫応答を、少なくとも、1.5、2、2.5、5、10又は20倍増強させる。対応する対照群に比べて、動物又はヒトの群において、アジュバントにより生じた所与のペプチドに対する免疫応答の統計的な平均増強を求めるための試験は当技術分野において利用されている。本明細書において使用されるアジュバントは、通常、哺乳動物には外来の化合物であり、これにより、例えばインターロイキン、インターフェロン及び他のホルモンなどの哺乳動物にとって内因性の免疫活性化化合物は除外される。

10

20

【0028】

本発明の組成物は、少なくとも1つのアジュバントを含有してよい。本発明において使用されるアジュバントは、ペプチドの効果が阻害されないように選択されることになる。本発明において使用されるアジュバントは、ヒトに対して生理学的に許容されるものであり、これらは、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、Montanide(商標)などの油/界面活性剤ベースの乳剤を含むが、これらに限定されるものではなく、この場合、様々な界面活性剤(特にマンニトールオレート)は、鉱物油、MF59(商標)などのスクアレン含有乳剤、モノホスホリル脂質又はナイセリア変異型リポ多糖に結合する(PCT/NL98/0063に記載されているように)。

30

【0029】

医薬は、単回投与として投与してよい。或いは、本明細書において既に定義されているペプチド及び/又はアジュバントの投与を必要であれば繰り返してもよく、及び/又は別種のペプチド及び/又は別種のアジュバントを順次投与してもよい。本発明のペプチド、組成物及び医薬は、好ましくは、静脈内又は皮下、或いは筋肉内投与に適するように製剤されるが、粘膜投与又は経皮及び/又は皮内の、例えば注射による投与など他の投与経路も想定できる。

【0030】

したがって、好ましい実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは医薬として使用される。より好ましくは、この医薬はアルツハイマー病に対するワクチンである。さらにより好ましくは、該医薬はアルツハイマー病を予防し、遅延及び/又は治療するためのものである。本明細書において定義されるワクチンは、アルツハイマー病に対する予防的防御策のため又はこの疾患の治療のために使用することができる。

40

【0031】

本発明の状況において、生物体又は個体又は対象は動物又はヒトでよい。好ましくは、生物体はヒトである。治療される生物体は、例えば、潜在的な遺伝性素因により及び/又は対象の年齢により及び/又は対象の生活様式(例えば食習慣及び/又は身体活動の欠如)及び/又はこの披験体がアルツハイマー病を発症するリスクが高いことを示す任意の他の既知パラメータにより、アルツハイマー病を発症するリスクが高いと疑われることが好ましい。

50

## 【0032】

「予防」という用語は、完全な予防 (prevention)、予防 (prophylaxis) を含み並びに前記の疾患又は病態を患う個体のリスクを低下させること及び疾患又は病態の発症を遅延させることを含むと理解されたい。「予防」という用語は、このように前記の病気又は病態を患うリスクがあると疑われる人を治療することも含む。該用語は既に発現した兆候を緩和することも含むと理解されたい。

## 【0033】

本明細書において使用される「遅延させること」という用語は、ある生物体、すなわち、治療すべき病態の前段階にある患者にペプチドを投与することを意味し、これらの患者では対応する状態の前形態 (pre-form) は当技術分野において既知の方法により診断される。

10

## 【0034】

「治療」又は「治療すること」という用語は、疾患、病態又は障害と闘うという目的のために患者を管理すること及びケアすることと理解される。

## 【0035】

本発明の状況において、「アルツハイマー病を治療する及び/又はその進行を遅延させること」は、好ましくは、ペプチドの治療有効量を与えることを意味する。治療有効量は、所望の治療結果を達成するのに、すなわちアルツハイマー病を治療する及び/又はその進行を遅延させるのに必要な投与量における及び時間周期における有効量を指す。

## 【0036】

ペプチドの量は、個体の病態、年齢、性別及び体重などの因子、並びに医薬が該個体に所望の応答を惹起する能力により異なる。

20

## 【0037】

治療効果 (アルツハイマー病を治療及び/又はその進行を遅延) は、好ましくは少なくとも以下のうちの1つが生じることである。

- ・脳内に存在するベータブラークの存在量の減少
- ・脳内に存在する可溶性Aオリゴマー又は前原線維の量の減少
- ・アルツハイマー病に付随する症状の重症度の低減

## 【0038】

治療される患者の脳内に存在するベータブラークの存在量が減少するとは、好ましくは、加えられたペプチドの量が、少なくともある程度ベータブラークの新たな形成を防ぐことができること及び/又は既に存在するプラークが、少なくともある程度プラーク自体の拡大する能力を阻害することを意味する。好ましくは、この状況において、ベータブラークの沈着は、治療される患者において、PETスキャンなどの画像技術 (Henriksen、Yousefira、2008) 及び/又は磁気共鳴画像法 (MRI) (O'Brien、2007) を使用することにより同定される、ベータブラークの存在量に関して増加しないであろう。PETスキャンにおいて、ベータブラーク存在量はトレーサーの集積に比例する。好ましくは、ベータブラークの存在量は、少なくとも2%、5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又はそれ以上減少する。ベータブラークが検出されないことがさらにより好ましい。ベータブラークの視覚化は、ワクチン接種のほぼ少なくとも1日後、少なくとも1週間後、少なくとも1カ月後又はそれより後に実施される必要があることを当業者は知っている (Meyer-Luehmann、Spirese-Jonesら、2008)。必要であれば、数回ワクチン接種をする及び定期的にベータブラークの存在量を監視することと決めてもよい。

30

40

## 【0039】

治療される患者の脳内に存在する可溶性Aオリゴマー又は前原線維の量が減少するとは、加えられたペプチド量が少なくともある程度可溶性Aオリゴマー又は前原線維の新たな形成を防ぐことができること及び/又は既に存在する可溶性Aオリゴマー又は前原線維が少なくともある程度それら自体の拡大する能力を阻害することを意味するのが好ま

50

しい。この状況において、好ましくは、可溶性 A オリゴマー又は前原線維の量は、治療される患者において上記で定義された画像技術により同定される表面が増加しない。好ましくは、可溶性 A オリゴマー又は前原線維の量は、少なくとも 2 %、5 %、10 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % 又はそれ以上減少する。同じ方法を使用し、可溶性 A オリゴマー又は前原線維の量が検出できないことがより好ましい。

【0040】

本発明の状況において、可溶性 A オリゴマー、前原線維又はプロト原線維は、2 ~ 24 A 単量体の集合体の標識となる (Haas and Selkoe, 2007)。

【0041】

本発明の状況において、「アルツハイマー病に付随する症状の重症度の低減」は、好ましくは、アルツハイマー病に罹患している患者における認知の改善を評価するための心理試験で測定される認知の改善を意味する。

【0042】

使用

したがって、別の態様において、アルツハイマー病に対する医薬の製造のため本明細書において定義されるペプチドの又は組成物の使用が提供される。好ましくは、該医薬はワクチンである。より好ましくは、該ワクチンは、アルツハイマー病を予防、遅延及び/又は治療するためのものである。

【0043】

したがって、さらに別の態様において、本明細書において定義されるペプチド又は組成物をこれらを必要とする患者に投与することによって、アルツハイマー病を予防、遅延及び/又は治療する方法が提供される。

【0044】

ペプチドを合成する方法

当技術分野では、現在、本発明のペプチドを生成する多くの方法が知られている。本発明は、生成されるペプチドが本明細書において同定された所与の修飾された配列のいずれかを含み、から成り又はと重複し、また本明細書において前に定義された所要の立体配座を有する限り、ペプチドを生成する任意の方法に限定されない。

【0045】

したがって、別の態様において、本明細書において定義され、修飾された環状ペプチドを産生するための方法が提供され、前記方法は次のステップを含む。

(a) 配列  $X_1 X_2 X_3 VGSN - Z$ 、 $X_2 X_3 VGSNK - Z$  又は  $X_3 VGSNKG - Z$  ( $X_1$  は A 又は G であり、 $X_2$  は E、G、Q 又は K であり、 $X_3$  は D 又は N であり、Z はペプチド配列  $X_1 X_2 X_3 VGSN$ 、 $X_2 X_3 VGSNK$  又は  $X_3 VGSNKG$  内に存在するペプチドを安定化させる因子である) を含む環状ペプチドを合成するステップ、及び (b) 任意選択で、好ましくは該免疫担体分子への Z の結合により、(b) で得られる該環状ペプチドに免疫原性担体分子を共役させるステップ。

【0046】

この方法の各ステップは当業者に既知であり、例において広範に記載されている。

【0047】

抗体

別の態様において、本明細書において定義される本発明の修飾された(環状)ペプチドに対する抗体が提供される。当業者は、ある種の動物においてこのような抗体を産生する方法を知っている。所与のポリペプチドに特異的に結合する抗体又は抗体断片を生成するための方法は、例えば、Harlow 及び Lane (1988、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY) 及び WO91/19818、WO91/18989、WO92/01047、WO92/06204、WO92/18619、並びに米国特許第 6,420,113 号及びこれに引用

10

20

30

40

50

されている参考文献において記載されている。「特異的結合」という用語は、本明細書において使用される場合、低親和性及び高親和性両方の特異的結合を含む。特異的結合は、例えば、少なくとも約  $10^{-4}$  M の  $K_d$  を有する低親和性の抗体又は抗体断片によって示すことができる。特異的結合は、高親和性の抗体又は抗体断片、例えば、少なくとも約  $10^{-7}$  M、少なくとも約  $10^{-8}$  M、少なくとも約  $10^{-9}$  M、少なくとも約  $10^{-10}$  M の  $K_d$  を有する、或いは少なくとも約  $10^{-11}$  M 若しくは  $10^{-12}$  M 又はそれ以上の  $K_d$  を有する抗体又は抗体断片によって示すことができる。

#### 【0048】

##### 診断方法

別の態様において、アルツハイマー病などの神経変性疾患又は病態を診断するための方法が提供される。該方法は、本明細書において定義される抗体を使用して患者の脳内のベータアミロイドプラーク（すなわち神経変性プラーク）の有無を決定するステップを含む。好ましくは、該方法において、披験体の脳内のベータアミロイドプラーク（又はその試料）の存在は、該披験体がアルツハイマー病などの神経変性の疾患又は病態を発症するリスクがあることを示し、或いは、アルツハイマー病などの神経変性の疾患又は病態を診断することを示している。好ましくは、このような方法は、患者の脳内のアルツハイマー病を予知する又は診断するために使用される。本発明の状況において、診断は、患者が将来アルツハイマー病を発症するかの予測的なリスク査定又は好ましくは披験体におけるアルツハイマー病の発症を評価することのどちらかを意味する。本発明の状況において、対象は動物又はヒトでよい。好ましくは、対象はヒトである。

#### 【0049】

好ましい実施形態によると、該方法は、対象から得られた試料において *in vitro* 又は *in vivo* で実施される。該試料は、好ましくは対象から単離される脳組織を含む。該組織が脳血管であればより好ましい。

#### 【0050】

好ましくは、ベータアミロイドプラークが存在するかの検出は、該例において説明されるように、ELISAによりアッセイされる脳試料に本発明の抗体を結合することによって明らかにされる。該診断方法を披験体に順次適用して疾患の発症を監視することができる。

#### 【0051】

本文書及びその請求の範囲において、動詞の「含む (comprise)」及びその動詞活用形はその非限定的な意味で使用され、その語に続く項目を含むことを意味するが、具体的に言及されない項目は除外されない。さらに、この動詞の「からなる (consist of)」は、「本質的にからなる (consist essentially of)」と取り替えて、本明細書において定義されるペプチド又は組成物が特異的に同定される成分以外の追加の成分（単数又は複数）を含めてもよく、前記の追加の成分（単数又は複数）が本発明の固有の特徴を変えないことを意味する。加えて、ある種の成分を不定冠詞の「a」又は「an」で指すことは、その状況がその成分が1つ及び唯1つであることを明らかに要求するものでない限り、その成分が複数存在する可能性を排除しない。不定冠詞「a」又は「an」はこのように通常「少なくとも1つ」を意味する。

#### 【0052】

本発明の明細書において示されるすべての特許及び文献の資料は、参照により本明細書に全体が取り込まれている。以下の例は、例示目的のみに提示されるものであり決して本発明の範囲を制限するものではない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0053】

【図1】A<sub>1-42</sub>原線維モデルの図である。A及びBは二量体の交差-ユニットを表し、Cは集合した原線維を表す。[Credit: Olssonら、2006 J. Biol. Chem. 281、477~483]

【図2】アミロイド由来の環状ペプチドの配列 (K\* は共役目的のための修飾リシン残基

10

20

30

40

50

である。)の図である。

【図3】 相同なペプチド - BSA 結合体に対する貯留マウス血清の IgG - 抗体価の図である。抗体価は ELISA において 450 nm の最大光学密度の 50% の逆の血清希釈物の  $10 \log$  である。

【図4】 被覆オリゴマー又は原線維の A<sub>1-42</sub> での希釈の関数としてのプールマウス血清 OD 450 nm の図である。

【図5】 オリゴマー又は原線維の A<sub>1-42</sub> に対する群 8 及び群 9 それぞれのマウス血清の IgG - 抗体価の図である。滴定値は ELISA における最大光学密度 450 nm の 50% の逆の血清希釈物の  $10 \log$  である。

【図6】 (a) シクロ [A<sub>(22-28)</sub> - YNGK] / 破傷風類毒素の結合体で免疫したマウス血清 (1 : 300) によるヒト脳切片ドナー 99 - 30 (Braak 6) の免疫組織化学染色及び (b) 対照モノクローナル抗体 6E10 (1 : 15,000) の図である。同様パターンのプラークがマウスの血清によって陽性対照として認められた。(顕微鏡 : DC300 カメラ装着のライカ DMRE)。

10

#### 【実施例】

##### 【0054】

###### (例1) 合成戦略

免疫優性の N 末端の B 細胞エピトープを含まない、A<sub>1-42</sub> の先端切断ペプチドを検査した。本発明者らは、異常な折りたたみ構造の A<sub>1-42</sub> に対する抗体応答を目標としている。

##### 【0055】

A<sub>1-42</sub> の配列は、  
D A E F R<sup>5</sup> H D S G Y<sup>10</sup> E V H H Q<sup>15</sup> K L V F F<sup>20</sup> A E D V G<sup>25</sup> S N K G A<sup>30</sup>  
<sup>0</sup> I I G L M<sup>35</sup> V G G V V<sup>40</sup> I A

(配列番号 4) である。

20

##### 【0056】

A<sub>1-42</sub> 原線維の構造は NMR 分光法により解明されている (Olsson ら、2006)。原線維についての水素 / 重水素交換実験は、A<sub>1-42</sub> 配列における Glu<sup>11</sup> - Gly<sup>25</sup> 及び Lys<sup>28</sup> - Ala<sup>42</sup> の領域が溶媒から保護されているが、一方、N 末端の Asp<sup>1</sup> - Tyr<sup>10</sup> 及び 2 つの残基断片の Ser<sup>26</sup> - Asn<sup>27</sup> は溶媒が接触可能である。該 NMR データは一致している。すなわち、Asp<sup>1</sup> - Tyr<sup>10</sup> 及び 2 残基断片 Ser<sup>26</sup> - Asn<sup>27</sup> は溶媒が接触可能である。該 NMR のデータは図 1C に示された原線維のモデルと一致する。予想される構造はねじれ構造の交差 - スパインである。図 1A 及び 1B は、二量体の交差 ユニットである切片を示す。該二量体において、各単量体は、Ser<sup>26</sup> - Asn<sup>27</sup> を含むターンにより結合されている 2 つの逆平行シートを含有する。

30

##### 【0057】

アミロイド原線維モデル (図 1) に基づいて、本発明者らは、一組の YNGK\* で安定化された環状の 10 及び 11 量体のアミロイドペプチドを調製することを決めた。図 2 は、目標とするアミロイドデカペプチドを示している。本発明者らは、YNGK\* であり、K\* が担体タンパク質の選択的共役のための修飾リシン残基である、人工の配列を加えることにより、続いて、主鎖 (「頭部から尾部」) のアミド環化 (Oomen ら、(2005)) によって、小さい A<sub>1-42</sub> ペプチドの立体配座を安定化させることができると仮定した。同様に、本発明者らは、A<sub>1-42</sub> 及び YNGK\* の領域 21 ~ 31 からの 6 つ又は 7 つの残基に及ぶ、環状十量体及び十量体でないペプチドの小さなパネルを作製した (表 1 参照)。

40

##### 【0058】

## 【表1】

表1: 合成ペプチド

群	抗原	ペプチド符号	ペプチドMH <sup>+</sup> 実測値/計算値
1	オリゴマー Aβ 1-42	-	-
2	原線維 Aβ 1-42	-	-
3	直線状 Aβ(22-28)/TTd	S070-07	1367.8/1367.6
4	シクロ-Aβ(25-30)/TTd	S060-08	1093.5/1093.5
5	シクロ-Aβ(24-29)/TTd	S060-09	1121.5/1121.5
6	シクロ-Aβ(23-28)/TTd	S060-10	1179.6/1179.5
7	シクロ-Aβ(24-30)/TTd	S061-56	1192.7/1192.5
8	シクロ-Aβ(23-29)/TTd	S060-05	1236.5/1236.5
9	シクロ-Aβ(22-28)/TTd	S060-06	1308.7/1308.6
10	シクロ-Aβ(21-27)/TTd	S076-08	1251.5/1251.5

10

20

## 【0059】

(例2) 折りたたみ A 1-42 の立体配座エピトープに対するいくつかの修飾環化ペプチドの特異性。

環状ペプチド [A (22-28) - YNGK\*]、すなわち、シクロ [EDVGSNK YNGK\*] 又は表1において群9に定義されたペプチドの破傷風類毒素の結合体は、*in vitro* で A (1-42) - オリゴマー (図4又は5) 及び A (1-42) 原線維 (図4又は5) と交差反応する、抗体を誘発した。これらの抗体はまた、死後の A D ヒト脳組織 (海馬) 内の A の沈着を認識する (図6参照)。線状 N アセチル化ペプチドアミド Ac - K\* EDVGSNK YNG - NH<sub>2</sub> の対応する結合体は、優れた抗ペプチド抗体価を誘導したが、生成された抗体はオリゴマー又は原線維 A を認識しなかった。該環状ペプチドは、抗体応答を通常誘導しない折りたたみ構造の A 1-42 内の立体配座エピトープによく類似している。群10に定義されたペプチドとの結合体に対する抗体応答のファイリング試験のときも、該環状ペプチド [A (21-27) - YNGK\*] は引き続き拡張していた。

30

## 【0060】

材料及び方法

ペプチド合成、精製及び共役

40

N - フルオレニルメトキシカルボニル - L - アスパラギン酸 (Fmoc - Asp - O Dmb) の (2, 4 - ジメトキシベンジル) エステルを、その側鎖を通じて高分子に結合させ、ペプチドアミドを合成した (その後、始めの Asp から Asn に変換した)。次に側鎖保護型の樹脂結合配列 GK\* EDVGSNK YD (樹脂) (K\* が N - (S - アセチルメルカプトアセチル) リシルである) 配列を、前述したように集合させた (Brugghe ら、1994)。該樹脂結合の直鎖ペプチドをシクロ [GK\* EDVGSNK YD (樹脂)] に変換した。Lys (SAMA) 以外の、側鎖の脱保護の後、及び樹脂シクロ [GK\* EDVGSNK YN] = シクロ [EDVGSNK YNGK\*] からの切断の後、群9からのペプチド (表1) を得た。群4 ~ 8 からのペプチドも同様に調製した。群10からのペプチド、シクロ [A EDVGSNK YNGK\*] は、側鎖保護の樹脂結合の

50

直線状前駆体 Y N G K \* A E D V G S D (樹脂) から調製した。該ペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製し、イオンブレイク質量分析法により特性を決定した (M H <sup>+</sup> 実測値 / 計算値、表 1 参照)。該精製したペプチドをプロモアセチル化破傷風類毒素又はマレイミジルで修飾したウシ血清アルブミン (B S A) のいずれかに結合させた (修飾試薬: N H S - P E O <sub>2</sub> - M a l e i m i d e、P i e r c e) (D r i j f h o u t J W ら、2 0 0 0)。

#### 【 0 0 6 1 】

A ( 1 - 4 2 ) の脱凝集

凍結乾燥した A 1 - 4 2 ( A n a s p e c ) を濃度 1 . 0 m M のトリフルオロ酢酸に溶解させ、室温で 1 時間放置し、窒素蒸気下で乾燥させ、その後、真空 ( 1 m m H g ) 内で 1 5 分間乾燥させた。次に該ペプチドを濃度 1 . 0 m M のヘキサフルオロイソプロパノール中に再溶解させ、室温で 1 時間培養した後、上記のように乾燥させた ( Z e n g ら、2 0 0 1 )。該ペプチドを - 2 0 ° C で 1 8 から 2 0 時間保存した。

10

#### 【 0 0 6 2 】

オリゴマー又は原線維 A ( 1 - 4 2 )

A 1 - 4 2 の脱凝集物を濃度 5 . 0 m M のジメチルスルホキシド中に溶解させ、リン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) ( p H 7 . 2 ) 又は 1 0 m M 塩酸で 5 0 倍希釈した。P B S 中該溶液を 4 ° C で 2 4 時間インキュベートし (オリゴマーを得るため)、一方、1 0 m M 中溶液を 3 7 ° C で 2 4 時間インキュベートした (原線維を得るため) ( S t i n e ら)。

#### 【 0 0 6 3 】

マウスの免疫付与

6 から 8 週齢の雌 B a l b / c マウス 8 匹からなる各群に、0 日目及び 2 8 日目に、アジュバントを含まない P B S 中 2 5 μ g の A 1 - 4 2、又は 5 0 μ g のペプチド - T T d 結合体及び P B S 中 7 5 μ g A 1 P O 4 で皮下に免疫を与えた。小さい血清試料を 0 日目に採取した。該マウスを 4 2 日目に放血させた。

20

#### 【 0 0 6 4 】

E L I S A

微小滴定プレート ( G r e i n e r 6 5 5 0 9 2 ) を A 1 - 4 2 又はペプチド - B S A 結合体で被覆した。新しく調製した A 1 - 4 2 オリゴマー又は原線維を 0 . 0 4 M 炭酸ナトリウム / 重炭酸ナトリウム緩衝液 ( p H 9 . 7 ) 中で 2 . 5 μ M ( 1 1 . 3 μ g / m l ) の最終濃度に希釈した。リン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) ( p H 7 . 2 ) 中ペプチド - B S A 結合体は総タンパク質濃度が 0 . 5 μ g / m l であった。これらの溶液のアリコード ( 1 0 0 μ l ) をプレートのウェルに移した。該プレートを 9 0 分間 3 7 ° C でインキュベートした。該プレートを上記のようにさらに処理した ( W e s t d i j k、V a n d e n I j s s e l ら、1 9 9 7 )。

30

#### 【 0 0 6 5 】

免疫組織化学染色

アルツハイマー病の数人のドナーの海馬のヒト脳切片 ( B r a a k 5 又は 6 ) を使用した (オランダ脳バンク)。凍結切片 ( 1 0 μ m ) を固定されていない直接凍結組織から切り取り、解凍し、1 時間乾燥させ、- 2 0 ° C の密閉ボックス内で保存した。免疫染色のため、切片を 4 % P F A - P B S 溶液中に 1 0 分間固定し、0 . 0 5 M リン酸緩衝液 ( P B ) 中で 2 回交換して 1 0 分間洗浄し、室温で 1 時間 1 0 % 標準ロバ血清 ( N D S ) + 0 . 0 5 M P B 中 0 . 4 % トリトン X 1 0 0 でブロックした。ブロック溶液を廃棄し、3 % N D S 中希釈マウス血清 ( 1 : 3 0 0、第 1 の抗体 ) + 0 . 0 5 M P B 中 0 . 4 % トリトン X 1 0 0 を添加し、室温のボックス内でウェットティッシュを用いて O / N でインキュベートした。切片を 0 . 0 5 M P B 中で、少なくとも 3 0 分間 1 回又は複数回交換して、洗浄した。次いで、切片を 0 . 0 5 M P B 中、ロバ対マウス ~ C y 3 : 1 4 0 0 で 2 時間培養した。切片を 0 . 0 5 M P B で少なくとも 3 0 分間 1 回又は複数回交換して洗浄した。切片を D a p i ( V e c t o r ) でベクタシールド内に密封した。ベータアミロイド 1 ~ 1 7 に対するマウスモノクローナル抗体の 6 E 1 0 ( A b c a m、C a m b r

40

50

ide、UK)を陽性対照(1:15,000)として使用した。  
(参考文献)

### Reference list

- Agadjanyan MG, Ghochikyan A, Petrushina I, Vasilevko V, Movsesyan N, Mkrtichyan M, Saing T, and Cribbs DH, 2005. Prototype Alzheimer's disease vaccine using the immunodominant B cell epitope from  $\beta$ -amyloid and promiscuous T cell epitope pan HLA DR-binding peptide. *J. Immunol.* **174**, 1580-1586. 10
- Beuvery, E. C., Roy, R., Kanhai, V., Jennings, H. J., 1986. Characteristics of two types of meningococcal group C polysaccharide conjugates using tetanus toxoid as carrier protein. *Dev.Biol.Stand.* **65**, 197-204.
- Blennow K, de Leon MJ, and Zetterberg H, 2006. Alzheimer's disease. *Lancet* **368**, 387-403.
- Brugghe HF, Timmermans HAM, van Unen LMA, ten Hove GJ, van de Werken G, Poolman JT, and Hoogerhout P, 1994. Simultaneous multiple synthesis and selective conjugation of cyclized peptides, derived from a surface-loop of a meningococcal class 1 outer membrane protein. *Int. J. Peptide Protein Res.* **43**, 166-172. 20
- Check E, 2002. Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature* **415**, 462.
- Claesson, B. A., Trollfors, B., Lagergard, T., Knutsson, N., Schneerson, R., Robbins, J. B., 2005. Antibodies against Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide and tetanus toxoid before and after a booster dose of the carrier protein nine years after primary vaccination with a protein conjugate vaccine. *Pediatr.Infect.Dis.J.* **24**, 463-464.
- Drijfhout JW and Hoogerhout P, 2000. Methods of preparing peptide-carrier conjugates. In: *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach* (W.C. Chan and P.D. White, eds.). Oxford University Press, pp. 229-241. 30
- Editorials *Nature Med.* 2006, Vol. **12**, # 7 July 2006.
- Gelinas DS, DaSilva K, Fenili D, St. George-Hyslop P, and McLaurin J, 2004. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14657-14662.
- Gevorkian G., Petrushina I, Manoutcharian K, Ghochikyan A, Acero G, Vasilevko V, Cribbs DH, and Agadjanyan MA, 2004. Mimotopes of conformational epitopes in fibrillar  $\beta$ -amyloid. *J. Neuroimmunol.* **156**, 10-20. 40
- Ghochikyan A, Mkrtichyan M, Petrushina I, Movsesyan N, Karapetyan A, Cribbs DH, and Agadjanyan MG, 2006. Prototype Alzheimer's disease epitope vaccine induced strong Th2-type anti-A $\beta$  antibody response with Alum to Quil A adjuvant switch. *Vaccine* **24**, 2275-2282.

Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Boada Rovira M, Forette F, and Orgogozo J-M, for the AN1792(QS-21)-201 study team, 2005. Clinical effects of A $\beta$  immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* **64**, 1553-1562.

Haass,C., Selkoe,D.J., 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **8**, 101-112.

Henriksen,G., Yousefi,B.H., Drzezga,A., Wester,H.J., 2008. Development and evaluation of compounds for imaging of beta-amyloid plaque by means of positron emission tomography. *Eur.J.Nucl.Med.Mol.Imaging* **35** Suppl 1, S75-S81. 10

Hock C, Konietzko U, Papassotiropoulos A, Wollmer A, Streffer J, von Rotz RC, Davey G, Moritz E, and Nitsch RM, 2002. Generation of antibodies specific for beta-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease. *Nature Med.* **8**, 1270-1275.

Hutchinson, E. G., Sessions, R. B., Thornton, J. M., Woolfson, D. N., 1998. Determinants of strand register in antiparallel beta-sheets of proteins. *Protein Sci.* **7**, 2287-2300. 20

Klein WL, Stine WB, and Teplow DB, 2004. Small assemblies of unmodified amyloid  $\beta$ -protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **25**, 569-580.

Lambert,M.P., Velasco,P.T., Chang,L., Viola,K.L., Fernandez,S., Lacor,P.N., Khuon,D., Gong,Y., Bigio,E.H., Shaw,P., De Felice,F.G., Krafft,G.A., Klein,W.L., 2007. Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *J.Neurochem.* **100**, 23-35. 30

Lee,M., Bard,F., Johnson-Wood,K., Lee,C., Hu,K., Griffith,S.G., Black,R.S., Schenk,D., Seubert,P., 2005. Abeta42 immunization in Alzheimer's disease generates Abeta N-terminal antibodies. *Ann.Neurol.* **58**, 430-435.

Lemere CA, Maier M, Jiang L, Peng Y, and Seabrook TJ, 2006. Amyloid-beta immunotherapy for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: lessons from mice, monkeys, and humans. *Rejuvenation Res.* **9**, 77-84. 40

Lemere,C.A., Maier,M., Peng,Y., Jiang,L., Seabrook,T.J., 2007. Novel Abeta immunogens: is shorter better? *Curr.Alzheimer Res.* **4**, 427-436.

Maier M, Seabrook TJ, Lazo ND, Jiang L, Das P, Janus C, and Lemere CA, 2006. Short amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) immunogens reduce cerebral A $\beta$  load and learning deficits in an

Alzheimer's disease mouse model in the absence of an A $\beta$ -specific cellular immune response. *J. Neurosci.* **26**, 4717-4728.

McDonnell J, Redekop WK, Van der Roer N, Goes E, Ruitenbergh A, Busschbach JJ, Breteler MM, and Rutten FF, 2001. The cost of treatment of Alzheimer's disease in The Netherlands: a regression-based simulation model. *Pharmacoeconomics* **19**, 379-390.

McLaurin J, Cecal R, Kierstead ME, Tian X, Phinney AL, Manea M, French JE, Lambermon MHL, Darabie AA, Brown ME, Janus C, Chishti MA, Horne P, Westaway D, Fraser PE, Mount HTJ, Przybylski M, and St George-Hyslop P, 2002. Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nature Med.* 1263-1269.

Meyer-Luehmann, M., Spires-Jones, T.L., Prada, C., Garcia-Alloza, M., de, C.A., Rozkalne, A., Koenigsnecht-Talboo, J., Holtzman, D.M., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., 2008. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* **451**, 720-724.

Movsesyan, N., Ghochikyan, A., Mkrtychyan, M., Petrushina, I., Davtyan, H., Olkhanud, P.B., Head, E., Biragyn, A., Cribbs, D.H., Agadjanyan, M.G., 2008. Reducing AD-like pathology in 3xTg-AD mouse model by DNA epitope vaccine - a novel immunotherapeutic strategy. *PLoS ONE*. **3**, e2124.

O'Brien, J.T., 2007. Role of imaging techniques in the diagnosis of dementia. *Br. J. Radiol.* **80** Spec No 2, S71-S77.

Olofsson A, Sauer-Eriksson AE, and Öhman A, 2006. The solvent protection of Alzheimer amyloid- $\beta$ -(1-42) fibrils as determined by solution NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **281**, 477-483.

Oomen, C.J., Hoogerhout, P., Bonvin, A.M., Kuipers, B., Brugghe, H., Timmermans, H., Haseley, S.R., van, A.L., Gros, P., 2003. Immunogenicity of peptide-vaccine candidates predicted by molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* **328**, 1083-1089.

Oomen CJ, Hoogerhout P, Kuipers B, Vidarsson G, van Alphen L, and Gros P, 2005. Crystal structure of an anti-meningococcal subtype P1.4 PorA antibody provides basis for peptide-vaccine design. *J. Mol. Biol.* **351**, 1070-1080.

Sadowski M and Wisniewski T, 2004. Vaccines for conformational disorders. *Expert Rev. Vaccines* **3**, 279-290.

10

20

30

40

Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol M, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJW, McFarlane HT, Madsen AØ, Riekel C, and Eisenberg D, 2007. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* **447**, 453-457.

Schenk, 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, and Seubert P, 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**, 173-177.

10

Sigurdsson EM, Knudsen E, Asuni A, Fitzcr-Attas C, sage D, Quartermain D, Goni F, Frangione B, and Wisniewski T, 2004. An attenuated immune response is sufficient to enhance cognition in an Alzheimer's disease mouse model immunized with amyloid- $\beta$  derivatives. *J. Neurosci.* **24**, 6277-6282.

Stine W B, Jr, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ, 2003. *J. Biol. Chem.*, 278:11612.

20

Tomiyama,T., Nagata,T., Shimada,H., Teraoka,R., Fukushima,A., Kanemitsu,H., Takuma,H., Kuwano,R., Imagawa,M., Ataka,S., Wada,Y., Yoshioka,E., Nishizaki,T., Watanabe,Y., Mori,H., 2008. A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann.Neurol.* **63**, 377-387.

Vas CJ, Rajkumar S, Tanyakitpibal P, and Chandra V, 2001. Alzheimer's disease: the brain killer. *Report of the World Health Organization.*

Walsh,D.M., Selkoe,D.J., 2007. A beta oligomers - a decade of discovery. *J.Neurochem.* **101**, 1172-1184.

30

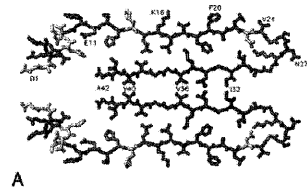
Westdijk,J., Van den Ijssel, J., Thalen,M., Beuvery,C., Jiskoot,W., 1997. Quantification of cell-associated and free antigens in Bordetella pertussis suspensions by antigen binding ELISA. *J.Immunoassay* **18**, 267-284.

Woolfson, D. N., Evans, P. A., Hutchinson, E. G., Thornton, J. M., 1993. Topological and stereochemical restrictions in beta-sandwich protein structures. *Protein Eng* **6**, 461-470.

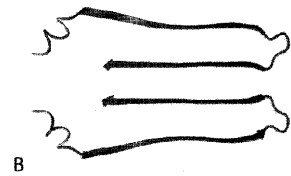
Zeng H, Zhang Y, Peng L-J, Shao H, Menon NK, Yang J, Salomon AR, Freidland RP, and Zagorski MG, 2001. Nicotine and amyloid formation. *Biol. Psychiatry* **49**, 248-257.

40

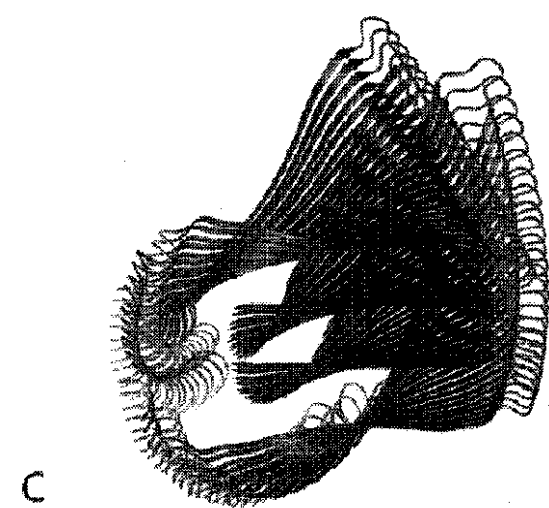
【図1A】



【図1B】

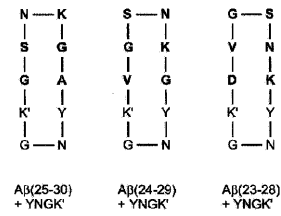


【図1C】



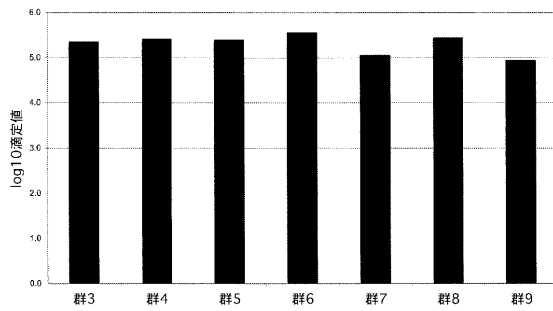
【図2】

Fig 2

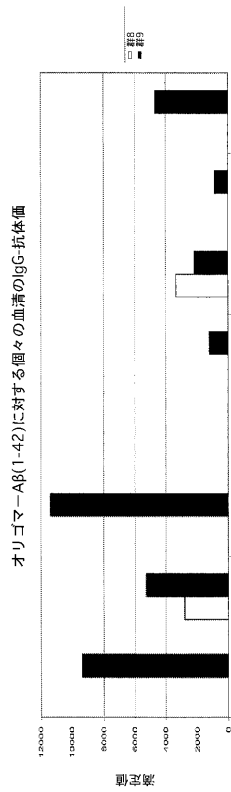


【図3】

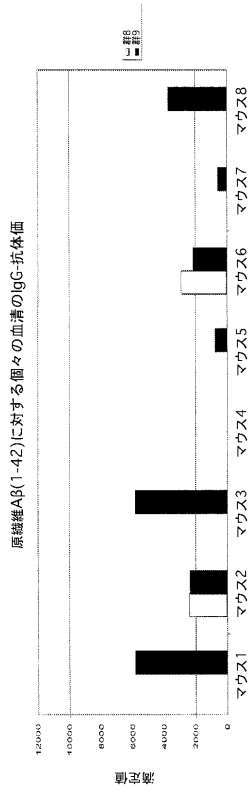
相同なペプチド-BSA結合体に対するプール血清のIgG抗体価



【図5a】

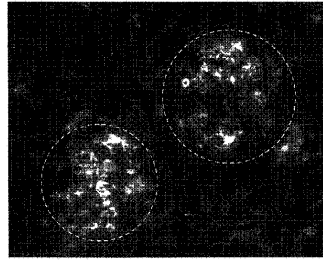


【図 5 b】



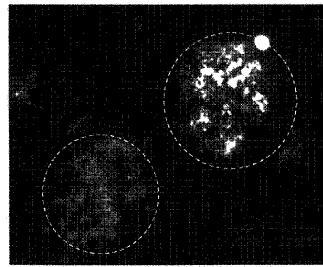
【図 6 a】

Fig 6a



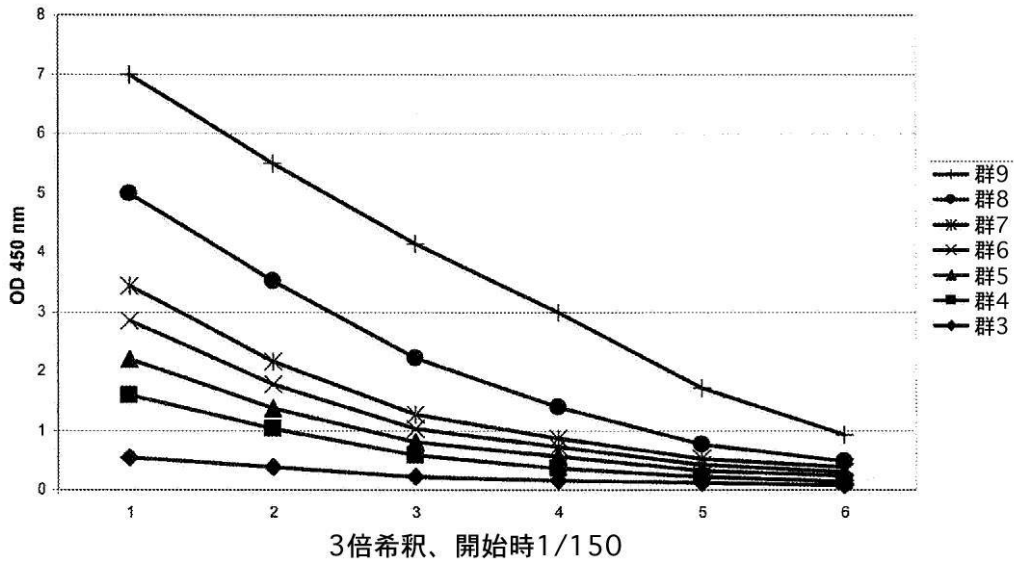
【図 6 b】

Fig 6b



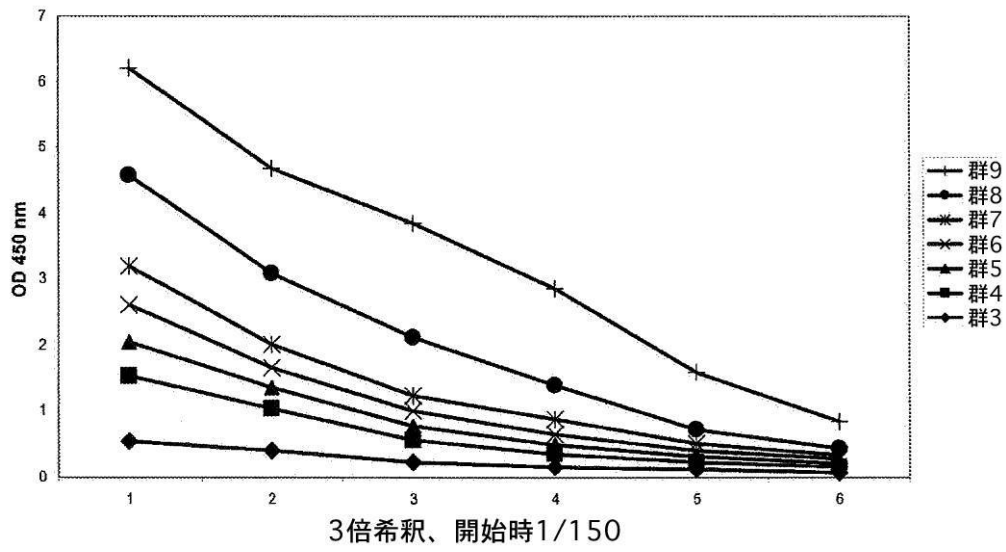
【図 4 a】

被覆オリゴマーAβ



【 図 4 b 】

被覆原纖維Aβ



【 配列表 】

[0005722770000001.app](#)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02 A
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 D
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18

(72)発明者 ファン デン ドッベルステーン、ヘラルダ、ペトロネラ、ヨハンナ、マリア  
オランダ国、ビルトーフエン、ステーネン カマー 15

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 国際公開第2006/121656(WO, A1)  
特表2004-526693(JP, A)  
MATSUZAKI, K. et al., "DESIGN, SYNTHESIS, AND BIOPHYSICAL PROPERTIES OF A HELICAL ABET A1-42 ANALOG: INHIBITION OF FIBRILLOGENESIS AND CYTOTOXICITY.", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 2008年5月8日, Vol.371, No.4, P.777-780  
SCIARRETTA, K.L. et al., "ABETA40-LACTAM(D23/K28) MODELS A CONFORMATION HIGHLY FAVORABLE FOR NUCLEATION OF AMYLOID.", BIOCHEMISTRY, 2005年4月26日, Vol.44, No.16, P.6003-6014  
CRUZ, L. et al., "SOLVENT AND MUTATION EFFECTS ON THE NUCLEATION OF AMYLOID BETA-PROTEIN FOLDING.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 2005年12月20日, Vol.102, No.51, P.18258-18263

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
PubMed  
Science Direct

专利名称(译)	针对淀粉样蛋白折叠中间体的疫苗		
公开(公告)号	<a href="#">JP5722770B2</a>	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	JP2011516186	申请日	2009-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	DE STAAT DER NEDERLANDEN VERT DOOR DE MINIST VAN VWS		
申请(专利权)人(译)	德启动戴尔Nedaranden, 震感.多尔德迷你明星范大众黑斯廷斯宗德海德, Ferujiin安妮运动		
当前申请(专利权)人(译)	德启动戴尔Nedaranden, 震感.多尔德迷你明星范大众黑斯廷斯宗德海德, Ferujiin安妮运动		
[标]发明人	ホーヘルホウトペーター ファンデンドッベルステーンヘラルダペトロネラヨハンナマリア		
发明人	ホーヘルホウト、ペーター ファン デン ドッベルステーン、ヘラルダ、ペトロネラ、ヨハンナ、マリア		
IPC分类号	C07K14/47 C07K7/06 A61K38/00 A61K39/00 A61P25/28 C12P21/02 G01N33/53 C07K16/18		
CPC分类号	A61P25/28 C07K14/4711 A61K38/1716 C07K7/06 C07K7/64 C07K19/00 A61K38/12 A61K39/385		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C07K7/06 A61K37/02 A61K39/00.H A61P25/28 C12P21/02.A G01N33/53.D C07K16/18		
审查员(译)	野村 英雄		
优先权	2008159385 2008-07-01 EP 61/077264 2008-07-01 US		
其他公开文献	JP2011526885A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于治疗阿尔茨海默病的改进疫苗。

群	抗原	ペプチド符号	ペプチドMH <sup>+</sup> 実測値/計算値
1	オリゴマー Aβ 1-42	-	-
2	原線維 Aβ 1-42	-	-
3	直線状 Aβ(22-28)/TTd	S070-07	1367.8/1367.6
4	シクロ-Aβ(25-30)/TTd	S060-08	1093.5/1093.5
5	シクロ-Aβ(24-29)/TTd	S060-09	1121.5/1121.5
6	シクロ-Aβ(23-28)/TTd	S060-10	1179.6/1179.5
7	シクロ-Aβ(24-30)/TTd	S061-56	1192.7/1192.5
8	シクロ-Aβ(23-29)/TTd	S060-05	1236.5/1236.5
9	シクロ-Aβ(22-28)/TTd	S060-06	1308.7/1308.6
10	シクロ-Aβ(21-27)/TTd	S076-08	1251.5/1251.5