



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I379839B1

(45)公告日：中華民國 101 (2012) 年 12 月 21 日

(21)申請案號：100140530

(22)申請日：中華民國 93 (2004) 年 12 月 17 日

(51)Int. Cl. : C07K19/00 (2006.01)

C07K4/12 (2006.01)

(30)優先權：2003/12/17 美國

60/530,481

(71)申請人：惠氏有限責任公司 (美國) WYETH LLC (US)

美國

詹森阿茲海默免疫療法公司 (愛爾蘭) JANSSEN ALZHEIMER IMMUNOTHERAPY

(IE)

愛爾蘭

(72)發明人：阿路穆更 羅沙帕 ARUMUGHAM, RASAPPA G. (US) ; 布朗沙 耶 PRASAD, A. KRISHNA (IN)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

EP 1321466A

WO 00/50077A1

WO 01/30390A2

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：37 項 圖式數：10 共 148 頁

(54)名稱

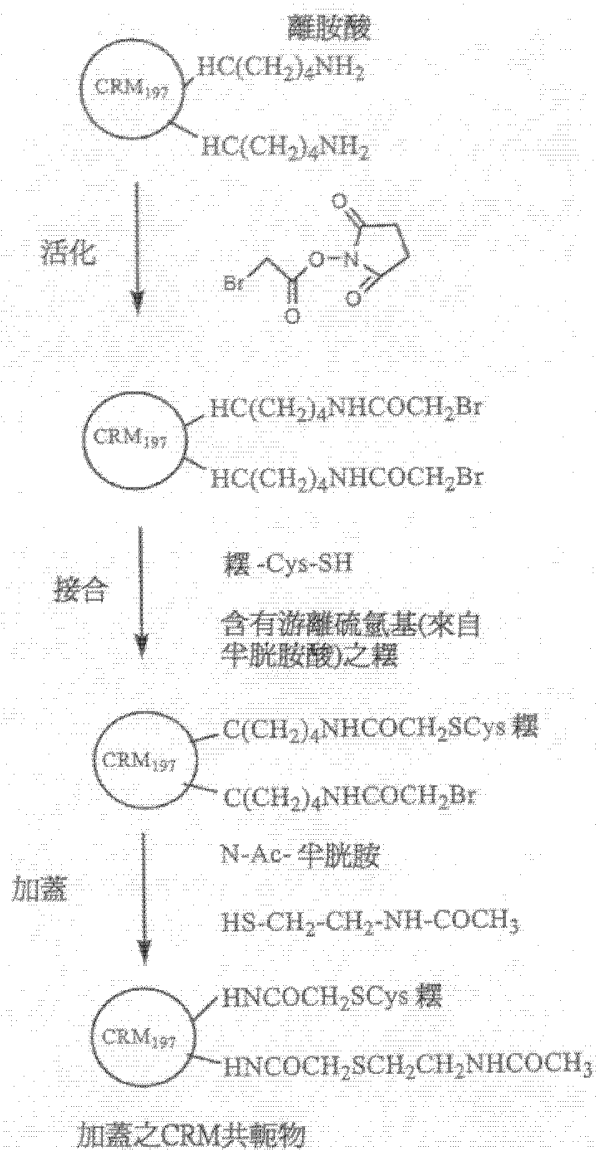
A β 免疫原肽-載體共軛物及產製彼之方法A β IMMUNOGENIC PEPTIDE CARRIER CONJUGATES AND METHODS OF PRODUCING SAME

(57)摘要

本發明係關於產製由 A β 免疫原與蛋白質/多載體分子形成之免疫原共軛物之方法，其中該免疫原係經由該載體上或任意地依附在該載體上之接頭分子之胺基酸殘基上被活化之官能基來接合到該蛋白質載體上，且其中該等胺基酸殘基上未進行接合之反應性官能基會經由加蓋(capping)來鈍化，如此可保有該載體分子的免疫官能性，但可減少由於共軛物進行不當反應而變得較不安全或較不有效之可能性。再者，本發明亦關於用此等方法產製之免疫原產物及含有此等免疫原產物之免疫原組成物。

The present invention is directed to methods of producing conjugates of A β peptide immunogens with protein/polypeptide carrier molecules, which are useful as immunogens, wherein peptide immunogens are conjugated to protein carriers via activated functional groups on amino acid residues of the carrier or of the optionally attached linker molecule, and wherein any unconjugated reactive functional groups on amino acid residues are inactivated via capping, thus retaining the immunological functionality of the carrier molecule, but reducing the propensity for undesirable reactions that could render the conjugate less safe or effective. Furthermore, the invention also relates to such immunogenic products and immunogenic compositions containing such immunogenic products made by such methods.

離胺酸



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

根據 35 U.S.A. §119 (e) 條款本發明主張於 2003 年 12 月 17 日提出之美國臨時專利申請案第 60/530,481 號之權益，其全部併此以供所有目的作參考。

【先前技術】

適應性免疫的要素為有機體有能力對外來物質的存在有所反應且能產生可與該異物特異性交互作用之成份（抗體及細胞）並保護該宿主免於異物的入侵。“抗原”或“免疫原”為一種物質，其能引起此類型免疫反應且可與被製造來對抗它之敏感化細胞及抗體相互作用。

抗原或免疫原通常為巨分子且含有獨特的抗原性部位或“抗原決定部位”，其可被免疫系統辨識且與免疫系統的多種成份相互反應。它們可呈個別分子的形式存在且可由合成性有機化學物質、蛋白質、脂蛋白、糖蛋白、RNA、DNA、或多醣所組成，或者它們可為部份細胞結構（細菌或真菌）或病毒（Harlow and Lane 1998a,b,c; Male et al., 1987）。

小分子如短肽雖然通常可與免疫反應的產物相互作用，但是僅有其自身時經常無法引起反應。此等肽免疫原或被稱為“半抗原”事實上為不完全抗原，雖然本身不具致免疫性或無法引起抗體產生，不過可以藉由偶合到適當的載體上而使其具致免疫性。載體通常為分子量較大之蛋白

質抗原且在活體內投予時會造成免疫性反應。

於免疫反應中，抗體係由 B-淋巴球以及 T-輔助（ T_H ）細胞所製造及分泌。於大多數半抗原-載體系統中，B 細胞製造的抗體對於半抗原及載體都具特異性。於此等例中，T 淋巴球具有針對載體的特殊結合域，但在只有半抗原時卻無法辨識出來。在一種協同作用下，該 B 及 T 細胞合作則可引發對半抗原具特異性之抗體反應。在此種免疫反應發生後，若宿主後來只受到半抗原之挑釁，通常初次疫苗接種後形成之記憶細胞還是能對該半抗原有所反應而產生半抗原-特異性抗體。

模仿較大巨分子上某些精確的抗原決定部位結構之合成性半抗原通常會被接合到載體上以產生針對該較大“母體”分子之免疫反應。例如，可根據一蛋白質之已知序列來合成短肽片段且將該片段偶合到載體上以引發針對該天然蛋白質之免疫反應。免疫原製造之此類合成性策略已成為近年來疫苗製造之研究基礎。然而在許多情形下，在使用合成肽-載體共軛物時若僅僅引發 B-細胞反應，不論該共軛物設計得有多好，卻無法保證總能針對完整免疫原產生徹底的免疫性保護。來自較大病毒顆粒或細菌細胞之短肽抗原決定部位所產生的免疫反應可能僅足以及在 B-細胞層次產生記憶。於此例中，現在一般已同意：細胞毒性 T-細胞反應才是保護性免疫的更重要指標。所以設計出具有適當抗原決定部位之結合位以供 B-細胞及 T-細胞兩者皆可辨識之肽免疫原已成為今日免疫學中最具挑戰性的研究領

域之一。

將小型或不良的免疫原分子接合到較大之“載體”分子上以增加致免疫性的策略已成功地運用數十年（參考例如 Goebel et al. (1939) *J. Exp. Med.* 69: 53）。例如，已有許多免疫原組成物被加以描述，其係將已純化的被膜聚合物接合到載體蛋白質上且藉由此種“載體效果”來製造出更有效的免疫原組成物。Schneerson et al. (1984) *Infect. Immun.* 45: 582-591。還有，當使用一種游離多醣來免疫嬰兒時往往只能得到不良的抗體反應，但是在把多醣與載體接合後就可以避免此種抗體反應不良之現象（Anderson et al. (1985) *J. Pediatr.* 107: 346; Insel et al. (1986) *J. Exp. Med.* 158: 294）。

半抗原-載體接合之共軛物可用多種交聯／偶合反應劑如同雙官能基、異雙官能基或零-長度交聯劑成功地製造。許多此等方法近來已被用來把醣類、蛋白質及肽類偶合到肽載體上。大多數的方法係產生胺、醯胺、胺基甲酸酯、異胺基甲酸酯、或二硫化物鍵結，或者於某些例為產生硫醚。使用偶合劑可將反應性部位引入位於載體及／或半抗原分子上之反應性胺基酸分子之側鏈中，所以使用偶合劑之一項缺點為：若未將反應性部位中和那麼此等反應性部位即可自由地與活體外（如此會不當地影響該共（等）軛物之官能性或穩定性）或活體內（如此會將接受此等製劑免疫之人類或動物置於不良條件的潛在風險中）的任何不良分子進行反應。此等過量的反應性部位可採用

多種已知的化學反應來加以耗用或“加蓋”好讓此等部位鈍化，不過此等反應卻另外地可能會妨礙共軛物的官能性。當意圖把反應性部位引入載體分子以製造共軛物時特別會有問題，由於其有更大且更複雜的結構（相較於半抗原）使其更易於感受化學處理的妨礙影響。事實上，目前還沒有採用如下方法製成之共軛物實例，該方法係先將載體活化，然後於共軛反應中讓載體與半抗原反應，最後將剩下的反應性部位“加蓋”以製成共軛物，同時使得所產生之共軛物仍保有成為具有所需“載體效果”特性之免疫原組成物之能力。

【發明內容】

本發明係關於一種包含 $A\beta$ 肽或 $A\beta$ 片段或其類似物之肽免疫原以及蛋白質／多肽載體形成之免疫原共軛物之產製方法，其中該 $A\beta$ 肽或 $A\beta$ 片段或其類似物係經由該載體之胺基酸殘基如離胺酸之衍生化官能基接合到該載體上，且其中該等胺基酸殘基上任何未進行接合之衍生化官能基會經由加蓋來鈍化以阻斷其與其它分子包括蛋白質／多肽進行反應，以保留該載體之官能性，如此該共軛物即可保有引發所需之抗該肽免疫原之免疫反應之能力且若無載體則無法產生該等免疫反應。進一步地，本發明亦關於以如上方法產製之共軛物，以及含有此等共軛物之免疫原組成物。

於一具體例中，本發明之第一方法係關於把含有 $A\beta$

肽或 A β 片段或其類似物之肽免疫原經由該肽免疫原上之胺基酸殘基之反應性基團來與具有一或多個官能基之蛋白質／多肽載體接合在一起之方法，該方法包含的步驟有：

(a) 將該蛋白質／多肽載體之一或多個官能基衍生化以產生具有反應性部位之衍生化分子；(b) 讓步驟(a)之衍生化蛋白質／多肽載體於反應條件下與該肽免疫原之胺基酸殘基之反應性基團反應，使得該肽免疫原經由該等官能基團接合到該衍生化蛋白質／多肽載體上；及(c) 進一步地將該共軛物與一種加蓋劑反應，好讓已活化蛋白質／多肽載體上之游離反應性官能基鈍化以保存該載體之官能性，如此該共軛物即可保有引發所需之抗該肽免疫原之免疫反應之能力且若無載體則無法產生該等免疫反應。

於一具體例中，該蛋白質／多肽載體係選自人類血清白蛋白、匙孔帽貝血青蛋白、免疫球蛋白分子、甲狀腺球蛋白、卵白蛋白、流感血球凝集素、PAN-DR 結合肽(PADRE 多肽)、瘧疾環孢蟲(CS)蛋白質、B 型肝炎表面抗原(HB_sAg₁₉₋₂₈)、熱休克蛋白質(HSP) 65、卡介二氏桿菌(BCG)、霍亂毒素、毒性較低之霍亂毒素突變體、白喉毒素、與白喉毒素交叉反應之 CRM₁₉₇ 蛋白質、重組鏈球菌性 C5a 肽酶、釀膿鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*) ORF1224、釀膿鏈球菌 ORF1664、釀膿鏈球菌 ORF2452、肺炎雙球菌(*Streptococcus pneumoniae*) 自溶酶、毒性較低之肺炎雙球菌自溶酶、肺炎衣原體(*Chlamydia pneumoniae*) ORF T367、肺炎衣原體 ORF

T858、破傷風類毒素、HIV gp120 T1、辨認黏附性基質分子之細菌表面成份（MSCRAMMS）、生長因子／激素、細胞因子及趨化因子等所組成之群組。

於另一具體例中，該蛋白質／多肽載體含有 T-細胞抗原決定部位。

於再一具體例中，該蛋白質／多肽載體為細菌性類毒素如破傷風類毒素、霍亂毒素或如上所述之霍亂毒素突變體。於較佳具體例中，該蛋白質／多肽為 CRM₁₉₇。

於再一具體例中，該蛋白質／多肽載體可為流感血球凝集素、PADRE 多肽、瘧疾 CS 蛋白質、B 型肝炎表面抗原（HSBA19-28）、熱休克蛋白質 65（HSP 65）、或來自結核桿菌之多肽（BCG）。

於再一具體例中，該蛋白質／多肽載體可為鏈球菌性 rC5a 肽酶、釀膿鏈球菌 ORF1224、釀膿鏈球菌 ORF1664、釀膿鏈球菌 ORF2452、肺炎雙球菌自溶酶、毒性較低之肺炎雙球菌自溶酶、肺炎衣原體 ORF T367、肺炎衣原體 ORF T858。

於再一具體例中，該蛋白質／多肽載體可為生長因子或激素，其可刺激或強化免疫反應且係選自 IL-1、IL-2、 γ -干擾素、IL-10、GM-CSF、MIP-1 α 、MIP-1 β 及 RANTES。

於一態樣中，本發明係提供一種含有 A β 肽或 A β 片段或其類似物之肽免疫原，其可引起抗 A β 內特殊抗原決定部位之免疫反應。本發明之免疫原肽類包括異源性免疫

原肽類。於某些免疫原肽中，其係將 $A\beta$ 片段連接到載體上以形成異源性免疫原肽，然後可用本發明方法來將此種異源肽連接到載體上以形成共軛物。

於本發明另一態樣中，該肽免疫原為一種包含 $A\beta$ 之 N 端部份至少第 1-5 個殘基之多肽，該 $A\beta$ 之第 1 個殘基為該多肽的 N-端殘基，其中該多肽不含有該 $A\beta$ 的 C 端片段。於本發明再一態樣中，本發明之肽免疫原為含有 $A\beta$ 之 N-端片段之多肽，該片段係以 $A\beta$ 之第 1-3 個殘基開始且以 $A\beta$ 之第 7-11 個殘基結束。於本發明某些態樣中，該肽免疫原為一種會引起抗 $A\beta$ 之 N-端片段之免疫反應之化學劑且該 $A\beta$ 之 N 端片段係以 $A\beta$ 之第 1-3 個殘基開始且以 $A\beta$ 之第 7-11 個殘基結束，而且其並不會引起針對 $A\beta$ 43 第 12-43 個殘基之抗原決定部位之免疫反應。於本發明另一態樣中，該肽免疫原為一種含有連接一段異源胺基酸序列及 $A\beta$ 片段之異源性多肽，其可引發抗該胺基酸序列之輔助者 T-細胞反應及抗該 N-端片段之 B-細胞反應。

於某些肽免疫原中，該 $A\beta$ 之 N-端片段係以其 C 端連接到異源多肽上。於某些肽免疫原中，該 $A\beta$ 之 N-端片段係以其 N 端連接到異源多肽上。於某些肽免疫原中，該 $A\beta$ 之 N-端片段係以其 C 端及 N 端分別連接到第一及第二異源多肽上。於某些肽免疫原中，該 $A\beta$ 之 N-端片段係以其 N 端連接到異源多肽且以其 C 端連接到至少額外一段 N-端片段複本上。於某些肽免疫原中，該多肽含有 N-端

到 C 端部份、 $A\beta$ 之 N-端片段、多個複本之 N-端片段及該異源胺基酸片段。

於某些如上的肽免疫原中，該多肽進一步含有至少一個額外的 N-端片段複本。於某些如上肽免疫原中，該片段不含至少 5 個 $A\beta$ 43 之 C-端胺基酸。

於如上肽免疫原之某些態樣中，該 $A\beta$ 片段含有最多 10 個鄰近的 $A\beta$ 胺基酸。

於另一態樣中，本發明提供一種含有 $A\beta$ 肽或 $A\beta$ 片段或其類似物之肽免疫原且其可引起抗 $A\beta$ 內特殊抗原決定部位之免疫反應，該肽免疫原之構型為一種被稱為多抗原性肽（MAP）之構型。

於某些上述之本發明態樣中，該肽免疫原係來自 $A\beta$ 之 N 端段。於本發明之某些態樣中，該肽免疫原係選自 $A\beta$ 1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-10、1-11、1-12、1-16、3-6 及 3-7 之 $A\beta$ 片段。於某些如上態樣中，該肽免疫原係來自 $A\beta$ 的中間區域。於本發明某些態樣中，該肽免疫原係選自 $A\beta$ 13-28、15-24、17-28 及 25-35 之 $A\beta$ 片段。於本發明某些態樣中，該肽免疫原係來自 $A\beta$ 的 C 端。於本發明某些態樣中，該肽免疫原係選自 $A\beta$ 33-42、35-40 及 35-42 之 $A\beta$ 片段。於本發明某些態樣中，該肽免疫原係選自 $A\beta$ 1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-10、1-11、1-12、1-16、1-28、3-6、3-7、13-28、15-24、17-28、25-35、33-42、35-40 及 35-42 之 $A\beta$ 片段。於本發明某些態樣中，該肽免疫原係選自 $A\beta$ 1-5、 $A\beta$ 1-7、 $A\beta$ 1-9 及

$A\beta$ 1-12 之 $A\beta$ 片段。於本發明某些態樣中，該肽免疫原係選自 $A\beta$ 1-5-L、 $A\beta$ 1-7-L、 $A\beta$ 1-9-L 及 $A\beta$ 1-12-L 之 $A\beta$ 片段，其中 L 為連接子。於本發明某些態樣中，該肽免疫原係選自 $A\beta$ 1-5-L-C、 $A\beta$ 1-7-L-C、 $A\beta$ 1-9-L-C 及 $A\beta$ 1-12-L-C 之 $A\beta$ 片段，其中 C 為半胱胺酸殘基。

於本發明某些態樣中，該肽免疫原係選自 $A\beta$ 16-22、 $A\beta$ 16-23、 $A\beta$ 17-23、 $A\beta$ 17-24、 $A\beta$ 18-24 及 $A\beta$ 18-25 之 $A\beta$ 片段。於本發明某些態樣中，該肽免疫原係選自 $A\beta$ 16-22-C、 $A\beta$ 16-23-C、 $A\beta$ 17-23-C、 $A\beta$ 17-24-C、 $A\beta$ 18-24-C 及 $A\beta$ 18-25-C 之 $A\beta$ 片段，其中 C 為半胱胺酸殘基。於本發明某些態樣中，該肽免疫原係選自 C- $A\beta$ 16-22、C- $A\beta$ 16-23、C- $A\beta$ 17-23、C- $A\beta$ 17-24、C- $A\beta$ 18-24 及 C- $A\beta$ 18-25 之 $A\beta$ 片段，其中 C 為半胱胺酸殘基。

於某些如上肽免疫原中，該異源多肽係選自具有 T-細胞抗原決定部位、B-細胞抗原決定部位及其組合之肽類。

於一具體例中，該蛋白質／多肽載體或該任意地依附在該載體上之多肽連接子之一或多個胺基酸分子之官能基可使用交聯劑來衍生化。於另一具體例中，該衍生性反應劑為一種零長度交聯劑。於另一具體例中，該衍生性反應劑為一種同雙官能交聯劑。於再一具體例中，該衍生性反應劑為一種異雙官能交聯劑。

於一較佳具體例中，該異雙官能反應劑為一種可與該蛋白質／多肽載體之一或多個胺基酸分子的初級或 ϵ -胺

官能基反應以及與該肽免疫原之一或多個胺基酸分子之突出硫醇基反應之反應劑。於一具體例中，該異雙官能反應劑為 N-琥珀醯亞胺基溴醋酸酯。

於另一具體例中，該初級或 ϵ -胺官能基為離胺酸。於再一具體例中，將該蛋白質／多肽載體之離胺酸之初級或 ϵ -胺官能基用 N-琥珀醯亞胺基溴醋酸酯來衍生化會使得該蛋白質／多肽載體上之離胺酸分子之初級或 ϵ -胺官能基溴乙醯化。於一更佳具體例中，該突出的硫醇基為該肽免疫原的半胱胺酸殘基，其可位在該肽免疫原的胺基端、該肽免疫原的羧基端或該肽免疫原的內部。

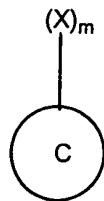
於另一具體例中，該硫醇基係用硫醇化劑如 N-乙醯基高半胱胺酸硫內酯、陶特試劑 (Traut's reagent, 2-亞胺硫烷) SATA (N-琥珀醯亞胺基 S-乙醯基硫醋酸酯)、SMPT (4-琥珀醯亞胺氧羰基-甲基-2-吡啶二硫甲苯)、硫 LC SPDP (硫琥珀醯亞胺基吡啶基二硫丙醯胺基乙酸酯)、SPSP (琥珀醯亞胺基吡啶基二硫丙酸酯)。於一較佳具體例中，用來把已活化蛋白質／多肽載體上游離之反應性官能基鈍化之加蓋劑係選自半胱胺、N-乙醯基半胱胺及乙醇胺。

於一特佳具體例中，用來把已活化蛋白質／多肽載體上游離之反應性官能基鈍化之加蓋劑係選自氫氧化鈉、碳酸鈉、碳酸氫銨及氨所組成之反應劑群組。

於一具體例中，該肽免疫原之胺基酸殘基之反應性基團為游離之硫氫基。

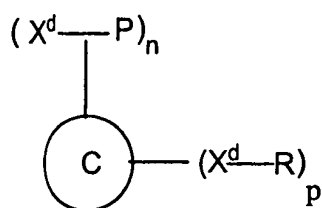
於其它具體例中，該一或多個官能基係位在連接子上，其係任意地依附在該蛋白質／多肽載體上。於一較佳具體例中，該連接子為肽連接子。於一更佳具體例中，該肽連接子為聚離胺酸。

於其它具體例中，本發明之第二方法係關於把含有 A β 肽或 A β 片段或 A β 類似物或其類似物之肽免疫原與具有如下結構之蛋白質／多肽接合在一起之方法，



其中 C 為蛋白質／多肽載體且 X 為位在該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之可衍生化官能基或者任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之可衍生化官能基，且其中 m 為大於 0 但小於或等於 85 之整數，該方法包含的步驟有：(a) 將位在該蛋白質／多肽載體上或位在任意地被接在該載體上之連接子之一或多個官能基衍生化以產生具有反應性部位之衍生化分子；(b) 讓步驟 (a) 之衍生化蛋白質／多肽載體與該肽免疫原之胺基酸殘基之反應性基團反應，以形成共價偶合之肽免疫原-蛋白質／多肽載體共軛物；及 (c) 進一步地將該共軛物與一種加蓋劑反應，好讓已活化蛋白質／多肽載體上之游離反應性官能基鈍化，使得已加蓋基團無法自由地

與其它分子包括蛋白質／多肽反應，藉以保存該載體之官能性，如此一來該共軛物即可保有引發所需之抗該肽免疫原之免疫反應之能力且若無載體則無法產生該等免疫反應，如此來產生一種具有如下結構之加蓋肽免疫原-蛋白質／多肽載體共軛物：



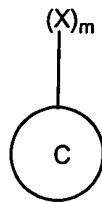
其中 C 為該蛋白質／多肽載體且 X^d 為位在該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之已衍生化官能基或者任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之已衍生化官能基，且其中

P 為肽免疫原分子，其係共價地依附到該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之已衍生化官能基上或者依附到任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之已衍生化官能基上；R 為加蓋分子，其係共價地依附到該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之已衍生化官能基上或者依附到任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之已衍生化官能基上；n 為大於 0 但小於或等於 85 之整數，且 p 為大於 0 但小於 85 之整數。

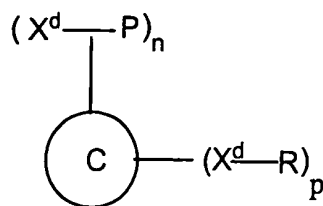
前文所述之第一方法的詳細具體例亦可應用在第二方

法製成之共軛物上。

於一具體例中，本發明係關於一種含有 $A\beta$ 肽或 $A\beta$ 片段或其類似物之肽免疫原與蛋白質／多肽載體之共軛物，其中該蛋白質／多肽載體具有如下結構：



其中 C 為蛋白質／多肽載體且 X 為位在該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之可衍生化官能基或者任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之可衍生化官能基，且其中 m 為大於 0 但小於或等於 85 之整數，且已加蓋之肽免疫原-蛋白質／多肽載體共軛物具有如下結構：

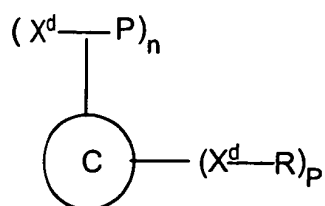


其中 C 為該蛋白質／多肽載體且 X^d 為位在該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之已衍生化官能基或者任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之已衍生化官能基，且其中 P 為肽免疫原分子，其係共價地依附到該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之已衍生

化官能基上或者依附在任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之已衍生化官能基上；R 為加蓋分子，其係共價地依附到該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之已衍生化官能基上或者依附到任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之已衍生化官能基上，藉以保存該載體之官能性，如此一來該共軛物即可保有引發抗該肽免疫原之所需免疫反應之能力且若無載體則無法產生該等免疫反應；n 為大於 0 但小於或等於 85 之整數，且 p 為大於 0 但小於 85 之整數。

如上第一及第二方法之詳細具體例亦可應用在如上所述之共軛物上。

於另一具體例中，本發明係關於以本發明第二方法所製造且含有 A β 肽或 A β 片段或其類似物之肽免疫原與蛋白質／多肽載體之共軛物，其具有如下結構：



其中 C 為該蛋白質／多肽載體且 X^d 為位在該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之已衍生化官能基或者位在任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之已衍生化官能基，且其中 P 為肽免疫原分子，其係共價地依附到該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之已

衍生化官能基上或者依附到任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之已衍生化官能基上；R 為加蓋分子，其係共價地依附到該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之已衍生化官能基上或者依附到任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之已衍生化官能基上，藉以保存該載體之官能性，如此一來該共軛物即可保有引發所需之抗該肽免疫原之免疫反應之能力且若無載體則無法產生該等免疫反應；n 為大於 0 但小於或等於 85 之整數，且 p 為大於 0 但小於 85 之整數。

如上第二方法之詳細具體例亦可應用在如上所述以第二方法製成之共軛物上。

於其它具體例中，本發明亦關於一種免疫原組成物，其含有用本發明之第二方法所產製之肽免疫原與蛋白質／多肽載體之共軛物，以及一或多種藥學可接受之賦形劑、稀釋劑及佐劑。

該第二方法之詳細具體例及藉此產生之共軛物亦可以應用在含有此等共軛物之免疫原組成物中。

於其它具體例中，本發明係關於一種在哺乳動物主體引起免疫反應之方法，其包含將有效份量之本發明免疫原組成物投予至該主體。

可應用在含有本發明共軛物之免疫原組成物之詳細具體例亦可應用在使用此等免疫原組成物之方法之具體例中。

序列簡要說明

SEQ ID NO:	序列	說明
1	DAEFR-C	A β 1-5-C
2	DAEFRHD-C	A β 1-7-C
3	DAEFRHDSG-C	A β 1-9-C
4	DAEFRHDSGYEV-C	A β 1-12-C
5	DAEFR-GAGA-C	A β 1-5-L-C
6	DAEFRHD-GAGA-C	A β 1-7-L-C
7	DAEFRHDSG-GAGA-C	A β 1-9-L-C
8	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C	A β 1-12-L-C
9	VEYGSDHRFEAD-C	A β 12-1-C
10	GAGA	接頭肽
11	PKYVKQNTLKLAT	流感血球凝集素: HA ₃₀₇₋₃₁₉
12	AKXVAAWTLKAAA	PAN-DR 肽(PADRE 肽)
13	EKKIAKMEKASSVFNV	瘧疾CS:T3抗原決定部位
14	FELLTRILTI	B型肝炎表面抗原: HB _s Ag ₁₉₋₂₈
15	DQSIGDLIAEAMDKVGNEG	熱休克蛋白質65: hsp65 ₁₅₃₋₁₇₁
16	QVHFQPLPPAVVKL	卡介二氏桿菌(BCG)
17	QYIKANSKFIGITEL	破傷風類毒素: TT ₈₃₀₋₈₄₄
18	FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	破傷風類毒素: TT ₉₄₇₋₉₆₇
19	KQIINMWQEVGKAMY	HIV gp120 T1
20	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C- FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE- DAEFRHD	A β ₁₋₇ /TT ₈₃₀₋₈₄₄ /C/TT ₉₄₇₋₉₆₇ /A β ₁₋₇
21	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN KGAIIGLMVGGVVIA	A β ₁₋₄₂
22	DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL	AN90549: A β ₁₋₇ /TT ₈₃₀₋₈₄₄ (以MAP4構型使用)
23	DAEFRHDFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	AN90550: A β ₁₋₇ /TT ₉₄₇₋₉₆₇ (以MAP4構型使用)

SEQ ID NO:	序列	説明
24	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	AN90542: A β ₁₋₇ /TT ₈₃₀₋₈₄₄ + TT ₉₄₇₋₉₆₇ (以線狀構型使用)
25	EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL	AN90576: A β ₃₋₉ /TT ₈₃₀₋₈₄₄ (以MAP4構型使用)
26	AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD	AN90562: A β ₁₋₇ /PADRE
27	DAEFRHD-DAEFRHDD-AEFRHDAKXVAAWTLKAAA	AN90543: A β ₁₋₇ x 3/PADRE
28	AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD	PADRE/A β ₁₋₇ x 3
29	DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA	A β ₁₋₇ x 3/PADRE
30	DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR	A β ₁₋₇ /白蛋白片段
31	FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR	A β ₄₋₁₀ /白蛋白片段
32	EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR	A β ₃₋₉ /白蛋白片段
33	PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD	HA ₃₀₇₋₃₁₉ /A β ₁₋₇ x 3
34	DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD	A β ₁₋₇ /HA ₃₀₇₋₃₁₉ /A β ₁₋₇
35	DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT	A β ₁₋₇ x 3/ HA ₃₀₇₋₃₁₉
36	DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT	A β ₁₋₇ x 2/ HA ₃₀₇₋₃₁₉
37	DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD	A β ₁₋₇ /HA ₃₀₇₋₃₁₉ / 瘧疾 CS/ TT ₈₃₀₋₈₄₄ /TT ₉₄₇₋₉₆₇ /A β ₁₋₇
38	DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	A β ₁₋₇ x 3/TT ₈₃₀₋₈₄₄ /C/TT ₉₄₇₋₉₆₇
39	DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	A β ₁₋₇ /TT ₈₃₀₋₈₄₄ /C/TT ₉₄₇₋₉₆₇

SEQ ID NO:	序列	說明
40	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGY VDSIQKGIQPKSGTQGNYYYYWKEFY STDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVV KVTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLS LTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLS LPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEIN FETRGKRGQDAMYEMAQACAGNRVR RSVGSSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLK EHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEE FHQTALEHPELSELKTVGTNPVFAGAN YAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAAL SILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSI ALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFV ESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPF HDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHD KITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSK THISVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSP VYVGNGVHANLHVAFHRSSEKIHSNEI SSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLFFEI KS	CRMβ ₁₉₇
41	ISQAVHAAHAEINEAGR	白蛋白片段
42	DAEFGHDSGFVVRHQKLVFFAEDVGSN KGAIIGLMVGGVVIA	鼠 Aβ ₁₋₄₂
43	VFFAEDVG-C	Aβ ₁₈₋₂₅ -C
44	LVFFAEDV-C	Aβ ₁₇₋₂₄ -C
45	KLVFFAED-C	Aβ ₁₆₋₂₃ -C
46	C-VFFAEDVG	C-Aβ ₁₈₋₂₅
47	C-LVFFAEDV	C-Aβ ₁₇₋₂₄
48	C-KLVFFAED	C-Aβ ₁₆₋₂₃
49	VFFAEDV-C	Aβ ₁₈₋₂₄ -C
50	LVFFAED-C	Aβ ₁₇₋₂₃ -C
51	KLVFFAE-C	Aβ ₁₆₋₂₂ -C
52	C-VFFAEDV	C-Aβ ₁₈₋₂₄
53	C-LVFFAED	C-Aβ ₁₇₋₂₃
54	C-KLVFFAE	C-Aβ ₁₆₋₂₂

本發明係關於一種產製肽免疫原-載體共軛物之方法，其中在載體上於活化過程中形成之活性官能基若未被反應掉，則會用加蓋劑如 N-乙醯基半胱胺來使其鈍化，以防止其作進一步反應。本發明亦關於用此等方法產製之加蓋載體-肽免疫原共軛物以及含有此等共軛物之免疫原組成物。

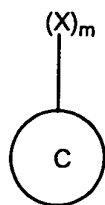
將小型或不良的免疫原分子如醣類經由接合作用增加免疫原性的策略已成功地運用數十年（參考例如 Goebel et al. (1939) J. Exp. Med. 69: 53），且已有許多免疫原組成物被加以描述，其係將已純化的被膜聚合物接合到載體蛋白質上且藉由此種“載體效果”來製造出更有效的免疫原組成物。例如 Schneerson et al. (J. Exp. Med. 152: 361-376, 1980) 已說明一種流感嗜血桿菌 b 多醣蛋白質共軛物，其可對此等微生物引起之疾病提供免疫性。PRP（多核糖核糖醇磷酸酯），一種流感嗜血桿菌 b 之被膜聚合物之共軛物，已顯示出比單獨含有該多糖之免疫原組成物更有效（Chu et al., (1983) Infect. Immun. 40:245; Schneerson et al. (1984), Infect. Immun. 45: 582-591）。還有，當使用一種游離多醣來免疫嬰兒時往往只能得到不良的抗體反應，但是把多醣與載體接合後就可以避免此種抗體反應不良之現象（Anderson et al. (1985) J. Pediatr. 107:346; Insel et al. (1986) J. Exp. Med. 158: 294）。

使用細菌性毒素或類毒素（該等毒素或類毒素已被常態地用來免疫人類（如破傷風或白喉）且為標準實務）作

為蛋白質載體之一項優點為使用該等毒素或類毒素可以引起對抗含被膜聚合物之病原體之免疫作用。

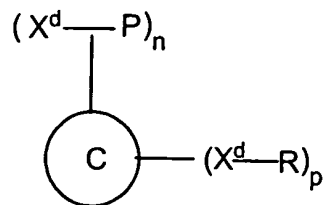
抗原性決定子 (antigenic determinant) / 半抗原-載體共軛物亦已被用來製造具高度特異性之單株抗體，其可以辨識位在偶合半抗原上獨特的化學抗原決定部位。所產生的單株抗體亦常被用來研究該抗原決定部位的結構及天然蛋白質彼此間的交互作用。於許多例中，用來製造此等單株抗體之抗原性決定子 / 半抗原為可代表較大蛋白質表面之嚴格抗原性部位之小型肽片段。可用來作為製造抗原性決定子 / 半抗原-載體共軛物之成功載體之要件為其具有免疫效能，並存在適當的官能基以供抗原性決定子 / 半抗原接合，而且即使在衍生化以後仍有合理的溶解性質及在活體內並無毒性。

本發明方法製成的共軛物便符合此等要件。該等共軛物可為使用在此所述之接合過程所製得之穩定免疫原-載體共軛物。該等共軛物係使用本發明之方法所製得的且其中具有如下結構之蛋白質 / 多肽會共價依附到肽免疫原上：



其中 C 為蛋白質 / 多肽載體且 X 為位在該蛋白質 / 多肽載體上之胺基酸殘基之可衍生化官能基或者為位在任意

地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之可衍生化官能基，且其中 m 為大於 0 但小於或等於 85 之整數，且其中該肽免疫原-蛋白質／多肽載體共軛物具有如下結構：



其中 C 為該蛋白質／多肽載體且 X^d 為位在該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之已衍生化官能基或者任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之已衍生化官能基； P 為肽免疫原分子，其係共價地依附到該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之已衍生化官能基上或者依附到任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之已衍生化官能基上； R 為加蓋分子，其係共價地依附到該蛋白質／多肽載體上之胺基酸殘基之已衍生化官能基上或者依附到任意地共價依附在該蛋白質／多肽載體上之肽連接子之胺基酸殘基之已衍生化官能基上藉以保存該載體之官能性，如此一來該共軛物即可保有引發所需之抗該肽免疫原之免疫反應之能力且若無載體則無法產生該等免疫反應； n 為大於 0 但小於或等於 85 之整數，且 p 為大於 0 但小於 85 之整數。

載體之選擇

某些肽免疫原含有引發免疫反應之適當抗原決定部位，但是太小而無法導致免疫。於此等情況下，會將肽免疫原連接到適當的載體上以輔助引發免疫反應。於前文圖式所表示之本發明方法製得之肽免疫原-載體共軛物中 C 為蛋白質／多肽載體，該等肽免疫原可直接透過載體本身之胺基酸殘基之已衍生化官能基或者間接地透過共價依附在該載體上之肽連接子之胺基酸殘基之已衍生化官能基而接合在一起。適當的蛋白質／多肽載體之實例包括但不限於：白蛋白（包括人類血清白蛋白）、匙孔帽貝血青蛋白、免疫球蛋白分子、甲狀腺球蛋白、卵白蛋白、MSCRAMMS、破傷風類毒素、來自其它致病細菌且毒性較低之類毒素包括其突變體，如白喉、大腸桿菌、霍亂或 *H. pylori*，或者減毒之毒素衍生物。一種此類載體為 CRM₁₉₇ 蛋白質（SEQ ID NO：40），其與白喉毒素有交叉反應。

其它載體還包括 T 細胞抗原決定部位，其會結合到多個 MHC 等位基因上如至少 75% 所有人類 MHC 等位基因。此等載體有時在此技術中係以“通用 T-細胞抗原決定部位”為人所知。具有通用 T-細胞抗原決定部位之示範性載體包括：

流感血球凝集素：HA ₃₀₇₋₃₁₉	PKYVKQNTLKLAT
	(SEQ. ID NO.11)
PAN-DR 肽 (PADRE 肽)	AKXVAAWTLKAAA

(SEQ. ID NO.12)

瘧疾 CS:T3 抗原決定部位

EKKIAKMEKASSVFNV

(SEQ. ID NO.13)

B 型肝炎表面抗原:HB_sAg₁₉₋₂₈ FELLTRILTI

(SEQ. ID NO.14)

熱休克蛋白質 65:hsp65₁₅₃₋₁₇₁ QSIGDLIAEAMDKVGNEG

(SEQ. ID NO.15)

卡介二氏桿菌(BCG)

QVHFQPLPPAVVKL

(SEQ. ID NO.16)

破傷風類毒素:TT₈₃₀₋₈₄₄

QYIKANSKFIGITEL

(SEQ. ID NO.17)

破傷風類毒素:TT₉₄₇₋₉₆₇

NNFTVSFWLRVPKVSASHLE

(SEQ. ID NO.18)

HIV gp120 T1:

KQIINMWQEVGKAMY

(SEQ. ID NO.19)

CRM₁₉₇

參考序列簡要說明

(SEQ. ID NO.40)

白蛋白片段

ISQAVHAAHAEINEAGR

(SEQ. ID NO.41)

可刺激或強化免疫反應且可與肽免疫原或半抗原接合之其它載體還包括細胞因子如 IL-1、IL-1 α 及 β 肽、IL-2、 γ INF、IL-10、GM-CSF 及趨化因子如 MIP 1 α 及 β 及 RANTES。免疫原肽類亦可被連接到可增加組織輸送通透

率之蛋白質／肽載體，如 O'Mahony, WO 97/17163 及 WO 97/17614 所述，其皆併此以供所有目的參考。

其它的載體還包括重組鏈球菌性 C5a 肽酶、釀膿鏈球菌 ORF1224、ORF1664 及 ORF2452、肺炎衣原體 ORF T367 及 ORF T858、肺炎雙球菌自溶酶、毒性較低之肺炎雙球菌自溶酶、生長因子及激素。

於本發明一較佳具體例中，該載體蛋白質為 CRM₁₉₇，其為一種白喉毒素之無毒突變株且係於初級序列上有一處胺基酸變異。於該分子胺基酸第 52 位置之甘胺酸由於單一核酸密碼子的變異而被一個麩胺酸所取代。由於此種改變，所以該蛋白質不具有 ADP-核糖基轉移酶活性且變得無毒。其分子量為 58,408 Da。CRM₁₉₇ 可根據美國專利第 5,614,382 號之方法以重組表現來大量製造，其併此以為參考。將醣類以及肽類接合到 CRM₁₉₇ 上之接合作用可透過連接離胺酸殘基之 ϵ -胺基來進行。從多種市售產物可完善地確定 CRM₁₉₇ 為一種針對 B-細胞抗原決定部位之優良及安全載體。

免疫原肽類

在此使用時，術語“肽免疫原”或“半抗原”為任何蛋白質或次單元結構／片段／由其衍生之類似物，當對哺乳動物投予時其可引發、促進或誘生免疫反應。更詳言之，此術語係用來指稱來自任何來源（細菌、病毒或真核生物）之多肽抗原性決定子，其可使用在此所揭示之方法偶合到

載體上。此等多肽免疫原／抗原性決定子可有病毒性、細菌性或真核細胞性來源。

肽免疫原可被接合到載體上用來防範、治療、預防或緩合多種人類病症以進行預防接種性治療。此等肽免疫原包括衍生自 39-43 個胺基酸之 $A\beta$ 肽，較佳為 42 個胺基酸之 $A\beta$ 肽，此種 $A\beta$ 肽為帕金森氏症之特徵斑塊的主要成份（參考 US 4,666,829；Glenner & Wong (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120:1131, Hardy (1984) TINS 20:1131; Hardy (1977) TINS 20:154），其係衍生自澱粉不溶素之澱粉樣肽，一種第 II 型糖尿病中胰島細胞製造的多肽物質，衍生自低密度脂蛋白基因產物之肽類，其與動脈硬化有關以及衍生自發炎性細胞因子及生長因子之抗原性肽類如干擾素 6 (IL-6)、腫瘤壞死因子 α (TNF- α) 及 GDF-8。此等真核性肽免疫原可包括 T-細胞 (CTL) 或 B-細胞抗原決定部位，其亦以 β -澱粉樣蛋白質或 A4 肽為人所習知。

$A\beta$ ，亦以 β -澱粉樣肽或 A4 肽為人所習知（參考 US 4,666,829; Glenner & Wong, biochem. Biophys. Res. Commun., 120, 1131 (1984)），為一種 39-43 個胺基酸之肽類，此為帕金森氏症之特徵斑塊的主要成份。 $A\beta$ 的生成係將較大蛋白質 APP 用兩種酶（被稱為 β 及 γ 分泌酶）加工所製成（參考 Hardy, TINS 20, 154(1997)）。已知與帕金森氏病有關之 APP 突變係在鄰近 β 及 γ 分泌酶作用部位之處或於 $A\beta$ 內部。例如，位置 717 係鄰近 γ 分泌酶將

APP 加工以製成 $A\beta$ 之剪切位，而位置 670/671 則鄰近 β 分泌酶剪切位。一般認為此等突變會與形成 $A\beta$ 之剪切反應相互作用而增加 42/43 個胺基酸形式之 $A\beta$ 量而造成 AD。

$A\beta$ 具有可固定以及活化典型性及替換性補體級聯之特殊性質。更詳言之，其會結合到 C1q 且最後結合到 C3bi 上。此種結合會促進與巨噬細胞結合且活化 B-細胞。此外，C3bi 會進一步地分解且然後以 T-細胞相關方式結合到 B 細胞上的 CR2，造成此等細胞的活化提高 10,000 倍。此等機制使得 $A\beta$ 引起之免疫反應程度超越其它抗原所引起的反應。

$A\beta$ 具有多種天然形式。人類類型的 $A\beta$ 有 $A\beta$ 39、 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 41、 $A\beta$ 42 及 $A\beta$ 43。此等肽類以及其與 APP 前體蛋白質間的關係係示於 Hardy et al., TINS 20, 155-158 (1997) 之第 1 圖中。例如 $A\beta$ 42 具有如下序列：

H₂N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-
His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-
Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-
Ala-OH (SEQ ID NO.21)。

$A\beta$ 41、 $A\beta$ 40 及 $A\beta$ 39 與 $A\beta$ 42 差異之處在於於 C 端分別略去 Ala，Ala-Ile 及 Ala-Ile-Val。 $A\beta$ 43 與 $A\beta$ 42 不同之處在於其 C 端多了羥丁胺酸之存在。

基於多個理由，在本發明方法中以 $A\beta$ 片段作為肽免疫原比起以完整分子作為免疫原更有利。首先，由於在

A β 內僅有特定的抗原決定部位會誘生出治療帕金森氏症之有效免疫反應，所以一劑含有此等抗原決定部位之片段比起同樣劑量之完整 A β 能提供更高莫耳濃度之有效免疫原抗原決定部位。其次，特定的 A β 肽免疫原可誘生抗澱粉樣蛋白澱積物之免疫反應，但不會對衍生 A β 之 APP 蛋白質引發顯著的免疫反應。第三，由於 A β 肽免疫原較小，所以製造此等免疫原比製造完整 A β 更容易。第四，完整 A β 會凝集在一起但是 A β 肽免疫原不會，可簡化與載體製成共軛物的製程。

某些 A β 肽免疫原具有來自天然肽之至少 2、3、5、6、10 或 20 個連續胺基酸之序列。某些肽免疫原具有不超過 10、9、8、7、5 或 3 個來自 A β 之連續胺基酸。於一較佳具體例中，係使用 A β 之 N 端段作為肽免疫原來製備共軛物。較佳肽免疫原包括 A β 1-5、1-6、1-7、1-10、1-11、3-7、1-3 及 1-4。例如 A β 1-5 之標示係指包括 A β N 端之殘基 1-5 之片段。以 A β 的 N 端開始且結束於殘基 7-11 間之殘基之 A β 片段為特佳。亦可使用 A β 1-12 之片段但較不好。於某些方法中，該片段為 A β 1-10 以外的 N 端片段。其它的較佳片段還有 A β 13-28、15-24、1-28、25-35、35-40、35-42 以及其它的內部片段及 C 端片段。

本發明某些 A β 肽為免疫原肽，其在投予至人類患者或動物時所產生之抗體能特異地結合到一或多個 A β 殘基 16 到 25 間之抗原決定部位上。較佳的片段為 A β 16-22、16-23、17-23、17-24、18-24 及 18-25。會特異地結合到

A β 殘基 16 到 25 間之抗原決定部位之抗體能特異地結合到溶解性 A β 上但不會與 A β 斑塊結合在一起。此等類型的抗體可特異性地結合到患者或動物模式循環系統內之溶解性 A β 上，但不會特異性地結合到患者或動物模式腦內之 A β 澱積物斑塊上。抗體對溶解性 A β 之特異性結合可抑制該 A β 被併入斑塊中，如此便可抑制患者發展出斑塊或者若在治療投藥前已發展出此等斑塊的話亦可抑制此等斑塊進一步長大或再產生的頻率。

較佳地，所投予之 A β 片段宜不含會引發 T-細胞反應之抗原決定部位。一般而言，T-細胞抗原決定部位會大於 10 個連續胺基酸。所以較佳的 A β 片段為 5-10 個連續胺基酸大小，較佳為 7-10 個連續胺基酸或最佳為 7 個連續胺基酸，即其長度足以引起抗體反應但不會產生 T 細胞反應。不含 T-細胞抗原決定部位是比較好的，因為此等片段無需此等抗原決定部位就可具有免疫反應且於某些次群組患者中此等抗原決定部位會引起不良的發炎反應 (Anderson et al., (2002) J. Immunol. 168, 3679-3701; Senior (2002) Lancet Neurol.1,3)。

以片段 A β 15-25 以及其 7-8 個連續胺基酸之次片段為佳，因為此等肽會持續地引發抗 A β 肽之高免疫反應。此等片段包括 A β 16-22、A β 16-23、A β 16-24、A β 17-23、A β 17-24、A β 18-24 及 A β 18-25。特佳的 A β 15-25 次片段為長度 7 個連續胺基酸之次片段。舉例來說 A β 15-21 之表示係指含有 A β 之殘基 15-21 但不含 A β 其它

殘基之片段，且較佳為 7-10 個連續胺基酸長。此等片段可引發抗體反應且其包括端特異（end-specific）抗體。

需將 A β 肽免疫原進行篩選以選取出具有清除或預防澱粉樣澱積活性者（參考 WO 00/72880，其全部併此以供所有目的參考）。投予 A β N 端片段可以誘生能於活體內及活體外辨識 A β 澱積之抗體。於某些方法中會使用缺乏至少 1 個（有時至少 5 或 10 個）天然 A β 型式之 C 端胺基酸之片段。例如，缺乏 5 個 C 端胺基酸之 A β 43 片段即包括了 A β N 端的前 38 個胺基酸。

除非另有說明，否則 A β 一詞係包括如上所述之天然人類胺基酸序列及其它包括等位基因、不同物種及誘發變異型之類似物。類似物一般與天然肽於一、二或多處位置有所不同，通常係由於保守性取代作用而產生。類似物與天然肽間典型地具有至少 80 或 90% 之序列同一性。某些類似物亦包括非天然胺基酸或者在 N 端或 C 端胺基酸之一、二或多處位置有修改。例如，於 A β 之位置 1 及／或 7 之天然天冬胺酸可為異天冬胺酸所取代。

非天然胺基酸之實例有 D、 α 、 α -取代胺基酸、N-烷基胺基酸、乳酸、4-羥基脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸、 ϵ -N,N,N-三甲基離胺酸、 ϵ -N-乙醯基離胺酸、O-磷絲胺酸、N-乙醯基絲胺酸、N-甲醯基甲硫胺酸、3-甲基組胺酸、5-羥基離胺酸、 ω -N-甲基精胺酸、 β -丙胺酸、鳥胺酸、己胺酸、戊胺酸、羥基脯胺酸、甲狀腺素、 γ -胺基丁酸、高絲胺酸、瓜胺酸、及異天冬胺酸。免疫原肽亦包

括 $A\beta$ 類似物及其片段。本發明某些治療劑為全-D 肽，如全-D $A\beta$ 、全-D $A\beta$ 片段或全-D $A\beta$ 或全-D $A\beta$ 片段之類似物。可依 WO 00/72880 所述，將該等片段及類似物用轉基因動物模式與未治療或安慰劑對照組比較來篩選其預防或治療效能。

肽免疫原亦包括較長多肽，其包括例如一種含有 $A\beta$ 肽及其它胺基酸之免疫原多肽。例如，較佳的免疫原多肽可為將 $A\beta$ 片段連接到一段異源胺基酸序列之融合蛋白質，其可引起抗該異源胺基酸序列之輔助者 T-細胞反應且藉此產生抗該 $A\beta$ 片段之 B-細胞反應。可依 WO 00/72880 所述，將此等多肽置於轉基因動物模式中與未治療或安慰劑對照組比較以篩選其預防或治療效能。

該等 $A\beta$ 肽、類似物、免疫原片段或其它多肽可採分散或凝集形式來投藥。分散型 $A\beta$ 或其片段意指單體型肽單元。分散型 $A\beta$ 或其片段一般係可溶的且可自行凝集成可溶性寡聚物、原纖維絲及 ADDLs。 $A\beta$ 或其片段之寡聚物通常具可溶性且主要呈 α -螺旋狀或隨機盤捲型。凝集型 $A\beta$ 或其片段係指 $A\beta$ 或其片段之寡聚物結合成不溶性 β -片狀組合。凝集型 $A\beta$ 或其片段亦指纖維狀聚合物。纖維絲通常不可溶。某些抗體會結合到溶解性 $A\beta$ 或其片段或凝集型 $A\beta$ 或其片段中之一者。某些抗體會同時結合到溶解性 $A\beta$ 或其片段及凝集型 $A\beta$ 或其片段兩者上。

免疫原肽亦包括免疫原肽單體之多聚體形式。 $A\beta$ 肽以外之其它免疫原肽應可引發對抗一或多種如上列示之較

佳 $A\beta$ 片段（如 $A\beta$ 1-3、17-、1-10 及 3-7）之免疫反應。

本發明之免疫原肽係使用本發明之方法連接到載體上而形成共軛物。該免疫原肽可用其胺基端、其羧基端或兩者連接到載體上來形成共軛物。任意地，在共軛物中可存在該免疫原肽之多個複本。

$A\beta$ 的 N 端片段可用其 C 端連接到載體肽上來形成共軛物。於此等共軛物中，該 $A\beta$ 片段的 N 端殘基會構成該共軛物的 N 端殘基。據此，此等共軛物有效誘生之抗體所結合之抗原決定部位為需要 $A\beta$ 之 N 端殘基呈游離形式之部位。本發明某些免疫原肽含有多個 $A\beta$ -N 端片段複本，其係以其 C 端連接到一或多個載體肽複本上以形成共軛物。合併到此等共軛物中之 $A\beta$ -N 端片段有時係以 $A\beta$ 1-3 開始且以 $A\beta$ 7-11 結束。 $A\beta$ 1-7、1-3、1-4、1-5 及 3-7 為較佳之 $A\beta$ -N 端片段。有些共軛物含有不同的 $A\beta$ -N 端片段且縱排成列。例如，一共軛物可含有 $A\beta$ 1-7 接著為 $A\beta$ 1-3 然後連接到載體上。

於某些共軛物中， $A\beta$ -N 端片段係用其 N-末端連接到載體肽上。同樣種類之 $A\beta$ -N 端片段可如 C 端鍵結般使用。某些共軛物含有載體肽連接到 $A\beta$ -N 端片段之 N-末端，其然後呈縱排地連接到一或多個額外的 $A\beta$ -N 端片段上。較佳地此等免疫原 $A\beta$ 片段在接合到適當的載體後所引發之免疫反應係特異地針對該 $A\beta$ 片段而不會對其它 $A\beta$ 片段有反應。

本發明之免疫原肽包括異源性免疫原肽。於某些免疫原肽中，係將 A β 片段連接到載體上以形成異源性免疫原肽。此等異源肽係使用本發明方法連接到載體上以形成共軛物。一些此等異源性免疫原肽所含 A β 片段係連接到破傷風類毒素抗原決定部位上，如 US 5,196,512，

EP 378,881，及 EP 427,347 號所述。任意地，一段免疫原肽例如可利用載體的 N 末端及 C 末端兩者來連接到一或多個載體複本上以形成該異源性免疫原肽。其它此種異源性免疫原肽還包括如 US 5,736,142 所述之連接到載體肽上之 A β 片段。例如，一段異源性免疫原肽可含有 A β 1-7 接著為 A β 1-3 然後為載體。此等異源性免疫原肽之實例包括：

A β 1-7 / 破傷風類毒素 830-844+947-967 皆呈線性構型
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE
(SEQ ID NO.:24)

述於 US 5,736,142 之肽，（皆呈線性構型）：

PADRE/A β 1-7:

AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD (SEQ ID NO.:26)

A β 1-7 x 3/PADRE:

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO.:27)

PADRE/A β 1-7 x 3:

AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO.:28)

A β 1-7/PADRE:

DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO.:29)

A β 1-7/ 白蛋白片段:

DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.:30)

A β 4-10/白蛋白片段:

FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.:31)

A β 3-9/ 白蛋白片段:

EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO.:32)

HA₃₀₇₋₃₁₉/A β 1-7 x 3:

PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD (SEQ ID NO.:33)

A β 1-7/HA₃₀₇₋₃₁₉/A β 1-7:

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD (SEQ ID NO.:34)

A β 1-7x 3/HA₃₀₇₋₃₁₉:

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO.:35)

A β 1-7x 2/HA₃₀₇₋₃₁₉:

DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO.:36)

A β 1-7/HA₃₀₇₋₃₁₉/ 瘧疾 CS/TT₈₃₀₋₈₄₄/TT₉₄₇₋₉₆₇/A β 1-7

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEQ ID NO.:37)

A β 1-7 x 3/TT₈₃₀₋₈₄₄/C/TT₉₄₇₋₉₆₇

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.:38)

A β 1-7/TT₈₃₀₋₈₄₄/C/TT₉₄₇₋₉₆₇

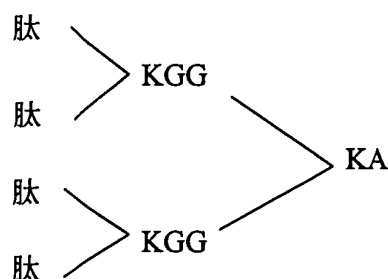
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.:39)

A β 1-7/TT₈₃₀₋₈₄₄/C/TT₉₄₇₋₉₆₇/A β 1-7

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-C-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEQ ID NO.:20)

某些異源性免疫原肽包含免疫原肽之 2^x 多聚體，其中 x 為 1-5 之整數。較佳地 x 為 1、2 或 3，以 2 為較佳。當 x 為 2 時，此等多聚體有 4 個免疫原肽以被稱為 MAP4 之較佳構型連接著（參考 US 5,229,490 號）。然後使用本發明方法將此等免疫原肽連接到一載體上以形成共軛物。

該 MAP4 構型顯示如下，其中該分支結構係在離胺酸的 N 端及側鏈胺兩者同時引發肽合成作用而造成的。視將離胺酸併入序列且令其分岔之次數而定，所產生的結構可具有多個 N 末端。於此實例中，在含有離胺酸之分支核上可製造出四個同樣 N-末端。此等多重性大幅增強了關聯 B 細胞的反應性。



此等異源性免疫原肽之實例包括：

A β 1-7/破傷風類毒素 830-844 呈 MAP4 構型：

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO.:22)

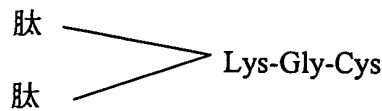
A β 1-7/破傷風類毒素 947-967 呈 MAP4 構型：

DAEFRHD-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO.:23)

A β 3-9/破傷風類毒素 830-844 呈 MAP4 構型：

EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO.:25)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL 於 2 分支樹脂上



該 A β 肽、類似物、活性片段或其它多肽可採組合或多聚體形式或分散形式來投藥。治療劑亦包括了單體性免疫原藥劑的多聚體。A β 肽以外的治療劑應引發抗一或多種前文所述之較佳 A β 片段（如 1-10、1-7、1-3 及 3-7）之免疫反應，且可使用本發明方法接合到載體上。較佳地，此等治療劑一旦被接合到適當載體上，即可引發特異性針對一種此等片段之免疫反應但不會對其它 A β 片段產生反應。爲了促進肽免疫原及載體之接合作用，可將額外的胺基酸加到該抗原性決定子的末端。此等額外的殘基亦可用來修改該肽免疫原之物理或化學性質。可在該肽免疫原的 C 或 N 末端引入胺基酸如酪胺酸、半胱胺酸、離胺酸、麩胺酸或天冬胺酸等。此外，還可引入含有胺基酸如甘胺酸及丙胺酸之肽連接子。另外，該抗原性決定子可經由末端 NH₂-基乙醯化如以烷醯基（C1-C20）或硫甘醇基乙醯化或用氨、甲胺等將末端-羧基醯胺化來加以修改而與天然序列有所不同。於某些例中，此等修改可提供用來連接撐體或其它分子之部位。

以在此所揭示之過程產製之本發明共軛物所用之肽免

疫原係透過鍵結來組合成聚合體（多聚體），或者可無需鍵結而用混合形式來配方成組成物。當肽被連接到同一種肽上形成同聚合體時，則在聚合體上會出現複數個重覆的抗原決定單元。例如，可使用多抗原肽（MPA）技術來建構含有 CTL 及／或抗體肽及肽兩者之聚合體。“CTL 抗原決定部位”係衍生自有效目標抗原內選定之抗原決定性區域。當肽有所不同時，像是如雞尾般之不同病毒亞型時，在該亞型內會有不同的抗原決定部位、不同 HLA 限制酶特異性，如此即可提供含有 T-輔助者抗原決定部位之肽類、具有重覆單元之雜聚合體。除了共價鍵結以外，本發明亦包括可形成分子間及結構內鍵結之非共價性鍵結。

此等肽免疫原及其類似物可用固相肽合成法或重組表現法來合成，或從天然來源取得。自動肽合成器可從多種供應商如 Applied Biosystems, Foster City, California 購得。

重組表現可在細菌（如大腸桿菌）、酵母菌、昆蟲細胞或哺乳動物細胞中進行。重組表現之步驟係述於 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, NY, 2nd ed., 1989)。某些免疫原肽亦可商業性取得（如 American Peptide Company, Inc. Sunnyvale, CA, 及 California Peptide Research, Inc., Napa, CA）。

亦可在肽或其它化合物之隨機庫中篩選出適合作為肽免疫原者。亦可使用許多類型之化合物來製成組合庫，其

係採一步一步的形式合成的。此等化合物包括多肽、 β -旋轉模仿劑、激素、寡聚性 N-取代甘胺酸、寡聚胺基甲酸酯等。諸化合物之大型組合庫亦可使用述於 WO 95/12608、WO 93/06121、WO94/08051、WO 95/35503 及 WO 95/30642（皆併此以供所有目的參考）編碼合成庫（ESL）法來構築。肽庫亦可使用噬菌體顯示法來產生（參考例如 Devlin, WO 91/18980）。

● 將免疫肽衍生化且接合到蛋白質載體上

肽免疫原依附到蛋白質／多肽載體之部位，以及用來把肽免疫原依附到該載體上之交聯劑的特性兩者對於其所誘生之抗體的特異性十分重要。爲了讓該免疫原能正確地被辨識出來，該肽免疫原必需以適當的方向偶合到該載體上。接下來爲了讓抗體辨識出沒有載體之游離肽免疫原部份，該肽免疫原-蛋白質／多肽載體共軛物必需以顯露及可接近形式來呈現該肽免疫原。將交聯反應導向肽免疫原的特殊部位通常可以達到最佳的方向性。一種以肽免疫原達成此目的的方法爲在肽合成期間於末端加上一個半胱胺酸殘基。如此可在肽的一端提供氫硫基以供載體接合。透過此基團交聯可使得該肽免疫原僅用一端依附，如此即可確保有恆定的方向性。

於肽免疫原-載體接合作用中，其目標並非維持該載體之天然態或穩定性，而在於以最佳方式呈現出該半抗原以供免疫系統辨識。爲了達到此目標，接合化學的選擇就

可控制所產生之抗該半抗原抗體之效價、親和力及特異性。在某些例子中很重要地必需選取一種交聯劑，其所含接頭臂必需長得足以非限制地呈現該抗原。控制載體表面肽免疫原之密度也很重要。肽免疫原取代太少可能只能引起微弱反應，甚至無法反應。事實上肽免疫原密度過高可能會造成免疫抑制作用且降低反應。此外，交聯劑本身也可能會引起不必要的免疫反應。必需考慮此等因素，所以在選擇時不僅要選擇適當的交聯劑，還要選擇適當的蛋白質／多肽載體與肽免疫原比例。

可以使用多種方法來將該蛋白質／多肽載體依附到該肽免疫原上。可透過末端或者離胺酸之 ϵ -胺基來進行離子性交互作用。也可以透過殘基側基團與肽免疫原間的氫鍵鍵結來進行。最後，蛋白質／多肽載體與免疫原肽間的結構交互作用亦可產生穩定的依附作用。

可使用多種交聯劑如零長度交聯劑、同雙官能交聯劑或異雙官能交聯劑來成功地產生肽免疫原-載體共軛物。在生物性接合作用中可用的最小反應劑系統被稱為零長度交聯劑。此等化合物可透過在兩分子間形成鍵結且並未加入額外原子而媒介兩分子的接合。所以係以分子的一個原子來作為連接子。在許多接合計劃中，最後的複合體基本上係在被交聯物質中加入外來結構來把此等化學成份交聯在一起。於某些應用中，此等介入連接子之存在對於所欲用途具有決定性。例如，在製備肽免疫原-載體共軛物時，所形成的複合物係要用來誘生針對所附半抗原之免疫

反應。有時候，有一部份免疫反應產生之抗體會對接合過程所用之交聯劑具有特異性。零長度交聯劑係在兩物質間媒介直接的鍵結作用，便能消除此類型交叉反應的可能性。

同雙官能反應劑，其為最先被用來修改及接合巨分子之交聯劑，係由兩端含有相同官能基之雙反應性化合物所組成（Hartman and Wold, 1966）。此等反應劑係藉著與兩分子上的共相同基團共價反應來把一蛋白質連接到另一者上。所以可簡單地將兩種蛋白質與同雙官能反應劑混合在一起，來使得一蛋白質上之離胺酸 ϵ -胺基或 N-端胺與第二種蛋白質上相同官能基交聯在一起。

異雙官能接合反應劑則含有兩種不同的反應性基團，其可與蛋白質及另一巨分子上不同的官能基標的偶合在一起。例如，一部份載體交聯劑可含有胺-反應性基團，另一部份則含有硫氫基-反應性基團。其結果使得該反應劑具有針對標的分子所選定部份進習交聯反應的能力，如此可對該接合過程有更佳控制。

異雙官能反應劑可用兩步驟或三步驟方式來交聯蛋白質及其它分子，如此便可限制聚合的程度，此為使用同雙官能交聯劑常產生的狀況。

近來有許多方法可用零長度、同雙官能或異雙官能交聯劑來將肽免疫原偶合到蛋白質／多肽載體上。多數方法會形成胺、醯胺、胺基甲酸酯、異胺基甲酸酯或二硫化物鍵結，有時會形成硫醚。將蛋白質或肽偶合到肽上的最常

用方法為使用雙官能交聯劑。此為兩端具有活性基團之小型接頭分子。該等接頭分子在兩端各具有相同或不同的活性基團。最常用的活性官能基團、偶合基團及所形成的鍵結為：

1. 醛 - 胺基 → 次級胺
2. 馬來醯亞胺 - 硫氫基 → 硫醚
3. 琥珀醯亞胺 - 胺基 → 醯胺
4. 亞胺酸酯 - 胺基 → 醯胺
5. 苯基疊氮化物 - 胺基 → 苯基胺
6. 醯基鹵 - 氫硫基 → 硫醚
7. 吡啶基二硫化物 - 氫硫基 → 二硫化物
8. 異硫氰酸鹽 - 胺基 → 異硫脲

特定載體蛋白質之反應性，換句話說為其用交聯劑修改來接合到肽免疫原的能力，係由其胺基酸組成、個別胺基酸在分子三級結構中的序列位置、以及肽免疫原之胺基酸組成所決定。

在位於蛋白質／肽載體及其它肽（如蛋白質／肽載體及肽免疫原）間的連接子（“L”）之例中，此等連接子典型地係選自 Ala、Gly 或其它非極性胺基酸之中性連接子或中性極性胺基酸。於特定具體例中，該中性連接子為 Ala。應瞭解地任意存在之連接子不需要係由同樣殘基所組成且所以可為異寡聚體或同寡聚體。示範性連接子包括 Ala 之同寡聚體。當存在時，該連接子通長有至少一或兩個殘基長，最常見為三到六個殘基長。於其它具體例中，

該蛋白質／多肽載體係被接合到肽免疫原上，較佳係以胺基端與該蛋白質／肽載體接合在一起。該等肽可用中性連接子如 Ala-Ala-Ala 等連接在一起，較佳地進一步含有一個依附在離胺酸（Lys）殘基之 α 及 ϵ 胺基酸上之脂質殘基如棕櫚酸等（（PAM）2Lys），其典型地係經 Ser-Ser 鍵結等依附到該肽共軛物之胺基端。

於本發明某些態樣中，該肽免疫原為一種選自 $A\beta$ 1-5-L、 $A\beta$ 1-7-L、 $A\beta$ 1-9-L 及 $A\beta$ 1-12-L 之 $A\beta$ 片段。於本發明某些態樣中，該連接子為 GAGA（SEQ IN NO：10）。

為了促進肽眼免疫原與載體之接合作用，將額外的胺基酸加到該抗原性決定子之末端。該額外的殘基亦可用來修改該肽免疫原的物理或化學性質。可將胺基酸如酪胺酸、半胱胺酸、離胺酸、麩胺酸或天冬胺酸等引入該肽免疫原的 C-或 N-末端。此外，還可引入含有胺基酸如甘胺酸及丙胺酸之肽連接子。另外，該抗原性決定子可經由末端 NH_2 -基乙醯化如烷醯基（C1-C20）或硫甘醇基乙醯化或用氨、甲胺等將末端-羧基醯胺化來加以修改而與天然序列有所不同。於某些例中，此等修改可提供用連接撐體或其它分子之部位。

於本發明某些態樣中，該肽免疫原為一種選自 $A\beta$ 1-5-C、 $A\beta$ 1-7-C、 $A\beta$ 1-9-C 及 $A\beta$ 1-12-C 之 $A\beta$ 片段，其中 C 為半胱胺酸殘基。於本發明某些態樣中，該肽免疫原為一種選自 $A\beta$ 1-5-L-C、 $A\beta$ 1-7-L-C、 $A\beta$ 1-9-L-C 及

A β 1-12-L-C 之 A β 片段。

該等肽免疫原係直接地或經由位於該肽免疫原之胺基或羧基末端之連接子來連接到該蛋白質／肽載體上。該肽免疫原或該蛋白質／肽載體之胺基末端可被乙醯化。此外，該肽免疫原-蛋白質／肽載體共軛物可經由一或多個接頭殘基如下文所述之 Gly、Gly-Gly、Ser、Ser-Ser 來連接到特定烷醯基（C1-C20）脂質上。其它有用的脂質基團還包括膽固醇、脂肪酸等。

肽免疫原可藉著化學交聯來連接到載體上。將免疫原連接到載體上之技術包括使用 N-琥珀醯亞胺基-3-（2-吡啶硫基）丙酸鹽（SPDP）（Carlssonm J et al. (1978) *biochem J*, 173: 723），及琥珀醯亞胺基 4-（N-馬來醯亞胺甲基）環己烷-1-羧酸酯（SMCC）（若該肽缺乏氫硫基，可藉由在半抗原上添加一個半胱胺酸來提供。此等反應劑可在彼此間及蛋白質上的肽半胱胺酸殘基間形成二硫化物鍵結及透過離胺酸上的 ϵ -胺基或其它胺基酸上的它種游離胺基來形成醯胺鍵結。多種此等二硫化物／醯胺形成反應劑係述於 *Immuno. Rev.* 62: 85 (1982) 中。其它雙官能偶合劑則會形成硫醚而非二硫化物鍵結。該等硫醚形成劑包括 5-馬來醯亞胺己酸、2-溴乙酸及 2-碘乙酸、4-（N-馬來醯亞胺甲）機環己烷-1-羧酸之反應性酯。該等羧基團可藉由將其與琥珀醯亞胺或 1-羥基-2-硝基-4-硫酸鈉鹽結合來被活化。

最常見地，離胺酸為載體蛋白質上數量最多的胺基酸

殘基，且此等殘基可用交聯反應劑來修改而生成親核性部位，其而後可被偶合到半抗原上。此等偶合作用係透過化學活化之半抗原分子上任何一個親水部位來進行。其包括舉例來說有精胺酸之胍基、麩胺酸及天冬胺酸之羧基、半胱胺酸之氫硫基、及離胺酸之 ϵ -胺基酸。修改蛋白質使其得以與其它基團偶合之修改作用可使用交聯劑來達成，該交聯劑可與蛋白質載體或半抗原分子的任一側鏈反應。

於本發明一態樣中，具有或不具有接頭分子之載體蛋白質可用能將反應性部位引入載體蛋白質分子之反應劑來官能化（衍生化），其可被進一步修改再引入親核性基團。於一具體例中，該載體係與鹵乙醯化劑反應，該反應劑較佳地會與多種蛋白質胺基酸殘基上的官能基如半胱胺酸的氫硫基、離胺酸殘基的初級 ϵ -胺基團、 α -胺之 α 末端、甲硫胺酸之硫醚及組胺酸之兩個咪唑醯基側鏈之氮原子來反應（Gurd, 1967）。於一較佳具體例中，該載體蛋白質之離胺酸殘基上之初級 ϵ -胺基係用 b N-羥琥珀醯亞胺基溴乙酸鹽來衍生化以生成溴乙醯化載體。肽免疫原及已活化蛋白質載體之接合係藉由將已活化載體緩慢地加到含有該肽免疫原之溶液中來進行。

藉由使用本發明方法，可將文中 B 部份討論之肽免疫原與任何文中 A 部份討論之載體接合在一起。從本發明方法製成的共軛物會被用來當作被動／活性預防接種治療中之免疫原以誘生抗 A β -抗體之產生。進一步地，連接到載體上之 A β 或 A β -片段可被投予至實驗動物以製造抗

A β 之單株抗體。

於本發明一態樣中，該共軛物為選自 A β 1-7-CRM₁₉₇、(A β 1-7 x 3)-CRM₁₉₇ 及 (A β 1-7 x 5)-CRM₁₉₇ 之共軛物。於本發明另一態樣中，該共軛物係選自 CRM₁₉₇-A β 1-5、CRM₁₉₇-A β 1-7、CRM₁₉₇-A β 1-9 及 CRM₁₉₇-A β 1-12。於本發明另一態樣中，該共軛物係選自 A β 1-5-C-CRM₁₉₇、A β 1-7-C-CRM₁₉₇、A β 1-9-C-CRM₁₉₇、A β 1-12-C-CRM₁₉₇、A β 16-23-C-CRM₁₉₇、A β 17-24-C-CRM₁₉₇、A β 18-25-C-CRM₁₉₇、CRM₁₉₇-C-A β 16-23、CRM₁₉₇-C-A β 17-24、CRM₁₉₇-C-A β 18-25、A β 16-22-C-CRM₁₉₇、A β 17-23-C-CRM₁₉₇、A β 18-24-C-CRM₁₉₇、CRM₁₉₇-C-A β 16-22、CRM₁₉₇-C-A β 17-23、CRM₁₉₇-C-A β 18-24、A β 1-9-C-CRM₁₉₇、A β 1-12-C-CRM₁₉₇。於本發明再一具體例中，該共軛物係選自 A β 1-5-L-C-CRM₁₉₇、A β 1-7-L-C-CRM₁₉₇、A β 1-9-L-C-CRM₁₉₇ 及 A β 1-12-L-C-CRM₁₉₇。

加蓋

使用能將反應性部位引入載體上及／或半抗原分子上之反應性胺基酸分子側鏈之偶合劑之一項缺點為：若反應性部位未經中和則其可在活體外或活體內與任何不良分子自由反應。於本發明方法中，未反應官能基之加蓋可藉由讓具有突出反應性基團之共軛物與可將該等反應性基團鈍化／加蓋之反應劑反應來進行。可用於本發明接合過程之

鈍化／加蓋反應劑之實例有半胱胺、N-乙醯基半胱胺、及乙醇胺。另外，加蓋可藉著與氨或碳酸氫銨反應來進行，任一者皆可將鹵乙醯基轉變成胺乙醯基。加蓋亦可藉由氫氧化鈉或碳酸鈉以鹼性 pH 值（9.0-9.8）來進行，其鹵乙醯基轉變成羥乙醯基。相對於與半胱胺衍生物、乙醇胺等反應，將鹵乙醯基轉變成胺乙醯基或羥乙醯基的一項潛在優點為與氨或氫氧化物／碳酸鹽反應時可引入體積較小之化學官能基團。如此產生之加蓋官能基如胺乙醯基或羥乙醯基可對共軛物的載體部份造成相對較小的干擾性。可依需要使用已知方法來純化加蓋之肽免疫原-載體蛋白質，此等方法如層析（膠過濾、離子交換、厭水性交互作用或親和力）、透析、超過濾-通透過濾、使用硫酸銨或醇類作選擇性沉澱等。

免疫原共軛物及組成物

該加蓋肽免疫原-載體蛋白質共軛物係以免疫原組成物之形式來投予至哺乳動物，特別是人類以供預防及／或治療。本發明共軛物係用來引發及／或增強抗該等免疫原之免疫反應。例如，CTL-載體共軛物係用來治療及／或預防病毒感染，澱粉樣變性病、癌症等。另外，亦可使用會誘生抗體反應之肽免疫原-載體共軛物。

於治療性應用中，本發明之共軛物係投予至已患有澱粉樣變性病如阿茲海默氏症之個體。此等處於疾病培育期或急症期之患者可個別使用本發明之共軛物或配合其它適

當療法來治療。

於治療性應用中，本發明之免疫原組成物可投予至患者，其份量係足以引起抗該澱粉樣斑之有效 CTL 反應或體液反應，以治癒或至少部份地遏阻疾病進程、症狀及／或併發症。足以達到此等目的之份量被稱為“治療有效劑量”。可有效達到此用途目的之份量部份將視該肽組成物、投藥方式、欲治療疾病之階段及嚴重性、患者體重及一般健康狀態、及處方醫師的判斷來決定。

在治療性或預防性投藥作首次預防接種時本發明免疫原組成物之治療有效劑量一般的範圍為 70 公斤患者使用約 $0.1 \mu\text{g}$ 到約 $10,000 \mu\text{g}$ 肽，通常為 0.1 到約 $8000 \mu\text{g}$ ，更佳為約 0.1 到約 $5000 \mu\text{g}$ 且最佳為 0.1 到約 $1000 \mu\text{g}$ 。於投予此等劑量之後，視患者反應及所測得特異性免疫反應之情況而定，在數週或數個月後的追加投藥計劃中所用之追加劑量為約 $0.1 \mu\text{g}$ 到約 $1000 \mu\text{g}$ 肽。

進一步地，本發明可預防性地使用以防止及／或緩和澱粉樣變性病。有效劑量如前所述。此外，熟悉此技術者將瞭解如何適當地調整或修正預防療法，例如使用追加促升投藥及調整投藥劑量及投藥計劃。

治療性投藥可在首次出現疾病徵兆時開始進行。然後接著進行追加投藥直到疾病病程停止或逆轉或症狀減輕一段時期。

本發明治療或預防處理用之免疫原組成物可非經腸、局部、靜脈內、經口、皮下、經動脈、顱內、腹腔內、鼻

內或肌肉內途徑來作預防性或治療性處理。免疫原劑投藥的一種典型途徑為經皮，不過其它途徑同樣有效。其它常用的途徑為肌肉內注射。此種類型的注射常在手臂或大腿肌肉內進行。於某些方法，藥劑會直接注射到澱積物累積的特殊組織，例如顱內注射。投予抗體時較佳係使用肌肉內注射或靜脈內灌注。於某些方法中，係將特殊抗體直接注射到顱內。基於投藥的容易性，本發明免疫原組成物特別適合口服投藥。本發明進一步提供一種非經腸投藥的免疫原組成物，其含有肽或共軛物之溶液，溶於或懸浮於一種可接受載體，特別是水性載體內。

有多種稀釋劑、賦形劑及緩衝液可使用，例如水、緩衝水、磷酸鹽緩衝鹽水、0.3%甘胺酸、玻璃酸等。此等組成物亦可用傳統習知消毒技術來滅菌或可過濾滅菌。產生之水溶液可就此分裝使用或者被冷凍乾燥，該等冷凍乾燥製劑可在投藥前與無菌溶液合併。此等組成物可含有接近生理條件需要之藥學可接受輔助物質，如緩衝液、肌肉彈性調整劑、濕化劑等，如醋酸鈉、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、單月桂酸山梨聚糖、油酸三乙醇胺等。

固體載劑中可使用習知的無毒載劑。其可包括例如藥用級甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、滑石、纖維素、葡萄糖、蔗糖、碳酸鎂等。口服投藥之藥學可接受無毒組成物可藉由併入任何常用賦形劑例如先前列示之賦形劑以及一般為10-95%之活性成份（即本發明一或多種共軛物）且更佳為濃度25-75%之活性成份來製成。

在藥學調合物中本發明免疫原組成物之濃度變化極大，可從低於約 0.1 重量%，到通常為約 2 重量%或更少，到多達 20 重量%到 50 重量%，且將依所選用之特殊投藥模式主要根據流體體積、黏度等來選用。

本發明共軛物亦可經由脂質體來投藥，該脂質體可將共軛物瞄準特殊組織如淋巴組織或瞄準感染細胞來投予，且可增加該肽組成物之半衰期壽命。脂質體包括乳液、泡沫、膠粒、不溶性單層體、液態結晶、磷脂質分散液、單層體等。於此等製劑中，欲運送之組成物會被合併成脂質體的一部份，其可單獨存在或與一種能與大量存在於淋巴細胞內之受器相結合之分子接合在一起。此等分子包括能與 CD45 抗原結合之單株抗體，或者以及其它治療性或免疫原組成物。所以，裝填有本發明組成物之脂質體可針對淋巴細胞部位來運送所選用之治療性／免疫原性肽組成物。用於本發明之脂質體係由標準囊泡形成脂質所形成，其一般包括中性及帶負電磷脂質及固醇如膽固醇。脂質的選用一般要考慮脂質體大小、酸不穩定性及脂質體於血流中的穩定性來決定。多種方法可用來製備脂質體，如述於 Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980)，美國專利第 4,235,871、4,501,728、4,873,028 及 5,019,369 號皆併此以為參考。

在以氣霧劑投藥時，本發明組成物較佳呈細分形式與一種界面活性劑及推進劑一起供應。該組成物典型的比例為 0.01-20 重量%，較佳為 1-10 重量%。當然，該界面活

性劑必需無毒且較佳地溶於推進劑中。此等化學劑的代表為含有 6 到 22 個碳原子之脂肪酸酯類或部份酯，如己酸、辛酸、月桂酸、棕櫚酸、硬脂酸、亞油酸、亞麻酸、油硬脂酸、油酸以及脂族多氫醇或其環狀酐。可採用混合酯如混合或中性甘油酯。該界面活性劑可構成 0.1-20 重量 % 之組成物，較佳為 0.25-5 重量 %。組成物之平衡劑通常為推進劑。若有需要可包括載體與卵磷脂以作鼻內投藥。

本發明之共軛物可任意地組合至少部份有效地治療及／或緩和及病及／或其症狀之其它藥劑來投予。於澱粉樣澱積發生在腦部之阿茲海默氏症及唐氏徵候群之例中，本發明共軛物可組合能增加本發明藥劑通過血腦屏障之通透性之其它藥劑來投予。

該免疫原組成物典型地含有佐劑。佐劑為一種與免疫原或抗原一起投藥時可加強免疫反應之物質。多種細胞因子及淋巴因子已顯示出具有免疫調節功能，所以可用來當作佐劑，包括但不限於白介素 1- α 、1- β 、2、4、5、6、7、8、10、12（參考美國專利第 5,723,127 號）、13、14、15、16、17 及 18（及其突變型），干擾素 α 、 β 及 γ ，粒細胞-巨噬細胞集落刺激因子（參考例如美國專利第 5,078,996 號）、巨噬細胞集落刺激因子、粒細胞集落刺激因子、CSF、及腫瘤壞死因子 α 及 β 。可用於本發明之其它佐劑還有趨化因子，包括但不限於 MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 及 RANTES。黏附分子如選凝素像是 L-選凝素、P-選凝素及 E-選凝素亦可用來當作佐劑。其它可用的

佐劑包括但不限於類黏蛋白分子，如 CD34、GlyCAM-1 及 MadCAM-1、整連蛋白家族之一員如 LFA-1、VLA-1、Mac-1 及 p150.95，免疫球蛋白超族之一員如 PECAM、ICAMs 如 ICAM-1、ICAM-2 及 ICAM-3，CD2 及 LFA-3，共刺激分子如 CD40 及 CD40L、生長因子包括血管生長因子、神經生長因子、成纖維細胞生長因子、表皮細胞生長因子、B7.2、PDGF、BL-1、及血管內皮細胞生長因子、受器分子包括 Fas、TNF 受器、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2 及 DR6。其它佐劑分子還包括 Caspase (ICE)。亦可參考國際專利公告第 WO98/17799 及 WO99/43839 號，其全部併此以供所有目的參考。

可用來增強免疫反應之適當佐劑包括但不限於 MPL™ (3-O-去醯基單磷醯基脂質 A; Corixa, Hamilton, MT)，其係述於美國專利第 4,912,094 號且該專利併此以爲參考。同樣適合用來作爲佐劑的還有合成性脂質 A 類似物或胺烷基葡糖胺磷酸鹽化合物 (AGP)、或其衍生物或類似物，其可取自 Corixa (Hamilton, MT) 且係述於美國專利第 6,113,918 號，其併此以爲參考。一種此類 AGP 爲 2-[(R)-3-十四烷醯氧基十四烷醯胺基]乙基 2-去氧-4-O-麟-3-O-[(S)-3-十四烷醯氧基十四烷醯基]-2-[(R)-3-十四烷醯氧基-十四烷醯胺基]-b-D-吡喃葡萄糖甙，其以 529 爲人所習知 (亦以 RC529 爲人所知; Corixa)。此種 529

佐劑可被配方成液體形式（529AF）或穩定的乳液（529SE）。

其它的佐劑還包括礦物油及水乳液，鈣鹽如磷酸鈣、鋁鹽（如明礬）如氫氧化鋁、磷酸鋁等，Amphigen, Avridine、L121／鯊烯、D-交酯-聚交酯／甌、pluronic 酸、多元醇、胞壁醯二肽、死亡的博代氏桿菌（*Bordetella*）、皂苷、如 StimulonTM QS-21（Antigenics, Framingham, MA），其係述於美國專利第 5,057,540 號且該文件併為參考資料 3 以為參考，及由其製成的顆粒如 ISCOMS（免疫刺激性複合物）、結核桿菌（*Mycobacterium tuberculosis*）、細菌性脂多醣、合成性聚核苷酸如含有 CpG motif 之寡聚核苷酸（美國專利第 6,207,646 號，其併此以為參考），百日咳類毒素（PT）、或大腸桿菌熱-不穩定毒素（LT）、特別是 LT-K63、LT-R72、PT-K9／G129；參考例如國際專利公告第 WO 93/13302 及 WO 92/19265 號，其併此以供所有目的參考。

同樣可用來作為佐劑的還有霍亂毒素及其突變體，包括述於已公開之國際專利申請案第 WO 00/18434 號者（其中於胺基酸位置 29 之麩胺酸已被另一種胺基酸（除了天冬胺酸以外之胺基酸，較佳為組胺酸）所替代）。類似的 CT 毒素或其突變物係述於已公開之國際專利申請案第 WO 02/098368 號（其中於胺基酸位置 16 之異白胺酸已被另一種胺基酸所替代，其可單獨存在或合併有胺基酸位

置 68 之絲胺酸被另一種胺基酸替代的情形；及／或其中位於胺基酸位置 72 之纈胺酸被另一種胺基酸替代）。其它 CT 毒素則述於已公開之國際專利申請案第 WO 02/098369 號（其中位於胺基酸位置 25 之精胺酸被另一種胺基酸替代；及／或有一個胺基酸插到胺基酸位置 49 之處；及／或有兩個胺基酸插到胺基酸位置 35 及 36 之處）。

應了解地在本說明書中所有引用之參考資料即使用任何理論來解釋本發明結果也不能用以限制本發明之範圍。基於本發明可發揮效用之方法的獨立性，在此所述之結果及優點可參考如下實施例來達成。

對於熟悉此技術者極明顯地可在不悖離後附申請專利範圍之精神或範疇下進行許多改變及修正。所有在此說明書中提到的公告、專利及專利申請案全部併此以供所有目的參考，如同特殊且個別標示地併用各個公告、專利及專利申請案以爲參考。

【實施方式】

實施例 1

CRM₁₉₇ 與 A β 肽的接合

半抗原／抗原性肽的接合係使用如下所述之方法（第 1 圖）將已活化且具有 39 個離胺酸殘基之 CRM₁₉₇ 載體與具有突出硫醇基之半抗原／抗原性肽反應來進行。所有 A β 肽於羧基端含有半胱胺酸殘基以促使此等肽經由半胱胺酸基硫氫基來接合到載體蛋白質上。此等肽可用固相合

成來產生。

I. 活化

將 CRM₁₉₇ 之游離胺基與過量溴乙酸 N-羥基琥珀醯亞胺酯 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Bernatowicz and Matsueda, 1986) 反應來溴乙醯化。

在 CRM₁₉₇ (約 15 mg) 之冰冷卻溶液中加入 10% (v/v) 1.0 M 碳酸氫鈉 (pH8.4)。將重量與所用 CRM₁₉₇ 相同之溴乙酸 N-羥基琥珀醯亞胺酯溶於 200 μ L 二甲醯甲醯胺 (DMF) 中，緩慢地加到 CRM₁₉₇ 內，且於室溫黑暗下溫和攪拌 1 小時。所產生的溴乙醯化 (活化) 蛋白質可藉著通過去鹽 (P6-DG) 管柱並使用 PBS / 1mM EDTA (pH7.0) 作為溶析液來純化。純化後，將相當於活化 CRM₁₉₇ 之餾份合併且用 BCA 檢定來估算蛋白質濃度。用溴乙酸 N-羥基琥珀醯亞胺酯處理前及處理後之蛋白質胺基用 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBSA) 來反應，其可作為溴乙醯化的指標 (Means et al., 1972)。

II. 接合

在接合前，先將肽與 5,5'-二硫-雙 (2-硝基苯甲酸) [艾蒙試劑] 反應以確定游離-SH 基團的量 (介於 62-88% 已還原)。對於前 4 種 A β 肽 (胺基酸 1-7 無連接子、胺基酸 1-12 具 GAGA 連接子 (SEQ ID NO: 10)、胺基酸 1-9 具 GAGA 連接子 (SEQ ID NO: 10)、及胺基酸 1-7 具

GAGA 連接子 (SEQ ID NO: 10)) , 約有 8.0-10.0 mg 肽被溶於無菌蒸餾水中使得濃度為約 20 mg/ml。以 1:1 比例 (w/w) 將肽緩慢地加到冷的已活化 CRM₁₉₇ 中且加入 20-26 μ l 之 1N NaOH 來把 pH 值調整成約 7.0-7.2。把所產生的物質置於黑暗 4°C 下溫和攪拌隔夜, 接著於黑暗 pH7.2 下針對 PBS 的兩種 IL 變化透析。至於其次 4 種 A β 肽 (胺基酸 1-5 無連接子、胺基酸 1-9 有接頭、胺基酸 1-12 有接頭、及胺基酸 1-5 有接頭), 用艾蒙試劑反應以確定游離 -SH 基量。將 CRM₁₉₇ 溴乙醯基化、純化且與 TNBSA 反應如前所述。各個肽之 pH 值可藉著加入體積為溶解肽 2.2 倍之 0.1 M NaPO₄ (pH 8.5) 來調整成 pH 7.0。以 1:1 比例 (w/w) 將肽緩慢地加到冷的已活化 CRM₁₉₇ 中且於黑暗 4°C 下任其反應隔夜。將所產生之物質透析。如上所述並採取如下修正來將終控制肽 (1-12 逆向聚體) 接合到 CRM₁₉₇ 上。與把肽 pH 值調整成 7.0 不同地, 已活化 CRM₁₉₇ 之 pH 值係藉著加入 20% (v/v) 0.5M NaPO₄ (pH8.0) 來調整。於透析後, 各個共軛物會被轉移到無菌 15mL 聚丙烯管中, 用鋁箔止包裹住, 且儲存在 4°C。而後載體上反應性胺基殘基活化的情形可使用質譜儀來確認。

共軛物	致免疫肽
A β 1-5-C-CRM ₁₉₇	DAEFR-C (SEQ. ID. NO.:1)
A β 1-7-C-CRM ₁₉₇	DAEFRHD-C (SEQ. ID NO.:2)
A β 1-9-C-CRM ₁₉₇	DAEFRHDSG-C (SEQ ID NO:3)

A β 1-12-C-CRM ₁₉₇	DAEFRHDSGYEV-C (SEQ ID NO:4)
A β 1-5-L-C-CRM ₁₉₇	DAEFR-GAGA-C (SEQ ID NO.:5)
A β 1-7-L-C-CRM ₁₉₇	DAEFRHD-GAGA-C (SEQ ID NO.:6)
A β 1-9-L-C-CRM ₁₉₇	DAEFRHDSG-GAGA-C (SEQ ID NO.:7)
A β 1-12-L-C-CRM ₁₉₇	DAEFRHDSGYEV-GAGA-C (SEQ ID NO.:8)
A β 12-1-C-CRM ₁₉₇ (-VE CONTROL)	VEYGSDHRFEAD-C (SEQ ID NO.: 9)

L= 接頭序列 (GAGA) (SEQ ID NO.:10)

實施例 2

製備 A β 肽 - CRM₁₉₇ 共軛物並以超過濾來純化

CRM₁₉₇ 之溴乙醯化

於氬氣下以 1 : 1 重量比來將 (100 mg) 於 0.01M 磷酸鈉緩衝液，0.9%氯化鈉，pH7.0 與溴乙酸 N-羥基琥珀醯亞胺酯 (於 DMSO 溶成 20 mg / ml) 反應。依需要將反應加以研製直到 pH 值保持在 7.0。混合物於室溫黑暗中攪拌 1.5 小時。反應混合物用 1.2 μ m 過濾到 UF / DF 系統 (Millipore Labscale TFF, Billerica, MA) 之保留儲槽中。純化係以 10K 或 30K UF 膜相對於 0.01M 磷酸鈉緩衝液 / 0.9% NaCl，pH7.0 進行通透過濾 (30 倍)。讓溴乙醯化 CRM₁₉₇ 通過 0.2 μ m 濾器來過濾。溴乙醯化程度之測定係將已活化 CRM₁₉₇ 與半胱胺酸反應，接著進行胺基酸分析及定量所產生之羧甲基半胱胺酸 (CMC)。

A β 肽與溴乙醯化定量之接合以及使用 N-乙析醯基半胱胺

來加蓋

將溴乙醯化 CRM₁₉₇ (50mg) 轉移到反應容器中。將維持於 2-8℃ 之攪拌溶液中加入 1M 碳酸鈉／碳酸氫鈉。於氬氣下進行研製以達到 pH9.0 之目標。個別地，秤量 50mg Aβ 肽且溶於注射用水 (WFI) 中直到成為 20 mg/mL。在此溶液中加入 1M 碳酸鈉／碳酸氫鈉直到達到 pH9.0。將肽溶液加到溴乙醯化 CRM₁₉₇ 溶液，且混合物於 2-8℃ 下攪拌 14-18 小時。剩下的溴乙醯化基團用 20 倍過量之 N-乙醯基半胱胺於 2-8℃ 下進行 3-6 小時之加蓋反應。

將反應混合物用 1.2 μm 濾器來過濾到 UF/DF 系統 (Millipore XL) 之保留儲槽中，且共軛物係於室溫下以 10K 或 30K MWCO 膜 (Millipore) 相對於 0.01M 磷酸鈉緩衝液／0.9%NaCl, pH7.0 進行 30 倍通透過濾。收集保留物且用 0.2 μm 過濾且分析蛋白質含量 (Lowry 或 Micro-BCA 比色檢定)，以 SDS-PAGE 分析，以胺基酸分析，及分析其於小鼠體內之免疫原性。

實施例 3

將未反應之溴乙醯基團加蓋轉化成胺乙醯基團

將如上實施例 2 製得之溴乙醯化 CRM₁₉₇ (50 mg) 轉移到反應容器中。將維持於 2-8℃ 之攪拌溶液中加入 1M 碳酸鈉／碳酸氫鈉。於氬氣下進行研製以達到 pH9.0 之目標。個別地，秤量 50mg Aβ 肽且溶於注射用水 (WFI) 中

直到成爲 20 mg/mL。在此溶液中加入 1M 碳酸鈉／碳酸氫鈉直到達到 pH9.0。將肽溶液加到溴乙醯化 CRM₁₉₇ 溶液，且混合物於 2-8℃ 下攪拌 14-18 小時。剩下的溴乙醯化基團於 2-8℃ 下用 8%碳酸氫銨溶液進行 4 小時加蓋反應。

將反應混合物用 1.2 μ m 濾器來過濾到 UF/DF 系統 (Millipore XL) 之保留儲槽中，且共軛物係於室溫下以 10K 或 30K MWCO 膜 (Millipore) 相對於 0.01M 磷酸鈉緩衝液／0.9%NaCl，pH7.0 進行 30 倍通透過濾。收集保留物且用 0.2 μ m 過濾且分析蛋白質含量 (Lowry 或 Micro-BCA 比色檢定)，以 SDS-PAGE 分析，以胺基酸分析，及分析其於小鼠體內之免疫原性。

實施例 4

定量測定 S-羧甲基半胱胺酸及 S-羧甲基半胱胺以評估肽免疫原-蛋白質／多肽共軛物之接合及加蓋程度

對使用溴乙醯活化化學所產生之蛋白質-肽共軛物在酸水解後會從接合部位的半胱胺酸生成酸穩定之 S-羧甲基半胱胺酸 (CMC) 且從加蓋部位之半胱胺生成酸穩定之 S-羧甲基半胱胺 (CMCA) (第 2 圖)。所有已接合及已加蓋離胺酸都會被轉變回離胺酸且以此形式來被偵測。除了色胺酸及半胱胺酸以外 (其在水解條件下會被破壞)，所有其它胺基酸會被水解成游離的胺基酸。天冬醯胺及麩醯胺分別會被轉化成天冬胺酸及麩胺酸。

將共軛物樣本用去離子水來稀釋直到總蛋白質濃度低於 1 mg/mL。將各個共軛物之 10 微克液份各兩份加以乾燥且再懸浮於 100 μ L 6N HCl [Pierce]，5 μ L 融化苯酚 [Sigma-Aldrich]及 1 μ L 2-氫硫基乙醇 [Sigma-Aldrich]。然後此等樣本於 110 $^{\circ}$ C 真空 (100 mT) 下培育 22 小時。將所產生的水解物乾燥，再懸浮於 250 μ L 貝克曼 (Beckman) Na-S 檸檬酸鈉樣本稀釋緩衝液 (pH2.2) [Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA]，且使用華特曼 (Whatman) 0.2 μ m 尼龍注射器頂端濾器及 1mL 注射器來過濾。

然後將所有樣本裝載到貝克曼 6300 胺基酸分析器樣本環中且置入分析器中。將各水解樣本及控制組胺基酸使用離子交換層析分離出來且接著於 135 $^{\circ}$ C 下與貝克曼 Ninhydrin NinRX 溶液反應。然後衍生化胺基酸會於 570nm 及 440nm 之可見範圍下偵測 (見表 1)。含有 500 微微莫耳各種胺基酸之標準胺基酸組 [Pierce Amino acid Standard H]會與樣本一起測試且作為各分析組之對照組。加入 S-羧甲基半胱胺酸 [Sigma-Aldrich]作為標準物。

表 1

使用貝克曼 6300 胺基酸分析器之

梯度計劃 1 時胺基酸的滯留時間

滯留時間 (分鐘)	胺基酸	偵測用波長
8.3	羧甲基半胱胺酸 CMC	570
9.6	天冬胺酸 & 天冬醯胺 Asx	570
11.3	羥丁胺酸 Thr	570
12.2	絲胺酸 Ser	570
15.8	麩胺酸 & 麩醯胺 Glx	570 & 440
18.5	脯胺酸 Pro	440
21.8	甘胺酸 Gly	570
23.3	丙胺酸 Ala	570
29.0	纈胺酸 Val	570
32.8	甲硫胺酸 Met	570
35.5	異白胺酸 Ile	570
36.8	白胺酸 Leu	570
40.5	酪胺酸 Tyr	570
42.3	苯丙胺酸 Phe	570
45.4	羧甲基半胱胺 CMCA	570
48.8	組胺酸 His	570
53.6	離胺酸 Lys	570
70.8	精胺酸 Arg	570

各標準峰之面積會在對各樣本進行比例性評估時被用來作為定量性等量 (quantitative equivalence)。脯胺酸係於 440 nm 下測定且使用麩胺酸 (最接近的胺基酸) 於 570nm 下轉化成等量值。

各項此等微微莫耳數會藉著把所測得之離胺酸之微微莫耳數與蛋白質內離胺酸量理論值作比較來轉化成胺基酸殘基之莫耳比例。由於離胺酸會共價依附到半胱胺酸及半胱胺上及其預期的類似水解作用，所以被選來用在此評估作用。然後各胺基酸所測得的莫耳數會與該蛋白質之胺基酸組成作比較，且與 CMC 及 CMCA 的數據共同顯示出來。CMC 值被直接用來評估接合程度且 CMCA 值被直接用來評估加蓋程度。

實施例 5

界定 A β - CRM₁₉₇ 肽共軛物之特性及最適化

為了確定接合作用，所有肽 - CRM₁₉₇ 共軛物會用胺基酸分析及基質-輔助雷射解析離子化-時間之航行 (MALDI-TOF) 質譜儀來分析。對於各個共軛物，接合到各莫耳 CRM₁₉₇ 之肽莫耳數係使用胺基酸分析 (S-羧甲基半胱胺酸殘基之數目) 及 MALDI-TOF 質譜儀來測定。各個方法所測得之數值一般係一致的。

1. 尺寸排除層析

從儲存處取出批次濃縮樣本且回溫至室溫。將 A β 肽

共軛物樣本溫和攪拌以確保均質製備。將該 A β 肽共軛物樣本用 Eppendorf 微離心機離心以除去任何粒狀物。取出上清液且作 TosoHass TSK-Gel G3000SW 層析 (TosoHaas, Stuttgart, 德國)。將 TosoHass TSK-Gel G3000SW 管柱連接到 HPLC 系統且把壓力限度設定在 1.4 MPa。管柱用至少 30 ml，流速 0.75 mL/分鐘之 PBS (10mM 磷酸鈉，150mM 氯化鈉，pH7.2 $\pm$ 0.1) 來平衡。採用如下參數將 A β 肽共軛物樣本裝載到 TosoHass TSK-Gel G3000SW 管柱：

A β 肽共軛物樣本之濃度：1.5 $\pm$ 1.0 mg/ml

流速：0.75 mL/分鐘

樣本體積：1.0 ml

進行時間：30 分鐘

吸光度係以 280 nm 及 210 nm 監測。爲了長期儲存，將 TosoHass TSK-Gel G3000SW 管柱用至少 50 ml，流速 0.5-1.0 ml/分鐘之 20%乙醇來平衡。

II. PAGE (聚丙烯醯胺凝膠電泳)：

已活化 (溴乙醯化) CRM₁₉₇ 及 A β 肽 - CRM₁₉₇ 共軛物係以 SDS-凝膠來檢驗，其中採用了 NuPAGE Bis-Tris 電泳法 (Novex, Frankfurt, 德國) 及中性 pH 值，預鑄聚丙烯醯胺迷你膠系統及 NuPAGE MES SDS 跑膠緩衝液。將 8

μ g 液份已活化 CRM 或其共軛物與還原性樣本緩衝液混合在一起且於 100℃ 加熱 5 分鐘。將共軛物及分子量 (MW) 標準物 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 載入基於 Bis-Tris-HCl 緩衝系統之 10% (w/v, 丙烯醯胺) NuPAGE 凝膠 (Novex) 且於 MES SDS 跑膠緩衝液-PAGE (Laemmli) 上跑膠。於 SDS-PAGE 後, 將凝膠用 Pierce Gel Code Blue (Pierce, Rockford, IL) 染色。A β 肽-CRM₁₉₇ 共軛物係以在天然 CRM 譜帶上方約 66 kDa 之主譜帶, 及約 120kDa 之二聚體譜帶, 以及微弱的多聚體譜帶 (數據未顯示) 來代表。

III. 肽 - CRM₁₉₇ 共軛物之 MALDI-TOF 質譜分析

質譜分析可用來立即測定接合的約略程度。將適當液份之已活化 CRM₁₉₇ 及共軛物樣本用 MALDI-TOF 質譜分析法使用 3,5-二甲氧基-4-羥基-肉桂酸 (芥子酸) 作基質來分析。以 MALDI-TOF 質譜分析 (Finnigan MAT Lasermat 200 質譜儀, Ringoes, NY) 測得之已活化之 CRM₁₉₇ 分子量係集中在約 60.5 kDa 附近且其共軛物之分子量視接合程度不同係從 65kDa 到 74kDa 不等 (數據未顯示)。在 CRM₁₉₇ 中發現到有最多高達 22 個離胺酸 (約 50%) 以 1:1 的比例被修改。

IV. 最適化實驗

活化及接合的程度為反應劑: 蛋白質比例, 反應溫度

及反應緩衝液之 pH 值的函數。爲了取得接合反應中可再現之過程控制參數，所以於下文提供一些實例以顯示產生最適接合結果之最適 pH 值。其結果（第 3 圖）顯示 A β 5-聚體（DAEFRC）（SEQ ID NO：1）以及 A β 7-聚體（DAEFRHDC）（SEQ ID NO：2）的接合與 pH 相關，且當反應條件的 pH 值增加時可產生較高度的修改／接合反應。使用 5-聚體及 7-聚體肽之 TFA 鹽類時，接合程度係在 pH9.0 下評估不同肽裝載量的情形（第 4 圖）。從此等結果明顯可知於每個 CRM 分子中具有定義數量之肽複本之肽共軛物可藉由變化接合反應中肽／已活化 CRM 之比例來產生。已使用 A β 7-聚體肽之醋酸鹽來進行類似的實驗。

至於 A β 1-7／CRM 的接合，其加蓋過程係藉由比較每 CRM 之 CMCA 莫耳數與每 CRM 之 CMCA 莫耳數來進行。由於在所測試之肽：CRM 比例下 CMC 及 CMCA 的總量係恆定的，所以加蓋過程被假定已經完成（第 5 圖）。共軛物的總修改量係停留在 19 到 21 之間，相當於溴乙醯化之離胺酸的數量（第 5 圖）。此等實驗係以 TFA 作為肽的抗衡離子來進行。使用肽的醋酸鹽而非 TFA 鹽重覆該 A β 1-7／CRM 的接合作用，且數據係顯示在第 5 圖及第 6 圖。加蓋過程似乎已經完成，且各點的 CMC 及 CMCA 總量係停留在 20 到 22 之間。A β -CRM 接合反應的條件在 pH9.0 下達最適化，且接合程度係由反應中肽對 CRM 的比率所控制。藉由將比例從 0.1 到 1.5 間變動，接合程度便

有所不同（第 6 圖）。

活化及接合的程度為反應劑：蛋白質比例，反應溫度及反應緩衝液之 pH 值的函數。各共軛物之修改（接合）程度係將各共軛物的質量減掉已活化 CRM₁₉₇ 的質量，然後除以用來製備該共軛物之肽的質量來計算。所有共軛物的修改（接合）程度係示於表 2。

接合程度也會與每莫耳 CRM₁₉₇ 上形成之 S-羧甲基半胱氨酸殘基的估計量比較（亦示於表 2）。

表 2

修改程度：MALDI-TOF 及 AAA 數據之比較

樣本	Da (來自質譜儀)	接合程度 (來自質譜儀)	接合程度 (來自 CMC- 胺基酸分析)
CRM ₁₉₇	58,408	--	--
BrAc-CRM	60,752	19	--
A β 1-7/CRM	74,463	14	15
A β 1-7/CRM	72,375	12	14
A β 1-5/CRM	75,425	20	21
A β 1-5/CRM	71,690	15	18

實施例 6

A β 肽共軛物之免疫原性研究

A β 之 N 端殘基 1-5、1-7、1-9 及 1-12（有及無連接

子 GAGAC) 之肽，及相當於 A β 之 N 端胺基酸 12 至胺基酸 1 反向序列 (1-12 聚體呈反向順序) 之肽，各連接到 CRM₁₉₇ 上，將此等共軛物以及未接合之 A β 1-12 聚體肽與 STIMULONTM QS-21 調配成調合物來免疫小鼠。各組小鼠係以 30 μ g 或 5 μ g 劑量之一種前述樣本調合 20 μ g 佐劑 STIMULONTM QS-21，於研究一開始 (第 0 週) 及後續第 3 及 6 週進行皮下預防接種。

如表 3 所示，A β 之 N 端殘基 1-5、1-7、1-9 及 1-12 (有及無連接子 GAGAC) 之肽，及相當於 A β 之 N 端胺基酸 12 至胺基酸 1 反向序列 (1-12 聚體呈反向順序) 之肽，各連接到 CRM₁₉₇ 上，將此等共軛物以及未接合之 A β 1-12 聚體肽與 QS-21 調配成調合物來免疫小鼠。各組小鼠係以 30 μ g 或 5 μ g 劑量之一種前述樣本調合 20 μ g 佐劑 QS-21，於研究一開始 (第 0 週) 及後續第 3 及 6 週進行皮下預防接種。使用瑞士威伯司特小鼠來進行整個研究且每組有 5 隻小鼠。注射體積=100 μ l；B=血液；V=接種；E=放血。

抗-A β 效價係如下文所述以抗 A β 及 CRM₁₉₇ 之 ELISA 來測量。簡要地，在寇司塔 (Costar) 96 凹孔平板 (#3591) 上塗以 2 μ g/mL A β 1-42 於無菌碳酸鹽/碳酸氫鹽緩衝液，pH9.6 於室溫下隔夜。將平板清空且每凹孔用 200 μ l 之 0.05%BSA 於 1X PBS/0.05%Tween 20 於室溫下阻斷 2 小時。將已阻斷平板清空且用含有 TBS，0.1%Brij-35 (無疊氮化物) 清洗緩衝液之平板清洗液來清

洗。所有的初級抗血清係用 0.05%BSA 於 1 X PBS 含有 0.05%Tween 20 / 0.02%疊氮化物來作系列稀釋，且將 100 μ L 各稀釋液轉移到適當的平板凹孔中且於室溫下培育 2 小時。然後將平板清空 / 如前文所述般清洗。將來自 Southern Biotech 之鹼性磷酸酶接合山羊抗-小鼠 IgG 次級抗體用 0.05%BSA 於 1 X PBS 含有 0.05%Tween 20 / 0.02%疊氮化物以 1 : 1000 來稀釋，且取 100 μ L 加到各凹孔中且於室溫下培育 1 小時。然後將平板清空且如前所述來清洗且最後於每凹孔加入 100 μ L 之 1 mg / ml 對硝苯基磷酸鹽基質於二乙醇胺 / MgCl₂，pH 9.8 之溶液於室溫下培育 1 小時。顏色的發生可藉由在每凹孔加入 50 μ L 之 3N NaOH 來終止。將平板置於 405 nm 下讀數且以 690nm 為參考。終點效價係以 0.1 AU 的 O.D 值來計算。

表 3
小鼠免疫研究步驟

群組 編號	說明	劑量 (μ g)	Wk0	Wk3	Wk6	Wk8	Wk13	Wk16
AE488	CRM/1-7 w/o 接頭	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE489	CRM/1-12 有接頭	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE490	CRM/1-9 有接頭	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE491	CRM/1-7 有接頭	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE492	CRM/1-5 w/o 接頭	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE493	CRM/1-9 w/o 接頭	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE494	CRM/1-12 w/o 接頭	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE495	CRM/1-5 有接頭	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE496	CRM/1-7 w/o 接頭	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE497	CRM/1-12 有接頭	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE498	CRM/1-9 有接頭	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE499	CRM/1-7 有接頭	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE500	CRM/1-5 w/o 接頭	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE501	CRM/1-9 w/o 接頭	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E

表 3

小鼠免疫研究步驟 - 續

群組 編號	說明	劑量 (μ g)	Wk 0	Wk 3	Wk 6	Wk 8	Wk 13	Wk 16
AE502	CRM/1-12 w/o 接頭	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE503	CRM/1-5 有接頭	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE504	CRM ₁₉₇ C1-6151	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE505	CRM ₁₉₇ C1-6151	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE506	CRM/12-1 聚體	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE507	CRM/12-1 聚體	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE508	1-12 聚體肽	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE509	1-12 聚體肽	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE510	Ab	30	B, V	B, V	B, V	B	B	E
AE511	Ab	5	B, V	B, V	B, V	B	B	E

CRM₁₉₇ELISA

在格林納 (Greiner) 96 凹孔平板 (#650011) 上塗以 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (每凹孔 100 μl) 之 CRM₁₉₇ 於無菌碳酸鹽／碳酸氫鹽緩衝液, pH9.6 置於 37°C 下處理 90 分鐘。將平板清空且用含有 1 x TBS, 0.1% Brij-35 清洗緩衝液之平板清洗液來清洗。所有的初級抗血清係用含有 0.3% Tween 20 / EDTA 之 1 X TBS 來作系列稀釋, 且將 100 μL 各稀釋液轉移到適當的平板凹孔中且於 37°C 下培育 1 小時。然後將平板清空 / 如前文所述般清洗。將來自 Southern Biotech 之鹼性磷酸酶接合山羊抗-小鼠 IgG 次級抗體用含有 0.05% Tween 20 / 0.02% 疊氮化物之 1 X PBS 以 1 : 1000 來稀釋。然後將平板清空且如前所述來清洗且最後於每凹孔加入 100 μL 之 1 mg/ml 對硝苯基磷酸鹽基質於二乙醇胺 / MgCl_2 , pH 9.8 之溶液於室溫下培育 1 小時。顏色的發生可藉由在每凹孔加入 50 μl 之 3N NaOH 來終止。將平板置於 405 nm 下讀數且以 690nm 為參考。終點效價係以 0.1 AU 的 O.D 值來計算。

表 4-6 顯示終點 ELISA 中抗 A β 效價。於初次疫苗接種後, 所有八種共軛物 (除了負對照組以外) 都可以誘發可測量的抗-A β IgG 免疫反應。不過。在初次疫苗接種 3 週後, 30 μg 劑量而非 5 μg 劑量之 A β 產生了正反應。在所有的共軛物中, 似乎是無連接子之 A β 1-7 肽比所研究的其它共軛物更能引發更好或一樣好的免疫反應。在 5 μg 劑量下, 第 8-16 週時 A β 1-5C 有更好的表現。在 30 μg

劑量下， $A\beta$ 1-7C 表現最佳。不論是用 $30\ \mu\text{g}$ 劑量或 $5\ \mu\text{g}$ 劑量在第二及第三次疫苗接種後進行之抗體效價分析，顯示對於大多數共軛物而言抗 $A\beta$ 最佳的免疫反應係在進行第二次疫苗注射後發生的。至少在小鼠身上，第三次疫苗注射似乎並不能再提高免疫反應。不過， $A\beta$ 肽需要用 $30\ \mu\text{g}$ 劑量進行三次免疫接種才能達到抗該種肽之最大免疫反應（表 5）。以隨著時間流逝抗體減少之抗體衰變的術語來說，相較於用各軛物來免疫群組時該群組所產生的最高抗體量相比，抗體衰變後群組之抗體量可減少 2 至 3 倍。分析來自第 6 及 8 週之個別樣本以計算各群組抗 $A\beta$ 之 GMTs 量（表 6），以瞭解是否有某一群組實質上比其它各組更佳。對第 6 週時 $A\beta$ 1-5C、 $A\beta$ 17-C 及 $A\beta$ 1-9C 共軛物之效價作統計分析，其顯示 $A\beta$ 1-7 共軛物顯著地引發更高的抗體效價。從該實驗亦顯示連接子 GAGAC 並不會提高針對該肽之免疫反應。

表 4

群組	第 0 週	第 3 週	第 6 週	第 8 週	第 13 週	第 16 週
1-5C	<100	14,960	687,691	882,012	625,208	771,828
1-7C	<100	51,253	1,280,181	860,463	520,060	571,043
1-9C	<100	18,615	1,008,872	622,325	348,967	380,755
1-12C	<100	615	132,009	390,624	166,162	184,170
1-5LC	<100	4,999	458,075	454,631	237,573	220,091
1-7LC	<100	17,693	849,170	842,402	446,089	400,536
1-9LC	<100	18,544	1,465,115	1,180,347	571,127	579,477
1-12LC	<100	12,664	908,360	598,867	368,101	316,075
CRM ₁₉₇	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-42	<100	<100	<100	<100	<100	<100
1-12	<100	<100	<100	<100	<100	<100
12-1C	<100	<100	<100	<100	<100	<100

表 4：於第 0、3、6、8、13 及 16 週，以 ELISA 終點法滴定 $5\mu\text{g}$ 劑量之肽共軛物製得之抗血清中抗 A β 之量，該肽共軛物具有不同長度之 N 端澱粉樣 A β 肽，參考標準物：愛倫(Elan)超免疫多株 #592=3,073,307。終點為 0.1 AU O.D. 值。瑞士威伯司特(Webster)小鼠係於第 0、3、6 週使用 $5\mu\text{g}$ 如上抗原並與 $20\mu\text{g}$ STIMULONTM QS-21 配方在一起以 SC-N 來免疫。

表 5

群組	第 3 週	第 6 週	第 8 週	第 13 週	第 16 週
1-5C	<100	590,355	332,832	204,645	176,159
1-7C	<100	1,840,741	647,470	592,638	779,072
1-9C	<100	1,184,696	713,494	363,459	327,065
1-12C	<100	1,325,725	1,126,389	681,268	577,604
1-5LC	<100	469,191	184,077	177,358	164,680
1-7LC	<100	971,229	462,200	463,466	529,726
1-9LC	<100	921,544	787,273	405,023	500,468
1-12LC	<100	697,150	483,320	284,800	397,816
CRM ₁₉₇	<100	<100	<100	<100	<100
1-42	<100	<100	<100	<100	<100
1-12	<100	<100	<100	<100	<100
12-1C	<100	<100	<100	<100	<100

表 5：於第 0、3、6、8、13 及 16 週，以 ELISA 終點法滴定 $30\mu\text{g}$ 劑量之肽共軛物製得之抗血清中抗 A β 之量，該肽共軛物具有不同長度之 N 端澱粉樣 A β 肽，參考標準物：愛倫 (Elan) 超免疫多株 #592=3,073,307。終點為 0.1 AU O.D. 值。瑞士威伯司特 (Webster) 小鼠係於第 0、3、6 週使用 $30\mu\text{g}$ 如上抗原並與 $20\mu\text{g}$ STIMULON™ QS-21 配方在一起以 SC-N 來免疫。

表 6

群 組	第 6 週	第 8 週
1-5C	237,668 ^a	161,671 ^b
1-7C	1,866,702 ^a	881,146 ^b
1-9C	963,323 ^a	595,414 ^b
1-12C	940,260	955,470
1-5LC	395,553	141,084
1-7LC	516,921	394,521
1-9LC	826,773	562,458
1-12LC	544,768	376,952
1-42	365	4,565

表 6：於第 6 及 8 週，以 ELISA 終點法測定 $30 \mu\text{g}$ 劑量之肽共軛物製得之抗血清中抗 $A\beta$ 之 GMTs 量，該肽共軛物具有不同長度之 N 端澱粉樣 $A\beta$ 肽，參考標準物：愛倫 (Elan) 超免疫多株 #592=3,073,307。終點為 0.1 AU O.D. 值。瑞士威伯司特 (Webster) 小鼠係於第 0、3、6 週使用 $30 \mu\text{g}$ 如上抗原並與 $20 \mu\text{g}$ STIMULONTMQS-21 配方在一起以 SC-N 來免疫。

a. 於第 6 週時 1-5C、1-7C 及 1-9C 滴定測得之效價使用 Tukey-Kramer 統計分析顯示出只有 1-5C 與 1-7C 間顯示出統計性差異，然而使用學生型 T 測試時在 1-5C 與 1-7C 之間以及 1-5C 與 1-9C 之間皆顯出統計性差異。

b. 對第 8 週時 1-5C、1-7C 及 1-9C 滴定測得之效價進行統計分析，顯示此三個群組間並沒有統計性差異。不過在 1-5C 與 1-7C 間似乎有所差異。

PDAPP 小鼠腦組織染色

PDAPP 腦組織染色檢定提供一種指示 $A\beta$ 肽共軛物及／或 $A\beta$ 1-42 抗血清之功能性的指標。對於來自個別小鼠群組之血清樣本，分別針對其辨識 PDAPP 小鼠腦組織內含有澱粉樣肽之斑塊的能力來作分析。此等結果顯示於表 7A 及 7B。除了 $A\beta$ 5 聚體共軛物抗血清以外，其它共軛物抗血清在辨識該等斑塊時都有著劑量相關反應。與連接子無關地， $30\mu\text{g}$ 共軛物引發之抗血清較 $5\mu\text{g}$ 共軛物引發之抗血清具有更佳之反應性型式。不過對於 $A\beta$ 5-聚體共軛物抗血清而言， $5\mu\text{g}$ 群組似乎有類似或更好的反應性。比較所有此等結果，得到的結論指出從 $A\beta$ 1-5 聚體到 $A\beta$ 1-9 聚體作成的共軛物皆足以引發斑塊辨識之免疫反應且連接子存在與否並不重要。從此一研究可得到如下結論：（a）與未接合之 CRM₁₉₇ 對照組相比，所有肽共軛物都可以引起相當或略高效價之抗載體蛋白質 CRM₁₉₇ 之抗血清（未顯示）。（b）與不具連接子之共軛物相比，具有 GAGAC 連接子之共軛物的免疫原性或功能性並未提高。（c）免疫原性數據及 PDAPP 腦組織染色（功能性抗體之主要指標）顯示 $A\beta$ 1-5 聚體及 $A\beta$ 1-7 聚體共軛物似乎為可再進一步發展之較佳免疫原。

表 7A. PDAPP 小鼠腦組織染色

5 μ g 劑量					
無連接子			有連接子		
疫苗	動物#	PDAPP 染色	疫苗	動物#	PDAPP 染色
CRM/A β 1-5	1	+(無擴散)	CRM/A β 1-5	1	-
	2	++/+++		2	-
	3	++/+++		3	±
	4	++		4	±
	5	++		5	±
CRM/A β 1-7	1	++	CRM/A β 1-7	1	+
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	++		4	+
	5	++		5	++
CRM/A β 1-9	1	+	CRM/A β 1-9	1	++
	2	+ / ++		2	++
	3	±		3	+
	4	±		4	+
	5	±		5	+
CRM/A β 1-12	1	-	CRM/A β 1-12	1	+
	2	?		2	+
	3	±		3	++
	4	-		4	-
	5	±		5	±
CRM/A β 12- 1 聚體	1	-	A β 12	1	-
	2	-		2	-
	3	±		3	-
	4	-		4	-
	5	±		5	-

所有抗血清以 1 : 1000 稀釋來進行染色步驟。

表 7B. PDAPP 小鼠腦組織染色

30 μ g 劑量					
無連接子			有連接子		
疫苗	動物#	PDAPP 染色	疫苗	動物#	PDAPP 染色
CRM/A β 1-5	1	-	CRM/A β 1-5	1	+
	2	+/++		2	-
	3	-		3	-
	4	$\pm$		4	$\pm$
	5	++		5	-
CRM/A β 1-7	1	+/++	CRM/A β 1-7	1	+
	2	++		2	$\pm$ /+
	3	++		3	+/++
	4	++		4	$\pm$ /+
	5	++/+++		5	+/++
CRM/A β 1-9	1	++/+++	CRM/A β 1-9	1	+/++
	2	++		2	++
	3	++		3	++
	4	+		4	$\pm$
	5	+		5	+/++
CRM/A β 1-12	1	-	CRM/A β 1-12	1	+/++
	2	+/++		2	+
	3	+/++		3	-
	4	$\pm$		4	+/++
	5	$\pm$		5	+
CRM/A β 12-1 聚體	1	-	A β 12	1	$\pm$
	2	-		2	-
	3	-		3	-
	4	-		4	-
	5	-		5	-

所有抗血清以 1 : 1000 稀釋來進行染色步驟

實施例 7

猴的免疫原研究

於第 0、29 及 58 天對諸猴群（每組 6 隻）給予 $30\ \mu\text{g}$ 之 7-聚體共軛物（總共軛物）及佐以 SIMULONTM QS-21，明礬或 RC529 SE 佐劑之調合物。其它各組調合物還包括 $30\ \mu\text{g}$ 之 5-聚體共軛物以及明礬（ $\text{Al}(\text{OH})_3$ ）或 RC529 SE，並以 $75\ \mu\text{g}$ 及 $300\ \mu\text{g}$ $\text{A}\beta$ 與 SIMULONTM QS-21 作為正對照組。正對照組每 2 週進行一次免疫接種。於第 36 及 64 天測定抗- $\text{A}\beta$ 抗體效價（第 7-9 圖）。於第 36 天，7-聚體／CRM 共軛物以及 SIMULONTM QS-21，明礬及 RC529 SE 引發之 GMT 效價分別為 10110，13330 及 17090（第 7 圖）。相對地， $75\ \mu\text{g}$ 及 $300\ \mu\text{g}$ 劑量之 $\text{A}\beta$ 1-42 及 SIMULONTM QS-21 所引發之 GMT 效價則分別為 223 及 173。 $\text{A}\beta$ 5-聚體共軛物與明礬所引發的效價為 2134 且其與 RC529 SE 引發之效價為 15980。於第 64 天，即投予 3 劑共軛物與 SIMULONTM QS-21 或 RC-529 SE 後所引發的效價基本上高出第二次投藥後引發的效價（7-聚體／RC-529 SE 之 GMTs 為 69910； $\text{A}\beta$ 5-聚體／RC-529 SE 則為 21640；且 $\text{A}\beta$ 7-聚體／SIMULONTM QS-21 則為 30310）（第 8 圖）。共軛物及明礬在第三次免疫後引發的效價則低於第二次免疫後引發的效價。似乎 $\text{A}\beta$ 7-聚體共軛物比 $\text{A}\beta$ 5-聚體共軛物更能引發較佳的免疫反應。於猴， $\text{A}\beta$ 7-聚體共軛物佐以 RC-529 SE 或 SIMULONTM QS-21 可引發最高度的反應（第 9 圖）。 $\text{A}\beta$ 7-聚體共軛物與

明礬引起的反應則為中度的且類似於 $300\ \mu\text{g}$ 之 $\text{A}\beta 1-42$ 與 $\text{SIMULON}^{\text{TM}}$ QS-21 的反應程度。

從這些實例可以獲得數項結論。首先，兩種共軛物在靈長類極具免疫原性。其次，在免疫調合物中佐劑的存在會顯著影響免疫反應。第三，除了鋁佐劑以外，佐劑 RC-529 SE 及 $\text{SIMULON}^{\text{TM}}$ QS-21 若在每次疫苗接種中皆投予且投予至少高達三次的情況下則可強化免疫反應（第 9 圖）。總括而言， $\text{A}\beta 7$ -聚體在存在 529 下可引發較好的抗體反應，存在 $\text{SIMULON}^{\text{TM}}$ QS-21 時則次之（參考第 9 圖）。

實施例 8

多抗原性肽（MAP）共軛物的製備及其免疫原性研究

多種方法可用來於載體上製造多抗原性部位。於先前實施例中，個別的抗原性部位係以所定義的接合及加蓋化學法個別地接合到載體上。於此實施例中，多抗原性部位係用固相合成法來合成 $\text{A}\beta 1-7$ 聚體之縱排複本構築而成。另一選擇地，此等縱排複本可透過或不透過它處說明之離胺酸核連接來與 T-細胞抗原決定部位偶合在一起。所合成之此等多抗原性肽可具有額外半胱胺酸殘基以接合到載體蛋白質上。合成含有 1 組複本單元（1-7）、3 組複本單元（1-7）及 5 組複本單元（1-7）之肽且在其羧基端有額外的半胱胺酸。將此等肽與溴乙醯化 CRM 處理隔夜且透過 C 端之半胱胺酸殘基共價依附在一起。此等反應係在

pH 9.0-9.2 下以表 8 所列示的肽：CRM 比例來進行。未與肽反應之溴乙醯基團會用 N-乙醯基半胱胺加蓋。此等編號分別代表接合到 CRM 之 A β 1-7 肽單一複本共軛物、三縱排複本共軛物及五縱排複本共軛物。表 8 簡要地顯示出此等樣本之性質。

表 8

多抗原性肽 (MAP) 共軛物樣本

共軛物	肽：CRM(w/w)	反應之 pH 值
Ab(1-7) ₁ /CRM	0.37	8.99
Ab(1-7) ₃ /CRM	1.02	8.95
Ab(1-7) ₅ /CRM	1.67	9.17

肽裝載量 (每個載體之 A β 1-7 肽之平均數目) 及加蓋數目 (表 9) 係以胺基酸分析所測得、位於每個載體上獨特胺基酸 (CMC 或 CMCA) 之數目。

表 9

各個共軛物之接合及加蓋程度

共軛物	肽裝載量 (CMC)	加蓋量 (CMCA)
Ab(1-7) ₁ /CRM	12.5	11.7
Ab(1-7) ₃ /CRM	10.4	15.2
Ab(1-7) ₅ /CRM	9.8	15.9

將瑞士威伯司特小鼠（每組 10 隻）以 1 或 $0.1 \mu\text{g}$ $\text{A}\beta$ / CRM 接合肽以皮下注射來免疫。有一半的小鼠係用調合 $100 \mu\text{g}$ 佐劑 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 之組成物來免疫，另一半小鼠則不含佐劑來免疫。免疫接種係排定在第 0 週及第 3 週進行。抽血係排定在第 0、3 及 6 週進行。分析血清樣本中抗 $\text{A}\beta 1-42$ 聚體肽之抗體反應。此結果示於表 10。

表 10

多抗原性肽(MAP)共軛物之抗 A β 終點效價

群組 編號	樣本說明	佐劑	第 0 週 池	第 3 週 GMT	第 6 週 GMT
AG332	1 μ g A β (1-7) ₁ /CRM	Al(OH) ₃	<100	18,096	100,279
AG333	1 μ g A β (1-7) ₃ /CRM	Al(OH) ₃	<100	44,911	420,235
AG334	1 μ g A β (1-7) ₅ /CRM	Al(OH) ₃	<100	27,032	394,488
AG335	0.1 μ g A β (1-7) ₁ /CRM	Al(OH) ₃	<100	19,350	66,834
AG336	0.1 μ g A β (1-7) ₃ /CRM	Al(OH) ₃	<100	13,307	208,272
AG337	0.1 μ g A β (1-7) ₅ /CRM	Al(OH) ₃	<100	1,196	22,665
AG338	1 μ g A β (1-7) ₁ /CRM	無	<100	5,273	370,980
AG339	1 μ g A β (1-7) ₃ /CRM	無	<100	9,299	541,093
AG340	1 μ g A β (1-7) ₅ /CRM	無	<100	3,100	185,272
AG341	0.1 μ g A β (1-7) ₁ /CRM	無	<100	340	25,839
AG342	0.1 μ g A β (1-7) ₃ /CRM	無	<100	128	5,553
AG343	0.1 μ g A β (1-7) ₅ /CRM	無	<100	668	2,098

在初次免疫後所有共軛物都可誘生抗 A β 1-42 抗體之效價且在追加促升投藥後抗體效價有實質的提升。在缺乏鋁佐劑時，於第 3 週及第 6 週抽血時劑量反應的差異係很顯著的。較高劑量會誘發高效價的抗體反應。與未加佐劑的群組相比，加入鋁佐劑者於兩種劑量下（0.1 μ g 及 1 μ g）於第 3 週時皆可誘發基本上較高的抗體效價。於第二次疫苗接種後，1 μ g 劑量之共軛物的抗體量會升高 5 至 10 倍。於此劑量下，含有 3 及 5 組複本之肽共軛物比僅含單一複本之共軛物可誘發更高的抗體反應。亦測定抗 CRM 載體之效價，其係列於表 11。

表 11

多抗原性肽(MAP)共軛物之抗 CRM 終點效價

群組 編號	樣本說明	佐劑	第 0 週 池	第 3 週 GMT	第 6 週 GMT
AG332	1 μ g A β (1-7) ₁ /CRM	Al(OH) ₃	<50	10,531	114,602
AG333	1 μ g A β (1-7) ₃ /CRM	Al(OH) ₃	<50	4,274	83,065
AG334	1 μ g A β (1-7) ₅ /CRM	Al(OH) ₃	<50	1,680	49,320
AG335	0.1 μ g A β (1-7) ₁ /CRM	Al(OH) ₃	<50	1,114	13,231
AG336	0.1 μ g A β (1-7) ₃ /CRM	Al(OH) ₃	<50	197	1,484
AG337	0.1 μ g A β (1-7) ₅ /CRM	Al(OH) ₃	<50	65	222
AG338	1 μ g A β (1-7) ₁ /CRM	無	<50	35	309
AG339	1 μ g A β (1-7) ₃ /CRM	無	<50	29	1,085
AG340	1 μ g A β (1-7) ₅ /CRM	無	<50	29	542
AG341	0.1 μ g A β (1-7) ₁ /CRM	無	<50	25	55
AG342	0.1 μ g A β (1-7) ₃ /CRM	無	<50	25	34
AG343	0.1 μ g A β (1-7) ₅ /CRM	無	<50	29	ND

動物係在第 0、3 及 6 週被免疫。佐劑：100 μ g Al(OH)₃ 或無。ND=未測定。

表 11 的數據指出未加佐劑之群組不論是劑量 $1\mu\text{g}$ 或 $0.1\mu\text{g}$ 即使在免疫兩次以後也只能誘發極低的抗-CRM 抗體反應。然而，共軛物與氫氧化鋁佐劑在 $1\mu\text{g}$ 劑量下則可誘發實質量的抗-CRM 抗體反應且於 $0.1\mu\text{g}$ 下反應則低得多。於存在佐劑時，具有單一複本之共軛物可產生最高 CRM 效價，具有三複本之共軛物則份量中等，具有四複本之共軛物量最低。此結果正如預期般，因為就每肽劑量之 CRM 量而言以 $\text{A}\beta(1-7)_5/\text{CRM}$ 最低而以 $\text{A}\beta(1-7)_1/\text{CRM}$ 最高。只有以 $0.1\mu\text{g}$ 劑量投藥且於第 6 週時彼此差異才具有統計上的顯著性。

本發明之目的在於引發高效價的抗-抗原性半抗原免疫反應但是抗載體蛋白質之免疫反應並非必要。於特殊情況下，較佳為引發抗該半抗原之抗原性決定子之最適免疫反應但沒有或只有極少的抗載體蛋白質之免疫反應。對於此等應用，具有縱排多複本之多抗原性決定子之共軛物且不搭配佐劑之調合物便能符合此等需要。

實施例 9

製備具有不同載體蛋白質之 $\text{A}\beta$ -肽共軛物及其免疫原性

此等實施例係在比較分別使用六種不同載體蛋白質之共軛物之免疫原性。將 $\text{A}\beta 1-7$ 醋酸鹽於 pH9 下以 1:1 之重量比來加到溴乙醯化載體中。除了 $\text{A}\beta 1-7/\text{rC5ap}$ 以外，所有的共軛物都用 N-乙醯基半胱胺來加蓋。所有的

其它載體都是重組性細菌蛋白質，包括 CRM（白喉類毒素），重組 C5a 肽酶（rC5ap；係選殖自無乳鏈球菌（*Streptococcus agalactiae*），包括 D130A 及 S512A 突變），ORFs 1224、1664、2452（全部皆選殖自釀膿鏈球菌），及 T367 及 T858（皆選殖自肺炎衣原體）。所用載體之概述係示於表 12。各 A β 1-7 共軛物對此等載體之接合及加蓋程度係示於表 13。

此等研究顯示重組 C5a 肽酶共軛物比起所測試的大多數載體包括 CRM 更能引發高效價的抗 A β 反應。接受氫氧化鋁佐劑之群組於第 6 週測得之效價間的差異便具有統計上的顯著性。此外在無佐劑時，A β 1-7/T858 共軛物顯著地比起大多數其它共軛物更具有免疫原性。唯一表現得比 CRM 對照組共軛物更差的共軛物為 A β 1-7/T367，其在蛋白質印跡法中也不與 A β 特異性單株抗體反應。此等研究確認了多種其它載體亦可成功地用在來引發抗 A β 肽的免疫反應。

表 12

載體及共軛物性質表

載體蛋白質	載體 MW (Da)	離胺酸 #
CRM	58,408	39
rC5ap	108,560	85
ORF1224	30,950	18
ORF1664	31,270	38
ORF2452	31,790	29
T367	49,700	29
T858	37,190	23

表 13

各共軛物接合及加蓋程度

共軛物	肽裝載量 (CMC)	加蓋 (CMCA)
A β 1-7 / rC5ap	25.9	-
A β 1-7 / ORF1224	12.8	5.7
A β 1-7 / ORF1664	13.4	10.8
A β 1-7 / ORF2452	12.03	10.5
A β 1-7 / T367	13.2	8.2
A β 1-7 / T858	5.2	1.7

接合結果：肽裝載量（每個載體之 A β 1-7 肽之平均數目）及加蓋數目為以胺基酸分析所測得之每個載體上獨特胺基酸（CMC 或 CMCA）的數目。該 CMC 與 CMCA 數

目係指離胺酸數目。

免疫結果

將此研究中各群組之幾何平均效度列於表 14。於第 3 週，不論有無佐劑存在， $A\beta$ 1-7 / rC5ap 比從釀膿鏈球菌 ORFs 1224、1664、2452，或從肺炎衣原體 ORFs T367 及 T858 製造的對應共軛物可顯著引發更高的抗- $A\beta$ 效價。在缺乏佐劑下，於第 3 週時 $A\beta$ 1-7 / rC5ap 亦比除了 $A\beta$ 1-7 / T858 以外的所有其它共軛物有更好的免疫原性。無 $Al(OH)_3$ 之 T858 共軛物引發的效價比無佐劑之 ORF1224、ORF1664、ORF2452 及 CRM 共軛物更高。免疫原性顯著地低於 $A\beta$ 1-7 / CRM 之唯一共軛物為 $A\beta$ 1-7 / T367 ($p < 0.00002$)。該 T367 載體不論有或無佐劑在第 3 及 6 週時表現都不佳。於第 6 週，rC5ap 共軛物與氫氧化鋁比起除了 $A\beta$ 1-7 / ORF2452 以外的所有其它共軛物更具免疫原性 ($p < 0.04$)。在缺乏佐劑時， $A\beta$ 1-7 / rC5ap 及 $A\beta$ 1-7 / T858 所引發的效價顯著地高於 ORF1224、ORF1664 或 T367 共軛物之效價。無氫氧化鋁之 $A\beta$ 1-7 / CRM 所引發之效價亦高於 $A\beta$ 1-7 / ORF1664 或 $A\beta$ 1-7 / T367。

表 14

抗 A β 1-42 終點效價

群組	樣本說明	佐劑	第 0 週	第 3 週	第 6 週
編號			池	GMT	GMT
AG344	5 μ g A β (1-7)/CRM	Al(OH) ₃	<100	21,404	54,157
AG345	5 μ g A β (1-7)/rC5ap	Al(OH) ₃	<100	61,967	402,972
AG346	5 μ g A β (1-7)/ORF1224	Al(OH) ₃	<100	10,711	30,084
AG347	5 μ g A β (1-7)/ORF1664	Al(OH) ₃	<100	7,188	43,226
AG348	5 μ g A β (1-7)/ORF2452	Al(OH) ₃	<100	11,437	109,091
AG349	5 μ g A β (1-7)/T367	Al(OH) ₃	<100	321	5,139
AG350	5 μ g A β (1-7)/T858	Al(OH) ₃	<100	16,656	33,328
AG351	5 μ g A β (1-7)/CRM	無	<100	2,615	119,488
AG352	5 μ g A β (1-7)/rC5ap	無	<100	11,858	279,113
AG353	5 μ g A β (1-7)/ORF1224	無	<100	1,674	18,719
AG354	5 μ g A β (1-7)/ORF1664	無	<100	119	9,832
AG355	5 μ g A β (1-7)/ORF2452	無	<100	2,493	76,038
AG356	5 μ g A β (1-7)/T367	無	<100	50	620
AG357	5 μ g A β (1-7)/T858	無	<100	28,820	275,202

動物係在第 0 及 3 週被免疫且於第 0、3 及 6 週採血。劑量係基於共軛物的總量。佐劑：100 μ g Al(OH)₃ 或無。

實施例 10

額外 A β 肽 - 蛋白質共軛物之製備

I. 活化

將解凍之 CRM₁₉₇ (8mL , 59.84 mg , 於 7.48 mg / mL) 溶於 0.1M 硼酸鹽緩衝液 (pH9 , 3.968 ml) 使得濃度成為 5 mg / ml 。 將溶液置於冰浴 0-5℃ 下冷卻 。 將溴乙酸 N-羥基琥珀醯亞胺 (59.9 mg) (Aldrich-Sigma) 溶於 DMF (100 μ L) (aldrich-Sigma) 且逐滴加到 CRM₁₉₇ 溶液中 。 在加入溴乙酸 N-羥基琥珀醯亞胺時可觀察到沉澱產生 。 檢查 pH 值 , 可發現 pH 降至 pH6 。 藉著加入更多 0.1M 硼酸緩衝液來將反應混合物的 pH 值調回 pH9 。 然後將反應混合物置於 4℃ 下溫和攪拌 1 小時 。 混合物用 YM-10 centriprep 離心濃縮器來純化及濃縮且於 Sephadex G-25 使用 10 mM 硼酸鹽作為溶析劑來再純化 。 把對布來德福特 (Bradford) 反應劑呈正反應之餾份合併且使用 centriprep YM-10 來濃縮 。 溴乙醯化程度係用布來德福特檢定 (線性) 來測量 。 發現濃度為 5.36 mg / mL (產量 30 mg) 。 然後把終濃度調整為 5 mg / mL 且於冷凍器中儲存在 5% 蔗糖中直到進一步使用 。

II. 接合

在每次接合時係使用解凍之溴乙醯化 CRM₁₉₇ 。 把肽溶解在硼酸鹽緩衝液中 (2.5 mg 於 125 ml 之 0.1M 硼酸鹽緩衝液) 。 在使用 A β 肽 KLVFFAED-C (SEQ ID NO :

45) 、 C-LVFFAEDV (SEQ ID NO : 47) 、 C-KLVFFAED (SEQ ID NO : 48) 、 LVFFAED-C (SEQ ID NO : 50) 時可觀察到有稍不溶解性。將溴乙醯化 CRM₁₉₇ (5 mg / mL) 用肽溶液 / 懸浮液處理。混合物中肽與蛋白質之比例為 1 : 2。在使用 KLVFFAED-C (SEQ ID NO : 45) 、 C-LVFFAEDV (SEQ ID NO : 47) 、 C-KLVFFAED (SEQ ID NO : 48) 及 LVFFAED-C (SEQ ID NO : 50) 之共軛混合物中可觀察到混濁現象。然後檢查混合物之 pH 值 (pH9) 且在緩慢搖晃下於 4℃ 培育隔夜。在培育前先將混合物的終濃度調整為 3 mg / mL。培育後， C-LVFFAEDV (SEQ ID NO : 47) 及 LVFFAED-C (SEQ ID NO : 50) 肽之共軛物混合液的混濁現象便消失了。不過， KLVFFAED-C (SEQ ID NO : 45) 及 C-KLVFFAED (SEQ ID NO : 48) 仍稍微混濁。可溶性仿製蛋白質 (mock protein) 共軛物亦可用 1 : 1 (w / w) 比例與半胱胺一起製成。可從 BIOSOURCE 獲得純度約 95% 之合成肽。

八聚體：

LVFFAEDV-C (SEQ ID NO : 44)

KLVFFAED-C (SEQ ID NO : 45)

VFFAEDVG-C (SEQ ID NO : 43)

C-LVFFAEDV (SEQ ID NO : 47)

C-KLVFFAED (SEQ ID NO : 48)

C-VFFAEDVG (SEQ ID NO : 46)

七聚體：

VFFAEDV-C (SEQ ID NO : 49)

LVFFAED-C (SEQ ID NO : 50)

III. 加蓋蛋白質上未反應之離胺酸基團

未反應的離胺酸基團係用 N-乙醯基半胱胺 (CMCA; Aldrich-Sigma) 以 1 : 1 (w / w) 的比例於黑暗 4℃ 下搖晃 4 小時來加蓋。然後，未反應的肽及加蓋劑係使用 Slide-A-Lyzer 匣 (Mw 切掉 10,000) (Pierce) 相對於 PBS 緩衝液 (2 L) 進行透析隔夜 (13 小時) 來從共軛物中移除掉。更換緩衝液及透析各進行兩次 (2 x 14 hr)。可發現到肽 KLVFFAED-C (SEQ ID NO : 45) 及 C-KLVFFAED (SEQ ID NO : 48) 之共軛物有稍不溶性。所有共軛物係於 4℃ 冰箱中儲存於保存劑中。

IV. 蛋白質載體之特性

使用 MALDI-TOF MS 來測定溴乙醯化 CRM₁₉₇ 之質量及仿製共軛物 N-乙醯基半胱胺-CRM₁₉₇ 之質量。基於該 CRM₁₉₇ 及溴乙醯化 CRM₁₉₇ 之質量，有 11 個離胺酸殘基被修改了。

(59941.46-58590.29) / 122=11

其中

CRM₁₉₇ 之 Mw 爲 58624.29

溴乙醯化 CRM₁₉₇ 之 Mw 爲 59941.46

溴乙酸之 Mw 爲 122

溴乙醯化程度超過 28% (於 CRM₁₉₇ 上之離胺酸總數爲 39)。於此 11 個已修改離胺酸殘基中，有 10 個係與半胱胺偶合。偶合效能爲 90%。

$$(61143 - 59941) / 119 = 10$$

其中

溴乙醯化 CRM₁₉₇ 之 Mw 爲 59941.46

仿製共軛物之 Mw 爲 61143

N-乙醯半胱胺之 Mw 爲 119

$$(10 / 11) \times 100 = 90$$

V. 以 SDS-PAGE 蛋白質印跡法使用三羥甲基胺基甲烷-N-三甲基甘胺酸 (Tris-tricine) 預鑄凝膠來界定肽-蛋白質共軛物之特性

將蛋白質-肽共軛物用蛋白質印跡法來分析。各線道分別爲：標記物 (第 1 線道)；L-28375 24/01 (第 2 線道)；L-28375 24/02 (第 3 線道)；L-28375 24/03 (第 4 線道)；L-28375 24/04 (第 5 線道)；L-28375 24/05 (第 6 線道)；L-28375 24/06 (第 7 線道)；L-28375 24/07 (第 8 線道)；L-28375 24/08 (第 9 線道)；L-28375 24/09 (Mock) (第 10 線道)；及 BrAcCRM₁₉₇ (第 11 線道)。使用來自小鼠之肽特異性單

株抗體（248-6H9-806 A β 17-28）作為初級抗體（抗血清）（發現以 1：3000 的比例最佳）。山羊-抗小鼠 IgG（H+L）-HRP 為次級抗體（1：1000 稀釋比例）。我們發現到除了仿製共軛物及已活化 CRM₁₉₇ 以外，所有共軛物都可被初級抗體辨識出來（參考第 10 圖）。

蛋白質濃度

共軛物樣本之蛋白質濃度係以 Pierce BCA 檢定來測量（參考表 15）。

胺基酸分析

進行胺基酸分析以測定接合程度。該接合程度係以在共軛物內發現之 CMCA（羧甲基半胱胺）殘基量來計算。在用肽接合後，使用 CMCA 來加蓋未反應的已活化部位（參考表 15）。

表 15

肽及 BrAcCRM₁₉₇ 之接合程度

接合碼	肽序列 (SEQ ID NO :)	終濃度 (mg/mL)	接合程度 (以 CMCA 為準)
L-28375 24/01	LVFFAEDV-C (SEQ ID NO : 44)	1.67	8/10
L-28375 24/02	KLVFFAED-C (SEQ ID NO : 45)	0.82	5/10
L-28375 24/03	VFFAEDVG-C (SEQ ID NO : 43)	1.43	8/10
L-28375 24/04	C-LVFFAEDV (SEQ ID NO : 47)	1.04	9/10
L-28375 24/05	C-KLVFFAED (SEQ ID NO : 48)	0.78	1/10
L-28375 24/06	C-VFFAEDVG (SEQ ID NO : 46)	0.97	9/10
L-28375 24/07	VFFAEDV-C (SEQ ID NO : 49)	1.00	7/10
L-28375 24/08	LVFFAED-C (SEQ ID NO : 50)	0.99	8/10
L-28375 24/09 (仿製)		1.89	10/11

所有比色檢定係使用微平板光譜劑及 SOFTmax Pro 來進行。

實施例 11

A β 肽共軛物於瑞士威伯司特小鼠之免疫原研究

遠系繁殖之瑞士威伯司特小鼠用接合到 CRM₁₉₇ 之 VFFAEDVG-C (SEQ ID NO: 43)、LVFFAEDV-C (SEQ ID NO: 44)、KLVFFAED-C (SEQ ID NO: 45)、C-VFFAEDVG (SEQ ID NO: 46)、C-LVFFAEDV (SEQ ID NO: 47)、C-KLVFFAED (SEQ ID NO: 48)、VFFAEDV-C (SEQ ID NO: 49) 及 LVFFAED-C (SEQ ID NO: 50)，或以 A β 1-7CRM₁₉₇ 來免疫，所有共軛物皆與 RC 529 SE 調合在一起。每組 10 隻動物且共有九組動物係在研究一開始（第 0 週）及後續第 4 週用一種 A β 肽共軛物經皮下來接種。血清係在接種當天於接種之前收集的。

A β 肽共軛物於純系 Balb/c 小鼠之免疫研究

如前一段所述來免疫純系 Balb/c 小鼠，不過在第 12 週還會用共軛物及佐劑來進行追加促升接種。

結果

收集兩種研究之血清以分析 A β ₁₃₋₂₈ 肽-特異性 IgG 抗體效價。在 Balb/c 小鼠進行第 12 週追加注射的前一天及一週之後收集 Balb/c 小鼠血清。用實施例 11 動物

之脾細胞來評估此等細胞於活體外使用 $A\beta_{1-42}$ 肽片段、 $A\beta_{1-42}$ 全長，CRM₁₉₇ 或多株抗體活化物之重疊池刺激時反應的潛能。分析包括在 Elispot 對白介素 4 及 5 及干擾素 γ 的讀取值。於完成後，該 $A\beta$ 肽共軛物如前所述及如實施例 6 所述來評估。

實施例 12

$A\beta$ 肽共軛物於 PSAPP 小鼠之免疫研究

將 PSAPP 小鼠用 VFFAEDVG-C (SEQ ID NO: 43)、LVFFAEDV-C (SEQ ID NO: 44)、KLVFFAED-C (SEQ ID NO: 45)、C-VFFAEDVG (SEQ ID NO: 46)、C-LVFFAEDV (SEQ ID NO: 47)、C-KLVFFAED (SEQ ID NO: 48)、VFFAEDV-C (SEQ ID NO: 49) 及 LVFFAED-C (SEQ ID NO: 50) 來免疫。該 PSAPP 小鼠為一種過度表現 APP 突變及 PS1 轉基因之雙轉基因小鼠，係述於 Holcomb et al. (1998) Nature Medicine 4: 97-11。

$A\beta$ 肽共軛物於 PDAPP 小鼠之免疫研究

將 PDAPP 小鼠用 VFFAEDVG-C (SEQ ID NO: 43)、LVFFAEDV-C (SEQ ID NO: 44)、KLVFFAED-C (SEQ ID NO: 45)、C-VFFAEDVG (SEQ ID NO: 46)、C-LVFFAEDV (SEQ ID NO: 47)、C-KLVFFAED (SEQ ID NO: 48)、VFFAEDV-C (SEQ ID NO: 49) 及 LVFFAED-C (SEQ ID NO: 50) 來免疫。該 PDAPP 小鼠

會表現一種人類 APP 之突變形式 (APP^{V71F}) 且在年輕時便發展出阿茲海默氏症 (Bard et al. (2000) Nature Medicine 6 : 916-919 ; Masliah e, et al. (1996) J Neutosci. 15 : 16(18) : 5795-811) 。

結果

收集兩種研究之血清以分析 A β ₁₃₋₂₈ 肽 - 特異性 IgG 抗體效價。於完成後，該 A β 肽共軛物如前所述及如實施例 6 及 11 所述，以及於制約恐懼調教 (contextual fear conditioning) (CFC) 檢定來評估。

典型地，該 CFC 檢定係在標準動物槽中進行且所採用的調教訓練包括伴有聽覺的 (如一段時間的 85 db 白色雜音)，嗅覺的 (如杏仁或檸檬味)，觸覺 (如獸欄地板材質紋理) 及 / 或視覺線索 (閃光) 之輕微電擊 (如 0.35m 足部電擊)。對於負面經驗 (電擊) 之反應一般為停頓 (除了呼吸以外沒有其它動作) 不過也可能包括眨眼或瞬膜反射，視所選動物而定。通常會在測驗第一天測定該負面反應以決定基線值以瞭解在後續測試期間非調教性恐懼之負面反應，例如出現線索但無負面經驗之停頓，即被定義成制約性調教恐懼。為了改善可信度，測試動物一般會分別由個別技術人員來測試且隨時間來計分。額外的實驗設計可於此技術中如 Crawley, JN, What's Wrong with my Mouse; Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice, Wiley-Liss, NY (2000) 發現得到。

用來測試在此所述之共軛物功能之條件性恐懼調教及其它活體內檢定可使用野生型小鼠或具有特定基因變異導致記憶受損之小鼠或神經退化性疾病如阿茲海默氏症小鼠模式，包括在腦脊髓液（CSF）或血漿中顯示高含量 $A\beta$ 之小鼠模式來進行。例如，阿茲海默氏症小鼠動物模式包括過度表現人類澱粉樣前體蛋白質之“瑞典型”突變（hAPP_{swe}; Tg2576）之轉基因小鼠，其會顯示出年齡相關之記憶缺損及斑塊（Hsiao et al. (1996) *Science* 274: 99-102）。在此所述共軛物之活體內功能性亦可使用述於 Duff et al. (1996) *Nature* 383,710-713 之 PS-1 突變小鼠來測試。阿茲海默氏症之其它基因變異之轉基因模式係述於 Masliah E and Rockenstein E. (2000) *J Neural Transm Suppl.* 59: 175-83。

CFC 檢定為一種模式小鼠檢定，其至少部份係根據制約恐懼調教研究中對動物投予測試之免疫原藥劑後測定動物認知情況並與適當對照組進行比較的結果。該 CFC 檢定會評估使用有潛力之治療性藥物來治療動物後，該動物（通常為小鼠或大鼠）認知情況改變的情形。於特定具體例中，所評估之認知改變為一種記憶受損狀態的改善或者記憶缺失的回復。據此，該 CFC 檢定可提供一種測定藥物預防或治療認知疾病之治療效果之直接方法，特別是該等疾病或異常會影響腦的一或多處區域如海馬回、海馬回下腳、帶狀皮質、額葉前部皮質、鼻週皮質、感覺皮質及內側顳葉等。此等 CFC 檢定於 2004 年 12 月 15 日提出且目

前正審查中的美國專利申請案第 60 / XXX,XXX (具律師檔案第 ELN-058-1) 中有討論，該案全部併此以為參考。

【圖式簡單說明】

第 1 圖：顯示將 $A\beta$ 肽片段接合到蛋白質 / 多肽載體 CRM₁₉₇ 以形成該 $A\beta$ / CRM₁₉₇ 共軛物之化學加工過程之流程圖；

第 2 圖：顯示以酸水解法定量測定 S-羧甲基半胱胺酸及 S-羧甲基半胱胺之流程圖，其可用來評估例如 $A\beta$ / CRM₁₉₇ 共軛物中肽免疫原-蛋白質 / 多肽共軛物接合的程度。

第 3 圖：此圖顯示 $A\beta$ 肽 / CRM 接合反應與 pH 值間之相關性。

第 4 圖：此圖顯示 $A\beta$ 肽 / CRM 接合反應與肽：CRM 比例間之相關性。

第 5 圖： $A\beta$ 1-7 / CRM 接合反應之加蓋過程的確認作用。反應之 pH 值為 9.15。與肽反應的反應時間為 16 小時，用 N-乙醯基半胱胺加蓋的反應時間為 8 小時。

第 6 圖：採用不同肽：CRM 比例進行之肽接合及加蓋作用。反應的 pH 值為 9.0。與肽反應的反應時間為 16 小時，用 N-乙醯基半胱胺加蓋的反應時間為 8 小時。

第 7 圖：在用 $A\beta$ 肽共軛物及不同佐劑來對靈長類免疫後第 36 天時靈長類血清的抗體效價。

第 8 圖：在用 $A\beta$ 肽共軛物及不同佐劑來對靈長類免

疫後第 64 天時靈長類血清的抗體效價。

第 9 圖：不同治療群組在不同天數時之靈長類血清的抗體效價。靈長類動物係以 $A\beta$ 1-7 或 $A\beta$ 1-5CRM₁₉₇ 共軛物且以明礬或 RC529 為佐劑來進行免疫且在第 29 天、36 天、57 天及 54 天時測量抗 $A\beta$ 抗體之效價。

第 10 圖：肽-蛋白質共軛物係使用 SDS-PAGE 蛋白質印跡分析並以三羥甲基胺基甲烷-三甲基甘胺酸預鑄凝膠來界定特徵。各線道分別為：標記物（第 1 線道）；L-28375 24／01（第 2 線道）；L-28375 24／02（第 3 線道）；L-28375 24／03（第 4 線道）；L-28375 24／04（第 5 線道）；L-28375 24／05（第 6 線道）；L-28375 24／06（第 7 線道）；L-28375 24／07（第 8 線道）；L-28375 24／08（第 9 線道）；L-28375 24／09（仿製物）（第 10 線道）；及 BrAcCRM₁₉₇（第 11 線道）。

序列表

<110> 衛斯公司(Wyeth)
艾倫法瑪國際有限公司(Elan Pharma International Limited)

<120> A β -免疫原-載體共軛物及產製彼之方法

<140> TW 093139610

<141> 2004-12-17

<150> US 60/530,481

<151> 2003-12-17

<160> 54

<170> PatentIn 版本 3.3

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg Cys

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Cys

1 5

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Cys
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val Cys
1 5 10

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Asp Ala Glu Phe Arg Gly Ala Gly Ala Cys
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gly Ala Gly Ala Cys

: 1 5 10

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gly Ala Gly Ala Cys
1 5 10

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val Gly Ala Gly Ala
1 5 10 15

Cys

<210> 9
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Val Glu Tyr Gly Ser Asp His Arg Phe Glu Ala Asp Cys
1 5 10

<210> 10

<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Gly Ala Gly Ala
1

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa可爲任何自然生成之胺基酸

<400> 12

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 16
<212> PRT

: <213> 智人

: <400> 13

Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val
1 5 10 15

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Phe Glu Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
1 5 10

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly
1 5 10 15

Asn Glu Gly

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu

1 5 10

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu

1 5 10 15

<210> 18

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

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

1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu

20

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr

1 5 10 15

<210> 20
<211> 51
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
20 25 30

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe
35 40 45

Arg His Asp
50

<210> 21
<211> 42
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 22
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20

<210> 23
<211> 28
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
1 5 10 15

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
20 25

<210> 24
<211> 43
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu
20 25 30

Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
35 40

<210> 25
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20

<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa可爲任何自然生成之胺基酸

<400> 26

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu
1 5 10 15

Phe Arg His Asp

20

<210> 27

<211> 34

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> Xaa可爲任何自然生成之胺基酸

<400> 27

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala

1

5

10

15

Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala

20

25

30

Ala Ala

<210> 28

<211> 34

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa可爲任何自然生成之胺基酸

<400> 28

:
Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu
1 5 10 15

Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg
 20 25 30

His Asp

<210> 29
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa可爲任何自然生成之胺基酸

<400> 29

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu
1 5 10 15

Lys Ala Ala Ala
 20

<210> 30
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His
1 5 10 15

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 31
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His
1 5 10 15

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 32
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His
1 5 10 15

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 33
<211> 34
<212> PRT

<213> 智人

<400> 33

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu
1 5 10 15

Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg
20 25 30

His Asp

<210> 34

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人

<400> 34

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
20 25

<210> 35

<211> 34

<212> PRT

<213> 智人

<400> 35

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala
1 5 10 15

Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu
20 25 30

Ala Thr

<210> 36

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人

<400> 36

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys
1 5 10 15

Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
20 25

<210> 37

<211> 79

<212> PRT

<213> 智人

<400> 37

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ala Thr Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser
20 25 30

Val Phe Asn Val Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile
35 40 45

Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro
50 55 60

Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
65 70 75

<210> 38
<211> 58
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala
1 5 10 15

Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly
20 25 30

Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg
35 40 45

Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
50 55

<210> 39
<211> 44
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe

1 5 10 15
Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
20 25 30
Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
35 40
<210> 40
<211> 535
<212> PRT
<213> 智人
<400> 40
Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
1 5 10 15
Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30
Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45
Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60
Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80
Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
245 250 255

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
405 410 415

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


```

      420              425              430
:
-
-
Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
      435              440              445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
      450              455              460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
      465              470              475              480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
      485              490              495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
      500              505              510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
      515              520              525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
      530              535

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1              5              10              15

```

Arg

<210> 42

<211> 42

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 42

Asp Ala Glu Phe Gly His Asp Ser Gly Phe Glu Val Arg His Gln Lys

1

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35

40

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造的

<220>

<223> A-beta 18-25 + C

<400> 43

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Cys

1

5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

: <213> 人造的

<220>

<223> A-beta 17-24 + C

<400> 44

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys
1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造的

<220>

<223> A-beta 16-23 + C

<400> 45

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Cys
1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造的

<220>

<223> A-beta 18-25 + C

<400> 46

Cys Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly
1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造的

<220>

<223> C + A-beta 18-25

<400> 47

Cys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造的

<220>

<223> C + A-beta 16-23

<400> 48

Cys Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp

1 5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> 人造的

<220>

<223> A-beta 18-24 + C

<400> 49

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Cys

1 5

<210> 50

<211> 8
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> A-beta 17-23 + C

<400> 50

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Cys
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> A-beta 16-22 + C

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> CRM 197經由終端半胱氨酸加入

<400> 51

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Cys
1 5

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> C + A-beta 18-24

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> CRM 197經由N-端半胱氨酸加入

<400> 52

Cys Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> C + A-beta 17-23

<400> 53

Cys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造的

<220>
<223> C + A-beta 16-22 + C

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> CRM 197經由N-端半胱氨酸加入

<400> 54

I379839

:

Cys Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu

:

1 5

-

-



-

-

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100140530

※申請日期：93.12.17

※IPC 分類：

C07K 19/00 (2006.01)
C07K 4/12 (2006.01)

原申請案號：093139610

(2006.01)

一、發明名稱：(中文／英文)

A β 免疫原肽－載體共軛物及產製彼之方法

A β immunogenic peptide carrier conjugates and methods of producing same

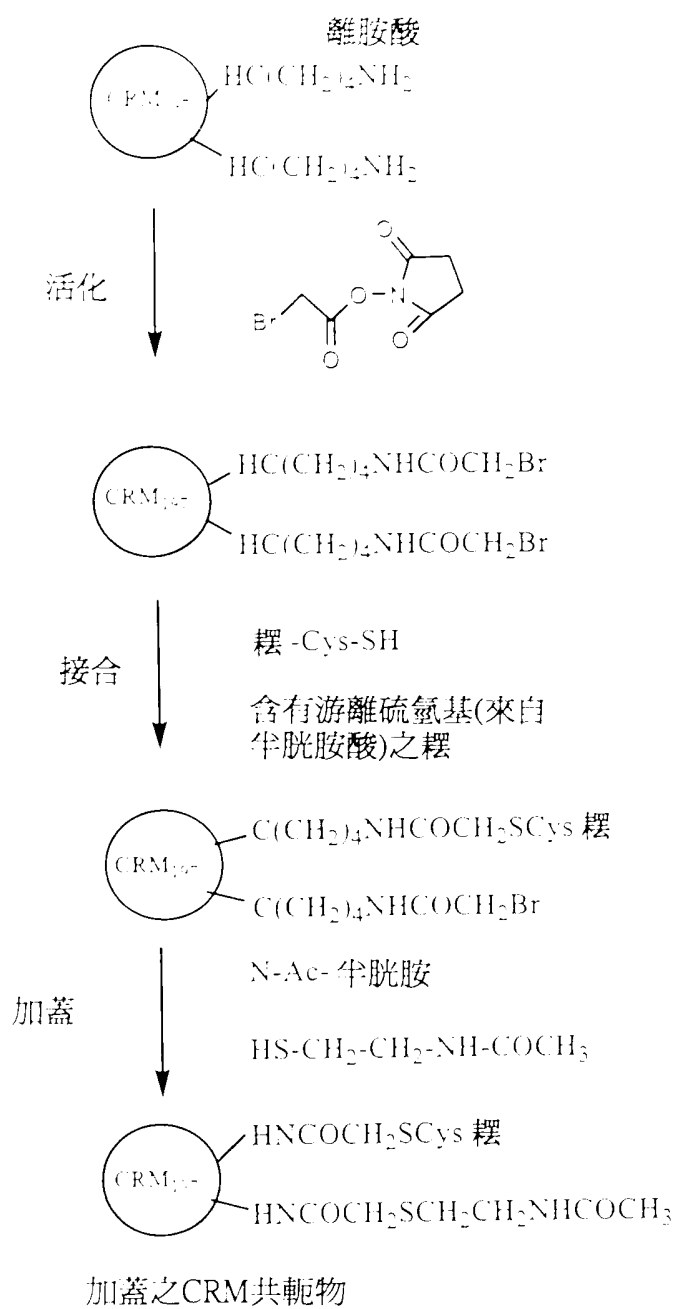
二、中文發明摘要：

本發明係關於產製由 A β 免疫原與蛋白質／多載體分子形成之免疫原共軛物之方法，其中該免疫原係經由該載體上或任意地依附在該載體上之接頭分子之胺基酸殘基上被活化之官能基來接合到該蛋白質載體上，且其中該等胺基酸殘基上未進行接合之反應性官能基會經由加蓋 (capping) 來鈍化，如此可保有該載體分子的免疫官能性，但可減少由於共軛物進行不當反應而變得較不安全或較不有效之可能性。再者，本發明亦關於用此等方法產製之免疫原產物及含有此等免疫原產物之免疫原組成物。

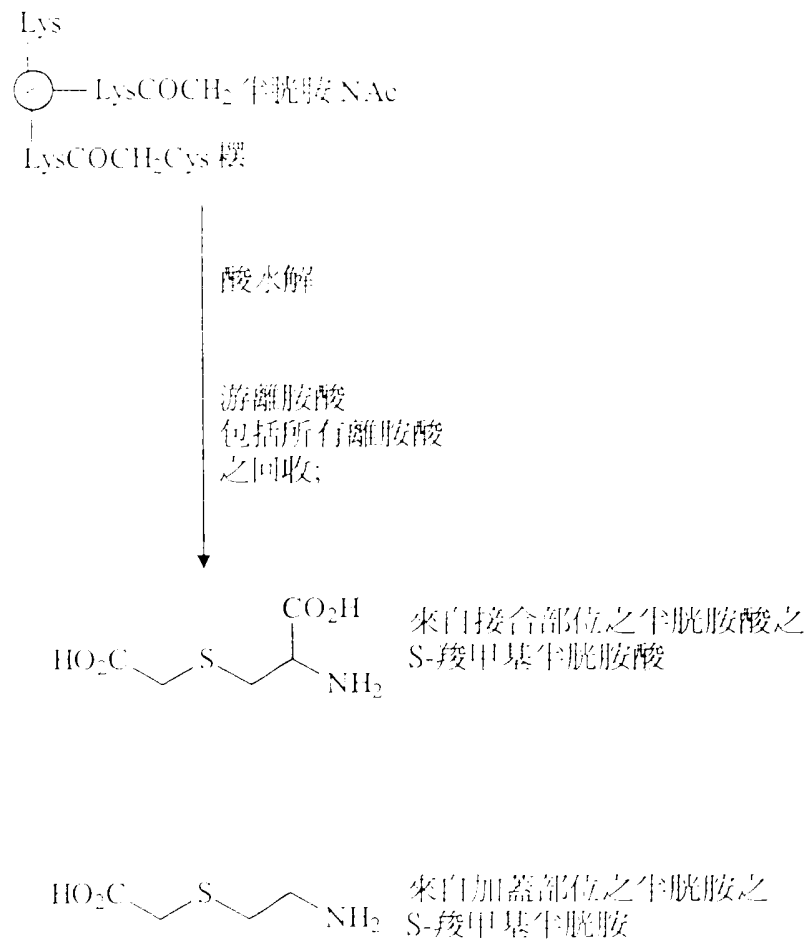
三、英文發明摘要：

The present invention is directed to methods of producing conjugates of A β peptide immunogens with protein/polypeptide carrier molecules, which are useful as immunogens, wherein peptide immunogens are conjugated to protein carriers via activated functional groups on amino acid residues of the carrier or of the optionally attached linker molecule, and wherein any unconjugated reactive functional groups on amino acid residues are inactivated via capping, thus retaining the immunological functionality of the carrier molecule, but reducing the propensity for undesirable reactions that could render the conjugate less safe or effective. Furthermore, the invention also relates to such immunogenic products and immunogenic compositions containing such immunogenic products made by such methods.

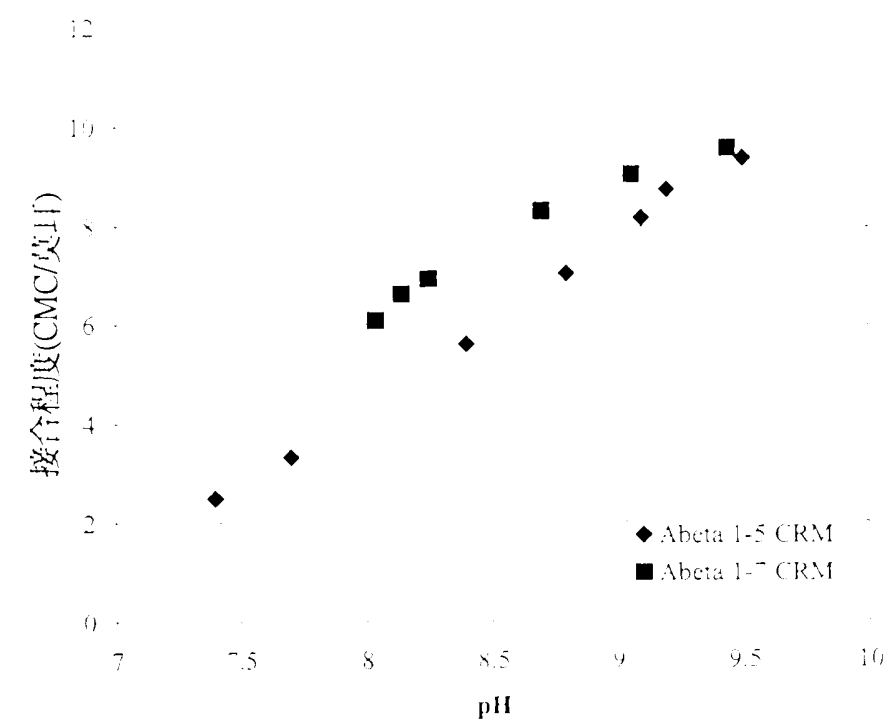
第1圖



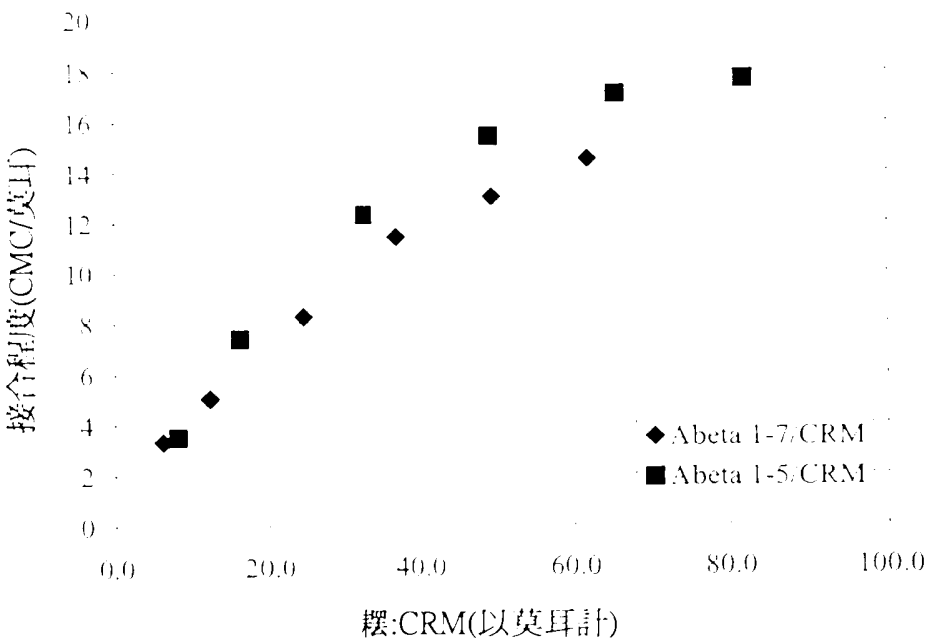
第2圖



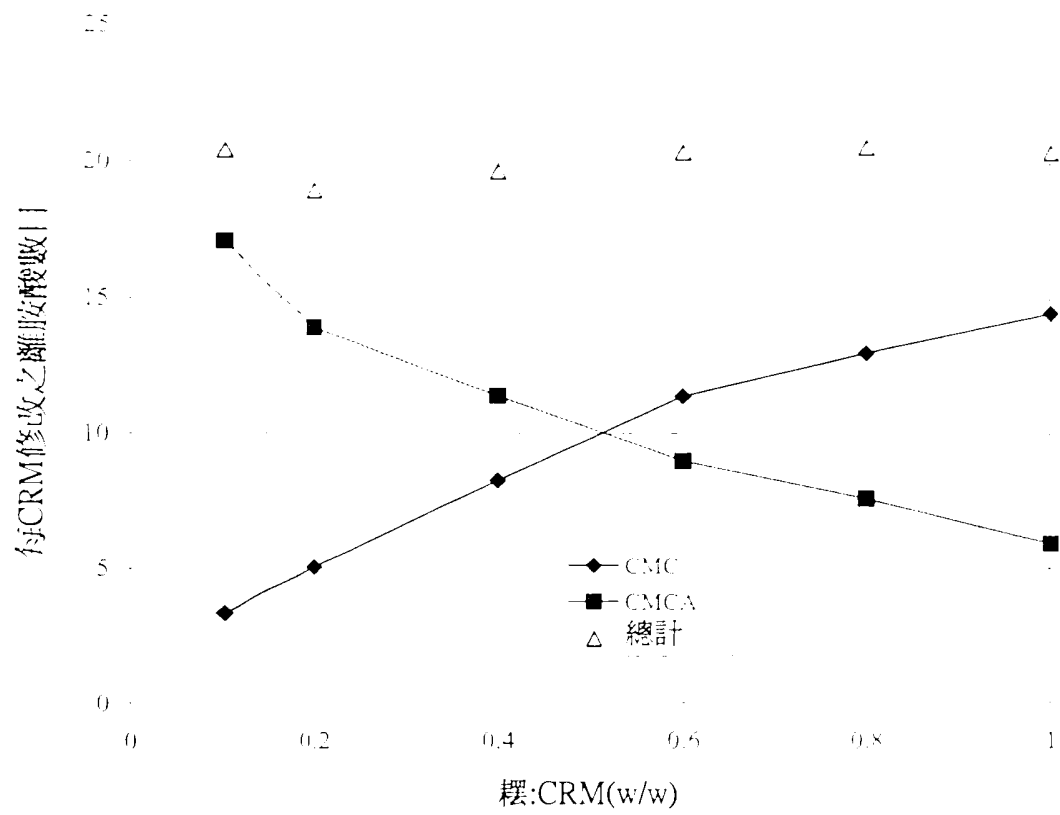
第3圖



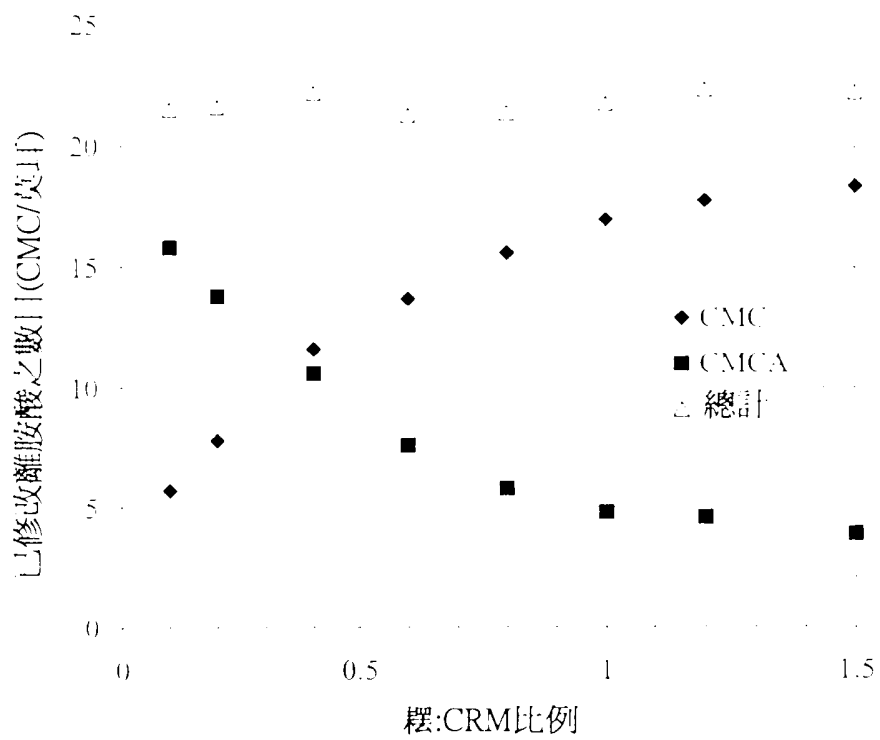
第4圖



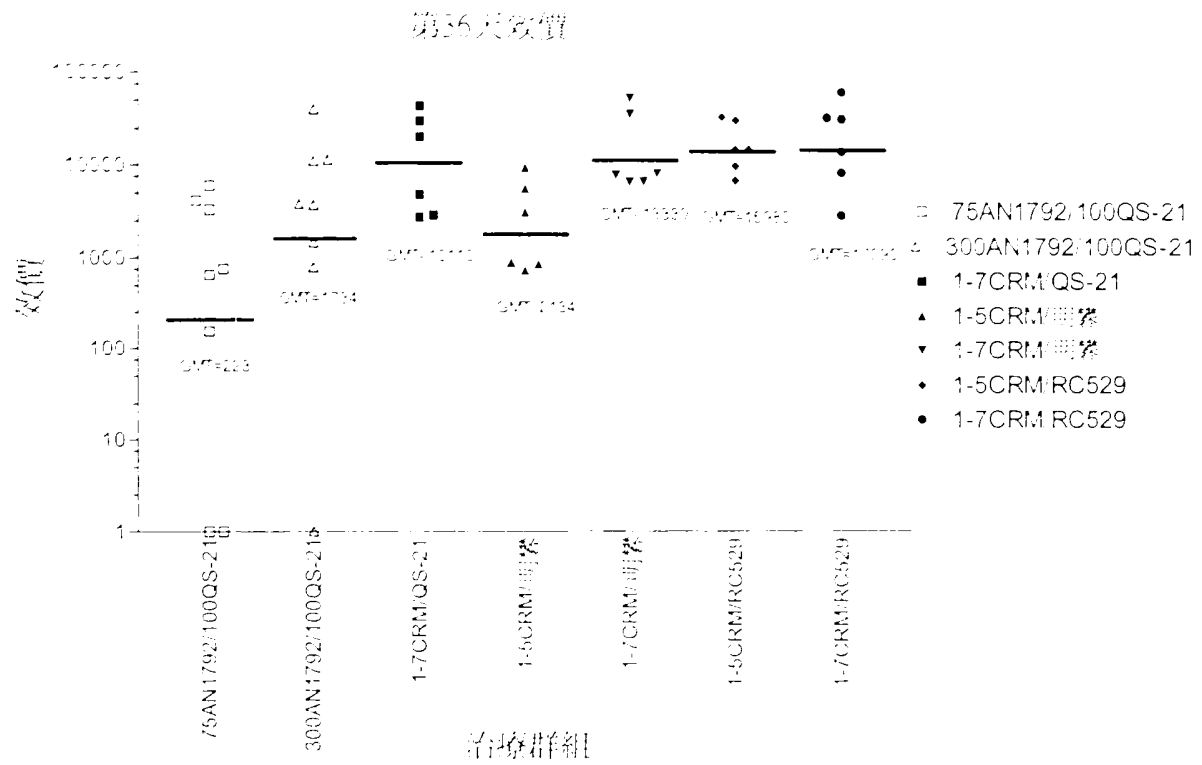
第5圖

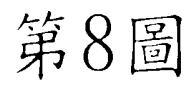


第6圖



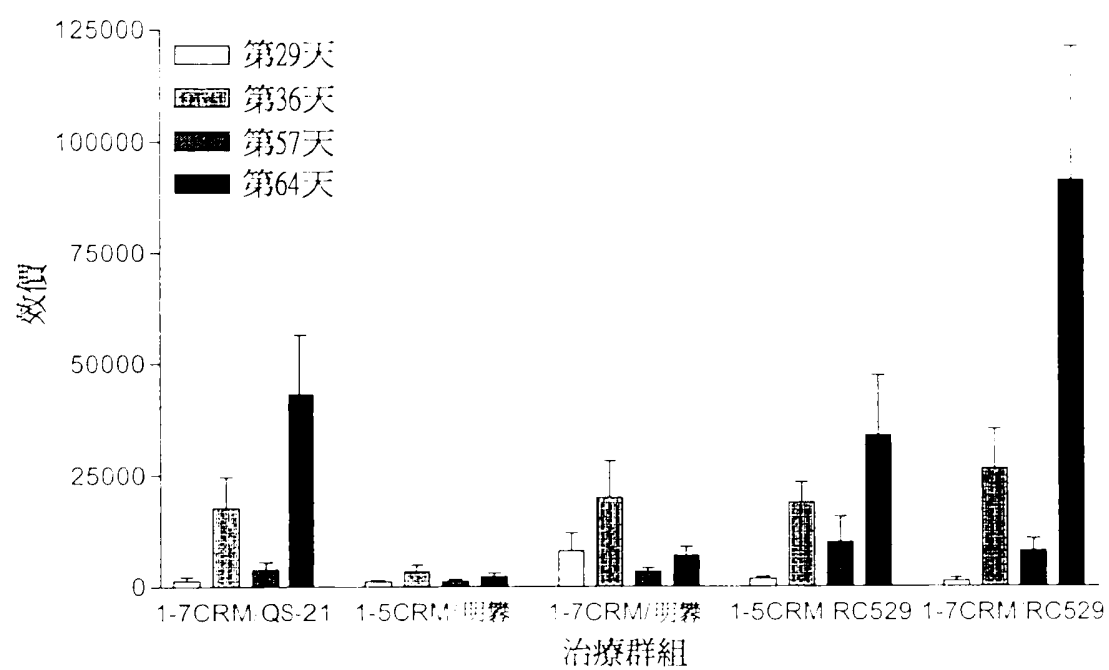
第7圖



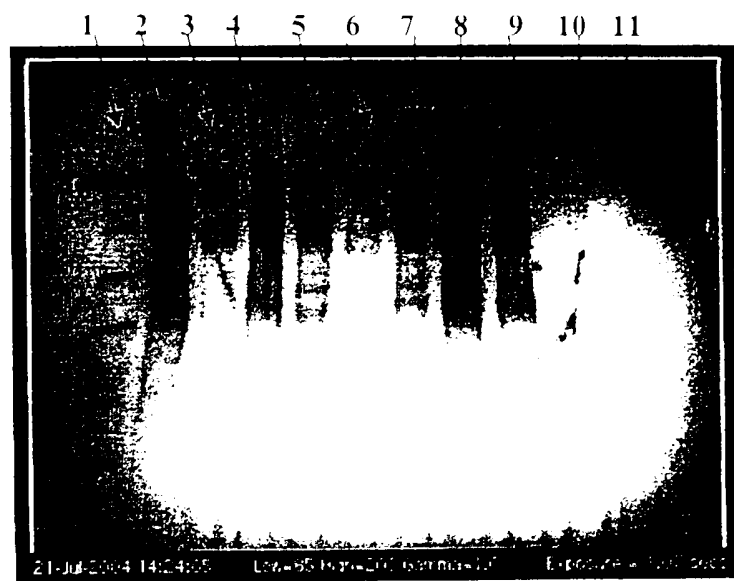


第9圖

不同天數之效價



第10圖



四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

年 101 月 5 日 修(更)正本

附件3 A：第100140530號申請專利範圍修正本

民國 101 年 5 月 16 日修正

七、申請專利範圍：

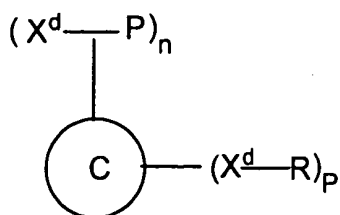
1. 一種製造免疫原性共軛物之方法，其包含下述步驟：

(a) 使載體蛋白質之一或多個官能基衍生化以於該載體蛋白質上產生經活化之官能基，其中該載體蛋白質係 CRM₁₉₇；

(b) 令包含 A β 片段之肽免疫原與步驟 (a) 之載體蛋白質於形成共軛物之條件下反應，其中該肽免疫原係與該載體蛋白質上經活化之官能基共價連接，且其中該 A β 片段選自 A β (SEQ ID NO: 21) 之殘基 1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-9、1-10、1-11、1-12、1-16、1-28、3-6、3-7、13-28、15-24、16-22、16-23、17-23、17-24、18-24、18-25、17-28、25-35、33-42、35-40 或 35-42；及

(c) 進一步令步驟 (b) 之共軛物與加蓋劑反應以使該載體蛋白質上任何殘留的經活化之官能基失去活性，藉以產生免疫原性共軛物，致使保留該載體蛋白質之官能性，使得該共軛物保有引發所欲之拮抗該肽免疫原之免疫反應之能力，且若無載體，則無法產生該免疫反應，

其中該共軛物係如下式所示：



其中 C 為載體蛋白質， X^d 為該載體蛋白質之衍生化官能基，P 為肽免疫原，R 為加蓋分子，n 為大於 0 但小於或等於 38 之整數，且 p 為大於 0 但小於或等於 38 之整數。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其進一步包含對該肽免疫原導入反應基，其中該肽免疫原係經由該反應基與該載體蛋白質的經活化之官能基共價連接。

3. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該反應基係終端半胱胺酸殘基。

4. 如申請專利範圍第 3 項之方法，其中該終端半胱胺酸殘基係位於該 A β 片段之羧基端。

5. 如申請專利範圍第 3 項之方法，其中該終端半胱胺酸殘基係位於該 A β 片段之胺基端。

6. 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該 A β 片段係 A β (SEQ ID NO: 21) 之殘基 1-7。

7. 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該 A β 片段係 A β (SEQ ID NO: 21) 之殘基 16-23。

8. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 n 係大於或等於 5 但小於或等於 25 之整數。

9. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其中 n 係大於或等於 12 但小於或等於 20 之整數。

10. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該加蓋劑選自半胱胺、N-乙醯基半胱胺、乙醇胺、氨、碳酸氫銨、氫氧化鈉或碳酸鈉。

11. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 A β 片段係

A β (SEQ ID NO: 21) 之殘基 1-7 且其中 n 係 12 或 14。

12. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該肽免疫原為 DAEFRHD-C (SEQ ID NO: 2)。

13. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該肽免疫原為 KLVFFAED-C (SEQ ID NO: 45)。

14. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該加蓋劑係 N-乙醯基半胱胺。

15. 如申請專利範圍第 13 項之方法，其中該加蓋劑係 N-乙醯基半胱胺。

16. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 X^d 為離胺酸殘基之衍生化官能基。

17. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中使用鹵乙醯化劑使該載體蛋白質之官能基衍生化。

18. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中對該肽免疫原導入該反應基包含加入含有該反應基之胺基酸殘基。

19. 如申請專利範圍第 18 項之方法，其中該胺基酸殘基係半胱胺酸殘基且該反應基包含 -SH，或該胺基酸殘基係精胺酸殘基且該反應基包含胍基，或該胺基酸殘基係麩胺酸或天冬胺酸殘基且該反應基包含 -COOH，或該胺基酸殘基係離胺酸殘基且該反應基包含 -NH₂。

20. 如申請專利範圍第 18 項之方法，其中於肽合成期間藉由加入將該胺基酸殘基導入該肽免疫原。

21. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中對該肽免疫原導入該反應基包含經由硫醇化劑產生懸垂之硫醇基。

22.如申請專利範圍第21項之方法，其中該硫醇化劑包含N-乙醯基高半胱胺酸硫內酯。

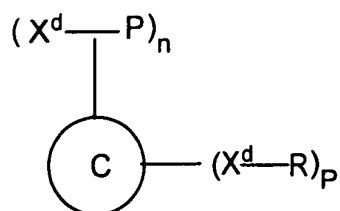
23.如申請專利範圍第1項之方法，其包含：

(a) 使CRM₁₉₇載體蛋白質之一或多個離胺酸殘基衍生化以於該載體蛋白質上產生經活化之官能基；

(b) 令包含A β (SEQ ID NO: 21)之殘基1-7和羧基端半胱胺酸殘基之肽免疫原與步驟(a)之載體蛋白質於形成共軛物之條件下反應；及

(c) 進一步令步驟(b)之共軛物與N-乙醯基半胱胺酸反應以使該載體蛋白質上任何殘留的經活化之官能基失去活性，藉以產生免疫原性共軛物，

其中該免疫原性共軛物係如下式所示：



其中

C為CRM₁₉₇，

X^d為CRM₁₉₇之衍生化離胺酸殘基，

P為經由該羧基端半胱胺酸殘基與該衍生化之離胺酸殘基共價連接之肽免疫原，

R為藉由令該共軛物與N-乙醯基半胱胺酸反應所生成之加蓋分子，該N-乙醯基半胱胺酸於步驟(c)中與該CRM₁₉₇之衍生化離胺酸殘基共價連接，致使保留該載體蛋白質之官能性，使得該共軛物保有引發所欲之拮抗該肽免疫原之

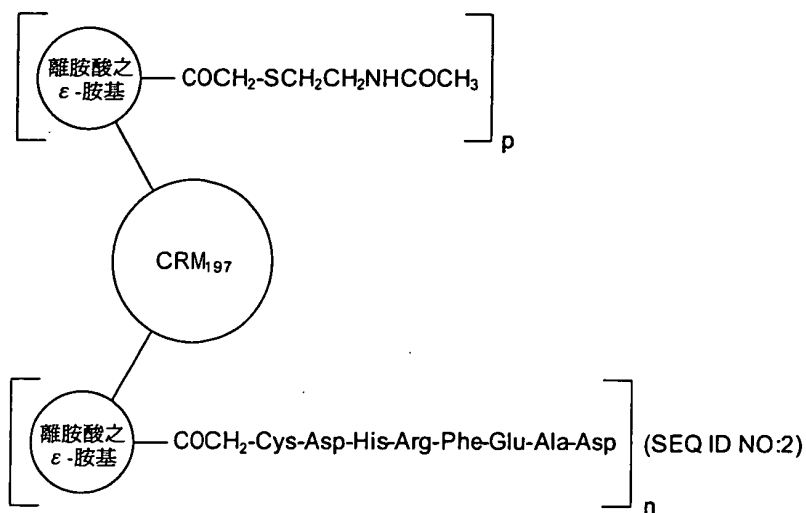
免疫反應之能力，且若無載體，則無法產生該免疫反應，

n 為大於 0 但小於或等於 38 之整數，且

p 為大於 0 但小於或等於 38 之整數。

24. 如申請專利範圍第 23 項之方法，其中該肽免疫原為 DAEFRHD-C (SEQ ID NO: 2)。

25. 如申請專利範圍第 23 項之方法，其中該免疫原性共軛物係如下式所示：



其中

n 為大於 0 但小於或等於 38 之整數，且

p 為大於 0 但小於或等於 38 之整數。

26. 如申請專利範圍第 25 項之方法，其中 n 為 12、14 或 15。

27. 如申請專利範圍第 26 項之方法，其中 $n+p$ 等於 20 至 22。

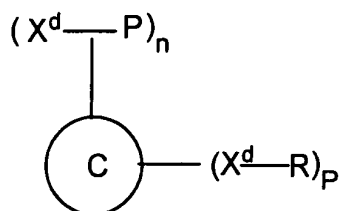
28. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其包含：

(a) 使 CRM₁₉₇ 載體蛋白質之一或多個離胺酸殘基衍生化以於該載體蛋白質上產生經活化之官能基；

(b) 令包含 A β (SEQ ID NO: 21) 之殘基 16-23 和羧基端半胱胺酸殘基之肽免疫原與步驟 (a) 之載體蛋白質於形成共軛物之條件下反應；及

(c) 進一步令步驟 (b) 之共軛物與 N-乙醯基半胱胺酸反應以使該載體蛋白質上任何殘留的經活化之官能基失去活性，藉以產生免疫原性共軛物，

其中該免疫原性共軛物係如下式所示：



其中

C 為 CRM₁₉₇，

X^d 為 CRM₁₉₇ 之衍生化離胺酸殘基，

P 為經由該羧基端半胱胺酸殘基與該衍生化之離胺酸殘基共價連接之肽免疫原，

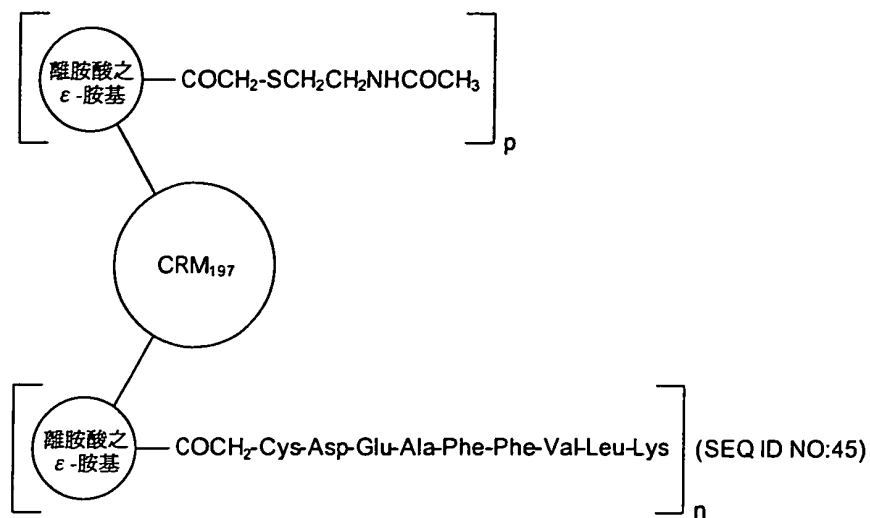
R 為藉由令該共軛物與 N-乙醯基半胱胺酸反應所生成之加蓋分子，該 N-乙醯基半胱胺酸於步驟 (c) 中與該 CRM₁₉₇ 之衍生化離胺酸殘基共價連接，致使保留該載體蛋白質之官能性，使得該共軛物保有引發所欲之拮抗該肽免疫原之免疫反應之能力，且若無載體，則無法產生該免疫反應，

n 為大於 0 但小於或等於 38 之整數，且

p 為大於 0 但小於或等於 38 之整數。

29. 如申請專利範圍第 28 項之方法，其中該肽免疫原為 KLVFFAED-C (SEQ ID NO: 45)。

30. 如申請專利範圍第28項之方法，其中該免疫原性共軛物係如下式所示：



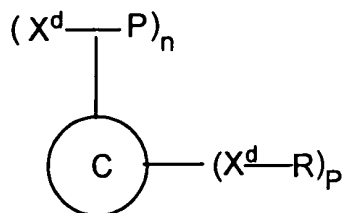
其中

n 為大於 0 但小於或等於 38 之整數，且

p 為大於 0 但小於或等於 38 之整數。

31. 如申請專利範圍第30項之方法，其中 $n+p$ 等於 20 至 22。

32. 一種免疫原性共軛物於製造供於哺乳動物個體內引起免疫反應的藥物之用途，其中該免疫原性共軛物係如下式所示：



其中

C 為 CRM₁₉₇ 載體蛋白質，

X^d 為該載體蛋白質的胺基酸殘基之衍生化官能基，

P 為包含 A β 片段之肽免疫原，該肽免疫原係經由彼之胺基酸殘基的反應基與該載體蛋白質的胺基酸殘基之衍生化官能基共價連接，其中該 A β 片段選自 A β (SEQ ID NO: 21) 之殘基 1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-9、1-10、1-11、1-12、1-16、1-28、3-6、3-7、13-28、15-24、16-22、16-23、17-23、17-24、18-24、18-25、17-28、25-35、33-42、35-40 或 35-42，

R 為與該載體蛋白質的胺基酸殘基之衍生化官能基共價連接之加蓋分子，致使保留該載體蛋白質之官能性，使得該共軛物保有引發所欲之拮抗該肽免疫原之免疫反應之能力，且若無載體，則無法產生該免疫反應，

n 為大於 0 但小於或等於 38 之整數，且

p 為大於 0 但小於 38 之整數。

33. 如申請專利範圍第 32 項之用途，其中該 A β 片段係 A β (SEQ ID NO: 21) 之殘基 1-7。

34. 如申請專利範圍第 33 項之用途，其中該肽免疫原為 DAEFRHD-C (SEQ ID NO: 2)。

35. 如申請專利範圍第 32 項之用途，其中該 A β 片段係 A β (SEQ ID NO: 21) 之殘基 16-23。

36. 如申請專利範圍第 35 項之用途，其中該肽免疫原為 KLVFFAED-C (SEQ ID NO: 45)。

37. 如申請專利範圍第 32 項之用途，其中該藥物係與一或多種佐劑併用，該等佐劑選自 GM-CSF、529 SE、IL-12、磷酸鋁、氫氧化鋁、結核桿菌 (*Mycobacterium*

tuberculosis)、百日咳桿菌 (*Bordetella pertussis*)、細菌性脂多醣、胺烷基葡萄糖胺磷酸酯化合物、MPLTM (3-O-去醯基單磷醯基脂質 A)、多肽、Quil A、STIMULONTM QS-21、百日咳毒素 (PT)、大腸桿菌熱不安定毒素 (LT)、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、干擾素 - α 、干擾素 - β 、干擾素 - γ 、G-CSF、TNF- α 或 TNF- β 。