



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102946899 B

(45) 授权公告日 2016.01.20

(21) 申请号 201080024398.2

(22) 申请日 2010.04.01

(30) 优先权数据

09157303.0 2009.04.03 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011.12.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/054418 2010.04.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/115843 EN 2010.10.14

(83) 生物保藏信息

DSM ACC3043 2010.03.03

DSM ACC3044 2010.03.10

DSM ACC3045 2010.03.10

DSM ACC3046 2010.03.10

DSM ACC3047 2010.03.10

DSM ACC3048 2010.03.10

DSM ACC3049 2010.03.10

DSM ACC3050 2010.03.10

(73) 专利权人 AC 免疫有限公司

地址 瑞士洛桑

专利权人 鲁汶大学

(72) 发明人 A·普法伊费尔 A·穆斯

F·范勒旺 M·皮尔格伦

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 凌立 黄革生

(51) Int. Cl.

A61K 39/00(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(56) 对比文件

US 005843779 A, 1998.12.01, 第4栏39行-第5栏38行, 第18栏50行-第19栏21行.

US 20020086009 A1, 2002.07.04, 说明书第18-20段, 序列表 SEQ ID NO:12.

US 2008050383 A1, 2008.02.28, 说明书第7段、第10段、第24段、第37段、第39段、第43段、第66-67段、表格.

US 2008050383 A1, 2008.02.28, 说明书第7段、第10段、第37段、第39段、第43段、第66-67段、表格.

WO 2005080986 A1, 2005.09.01, 第2页第10行-第3页第3行, 实施例3.

WO 2007068105 A1, 2007.06.21, 说明书第46段、第48-49段及表1.

WO 9620218 A1, 1996.07.04, 全文.

WO 9734145 A1, 1998.09.18, 全文.

WO 9822120 A1, 1998.05.28, 说明书第4页1-24行, 第9页20-22行, 第10页3、20、24-25行.

审查员 童欣

权利要求书2页 说明书60页

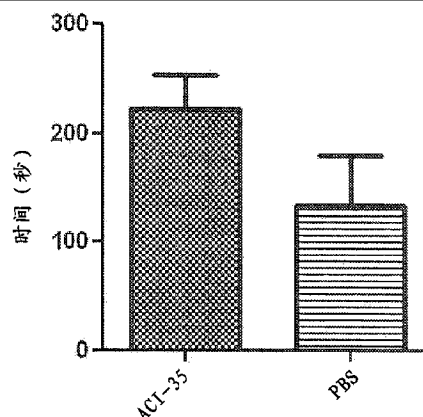
序列表4页 附图29页

(54) 发明名称

药物组合物

(57) 摘要

本发明涉及在由神经原纤维缠结引起或与神经原纤维缠结相关的疾病和障碍的治疗中用于治疗 and 诊断用途的方法和组合物。具体而言, 本发明涉及包含抗原肽的药物组合物, 尤其是模拟 tau 蛋白的主要病理磷酸化表位的抗原磷酸肽的药物组合物, 其在包括阿尔茨海默病的 tau 病的治疗中用于治疗 and 诊断用途。



1. 包含肽或其功能片段的抗原构建体,所述肽或其功能片段是模拟 tau 蛋白的病理磷酸化表位的磷酸肽或其功能片段,所述肽 (a) 通过与便于插入脂质体的脂双层的亲脂或疏水部分连接修饰且 (b) 重构在脂质体中修饰,由此所述肽呈递在脂质体的表面上,其中所述抗原肽如下所示:

a. SEQ ID NO:2,其中对应于 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 18 (P-Tyr₁₈)的氨基酸残基是磷酸化的;或

b. SEQ ID NO:3,其中对应于 SEQ ID NO:3 的氨基酸残基 212(P-Thr₂₁₂)和 214(P-Ser₂₁₄)的氨基酸残基中的至少一个是磷酸化的;或

c. SEQ ID NO:4,其中对应于 SEQ ID NO:4 的氨基酸残基 202(P-Ser₂₀₂)和 205(P-Thr₂₀₅)的氨基酸残基中的至少一个是磷酸化的;或

d. SEQ ID NO:5,其中对应于 SEQ ID NO:5 的氨基酸残基 396(P-Ser₃₉₆)和 404(P-Ser₄₀₄)的氨基酸残基中的至少一个是磷酸化的;或

e. SEQ ID NO:6,其中对应于 SEQ ID NO:6 的氨基酸残基 404(P-Ser₄₀₄)和 409(P-Ser₄₀₉)的氨基酸残基中的至少一个是磷酸化的;或

f. SEQ ID NO:7,其中对应于 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 202(P-Ser₂₀₂)、205(P-Thr₂₀₅)、212 (P-Thr₂₁₂) 和 214 (P-Ser₂₁₄) 的氨基酸残基中的至少一个是磷酸化的;或

g. SEQ ID NO:8,其中对应于 SEQ ID NO:8 的氨基酸残基 409 (P-Ser₄₀₉)的氨基酸残基是磷酸化的;或

h. SEQ ID NO:9,其中对应于 SEQ ID NO:9 的氨基酸残基 404 (P-Ser₄₀₄)的氨基酸残基是磷酸化的;

其中所述亲脂或疏水部分是含有 C12 和 C24 之间的碳链的脂肪酸、甘油三酯或磷脂,所述脂肪酸、甘油三酯或磷脂与所述肽的末端共价结合。

2. 权利要求 1 的抗原构建体,其中所述抗原肽如下所示:

b. SEQ ID NO:3,其中对应于 SEQ ID NO:3 的氨基酸残基 212(P-Thr₂₁₂)和 214(P-Ser₂₁₄)的氨基酸残基中的全部是磷酸化的;或

c. SEQ ID NO:4,其中对应于 SEQ ID NO:4 的氨基酸残基 202(P-Ser₂₀₂)和 205(P-Thr₂₀₅)的氨基酸残基中的全部是磷酸化的;或

d. SEQ ID NO:5,其中对应于 SEQ ID NO:5 的氨基酸残基 396(P-Ser₃₉₆)和 404(P-Ser₄₀₄)的氨基酸残基中的全部是磷酸化的;或

e. SEQ ID NO:6,其中对应于 SEQ ID NO:6 的氨基酸残基 404(P-Ser₄₀₄)和 409(P-Ser₄₀₉)的氨基酸残基中的全部是磷酸化的;或

f. SEQ ID NO:7,其中对应于 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 202(P-Ser₂₀₂)、205(P-Thr₂₀₅)、212 (P-Thr₂₁₂) 和 214 (P-Ser₂₁₄) 的氨基酸残基中的至少两个是磷酸化的。

3. 权利要求 2 的抗原构建体,其中所述抗原肽如下所示:

f. SEQ ID NO:7,其中对应于 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 202(P-Ser₂₀₂)、205(P-Thr₂₀₅)、212 (P-Thr₂₁₂) 和 214 (P-Ser₂₁₄) 的氨基酸残基中的至少三个是磷酸化的。

4. 权利要求 3 的抗原构建体,其中所述抗原肽如下所示:

f. SEQ ID NO:7,其中对应于 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 202(P-Ser₂₀₂)、205(P-Thr₂₀₅)、212 (P-Thr₂₁₂) 和 214 (P-Ser₂₁₄) 的氨基酸残基中的全部是磷酸化的。

5. 权利要求 1-4 中任一项的抗原构建体, 其中所述抗原肽或其功能片段部分或完全附着在载体上, 或部分或完全掺入或重构在脂质体中, 使得形成并稳定希望的构象, 且其中所述脂质体包含两个或多个抗原肽。

6. 权利要求 5 的抗原构建体, 其中所述两个或多个抗原肽以聚集状态暴露于脂质体表面, 所述聚集状态包含 β -折叠和 / 或无规卷曲构象。

7. 权利要求 1-4 中任一项的抗原构建体, 其中所述抗原构建体能够引发构象特异的免疫应答和 / 或独立于 T 细胞的免疫应答。

8. 权利要求 1-4 中任一项的抗原构建体或其组合, 其用于治疗阿尔茨海默病。

9. 药物组合物, 其包含权利要求 1-8 中任一项的抗原构建体或其组合和可药用载体, 和 / 或稀释剂和 / 或赋形剂。

10. 权利要求 9 的药物组合物, 其还包含可药用佐剂和 / 或免疫调节剂。

11. 权利要求 9 或 10 的药物组合物, 其用于治疗阿尔茨海默病。

12. 使用权利要求 1-8 中任一项的抗原构建体或其组合, 或权利要求 9-11 中任一项的药物组合物用于制备预防和 / 或治疗性处理阿尔茨海默病的作用的药物的方法。

13. 权利要求 12 的方法, 其中所述药物是缓解阿尔茨海默病的作用的药物。

药物组合物

[0001] 本发明涉及在由神经原纤维缠结引起或与神经原纤维缠结相关的疾病和障碍的治疗中用于治疗 and 诊断用途的方法和组合物。具体而言,本发明涉及在包括阿尔茨海默病(AD)的 tau 病(tauopathy)的治疗中用于治疗 and 诊断用途的方法和组合物。

[0002] 神经原纤维缠结是 AD 中主要的神经病理学标志。它们通过超磷酸化 tau 蛋白及其构象异构体的聚集而发生。AD 与许多神经变性 tau 病,尤其是与指定类型的额颞痴呆(FTD)共享此病理。

[0003] Tau 蛋白是积极与微管(MT)结合来促进它们的组装和稳定性的易溶、“天然未折叠”的蛋白质。MT 对神经元的细胞骨架完整性具有重要意义——从而对神经元回路的正确形成和执行功能具有重要意义,因此对学习和记忆具有重要意义。如主要在体外和在非神经元细胞中所表明,tau 与 MT 的结合受动态的磷酸化和去磷酸化控制。由于许多可能的磷酸化位点(> 80),基本上仍未在体内确定各位点的确切贡献和负责的激酶的同源性。

[0004] 在 AD 脑中,tau 病理发展晚于淀粉状蛋白病理,并因此很可能响应于淀粉状蛋白病理,这构成淀粉状蛋白级联假说的精髓。这基于 AD 和唐氏综合症患者中的研究并由这些研究显示,并为具有组合的淀粉状蛋白病理和 tau 病理的转基因小鼠中的研究所证明(Lewis 等,2001;Oddo 等,2004;Ribe 等,2005;Muyllaert 等,2006;2008;Terwel 等,2008)。

[0005] 两种病理在人 AD 患者中的精确计时以及将淀粉状蛋白病理与 tau 病理相联系的机制基本上仍未知,但已提出其涉及神经元信号传导途径的活化,该途径作用于作为主要“tau 激酶”的 GSK3 和 cdk5,或者通过 GSK3 和 cdk5 发挥作用(Muyllaert 等,2006,2008 的综述)。

[0006] tau 病不是 AD 中无害的副作用而是主要的病理执行者的假说基于彼此充分证实的可靠的遗传、病理和实验观察:

[0007] ■在由淀粉状蛋白前体(APP)或早老蛋白中的突变引起的早发型家族性 AD 病例中,专性病因是淀粉状蛋白累积,但与迟发型散发性 AD 病例中的情况一致,病理毫无例外地包含并发的 tau 病;

[0008] ■最近通过几项临床 1 期和 2 期研究例证,认知功能障碍和痴呆的严重度与 tau 病相关,而不与淀粉状蛋白病理相关,该研究包括淀粉状蛋白的 PIB-PET 成像,并鉴定了许多“假阳性”:具有高脑淀粉状蛋白负荷的认知正常个体;

[0009] ■在家族性 FTD 中,tau 病由突变体 tau 引起,并在无淀粉状蛋白病理的情况下直接引起神经变性;

[0010] ■在实验小鼠模型中,tau 蛋白的存在几乎完全缓解了由淀粉状蛋白病理引起的认知缺陷(Roberson 等,2007)。

[0011] 组合的论据支持 tau 蛋白是 AD 和相关神经变性 tau 病中的认知死亡中的主要参与者的假说。

[0012] 突出涌现的 AD 治疗是通过使用特异性 mAb 的被动免疫治疗来清除推测具有神经毒性或突触毒性的淀粉状肽和它们的聚集物。

[0013] 预期此处提出的靶向 tau 病理的免疫治疗对抗已知或推测引起神经变性的病理 tau 蛋白构象异构体。已提出 AD 中的淀粉状蛋白病理和神经元内超磷酸化 tau 蛋白聚集物在导致从轻微认知损伤 (MCI) 至 AD 的严重痴呆的病理事件的认知和变性级联中协同作用。因此,定向 tau 的药疗法与定向淀粉状蛋白(或任意其他)的药疗法的组合将构成优选的,且基本上更有效的 AD 治疗。

[0014] 靶向 tau 蛋白的其他治疗途径少见,且主要包括:

[0015] ■认为其将 tau 的磷酸化增加至病理水平的激酶的抑制剂;

[0016] ■阻断超磷酸化 tau 蛋白的胞质聚集的化合物。

[0017] 这些途径具有特异性和功效的多种缺点,这是它们与修饰 APP 和淀粉状蛋白的代谢的尝试所共有的问题,这些全都强调继续寻找包括针对 tau 的免疫治疗的其他治疗选择的重要性。

[0018] 实际上,尚未致力于在体内确定——更不必说靶向——病理 tau 构象异构体。在 A β 42 的 II 期临床试验中,似乎未很好地考虑也未较深入地分析缠结病理 (Nicolli 等, 2003 ;Masliah 等, 2005)。另一方面,虽然 tau 聚集物存留,但在具有组合的 AD 样病理的临床前小鼠模型中靶向淀粉状蛋白的实验性免疫治疗也显示对 tau 病理的作用 (Oddo 等, 2004)。

[0019] 已对通过免疫治疗接近胞内 tau 蛋白的可行性提出了一些质疑。Asuni 和同事最近在 tau 病小鼠模型中的实验研究 (Asuni 等, 2007) 反击了这些质疑。他们通过用 tau 蛋白衍生的磷酸肽接种显示了缠结病理的减少和功能改善。这些数据支持之前的报道:在帕金森综合症 (PD) 模型中靶向 α -突触核蛋白 (Masliah 等, 2005) 和在肌萎缩性侧索硬化 (ALS) 模型中靶向超氧化物歧化酶 (Urushitani 等, 2007) 的免疫治疗。这两种疾病是通过尚未充分了解的机制导致神经变性的胞内蛋白质的实例。另一方面,在细菌中产生并从细菌分离的全长重组 tau 蛋白质似乎不适合作为疫苗,虽然所使用的佐剂,即完全弗氏佐剂和百日咳毒素可以促成该研究的阴性结果 (Rosenmann 等, 2006)。

[0020] 存在对有效对抗病理蛋白质构象异构体的被动和 / 或主动免疫治疗的未得到满足的需要,已知——或推测——该病理蛋白质构象异构体引起神经变性障碍,如由例如神经元内的超磷酸化 tau 蛋白聚集物引起的 AD 中的淀粉状蛋白病理,该聚集物对 AD 而言与淀粉状蛋白一样典型。

[0021] 可以通过提供使用基于脂质体的疫苗 (Nicolau 等, 2002 ;Muhs 等, 2007) 和基于模拟 tau 蛋白的主要病理磷酸化表位的磷酸肽的 mAb 的被动和主动免疫方法来在本发明的范围内满足此未得到满足的需要。这些组合作用产生针对被认为在包括 AD 的 tau 病中负责突触毒性和神经毒性的 tau 蛋白上的线性和构象、简单和复杂的磷酸化表位的新的特异性 mAb。

[0022] 本发明提供用于在生物中,但尤其是在动物,尤其是哺乳动物或人内引出高特异性,尤其是构象特异性免疫应答的新方法,及根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽及其功能片段,包括含有该抗原肽或其片段的组合物,其高度有效,且能够预防或缓解 tau 病或与 tau 病相关的症状,tau 病是与神经原纤维损伤的形成相关的一组疾病和障碍,神经原纤维损伤的形成是此组神经变性障碍中的主要脑病理。

[0023] 本发明还涉及用于预防或缓解 tau 病或与 tau 病相关的症状的抗体,尤其是单克

隆抗体,包括其功能部分,及包含该抗体的药物组合物,该抗体通过根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽或其功能片段及包含该抗原肽或其片段的组合物的施用产生自生物中的高特异性,尤其是构象特异性免疫应答,tau 病是与神经原纤维损伤的形成相关的一组疾病和障碍,神经原纤维损伤的形成是此组神经变性障碍中的主要脑病理。

[0024] 此组神经变性障碍可以进一步划分为两个亚类。第一类中包含显示 tau 病理和淀粉状蛋白病理的共存的疾病和障碍,其包括但不限于阿尔茨海默病、克 - 雅综合症、拳击员痴呆、唐氏综合症、格 - 施 - 沙病、包涵体肌炎、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病和外伤性脑损伤。

[0025] 第二类中包含无明显的淀粉状蛋白病理的疾病或障碍,其包括但不限于肌萎缩性侧索硬化 / 帕金森综合症 - 痴呆综合症、嗜银颗粒性痴呆、皮层基底节 (corticobasal) 变性、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、17 号染色体连锁额颞痴呆伴帕金森综合症、哈 - 施病 (Hallervorden-Spatz disease)、多系统性萎缩、C 型尼 - 皮病、皮克病、进行性皮层下神经胶质增生、进行性核上性全脑炎。

[0026] 具体而言,本发明提供用于在患有与神经原纤维损伤的形成相关的疾病或障碍的哺乳动物,尤其是人中保持或改善,但尤其是恢复,更尤其是完全恢复认知记忆能力的新的方法,及包含根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽或其功能片段的药物组合物,及可通过对宿主动物施用根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽或其功能片段获得的抗体,尤其是单克隆抗体,包括其功能部分。

[0027] 本发明的目的是提供抗原肽,尤其是修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽可获自 tau 蛋白。具体而言,本发明涉及用于治疗由神经原纤维损伤的形成引起或与神经原纤维损伤的形成相关的疾病和障碍的:模拟 tau 蛋白的主要病理磷酸化表位的抗原肽,尤其是抗原磷酸肽,或其功能片段,通过附着在载体上或重构在载体中来进一步修饰该肽或片段;包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物;及分别产生这种肽或其功能片段和药物组合物的方法;神经原纤维损伤的形成是 tau 病中的主要脑病理,tau 病包含一组异质性神经变性疾病或障碍,该组异质性神经变性疾病或障碍包含:显示 tau 病理和淀粉状蛋白病理的共存的疾病或障碍,其包括但不限于阿尔茨海默病、克 - 雅综合症、拳击员痴呆、唐氏综合症、格 - 施 - 沙病、包涵体肌炎和朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、外伤性脑损伤;及不显示明显的淀粉状蛋白病理的其他疾病和障碍,其包括但不限于关岛肌萎缩性侧索硬化 / 帕金森综合症 - 痴呆综合症、非关岛运动神经元病伴神经原纤维缠结、嗜银颗粒性痴呆、皮层基底节变性、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、17 号染色体连锁额颞痴呆伴帕金森综合症、Hallervorden-Spatz 病、多系统性萎缩、C 型尼 - 皮病、皮克病、进行性皮层下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结型痴呆 (tangle only dementia)、脑炎后帕金森综合症、强直性肌营养不良。

[0028] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽或其功能片段和包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段分别包含选自 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :9 中所示序列的氨基酸序列的 5 个氨基酸残基至 30 个氨基酸残基、尤其是 10 个氨基酸残基至 25 个氨基酸残基、尤其是 12 个氨基酸残基至 22 个氨基酸残基、尤其是 14 个氨基酸残基至 20 个氨基酸残基、尤其是 16 个氨基酸残基至 18 个氨基酸残基,其中该序列表征为与病理病症或障碍,尤其是与

神经原纤维损伤的形成相关的病症或障碍相关的特征性磷酸化模式。

[0029] 在一个实施方案中,本发明涉及编码选自 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :9 中所示序列的抗原肽或其功能片段的核酸分子或其片段。

[0030] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与 SEQ ID NO :2 中所示序列显示至少 80%、尤其是至少 85%、尤其是至少 90%、尤其是至少 95%、尤其是至少 98%、尤其是至少 99% 序列同一性的氨基酸序列,且具有与该 SEQ ID NO :2 的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于 SEQ ID NO :2 的氨基酸残基 18 (P-Tyr₁₈) 的氨基酸残基是磷酸化的 (T1)。

[0031] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示 SEQ ID NO :2 中所示的氨基酸序列,其中氨基酸残基 18 (P-Tyr₁₈) 是磷酸化的 (T1)。

[0032] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段分别显示与 SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4 中所示序列显示至少 80%、尤其是至少 85%、尤其是至少 90%、尤其是至少 95%、尤其是至少 98%、尤其是至少 99% 序列同一性的氨基酸序列,且具有与该 SEQ ID NO :3 的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中分别对应于 SEQ ID NO :3 和 4 的氨基酸残基 202 (P-Ser₂₀₂)、205 (P-Thr₂₀₅)、212 (P-Thr₂₁₂) 和 214 (P-Ser₂₁₄) 的氨基酸残基中的至少一个、尤其是至少两个、尤其是至少三个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0033] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段分别显示 SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4 中所示的氨基酸序列,其中氨基酸残基 202 (P-Ser₂₀₂)、205 (P-Thr₂₀₅)、212 (P-Thr₂₁₂) 和 214 (P-Ser₂₁₄) 中的至少一个、尤其是至少两个、尤其是至少三个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0034] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与 SEQ ID NO :4 中所示序列显示至少 80%、尤其是至少 85%、尤其是至少 90%、尤其是至少 95%、尤其是至少 98%、尤其是至少 99% 序列同一性的氨基酸序列,且具有与该 SEQ ID NO :4 的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于 SEQ ID NO :4 的氨基酸残基 202 (P-Ser₂₀₂) 和 205 (P-Thr₂₀₅) 的氨基酸残基中的至少一个、尤其是至少两个是磷酸化的。

[0035] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示 SEQ ID NO :4 中所示的氨基酸序列,其中氨基酸残基 202 (P-Ser₂₀₂) 和 205 (P-Thr₂₀₅) 中的至少一个、尤其是至少两个是磷酸化的。

[0036] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与 SEQ ID NO :3 中所示序列显示至少 80%、尤其是至少 85%、尤其是至少 90%、尤其是至少 95%、尤其是至少 98%、尤其是至少 99% 序列同一性的氨基酸序列,且具有与该 SEQ ID NO :3 的抗

原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于 SEQ ID NO:3 的氨基酸残基 212(P-Thr₂₁₂) 和 214(P-Ser₂₁₄) 的氨基酸残基中的至少一个、尤其是至少两个是磷酸化的。

[0037] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列,其中氨基酸残基 212(P-Thr₂₁₂) 和 214(P-Ser₂₁₄) 中的至少一个、尤其是至少两个是磷酸化的。

[0038] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与 SEQ ID NO:5 中所示序列显示至少 80%、尤其是至少 85%、尤其是至少 90%、尤其是至少 95%、尤其是至少 98%、尤其是至少 99% 序列同一性的氨基酸序列,且具有与该 SEQ ID NO:5 的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于 SEQ ID NO:5 的氨基酸残基 396(P-Ser₃₉₆) 和 404(P-Ser₄₀₄) 的氨基酸残基中的至少一个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0039] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示 SEQ ID NO:5 中所示的氨基酸序列,其中氨基酸残基 396(P-Ser₃₉₆) 和 404(P-Ser₄₀₄) 中的至少一个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0040] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与 SEQ ID NO:6 中所示序列显示至少 80%、尤其是至少 85%、尤其是至少 90%、尤其是至少 95%、尤其是至少 98%、尤其是至少 99% 序列同一性的氨基酸序列,且具有与该 SEQ ID NO:6 的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于 SEQ ID NO:6 的氨基酸残基 404(P-Ser₄₀₄) 和 409(P-Ser₄₀₉) 的氨基酸残基中的至少一个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0041] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示 SEQ ID NO:6 中所示的氨基酸序列,其中氨基酸残基 404(P-Ser₄₀₄) 和 409(P-Ser₄₀₉) 中的至少一个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0042] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与 SEQ ID NO:7 中所示序列显示至少 80%、尤其是至少 85%、尤其是至少 90%、尤其是至少 95%、尤其是至少 98%、尤其是至少 99% 序列同一性的氨基酸序列,且具有与该 SEQ ID NO:7 的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于 SEQ ID NO:7 的氨基酸残基 202(P-Ser₂₀₂)、205(P-Thr₂₀₅)、212(P-Thr₂₁₂) 和 214(P-Ser₂₁₄) 的氨基酸残基中的至少一个、尤其是至少两个、尤其是至少三个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0043] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示 SEQ ID NO:7 中所示的序列,其中氨基酸残基 202(P-Ser₂₀₂)、205(P-Thr₂₀₅)、212(P-Thr₂₁₂) 和 214(P-Ser₂₁₄) 中的至少一个、尤其是至少两个、尤其是至少三个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0044] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与 SEQ ID NO:8 中

所示序列显示至少 80%、尤其是至少 85%、尤其是至少 90%、尤其是至少 95%、尤其是至少 98%、尤其是至少 99% 序列同一性的氨基酸序列,且具有与该 SEQ ID NO:8 的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于 SEQ ID NO:8 的氨基酸残基 409 (P-Ser₄₀₉) 的氨基酸残基是磷酸化的。

[0045] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示 SEQ ID NO:8 中所示的氨基酸序列,其中对应于 SEQ ID NO:8 的氨基酸残基 409 (P-Ser₄₀₉) 的氨基酸残基是磷酸化的。

[0046] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与 SEQ ID NO:9 中所示序列显示至少 80%、尤其是至少 85%、尤其是至少 90%、尤其是至少 95%、尤其是至少 98%、尤其是至少 99% 序列同一性的氨基酸序列,且具有与该 SEQ ID NO:9 的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于 SEQ ID NO:9 的氨基酸残基 404 (P-Ser₄₀₄) 的氨基酸残基是磷酸化的。

[0047] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示 SEQ ID NO:9 中所示的氨基酸序列,其中对应于 SEQ ID NO:9 的氨基酸残基 404 (P-Ser₄₀₄) 的氨基酸残基是磷酸化的。

[0048] 本发明还包含按照本发明修饰的抗原肽或其功能片段,及含有该修饰的抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽与上文提到的 SEQ ID NO:2 至 9 中所示的抗原肽基本上同一,且具有与该 SEQ ID NO:2 至 9 的抗原肽基本上相同的免疫原活性,但尤其是变体肽片段,其是该片段的保守性修饰变体,其中该改变导致用化学上相似的氨基酸取代一个或多个氨基酸,尤其是 1 至 10 个氨基酸,更尤其是 1 至 6 个氨基酸,甚至更尤其是 1 至 4 个氨基酸,但尤其是 1 至 3 个氨基酸。提供功能上相似的氨基酸的保守性取代表为本领域公知,并公开于本文下文中。优选这样产生保守性取代,使得肽的总体净电荷以及肽分子上的电荷分布保持基本上相同。

[0049] 本发明还包含变体肽片段,尤其是按照本发明修饰的变体抗原肽,及包含该变体肽片段的药物组合物,该肽与上文鉴定的本发明的片段基本上同一,且具有与该片段基本上相同的生物活性,其中缺失一个或多个氨基酸残基。

[0050] 在另一实施方案中,以选自二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体、十聚体、十一聚体、十二聚体、十三聚体、十四聚体、十五聚体、十六聚体、二十聚体、三十聚体和五十聚体的多聚体形式提供本发明的肽或其功能片段,其中组成该多聚体的单体单位总是同一的或是不同的单体单位,且选自根据本发明和如本文中所述的肽,尤其是 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9 中所示的肽,或其功能片段,及变体肽。

[0051] 在一个实施方案中,通过附着在载体上或重构在载体中来修饰根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽或其功能片段,该载体尤其是还具有作为产生超分子抗原构建体的佐剂的功能性的载体。在具体实施方案中,通过附着在例如脂质体上或重构在例如脂质体中来修饰根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽,或其功能片段,以产生 WO 公

开 W02005/081872 中所述的“超分子抗原构建体”，该 W0 公开的描述在此以其整体引入作为参考。还进一步这样修饰抗原肽或其功能片段，使得它在载体表面上显示独特的抗原肽呈递，该呈递导致增强的抗原暴露，并最终导致显示高构象敏感度的抗体的产生。具体而言，通过与便于插入脂质体载体 / 免疫佐剂的脂双层的亲脂或疏水部分结合来修饰根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽，尤其是通过作为肽在脂质体双层中的锚发挥作用，且具有导致肽靠近脂质体表面定位和稳定化的尺寸的亲脂或疏水部分。

[0052] 在本发明的另一实施方案中，亲脂或疏水部分是脂肪酸、甘油三酯或磷脂，尤其是含有 C12 和 C24 之间的碳链的脂肪酸、甘油三酯或磷脂，但尤其是棕榈酸。

[0053] 在本发明的具体实施方案中，通过至少两分子棕榈酸与该抗原肽或其功能片段的 N 端和 C 末端共价结合和通过重构在脂质体载体中来修饰根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽，或其功能片段。

[0054] 在本发明的一个实施方案中，缀合物中的肽或片段各与四分子棕榈酸偶联；因此它们是四棕榈酰化的。

[0055] 在本发明的一个实施方案中，两分子棕榈酸与肽或片段的 N 末端偶联，两分子棕榈酸与肽或片段的 C 末端偶联。

[0056] 还在另一实施方案中，本发明提供根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽，或其功能片段，其通过与亲脂或疏水部分，例如棕榈酸结合来修饰并重构在脂质体中，其中该脂质体制剂可以还包含产生超分子抗原构建体的佐剂，例如脂质 A、明矾、磷酸钙、白细胞介素 1 和 / 或多糖和蛋白质的微囊，但尤其是去毒脂质 A，如单磷酸或二磷酸脂质 A，或明矾。

[0057] 在一个实施方案中，本发明涉及本发明的超分子构建体和如本文中所述的超分子构建体，其每个载体分子包含根据本发明和如本文中所述的一个或多个抗原肽，尤其是两个或多个抗原肽，或其功能片段。

[0058] 在本发明的一个实施方案中，该载体分子是脂质体。

[0059] 在本发明的一个实施方案中，该两个或多个抗原肽是相同的或不同的肽，尤其是选自 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :9 的肽或其功能片段和变体肽。

[0060] 在一个实施方案中，本发明涉及本发明的超分子构建体和如本文中所述的超分子构建体，其每个载体分子包含两个或多个 SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4 的抗原肽或其功能片段的组合。

[0061] 在一个实施方案中，本发明涉及抗体，尤其是单克隆抗体，包括任意功能上等同的抗体，或其功能部分，该抗体识别和结合磷酸化病理 tau 蛋白构象异构体，或导致该构象异构体的病理特性的那些构象异构体部分，尤其是 tau 蛋白的病理磷酸化表位。

[0062] 具体而言，本发明提供抗体，尤其是单克隆抗体，包括任意功能上等同的抗体，或其功能部分，该抗体以高特异性识别和结合磷酸化病理 tau 蛋白构象异构体，或导致该构象异构体的病理特性的那些构象异构体部分，尤其是 tau 蛋白的病理磷酸化表位。

[0063] 在具体实施方案中，本发明的抗体，尤其是单克隆抗体，包括任意功能上等同的抗体，或其功能部分以比对未磷酸化的非病理 tau 构象异构体的结合亲和力高至少 40%、尤其是至少 50%、尤其是至少 60%、尤其是至少 70%、尤其是至少 80%、尤其是至少 90%、尤

其是至少 95% 和至多 100% 的亲合力结合病理 tau 蛋白构象异构体或导致该构象异构体的病理特性的那些构象异构体部分。

[0064] 在具体实施方案中, 提供本发明的抗体, 尤其是单克隆抗体, 包括任意功能上等同的抗体, 或其功能部分, 其特异性结合人阿尔茨海默病脑中的神经原纤维缠结 (NFT) 和神经毡细丝 (neuropil thread)。

[0065] 本发明的另一目的是提供抗体, 尤其是单克隆抗体, 或其功能部分, 其直接和特异地与 tau 蛋白上的表位, 或与表位的组合, 尤其是与磷酸化病理 tau 蛋白构象异构体特异的表位, 尤其是 tau 蛋白的病理磷酸化表位, 例如选自 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :9 中给出的序列的肽序列及其变体片段所代表或包含于其中的表位结合。

[0066] 具体而言, 本发明提供包括任意功能上等同的抗体的抗体或其功能部分, 尤其是包括任意功能上等同的抗体的单克隆抗体或其功能部分, 其可以通过用抗原肽, 尤其是根据本发明和如之前本文中所述的肽组合物, 尤其是包含含有 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :9 中给出的氨基酸序列的抗原肽, 包括其功能片段或变体片段的组合物免疫适宜的动物来获得。

[0067] 在一个实施方案中, 本发明涉及抗体, 尤其是单克隆抗体, 包括任意功能上等同的抗体, 或其功能部分, 该抗体具有由 2010 年 3 月 3 日保藏为 DSMACC3043 的杂交瘤细胞系 ACI-41-Ab1 产生的抗体的特性。

[0068] 更具体而言, 本发明涉及由 2010 年 3 月 3 日保藏为 DSM ACC3043 的杂交瘤细胞系 ACI-41-Ab1 产生的抗体, 尤其是单克隆抗体, 包括任意功能上等同的抗体, 或其功能部分。

[0069] 在一个实施方案中, 本发明涉及抗体, 尤其是单克隆抗体, 包括任意功能上等同的抗体, 或其功能部分, 该抗体具有由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSMACC3044 的杂交瘤细胞系 2B6 产生的抗体的特性。

[0070] 更具体而言, 本发明涉及由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSM ACC3044 的杂交瘤细胞系 2B6 产生的抗体, 尤其是单克隆抗体, 包括任意功能上等同的抗体, 或其功能部分。

[0071] 在一个实施方案中, 本发明涉及抗体, 尤其是单克隆抗体, 包括任意功能上等同的抗体, 或其功能部分, 该抗体具有由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSMACC3045 的杂交瘤细胞系 3A8 产生的抗体的特性。

[0072] 更具体而言, 本发明涉及由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSM ACC3045 的杂交瘤细胞系 3A8 产生的抗体, 尤其是单克隆抗体, 包括任意功能上等同的抗体, 或其功能部分。

[0073] 在一个实施方案中, 本发明涉及抗体, 尤其是单克隆抗体, 包括任意功能上等同的抗体, 或其功能部分, 该抗体具有由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSM ACC3046 的杂交瘤细胞系 4C1 产生的抗体的特性。

[0074] 更具体而言, 本发明涉及由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSM ACC3046 的杂交瘤细胞系 4C1 产生的抗体, 尤其是单克隆抗体, 包括任意功能上等同的抗体, 或其功能部分。

[0075] 在一个实施方案中, 本发明涉及抗体, 尤其是单克隆抗体, 包括任意功能上等同的抗体, 或其功能部分, 该抗体具有由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSMACC3047 的杂交瘤细胞系 5D10A3 产生的抗体的特性。

[0076] 更具体而言,本发明涉及由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSM ACC3047 的杂交瘤细胞系 5D10A3 产生的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分。

[0077] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSMACC3048 的杂交瘤细胞系 6C10 产生的抗体的特性。

[0078] 更具体而言,本发明涉及由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSM ACC3048 的杂交瘤细胞系 6C10 产生的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分。

[0079] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSMACC3049 的杂交瘤细胞系 6H1 产生的抗体的特性。

[0080] 更具体而言,本发明涉及由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSM ACC3049 的杂交瘤细胞系 6H1 产生的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分。

[0081] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSMACC3050 的杂交瘤细胞系 7C2 产生的抗体的特性。

[0082] 更具体而言,本发明涉及由 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSM ACC3050 的杂交瘤细胞系 7C2 产生的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分。

[0083] 可以以仍显示上文公开的特异性结合特征的嵌合抗体或人源化抗体的形式提供抗体。

[0084] 在一个实施方案中,本发明涉及产生本文中所述的本发明的抗体的细胞系。

[0085] 在具体实施方案中,本发明涉及于 2010 年 3 月 3 日保藏为 DSMACC3043 的杂交瘤细胞系 ACI-41-Ab1。

[0086] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSMACC3044 的杂交瘤细胞系 2B6。

[0087] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSMACC3045 的杂交瘤细胞系 3A8。

[0088] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSMACC3046 的杂交瘤细胞系 4C1。

[0089] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSMACC3047 的杂交瘤细胞系 5D10A3。

[0090] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSMACC3048 的杂交瘤细胞系 6C10。

[0091] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSMACC3049 的杂交瘤细胞系 6H1。

[0092] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于 2010 年 3 月 10 日保藏为 DSMACC3050 的杂交瘤细胞系 7C2。

[0093] 本文还包含上文所列的具体杂交瘤细胞系的亚克隆和变体克隆,其仍产生具有本发明的特异性 tau 结合特性的抗体。

[0094] 在具体实施方案中,本发明提供药物组合物和产生药物组合物的方法,该药物组

合物包含根据本发明的抗原肽片段和如本文中所述的抗原肽片段,尤其是通过附着在载体、尤其是脂质体载体上和/或重构在载体、尤其是脂质体载体中修饰的抗原肽片段,或其功能片段,连同可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂,用于保持或改善,尤其是用于完全恢复患有记忆损伤的动物,尤其是哺乳动物或人的认知记忆能力。

[0095] 在一个实施方案中,提供以治疗有效量包含本发明的包括任意功能上等同的抗体的抗体或其功能部分,尤其是包括任意功能上等同的抗体的单克隆抗体或其功能部分,连同可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂的药物组合物。

[0096] 提供根据本发明和如本文中所述的药物组合物和/或用于治疗由神经原纤维损伤的形成引起或与神经原纤维损伤的形成相关的疾病和障碍的方法也是本发明的目的,神经原纤维损伤的形成是 tau 病中的主要脑病理,tau 病包含一组异质性神经变性疾病或障碍,该组异质性神经变性疾病或障碍包括:显示 tau 病理和淀粉状蛋白病理的共存的疾病或障碍,其包括但不限于阿尔茨海默病、克-雅综合症、拳击员痴呆、唐氏综合症、格-施-沙病、包涵体肌炎和朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、外伤性脑损伤;及不显示明显的淀粉状蛋白病理的其他疾病或障碍,其包括但不限于关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森综合症-痴呆综合症、非关岛运动神经元病伴神经原纤维缠结、嗜银颗粒性痴呆、皮层基底节变性、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、17 号染色体连锁额颞痴呆伴帕金森综合症、Halleorden-Spatz 病、多系统性萎缩、C 型尼-皮病、皮克病、进行性皮层下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结型痴呆、脑炎后帕金森综合症、强直性肌营养不良,该方法包括以治疗有效量对动物,尤其是哺乳动物或人施用根据本发明和如本文中所述的药物组合物,连同可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0097] 在具体实施方案中,本发明提供根据本发明和如本文中所述的药物组合物,和/或用于保持或增加患有记忆损伤的动物,尤其是哺乳动物或人的认知记忆能力,但尤其是用于完全恢复患有记忆损伤的动物,尤其是哺乳动物或人的认知记忆能力的方法,该方法包括以治疗有效量对动物,尤其是哺乳动物或人施用根据本发明和如本文中所述的药物组合物,连同可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0098] 本发明的另一目的是提供药物组合物和产生这种药物组合物的方法,以及用于通过与可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂一起,以治疗有效量对动物或人施用本发明的药物组合物来在患有由神经原纤维损伤的形成引起,或与神经原纤维损伤的形成相关的疾病和病症的动物,尤其是哺乳动物或人中诱导免疫应答的方法。

[0099] 在本发明的一个实施方案中,提供以这样的程度在患有导致 tau 病的神经原纤维损伤的动物,尤其是哺乳动物或人中诱导免疫应答,使得可以获得与此疾病或病症相关的症状,例如记忆损伤的保持或改善,尤其是最初病症的完全恢复的方法。

[0100] 在对动物,尤其是哺乳动物,但尤其是入施用,包含根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽的药物组合物主要导致非炎性 Th2 亚型,例如同种型 IgG1 和 IgG2b 的抗体和/或独立于 T 细胞的 IgG 亚类,例如 IgG3 的抗体的产生,和/或不导致脑中炎症标志,尤其是选自 IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 和 TNF α 的炎症标志的显著增加。

[0101] 在本发明的另一方面,在患者,尤其是动物或人患者,尤其是需要这种独立于 T 细胞的应答的患者,例如免疫耐受患者或 T 细胞活化患者中治疗疾病、病症或障碍时,可以用包含根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽的药物组合物来诱导独立于 T 细胞的

免疫应答,其中,通过附着在载体、尤其是脂质体载体上和 / 或重构在载体、尤其是脂质体载体中来修饰该抗原肽,使得抗原呈递在载体、尤其是脂质体的表面上。

[0102] 在一个实施方案中,本文中所述的本发明的抗原组合物作为免疫刺激剂是有效的。

[0103] 在本发明的具体实施方案中,该肽抗原以高度重复阵列呈递在脂质体的表面上。在另一具体实施方案中,该抗原不包含 T 细胞表位。

[0104] 在本发明的一个实施方案中,本文中所述的本发明的抗原组合物用于治疗免疫耐受患者或 T 细胞活化患者,尤其是无免疫应答的患者,尤其是患有自身免疫病的患者,尤其是患有 T 细胞缺乏,尤其是由 CD4T 细胞在该患者内的缺失和 / 或 CD4T 细胞上 CD14 和 / 或 CD40L 的减少的表达引起的 T 细胞缺乏的患者。

[0105] 本发明的抗体可以用于在患者中诊断 tau 蛋白相关疾病或病症的方法中,该方法包括在样品中或在原位检测抗体或其活性片段与 tau 蛋白表位的免疫特异性结合,其包括以下步骤:

[0106] (a) 使疑似包含 tau 蛋白的样品或具体身体部分或身体区域与该抗体接触,该抗体结合 tau 蛋白的表位;

[0107] (b) 使抗体与 tau 蛋白结合,以形成免疫复合物;

[0108] (c) 检测免疫复合物的形成;和

[0109] (d) 使免疫复合物的存在或缺乏与 tau 蛋白在样品或具体身体部分或区域中的存在或缺乏相关。

[0110] 在一个实施方案中,提供用于在患者中诊断对 tau 蛋白相关疾病或病症的诱因的方法,该方法包括在样品中或在原位检测单克隆抗体或其活性片段与 tau 蛋白表位的免疫特异性结合,其包括以下步骤:

[0111] (a) 使疑似包含 tau 抗原的样品或具体身体部分或身体区域与根据本发明的抗体和如之前本文中所述的抗体接触,该抗体结合 tau 蛋白的表位;

[0112] (b) 使抗体与 tau 抗原结合,以形成免疫复合物;

[0113] (c) 检测免疫复合物的形成;和

[0114] (d) 使免疫复合物的存在或缺乏与 tau 抗原在样品或具体身体部分或区域中的存在或缺乏相关;

[0115] (e) 将该免疫复合物的量与正常对照值相比;

[0116] 其中,与正常对照值相比,该聚集物的量的增加指示该患者患有 tau 蛋白相关疾病或病症,或处于发展 tau 蛋白相关疾病或病症的风险。

[0117] 在另一实施方案中,本发明涉及用于在用任意前述抗体或药物组合物治疗后在患者中监测微小残留病 (minimal residual disease) 的方法,其中该方法包括:

[0118] (a) 使疑似包含 tau 抗原的样品或具体身体部分或身体区域与根据本发明的抗体和如之前本文中所述的抗体接触,该抗体结合 tau 蛋白的表位;

[0119] (b) 使抗体与 tau 抗原结合,以形成免疫复合物;

[0120] (c) 检测免疫复合物的形成;和

[0121] (d) 使免疫复合物的存在或缺乏与 tau 抗原在样品或具体身体部分或区域中的存在或缺乏相关;

[0122] (e) 将该免疫复合物的量与正常对照值相比；

[0123] 其中，与正常对照值相比，该聚集物的量的增加指示该患者仍患有微小残留病。

[0124] 还在另一实施方案中，本发明提供用于预测用任意前述抗体或药物组合物治疗的患者的反应性的方法，其包括：

[0125] (a) 使疑似包含 tau 抗原的样品或具体身体部分或身体区域与根据本发明的抗体和如之前本文中所述的抗体接触，该抗体结合 tau 蛋白的表位；

[0126] (b) 使抗体与 tau 抗原结合，以形成免疫复合物；

[0127] (c) 检测免疫复合物的形成；和

[0128] (d) 使免疫复合物的存在或缺乏与 tau 抗原在样品或具体身体部分或区域中的存在或缺乏相关；

[0129] (e) 比较起始治疗之前和之后免疫复合物的量；

[0130] 其中，该聚集物的量的增加指示该患者具有对治疗具有反应的高可能性。

[0131] 在本发明的另一实施方案中，本发明的抗体可以用于用于检测和诊断 tau 相关疾病和病症的测试试剂盒中。

[0132] 具体而言，提供包含本发明的抗体的用于检测和诊断 tau 蛋白相关疾病和病症的测试试剂盒，尤其是包含装有本发明的一种或多种抗体的容器，及为了与 tau 抗原结合形成免疫复合物和检测免疫复合物的形成，使得免疫复合物的存在或缺乏与 tau 抗原的存在或缺乏相关的目的而使用抗体的说明的测试试剂盒。

[0133] 本发明的这些和其他目的、特征和优势将在参阅以下所公开的实施方案和所附权利要求的详细描述后变得显而易见。

[0134] 附图和序列简述

[0135] 图 1a：用 ACI-33 免疫的 WT 小鼠中的抗 -Tau5-20[pY18]IgG 抗体。在 d0、d13 和 d28 接受三次 ACI-33 注射，并在 d-1、d27 和 d47 采血的 C57BL/6 野生型小鼠的血清中的抗 -Tau5-20[pY18]IgG 抗体的分析。结果表示为在 6 只小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。

[0136] 图 1b：用 ACI-33 免疫的 TKO 小鼠中的抗 -Tau5-20[pY18]IgG 抗体。在 d0、d13 和 d28 接受三次 ACI-33 注射，并在 d-1、d27 和 d47 采血的 C57BL/6 野生型小鼠的血清中的抗 -Tau5-20[pY18]IgG 抗体的分析。结果表示为在 6 只小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。

[0137] 图 2a：用 ACI-35 免疫的 WT 小鼠中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404]IgG 抗体。在 d0、d16、d30、d99 和 d113 接受五次 ACI-35 注射，并在 d-1、d28、d42、d98 和 d126 采血的 C57BL/6 野生型小鼠的血清中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404]IgG 抗体的分析。结果表示为在 6 只小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。

[0138] 图 2b：用 ACI-35 免疫的 TKO 小鼠中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404]IgG 抗体。在 d0、d16、d30、d99 和 d113 接受五次 ACI-35 注射，并在 d-1、d28、d42、d98 和 d126 采血的 TKO 小鼠的血清中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404]IgG 抗体的分析。结果表示为在 6 只小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。

[0139] 图 3a：用 ACI-36 免疫的 WT 小鼠中的抗 -Tau401-418[pS404/S409]IgG 抗体。在 d0、d13 和 d28 接受三次 ACI-36 注射，并在 d-1、d27 和 d47 采血的 C57BL/6 野生型小鼠的

血清中的抗 -Tau401-418[pS404/S409]IgG 抗体的分析。结果表示为在 6 只小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。

[0140] 图 3b :用 ACI-36 免疫的 TKO 小鼠中的抗 -Tau401-418[pS404/S409]IgG 抗体。在 d0、d13 和 d28 接受三次 ACI-36 注射,并在 d-1、d27 和 d47 采血的 TKO 小鼠的血清中的抗 -Tau401-418[pS404/S409]IgG 抗体的分析。对于 d-1/d27,结果表示为在 6 只小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差 ;对于 d47,结果表示为在 5 只小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。

[0141] 图 4a/4b :用 ACI-41 免疫的 WT 小鼠中的抗 -Tau206-221[pT212/pS214]和抗 -Tau196-211[pS202/pT205]IgG 抗体。在 d0、d20、d35 接受三次 ACI-41 注射,并在 d-1、d34、d48 采血的 C57BL/6 野生型小鼠的血清中的抗 -Tau206-221[pT212/pS214]和抗 -Tau196-211[pS202/pT205]IgG 抗体的分析。结果表示为在 6 只小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。在两种 pTau 肽上都测试了相同的血清。

[0142] 图 4c/4d :用 ACI-41 免疫的 TKO 小鼠中的抗 -Tau206-221[pT212/pS214]和抗 -Tau196-211[pS202/pT205]IgG 抗体。在 d0、d20、d35 接受三次 ACI-41 注射,并在 d-1、d34、d48 采血的 TKO 小鼠的血清中的抗 -Tau206-221[pT212/pS214]和抗 -Tau196-211[pS202/pT205]IgG 抗体的分析。结果表示为在 6 只小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。在两种 pTau 肽上都测试了相同的血清。

[0143] 图 5a :用 ACI-33 免疫的 WT 小鼠中的抗 -Tau5-20[pY18]IgG 同种型和 IgM 抗体。第一次 ACI-33 免疫后 47 天的 C57BL/6 小鼠的血清中的抗 -Tau5-20[pY18]IgG1、2a、2b、3 和 IgM 抗体的分析。结果表示为 1/100 (gG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和 1/3200 (IgM) 的稀释度下的 O. D. ,显示在 6 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0144] 图 5b :用 ACI-33 免疫的 TKO 小鼠中的抗 -Tau5-20[pY18]IgG 同种型和 IgM 抗体。第一次 ACI-33 免疫后 47 天的 TKO 小鼠的血清中的抗 -Tau5-20[pY18]IgG1、2a、2b、3 和 IgM 抗体的分析。结果表示为 1/100 (gG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和 1/3200 (IgM) 的稀释度下的 O. D. ,显示在 6 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0145] 图 6a :用 ACI-35 免疫的 WT 小鼠中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404]IgG 同种型和 IgM 抗体。第一次 ACI-35 免疫后 42 天的 C57BL/6 小鼠的血清中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404]IgG1、2a、2b、3 和 IgM 抗体的分析。结果表示为 1/100 (gG1)、1/1600 (IgG2a)、1/1600 (IgG2b)、1/800 (IgG3) 和 1/600 (IgM) 的稀释度下的 O. D. ,显示在 6 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0146] 图 6b :用 ACI-35 免疫的 TKO 小鼠中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404]IgG 同种型和 IgM 抗体。第一次 ACI-35 免疫后 42 天的 TKO 小鼠的血清中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404]IgG1、2a、2b、3 和 IgM 抗体的分析。结果表示为 1/100 (gG1)、1/1600 (IgG2a)、1/1600 (IgG2b)、1/800 (IgG3) 和 1/1600 (IgM) 的稀释度下的 O. D. ,显示在 6 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0147] 图 7a :用 ACI-36 免疫的 WT 小鼠中的抗 -Tau401-418[pS404/S409]IgG 同种型和 IgM 抗体。第一次 ACI-36 免疫后 47 天的 C57BL/6 小鼠的血清中的抗 -Tau401-418[pS404/S409]IgG1、2a、2b、3 和 IgM 抗体的分析。结果表示为 1/100 (IgG1)、1/400 (IgG2a)、1/400 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和 1/400 (IgM) 的稀释度下的 O. D. ,显示在 6 只小鼠的组中获

得的平均值 + 标准差。

[0148] 图 7b :用 ACI-36 免疫的 TKO 小鼠中的抗 -Tau401-418[pS404/S409] IgG 同种型和 IgM 抗体。第一次 ACI-36 免疫后 47 天的 TKO 小鼠的血清中的抗 -Tau401-418[pS404/S409] IgG1、2a、2b、3 和 IgM 抗体的分析。结果表示为 1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和 1/400 (IgM) 的稀释度下的 O. D. , 显示在 5 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0149] 图 8a :用 ACI-41 免疫的 WT 小鼠中的抗 -Tau196-211[pS202/pT205] IgG 同种型和 IgM 抗体。第一次 ACI-41 免疫后 48 天的 C57BL/6 小鼠的血清中的抗 -Tau196-211[pS202/pT205] IgG1、2a、2b、3 和 IgM 抗体的分析。结果表示为 1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/3200 (IgG2b)、1/1600 (IgG3) 和 1/3200 (IgM) 的稀释度下的 O. D. , 显示在 6 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0150] 图 8b :用 ACI-41 免疫的 TKO 小鼠中的抗 -Tau196-211[pS202/pT205] IgG 同种型和 IgM 抗体。第一次 ACI-41 免疫后 48 天的 TKO 小鼠的血清中的抗 -Tau196-211[pS202/pT205] IgG1、2a、2b、3 和 IgM 抗体的分析。结果表示为 1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/3200 (IgG2b)、1/1600 (IgG3) 和 1/3200 (IgM) 的稀释度下的 O. D. , 显示在 6 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0151] 图 9a/9b :来自 T25 瓶的 ACI-36 杂交瘤上清 :TAUPIR 和 Tau ELISA 筛选。9a. 使用未稀释的上清的老年 biGT 小鼠的 TAUPIR 染色。9b. 未稀释的克隆上清样品的抗 -pTau 肽 T4.5、抗 -Tau 肽 T4.6、抗 -pTau 蛋白和抗 -Tau 蛋白效价的分析。结果表示为 O. D. 。

[0152] 图 10a/10b/10c :来自 T25 瓶的 ACI-41 杂交瘤上清 :TAUPIR 和 TauELISA 筛选。10a. 使用未稀释的上清的老年 biGT 小鼠的 TAUPIR 染色。10b. 未稀释的克隆上清样品的抗 -pTau 肽 T8.5、抗 -Tau 肽 T8.6、抗 -pTau 蛋白和抗 -Tau 蛋白效价的分析。结果表示为 O. D. 。

10c. 未稀释的克隆上清样品的抗 -pTau 肽 T9.5、抗 -Tau 肽 T9.6、抗 -pTau 蛋白和抗 -Tau 蛋白效价的分析。结果表示为 O. D. 。

[0153] 图 11 : 用 T8 :Tau206-221[pT212/pS214]、T9 :Tau196-211[pS202/pT205] 和 hP-Tau 包被的平板上的杂交瘤上清。来自杂交瘤克隆上清的抗 -Tau206-221[pT212/pS214]、抗 -Tau196-211[pS202/pT205] 和抗 -hP-Tau 抗体的分析。结果表示为 O. D. 。在 pTau 肽和 hP-Tau 上都未稀释地测试了相同的上清。

[0154] 图 12 :抗体克隆 ACI-41-Ab1 (T89-F4) 染色人 AD 脑中的 NFT。按 1/1 (b、e 和 h) 或按 1/30 (c、f 和 i) 稀释度用 AT100 (a、d 和 g) 或 ACI-41-Ab1 (T89-F4) 染色来自 AD (a、b 和 c)、PSP (进行性核上性麻痹) (d、e 和 f) 和健康对照 (g、h 和 i) 受试者的脑切片。

[0155] 图 13 :抗体 5D10 染色人 AD 脑中的 NFT。用 5D10 (a) 或 AT100 (b) 抗体染色来自 AD 患者的皮层脑切片。

[0156] 图 14 :用 ACI-35 免疫的小鼠中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404] IgG 抗体。在 d0、d14 和 d28 接受三次 ACI-35 注射,并在 d-7、d7、d21、d35 和 d56 的 C57BL/6 小鼠的血浆中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404] IgG 抗体的分析。结果表示为在 10 只小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。

[0157] 图 15 :用 ACI-35 免疫的小鼠中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404] IgG 同种型抗体。第一次 ACI-35 免疫后 35 天的 C57BL/6 小鼠的血浆中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404]

IgG1、2a、2b 和 3 抗体的分析。结果表示为 1/1600 (IgG1)、1/3200 (IgG2a)、1/3200 (IgG2b) 和 1/800 (IgG3) 的非饱和稀释度下的 O. D. , 显示在 10 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0158] 图 16a :用 ACI-35 免疫的小鼠中的抗 -Tau393-408[pS396/S404] IgM 抗体。第一次 ACI-35 免疫后 35 天的 C57BL/6 小鼠的血浆中的抗 -Tau393-408[pS396/S404] IgM 抗体的分析。结果表示为 1/6400 的稀释度下的 O. D. , 显示在 10 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0159] 图 16b :用 ACI-35 免疫的小鼠中的抗 -Tau393-408IgG 抗体。第一次 ACI-35 免疫后 35 天的 C57BL/6 小鼠的血浆中的抗 -Tau393-408IgG 抗体的分析。结果表示为 1/100 的稀释度下的 O. D. , 显示在 10 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0160] 图 17 :来自用 Con A 或 pTau/Tau 肽再刺激的脾的细胞的增殖。d56 的 Tau 特异性 T 细胞增殖的 MTT 分析。混合来自各组的 10 只小鼠的脾细胞, 并用 ConA、Tau393-408[pS396/S404] 或 Tau393-408 肽再刺激。

[0161] 图 18 :用 Tau393-408[pS396/S404] 和 Tau393-408 肽再刺激的脾细胞的 ELISPOT 的细胞因子产生。P-Tau/Tau 特异性 T 细胞的细胞因子产生的 ELISPOT 分析。混合来自各组的 10 只小鼠的脾细胞, 并用 Tau393-408[pS396/S404] 和 Tau393-408 肽再刺激。

[0162] 图 19 :用 ACI-33 免疫的小鼠中的抗 -Tau5-20[pY18] IgG 抗体。在 d0、d13、d28、d91 和 d133 接受五次 ACI-33 注射, 并在 d-1、d27、d41、d76、d104 和 d135 采血的 TPLH 小鼠的血清中的抗 -Tau5-20[pY18] IgG 抗体的分析。结果表示为在小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。d-1, n = 10 只小鼠 ;d27、d41 和 d76, n = 9 只小鼠, 1 只小鼠因打架死亡 ;d104, n = 6, 3 只小鼠因病死亡 ;d135, n = 2, 4 只小鼠因病死亡。

[0163] 图 20 :用 ACI-35 免疫的小鼠中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404] IgG 抗体。在 d0、d13、d27、d91 和 d133 接受五次 ACI-35 注射, 并在 d-1、d26、d40、d75、d103、d145 和 d155 采血的 TPLH 小鼠的血清中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404] IgG 抗体的分析。结果表示为在小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。d-1、d26, n = 10 只小鼠 ;d40, n = 9 只小鼠 ;d75, n = 6 ;d103 和 d145, n = 4 ;d155, n = 3。所有小鼠都是因病死亡。

[0164] 图 21 :用 ACI-39 免疫的小鼠中的抗 -Tau206-221[pT212, pS214] IgG 抗体。在 d0、d13、d28、d91 和 d133 接受五次 ACI-39 注射, 并在 d-1、d27、d41、d76、d104 和 d135 采血的 TPLH 小鼠的血清中的抗 -Tau206-221[pT212, pS214] IgG 抗体的分析。结果表示为在小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。d-1、d27 和 d41, n = 10 只小鼠 ;d76, n = 7 只小鼠 ;d104, n = 6 ;d135, n = 2。所有小鼠都是因病死亡。

[0165] 图 22 :用 ACI-40 免疫的小鼠中的抗 -Tau196-211[pS202, pT205] IgG 抗体。在 d0、d13、d28、d91 和 d133 接受五次 ACI-40 注射, 并在 d-1、d27、d41、d76、d104 和 d135 采血的 TPLH 小鼠的血清中的抗 -Tau196-211[pS202, pT205] IgG 抗体的分析。结果表示为在小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。d-1、d27 和 d41, n = 10 只小鼠 ;d76, n = 8 只小鼠 ;d104, n = 6 ;d135, n = 2。所有小鼠都是因病死亡。

[0166] 图 23 :用 ACI-33 免疫的小鼠中的抗 -Tau5-20[pY18] IgG 同种型和 IgM 抗体。三次 ACI-33 免疫后 d41 的 TPLH 小鼠的血清中的抗 -Tau5-20[pY18] IgG1、2a、2b、3 和 IgM 抗体的分析。结果表示为 1/100 (IgG1)、1/200 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和 1/100 (IgM)

的稀释度下的非饱和 O. D. , 显示在 9 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0167] 图 24 : 用 ACI-35 免疫的小鼠中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404] IgG 同种型和 IgM 抗体。三次 ACI-35 免疫后 d40 的 TPLH 小鼠的血清中的抗 -Tau393-408[pS396/pS404] IgG1、2a、2b、3 和 IgM 抗体的分析。结果表示为 1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和 1/100 (IgM) 的稀释度下的非饱和 O. D. , 显示在 9 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0168] 图 25 : 用 ACI-39 免疫的小鼠中的抗 -Tau206-221[pT212, pS214] IgG 同种型和 IgM 抗体。三次 ACI-39 免疫后 d41 的 TPLH 小鼠的血清中的抗 -Tau206-221[pT212, pS214] IgG1、2a、2b、3 和 IgM 抗体的分析。结果表示为 1/100 (IgG1)、1/200 (IgG2a)、1/200 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和 1/100 (IgM) 的稀释度下的非饱和 O. D. , 显示在 10 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0169] 图 26 : 用 ACI-40 免疫的小鼠中的抗 -Tau196-211[pS202, pT205] IgG 同种型和 IgM 抗体。三次 ACI-40 免疫后 d41 的 TPLH 小鼠的血清中的抗 -Tau196-211[pS202, pT205] IgG1、2a、2b、3 和 IgM 抗体的分析。结果表示为 1/100 (IgG1)、1/400 (IgG2a)、1/200 (IgG2b)、1/800 (IgG3) 和 1/100 (IgM) 的稀释度下的非饱和 O. D. , 显示在 10 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0170] 图 27 : 用 ACI-33 免疫的小鼠中的不同 Tau 肽和蛋白质上的 IgG 抗体效价。三次 ACI-33 注射后 TPLH 小鼠的 d-1 和 d41 血清中的 IgG 抗体效价的分析。结果表示为 O. D. , 显示在 9 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0171] 图 28 : 用 ACI-35 免疫的小鼠中的不同 Tau 肽和蛋白质上的 IgG 抗体效价。三次 ACI-35 注射后 TPLH 小鼠的 d-1 和 d40 血清中的 IgG 抗体效价的分析。结果表示为 O. D. , 显示在 9 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0172] 图 29 : 用 ACI-39 免疫的小鼠中的不同 Tau 肽和蛋白质上的 IgG 抗体效价。三次 ACI-39 注射后 TPLH 小鼠的 d-1 和 d41 血清中的 IgG 抗体效价的分析。结果表示为 O. D. , 显示在 9 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0173] 图 30 : 用 ACI-40 免疫的小鼠中的不同 Tau 肽和蛋白质上的 IgG 抗体效价。三次 ACI-40 注射后 TPLH 小鼠的 d-1 和 d41 血清中的 IgG 抗体效价的分析。结果表示为 O. D. , 显示在 10 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0174] 图 31 : 用 ACI-33 免疫的小鼠对 PBS 注射的小鼠的转棒 (rotarod)。在参考 TPLH 小鼠的年龄 (月) 的五个不同时机进行了转棒试验。

[0175] 图 32 : 抗 -Tau5-20[pY18] 抗体效价与转棒测试之间的相关性。在 7.8 月龄时针对注射 ACI-33 的 TPLH 测量了相关性。通过 ELISA 测量小鼠血清中的抗体效价 (O. D.), 转棒测试测量动物在仪器上停留的时间 (时间)。

[0176] 图 33 : 用 ACI-35 免疫的小鼠对 PBS 注射的小鼠的转棒。用 ACI-35 免疫的 9.5 月龄 TPLH 小鼠对 PBS 对照组的转棒结果。ACI-35n = 5, PBSn = 4, 其他小鼠因该模型所显示的病理而死亡。

[0177] 图 34 : 用 ACI-33 处理的裸鼠和野生型小鼠中的 CD3+CD4+ 的 FACS 定量。接受 ACI-33 的裸鼠或 wt 小鼠的百分比门控 (gated) 细胞, 其是 CD3 和 CD4 染色阳性。左图 : 裸鼠组和 wt 组的两只小鼠中的 FACS 分析的图示。右图 : 各柱代表 6 只小鼠的组的平均值和

SD。小鼠 #5 和 6 :裸鼠 ;小鼠 #7 和 8 :野生型小鼠。

[0178] 图 35 :用 ACI-33 免疫的裸鼠和 wt 小鼠中的抗 -Tau5-20[pY18]IgG 抗体。在 d0、d14 和 d28 接受三次 ACI-33 注射,并在 d2、d7、d21、d35 和 d56 采血的裸鼠和 wt 小鼠的血清中的抗 -Tau5-20[pY18]IgG 抗体的分析。结果表示为在 6 只小鼠的组中获得的平均 O. D. + 标准差。

[0179] 图 36 :用 ACI-33 免疫的裸鼠和 wt 小鼠中的抗 -Tau5-20[pY18]IgG 同种型和 IgM 抗体。三次 ACI-33 免疫后 d35 的裸鼠和 wt 小鼠的血清中的抗 -Tau5-20[pY18]IgG1、2a、2b、3 和 IgM 抗体的分析。结果表示为 1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和 1/100 (IgM) 的稀释度下的非饱和 O. D.,显示在 6 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0180] 图 37 :用 ACI-33 免疫的裸鼠和 wt 小鼠中的不同 Tau 肽和蛋白质上的 IgG 抗体效价。三次 ACI-33 注射后裸鼠和 wt 小鼠的 d35 血清中的 IgG 抗体效价的分析。结果表示为 O. D.,显示在 6 只小鼠的组中获得的平均值 + 标准差。

[0181] SEQ ID NO :1 对照序列 T5 :Tau 379-408[pS396, pS404] 的氨基酸序列

[0182] SEQ ID NO :2 序列 1 (T1) :Tau 5-20[pY18] 的氨基酸序列

[0183] SEQ ID NO :3 序列 8 (T8) :Tau 206-221[pT212, pS214] 的氨基酸序列

[0184] SEQ ID NO :4 序列 9 (T9) :Tau 196-211[pS202, pT205] 的氨基酸序列

[0185] SEQ ID NO :5 序列 3 (T3) :Tau 393-408[pS396, pS404] 的氨基酸序列

[0186] SEQ ID NO :6 序列 4 (T4) :Tau 401-418[pS404, pS409] 的氨基酸序列

[0187] SEQ ID NO :7 序列 2 (T2) :Tau 200-216[pS202+pT205 和 pT212+pS214] 的氨基酸序列

[0188] SEQ ID NO :8 序列 10 (T10) :Tau 407-418[pS409] 的氨基酸序列

[0189] SEQ ID NO :9 序列 11 (T11) :Tau 399-408[pS404] 的氨基酸序列

[0190] 术语定义

[0191] 本文中使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换,且定义为意指由通过肽键连接的氨基酸组成的生物分子。

[0192] 术语“肽”是氨基酸(通常是 L-氨基酸)的链,该氨基酸的 α 碳通过肽键连接,该肽键由一个氨基酸的 α 碳的羧基与另一氨基酸的 α 碳的氨基之间的缩合反应形成。链一端(即氨基端)的末端氨基酸具有自由氨基,而链另一端(即羧基端)的末端氨基酸具有自由羧基。因此,术语“氨基端”(缩写为 N 端)指肽的氨基酸端氨基酸上的自由 α 氨基,或指肽内任意其他位置上的氨基酸的 α 氨基(参与肽键时为亚氨基)。类似地,术语“羧基端”(缩写为 C 端)指肽的羧基端氨基酸上的自由羧基,或指肽内任意其他位置上的氨基酸的羧基。

[0193] 本文中使用的术语“其片段”或“片段”指具有与本文中定义的肽(例如,分别如 SEQ ID NO 2 至 9 中所示)基本上相同的(生物)活性的功能肽片段,即该片段仍能够在生物中,但尤其是在动物,尤其是哺乳动物或人内引出高特异性,尤其是构象特异性免疫应答,其高度有效,且能够预防或缓解 tau 病,或与 tau 病相关的症状。具体而言,该片段仍包含本文中使用和定义的 tau 肽的特异性病理磷酸化表位。

[0194] 通常,从肽的氨基端起始并向肽的羧基端方向增加,按顺序编号组成肽的氨基酸。因此,说一个氨基酸“跟随”另一个氨基酸时,该氨基酸比前一氨基酸更靠近肽的羧基端定

位。

[0195] 本文中用术语“残基”来指通过酰胺键掺入肽中的氨基酸。因此,氨基酸可以是天然存在的氨基酸,或者,除非另有限制,可以包含以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥作用的天然氨基酸的已知类似物(即氨基酸模拟物)。此外,酰胺键模拟物包含本领域技术人员公知的肽主链修饰。

[0196] 本文中用短语“基本上由...组成”来排除将实质性改变该短语所指的肽的本质属性的任意元件。因此,“基本上由...组成”的肽的描述排除了将实质性改变该肽的生物活性的任意氨基酸取代、添加或缺失。

[0197] 此外,技术人员将理解,如上文所述,在编码的序列中改变、添加或缺失单个氨基酸或小百分比的氨基酸(通常少于5%,更通常少于1%)的单个取代、缺失或添加是保守性修饰变异,其中该改变导致用化学上相似的氨基酸取代氨基酸。提供功能上相似的氨基酸的保守性取代表为本领域公知。以下六组各包含对彼此而言是保守性取代的氨基酸:

[0198] 1) 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);

[0199] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0200] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0201] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0202] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);和

[0203] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0204] 短语“分离的”或“生物纯的”指实质上或本质上游离于见于它的天然状态中的正常伴随它的成分的物质。因此,本文中所述的肽不包含正常情况下与它们的原位环境结合的物质。通常,通过银染凝胶上的条带强度测量,本文中所述的分离的免疫原肽至少约80%纯,通常至少约90%和优选至少约95%(纯)。

[0205] 可以通过本领域公知的许多方法来显示蛋白质纯度或同质性,如蛋白质样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳后通过染色显示。为了某些目的,将需要高分辨率,利用HPLC或类似的手段进行纯化。

[0206] 当免疫原肽的长度相对短(即少于约50个氨基酸)时,通常用标准的化学肽合成技术合成它们。

[0207] 固相合成是用于化学合成本文中所述的免疫原肽的优选方法,其中将序列的C端氨基酸与不可溶支持物连接,然后连续添加序列中的其余氨基酸。用于固相合成的技术为本领域技术人员已知。

[0208] 备选地,用重组核酸法合成本文中所述的免疫原肽。一般而言,这涉及产生编码肽的核酸序列,将核酸在特定启动子控制下放置在表达盒中,在宿主中表达肽,分离所表达的肽或多肽,并根据需要复性肽。足以指导技术人员完成这类方法的技术见于文献中。

[0209] 一旦表达,即可以按照包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、凝胶电泳等的标准方法纯化重组肽。对于用作治疗剂,优选约50%至95%同质性,且最优选80%至95%或更大同质性的基本上纯的组合物。

[0210] 本领域技术人员将理解,化学合成、生物表达或纯化后,免疫原肽可以具有实质上不同于组成肽的天然构象的构象。在这种情况下,通常有必要变性和还原抗增殖肽,然后使肽重新折叠为优选构象。还原和变性蛋白质并诱导重新折叠的方法为本领域技术人员公

知。

[0211] 可以例如通过显示与免疫血清或与针对该蛋白质本身产生的抗血清的反应来确认纯化的蛋白质的抗原性。

[0212] 除非背景不适合,本文中使用的术语“一”、“一个”和“该”定义为意指“一个或多个”,且包含复数形式。

[0213] 本文中使用的术语“检测”意指使用已知的生物分子检测技术,如免疫化学或组织学方法,并意指:定性或定量测定所研究的生物分子的存在或浓度。

[0214] “分离的”意指游离于它与之天然存在的成分中的一些的生物分子。

[0215] 本文中使用的术语“抗体”或“其功能部分”是本领域公知的术语,且理解为指与已知抗原结合的分子或分子的活性片段,尤其是指免疫球蛋白分子和指免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即包含免疫特异性结合抗原的结合部位的分子。本发明的免疫球蛋白可以是任意类型(IgG、IgM、IgD、IgE、IgA 和 IgY)或种类(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类的免疫球蛋白分子。

[0216] “抗体”在本发明的范围内旨在包含单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、双特异性抗体、猿源化(simianized)抗体、人抗体和人源化抗体及其活性片段。与已知抗原结合的分子的活性片段的实例包含 Fab 和 F(ab')₂ 片段,其包括 Fab 免疫球蛋白表达文库的产物及上述任意抗体和片段的表位结合片段。

[0217] 可以通过许多技术从本发明的抗体衍生这些活性片段。例如,可以用酶,如胃蛋白酶切割纯化的单克隆抗体,并进行 HPLC 凝胶过滤。然后可以收集包含 Fab 片段的适当级分,并通过膜过滤等浓缩。用于分离抗体的活性片段的一般技术的进一步描述见例如 Khaw, B. A. 等 J. Nucl. Med. 23 :1011-1019 (1982) ;Rousseaux 等 Methods Enzymology, 121 : 663-69, Academic Press, 1986。

[0218] “人源化抗体”指一类改造抗体,其具有它的源自非人供体免疫球蛋白的 CDR,分子的其余源自免疫球蛋白的部分源自一个(或多个)人免疫球蛋白。

[0219] 人源化抗体还可以指具有可变区的抗体,其中该可变区的构架区中的一个或多个具有人或灵长类氨基酸。此外,可以改变构架支持残基来保留结合亲和力。获得“人源化抗体”的方法为本领域技术人员公知(见例如 Queen 等, Proc. Natl Acad Sci USA, 86 : 10029-10032 (1989) ;Hodgson 等, Bio/Technology, 9 :421 (1991))。

[0220] 还可以通过新的遗传工程方法获得“人源化抗体”,该方法使得能够在大型动物,例如兔中产生亲和力成熟的人样多克隆抗体 (<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php>)。

[0221] 术语“单克隆抗体”也为本领域公知,且指在实验室中从单克隆大量产生,且仅识别一种抗原的抗体。通常通过使正常情况下存活时间短的产抗体 B 细胞与快速生长的细胞,如癌细胞(有时称为“永生”细胞)融合来产生单克隆抗体。产生的杂交细胞或杂交瘤快速倍增,产生大量产生抗体的克隆。

[0222] 术语“抗原”指可以在生物,尤其是动物,更尤其是包括人的哺乳动物中诱导免疫应答的实体或其片段。该术语包含免疫原和负责抗原性的区域或抗原决定簇。

[0223] 本文中使用的术语“可溶的”意指部分或完全溶解在水溶液中。

[0224] 同样如本文中所使用,术语“免疫原性的”指在人类或动物中引出或增强定向针对

免疫原性剂的抗体、T 细胞和其他反应性免疫细胞的产生并促成免疫应答的物质。

[0225] 个体针对所施用的本发明的免疫原组合物产生足以缓和或缓解待治疗的障碍的抗体、T 细胞和其他反应性免疫细胞时发生免疫应答。

[0226] 术语“杂交瘤”为本领域公知，且本领域普通技术人员将其理解为指通过产抗体细胞和永生细胞，例如多骨髓瘤细胞的融合产生的细胞。此杂交细胞能够产生持续的抗体供给。融合方法的更详细的描述见上文“单克隆抗体”的定义和下文实施例。

[0227] 本文中使用的术语“载体”意指抗原肽或超分子构建体可以掺入其中或可以与之结合，从而将抗原肽或肽的部分呈递或暴露给人或动物的免疫系统的结构。在本发明的背景内，可以将可以适宜地用于动物或人治疗的任意颗粒，例如小泡、颗粒或颗粒体用作载体。

[0228] 术语“载体”还包括递送方法，其中可以通过递送机制将包含抗原肽的超分子抗原构建体组合物转运至希望的部位。这种递送系统的一个实例利用胶体金属，如胶体金。

[0229] 可以用于本发明的超分子抗原构建体组合物中的载体蛋白包括但不限于麦芽糖结合蛋白“MBP”、牛血清白蛋白“BSA”、匙孔梗血蓝蛋白“KLH”、卵清蛋白、鞭毛蛋白、甲状腺球蛋白、任意物种的血清白蛋白、任意物种的 γ 球蛋白、同源细胞、具有 1a 抗原的同源细胞及 D- 和 / 或 L- 氨基酸的多聚体。

[0230] 在本发明的“超分子抗原构建体”中，脂质体可以具有双重功能，因为它可以用作包含之前本文中所述的超分子构建体的载体，同时作为佐剂发挥作用来在待用本发明的治疗性疫苗治疗的靶动物或人内增加或刺激免疫应答。还应理解，本发明的超分子抗原构建体组合物可以进一步包含其他佐剂，其包括但不限于匙孔梗血蓝蛋白 (KLH)、牛血清白蛋白 (BSA) 和其他佐剂，例如脂质 A、明矾、磷酸钙、白细胞介素 1，和 / 或多糖和蛋白质的微囊，但尤其是去毒脂质 A，如单磷酸或二磷酸脂质 A，或明矾；其他防腐剂；稀释剂；乳化剂；稳定剂；和已知并用于现有技术的疫苗中的其他成分。此外，可以将本领域已知的任意佐剂系统用于本发明的组合物中。这类佐剂包括但不限于弗氏不完全佐剂；弗氏完全佐剂；多分散 β -(1,4) 连接乙酰化甘露聚糖 (“Acemannan”)；**Titermax®** (来自 CytRx Corporation 的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物佐剂)；来自 Chiron Corporation 的修饰的脂质佐剂；来自 Cambridge Biotech 的皂苷衍生物佐剂；灭活百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*)；革兰氏阴性菌的脂多糖 (LPS)；大的聚合阴离子，如硫酸葡聚糖；和无机凝胶，如明矾、氢氧化铝或磷酸铝。

[0231] 此外，术语“有效量”指在对人或动物施用时引出免疫应答的抗原 / 免疫原组合物的量。本领域技术人员易于按照常规方法测定有效量。

[0232] 本文中使用的“免疫耐受患者”指动物或人患者，其显示有限的应答抗原，尤其是非自身抗原，但尤其是新抗原，例如存在于新出现的疾病中的新抗原的能力。此限制可以至少部分由 CD4+T 细胞的实足年龄引起。此外，由于回忆应答期间记忆 T 细胞的增殖和细胞因子分泌的缺陷，“免疫耐受患者”可以对抗原暴露显示受损的长期 CD4+T 细胞免疫应答。

[0233] 本文中使用的“T 细胞活化患者”指显示 T 细胞活化，且其中进一步刺激 T 细胞应答将导致医疗风险的动物或人患者。

[0234] 本文中使用的“无免疫应答的患者”指具有因年龄、诸如 HIV 或癌症的疾病，或因治疗，例如针对包括但不限于类风湿性关节炎、银屑病、系统性红斑狼疮、韦格纳肉芽肿等

的炎症疾病的治疗而受损的免疫系统的动物或人患者。

[0235] 在本发明的范围内,已显示抗体诱导的对本发明的抗原组合物的应答基本上是独立于 T 细胞的。将裸鼠模型用于此方面,接种裸鼠并测量抗体应答来评价本发明的抗原组合物在免疫的裸鼠中诱导的 A β 特异性抗体应答。裸鼠携带 Foxn1nu 突变,结果由于缺乏适当的胸腺而具有减少的 T 细胞功能。

[0236] 本文中使用的“药物有效量”指药物组合物中足以治愈,或至少部分阻断待治疗的疾病、障碍或病症的症状或与之相关的任意并发症的症状的活性成分剂量。

[0237] 在具体实施方案中,本发明利用尤其是在诸如脂质体的载体分子的表面上的抗原呈递,其导致优选抗原构象的增强的暴露和稳定化,其最终导致高特异性免疫应答,尤其是独立于 T 细胞的免疫应答,并导致具有独特特性的抗体的产生。

[0238] 具体而言,以高度重复阵列,尤其是包含至少 10 个重复抗原单位 / 载体分子、尤其是至少 50 个重复抗原单位 / 载体分子、尤其是至少 100 个重复抗原单位 / 载体分子、尤其是至少 200 个重复抗原单位 / 载体分子、尤其是至少 300 个重复抗原单位 / 载体分子、尤其是至少 400 个重复抗原单位 / 载体分子、尤其是至少 500 个重复抗原单位 / 载体分子的重复阵列将抗原肽呈递在载体分子的表面上。

[0239] 可以按照 Nicolau 等 (2002) Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2332-2337 中报道的改进方法合成根据本发明和如本文中所述的修饰的磷酸肽抗原,尤其是模拟 tau 蛋白的主要病理磷酸化表位的磷酸肽抗原。此方法涉及用标准 Fmoc/tBu 化学在酰胺树脂上通过固相肽合成逐步组装构建体。然后去除末端赖氨酸的正交保护基团,并用棕榈酸酰化自由氨基。

[0240] 在酸性条件下达到侧链保护基团的脱保护和肽从树脂的并行释放,作为粗产物提供希望的四棕榈酰化磷酸肽。

[0241] 然后可以以高纯度获得终产物,并通过本领域已知的方法,例如电喷射质谱分析法和 / 或 HPLC 分析来确认其身份 (identity) 和纯度。

[0242] 在一个实施方案中,本发明提供包含模拟 tau 蛋白的主要病理磷酸化表位的根据本发明和如本文中所述的磷酸肽抗原的免疫原组合物,这样修饰该肽抗原,使得它能够保持和稳定确定的抗原构象。此确定的构象导致在引入动物或人中时诱导强烈和高度特异的免疫应答。

[0243] 达到形成和稳定化希望的抗原肽构象的一种方式是通过将抗原肽附着在载体、尤其是还可以作为佐剂发挥作用的载体上,或部分或完全掺入或重构在载体、尤其是还可以作为佐剂发挥作用的载体中来呈递抗原肽。

[0244] 在本发明的范围内可以考虑的载体是例如小泡、颗粒体或分子;细菌膜蛋白、肠杆菌 Omp 蛋白、纳米颗粒、微胶粒、金颗粒、微球和 / 或病毒体或可以适宜地作为抗原肽的载体 / 佐剂的任意其他手段,但尤其是脂质体。

[0245] 在本发明的具体实施方案中,通过弱相互作用,例如范德瓦耳斯相互作用、疏水或静电相互作用、或该相互作用中的两种或多种的组合将抗原肽附着在载体上,或掺入或重构在载体中,使得以特异性构象呈递肽,通过在它的三维运动自由中限制该抗原肽来保持和稳定该特异性构象,使得构象变化被阻止或严格限制。

[0246] 在将小泡、颗粒或颗粒体用作载体 / 佐剂,例如脂质体时,可以这样选择抗原肽的组成,使得它的总体净电荷与该肽所附着的载体 / 佐剂表面的总体净电荷相同。在带相同

电荷的载体 / 佐剂表面和抗原肽之间,但尤其是带相同电荷的载体表面和组成抗原肽的氨基酸残基之间,且更尤其是带相同电荷的载体表面和包含于抗原肽中的带相同电荷的氨基酸残基之间有效的静电排斥力可以导致抗原肽采取确定、高度特异和稳定化的构象,这保证了高生物活性。结果,抗原肽以具有高生物活性的构象暴露和呈递,因为它允许靶生物的免疫系统自由地与以生物活性构象包含于抗原构建体中的抗原决定簇相互作用,在对动物或人施用,其导致强烈和构象特异性的免疫应答,在靶生物中产生例如高抗体效价。

[0247] 可以通过用脂质体作为载体来进一步增加免疫原应答,该脂质体可以作为佐剂发挥作用来在待用本发明的药物组合物治疗的靶动物或人内增加或刺激免疫应答。可选地,此外,脂质体可以包含其他佐剂,例如脂质 A、明矾、磷酸钙、白细胞介素 1 和 / 或多糖和蛋白质的微囊,但尤其是去毒脂质 A,如单磷酸或二磷酸脂质 A,或明矾。

[0248] 在本发明的具体实施方案中,将根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽,尤其是其总体净电荷为负的抗原肽重构在脂质体,尤其是这样选择其组分,使得脂质体头部基团的总体净电荷为负的脂质体中来使用。具体而言,脂质体由选自双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC)、双肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (DMPEA)、双肉豆蔻酰磷脂酰甘油 (DMPG) 和胆固醇的组分组成,且可选地进一步包含单磷酸脂质 A 或可以适宜地在本发明的范围内使用的任意其他佐剂,例如明矾、磷酸钙、白细胞介素 1 和 / 或多糖和蛋白质的微囊。

[0249] 在本发明的另一具体实施方案中,提供与锚型分子共价结合的根据本发明和如之前本文中所述的修饰的肽抗原,该锚型分子能够插入载体 / 佐剂,从而将肽固定于载体 / 佐剂,并将它呈递在载体 / 佐剂分子的表面上或靠近载体 / 佐剂分子的表面呈递,使得静电力如之前本文中所述变得有效。

[0250] 用脂质体作为载体 / 佐剂时,抗原肽构建体在它形成时一般具有插入脂质体膜中的疏水尾部。此外,可以修饰抗原肽为包含疏水尾部,使得它可以插入脂质体中。

[0251] 本发明的抗原组合物尤其包含修饰来增强抗原作用的肽,其中这类肽可以通过聚乙二醇化 (使用聚乙二醇或修饰的聚乙二醇) 来修饰,或通过其他方法,如通过之前本文中所述的棕榈酸、聚氨基酸 (例如聚甘氨酸、聚组氨酸)、多糖 (例如聚半乳糖醛酸、聚乳酸、聚乙醇酸交酯、壳多糖、脱乙酰壳多糖)、合成聚合物 (聚酰胺、聚氨基甲酸酯、聚酯) 或共聚物 (例如聚 (甲基丙烯酸) 和 N-(2-羟基) 丙基甲基丙烯酰胺) 等来修饰。

[0252] 在本发明的具体实施方案中,提供根据本发明和如之前本文中所述的抗原肽,将其修饰为包含疏水尾部,使得该肽可以插入脂质体中。具体而言,可以通过便于插入载体 / 佐剂的脂双层中的亲脂或疏水部分来修饰模拟 tau 蛋白的主要病理磷酸化表位的根据本发明和如本文中所述的磷酸肽抗原。本发明的亲脂或疏水部分可以是脂肪酸、甘油三酯和磷脂,尤其是其中脂肪酸碳主链具有至少 10 个碳原子的脂肪酸、甘油三酯和磷脂,尤其是包含具有至少约 14 个碳原子和至多约 24 个碳原子的碳主链的脂肪酸的亲脂部分,此范围内的各单个碳原子数也是本发明的部分。具体而言,本发明涉及根据本发明和如之前本文中所述的抗原肽,将其修饰为包含疏水尾部,尤其是包含具有至少 14 个碳原子,但尤其是 16 个碳原子的碳主链的疏水部分的疏水尾部。疏水部分的实例包括但不限于棕榈酸、硬脂酸、豆蔻酸、月桂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸和胆固醇或 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺 (DSPE)。在本发明的具体实施方案中,疏水部分是棕榈酸。

[0253] 在一个实施方案中,根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽与亲脂或疏水

部分共价连接。在本发明的背景中,可以利用氨基酸残基来介导抗原肽的共价连接,该氨基酸残基尤其是在它们的末端,尤其是在它们的 N 端和 C 末端延伸对应于本发明的抗原肽的序列的氨基酸序列,且脂肪酸残基与该氨基酸残基偶联。

[0254] 具体而言,各缀合物包含至少四分子脂肪酸,该脂肪酸包含 C12 和 C24 之间的碳链,尤其是 C16 的碳链,其中脂肪酸分子在抗原肽的 N 端和 C 末端共价连接。还可以考虑包括在氨基酸序列内连接的其他分布。这些肽还与脂肪酸分子共价偶联。

[0255] 因此,本发明的药物组合物可以包含通过在存在根据本发明和如本文中所述的纯化或部分纯化或修饰的抗原肽的情况下重构脂质体产生的脂质体。此外,可以将肽片段重构在脂质体中。本发明还包含为了增加它们的抗原性而修饰的抗原肽片段。例如,可以将抗原部分和佐剂与肽连接或混合。抗原部分和佐剂的实例包括但不限于亲脂性胞壁酰二肽衍生物、非离子型嵌段聚合物、氢氧化铝或磷酸铝佐剂及其混合物。

[0256] 可以用于本发明的组合物中的脂质体包含本领域技术人员公知的那些。可以使用用于制备脂质体的任意标准脂质。可以用标准的双层和多层脂质体来制备本发明的组合物。虽然可以使用本领域技术人员已知的制备脂质体的任意方法,但按照 Alving 等, *Infect. Immun.* 60 :2438-2444, 1992 的方法制备最优选的脂质体,该文献在此引入作为参考。脂质体可以可选地包含佐剂或 / 和免疫调节剂或二者。优选的免疫调节剂是脂质 A,尤其是去毒脂质 A,例如单磷酰或二磷酰脂质 A。

[0257] 可以通过例如 Wagner 等 (2002) *Journal of Liposome Research*, 第 12(3) 卷,第 259-270 页中所述的交叉流注射技术来制备脂质体。在脂质溶液注入水性缓冲系统期间,脂质趋向于形成“沉淀物”,然后自排列为小泡。所获得的小泡大小取决于诸如脂质浓度、搅拌速度、注射速度和脂质的选择的因素。制备系统可以由交叉流注射模块、用于极性相(例如 PBS 缓冲溶液)的容器、乙醇 / 脂质溶液容器和压力装置但尤其是氮气压力装置组成。通过交叉流注射模块泵入水溶液或极性溶液,同时应用不同压力将乙醇 / 脂质溶液注入极性相。

[0258] 在一个实施方案中,因此可以通过重构在由不同摩尔比的磷脂和胆固醇(磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、胆固醇)组成的脂质体中来进一步修饰根据本发明和如本文中所述的修饰的抗原肽。可以使用其他磷脂。按约 40 $\mu\text{g}/\text{pmole}$ 磷脂的浓度使用脂质 A。

[0259] 脂质体可以具有双重功能,因为它可以用作包含之前本文中所述的超分子构建体的载体,同时作为佐剂发挥作用来在待用本发明的治疗性疫苗治疗的靶动物或人内增加或刺激免疫应答。可选地,此外,脂质体可以包含其他佐剂或 / 和免疫调节剂或二者,例如脂质 A、明矾、磷酸钙、白细胞介素 1 和 / 或多糖和蛋白质的微囊,但尤其是脂质 A,更尤其是去毒脂质 A,如单磷酰或二磷酰脂质 A,或明矾。

[0260] 在本发明的具体实施方案中,用具有脂质 A 的脂质体作为佐剂来制备本发明的药物组合物。尤其是以 9 : 1 : 7 的摩尔比混合双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、双肉豆蔻酰磷脂酰甘油和双肉豆蔻酰磷脂酰胆固醇。然后按适宜的浓度,尤其是按每毫摩尔磷脂 20mg 和 50mg 之间的浓度,更尤其是按每毫摩尔磷脂 30mg 和 40mg 之间的浓度加入强免疫调节剂,例如单磷酰脂质 A。然后按肽与磷脂的摩尔比在 1 : 30 和 1 : 200 之间,尤其是摩尔比在 1 : 50 和 1 : 120 之间,更尤其是 1 : 100 加入修饰的抗原肽。例如通过蒸发去除溶剂,并用无菌缓冲溶液,例如 PBS 水化产生的膜。

[0261] 在本发明的具体实施方案中,提供根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽,通过与该抗原肽的 N 端和 C 末端共价结合的至少两分子棕榈酸和通过重构在脂质体载体中来修饰该抗原肽。

[0262] 在提供肽在脂质体双层中的锚的同时,由于 C_{16} 脂肪酸部分的相对减少的长度,棕榈酰化导致肽暴露在脂质体表面上或靠近脂质体表面呈递。

[0263] 在例如下文所述的利用本组合物的试剂盒的背景中,可以以液体溶液或可注射悬液的形式,或者以适合在注射前溶解的固体形式制备本发明的药物组合物,该药物组合物尤其是以药物有效量包含根据本发明的肽抗原和如本文中所述的肽抗原,尤其是模拟 tau 蛋白的主要病理磷酸化表位的磷酸肽。

[0264] 适宜的药物载体、稀释剂和 / 或赋形剂为本领域公知,且包含例如磷酸缓冲盐溶液、水、诸如油 / 水乳剂的乳剂、多种类型的湿润剂、无菌溶液等。

[0265] 可以按照本领域技术人员已知的标准方法完成本发明的药物组合物的配制。

[0266] 可以对患有 tau 病或与 tau 病相关的症状的人或动物施用本发明的药物组合物来在该人或动物中诱导免疫应答,以缓解与该疾病相关的症状或恢复见于未患该疾病的健康个体中的条件,该药物组合物尤其是以药物有效量包含根据本发明的肽抗原和如本文中所述的肽抗原,尤其是模拟 tau 蛋白的主要病理磷酸化表位的磷酸肽。

[0267] 按适宜的药物有效剂量以固体、液体或气溶胶的形式通过任意适当的标准给药途径对人或动物施用本发明的组合物。一般而言,可以通过局部、口服、直肠、鼻或肠胃外(例如静脉内、皮下或肌内)途径施用组合物。此外,可以将组合物掺入持续释放基质,如生物降解聚合物中,将该聚合物植入希望递送的部位附近,例如肿瘤部位处。该方法包括施用单剂量、按预定的时间间隔施用重复剂量和持续施用预定的一段时间。

[0268] 在本发明的具体实施方案中,按 1 周和 20 周之间的时间间隔,尤其是按 1 周和 10 周之间的时间间隔,尤其是按 1 周和 6 周之间的时间间隔,更尤其是按 1 周和 4 周之间的时间间隔,甚至更尤其是按 2 周和 3 周之间的时间间隔,以重复剂量,尤其是以 1 至 15 个剂量,更尤其是以 2 至 10 个剂量,更尤其是以 3 至 5 个剂量,甚至更尤其是以 3 个剂量施用本发明的抗原构建体,尤其是以可药用形式包含该抗原构建体的疫苗组合物。可以通过在强化后适宜的时间,尤其是强化后 3 至 10 天,更尤其是强化后 4 至 8 天,更尤其是强化后 7 天采集血清 / 血浆样品,并用已知的方法,尤其是常用免疫测定中的一种,例如 ELISA 实验测定抗原构建体的免疫原性来监测免疫应答。

[0269] 具体而言,通过肠胃外,尤其是通过腹膜内、静脉内、皮下和肌内注射施用本发明的抗原肽组合物。

[0270] 用于肠胃外施用的制剂包含无菌水溶液或非水溶液、悬液和乳剂。非水溶剂非限制性地包括丙二醇;聚乙二醇;植物油,如橄榄油;和可注射的有机酯,如油酸乙酯。水性溶剂可以选自水、醇 / 水溶液、包括盐水和缓冲介质的乳剂或悬液。肠胃外载体包含氯化钠溶液、Ringer's 葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸化 Ringer's 或固定油类。静脉内载体包含液体和营养物补充剂、电解质补充剂(如基于 Ringer's 葡萄糖的那些)等。还可以存在防腐剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0271] 组合物的剂量将取决于所治疗的病症、所使用的具体组合物和其他临床因素,如患者的体重、大小和病症、体表面积、待施用的具体化合物或组合物、同时施用的其他药物

和给药途径。

[0272] 本发明的药物组合物可以与其他生物活性物质和用于治疗疾病,尤其是神经变性疾病的方法组合施用。其他生物活性物质可以是已经以混合物的形式包含本发明的药物组合物的相同组合物的部分,其中本发明的药物组合物和其他生物活性物质混合在相同的可药用溶剂和/或载体中或与相同的可药用溶剂和/或载体混合,或者可以作为分开的组合物的部分分别提供,该分开的组合物可以以一套组件的形式分开或一起提供。

[0273] 本发明的药物组合物可以间歇地或顺次地与其他生物活性物质并行施用。例如,用本发明的药物组合物可以与第一其他生物活性物质同时或顺次地在施用药物组合物之后或之前施用。如果选择与本发明的至少一种药物组合物一起施用一种以上其他生物活性物质的应用方案,则可以以多种组合部分同时地、部分顺次地施用该化合物或物质。

[0274] 本发明的另一目的是提供本发明的药物组合物与可选的一种或多种其他生物活性物质的混合物,以及用本发明的药物组合物或其混合物,包括含有该药物组合物的组合物或药物组合物的混合物来预防和/或治疗性处理和/或缓解 tau 病的作用的方法,tau 病是与神经原纤维损伤的形成相关的一组疾病和障碍,神经原纤维损伤的形成是此组神经变性障碍中的主要脑病理,此组神经变性障碍包括但不限于阿尔茨海默病、克-雅综合症、拳击员痴呆、唐氏综合症、格-施-沙病、包涵体肌炎和阮病毒蛋白脑淀粉样血管病、外伤性脑损伤,及其他关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森综合症-痴呆综合症、非关岛运动神经元病伴神经原纤维缠结、嗜银颗粒性痴呆、皮层基底节变性、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、17 号染色体连锁额颞痴呆伴帕金森综合症、Halleorden-Spatz 病、多系统性萎缩、C 型尼-皮病、皮克病、进行性皮层下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结型痴呆、脑炎后帕金森综合症、强直性肌营养不良。

[0275] 除本发明的药物组合物外,本发明的混合物可以包含生物活性物质,例如已知的用于 tau 病和/或淀粉状蛋白病 (amyloidoses) 的药物中的化合物,淀粉状蛋白病是与淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白质,如涉及阿尔茨海默病的淀粉状蛋白 β 蛋白质相关的一组疾病和障碍。

[0276] 在本发明的另一实施方案中,其他生物活性物质或化合物还可以是治疗剂,该治疗剂可以用于治疗由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白质引起或与淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白质相关的疾病和障碍,包括由淀粉状蛋白 β 引起的淀粉状蛋白病,或者可以用于其他神经障碍的药疗法中。

[0277] 其他生物活性物质或化合物可以通过与本发明的治疗性疫苗相同或相似的机制,或者通过不相关的作用机制,或者通过相关和/或不相关的作用机制的多重性发挥其生物效应。

[0278] 一般而言,其他生物活性化合物可以包含神经传递增强剂;精神病治疗药物;乙酰胆碱酯酶抑制剂;钙通道封闭剂;生物胺;苯二氮杂安定药;乙酰胆碱合成、保存或释放的增强剂;乙酰胆碱突触后受体激动剂;单胺氧化酶-A 或-B 抑制剂;N-甲基-D-天冬氨酸谷氨酸受体拮抗剂;非类固醇抗炎药;抗氧化剂;和 5-羟色胺能受体拮抗剂。

[0279] 具体而言,本发明的混合物可以包含选自以下的至少一种其他生物活性化合物:抗氧化应激的化合物;抗凋亡化合物;金属螯合剂;DNA 修复的抑制剂,如哌仑西平和代谢物 3-氨基-1-丙磺酸 (3APS)、1,3-丙二磺酸 (1,3PDS);分泌酶激活剂; β -和 γ -分泌酶

抑制剂;tau 蛋白;神经递质; β -折叠封闭剂;抗炎分子;或胆碱酯酶抑制剂(ChEI),如他克林、利斯的明、多奈哌齐和/或加兰他敏;和其他药物和营养补充剂;连同本发明的治疗性疫苗和可选的可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0280] 在另一实施方案中,本发明的混合物可以包含烟酸或二甲金刚烷,连同本发明的治疗性疫苗和可选的可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0281] 还在本发明的另一实施方案中,提供包含“非典型抗精神病药”,连同本发明的治疗性疫苗和可选的可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂的混合物,该非典型抗精神病药例如用于治疗包括幻觉、妄想、思维障碍(表征为明显的不连贯、偏向、离题症)和奇异或紊乱行为,以及快感缺乏、情感淡漠、无欲貌和回避社交的阳性和阴性精神病症状的氯氮平、齐培西酮、利培酮、阿立哌唑或奥氮平。

[0282] 在本发明的具体实施方案中,根据本发明和如之前本文中所述的组合物和混合物分别以治疗或预防有效量包含本发明的药物组合物和生物活性物质。

[0283] 可以适宜地与本发明的药物组合物组合用于混合物中的其他化合物描述于例如 WO 2004/058258 中(尤其见 16 和 17 页),其包含治疗性药物靶标(36-39 页)、链烷磺酸和链烷醇硫酸(39-51 页)、胆碱酯酶抑制剂(51-56 页)、NMDA 受体拮抗剂(56-58 页)、雌激素(58-59 页)、非类固醇抗炎药(60-61 页)、抗氧化剂(61-62)、过氧化物增殖物激活受体(PPAR)激动剂(63-67 页)、降胆固醇剂(68-75 页)、淀粉状蛋白抑制剂(75-77)、淀粉状蛋白形成抑制剂(77-78 页)、金属螯合剂(78-79 页)、抗精神病药和抗抑郁药(80-82 页)、营养补充剂(83-89)和增加生物活性物质在脑中的有效性的化合物(见 89-93 页)和前体药物(93 和 94 页),该文件在此引入作为参考,尤其是上文所指出的页面上提到的化合物在此引入作为参考。

[0284] 实施例

[0285] 实施例 1:疫苗

[0286] 将源自磷酸化 tau 蛋白的八个序列设计为抗原进行疫苗研发。将之前使用的免疫原肽用作对照(Asuni 等,2007)。

[0287] 表 1: Tau 序列描述

[0288]

描述	疫苗	序列
T5: 对照序列: Tau 379-408 [pS396, pS404]	ACI-37	RENAKAKTDHGAEIVYKS(p)PVVSG DTS(p)PRHL (n = 30) (SEQ ID NO: 1)
T1: 序列 1: Tau 5-20 [pY18]	ACI-33	RQEFVEMEDHAGTY(p)GL (n = 16) (SEQ ID NO : 2)
T8: 序列 8: Tau 206-221 [pT212,	ACI-39	PGSRST(p)PS(p)LPTPPTR (n = 16) (SEQ ID NO : 3)

[0289]

pS214]		
T9: 序列 9: Tau 196-211 [pS202, pT205]	ACI-40	GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRSR (n = 16) (SEQ ID NO 4)
T3: 序列 3: Tau 393-408 [pS396, pS404]	ACI-35	VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL (n = 16) (SEQ ID NO : 5)
T4: 序列 4: Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	GDTS(p)PRHLS(p)NVSSTGSID (n = 18) (SEQ ID NO : 6)
T2: 序列 2: Tau 200-216 [pS202+ pT205 & pT212+pS214]	ACI-34	PGS(p)PGT(p)PGSRSR(p)PS(p)LP (n = 17) (SEQ ID NO : 7)
T10: 序列 10: Tau 407-418 [pS409]	ACI-42	HLS(p)NVSSTGSID (n = 12) (SEQ ID NO : 8)
T11: 序列 11: Tau 399-408 [pS404]	ACI-43	VSGDTS(p)PRHL (n = 10) (SEQ ID NO : 9)

[0290] 实施例 2 :Tau 衍生的四棕榈酰化磷酸肽的制备

[0291] 用标准 Fmoc/tBu 化学在酰胺树脂上通过固相肽合成逐步组装两对赖氨酸位于侧翼的抗原肽序列。然后选择性去除末端赖氨酸的正交保护基团,并用棕榈酸酰化自由氨基。

[0292] 在酸性条件下达到侧链保护基团的脱保护和肽从树脂的并行释放,作为粗产物提供希望的四棕榈酰化磷酸肽。通过 MALDI-TOF 质谱分析法和 HPLC 分析进一步确认同一性和纯度。

[0293] Tau 衍生的四棕榈酰化磷酸肽的序列:

[0294] T1 :H-K (Pal)-K (Pal)-RQEFVEMDHAGTY (P) GL-K (Pal)-K (Pal)-NH₂

[0295] T2 :H-K (Pal)-K (Pal)-PGS (p) PGT (p) PGSRSR (p) PS (p) LP-K (Pal)-K (Pal)-NH₂

[0296] T3 :H-K (Pal)-K (Pal)-VYKS (p) PVVSGDTS (p) PRHL-K (Pal)-K (Pal)-NH₂

[0297] T4 :H-K (Pal)-K (Pal)-GDTS (p) PRHLS (p) NVSSTGSID-K (Pal)-K (Pal)-NH₂

[0298] T8 :H-K (Pal)-K (Pal)-PGSRSR (p) PS (p) LPTPPTR-K (Pal)-K (Pal)-NH₂

[0299] T9 :H-K (Pal)-K (Pal)-GYSSPGS (p) PGT (p) PGSRSR-K (Pal)-K (Pal)-NH₂

[0300] T10 :H-K (Pal)-K (Pal)-HLS (p) NVSSTGSID-K (Pal)-K (Pal)-NH₂

[0301] T11 :H-K (Pal)-K (Pal)-VSGDTS (p) PRHL-K (Pal)-K (Pal)-NH₂

[0302] 2.1 肽抗原 T1 的合成

[0303] 在存在含 2 当量 DIC/HOBt 的 DMF 的情况下将正交保护的氨基酸 Fmoc-Lys(Mtt)-OH(3 当量)手动装载至酰胺树脂(Rink 酰胺 MBHA 树脂,1 当量,0.26mmol)。然后用 DMF 洗涤树脂(3×1 分钟)。用含 25% 哌啶的 DMF(1×1 分钟和 2×15 分钟)去除 N 端 Fmoc 基团后,用含 5 当量 PyBOP/HOBt/DIEA 的 DMF(2×15 分钟)自动偶联 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 的第二残基(3 当量)。应用之前所述的偶联流程自动掺入随后 16 个具

有 Fmoc 标准侧链保护基团的氨基酸。作为磷酸基团上的单苄基酯引入磷酸氨基酸。各偶联步骤后进行使用 DMF 的洗涤步骤 (3×30 秒)、使用含 25% 哌啶的 DMF 的 Fmoc 去除步骤 (3×3 分钟) 和使用 DMF 的第二洗涤步骤 (6×30 秒)。偶联 Tyr (PO(OBzl)2) 之后, 用含 0.5% DBU 的 DMF 进行 Fmoc 脱保护步骤。肽序列的组装以用含 2 当量 PyBOP/HOBt/DIEA 的 DMF 添加最后两个 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 结束。

[0304] 然后, 通过在几个 10 分钟的循环期间用 10mL TIPS/TFA/DCM(1 : 1 : 98) 的脱气混合物处理树脂 (1 当量, 600mg, 0.092mmol) 来在氮气下选择性切割末端赖氨酸残基的 Mtt 基团。用 DCM(×3) 和 DMF(×3) 洗涤树脂。然后用含 TBTU(20 当量, 593mg, 1.85mmol) 和 DIEA(40 当量, 643 μL, 3.70mmol) 的 DCM/DMF(1 : 1) (6mL) 将棕榈酸 (20 当量, 473mg, 1.85mmol) 偶联至这些脱保护的氨基。然后用 DCM(×5) 和 DMF(×5) 洗涤树脂。然后用脱气的含 20% 哌啶的 DMF (3×10 分钟) 去除 N 端 Fmoc 基团, 并用 DMF(×3) 和 DCM(×5) 洗涤树脂。最后, 在 4.5 小时内用 TFA/TIPS/H₂O/EDT(95 : 1 : 2.5 : 2.5) 的脱气混合物 (4mL) 在氮气下进行同时的树脂切割和侧链脱保护。作为具有 56% 纯度 (来自 HPLC 分析) 的白色固体 (189mg, 60% 产率), 从冷乙醚研磨产生了粗产物 T1。MALDI-TOF 质谱分析法确认了主产物的身份 (预期 m/z : 3427.12[MH⁺], 实测 : 3426.87)。

[0305] 2.2 肽抗原 T3 的合成

[0306] 在存在 DMF 中的 PyBOP/HOBt/DIEA 的情况下将正交保护的氨基酸 Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 当量) 手动装载至酰胺树脂 (Rink 酰胺 MBHA 树脂, 1 当量, 0.4mmol)。然后用 DMF 洗涤树脂 (3×1 分钟)。用含 25% 哌啶的 DMF (1×1 分钟和 2×15 分钟) 去除 N 端 Fmoc 基团后, 用相同的装载条件偶联 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 的第二残基 (3 当量)。应用之前所述的偶联流程手动掺入随后 16 个具有 Fmoc 标准侧链保护基团的氨基酸。作为磷酸基团上的单苄基酯引入磷酸氨基酸。脯氨酸之后通过 TNBT 测试或 chloranyl 测试测定偶联时间。根据需要, 在存在 DIC/HOBt 或 HATU/DIEA 的情况下用 2 当量 Fmoc-氨基酸进行第二偶联。各偶联步骤后跟随使用 DMF 的洗涤步骤 (3×1 分钟)、使用含 25% 哌啶的 DMF 的 Fmoc 去除步骤 (1×1 分钟和 2×15 分钟) 和使用 DMF 的第二洗涤步骤 (7×1 分钟)。偶联第一 Ser (PO(OBzl)OH) 之后, 用 DMF 中的 0.5% DBU 进行 Fmoc 脱保护步骤。肽序列的组装以最后两个 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 的添加结束。

[0307] 然后, 通过在几个 10 分钟的循环期间用 10mL TIPS/TFA/DCM(1 : 1 : 98) 处理树脂 (1 当量, 195mg, 0.01mmol) 来选择性切割末端赖氨酸残基的 Mtt 基团。用 DCM(×3) 和 DMF(×3) 洗涤树脂。然后用 DCM/DMF(1 : 1) (2mL) 中的 TBTU(20 当量, 64mg, 0.2mmol) 和 DIEA(40 当量, 70 μL, 0.4mmol) 将棕榈酸 (20 当量, 51mg, 0.2mmol) 偶联至这些脱保护的氨基。然后用 DCM(×5) 和 DMF(×5) 洗涤树脂。然后用含 20% 哌啶的 DMF (3×10 分钟) 去除 N 端 Fmoc 基团, 并用 DMF(×3) 和 DCM(×5) 洗涤树脂。最后, 在 2 小时内用 TFA/TIPS/H₂O(95 : 2.5 : 2.5) 的混合物 (2mL) 进行同时的树脂切割和侧链脱保护。作为具有 67% 纯度 (来自 HPLC 分析) 的白色固体 (34mg, 100% 产率), 从冷乙醚研磨产生了粗产物 T3。MALDI-TOF 质谱分析法确认了主产物的身份 (预期 m/z : 3365.15[MH⁺], 实测 : 3369.66)。

[0308] 2.3 肽抗原 T4 的合成

[0309] 用 DCCI 和 HOBt 作为 DMF 中的激活剂将正交保护的氨基酸 Fmoc-Lys(Mtt)-OH (5 倍过量) 自动连接至 Tentagel R RAM 酰胺树脂 (0.19mm/g, 750mg, 0.1425mmol)。去除 N

端 Fmoc 基团后,在存在 DCCI 和 HOBT 的情况下偶联 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 的第二残基(5 倍过量)。应用相似的偶联/脱保护流程自动掺入随后 16 个具有标准侧链保护基团的氨基酸。作为磷酸基团上的单苄基酯引入磷酸氨基酸。对所有残基进行 60 分钟的双偶联,然后是使用无水醋酸的帽化步骤。肽序列的组装以最后两个 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 的添加结束。

[0310] 然后,通过在几个 10 分钟的循环期间用 10mL TIPS/TFA/DCM(1 : 1 : 98) 处理树脂(1 当量,750mg,0.075mmol) 来选择性切割末端赖氨酸残基的 Mtt 基团。用 DCM($\times 3$) 和 DMF($\times 3$) 洗涤树脂。然后用 DCM/DMF(1 : 1) (7mL) 中的 TBTU(20 当量,482mg,1.5mmol) 和 DIEA(40 当量,536 μ L,3.0mmol) 将棕榈酸(20 当量,51mg,0.2mmol) 偶联至这些脱保护的氨基。然后用 DCM($\times 5$) 和 DMF($\times 5$) 洗涤树脂。然后用含 20% 哌啶的 DMF(3×10 分钟) 去除 N 端 Fmoc 基团,并用 DMF($\times 3$) 和 DCM($\times 5$) 洗涤树脂。最后,在 3.5 小时内用 TFA/TIPS/H₂O(95 : 2.5 : 2.5) 的混合物(6mL) 进行同时的树脂切割和侧链脱保护。作为具有 50% 纯度(来自 HPLC 分析) 的白色固体(96mg,37% 产率),从冷乙醚研磨产生了粗产物 T4。MALDI-TOF 质谱分析法确认了主产物的身份(预期 m/z :3455.10[MH⁺],实测 :3456.13)。

[0311] 2.4 肽抗原 T8 的合成

[0312] 用 DMF(5mL) 中的 DIPCDI(5 当量,196mg,1.25mmol) 和 HOBT(5 当量,169mg,1.25mmol) 进行两次 8 小时的偶联,将正交保护的氨基酸 Fmoc-Lys(Mtt)-OH(5eq,781mg,1.25mmol) 手动连接至 Rink 酰胺 PEGA 树脂(1 当量,0.33mmol/g,758g)。然后用 DMF 洗涤树脂($\times 5$)。用含 20% 哌啶的 DMF(7mL $\times 3 \times 5$ 分钟) 去除 N 端 Fmoc 基团后,在存在 TBTU(10 当量,803mg,2.5mmol)、HOBT(10 当量,338mg,2.5mmol) 和 DIEA(20 当量,871mg,5.0mmol) 的情况下偶联 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 的第二残基(10 当量,1.56g,2.5mmol)。通过相似的偶联/脱保护/洗涤循环手动掺入随后 16 个具有标准侧链保护基团的氨基酸。例外地,用 DMF 中的 TBTU(10 当量)、HOBT(5 当量) 和 DIEA(15 当量) 作为磷酸基团(10 当量) 上的单苄基酯引入磷酸氨基酸。整个合成过程中使用 1 小时的偶联时间。肽序列的组装以最后两个 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 的添加结束。

[0313] 然后,通过在几个 10 分钟的循环期间用 10mL TIPS/TFA/DCM(1 : 1 : 98) 处理肽基树脂(1 当量,385mg,0.019mmol) 来选择性切割末端赖氨酸残基的 Mtt 基团。用 DCM($\times 3$) 和 DMF($\times 3$) 洗涤树脂。然后用 DCM/DMF(1 : 1) (4mL) 中的 TBTU(20 当量,1.21g,3.8mmol) 和 DIEA(40 当量,1.31mL,7.6mmol) 将棕榈酸(20 当量,968mg,3.8mmol) 偶联至这些脱保护的氨基。然后用 DCM($\times 5$) 和 DMF($\times 5$) 洗涤树脂。然后用含 20% 哌啶的 DMF(3×10 分钟) 去除 N 端 Fmoc 基团,并用 DMF($\times 3$) 和 DCM($\times 5$) 洗涤树脂。最后,在 3.5 小时内用 TFA/TIPS/H₂O(95 : 2.5 : 2.5) 的混合物(4mL) 进行同时的树脂切割和侧链脱保护。作为具有 55% 纯度(来自 HPLC 分析) 的白色固体(50.2mg,10% 产率),从冷乙醚研磨产生了粗产物 T8。MALDI-TOF 质谱分析法确认了主产物的身份(预期 m/z :3331.17[MH⁺],实测 :3335.19)。

[0314] 2.5 肽抗原 T9 的合成

[0315] 在存在 DMF 中的 PyBOP/HOBT/DIEA 的情况下将正交保护的氨基酸 Fmoc-Lys(Mtt)-OH(3 当量) 手动装载至酰胺树脂(Rink 酰胺 MBHA 树脂,1 当量,0.4mmol)。然后用 DMF 洗涤树脂(3×1 分钟)。用含 25% 哌啶的 DMF(1×1 分钟和 2×15 分钟) 去除 N 端 Fmoc 基团后,用相同的装载条件偶联 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 的第二残基(3 当量)。应用之前所述的偶联流程掺入随后 16 个具有 Fmoc 标准侧链保护基团的氨基酸。作为磷酸基

团上的单苄基酯引入磷酸氨基酸。脯氨酸之后通过 TNBT 测试或 chloranil 测试测定偶联时间。根据需要,在存在 DIC/HOBt 或 HATU/DIEA 的情况下用 2 当量 Fmoc-氨基酸进行第二偶联。各偶联步骤后跟随使用 DMF 的洗涤步骤 (3×1 分钟)、使用含 25% 哌啶的 DMF 的 Fmoc 去除步骤 (1×1 分钟和 2×15 分钟) 和使用 DMF 的第二洗涤步骤 (7×1 分钟)。偶联 Thr (PO(OBzl)OH) 之后,用 DMF 中的 0.5% DBU 进行 Fmoc 脱保护步骤。肽序列的组装以最后两个 Fmoc-Lys (Mtt)-OH 的添加结束。

[0316] 然后,通过在几个 10 分钟的循环期间用 10mL TIPS/TFA/DCM (1 : 1 : 98) 处理树脂 (1 当量, 650mg, 0.156mmol) 来选择性切割末端赖氨酸残基的 Mtt 基团。用 DCM (×3) 和 DMF (×3) 洗涤后,用 DCM/DMF (1 : 1) (6mL) 中的 TBTU (20 当量, 814mg, 3.15mmol) 和 DIEA (40 当量, 1.1mL, 6.30mmol) 将棕榈酸 (20 当量, 1.01g, 3.15mmol) 偶联至那些脱保护的氨基。用 DCM (×5) 和 DMF (×5) 充分洗涤树脂。然后用含 20% 哌啶的 DMF (3×10 分钟) 去除 N 端 Fmoc 基团,并用 DMF (×3) 和 DCM (×5) 洗涤树脂。最后,在 3 小时内用 TFA/TIPS/H₂O (95 : 2.5 : 2.5) 的混合物 (9mL) 进行同时的树脂切割和侧链脱保护。作为具有 69% 纯度 (来自 HPLC 分析) 的白色固体 (291mg, 59% 产率),从冷乙醚研磨产生了粗产物 T9。MALDI-TOF 质谱分析法确认了主产物的身份 (预期 m/z : 3172.98 [MH⁺], 实测 : 3172.90)。

[0317] 2.6 肽抗原 T10 的合成

[0318] 按照与 T9 相似的流程制备四棕榈酰化肽 T10 (肽合成规模 : 0.25mmol)。此外,在问题序列 Asn-Val-Ser-Ser 前用假脯氨酸 [psi (Gly-Ser)] 作为构件。作为具有 56% 纯度 (来自 HPLC 分析) 的白色固体 (809mg, 定量产率) 获得了粗产物 T10。MALDI-TOF 质谱分析法确认了主产物的身份 (预期 m/z : 2761.9 [MH⁺], 实测 : 2759.2)。

[0319] 2.7 肽抗原 T11 的合成

[0320] 按照与 T9 相似的流程制备四棕榈酰化肽 T11 (肽合成规模 : 0.25mmol)。作为具有 80% 纯度 (来自 HPLC 分析) 的白色固体 (495mg, 76% 产率) 获得了粗产物 T10。MALDI-TOF 质谱分析法确认了主产物的身份 (预期 m/z : 2613.8 [MH⁺], 实测 : 2612.2)。

[0321] 实施例 3 : 疫苗制备 (方法 A)

[0322] 称取 tau 衍生的四棕榈酰化磷酸肽 (数量见下文表 2), 并放入 250ml 玻璃圆底瓶。然后按 9 : 1 : 7 : 0.2 的摩尔比分别称取和加入双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC)、双肉豆蔻酰磷脂酰甘油 (DMPG)、胆固醇和佐剂单磷酸脂质 A (MPLA) (均来自 Avanti Polar Lipids Inc. AL, 美国)。然后加入氯仿, 产生具有细粒的澄清溶液。轻轻搅拌 15 分钟后, 通过在 40℃ 下在降低的压力下, 然后在高真空下蒸发 3 小时来去除有机溶剂。通过在层状罩 (lamellar hood) 中加入无菌 PBS 并在 RT 下轻轻搅拌 18 小时来再水化产生的薄膜。最终的肽 / 磷脂摩尔比为 1 : 100。然后在保存于 2-8℃ 之前将脂质体悬液分装在无菌 15ml Falcon 管中 (5ml 产物 / 管)。最终的肽浓度为 40 μM。

[0323] 实施例 4 : Tau 脂质体疫苗的表征

[0324] 4.1 方法

[0325] 4.1.1 肽、DMPC 和胆固醇的 HPLC 定量

[0326] 为了分析脂质体 tau 疫苗 (ACI-33、ACI-35、ACI-36、ACI-39、ACI-40 和 ACI-41, 均按照实施例 3 中所述的方法 A 制备), 通过向玻璃 HPLC 管中的疫苗样品 (20 μl) 加入水 (20 μl), 然后加入异丙醇 (140 μl) 和 TFA (20 μl) 来制备样品。注射 (20 μl) 前短暂涡

旋 5 倍稀释的样品。用保持 75℃ 恒温的 C3 反相 Zorbax 300SB-B3 柱 (250×4.6mm, 5 μm, **300Å**, Agilent) 进行分析, 在 207 和 214nm 下检测。洗脱溶剂如下: 溶剂 B: 95% 异丙醇、5% 水、0.1% TFA; 溶剂 A: 10% 乙腈、90% 水、0.1% TFA。以 1ml/ 分钟的流速在 20 分钟内应用从 40% B 至 60% B 的梯度。为了校准目的, 分别按不同的浓度使用 tau 肽 (T1、T3、T4、T8 和 T9) 和 DMPC/ 胆固醇的标准品。对于 tau 肽, 制备 TFA/iPrOH/H₂O (1 : 7 : 2) 中的 1mg/ml 的储液, 并从 400 μg/ml (1 : 1) 系列稀释至 12.5 μg/ml。对于脂质, 制备 70% 异丙醇和 30% 水中的 8.0mg/ml DMPC 和 3.5mg/ml 胆固醇的储液, 并用相同的混合物 (1 : 5)、(1 : 10) 和 (1 : 50) 稀释。

[0327] 4.1.2 MPLA 的 HPLC 定量

[0328] 用 UV 活性生色团 3,5- 二硝基苄氧胺 (DNBA) 衍生化佐剂后, 通过具有 UV 检测的 HPLC 定量 tau 脂质体疫苗内的 MPLA。简言之, 将 20 μl 脂质体 tau 构建体加至 DNBA 的吡啶溶液 (10mg/ml, 总体积 100 μl), 在 60℃ 下加热 3 小时, 然后通过蒸发去除吡啶。将产生的沉淀溶解在氯仿/ 甲醇 (2 : 1, v/v) 中进行 HPLC 分析。按四个不同的浓度将 MPLA (Avanti Polar Lipids) 用于校准目的, 并按照针对脂质体 tau 构建体所述衍生和分析。用保持 50℃ 恒温的 Agilent XDB-C18 反相柱 (250×4.6mm, **120 Å**, 5 μm) 进行 HPLC 分析, 在 254nm 下检测。洗脱溶剂如下: 溶剂 A: 95% 乙腈、5% 水、4.8mM 磷酸; 溶剂 B: 95% 异丙醇、5% 水、4.8mM 磷酸。以 1ml/ 分钟的流速在 30 分钟内应用从 10% B 至 70% B 的梯度。

[0329] 4.1.3 脂质体表面电势

[0330] 用 PBS 100 倍稀释 tau 脂质体构建体样品。在 25℃ 下用 Zetasizer Nano (Malvern, 美国) 进行分析。以自动模式进行测量持续时间和电压的选择, 典型的应用电压为 50mV。使用 DTS 5.0 (Malvern) 软件, 用 Smoluchowski 方程自动转化数据来计算 ζ 电势。由于 tau 脂质体构建体由摩尔比 9 : 1 : 7 : 0.2 的 DMPC/DMPG/ 胆固醇 /MPLA 的混合物组成, 预期的净电荷将为负。

[0331] 4.1.4 圆二色性构象分析

[0332] 用 PBS 1 : 1 稀释脂质体构建体来产生 18 μM 的最终肽浓度。用具有相同组成但缺乏 tau 肽的脂质体作为空白溶液进行基线扣除。在 23℃ 下用 0.1cm 光程长度的石英杯 (Hellma, 德国) 在 Jasco-815 旋光分光计上获得 CD 光谱。以 1.0nm 带宽和 0.5nm 分辨率在 195-250nm 波长范围内进行测量。利用具有 1 秒响应时间的 50nm/ 分钟的扫描速度。平均并从各样品光谱的 8 次扫描的平均值并减去空白光谱 (来自 8 次扫描)。用方程 $[\theta] = [\theta]_{\text{obs}} \times (\text{MRW}/101c)$ 转化为平均残基摩尔椭圆度 ($[\theta]$, 度 $\text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$) 后使所获得的光谱 ($[\theta]_{\text{obs}}$, 度) 平滑, 其中 MRW 是平均残基分子量 (MW/ 残基数), I 是光程长度 (cm), 而 c 是浓度 (g/cm^3)。

[0333] 4.1.5 ThT 荧光测定

[0334] 在酶标仪 Infinite M200 (Tecan Group Ltd, 瑞士) 上获得 ThT 荧光测量结果。作为一般方法, 用 PBS 将 tau 脂质体构建体稀释至不同浓度 (表 2)。类似地稀释具有相同组成但缺乏 tau 肽的脂质体, 以用作阴性对照 (批次 ACI-35-081015-B)。向 98 μl 的各疫苗或空白溶液加入 ThT (2 μl, 1.2mM 于水中), 以产生 24 μM 的终浓度。短暂涡旋后, 将来自各样品的整分试样 (70 μl) 加至黑色不透明的 384 孔 Perkin Elmer 微量滴定板上, 在 440nm 下激发 30 分钟后在 485nm 下测量荧光发射。激发带宽为 9nm, 发射带宽为 20nm。用 γ-环

糊精作为内部对照。从 PBS 中的 640mM 储液制备 PBS 中的系列 2 倍稀释液,以获得 320、160 和 80mM γ -环糊精对照溶液。

[0335] 表 2:制备用于 ThT 测定的样品

[0336]

肽	疫苗	批次	稀释度	肽浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
T1	ACI-33	ACI-33-081031-A	2 倍	23
		ACI-33-081031-A	3 倍	15
		ACI-33-081031-A	4 倍	7.7
		ACI-33-081031-A	12 倍	3.8
T3	ACI-35	ACI-35-081015-A	2 倍	39
		ACI-35-081015-A	3 倍	26
		ACI-35-081015-A	4 倍	20
		ACI-35-081015-A	12 倍	5
T4	ACI-36	ACI-36-081110-A	2 倍	16.5
		ACI-36-081110-A	3 倍	11
		ACI-36-081110-A	4 倍	8.3
		ACI-36-081110-A	12 倍	2.1
T8	ACI-39	ACI-39-090202-A	2 倍	24
		ACI-39-090202-A	3 倍	16
		ACI-39-090202-A	4 倍	12
		ACI-39-090202-A	12 倍	4
T9	ACI-40	ACI-40-090202-A	2 倍	30
		ACI-40-090202-A	3 倍	20
		ACI-40-090202-A	4 倍	15
		ACI-40-090202-A	12 倍	5
T8+T9	ACI-41	ACI-41-081204-A	2 倍	11.5
		ACI-41-081204-A	3 倍	7.7
		ACI-41-081204-A	4 倍	5.8
		ACI-41-081204-A	12 倍	1.9
阴性对照	阴性对照	ACI-35-081015-B	2 倍	n/a
		ACI-35-081015-B	3 倍	n/a
		ACI-35-081015-B	4 倍	n/a
		ACI-35-081015-B	12 倍	n/a

[0337] 4.2. 结果

[0338] 4.2.1 肽、DMPC 和胆固醇的 HPLC 定量

[0339] 从疫苗样品的注射获得的 207nm 检测波长下的 HPLC 层析谱显示 tau 肽、DMPC 和胆固醇的存在 (见表 4)。从用标准品测定的校准曲线计算了疫苗中各成分的量。检测到的

tau 脂质体悬液中的 tau 肽、DMPC 和胆固醇含量接近于目标值。

[0340] 4.2.2MPLA 的 HPLC 定量

[0341] 从 DNBA 衍生的 tau 疫苗样品的注射获得的 254nm 检测波长下的 HPLC 层析谱显示标记 MPLA 的存在（见表 4）。使用用标准品获得的校准曲线，计算了 tau 脂质体疫苗中 MPLA 的量。检测到的 tau 脂质体悬液中的 MPLA 含量接近于目标值。

[0342] 4.2.3 脂质体表面电势

[0343] 测量到的 tau 脂质体疫苗的 ζ 电势显示在表 4 中。

[0344] 4.2.4 脂质体疫苗内 tau 肽的 CD 构象分析

[0345] 通过圆二色性测定了按照之前的描述制备的 tau 脂质体疫苗的构象。结果显示在表 3 中。

[0346] 4.2.5 脂质体疫苗内 tau 肽的 ThT 测定

[0347] 通过 ThT 荧光测定测定的脂质体疫苗（通过上述方法 A 制备）的 tau 肽的聚集状态显示在表 4 中。

[0348] 表 3. 疫苗特征的总结

[0349]

疫苗	成分	存留时间	目标值 ($\mu\text{g/ml}$)	结果 ($\mu\text{g/ml}$)	脂质体 表面电 势(mV)	构象 圆二色性	ThT 测 定 (肽聚 集) 荧光信 号
ACI-33	肽 T1	19.3 分钟	130	46	-18.7	β -折叠和 β -转 角混合构象	聚集
	胆固醇	11.2 分钟	1027	923			
	DMPC	10.0 分钟	2314	2463			
	DMPG	Nd	261	nd			
	MPLA	39.8 分钟	135	62			
ACI-35	肽 T3	19.5 分钟	130	78	-19.2	无规卷曲构象	无聚集
	胆固醇	11.6 分钟	1046	1438			
	DMPC	10.3 分钟	2357	nd			
	DMPG	nd	266	nd			
	MPLA	29.7 分钟	135	124			
ACI-36	肽 T4	20.3 分钟	130	33	-17.8	具有一些 β -折 叠贡献的无规 卷曲构象	聚集
	胆固醇	11.2 分钟	1018	1387			
	DMPC	10.0 分钟	2296	nd			
	DMPG	nd	259	nd			
	MPLA	29.7 分钟	135	83			
ACI-39	肽 T8	19.3 分钟	130	48	-16.8	β -折叠构象	无聚集
	胆固醇	11.8 分钟	1056	1906			
	DMPC	10.5 分钟	2381	4316			
	DMPG	nd	269	nd			
	MPLA	30.9 分钟	135	144			
ACI-40	肽 T9	21.0 分钟	130	60	-14.7	无规卷曲构象	无聚集
	胆固醇	11.8 分钟	1109	1655			
	DMPC	10.5 分钟	2500	2894			
	DMPG	nd	269	nd			
	MPLA	30.9 分钟	135	122			
ACI-41	肽 T8+T9	18.3 分钟 + 19.9 分钟	65+65	23+34	-17.3	无规卷曲和 β - 折叠构象的混 合	无聚集
	胆固醇	11.2 分钟	1109	34			
	DMPC	9.9 分钟	2500	1574			
	DMPG	nd	282	3829			
	MPLA	30.9 分钟	135	80			

[0350] 实施例 5 :tau 棕榈酰化抗原在野生型和 Tau-/-KO 小鼠中的免疫原性

[0351] 5.1 方法

[0352] 5.1.1tau 敲除小鼠 (TKO)

[0353] 用靶向载体达到 tau 基因的敲除,该靶向载体在该基因的外显子 1 中与内源起始密码子符合读框地插入 EGFP(增强型绿色荧光蛋白)cDNA。这产生了融合蛋白质,其具有

tau 的前 31 个氨基酸,随后是 EGFP(由 Tucker KL. 等,Nature Neuroscience,2001 描述)。通过全脑裂解物的 Western 印迹确认了基因的缺失。使用几种抗-tau 抗体的 tau 蛋白水平显示,所有 tau 同种型都在纯合突变体中缺乏,在杂合突变体中减少 50%。将突变维持在 C57BL/6 背景上。

[0354] 5.1.2 疫苗的制备

[0355] 通过实施例 3 中所述的方法 A 制备疫苗。

[0356] 5.1.3 免疫

[0357] C57BL/6 或 Tau-/-KO 小鼠 (TKO) 在三个时机 (方案 1) 接受疫苗 (ACI-33、ACI-35、ACI-36 和 ACI-41) 的腹膜内注射 (表 4)。

[0358] 对于 ACI-33、ACI-35、ACI-36 和 ACI-41 免疫,按照方案 1 每次施用间隔 2 周 (d0、d13、d28) 进行三次免疫。在第一次免疫前 1 天 (d-1),然后在第二 (d27) 和第三 (d47) 次免疫后采集血液样品并制备血清。通过使血液样品过夜凝固,然后在离心后取上清来制备血清。通过 ELISA 测定 tau 磷酸肽特异性 IgG 和 IgM 抗体效价及 IgG 同种型模式。作为对照,还通过 ELISA 测定了非 pTau 肽特异性 IgG 抗体效价。

[0359] 表 4:小鼠免疫

[0360]

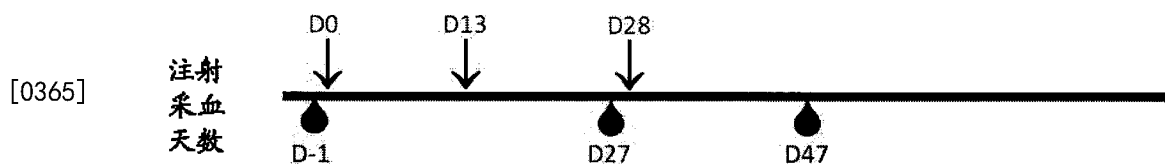
组	小鼠	月龄	动物数目和性别	处理/体积 ^a	疫苗批次	给药途径 ^b	剂量水平肽的量 ug/剂量 ^c	MPLA 的量 ug/剂量 ^c
ACI-33 (T1 肽)	WT	6	3 ♀ 3 ♂	ACI-33 0.2 ml	ACI-33-0 81031-A	腹膜内	9	12
	KO	4-5	3 ♀ 3 ♂	ACI-33 0.2 ml	ACI-33-0 81031-A	腹膜内	9	12
ACI-35 (T3 肽)	WT	6	3 ♀ 3 ♂	ACI-35 0.2 ml	ACI-35-0 81015-A	腹膜内	16	23
	KO	6-8	3 ♀ 3 ♂	ACI-35 0.2 ml	ACI-35-0 81015-A	腹膜内	16	23
ACI-36 (T4 肽)	WT	6	3 ♀ 3 ♂	ACI-36 0.2 ml	ACI-36-0 81110-A	腹膜内	7	13
	KO	4	3 ♀ 3 ♂	ACI-36 0.2 ml	ACI-36-0 81110-A	腹膜内	7	13
ACI-41 (T8+T9 肽)	WT	7	3 ♀ 3 ♂	ACI-41 0.2 ml	ACI-41-0 81204-A	腹膜内	5	7
	KO	4	3 ♀ 3 ♂	ACI-41 0.2 ml	ACI-41-0 81204-A	腹膜内	5	7

[0361] ^a:理论体积

[0362] ^b:i. p. :腹膜内

[0363] °:分析后测定的测量量

[0364] 方案 1 :用于 ACI-33、ACI-35、ACI-36 和 ACI-41 的免疫和采血时间表 (P65)



[0366] 5. 1. 4Tau 肽特异性抗体的定量

[0367] 在 3 个血清采血样品中通过 ELISA 测定针对 pTau 肽的特异性 IgG 抗体。在来自 d-1 和 d47 的血清中测定了 Tau 肽特异性 IgG。在 d47 血清采血样品中通过 ELISA 测定了肽 pTau 特异性 IgM 和 IgG 同种型抗体。用 10ug/ml 的对应的 Tau 肽在 4℃ 下过夜包被平板。用 PBS-0.05% Tween 20 洗涤各孔并用 PBS-0.05% Tween 20 中的 1% BSA 封闭后,将血清的系列稀释液加至平板,并在 37℃ 下孵育 2 小时。洗涤后,用碱性磷酸酶 (AP) 缀合的抗 - 小鼠 IgG 总抗体 (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, 美国) 或同种型特异性抗体 (购自 Pharmingen BD, San Diego, CA, USA 的辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的抗 - 小鼠 IgM、AP 缀合的抗 - 小鼠 IgG1、生物素缀合的抗 - 小鼠 IgG2a 和 IgG3, 及来自 Zymed Laboratories, San Francisco, CA 的 HRP 缀合的抗 - 小鼠 IgG2b) 在 37℃ 下孵育平板 2 小时。洗涤后,用 AP 的磷酸酶底物 pNPP (对 - 硝基 - 苯基 - 磷酸盐) 或 HRP 的底物 ABTS (2,2' - 连氨基 - 双 (3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸)) 孵育平板,并用 ELISA 酶标仪在 405nm 下读数。对生物素缀合的抗体进行了补充步骤,其中在用 ABTS 检测前在链霉抗生物素蛋白 -HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, 美国) 中孵育平板 45 分钟。对于 IgG, 结果表示为第一稀释度和非饱和稀释度下的 O. D. (光密度), 对于 IgG 同种型和 IgM, 结果表示为非饱和 O. D. 下的 O. D.。

[0368] 5. 1. 5 抗 -Tau 抗体与来自转基因动物的脑片上的 Tau 缠结的结合 (TAUPIR)

[0369] 通过 TAUPIR 免疫组织化学进行存在于接种动物的血清中的抗体与脑片上的缠结的结合。

[0370] 所使用的脑片来自终末期的 Tau P301L (TPLH : 具有 P301L 突变的人 Tau 的最长同种型 (441aa)) 转基因动物和来自老年 (> 15 月龄) 双转基因 biGT 小鼠 (GSK-3 转基因小鼠与 TPLH 小鼠杂交)。

[0371] 在 PBS 中洗涤脑切片 5 分钟,然后在 PBS : MeOH (1 : 1) 中的 1.5% H₂O₂ 中在 RT 下孵育 15 分钟,以封闭内源过氧化物酶。在 PBST (PBS/0.1% TritonX100) 中洗涤切片三次后,在 PBST+10% FCS (胎牛血清) 封闭溶液在 RT 下孵育它们 30 分钟。在 4℃ 下过夜进行包含抗 -tau 抗体的血清的孵育。用从 1/2' 500 至 1/10'000 的几个不同稀释度将血清稀释在 PBST/10% FCS 中。在 PBST 中洗涤切片三次,然后用 PBST/10% FCS 中的 HRP 缀合的山羊抗 - 小鼠 (购自 Dako, Glostrup, 丹麦) 第二抗体在 RT 下孵育 1 小时。检测前,用 PBST 洗涤切片三次,并在 50mM Tris/HCl pH7.6 中孵育 5 分钟。通过在二氨基联苯胺 (DAB : 1 片于 10ml 50mM Tris. HCl+3ul H₂O₂ 30% 中 ;MP Biomedicals, Solon, OH, 美国) 中孵育切片 3 分钟来进行检测。通过在 PBST 中洗涤切片三次来终止反应。然后将切片转移至硅烷化玻璃板上,并在 50℃ 下在加热板上风干 2 小时。用 Mayers 苏木精 (Fluka Chemie, Buchs, 瑞士) 孵育 1 分钟进行复染,然后在流动的自来水中洗涤 4 分钟。通过在 50%、70%、90% 和两次 100% 的乙醇浴中,然后在二甲苯中 2 次 1 分钟传递来脱水切片。最后,用 DePeX (BDH Chemicals Ltd., Poole, 英格兰) 将切片封固在玻璃盖片下。

[0372] 5.1.6 Western 印迹 (WB)

[0373] 通过 WB 进行存在于接种动物的血清中的抗体与来自转基因动物的脑提取物中的 pTau 的结合。

[0374] 在以下缓冲液中进行野生型 FVB、TPLH、biGT 和 Tau 敲除 (TKO) 小鼠的脑匀浆: 25mM Tris/HCl pH7.6、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM MEGTA、30mM NaF、0.2mM Na_3VO_4 、1nM 冈田软海绵酸 (Okadaic acid)、1mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、5mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、每 12ml 总体积 1 片全蛋白酶抑制剂混合物 (CPIC)。为了获得总脑匀浆, 用以 700 转 / 分钟使用的电机驱动 potter-like (玻璃管 / 聚四氟乙烯研杵) 在 1 体积 / 重量半球 (ml/g) 中在冰上匀浆脑。

[0375] 将总脑匀浆 1/2 稀释在样品缓冲液 (125mM Tris/HCl pH6.8、4% (w/v) 十二烷基硫酸钠 (SDS)、20% 甘油、0.01% 溴酚蓝) + 5% β -巯基乙醇中, 然后迅速加热至 95℃。将样品保持 5 分钟, 1/4 稀释在样品缓冲液中, 再次加热至 95℃, 然后冷却, 并于 14000 转 / 分钟离心 5 分钟, 以清除未溶解的碎片。收集上清并上样在 SDS-PAGE 凝胶上。在转移缓冲液 (25mM Tris pH 8.6、190mM 甘氨酸、20% 甲醇) 中进行向硝酸纤维素膜 (Hybond-ECL) 的转移。将膜转移至封闭溶液 (TBS (50mM Tris, HCl, pH7.6、150mM NaCl) 中的 0.1% Tween+5% 奶粉), 然后用稀释在封闭溶液中的小鼠血清在 4℃ 下过夜孵育。1/10'000 稀释在封闭溶液中的第二抗体 HRP 缀合的山羊抗-小鼠 (Dako, Glostrup, 丹麦) 的孵育在 RT 下进行 1 小时。用来自 GE Healthcare 的 ECL Western Blotting Detection Reagents 进行检测。

[0376] 5.2 结果

[0377] 5.2.1 来自接种小鼠的血清的抗体的特异性

[0378] 针对它们的抗体在 ELISA 测定中对 pTau 和 Tau 肽二者、在 TAUIR 中对 tau 缠结和在 Western 印迹中对 pTau 的特异性测试了来自接种小鼠的血清。

[0379] 腹膜内注射后, ACI-33 疫苗诱导抗-Tau5-20[pY18] IgG 应答。2 次免疫 (d27) 后, IgG 应答保持稳定, 未随第三次免疫 (d47) 而增加 (图 1a: WT 小鼠, 单因素方差分析 $P < 0.05$ d-1 对 d27、 $P < 0.001$ d-1 对 d47; 和图 1b: TKO 小鼠, 单因素方差分析 $P < 0.001$ d-1 对 d27/47)。

[0380] 腹膜内注射后, ACI-35 疫苗诱导强健的抗-Tau393-408[pS396/pS404] IgG 应答。2 次免疫 (d28) 后, IgG 应答保持稳定 (d42、98 和 126), 未随第三次免疫 (d42) 而增加, 且未在强化之前、之间和之后的采血中减少 (图 2a: WT 小鼠: 单因素方差分析 $P < 0.0001$ d-1 对 d28/42/98/126; 和图 2b: TKO 小鼠: 单因素方差分析 $P < 0.0001$ d-1 对 d28/42/98/126)。

[0381] 腹膜内注射后, ACI-36 疫苗诱导 Tau401-418[pS404/S409] IgG 应答。2 次免疫 (d27) 后, IgG 应答保持稳定, 未随第三次免疫 (d47) 而增加 (图 3a: WT 小鼠: 单因素方差分析 $P < 0.001$ d-1 对 d27、 $P < 0.0001$ d-1 对 d47; 和图 3b: TKO 小鼠: 单因素方差分析 $P < 0.0001$ d-1 对 d27/47)。

[0382] 腹膜内注射后, ACI-41 疫苗诱导对 Tau206-221[pT212/pS214] 和 Tau196-211[pS202/pT205] 肽二者的强健的 IgG 应答。2 次免疫 (d34) 后, IgG 应答保持稳定 (d48), 未随第三次免疫 (d48) 而增加 (图 4a: WT 小鼠, 抗-Tau206-221[pT212/pS214]-IgG, 单因素方差分析 $P < 0.0001$ d-1 对 d34/48) (图 4b: WT 小鼠, 抗-Tau196-211[pS202/pT205]-IgG, 单因素方差分析 $P < 0.0001$ d-1 对 d34/48)。(图 4c: TKO 小鼠, 抗-Tau206-221[pT212/pS214]-IgG, 单因素方差分析 $P < 0.0001$ d-1 对 d34/48) (图 4d: TKO

小鼠, 抗-Tau196-211[pS202/pT205]-IgG, 单因素方差分析 $P < 0.0001$ d-1 对 d34/48)。

[0383] 针对抗-tau 抗体在 TAUPIR 免疫组织化学和 Western 印迹中的特异性进一步测试了来自接种小鼠的血清。来自所有脂质体构建体和针对各小鼠模型的数据总结在下文表 5 中。

[0384] 表 5: 来自接种小鼠的血清的抗体特异性提要

[0385]

疫苗	小鼠	ELISA (阳性/总小鼠)	TAUPIR (阳性/总小鼠)	Western Blot (阳性/总小鼠)
ACI-33	WT	4/6	2/6	1/6
	KO	5/6	2/6	2/6
ACI-35	WT	5/6 ; 1†	5/6 ; 1†	5/6 ; 1†
	KO	6/6	3/6	6/6
ACI-36	WT	5/6	4/6	1/6
	KO	5/6 ; 1†	3/6 ; 1†	1/6 ; 1†
ACI-41	WT	6/6	4/6	4/6
	KO	6/6	1/6	3/6

[0386] 5.2.2 来自野生型 C57BL/6 和 Tau-/-KO(TK0) 免疫小鼠的同种型应答的分析

[0387] ACI-33

[0388] 三次腹膜内免疫后, ACI-33 疫苗在 WT 小鼠中诱导所有 IgG2a、2b 和 3 同种型以及 IgM 的抗体效价 (图 5a ; WT 小鼠)。几乎不存在 IgG1, 且 IgG1 与 IgG2b 和 3 之间存在显著差异 (图 5a ; WT 小鼠, 单因素方差分析 $P < 0.05$ IgG1 对 IgG3, $P < 0.001$ IgG1 对 IgG2b)。

[0389] 三次腹膜内免疫后, ACI-33 疫苗在 TK0 小鼠中诱导所有 IgG2a、2b 和 3 同种型以及 IgM 的抗体效价 (图 5b ; TK0 小鼠)。几乎不存在 IgG1, 此亚类与其他 IgG 同种型之间存在显著差异 (图 5b : 单因素方差分析 $P < 0.05$ IgG1 对 IgG2a/IgG3, $P < 0.001$ IgG1 对 IgG2b)。

[0390] ACI-35

[0391] 三次腹膜内免疫后, ACI-35 疫苗在 WT 小鼠中诱导所有 IgG 同种型以及 IgM 的抗体效价 (图 6a ; WT 小鼠)。唯一的显著差异是与 IgG3 相比更高的 IgM 应答 (图 6a ; WT 小鼠, 单因素方差分析 $P < 0.05$ IgM 对 IgG3)。

[0392] 三次腹膜内免疫后, ACI-35 疫苗在 TK0 小鼠中诱导所有 IgG 同种型以及 IgM 的高抗体效价 (图 6b ; TK0 小鼠)。

[0393] ACI-36

[0394] 三次腹膜内免疫后, ACI-36 疫苗在 WT 小鼠中诱导所有 IgG 同种型以及 IgM 的抗体效价 (图 7a ; WT 小鼠)。

[0395] 三次腹膜内免疫后, ACI-36 疫苗在 TK0 小鼠中诱导所有 IgG 同种型以及 IgM 的抗体效价 (图 7b ; TK0 小鼠)。与 IgG1 相比, 存在统计上显著高的 IgG2b 水平 (图 7b ; TK0 小鼠, 单因素方差分析 $P < 0.05$ IgG2b 对 IgG1)。

[0396] ACI-41

[0397] 三次腹膜内免疫后, ACI-41 疫苗在 WT 小鼠中诱导所有 IgG 同种型以及 IgM 的高的抗-Tau196-211[pS202/pT205] 抗体效价 (图 8a ; WT 小鼠)。

[0398] 三次腹膜内免疫后, ACI-41 疫苗在 TK0 小鼠中诱导所有 IgG 同种型以及 IgM 的高

的抗-Tau196-211[pS202/pT205] 抗体效价(图 8b;TKO 小鼠)。

[0399] 5.3 结论

[0400] Tau 疫苗在所有小鼠中诱导 IgG 效价。在 ACI-33 免疫的小鼠中,与 IgG2b 和 IgG3 相比,存在低 IgG1 抗体应答。在所有其他 tau 接种的小鼠中,所诱导的所有 IgG2a、2b 和 3 同种型以及 IgM 的抗体效价相当。

[0401] 从 tau 疫苗免疫的小鼠产生的抗体特异性结合 pTau,与 Tau 肽具有微弱结合。所产生的抗体还能识别 Tau 转基因小鼠脑中的缠结和通过 WB 识别来自 Tau 转基因小鼠脑提取物的 pTau。

[0402] 实施例 6:杂交瘤和抗体的产生和筛选

[0403] 此研究的目的是产生和筛选抗-Tau mAb(单克隆抗体)。通过 tau 疫苗免疫的小鼠脾与骨髓瘤细胞系的融合来产生杂交瘤。针对与磷酸化和非磷酸化全长 Tau 蛋白,以及用于疫苗制剂中的磷酸化和非磷酸化 Tau 抗原肽的反应性评估了杂交瘤。还用 Tau 转基因小鼠脑片上的免疫化学针对杂交瘤上清对 tau 缠结的反应性进行了杂交瘤筛选。

[0404] 6.1 方法

[0405] 6.1.1 融合

[0406] 用接种 ACI-33(Tau5-20[pY18]) 和 ACI-35 的野生型 C57BL/6 小鼠进行杂交瘤产生。在第 0 天用 ACI-33 疫苗强化小鼠,然后在第 4 天再次强化小鼠,并在第 7 天进行融合。按 5 个脾细胞/1 个骨髓瘤细胞的比使来自免疫小鼠的 173×10^6 (ACI-33) 个脾细胞与 SP2-O-Ag14 骨髓瘤细胞融合。

[0407] 用接种 ACI-36(Tau401-418[pS404/S409]) 的野生型 C57BL/6 小鼠进行杂交瘤产生。在第 0 天用 ACI-36 疫苗强化小鼠,然后在第 4 天再次强化小鼠,并在第 7 天进行融合。按 5 个脾细胞/1 个骨髓瘤细胞的比使来自免疫小鼠的 84×10^6 个脾细胞与 SP2-O-Ag14 骨髓瘤细胞融合。

[0408] 用接种 ACI-41(Tau206-221[pT212/pS214] 和 Tau196-211[pS202/pT205] 的混合物)的野生型 C57BL/6 小鼠进行杂交瘤产生。在第 0 天用 ACI-41 疫苗强化小鼠,然后在第 4 天再次强化小鼠,并在第 8 天进行融合。按 5 个脾细胞/1 个骨髓瘤细胞的比使来自免疫小鼠的 162×10^6 个脾细胞与 SP2-O-Ag14 骨髓瘤细胞融合。

[0409] 三次融合产生 8×96 孔板,按照板(1-8),之后为行(A-G),最后为列(1-12)命名克隆。

[0410] 6.1.2 选择克隆的筛选方法

[0411] 首先针对 IgG 表达筛选 8×96 孔板两次。然后将阳性表达克隆转入 24 孔板,并在 Tau ELISA 筛选和免疫组织化学 TAUIR 筛选中测试生长细胞的细胞上清(=克隆)。将 ELISA 和/或 TAUIR 中的阳性上清转移至 T25 瓶,针对 IgG 表达、Tau ELISA 筛选和 TAUIR 再次筛选克隆。

[0412] 6.1.3 IgG 筛选

[0413] 用 50u1/孔的包被缓冲液中的抗-小鼠 IgG 抗体(CER Groupe,Marloie,比利时)在 4℃ 下包被 ELISA 平板 16 小时。用 PBS/Tween 洗涤平板后,在 RT 下应用 100u1/孔的封闭缓冲液 1 小时。在 RT 下孵育 50u1 未稀释的杂交瘤上清 1 小时。洗涤步骤之后,在 RT 下在平板上应用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗-小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3(Ab Serotec,

Raleigh, NC, 美国) 的混合物 1 小时。最后的洗涤之后, 用 HRP 的磷酸酶底物 TMB (3-3', 5,5' - 四甲基联苯胺) 进行检测, 并用 ELISA 酶标仪在 405nm 下对平板进行读数。结果表示为 O. D. (光密度)。

[0414] 6.1.4 杂交瘤 Tau ELISA 筛选

[0415] 在 pTau 肽 (ACI-33, T1.5 :Tau5-20[pY18] ;ACI-36, T4.5 :Tau401-418[pS404/S409] ;ACI-41, T8.5 :Tau206-221[pT212/pS214] 和 T9.5 :Tau196-211[pS202/pT205] ; PolyPeptide Laboratories, **Hillerød**, 丹麦)、对应的 Tau 肽 (ACI-33, T1.6 :Tau5-20 ; ACI-36, T4.6 :Tau401-4 ;ACI-41, T8.6 :Tau206-221 和 T9.6 :Tau196-211 ;PolyPeptide Laboratories, **Hillerød**, 丹麦)、磷酸化全长 (441aa) Tau 蛋白 (pTau 蛋白, Vandebroek 等, 2005) 和全长 (441aa) Tau 蛋白 (Tau 蛋白, SignalChem, Richmond, 加拿大) 上进行了杂交瘤 ELISA 筛选。最后, 用牛血清白蛋白 (BSA) 作为阴性对照。

[0416] 用 10ug/ml 的对应的 Tau 肽和 1ug/ml 的对应的 Tau 蛋白在 4℃ 下过夜包被平板。用 PBS-0.05% Tween 20 洗涤各孔并用 PBS-0.05% Tween 20 中的 1% BSA 封闭后, 将未稀释的杂交瘤上清或培养基阴性对照加至平板, 并在 37℃ 下孵育 2 小时。洗涤后, 用碱性磷酸酶 (AP) 缀合的抗 - 小鼠 IgG 总抗体 (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, 美国) 在 37℃ 下孵育平板 2 小时。洗涤后, 用 AP 的磷酸酶底物 pNPP (对 - 硝基 - 苯基 - 磷酸盐) 孵育平板, 并用 ELISA 酶标仪在 405nm 下读数。结果表示为 O. D. (光密度)。

[0417] 6.1.5 杂交瘤 IHC 筛选 : 抗 - Tau 抗体与来自转基因小鼠的脑切片中的缠结的结合 (TAUPIR)

[0418] 按照来自实施例 5.1.5 的流程进行 TAUPIR 实验。

[0419] 6.1.6 T25 瓶 IgG 筛选

[0420] 用碳酸盐 - 碳酸氢盐包被缓冲液 pH 9.6 (Sigma, Buchs, 瑞士) 中的 5ug/ml 的抗 - 小鼠 IgG F(ab')₂ 片段特异性抗体 (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, 美国) 在 4℃ 下过夜包被 Elisa 平板。洗涤平板后, 在 RT 下孵育未稀释的杂交瘤上清、阳性对照 IgG1 抗体 (1ug/ml 的 6E10 :Covance, Emeryville, CA, 美国) 或阴性对照 (培养基单独) 1 小时。洗涤步骤后, 在 37℃ 下在平板上孵育第二 AP 缀合的山羊抗 - 小鼠 IgG (亚类 1+2a+2b+3) Fc γ 片段特异性抗体 (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, 美国) 2 小时。最后的洗涤后, 用 AP 的磷酸酶底物 pNPP (对 - 硝基 - 苯基 - 磷酸盐) 进行检测, 并用 ELISA 酶标仪在 405nm 下对平板进行读数。结果表示为 O. D. (光密度)。

[0421] 6.2 结果

[0422] ACI-33 杂交瘤

[0423] 针对 IgG 的产生筛选了来自产生自融合的 8×96 孔板的细胞上清。在所测试的 768 个孔 (8×96 孔) 中, 277 个孔为 IgG 表达阳性, 并转移至 24 孔板。在 24 孔板中, 79 个克隆生长, 分析了来自那些细胞的上清。将阳性克隆进一步转入 T25 瓶, 并针对 IgG 产生、ELISA 和 TAUPIR 筛选上清 (表 6)。

[0424] 表 6 :

[0425]

24 孔板筛选		T25 瓶筛选		
ELISA 阳性	TAUPIR 阳性	IgG 筛选 阳性	ELISA 阳性	TAUPIR 阳性
1A7		1A7		
	1A11			
	1C11	1C11		
2C9		2C9		
3C3		3C3	3C3	
3C5		3C5		
3E8		3E8		
3G10	3G10	3G10	3G10	
6C10	6C10	6C10	6C10	6C10
6F3		6F3		
6F8		6F8		

[0426] 克隆 6C10 是仅有的在 3 次筛选中都为阳性的克隆,选择其进行了亚克隆。

[0427] ACI-36 杂交瘤

[0428] 针对 IgG 的产生筛选了来自产生自融合的 8×96 孔板的细胞上清。在所测试的 768 个孔 (8×96 孔) 中,333 个孔为 IgG 表达阳性,并转移至 24 孔板。在 24 孔板中,75 个克隆生长,分析了来自那些细胞的上清。将阳性克隆进一步转入 T25 瓶,并针对 IgG 产生、ELISA 和 TAUIR 筛选上清 (表 7)。

[0429] 表 7:

[0430]

24 孔板筛选		T25 瓶筛选		
ELISA 阳性	TAUPIR 阳性	IgG 筛选 阳性	ELISA 阳性	TAUPIR 阳性
2B6	2B6	2B6	2B6	2B6
2F9	2F9	2F9	2F9	2F9
2G1		2G1	2G1	2G1
3A8	3A8	3A8	3A8	3A8
3B9		3B9	3B9	3B9
3F11	3F11	3F11		3F11
	4A3			4A3
4C1		4C1	4C1	4C1
4C12		4C12	4C12	4C12
4E12		4E12	4E12	4E12
5E10		5E10	5E10	
5F5		5F5	5F5	
7D6	7D6	7D6	7D6	7D6
6H1		6H1	6H1	6H1

[0431] 为了选择用于下一步的克隆,根据 ELISA 和 TAUIPR 结果进行了 IgG/ELISA/TAUIPR 筛选阳性的所有上清的排序。按方法部分中所述进行了 ELISA 和 TAUIPR 结果的排序。前 5 个克隆的 TAUIPR 染色几乎一致,这对应于 ELISA 结果。排除了 4C12,因为它与 4C1 见于同一块平板,这增加了这两个克隆相同(识别相同表位)的可能性。所选择的最好的四个克隆是 3A8、2B6、4C1 和 6H1。保存其他 6 个克隆(4C12、2G1、2F9、7D6、3B9、4E12)作为后备。

[0432] 进行了在 ELISA 筛选和 TAUIPR 筛选中显示阳性的 10 个克隆的排序来选择最好的克隆(表 8)。以灰色突出显示的是最好的 5 个克隆。

[0433] 表 8:ELISA 和 TAUIPR 中的阳性克隆的排序

[0434]

按 ELISA 排序	按 TAUIPR 排序
3A8	6H1
2B6	4C1
4C1	3A8
6H1	4C12
4C12	2B6
2G1	2F9
2F9	3B9
7D6	2G1
3B9	7D6
4E12	4E12

[0435] ACI-41 杂交瘤

[0436] 针对 IgG 的产生筛选了来自产生自融合的 8×96 孔板的细胞上清。在所测试的 768 个孔 (8×96 孔) 中, 215 个孔为 IgG 表达阳性, 并转移至 24 孔板。在 24 孔板中, 81 个克隆生长, 分析了来自那些细胞的上清。将阳性克隆进一步转入 T25 瓶, 并针对 IgG 产生、ELISA 和 TAUPIR 筛选上清 (表 9)。

[0437] 表 9

[0438]

24 孔板筛选		T25 瓶筛选		
ELISA 阳性	TAUPIR 阳性	IgG 筛选 阳性	ELISA 阳性	TAUPIR 阳性
	3D11	3D11		3D11
4H6		4H6		4H6
5D10	5D10	5D10	5D10	5D10
5E6	5E6			
5F10		5F10		
6B7		6B7	6B7	
7C2	7C2	7C2	7C2	7C2
	8G8			8G8
	8H8	8H8		8H8

[0439] 克隆 5D10 和 7C2 是仅有的两个在 3 次筛选中都为阳性的克隆, 选择它们进行了亚克隆。克隆 5D10 只结合肽 T8. 5, 而克隆 7C2 与 ACI-41 疫苗的两种肽 (T8. 5 和 T9. 5) 结合 (图 10)。

[0440] 源自 5D10 的亚克隆 5D10A4 对 pTau 肽特异。

[0441] 8. 3 结论

[0442] 所产生的抗体已显示了对 pTau 肽的高特异性, 与非磷酸化肽只有微弱结合。

[0443] 将来自三次融合 (ACI-33、ACI-36 和 ACI-41) 的总计 7 个克隆保藏于 DSMZ (表 10), 并选择其用于进一步亚克隆。

[0444] 表 10 : 所保藏的杂交瘤的列表

[0445]

抗原	疫苗	杂交瘤名称	保藏号	保藏日期
T8: Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	ACI-41-Ab1	DSM ACC3043	2010 年 3 月 3 日
T4: Tau401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	2B6	DSM ACC3044	2010 年 3 月 10 日
T4: Tau401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	3A8	DSM ACC3045	2010 年 3 月 10 日
T4: Tau401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	4C1	DSM ACC3046	2010 年 3 月 10 日
T8: Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	5D10A3	DSM ACC3047	2010 年 3 月 10 日
T1: Tau 5-20 [pY18]	ACI-33	6C10	DSM ACC3048	2010 年 3 月 10 日
T4: Tau401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	6H1	DSM ACC3049	2010 年 3 月 10 日
T8: Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	7C2	DSM ACC3050	2010 年 3 月 10 日

[0446] 实施例 7:源自接种 ACI-41 的小鼠的两种抗体 (ACI-41-Ab1 和 5D10) 的人 AD 脑片特异性染色

[0447] 此研究的目的是用抗体 ACI-41-Ab1 (9H3 亚克隆 T89-F4) 和 5D10 染色人阿尔茨海默病 (AD) 脑中的神经原纤维缠结 (NFT), 该抗体产生自接种 ACI-41 疫苗免疫的小鼠的两种不同融合。为了对此进行测试, 利用了使用人 AD 脑切片的磷酸化 Tau 蛋白免疫反应性染色测定 (TAU-PIR)。

[0448] 7.1. 方法

[0449] 7.1.1 5D10 抗体产生

[0450] 按实施例 9 中所述产生 5D10。

[0451] 7.1.2 ACI-41-Ab1 产生

[0452] 7.1.2.1 融合

[0453] 用接种 ACI-41 (包含两种磷酸化 Tau 肽 Tau206-221 [pT212/pS214] 和 Tau196-211 [pS202/pT205] 的混合物的 ACI-41 疫苗) 的野生型 C57BL/6 小鼠进行杂交瘤产生。融合前 5 天用 ACI-41 强化小鼠。按 5 个脾细胞 / 1 个骨髓瘤细胞的比使来自免疫小鼠的 58×10^6 个脾细胞与 SP2/0-O-Ag 14 骨髓瘤细胞融合。融合产生 10×96 孔板, 然后对其进行筛选来测定感兴趣的克隆。

[0454] 7.1.2.2 杂交瘤 ELISA 筛选

[0455] 在 T8 :Tau206-221[pT212/pS214]、T9 :Tau196-211[pS202/pT205] 或超磷酸化(hP)Tau(在 Western 印迹部分下解释)包被的平板上进行了杂交瘤 ELISA 筛选。

[0456] 用 2ug/ml 的 hP-Tau 在室温(RT)下过夜包被平板。用 PBS 洗涤各孔并用 PBS 中的 2% FCS 封闭后,将杂交瘤上清加至平板,并在 RT 下孵育 1 小时。洗涤步骤后,用 PBS 1% FCS 中的过氧化物酶缀合的 AffiniPure 山羊抗-小鼠总 Ig(IgG+IgM 的检测,Dako Glostrup,丹麦)在 RT 下孵育平板 1 小时。用 TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)显色平板。用 2N H₂SO₄ 终止反应,并用 ELISA 酶标仪在 405nm 下读数。结果表示为各杂交瘤克隆的光密度(O.D.)。

[0457] 对于肽,用 10ug/ml 的 Tau206-221[pT212/pS214] 或 Tau196-211[pS202/pT205] 在 4℃ 下过夜包被平板。用 PBS 洗涤并用 PBS 中的 2% NHS 封闭后,将杂交瘤上清加至平板,并在室温(RT)下孵育 1 小时。洗涤步骤后,用 PBS 1% NHS 中的生物素化抗-小鼠 IgG(购自 Vector labs)在 RT 下孵育平板 1 小时。对生物素缀合的抗体进行了补充步骤,检测前在链霉抗生物素蛋白-HRP(ABC 试剂盒,Vector labs)中孵育平板 30 分钟。洗涤步骤后,用 TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)显色平板。用 2N H₂SO₄ 终止反应,并用 ELISA 酶标仪在 405nm 下读数。结果表示为各杂交瘤克隆的光密度(O.D.)。

[0458] 7.1.2.3 杂交瘤 IHC 筛选:抗-Tau 抗体与来自转基因小鼠的脑切片中的缠结的结合(TAUPIR)

[0459] 通过 Tau 转基因小鼠脑切片上的免疫组织化学(IHC)进行了杂交瘤细胞产生的抗体与缠结的结合。

[0460] 来自老年(>20 月龄)双转基因 biGT 小鼠(GSK-3 转基因小鼠与 TPLH(表达具有 P301L 突变的人 Tau 最长同种型(441aa)的小鼠)杂交)和来自 Tau 敲除(TKO)小鼠的脑切片作为阴性对照。

[0461] 按照来自实施例 5.1.5 的流程进行 TAUPIR 染色。

[0462] 7.1.2.4 杂交瘤 Western 印迹筛选(WB)

[0463] 通过 WB 进行了杂交瘤细胞产生的抗体与来自转基因动物的脑提取物和/或 hP-Tau 提取物中的 pTau 的结合。

[0464] 在以下缓冲液中进行野生型 FVB、TPLH、biGT 和 Tau 敲除(TKO)小鼠的脑匀浆:25mM Tris/HCl pH7.6、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、30mM NaF、0.2mM Na₃VO₄、1nM 冈田软海绵酸、1mM 苯甲基磺酰氟(PMSF)、5mM Na₄P₂O₇、每 12ml 总体积 1 片全蛋白酶抑制剂混合物(CPIC)。为了获得总脑匀浆,用以 700 转/分钟使用的电机驱动 potter-like(玻璃管/聚四氟乙烯研杵)在 10 体积/重量半球(ml/g)中在冰上匀浆脑。

[0465] 对于 hP-Tau 提取,用以下缓冲液匀浆 TPLH 和 TKO 小鼠的脑:100mM MES pH 6.8、1mM β-巯基乙醇、5mM EDTA、2.5mM PMSF、5 μg/ml 甲苯磺酰基-L-赖氨酸氯甲基酮(TLCK)、100mM NaF、1nM 冈田软海绵酸、0.2mM Na₃VO₄和每 12ml 总体积 1 片全蛋白酶抑制剂混合物(CPIC)。用以 700 转/分钟使用的电机驱动 potter-like(玻璃管/聚四氟乙烯研杵)在 6 体积/重量半球(ml/g)中在冰上匀浆脑。在 4℃ 下 20000×g 离心匀浆 30 分钟,转移上清并迅速加热至 95℃,在 95℃ 保持 10 分钟,然后在融化的冰中冷却。进行离心步骤,然后进行上清分装并作为“hP-Tau”保存于 -20℃。

[0466] 将总脑匀浆 1/2 稀释在样品缓冲液(125mM Tris/HCl pH6.8、4% (w/v) 十二烷基

硫酸钠 (SDS)、20% 甘油、0.01% 溴酚蓝)+5% β -巯基乙醇中,然后迅速加热至 95℃。将样品保持 5 分钟,1/4 稀释在样品缓冲液中,再次加热至 95℃,然后冷却,并于 14000 转/分钟离心 5 分钟,以清除未溶解的碎片。收集上清并上样在 SDS-PAGE 凝胶上。在转移缓冲液 (25mM Tris pH 8.6、190mM 甘氨酸、20% 甲醇) 中进行向硝酸纤维素膜 (Hybond-ECL) 的转移。将膜转移至封闭溶液 (TBS (50mM Tris.HCl、pH7.6、150mM NaCl) 中的 0.1% Tween+5% 奶粉),然后用未稀释的杂交瘤上清在 4℃ 下过夜孵育。1/10'000 稀释在封闭溶液中的第二抗体 HRP 缀合的山羊抗-小鼠 (Dako, Glostrup, 丹麦) 的孵育在 RT 下进行 1 小时。用来自 GE Healthcare 的 ECL Western Blotting Detection Reagents 进行检测。

[0467] 7.1.3 抗-磷酸化 Tau 抗体与人 AD 脑中的 Tau 缠结的结合

[0468] 从接种 ACI-41 的小鼠的两次分开的融合产生抗-磷酸化 Tau 抗体克隆 ACI-41-Ab1 (9H3T89-F4 亚克隆) (小鼠 IgM 同种型) 和 5D10 (小鼠 IgG 同种型)。ACI-41 疫苗包含两种磷酸化 Tau 肽 Tau206-221 [pT212/pS214] 和 Tau196-211 [pS202/pT205] 的混合物。通过 TAUIR 免疫组织化学进行抗体克隆 T89-F4 与来自人 AD 脑的脑片上的缠结的结合。使用了来自患有 AD、进行性核上性麻痹 (PSP) 的个体和健康对照的皮层脑切片。在 PBS 中洗涤脑切片 5 分钟,然后在 PBS : MeOH (1 : 1) 中的 1.5% H_2O_2 中在 RT 下孵育 15 分钟,以封闭内源过氧化物酶。在 PBST (PBS/0.1% TritonX100) 中洗涤切片三次后,在 PBST+10% FCS (胎牛血清) 封闭溶液在 RT 下孵育它们 30 分钟。在 4℃ 下过夜进行第一抗体 (克隆 9H3T89-F4、5D10 和作为阳性对照的 AT100) 的孵育。在 PBST 中洗涤切片三次,然后用 PBST/10% FCS 中的 HRP 缀合的山羊抗-小鼠 (购自 Dako, Glostrup, 丹麦) 第二抗体在 RT 下孵育 1 小时。检测前,用 PBST 洗涤切片三次,并在 50mM Tris/HCl pH7.6 中孵育 5 分钟。通过在二氨基联苯胺 (DAB : 1 片于 10ml 50mM Tris.HCl+3ul H_2O_2 30% 中 ; MPBiomedicals, Solon, OH, 美国) 中孵育切片 3 分钟来进行检测。通过在 PBST 中洗涤切片三次来终止反应。然后将切片转移至硅烷化玻璃板上,并在 50℃ 下在加热板上风干 2 小时。通过用 Mayers 苏木精 (Fluka Chemie, Buchs, 瑞士) 孵育 1 分钟进行复染,然后在流动的自来水中洗涤 4 分钟。通过在二甲苯中 2 次 5 分钟和在 100% EtOH 中 2 次 1 分钟传递,然后在 90%、70%、50% EtOH 和蒸馏水中洗涤来对切片进行脱蜡。对于抗原修复,在 0.01M 柠檬酸溶液 (pH 6.0) 中煮沸切片 10 分钟,并冷却 20 分钟。最后,用 DePeX (BDH Chemicals Ltd., Poole, 英格兰) 将切片封固在玻璃盖片下。用落射荧光照明光学器件 (epifluorescence illumination optics) 和 3CCD 照相机 (Leica, Wetzlar, 德国) 对染色的切片进行显微镜检查。用专用软件 (IM500, Leica) 获取和分析图像。

[0469] 7.2 结果

[0470] 7.2.1 杂交瘤筛选

[0471] 按方法中所述进行 ELISA 筛选,选择了 172 个杂交瘤克隆,并转移至 12 孔板。进行随后的 ELISA 来评价所产生的抗体对 pTau 肽 Tau206-221 [pT212/pS214]、Tau196-211 [pS202/pT205] 和 / 或 hP-Tau 提取物的特异性。这产生了 25 个 pTau 肽的阳性克隆,且 21 个克隆显示对 hP-Tau 的特异性 (图 11)。

[0472] 与 ELISA 分析平行进行了免疫组织化学研究。在转移至 12 孔板的克隆中发现了不同的染色模式。在用来自所选择的克隆的未稀释的上清孵育的一些 biGT 切片上观察到了非特异性胶质染色、核染色和胞质染色。

[0473] 来自克隆 9H3 (ACI-41-Ab1) 的上清以高特异性染色胞质缠结结构。

[0474] 用来自所选择的杂交瘤的未稀释的上清进行来自不同小鼠的脑和 hP-Tau 提取物上的 WB 筛选。针对所测试的任意杂交瘤上清未观察到与 Tau 的反应。

[0475] 7.2.2 人阿尔茨海默病脑切片中神经原纤维缠结的染色

[0476] 通过 TAUIR 免疫组织化学检查了抗体克隆 ACI-41-Ab1 (9H3 亚克隆 T89-F4) 和 5D10 与人 AD 脑中的 NFT 结合的能力。抗-磷酸化 Tau 抗体克隆 T89-F4 与人 AD 脑中包含磷酸化 Tau 的 NFT 结合 (图 12)。

[0477] 通过 TAUIR 免疫组织化学检查了抗体 5D10 与人 AD 皮层脑切片中的 NFT 结合的能力。抗-磷酸化 Tau 抗体克隆 5D10 与人 AD 脑皮层切片中包含磷酸化 Tau 的 NFT 和神经毡细丝结合 (图 13)。

[0478] 7.3 结论

[0479] 通过 ELISA 筛选 ACI-41 产生的杂交瘤克隆产生了 36 个与磷酸化的肽和 / 或全长 hP-Tau 提取物结合的克隆。通过 TAUIR 筛选这 36 个克隆确认了一个克隆 (9H3) ACI-41-Ab1 对胞质缠结结构的染色。

[0480] ACI-41-Ab1 (9H3-F4) 和 5D10 这两个抗体显示与人 AD 脑切片中的 NFT 和神经毡细丝的特异性结合。

[0481] 实施例 8 : 通过两种不同方法产生的 ACI-35 在腹膜内或皮下免疫后在野生型小鼠 (C57BL/6) 中诱导 pTau 特异性 IgG 应答的潜能

[0482] 此研究的目的是评价通过两种不同方法产生的 ACI-35 (Tau393-408 [pS396/pS404]) : 方法 AACI 或方法 L3ACI 在皮下 (s. c.) 或腹膜内 (i. p.) 注射后在野生型 C57BL/6 小鼠中诱导抗体效价的潜能。以 2 周的间隔免疫小鼠三次, 第一次注射前 1 周和然后每次免疫后 1 周采血。通过 ELISA 测量了总抗-pTau (Tau393-408 [pS396/pS404]) IgG 应答。此外, 三次免疫后分析了抗体应答的同种型模式来评价不同亚类的 IgG 以及 IgM 的分布。分析了针对对应的非 pTau (Tau393-408) 肽的抗体效价。用 ELISPOT 技术分析了 ACI-35 诱导的 T 细胞应答。

[0483] 8.1. 方法

[0484] 8.1.1 疫苗 ACI-35 方法 AACI 的制备

[0485] 按照来自实施例 3 的流程制备 ACI-35 疫苗。然后在保存于 2-8°C 之前分装脂质体悬液 (批次 ACI-35-081103-B)。最终的肽 / 磷脂摩尔比为 1 : 100。

[0486] 8.1.2 疫苗 ACI-35 方法 L3ACI 的制备

[0487] 称取 Tau 衍生的四棕榈酰化磷酸肽 Tau393-408 [pS396/pS404] (S396 和 S404 上具有磷酸基团的人 Tau 393-408) (4.0mg) 放入 25ml 玻璃管, 向其中加入六氟异丙醇 (HFIP) (5ml)。然后将此澄清溶液加至氯仿 (35ml) 中的双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC)、双肉豆蔻酰磷脂酰甘油 (DMPG)、胆固醇和佐剂单磷酸脂质 A (MPLA) (均来自 Avanti Polar Lipids Inc. AL, 美国) (摩尔比分别为 9 : 1 : 7 : 0.2) 的搅拌溶液。然后通过 0.2um 疏水 PTFE 滤膜将产生的溶液滤入 250ml 玻璃圆底瓶中。然后通过 40°C 下在降低的压力下和然后在高真空下蒸发 3 小时来去除有机溶剂。通过加入 PBS (40ml) 并在 RT 下轻轻搅拌 18 小时来再水化产生的薄膜。然后在保存于 2-8°C 之前分装脂质体悬液 (批号 ACI-35-081103-A)。最终的肽 / 磷脂摩尔比为 1 : 100。

[0488] 8.1.3 免疫

[0489] 13 周龄 C57BL/6 小鼠（每组 10 只小鼠）按照表 11 在每次施用间隔 2 周的三个时机（d0、d14、d28）接受疫苗的皮下或腹膜内注射。在第一次免疫前 1 周（d-7）、然后在注射后 7 天（即 d7、d21、d35）和在处死时（d56）采集血液样品，并制备血清。通过 ELISA 测定 Tau393-408[pS396/pS404] 特异性 IgG 和 IgM 抗体效价及 IgG 同种型模式。通过 ELISA 测定了非 pTau393-408 特异性 IgG 抗体效价作为对照。

[0490] 表 11：小鼠免疫

[0491]

组	动物数目和性别	处理/ 体积 ^a	疫苗批次	方法	给药途径 ^b	剂量水平 Tau 肽的量 ug/剂量 ^c	MPLA 的量 ug/剂量 ^c
1	10 雌性	ACI-35 0.2 ml	ACI-35-08110 3-A	L3 ACI	腹膜内	10	16
2	10 雌性	ACI-35 0.2 ml	ACI-35-08110 3-A	L3 ACI	皮下	10	16
3	10 雌性	ACI-35 0.2 ml	ACI-35-08110 3-B	A ACI	腹膜内	13	19
4	10 雌性	ACI-35 0.2 ml	ACI-35-08110 3-B	A ACI	皮下	13	19

[0492] ^a:理论体积

[0493] ^b:s. c. :皮下

[0494] ^c:分析后测定的测量量

[0495] 8.1.4Tau 肽特异性抗体的定量

[0496] 通过 ELISA 在 5 个血浆采血样品中测定 Tau393-408[pS396/pS404] 特异性 IgG 抗体。通过 ELISA 在 d35 血浆采血样品中测定特异性 Tau393-408IgG 抗体、Tau393-408[pS396/pS404] 特异性 IgM 和 IgG 同种型抗体。用 10ug/ml 的对应的 Tau 肽在 4℃ 下过夜包被平板。用 PBS-0.05% Tween 20 洗涤各孔并用 PBS-0.05% Tween 20 中的 1% BSA 封闭后，将血浆的系列稀释液加至平板，并在 37℃ 下孵育 2 小时。洗涤后，用碱性磷酸酶（AP）缀合的抗 - 小鼠 IgG 抗体（Jackson Laboratories, Baltimore, PA, 美国）或同种型特异性抗体（购自 Pharmingen BD, San Diego, CA, USA 的辣根过氧化物酶（HRP）缀合的抗 - 小鼠 IgM、AP 缀合的抗 - 小鼠 IgG1、生物素缀合的抗 - 小鼠 IgG2a 和 IgG3，及来自 Zymed Laboratories, San Francisco, CA 的 HRP 缀合的抗 - 小鼠 IgG2b）在 37℃ 下孵育平板 2 小时。洗涤后，用 AP 的磷酸酶底物 pNPP（对 - 硝基 - 苯基 - 磷酸盐）或 HRP 的底物 ABTS（2,2'-连氨基 - 双（3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸））孵育平板，并用 ELISA 酶标仪在 405nm 下读数。对生物素缀合的抗体进行了补充步骤，其中在用 ABTS 检测前在链霉抗生物素蛋白 - HRP（R&D Systems, Minneapolis, MN, 美国）中孵育平板 45 分钟。对于 IgG，结果表示为第一稀释度和非饱和稀释度下的 O. D.（光密度），对于 IgG 同种型和 IgM，结果表示为

非饱和和 0. D. 下的 0. D. 。

[0497] 8. 1. 5 产生 Tau 肽特异性细胞因子的 T 细胞的 ELISPOT 定量

[0498] 通过 ELISPOT 评估了 Tau393-408[pS396/pS404] 和 Tau393-408 特异性 T 细胞的细胞因子产生。按照厂家的说明 (Pharmingen BD, San Diego, CA, 美国) 用抗 - 小鼠 IFN- γ 和 IL-4 单克隆抗体过夜包被 Multiscreen 96 孔硝酸纤维素板 (Millipore, Molsheim, 法国)。从免疫小鼠的脾制备单细胞悬液, 并在系列稀释度下与 Tau393-408[pS396/pS404] 和 Tau393-408(10 和 1 μ g/ml) 及 Concavalin A(5 μ g/ml, Amersham) 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下孵育 72 小时。然后洗涤平板, 并用生物素化抗 - 小鼠 IFN- γ 和 IL-4 单克隆抗体在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时。洗涤后, 用链霉抗生物素蛋白 -HRP 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育平板 1 小时, 洗涤后, 通过加入底物 (AEC, 3- 氨基 -9- 乙基呋唑) 来显色斑点。在立体显微镜下目测计数每孔的斑点数, 结果表示为斑点 /10⁶ 细胞。将首次用于实验的小鼠的脾用作阴性对照。

[0499] 8. 1. 6 非放射性细胞增殖测定

[0500] 从免疫小鼠的脾制备单细胞悬液, 并在系列稀释度下与 Tau393-408[pS396/pS404] 和 Tau393-408(10 和 1 μ g/ml) 及 Concavalin A(5 μ g/ml, Amersham) 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下孵育 72 小时。为了测量增殖, 按照厂家的说明使用了非放射性细胞增殖测定 (MTT) 试剂盒 (Promega, Dübendorf, 瑞士)。简言之, 将 15 μ l 染料溶液加至各孔, 并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育平板 4 小时。随后, 每孔加入 100 μ l 固定 / 终止溶液, 并在 4 $^{\circ}$ C 下孵育平板最少再 1 小时。在 570nm 和 690nm 波长下测量 0. D. 。

[0501] 8. 2. 结果

[0502] 8. 2. 1 不同疫苗诱导的抗体应答的评价

[0503] 独立于所使用的方法, 腹膜内或皮下注射后, ACI-35 疫苗诱导强健的抗 -pTau393-408[pS396/pS404] IgG 应答。一般而言, 第一次疫苗免疫后 7 天就已经存在强健的抗体效价。就接种方法 L3ACI 的动物的 d21 和 d35 (图 14, 双因素方差分析, $P < 0.001$ d21/d35) 及注射方法 AACI 的动物的 d21、d35 和 d56 (图 14, 双因素方差分析, $P < 0.001$ d21/d35, $P < 0.01$ d56) 而言, 对于相同的方法, 与腹膜内注射相比, 皮下注射具有更高的应答。就腹膜内注射的动物而言, 在早期采血的 d7 和 d21, 与 AACI Process 相比, L3ACI Process 的应答更高 (图 14, 双因素方差分析, $P < 0.001$ d7/d21), 而就皮下注射的动物而言不存在差异。概括而言, 在皮下注射它们时, 两种方法似乎是等同的。

[0504] 非饱和和 0. D. 稀释度下的结果的分析确认了不同 ACI-35 疫苗方法的腹膜内注射和皮下注射间的差异。概括而言, 结果保持不变, 显示皮下注射产生比腹膜内注射高的 Ab 效价, 且就皮下注射而言, 两种方法间不存在显著差异。

[0505] 为了测定疫苗诱导的抗体的同种型, 通过同种型特异性 IgG ELISA 分析了来自 d35 的血浆。ACI-35 在所有组中诱导了 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 同种型的抗 -pTau393-408[pS396/pS404] IgG。IgG2b 是优势同种型, 即使在 1/3200 的稀释度下也具有高 0. D. 。就 IgG1 亚类而言, 对于两种方法, 与腹膜内注射相比, 皮下注射具有更高的应答 (图 15, 单因素方差分析, $P < 0.05$)。针对 IgG3 亚类观察到了相同的差异。就 IgG2a 和 2b 亚类而言, 所测试的两种方法间不存在差异, 疫苗的腹膜内注射或皮下注射间也不存在差异。

[0506] 就抗 -pTau393-408[pS396/pS404] IgM 抗体而言, 所测试的两种方法间不存在差

异,而与皮下注射相比,腹膜内注射具有显著高的 IgM 效价(图 16a,单因素方差分析, $P < 0.001$)。

[0507] 还针对所有组分析了针对非磷酸化 Tau393-408 的抗体效价。针对所有组检测到了抗 -Tau393-408 特异性 IgG 抗体,但那些效价低于抗 -pTau393-408[pS396/pS404]。两种方法之间或注射方式之间不存在抗 -Tau393-408IgG 效价的差异。

[0508] 不同 Tau 肽的前 3 个 IgG 效价的平均值显示于表 12 中:

[0509] 表 12:前三个抗 -Tau393-408[pS396/S404] IgG 效价(1/100 稀释度下的 O. D.) 的平均值

[0510]	疫苗 pTau 肽	产生疫苗的方法	注射方式	d7	d21	d35	平均值
	Tau393-408 [pS396/pS404]	L3 ACI	腹膜内	1.899	2.284	1.825	2.003
			皮下	1.485	2.956	2.444	2.295
		A ACI	腹膜内	0.902	1.467	1.708	1.359
			皮下	1.276	2.964	2.426	2.222

[0511] 8.2. 2ACI-35 诱导的 T 细胞应答的评价

[0512] 用 ConA、pTau393-408[pS396/pS404] 或 Tau393-408 肽在体外再刺激脾细胞未导致测试组间的增殖差异(图 17),而它是 ConA 阳性。

[0513] 用 10ug/ml 的 Tau393-408[pS396/S404] 再刺激诱导了细胞因子分泌,与首次用于实验的小鼠相比,来自接种小鼠的脾细胞的细胞因子分泌更高(图 18)。皮下注射的方法 L3ACI 诱导所分析的两种细胞因子的更高的水平,IFN- γ 和 IL-4 之间无明显差异。方法 AACI 的腹膜内或皮下注射诱导主要为 IL-4 的细胞因子分泌,且腹膜内注射的水平更高。用 1ug/ml 的 Tau393-408[pS396/S404] 再刺激诱导了与用 10ug/ml 的 Tau393-408[pS396/S404] 再刺激相当的结果。

[0514] 用非 pTau939-408 肽再刺激诱导了与 pTau 肽对应物相当的结果(图 18)。同样,方法 AACI 的使用诱导主要为 IL-4 的细胞因子分泌。

[0515] 8.3 结论

[0516] 独立于所测试的方法或注射方式,一次免疫后 ACI-35 疫苗就已经诱导了强健的 IgG 效价。根据比较,疫苗的皮下注射独立于所使用的方法产生更高的 IgG 抗体效价。与其他组相比,ACI-35 方法 AACI 的腹膜内注射产生更低的 IgG1 和 IgG3 效价。ACI-35 的腹膜内注射产生显著高于皮下注射的 IgM 效价。最后,所有组都具有针对非 pTau393-408 肽的 IgG 效价。

[0517] 用 pTau 或 Tau 肽再刺激在 ELISPOT 研究中诱导细胞因子产生,对于接种方法 AACI 的小鼠,该细胞因子主要是 IL-4。

[0518] 实施例 9:tau 疫苗在 Tau P301L 转基因小鼠(TPLH)中的免疫原性

[0519] 此研究的目的是在 Tau P301L 转基因小鼠中用 tau 脂质体疫苗(ACI-33、ACI-35、

ACI-39 和 ACI-40) 的皮下 (s. c.) 注射分析抗 -Tau 接种的免疫原性。

[0520] 9. 1. 方法

[0521] 9. 1. 1Tau P301L 转基因小鼠 (TPLH)

[0522] 用具有 FVB/N 背景的纯合 Tau P301L 转基因小鼠 (TPLH) 来测试皮下 ACI-33 或 ACI-35 接种的功效。这些小鼠在小鼠 thy1 启动子的控制下表达具有 P301L 突变的最长人 tau 同种型。临床症状始于 6 至 7 月龄,衰老的 TPLH 小鼠发展伴有进行性神经损伤和神经原纤维缠结 (NFT) 形成的濒死 tau 病。在终末期,它们体重减轻,且它们中的大部分在 9 至 11 月龄,且无例外地在 12 月龄之前猝死 (可能由于呼吸问题 (窒息))

[0523] 9. 1. 2 疫苗 ACI-33 和 ACI-35 和制备

[0524] 按照实施例 3 中所述的方法 A 制备疫苗。

[0525] 然后在保存于 2-8°C 之前分装脂质体悬液 (批次 ACI-33-081031-A 和批次 ACI-35-081015-A+ACI-35-090402-A)。最终的肽 / 磷脂摩尔比为 1 : 100。

[0526] 9. 1. 3 免疫

[0527] ACI-33、ACI-39 和 ACI-40

[0528] 21 和 31 周龄之间的 TPLH 小鼠 (每组 8-10 只小鼠 :雌性 (♀) 和雄性 (♂) 的混合) 在 5 个时机接受疫苗的皮下注射 (表 14)。按照方案 1 每次施用之间间隔 2 周 (d0、d13、d28) 进行前三次免疫。然后每月一次强化动物 2 个月 (d91 和 d133)。在第一次免疫前 1 天 (d-1),然后在第二 (d27) 和第三 (d41) 次免疫后采集血液样品。还在强化之前、之间和之后 (d76、d104、d135) 进行了血液采集。通过使样品过夜凝固,然后在离心后取上清来制备血清。通过 ELISA 测定磷酸化 Tau 肽特异性 IgG 和 IgM 抗体效价及 IgG 同种型模式。还通过 ELISA 测定了非 pTau、全长 (441aa)Tau 蛋白和磷酸化全长 (441aa)Tau 蛋白的特异性 IgG 抗体效价。

[0529] ACI-35

[0530] 22 和 31 周龄之间的 TPLH 小鼠 (每组 8-10 只小鼠 :雌性 (♀) 和雄性 (♂) 的混合) 在 5 个时机接受疫苗的皮下注射 (表 13)。按照方案 1 每次施用之间间隔 2 周 (d0、d13、d27) 进行前三次免疫。然后每月一次强化动物 2 个月 (d91 和 d133)。在第一次免疫前 1 天 (d-1),然后在第二 (d26) 和第三 (d40) 次免疫后采集血液样品。还在强化之前、之间和之后 (d75、d103、d145、d155) 进行了血液采集。通过使样品过夜凝固,然后在离心后取上清来制备血清。通过 ELISA 测定 Tau393-408[pS396/pS404] 特异性 IgG 和 IgM 抗体效价及 IgG 同种型模式。还通过 ELISA 测定了非 pTau393-408、全长 (441aa)Tau 蛋白和磷酸化全长 (441aa)Tau 蛋白的特异性 IgG 抗体效价。

[0531] 表 13 :小鼠免疫

[0532]

组	动物数目 和性别	处理/ 体积 ^a	疫苗批次	给药途径 ^b	剂量水平 Tau 肽的量 ug/剂量 ^c	MPLA 的 量 ug/剂量 ^c
1	5 ♀	ACI-33	ACI-33-081031-A	皮下	9	12
	5 ♂	0.2 ml				
	5 ♀	PBS	N.A.	皮下	N.A.	N.A.
	3 ♂	0.2ml				
2	5 ♀	ACI-35	ACI-35-081015-A	皮下	16	23
	5 ♂	0.2 ml	ACI-35-090402-A		8	27
	5 ♀	PBS	N.A.	皮下	N.A.	N.A.
	5 ♂	0.2ml				
3	5 ♀	ACI-39	ACI-39-090202-A	皮下	9.6	28.8
	5 ♂	0.2 ml				
	5 ♀	PBS	N.A.	皮下	N.A.	N.A.
	3 ♂	0.2ml				
4	5 ♀	ACI-40	ACI-40-090202-A	皮下	12	24.4
	5 ♂	0.2 ml				
	5 ♀	PBS	N.A.	皮下	N.A.	N.A.
	3 ♂	0.2ml				

[0533] N. A. = 不适合

[0534] ^a:理论体积

[0535] ^b:s. c. :皮下

[0536] ^c:分析后测定的测量量

[0537] 9. 1. 4Tau 肽特异性抗体的定量

[0538] 对于 ACI-33、ACI-39 和 ACI-40 处理的小鼠,通过 ELISA 在 6 个血清采血样品中测定了分别针对 Tau5-20[pY18]、Tau206-221[pT212,pS214] 和 Tau196-211[pS202,pT205] 的特异性 IgG 抗体。在来自 d-1 和 d41 的血清中测定了 Tau5-20- 特异性 IgG、全长 (441aa) Tau 蛋白特异性 IgG 和磷酸化全长 (441aa) Tau 蛋白特异性 IgG。还通过 ELISA 在 d41 血清采血样品中测定了磷酸化 tau 肽特异性 IgM 和 IgG 同种型抗体。

[0539] 对于 ACI-35 处理的小鼠,通过 ELISA 在 7 个血清采血样品中测定了 Tau393-408[pS396/pS404] 的特异性 IgG 抗体。在来自 d-1 和 d40 的血清中测定了 Tau393-408- 特异性 IgG、全长 (441aa) Tau 蛋白特异性 IgG 和磷酸化全长 (441aa) Tau 蛋白特异性 IgG。还通过 ELISA 在 d40 血清采血样品中测定了 Tau393-408[pS396/pS404]- 特异性 IgM 和 IgG 同种型抗体。

[0540] 用 10ug/ml 的对应的 Tau 肽和 1ug/ml 的对应的 Tau 蛋白在 4℃ 下过夜包被平板。用 PBS-0.05% Tween 20 洗涤各孔并用 PBS-0.05% Tween 20 中的 1% BSA 封闭后,将血清的系列稀释液加至平板,并在 37℃ 下孵育 2 小时。洗涤后,用碱性磷酸酶 (AP) 缀合的抗 - 小鼠 IgG 总抗体 (Jackson Laboratories,Baltimore,PA,美国) 或同种型特异性抗体 (购自 Pharmingen BD San Diego,CA,USA 的辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的抗 - 小鼠 IgM、AP 缀合的抗 - 小鼠 IgG1、生物素缀合的抗 - 小鼠 IgG3;购自 Invitrogen CA,USA 的生物素缀合的抗 - 小鼠 IgG2a;和来自 Zymed Laboratories, San Francisco, CA 的 HRP 缀合的抗 - 小鼠 IgG2b) 在 37℃ 下孵育平板 2 小时。洗涤后,用 AP 的磷酸酶底物 pNPP (对 - 硝基 - 苯基 - 磷

酸盐)或HRP的底物ABTS(2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸))孵育平板,并用ELISA酶标仪在405nm下读数。对生物素缀合的抗体进行了补充步骤,其中在用ABTS检测前在链霉抗生物素蛋白-HRP(R&D Systems, Minneapolis, MN, 美国)中孵育平板45分钟。对于IgG、IgG同种型和IgM,结果表示为非饱和0.D.下的0.D.(光密度)。

[0541] 9.1.5 抗-Tau抗体与来自转基因动物的脑片上的Tau缠结的结合(TAUIR)

[0542] 通过TAUIR免疫组织化学进行了存在于接种ACI-33、ACI-35、ACI-39和ACI-40的动物的血清中的抗体与脑片上的缠结的结合。

[0543] 按照来自实施例5.1.5的流程进行TAUIR染色。

[0544] 9.1.6 Western印迹(WB)

[0545] 除洗涤是在检测前用Qdot 625链霉抗生物素蛋白缀合物溶液(Invitrogen, CA, 美国)在RT下进行30-60分钟外,按照来自实施例5.1.6的流程进行Western印迹。

[0546] 9.2. 结果

[0547] 9.2.1 IgG抗体应答

[0548] 所有疫苗构建体都产生了特异性IgG抗体效价。

[0549] 皮下注射后,ACI-33疫苗诱导特异性IgG应答。两次免疫(d27)后,IgG应答保持稳定,未随第三次免疫(d41)而增加(图19,单因素方差分析 $P < 0.001$ d-1对d27, $P > 0.05$ d27对d41)。在d76观察到了抗体效价的减少(图19,单因素方差分析 $P < 0.001$ d41对d76),动物的强化再次轻微增加了d104的效价。

[0550] 皮下注射后,ACI-35疫苗诱导抗-Tau393-408[pS396/pS404]IgG应答。两次免疫(d26)后,IgG应答未随第三次免疫(d40)而增加(图20,单因素方差分析 $P < 0.001$ d-1对d26和d40)。动物的强化再次增加了d103的效价(图20,单因素方差分析 $P < 0.05$ d-1对d104和 $P < 0.001$ d-1对d145)。

[0551] 皮下注射后,ACI-39疫苗诱导抗-Tau206-221[pT212, pS214]IgG应答。两次免疫(d27)后,IgG应答保持稳定,未随第三次免疫(d41)而增加(图21,单因素方差分析 $P < 0.001$ d-1对d27/d41)。在d76存在效价的降低,动物的强化使效价恢复至与三次免疫后相同的水平(图21,单因素方差分析 $P < 0.05$ d-1对d76和 $P > 0.05$ d41对d104)。

[0552] 非饱和0.D.稀释度下的结果的分析显示与饱和的1/100稀释度相同的结论(单因素方差分析 $P < 0.05$ d-1对d27/d41/d104和 $P > 0.05$ d-1对d76)。

[0553] 皮下注射后,ACI-40疫苗诱导抗-Tau196-211[pS202, pT205]IgG应答。两次免疫(d27)后,IgG应答保持稳定,未随第三次免疫(d41)而增加(图22,单因素方差分析 $P < 0.001$ d-1对d27, $P > 0.05$ d27对d41)。在d76观察到了抗体效价的减少(图22,单因素方差分析 $P < 0.001$ d41对d76),动物的强化再次轻微增加了d104的效价。

[0554] 非饱和0.D.稀释度下的结果的分析显示与饱和的1/100稀释度相同的结论(单因素方差分析 $P < 0.001$ d-1对d27, $P > 0.05$ d27对d41和 $P < 0.01$ d41对d76)。

[0555] 9.2.2 同种型分析

[0556] 三次皮下免疫后,ACI-33接种诱导了主要属于IgG2a和2b亚类的抗体效价(图23)。IgG1、IgG3和IgM水平低,且IgG2a/2b和IgG1/IgM的水平之间存在显著差异(图23,单因素方差分析 $P < 0.05$ IgG1对IgG2a/2b, $P < 0.001$ IgM对IgG2a/2b)。

[0557] 三次皮下免疫后,ACI-35接种诱导了主要属于IgG2a和2b亚类的抗体效价

(图 24)。IgG1 水平较低, IgG1 和 IgG2a 之间存在显著差异(图 24, 单因素方差分析 $P < 0.05$ IgG1 对 IgG2a)。IgG3 和 IgM 水平低, 且 IgG2a/2b 和 IgG3/IgM 的水平之间存在显著差异(图 24, 单因素方差分析 $P < 0.05$ IgG3/IgM 对 IgG2b, $P < 0.0001$ IgG3/IgM 对 IgG2a)。

[0558] 三次皮下免疫后, ACI-39 接种诱导了主要属于 IgG2a 和 2b 亚类的抗体效价(图 25)。IgG1、IgG3 和 IgM 水平显著低于 IgG2a/2b 效价(图 25, 单因素方差分析 $P < 0.05$ IgG2b 对 IgG1/IgG3, $P < 0.01$ IgG2a 对 IgG1/IgG3, $P < 0.001$ IgG2a/2b 对 IgM)。

[0559] 三次皮下免疫后, ACI-40 接种诱导了主要属于 IgG2b 亚类的抗体效价(图 26, 单因素方差分析 $P < 0.05$ IgG2b 对 IgG2a 和 $P < 0.001$ IgG2b 对 IgG1/IgG3/IgM)。IgG2a 效价也高于 IgM(图 26, 单因素方差分析 $P < 0.01$ IgG2a 对 IgM)。

[0560] 9.2.3 抗体特异性

[0561] 还在不同的 Tau 肽(pTau 肽和 Tau 肽)和蛋白质(抗-磷酸化全长(441aa)Tau 蛋白=抗-pTau 蛋白和抗-全长(441aa)Tau 蛋白=抗-Tau 蛋白)上分析了 tau 疫苗的三次皮下注射后诱导的 IgG 效价。

[0562] 在接种 ACI-33 的小鼠中, 用 d-1 采血作为对照, 且就各不同包被而言, 对于 Tau5-20[pY18] 和 Tau 蛋白包被, 在预先采集的血清和三次免疫后采集的血清之间存在差异(图 27, 对于 Tau5-20[pY18], 单因素方差分析 $P < 0.001$ d-1 对 d41; 对于 Tau 蛋白, 单因素方差分析 $P < 0.05$ d-1 对 d41)。

[0563] 在接种 ACI-35 的小鼠中, 用 d-1 采血作为对照, 且仅对于抗-Tau393-408[pS396/pS404] 效价, 在 d-1 和 d40 之间存在显著差异(图 28, 对于抗-Tau393-408[pS396/pS404] 效价, 单因素方差分析 $P < 0.0001$ d-1 对 d40)。在 Tau393-408[pS396/pS404] 肽上获得的 d40 抗体水平也显著不同于在所有其他包被上获得的水平(图 28, 单因素方差分析 $P < 0.0001$ d40 抗-Tau393-408[pS396/pS404] 对 d40 抗-Tau393-408/pTau 蛋白/Tau 蛋白)。

[0564] 在接种 ACI-39 的小鼠中, 用 d-1 采血作为对照, 且仅对于 Tau206-221[pT212, pS214] 包被, 在预先采集的血清和三次免疫后采集的血清之间存在差异(图 29, 对于 Tau206-221[pT212, pS214], 单因素方差分析 $P < 0.001$ d-1 对 d41)。

[0565] 在接种 ACI-40 的小鼠中, 用 d-1 采血作为对照, 且对于 Tau196-211[pS202, pT205] 和 Tau 196-211 包被, 在预先采集的血清和三次免疫后采集的血清之间存在差异(图 30, 对于 Tau196-211[pS202, pT205], 单因素方差分析 $P < 0.001$ d-1 对 d41; 对于 Tau196-211, 单因素方差分析 $P < 0.05$ d-1 对 d41)。

[0566] 将小鼠血清进一步用于 TAUPIR 实验来测定存在于血清中的抗-Tau 抗体是否可以识别来自 Tau 转基因动物的脑片中的缠结。

[0567] 还用小鼠血清或检测所有形式的 Tau(pTau 和 Tau) 的对照抗体 Tau-5 进行了来自不同小鼠的脑提取物上的 WB。

[0568] 数据总结在下文表 14 中。

[0569] 表 14: TPLH 接种小鼠上的 TAUPIR 和 WB 实验的总结

[0570]

疫苗	TAUPIR (阳性/ 总小鼠)	Western 印迹 (阳性/ 总小鼠)
ACI-33	6/10	3/9
ACI-35	4/10	0/4
ACI-39	7/10	1/5
ACI-40	10/10	3/7

[0571] 9.3 结论

[0572] 针对它们与不同 Tau 和 pTau 肽以及全长 pTau 或 Tau 蛋白的结合分析了抗 -tau 抗体效价。Tau 脂质体免疫产生了与 pTau 肽和磷酸化 tau 蛋白特异性结合,与非磷酸化肽和蛋白质具有较弱结合的 IgG 抗体。

[0573] 就 IgG 同种型而言,与 IgG2b 和 IgG3 相比,存在低 IgG1 抗体应答。观察到了低 IgM 应答,这与免疫方式(皮下)一致。

[0574] 在 TAUPIR 中测试了 tau 疫苗免疫的小鼠产生的抗体的特异性,且几乎所有小鼠血清都显示与存在于突变体 Tau 动物的脑片中的 Tau 缠结的高结合。

[0575] 实施例 10 :ACI-33 或 ACI-35 免疫后在 Tau P301L 转基因小鼠中的功效

[0576] 此研究的目的是在 Tau P301L 转基因小鼠中用 ACI-33(Tau5-20[pY18]) 或 ACI-35(Tau393-408[pS396/pS404]) 疫苗的皮下(s. c.)注射来分析抗 -Tau 免疫的功效。免疫小鼠五次,并通过在动物的寿命内进行的转棒分析来分析行为变化。

[0577] 10.1. 方法

[0578] 10.1.1 疫苗制备

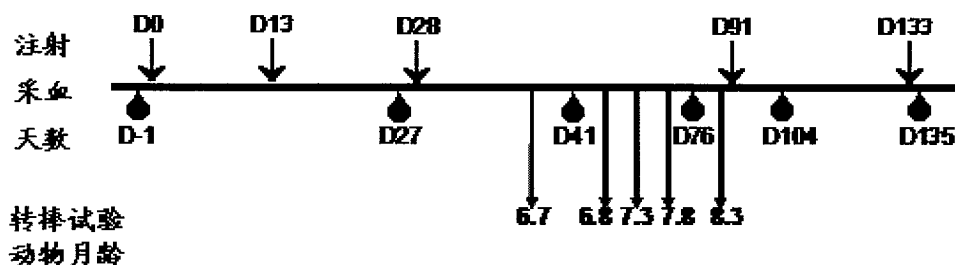
[0579] 按照来自实施例 3 的流程制备 ACI-33 和 ACI-35 疫苗。

[0580] 10.1.2 免疫

[0581] 按照实施例 9 中所述的流程用 ACI-33 或 ACI-35 免疫动物(方案 2 用于 ACI-33,方案 3 用于 ACI-35)。

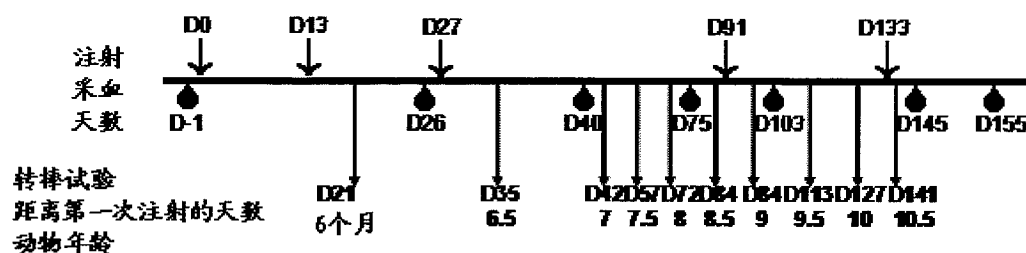
[0582] 方案 2 :用于 ACI-33 的免疫、采血和转棒试验的时间表 (P96)

[0583]



[0584] 方案 3 :用于 ACI-35 的免疫、采血和转棒试验的时间表 (P96)

[0585]



[0586] 10.1.3 行为 (转棒)

[0587] 为了观察动物的运动条件,进行了自动转棒测试。在用不透明分隔物分开的旋转式转棒 (直径 3cm) 上同时测试 5 只小鼠。测试过程中,棒在 5 分钟内从 4 转 / 分钟加速至 40 转 / 分钟。记录每只小鼠在转棒上停留的时间,最大值为 5 分钟。

[0588] 10.2. 结果

[0589] 为了评价 ACI-33 或 PBS 处理后 TPLH 的运动条件,在 5 个不同时机对小鼠进行了转棒测试 (图 31)。在 7.3 月龄观察到了注射 ACI-33 和 PBS 的动物间的显著差异 (图 31, 双因素方差分析 $P < 0.001$ 7.3 月龄)。ACI-33 对小鼠运动行为的此影响与 7.8 月龄时小鼠血清中的抗 -Tau5-20[pY18] 抗体效价相关 (图 32, Spearman r $P < 0.001$)。

[0590] 为了评价 ACI-35 或 PBS 处理后 TPLH 的运动条件,对小鼠进行了转棒测试 (图 33)。虽然治疗组和对照组之间不存在显著差异,但可以在小鼠 9.5 月龄时进行的转棒试验中观察到 ACI-35 功效的趋势 (图 33, Mann-Whitney 检验 $P = 0.1905$ 9.5 月龄)。

[0591] 10.3 结论

[0592] 与注射 PBS 的动物相对, TPLH 小鼠中的 ACI-33 接种显示对小鼠在转棒试验期间的运动缺陷的有益作用。此阳性结果与小鼠血清中的抗 -Tau 抗体效价相关。

[0593] 与注射 PBS 的动物相对, TPLH 小鼠中的 ACI-35 接种显示对小鼠在 9.5 月龄的转棒试验期间的运动缺陷的功效的趋势。

[0594] 实施例 11: 雌性裸鼠中的抗 -pTau 抗体应答

[0595] 此研究的目的是在雌性裸鼠中评价 ACI-33 (Tau5-20[pY18]) 疫苗的注射诱导的抗 -pTau 抗体应答。裸鼠携带 Foxn1tm 突变, 由于缺乏正确执行功能的胸腺而具有减少的 T 细胞功能。因此, 此研究的目的是分析 ACI-33 诱导的抗体应答是否独立于 T 细胞。

[0596] 皮下 (s.c.) 注射 11 或 13 周龄的具有 C57BL/6 背景的裸鼠和对应的野生型同窝仔。按两周的间隔免疫小鼠三次, 并在每次免疫后一周采血。通过 ELISA 测量总抗 -pTau (Tau5-20[pY18]) 肽 IgG 应答。此外, 三次免疫后分析了抗体应答的同种型模式来评价 IgG 的不同亚类以及 IgM 的分布。还分析了针对对应的非 pTau (Tau5-20)、全长 (441aa) Tau 蛋白和磷酸化全长 (441aa) Tau 蛋白的抗体效价。

[0597] 为了验证辅助 T 细胞在裸鼠中的缺乏, 通过荧光激活细胞分选仪 (FACS) 评价了 CD3⁺/CD4⁺ 细胞的百分比。

[0598] 11.1 方法

[0599] 11.1.1 疫苗 ACI-33 的制备

[0600] 按照实施例 3 制备 ACI-33 疫苗。

[0601] 然后在保存于 2-8°C 前分装脂质体悬液 (批次 ACI-33-090818-A)。最终的肽 / 磷脂摩尔比为 1 : 100。将疫苗运送至 JSW Life Sciences GmbH (奥地利)。

[0602] 11.1.2 免疫

[0603] 在 JSW Life Sciences GmbH, 具有 C57BL/6 背景的裸鼠 (B6. Cg-Foxn1nu/J) 和对应的野生型同窝仔 (6 ♀ 小鼠 / 组) 按照表 15 每次施用之间间隔两周在三个时机 (d0, d14, d28) 接受 ACI-33 的皮下注射。第一次注射前 7 天及第一次注射后 2、4、7、21、35 和 56 天采集来自面静脉 / 动脉的血浆样品。通过 ELISA 测定 Tau5-20[pY18] 特异性 IgG 和 IgM 抗体效价及 IgG 同种型模式。还通过 ELISA 测定了非 pTau5-20、全长 (441aa) Tau 蛋白和磷酸化全长 (441aa) Tau 蛋白的特异性 IgG 抗体效价。还在 d-7 采集了血液样品进行 FACS 分析来测定 CD3+/CD4+ 细胞的百分比。

[0604] 11. 1. 3Tau 肽特异性抗体的定量

[0605] 通过 ELISA 在 5 个血清采血样品 (d2、d7、d21、d35 和 d56) 中测量了 Tau5-20[pY18] 的特异性 IgG 抗体。在来自 d35 的血清中测定了 Tau5-20-特异性 IgG、全长 (441aa) Tau 蛋白特异性 IgG 和磷酸化全长 (441aa) Tau 蛋白特异性 IgG。通过 ELISA 在 d35 血清采血样品中测定了 Tau5-20[pY18] 特异性 IgM 和 IgG 同种型抗体。用 10ug/ml 的对应的 Tau 肽和 1ug/ml 的对应的 Tau 蛋白在 4℃ 下过夜包被平板。用 PBS-0.05% Tween 20 洗涤各孔并用 PBS-0.05% Tween 20 中的 1% BSA 封闭后, 将血清的系列稀释液加至平板, 并在 37℃ 下孵育 2 小时。洗涤后, 用碱性磷酸酶 (AP) 缀合的抗小鼠 IgG 总抗体 (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, 美国) 或同种型特异性抗体 (购自 Pharmingen BD San Diego, CA, USA 的辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的抗小鼠 IgM、AP 缀合的抗 - 小鼠 IgG1、生物素缀合的抗 - 小鼠 IgG3; 购自 Invitrogen CA, USA 的生物素缀合的抗 - 小鼠 IgG2a; 和来自 Zymed Laboratories, San Francisco, CA 的 HRP 缀合的抗 - 小鼠 IgG2b) 在 37℃ 下孵育平板 2 小时。洗涤后, 用 AP 的磷酸酶底物 pNPP (对 - 硝基 - 苯基 - 磷酸盐) 或 HRP 的底物 ABTS (2,2'-连氨基 - 双 (3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸)) 孵育平板, 并用 ELISA 酶标仪在 405nm 下读数。对生物素缀合的抗体进行了补充步骤, 其中在用 ABTS 检测前在链霉抗生物素蛋白 - HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, 美国) 中孵育平板 45 分钟。对于 IgG、IgG 同种型和 IgM, 结果表示为非饱和 O.D. 下的 O.D. (光密度)。

[0606] 11. 1. 4CD3+/CD4+ 细胞定量

[0607] 用氯化铵裂解小鼠血液样品直至澄清, 然后 400×g 离心 7 分钟, 并将沉淀重悬在含有 EDTA 的 PBS 中。然后用 CD16/CD32 封闭试剂封闭细胞, 并用 CD4 (PE 缀合物) 和 CD3 (PE-Cy5) 抗体在 4℃ 下染色 30 分钟。用 PBS 洗涤样品, 重悬在固定剂溶液 (1 : 40 稀释在 BD FACS Flow 中的 DBCellfix) 中, 并在 BD FACS Calibur 细胞计数器上获得。评价了 CD3+ 和 CD4+ (辅助 T 细胞) 染色阳性的门控细胞的百分比。

[0608] 表 15 : 小鼠免疫

[0609]

组	动物数目和性别	处理/体积 ^a	疫苗批次	方法	给药途径 ^b	剂量水平 T1 的量 ug/剂量 ^c	MPLA 的量 ug/剂量 ^c
1	6 ♀ 裸鼠	ACI-33 0.2 ml	ACI-33-090818-A	ACI-A	皮下	12.6	15.8
2	6 ♀ 裸鼠	ACI-33 0.2ml	ACI-33-090818-A	ACI-A	皮下	12.6	15.8

[0610] ^a:理论体积

[0611] ^b:s. c. :皮下

[0612] ^c:分析后测定的测量量

[0613] 11.2 结果

[0614] 11.2.1 一般观察

[0615] 无动物夭折,且未报告处理引起的副作用。对于所有 B6. Cg-Foxn1nu/J 动物,存在典型的裸鼠表型,而野生型 (wt) 同窝仔具有正常毛皮。

[0616] 11.2.2CD3+/CD4+ 细胞定量

[0617] CD3+/CD4+ 染色后进行 FACS 分析揭示了与 wt 动物相比,裸鼠中辅助 T 细胞计数 (CD3+/CD4+ 细胞) 的显著减少 (图 34)。

[0618] 11.2.3 免疫应答分析

[0619] 分析了 ACI-33 接种产生的抗 -Tau5-20[pY18]IgG 效价来研究疫苗在 wt 小鼠和裸鼠中的免疫原性。分析了裸鼠的抗 -Tau5-20[pY18]IgG 效价来研究 ACI-33 诱导的应答是否独立于 T 细胞功能。疫苗在裸鼠中诱导了抗 -Tau5-20[pY18]IgG 应答,且在所测试的所有时间点,ACI-33 在 wt 小鼠或裸鼠中诱导的抗体应答之间不存在显著差异 (图 35,对于所有采血,裸鼠和 wt 小鼠之间的双因素方差分析 $P < 0.05$)。

[0620] 皮下注射后,ACI-33 疫苗在两种小鼠类型中都诱导抗 -Tau5-20[pY18]IgG 应答,其在两次免疫 (d27) 后达到峰值 (图 35)。

[0621] ACI-33 接种诱导就不同 IgG 亚类和 IgM 而言在裸鼠和 wt 小鼠间相同谱的抗体效价,因为疫苗的三次皮下免疫后两种小鼠类型之间不存在显著差异 (图 36,单因素方差分析 $P > 0.05$ IgG1 裸鼠对 IgG1wt, IgG2a/2b 裸鼠对 IgG2a/2b wt, IgG3 裸鼠对 IgG3wt, IgM 裸鼠对 IgM wt)。两个小鼠类型中都存在显著低于 IgG2b 和 IgM 的 IgG1 水平 (图 36,单因素方差分析,裸鼠 : $P < 0.01$ IgG1 对 IgG2b 或 IgM ;Wt 小鼠 : $P < 0.05$ IgG1 对 IgG2b 或 IgM)。此外,裸鼠显示显著低于 IgG3 的 IgG1 水平 (图 36,单因素方差分析,裸鼠 : $P < 0.05$ IgG1 对 IgG3),且 IgG2a 的水平也低于 IgG2b、IgG3 和 IgM (图 36,单因素方差分析,裸鼠 : $P < 0.05$ IgG2a 对 IgG2b、IgG3 或 IgM)。

[0622] 还在不同 Tau 肽 (抗 -Tau5-20[pY18] 和抗 -Tau5-20) 和蛋白质 (抗 -磷酸化全长 (441aa) Tau 蛋白=抗 -pTau 蛋白和抗 -全长 (441aa) Tau 蛋白=抗 -Tau 蛋白) 上分析了 ACI-33 的三次皮下注射后诱导的 IgG 效价。wt 小鼠和裸鼠之间不存在不同肽和蛋白质上的效价的差异。在裸鼠组中,存在抗 -Tau5-20[pY18] 效价高于抗 -Tau5-20 效价的显著差异 (图 37,单因素方差分析, $P < 0.05$ 抗 -Tau5-20[pY18] 效价对抗 -Tau5-20 效价)。

[0623] 11.3 结论

[0624] 虽然裸鼠中小百分比的 CD3⁺ 和 CD4⁺ 细胞, 但 ACI-33 疫苗诱导了强健的抗 -Tau5-20[pY18]IgG 应答。抗体应答的持久性和 IgG 同种型分布在 wt 小鼠和裸鼠中相似, 暗示在 ACI-33 接种的背景中, 这些参数独立于 T 细胞。与免疫感受态小鼠相比, ACI-33 免疫在 T 细胞缺乏的小鼠中以相似的 IgG 谱诱导相同的抗体效价和动态。此外, 不同 Tau 肽和蛋白质上的抗体效价在免疫感受态小鼠和 T 细胞缺乏的小鼠之间相似。这些数据表明, ACI-33 在裸鼠和 wt 小鼠中都诱导独立于 T 细胞的抗体应答。

[0625] 参考文献列表

- [0626] Alving 等, (1992) *Infect. Immun.* 60 :2438-2444
- [0627] Asuni 等, (2007) *J Neurosc.* 27 (34), 9115-29
- [0628] Hodgson 等, (1991) *Bio/Technology*, 9 :421
- [0629] Khaw, B. A. 等, (1982) *J. Nucl. Med.* 23 :1011-1019
- [0630] Lewis 等, (2000) *Nature Genetics*, 25 :402-405
- [0631] Masliah 等, (2005) *Neuron*, 46 (6), 857-68
- [0632] Muhs 等, (2007) *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (23), 9810-5
- [0633] Muyllaert 等, (2006) *Rev Neurol*, 162 (10), 903-907
- [0634] Muyllaert 等, (2008) *Genes Brain Behav.*, Suppl. 1, 57-66
- [0635] Nicolau 等, (2002) *Proc Natl. Acad. Sci USA* 99, 2332-2337
- [0636] Nicoll 等, (2003) *Nature Med*, 9, 448-452
- [0637] Oddo 等, (2004) *Neuron*, 43, 321-332
- [0638] Queen 等, (1989) *Proc. Natl Acad Sci USA*, 86 :10029-10032
- [0639] Ribe 等, (2005) *Neurobiol Dis*, 20 (3), 814-22
- [0640] Roberson 等, (2007) *Science*, 316 (5825), 750-4
- [0641] Rosenmann 等, (2006) *Arch Neurol*, 63 (10), 1459-67
- [0642] Rousseaux 等, *Methods Enzymology*, (1986), Academic Press 121 :663-69
- [0643] Terwel 等, (2006) *J Biol Chem*, 280, 3963-3973
- [0644] Terwel 等, (2008) *Am J pathol.*, 172 (3), 786-98
- [0645] Urushitani 等, (2007) *Proc. Natl Acad Sci USA*, 104 (79), 2495-500
- [0646] Wagner 等, (2002) *Journal of Liposome Research Vol 12* (3), pp 259-270
- [0647] 保藏:

[0648] 在布达佩斯条约的规定下, 以 AC IMMUNE S.A. 的名义将以下杂交瘤细胞系保藏于因韦伦街 7B, D-28124 布劳恩斯切魏格 (Braunschweig, Inhoffenstr. 7B, D-28124 Braunschweig) 的德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ):

[0649]

杂交瘤名称	检索号	保藏日期
ACI-41-Ab1	DSM ACC3043	2010 年 3 月 3 日

2B6	DSM ACC3044	2010 年 3 月 10 日
3A8	DSM ACC3045	2010 年 3 月 10 日
4C1	DSM ACC3046	2010 年 3 月 10 日
5D10A3	DSM ACC3047	2010 年 3 月 10 日
6C10	DSM ACC3048	2010 年 3 月 10 日
6H1	DSM ACC3049	2010 年 3 月 10 日
7C2	DSM ACC3050	2010 年 3 月 10 日

[0001]

序 列 表

<110> AC免疫有限公司 (AC Immune SA)
鲁汶大学研究和开发中心 (K.U. Leuven Research & Development)

<120> 药物组合物

<130> P2654 PCT BS

<150> 09157303.0

<151> 2009-04-03

<160> 9

<170> PatentIn 版本 3.4

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> 人 (Homo Sapiens)

<220>

<221> 变体

<222> (18).. (18)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (26).. (26)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 1

Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
1 5 10 15

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
20 25 30

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (14).. (14)

<223> /取代="磷酸化的酪氨酸"

<400> 2

[0002]

Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu
1 5 10 15

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (7).. (7)

<223> /取代="磷酸化的苏氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (9).. (9)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 3

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (7).. (7)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (10).. (10)

<223> /取代="磷酸化的苏氨酸"

<400> 4

Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg
1 5 10 15

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (4).. (4)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

[0003]

<220>
<221> 变体
<222> (12).. (12)
<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 5

Val	Tyr	Lys	Ser	Pro	Val	Val	Ser	Gly	Asp	Thr	Ser	Pro	Arg	His	Leu
1				5					10					15	

<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 变体
<222> (4).. (4)
<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<220>
<221> 变体
<222> (9).. (9)
<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 6

Gly	Asp	Thr	Ser	Pro	Arg	His	Leu	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Gly	Ser
1				5				10						15	

Ile Asp

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 变体
<222> (3).. (3)
<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<220>
<221> 变体
<222> (6).. (6)
<223> /取代="磷酸化的苏氨酸"

<220>
<221> 变体
<222> (13).. (13)

[0004]

<223> /取代="磷酸化的苏氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (15).. (15)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 7

Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu
1 5 10 15

Pro

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (3).. (3)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 8

His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp
1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (6).. (6)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 9

Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
1 5 10

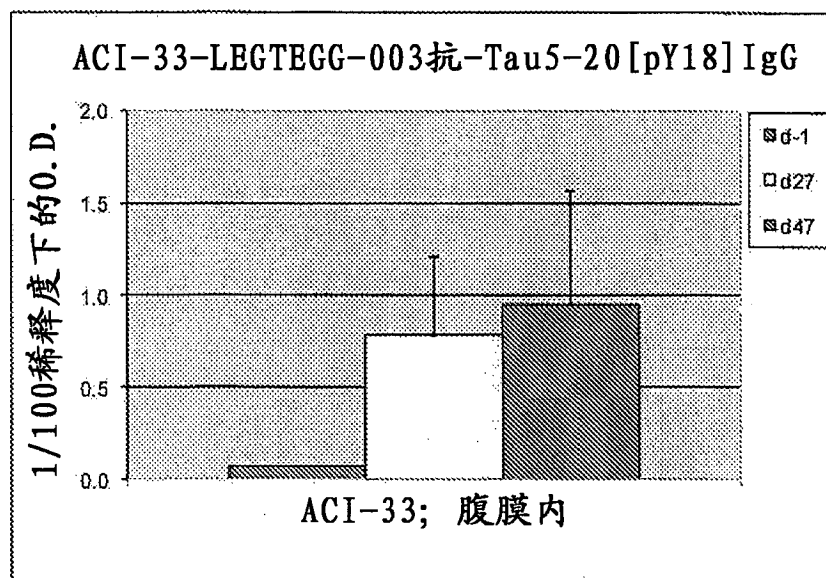


图 1a

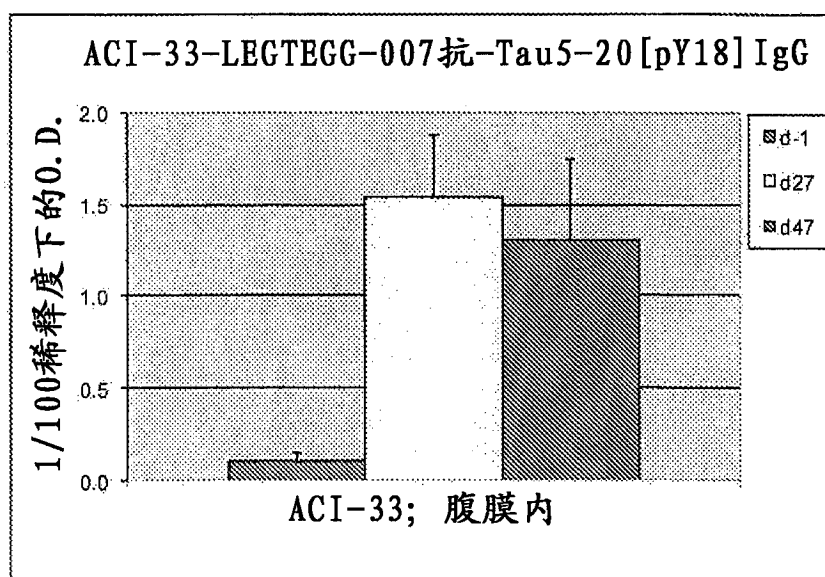


图 1b

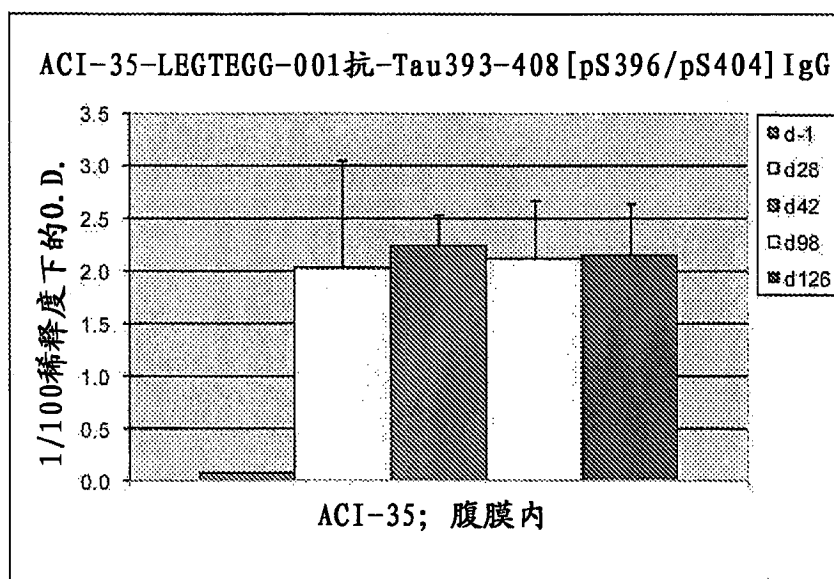


图 2a

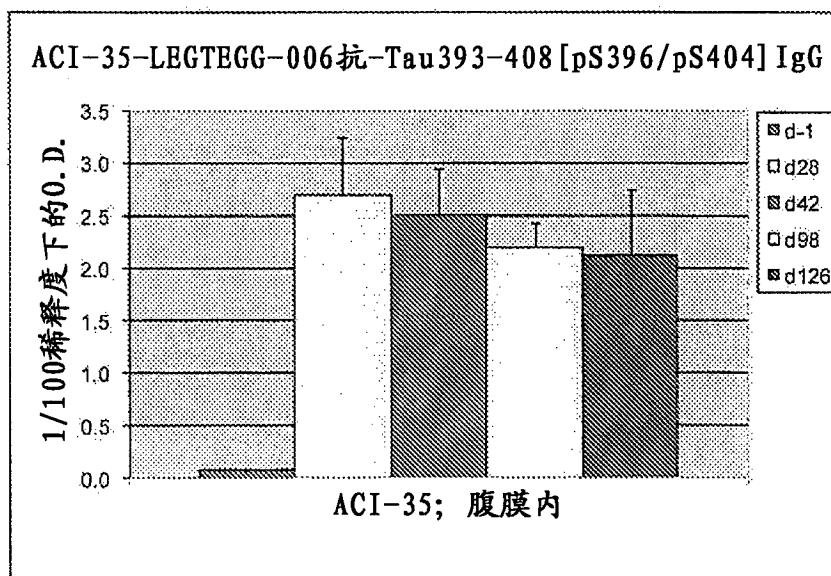


图 2b

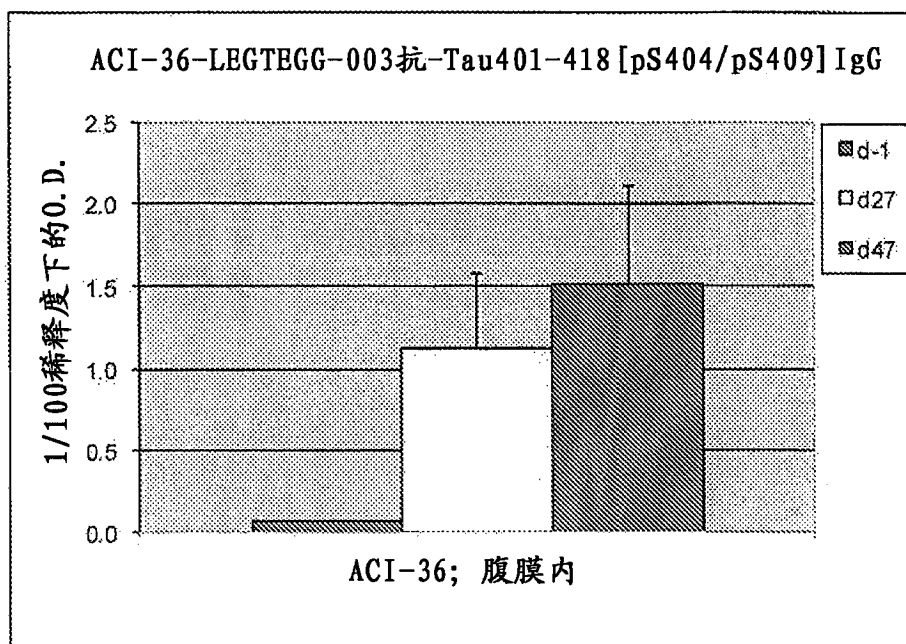


图 3a

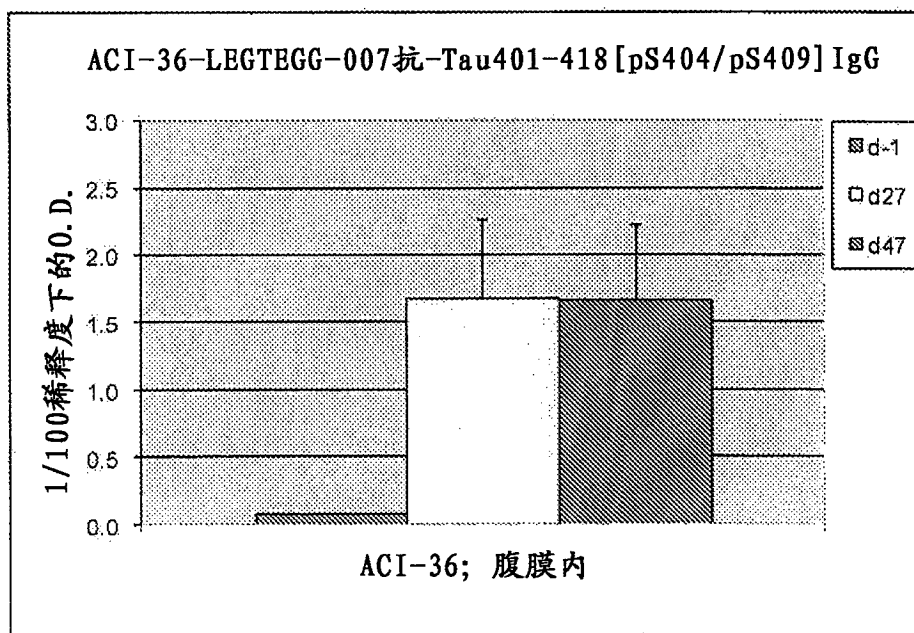


图 3b

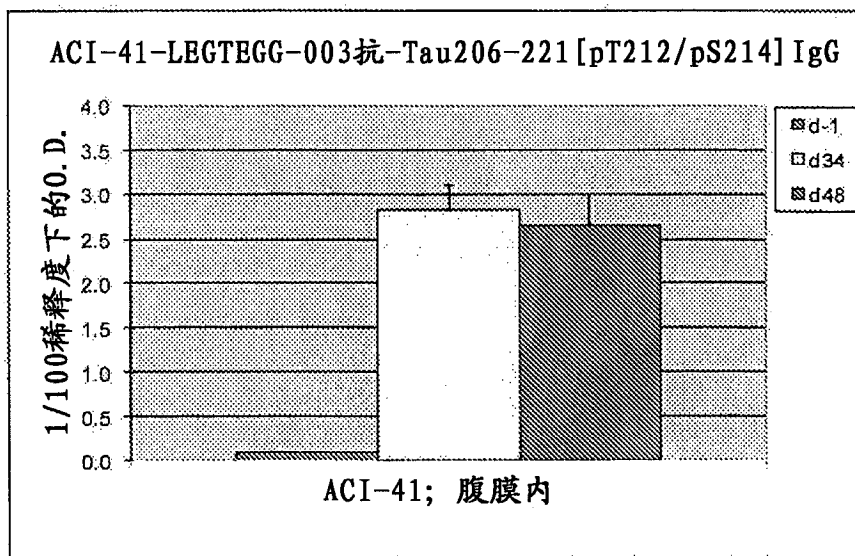


图 4a

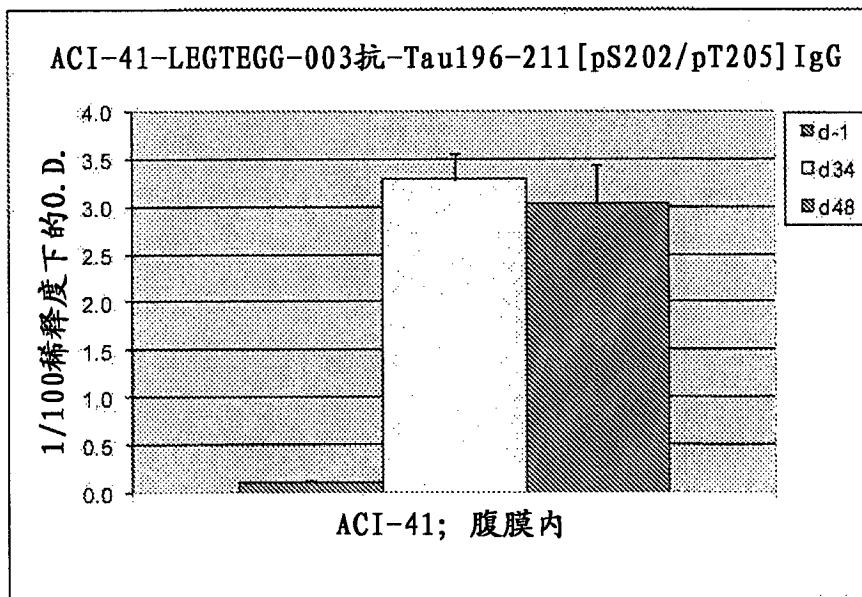


图 4b

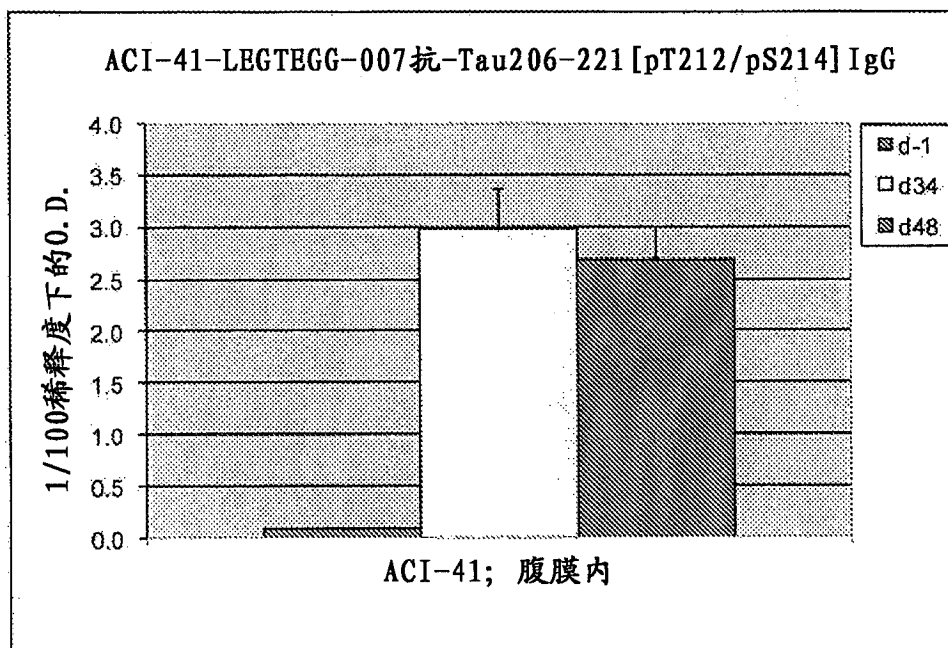


图 4c

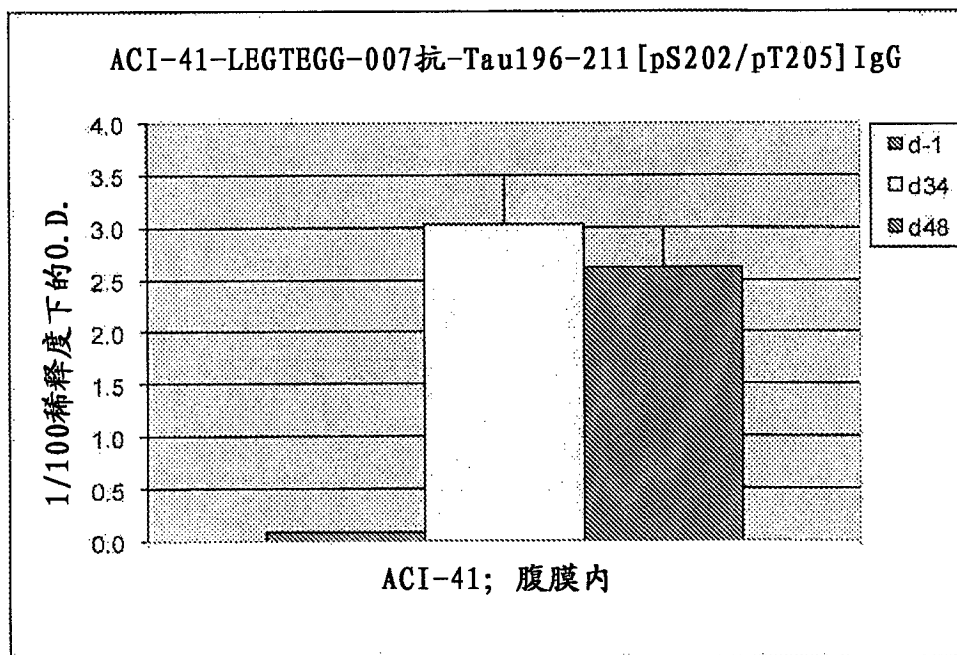


图 4d

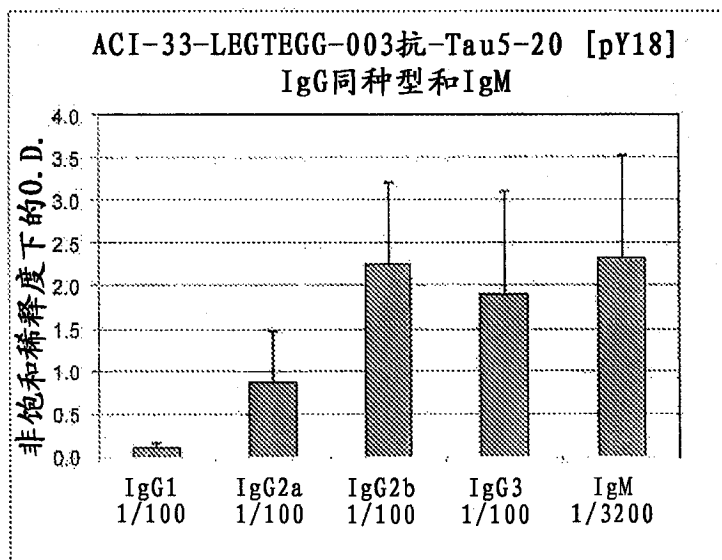


图 5a

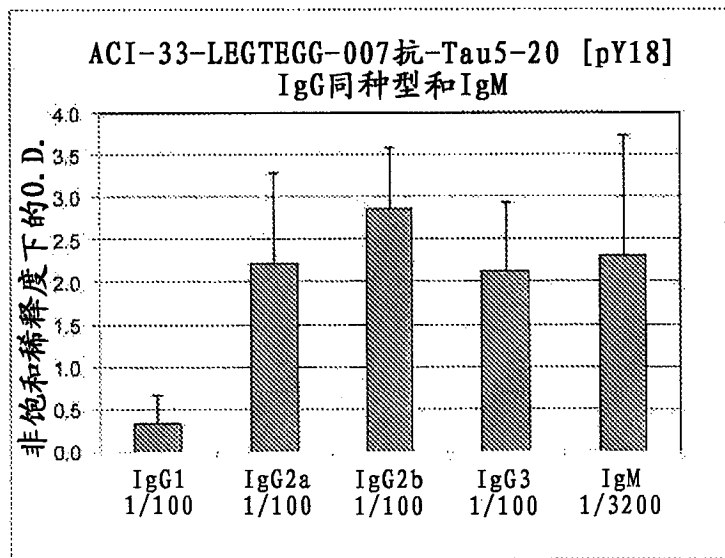


图 5b

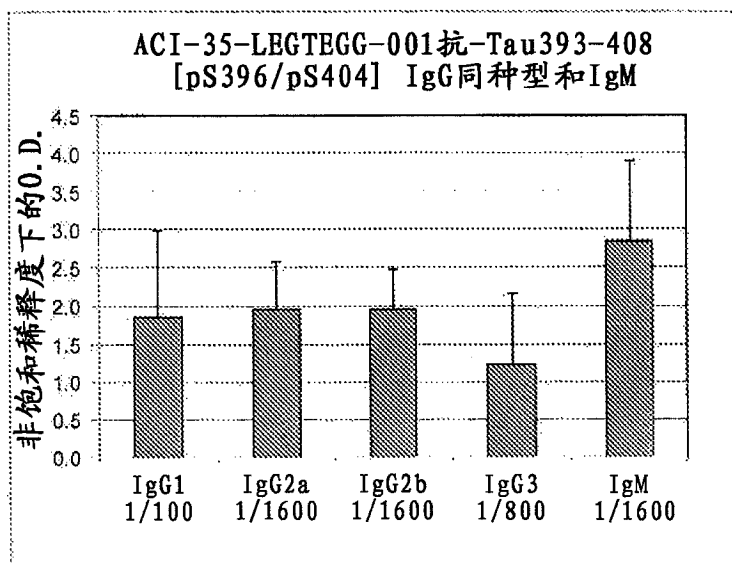


图 6a

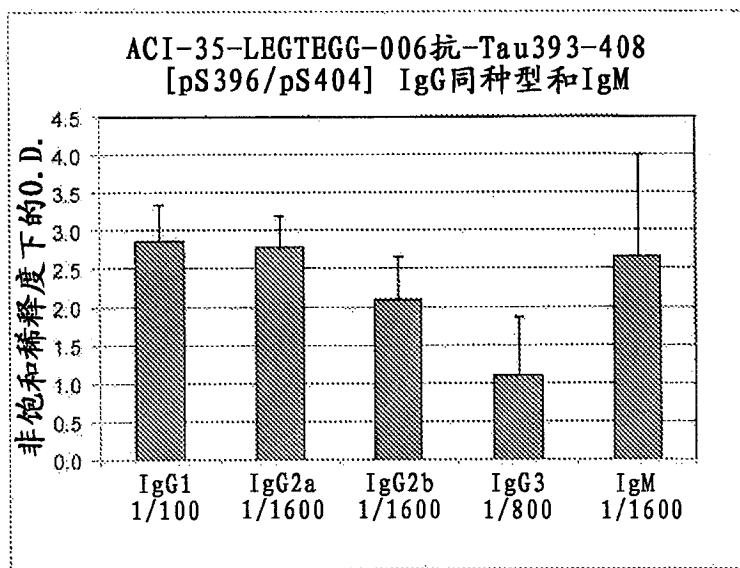


图 6b

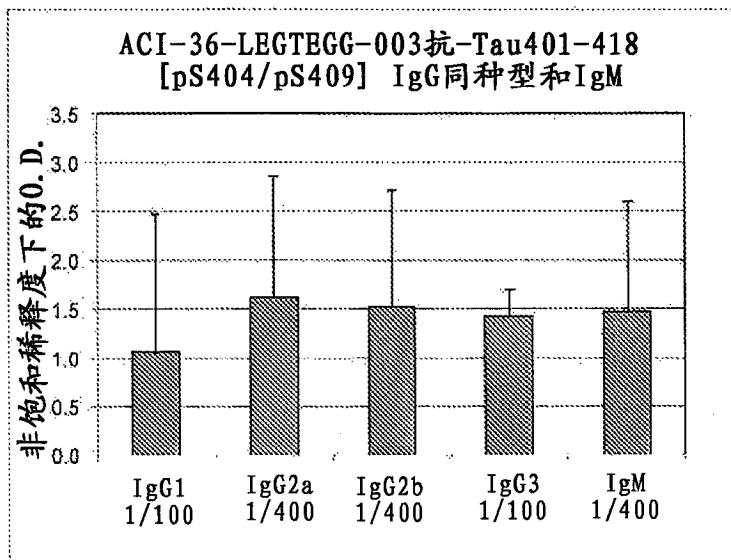


图 7a

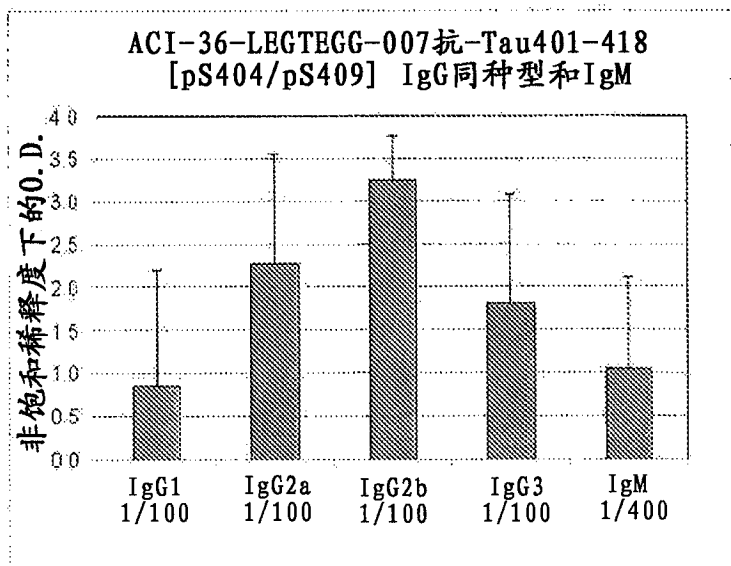


图 7b

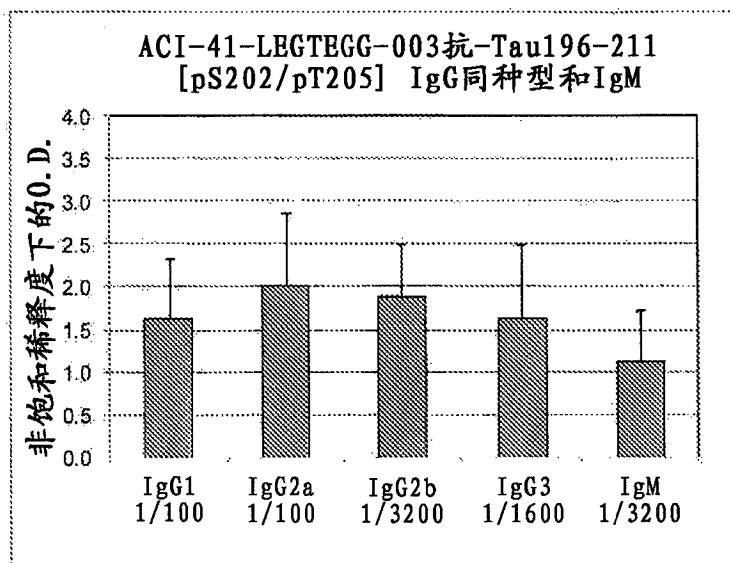


图 8a

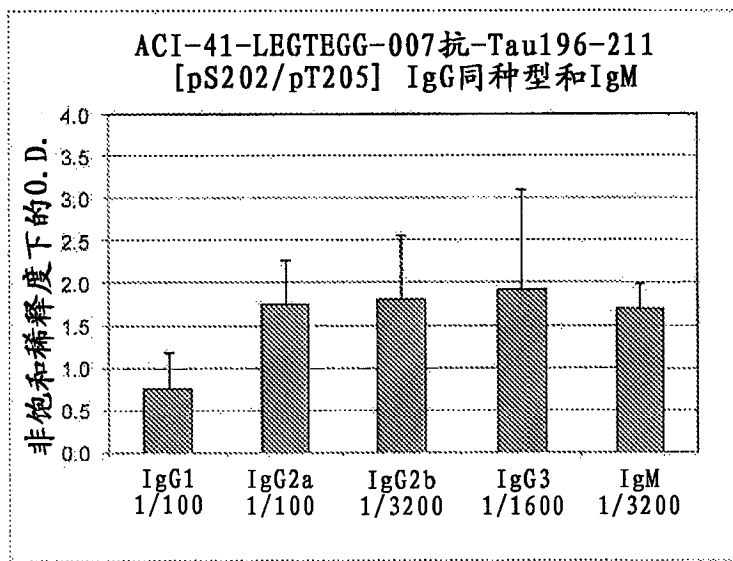


图 8b

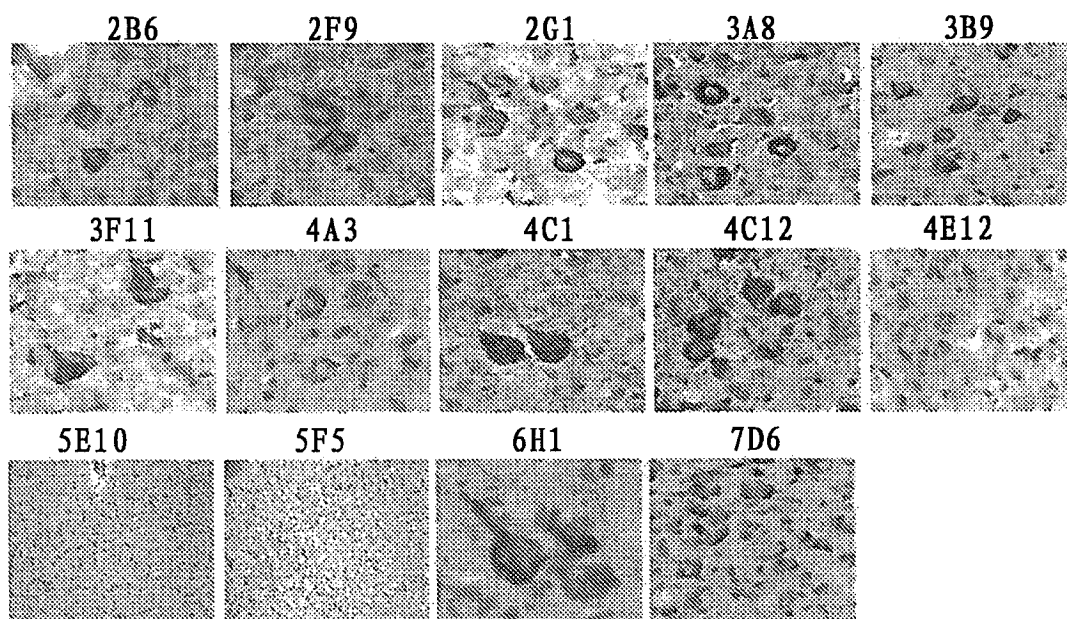


图 9a

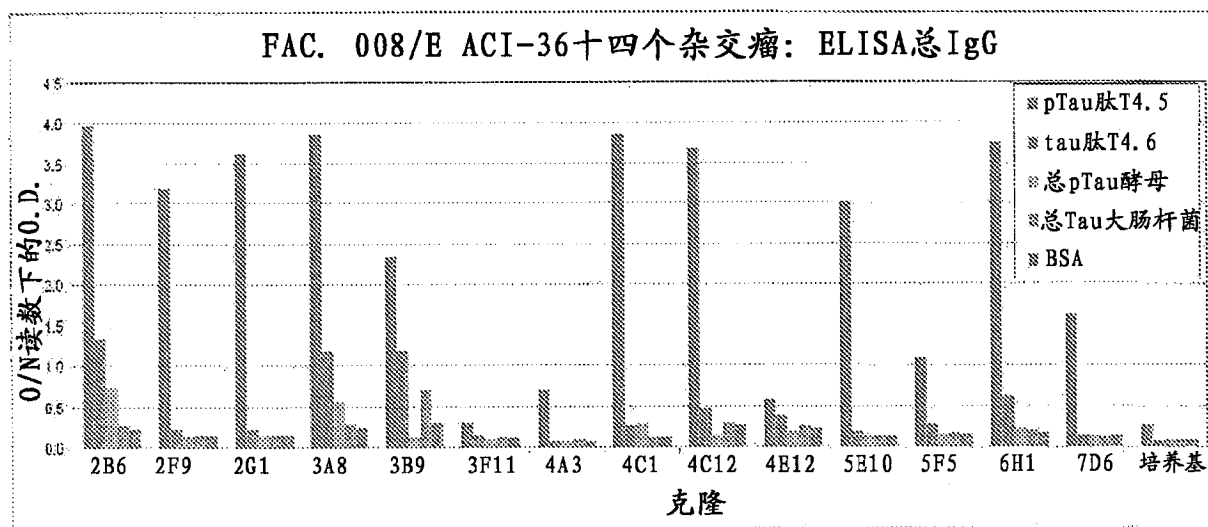


图 9b

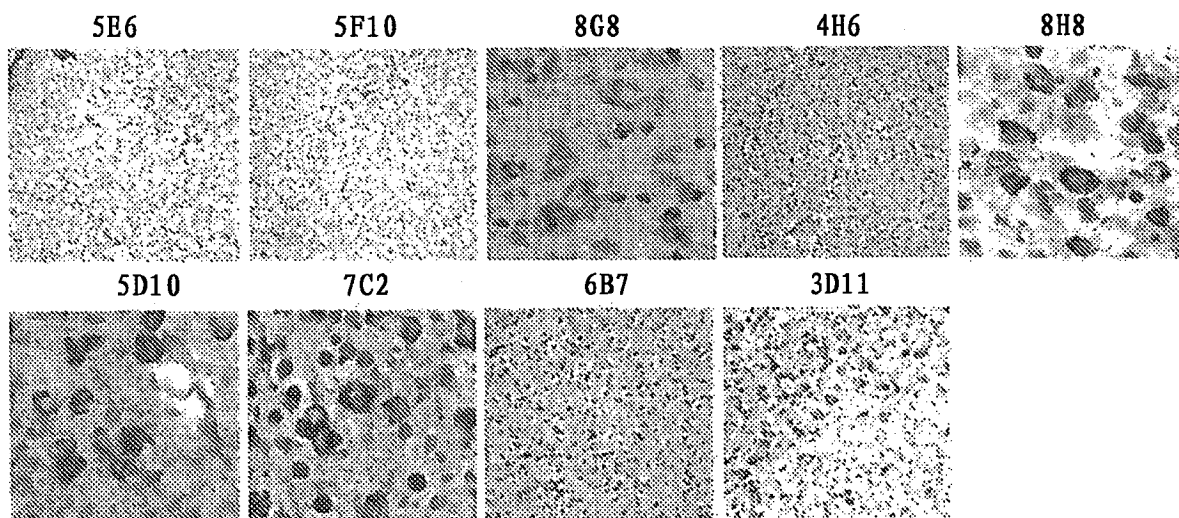


图 10a

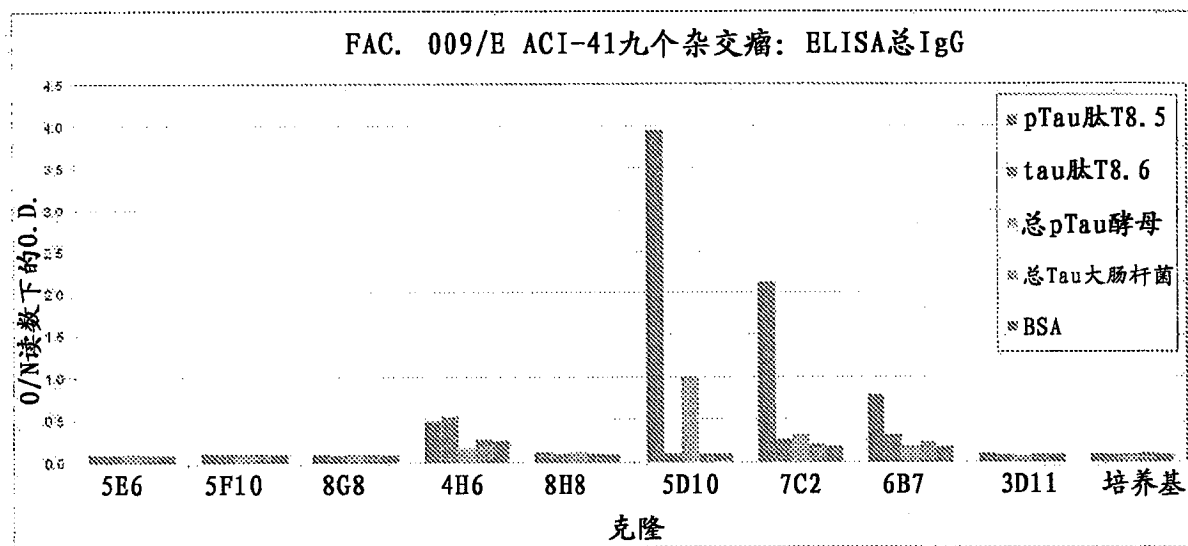


图 10b

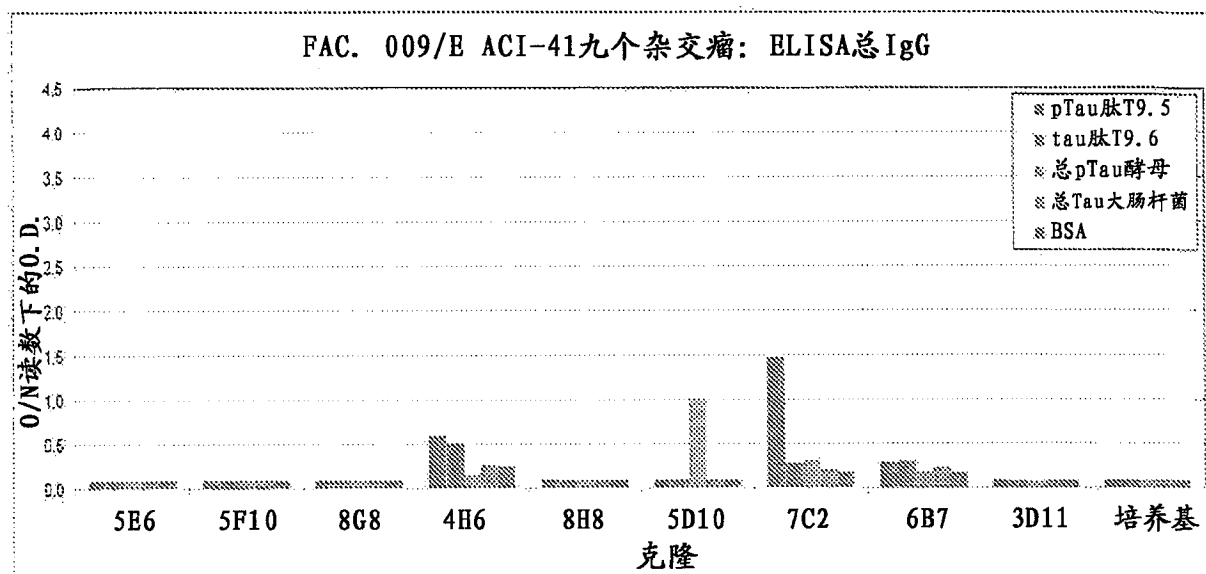


图 10c

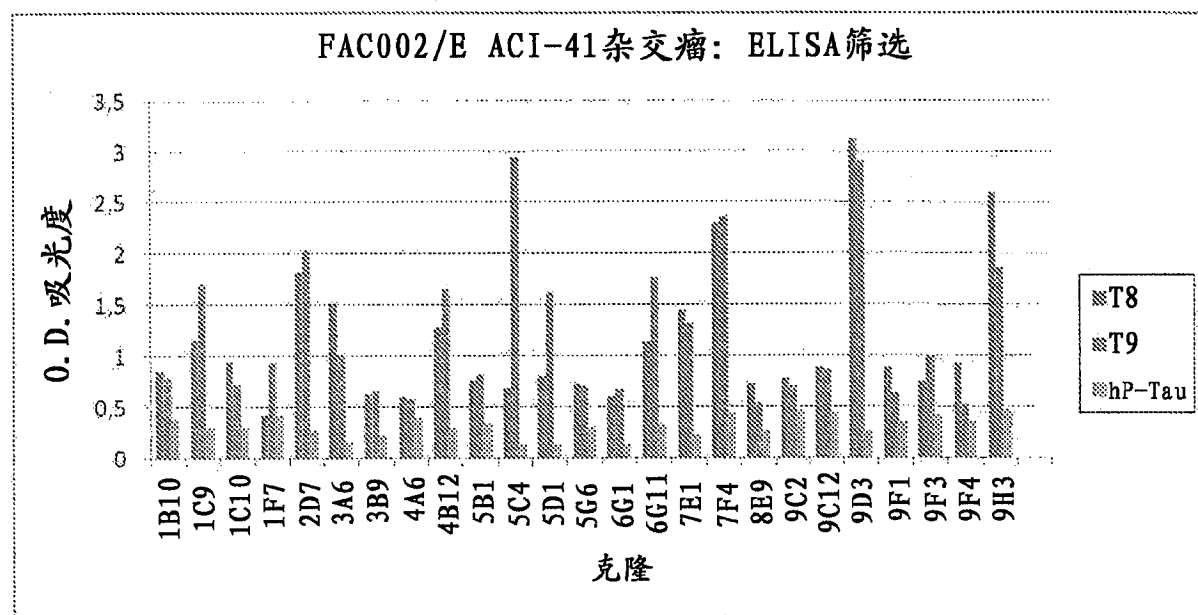
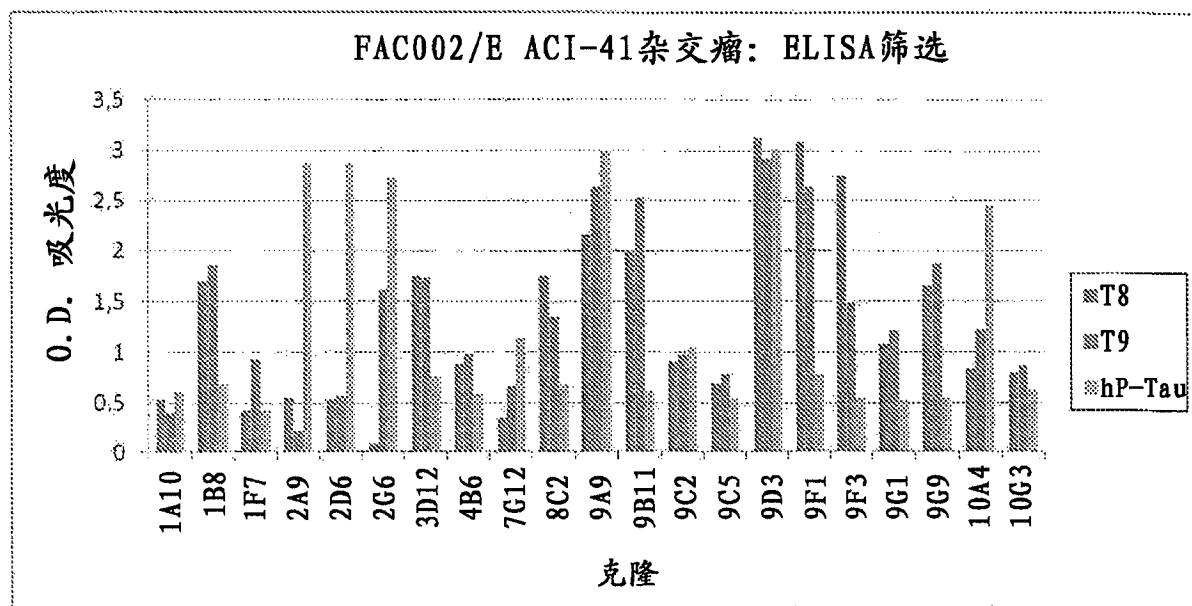


图 11

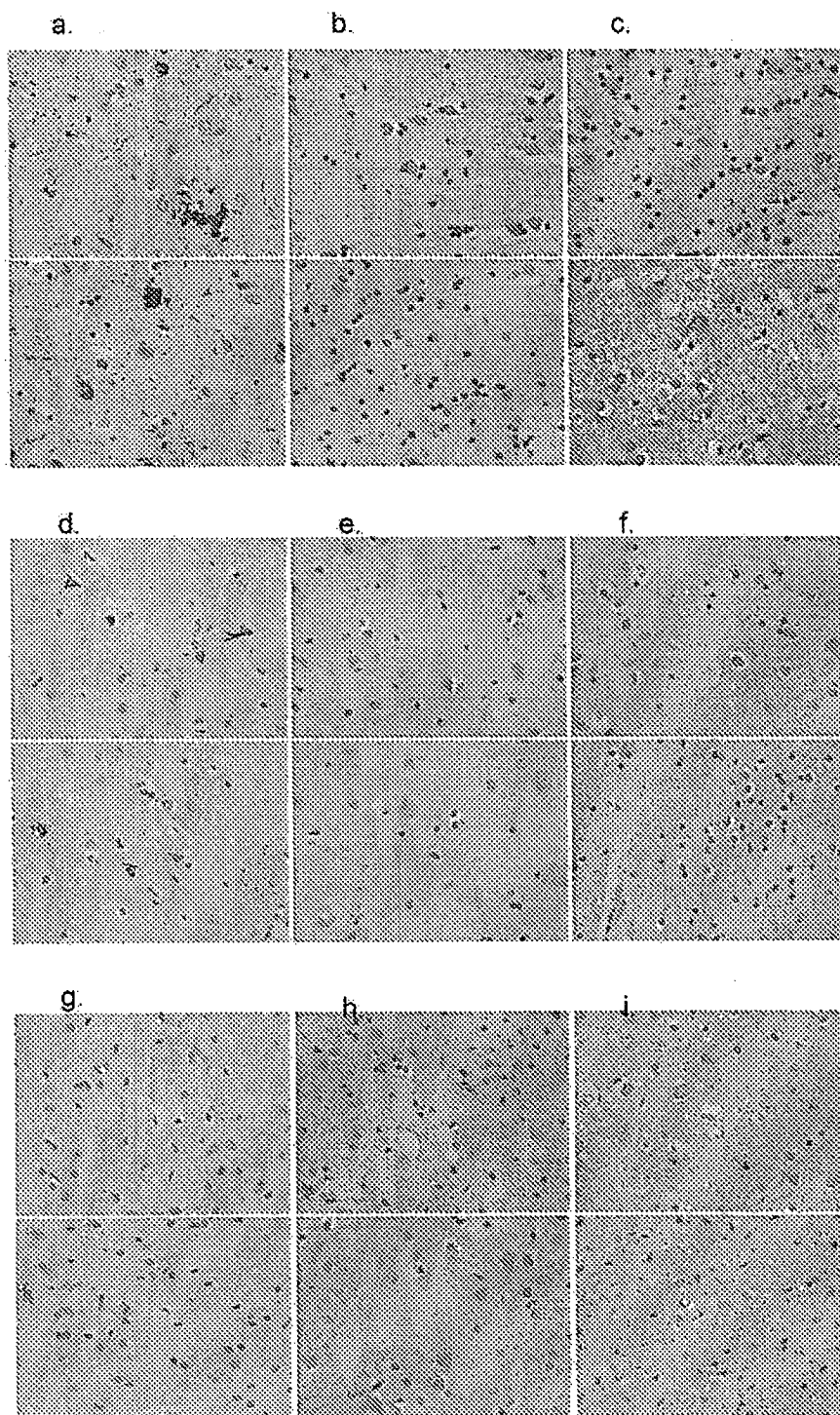


图 12

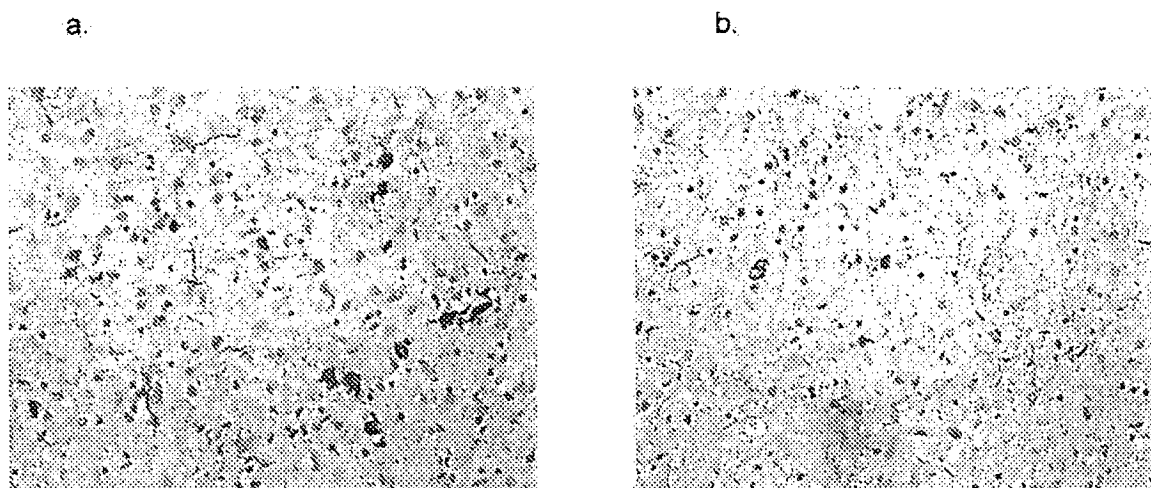


图 13

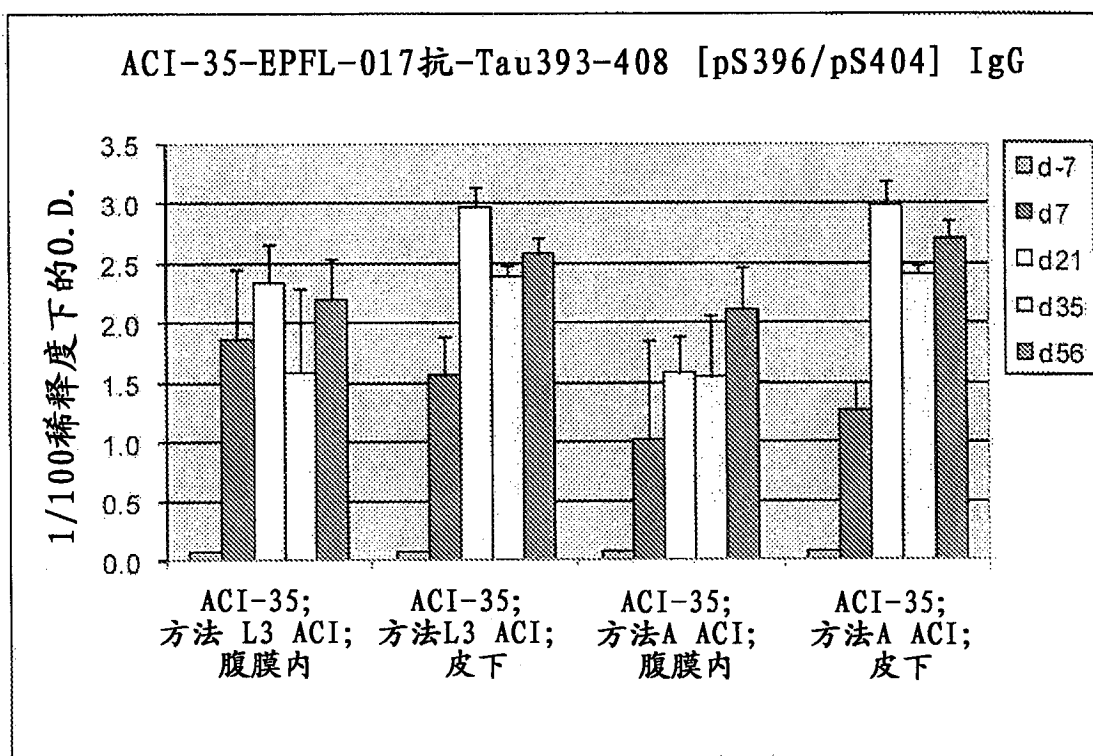


图 14

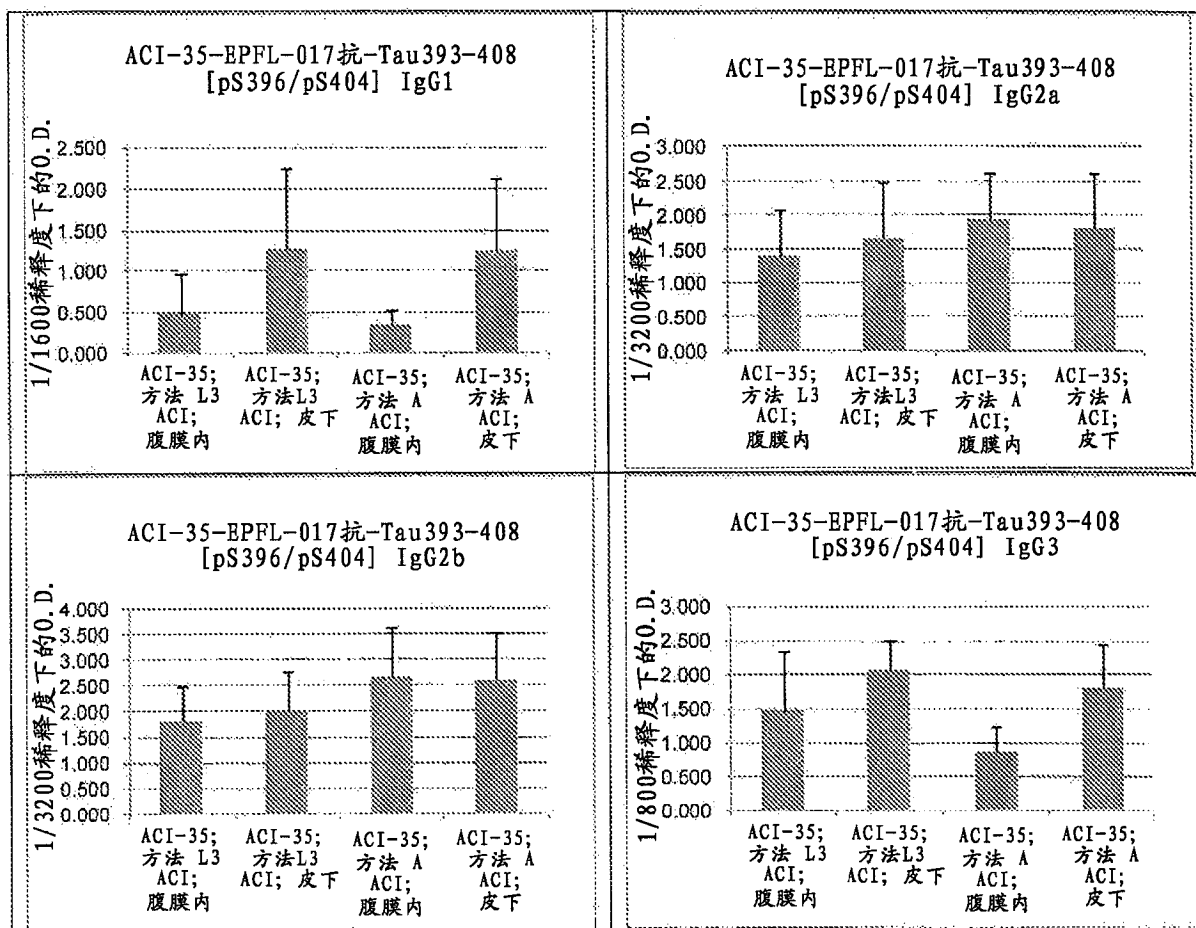


图 15

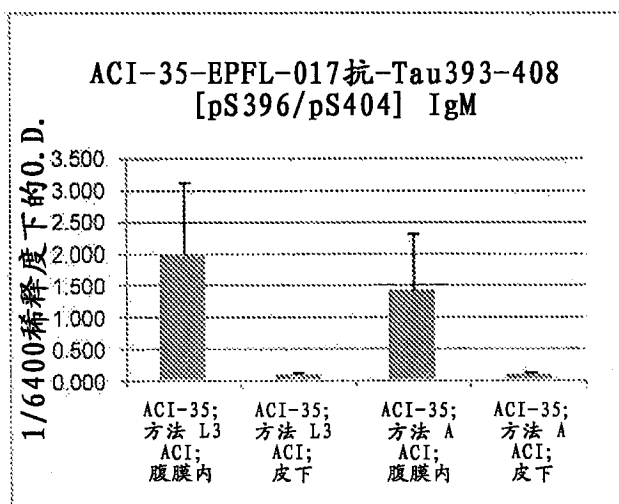


图 16a

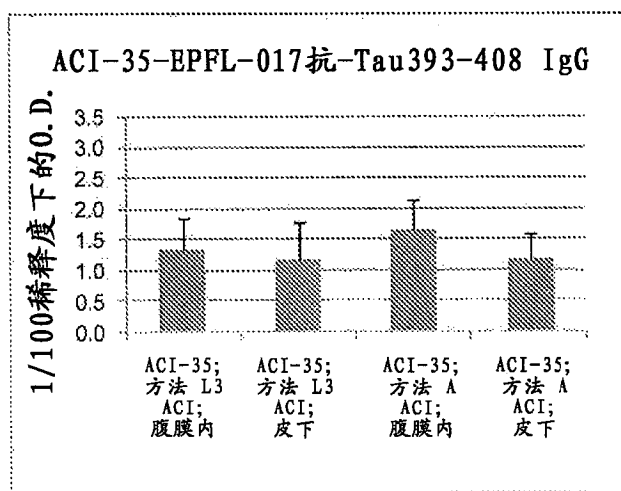


图 16b

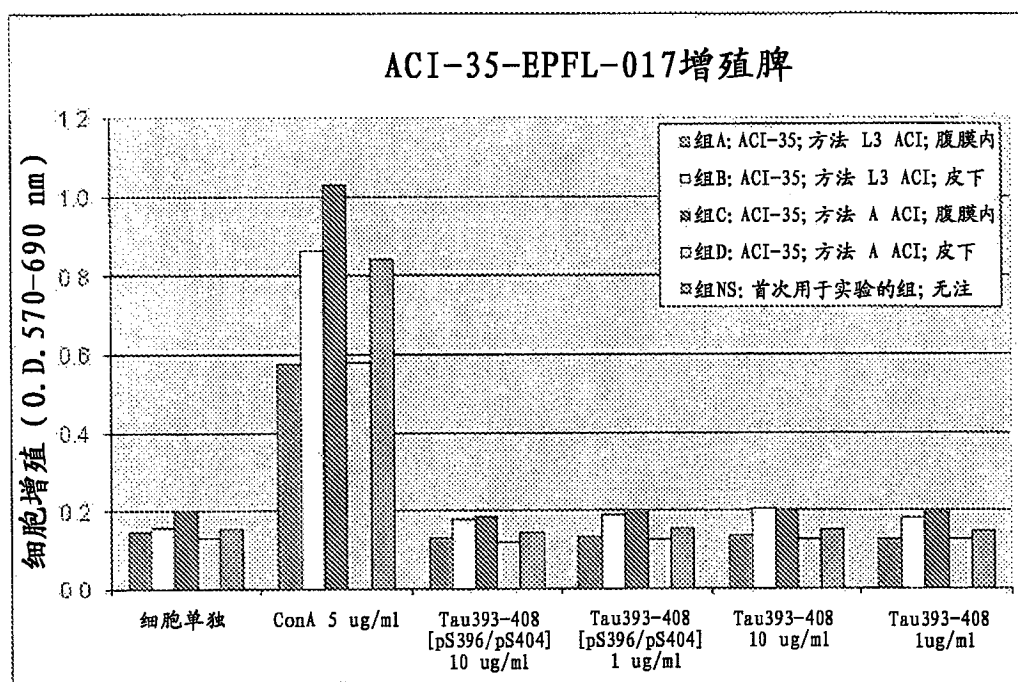


图 17

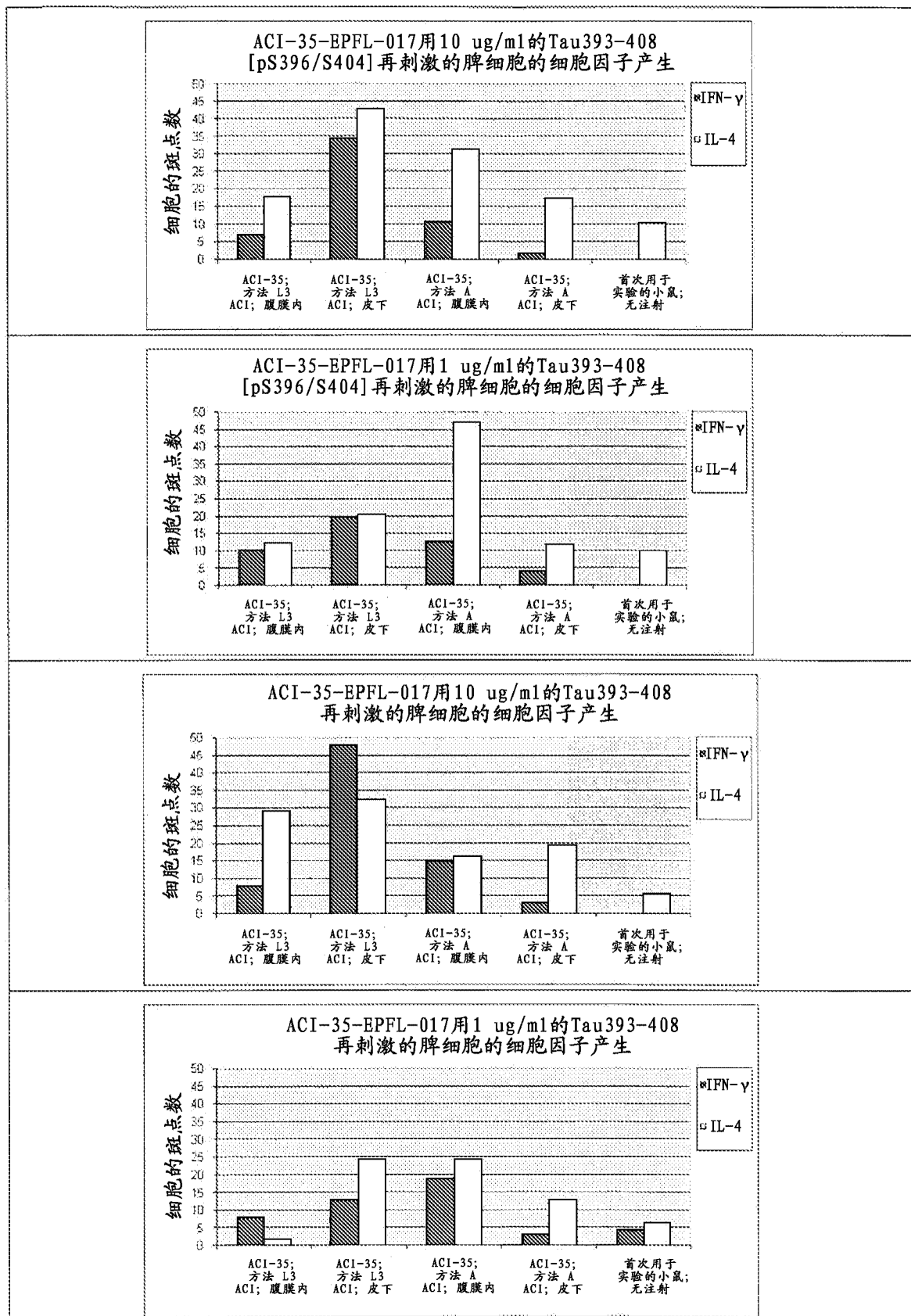


图 18

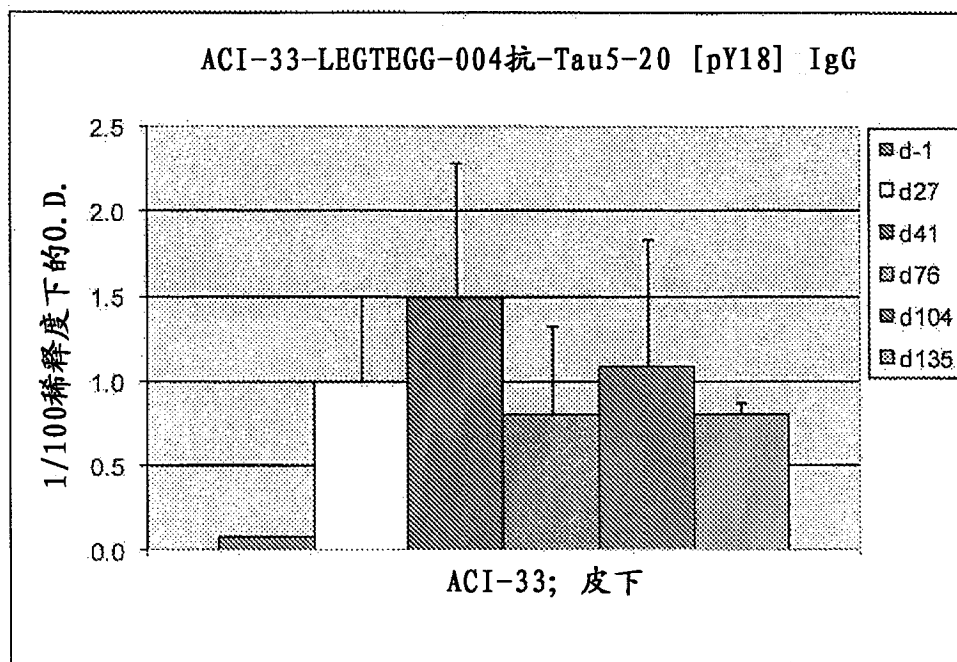


图 19

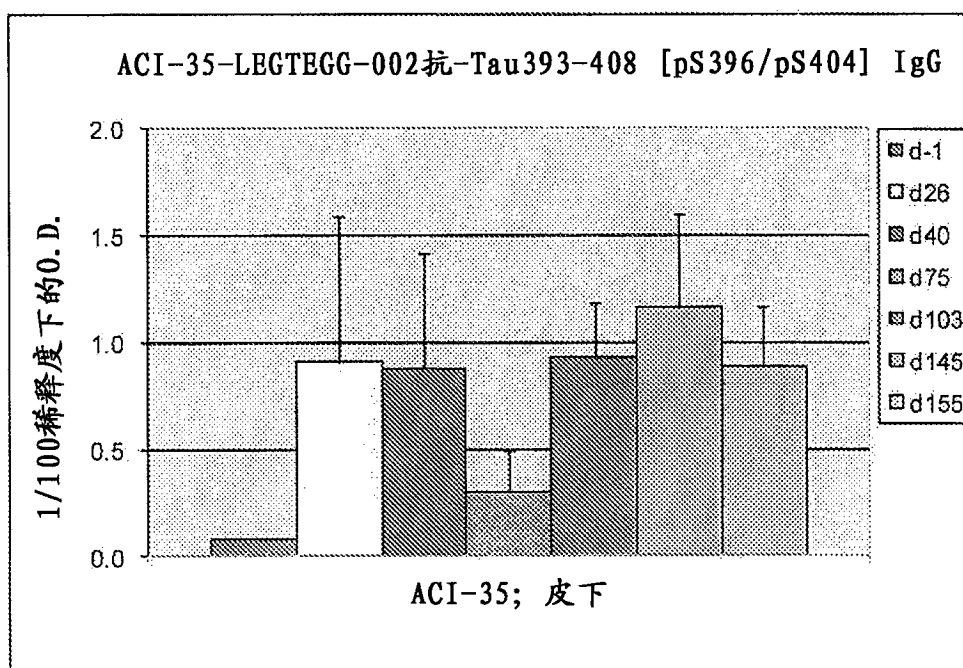


图 20

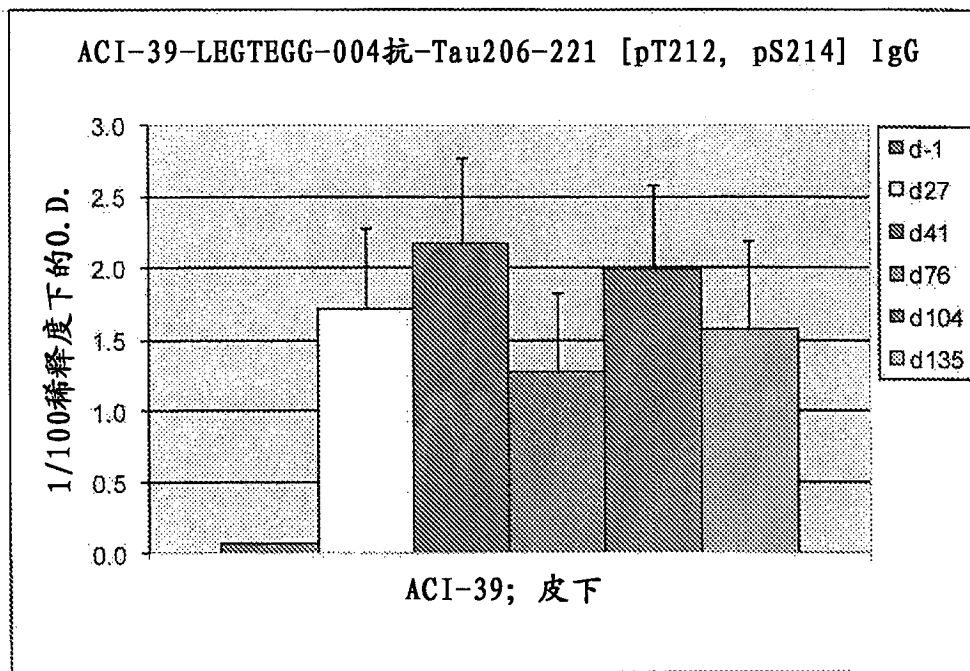


图 21

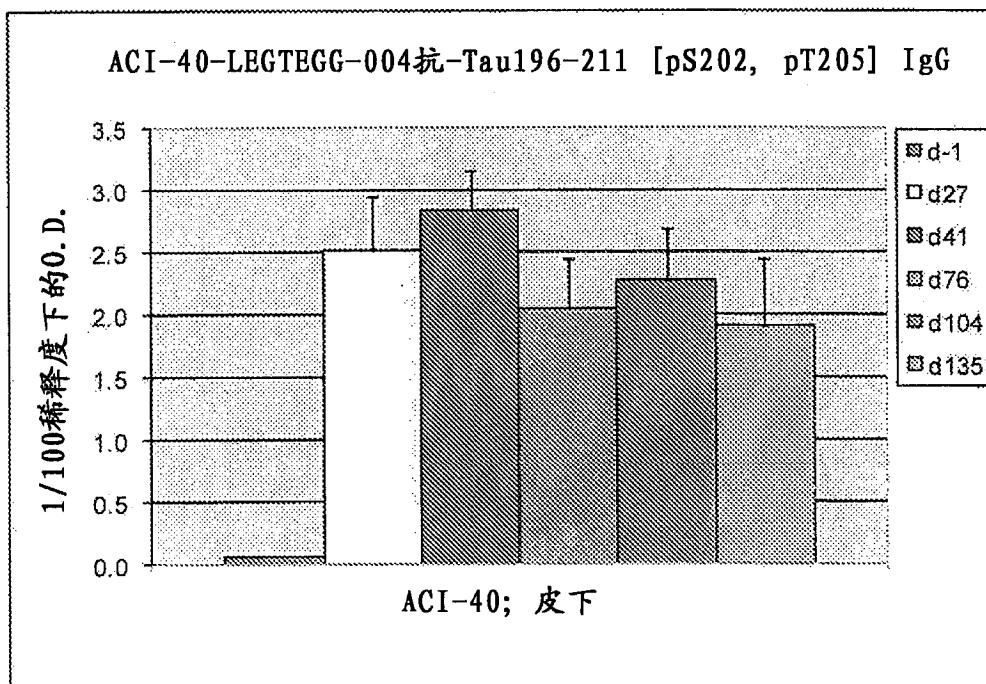


图 22

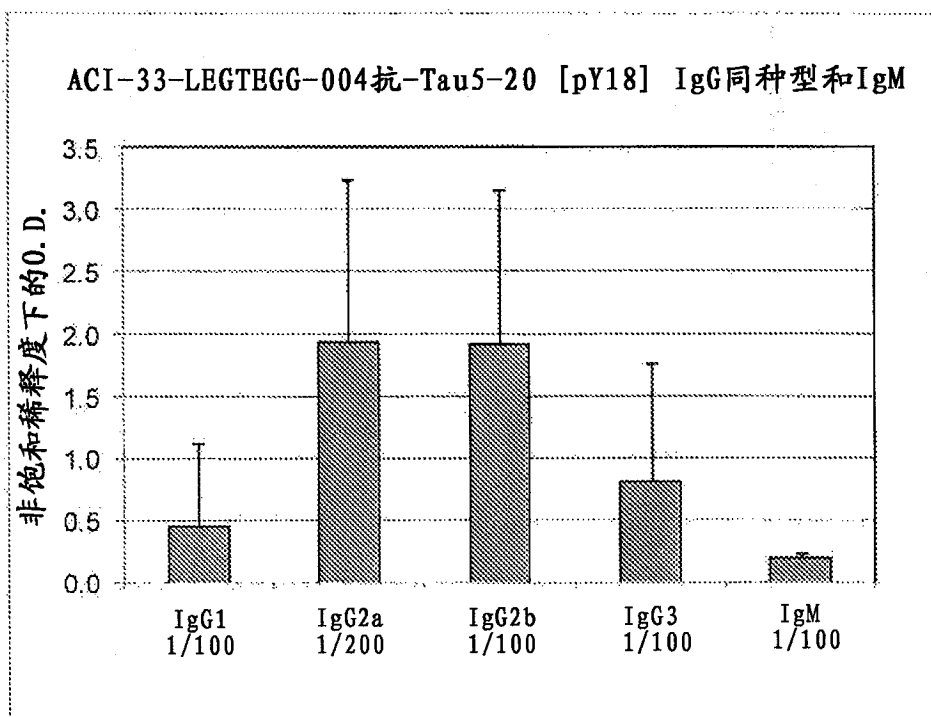


图 23

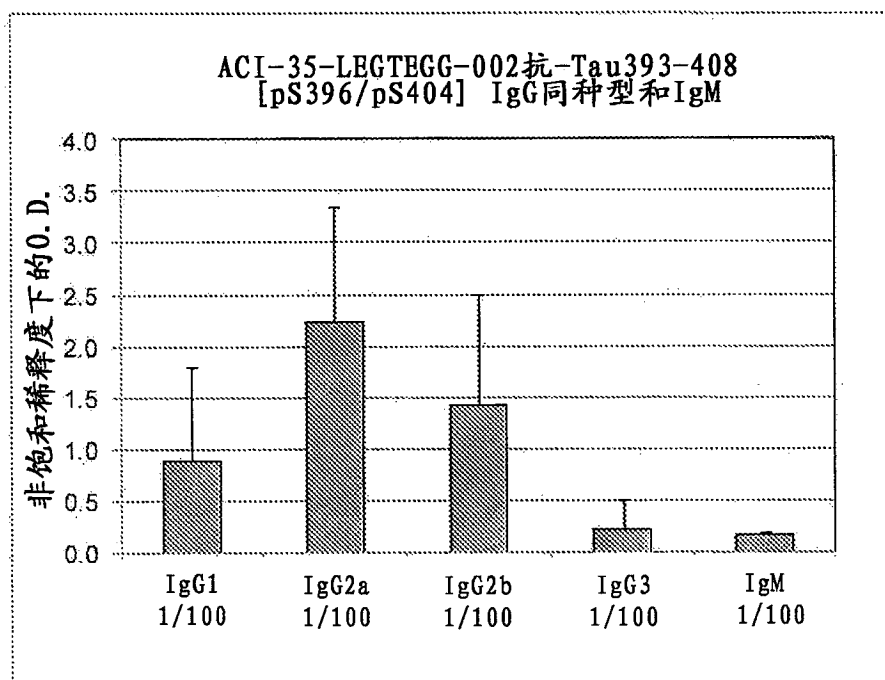


图 24

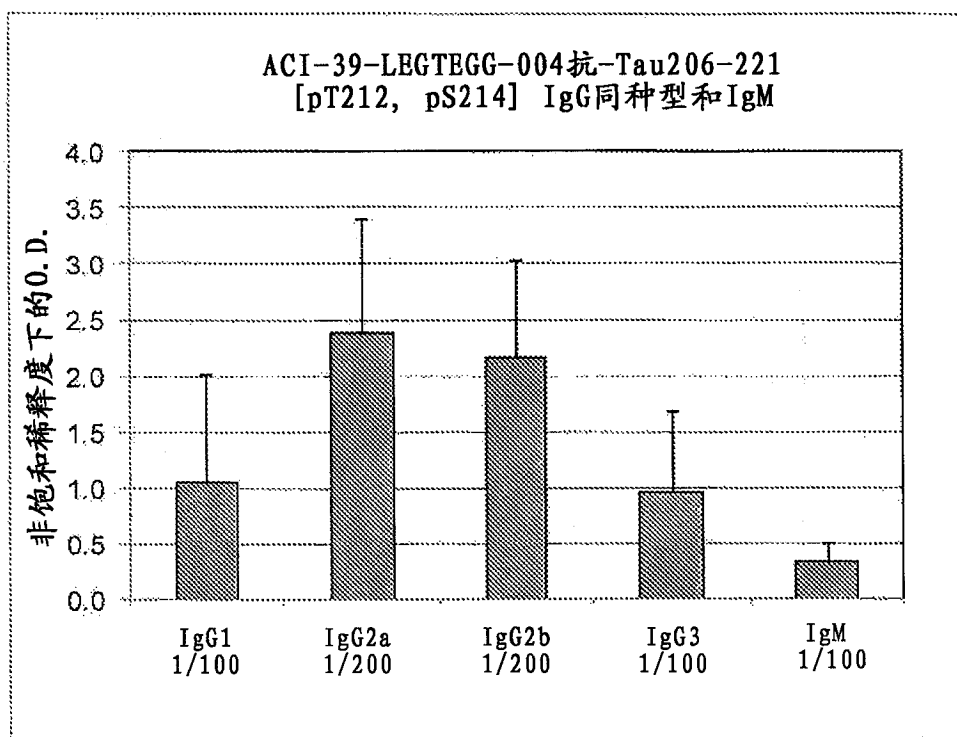


图 25

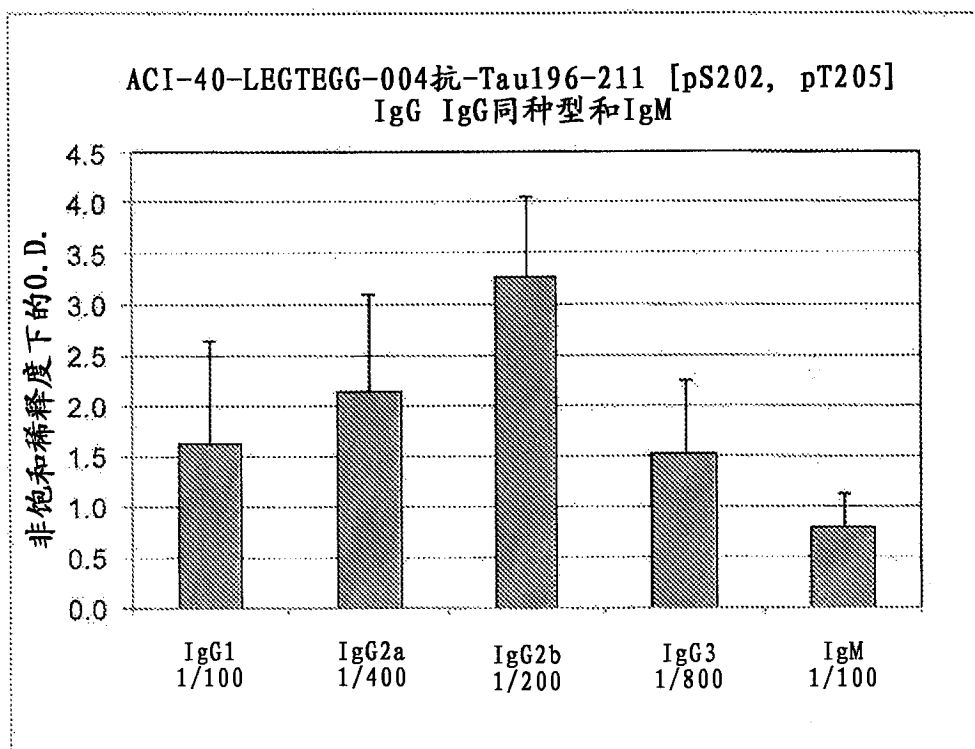


图 26

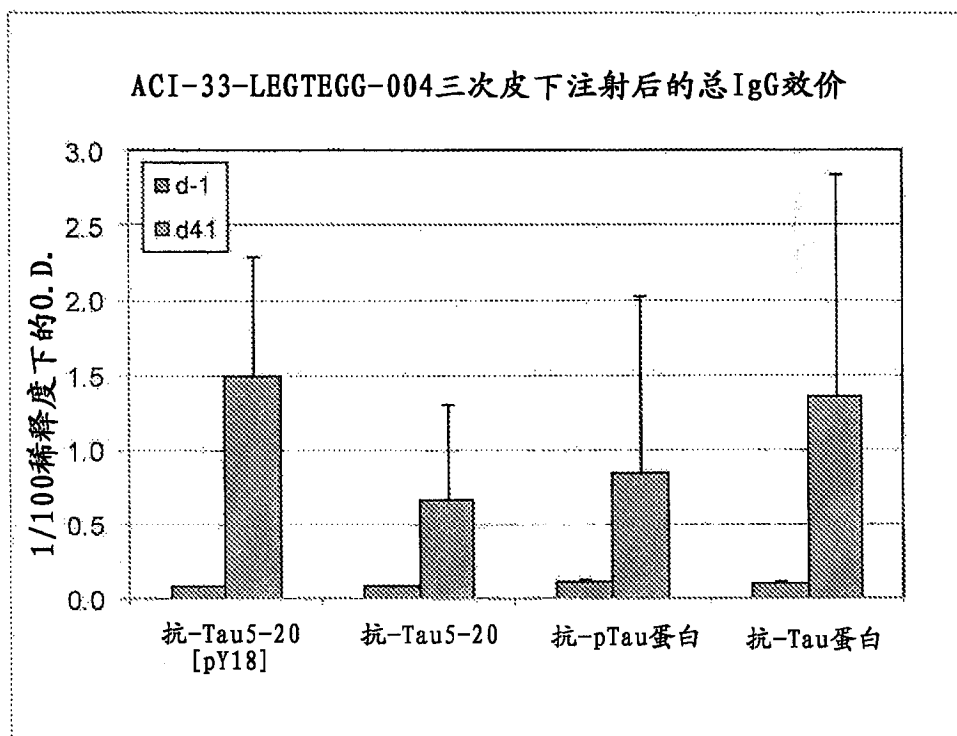


图 27

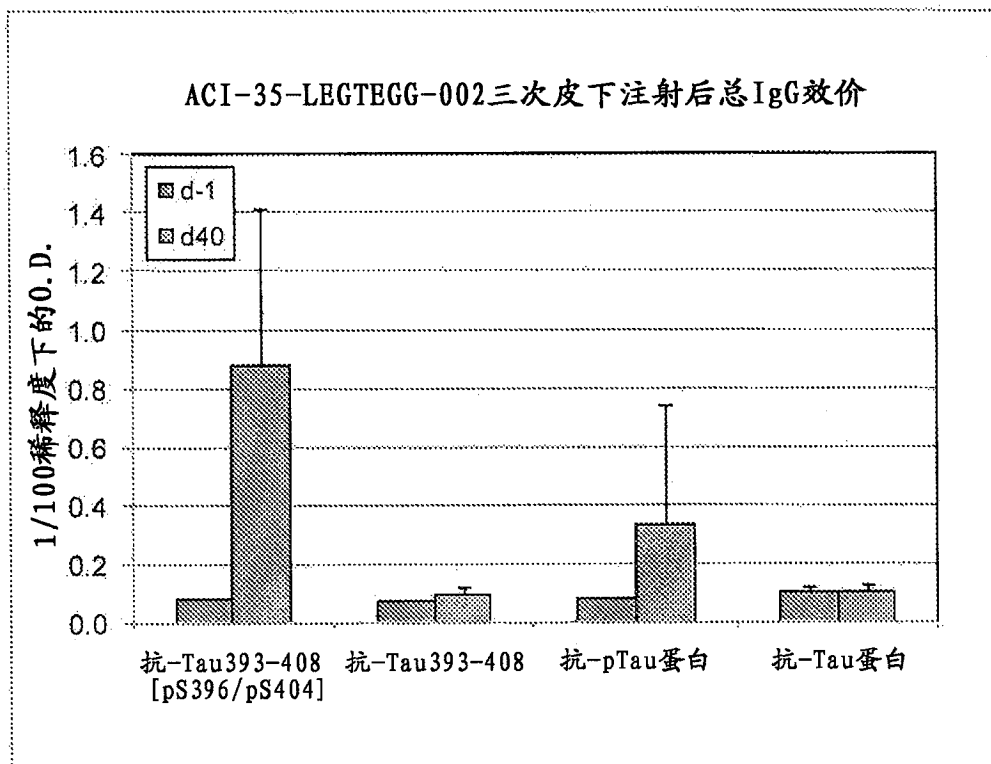


图 28

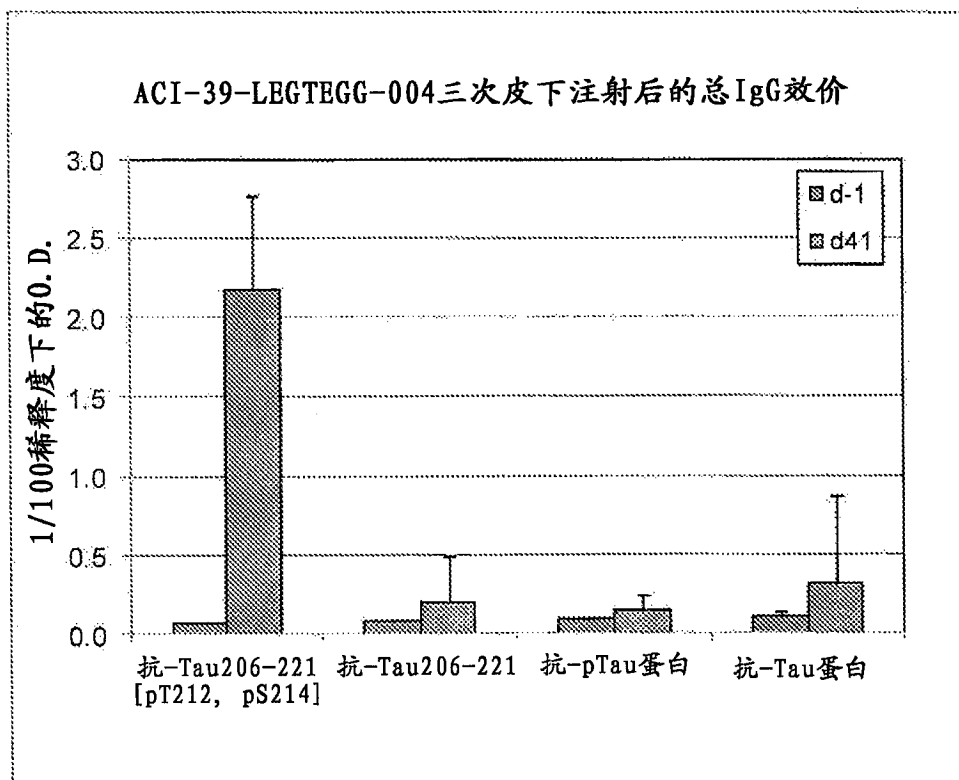


图 29

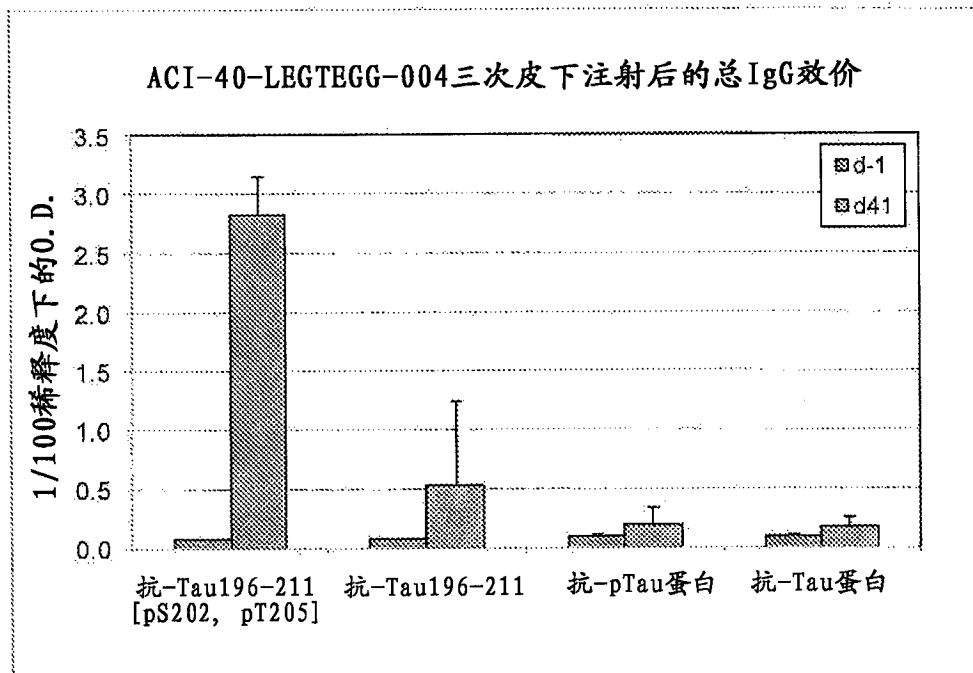


图 30

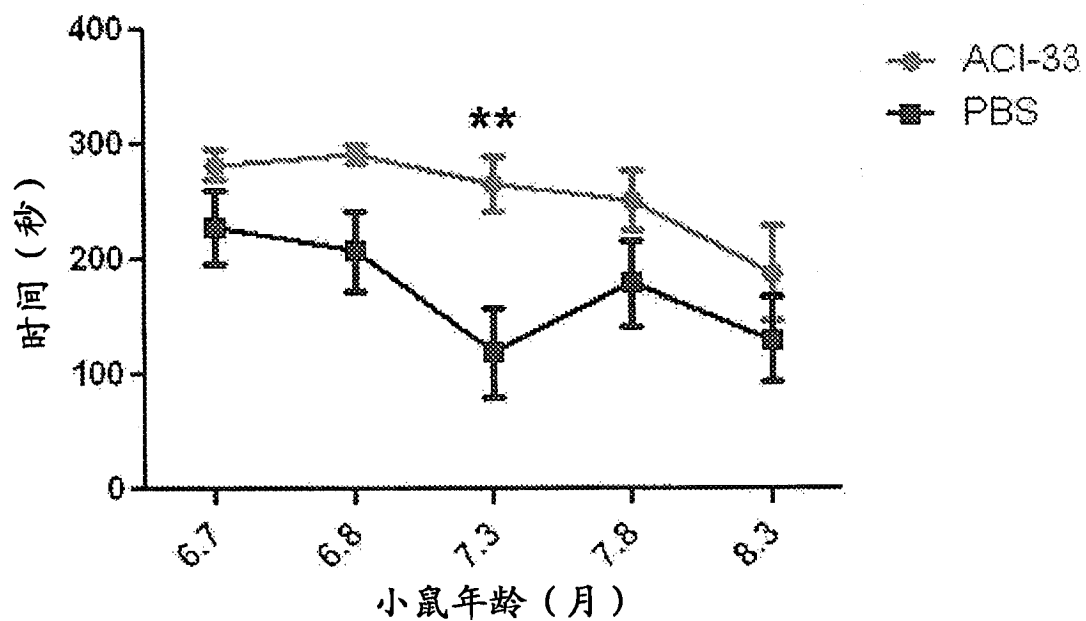


图 31

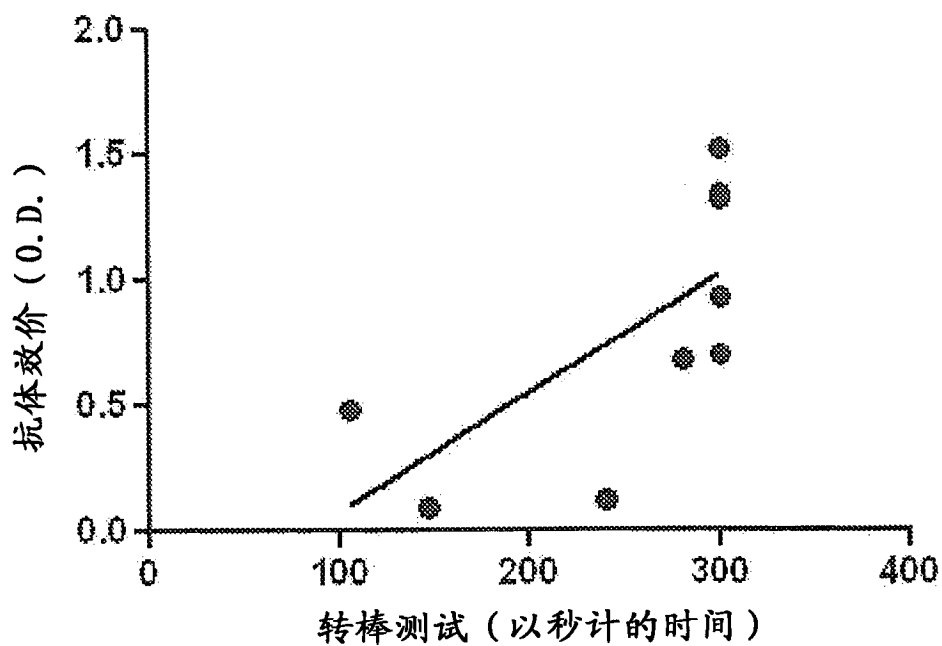


图 32

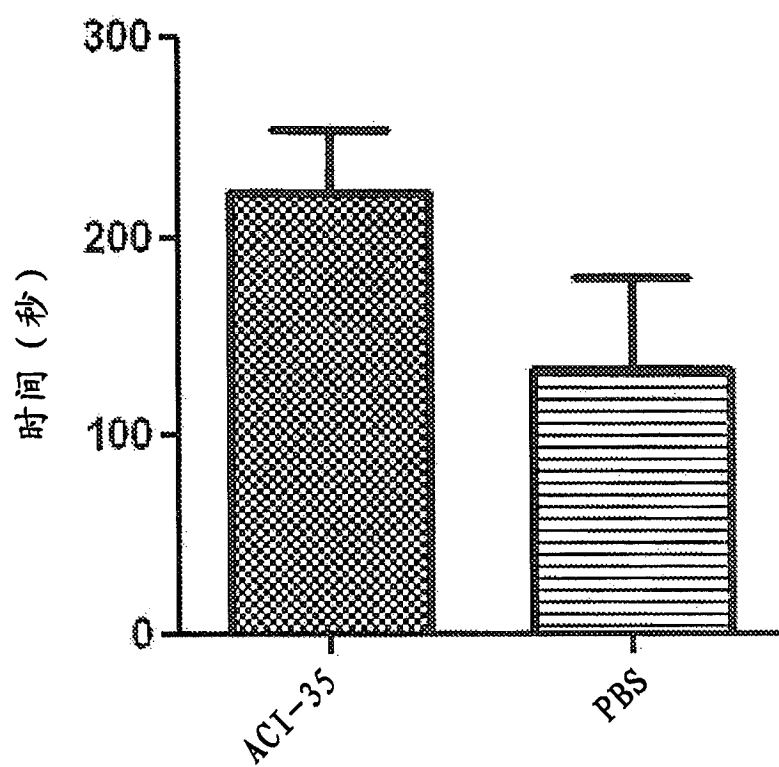


图 33

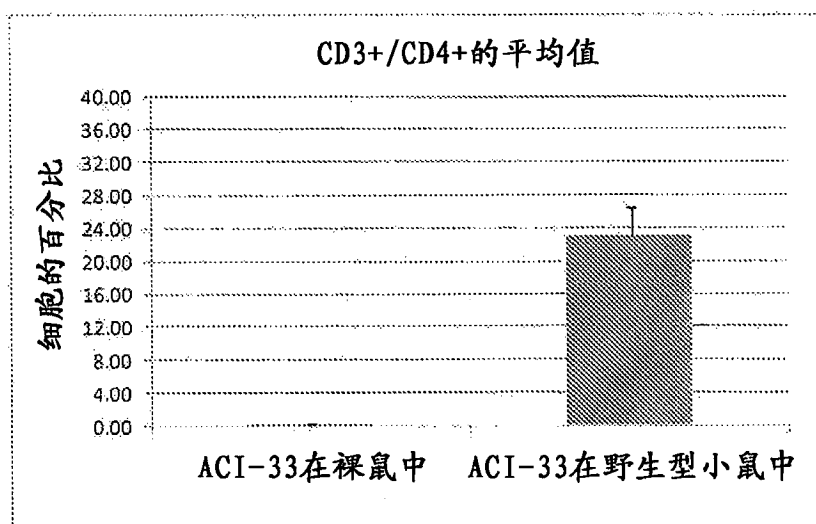
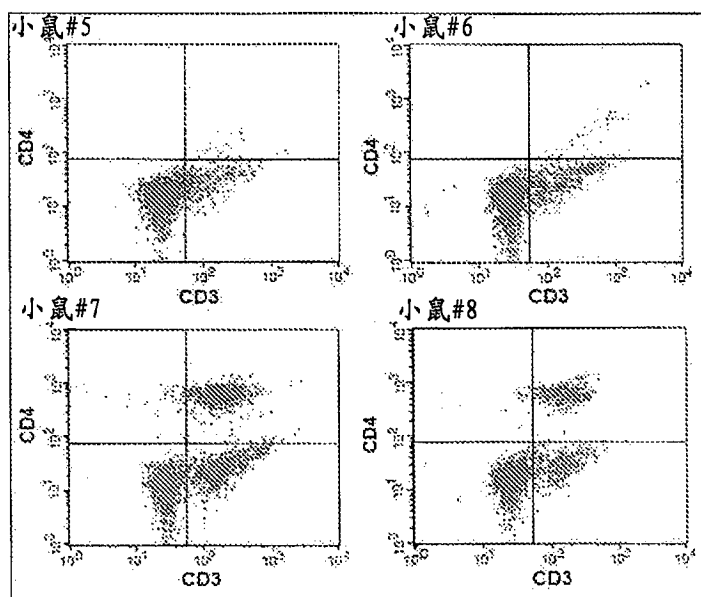


图 34

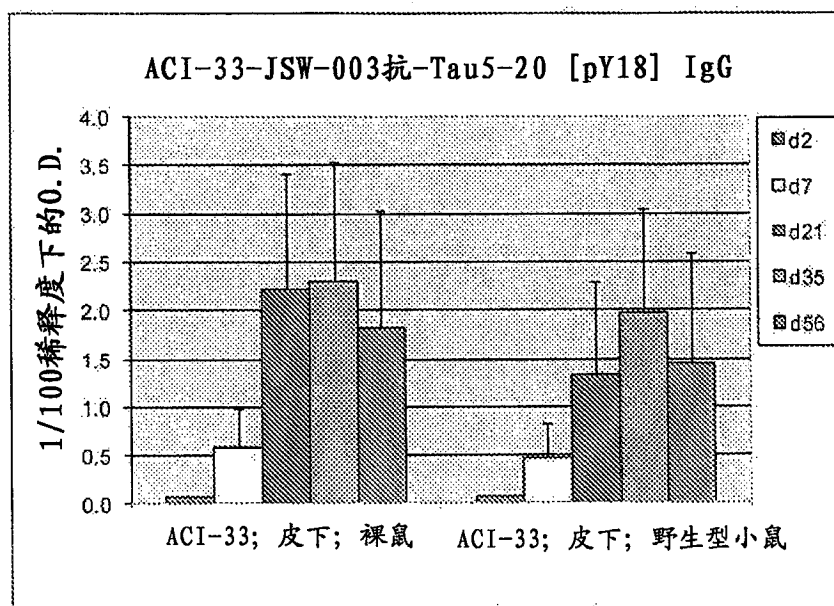


图 35

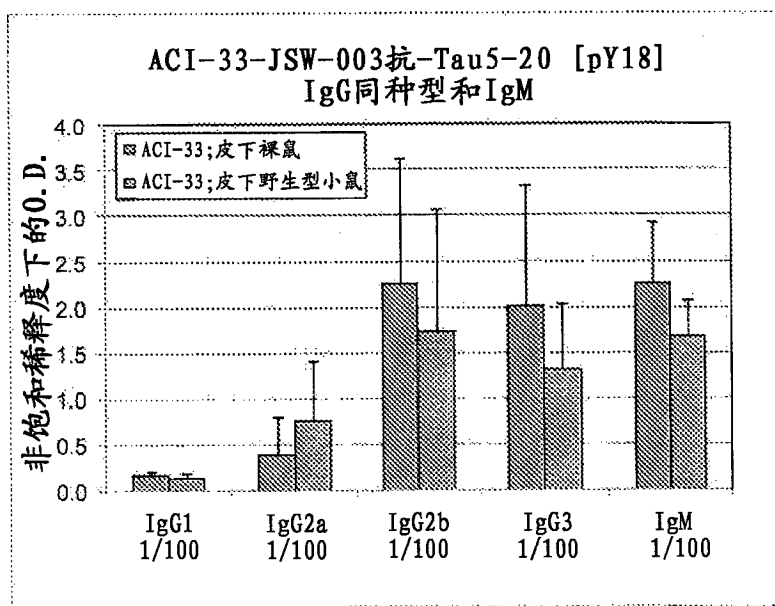


图 36

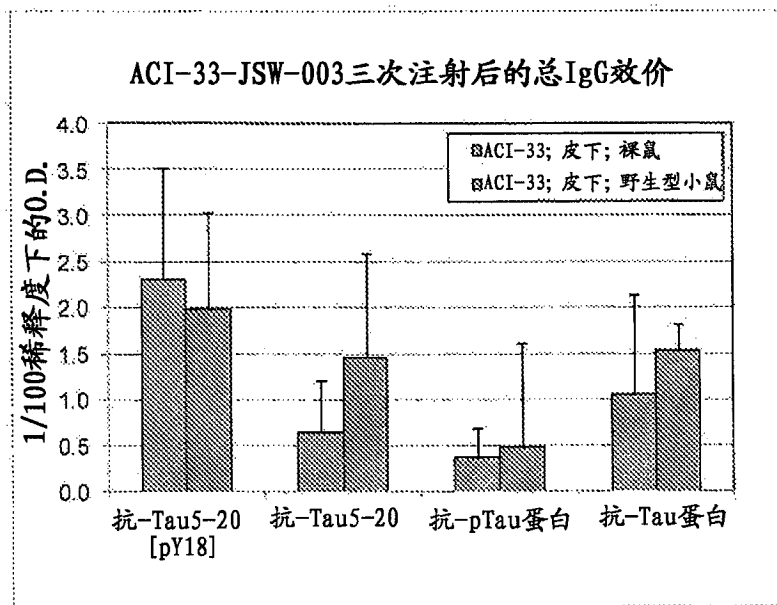


图 37

专利名称(译)	药物组合物		
公开(公告)号	CN102946899B	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201080024398.2	申请日	2010-04-01
[标]申请(专利权)人(译)	AC免疫有限公司 法语天主教鲁汶大学		
申请(专利权)人(译)	AC免疫有限公司 鲁汶大学		
当前申请(专利权)人(译)	AC免疫有限公司 鲁汶大学		
[标]发明人	A普法伊费尔 A穆斯 F范勒旺 M皮尔格伦		
发明人	A·普法伊费尔 A·穆斯 F·范勒旺 M·皮尔格伦		
IPC分类号	A61K39/00 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/0005 A61K2039/55572 A61K2039/6087 C07K14/4711 G01N33/6896 G01N2333/47 G01N2800/2821 G01N2800/52 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 A61K9/127 A61K39/00 A61K39/39 A61K2039/505 C07K14/47 C07K16/00 C07K16/18 C07K2317/24 C07K2317/565 C12N5/12 G01N33/53		
代理人(译)	凌立		
审查员(译)	童欣		
优先权	2009157303 2009-04-03 EP		
其他公开文献	CN102946899A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及在由神经原纤维缠结引起或与神经原纤维缠结相关的疾病和障碍的治疗中用于治疗 and 诊断用途的方法和组合物。具体而言，本发明涉及包含抗原肽的药物组合物，尤其是模拟tau蛋白的主要病理磷酸化表位的抗原磷酸肽的药物组合物，其在包括阿尔茨海默病的tau病的治疗中用于治疗 and 诊断用途。

