



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102596236 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201080040148. 8

C07K 14/47(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 07. 20

(30) 优先权数据

61/229, 860 2009. 07. 30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 03. 09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2010/053313 2010. 07. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02011/013034 EN 2011. 02. 03

(71) 申请人 辉瑞疫苗有限责任公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 G·J·史密斯三世 K·N·威尔斯

J·X·朱

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

A61K 39/00(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 51 页 附图 13 页

按照条约第19条修改的权利要求书 2 页

(54) 发明名称

抗原性 Tau 肽及其用途

(57) 摘要

本发明涉及包含优选连接至免疫原性载体的抗原性 Tau 肽的免疫原和组合物,其用于治疗 Tau 相关的神经学病症。本发明还涉及制备这些免疫原及组合物的方法以及其在医药中的用途。

1. 一种免疫原,其包含至少一种连接至免疫原性载体的抗原性 tau 肽,其中所述抗原性 tau 肽包含选自以下的磷酸-tau 表位:pSer-396 磷酸-tau 表位、pThr-231/pSer-235 磷酸-tau 表位、pThr-231 磷酸-tau 表位、pSer-235 磷酸-tau 表位、pThr-212/pSer-214 磷酸-tau 表位、pSer-202/pThr-205 磷酸-tau 表位、和 pTyr 18 磷酸-tau 表位。

2. 一种免疫原,其包含至少一种连接至免疫原性载体的抗原性 tau 肽,其中所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO:4、6-26、105 和 108-112 的氨基酸序列。

3. 权利要求 2 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽通过式 $(G)_n C$ 所表示的接头共价连接至所述免疫原性载体,其中所述接头位于所述肽的 C 端(肽 $-(G)_n C$) 或 N 端 $C(G)_n$ -肽),并且其中 n 是 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

4. 权利要求 3 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO:4 及 6-13 的氨基酸序列。

5. 权利要求 4 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO:11 中所示的氨基酸序列组成。

6. 权利要求 3 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO:14-19 的氨基酸序列。

7. 权利要求 6 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO:16 中所示的氨基酸序列组成。

8. 权利要求 3 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO:20-24 的氨基酸序列。

9. 权利要求 8 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO:21 中所示的氨基酸序列组成。

10. 权利要求 3 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO:105 及 108-112 的氨基酸序列。

11. 权利要求 10 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO:105 中所示的氨基酸序列组成。

12. 权利要求 1 至 11 中任一项的免疫原,其中所述免疫原性载体是选自由 HBcAg VLP、HBsAg VLP、和 Qbeta VLP 组成的组的病毒样颗粒。

13. 一种组合物,其包含至少两种权利要求 2 的免疫原,其中:

- a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:4 及 6-13 的氨基酸序列组成;且
- b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:14-19 的氨基酸序列组成。

14. 一种组合物,其包含至少两种权利要求 2 的免疫原,其中:

- a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:4 及 6-13 的氨基酸序列组成;且
- b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:20-24 的氨基酸序列组成。

15. 一种组合物,其包含至少两种权利要求 2 的免疫原,其中:

- a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:14-19 的氨基酸序列组成;且
- b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:20-24 的氨基酸序列组成。

16. 一种组合物,其包含至少两种权利要求 2 的免疫原,其中:

- a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:4 及 6-13 的氨基酸序列组成;且
- b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽选自 SEQ ID NO:105 及 108-112。

17. 一种组合物,其包含至少两种权利要求 2 的免疫原,其中:
- a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:14-19 的氨基酸序列组成;且
 - b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽选自 SEQ ID NO:105 及 108-112。
18. 一种组合物,其包含至少两种权利要求 2 的免疫原,其中:
- a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:20-24 的氨基酸序列组成;且
 - b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽选自 SEQ ID NO:105 及 108-112。
19. 一种组合物,其包含权利要求 2 的四种免疫原中的至少三种免疫原,其中:
- a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:4 及 6-13 的氨基酸序列组成;
 - b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:14-19 的氨基酸序列组成;且
 - c) 第三种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:20-24 的氨基酸序列组成;
 - d) 第四种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:105 及 108-112 的氨基酸序列组成。
20. 一种药物组合物,其包含权利要求 1 至 12 中任一项的免疫原、或权利要求 13 至 19 中任一项的组合物、及药物可接受的赋形剂。

抗原性 Tau 肽及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及包含连接至诸如病毒样颗粒 (VLP) 等免疫原性载体的抗原性 tau 肽 (tau peptide) 的免疫原、免疫原性组合物及药物组合物,其用于治疗 tau 相关的神经学病症或病状,例如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease) 及轻度认知损伤 (Mild Cognitive Impairment)。本发明还涉及制备这些免疫原、免疫原性组合物及药物组合物的方法及其于医药中的用途。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病也称为阿尔茨海默痴呆或 AD,其是一种造成记忆丧失及严重精神衰退的进行性神经变性病症或病状。AD 是最常见的痴呆形式,占有痴呆的一半以上。据估计,全世界超过 2600 万人遭受 AD 影响,预计随着人口老龄化在 2050 年以前该数字会变成四倍 (Brookmeyer 等人, Alzheimer's & Dementia 3:186-191(2007))。考虑到 AD 患者在诊断后平均存活 8 至 10 年且需要高水平的日常护理,除丧失生命及降低生活质量外,对社会造成的经济成本也非常巨大。在早期,抱怨自己略微记忆丧失及意识错乱的患者被鉴定为患有轻度认知损伤 (MCI),在一些情况下其会发展成典型的阿尔茨海默病症状,导致严重的智力及社会能力障碍。

[0003] 通常,阿尔茨海默病 (AD) 的特征在于脑中神经炎斑 (neuritic plaque) 及神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangle) 的聚积,导致神经元细胞死亡,随后进行性认知衰退。大多数当前可用的 AD 疗法集中于治疗症状,但不一定终止疾病进展。因此,显然需要新的途径以鉴别出能够保护神经元免受 AD 衰弱效应的疗法。

[0004] 大多数目前用于治疗 AD 的治疗途径是基于广为接受的“淀粉样蛋白级联假说 (amyloid cascade hypothesis)”。此观点将病理生理学作用归因于淀粉样蛋白- β ($A\beta$),该淀粉样蛋白- β 是单体至寡聚体形式的神经毒素 (neurotoxin) 及突触毒素 (synaptotoxin)、同时以聚合物形式沉积于淀粉样蛋白斑 (amyloid plaque) 中,这是 AD 病理学的特征之一。抗一系列 $A\beta$ 形式的单克隆抗体被认为是有效的,这是因为其使血脑平衡 (brain-blood equilibrium) 向血液偏移,由此降低脑中的 $A\beta$ 储量。

[0005] AD 病理生理学的特征不仅在于 $A\beta$ 沉积于老年斑中,且还包括神经原纤维缠结 (NFT) 的聚积。NFT 是由成对螺旋纤维与高度磷酸化的 tau 蛋白连接在一起而形成的原纤维。Tau 可在多于 30 个不同丝氨酸及苏氨酸残基 (Hanger 等人, J. Neurochem. 71: 2465-2476(1998)) 以及数个酪氨酸残基 (Lebouvier 等人, JAD 18:1-9(2009)) 处经多种激酶而短暂磷酸化。在 AD 中,激酶与磷酸酶活性明显不平衡,导致产生以 NFT 形式聚集和堆积的 tau 蛋白的高度磷酸化形式。

[0006] 轻度认知损伤 (MCI) 最通常定义为具有可测量的记忆损伤,该记忆损伤超出了通常对衰老的预期,但未显示其他痴呆或 AD 症状。MCI 似乎代表着介于与正常衰老及早期痴呆有关的认知变化之间的过渡状态。当主要症状是记忆丧失时,此类型的 MCI 进一步细定义为遗忘型 MCI。患有此亚型 MCI 的个体最可能以每年约 10-15% 的比率发展成

AD(Grundman M 等人, Arch Neurol. 61, 59-66, 2004)。2005 年公布的一项大规模研究作为第一个临床试验显示出在第一年试验期间对 MCI 患者进行治疗可延迟转变至 AD(Petersen RC 等人, NEJM 352, 2379-2388, 2005), 表明这些患者也代表了对于 AD 治疗干预的是可行的群体。

[0007] 最近的研究报导, 在病原性 tau 的缠结小鼠模型中接种抗磷酸化 tau 肽的疫苗可导致脑中聚积的 tau 减少并改善与缠结有关的行为缺陷 (Asuni 等人, J. Neurosci. 27 : 9115-9129 (2007))。尽管高度磷酸化的 tau 及 NFT 对认知丧失及 AD 进展的影响尚未完全了解, 但最近的意见表明仅靶向淀粉样蛋白并不足以在整个病程期间看到改善, 这使得靶向其他的或替代的靶标成为必须 (Oddo 等人, J. Biol. Chem. 281 : 39413 (2006))。有鉴于此, 可能需要靶向 tau 蛋白的疾病构象的活性疫苗途径来产生对于 AD 及 MCI 有效的治疗疫苗。

[0008] 此外, 除 AD 及 MCI 外还有许多疾病也与 tau 病变 (tau pathology 或 tauopathies) 有关, 其也可能得益于特异性靶向所涉及致病形式的 tau 疫苗。这些疾病包括例如额颞痴呆、帕金森病 (Parkinson's disease)、皮克病 (Pick's disease)、进行性核上麻痹、和肌萎缩侧索硬化 / 帕金森病 - 痴呆综合症 (参见, 例如 Spiers-Jones 等人, TINS 32 : 150-9 (2009))。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明提供包含至少一种抗原性 tau 肽的新的免疫原、免疫原性组合物和药物组合物, 所述抗原性 tau 肽能够诱导免疫应答、特别是抗体应答, 导致产生针对呈致病的高度磷酸化状态的自身抗原 tau 的抗体效价。此类免疫原、免疫原性组合物及药物组合物展现出多种期望的特性, 例如能够诱导免疫应答、特别是抗体应答, 对于与高度磷酸化 tau 有关的神经变性疾病 (例如阿尔茨海默病及 MCI) 的诱导及发展具有治疗效果。

[0011] 在一个方面, 本发明提供包含至少一种连接至免疫原性载体的抗原性 tau 肽的免疫原, 其中所述抗原性 tau 肽包含选自以下的磷酸 -tau 表位: pSer-396 磷酸 -tau 表位、pThr-231/pSer-235 磷酸 -tau 表位、pThr-231 磷酸 -tau 表位、pSer-235 磷酸 -tau 表位、pThr-212/pSer-214 磷酸 -tau 表位、pSer-202/pThr-205 磷酸 -tau 表位, 以及表位。

[0012] 在一个实施例中, 所述磷酸 -tau 表位是 pSer-396 磷酸 -tau 表位。在又一实施例中, 所述磷酸 -tau 表位是 pThr-231/pSer-235 磷酸 -tau 表位。在又一实施例中, 所述磷酸 -tau 表位是 pThr-231 磷酸 -tau 表位, 在又一实施例中, 所述磷酸 -tau 表位是 pSer-235 磷酸 -tau 表位。在又一实施例中, 所述磷酸 -tau 表位是 pThr-212/pSer-214 磷酸 -tau 表位。在又一实施例中, 所述磷酸 -tau 表位是 pSer-202/pThr-205 磷酸 -tau 表位。在又一实施例中, 所述磷酸 -tau 表位是 pTyr18 磷酸 -tau 表位。

[0013] 在另一方面, 本发明提供包含至少一种连接至免疫原性载体的抗原性 tau 肽的免疫原, 其中所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO : 4、6-26、105 及 108-112 的氨基酸序列。

[0014] 在一个实施例中, 所述抗原性 tau 肽通过式 $(G)_n C$ 表示的接头共价连接至所述免疫原性载体, 其中所述接头位于所述肽的 C 端 (肽 - $(G)_n C$) 或 N 端 ($C(G)_n$ 肽), 且其中 n 是 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在又一实施例中, 所述接头位于所述 tau 肽的 N 端, 且其中 n 为 1 或 2。在另一实施例中, 所述接头位于所述 tau 肽的 C 端, 且其中 n 为 1 或 2。在又一实施例中, 所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO : 4 及 6-13 的氨基酸序列。在又一实施例中, 所述抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO : 4 及 6-13 的氨基酸序列组成。在又一实施例中,

所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO :11 中所示的氨基酸序列组成。

[0015] 在另一实施例中,所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO :14-19 的氨基酸序列。在又一实施例中,所述抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :14-19 的氨基酸序列组成。在又一实施例中,所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO :16 中所示的氨基酸序列组成。

[0016] 在另一实施例中,所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO :20-24 的氨基酸序列。在又一实施例中,所述抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :20-24 的氨基酸序列组成。在又一实施例中,所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO :21 中所示的氨基酸序列组成。

[0017] 在另一实施例中,所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO :105 及 108-112 的氨基酸序列。在又一实施例中,所述抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :105 及 108-112 的氨基酸序列组成。在又一实施例中,所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO :105 中所示的氨基酸序列组成。

[0018] 在一个方面,本发明提供任何本文所述的免疫原,其中所述免疫原性载体为血蓝蛋白(例如 KLH)、血清白蛋白、球蛋白、提取自蛔虫属的蛋白质、或失活的细菌毒素。

[0019] 在一个方面,本发明提供任何本文所述的免疫原,其中所述免疫原性载体选自自由 HBcAg VLP、HBsAg VLP 及 Qbeta VLP 组成的组的病毒样颗粒。在一个实施例中,本发明提供包含至少两种本文所述免疫原的组合物。在又一实施例中,所述组合物包含至少三种本文所述的免疫原。

[0020] 在一个实施例中,本发明提供包含至少两种本文所述免疫原的组合物,其中:a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :4 及 6-13 的氨基酸序列组成;且 b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :14-19 的氨基酸序列组成。

[0021] 在另一实施例中,本发明提供包含至少两种本文所述免疫原的组合物,其中:a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :4 及 6-13 的氨基酸序列组成;且 b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :20-24 的氨基酸序列组成。

[0022] 在另一实施例中,本发明提供包含至少两种本文所述免疫原的组合物,其中:a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :14-19 的氨基酸序列组成;且 b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :20-24 的氨基酸序列组成。

[0023] 在又一实施例中,本发明提供包含至少两种本文所述免疫原的组合物,其中:a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :4 及 6-13 的氨基酸序列组成;且 b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽选自 SEQ ID NO :105 及 108-112。

[0024] 在又一实施例中,本发明提供包含至少两种本文所述免疫原的组合物,其中:a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :14-19 的氨基酸序列组成;且 b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽选自 SEQ ID NO :105 及 108-112。

[0025] 在又一实施例中,本发明提供包含至少两种本文所述免疫原的组合物,其中:a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :20-24 的氨基酸序列组成;且 b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽选自 SEQ ID NO :105 及 108-112。

[0026] 在另一实施例中,本发明提供包含本文所述四种免疫原中的至少三种免疫原的组合物,其中:a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :4 及 6-13 的氨基酸序列组成; b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :14-19 的氨基酸序列组成;且 c) 第三种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :20-24 的氨基酸序列组成; d) 第四免疫原的抗原性 tau 肽选自 SEQ ID NO :105 及 108-112。

[0027] 在又一实施例中,本发明提供任何本文所述的组合物,其中所述抗原性 tau 肽中的每一种独立地通过式 $(G)_n C$ 所表示的接头共价连接至所述免疫原性载体,其中这些接头中的每一种独立地位于所述 tau 肽的 C 端(肽 $-(G)_n C$) 或 N 端 $C(G)_n$ -肽),且其中各个 n 独立地为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在又一实施例中,本发明提供任何本文所述的组合物,其中所述接头中的每一种位于该 tau 肽的 N 端且其中各 n 独立地为 1 或 2。

[0028] 在另一方面,本发明提供包含四种免疫原中的至少三种免疫原的组合物,其中:a) 第一种免疫原包含至少一种连接至 Qbeta VLP 的抗原性 tau 肽,其中所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO:11 组成,且其中所述肽通过式 $(G)_n C$ 所表示的接头共价连接至所述 VLP,其中所述接头位于所述 tau 肽的 C 端(肽 $-(G)_n C$) 或 N 端 $C(G)_n$ -肽),且其中 n 是 1 或 2;b) 第二种免疫原包含至少一种连接至 Qbeta VLP 的抗原性 tau 肽,其中所述抗原性 tau 肽由 SEQ IDNO:16 组成,且其中所述肽通过式 $(G)_n C$ 表示的接头共价连接至所述 VLP,其中所述接头位于所述 tau 肽的 C 端(肽 $-(G)_n C$) 或 N 端 $C(G)_n$ -肽),且其中 n 是 1 或 2;且 c) 第三种免疫原包含至少一种连接至 Qbeta VLP 的抗原性 tau 肽,其中所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO:21 组成,且其中所述肽经由式 $(G)_n C$ 表示的接头共价连接至所述 VLP,其中所述接头位于所述 tau 肽的 C 端(肽 $-(G)_n C$) 或 N 端 $C(G)_n$ -肽),且其中 n 是 1 或 2;d) 第四种免疫原包含至少一种连接至 Qbeta VLP 的抗原性 tau 肽,其中所述抗原性 tau 肽由 SEQ IDNO:105 组成,且其中所述肽通过式 $(G)_n C$ 表示的接头共价连接至所述 VLP,其中所述接头位于所述 tau 肽的 C 端(肽 $-(G)_n C$) 或 N 端 $C(G)_n$ -肽),且其中 n 为 1 或 2。

[0029] 在一个实施例中,第一、第二及第三免疫原的所述接头中的每一种位于所述抗原性 tau 肽中的每一种的 N 端,且其中对于所述接头中的每一种,n 为 2。

[0030] 在另一方面,本发明提供包含任何本文所述免疫原或组合物的组合物,其进一步包含至少一种佐剂,所述佐剂选自明矾、含 CpG 寡核苷酸、及基于皂苷的佐剂。

[0031] 在又一方面,本发明提供包含任何本文所述的免疫原或组合物、及药物可接受的赋形剂的药物组合物。在一个实施例中,至少一种佐剂是选自 CpG 7909(SEQ ID NO:27)、CpG 10103(SEQ ID NO:28) 及 CpG 24555(SEQ ID NO:29) 的含 CpG 寡核苷酸。

[0032] 在又一方面,本发明提供包含任何本文所述免疫原或组合物、及药物可接受的赋形剂的药物组合物。

[0033] 在另一方面,本发明提供一种免疫方法,其包括向哺乳动物施用任何本文所述的免疫原、组合物或药物组合物。例如,在一个方面,所述施用是通过使用医药有效剂量的任何本文所述免疫原、组合物或药物组合物来实施。

[0034] 在另一方面,本发明提供治疗哺乳动物 tau 相关神经学病症的方法,其包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的任何本文所述的免疫原、免疫原性组合物或药物组合物。

[0035] 在一个方面,所述施用是通过使用医药有效剂量的任何本文所述免疫原、组合物或药物组合物来实施。

[0036] 在另一方面,本发明提供治疗哺乳动物 tau 相关神经学病症的方法,其包括向所述哺乳动物施用:a) 医药有效剂量的任何本文所述的免疫原、免疫原性组合物或药物组合物;及 b) 医药有效剂量的至少一种佐剂。在一个实施例中,所述至少一种佐剂选自明矾、含 CpG 寡核苷酸及基于皂苷的佐剂。在又一实施例中,所述至少一种佐剂是选自 CpG 7909(SEQ ID NO:27)、CpG 10103(SEQ ID NO:28)、以及 CpG 24555(SEQ ID NO:29) 的含 CpG 寡核苷酸

酸。

[0037] 在又一实施例中,所述神经学病症为阿尔茨海默病。在另一实施例中,所述神经学病症被诊断为轻度认知损伤。在另一实施例中,所述神经学病症被诊断为遗忘型 MCI。

[0038] 在另一实施例中,本发明提供了任何本文所述的免疫原、组合物或药物组合物用于制造药物的用途。例如,在一个方面,所述药物可用于治疗哺乳动物 tau 相关的神经学病症。在一个实施例中,所述神经学病症为阿尔茨海默病。在另一实施例中,所述神经学病症被诊断为轻度认知损伤 (MCI)。在另一实施例中,所述神经学病症被诊断为遗忘型 MCI。

[0039] 在又一方面,本发明提供应答任何本文所述免疫方法而产生的分离的抗体,其中所述抗体特异性结合高度磷酸化形式的人类 tau。

[0040] 在又一方面,本发明提供治疗哺乳动物 tau 相关神经学病症的方法,其包括向所述哺乳动物施用特异性结合高度磷酸化形式的人类 tau 的抗体,且其中所述抗体是应答任何本文所述免疫方法而产生。

[0041] 在又一方面,本发明提供任何本文所述抗体用以制造用于治疗哺乳动物 tau 相关神经学病症的药物的用途。在一个实施例中,所述神经学病症为阿尔茨海默病。在另一实施例中,所述神经学病症被诊断为轻度认知损伤 (MCI)。在另一实施例中,所述神经学病症被诊断为遗忘型 MCI。

[0042] 在又一方面中,本发明提供一种分离的肽,其由选自 SEQ ID NO :4、6 至 26、31 至 76 以及 105 至 122 的氨基酸序列组成或基本上由上述氨基酸序列所组成。在又一方面,本发明提供编码任何所述分离肽的分离核酸。在又一方面,本发明提供包含任何所述核酸的表达载体。在又一方面,本发明提供包含任何所述表达载体的宿主细胞。

[0043] 附图简述

[0044] 图 1A 及 1B 显示了如实施例 5 所述的经皮下免疫的 Balb/c 小鼠组的描述,以及效价和选择性结果。用 300 μ g 肽、100 μ g 肽 -KLH 或 100 μ g 肽 -VLP 经皮下免疫 Balb/c 小鼠。在列出的情形中用 50 μ L TiterMax Gold (Alexis Biochemicals) 作为佐剂。在抗原特异性效价确定测定法 (参见实施例 13) 中所测试的血清稀释度介于 1 : 30 至 1 : 7,290 范围内。

[0045] 图 2 显示如实施例 5 所述的经免疫的 Balb/c 小鼠组的描述、以及效价结果。经皮下免疫 Balb/c 小鼠。在列出的情形中使用 50 μ L TiterMax Gold 作为佐剂。在抗原特异性效价确定测定法 (参见实施例 13) 中所测试的血清稀释度介于 1 : 900 至 1 : 1,968,300 范围内。

[0046] 图 3 显示如实施例 6 所进一步阐述的经皮下免疫的 Balb/c 小鼠的描述。使用 100 μ g 肽初免,并使用 100 μ g 肽 -VLP 加强免疫。在列出的情形中使用 750 μ g 明矾 (Al(OH)₃) 作为佐剂。在抗原特异性效价确定测定法 (参见实施例 13) 中测试的血清稀释度介于 1 : 800 至 1 : 1,750,000 范围内。ND 意指未进行测定。

[0047] 图 4A、4B 及 4C 显示如实施例 7 所述的经肌内免疫的 TG4510++ 小鼠的结果。图 4A 显示组 1 至 7 的效价结果,而图 4B 显示组 8 至 17 的效价结果。图 4C 显示组 1 至 6 的选择性结果。CPG 是 CpG-24555。明矾是 Al(OH)₃。在抗原特异性效价确定测定法 (参见实施例 13) 中测试的血清稀释度介于 1 : 5,000 至 1 : 15,800,000 范围内。ND 意指未进行测定。

[0048] 图 5 显示如实施例 8 所述的免疫小鼠的描述。通过肌内 (IM) 或皮下 (SC) 途径免

疫 Balb/c 小鼠。在列出的情形中使用 90 μ g 肽-VLP。在列出的情形中使用 1,595 μ g 明矾 (Al(OH)₃)、20 μ g CpG-24555 及 12 μ g ABISCO-100。在抗原特异性效价确定测定法 (参见实施例 13) 中测试的血清稀释度介于 1 : 5,000 至 1 : 15,800,000 范围内。标准曲线检测的下限为 0.0025mg/mL。NA 意指不适用。

[0049] 图 6 显示如实施例 11 所述的经免疫小鼠的描述。经肌内免疫 Balb/c 小鼠。使用 100 μ g 肽-VLP。在列出的情形中使用 252(750) μ g 明矾 (Al(OH)₃)。在抗原特异性效价确定测定法 (参见实施例 13) 中测试的血清稀释度介于 1 : 500 至 1 : 2,720,000 范围内。ND 意指未进行测定。

[0050] 图 7 显示如实施例 11 所述的经免疫小鼠的描述。经肌内免疫 Balb/c 小鼠。使用 750 μ g 明矾 (Al(OH)₃) 作为佐剂。在抗原特异性效价确定测定法 (参见实施例 13) 中测试的血清稀释度介于 1 : 500 至 1 : 15,800,000 范围内。

[0051] 图 8 显示如实施例 12 所述的经免疫小鼠的描述。经肌内免疫 TG4510-/- (野生型同窝) 小鼠。列出时,使用 100 μ g 各肽-VLP 进行第 0 天的初免以及第 14 天的加强免疫。使用所列出的量的明矾 (Al(OH)₃)。采集“未治疗”组的血清。在抗原特异性效价确定测定法 (参见实施例 13) 中测试的血清稀释度介于 1 : 5,000 至 1 : 15,800,000 范围内。

[0052] 图 9 显示如实施例 12 所述的经免疫小鼠的描述。经肌内免疫 TG4510-/- (野生型同窝) 小鼠。使用 100 μ g 的各种肽-VLP 进行第 0 天的初免以及第 14 天的加强免疫。不使用明矾或使用 504 μ g 明矾 (Al(OH)₃)。在第 21 天采集脾。显示如经干扰素- γ T 细胞 ELIspot (参见实施例 14) 所测量的每 5x10⁵ 个脾细胞的斑点数量。获得一组 3 只脾的结果。肽 HBV-1 (SEQ ID NO :77) 为不相关的肽。BSA 为不相关的蛋白质。ND 表示未进行测定。
* 表示相对于适当的不相关肽或蛋白质 p 小于 0.05。

[0053] 图 10 显示人类 tau 同种型 2 (Genbank 登记号为 NP_005901) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :30)。

[0054] 发明详述

[0055] 定义及一般技术

[0056] 除非本文另有定义,否则结合本发明使用的科学及技术术语将具有那些本领域技术人员所通常了解的含义。通常,结合以下所使用的命名及关于以下的技术已为本领域所熟知且在本领域常用:本文所述的细胞及组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学及蛋白质与核酸化学、杂交、分析化学、合成有机化学、及医学与医药化学。

[0057] 除非另有说明,否则本发明方法及技术通常按照本领域技术人员所熟知的常规方法并如本说明书全文中所引用及论述的各个概括以及更具体的参考文献中所述来实施。参见,例如, Sambrook J. & Russell D. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, 第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2000) ; Ausubel 等人, *Short Protocols in Molecular Biology :A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons 公司 (2002) ; Harlow 及 Lane, *Using Antibodies :A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1998) ; 及 Coligan 等人, *Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons 公司 (2003)。酶促反应及纯化技术是按照制造商说明书、按照本领域习用方法或如本文所述实施。

[0058] 本文所用的术语“轻度认知损伤 (MCI)”是指一种记忆及认知损伤等级,其通常特征在于临床痴呆评级 (clinical dementia rating) (CDR) 为 0.5 (参见,例如 Hughes 等人, Brit. J. Psychiat. 140 :566-572, 1982), 且其另外特征在于记忆损伤,但其他认知领域的功能未出现损伤。记忆损伤优选使用诸如“段落测试 (paragraph test)”等测试来测量。诊断为轻度认知损伤的患者通常呈现受损且延迟的回忆表现。轻度认知损伤通常与衰老有关,且通常发生于 45 周岁或更大年龄的患者。

[0059] 本文所用的术语“痴呆”在其最广泛意义上是指一种精神病的病状,如美国精神病学学会 (American Psychiatric Association) :Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 第 4 版, Washington, D. C., 1994 (“DSM-IV”) 中所定义。DSM-IV 将“痴呆”定义为特征在于包括记忆损伤在内的多种认知缺陷,且按照推测的病因列出各种痴呆。DSM-IV 阐述通常可接受的用于痴呆及相关精神损伤的诊断、分级及治疗的标准。

[0060] 术语“Tau”或“tau 蛋白”是指与神经细胞中微管的稳定化有关的 tau 蛋白及广泛的 tau 聚集体 (例如,神经原纤维缠结) 的组份。具体而言,本文所用的术语“tau 蛋白”涵盖任何多肽,该多肽包含 SEQ ID NO :30 的人类 tau、或经修饰或未经修饰的其他人类同种型、或来自任何其他动物的对应直向同源物 (ortholog), 或者由上述所组成。本文所用的术语“tau 蛋白”进一步涵盖转译后修饰,包括但不限于对如上文所定义 tau 蛋白的糖基化、乙酰化及磷酸化。

[0061] 术语“Tau 病变”是指 tau 相关的病症或病状,例如,阿尔茨海默病、进行性核上麻痹 (PSP)、皮质基底节变性 (CBD)、皮克病、与染色体 17 有关的额颞痴呆及帕金森病 (FTDP-17)、帕金森病、中风、外伤性脑损伤、轻度认知损伤及诸如此类。

[0062] 术语“抗原”与“免疫原”在本文中可互换使用,其是指由 MHC 分子呈递的能够与抗体、B 细胞受体 (BCR) 或 T 细胞受体 (TCR) 结合的分子。本文所用的术语“抗原”及“免疫原”还涵盖 T 细胞表位。另外,抗原能够被免疫系统识别和 / 或能够诱导体液免疫应答和 / 或细胞免疫应答,导致 B- 淋巴细胞和 / 或 T- 淋巴细胞激活。然而,至少在某些情形下,这可能需要抗原含有或连接至 T 辅助细胞表位并提供抗原一种佐剂。抗原可具有一或多种表位 (例如, B- 表位及 T- 表位)。上文提及的特异性反应意在表明,抗原优选与其对应的抗体或 TCR 反应 (通常以高度选择性方式), 且不与可能由其他抗原诱发的大量其他抗体或 TCR 反应。本文所用的抗原还可以为数种单一抗原的混合物。术语“抗原”及“免疫原”均涵盖 (但不限于) 多肽。

[0063] 术语“抗原位点”与术语“抗原表位”在本文中可互换使用,其是指多肽的可被抗体或 T 细胞受体 (在 MHC 分子的情况下) 免疫特异性地结合连续或不连续部分。免疫特异性结合排除非特异性结合,但不一定排除交叉反应性。抗原位点通常在该抗原位点所特有的空间构象中包含 5 至 10 个氨基酸。

[0064] 就氨基酸残基而言,本文所用的术语“磷酸化”是指在原本通常存在羟基的残基侧链上存在磷酸酯基团。所述磷酸化通常以羟基的氢原子被磷酸酯基团 ($-PO_3H_2$) 取代的形式发生。本领域技术人员认识到,基于局部环境的 pH, 此磷酸酯基团可以不带电荷的中性基团 ($-PO_3H_2$)、或带一个负电荷 ($-PO_3H$)、或带两个负电荷 ($-PO_3^{2-}$) 的形式存在。通常可被磷酸化的氨基酸残基包括丝氨酸、苏氨酸及酪氨酸侧链。在本发明全文中,磷酸化的氨基酸残基以粗体表示并标以下划线。

[0065] 如本文所用,以单字母或三字母代码来表示提及的氨基酸残基(参见,例如 Lehninger, Biochemistry, 第 2 版, Worth Publishers, New York, 1975, 第 72 页)。

[0066] 冠词“一”(a 及 an) 在本文中用以指一个或一个以上(即指至少一个)的该冠词的语法对象。例如,“一元件”意指一个元件或一个以上的元件。此外,除非上下文另有需要,否则单数形式应包括复数,且复数形式应包括单数,除非本文另外明确说明。

[0067] 术语“肽”或“多肽”是指氨基酸的聚合物且不考虑聚合物的长度;因此,蛋白质片段、寡肽及蛋白质均涵盖于肽或多肽的定义之内。此术语也未指定或排除多肽的表达后修饰,例如,术语多肽明确地涵盖包括糖基、乙酰基、磷酸酯基团、脂质基团及诸如此类的共价附着的多肽。此定义也包括含有一或多种氨基酸类似物(包括,例如,非天然存在的氨基酸、仅天然存在于不相关生物系统中的氨基酸、来自哺乳动物系统的经修饰氨基酸等)的多肽、具有经取代键以及本领域技术人员熟知的其他修饰(包括天然存在及非天然存在的)的多肽。

[0068] 本文所用的术语“tau 片段”涵盖包含本文所定义 tau 蛋白的至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个邻接氨基酸或由其组成的任何多肽。

[0069] 本文所用的术语“pSer-396 磷酸-tau 表位”是指包含氨基酸序列 K **S** P(即人类 tau 序列的 Lys-395Ser-396Pro-397) 的肽,其中丝氨酸残基经磷酸化,且其中序列编号是基于 SEQ ID NO :30 所提供的人类 tau 同种型 2。pSer-396 磷酸-tau 表位的长度通常为约 3 个至约 25 个氨基酸。

[0070] 本文所用的术语“pThr-231/pSer-235 磷酸-tau 表位”是指包含氨基酸序列 **T** PPK **S** (SEQ ID NO :1) (即人类 tau 序列的 Thr-231Pro-232Pro-233Lys-234Ser-235) 的肽,其中苏氨酸及丝氨酸残基各自经磷酸化,且其中序列编号是基于 SEQ ID NO :30 提供的人类 tau 同种型 2。这些表位的长度通常为约 5 个至约 25 个氨基酸。所述 pThr-231/pSer-235 磷酸-tau 表位也可指该表位的包含磷酸化 Thr-231 残基但不包括磷酸化 Ser-235 残基或包含磷酸化 Ser-235 残基但不包括磷酸化 Thr-231 表位的形式。该表位的这些形式的长度通常为约 3 个至约 20 个氨基酸。

[0071] 本文所用的术语“pThr-212/pSer-214 磷酸-tau 表位”是指包含氨基酸序列 **T** P **S** (即人类 tau 序列的 Thr-212Pro-213Ser-214) 的肽,其中苏氨酸及丝氨酸残基各自经磷酸化,且其中序列编号是基于 SEQ ID NO :30 提供的人类 tau 同种型 2。pThr-212/pSer-214 磷酸-tau 表位的长度通常为约 3 个至约 25 个氨基酸。

[0072] 本文所用的术语“pSer-202/pThr-205 磷酸-tau 表位”是指包含氨基酸序列 **S** PG **T** (SEQ ID NO :3) (即人类 tau 序列的 Ser-202Pro-203Gly-204Thr-205) 的肽,其中丝氨酸及苏氨酸残基各自经磷酸化,且其中序列编号是基于 SEQ ID NO :30 提供的人类 tau 同种型 2。pSer-202/pThr-205 磷酸-tau 表位的长度通常为约 4 个至约 25 个氨基酸。

[0073] 本文所用的术语“纯化”及“分离”为同义词。例如,就多肽而言,术语“分离”或“纯化”根据起源或衍生源是指如下多肽:(1) 不与在其天然状态下伴随其的天然结合组份相结合;(2) 基本上不含来自相同物种的其他蛋白质;(3) 由来自不同物种的细胞表达;或(4) 在天然状态下不存在。因此,经化学合成或在不同于多肽天然起源的细胞的细胞系统中

合成的多肽是与其天然结合组份“分离”的。还可使用本领域技术人员所熟知的蛋白质纯化技术通过分离使多肽基本上不含天然结合组份。当至少约 60% 至 75% 的试样呈现单一种类的多肽时,多肽为“基本上纯净”、“基本上均质”或“基本上纯化”。多肽可以为单体或聚合物。基本上纯净的多肽通常可占蛋白质试样的约 50%、60%、70%、80% 或 90% w/w,更通常约 95%,且优选地可为 99% 以上纯净。蛋白质纯度或均质性可由本领域熟知的多种方式来展现,例如进行蛋白质试样的聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后在用本领域熟知染色剂染色凝胶后目测单个多肽条带。出于某些目的,可通过使用 HPLC 或本领域熟知的其他方式进行纯化来提供更高的分辨率。

[0074] 本文所用的术语 tau 相关神经学病症意指 tau(尤其 tau 的高度磷酸化形式)被认为起作用的任何疾病或其他病状。所述病症、疾病和 / 或病状通常与存在神经原纤维缠结(通常涉及 tau 的高度磷酸化形式)有关,且包括(但不限于)阿尔茨海默病、MCI、额颞痴呆、皮克病、进行性核上麻痹、皮质基底节变性、关岛型帕金森病-痴呆综合症及其他 tau 病变。

[0075] 本文所用的术语“抗原性 tau 肽”涵盖所有 tau 衍生多肽,例如来自哺乳动物物种,例如来自人类,以及其呈现“抗原性 tau 肽生物活性”的变体、类似物、直向同源物、同源物及衍生物、及其片段。例如,术语“抗原性 tau 肽”是指包含选自 SEQ ID NO:1 至 26、31 至 76、及 105-122 的氨基酸序列、由这些氨基酸序列组成或基本上由这些氨基酸序列组成的多肽、以及其呈现基本上相同生物活性的变体、同源物及衍生物。

[0076] 本文所用的术语“抗原性 tau 肽生物活性”是指本发明抗原性 tau 肽在个体中诱导具有拮抗性质的自身 tau 抗体的能力,所述自身抗体能够降低高度磷酸化的致病形式的 tau 的含量,同时基本上不能够结合正常的非高度磷酸化、非致病形式的 tau。此外,可对具有抗原性 tau 肽生物活性的抗原性 tau 肽进行设计以使施用至患者后 tau 特异性 T 细胞应答降低至最低程度。本领域技术人员应明了可使用何种技术来证实特定构建体是否在本发明范围内。这些技术包括(但不限于)本发明实施例部分中所述的技术以及以下技术。可对具有推定抗原性 tau 肽生物活性的肽进行分析以确定该肽的免疫原性(例如,确定由推定肽产生的抗血清是否结合高度磷酸化形式的 tau,而基本上不结合非高度磷酸化、非致病形式的 tau)。此外,可对具有推定抗原性 tau 肽生物活性的肽进行分析以确定该肽是否实质上诱导 tau 特异性 T 细胞介导的应答。

[0077] 本文所用的术语“高度磷酸化”或“异常磷酸化”是指每个 tau 分子含有至少约 7 个(即约 7 个或更多个)磷酸酯基团的 tau(参见,例如 Kopke 等人, J. Biol Chem 268: 24374-84(1993))。高度磷酸化 tau 是发现于 AD 患者中的神经原纤维缠结(NFT)及成对螺旋纤维(PHF)的主要组份,且高度磷酸化是造成 tau 的正常生物活性丧失及自聚集的原因。一些 tau 残基通常仅在其致病的高度磷酸化形式(例如 PHF 及 NFT)中被发现为磷酸化。这些残基包括 Ser-202、Thr-205、Thr-212、Ser-214、Thr-231、Ser-235、Ser-396 和 / 或 Ser-404、Tyr-18。因此,在通常不参与 tau 与微管的结合的多个位点上、尤其在 tau 的微管结合区域两侧的脯氨酸富集区域中发现的位点上磷酸化且包含 PHF 及 NFT 的主要组份的 tau 蛋白也涵盖于术语高度磷酸化 tau 或异常磷酸化 tau 的范围内。

[0078] 抗原性 tau 肽

[0079] 人类 tau 蛋白是微管相关蛋白,其在中枢神经系统的神经元中相对富集,但在其

他区域中并不常见。在脑组织中,作为 tau 基因的外显子 2、3 及 10 的可变剪接的结果,tau 以六种不同同种型存在。对于本发明的所有 tau 肽,人类 tau 同种型 2(SEQ ID NO:30) 在本文中被用作氨基酸编号的参考。Tau 通常与微管蛋白相互作用以稳定微管并促进微管蛋白组装成微管,以及提供蛋白质的轴突运输。Tau 是由发育调控的磷蛋白,在成人脑中在正常状态下通常每个分子含有 2 个至 3 个磷酸酯基团。然而,tau 可在多于 30 个不同残基处、主要在 Ser/Thr-Pro 基序处经不同激酶短暂磷酸化 (Hanger 等人, J. Neurochem. 71: 2465-2476 (1998))。

[0080] 本发明的抗原性 tau 肽通常具有较小大小,由此他们模拟了选自整个 tau 蛋白的区域,在其中发现了致病形式的 tau 中的表位。如先前所述,此类致病形式的 tau 通常特征在于 tau 蛋白内某些氨基酸处经磷酸化。因此,本发明的抗原性 tau 肽的长度通常小于 100 个氨基酸,例如小于 75 个氨基酸,例如小于 50 个氨基酸。本发明的抗原性 tau 肽的长度通常为约 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或约 30 个氨基酸。序列表中提供的本发明抗原性 tau 肽的具体实施例包括长度介于 4 个至 31 个氨基酸范围内的肽。本领域技术人员应明了,此类抗原肽通常具有游离 N 端,且可具有羧基化或酰胺化的 C 端。

[0081] 本发明的抗原肽包含衍生自高度磷酸化或致病形式的人类 tau 的一部分的氨基酸序列。具体而言,此类抗原性 tau 肽通常包含特异性磷酸 -tau 表位,其在文献中可参考结合此类表位的抗体而提及 (例如 PHF1、TG3、AT8 和 / 或 AT100; 参见,例如 Hanger 等人, J. Biol. Chem. 282 (32): 23645-23654 (2007); Pennanen 等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. 337: 1097-1101 (2005); Porzig 等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. 358: 644-649 (2007))。

[0082] 本发明已识别出人类 tau 蛋白的特异性抗原区,当单独或彼此组合使用时其可有利地用于引发针对致病形式的高度磷酸化 tau 的免疫应答。例如, pSer-396 磷酸 -tau 表位通常为包括磷酸化丝氨酸残基 Ser-396 的人类 tau 片段。此类片段的长度通常为约 3 个至约 20 个氨基酸 (例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个),且在 Ser-396 的 N 端及 C 端侧包括至少一个来自天然人类 tau 序列的氨基酸。例如, pSer-396 磷酸 -tau 表位通常包含如 SEQ ID NO:30 中所示人类 tau 序列的残基 395、396 及 397 (即 Lys-395Ser-396Pro-397, 其中 Ser-396 经磷酸化)。这些 pSer-396 表位还可进一步包含天然人类序列的磷酸化丝氨酸残基 Ser-404。包含 pSer-396 磷酸 -tau 表位的 tau 肽的实例以 SEQ ID NO:4 及 6-13 提供。

[0083] 此外,例如, pThr-231/pSer-235 磷酸 -tau 表位通常是包括磷酸化苏氨酸残基 Thr-231 及磷酸化丝氨酸残基 Ser-235 二者的人类 tau 片段。或者, pThr-231/pSer-235 磷酸 -tau 表位仅包括 Thr-231 或 Ser-235 之一。此类表位的长度通常为约 3 个至约 20 个氨基酸 (例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个),且在 Thr-231 的 N 端侧包括至少一个来自天然人类 tau 序列的氨基酸 (即 Arg-230) 和 / 或在 Ser-235 的 C 端侧包括至少一个氨基酸 (即 Pro-236)。包含 pThr-231/pSer-235 表位的 tau 肽的实例以 SEQ ID NO:14-19 提供。

[0084] 此外,例如, pThr-212/pSer-214 磷酸 -tau 表位通常为包括磷酸化苏氨酸残基 Thr-212 及磷酸化丝氨酸残基 Ser-214 的人类 tau 片段。此类表位的长度通常为约 3 个

至约 20 个氨基酸（例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个），且在 Thr-212 的 N 端侧包括至少一个来自天然人类 tau 序列的氨基酸（即 Arg-211）及在 Ser-214 的 C 端侧包括至少一个氨基酸（即 Leu-215）。包含 pThr-212/pSer-214 表位的 tau 肽的实例以 SEQ ID NO:20-24 提供。

[0085] 此外，例如，pSer-202/pThr-205 磷酸-tau 表位通常为包括磷酸化丝氨酸残基 Ser-202 及磷酸化苏氨酸残基 Thr-205 的人类 tau 片段。此类表位的长度通常为约 6 个至约 20 个氨基酸（例如 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个），且在 Ser-202 的 N 端侧通常包括至少一个来自天然人类 tau 序列的氨基酸（即 Gly-201）及在 Thr-205 的 C 端侧包括至少一个氨基酸（即 Pro-206）。包含 pSer-202/pThr-205 表位的 tau 肽的实例以 SEQ ID NO:25 提供。

[0086] 此外，例如，pTyr-18 磷酸-tau 表位通常为包括磷酸化酪氨酸残基 Tyr-18 的人类 tau 片段。此类表位的长度通常为约 6 个至约 20 个氨基酸（例如 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个），且在 Tyr-18 的 N 端侧通常包括至少一个来自天然人类 tau 序列的氨基酸（即 Thr-17）及在 Tyr-18 的 C 端侧包括至少一个氨基酸（即 Gly-19）。包含 pTyr-18 表位的 tau 肽的实例以 SEQ ID NO:112 提供。

[0087] 本发明的抗原性 tau 肽还可包括包含上文所述磷酸-tau 表位的 tau 肽，包括少数氨基酸已经取代、添加或缺失但基本上仍保留相同免疫特性的肽。另外，此类衍生的抗原性 tau 肽可进一步经氨基酸修饰，尤其在 N 端及 C 末端，以使抗原性 tau 肽在构象上受局限和 / 或使抗原性 tau 肽与免疫原性载体在实施适当化学处理后偶合。

[0088] 本发明的抗原性 tau 肽还涵盖衍生自氨基酸已经缺失、插入或取代但其免疫特性基本上未减弱的 tau 的氨基酸序列的功能活性变体肽，即此类功能变体肽保留实质的抗原性 tau 肽生物活性。通常，此类功能变体肽与任何 SEQ ID NO:1 至 26、31 至 76 及 105-122 中所述的氨基酸序列具有氨基酸序列同源性，优选高度同源性。

[0089] 在一个方面中，所述功能活性变体肽呈现与选自 SEQ ID NO:1 至 26、31 至 76 及 105-122 组成的组的氨基酸序列至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的一致性。

[0090] 多肽的氨基酸序列一致性可使用诸如 Bestfit、FASTA 或 BLAST 等公知的计算机程序以常规方式来确定（参见，例如 Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98(1990)；Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219(2000)；Altschul 等人, *J. Mol. Biol.* 215:403-410(1990)；Altschul 等人, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402(1997)）。当使用 Bestfit 或任何其他序列比对程序来确定特定序列是否与参考氨基酸序列（例如）95% 一致时，可设置参数以在参考氨基酸序列的全长范围内计算一致性百分比，且容许引入占参考序列中的全部氨基酸残基高达 5% 的同源性空位 (gap)。此上文提及的确定多肽间一致性百分比的方法可适用于本文所公开的所有蛋白质、其片段或变体。

[0091] 功能活性变体包含天然存在的功能活性变体，例如等位基因变体及种类变体 (species variant)；以及可通过例如诱变技术或通过直接合成来制备的非天然存在的功能活性变体。

[0092] 功能活性变体与 SEQ ID NO:1 至 26 及 31 至 76 中所示的任一种肽相差约例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基，但仍保留抗原 tau 生物活性。当此种比较需要进行

比对时,可针对最大同源性对序列进行比对。变化位点可位于肽中的任何地方,只要生物活性与任何 SEQ ID NO :1 至 26、31 至 76 及 105-122 中所示的肽基本上类似即可。

[0093] 关于如何实施表型沉默氨基酸取代的指导在 Bowie 等人, *Science*, 247 : 1306-1310 (1990) 中有提供,该文献指出,主要有两种策略用于研究氨基酸序列对变化的耐受性。

[0094] 第一种策略利用进化过程期间自然选择的氨基酸取代耐受性。通过比较不同物种中的氨基酸序列,可识别在各物种间保守的氨基酸位置。此类保守氨基酸对于蛋白质功能可能非常重要。相比之下,自然选择耐受的取代所处的氨基酸位置表示对于蛋白质功能并不重要的位置。因此,可对耐受氨基酸取代的位置进行修饰,同时仍保留经修饰肽的特定免疫原性活性。

[0095] 第二种策略利用基因工程在克隆基因的特定位置上引入氨基酸变化以识别对于蛋白质功能极为重要的区域。例如,可利用定点诱变或丙氨酸扫描诱变 (Cunningham 等人, *Science*, 244 :1081-1085 (1989))。随后可针对特定抗原 tau 生物活性对所得变体肽进行测试。

[0096] 按照 Bowie 等人,所述两种策略揭示蛋白质对于氨基酸取代令人惊奇地耐受。作者进一步指出在蛋白质中的某些氨基酸位置上何种氨基酸变化可能是许可的。例如,最隐匿或最内部(在蛋白质的三级结构中)的氨基酸残基需要非极性侧链,然而很少表面或外部侧链特征通常是保守的。

[0097] 向蛋白质的氨基酸中引入突变的方法已为本领域技术人员所熟知(参见,例如, Ausubel(编辑), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons 公司 (1994); T. Maniatis, E. F. Fritsch 及 J. Sambrook, *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989))。

[0098] 还可使用诸如“QuikChange™ 定点诱变试剂盒”(Stratagene) 等市售试剂盒来引入突变。本领域技术人员能够通过替代不显著影响抗原性 tau 肽的功能的氨基酸来制备该抗原性 tau 肽的功能活性变体。保守氨基酸取代是可在本发明肽之一中实施的一种氨基酸取代。“保守氨基酸取代”为其中一氨基酸残基由另一具有有着相似化学特性(例如,电荷或疏水性)的侧链 R 基团的氨基酸残基所取代的取代。通常,保守氨基酸取代不会实质改变蛋白质的功能特性。在其中两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情形下,可上调百分比序列一致性或相似度以校正取代的保守性质。用于进行此调整的方法已为本领域技术人员所熟知(参见例如, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243 :307-31 (1994))。

[0099] 具有有着相似化学特性侧链的各组氨基酸的实例包括:1) 脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸;2) 脂肪族羟基侧链:丝氨酸及苏氨酸;3) 含酰胺侧链:天冬酰胺及谷氨酰胺;4) 芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸;5) 碱性侧链:赖氨酸、精氨酸及组氨酸;6) 酸性侧链:天冬氨酸及谷氨酸;以及 7) 含硫侧链:半胱氨酸及甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代基团为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸及天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0100] 或者,保守替代是 Gonnet 等人, *Science* 256 :1443-45 (1992) 中公开的 PAM250 对数相似度矩阵中具有正值的任何改变。“中度保守”替代是在 PAM250 对数相似度矩阵中具有非负值的任何改变。

[0101] 功能活性变体肽还可使用杂交技术进行分离。简言之,使用与编码目标肽、多肽或蛋白质(例如 SEQ ID NO:1 至 26、31 至 76 及 105-122)的完整或部份核酸序列具有高度同源性的 DNA 来制备功能活性肽。因此,本发明的抗原性 tau 肽还包括与任何 SEQ ID NO:1 至 26 及 31 至 76 具同等功能且可由与编码任何 SEQ ID NO:1 至 26、31 至 76 及 105-122 的核酸杂交的核酸分子编码的肽、或其互补序列。本领域技术人员可使用容易获得的密码子列表很容易即可决定编码本文所公开肽的核酸序列。因此,本文中并未提供此类核酸序列。

[0102] 编码功能活性变体的肽、多肽或蛋白质的核酸的杂交严格性例如为 10% 甲酰胺、5×SSPE、1×Denhart 溶液及 1× 鲑鱼精子 DNA(低度严格条件)。更优选条件为 25% 甲酰胺、5×SSPE、1×Denhart 溶液及 1× 鲑鱼精子 DNA(中度严格条件),更优选的条件为 50% 甲酰胺、5×SSPE、1×Denhart 溶液及 1× 鲑鱼精子 DNA(高度严格条件)。然而,除上述甲酰胺浓度外,数种因素会影响杂交严格性,且本领域技术人员可适当地选择此类因素以实现类似的严格性。

[0103] 编码功能活性变体的核酸分子还可使用编码目标肽、多肽或蛋白质的核酸分子 DNA 的一部分(例如任何 SEQ ID NO:1 至 26、31 至 76 及 105-122 中所示的肽)作为探针,通过基因扩增方法(例如 PCR)分离。

[0104] 肽/蛋白质的制备

[0105] 本发明多肽可衍生自天然来源及自哺乳动物分离得到,所述哺乳动物(例如)为人类、灵长类动物、猫、狗、马、小鼠或大鼠。因此,本发明多肽可使用标准蛋白质纯化技术自细胞或组织来源分离得到。

[0106] 或者,多肽可由化学方式合成或使用重组 DNA 技术制备。例如,本发明多肽(例如 tau 片段)可通过本领域技术人员所熟知的固相程序合成。可使用“T-boc”或“F-moc”程序来适当地合成。环肽可使用熟知的“F-moc”程序及聚酰胺树脂在全自动设备中通过固相方法来合成。或者,本领域技术人员应了解手动实施此过程所需要的实验室程序。固相合成的技术及程序阐述于 Solid Phase Peptide Synthesis :A Practical Approach, E. Atherton 及 R. C. Sheppard, 由 IRL 在 Oxford University Press 出版(1989); 以及 Methods in Molecular Biology, 第 35 卷:肽合成方案(M. W. Pennington 及 B. M. Dunn 编辑), 第 7 章, 第 91-171 页, D. Andreau 等人著。

[0107] 或者,可使用本领域技术人员所熟知的技术将编码本发明多肽的多核苷酸引入至可在适宜的表达系统中表达的表达载体中,随后分离或纯化所表达的目标多肽。本领域可得到各种细菌、酵母、植物、哺乳动物及昆虫表达系统,且可使用任何所述的表达系统。任选地,可在无细胞翻译系统中翻译编码本发明多肽的多核苷酸。

[0108] 本发明的抗原性 tau 肽还可包含由于存在多种基因、选择性转录事件、选择性 RNA 剪接事件及选择性翻译及翻译后事件而产生者。多肽可在以下系统中表达:获得的翻译后修饰与在天然细胞中表达多肽时所存在的基本上相同的系统,例如培养的细胞;或导致在天然细胞中表达时存在的翻译后修饰(例如糖基化或裂解)改变或删除的系统。

[0109] 本发明多肽(例如抗原 tau 多肽)可以含有其他非 tau 或非 tau 衍生氨基酸序列的融合蛋白形式来制备,此类其他非 tau 或非 tau 衍生氨基酸序列例如为本文所述的氨基酸接头或信号序列或免疫原性载体、以及可用于蛋白质纯化的配体,例如谷胱甘肽-S-转移酶、组氨酸标签及葡萄球菌蛋白质 A。融合蛋白中可存在不止一种本发明抗原 tau 多肽。

例如,可将异源多肽融合至本发明多肽的 N 端或 C 端。本发明多肽还可以包含同源氨基酸序列(即,其他 tau 或 tau 衍生序列)的融合多肽形式来制备。

[0110] 受局限的肽

[0111] 本发明的抗原性 tau 肽可以是线性的或在构象上受局限的。如本文所用,就分子而言,术语“构象上受局限”意指随时间流逝分子(例如多肽)的三维结构基本上保持一种空间排列。构象上受局限的分子可具有改良特性,例如增强的亲和性、免疫原性、代谢稳定性、膜通透性或溶解性。另外,预期此类构象上受局限的分子会以与天然构象类似的构象提供抗原 tau 表位,由此诱导更易识别自身 tau 分子的抗-tau 抗体。构象局限方法已为本领域技术人员所熟知,且包括(但不限于)桥连及环化。

[0112] 现有技术中已知数种向线性肽或多肽链中引入构象局限的途径。例如,使肽中的两个邻近氨基酸桥连产生局部构象修饰,与规则肽的弹性相比,其弹性有限。形成此类桥键的一些可能方式包括纳入内酰胺及六氢吡嗪酮(参见,例如 Giannis 及 Kolter, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 32:1244(1993))。

[0113] 如本文所用,就肽而言,术语“环状”是指在两个非毗邻氨基酸或氨基酸类似物之间包括分子内键的结构。环化可通过共价或非共价键来实现。分子内键包括(但不限于)骨架与骨架、侧链与骨架、侧链与侧链、侧链与端基、及端部与端部之间的键。环化方法包括(但不限于)在非毗邻氨基酸或氨基酸类似物的侧链之间形成二硫键;在 Lys 与 Asp/Glu 残基侧链之间形成酰胺键;在丝氨酸残基与 Asp/Glu 残基之间形成酯键;形成内酰胺键,例如,在一种氨基酸或其类似物的侧链基团与氨基末端残基的 N 端胺之间;及形成赖氨酸正亮氨酸及二酪氨酸键。还可使用碳形式的二硫键,例如乙烯基或乙基键(*J. Peptide Sc.* 14: 898-902(2008)),以及使用经适当多取代的亲电试剂(例如二-、三-或四卤代烷烃)实施烷基化反应(*PNAS*, 105(40), 15293-15298(2008); *ChemBioChem*, 6:821-824(2005))。还可使用经各种修饰的脯氨酸类似物来向肽中纳入构象局限(Zhang 等人, *J. Med. Chem.*, 39: 2738-2744(1996); Pfeifer 及 Robinson, *Chem. Comm.*, 1977-1978(1998))。可利用化学方式使本发明肽环化,以产生利用包括但不限于以下键环化的肽:内酰胺、脘、脞、噻唑啉、硫醚或硫键。

[0114] 设计构象受局限肽的另一途径(阐述于美国专利公开第 2004-0176283 号中)是将较短的目标氨基酸序列附着至模板上以产生环状受限肽。此类环肽不仅通过其模板在结构上保持稳定,由此提供可模仿病毒及寄生虫上的构象表位的三维构象,而且与线性肽相比其对血清中的蛋白水解降解更具抗性。美国专利公开第 2004-0176283 号进一步揭示构象受局限交联肽的合成,其通过制备骨架偶合至适当定位的氨基酸以稳定肽的超二级结构的合成氨基酸来实施。交联可通过使经正交保护的 (2S,3R)-3- 氨基脯氨酸残基的一级氨基与谷氨酸盐的适当定位的侧链羧基进行酰胺偶合来实现。已遵循该途径来制备 CS 蛋白质的构象受局限的四肽重复,其中至少一个脯氨酸由 (2S,3R)-3- 氨基脯氨酸替代,而且为引入侧链羧基,已纳入谷氨酸盐作为丙氨酸的替代。

[0115] 交联策略还包括应用 Grubbs 闭环置换反应来形成经设计以模拟 α -螺旋构象的“U 型钉(stapled)”肽(*Angew. Int. Ed. Engl.* 37:3281(1998); *JACS* 122:5891(2000));使用多官能化糖类;使用氨基羧乙基硫色氨酸(tryptathionine)键(*Chemistry Eu. J.* 24: 3404-3409(2008));以及利用迭氮化物与炔烃的“点击(click)”反应,该两种物质可以侧

链氨基酸残基纳入或位于肽序列的骨架中 (Drug Disc. Today 8(24) :1128-1137(2003))。还从文献中了解到,金属离子可通过整合与金属阳离子配位的特定残基(例如组氨酸)来稳定线性肽的受局限构象 (Angew. Int. Ed. Engl. 42 :421(2003))。类似地,可利用使用非天然酸及氨官能团或多氨及多酸官能团官能化线性肽序列、随后激活及形成酰胺键来实现环状结构。

[0116] 根据一个实施例,通过使抗原性 tau 肽的两个非毗邻氨基酸(例如 N 端及 C 端氨基酸)彼此分子内共价键合来使该抗原性 tau 肽构象受局限。根据另一实施例,通过使本发明抗原性 tau 肽共价结合至支架分子来使其构象受限。根据又一实施例,抗原性 tau 简单受局限,即在一端(C 端或 N 端)或通过不位于任一端的另一氨基酸偶合至支架分子。根据再一实施例,抗原性 tau 肽双重受限,即 C 端及 N 端均偶合至支架分子。

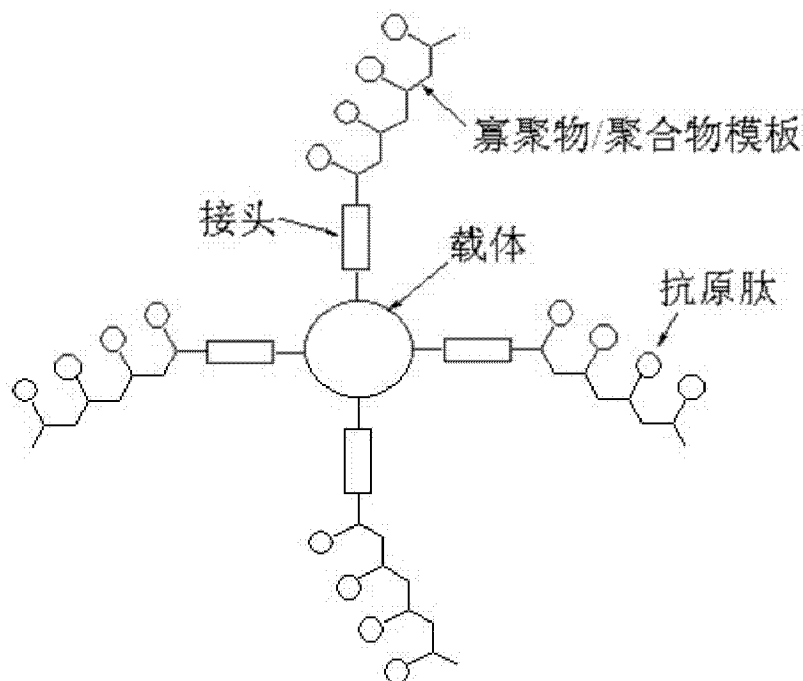
[0117] 支架(也称为“平台(platform)”)可以是能够通过共价键合来减少抗原性 tau 肽可呈现的构象数量的任何分子。构象受局限支架的实例包括蛋白质及肽,例如脂质运载蛋白相关分子,例如含有 β -桶的硫氧还蛋白及硫氧还蛋白样蛋白质、核酸酶(例如 RNaseA)、蛋白酶(例如胰蛋白酶)、蛋白酶抑制剂(例如水蛭抑制剂(eglin)C)、抗体或其结构刚性片段、荧光蛋白(例如 GFP 或 YFP)、芋螺毒素(conotoxin)、纤维连接蛋白 III 型结构域的环区域、CTLA-4 及病毒样颗粒(VLP)。

[0118] 其他适宜平台分子包括碳水化合物,例如琼脂糖。平台可为线性分子或例如闭合形成环的环形分子。平台通常与抗原性 tau 肽异源。与线性肽相比此类连接至平台的构象受限肽据认为对蛋白水解降解更具抗性。

[0119] 根据一个实施例,支架是如本发明中所定义的免疫原性载体,例如异源载体蛋白或 VLP。在另一实施例中,抗原性 tau 肽简单受限至免疫原性载体上。在又一实施例中,抗原性 tau 肽双重受限至免疫原性载体上。以此方式,抗原性 tau 肽形成构象受局限的环结构,已证实其为细胞内识别分子的特别适宜的结构。

[0120] 可对本发明的抗原性 tau 肽进行修饰以便于偶联至平台上,例如通过在一端或两端添加末端半胱氨酸和/或通过添加接头序列,例如双甘氨酸头或尾、以赖氨酸残基封端的接头、或本领域技术人员所熟知的可实施此功能的任何其他接头。还可利用生物正交化学(Bioorthogonal chemistry)(例如上文所述的点击反应)将完整的肽序列偶合至载体上,由此避免任何区域化学及化学选择性问题。已知刚性接头(例如阐述于 Jones 等人, (Angew. Chem. Int. Ed. 2002, 41 :4241-4244) 中的)可引发改善的免疫应答,而且也可使用。在又一实施例中,使抗原性 tau 肽附着至多价模板上,其本身偶合至载体上,由此增加抗原密度(见下文)。多价模板可为适当官能化的聚合物或寡聚物,例如(但不限于)寡聚谷氨酸盐或壳寡糖(oligochitosan)。

[0121]



[0122] 所述接头可位于肽的N端、或位于肽的C端、或位于肽的两端。所述接头的长度可为0至10个氨基酸,例如0至6个氨基酸。或者,可添加或取代一或多个氨基酸的D-立体异构体形式以产生有益的衍生物,例如以增强肽的稳定性。

[0123] 下文提供使用各种接头的示例性偶联组合(所有均在本发明范围内且构成各个实施例):

[0124] 肽-GGGGC(SEQ ID NO:79)-支架;肽-GGGC(SEQ ID NO:80)-支架;肽-GGC(SEQ ID NO:81)-支架;肽-GC-支架;肽-GC-支架;肽-C-支架;肽-GGGGK(SEQ ID NO:82);肽-GGGK(SEQ ID NO:83)

[0125] 肽-GGGK(SEQ ID NO:84);肽-GGK;肽-GK;肽-K;肽-GGGSC(SEQ IDNO:85);肽-GGGSC(SEQ ID NO:86);肽-GGSC(SEQ ID NO:87);肽-GSC;肽-SC;肽-GGGC(SEQ ID NO:80);肽-GGGC(SEQ ID NO:81);肽-GGC;肽-GC;CSGGG(SEQ ID NO:88)-肽;CSGGG(SEQ ID NO:89)-肽;CSGG(SEQ ID NO:90)-肽;CSG-肽;CS-肽;CGGGG(SEQ ID NO:91)-肽;CGGG(SEQ ID NO:92)-肽;CGG-肽;CG-肽

[0126] 下文提供使用各种接头及双重受限肽的示例性偶联组合,其中载体可为一致的载体单体或差异的载体单体。在下文实施例中,GC接头可由上文所示例的GK接头或GSC接头中的任一者或本领域技术人员所熟知的任何其他接头取代:

[0127] 载体-CGGGG(SEQ ID NO:93)-肽-GGGGC(SEQ ID NO:79)-载体;载体-CGGGG(SEQ ID NO:91)-肽-GGGC(SEQ ID NO:80)-载体;载体-CGGG(SEQ ID NO:92)-肽-GGGC(SEQ ID NO:81)-载体;载体-CG-肽-GC-载体;载体-C-肽-C-载体

[0128] 在一个实施例中,将末端半胱氨酸残基(若先前未存在于抗原性tau肽的氨基酸序列中)添加至包含SEQ ID NO:1至26中所示序列中的任一者或由其组成的抗原性tau肽的一端或两端以产生构象受限的肽。

[0129] 在另一实施例中,将包含可变数量的甘氨酸残基及一个末端半胱氨酸残基的GC接头添加至包含SEQ ID NO:1至26中所示序列中的任一者或由其组成的抗原性tau肽的

一端或两端以产生构象受限的肽。优选地,GC 接头包含 1 至 10 个甘氨酸残基,更优选地,包含 1、2、3、4 或 5 个甘氨酸残基。

[0130] 在再一实施例中,将包含可变数量的甘氨酸残基及一个末端半胱氨酸残基的 GC 接头添加至包含 SEQ ID NO:1 至 26 中所示序列中的任一者或由其组成的抗原性 tau 肽的一端,并将末端半胱氨酸残基(若先前未存在于抗原性 tau 肽的另一端)添加至抗原性 tau 肽的另一端。优选地,GC 接头包含 1 至 10 个甘氨酸残基,更优选地,包含 1、2、3、4 或 5 个甘氨酸残基。免疫原性载体

[0131] 在本发明的一个实施例中,将本发明的抗原性 tau 肽或多肽连接至免疫原性载体分子以形成供疫苗接种方案用的免疫原。术语“免疫原性载体”在本文中包括以下物质:具有独立地在宿主动物中引发免疫原性应答的特性,且可连接(例如共价偶合)至肽、多肽或蛋白质,此连接是直接经由在肽、多肽或蛋白质的游离羧基、氨基或羟基与免疫原性载体物质的对应基团之间形成肽或酯键,或另一选择为通过经常用双功能连接基团或以融合蛋白形式键合。

[0132] 本领域技术人员可容易地获知用于本发明免疫原中的载体类型。此类免疫原性载体的实例有:病毒样颗粒(VLP);血清白蛋白,例如牛血清白蛋白(BSA);球蛋白;甲状腺球蛋白;血红蛋白;血蓝蛋白(尤其钥孔血蓝蛋白(KLH));提取自蛔虫的蛋白质;失活细菌毒素或类毒素,例如破伤风或白喉毒素(TT 及 DT)或 CRM197;结核菌素的纯化蛋白质衍生物(PPD);或来自流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)的蛋白质 D(PCT 公开第 W091/18926 号)或其重组片段(例如,TT 的片段 C 的结构域 1、或 DT 的易位结构域、或包含流感嗜血菌蛋白质 D 的 N 端 100 个至 110 个氨基酸的 1/3 蛋白质 D(GB 9717953.5));聚赖氨酸;聚谷氨酸;赖氨酸-谷氨酸共聚物;含有赖氨酸或鸟氨酸的共聚物;脂质体载体等。

[0133] 在一个实施例中,免疫原性载体为 KLH。在另一实施例中,免疫原性载体为病毒样颗粒(VLP),优选为重组病毒样颗粒。

[0134] 本文所用的术语“病毒颗粒”是指病毒的形态形式。在一些病毒类型中,其包含由蛋白质衣壳包围的基因组;另一些病毒类型则具有其他结构,例如包膜、尾部等。

[0135] 本文所用的术语“病毒样颗粒”(VLP)是指非复制性和/或非感染性病毒颗粒,或是指与病毒颗粒类似的非复制性和/或非感染性结构,例如病毒衣壳。本文所用的术语“非复制性”是指 VLP 所包含的基因组不能复制。本文所用的术语“非感染性”是指不能进入宿主细胞。在一个实施例中,由于病毒样颗粒缺少全部病毒基因组或基因组功能或其一部分而呈现非复制性和/或非感染性。例如,病毒样颗粒是病毒基因组已经以物理方式或以化学方式失活的病毒颗粒。此外,例如,病毒样颗粒缺少病毒基因组的全部复制性及感染性组件或其一部分。病毒样颗粒可含有不同于病毒基因组的核酸。病毒样颗粒的一个实例为病毒衣壳,例如相应病毒的病毒衣壳,例如噬菌体,例如 RNA-噬菌体。术语“病毒衣壳”或“衣壳”是指由病毒蛋白亚基构成的大分子组装。例如,可有 60、120、180、240、300、360 及多于 360 个病毒蛋白亚基。此类亚基相互作用可形成具有内在重复组织结构的病毒衣壳或病毒衣壳样结构,其中该结构例如为球形或管形。

[0136] 本文所用的术语“RNA 噬菌体的病毒样颗粒”是指包含 RNA 噬菌体的外壳蛋白、其变体或片段、或基本上由其组成、或由其组成的病毒样颗粒。例如, RNA 噬菌体的病毒样颗粒可能与非复制性和/或非感染性且至少缺少编码 RNA 噬菌体复制机构的基因的 RNA 噬菌

体的结构类似,且也可缺少编码负责病毒附着至宿主或进入宿主的蛋白质的基因。然而,所述定义还应涵盖上述基因仍然存在但失活(且因此也导致产生 RNA 噬菌体的非复制性和/或非感染性病毒样颗粒)的 RNA 噬菌体的病毒样颗粒。在本发明中,术语“亚基”与“单体”在此上下文中可互换及等价使用。此外,在本发明中,术语“RNA-噬菌体(RNA-phage)”与术语“RNA-噬菌体(RNA-bacteriophage)”可互换使用。

[0137] 本发明提供用于诱导和/或增强哺乳动物中针对磷酸化 tau 的免疫应答的组合物及方法。本发明组合物可包含与至少一种抗原性 tau 肽连接的病毒样颗粒(VLP)。例如,抗原性 tau 肽可连接至 VLP 以形成有序且重复的抗原-VLP 阵列。例如,在一种情形下,至少 20 种、至少 30 种、至少 60 种、至少 120 种、至少 180 种、至少 360 种或至少 540 种本文所述肽连接至 VLP。自 RNA 噬菌体外壳蛋白的 180 个亚基的自组装形成且任选含有宿主 RNA 的衣壳结构在本文中称为“RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP”。一具体实例为 Qbeta 外壳蛋白的 VLP。在此特定情形下,Qbeta 外壳蛋白的 VLP 可仅自 Qbeta CP 亚基(由 Qbeta CP 基因的表达而产生,所述 Qbeta CP 基因含有例如通过抑制来阻止较长 A1 蛋白质的任何表达的 TAA 终止密码子,参见 Kozlovska, T. M. 等人, *Intervirology* 39:9-15(1996)) 组装,或在衣壳组装中额外含有 A1 蛋白质亚基。通常,限制衣壳组装中 Qbeta A1 蛋白质相对于 Qbeta CP 的百分比以确保衣壳形成。

[0138] 在本发明上下文中适宜作为免疫原性载体的 VLP 的实例包括(但不限于)以下衣壳蛋白:乙型肝炎病毒(Ulrich 等人, *Virus Res.* 50:141-182(1998))、麻疹病毒(Warnes 等人, *Gene* 160:173-178(1995))、辛德毕斯病毒(Sindbis virus)、轮状病毒(美国专利第 5,071,651 号及第 5,374,426 号)、口蹄疫病毒(Twomey 等人, *Vaccine* 13:1603-1610, (1995))、诺沃克病毒(Norwalk virus)(Jiang, X. 等人, *Science* 250:1580-1583(1990); Matsui, S. M. 等人, *J Clin. Invest.* 87:1456-1461(1991))、反转录病毒 GAG 蛋白质(PCT 公开案第 W096/30523 号)、反转录转座子 Ty 蛋白质 p1、乙型肝炎病毒的表面蛋白(PCT 公开案第 W0 92/11291 号)、人类乳头瘤病毒(PCT 公开案第 W0 98/15631 号)、人类多瘤病毒(Sasnauskas K. 等人, *Biol. Chem.* 380(3):381-386(1999); Sasnauskas K. 等人, *Generation of recombinant virus-like particles of different polyomaviruses in yeast*, 第 3 届国际研讨会“病毒样颗粒作为疫苗(Virus-like particles as vaccines)”, Berlin, 9 月 26 日-29 日(2001))、RNA 噬菌体、Ty、fr 噬菌体(frphage)、GA-噬菌体、AP 205-噬菌体及特别是 Qbeta-噬菌体。

[0139] 本领域技术人员应容易地明了,要用作本发明免疫原性载体的 VLP 并不限于任何特定形式。颗粒可以化学方式或通过生物过程加以合成,其可为天然的或非天然的。例如,此类型的实例包括病毒样颗粒或其重组形式。在一更具体实施例中,VLP 可包含已知形成 VLP 的任一病毒的重组多肽、或另一选择为由其组成。VLP 可进一步包含此类多肽之一或多个片段以及此类多肽的变体、或另一选择为由其组成。多肽变体与其野生型对应物在氨基酸层面上可具有例如至少 80%、85%、90%、95%、97% 或 99% 的一致性。适用于本发明的变体 VLP 可衍生自任何生物体,只要其能够形成“病毒样颗粒”且可用作本发明所定义的“免疫原性载体”即可。

[0140] 优选的本发明 VLP 包括 HBV 的衣壳蛋白或核心及表面抗原(分别为 HBcAg 及 HBsAg) 或其重组蛋白质或片段、及 RNA-噬菌体的外壳蛋白或其重组蛋白质或片段,更优选

地, Qbeta 的外壳蛋白或其重组蛋白质或片段。在一个实施例中, 与本发明抗原性 tau 肽组合使用的免疫原性载体为 HBcAg 蛋白质。本领域技术人员可容易地确定可用于本发明上下文中的 HBcAg 蛋白质的实例。实例包括 (但不限于) 阐述于以下文献中的 HBV 核心蛋白质: Yuan 等人, *J. Virol.* 73:10122-10128 (1999); 及 PCT 公开第 WO 00/198333 号、第 WO 00/177158 号、第 WO 00/214478 号、第 WO 00/32227 号、第 WO 01/85208 号、第 WO 02/056905 号、第 WO 03/024480 号及第 W003/024481 号。适用于本发明的 HBcAg 可衍生自任何生物体, 只要其能够形成“病毒样颗粒”且可用作本发明所定义的“免疫原性载体”即可。

[0141] 可用于本发明上下文中的特别感兴趣的 HBcAg 变体是其中一或多个天然存在的半胱氨酸残基已经缺失或取代的变体。本领域技术人员已熟知, 游离半胱氨酸残基可参与诸多化学副反应, 包括二硫化物交换、与例如注射或形成于与其他物质的组合疗法中的化学物质或代谢物反应、或暴露于 UV 光后直接氧化及与核苷酸反应。由此可产生毒性加合物, 尤其考虑到 HBcAg 具有较强的结合核酸的趋势的事实。因此, 此类毒性加合物会分布于诸多种物质中, 其单独地可各自以低浓度存在, 但合在一起即会达到毒性含量。有鉴于此, 在疫苗组合物中使用已经修饰而移除天然存在的半胱氨酸残基的 HBcAg 的一个优点在于, 当附着抗原或抗原决定簇时毒性物质可结合非人位点数量减少或完全消除。

[0142] 另外, HBcAg 的缺少乙型肝炎核心抗原前体蛋白的 N 端前导序列的经处理形式也可用于本发明上下文中, 尤其当 HBcAg 是在不会发生处理作用的条件下产生时 (例如于细菌系统中表达)。

[0143] 本发明的其他 HBcAg 变体包括 i) 使用标准序列比较电脑算法与野生型 HBcAg 氨基酸序列之一或其子部分 (subportion) 至少 80%、85%、90%、95%、97% 或 99% 一致的多肽序列; ii) C 端截短型突变体, 包括至少 1、5、10、15、20、25、30、34 或 35 个氨基酸已经自 C 端移除的突变体; iii) N 端截短型突变体, 包括至少 1、2、5、7、9、10、12、14、15 或 17 个氨基酸已经自 N 端移除的突变体; iv) N 端及 C 端均截短的突变体, 包括至少 1、2、5、7、9、10、12、14、15 或 17 个氨基酸已经自 N 端移除且至少 1、5、10、15、20、25、30、34 或 35 个氨基酸已经自 C 端移除的 HBcAg。

[0144] 本发明范围内的另一些其他 HBcAg 变体蛋白质是经修饰以增强外来表位的免疫原性呈递的变体, 其中 4 个精氨酸重复中之一或多个缺失, 但仍保留 C 端半胱氨酸 (参见例如 PCT 公开第 WO 01/98333 号); 及嵌合 C 端截短型 HBcAg, 例如阐述于 PCT 公开第 WO 02/14478 号、第 WO 03/102165 号及第 WO 04/053091 号中的内容。

[0145] 在另一实施例中, 与本发明抗原性 tau 肽组合使用的免疫原性载体是 HBsAg 蛋白质。本领域技术人员可容易地确定可用于本发明上下文中的 HBsAg 蛋白质。实例包括 (但不限于) 阐述于以下文献中的 HBV 表面蛋白: 美国专利第 5, 792, 463 号、及 PCT 公开第 WO 02/10416 号及第 WO 08/020331 号。适用于本发明的 HBsAg 可源自任何生物体, 只要其能够形成“病毒样颗粒”且可用作本发明所定义的“免疫原性载体”即可。

[0146] 在又一实施例中, 与本发明抗原性 tau 肽组合使用的免疫原性载体是 Qbeta 外壳蛋白。已发现, 当 Qbeta 外壳蛋白表达于大肠杆菌 (*E. coli*) 中时, 其自组装成衣壳 (Kozlovskaya T.M. 等人, *GENE* 137:133-137 (1993))。所获得的衣壳或病毒样颗粒显示直径为 25nm 且 $T = 3$ 准对称的二十面体噬菌体样衣壳结构。此外, 已解析出噬菌体 Qbeta 的晶体结构。该衣壳含有 180 拷贝外壳蛋白, 其以共价五聚体及六聚体通过二硫键连接

(Golmohammadi, R. 等人, Structure 4 :5435554(1996)), 使得 Qbeta 外壳蛋白的衣壳具有显著稳定性。Qbeta 衣壳蛋白也显示对有机溶剂及变性剂不寻常的抗性。Qbeta 外壳蛋白的衣壳的高度稳定性特别对于其在本发明上下文中于哺乳动物及人类的免疫及疫苗接种中的用途而言是一个有利的特征。

[0147] 本领域技术人员可容易地确定可用于本发明上下文中的 Qbeta 外壳蛋白的实例。实例已详尽阐述于 PCT 公开第 WO 02/056905 号、第 W003/024480 号、第 WO 03/024481 号中, 且包括 (但不限于) 揭示于 PIR 数据库中的氨基酸序列, 登记号为 VCBPQbeta, 称为 Qbeta CP; 登记号为 AAA16663, 称为 Qbeta A1 蛋白质; 及其变体, 包括 N 端甲硫氨酸已裂解的变体蛋白质; Qbeta A1 的失去多达 100 个、150 个或 180 个氨基酸的 C 端截短形式; 通过缺失或取代而移除赖氨酸残基或通过取代或插入而添加赖氨酸残基的变体蛋白质 (参见例如揭示于 PCT 公开第 WO 03/024481 号中的 Qbeta-240、Qbeta-243、Qbeta-250、Qbeta-251 及 Qbeta-259); 及与本文所述的任何 Qbeta 核心蛋白质显示出至少 80%、85%、90%、95%、97% 或 99% 的一致性的变体。适用于本发明的变体 Qbeta 外壳蛋白可衍生自任何生物体, 只要其能够形成“病毒样颗粒”且可用作本发明所定义的“免疫原性载体”即可。

[0148] 键

[0149] 本发明的抗原性 tau 肽可经由化学偶联或通过表达基因工程融合伴侣而偶合至免疫原性载体。偶合不一定需要直接偶合, 而是可以通过接头序列来实施。更通常地, 在抗原肽融合、偶联或以其他方式附着至免疫原性载体的情形下, 通常将间隔区或接头序列添加至抗原肽的一端或两端。此类接头序列通常包含由蛋白酶体、核内体或细胞的其他囊泡室的蛋白酶识别的序列。

[0150] 在一个实施例中, 本发明肽以与免疫原性载体的融合蛋白形式表达。肽的融合可通过插入至免疫原性载体的基本序列中或通过融合至免疫原性载体的 N 端或 C 端来实现。在下文中, 当提及肽与免疫原性载体的融合蛋白时, 涵盖融合至亚基序列的任一端或将肽内部插入于载体序列中。如下文中所提及, 融合可通过将抗原肽插入至载体序列中、通过使用抗原肽取代载体序列的一部分、或通过缺失、取代或插入的组合来实施。

[0151] 当免疫原性载体是 VLP 时, 嵌合的抗原肽-VLP 亚基通常能够自组装成 VLP。展示融合至其亚基的表位的 VLP 在本文中也称为嵌合 VLP。例如, EP 0 421 635B 阐述在病毒样颗粒中使用嵌合的嗜肝性 DNA 病毒 (hepadnavirus) 核心抗原颗粒来呈递外来肽序列。

[0152] 侧翼氨基酸残基可添加至要融合至 VLP 亚基序列的任一端的抗原肽序列的任一端, 或用于将该肽序列内部插入至 VLP 的亚基序列中。甘氨酸及丝氨酸残基是用于添加至要融合肽的侧翼序列中的特别有利的氨基酸。甘氨酸残基赋予额外弹性, 这可以降低将外来序列融合至 VLP 亚基序列中的潜在不稳定效应。

[0153] 在本发明的一具体实施例中, 免疫原性载体是 HBcAg VLP。已阐述抗原肽融合至 HBcAg 的 N 端的融合蛋白 (Neyrinck, S. 等人, Nature Med. 5 :11571163(1999)) 或插入于所谓的主要免疫显性区 (MIR) 中 (Pumpens 等人, Intervirology 44 :98-114(2001); PCT 公开第 WO 01/98333 号), 且为本发明的具体实例。也已经阐述了天然存在的 MIR 缺失的 HBcAg 变体 (Pumpens 等人, Intervirology 44 :98-114(2001)), 且融合至 N 端或 C 端以及插入于与野生型 HBcAg 相比对应于缺失位点的 MIR 位置是本发明的其他实例。也已经阐述了融合至 C 端 (Pumpens 等人, Intervirology 44 :98-114(2001))。本领域技术人员将容易地找到

如何使用经典分子生物学技术来构建融合蛋白的指导。已阐述了编码 HBcAg 及 HBcAg 融合蛋白且可用于表达 HBcAg 及 HBcAg 融合蛋白的载体及质粒 (Pumpens 等人, *Intervirology* 44 :98-114(2001) ;Neyrinck, S. 等人, *Nature Med.* 5 :1157-1163(1999)), 且可用于实施本发明。使自组装及要插入于 HBcAg MIR 中的表位展示的效率最佳化的重要因素是所选择的插入位点, 以及插入后 MIR 内要从 HBcAg 序列缺失的氨基酸的数量 (欧洲专利第 EP 0421635 号 ;美国专利第 6, 231, 864 号), 或换言之要使用新表位取代的形成 HBcAg 的氨基酸的数量。例如, 已阐述使用外来表位来取代 HBcAg 氨基酸 76-80、79-81、79-80、75-85 或 80-81 (Pumpens 等人, *Intervirology* 44 :98-114(2001) ;欧洲专利第 EP 0421635 号 ;美国专利第 6, 231, 864 号 ;PCT 专利公开第 W000/26385 号)。HBcAg 含有对于衣壳组装及能够结合核酸非必要的较长精氨酸尾部。包含或缺少此精氨酸尾部的 HBcAg 是本发明的两个实例。

[0154] 在本发明的另一具体实施例中, 免疫原性载体是 RNA 噬菌体的 VLP, 优选为 Qbeta。在细菌以及特别是大肠杆菌中表达之后, RNA 噬菌体的主要外壳蛋白自发组装成 VLP。已阐述了抗原肽已经融合至截短形式 Qbeta 的 A1 蛋白质的 C 端或插入于 A1 蛋白质内部的融合蛋白构建体 (Kozlovska 等人, *Intervirology*, 39 :9-15(1996))。所述 A1 蛋白质是通过抑制 UGA 终止密码子而产生, 且其具有 329 个氨基酸, 或者若将 N 端甲硫氨酸的裂解考虑在内则具有 328 个氨基酸的长度。丙氨酸 (由 Qbeta CP 基因编码的第二氨基酸) 之前的 N 端甲硫氨酸的裂解通常发生于大肠杆菌中, 且 Qbeta 外壳蛋白的 N 端即为此种情况。A1 基因的该部分 (UGA 琥珀密码子的 3' 端) 编码具有 195 个氨基酸长度的 CP 延伸部分。在 CP 延伸部分的位置 72 与 73 之间插入抗原肽获得本发明的其他实例 (Kozlovska 等人, *Intervirology* 39 :9-15(1996))。将抗原肽融合于 C 端截短型 Qbeta A1 蛋白质的 C 端获得本发明的其他优选实例。例如, Kozlovska 等人, *Intervirology*, 39 :9-15(1996) 阐述了表位融合于位置 19 处经截短的 Qbeta CP 延伸部分的 C 端的 Qbeta A1 蛋白质融合物。

[0155] 如 Kozlovska 等人, *Intervirology*, 39 :9-15(1996) 所述, 展示融合表位的颗粒的组装通常需要存在 A1 蛋白质 - 抗原融合物及野生型 CP 二者以形成镶嵌颗粒 (mosaic particle)。然而, 包含病毒样颗粒且由此特别是 RNA 噬菌体 Qbeta 外壳蛋白的 VLP (其仅由与抗原肽融合的 VLP 亚基构成) 的实施例也在本发明范围内。

[0156] 镶嵌颗粒的产生可以多种方式实施。Kozlovska 等人, *Intervirology* 39 :9-15(1996) 阐述了三种方法, 所有方法均可用于实施本发明。在第一种途径中, 融合表位于 VLP 上的有效展示是由编码 Qbeta A1 蛋白质融合物的质粒在大肠杆菌菌株中的表达来介导的, 该融合物在 CP 与 CP 延伸部分之间具有 UGA 终止密码子, 所述大肠杆菌菌株含有编码克隆 UGA 抑制基因 tRNA 的质粒, 这使得 UGA 密码子翻译至 Trp (pISM3001 质粒中 (Smiley 等人, *Gene* 134 :33-40(1993))。在另一种途径中, 将 CP 基因终止密码子修饰成 UAA, 且将表达 A1 蛋白质 - 抗原融合物的第二质粒共转化。第二质粒编码不同的抗生素抗性, 且复制起始点与第一质粒一致。在第三种途径中, CP 及 A1 蛋白质 - 抗原融合物以双顺反子方式编码, 且可操作地连接至诸如 Trp 启动子等启动子, 如 Kozlovska 等人, *Intervirology*, 39 :9-15(1996) 的图 1 中所述。

[0157] 适于融合抗原或抗原决定簇的其他 VLP 在 PCT 公开第 W0 03/024481 号中有阐述, 且包括噬菌体 fr、RNA 噬菌体 MS-2、乳头瘤病毒的衣壳蛋白、反转录转座子 Ty、酵母以及反

转录病毒样颗粒、HIV2 Gag、豇豆花叶病毒 (Cowpea Mosaic Virus)、细小病毒 VP2 VLP、HBsAg(美国专利第 4,722,840 号及欧洲专利第 EP 0020416B1 号)。适于实施本发明的嵌合 VLP 的实例也有 Intervirology 39:1(1996) 中所公开的那些。涵盖用于本发明的 VLP 的其他实例有:HPV-1、HPV-6、HPV-11、HPV-16、HPV-18、HPV-33、HPV-45、CRPV、CPOV、HIV GAG 及烟草花叶病毒。其他实施例包括 SV-40、多瘤病毒、腺病毒、单纯疱疹病毒、轮状病毒及诺沃克病毒的 VLP。

[0158] 对于构成本发明的一部分的任何重组表达肽或蛋白质(包括偶合或未偶合至免疫原性载体的本发明抗原性 tau 肽),编码该肽或蛋白质的核酸也构成本发明的一方面,包含所述核酸的表达载体以及含有所述表达载体的宿主细胞(自发地或染色体插入)也是如此。通过将肽或蛋白质表达于上文宿主细胞中并从宿主细胞分离免疫原以重组产生肽或蛋白质的方法是本发明的又一方面。

[0159] 在另一实施例中,使用本领域技术人员所熟知的技术将本发明肽化学偶合至免疫原性载体。可以如下方式实施偶联:经由单点偶联(例如 N 端或 C 端点)以容许肽自由移动或作为肽的两端均偶联至免疫原性载体蛋白质或支架结构(例如 VLP)的锁定结构(locked down structure)。该偶联可通过本领域技术人员所熟知的偶联化学来实施,例如通过半胱氨酸残基、赖氨酸残基或通常已知作为偶联点的其他羧基部分,例如谷氨酸或天冬氨酸。因此,例如,对于直接共价偶合,可使用碳化二亚胺、戊二醛或(N-[γ -马来酰亚胺基丁酰氧基]琥珀酰亚胺酯,使用诸如 CDAP 及 SPDP 等常见市售异型双功能接头(使用制造商说明书)。肽(尤其环肽)与蛋白质载体通过酰肼肽衍生物的偶联的实例在 PCT 公开第 WO 03/092714 号中有阐述。在偶合反应后,可借助透析方法、凝胶过滤方法、分级分离方法等容易地分离及纯化免疫原。以半胱氨酸残基封端的肽(优选地在环状区域外部有接头)可经由马来酰亚胺化学方便地偶联至载体蛋白。

[0160] 当免疫原性载体是 VLP 时,可将数种具有相同氨基酸序列或不同氨基酸序列的抗原肽偶合至单一 VLP 分子,优选产生重复且有序的结构,以定向方式呈递数个抗原决定簇,如 PCT 公开第 WO 00/32227 号、第 W003/024481 号、第 WO 02/056905 号及第 WO 04/007538 号中所述。

[0161] 在本发明的一个方面,抗原肽经由化学交联、通常且优选地通过使用异型双功能交联剂结合至 VLP。数种异型双功能交联剂已为本领域技术人员所熟知。在一些实施例中,异型双功能交联剂含有可与第一附着位点反应的官能团,即与 VLP 或 VLP 亚基的赖氨酸残基的侧链氨基反应的官能团;及可与优选第二附着位点反应的另一官能团,即融合至抗原肽且任选地可实施还原反应的半胱氨酸残基。该程序的第一个步骤(通常称为衍生化)是 VLP 与交联剂的反应。该反应的产物是激活的 VLP,其也称为激活载体。在第二个步骤中,使用诸如凝胶过滤或透析等标准方法来移除未反应的交联剂。在第三个步骤中,使抗原肽与激活的 VLP 反应,且此步骤通常称为偶合步骤。在第四个步骤中,可任选地通过例如透析来移除未反应的抗原肽。数种异型双功能交联剂已为本领域技术人员所熟知。这些包括优选的交联剂 SMPH(Pierce)、Sulfo-MBS、Sulfo-EMCS、Sulfo-GMBS、Sulfo-SIAB、Sulfo-SMPB、Sulfo-SMCC、SVSB、SIA 及其他交联剂,此类其他交联剂可购自例如 Pierce 化学公司(Rockford, IL, USA)并且具有一个对氨基具有反应性的官能团及一个对半胱氨酸残基具有反应性的官能团。上文提及的交联剂全部导致形成硫醚键。

[0162] 适于实施本发明的另一类交联剂的特征在于偶合后在抗原肽与 VLP 之间引入二硫键。属于此类的优选交联剂包括例如 SPDP 及 Sulfo-LC-SPDP (Pierce)。VLP 与交联剂的衍生化程度可能受诸如下述各种实验条件影响：各反应伴侣 (partner) 的浓度、一种试剂相比于另一种试剂是否过量、pH、温度及离子强度。偶合度，即每一 VLP 亚基的抗原肽的量可通过改变上文所述的实验条件加以调节以与疫苗要求相匹配。

[0163] 使抗原肽结合至 VLP 的另一种方法是使 VLP 表面上的赖氨酸残基与抗原肽上的半胱氨酸残基连接。在一些实施例中，可能需要含有半胱氨酸残基作为第二附着位点或作为其一部分的氨基酸接头与用于偶合至 VLP 的抗原肽进行融合。通常，弹性氨基酸接头较有利。氨基酸接头的实例选自由以下所组成的组：(a) CGG；(b) N 端 γ 1- 接头；(c) N 端 γ 3- 接头；(d) Ig 铰链区；(e) N 端甘氨酸接头；(f) $(G)_k C(G)_n$ ，其中 $n = 0$ 至 12 且 $k = 0$ 至 5；(g) N 端甘氨酸-丝氨酸接头；(h) $(G)_k C(G)_m (S)_i (GGGG)_n$ ，其中 $n = 0$ 至 3， $k = 0$ 至 5， $m = 0$ 至 10， $i = 0$ 至 2；(i) GGC；(k) GGC-NH₂；(l) C 端 γ 1- 接头；(m) C 端 γ 3- 接头；(n) C 端甘氨酸接头；(o) $(G)_n C(G)_k$ ，其中 $n = 0$ 至 12 且 $k = 0$ 至 5；(p) C 端甘氨酸-丝氨酸接头；(q) $(G)_m (S)_t (GGGG)_n (G)_o C(G)_k$ ，其中 $n = 0$ 至 3， $k = 0$ 至 5， $m = 0$ 至 10， $t = 0$ 至 2，且 $o = 0$ 至 8。氨基酸接头的其他实例为免疫球蛋白的铰链区、甘氨酸丝氨酸接头 $(GGGG)_n$ 及甘氨酸接头 $(G)_n$ ，所有均进一步含有半胱氨酸残基作为第二附着位点并且任选进一步含有甘氨酸残基。此类氨基酸接头的通常优选实例为 N 端 γ 1:CGDKTHTSPP (SEQ ID NO:94)；C 端 γ 1:DKTHTSPPCG (SEQ ID NO:95)；N 端 γ 3:CGGPKPSTPPGSSGGAP (SEQ ID NO:96)；C 端 γ 3:PKPSTPPGSSGGAPGGCG (SEQ ID NO:97)；N 端甘氨酸接头:GCGGGG (SEQ ID NO:98) 及 C 端甘氨酸接头:GGGGCG (SEQ ID NO:99)。

[0164] 当疏水性抗原肽结合至 VLP 时，尤其适于实施本发明的其他氨基酸接头是用于 N 端接头的 CGKKGG (SEQ ID NO:100) 或 CGDEGG (SEQ ID NO:101)；或用于 C 端接头的 GGKKGC (SEQ ID NO:102) 及 GGEDGC (SEQ ID NO:103)。对于 C 端接头，末端半胱氨酸任选经 C 端酰胺化。

[0165] 在本发明的一些实施例中，位于肽 C 端的 GGCG (SEQ ID NO:104)、GGC 或 GGC-NH₂ (“NH₂”代表酰胺化) 接头或位于肽 N 端的 CGG 是优选的氨基酸接头。通常，将甘氨酸残基插入于较大氨基酸与要用作第二附着位点的半胱氨酸之间以避免偶合反应中较大氨基酸的潜在空间位阻。在本发明的又一实施例中，使氨基酸接头 GGC-NH₂ 融合至抗原肽的 C 端。

[0166] 存在于抗原肽上的半胱氨酸残基优选呈还原态与激活 VLP 上的异型双功能交联剂反应，即应当可以得到游离半胱氨酸或半胱氨酸残基与游离巯基。在半胱氨酸残基以氧化形式而起结合位点作用的情形下，例如，若其形成二硫键，则优选使用例如 DTT、TCEP 或 p- 巯基乙醇还原该二硫键。低浓度的还原剂适合 PCT 公开第 W0 02/05690 号中所述的偶合，而较高浓度会抑制偶合反应，如本领域技术人员所了解的，在此情形下应在偶合之前通过例如透析、凝胶过滤或反相 HPLC 移除还原剂或降低其浓度。

[0167] 通过使用异型双功能交联剂按照上文所述的方法使抗原肽与 VLP 结合使得抗原肽与 VLP 能够以定向方式偶合。使抗原肽与 VLP 结合的其他方法包括使用碳化二亚胺 EDC 及 NHS 使抗原肽交联至 VLP 的方法。

[0168] 在其他方法中，使用同型双功能交联剂使抗原肽附着至 VLP，该交联剂例如为戊二

醛、DSGBM[PEO]4、BS3 (Pierce 化学公司, Rockford, IL, USA) 或其他已知的带有对 VLP 的胺基团或羧基具有反应性的官能团的同型双功能交联剂。

[0169] 使 VLP 与抗原肽结合的其他方法包括其中 VLP 经生物素化并且抗原肽以抗生蛋白链菌素 - 融合蛋白形式表达的方法, 或其中抗原肽与 VLP 二者均经生物素化的方法, 例如 PCT 公开第 WO 00/23955 号中所述。在此情形下, 可首先使抗原肽结合至抗生蛋白链菌素或抗生物素蛋白上, 这通过调节抗原肽与抗生蛋白链菌素的比率以使在随后步骤中添加的 VLP 仍然能够结合游离的结合位点来实施。或者, 可将所有组份混合于“一罐 (one pot)”反应中。可以使用可得到可溶形式的受体及配体且能够交联至 VLP 或抗原肽的其他配体 - 受体对作为结合剂来使抗原肽结合至 VLP 上。或者, 可使配体或受体融合至抗原肽, 并由此介导与分别化学结合或融合至受体或配体的 VLP 的结合。还可通过插入或取代来实施融合。

[0170] 若空间上容许, 可将一个或多个抗原分子附着至 RNA 噬菌体外壳蛋白的衣壳或 VLP 的一个亚基上, 这优选通过 RNA 噬菌体的 VLP 的暴露的赖氨酸残基。因此, RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP 且特别是其 Qbeta 外壳蛋白 VLP 的一个具体特征是每一亚基可能偶合数种抗原。这能够产生密集的抗原阵列。

[0171] 在本发明的一个实施例中, 至少一种抗原或抗原决定簇与病毒样颗粒的分别结合及附着是通过病毒样颗粒的至少一个第一附着位点与抗原肽的至少一个第二附着位点之间分别相互作用及缔合来实施。

[0172] Qbeta 外壳蛋白的 VLP 或衣壳在其表面上展示界定数量的赖氨酸残基, 其具有给定的拓扑结构, 其中三个赖氨酸残基指向衣壳内部并与 RNA 相互作用, 而四个其他赖氨酸残基暴露于衣壳外部。这些给定特性有利于抗原附着至颗粒外部而非赖氨酸残基与 RNA 相互作用的颗粒内部。其他 RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP 在其表面上还具有给定数目的赖氨酸残基并具有此类赖氨酸残基的给定的拓扑结构。

[0173] 在本发明的又一实施例中, 第一附着位点是赖氨酸残基和 / 或第二附着位点包含巯基或半胱氨酸残基。在本发明的又一实施例中, 第一附着位点是赖氨酸残基且第二附着位点是半胱氨酸残基。在又一些实施例中, 抗原或抗原决定簇通过半胱氨酸残基结合至 RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP 的赖氨酸残基, 并且特别结合至 Qbeta 外壳蛋白的 VLP。

[0174] 衍生自 RNA 噬菌体的 VLP 的另一优点是其在细菌中的表达量很高, 这能够以担负得起的成本制备大量材料。而且, 使用 VLP 作为载体能够以可变的抗原密度分别形成稳健的抗原阵列及缀合物。具体而言, 使用 RNA 噬菌体的 VLP、以及由此而特别使用 RNA 噬菌体 Qbeta 外壳蛋白的 VLP 能够实现非常高的表位密度。

[0175] 在一些实施例中, 免疫原性组合物可包含免疫原性缀合物的混合物, 即免疫原性载体缀合至一种或数种抗原性 tau 肽。因此, 此类免疫原性组合物可由氨基酸序列不同的免疫原性载体构成。例如, 可制备包含“野生型”VLP 及其中一或多个氨基酸残基已改变 (例如, 缺失、插入或取代) 的经修饰 VLP 蛋白质的疫苗组合物。或者, 可使用相同的免疫原性载体, 但使其偶合至具有不同氨基酸序列的抗原性 tau 肽。

[0176] 因此, 本发明还涉及产生免疫原的方法, 其包括 : i) 提供本发明抗原性 tau 肽 ; ii) 提供本发明免疫原性载体, 优选为 VLP ; 及 iii) 将所述抗原性 tau 肽与所述免疫原性载体组合。在一个实施例中, 所述组合步骤通过化学交联、优选地通过异型双功能交联剂来实施。

[0177] 包含抗原性 tau 肽的组合物

[0178] 本发明还涉及组合物,特别是还称为“对象免疫原性组合物”的免疫原性组合物,其包含本发明抗原性 tau 肽及任选存在的至少一种佐剂,该抗原性 tau 肽优选连接至免疫原性载体,更优选连接至 VLP,更优选连接至 HBsAg、HBcAg 或 Qbeta VLP。此类免疫原性组合物(特别是调配成药物组合物时)被认为可用于预防、治疗或减轻 tau 相关病症,例如阿尔茨海默病。

[0179] 免疫原性组合物

[0180] 在一些实施例中,本发明的对象免疫原性组合物包含抗原性 tau 肽,所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO:1 至 26、31 至 76 及 105 至 122 的氨基酸序列。在一些实施例中,所述抗原性 tau 肽连接至免疫原性载体,优选连接至 VLP,更优选连接至 HBsAg、HBcAg 或 Qbeta VLP。

[0181] 包含本发明抗原性 tau 肽的对象免疫原性组合物可以诸多方式如下文更详细阐述那样进行调配。

[0182] 在一些实施例中,对象免疫原性组合物包含单一种类的抗原性 tau 肽,例如,免疫原性组合物包含一群抗原性 tau 肽,基本上全部抗原性 tau 肽都具有相同的氨基酸序列。在其他实施例中,对象免疫原性组合物包含两种或更多种不同的抗原性 tau 肽,例如,免疫原性组合物包含一群抗原性 tau 肽,该群体成员的氨基酸序列可能有所不同。

[0183] 例如,在一些实施例中,对象免疫原性组合物包含第一抗原性 tau 肽,其优选连接至免疫原性载体,更优选连接至 VLP,更优选连接至 HBsAg、HBcAg 或 Qbeta VLP,且包含选自 SEQ ID NO:1 至 26、31 至 76 及 105 至 122 的第一氨基酸序列;及至少一种第二抗原性 tau 肽,优选连接至免疫原性载体,更优选连接至 VLP,更优选连接至 HBsAg、HBcAg 或 Qbeta VLP,且包含优选选自 SEQ ID NO:1 至 26、31 至 76 及 105 至 122 的第二氨基酸序列,其中第二氨基酸序列与第一氨基酸序列相差至少 1、2、3、4、5、6 至 10、或 15 个氨基酸。

[0184] 作为另一实施例,对象免疫原性组合物包含第一抗原性 tau 肽,其优选连接至免疫原性载体,更优选连接至 VLP,更优选连接至 HBsAg、HBcAg 或 Qbeta VLP,且包含选自 SEQ ID NO:1 至 26、31 至 76 及 105 至 122 的第一氨基酸序列;第二抗原性 tau 肽,其优选连接至免疫原性载体,更优选连接至 VLP,更优选连接至 HBsAg、HBcAg 或 Qbeta VLP,且包含优选选自 SEQ ID NO:1 至 26、31 至 76 及 105 至 122 的第二氨基酸序列,其中第二氨基酸序列与第一氨基酸序列相差至少 1、2、3、4、5、6 至 10、或 15 个氨基酸;及至少一种第三抗原性 tau 肽,其优选连接至免疫原性载体,更优选连接至 VLP,更优选连接至 HBsAg、HBcAg 或 Qbeta VLP,且包含优选选自 SEQ ID NO:1 至 26、31 至 76 及 105 至 122 的第三氨基酸序列,其中第三氨基酸序列与第一及第二氨基酸序列均相差至少 1、2、3、4、5、6 至 10、或 15 个氨基酸。

[0185] 在其他实施例中,对象免疫原性组合物包含如上文所述的多聚抗原性 tau 肽。本文所用的术语“包含抗原性 tau 肽的免疫原性组合物”或“本发明的免疫原性组合物”或“对象免疫原性组合物”是指包含单一种类(多聚或未多聚)或多种偶合或未偶合至免疫原性载体的抗原性 tau 肽的免疫原性组合物。

[0186] 佐剂

[0187] 在一些实施例中,对象免疫原性组合物包含至少一种佐剂。适宜的包括适用于哺乳动物、优选适用于人类的佐剂。可用于人类的已知适宜佐剂的实例包括(但不限于)明

矾、磷酸铝、氢氧化铝、MF59TM(4.3% w/v 角鲨烯、0.5% w/v 聚山梨酯 80(Tween 80)、0.5% w/v 山梨醇酐三油酸酯(Span 85))、含 CpG 核酸(其中胞嘧啶未甲基化)、QS21(皂苷佐剂)、MPL(单磷酸脂质 A)、3DMPL(3-O-去酰基化 MPL)、沉香(Aquilla)提取物、ISCOMS(参见,例如,Sjölander 等人, J. Leukocyte Biol. 64 :713(1998) ;PCT 公开第 WO90/03184 号、第 WO 96/11711 号、第 WO 00/48630 号、第 WO 98/36772 号、第 WO 00/41720 号、第 WO 06/134423 号及第 WO 07/026190 号)、LT/CT 突变体、聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLG)微粒、Quil A、白细胞介素及诸如此类。对于包括但不限于动物实验在内的兽医应用,可以使用弗氏佐剂(Freund's)、N-乙酰基-胞壁酰基-L-苏胺酰基-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰基-正-胞壁酰基-L-丙胺酰基-D-异谷氨酰胺(CGP 11637,称为正-MDP)、N-乙酰基胞壁酰基-L-丙胺酰基-D-异谷氨酰胺基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油-3-羟基磷酰基氧基)-乙胺(CGP 19835A,称为 MTP-PE)、及 RIBI(其含有三种提取自细菌的组份)、单磷酸脂质 A、海藻糖二霉菌酸酯及存于 2%角鲨烯/Tween 80 乳液中的细胞壁支架(MPL+TDM+CWS)。

[0188] 可增强组合物效力的其他示例性佐剂包括但不限于:(1) 水包油乳液配制品(含有或不含有其他特定免疫刺激剂,例如胞壁酰肽(见下文)或细菌细胞壁组份),例如(a)MF59TM(PCT 公开第 WO 90/14837 号;第 10 章, Vaccine design:the subunit and adjuvant approach, Powell&Newman 编辑, Plenum Press 1995),其含有 5%角鲨烯、0.5% Tween 80(聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯)及 0.5% Span 85(山梨醇酐三油酸酯)(任选含有共价连接至二棕榈酰基磷脂酰基乙醇胺的胞壁酰三肽(MTP-PE)),使用微射流均质机调配成亚微米粒子,(b)SAF,其含有 10%角鲨烯、0.4% Tween 80、5%普朗尼克封闭聚合物(pluronic-blocked polymer)L121 及 thr-MDP,微流化成亚微米乳液或实施涡旋以产生较大粒径乳液,及(c)RIBITM佐剂体系(RAS)(Ribi Immunochem, Hamilton, MT),其含有 2%角鲨烯、0.2% Tween 80 及一或多种细菌细胞壁组份,例如单磷酸脂质 A(MPL)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)及细胞壁支架(CWS),优选为 MPL+CWS(DETOXTM);(2) 皂苷佐剂,例如 QS21、STIMULONTM(Cambridge Bioscience, Worcester, MA)、Abisco®(Isconova, Sweden)或免疫刺激复合物基质(Iscomatrix)®(Commonwealth Serum Laboratories, Australia),可使用此类物质或自其产生的颗粒,例如 ISCOM(免疫刺激复合物), ISCOMS 可不含其他洗涤剂,例如 PCT 公开第 WO 00/07621 号;(3) 完全弗氏佐剂(CFA)及不完全弗氏佐剂(IFA);(4) 细胞因子,例如白细胞介素(例如 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12(PCT 公开第 WO99/44636 号)等)、干扰素(例如 γ 干扰素)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)等;(5) 单磷酸脂质 A(MPL)或 3-O-去酰基化 MPL(3dMPL),例如英国专利第 GB-2220221 号及欧洲专利第 EP-A-0689454 号,当与肺炎球菌糖一起使用时任选于实质上不存在明矾下使用,例如 PCT 公开第 WO 00/56358 号;(6) 3dMPL 与例如 QS21 和 / 或水包油乳液的组合,例如 EP-A-0835318、EP-A-0735898、EP-A-0761231;(7) 包含 CpG 基序的寡核苷酸[Krieg, Vaccine(2000)19 :618-622;Krieg, Curr Opin Mol Ther(2001)3 :15-24;Roman 等人, Nat. Med. (1997)3 :849-854;Weiner 等人, PNAS USA(1997)94 :10833-10837;Davis 等人, J. Immunol(1998)160 :870-876;Chu 等人, J. Exp. Med(1997)186 :1623-1631;Lipford 等人, Ear. J. Immunol. (1997)27 :2340-2344;Moldoveami 等人, Vaccine(1988)16 :1216-1224;Krieg 等人, Nature(1995)374 :546-549;

Klinman 等人, PNAS USA (1996) 93 :2879-2883 ;Ballas 等人, J. Immunol, (1996) 157 : 1840-1845 ;Cowdery 等人, J. Immunol (1996) 156 :4570-4575 ;Halpern 等人, Cell Immunol. (1996) 167 :72-78 ;Yamamoto 等人, Jpn. J. Cancer Res. , (1988) 79 :866-873 ;Stacey 等人, J. Immunol. , (1996) 157 :2116-2122 ;Messina 等人, J. Immunol, (1991) 147 :1759-1764 ;Yi 等人, J. Immunol (1996) 157 :4918-4925 ;Yi 等人, J. Immunol (1996) 157 :5394-5402 ;Yi 等人, J. Immunol, (1998) 160 :4755-4761 ;及 Yi 等人, J. Immunol, (1998) 160 :5898-5906 ;PCT 公开第 WO 96/02555 号、第 WO 98/16247 号、第 WO 98/18810 号、第 WO 98/40100 号、第 WO98/55495 号、第 WO 98/37919 号及第 WO 98/52581 号],即含有至少一种 CG 二核苷酸,其中胞嘧啶未甲基化 ;(8) 聚氧乙烯醚或聚氧乙烯酯,例如 PCT 公开第 WO 99/52549 号 ;(9) 聚氧乙烯山梨醇酐酯表面活性剂与辛苯昔醇的组合 (PCT 公开第 WO 01/21207 号) 或聚氧乙烷基醚或酯表面活性剂与至少一种其他非离子型表面活性剂 (例如辛苯昔醇) 的组合 (PCT 公开第 WO 01/21152 号) ;(10) 皂苷及免疫刺激性寡核苷酸 (例如 CpG 寡核苷酸) (PCT 公开第 WO 00/62800 号) ;(11) 免疫刺激剂及金属盐颗粒,例如 PCT 公开第 WO 00/23105 号 ;(12) 皂苷及水包油乳液,例如 PCT 公开第 WO 99/11241 号 ;(13) 皂苷 (例如 QS21)+3dMPL+IM2 (任选 + 固醇),例如 PCT 公开第 WO98/57659 号 ;(14) 可作为免疫刺激剂增强组合物功效的其他物质,例如胞壁酰肽,包括 N- 乙酰基 - 胞壁酰基 -L- 苏胺酰基 -D- 异谷氨酰胺 (thr-MDP)、N-25 乙酰基 - 正胞壁酰基 -L- 丙胺酰基 -D- 异谷氨酰胺 (正-MDP)、N- 乙酰基胞壁酰基 -L- 丙胺酰基 -D- 异谷氨酰胺基 -L- 丙氨酸-2-(1' -2' -二棕榈酰基 -sn- 甘油 -3- 羟基磷酰基氧基) - 乙胺 (MTP-PE) ;(15) Toll 样受体 (toll-like receptor) (TLR) 的配体,天然或合成的 (例如,如 Kanzler 等人, Nature Med. 13 : 1552-1559 (2007) 中所述),包括 TLR3 配体,例如聚肌苷酸胞苷酸 (polyI :C) 及类似化合物,例如 Hiltonol 及安普济 Ampligen。

[0189] 在一个实施例中,本发明的免疫原性组合物包含至少一种佐剂。在一特定实施例中,所述佐剂是免疫刺激性寡核苷酸,且优选为 CpG 寡核苷酸。在一个实施例中,CpG 寡核苷酸具有核酸序列 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (CpG 7909 ;SEQ ID NO :27)。在另一实施例中,CpG 寡核苷酸具有核酸序列 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (CpG 24555 ;SEQ ID NO :29)。SEQ ID NO :29 的免疫刺激性寡核苷酸核酸序列与先前报导的免疫刺激性寡核苷酸 (CpG 10103) 5' TCGTCGTTTTTCGGTTCGTTTT 3' (SEQ ID NO :28) 的不同之处在于最靠近 3' 的 CG 二核苷酸的颠倒。此两种免疫刺激性寡核苷酸的活性具有惊人的相似性,这是因为先前已报导 CpG 寡核苷酸的免疫刺激活性取决于 CpG 基序的数量、CG 二核苷酸两侧的序列、CpG 基序的位置及各 CpG 基序之间的间距 (Ballas 等人,1996, J. Immunol. ;Hartmann 等人,2000, J. Immunol. ;Klinman 等人,2003, Clin. Exp. Immunol.)。如根据先前揭示内容所预期的那样,移除免疫刺激性寡核苷酸 CpG 24555 中最靠近 3' 的 CG 二核苷酸不会对此免疫刺激性寡核苷酸增强抗原特异性免疫应答的能力造成负面影响。CpG 24555 呈现与 CpG 10103 相比类似的且在一些情形下增强的免疫刺激活性。

[0190] 免疫刺激性寡核苷酸可为双链或单链。通常,双链分子在活体内更稳定,而单链分子具有增强的免疫活性。因此,在本发明的一些方面中,核酸优选为单链 ;且在其他方面中,核酸优选为双链。

[0191] 对于任何本文所揭示的 CpG 序列 (例如 CpG 24555、CpG 10103 及 CpG7909),核苷

酸间键中的任一者可为硫代磷酸酯或磷酸二酯键。

[0192] 术语“核酸”与“寡核苷酸”在本文中可互换使用,其意指多个核苷酸(即包含连接至磷酸酯基团及可交换有机碱基的糖(例如核糖或去氧核糖)的分子,所述有机碱基为经取代嘧啶(例如胞嘧啶(C)、胸苷(T)或尿嘧啶(U))或经取代嘌呤(例如腺嘌呤(A)或鸟嘌呤(G))。本文所用的此类术语是指寡核糖核苷酸(即去除磷酸酯的多核苷酸)及任何其他含有有机碱基的聚合物。核酸分子可得自现有核酸来源(例如基因组DNA或cDNA),但优选为合成的核酸分子(例如通过核酸合成来产生)。

[0193] 在一个实施例中,免疫刺激性寡核苷酸可相比于天然RNA及DNA涵盖各种化学修饰及取代,包括核苷间磷酸二酯桥、 β -D-核糖(去氧核糖)单元和/或天然核苷碱基(腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶)。化学修饰的实例已为本领域技术人员所熟知,且阐述于(例如)Uhlmann E. 等人,(1990),Chem. Rev. 90 :543;“Protocols for Oligonucleotides and Analogs”, Synthesis and Properties&Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal 编辑, Humana Press, Totowa, USA 1993 ;Crooke, S. T. 等人,(1996)Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36 :107-129;及 Hunziker J. 等人,(1995),Mod. Synth. Methods 7 :331-417 中。本发明寡核苷酸可具有一或多种修饰,其中相比于由天然DNA或RNA组成的具有相同序列的寡核苷酸,各修饰位于特定的核苷间磷酸二酯桥和/或位于特定的 β -D-(去氧)核糖单元和/或位于特定的天然核苷碱基位置。

[0194] 例如,寡核苷酸可包含一或多种修饰。此类修饰可选自:a)用经修饰核苷间桥替代位于核苷3'和/或5'端的核苷间磷酸二酯桥,b)用去磷桥替代位于核苷3'和/或5'端的磷酸二酯桥,c)用另一单元替代糖磷酸酯骨架中的糖磷酸酯单元,d)用经修饰糖单元替代 β -D-核糖单元,及e)替代天然核苷碱基。

[0195] 核酸还包括经取代的嘌呤及嘧啶,例如C-5丙炔嘧啶及7-去氮-7-经取代嘌呤修饰碱基(Wagner 等人,1996,Nat. Biotechnol. 14 :840-4)。嘌呤及嘧啶包括(但不限于)腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸苷、5-甲基胞嘧啶、2-氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、次黄嘌呤、及其他天然及非天然存在的核碱基、经取代及未经取代的芳香族部分。其他此类修饰已为本领域技术人员所熟知。

[0196] 经修饰碱基是在化学上与通常在DNA及RNA中所发现天然存在碱基(例如T、C、G、A及U)不同的任何碱基,但其与此类天然存在碱基共享基本化学结构。经修饰核苷碱基可选自(例如)次黄嘌呤、尿嘧啶、二氢尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-胺基尿嘧啶、5-(C1-C6)-烷基尿嘧啶、5-(C2-C6)-烯基尿嘧啶、5-(C2-C6)-炔基尿嘧啶、5-(羟基甲基)尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羟基胞嘧啶、5-(C1-C6)-烷基胞嘧啶、5-(C2-C6)-烯基胞嘧啶、5-(C2-C6)-炔基胞嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、N2-二甲基鸟嘌呤、2,4-二胺基-嘌呤、8-氮杂嘌呤、经取代7-去氮嘌呤(优选7-去氮-7-经取代和/或7-去氮-8-经取代嘌呤)、5-羟基甲基胞嘧啶、N4-烷基胞嘧啶(例如N4-乙基胞嘧啶)、5-羟基去氧胞苷、5-羟基甲基去氧胞苷、N4-烷基去氧胞苷(例如N4-乙基去氧胞苷)、6-硫去氧鸟苷、及硝基吡咯的去氧核糖核苷、C5-丙炔基嘧啶、及二胺基嘌呤(例如2,6-二胺基嘌呤)、肌苷、5-甲基胞嘧啶、2-胺基嘌呤、2-胺基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤或天然核苷碱基的其他修饰。此列表是用于示例而并不应理解为具有限制性。

[0197] 在本发明的一些方面,本文所述免疫刺激性寡核苷酸的CpG二核苷酸优选未甲基

化。未甲基化 CpG 基序是未甲基化胞嘧啶 - 鸟嘌呤二核苷酸序列（即未甲基化 5' 胞嘧啶以及随后的 3' 鸟苷，且通过磷酸酯键来连接）。在其他方面，CpG 基序经甲基化。甲基化 CpG 基序是甲基化胞嘧啶 - 鸟嘌呤二核苷酸序列（即甲基化 5' 胞嘧啶以及随后的 3' 鸟苷，且通过磷酸酯键来连接）。

[0198] 在本发明的一些方面，免疫刺激性寡核苷酸可含有经修饰的胞嘧啶。经修饰的胞嘧啶是胞嘧啶的天然存在或非天然存在的嘧啶碱基类似物，其可替代此碱基且不损害寡核苷酸的免疫刺激活性。经修饰胞嘧啶包括（但不限于）5- 经取代胞嘧啶（例如 5- 甲基 - 胞嘧啶、5- 氟 - 胞嘧啶、5- 氯 - 胞嘧啶、5- 溴 - 胞嘧啶、5- 碘 - 胞嘧啶、5- 羟基 - 胞嘧啶、5- 羟基甲基 - 胞嘧啶、5- 二氟甲基 - 胞嘧啶、及未经取代或经取代的 5- 炔基 - 胞嘧啶）、6- 经取代胞嘧啶、N4- 经取代胞嘧啶（例如 N4- 乙基 - 胞嘧啶）、5- 氮杂 - 胞嘧啶、2- 巯基 - 胞嘧啶、异胞嘧啶、假异胞嘧啶、具有稠环系统的胞嘧啶类似物（例如 N, N' - 丙烯胞嘧啶或吩恶嗪）、及尿嘧啶及其衍生物（例如 5- 氟 - 尿嘧啶、5- 溴 - 尿嘧啶、5- 溴乙烯基 - 尿嘧啶、4- 硫 - 尿嘧啶、5- 羟基 - 尿嘧啶、5- 丙炔基 - 尿嘧啶）。一些优选胞嘧啶包括 5- 甲基 - 胞嘧啶、5- 氟 - 胞嘧啶、5- 羟基 - 胞嘧啶、5- 羟基甲基 - 胞嘧啶、及 N4- 乙基 - 胞嘧啶。在本发明的另一实施例中，胞嘧啶碱基经通用碱基（例如 3- 硝基吡咯、P- 碱基）、芳香族环系统（例如氟苯或二氟苯）或氢原子（d 间隔区）取代。

[0199] 在本发明的一些方面，免疫刺激性寡核苷酸可含有经修饰的鸟嘌呤。经修饰的鸟嘌呤是鸟嘌呤的天然存在或非天然存在的嘌呤碱基类似物，其可替代此碱基而不损害寡核苷酸的免疫刺激活性。经修饰鸟嘌呤包括（但不限于）7- 去氮鸟嘌呤、7- 去氮 -7- 经取代鸟嘌呤、次黄嘌呤、N2- 经取代鸟嘌呤（例如 N2- 甲基 - 鸟嘌呤）、5- 氨基 -3- 甲基 -3H, 6H- 噻唑并 [4, 5-d] 嘧啶 -2, 7- 二酮、2, 6- 二氨基嘌呤、2- 氨基嘌呤、嘌呤、吡咯、腺嘌呤、经取代腺嘌呤（例如 N6- 甲基 - 腺嘌呤、8- 侧氧基 - 腺嘌呤）、8- 经取代鸟嘌呤（例如 8- 羟基鸟嘌呤及 8- 溴鸟嘌呤）、及 6- 硫鸟嘌呤。在本发明的另一实施例中，鸟嘌呤碱基经通用碱基（例如 4- 甲基 - 吡咯、5- 硝基 - 吡咯、及 K- 碱基）、芳香族环系统（例如苯并咪唑或二氯 - 苯并咪唑、1- 甲基 -1H-[1, 2, 4] 三唑 -3- 甲酰胺）或氢原子（d 间隔区）取代。

[0200] 在某些方面，寡核苷酸可包括经修饰核苷酸间键。此类经修饰键可部分抵抗降解（例如经稳定）。“经稳定的核酸分子”意指核酸分子对活体内降解（例如经由外切或内切核酸酶）具有相对强的抗性。稳定性可随长度或二级结构而变化。长度为数万至数十万碱基的核酸对活体内降解的抗性相对较强。对于较短核酸而言，二级结构可稳定且增强其效应。茎环结构的形成可稳定核酸分子。例如，若核酸的 3' 端对上游区域具有自身互补性而使其可向后折叠并形成茎环结构，则该核酸可变得稳定且呈现更强活性。

[0201] 对于活体内应用而言，核酸优选对降解（例如经由内切及外切核酸酶）具有相对强抗性。已证实，修饰核酸骨架可在活体内施用增强核酸活性。诸如茎环等二级结构可稳定核酸以对抗降解。或者，核酸稳定可经由磷酸酯骨架修饰来实现。优选的经稳定核酸具有至少部分硫代磷酸酯修饰骨架。硫代磷酸酯可使用采用氨基磷酸酯或 H- 磷酸酯化学物质的自动化技术来合成。芳基 - 及烷基 - 磷酸酯可如（例如）美国专利第 4, 469, 863 号中所述来制备；且烷基磷酸三酯（其中带电氧部分如美国专利第 5, 023, 243 号及欧洲专利第 092, 574 号中所述经烷基化）可通过自动化固相合成使用市售试剂来制备。已阐述制备其他 DNA 骨架修饰及取代的方法 (Uhlmann, E. 及 Peyman, A. (1990) Chem. Rev. 90 :544 ;

Goodchild, J. (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:165)。具有 CpG 基序的 2'-O-甲基核酸也造成免疫激活,与乙氧基修饰的 CpG 核酸一样。事实上,尚未发现任何骨架修饰可完全消除 CpG 效应,但可通过用 5-甲基 C 替代 C 来显著降低该效应。具有硫代磷酸酯键的构造提供最大活性且保护核酸免受细胞内外切及内切核酸酶降解。其他经修饰核酸包括磷酸二酯修饰核酸、磷酸二酯与硫代磷酸酯核酸的组合、甲基磷酸酯、甲基硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、p-乙氧基、及其组合。此类组合中每种及其对免疫细胞的特定影响就 CpG 核酸而言更详细地论述于 PCT 公开第 W096/02555 号及第 W0 98/18810 号及美国专利第 6,194,388 号及第 6,239,116 号中。此类经修饰核酸由于增强的核酸酶抗性、提高的细胞摄取、通过的蛋白质结合和 / 或改变了的细胞内定位而被认为可显示更强的刺激活性。

[0202] 对于体内施用,核酸可与某种分子结合,该分子可导致与靶细胞(例如树突细胞、B 细胞、单核细胞及天然杀伤(NK)细胞)表面的较高亲和力结合和 / 或提高靶细胞的细胞摄取,从而形成“核酸递送复合物”。可使用本领域熟知的技术使核酸以离子方式或共价方式与适宜分子结合。可使用多种偶合或交联剂,例如蛋白质 A、碳化二亚胺、及 3-(2-吡啶基二硫)丙酸 N-琥珀酰亚胺基酯(SPDP)。或者可使用常规技术将核酸囊封于脂质体或病毒体中。

[0203] 其他经稳定核酸包括(但不限于)非离子型 DNA 类似物,例如烷基-及芳基-磷酸酯(其中带电磷酸酯氧经烷基或芳基替代)、磷酸二酯及烷基磷酸三酯(其中带电氧部分经烷基化)。在一端或两端含有二醇(例如四乙二醇或六乙二醇)的核酸也已表达可实质上抵抗核酸酶降解。在一些实施例中,本发明免疫刺激性寡核苷酸可包括至少一种亲脂性经取代核苷酸类似物和 / 或嘧啶-嘌呤二核苷酸。

[0204] 寡核苷酸可具有一个或两个可及 5' 端。可产生具有两个可及 5' 端的经修饰寡核苷酸,其是通过(例如)经 3'-3' 键附着两个寡核苷酸以生成具有一个或两个可及 5' 端的寡核苷酸来实现。3'-3' 键可为磷酸二酯、硫代磷酸酯或任何其他经修饰核苷间桥。实现此类键的方法为本领域技术人员所熟知。例如,此类键已阐述于以下文献中: Seliger, H. 等人, *Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'-and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression*, *Nucleosides&Nucleotides*(1991), 10(1-3), 469-77; 及 Jiang 等人, *Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties*, *Bioorganic&Medicinal Chemistry*(1999), 7(12), 2727-2735。

[0205] 此外,可使用诸如三-或四-乙二醇磷酸酯部分等其他间隔区来制备 3' 端核苷之间的键并非磷酸二酯、硫代磷酸酯或其他经修饰桥的 3'-3' 连接寡核苷酸(Durand, M. 等人, *Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one(dA)₁₂and two(dT)₁₂sequences bridged by two hexaethylene glycol chains*, *Biochemistry*(1992), 31(38), 9197-204; 美国专利第 5,658,738 号及美国专利第 5,668,265 号)。或者,非核苷酸接头可使用标准亚磷酰胺化学而从乙二醇、丙二醇或无碱基去氧核糖(d 间隔区)单元获得(Fontanel, Marie Laurence 等人, *Nucleic Acids Research*(1994), 22(11), 2022-7)。可一次或多次纳入非核苷酸接头,或可将其彼此组合,从而使得要连接的两个寡核苷酸的 3' 端之间可存在任何期望的距离。

[0206] 可通过经修饰核苷间桥来替代位于核苷 3' 和 / 或 5' 端的核苷间磷酸二酯桥,其

中经修饰核苷间桥选自(例如)硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、 NR_1R_2 -胺基磷酸酯、硼烷磷酸酯、 α -羟基苄基磷酸酯、磷酸-(C_1 - C_{21})-O-烷基酯、磷酸-[(C_6 - C_{12})芳基-(C_1 - C_{21})-O-烷基]酯、(C_1 - C_8)烷基磷酸酯和/或(C_6 - C_{12})芳基磷酸酯桥、(C_7 - C_{12})- α -羟基甲基-芳基(例如揭示于PCT公开第W095/01363号中的),其中(C_6 - C_{12})芳基、(C_6 - C_{20})芳基及(C_6 - C_{14})芳基任选经卤素、烷基、烷氧基、硝基、氰基取代且其中 R_1 及 R_2 彼此独立地为氢、(C_1 - C_{18})-烷基、(C_6 - C_{20})-芳基、(C_6 - C_{14})-芳基、(C_1 - C_8)-烷基,优选为氢、(C_1 - C_8)-烷基,优选为(C_1 - C_4)-烷基和/或甲氧基乙基,或 R_1 及 R_2 与携带其的氮原子一起形成可另外含有选自O、S及N的群的另一杂原子的5元或6元杂环。

[0207] 通过去磷桥来替代位于核苷3'和/或5'端的磷酸二酯桥(去磷桥阐述于(例如)以下文献中:Uhlmann E.及Peyman A.,“Methods in Molecular Biology”,第20卷,“Protocols for Oligonucleotides and Analogs”,S. Agrawal编辑,Humana Press,Totowa 1993,第16章,第355页以后),其中去磷桥选自(例如)以下去磷桥:甲缩醛、3'-硫代甲缩醛、甲基羟胺、胍、亚甲基二甲基-亚胍基、二甲砷和/或甲硅烷基。

[0208] 本发明的免疫刺激性寡核苷酸可任选具有嵌合骨架。嵌合骨架是包含不止一种类型的键的骨架。在一个实施例中,嵌合骨架可由下式表示: $5' \text{ Y1N1ZN2Y2 } 3'$ 。Y1及Y2是具有1至10个核苷酸的核酸分子。Y1及Y2各自包括至少一个经修饰核苷酸间键。由于嵌合寡核苷酸中至少2个核苷酸包括骨架修饰,因而此类核酸是一类“经稳定免疫刺激性核酸”的实例。

[0209] 对于嵌合寡核苷酸而言,应认为Y1与Y2彼此独立。此意指在同一分子中,Y1及Y2可各自具有或不具有彼此不同的序列及彼此不同的骨架键。在一些实施例中,Y1和/或Y2具有3至8个核苷酸。N1及N2是具有0至5个核苷酸的核酸分子,只要N1ZN2总共有至少6个核苷酸即可。N1ZN2的核苷酸具有磷酸二酯骨架且不包括具有经修饰骨架的核酸。Z是免疫刺激性核酸基序,其优选选自本文所述的那些。

[0210] 式Y1N1ZN2Y2的中心核苷酸(N1ZN2)具有磷酸二酯核苷酸间键,且Y1及Y2具有至少一个经修饰核苷酸间键,但可能具有不止一个经修饰核苷酸间键,或甚至可具有所有经修饰核苷酸间键。在优选实施例中,Y1和/或Y2具有至少两个或2个至5个经修饰核苷酸间键,或Y1具有5个经修饰核苷酸间键且Y2具有2个经修饰核苷酸间键。在一些实施例中,经修饰核苷酸间键是硫代磷酸酯修饰键、二硫代磷酸酯键或p-乙氧基修饰键。

[0211] 核酸也包括骨架糖共价附着至除2'位的羟基及5'位的磷酸酯基团以外的低分子量有机基团的核酸。因此,经修饰核酸可包括'-O-烷基化核糖基团。此外,经修饰核酸可包括诸如阿拉伯糖或2'-氟阿拉伯糖等糖来代替核糖。因此,各核酸可具有不同骨架组成,由此含有任何可能组合的连接在一起的聚合物单元,例如肽-核酸(其具有氨基酸骨架及核酸碱基)。在一些实施例中,各核酸具有相同骨架组成。

[0212] 糖磷酸酯骨架(即,糖磷酸酯骨架由糖磷酸酯单元组成)的糖磷酸酯单元(即 β -D-核糖与核苷间磷酸二酯桥一起形成糖磷酸酯单元)可由另一单元替代,其中所述另一单元适于例如构建“吗啉基-衍生物”寡聚物(如(例如)Stirchak E. P.等人,(1989)Nucleic Acid Res. 17:6129-41中所述),即,例如,由吗啉基-衍生物替代;或构建聚酰胺核酸(“PNA”;如(例如)Nielsen P. E.等人,(1994)Bioconjug. Chem. 5:3-7中所述),例如,由PNA骨架单元、例如2-氨基乙基甘氨酸替代。寡核苷酸可具有其他碳水化合物骨架

修饰及替代,例如具有磷酸酯基团的肽核酸 (PHONA)、锁核酸 (LNA)、及骨架区段具有烷基接头或胺基接头的寡核苷酸。烷基接头可具有支链或无支链,经取代或未经取代,且为手性纯或外消旋混合物。

[0213] β -核糖单元或 β -D-2' 去氧核糖单元可由经修饰糖单元来替代,其中所述经修饰糖单元选自(例如) β -D-核糖、 α -D-2' 去氧核糖、L-2' 去氧核糖、2' -F-2' 去氧核糖、2' -F-阿拉伯糖、' -O-(C₁-C₆) 烷基-核糖,优选' -O-(C₁-C₆) 烷基-核糖是 2' -O-甲基核糖、' -O-(C₁-C₆) 烯基-核糖、2' -[O-(C₁-C₆) 烷基-O-(C₁-C₆) 烷基]-核糖、2' -NH₂-2' 去氧核糖、 β -D-木-呋喃糖、 α -阿拉伯呋喃糖、2,4-二去氧- β -D-赤藓-己-吡喃糖、及碳环(例如 Froehler J. (1992) Am. Chem. Soc. 114 :8320 中所述)和/或开链糖类类似物(例如 Vandendriessche 等人 (1993), Tetrahedron 49 :7223 中所述)和/或二环糖类类似物(例如 Tarkov M. 等人 (1993), Helv. Chim. Acta. 76 :481 中所述)。

[0214] 在一些实施例中,糖是 2' -O-甲基核糖,对于一个或两个通过磷酸二酯或磷酸二酯样核苷间键连接的核苷酸而言尤其如此。

[0215] 本发明寡核苷酸可使用多种本领域熟知程序中的任一种来从头合成。例如,b-氰基乙基亚磷酸胺方法 (Beaucage, S. L. 及 Caruthers, M. H., (1981) Tet. Let. 22 :1589); 核苷 H-磷酸酯方法 (Garegg 等人, (1986) Tet. Let. 27 :4051-4054; Froehler 等人, (1986) Nucl. Acid Res. 14 :5399-5407; Garegg 等人, (1986) 27 :4055-4058; Gaffney 等人, (1988) Tet. Let. 29 :2619-2622)。此类化学方法可通过多种市售自动化核酸合成仪来实施。此类寡核苷酸称作合成寡核苷酸。或者,可在质粒中大规模制造富含 T 的核酸和/或 TG 二核苷酸(参见 Sambrook T. 等人, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989), 并将其分离成较小部分或以完整形式施用。可从现有核酸序列(例如基因组 DNA 或 cDNA) 使用已知技术来制备核酸,例如采用限制性酶、外切核酸酶或内切核酸酶的那些技术。

[0216] 诸如硫代磷酸酯等经修饰骨架可使用采用氨基磷酸酯或 H-磷酸酯化学物质的自动化技术来合成。芳基-及烷基-磷酸酯可如(例如)美国专利第 4,469,863 号中所述来制备,且烷基磷酸三酯(其中带电氧部分是如美国专利第 5,023,243 号中所述来烷基化)可通过自动化固相合成使用市售试剂来制备。已阐述制备其他 DNA 骨架修饰及取代的方法(例如 Uhlmann, E. 及 Peyman, A., Chem. Rev. 90 :544, 1990; Goodchild, J., Bioconjugate Chem. 1 :165, 1990)。

[0217] 以此方式制备的核酸称为分离的核酸。“分离的核酸”通常是指与一起自细胞、自细胞核、自线粒体或自染色质分离的组份及任何其他可视作杂质的组份分开的核酸。

[0218] 在一些实施例中,可按照本领域技术人员所熟知的方法(参见例如 PCT 公开案第 WO 03/024480 号)将含 CpG 寡核苷酸与免疫原性载体简单地混合。在本发明的其他实施例中,可将含 CpG 寡核苷酸封装于 VLP 内(参见例如 PCT 公开案第 WO 03/024481 号)。

[0219] 在本发明上下文中佐剂的实例包括明矾;含 CpG 寡核苷酸,例如 CpG7909、CpG 10103 及 CpG 24555;及基于皂苷的佐剂,例如免疫刺激复合物基质,其可单独或组合使用。

[0220] 因此,本发明提供包含抗原性 tau 肽及至少一种佐剂的免疫原性组合物,所述抗原性 tau 肽优选包含选自由 SEQ ID NO :1 至 26、31 至 76 及 105 至 122 组成的组的氨基酸序列。所述抗原性 tau 肽优选连接至免疫原性载体,优选连接至 VLP,更优选连接至 HBsAg、

HBcAg 或 Qbeta VLP。在一个实施例中,所述佐剂是基于皂苷的佐剂,优选为免疫刺激复合物基质。在另一实施例中,所述佐剂是明矾。在又一实施例中,所述佐剂含 CpG 寡核苷酸。优选地,所述佐剂是 CpG 7909 或 CpG 10103。更优选,所述佐剂是 CpG 24555。

[0221] 在又一实施例中,所述至少一种佐剂包含两种佐剂,其优选选自下列组成的组:明矾、基于皂苷的佐剂及含 CpG 寡核苷酸。在一优选实施例中,此类佐剂是明矾及含 CpG 寡核苷酸,优选为 CpG 7909,优选为 CpG10103,更优选为 CpG 24555。在另一优选实施例中,此类佐剂是基于皂苷的佐剂,优选为免疫刺激复合物基质;及含 CpG 寡核苷酸,优选为 CpG7909,优选为 CpG 10103,更优选为 CpG 24555。在另一优选实施例中,此类佐剂是明矾及基于皂苷的佐剂,优选为免疫刺激复合物基质。

[0222] 在又一实施例中,所述至少一种佐剂包含三种佐剂,其优选选自下列组成的组:明矾;基于皂苷的佐剂,优选为免疫刺激复合物基质;及含 CpG 寡核苷酸,例如 CpG 7909、CpG 10103 及 CpG 24555。

[0223] 配制品

[0224] 本发明还提供包含本发明抗原性 tau 肽或其免疫原性组合物的药物组合物,其是与一或多种药物可接受的赋形剂的配制品形式。术语“赋形剂”在本文中用以描述除活性成份以外的任何成份,活性成份即为最终偶合至免疫原性载体且任选与一或多种佐剂组合的本发明抗原性 tau 肽。对赋形剂的选择在很大程度上取决于(例如)以下因素:具体施用方式、赋形剂对溶解性及稳定性的影响、及剂型的性质。本文所用的“药物可接受的赋形剂”包括任何及所有生理上相容的溶剂、分散介质、涂布剂、抗细菌剂及抗真菌剂、等渗剂及吸收延迟剂、及诸如此类。药物可接受的赋形剂的一些实例有水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇及诸如此类、以及其组合。在许多情形下,优选将等渗剂,例如,糖、多元醇(例如,甘露醇、山梨醇)或氯化钠纳入组合物中。药物可接受的物质的其他实例有润湿剂或少量辅助物质,诸如润湿或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其可延长活性成份的存储寿命或增强其效力。

[0225] 本发明的药物组合物及其制备方法易于为本领域技术人员所了解。此类组合物及其制备方法可参见(例如)Remington's Pharmaceutical Sciences,第19版(Mack 出版公司,1995)。药物组合物优选在 GMP 条件下制造。

[0226] 本发明的药物组合物可以散装形式、作为单一单位剂量或作为多个单一单位剂量加以制备、包装或出售。本文所用的“单位剂量”是包含预定量活性成份的药物组合物的离散量。活性成份的量通常等于要施用个体的活性成份的剂量或此一剂量的适宜分数(例如,此一剂量的二分之一或三分之一)。

[0227] 本发明的药物组合物通常适于非经肠施用。本文所用的药物组合物的“非经肠施用”包括特征在于个体组织的物理破裂及通过组织中的裂口施用药物组合物,由此通常直接施用至血流、肌肉或内脏器官中的任何施用途径。因此,非经肠施用包括(但不限于)通过注射组合物、通过经外科切口施用组合物、通过经穿透组织的非外科伤口施用组合物及诸如此类等方式施用药物组合物。具体而言,预期非经肠施用包括(但不限于)皮下、腹腔内、肌内、胸骨内、静脉内、动脉内、鞘内、心室内、尿道内、颅内、滑膜内注射或输注;及肾透析输注技术。优选实例包括静脉内、皮下、皮内及肌内途径。

[0228] 适于非经肠施用的药物组合物的配制品通常包含活性成份与药物可接受的载剂

(例如无菌水或无菌等渗盐水)的组合。此类配制品可以适于推注施用或持续施用的形式加以制备、包装或出售。可注射配制品可以存于例如含有防腐剂的安瓿或多剂量容器中的单位剂型加以制备、包装或出售。用于非经肠施用的配制品包括(但不限于)存于油性或水性媒剂中的悬浮液、溶液、乳液、糊剂及诸如此类。此类配制品可进一步包含一或多种其他成份,包括但不限于悬浮剂、稳定剂或分散剂。在用于非经肠施用的配制品的一个实施例中,活性成份是以干燥(即粉末或颗粒)形式提供以使用适宜媒剂(例如无菌无热原水)进行重构,随后非经肠施用重构的组合物。非经肠配制品还包括水性溶液,其可含有赋形剂(例如盐、碳水化合物)及缓冲剂(优选至3至9的pH),但对于一些应用,可能更适合将其调配成无菌非水性溶液或调配成干燥形式从而和适宜的媒剂(例如无菌无热原水)结合使用。示例性非经肠施用形式包括存于无菌水性溶液(例如,水性丙二醇或右旋糖溶液)中的溶液或悬浮液。若需要,此类剂型可适当地进行缓冲。其他可用的可非经肠施用的配制品包括含有呈微晶形式或脂质体制剂形式的活性成份的配制品。用于非经肠施用的配制品可经调配而能够直接释放和/或改良释放。改良释放配制品包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、受控释放、靶向释放及程序性释放。

[0229] 例如,在一个方面,无菌可注射溶液可通过将所需量的抗原性 tau 肽(优选偶合至免疫原性载体,最终与一或多种佐剂组合)纳入于任选含有一种上文所列举成份或各成份组合的合适溶剂中随后进行无菌过滤来制备。通常,可通过将活性化合物纳入于含有基本分散介质及所需的选自上文所列举成份的其他成份的无菌媒剂中来制备分散液。对于使用无菌粉末来制备无菌可注射溶液来说,优选的制备方法是真空干燥及冷冻干燥,这可产生由活性成份及任何所需附加成份(来自其先前经无菌过滤的溶液)构成的粉末。可通过(例如)使用诸如卵磷脂等包衣、通过保持所需粒径(对于分散液来说)以及通过使用表面活性剂来保持溶液的适当流动性。可通过将可延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸盐及明胶)纳入组合物中来延长可注射组合物的吸收。

[0230] 本发明的示例性非限制性药物组合物是呈无菌水性溶液形式的配制品,所述无菌水性溶液的pH介于约5.0至约6.5之间且包含约1mg/mL至约200mg/mL的本发明肽、约1毫摩尔至约100毫摩尔组氨酸缓冲剂、约0.01mg/mL至约10mg/mL聚山梨酯80、约100毫摩尔至约400毫摩尔海藻糖及约0.01毫摩尔至约1.0毫摩尔二水EDTA二钠。

[0231] 本发明的抗原性 tau 肽还可以下列方式来施用:经鼻内或通过吸入,通常以干燥粉末形式(单独、作为混合物、或作为混合组份颗粒,例如,与适宜的药物可接受的赋形剂混合)自干燥粉末吸入器施用;作为气溶胶喷雾自加压容器、帮浦、喷射器、雾化器(优选是使用电流体动力学以生成细雾的雾化器)、或喷雾器施用(其中使用或不使用适宜推进剂);或作为滴鼻剂。该加压容器、帮浦、喷射器、雾化器或喷雾器通常含有本发明组合物的溶液或悬浮液,本发明组合物包含(例如)适宜的分散剂、增溶剂或延长活性物质释放的试剂、及推进剂作为溶剂。

[0232] 在干燥粉末或悬浮液配制品中使用之前,通常将药品微粉化至适于通过吸入递送的大小(通常小于5微米)。这可通过任一适宜粉碎方法来实现,例如螺旋喷射研磨、流化床喷射研磨、超临界流体处理以形成奈米粒子、高压均质化或喷雾干燥。

[0233] 用于吸入器或吹入器中的胶囊、泡罩及药筒可经调配而含有本发明化合物、适宜粉末基质及性能改良剂的粉末混合物。

[0234] 适用于使用电流体动力学以生成细雾的雾化器的溶液配制品每次喷射可含有适宜剂量的本发明的抗原性 tau 肽,且喷射体积可在例如 1 μ l 至 100 μ l 间变化。

[0235] 可将适宜调味剂(例如薄荷醇及左薄荷醇)或甜味剂(例如糖精或糖精钠)添加至那些要用于吸入/鼻内施用的本发明配制品中。

[0236] 用于吸入/鼻内施用的配制品可经调配而能够直接释放和/或改良释放。改良释放的配制品包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、受控释放、靶向释放及程序性释放。

[0237] 在干燥粉末吸入剂及气溶胶的情形中,剂量单位是借助递送计量量的阀来确定的。本发明的单位通常经过设置以施用计量剂量或“喷雾量(puff)”的本发明组合物。总的日剂量通常以单次剂量或更通常以分次剂量全天施用。

[0238] 包含抗原性 tau 肽的药物组合物还可调配用于口服途径施用。口服施用可包括吞咽(以使化合物进入胃肠道)和/或口腔、舌或舌下施用(由此,该化合物可直接自口腔进入血流)。

[0239] 适于口服施用的配制品包括固体、半固体及液体系统(例如,锭剂);含有多颗粒或奈米颗粒、液体或粉末的软质或硬质胶囊;糖锭(包括填充有液体者);咀嚼锭;凝胶剂;快速分散剂型;薄膜;阴道锭;喷雾剂;及口腔/粘膜粘着性贴片。

[0240] 液体配制品包括悬浮液、溶液、糖浆剂及酞剂。此类配制品可作为软质或硬质胶囊(例如,由明胶或羟丙基甲基纤维素制成)内的填充剂使用,且通常包含载剂(例如,水、乙醇、聚乙二醇、丙二醇、甲基纤维素或适宜油)及一或多种乳化剂和/或悬浮剂。液体配制品还可通过(例如)对药袋中的固体实施重构来制得。

[0241] 剂量

[0242] 本发明组合物可用于治疗、减轻或预防个体的 tau 相关病症或症状,该个体具有患所述病症或症状的风险或患有该病症或症状,这通过实施免疫疗法刺激所述个体中的免疫应答来进行。免疫疗法可包含初始免疫及随后的额外(例如一次、两次、三次或更多次)加强免疫。

[0243] 本发明抗原性 tau 肽或其组合物的“免疫有效量”是以单次剂量或作为一系列的一部分递送至哺乳动物个体以在该个体中有效诱导针对致病形式 tau 的免疫应答的量。所述量根据以下因素而有所变化:所治疗个体的健康及身体状况、所治疗个体的分类学群组、个体免疫系统引发体液和/或细胞免疫应答的能力、疫苗配制品及其他相关因素。预期所述量在相对较宽的范围内,且所述范围可通过合适试验来确定。

[0244] “医药有效剂量”或“治疗有效剂量”是治疗或预防、或减轻个体的一或多种 tau 相关病症或症状所需要的剂量。医药有效剂量可根据以下因素而定:施用的特定化合物、症状的严重程度、个体对副作用的感受性、疾病类型、所使用的组合物、施用途径、所治疗哺乳动物的类型、所考虑特定哺乳动物的身体特征,例如健康及身体状况、同时实施的药物治疗、个体免疫系统的能力、所期望的保护程度及本领域技术人员认识到的其他因素。出于预防目的,将典型疫苗中诱导免疫保护性应答而无明显不利副作用的量选择作为每一剂量中肽的量。初始疫苗接种后,个体可以适当的间隔来接受一次或多次加强免疫。

[0245] 应了解,用于任何特定患者的特定剂量应根据多种因素而定,所述因素包括所用具体化合物的活性、年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、施用时间、施用途径、排泄速率、药物组合及经受疗法的特定疾病的严重程度。

[0246] 例如,本发明的抗原性 tau 肽(偶合至免疫原性载体)可以以下剂量施用至个体:每次约 0.1 μ g 至约 200mg,例如,约 0.1 μ g 至约 5 μ g、约 5 μ g 至约 10 μ g、约 10 μ g 至约 25 μ g、约 25 μ g 至约 50 μ g、约 50 μ g 至约 100 μ g、约 100 μ g 至约 500 μ g、约 500 μ g 至约 1mg、约 1mg 至约 10mg、约 10mg 至约 50mg、或约 50mg 至约 200mg,且任选在例如 1 周、2 周、3 周、4 周、2 个月、3 个月和 / 或 1 年后施用加强免疫。在一些实施例中,每一剂量的抗原性 tau 肽的量是基于单位体重来确定。例如,在一些实施例中,抗原肽是以下列量施用:每一剂量约 0.5mg/kg 至约 100mg/kg,例如,约 0.5mg/kg 至约 1mg/kg、约 1mg/kg 至约 2mg/kg、约 2mg/kg 至约 3mg/kg、约 3mg/kg 至约 5mg/kg、约 5mg/kg 至约 7mg/kg、约 7mg/kg 至约 10mg/kg、约 10mg/kg 至约 15mg/kg、约 15mg/kg 至约 20mg/kg、约 20mg/kg 至约 25mg/kg、约 25mg/kg 至约 30mg/kg、约 30mg/kg 至约 40mg/kg、约 40mg/kg 至约 50mg/kg、约 50mg/kg 至约 60mg/kg、约 60mg/kg 至约 70mg/kg、约 70mg/kg 至约 80mg/kg、约 80mg/kg 至约 90mg/kg、或约 90mg/kg 至约 100mg/kg、或大于约 100mg/kg。

[0247] 在一些实施例中,施用本发明抗原性 tau 肽的单一剂量。在其他实施例中,施用本发明抗原性 tau 肽的多次剂量。施用频率可根据以下多种因素中任一因素而有所变化:例如,症状的严重程度、所期望的免疫保护程度、组合物是用于预防还是治愈目的等。例如,在一些实施例中,本发明抗原性 tau 肽是以下列频率施用:一个月一次、一个月两次、一个月三次、每隔一周一次(qow)、一周一次(qw)、一周两次(biw)、一周三次(tiw)、一周四次、一周五次、一周六次、每隔一天一次(qod)、一天一次(qd)、一天两次(qid)或一天三次(tid)。当本发明组合物用于预防目的时,其通常以初免剂量(priming dose)及加强剂量来施用。预期加强剂量会适当地间隔开,或优选一年施用一次,或者在循环抗体的含量降低至期望含量以下时施用。加强剂量可由不存在最初免疫原性载体分子的抗原性 tau 肽组成。此类加强构建体可包含替代的免疫原性载体或可不含任何载体。所调配的此类加强组合物可含有或不含佐剂。

[0248] 本发明抗原性 tau 肽的施用持续时间(例如,施用抗原性 tau 肽所经历的时间段)可根据多种因素中的任一因素而变化:例如,患者反应等。例如,抗原性 tau 肽可经以下时间段来施用:约 1 天至约 1 周、约 2 周至约 4 周、约 1 个月至约 2 个月、约 2 个月至约 4 个月、约 4 个月至约 6 个月、约 6 个月至约 8 个月、约 8 个月至约 1 年、约 1 年至约 2 年、或约 2 年至约 4 年、或更长时间。

[0249] 用途及治疗方法

[0250] 本发明还涵盖包含施用本发明抗原性 tau 肽的各种治疗方法。治疗方法包括在个体中诱导针对致病形式的自身 tau 的免疫应答的方法以及预防、减轻或治疗个体的 tau 相关病症或症状的方法。

[0251] 在一个方面,本发明提供治疗、预防或减轻个体的 tau 相关病症或症状的方法,其包括向该个体施用治疗有效量的本发明抗原性 tau 肽或其免疫原性组合物或药物组合物。

[0252] 在另一方面,本发明提供在个体中诱导针对致病形式的自身 tau 的免疫应答的方法,其包括向该个体施用治疗或免疫原性有效量的本发明抗原性 tau 肽或其免疫原性组合物或药物组合物。

[0253] “治疗(treat、treating 及 treatment)”是指减轻或消除生物学病症和 / 或至少一种其伴随症状的方法。本文所用的“减轻”疾病、病症或病状意指降低疾病、病症或病状

的症状的严重程度和 / 或发生频率。此外,在本文中提及“治疗”包括提及治愈性、缓和性及预防性治疗。所述个体优选为人类,且可为任何年龄的男性或女性。

[0254] 本发明的其他方面涉及本发明抗原性 tau 肽或其免疫原性组合物或药物组合物用作药剂,优选用于治疗 tau 相关病症。

[0255] 在再一方面中,本发明提供本发明抗原性 tau 肽或其免疫原性组合物或药物组合物用以制造优选用于治疗 tau 相关病症的药剂的用途。

[0256] 本发明将通过以下实施例进一步阐述,且不应将其视为进一步限制。本发明通篇所引用的所有图及所有参考文献、专利及公开的专利申请的全部内容明确地以引用方式并入本文中。

实施例

[0257] 已经努力确保所用数字(例如量、温度等)的精确性,但应考虑到一些实验误差及偏差。除非另有说明,否则份数是重量份数,分子量是重量平均分子量,温度是以摄氏度计,而压力是大气压力或接近大气压力。如下文实施例中所使用的,下列缩写具有以下含义,且除非另有说明,其均可容易地自商业供应商购得:DMF:二甲基甲酰胺;TFA:三氟乙酸;TIPS:三异丙基甲硅烷基三氟甲磺酸盐;TCEP:叁(2-羧基乙基)膦;mcKLH:海水培养的钥孔血蓝蛋白;HBTU:六氟磷酸 O-苯并三唑-N,N,N'-四甲基-脒鎓盐;EDTA:乙二胺四乙酸;DMSO:二甲基亚砷。

[0258] 实施例 1:Qbeta 质粒构建

[0259] 天然 Qbeta 外壳蛋白:通过 DNA 2.0(DNA 2.0, Menlo Park, CA) 来合成对应于 Qbeta 外壳蛋白核苷酸 1304 至 1705(来自 GenBank 登记号 AY099114)的编码序列。包括引入 NcoI 位点的 5' 修饰(Catgg)及引入两个终止密码子及 XhoI 位点的 3' 修饰(gtaTTAATGACTCGAG-SEQ ID NO:78)。

[0260] 密码子优化的 Qbeta 外壳蛋白:也使用 Gene Designer 针对表达对 Qbeta 外壳蛋白编码序列进行优化(Villalobos 等人, BMC Bioinformatics 7:285(2006))。将相同的 5' 及 3' 修饰纳入至密码子优化的 Qbeta 外壳蛋白中。

[0261] 利用常规的 DNA 亚克隆方法(包括限制酶切消化及连接反应)将天然及密码子优化的 Qbeta 外壳蛋白序列引入 pET28 表达载体中。

[0262] 实施例 2:合成 Tau 肽的制备

[0263] 如下制备 Tau 肽(称为 A-1 至 A-11;B-1 至 B-6;C-1 至 C-5;D-1;E-1 及 F1;以及此类肽的磷酸化形式-表示为 A-1P、A-2P、A-3P 等),此类肽是如 SEQ ID NO. 31-76、105-107 中所示及如下表 5 中所显示,表 5 中还显示以下所有实施例中所用的其对应名称。含有接头序列(CGG 或 GGC)的磷酸化或未磷酸化 tau 肽的合成是使用固相合成技术在 Symphony 肽合成仪(Protein Technologies 公司)上进行。使用经过单保护的氨基酸 Fmoc-Ser[P0(O-Bzl)OH]-OH、Fmoc-Thr[P0(O-Bzl)OH]-OH 及 Fmoc-Tyr[P0(O-Bzl)OH]-OH(EMD Chemicals 公司)将磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸及磷酸酪氨酸纳入磷酸化形式的序列中。通过使含有第一氨基酸的 NovaSyn TGA 树脂(EMD Chemicals 公司)与 6.25 倍过量的经 Fmoc 保护的第二氨基酸(1mmol)(使用 1mmol HBTU 激活 1 小时)混合来开始反应。对于每一氨基酸,偶合反应均重复一次。在存于 DMF 中的 20%六氢吡啶中经 2×5 分钟移除 Fmoc 基团。通过将树脂与 5mL

含有 2.5% TIPS 及 2.5% 苯甲硫醚的 TFA 溶液在室温下一起培育 3 小时自树脂释放合成的肽。在过滤、二乙醚介导的沉淀及真空干燥后,回收粗肽。在配备有 BEH 130 制备型 C18 管柱的反相 HPLC(Waters 2525 Binary Gradient Module) 上对肽实施纯化。流动相由存于水中的 0.1% TFA(作为缓冲液 A) 及存于乙腈中的 0.1% TFA(作为缓冲液 B) 组成。将所收集的含有肽的流份组合并在真空中冻干。自典型注射 100mg 粗肽纯化得到约 20mg 肽,其中纯度高于 95%。利用 LC-MS 验证所有纯化肽。

[0264] 以类似方式合成及纯化其他 tau 肽 (SEQ ID :108-122)。

[0265] 实施例 3 :Qbeta-VLP :表达、纯化及与 tau 肽的偶联

[0266] Qbeta 于大肠杆菌中的表达 :将含有 Qbeta cDNA 的质粒 pET28 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中。将单一菌落接种于 5mL 含有 50 μ g/mL 卡那霉素 (kanamycin) 的 2 \times YT 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 下保持过夜。将过夜接种物稀释于 500mL 含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 TB 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 下于 250rpm 下生长至 0.8OD₆₀₀,并使用 0.4mM IPTG(异丙基 β -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷) 诱导过夜。通过在 2500RCF 下离心 15 分钟来收获细胞。将细胞沉淀物储存于 -80 $^{\circ}$ C 下。

[0267] 自大肠杆菌纯化 Qbeta VLP :所有纯化步骤均在 4 $^{\circ}$ C 下实施。将表达 Qbeta 的细胞沉淀物再悬浮于含有 25mM Tris pH 8.0、150mM NaCl、5mMEDTA、0.1% Triton-100 且补加有蛋白酶抑制剂混合液 (Roche) 的裂解缓冲液中。使再悬浮溶液通过微射流均质机 (Microfluidics 公司),随后超速离心。通过添加硫酸铵至 50% 饱和、随后在 15,000RCF 下离心 30 分钟使蛋白质沉淀。将沉淀物再悬浮并于含有 25mM HEPES pH 7.5、100mM NaCl、1mMEDTA 的缓冲液中于 4 $^{\circ}$ C 下透析过夜。离心所透析的溶液,并随后加载至在 25mM HEPES pH 7.5、100mM NaCl、1mM EDTA 中平衡的 Capto Q 管柱 (GE) 中。洗涤管柱并以存于含有 25mM HEPES pH 7.5、1mM EDTA 的缓冲液中的 100mM NaCl 至 1M NaCl 的梯度运行。使用 SDS-PAGE 鉴定 Qbeta 蛋白质。将含有 Qbeta 的流份在 10mM 磷酸钾 pH 7.4、150mM KCl 中透析过夜,并加载至羟基磷灰石管柱 (II 型, Bio-Rad 公司) 中。洗涤管柱,并使用自 100% 的含有 10mM 磷酸钾 pH 7.5、150mM KCl 的缓冲液至 100% 的含有 500mM 磷酸钾 pH 7.5、0.5M KCl 的缓冲液的梯度进行溶析。集中含有 Qbeta 的流份,透析,并加载至在 25mM Tris-Cl pH 8.0、150mM NaCl、0.7M(NH₄)₂SO₄ 中平衡的苯基管柱中。使用自 100% 的含有 25mM Tris-Cl pH 8.0、150mM NaCl、0.7M(NH₄)₂SO₄ 的缓冲液至 100% 的含有 25mM Tris-Cl pH 8.0、50mM NaCl 的缓冲液的梯度溶析蛋白质。集中含有纯净 Qbeta 的流份,并在 PBS 中于 4 $^{\circ}$ C 下透析过夜。通过 Bradford 分析来测定蛋白质的浓度。

[0268] tau 肽与 Qbeta VLP 的偶合 :借助双功能交联剂 SMPH(琥珀酰亚胺基 -6-[β -马来酰亚胺基丙酰胺基]己酸酯) (Thermo Scientific) 来介导 tau 肽与 Qbeta-VLP 的偶合 (Freer 等人, Virology 322(2) :360-369(2004))。将肽以 10mg/mL 溶解于含有 5mM EDTA 的 PBS (Invitrogen) (pH 7.0) 中,并通过与固定的 TCEP 二硫化物还原凝胶以等体积在室温下一起培育 1 小时来还原。通过在 1000 \times g 下离心 2 分钟来回收肽溶液。通过将存于 PBS (Invitrogen) 中的 2mg/mL Qbeta-VLP 蛋白质与存于 DMSO 中的 7mM SMPH 在室温下一起培育 1 小时来将前者激活。通过以 1000 \times g 经 2 分钟通过 Zeba 除盐离心柱 (Desalt Spin column) (Thermo Scientific) 来除去衍生化 VLP 中的盐分。将激活的 VLP 溶液与 10 倍摩尔过量的还原肽在室温下混合 2 至 3 小时。浓缩反应混合物,并在 PBS 或 25mM 组氨酸 pH

7.4(含有 50mM NaCl) 中于 4°C 下透析过夜。利用 Thermo Scientific 的 Coomassie Plus 蛋白质分析来测定蛋白质的浓度。

[0269] 实施例 4 :肽 -KLH 缀合物的制备

[0270] 使含有 CGG 接头的 tau 肽 A-1P (SEQ ID NO :31) 偶联至 mcKLH (Thermo Scientific, 目录号为 77605) 以评估其在小鼠中的免疫原性。借助双功能交联剂 SMPH (琥珀酰亚胺基 -6-[β - 马来酰亚胺基丙酰胺基] 己酸酯) (Thermo Scientific) 来介导偶联。以存于含有 5mM EDTA 的 PBS pH 7.0 中的 10mg/mL 的 A-1P 肽首先使用等体积的固定化 TCEP 二硫化物还原凝胶, 通过在室温下搅动 1 小时进行处理。通过在 1000×g 下离心 2 分钟, 回收肽溶液。由存于 PBS 中的 10mg/mL KLH 与 200 μL 存于 DMSO 中的 100mMSMPH 在室温下一起培育 1 小时, 将 KLH 激活。使反应混合物通过 Zeba 除盐离心管柱 (Zeba Desalt Spin column, Thermo Scientific)。随后将所收集的衍生化 KLH 与还原 A-1P 在室温下混合 2 小时。将反应混合物在含有 0.6M NaCl 的 PBS 中于 4°C 下透析过夜。利用 Thermo Scientific 的 Coomassie Plus 蛋白质分析法测定蛋白质的浓度。

[0271] 实施例 5 :针对免疫原性及 B 细胞记忆的肽免疫研究

[0272] 进行实验, 以测定示于表 5 的所选肽是否具有免疫原性并确定是否产生免疫记忆。在第 0 天使用肽或偶联至 Qbeta VLP 的肽, 对每组 3 只 Balb/c 小鼠进行初免, 并在第 14 天及第 101 天加强免疫, 但是一些小鼠仅在第 101 天进行初免, 如图 1A、1B 及 2 中所示。在第 28、101、104、108 及 115 天采集血清。在第 94 天采集所选小鼠的血清。利用抗原特异性效价测定分析 (如实施例 13 中所述) 分析免疫动物的抗体应答。

[0273] 抗原特异性 IgG 效价结果概述于图 1B 中, 其利用第 28 天的血清试样显示此类肽具有免疫原性。该研究显示, 当使用 TiterMax Gold (Alexis Biochemicals) 作为佐剂进行免疫时, 肽 A-1、A-1P、B-1P 及 C-1P 具有免疫原性。使用 A-1P 肽及 TiterMax Gold 或使用偶联至 Qbeta-VLP 的 A-1P 初免, 随后在第 14 天使用 A-1P-Qbeta-VLP 加强免疫, 产生的抗体效价大于 A-1P TiterMax 初免加强群组。使用偶联至 KLH 的 A-1P (如实施例 4 中所述来制备) 作为佐剂初免并在第 14 天加强免疫时, 所产生的抗体效价也大于 A-1P TiterMax 初免加强群组。

[0274] 还检测用于免疫的磷酸化肽 (A-1P、B-1P、D-1P、C-1P) 或未磷酸化肽 (A-1) 所引发抗体的选择性。其作法是比较用于免疫的每一种肽的磷酸化及未磷酸化形式的抗体效价 (参见图 1B)。计算特异性效价对非特异性效价的比值。在此实验中, 针对 A-1 的抗体应答 (群组 1) 对为动物免疫接种的肽的磷酸化状态具有选择性 (小于 0.1 倍), 而针对 C-1P 的抗体 (群组 5) 似乎具有选择性 (C-1P/C-1 效价比值大于 7)。群组 2 (A-1P) 不具有选择性。

[0275] 显示 A-1P B 细胞记忆回忆应答的结果显示于图 2 中。将群组 A (使用 A-1P 与 TiterMax 初免, 使用 A-1P-Qbeta-VLP 加强免疫) 及群组 B (使用 A-1P-Qbeta-VLP 初免及加强免疫) 与群组 C 进行比较, 群组 C 在第 101 天使用偶联至 Qbeta-VLP 的 A-1P 初免。所有三个群组均具有 IgM 应答。于第 101 天加强免疫的两个群组中, 在第 104 天检测到 IgG, 但对于在第 101 天初免的群组直至初免后第 7 天才检测到。第 104 天的效价大于第 94 天的效价。第 7 天及第 14 天的 IgG 效价也大于第 101 天初免群组 (群组 C)。在第 108 天及第 115 天群组 A 及 B 的 IgG 效价相同, 而群组 C 的 IgG 效价直至第 115 天才达到峰值。此类数据表明长期抗体应答及 B 细胞记忆回忆。

[0276] 实施例 6 :针对免疫原性的肽初免及肽-VLP 加强免疫研究

[0277] 实施实验以测定当使用以明矾 ($Al(OH)_3$; 铝胶 2%“85”, Brenntag Biosector) 作为佐剂的肽初免、随后使用偶联至 Qbeta-VLP 的肽加强免疫来进行免疫时表 5 中的所选肽是否具有免疫原性。如图 3 中所示,在第 0 天使具有 4 只 Balb/c 小鼠的群组初免,并在第 28 天及第 56 天加强免疫。在第 70 天采集血清。利用抗原特异性效价测定分析(如实施例 13 中所述)对免疫动物的抗体应答进行研究。

[0278] 结果概述于图 3 中。在群组 1-6 中,在所测试的最大稀释度(1:1,749,600)下检测到针对用于免疫的肽的 IgG 抗体,表明对免疫肽抗原具有稳健的抗体应答。在未经治疗群组(群组 7)中未检测到抗体。通过使用肽 D-1P 及 C-1P 免疫而产生的抗体识别肽 E-1P。肽 D-1P 及 C-1P 完全包含于 E-1P 中。

[0279] 检测用于免疫的磷酸化肽(A-1P、B-1P、D-1P、C-1P、E-1P)或未磷酸化肽(A-1)所引发抗体的选择性。此通过测定磷酸化肽的未磷酸化形式与未磷酸化肽的磷酸化形式的抗体效价来实施(参见图 3)。计算特异性效价对非特异性效价的比。在此实验中,针对 D-1P(群组 4)、C-1P(群组 5)及 E-1P(群组 6)的抗体对磷酸化状态的肽(使用其对动物进行免疫)具有选择性(效价比大于 10)。

[0280] 实施例 7 :针对免疫原性的肽-VLP 免疫研究

[0281] 实施实验以测定当使用各种佐剂以 Qbeta-VLP 缀合物进行免疫时表 5 中的所选肽及肽组合是否具有免疫原性。如图 4 中所示,在第 0 天使具有 4 只 TG4510+/+(转基因双阳性,参见 Ramsden 等人, *J. Neuroscience* 25(46):10637(2005))或 TG4510-/(野生型同窝对照)小鼠的群组初免,并在第 56 天及第 28 或 29 天加强免疫。在第 63 天采集血清。利用如实施例 13 中所述的抗原特异性 IgG 效价测定分析对免疫动物的抗体应答进行研究。第 63 天的试样结果概述于图 4 中。在每一群组中,以介于 $7.7E+04$ 至 $1.58E+06$ 范围内的平均效价检测到针对用于免疫的肽或肽组合的抗体(IgG)。使用三种肽-Qbeta-VLP 缀合物以 $100 \mu g$ 或 $10 \mu g$ 的组合进行免疫各自引发的效价与单独使用 $100 \mu g$ 肽-Qbeta-VLP 缀合物进行免疫所引发的效价类似。组合投药群组 1 及 2 的 A-1P、B-1P 及 C-1P 效价是相关单一投药群组(群组 3、4 及 5)的效价的 1.7 至 4.4 倍。组合投药群组 11 及 12 的 A-1P、B-1P 及 C-1P 效价是相关单一投药群组(群组 13、14 及 15)的效价的 0.32 至 2.8 倍。在使用佐剂(明矾、或 CpG-24555(美国临时专利申请第 61/121,022 号,2008 年 12 月 9 日申请)、或 ABISCO-100(Isconova)与 CpG-24555)或不使用佐剂时,检测到抗体。在未经治疗对照中未检测到针对肽的抗体。

[0282] 在所选群组中检测用于免疫的磷酸化肽(A-1P、B-1P、D-1P、C-1P、E-1P)所引发抗体的选择性。此通过测定群组 1-7 中磷酸化肽的未磷酸化形式的抗体效价来实施(图 4)。计算特异性效价对非特异性效价之比。在此实验中,在所有投药群组中,抗体对 B-1P 的选择性优于 B-1(效价比大于 10 倍)。仅在群组 6(不含有明矾的群组)中抗体对 C-1P 的选择性优于 C-1。在群组 2、3 及 6 中,抗体对 A-1P 的选择性优于 A-1,但在群组 1(以明矾作为佐剂使用高剂量组合进行免疫)中并非如此。在未经治疗对照中未检测到针对未磷酸化肽的抗体。

[0283] 实施例 8 :针对途径、佐剂及同种型的肽-VLP 免疫研究

[0284] 实施实验以比较使用不同佐剂及施用途径时所引发抗体的免疫原性及同种型。如

图 5 中所示,在第 0 天使具有 3 只 Balb/c 小鼠的群组初免,并在第 17 天加强免疫。在第 24 天采集血清。利用抗原特异性效价测定分析(如实施例 13 中所述)对免疫动物的抗体应答进行研究。

[0285] 将偶联至 Qbeta-VLP 的 A-1P 经由皮下或肌内注射递送至 BALB/c。还经由肌内途径测试不同抗原组合。使用第 27 天试样的结果概述于图 5 中。皮下及肌内施用偶联至 Qbeta-VLP 且以明矾作为佐剂的 A-1P 均引发 IgG 抗体应答。肌内投药群组 (70) 比皮下投药群组 (11) 具有较大的 A-1P 对 A-1 效价比。这表明施用途径会影响应答的选择性。

[0286] 如图 5 中所示,所用的所有佐剂组合皆引发 IgG1 及 IgG2a 抗体,其中含有明矾的群组的 IgG1 对 IgG2a 比(对于群组 2 及 5,比分别为 21 及 12)远远大于不包括明矾作为佐剂的群组 3 (0.17) 及 4 (0.17)。此与已知的明矾使免疫应答偏向 Th2 型的效应一致(参见 Lindblad, Immunol Cell Biol. 82(5):497-505(2004);Marrack 等人, Nature Rev. 9:287-293(2009))。此类结果表明,可使用佐剂来改变此实施例中所用疫苗的抗体应答。在未经治疗对照中未检测到针对肽的抗体。

[0287] 实施例 9:针对接头分析的肽-VLP 免疫

[0288] 实施实验以测定免疫原性是否受表 5 中所选肽的接头 (CGG 或 GGC) 的位置影响。此处,使用接头位于肽的 N 端(即 SEQ ID NO:31-A-1P)或 C 端(即 SEQ ID NO:41-A-11P)的 A-1P 肽。如下表 1 中所示,在第 0 天使具有 4 只 TG4510+/+ 小鼠的群组初免,并在第 14 天加强免疫。在第 20 天抽取小鼠血液。利用如实施例 13 中所述的抗原特异性效价测定分析对免疫动物的抗体应答进行研究。

[0289] 基于显示于表 1 中的结果,至 Qbeta-VLP 的接头序列可置于 tau 特异性序列的 N 端 (CGG) 或 C 端 (GGC),且仍然引发磷酸化选择性 IgG 应答(效价比大于 10 倍,表 1)。该实验中所用的肽 (SEQ ID NO:31 及 41) 具有相同序列,只是 CGG 接头位于 SEQ ID NO:31 的 N 端,而接头 GGC 位于 SEQ IDNO:41 的 C 端。二者在第 20 天试样中引发类似的 IgG 效价。如表 1 中所示,如通过磷酸化对未磷酸化 IgG 效价比为 49 及大于 132 所测定,由该两个肽序列引发的抗体具有选择性。在第 56 天未经治疗对照(图 4 中的群组 7)中未检测到针对肽的抗体。

[0290] 表 1:经肌内使小鼠免疫。使用 100 μ g 肽-VLP 及 750 μ g 明矾 (Al(OH)₃)。在抗原特异性效价测定分析(参见实施例 13)中测试的血清稀释度介于 1:5,000 至 1:15,800,000 范围内。

[0291]

疫苗	佐剂	小鼠	数量	第20天的IgG效价			选择性
				A-1P IgG (mg/mL)	A-1P效价	A-1效价	A-1P/A-1
A-1P-VLP	明矾	TG4510++	4	0.62	6.85E+05	1.90E+04	49.0
A-11P-VLP	明矾	TG4510++	4	0.42	6.58E+05	<5.00E+03	>132

[0292] 实施例 10:多克隆抗体与截短肽的结合

[0293] 实施实验以测定表 5 中的所选肽是否含有存在于 A-1P、B-1P 或 C-1P (引发针对其的抗体)中的免疫原性表位。如下表 2 中所示,自接种 A-1P、B-1P 或 C-1P 的小鼠采集血清。利用抗原特异性效价测定分析(如实施例 13 中所述)对免疫动物的抗体应答进行研究,其中对数据分析进行以下修正:为未经涂敷孔平均值的两倍的信号视为阳性,而低于未

经涂敷孔平均值的两倍的信号视为阴性。

[0294] 实施 ELISA 以测定来自使用 A-1P、B-1P 或 C-1P 肽的肽-VLP 缀合物进行免疫的动物的抗体是否结合此类肽中的每一者的缩短形式。使用所测试 tau 肽中的每一者作为板抗原 (plate antigen), 且对以 $1 : 4 \times 10^4$ 及 $1 : 4 \times 10^5$ 稀释的来自 A-1P-、B-1P- 或 C-1P-VLP 免疫小鼠的血清进行测试以测定其是否能够结合相关肽 (参见表 3)。先前显示此类血清含有抗原特异性抗体。血清是来自使用相关亲代肽 (对于 A-1P 及衍生物为 A-1P; 对于 B-1P 及衍生物为 B-1P; 对于 C-1P 及 C-1P/E-1P 衍生物为 C-1P) 免疫的小鼠 (参见表 2)。每一抗血清以 2 种稀释度 ($1 : 4 \times 10^4$ 及 $1 : 4 \times 10^5$) 使用。若检测到与肽的结合, 则列为阳性结果。若自任一血清稀释物均未检测到信号, 则列为阴性结果。除 A-5P、A-10P 及 B-2P 外, 所有测试试样皆具有阳性信号, 表明由全长 (亲代) 肽引发的抗体也结合大多数所测试的缩短衍生物。

[0295] 表 2: 经肌肉使小鼠免疫。在列出的情况下使用 $100 \mu\text{g}$ 肽、 $100 \mu\text{g}$ 肽-VLP 及 $750 \mu\text{g}$ 明矾 ($\text{Al}(\text{OH})_3$)。在抗原特异性效价测定分析 (实施例 13) 中测试的每一血清的稀释度为 $1 : 4 \times 10^4$ 及 $1 : 4 \times 10^5$ 。

[0296]

血清	初免(第0天)	加强免疫		小鼠品系	血清采集(天数)
	疫苗	疫苗	天数		
1	A-1P-VLP+明矾	A-1P-VLP+明矾	14、28	TG4510 -/-	42
2	A-1P-VLP+明矾	A-1P-VLP+明矾	14	TG4510 -/-	20
3	B-1P	B-1P-VLP	28、56	Balb/c	70
4	B-1P	B-1P-VLP	28、56	Balb/c	70
5	C-1P-VLP+明矾	C-1P-VLP+明矾	14、28	TG4510 -/-	42
6	C-1P	C-1P-VLP	28、56	Balb/c	70

[0297] 表 3: “阳性”表示该孔的 OD 是背景 (未经涂敷孔) OD 平均值的至少两倍。“阴性”表示该孔的 OD 小于背景 (未经涂敷孔) OD 平均值的两倍。

[0298]

肽	血清 A	血清 B
A-1P	阳性	阳性
A-2P	阳性	阳性
A-4P	阳性	阴性
A-5P	阴性	阴性
A-6P	阳性	阳性
A-7P	阳性	阳性
A-8P	阳性	阳性

A-9P	阳性	阳性
A-10P	阴性	阴性
B-1P	阳性	阳性
B-2P	阴性	阴性
B-3P	阳性	阳性
B-4P	阳性	阴性
B-5P	阳性	阴性
B-6P	阳性	阴性
C-1P	阳性	阳性
C-2P	阳性	阳性
C-3P	阳性	阳性
C-4P	阳性	阳性
C-5P	阳性	阳性

[0299] 实施例 11 :针对免疫原性及记忆的截短肽免疫研究

[0300] 实施两项实验以测定当以 Qbeta-VLP 缀合物进行免疫时表 5 中的所选肽是否具有免疫原性。也利用此类研究之一来测定是否产生免疫记忆。为努力避免肽抗原与 I 类 MHC 及 II 类 MHC T 细胞配体的潜在结合,对 A-1P、B-1P 及 C-1P“亲代”肽的缩短形式进行测试。选择 7 至 11 个氨基酸的肽长度,这是因为 II 类 MHC 分子通常结合具有 13-17 个氨基酸的肽,且 I 类 MHC 结合需要至少 8 个氨基酸的肽长度 (Murphy 等人, Janeway' s Immunobiology, Garland Science (2007))。因此,具有 11 个或较少氨基酸的肽不应诱导 II 类 MHC 限制性 CD4T 细胞应答,而具有 7 个氨基酸的肽不应诱导 CD4T 细胞应答,也不应诱导 I 类 MHC 限制性 CD8T 细胞应答。还对长度为 7 个氨基酸的肽 F-1P 进行测试。如图 6 中所示,在第 0 天使具有 3 或 6 只 Balb/c 小鼠的群组初免,并在第 14 天加强免疫。三个群组也在第 108 天加强免疫,且三个群组在第 108 天初免 (参见图 7)。在第 21 天、或第 28 天、或第 111 天、第 115 天及第 122 天或第 21 天、第 105 天、第 111 天、第 115 天及第 122 天采集血清。利用抗原特异性效价测定分析 (如实施例 13 中所述) 对免疫动物的抗体应答进行研究。

[0301] 结果概述于图 6 中。除 B-5P 外,所有肽-Qbeta-VLP 缀合物皆在所有 ELISA 测试小鼠中引发抗原特异性 IgG 抗体,对于 B-5P,3 只小鼠中仅有 2 只小鼠在 1 : 15,800 的血清稀释度下具有可检测抗体。这些结果表明,具有 CGG 接头的具有 7 至 11 个氨基酸的 tau 肽具有免疫原性且能够引发对免疫原具有特异性的抗体。

[0302] 检测用于免疫的磷酸化肽形式所引发抗体的选择性 (参见图 6)。大多数此类肽对

磷酸化形式的肽的选择性优于未磷酸化形式（效价比大于 10 倍）。当以未磷酸化形式的免疫肽用作板抗原时，许多缩短的 A-1P、B-1P 及 C-1P 衍生物不产生可检测的 ELISA 信号。许多缩短的 A-1P、B-1P 及 C-1P 衍生物的选择性等于或大于亲代肽。已报导，在 JN L3 Tau P301L 过表达动物模型中，不具有 CGG 接头的肽 A-2P 的主动免疫会降低脑中的聚集 Tau 并减缓缠结相关性感觉运动损伤的进展 (Asuni 等人, *J. Neurosci.* 27 :9115(2007))。偶联至 Qbeta-VLP 的 A-2P 具有免疫原性。然而，在 ELISA 分析中，所引发抗体对磷酸化形式的肽 (A-2P) 相对于未磷酸化形式的肽 (A-2) 不具有选择性 (A-2P/A-2 效价比为 1.7)。相比之下，此类抗体对 A-1P 的选择性优于 A-1 (A-1P/A-1 效价比大于 10.0)。使用 A-2P 及 A-1P 作为 ELISA 抗原时，效价相同。此表明，大多数非磷酸特异性抗体 (non-phosphospecific antibody) 的表位包括肽 A-2P 的 12 个氨基酸，此 12 个氨基酸并不包含于 A-1P 中。在此实验中，不使用明矾作为佐剂比使用明矾作为佐剂进行测试（分别为群组 14 及 10）时，C-1P 具有较高选择性。可使用佐剂（例如明矾）来改变对磷酸化与未磷酸化肽的选择性。在未经治疗对照中未检测到针对肽的抗体。此类结果表明，具有 CGG 接头的具有 7 至 11 个氨基酸的 tau 肽能够引发磷酸 - 肽选择性抗体。

[0303] 测试 A-1P、B-1P 及 C-1P 的记忆回忆应答的结果显示于图 7 中。将在第 0、14 及 108 天初免及加强免疫的肽 -Qbeta-VLP 免疫小鼠第 111 天、第 115 天及第 122 天（距最后一次免疫分别为 +3 天、+7 天及 +14 天）的 IgG 效价与那些在第 108 天初免的小鼠的 IgG 效价进行比较。群组 1、2 及 3 在第 105 天、最后一次加强免疫后 84 天具有较高 IgG 效价。与第 108 天初免群组（群组 4、5 及 6）相比，此类群组在第 111 天与第 115 天期间也具有较大的 IgG 效价增加。此类数据表明长期抗体应答及记忆回忆。

[0304] 实施例 12：与明矾组合及不与明矾组合时针对免疫原性及 T 细胞应答的截短肽免疫研究

[0305] 实施实验以测定当使用 100 μ g Qbeta-VLP 缀合物与 0 或 504 μ g 明矾 ($Al(OH)_3$) 进行免疫时或当以肽 -Qbeta-VLP 缀合物与明矾的组合形式或以肽 -Qbeta-VLP 缀合物形式施用时衍生自 A-1P、B-1P 及 C-1P 的肽（表 5）是否具有免疫原性。还分析脾中的 T 细胞应答。如图 8 中所示，在第 0 天使具有 3 只 TG4510^{-/-} 野生型同窝小鼠的群组初免，并在第 14 天加强免疫。在第 21 天采集血清及脾。利用抗原特异性效价测定分析（如实施例 13 中所述）及 IFN- γ ELISPOT 分析（如实施例 14 中所述）对免疫动物的抗体应答进行研究。

[0306] 抗原特异性 IgG 效价显示，当使用 504 μ g 明矾 ($Al(OH)_3$) 或不使用明矾以 Qbeta-VLP 缀合物进行免疫时，所有测试肽皆具有免疫原性（参见图 8）。使用 A-8P、B-3P 及 C-2P 与总共 750 μ g 明矾的组合以 300 μ g 肽 -Qbeta-VLP 缀合物进行免疫对所有 3 种肽皆产生选择性抗体应答。

[0307] 通过 ELISA 来检测用于免疫的磷酸化肽与未磷酸化形式的肽所引发抗体的选择性（图 8）。计算特异性效价对非特异性效价之比，其中较大比值表示较高选择性。不管在初免及加强免疫中是否包括明矾，也不管肽 -Qbeta-VLP 缀合物是单独抑或以组合形式进行免疫，所引发抗体对磷酸化形式的肽具有选择性。

[0308] 利用 IFN- γ ELISPOT 分析来分析使用单一肽 Qbeta-VLP 免疫后脾中的 T 细胞应答（参见图 9）。在第 21 天、最后一次肽 Qbeta-VLP 加强免疫后 7 天分析分泌对亲代 tau 肽 (A-1P、B-1P、C-1P) 及其对应截短形式具有特异性的 IFN- γ 的 T 细胞的频率。相对于无关肽

对照 (HBV-1), 在使用 B-3P-Qbeta-VLP 及 C-2P-Qbeta-VLP 于存在或不存在明矾下免疫后, 未产生大量分泌对 B-1P、B-1、B-3P、B-3、C-1P、C-1、C-2P 或 C-2 具有特异性的 IFN- γ 的 T 细胞。在使用 A-3P-Qbeta-VLP 免疫后, 诱导显著 ($p < 0.05$) 程度的 A-3P 特异性 IFN- γ T 细胞应答。A-3P 肽含有预测的小鼠 I 类 MHC Kb 结合表位 (IVYKSPVV, 参见 Lundegaard 等人, *Bioinformatics* 24:1397-1398(2008)), 且该表位可能促成 A-3P 免疫动物中所观察到的 T 细胞应答。此表位还存在于 A-1P、A-1、A-2P、A-2 及 A-3 中。当将 A-1P 肽缩短成长度为 7 个氨基酸的肽 (A-8P Qbeta-VLP) 时, A-8P Qbeta-VLP 免疫小鼠中的 IFN- γ 特异性 T 细胞应答降低至背景层面。

[0309] CD4T 辅助细胞为产生同种型转换抗体应答及产生记忆 B 细胞所需要 (参见 Murphy 等人, *Janway's Immunobiology*, Garland Science, (2007))。因此, 在使用截短型磷酸-tau 肽 Qbeta-VLP 免疫后产生的 IgG 抗体应答对应于其各自肽表位的发现表明, CD4T 辅助应答是针对疫苗而诱导。由于在使用截短肽缀合物免疫后未产生显著含量的 tau-肽特异性 T 细胞, 故测试对疫苗另一组份的 T 细胞应答。对 VLP 蛋白质的 T 细胞应答的分析显示, IFN-特异性 T 细胞是针对 VLP 表位而产生 (4-15 倍高于无关蛋白质对照 (BSA, Sigma Aldrich A9418))。

[0310] 实施例 13: 抗原特异性抗体效价测定

[0311] 利用以下分析来测定如上文实施例 5-12 所述的免疫动物的抗体应答。

[0312] 利用比色 ELISA 来测定具有可检测抗原特异性抗体 (如通过阳性信号所代表) 的最高血清稀释度。自血清试样制备连续稀释物并在分析中进行测试。在一些分析中, 使用对磷酸-tau 肽具有特异性的单克隆抗体作为阳性对照或标准物。使用来自未接种疫苗小鼠 (BALB/c, TG4510+/+ 或 Tg4510-/-) 的血清作为阴性对照。将 96 孔高结合力聚苯乙烯板 (CoStar 9018) 用 100 μ L 稀释于 0.1M 碳酸钠 pH 8.2 (Sigma S7795) 中的肽在 4°C 下涂敷 18 至 21 小时。除 C-1P 及 C-1 的浓度为 3 μ g/mL 外, 所有其他肽的浓度均为 0.3 μ g/mL。第二天, 移除涂敷溶液, 并在室温下使用含有 0.05% Tween 20 (Sigma P2287) 及 1% BSA (Sigma A9418) 的 PBS 溶液 (EMD OmniPure 6507) 在使用 Heildolph Titramax 1000 以 600rpm 振荡下将此类板阻断 1 小时。移除阻断溶液, 随后将试样添加至此类板中。

[0313] 将小鼠血清及用作标准物的单克隆抗体利用 0.5 或 1 对数稀释于含有 0.5% Tween 20 的 PBS (PBS-T) 中进行连续稀释。对于每一试样, 测试自 1:500、1:5000 或 1:15,800 开始的 6 至 8 份血清试样稀释物。用作标准物及阳性对照的单克隆抗体体系: 针对 A-1P 的抗-Tau 396 (Zymed 35-5300); 针对 B-1P 的 AT-180 (Thermo Pierce MN1040); 针对 D-1P 及 E-1P 的 AT-8 (Thermo Pierce MN1020); 针对 C-1P 的 AT-100 (Thermo Pierce MN1060)。用于标准曲线的所用单克隆抗体的浓度是每孔 50、15.8、5、1.58、0.5、0.158 及 0.05ng。

[0314] 将试样及标准物以每孔 100 μ L 添加至板中, 每孔一式两份。将此类板在室温下于 600rpm 振荡下培育 1 小时。随后使用 PBS-T 将此类板洗涤 3 次, 并以 100 μ L/孔添加以 1:3000 稀释于 PBS-T 中的二级抗体 (偶联 HRP0 的抗-小鼠 IgG, Caltag#M30107)。使用不同二级抗体来检测 IgG1 (Caltag#M32107 1:2000)、IgG2a (Caltag#M32307 1:2000) 及 IgM (Caltag#315071 1:3000)。使二级抗体在室温下于振荡下在此类板上结合 1 小时。将此类板再次使用 PBS-T 洗涤三次, 并在最后一次洗涤后将此类板吸干。为显影, 向每一孔中

添加 100 μ L TMB 过氧化物酶 EIA 受质 (Bio-Rad#172-1067), 并在室温下保持 11 分钟。向每一孔中添加 100 μ L 1N 硫酸以终止反应。在 Molecular Devices Spectramax plus 384 上在 450nm 下读取吸光度。通过取用 PBS-T 处理的所有孔的平均值并加上此类孔的标准偏差的 3 倍来计算各板的 OD 阈值。若不能计算得到标准偏差, 则使用两倍于 PBS-T OD 的值作为阈值。自第一试样稀释物测定试样效价, 其中 450nm 吸光度值大于所计算的阈值。对于一些分析, 使用基于相关阳性对照单克隆抗体的稀释物的标准曲线来计算相对于标准曲线的效价浓度。当未检测到信号时, 使用最低稀释值或所测试标准物来计算, 而当最高稀释是阳性时, 则使用最高稀释值或所测试标准物来计算。当 N 大于 2 时, 计算平均效价, 而当 N 是 1 或 2 时, 则显示各值。通过将对于每一试样磷酸化肽的试样效价除以未磷酸化形式的相同肽的效价, 随后取不同试样比值的平均值来测定选择性比值。大于 10 或小于 0.1 的值视为具有选择性。使用第一阳性稀释来测定选择性是最保守的方法。使用其他方法 (例如阈值 OD 为 1 或 1/2 的最大 OD) 可能得到较大的选择性值。

[0315] 实施例 14 : IFN- γ ELISPOT 分析

[0316] 使用 IFN- γ ELISPOT 试剂盒 (BD Biosciences ;551083) 来测量使用肽-Qbeta-VLP 免疫后的 T 细胞应答。对自 A-8P、A-3P、B-3P、C-2P (在低剂量明矾存在下或无明矾) 免疫小鼠以及未免疫小鼠采集的脾 (N = 3) 实施 ELISPOT。给 96 孔 ELISPOT 板铺板 5 μ g/mL 捕获抗-小鼠 IFN- γ 抗体, 并在 4 $^{\circ}$ C 下保持过夜。洗涤涂敷抗体的板并使用含有 10% 胎牛血清 (VWRA15-204) 的 RPMI 1640 完全培养基 (Invitrogen 11875-119) 实施阻断。

[0317] 随后将脾细胞以每孔 500,000 个脾细胞接种至涂敷有抗-IFN- γ 抗体的板上, 使用 10 μ g/mL 肽或蛋白质抗原在 37 $^{\circ}$ C 且含有 5% CO₂ 的培育箱中刺激 20 至 24 小时。无关肽对照是肽 HBV-1 (SEQ ID NO :77) 且使用牛血清白蛋白 (Sigma Aldrich ;A9418) 作为 Qbeta-VLP 的无关蛋白质对照。使用以每孔 55,555 个及 18,520 个细胞接种的经佛波醇 12-肉豆蔻酸酯 13-乙酸酯 (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) (0.5 μ g/mL PMA, Sigma Aldrich ;P8139) 及离子霉素 (ionomycin) (0.5 μ g/mL, Sigma Aldrich ;I0634) 刺激的脾细胞作为阳性对照。培育 20 至 24 小时后, 使用蒸馏水洗涤 ELISPOT 板两次, 然后再使用洗涤缓冲液 (1 \times PBS (Invitrogen 10010072), 含有 0.05% Tween-20 (Sigma P2287)) 洗涤三次。通过以下来检测 IFN- γ 细胞因子 : 将稀释于含有 10% FBS 的 PBS 中的 2 μ g/mL 生物素化抗-IFN- γ 检测抗体在室温下培育 2 小时, 随后与以 1 : 100 稀释于 PBS 10% FBS 中的抗生蛋白链菌素 HRP 一起培育。使用洗涤缓冲液洗涤板 4 次且使用 PBS 洗涤板 2 次后, 使用 AEC 发色团-受质 (在室温下培育 11 分钟) 来显现 IFN- γ 斑点。

[0318] 扫描 IFN- γ 阳性斑点, 捕获, 并使用 Cellular Technology ELISpot 分析仪及 5.0 Professional Immunospot 软体计数, 并取每孔计数的平均值。无关肽是肽抗原的阴性对照, 而 BSA 是未偶联 VLP 的阴性对照。利用 Student T 检验时平均斑点值必须显著大于 ($p < 0.05$) 相关阴性对照才能视为阳性。

[0319] 实施例 15 : 佐剂配制品及免疫

[0320] 如下制备本文所述特定实施例 (例如实施例 5-14) 中所用的佐剂。将 CpG-24555 制备成存于水中的 2mg/mL 原液。所用明矾是含有 10mg/mL 铝的铝胶“85” (Brenntag Biosector)。将铝胶“85”与 100 μ g 肽或 VLP 偶联肽以 1 : 1 的比率混合。通常, 将高达 25 μ L (对于肌肉疫苗接种) 或 50 μ L (对于皮下疫苗接种) 添加至含有 100 μ g VLP 的溶

液中,并立即实施涡旋并置于冰上。以与肽溶液 1 : 1 的比率添加 TiterMax Gold(Alexis Biochemicals)。将 50 μ L TiterMax Gold 添加至用于 100 μ L 皮下剂量的 50 μ L 2mg/mL 肽溶液中,并使用 Mixermill(SPEX Sample Prep) 在 4°C 下乳化 10 分钟。将 25 μ L(12 μ g) AbISCO-100(Isconova) 添加至高达 100 μ g VLP-肽溶液及 5 μ L(10 μ g) CpG-24555 中,实施涡旋并置于冰上。

[0321] 按照普遍认可的方法实施本文所述特定实施例(例如实施例 5-14)中所进行的免疫及动物操作。疫苗接种时,在尾巴根部经皮下注射高达 100 μ L 疫苗,或者将 50 μ L 疫苗注射至胫骨后肌及胫骨前肌的一或二者中。经由下颌下切缝或在结束时经由心脏穿刺采集血液。在驱血法及颈椎脱位后取出脾,并置于含有 5% PBS 及 Penn/Strep(Invitrogen, 目录号为 15140-122) 的冷的无菌 HBBS(Invitrogen, 目录号为 14170) 中。在 70 μ m 筛网(Falcon) 上磨碎脾。在冰冷的 HBBS 中洗涤细胞,并使用 ACK 裂解缓冲液(Invitrogen) 裂解红细胞。在 Guava PCA 96(Guava Technologies 公司) 上计数脾细胞。

[0322] 实施例 16 :优化 pTau 肽至 Qbeta/VLP 的偶联密度以获得期望免疫应答

[0323] 实施实验以确定 pTau 肽表位至 Qbeta/VLP 的偶联密度(每一 Qbeta 单体亚基的肽数量)是否影响 pTau 特异性抗体应答。利用通过改变 SMPH 的摩尔过量与 pTau 肽过量产生的不同偶合条件来产生 8 种具有不同表位密度的 pTau/VLP 缀合物(表 4)。在第 0 天及第 14 天(sc) 使用 100 μ g 存于 750 μ g 明矾 ($Al(OH)_3$) 中的不同密度缀合物中的每一者使具有 5 只雌性 BalbC 小鼠(8 周龄)的群组免疫。在第 26 天采集血清。利用如实施例 13 中所述的抗原特异性效价测定分析对免疫动物的抗体应答进行研究。

[0324] 基于显示于表 4 中第 26 天的效价结果,对于 A-8P/Qbeta, 2.3 的偶联密度与较高(3.6) 密度偶联形式相比产生较高的效价免疫应答。对于不同的 B-3P/Qbeta 缀合物,效价类似且 2.2 及 3.6 偶联密度形式的效价最高。对于 C-2P/Qbeta, 2.2 及 3.5 表位偶联密度产生类似效价,其略微高于 4.3 偶联密度形式。结果表明,表位偶联密度可以抗原特异性方式影响抗体应答,且通常,导致偶联密度为每一 Qbeta 单体 2-3 个 pTau 肽表位的偶合条件优选。

[0325] 表 4 :在第 0 天及第 14 天使用 10 μ g 或 100 μ g 指定的不同偶合密度的存于 750 μ g 明矾 ($Al(OH)_3$) 中的 pTau-肽 /Qbeta/VLP 缀合物经皮下使小鼠免疫。在实施例 13 所述的抗原特异性效价测定分析中测试第 26 天的血清稀释物。显示效价结果。

[0326]

		A-8P/Qbeta		B-3P/Qbeta			C-2P/Qbeta		
		群组 1	群组 2	群组 3	群组 4	群组 5	群组 6	群组 7	群组 8
衍生化	SMPH 过量	10X	40X	7.5X	20X	80X	7.5X	20X	80X
偶合	肽过量	5X	10X	5X	10X	10X	5X	10X	10X
偶联密度		2.3	3.6	2.2	3.6	4.4	2.2	3.5	4.3
第 26 天的 IgG 效价		9.00E+04	3.00E+04	1.50E+05	1.20E+05	8.00E+04	1.00E+05	1.80E+05	4.00E+04

[0327] 表 5 :序列表概述

[0328] 在下表中,且如本文先前所述,磷酸化的氨基酸以粗体表示且标以下划线。

[0329]

序列号:	说明	序列
1	pThr-231/pSer-235磷酸-tau表位	<u>T</u> PP <u>K</u> S
2	替代pThr-231/pSer-235磷酸-tau表位	PP <u>K</u> S
3	pSer-202/pThr-205磷酸-tau表位	<u>S</u> PG <u>T</u>
4	不带有接头的肽A-1P	EIVYK <u>S</u> PVVSGDT <u>S</u> PRHLS
5	不带有接头的肽A-2P	RENAKAKTDHGAEIVYK <u>S</u> PVVSGDT <u>S</u> PRHLS
6	不带有接头的肽A-3P	EIVYK <u>S</u> PVVS
7	不带有接头的肽A-4P	GDT <u>S</u> PRH
8	不带有接头的肽A-5P	K <u>S</u> PVVSGDT <u>S</u> P
9	不带有接头的肽A-6P	EIVYK <u>S</u> P
10	不带有接头的肽A-7P	IVYK <u>S</u> PV
11	不带有接头的肽A-8P	VYK <u>S</u> PVV
12	不带有接头的肽A-9P	YK <u>S</u> PVVS
13	不带有接头的肽A-10P	K <u>S</u> PVVS
14	不带有接头的肽B-1P	KVAVVR <u>T</u> PP <u>K</u> SPSSAKS
15	不带有接头的肽B-2P	VR <u>T</u> PP <u>K</u> SPS

[0330]

序列号:	说明	序列
16	不带有接头的肽B-3P	VVR <u>T</u> PPK <u>S</u> P
17	不带有接头的肽B-4P	R <u>T</u> PPK <u>S</u> P <u>S</u> S
18	不带有接头的肽B-5P	R <u>T</u> PPK <u>S</u> P
19	不带有接头的肽B-6P	PPK <u>S</u> P <u>S</u> S
20	不带有接头的肽C-1P	SRSR <u>T</u> PSL <u>P</u> TPPT
21	不带有接头的肽C-2P	S <u>R</u> <u>T</u> PSL <u>P</u>
22	不带有接头的肽C-3P	R <u>T</u> PSL <u>P</u> T
23	不带有接头的肽C-4P	RSR <u>T</u> PSL
24	不带有接头的肽C-5P	PGRSR <u>T</u> PSL <u>P</u>
25	不带有接头的肽D-1P	GYSSPG <u>S</u> PG <u>T</u> PGSRS
26	不带有接头的肽E-1P	GYSSPG <u>S</u> PG <u>T</u> PGRSR <u>T</u> PSL <u>P</u> TPPT
27	CpG 7909	5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3'
28	CpG 10103	5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3'
29	CpG 24555	5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3'
30	人类tau同种型2	Genbank登记号为NP_005901
31	带有接头的肽A-1P	CGGEIVYK <u>S</u> PVVSGDT <u>S</u> PRHLS
32	带有接头的肽A-2P	CGGRENAKAKTDHGAEIVYK <u>S</u> PVVSGDT <u>S</u> PRHLS
33	带有接头的肽A-3P	CGGEIVYK <u>S</u> PVVS
34	带有接头的肽A-4P	CGG <u>G</u> DT <u>S</u> PRH
35	带有接头的肽A-5P	CGGK <u>S</u> PVVSGDT <u>S</u> P
36	带有接头的肽A-6P	CGGEIVYK <u>S</u> P
37	带有接头的肽A-7P	CGGIVYK <u>S</u> PV
38	带有接头的肽A-8P	CGGVYK <u>S</u> PVV
39	带有接头的肽A-9P	CGGYK <u>S</u> PVVS
40	带有接头的肽A-10P	CGGK <u>S</u> PVVSG
41	带有接头的肽A-11P	EIVYK <u>S</u> PVVSGDT <u>S</u> PRHLSGGC
42	带有接头的肽B-1P	CGGKVAVVR <u>T</u> PPK <u>S</u> PS <u>S</u> AKS
43	带有接头的肽B-2P	CGGV <u>R</u> TPPK <u>S</u> PS
44	带有接头的肽B-3P	CGGV <u>V</u> R <u>T</u> PPK <u>S</u> P
45	带有接头的肽B-4P	CGGR <u>T</u> PPK <u>S</u> PS
46	带有接头的肽B-5P	CGGR <u>T</u> PPK <u>S</u> P
47	带有接头的肽B-6P	CGGPPK <u>S</u> PS
48	带有接头的肽C-1P	CGGSRSR <u>T</u> PSL <u>P</u> TPPT
49	带有接头的肽C-2P	CGGSR <u>T</u> PSL <u>P</u>
50	带有接头的肽C-3P	CGGR <u>T</u> PSL <u>P</u> T
51	带有接头的肽C-4P	CGGSR <u>T</u> PSL
52	带有接头的肽C-5P	CGGPGRSR <u>T</u> PSL <u>P</u>
53	带有接头的肽D-1P	CGGYSSPG <u>S</u> PG <u>T</u> PGSRS
54	带有接头的肽E-1P	CGGYSSPG <u>S</u> PG <u>T</u> PGRSR <u>T</u> PSL <u>P</u> TPPT
55	带有接头的肽A-1	CGGEIVYK <u>S</u> PVVSGDT <u>S</u> PRHLS
56	带有接头的肽A-2	CGGRENAKAKTDHGAEIVYK <u>S</u> PVVSGDT <u>S</u> PRHLS
57	带有接头的肽A-3	CGGEIVYK <u>S</u> PVVS

[0331]

序列号:	说明	序列
58	带有接头的肽A-4	CGGGDTSPRH
59	带有接头的肽A-5	CGGKSPVVSGDTSP
60	带有接头的肽A-6	CGGEIVYKSP
61	带有接头的肽A-7	CGGIVYKSPV
62	带有接头的肽A-8	CGGVYKSPVV
63	带有接头的肽A-9	CGGYKSPVVS
64	带有接头的肽A-10	CGGKSPVVSG
65	带有接头的肽B-1	CGGKVAVVRTPPKSPSSAKS
66	带有接头的肽B-2	CGGVRTPPKSPS
67	带有接头的肽B-3	CGGVVRTPPKSP
68	带有接头的肽B-4	CGGRTPPKSPSS
68	带有接头的肽B-5	CGGRTPPKSP
69	带有接头的肽B-6	CGGPPKSPSS
70	带有接头的肽C-1	CGGSRRTPSLPTPPT
71	带有接头的肽C-2	CGGSRTPSLP
72	带有接头的肽C-3	CGGRTPSLPT
73	带有接头的肽C-4	CGGRSRTPSL
74	带有接头的肽C-5	CGGPGSRRTPSLP
75	带有接头的肽D-1	CGGYSSPGSPGTPGSR
76	带有接头的肽E-1	CGGYSSPGSPGTPGSRRTPSLPTPPT
77	肽HBV-1	IPQLDSWWTSL
78	含有XhoI位点的Qbeta的3'序列	5'-GTATTAATGACTCGAG-3'
79	接头	GGGGGC
80	接头	GGGGC
81	接头	GGGC
82	接头	GGGGGK
83	接头	GGGGK
84	接头	GGGK
85	接头	GGGGSC
86	接头	GGGSC
87	接头	GGSC
88	接头	CSGGGG
89	接头	CSGGG
90	接头	CSGG
91	接头	CGGGG
92	接头	CGGG
93	接头	CGGGGG
94	接头	CGDKTHTSPP
95	接头	DKTHTSPPCG
96	接头	CGGPKSTPPGSSGGAP
97	接头	PKPSTPPGSSGGAPGGCG
98	接头	GCGGGG

[0332]

序列号:	说明	序列
99	接头	GGGGCG
100	接头	CGKKGG
101	接头	CGDEGG
102	接头	GGKKGC
103	接头	GGEDGC
104	接头	GGCG
105	不带有接头的肽F-1P	AGTYGLG
106	带有接头的肽F-1P	CGGAGTYGLG
107	带有接头的肽F-1	CGGAGTYGLG
108	不带有接头的肽F-2P	DHAGTYG
109	不带有接头的肽F-3P	HAGTYGL
110	不带有接头的肽F-4P	GTYGLGD
111	不带有接头的肽F-5P	TYGLGDR
112	不带有接头的肽F-6P	DHAGTYGLG DR
113	带有接头的肽F-2P	CGGDHAGTYG
114	带有接头的肽F-3P	CGGHAGTYGL
115	带有接头的肽F-4P	CGGGTYGLGD
116	带有接头的肽F-5P	CGGTYGLGDR
117	带有接头的肽F-6P	CGGDHAGTYGLG DR
118	带有接头的肽F-2	CGGDHAGTYG
119	带有接头的肽F-3	CGGHAGTYGL
120	带有接头的肽F-4	CGGGTYGLGD
121	带有接头的肽F-5	CGGTYGLGDR
122	带有接头的肽F-6	CGGDHAGTYGLG DR

组	初免(第 0 天)		加强免疫(第 14 天)		N
	疫苗	佐剂	疫苗	佐剂	
1	300 μ g A-1	TiterMax	300 μ g A-1	TiterMax	3
2	300 μ g A-1P	TiterMax	300 μ g A-1P	TiterMax	3
3	300 μ g B-1P	TiterMax	300 μ g B-1P	TiterMax	3
4	300 μ g D-1P	TiterMax	300 μ g D-1P	TiterMax	3
5	300 μ g C-1P	TiterMax	300 μ g C-1P	TiterMax	3
6	300 μ g A-1P	TiterMax	100 μ g A-1P-VLP		3
7	100 μ g A-1P-VLP		100 μ g A-1P-VLP		3
8	100 μ g A-1P-KLH		100 μ g A-1P-KLH		3

图 1A

组	第 28 天的 IgG 效价		选择性	第 28 天的 IgG 效价		选择性	第 28 天的 IgG 效价		选择性	第 28 天的 IgG 效价		选择性
	A-1P	A-1		B-1P	B-1		D-1P	D-10		C-1P	C-1	
1	< 290	4050	< 0.045									
2	50.0	50.0	1.0									
3				> 7290	> 7290	1.0						
4							< 30.0	< 30.0	1.0			
5											270	< 50.0
6	> 7290	> 7290										> 7.0
7	> 7290	> 7290										
8	> 7290	> 7290										

图 1B

组	初免			加强免疫			天数			
	疫苗	佐剂	天数	疫苗	佐剂	天数	94 (N=1)	104	108	115
IgM										
A	A-1P	TiterMax	0	A-1P-VLP	无	14, 101	2.70E+03	2.67E+05	2.67E+05	1.05E+05
B	A-1P-VLP	无	0	A-1P-VLP	无	14, 101	2.43E+04	4.05E+04	2.19E+05	8.91E+04
C	A-1P-VLP	无	101	无	无	无		7.29E+04	1.70E+05	2.43E+04
IgG										
组							IgG 效价	IgG 效价	IgG 效价	IgG 效价
A	A-1P	TiterMax	0	A-1P-VLP	无	14, 101	7.29E+04	1.70E+05	1.97E+06	1.97E+06
B	A-1P-VLP	无	0	A-1P-VLP	无	14, 101	2.19E+05	6.56E+05	1.97E+06	1.97E+06
C	A-1P-VLP	无	101	无	无	无		9.00E+02	1.22E+05	5.10E+05

图 2

疫苗									
	A-1	A-1P	B-1P	D-1P	C-1P	E-1P			未治疗
疫苗初免 (第0天)									
疫苗加强免疫 (第28天、第56天)									
N	4	4	4	4	4	4		4	3
第70天的IgG效价									
A-1P效价	> 1.75E+06	> 1.75E+06							< 8.00E+02
A-1效价	> 1.75E+06	> 1.75E+06							< 8.00E+02
B-1P效价			> 1.75E+06						< 8.00E+02
B-1效价			> 1.17E+06						< 8.00E+02
D-1P效价				> 1.75E+06					< 8.00E+02
D-1效价				7.08E+04					< 8.00E+02
C-1P效价					> 1.75E+06				< 8.00E+02
C-1效价					3.56E+05				ND
E-1P效价				> 1.75E+06	> 1.75E+06	> 1.75E+06		> 1.75E+06	ND
E-1效价						1.80E+05			ND
选择性									
A-1P/A-1	1.0	1.0							
B-1P/B-1			2.0						
D-1P/D-1				> 212					
C-1P/C-1					> 10.5				
E-1P/E-1						> 75			
E-1P/D-1				> 212					
E-1P/D-1P				1.0					
E-1P/C-1					> 10.5				
E-1P/C-1P					1.0				

图 3

组	疫苗	每一VLP的量	佐剂	N	第63天的IgG效价							
					A-1P IgG (mg/mL)	A-1P 效价	A-1 效价	B-1P IgG (mg/mL)	B-1P 效价	B-1 效价	C-1P 效价	C-1 效价
1	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	100 µg	1160 µg 明矾	4	0.40	7.70E+04	9.55E+04	0.44	1.04E+05	< 5.00E+03	2.17E+05	1.31E+05
2	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	10 µg	116 µg 明矾	4	0.19	9.55E+04	< 5.00E+03	0.15	6.85E+04	< 5.00E+03	2.17E+05	1.31E+05
3	A-1P-VLP	100 µg	386 µg 明矾	3	0.41	1.58E+05	1.22E+04					
4	B-1P-VLP	100 µg	386 µg 明矾	4				0.59	2.44E+05	1.63E+04		
5	C-1P-VLP	100 µg	386 µg 明矾	4							9.55E+05	2.17E+05
6	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	100 µg	无	4	0.37	2.44E+05	2.17E+04	0.41	1.90E+05	< 1.90E+04	2.44E+05	4.33E+04
7	未治疗	无	无	3		< 5.00E+03	< 5.00E+03		< 5.00E+03	< 5.00E+03	< 5.00E+03	< 5.00E+03

图 4A

组	疫苗	每一VLP的量	佐剂	N	第 63 天的 IgG 效价							
					A-1P IgG (mg/mL)	A-1P 效价	A-1 效价	B-1P IgG (mg/mL)	B-1P 效价	B-1 效价	C-1P 效价	C-1 效价
8	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	100 µg	20 µg CPG 24555	3	0.51	8.60E+05	ND	0.41	8.60E+04	ND	3.86E+05	ND
9	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	100 µg	1160 µg 明矾	4	0.45	1.58E+06	ND	0.25	7.70E+04	ND	4.87E+05	ND
10	未治疗	无	无	4		< 5.00E+03	ND		< 5.00E+03	ND	< 5.00E+03	ND
11	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	100 µg	20 µg CPG 24555	3	0.55	2.72E+05	ND	0.64	3.86E+05	ND	3.86E+05	ND
12	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	10 µg	20 µg CPG 24555	4	0.40	4.87E+05	ND	0.26	1.90E+05	ND	1.31E+05	ND
13	A-1P-VLP	100 µg	20 µg CPG 24555	4	0.79	7.70E+05	ND					
14	B-1P-VLP	100 µg	20 µg CPG 24555	4				0.53	2.17E+05	ND		
15	C-1P-VLP	100 µg	20 µg CPG 24555	3							1.22E+05	ND
16	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	100 µg	12 µg AbISCO + 20 µg CPG 24555	4	0.96	3.88E+05	ND	0.88	3.02E+05	ND	6.85E+05	ND
17	未治疗	无	无	3		< 5.00E+03	ND		< 5.00E+03	ND	< 5.00E+03	ND

图 4B

选择性			
组	A-1P / A-1	B-1P / B-1	C-1P / C-1
1	2.9	> 20.8	1.5
2	> 19.1	> 13.7	1.5
3	17.2		
4		26.2	
5			6.0
6	15.4	> 13.7	24.5

图 4C

组	疫苗	佐剂	途径	N	A-1P IgG (mg/mL)	第27天的 A-1P IgG 效价	第27天的 A-1 IgG 效价	选择性 (A-1P/A-1)	第27天的 A-1P IgG1 效价	第27天的 A-1P IgG2a 效价	IgG1/IgG2a 比率
1	A-1P-VLP	明矾	SC	3	0.44	8.60E+05	3.50E+05	11.3	5.00E+06	2.21E+06	34.8
2	A-1P-VLP	明矾, CpG 24555	IM	3	0.45	8.60E+05	1.22E+05	7.7	2.36E+06	2.36E+05	21.4
3	A-1P-VLP	CpG 24555	IM	3	0.97	1.58E+06	3.86E+05	5.4	8.60E+05	5.00E+06	0.17
4	A-1P-VLP	AbISCO, CpG 24555	IM	3	3.04	5.00E+06	8.60E+05	7.7	1.58E+06	1.22E+07	0.17
5	A-1P-VLP	明矾	IM	3	0.50	1.22E+06	5.96E+04	70.0	8.60E+05	5.85E+05	12.0
6	未治疗	无	NA	3	<0.0025	<5.00E+03	<5.00E+03	1.00	<5.00E+03	<5.00E+03	1.0

图 5

组	疫苗	μg 明矾 (Al(OH) ₃)	ELISA 抗原	第21天或 第28天的 IgG 效价	ELISA 抗原	第21天或 第28天的 IgG 效价	选择 性	ELISA 抗原	第21天或 第28天的 IgG 效价	选择 性
1	A-1P-VLP	750	A-1P	3.86E+05	A-1	< 2.72E+04	> 17.2	A-1P	5.00E+05	> 24.4
2	A-3P-VLP	750	A-3P	5.00E+05	A-3	< 2.72E+04	> 24.4	A-1P	2.36E+06	> 149
3	A-2P-VLP	750	A-2P	1.58E+05	A-2	1.22E+05	1.7	A-1P	1.58E+05	> 10.0
4	A-7P-VLP	750	A-7P	1.11E+05	A-7	< 1.58E+04	> 7.0	A-1P	5.00E+04	> 3.2
5	A-8P-VLP	750	A-8P	1.58E+05	A-8	< 1.58E+04	> 10.0	A-1P	5.00E+05	> 31.6
6	B-1P-VLP	750	B-1P	3.86E+05	B-1	1.11E+05	5.4	B-1P	3.86E+05	14.9
7	B-3P-VLP	750	B-3P	2.25E+05	B-3	< 1.58E+04	> 14.2	B-1P	2.36E+05	> 14.9
8	B-5P-VLP	750	B-5P	< 2.72E+04	B-5	< 1.58E+04	1.7	B-1P	< 6.32E+04	> 4.0
9	B-6P-VLP	750	B-6P	1.22E+05	B-6	< 1.58E+04	> 7.7	B-1P	2.72E+06	> 172
10	C-1P-VLP	750	C-1P	1.22E+06	C-1	6.32E+05	4.7	C-1P	7.46E+05	1.7
11	C-2P-VLP	750	C-2P	1.58E+05, 5.00E+05	C-2	< 1.58E+04, < 1.58E+04	> 20.8	C-1P	5.00E+04, 5.00E+05	> 17.4
12	C-3P-VLP	750	C-3P	> 1.85E+06	C-3	< 1.58E+04	> 117	C-1P	2.36E+05	> 14.9
13	C-5P-VLP	750	C-5P	> 2.36E+06	C-5	< 1.58E+04	> 149	无	ND	ND
14	C-1P-VLP	无	C-1P	> 2.72E+06	C-1	1.11E+05	> 47.2	C-1P	> 2.72E+06	> 172
15	未治疗	无	A-1P B-1P C-1P	< 1.58E+04 < 1.58E+04 < 1.58E+04	A-1 B-1 C-1	< 1.58E+04 < 1.58E+04 < 1.58E+04	1.0 1.0 1.0	无	ND ND ND	ND ND ND
16	F-1P-VLP	252	F-1P	1.22E+05	F-1	1.58E+05	0.77	无	ND	ND
17	A-8P-VLP	252	无	ND	无	ND	ND	A-1P	2.36E+06	> 4729
18	未治疗	无	A-1P F-1P	< 5.00E+02 < 5.00E+02	A-1 F-1	< 5.00E+02 < 5.00E+02	1.0 1.0	无	< 5.00E+02	> 4729

图 6

组	疫苗	佐剂	初免天数	加强免疫天数	N	天数			
						105	111	115	122
						效价	效价	效价	效价
1	A-8P-VLP	明矾	0	14, 108	3	2.36E+06	7.46E+05	1.11E+07	7.46E+06
2	B-3P-VLP	明矾	0	14, 108	3	2.72E+05	2.36E+05	1.58E+06	6.32E+06
3	C-2P-VLP	明矾	0	14, 108	2	1.58E+04, 1.58E+05	1.58E+04, 1.58E+05	5.00E+05, 5.00E+05	1.58E+06, 1.58E+06
4	A-8P-VLP	明矾	108	无	3	< 5.00E+02	< 5.00E+02	3.86E+04	1.22E+05
5	B-3P-VLP	明矾	108	无	3	ND	< 5.00E+02	8.60E+04	5.96E+06
6	C-2P-VLP	明矾	108	无	3	ND	< 5.00E+02	2.72E+04	2.36E+05

IgG

图 7

组	组平均值	明矾 (μg)	N	第 21 天的 IgG 效价		选择性		第 21 天的 IgG 效价		选择性		第 21 天的 IgG 效价		选择性	
				A-1P	A-1	A-1P/A-1	B-1P	B-1	B-1P/B-1	E-1P	E-1	E-1P/E-1			
1	A-8P -VLP	0	3	2.36E+06	< 5.00E+03	> 472									
2	A-8P -VLP	504	3	5.00E+06	< 5.00E+03	> 1000									
3	A-3P -VLP	0	3	5.00E+06	2.72E+04	244									
4	A-3P -VLP	504	3	1.58E+07	2.25E+05	377									
5	B-3P -VLP	0	3				5.00E+06	< 5.00E+03			> 1000				
6	B-3P -VLP	504	3				8.60E+06	< 5.00E+03			> 1720				
7	C-2P -VLP	0	3						1.22E+06			1.22E+06	< 5.00E+03	> 244	
8	C-2P -VLP	504	3						1.58E+06			1.58E+06	< 5.00E+03	> 316	
9	C-5P -VLP	0	3						2.72E+06			2.72E+06	< 5.00E+03	> 544	
10	C-5P -VLP	504	3						3.86E+06			3.86E+06	< 5.00E+03	> 772	
11	A-8P -VLP, B-3P -VLP, C-2P -VLP	0	3	2.72E+06	< 5.00E+03	> 544	3.86E+06	< 5.00E+03			> 772	5.00E+05	< 5.00E+03	> 100	
12	A-8P -VLP, B-3P -VLP, C-2P -VLP	750	3	7.46E+06	< 5.00E+03	> 1492	3.86E+06	< 5.00E+03			> 772	2.72E+05	< 5.00E+03	> 54.4	
13	未治疗	0	3 只的 群组	< 5.00E+03	< 5.00E+03	1.0	< 5.00E+03	< 5.00E+03			1.0	< 5.00E+03	< 5.00E+03	1.0	

图 8

免疫组	B-3P 无明砷 斑点	B-3P 504 μg 明砷 斑点	未免疫 斑点
测试抗原	斑点	斑点	斑点
B-1P	6	5	0
B-1	10	4	1
B-3P	7	1	2
B-3	12	7	3
不相关肽	10	5	ND
未偶联 VLP	267*	356*	10
不相关蛋白	17	35	8

免疫组	C-2P 无明砷 斑点	C-2P 504 μg 明砷 斑点	未免疫 斑点
测试抗原	斑点	斑点	斑点
C-1P	24	9	0
C-1	22	6	3
C-2P	47	15	2
C-2	29	9	1
不相关肽	22	11	ND
未偶联 VLP	350*	402*	10
不相关蛋白	58	112	8

免疫组	A-8P 无明砷 斑点	未免疫 斑点
测试抗原	斑点	斑点
A-1P	16	1
A-1	26	3
A-8P	27	2
A-8	25	2
不相关肽	17	ND
未偶联 VLP	469*	10
不相关蛋白	53	8

免疫组	A-3P 无明砷 斑点	未免疫 斑点
测试抗原	斑点	斑点
A-1P	7	1
A-1	11	3
A-3P	60*	1
A-3	29	0
不相关肽	16	ND
未偶联 VLP	204*	10
不相关蛋白	47	8

图 9

1	MAEPRQEEFV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDEGSEEPG
61	SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTEIPEG	TTAEFAGIGD	TPSLEDEAAG
121	HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKQANATR	IPAKTPPAPK
181	TPPSSGEPPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSR	RTPSLPTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK
241	SRLQTAPVPM	PDLKNVSKSI	GSTENLKHQP	GGKVQIINK	KLDLSNVQSK	CGSKDNIKHV
301	PGGGSVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDKDRV	QSKIGSLDNI
361	THVPGGGNKK	IETHKLTFRE	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	GDTSPRHLSN	VSSTGSIDMV
421	DSPQLATLAD	EVSASLAKQG	L			

图 10

1. 一种免疫原,其包含连接至免疫原性载体的抗原性 tau 肽,其中所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO :4、6-26、105 和 108-112 的氨基酸序列,并且其中所述抗原性 tau 肽通过式 $(G)_n C$ 所表示的接头共价连接至所述免疫原性载体,其中所述接头位于所述肽的 C 端(肽 $-(G)_n C$) 或 N 端 $(C(G)_n-$ 肽),并且其中 n 是 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

2. 权利要求 1 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO :4 及 6-13 的氨基酸序列。

3. 权利要求 2 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO :11 中所示的氨基酸序列组成。

4. 权利要求 1 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO :14-19 的氨基酸序列。

5. 权利要求 4 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO :16 中所示的氨基酸序列组成。

6. 权利要求 1 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO :20-24 的氨基酸序列。

7. 权利要求 6 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO :21 中所示的氨基酸序列组成。

8. 权利要求 1 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽包含选自 SEQ ID NO :105 及 108-112 的氨基酸序列。

9. 权利要求 8 的免疫原,其中所述抗原性 tau 肽由 SEQ ID NO :105 中所示的氨基酸序列组成。

10. 权利要求 1 至 9 中任一项的免疫原,其中所述免疫原性载体是选自由 HBcAg VLP、HBsAg VLP、和 Qbeta VLP 组成的组的病毒样颗粒。

11. 一种组合物,其包含至少两种免疫原,每种所述免疫原包含连接至免疫原性载体的抗原性 tau 肽,其中:

a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :4 及 6-13 的氨基酸序列组成;且

b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :14-19 的氨基酸序列组成。

12. 一种组合物,其包含至少两种免疫原,每种所述免疫原包含连接至免疫原性载体的抗原性 tau 肽,其中:

a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :4 及 6-13 的氨基酸序列组成;且

b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :20-24 的氨基酸序列组成。

13. 一种组合物,其包含至少两种免疫原,每种所述免疫原包含连接至免疫原性载体的抗原性 tau 肽,其中:

a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :14-19 的氨基酸序列组成;且

b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :20-24 的氨基酸序列组成。

14. 一种组合物,其包含至少两种免疫原,每种所述免疫原包含连接至免疫原性载体的抗原性 tau 肽,其中:

a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO :4 及 6-13 的氨基酸序列组成;且

b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽选自 SEQ ID NO :105 及 108-112。

15. 一种组合物,其包含至少两种免疫原,每种所述免疫原包含连接至免疫原性载体的

抗原性 tau 肽,其中:

- a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:14-19 的氨基酸序列组成;且
- b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽选自 SEQ ID NO:105 及 108-112。

16. 一种组合物,其包含至少两种免疫原,每种所述免疫原包含连接至免疫原性载体的抗原性 tau 肽,其中:

- a) 第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:20-24 的氨基酸序列组成;且
- b) 第二种免疫原的抗原性 tau 肽选自 SEQ ID NO:105 及 108-112。

17. 一种组合物,其包含选自自由第一种免疫原、第二种免疫原、第三种免疫原、和第四种免疫原组成的组的至少三种免疫原,其中所述的第一种免疫原、第二种免疫原、第三种免疫原、和第四种免疫原中的每种均包含连接至免疫原性载体的抗原性 tau 肽,并且其中:

- a) 所述第一种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:4 及 6-13 的氨基酸序列组成;
- b) 所述第二种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:14-19 的氨基酸序列组成;且
- c) 所述第三种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:20-24 的氨基酸序列组成;
- d) 所述第四种免疫原的抗原性 tau 肽由选自 SEQ ID NO:105 及 108-112 的氨基酸序列组成。

18. 一种药物组合物,其包含权利要求 1 至 10 中任一项的免疫原、或权利要求 11 至 17 中任一项的组合物、及药物可接受的赋形剂。