



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101675992 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 21

(21) 申请号 200910204496. 3

(22) 申请日 2002. 08. 20

(30) 优先权数据

60/373, 027 2002. 04. 16 US

PA200200558 2002. 04. 16 DK

PA200101231 2001. 08. 20 DK

60/337, 543 2001. 10. 22 US

(62) 分案原申请数据

02816326. 5 2002. 08. 20

(73) 专利权人 灵北联合股份公司

地址 丹麦瓦尔比

(72) 发明人 彼得·比尔克·拉斯穆森

马丁·罗兰·詹森

克劳斯·格雷戈留斯·尼尔森

彼得·克费欧德

弗洛伦斯·达尔·德甘

(74) 专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理

有限公司 11291

代理人 黄志华

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006. 01)

A61K 39/385 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

A61P 25/28 (2006. 01)

C12N 15/12 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 5/22 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 0072880 A2, 2000. 12. 07,

W0 0142306 A2, 2001. 06. 14,

W0 9927944 A9, 1999. 09. 23,

审查员 李煦颖

权利要求书1页 说明书51页 附图2页

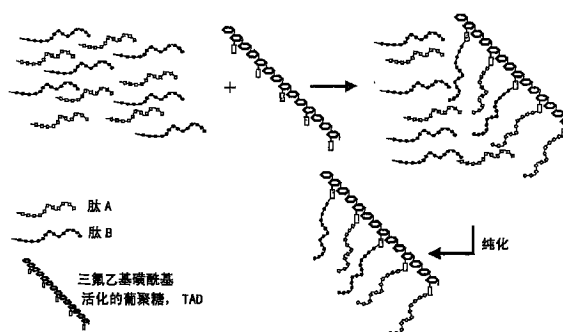
(54) 发明名称

β -淀粉样蛋白-类似物-T-细胞表位疫苗

(57) 摘要

发明了抵抗以淀粉样蛋白沉积为特征的疾病的新方法。概括地说,该方法基于抗淀粉样蛋白前体 (APP) 或 β 淀粉样蛋白 (A β) 的免疫接种。优选地免疫接种通过给药自源 APP 或 A β 类似物而发挥作用,所述类似物能够诱导产生抗自源淀粉样多肽的抗体。特别优选地是,以通过修饰而引入一个或几个外源的免疫显性的混杂型 T 细胞表位的自源 A β 作为免疫原。另外也发明了抗 APP 或 A β 的核酸免疫接种和使用活疫苗的免疫接种,以及在免疫接种中所用的方法和方式。这些方法和方式包括制备类似物和药物制品以及核酸片段、载体、转化细胞、多肽和药物组分的方法。

PEP-CoVAC 合成



1. 一种免疫原在制备用于在动物中治疗、预防或改善阿尔兹海默氏病或其它以淀粉样蛋白沉积为特征的疾病的药物制剂中的应用,所述药物制剂包含所述免疫原,所述免疫原是如下所限定的多聚氨基酸:

A β 的氨基酸残基 672-683 + 破伤风类毒素 P30 表位的氨基酸残基 + A β 的氨基酸残基 672-683 + 破伤风类毒素 P2 表位的氨基酸残基 + A β 的氨基酸残基 672-683,

或 A β 的氨基酸残基 672-714 + 破伤风类毒素 P2 表位的氨基酸残基 + A β 的氨基酸残基 672-714 + 破伤风类毒素 P30 表位的氨基酸残基 + A β 的氨基酸残基 672-714, 其中 A β 是 SEQ ID NO:2 的序列,所述破伤风类毒素 P2 表位的氨基酸序列是 SEQ ID NO:4,所述破伤风类毒素 P30 表位的氨基酸序列是 SEQ ID NO:6。

2. 根据权利要求 1 的应用,其中所述多聚氨基酸已与一种佐剂一起配制,所述佐剂促进破坏对自身抗原的自动耐受。

3. 根据权利要求 1 或 2 的应用,其中所述治疗、预防或改善需要通过一种途径对所述动物给药有效量的所述多聚氨基酸,所述途径选自肠胃外途径;腹膜途径;口服途径;口含途径;舌下途径;硬膜外途径;脊柱途径;肛门途径和颅内途径。

4. 根据权利要求 1 或 2 的应用,其中所述治疗、预防或改善需要通过一种途径对所述动物给药有效量的所述多聚氨基酸,所述途径选自皮内、皮下和肌内途径。

5. 根据权利要求 3 的应用,其中所述有效量为 0.5 μ g-2,000 μ g 多聚氨基酸。

6. 根据权利要求 2 的应用,其中所述治疗、预防或改善需要每年至少进行一次给药/引入。

7. 根据权利要求 2 的应用,其中所述治疗、预防或改善需要每年进行至少 2 次、至少 3 次、至少 4 次、至少 6 次或者至少 12 次给药/引入。

8. 根据权利要求 1 的应用,其中所述治疗、预防或改善需要将 APP 或 A β 下调到使淀粉样蛋白总量降低或淀粉样蛋白形成速度具有临床显著性降低的程度。

β -淀粉样蛋白-类似物-T-细胞表位疫苗

发明领域

[0001] 本发明涉及改善阿尔兹海默氏病(AD)和其他以淀粉样蛋白沉积为特征,例如以淀粉样蛋白在中枢神经系统(CNS)中沉积为特征的疾病的治疗和预防。更具体地说,本发明提供一种通过在遭受或有风险遭受具有涉及淀粉样蛋白沉积病理特征的疾病的患者中产生抗相关蛋白(APP或A β)或其组分的抗体来下调(不需要的)淀粉样蛋白沉积的方法。本发明还提供生产在该方法中所用多肽的方法及如此修饰的多肽。本发明还包括编码修饰多肽的核酸片段以及整合这些核酸片段的载体,及以此转染的宿主细胞和细胞系。最后,本发明还提供一种新型的结合物肽免疫原。

[0002] 发明背景

[0003] 淀粉样变性是导致组织损伤和疾病的不溶性蛋白原纤维的细胞外沉积(Pepys, 1996; Tan 等, 1995; Kelly, 1996)。当正常可溶性蛋白和肽以异常方式进行自交联时,原纤维形成(Kelly, 1997)。

[0004] 淀粉样蛋白与严重疾病,包括系统淀粉样变性病、AD、成熟期发作糖尿病(maturity onset diabetes)、帕金森病、亨廷顿舞蹈病、额颞痴呆(fronto-temporal dementia)和朊病毒相关的传染性海绵状脑病(人的库鲁病和克雅病及绵羊和牛的痒病)有关,在例如阿尔兹海默氏病中淀粉样蛋白斑的形成,似乎与人的疾病发展最相关。已显示在沉积物中发现的蛋白,如 β -淀粉样蛋白在动物模型中的过量表达或修饰形式的表达诱导疾病的各种症状,例如阿尔兹海默氏病样症状。目前没有针对淀粉样蛋白沉积的特异性治疗,而且这些疾病通常是致命的。

[0005] 淀粉样蛋白原纤维的亚基可以是野生型、变异的或截短的蛋白,在体外,从寡肽和变性蛋白可形成类似的原纤维(Bradbury 等, 1960; Filshie 等, 1964; Burke & Rougvie, 1972)。原纤维多肽组分的性质决定淀粉样变性病的特征。尽管淀粉样蛋白的大小、天然结构和功能差别很大,但所有淀粉样蛋白原纤维都是长度不定的、无分支、直径为70-120Å,对刚果红表现出特征性染色(Pepys, 1996)。它们特征在于交叉的 β -结构(Pauling & Corey, 1951),其中多肽链组织成 β -折叠形式。虽然淀粉样蛋白具有非常不同的前体结构,但它们都可经历一种结构转换,或许沿类似的途径,转换成 β -折叠螺旋原纤维构件的错折叠形式。

[0006] 这种独特的纤维模式导致称为 β -纤维丝状的淀粉样变性病,(Glenner, 1980a, b), AD的原纤维蛋白在其二级结构被发现前称为 β -蛋白(Glenner & Wong, 1984)。目前,特征性交联 β -衍射模式与原纤维的出现和着色性能一起成为可接受的淀粉样蛋白的诊断标记,而且暗示,虽然原纤维从非常不同的蛋白前体形成,但不管其前体蛋白的性质如何,它们在一定程度上具有结构相似性,并包含一种结构超家族(Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CCFJ Mol Biol 1997 Oct 31; 273(3): 729-739)。

[0007] AD是最广泛和熟知的疾病之一,所述疾病中存在于中枢神经系统的淀粉样蛋白沉积物暗示在疾病发展中起到中心作用。

[0008] AD

[0009] 阿尔兹海默氏病 (AD) 是一种不可逆的渐进性脑疾病,其逐渐发生,并导致记忆丧失、行为和个性改变及智力下降。这些丧失与脑细胞死亡及它们之间连接的下降相关。该病的成因因人而异,如同下降的速度。平均来讲,虽然该病可持续达 20 年,但确诊后的 AD 患者只活 8 到 10 年。

[0010] AD 分阶段地发展,从早期轻度遗忘到精神功能的严重丧失。这种丧失已知为痴呆。在多数患有 AD 的人中,症状首先在 60 岁以后表现出来,但更早的发作并不罕见。最早期的症状通常包括近期记忆丧失、判断错误和个性改变。通常,处于 AD 初期的人思考较不清晰,忘记熟悉的人和一般物体的名称。在疾病晚期,他们甚至可能忘记如何做简单的事情。最后,患有 AD 的人丧失所有推理能力,变得依赖他人对其日常生活的照顾。最终,该病变得非常恶化以至于患者卧床不起,并可能发展其他疾病和感染。最常见地,患有 AD 的人死于肺炎。

[0011] 虽然 AD 发生的危险随年龄而增加,但 AD 和痴呆症状并不是正常衰老的一部分。AD 和其他痴呆疾病是由影响脑的疾病引起的。在正常衰老中,脑中的神经细胞并不大量丢失。相反,AD 破坏三个关键过程:神经细胞通讯、新陈代谢和修复。这种破坏最终导致许多神经细胞停止机能,丧失与其他神经细胞的联系,并死亡。

[0012] 首先,AD 破坏控制记忆的脑部分特别是海马和相关结构中的神经元。由于在海马中的神经细胞完全停止机能,所以造成短期记忆丧失,而且常常人做容易和熟悉事情的能力开始下降。AD 也攻击大脑皮层,特别是负责语言和推理的区域。最后,许多脑的其他区域也参与进来,所有这些脑区萎缩(收缩),AD 患者变得卧床不起、失禁、完全无助、对外界不反应(来源:National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999)。

[0013] AD 的冲击

[0014] AD 是 65 岁及以上的人中痴呆的最普遍原因。由于其对个人、家庭、健康护理系统和整个社会的巨大冲击,AD 已成为一个主要的健康问题。科学家估计,当前有超过 4 百万的人遭受该病,而且这种趋势在 65 岁以上的人中每 5 年翻一番。另外也估计大约每年有 360,000 新病例(发病率(incidence))发生,可是该数字随人口年龄而增加(Brookmeyer 等,1998)。

[0015] AD 给社会造成严重的经济负担。一项在美国进行的最新研究估计,每年用于一位 AD 患者的看护费用,对一个患有轻度 AD 的患者来说,是 \$18,408,对患有中度 AD 的患者是 \$30,096,对患有严重 AD 的患者是 \$36,132。在美国,估计每年用于看护 AD 患者的国家花费略高于 \$500 亿(Leon 等,1998)。

[0016] 大约 400 万美国人是 85 岁或更老,而且在大多数工业化国家,该年龄群是人口中增长最快的一部分。估计在美国,到 2030 年,该群体将接近 850 万;一些研究人口趋势的专家暗示该数字甚至可能更大。随着越来越多的人活的更长,受衰老疾病,包括 AD,影响的人数将继续增长。例如,一些研究表明,年龄为 85 岁和更老的人中大约有一半患有某种形式的痴呆症(National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999)。

[0017] AD 的主要特征

[0018] AD 的标志是脑中的两个异常结构:淀粉样蛋白斑和神经原纤维缠结(NFT)。斑是

密集的,是在脑神经元外部和周围蛋白和细胞物质的大量不溶性沉积物。缠结是在神经元内部形成的不溶的缠结的纤维。

[0019] 存在两种类型的AD:家族性AD(FAD)和偶发性AD,家族性AD遵循一个确定的遗传模式,而在偶发性AD中没有观察到明显的遗传模式。由于发作年龄的差异,AD进一步可描述为早期发作型(在小于65岁的人中发生)或晚期发作型(在65岁和更老的人中发生)。早期发作型AD是罕见的(大约有10%病例),通常影响30-60岁的人。某些形式的早期发作型AD是遗传的,在家族中流行。早期发作型AD也经常比更普遍的晚期发作型发展更快。

[0020] 所有迄今已知的FADs都有早期发作,现在已知有50%FAD病例由位于三个不同染色体上的三个基因的缺陷造成。它们是染色体21上APP基因的突变;染色体14上一个称为早老素基因(presenilin)1的基因突变;和染色体1上一个称为早老素基因2的基因突变。然而还没有证据证明这些突变中任何一个也在更普遍的偶发性或非家族性晚期发作AD中起主要作用(National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease,1999)。

[0021] 淀粉样蛋白斑

[0022] 在AD中,淀粉样蛋白斑首先在用于记忆和其他认知功能的脑区域中发生。它们包含 β 淀粉样蛋白(此后命名为A β)的大量不溶性沉积物,所述 β 淀粉样蛋白为称为淀粉样蛋白前体蛋白(APP,其氨基酸序列列于SEQ ID NO:2中)的较大蛋白的蛋白片段-混合以部分神经元和非神经细胞如小胶质细胞和星形胶质细胞。目前不知道是否淀粉样蛋白斑自身构成AD的主要原因或是否它们是AD过程的副产物。当然,APP蛋白的改变可导致AD,如在由APP基因突变导致的遗传型AD中,而且A β 斑的形成似乎与人疾病的发展紧密相关(Lippa C.F.等,1998)。

[0023] APP

[0024] APP是许多与细胞膜相关的蛋白质中的一个。当它合成后,APP嵌入到神经细胞的细胞膜中,部分在细胞内,部分在细胞外。最近用转基因小鼠的研究表明,APP在神经元的生长和存活中似乎起到重要作用。例如,一定形式和数量的APP可以保护神经元免受短期和长期损伤,并使损伤的神经元能更好地修复自己,而且在脑损伤后,可帮助部分神经元生长。

[0025] 当APP嵌入到细胞膜中时,蛋白酶作用在APP的特定位点,将其切割为蛋白片段。一种蛋白酶帮助将APP切割形成A β ,另一种蛋白酶在淀粉样蛋白片段中部切割APP,从而使A β 不能形成。形成的A β 有两种不同长度,较短的40(或41)个氨基酸的A β ,它是相对可溶的且聚集缓慢,稍微较长的,42个氨基酸的“粘性”A β ,它能够很快形成不溶的团块。当形成A β 时,还不确切知道它是如何通过或围绕神经细胞移动的。在该过程的最后阶段,“粘性”A β 在细胞外聚集成丝,并与已死和将死的神经元片段及小胶质细胞和星形胶质细胞形成作为脑组织中AD特征的斑。

[0026] 一些存在证据表明,APP中的突变赋予使A β 从APP前体中剪切出来,从而产生更多的总A β 或相对更多的“粘性”形式更多的可能性。它还显示早老素基因的突变可至少以两种方式造成神经元的退化:通过修饰A β 产生或更直接地通过引发细胞的死亡。其他研究者提示突变的早老素基因1和2可能参与加速细胞凋亡速度。

[0027] 预期随着疾病的进行,将会产生越来越多的病斑,填充越来越多的脑区。研究提

示 A β 可能以一种动态平衡的形式同时进行聚集和解聚。这给我们带来如下希望,即甚至有可能在斑形成后再对其进行降解 (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999)。

[0028] 认为 A β 对神经元是有毒性的。在组织培养研究中,研究者发现,与过量表达正常人 APP 的神经元相比较,改造成过量表达突变形式的人 APP 的海马神经元细胞死亡增加 (Luo 等, 1999)。

[0029] 另外,在动物模型中已表明,过量表达或表达修饰形式的 A β 蛋白诱导阿尔兹海默氏病症状 (Hsiao K. 等, 1998)。

[0030] 假定 A β 产生增加、其聚合为斑和由此造成的神经毒性可能导致 AD,那么调查可降低或甚至阻断 A β 聚集为斑的条件是具有治疗意义的。

[0031] 早老素基因

[0032] 早老素基因 -1 (S-180) 中的突变大约占有早期发作家族性 AD (FAD) 病例的 50%。已鉴定大约 30 个导致 AD 的突变。AD 的发作随突变而异。早老素基因 -2 中的突变占 FAD 病例更小得多的部分,但仍是一个重要因素。目前还不知道早老素基因是否参与偶发性非家族性 AD。早老素基因的功能是未知的,但由于在具有早老素基因突变的 AD 患者中 A β -42 水平增加,因此早老素基因似乎参与 APP 的加工以产生 A β -42 (较长较粘形式的肽, SEQ ID NO:2 中,残基 673-714)。不清楚早老素基因是否也在 NFT's 产生中具有作用。一些提示早老素基因在神经元退化和神经元死亡中具有更直接的作用。早老素基因 -1 位于染色体 14 上,而早老素基因 -2 在染色体 1 上。如果一个人具有这些基因中仅一个突变形式,他或她几乎一定会发生早期发作型 AD。

[0033] 关于早老素基因 -1 是否与假设的参与 APP 加工过程的 γ -分泌酶一致仍存在一些不确定性 (Naruse 等, 1998)。

[0034] 载脂蛋白 E

[0035] 载脂蛋白 E 通常与胆固醇相关,但在 AD 脑的病斑和缠结中也发现存在。尽管等位基因 1-3 似乎并不参与 AD,但 APOE- ϵ 4 等位基因的存在和晚期 AD 的发展有重要关系 (Strittmatter 等, 1993)。然而它是一个危险因素,不是与早老素基因及 APP 突变情况一样的直接原因,而且它并不限定在家族性 AD 中。

[0036] 还不确切知道 APOE ϵ 4 蛋白增加发生 AD 可能性的途径,但一个可能的理论是,它促进 A β 的构建,这造成 AD 发作年龄的降低,或者存在或不存在 APOE 等位基因可能影响神经元对损伤应答的方式 (Buttini 等, 1999)。

[0037] 另外表明 Apo A1 是淀粉样蛋白原性的 (amyloigenic)。在体外,完整的 apo A1 自身可形成刚果红阳性的淀粉样蛋白样的原纤维 (Am J Pathol 147 (2):238-244 (Aug 1995), Wisniewski T, Golabek AA, Kida E, Wisniewski KE, Frangione B)。

[0038] 存在一些矛盾的结果,即相对于其他等位基因, APOE- ϵ 4 等位基因在降低智力丧失症状中具有一个正向作用 (Stern, Brandt, 1997, Annals of Neurology 41)。

[0039] 神经原纤维缠结

[0040] 第二个 AD 标记包括在神经细胞内部发现的缠结的丝的异常集合。缠结的主要成分是称为 tau (τ) 的蛋白的一种形式。已知在中枢神经系统中, tau 蛋白结合并稳定细胞内部支持结构或骨架的构件的微管。但是,在 AD 中, tau 进行化学改变,该改变的 tau 不再

稳定微管,而是造成它们的分解。这种运输系统的瓦解首先导致神经细胞间通讯故障,随后可能导致神经元死亡。

[0041] 在 AD 中,化学改变的 tau 缠结为配对的螺旋丝 – 两股互相交缠的 tau。这些丝是在神经原纤维缠结中发现的主要物质。在一项最近的研究中,研究者发现,在健康脑的海马的特定部分中,少于 6% 的神经元发生神经原纤维变化,而在死于轻度 AD 的人中则为这些神经元的多于 43%,在死于严重 AD 的人中为这些神经元的多于 71%。在研究神经元的丢失中发现类似的递进关系。该证据支持随着 AD 的进程同时存在缠结的形成和神经元发展的损失的观点 (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer' s Disease, 1999)。

[0042] Tauopathies 和缠结

[0043] 除 AD 外,几种神经变性疾病特征在于在神经元和神经胶质中 tau 聚集成不溶性细丝,导致功能紊乱和死亡。最近,几组研究患有除 AD 外的多种遗传型痴呆家族的研究者发现, tau 基因的突变在染色体 17 上 (Clark 等,1998 ;Hutton 等,1998 ;Poorkaj 等,1998 ;Spillantini 等,1998)。在这些家族中,tau 基因的突变导致神经元细胞死亡和痴呆。这些与 AD 具有一些共同特征,但在几个主要方面有所不同的疾病,总称为“与染色体 17 相关的额颞痴呆和帕金森病”(FTDP-17)。这些疾病是,例如帕金森病、某些形式的肌萎缩性(脊髓)侧索硬化(ALS)、皮质退化(corticobasal degeneration)、进行性核上性麻痹和皮克病,均以 tau 蛋白异常聚集为特征。

[0044] 其他 AD 样神经疾病

[0045] AD 和其他神经疾病,包括朊病毒病(如库鲁病,克雅病和牛海绵状脑炎)、帕金森病、亨廷顿舞蹈病和额颞痴呆,具有重要的平行性。所有这些疾病都涉及在脑中异常蛋白的沉积。AD 和朊病毒病导致痴呆和死亡,二者都与不溶性淀粉样蛋白原纤维的形成有关,但从膜蛋白来讲彼此不同。

[0046] 研究 AD 之后第二个最普遍的神经变性疾病 – 帕金森病的科学家发现与该病相关的第一个基因。该基因编码一个称为 synuclein 的蛋白,感兴趣的是,该蛋白也发现于 AD 患者脑的淀粉样蛋白斑中 (Lavedan C,1998, Genome Res. 8(9) :871-80)。研究者已经发现,另一种进行型神经变性疾病 – 亨廷顿舞蹈病中的遗传缺陷导致痴呆,导致亨廷顿蛋白(Huntington protein) 形成非常类似于 AD 中 A β 原纤维和朊病毒病中蛋白原纤维的不溶性原纤维 (Scherzinger E 等,1999, PNAS U. S. A. 96(8) :4604-9)。

[0047] 科学家也已经发现了一种新基因,当其突变时,导致发生家族性 British 痴呆(FBD),这是一种罕见的导致类似于在 AD 中看到的严重行动障碍和进行性痴呆的遗传病。在发现于 FBD 病斑中的淀粉样蛋白斑的生化分析中,发现了一个称为 ABri 的独特肽 (Vidal 等,1999)。在该基因特定位点的突变导致产生一个比正常 Bri 蛋白更长的蛋白。

[0048] 通过 Bri 蛋白突变末端剪切而得到的 ABri 肽和淀粉样蛋白原纤维一样沉积。认为这些斑导致神经元机能障碍和以 FBD 为特征的痴呆。

[0049] 用 A β 免疫

[0050] 免疫系统通常在机体中参与清除外源蛋白和蛋白质的颗粒,但与上述疾病相关的沉积物主要包括自身蛋白,因此使免疫系统在控制这些疾病中的作用不太明显。另外,沉积物通常位于与免疫系统分离的区间 (CNS),二者均提示任何疫苗或免疫治疗方法将是无效

的。

[0051] 然而,科学家最近已经尝试用包含异源的人 A β 和已知激发免疫系统的物质的疫苗对小鼠进行免疫 (Schenk 等,1999 和 WO 99/27944)。用人 APP 突变基因插入到小鼠 DNA 中的部分转基因 AD 小鼠模型检测疫苗。小鼠产生修饰的 APP 蛋白,并随其长大而发展为淀粉样蛋白斑。该小鼠模型用于检测抗修饰的转基因人 APP 的接种是否在斑的形成中起作用。在第一个实验中,一组转基因小鼠给以每月注射的疫苗,从 6 周龄开始,至 11 月结束。第二组转基因小鼠作为对照组不进行注射。到 13 月龄,对照组小鼠具有占脑 2-6%的病斑。相反,免疫小鼠中事实上没有病斑产生。

[0052] 在第二个实验中,研究者在已产生一些病斑的第 11 个月开始注射。经过 7 个月时间,对照转基因小鼠脑中病斑数量增加 17 倍,而接受疫苗的那些小鼠与 18 月龄对照转基因小鼠相比较,降低 99%。在一些小鼠中,一些已存在的病斑沉积物似乎通过治疗已被除去。而且也发现其他病斑相关的损伤,如炎症和异常神经细胞过程,作为免疫结果均有下降。

[0053] 因此,以上是在小鼠中的初步研究,例如,科学家需要了解接种的小鼠是否在其他方面保持健康,及那些接种的小鼠是否记忆保持正常。另外,由于小鼠模型并不是 AD 的完全代表(动物不产生神经原纤维缠结,而且其多数神经元也不死亡),所以需要进行另外的研究以确定人是否有与小鼠相似或不同的反应。另一个需要考虑的问题是该方法可能“治愈”淀粉样蛋白沉积,但可能不能终止痴呆的发展。

[0054] 技术问题也具有主要的挑战性。例如,不可能用该技术制造使人产生抗其自身蛋白的抗体的疫苗。因此许多安全性和有效性的问题需要在任何在人中进行实验之前进行解决。

[0055] 因此,Schenk 等的工作表明,如果可能对中枢神经系统中蛋白质沉积物,例如 AD 中形成的病斑,中的自身蛋白产生强的免疫应答,则既有可能阻止沉积物的形成,又有可能清除已形成的病斑。

[0056] 最近,由于副作用,使用上述讨论的 A β 疫苗的临床试验已停止进行,所述副作用是:可能由于产生抗 CNS 中 A β 的不可控制的自身免疫,大量被免疫的受试者发展为慢性脑炎。

[0057] 发明目的

[0058] 本发明的目的是提供新型的抵抗以淀粉样蛋白沉积为特征的疾病,例如 AD,的治疗方法。进一步的目的是开发一种抗淀粉样蛋白的自身疫苗,以获得一种新型的对涉及淀粉样蛋白沉积的 AD 和其它病理疾病的治疗方法。

[0059] 发明概述

[0060] 此处所描述的是应用一种自身免疫技术来产生强烈的抗另外的无免疫原性的 APP 和 A β 的免疫应答。而且也描述了这种用于预防、可能治愈或缓和与淀粉样蛋白沉积相关的这类疾病症状的这类疫苗的制剂。

[0061] 因此,在其最广泛和最概括的范围内,本发明涉及一种在动物,包括人体内下调淀粉样蛋白前体蛋白(APP)或 β -淀粉样蛋白(A β)的方法,该方法包含对动物免疫系统有效呈递免疫有效量的至少一个 APP 或 A β 类似物,所述类似物在同一个分子中整合至少一个 APP 和 / 或 A β 的 B 细胞表位和至少一个外源 T 辅助细胞表位(T_H 表位),从而用该类似物免疫动物可诱导产生抗动物自源的 APP 或 A β 的抗体。其中所述类似物

[0062] a) 是由至少一个拷贝 SEQ ID NO:2 的残基 672-714 的亚序列组成的多聚氨基酸, 其中外源 T_H 表位通过氨基酸添加和 / 或插入和 / 或删除和 / 或取代的方式而被引入, 其中亚序列选自 SEQ ID NO:2 中氨基酸残基 673-714 组成的氨基酸序列的残基 1-42、残基 1-40、残基 1-39、残基 1-35、残基 1-34、残基 1-28、残基 1-12、残基 1-5、残基 13-28、残基 13-35、残基 17-28、残基 25-35、残基 35-40、残基 36-42 和残基 35-42 ; 和 / 或

[0063] b) 是包含外源 T_H 表位和打断的 APP 或 A β 序列的多聚氨基酸, 以使类似物不包括任何可与引发 T 细胞应答的 MHC II 类分子有效结合的 SEQ ID NO:2 中的亚序列 ; 和 / 或

[0064] c) 是包含外源 T_H 表位和 APP 或 A β 衍生的氨基酸的多聚氨基酸, 并在类似物 C 末端包含一个单独的甲硫氨酸残基, 其中 APP 或 A β 中及外源 T_H 表位中的其他甲硫氨酸残基已被取代或删除, 优选已被亮氨酸或异亮氨酸取代 ; 和 / 或

[0065] d) 是一种包含多羟基聚合物骨架的结合物, 在所述骨架上分别偶联 a) 中定义的多聚氨基酸和 / 或 b) 中定义的多聚氨基酸和 / 或 c) 中定义的多聚氨基酸 ; 和 / 或

[0066] e) 是一种包含多羟基聚合物骨架的结合物, 在所述骨架上分别偶联 1) 外源 T_H 表位和 2) 选自下述的多聚氨基酸 : a) 中定义的亚序列、b) 中定义的 APP 或 A β 打断的序列、和 APP 或 A β 衍生的, C 末端包含一个单独的甲硫氨酸残基的氨基酸序列, 其中 APP 或 A β 中和外源 T_H 表位中的其他甲硫氨酸残基已被取代或删除, 优选已被亮氨酸或异亮氨酸取代。

[0067] 本代理人先前已提出一项国际专利申请, 涉及抗淀粉样蛋白原性多肽, 例如 APP 和 A β 的安全接种策略, 参阅 WO 01/62284。该申请在本申请的递交日未公布, 而且还不包括关于上述的有用的 APP 和 A β 类似物的详细资料。

[0068] 本发明也涉及 APP 和 A β 类似物及编码这些的子集的核酸片段。包含类似物或核酸片段的免疫原性组合物也是本发明的一部分。

[0069] 附图图例

[0070] 图 1 : 来源于淀粉样蛋白前体蛋白的自免疫变异体, 以产生抗 A β 蛋白 A β -43 (或 C-100) 的抗体应答的示意性描述图。APP 显示在图的顶部, 其余示意性构件表示模式表位 P2 和 P30 被取代或插入到 APP 的各种剪切体中。在图中, 黑色部分表示 APP 的信号序列, 双向交叉阴影是 APP 的细胞外部分, 深色竖向阴影是 APP 的跨膜结构域, 浅色竖向阴影是 APP 的胞内结构域, 粗交叉阴影表示 P30 表位, 细交叉阴影表示 P2 表位。实线框表示 A β -42/43, 实线框和点线框一起表示 C-100。“Abeta”表示 A β 。

[0071] 图 2 : 合成通常应用的免疫原性结合物的实施例的示意性描述。肽 A (任何抗原序列, 例如, 此处所述的 A β 序列) 和肽 B (一段包括外源 T 辅助细胞表位的氨基酸序列) 被合成和混合。然后, 将它们与合适的活化多羟基聚合物接触, 肽 A 和 B 通过活化基团以相应于这两种物质在肽混合物中的最初比例的定量进行连接。详见实施例 4。

[0072] 发明详述

[0073] 定义

[0074] 下面将对本说明书和权利要求书中所用的大量术语进行定义和详细解释, 以阐明本发明的界线和范围。

[0075] 此处可互换的术语“淀粉样蛋白”和“淀粉样蛋白质”表示一类长度不确定的蛋白质无支链的原纤维。淀粉样蛋白原纤维对刚果红表现出特征性染色, 具有交叉的 β 结构, 其中多肽链组织为 β -折叠。淀粉样蛋白通常来源于淀粉样的蛋白质, 它们具有非常不

同的前体结构,但都将经历一种结构转变成成为错折叠形式,该形式是 β 折叠螺旋原丝的构件。通常,淀粉样蛋白原纤维的直径在大约 70 到约 120Å 的范围变动。

[0076] 术语“淀粉样蛋白原性 (amyloidogenic) 蛋白质”意图表示通过如此成为沉积物的一部分或通过成为导致形成沉积物形成的生物合成途径的一部分而参与形成淀粉样蛋白沉积物的多肽。因此,淀粉样蛋白原性蛋白的实例是 APP 和 A β 。但参与这些代谢的蛋白也可能是淀粉样蛋白原性蛋白。

[0077] 此处的“淀粉样蛋白多肽”意图表示包含上述讨论的来源于人或其他哺乳动物的淀粉样蛋白原性蛋白质的氨基酸序列的多肽(或其剪切体,所述剪切体与完整的淀粉样蛋白原性蛋白质共用许多 B-细胞表位),-淀粉样蛋白原性多肽可因此例如包含淀粉样蛋白原性多肽前体的实质部分(substantial parts)(对 A β 而言,一种可能的淀粉样蛋白多肽可以来源于 APP)。从原核系统制备的淀粉样蛋白原性多肽的非糖基化形式也包括在术语范围内,如同由于使用例如酵母或其他非哺乳类真核表达系统而具有的各种糖基化模式的形式。然而应该注意,当使用术语“淀粉样蛋白原性多肽”时,是指所述多肽在施用于待治疗动物时通常是不具有免疫原性的。换句话说,淀粉样蛋白原性多肽是自身蛋白或这种自身蛋白的类似物,它们通常不引起抗所述动物的淀粉样蛋白原性的免疫应答。

[0078] “类似物”是指分子结构中整合一个或几个改变的 APP 或 A β 衍生的分子。这种改变可以是例如,APP 或 A β 多聚氨基酸与合适的融合配偶体的融合形式(即,在一级结构上仅涉及 C-和/或 N-末端氨基酸残基增加的改变),和/或它可以是在多肽氨基酸序列中的插入和/或删除和/或取代形式。该术语也包括衍生的 APP 或 A β 衍生的分子,参阅以下讨论的 APP 或 A β 修饰。在某些情况下,可以构建类似物以致很少或甚至不能引发抗正常淀粉样蛋白前体蛋白的抗体,从而避免对作为淀粉样蛋白前体的多肽的(生理上正常的)非聚集形式产生不必要干涉。

[0079] 应注意可以设想在人中使用人的 APP 或 A β 异种类似物(例如,犬或猪的类似物)作为疫苗,有可能产生所需的抗 APP 或 A β 的免疫。因此这种异种类似物进行免疫的应用也是本发明的一部分。

[0080] 本文中的术语“多肽”意图指从 2 到 10 个氨基酸残基的短肽、从 11 到 100 个氨基酸残基的寡肽,和多于 100 个氨基酸残基的多肽。另外,该术语也意图包括蛋白,即,包含至少一个多肽的功能生物分子;当包含至少两个多肽时,这些可以共价连接或非共价连接形成复合体。蛋白质中的多肽可以是糖基化的和/或脂化(lipidated)的和/或包含辅基。而且术语“多聚氨基酸”是术语“多肽”的等同体。

[0081] 术语“T 淋巴细胞”和“T 细胞”可互用,表示胸腺来源的淋巴细胞,负责各种细胞介导的免疫应答以及在体液免疫应答中的辅助。同样,术语“B 淋巴细胞”和“B 细胞”可互用,指产生抗体的淋巴细胞。

[0082] 术语“亚序列”是指分别直接来源于天然存在的淀粉样蛋白氨基酸序列或核酸序列的,至少 3 个氨基酸或当相应时至少 3 个核苷酸的任何连续的一段序列。

[0083] 本文中的术语“动物”通常意图表示动物物种(优选哺乳动物),例如人类、Canis domesticus 等,而不是指一种单一的动物。然而,该术语也表示这种动物物种的一个群体,因为有一点很重要,即根据本发明的方法免疫的个体确实都具有相同的 APP 或 A β ,从而允许用相同的免疫原免疫动物。对熟练技术人员将是清楚的,即本文中的动物是指具有免疫

系统的生物。优选动物是脊椎动物,例如哺乳动物。

[0084] 此处的术语“APP 或 A β 的体内下调”是指在活生物体中降低沉积的相关类型的淀粉样蛋白质(或同样地淀粉样蛋白)的总量。这种下调可通过几种机制来实现:其中,通过抗体结合而对淀粉样蛋白进行简单干涉以阻止错误聚集是最简单的方式。然而,本发明的范围也包括抗体结合导致清除细胞(例如巨噬细胞和其他吞噬细胞)对淀粉样蛋白的清除,以及抗体干涉其他导致淀粉样蛋白形成的淀粉样蛋白原性多肽。进一步的可能性是抗体结合 CNS 外的 A β ,从而通过简单的质量作用原理从 CNS 中有效除去 A β 。

[0085] 表述“有效呈递...到免疫系统”意图表示动物的免疫系统以可控方式经受一种免疫原性挑战。如以下内容所表现出的,这种免疫系统的挑战可通过多种方式实现,其中最重要的是用包含“药物疫苗(pharmaccine)”的多肽(即,被给药以治疗或改善进行性疾病的疫苗)接种或核酸“药物疫苗”接种。要达到的重要结果是动物中免疫活性细胞以免疫有效方式对抗抗原,而达到该结果的精确方式对于支撑本发明的发明设想来说是不太重要的。

[0086] 术语“免疫有效数量”在本领域中有其通常意义,即,一定量的免疫原,它能够引发有效杀伤与免疫原具有相同免疫学特性的致病剂的免疫应答。

[0087] 当使用表述 APP 或 A β 已被“修饰”,此处是指在 APP 或 A β 上已经进行多肽的化学修饰。例如,这种修饰可以是序列中特定氨基酸残基的衍生化(例如烷基化),但是,如以下描述所理解的,优选的修饰包括氨基酸序列一级结构的改变。

[0088] 当讨论“对 APP 或 A β 的自耐受”时,可理解为,由于多肽是待接种群体的自身蛋白质,因此群体中的正常个体不具有抗该多肽的免疫应答;虽然不能排除在动物群体中个别个体可产生抗天然多肽的抗体,例如,作为自免疫疾病的部分。无论如何,动物通常仅对其自身的 APP 或 A β 产生自耐受,但不排除具有不同表型的来源于其他动物物种或群体的类似物也可能被所述动物耐受。

[0089] “外源 T 细胞表位”(或“外源 T 淋巴细胞表位”)是一种能够结合 MHC 分子并刺激动物物种中 T 细胞的肽。本发明中优选的外源 T 细胞表位是“混杂的”表位,即,与动物物种或群体中大部分特定类别的 MHC 分子结合的表位。这种混杂的 T 细胞表位仅有有限数量是已知的,它们在下面将进行详细讨论。混杂的 T 细胞表位也指“通用的”T 细胞表位。应注意,根据本发明使用的免疫原对尽可能大部分的动物群体是有效的,必须 1) 在同一个类似物中插入几个外源 T 细胞表位,或 2) 制备几种类似物,其中每种类似物具有插入的不同的混杂表位。也应注意,外源 T 细胞表位的概念也包括使用隐藏的 T 细胞表位,即,来源于自身蛋白的表位,它仅在以分离形式存在,而不是所述自身蛋白部分时发挥免疫行为。

[0090] “外源 T 辅助淋巴细胞表位”(外源 T_H 表位)是一种外源 T 细胞表位,它与 MHC II 类分子结合,能够呈递到与 MHC II 类分子结合的抗原呈递细胞(APC)表面。

[0091] 本文中(生物)分子的“功能部分”意图指负责至少一个该分子发挥的生化或生理效应的分子部分。本领域中众所周知,许多酶和其它效应分子具有一个负责所述分子发挥效应的活性位点。该分子的其他部分可用于增强稳定性或可溶性的目的,因此,如果在本发明的具体实施例的内容中,这些目的是不相关的,则可以省略。例如,可能用特定的细胞因子作为 APP 或 A β 中的修饰部分(参阅下面的详细讨论),在这种情况下,由于偶联到 APP 或 A β 上可提供了必要的稳定性,因此稳定性问题是没有关系的。

[0092] 术语“佐剂”具有在疫苗技术领域通常的含义,即,一种物质或物质的组合物,它

1) 本身不能引起特异的的抗疫苗免疫原的免疫应答,但它 2) 尽管如此能够增强抗免疫原的免疫应答。或换句话说,单独用佐剂接种不提供抗免疫原的免疫应答,用免疫原接种可以引起或不引起抗免疫原的免疫应答,但用免疫原和佐剂联合接种诱导比单独免疫原诱导的更强的抗免疫原的免疫应答。

[0093] 本文中的分子“导向”意图表示位置,在该位置处,导入在动物中的分子将在特定组织中优选出现或优选与特定的细胞或细胞类型相关。这种效果可通过多种方法来实现,包括在促进导向的组合物中配制分子或通过分子中引入利于导向的基团,这些问题将在下面详细讨论。

[0094] “免疫系统的刺激”是指一种物质或物质的组合物表现出普遍的,非特异性免疫刺激效应。大量佐剂和假定的佐剂(例如某些细胞因子)具有刺激免疫系统的能力。使用免疫刺激剂的结果是免疫系统提高“警戒”,即用免疫原同时或随后进行免疫时,诱导出比单独使用免疫原显著更有效的免疫应答。

[0095] “有效结合”是指肽结合到 MHC 分子(I 类或 II 类)上以能够刺激 T 细胞,使其杀伤呈递与 MHC 分子结合的肽的细胞。例如,如果该 APC 将刺激与呈递的肽-MHC II 类分子复合体结合的 T_H 细胞,则与 APC 表面上 MHC II 类分子结合的肽被称为是有效结合的。

[0096] 下调淀粉样蛋白的优选实施方案

[0097] 优选在本发明的方法中用作免疫原的类似物是修饰的 APP 或 A β 分子,其中在 APP 或 A β 的氨基酸序列中至少存在一中改变,因为那样极大地促进了获得所有重要的阻断自耐受的机会-例如,这在本文实施例 2 中得到的结果可明显看出,在实施例 2 中,比较了用野生型 A β 进行的免疫与用 A β 变异分子进行的免疫。已表明(在 Dalum I 等,1996, J. Immunol. 157 :4796-4804),在正常个体中,生理上存在识别自身蛋白的潜在自反应性 B 淋巴细胞。然而,为了诱导这些 B 淋巴细胞确实产生与相关自身蛋白反应的抗体,需要产生细胞因子的 T 辅助淋巴细胞(T_H 细胞和 T_H 淋巴细胞)的帮助。通常,因为当被抗原呈递细胞(APCs)提呈时, T 淋巴细胞一般不识别来源于自身蛋白的 T 细胞表位,所以并不提供这种帮助。但是通过在自身蛋白中提供一种“外来性”元素(即通过引入免疫重要的修饰),当识别 APC(例如最初为单核细胞)上的外源表位时激活了识别外源元素的 T 细胞。可识别修饰的自身蛋白上的自身表位的多克隆 B 淋巴细胞(也是 APCs),也识别(internalise)抗原,并随后呈递其外源 T 细胞表位,活化的 T 淋巴细胞随后提供细胞因子来辅助这些自身反应的多克隆 B 淋巴细胞。因为由这些多克隆 B 淋巴细胞所产生的抗体与修饰多肽上的不同表位,包括也在天然多肽中存在的那些反应,因此诱导了与非修饰的自身蛋白交叉反应的抗体。总之,可导致 T 淋巴细胞发挥作用,仿佛多克隆 B 淋巴细胞群体已识别整个外源抗原,而实际上仅插入的表位对宿主来说是外源的。在这种方式下,诱导产生了能够与非修饰的自身抗原交叉反应的抗体。

[0098] 在本领域中已知几种方式来修饰肽自身抗原以阻断自耐受。然而优选地,根据本发明的类似物包括

[0099] - 至少引入一个实现将修饰分子定位到抗原呈递细胞(APC)的第一部分,和 / 或

[0100] - 至少引入一个刺激免疫系统的第二部分,和 / 或

[0101] - 至少引入一个优化类似物呈递到免疫系统的第三部分。

[0102] 然而所有这些修饰应在维持 APP 或 A β 中原始 B 淋巴细胞表位的实质部分的情况

下来完成,因为可从而增强 B 淋巴细胞识别自身分子。

[0103] 在一个优选实施方案中,侧链基团(以外源 T 细胞表位或上述的第一、第二和第三部分的形式)通过共价或非共价方式引入。也就是说,来源于 APP 或 A β 的氨基酸残基一段序列在没有改变一级氨基酸序列,或至少没有在链中的单独氨基酸间的肽键中引入改变的情况下进行衍生化。

[0104] 一个备选的和优选的实施方案利用氨基酸取代和/或删除和/或插入和/或添加(其可通过重组方式或借助于肽合来实现;涉及较长一段序列的氨基酸的修饰可产生融合多肽)。本实施方案的一个特别优选的形式是如 WO 95/05849 所述的技术,它公开了一种通过用自身蛋白类似物进行免疫而下调自身蛋白的方法,所述类似物中许多氨基酸序列已被相应的许多每个包含外源免疫显性 T 细胞表位的氨基酸序列所取代,而同时在类似物中维持自身蛋白的整个三级结构。然而对本发明而言,如果修饰(可以是插入、添加、删除或取代)可以产生外源 T 细胞表位,同时在 APP 或 A β 中保存大量的 B 细胞表位,这样就足够了。但是,为了获得所诱导的免疫应答的最大效率,优选 APP 或 A β 的整个三级结构在修饰的分子中维持不变。

[0105] 在某些情况下,优选 APP 或 A β 或其片段被突变。特别优选的是在 A β -43 的 35 位的甲硫氨酸已被取代,优选用亮氨酸或异亮氨酸取代,或被简单地删除的取代变异体。特别优选类似物包含一个单独的位于 C-末端的甲硫氨酸,或是由于它天然存在于淀粉样蛋白原性多肽或外源 T_H 表位中、或是由于它已被插入或增加。因此,还优选除了在 C-末端位置可能有一个甲硫氨酸以外,包含外源 T_H 表位的类似物部分不含甲硫氨酸。

[0106] 删除一个甲硫氨酸以外的所有甲硫氨酸的主要原因是,可能通过重组来制备多聚类似物,其随后可被溴化氰切割而得到单个类似物。其有利之处是在于这样便于进行重组生产。

[0107] 实际上,通常优选所有根据本发明使用的 APP 或 A β 类似物都具有以下特征,即仅包括一个单独的作为类似物中 C-末端氨基酸的甲硫氨酸,而在淀粉样蛋白原性多肽或外源 T_H 表位中的其它甲硫氨酸均被删除或用另一种氨基酸取代。

[0108] 一个进一步感兴趣的突变是删除或取代 A β -43 的 19 位的苯丙氨酸,特别优选该突变是用脯氨酸来取代这个苯丙氨酸残基。

[0109] 其它在类似物中使用的感兴趣的多聚氨基酸是 A β -43 蛋白的截短的部分。这些也可在根据本发明的免疫原性类似物中使用。特别优选地是截短体 A β (1-42)、A β (1-40)、A β (1-39)、A β (1-35)、A β (1-34)、A β (1-34)、A β (1-28)、A β (1-12)、A β (1-5)、A β (13-28)、A β (13-35)、A β (17-28)、A β (25-35)、A β (35-40)、A β (36-42) 和 A β (35-42)(其中括号中的数字表示组成相关片段的 A β -43 的氨基酸序列-例如, A β (35-40) 与 SEQ ID NO:2 中 706-711 位氨基酸相同)。所有这些具有截短部分的 A β -43 的变异体可用此处描述的 A β 片段来制备,特别是用实施例 1 中提到的变异体 9、10、11、12 和 13 来制备。

[0110] 下面的公式描述本发明通常包括的分子构建体: (MOD₁)_{s1} (淀粉样蛋白_{e1})_{n1} (MOD₂)_{s2} (淀粉样蛋白_{e2})_{n2} (MOD_x)_{sx} (淀粉样蛋白_{ex})_{nx} (I)

[0111] - 其中淀粉样蛋白_{e1}-淀粉样蛋白_{ex} 是包含 APP 或 A β 亚序列的 xB 细胞表位,它们分别是相同或不同的,并且可以包含或不包含外源侧链基团, x 是 ≥ 3 的整数, n1-nx 是 x 个

≥ 0 的整数 (至少有一个 ≥ 1), $\text{MOD}_1\text{--MOD}_x$ 是 x 个在保留的 B 细胞表位间引入的修饰, $s_1\text{--}s_x$ 是 x 个 ≥ 0 的整数 (如果在淀粉样蛋白_{ex} 序列中没有引入侧链基团, 则至少有一个 ≥ 1)。因此, 考虑到构建体在免疫原性上的一般功能限制, 本发明允许 APP 或 A β 原始序列的所有种类的变换 (permutation) 及其中所有种类的修饰。因此, 本发明所包括的是通过删除部分序列, 例如在体内表现出副作用的部分、或通常为胞内部分并因此可产生非所需的免疫反应的部分, 从而获得的修饰的 APP 或 A β 。

[0112] 当应用时, 上述阐明的构建体的一个优选形式是那些包含淀粉样蛋白亚序列的 B 细胞表位未胞外暴露在衍生该淀粉样蛋白的前体多肽中。通过选择这样的表位, 保证不产生与产生前体的细胞发生反应的抗体, 从而使所产生的免疫应答限定在抗非所需的淀粉样蛋白沉积物。例如, 在这种情况下, 当没有偶联任何产生它们的细胞时, 诱导抗仅暴露在细胞外相的 APP 或 A β 表位的免疫反应是可行的。

[0113] 通过几种方法来维持如此处所述的 B 细胞表位的实质部分 (substantial fraction) 或甚至经过修饰的蛋白的全部三级结构。一种方式是简单地制备直接抗所述多肽的多克隆抗血清 (例如在兔中制备的抗血清), 然后用该抗血清作为抗产生的修饰蛋白的检测试剂 (例如, 在竞争性 ELISA 中)。以与 APP 或 A β 相同的程度与抗血清反应的修饰形式 (类似物) 必须被认为具有与 APP 或 A β 相同的整体三级结构, 而对这种抗血清表现出限制性 (但仍为主要的和特异的) 反应的类似物被认为已保留了原始 B 细胞表位的实质部分。

[0114] 备选地, 可以制备与 APP 或 A β 上独特表位反应的选择的单克隆抗体并用作试验样板。该方法的优势在于得到 1) APP 或 A β 的表位图谱和 2) 在制备的类似物中保留的表位的图谱。

[0115] 当然, 第三种方法可分解 APP 或 A β 或其生物活性截短物 (参阅上述内容) 的三维结构, 并将该结构与制备的类似物的分解的三维结构相比较。三维结构可通过 X 射线衍射研究和 NMR 光谱分析来分解。关于三维结构的进一步信息可某种程度上获自圆二色性研究, 其优势在于仅需要纯的多肽 (而 X 射线衍射需要提供结晶化的多肽, NMR 需要提供多肽的同位素变体) 以提供给定分子的三维结构的有用信息。但是, 最终需要 X 射线衍射和 / 或 NMR 来得到结论性数据, 因为圆二色性仅能够通过二级结构元件的信息来提供正确三维结构的间接证据。

[0116] 本发明的一个优选实施方案利用 APP 或 A β 的 B 淋巴细胞表位的多重呈递 (即, 在公式 I 中至少有一个 B 细胞表位存在于两个位置)。该效果可通过各种方法来完成, 例如, 通过简单地制备包含结构 (APP 或 A β 衍生的多肽)_m 的融合多肽, 其中 m 是 ≥ 2 的整数, 然后在 APP 或 A β 序列至少一个中引入此处讨论的修饰。优选引入的修饰包括至少一个拷贝的 B 淋巴细胞表位和 / 或引入一个半抗原。这些包括所选择表位的多重呈递的实施方案在以下情况是特别优选的, 即在疫苗试剂中仅 APP 或 A β 的次要部分用作组分。

[0117] 如上所述, 可通过引入至少一个氨基酸插入、添加、删除或取代来完成外源 T 细胞表位的引入。当然, 正常的情况是在氨基酸序列中引入多于一个变化 (例如, 用完全 T 细胞表位来插入或取代), 但要达到的重要目标是, 当被抗原呈递细胞 (APC) 加工时, 类似物将产生这种由 APC 表面上的 MHC II 类分子所呈递的外源免疫显性 T 细胞表位。因此, 如果 APP 或 A β 的氨基酸序列在合适的位置包含许多也发现于外源 T_H 表位中的氨基酸残基, 那

么可通过氨基酸插入、添加、删除和取代来提供外源表位的剩余氨基酸,从而来完成外源 T_H 表位的引入。换句话说,即不必通过插入或取代来引入完整的 T_H 表位以达到发明的目标。

[0118] 优选氨基酸插入、删除、取代或添加的数量至少是 2,例如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 和 25 个插入、取代、添加或删除。另外,优选插入、取代、添加或删除的氨基酸数目不超过 150,例如至多 100、至多 90、至多 80 和至多 70。特别优选取代、插入、删除或添加的数目不超过 60,特别是该数字不超过 50 或甚至 40。最优选地是该数字不超过 30。关于氨基酸添加,应注意的是,当所得到的构建体是融合多肽形式时,这些常考虑高于 150 个。

[0119] 本发明的优选实施方案包括通过引入至少一个外源免疫显性的 T 细胞表位而进行的修饰。可以理解,T 细胞表位的免疫显性问题依赖于所述的动物物种。如此处所用,术语“免疫显性”仅指在接种的个体/群体中产生重要免疫应答的表位,但众所周知的事实是,在一个个体/群体中为免疫显性的 T 细胞表位不必在另一个同种个体中为免疫显性,即使它可能能够在后一个体中与 MHC II 类分子结合。因此,对本发明而言,免疫显性的 T 细胞表位是在当存在抗原时,可有效提供 T 细胞辅助的 T 细胞表位。典型地,免疫显性的 T 细胞表位具有内在特征,即它们实质上总被提呈与 MHC II 类分子进行结合,而不管其中它们显现的多肽。

[0120] 另一个重要的问题是 T 细胞表位的 MHC 限制性。通常,天然存在的 T 细胞表位是 MHC 限制性的,即,某些组成 T 细胞表位的肽仅与 MHC II 类分子的一个亚群有效结合。这反过来具有这样一个效应,即在大多数情况下,应用一种特定的 T 细胞表位将导致疫苗组分仅对群体中的一部分有效,而且取决于该部分的大小,必须在相同分子中包括更多的 T 细胞表位,或备选地制备多组分疫苗,其中组分是根据引入的 T 细胞表位的性质而互相区别的 APP 或 A β 的变异体。

[0121] 如果所用的 T 细胞的 MHC 限制性是完全未知的(例如在接种动物具有贫乏的确定的 MHC 组成的情况下),由特定疫苗组合物所覆盖的部分可通过以下公式近似计算

[0122]

$$f_{\text{人群}} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - p_i) \quad (11)$$

[0123] - 其中 p_i 是对存在于疫苗组合物中第 i 个外源 T 细胞表位产生反应者在群体中的频率, n 是疫苗组合物中外源 T 细胞表位的总数。因此,在群体中的反应频率分别为 0.8、0.7 和 0.6 的包含 3 个外源 T 细胞表位的疫苗组合物,将给出

[0124] $1 - 0.2 \times 0.3 \times 0.4 = 0.976$

[0125] - 即 97.6% 的群体在统计意义上产生对疫苗的 MHC-II 介导的应答。

[0126] 以上公式不能应用在已或多或少知道所用多肽精确的 MHC 限制性图谱的情况中。如果,例如某种肽仅与 HLA-DR 等位基因 DR1、DR3、DR5 和 DR7 编码的人 MHC-II 分子结合,那么同时使用该肽和另一种与其余的由 HLA-DR 等位基因编码的 MHC-II 分子结合的肽将可以对所述群体达到 100% 覆盖。同样,如果第二种肽仅与 DR3 和 DR5 结合,添加该肽将根本不能增加覆盖率。如果群体应答的计算纯粹基于疫苗中 T 细胞表位的 MHC 限制性,则被特定疫苗组合物所覆盖的群体的最小部分可通过以下公式来确定:

[0127]

$$f_{\text{人群}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 \quad (III)$$

[0128] - 其中 φ_j 是编码与疫苗中任何一种 T 细胞表位结合、并属于三个已知 HLA 位点 (DP、DR 和 DQ) 的第 j 个的 MHC 分子的等位基因单元型在群体中频率的总和; 实际上, 首先要确定哪些 MHC 分子可识别疫苗中的每个 T 细胞表位, 其后并以类型 (DP, DR 和 DQ) 列出, 然后不同的列出的等位基因单元型的单个频率以每种类型进行加和, 从而产生 φ_1 、 φ_2 和 φ_3 。

[0129] 在公式 II 中 p_i 值可能超过相应的理论值 Π_i :

$$\pi_i = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - v_j)^2 \quad (IV)$$

[0131] - 其中 v_j 是编码与疫苗中第 i 个 T 细胞表位结合、并属于三个已知 HLA 位点 (DP、DR 和 DQ) 的第 j 个的 MHC 分子的等位基因单元型在群体中频率的总和。这表明在 $1 - \Pi_i$ 群体中, 应答者的频率是 $f_{\text{残余的}_i} = (p_i - \Pi_i) / (1 - \Pi_i)$ 。因此可调整公式 III 以得到公式 V :

[0132]

$$f_{\text{人群}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 + \left(1 - \prod_{i=1}^n (1 - f_{\text{残余的}_i}) \right) \quad (V)$$

[0133] - 其中术语 $1 - f_{\text{残余的}_i}$ 在阴性情况下设定为 0。应该注意的是, 公式 V 需要所有的表位都已经对相同组的单元型而被单元型图谱化。

[0134] 因此, 当选择引入到类似物中的 T 细胞表位时, 包括所有可获得的关于该表位的以下知识是非常重要的: 1) 应答者在群体中对每个表位的频率, 2) MHC 限制性数据和 3) 相关单元型在群体中的频率。

[0135] 存在许多天然存在的“混杂的”T 细胞表位, 它们在动物物种或动物群体的大部分个体中是活性的, 这些表位优选被引入到疫苗中, 从而降低在同一种疫苗中对大量不同类似物的需求。

[0136] 根据本发明, 混杂表位可以是天然存在的人 T 细胞表位, 例如, 来自于破伤风类毒素 (例如 P2 和 P30 表位)、白喉类毒素、流感病毒血凝素 (hemagglutinin) (HA) 和 P. falciparum CS 抗原的表位。

[0137] 近年来, 已鉴定出大量其他混杂的 T 细胞表位。特别是已鉴定了能够与由不同 HLA-DR 等位基因编码的大部分 HLA-DR 分子进行结合的肽, 它们是所有可能引入到依照本发明使用的类似物中的 T 细胞表位。参见以下参考文献中所讨论的表位, 它们因此通过参考结合于此: WO 98/23635 (Frazer IH 等, assigned to The University of Queensland); Southwood S 等, 1998, J. Immunol. 160:3363-3373; Sinigaglia F 等, 1988, Nature 336:778-780; Chicz RM 等, 1993, J. Exp. Med 178:27-47; Hammer J 等, 1993, Cell 74:197-203; 和 Falk K 等, 1994, Immunogenetics 39:230-242。后面的参考文献也涉及 HLA-DQ 和 HLA-DP 配体。因为所有在这五个参考文献中所列出的表位都具有相同的基元, 所以它们都相应的作为用于本发明的候选的天然表位。

[0138] 备选地, 表位可以是任何人工 T 细胞表位, 它能够与大部分 MHC II 类分子结合。在 WO 95/07707 中所述的 pan DR 表位肽 (“PADRE”) 和在相关文献 Alexander J 等, 1994, Immunity 1:751-761 中 (二个内容均结合于此作为参考) 是根据本发明使用的令人感兴

趣的表位的候选者。应该注意的是,在这些文章中公开的最有效的 PADRE 肽在 C- 和 N- 末端具有 D- 氨基酸,以提高给药时的稳定性。然而,本发明主要目的是在于,整合相关的表位作为类似物的一部分,然后其在 APCs 的溶酶体分割内部被酶降解,以使随后在 MHC-II 分子的范围中呈递,因此在本发明使用的表位中整合 D- 氨基酸不是有利的。

[0139] 一个特别优选的 PADRE 肽是具有氨基酸序列 AKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO :17) 或其免疫原性有效的亚序列。该肽和其它具有相同 MHC 限制性缺陷的表位是优选的 T 细胞表位,应在发明方法中使用的类似物中存在。这样的超混杂表位可供本发明最简单的实施方案所用,其中仅有一个单独的类似物呈递给接种的动物的免疫系统。

[0140] 如上所述,APP 或 A β 的修饰也可包括引入将修饰的淀粉样蛋白原性多肽定位于 APC 或 B 淋巴细胞的第一部分。例如,第一部分可以是 B 淋巴细胞特异表面抗原或 APC 特异表面抗原的特异结合配偶体。许多这样的特异表面抗原在本领域中是已知的。例如,该部分可以是一种糖,且在 B 淋巴细胞或 APC 上有其受体(例如甘露聚糖或甘露糖)。备选地,第二部分可以是半抗原。而且特异识别 APCs 或淋巴细胞上表面分子的抗体片段也可用作第一部分(表面分子可以是,例如,巨噬细胞和单核细胞的 FC γ 受体,例如 FC γ RI 或,选择的任何其它特异表面标志物,如 CD40 或 CTLA-4)。应注意的是,所有这些举例的导向分子也可用作佐剂的一部分,参见以下所述。

[0141] 作为将类似物定位于特定细胞类型以实现增强的免疫应答的一个选择或补充,可通过包含上述刺激免疫系统的第二部分来增加免疫系统的应答水平。这种第二部分的典型例子是细胞因子、热激蛋白或分子伴侣,以及其有效部分。

[0142] 根据本发明使用的合适细胞因子是那些通常也在疫苗组合物中作为佐剂起作用的细胞因子,即,例如干扰素 γ (IFN- γ)、白介素 1 (IL-1)、白介素 2 (IL-2)、白介素 4 (IL-4)、白介素 6 (IL-6)、白介素 12 (IL-12)、白介素 13 (IL-13)、白介素 15 (IL-15) 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF); 备选地,细胞因子分子的功能部分足以作为第二部分。关于应用这种细胞因子作为佐剂物质,参见如下讨论。

[0143] 根据本发明,用作第二部分的合适的热激蛋白或分子伴侣可以是 HSP70、HSP90、HSC70、GRP94 (也已知为 gp96,参阅, Wearsch PA 等,1998, Biochemistry 37 :5709-19) 和 CRT (钙网蛋白)。

[0144] 备选地,第二部分可以是一种毒素,例如李斯特菌溶胞素 (listeriolysin) (LL0)、脂质 A 和热不稳定的肠毒素。而且,许多分支杆菌衍生物,例如 MDP (胞壁酰二肽)、CFA (完全弗氏佐剂) 和海藻糖二酯 TDM 及 TDE 也是令人感兴趣的可能选择。

[0145] 同样,引入增强将类似物呈递到免疫系统的第三部分是本发明一个重要实施方案。本领域已展现该原理的几个实施例。例如,已知可利用布氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 蛋白 A 中的棕榈酰脂化 (lipidation) 锚以提供自身辅佐的多肽(参见例如 WO 96/40718) - 似乎脂化的蛋白形成胶粒样的结构,具有由多肽的脂化锚部分的核和从该处伸出的分子的其余部分,从而导致抗原决定簇的多重呈递。因此,该方法和使用不同的脂化锚(例如,肉豆蔻基、肉豆蔻基、法呢基、香叶基-香叶基基团、GPI 锚和 N- 酰基二甘油酯基) 的相关方法的应用是本发明优选的实施方案,特别是由于在重组产生的蛋白中提供这样的脂化锚是非常直接的,仅需要使用例如天然存在的信号序列作为类似物的融合配偶体。另一种可能性是使用补体因子 C3 的 C3d 片段或 C3 本身(参见, Dempsey 等,1996,

Science 271, 348-350 and Lou & Kohler, 1998, Nature Biotechnology 16, 458-462)。

[0146] 本发明另一个可选择的、导致优选地呈递多个(例如,至少2个)拷贝的APP或A β 的重要表位区到免疫系统的实施方案是将类似物共价偶联到特定分子上,即,上述的变异体d和e。例如,可使用聚合物,如糖例如葡聚糖,参见,例如Lees A等,1994, Vaccine 12: 1160-1166; Lees A等,1990, J Immunol. 145: 3594-3600,而且甘露糖和甘露聚糖是有用的备选物。来自于例如大肠杆菌和其他细菌的整合膜蛋白也是有用的结合配偶体。传统的载体分子,例如匙孔血蓝蛋白(KLH)、破伤风类毒素、白喉类毒素和牛血清白蛋白(BSA)也是优选的和有用的结合配偶体。

[0147] 将APP或A β 衍生的物质共价偶联到多羟基聚合物例如糖上的优选实施方案涉及使用至少一个APP或A β 衍生的肽和至少一个外源T辅助细胞表位,它们是分别偶联到多羟基聚合物上(即,外源T辅助细胞表位和APP或A β 衍生的氨基酸序列不互相融合,而是连接到随后作为载体骨架的多羟基聚合物上)。而且,当合适的具有APP或A β 衍生的肽区域的B细胞表位通过短肽序列构建时,这样的实施方案是最优选的—这是因为该方法是一种能在所得的免疫试剂中实现所选择的表位的多重呈递的非常方便的途径。但是,也可能仅仅将此处已描述的类似物偶联到多羟基聚合物骨架上,即,APP或A β 衍生的物质不连接到骨架上而与外源T_H表位分开。

[0148] 特别优选地是通过可被肽酶切割的酰胺键将外源T辅助细胞表位和APP或A β 衍生的(多)肽偶联。该策略的效果是APCs能够吸收结合物,同时能够加工该结合物,随后在MHC II类范围中呈递外源T细胞表位。

[0149] 完成肽偶联(感兴趣的是APP或A β 衍生的肽和外源表位)的一个方法是用tresyl(三氟乙基磺酰基)基团或其他合适的活化基团例如,马来酰亚胺基(maleimido)、p-Nitrophenyl chloroformate(活化OH基,在肽和多羟基聚合物之间形成肽键)和甲苯磺酰基(对-甲苯磺酰基)活化合适的多羟基聚合物。例如,如WO 00/05316和US 5,874,469(二者结合于此作为参考)所述可能制备活化的多糖,并将它们偶联到APP或A β 衍生的肽或多聚氨基酸以及偶联到通过传统的固相或液相肽合成技术制备的T细胞表位上。得到的产物包括多羟基聚合物骨架(例如,葡聚糖骨架),该骨架通过其N末端—端或通过其他可利用的氮部分连接来源于APP或A β 和来源于外源T细胞表位的多聚氨基酸。如果需要,可能合成已保护了除N-末端一个氨基外的所有可用氨基的APP或A β 肽,随后将得到的被保护的肽连接到三氟乙基磺酰基化的葡聚糖部分,最后,对得到的结合物去保护。该方法的特定实施例在下面的实施例中进行描述。

[0150] 除了使用WO 00/05316和US 5,874,469中教导的水溶性多糖分子,同样可使用交联的多糖分子,从而在多肽和多糖间获得微粒状的结合物—相信这将导致改善将多肽呈递到免疫系统,因为达到了两个目标,即当注射该结合物时可获得一种局部的沉积效应,以及得到对APCs而言是有吸引力的靶目标的粒子。用这样微粒系统的方法也在实施例中详述。

[0151] 在APP或A β 中引入修饰的优先选择区域的注意事项是,a)保留已知和预测的B细胞表位,b)保留三级结构,c)避免B细胞表位在“生产细胞”等上呈递,无论如何,如上所述,很容易筛选一组已在不同位置引入T细胞表位的类似物。

[0152] 由于本发明最优选的实施方案是人A β 的下调,所以优选地上述APP或A β 多肽是人的APP或A β 多肽。在该实施例中,特别优选地是,APP或A β 多肽通过用至少一个等

长或不同长度并包含外源 T_H 表位的氨基酸序列取代 SEQ ID NO:2 中至少一个氨基酸序列已经被修饰。修饰的淀粉样蛋白原性 APP 和 A β 的优选实施例以 P2 和 P30 表位为例图示在图 1 中。在实施例中详细讨论了该构建体的基本原理。

[0153] 更具体地,包含(或全部)引入到 SEQ ID NO:2 中的氨基酸序列的 T_H 可在 SEQ ID NO:2 的任何一个氨基酸中被引入。也就是说,引入可能是在氨基酸 1-770 任何一个之后,但优选地是在 SEQ ID NO:2 中的 671、672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713 和 714 位氨基酸的任何一个之后。可结合以删除氨基酸 1-671 的任何一个或全部,或氨基酸 715-770 的任何一个或全部。另外,当应用取代技术时,与引入相结合,可以删除 SEQ ID NO:2 中的氨基酸 671、672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713 和 714 中的任何一个。

[0154] 本发明的另一个实施方案是呈递不包括任何 SEQ ID NO:2 亚序列的类似物,所述亚序列与启动 T 细胞应答的 MHC II 类分子有效结合。

[0155] 这种设计免疫原以使免疫系统诱导产生抗 A β 免疫应答的策略的基本原理如下:应注意,当用配制在足以强烈破坏体内对自身蛋白耐受的佐剂中的大量自身蛋白如 A β 进行免疫时,存在一种风险,即在一些接种个体中免疫应答不能简单地通过终止免疫而被终止。这是因为在这种个体中诱导的免疫应答最可能是由自身蛋白的天然 T_H 表位所引起的,其副作用是接种的个体的自身蛋白自身将作为免疫试剂发挥作用:因此已经建立了一个自免疫条件。

[0156] 优选的方法,其包括外源 T_H 表位的应用必须是发明人最了解的,还没有观察到这种效应,因为抗自身免疫应答是由外源 T_H 表位诱导的,并且发明人已反复证实由优选技术所引发的诱导的在终止免疫后实际上降低。但是,理论上它可能在少数个体中发生,即个体被免疫,也可由相关自身蛋白的自源 T_H 表位引发免疫应答-当考虑的自体蛋白相对丰富时,例如 A β ,则这是更相关的,而其他治疗相关的自体蛋白仅在局部存在或在体内数量很低,以至于不可能发生“自身免疫效应”。因此,避免该效应的一个简单方式是完全避免在免疫原中用作 T_H 表位(因为短于 9 个氨基酸的肽不能用作 T_H 表位,所以使用更短的片段是一个简单可行的方法)的肽序列的包含体。因此,本发明的该实施方案也用于确保免疫原不包括作为“自身刺激 T_H 表位”的靶 APP 或 A β 的肽序列,所述“自身刺激 T_H 表位”包括仅包含在靶蛋白的序列中的保守取代的序列,使其可另外用作 T_H 表位。

[0157] 呈递 APP 或 A β 类似物的免疫系统的优选实施例包括应用包含至少一个不与 MHC 二级分子有效结合的 APP 或 A β 衍生肽的模拟肽,及至少一个外源 T 辅助细胞表位。另外,优选地,APP 或 A β 衍生肽具有 B 细胞表位。如果免疫类似物包含一个或多个以连续序列或包含外源 T 辅助细胞表位的插入序列所代表的 B 细胞表位,则该类似物是十分有利的。

[0158] 而且,当通过短肽序列构建携带 APP 或 A β 区的合适的 B 细胞表位,使其决不与 MHC II 类分子有效结合时,这种实施方案是最优选的。因此,选择的 B 细胞表位或淀粉样蛋白原性多肽的表位应包括至多 SEQ ID NO:2 的 9 个连续氨基酸。更短的肽是优选的,例如那些具有至多淀粉样蛋白原性多肽氨基酸序列的 8、7、6、5、4 或 3 个连续氨基酸的肽。

[0159] 优选地,类似物包括至少 SEQ ID NO:2 的一个亚序列,使得每个这样的至少一个亚序列独立地由选自 9 个连续氨基酸、8 个连续氨基酸、7 个连续氨基酸、6 个连续氨基酸、5 个连续氨基酸、4 个连续氨基酸和 3 个连续氨基酸的 APP 或 Aβ 的氨基酸序列组成。

[0160] 特别优选地是,连续氨基酸在选自 SEQ ID NO:2 的残基 672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713 和 714 的氨基酸残基开始。

[0161] 蛋白/肽接种;类似物的配制和给药

[0162] 当通过给药动物而实现将类似物呈递给动物免疫系统时,多肽的配制遵循本领域中公认的原理。

[0163] 在本领域中,已非常了解包含肽序列作为活性成分的疫苗的制备,如美国专利 4,608,251;4,601,903;4,599,231;4,599,230;4,596,792 和 4,578,770 所例证,所有的结合于此作为参考。典型地,这种疫苗以可注射形式,或者作为液体溶液或混悬液形式而制备;也可以制备适于在注射前溶解或悬浮在液体中的固体形式。也可将制剂乳化。活性免疫组分通常与药用的并与活性成分兼容的赋形剂混合。合适的赋形剂是例如,水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇或类似物质,及其组合。另外,如果需要,疫苗可包含少量辅助物质,例如湿润剂或乳化剂,pH 缓冲剂或增强疫苗效力的佐剂;参见,下述佐剂的详细讨论。

[0164] 传统上,疫苗是通过注射肠胃外给药,例如皮下、皮内或肌肉注射。适于其他给药方式的另外的制剂包括栓剂,及在某些情况下,口、口含(buccal)、舌下(sublingual)、腹膜内、阴道内、肛门、硬膜外、脊柱、颅骨内制剂。对于栓剂,传统结合剂和载体可包括,例如,聚(亚烷基)二醇(polyalkylene glycols)或甘油三酯;这种栓剂可由包含 0.5%-10%,优选地 1-2%活性成分的混合物形成。口服制剂包括通常使用的赋形剂,例如,药物级别的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采用溶液、混悬液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放制剂或粉末形式,并包含 10-95%活性成分,优选地为 25-70%。对口服制剂,霍乱毒素是令人感兴趣的制剂配偶体(也是可能的结合物配偶体)。

[0165] 多肽可以中性或盐形式配制在疫苗中。药用盐包括酸式加成盐(与肽的自由氨基形成),它用无机酸,例如盐酸或磷酸,或有机酸,例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成。用自由羧基形成的盐也可从无机碱,例如,氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,和有机碱,例如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等而衍生。

[0166] 疫苗以与剂量配方一致的方式并以治疗有效和具有免疫原性的剂量进行给药。给药量依赖于待治疗的受试者,包括例如,个体免疫系统引发免疫应答的能力及所需保护的程 度。合适剂量范围是每次接种几百微克级的活性成分,优选范围为大约 1 μg-2,000 μg(即使预期了 1-10mg 范围的更高的量),例如,在大约 0.5 μg-1,000 μg 范围,优选是在约 1 μg-500 μg 范围,特别在约 10 μg-100 μg 范围。最初给药和加强接种的合适疗法也是可变的,但典型地是在初次给药后,随后进行接种或其他给药。

[0167] 应用方式可以广泛改变。可应用任何传统的给药疫苗方法。这些包括在固体生理上可接受的基底上或生理上可接受的分散体形式口服施用,肠胃外注射或类似方式。疫苗剂量依赖于给药途径,并根据被接种者年龄和抗原配制而改变。

[0168] 在疫苗中,一些疫苗的多肽具有足够免疫原性,而对另一些来说,如果疫苗进一步

包含佐剂物质,则会增强免疫应答。

[0169] 已知有各种实现对疫苗的佐剂效果的方法。基本原理和方法在 " The Theory and Practical Application of Adjuvants " ,1995, Duncan E. S. Stewart-Tull (编辑), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-95170-6 和 " Vaccines: New Generation Immunological Adjuvants " ,1995, Gregoriadis G 等, (编辑), Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9 中进行详细描述,二者均因此结合于此作为参考。

[0170] 特别优选的是使用已证明利于破坏对自体抗原的自体耐受的佐剂;实际上,在自身疫苗中使用非修饰的三萜系化合物多肽作为活性成分时,这一点是非常必要的。合适佐剂的非限制性实施例选自免疫导向佐剂;免疫调节佐剂,例如毒素、细胞因子和分支细菌衍生物;油制剂;聚合物;胶粒形式佐剂;皂苷;免疫刺激复合物基质 (ISCOM 基质);颗粒;DDA;铝佐剂;DNA 佐剂; γ -菊粉和包封佐剂 (encapsulating adjuvant)。通常应注意,涉及首先使用的化合物和试剂,类似物中的第二和第三部分的上述内容加以必要的变更还涉及它们在本发明疫苗的佐剂中的应用。

[0171] 佐剂的应用包括使用试剂,例如氢氧化铝或磷酸铝,通常在缓冲生理盐水中用量为 0.05-0.1% 溶液,与糖合成聚合物的混合物 (例如, Carbopol®), 用量为 0.25% 溶液,通过用 70-101°C 温度分别热处理 30 秒 -2 分钟的时间得到的疫苗中蛋白的聚合体,也可能是通过交联剂得到的聚合体。也可利用通过用胃蛋白酶处理的抗白蛋白的抗体 (Fab 片段) 再活化得到的聚合体,与细菌细胞例如 C. parvum 或内毒素或革兰氏阴性菌的脂多糖组分的混合物,在生理上可接受的油类赋形剂例如二缩甘露醇单油酸酯 (Aracel A) 中的乳剂或与用作阻断替代物 (block substitute) 的 20% 全氟化碳 (Fluosol-DA) 溶液的乳剂。与油例如鲨烯和 IFA 的混合物也是优选的。

[0172] 根据本发明, DDA (二甲基二 (十八烷基) 溴化铵) 与 DNA 及 γ -菊粉一样,是一种感兴趣的佐剂候选物,而且弗氏完全佐剂和不完全佐剂及皂树皂苷,例如 QuilA 和 QS21 与 RIBI 一样是令人感兴趣的。进一步的可能性是单磷酸脂类 A (MPL), 上述的 C3 和 C3d 及胞壁酰二肽 (MDP)。

[0173] 已知脂质体制剂也具有佐剂效果,因此依照本发明,脂质体佐剂是优选的。

[0174] 根据本发明,免疫刺激复合物基质类型 (ISCOMO® 基质) 佐剂也是优选的选择,特别是由于已表明该类型佐剂能够通过 APCs 上调 MHC II 类分子的表达。ISCOM® 基质由来源于皂树皂苷的皂苷 (三萜类化合物)、胆固醇和磷脂组成 (可选择性地馏分)。当与免疫原性蛋白混合时,所得到的颗粒制剂即为已知为 ISCOM 颗粒,其中皂苷占 60-70% 重量 / 重量,胆固醇和磷脂为 10-15% 重量 / 重量,蛋白为 10-15% 重量 / 重量。关于免疫刺激复合物的组成及应用的详细资料可在例如上述关于佐剂的教材中找到,而且, Morein B 等., 1995, Clin. Immunother. 3:461-475 和 Barr IG 和 Mitchell GF, 1996, Immunol. and Cell Biol. 74:8-25 (二者均结合于此作为参考) 提供了制备完全的免疫刺激复合物的指导。

[0175] 另一个非常令人感兴趣 (因此是优选的) 的实现佐剂效果的可能性是应用在 Gosselin 等, 1992 (其因此结合于此作为参考) 所描述的技术。简单地说,对相关抗原例如本发明中的抗原的呈递,可通过将抗原连接到抗单核细胞 / 巨噬细胞上的 Fc γ 受体的抗体 (或抗原结合的抗体片段) 上而增强。特别地是已证明抗原和抗 Fc γ RI 的结合物对接种而

言可增强免疫原性。

[0176] 其他可能性涉及使用上述导向及免疫调节物质(尤其细胞因子)作为淀粉样蛋白原性多肽的修饰形式中第一和第二部分的候选者。就此而论,合成的细胞因子诱导物,如多聚 I :C,也是一种可能性。

[0177] 合适的分枝杆菌衍生物选自胞壁酰二肽、完全弗氏佐剂、RIBI 和海藻糖的二脂例如 TDM 和 TDE。

[0178] 合适的免疫导向佐剂选自 CD40 配体和 CD40 抗体或其特异结合片段(参见上述讨论)、甘露糖、Fab 片段和 CTLA-4。

[0179] 合适的聚合物佐剂选糖例如葡聚糖、PEG、淀粉、甘露聚糖和甘露糖;塑料聚合物例如;和胶乳例如胶乳珠。

[0180] 然而另一个感兴趣的调节免疫应答的方式是在“有效淋巴结”(VLN)(由 ImmunoTherapy, Inc., 360 Lexington Avenue, New York, NY 10017-6501 发明的私人医疗装置)中包括免疫原(任选地与佐剂和药用载体及媒介物一起)。VLN(一种薄的管状装置)模拟淋巴结的结构和功能。在皮下插入 VLN 可创造一个细胞因子和趋化因子高涨的无菌炎症位点。T 细胞和 B 细胞及 APCs 很快对危险信号产生应答,找到该发炎位点并在 VLN 孔状基质内容累积。已表明当使用 VLN 时,引起对抗原的免疫应答所需的必需抗原剂量下降,而且用 VLN 进行接种所达到的免疫保护超过了用 Ribi 作为佐剂的传统免疫所达到的保护。该技术也在尤其 Gelber C 等,1998, "Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of Immunogens Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node", 在:"From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts, 十月第 12-15 1998, Seascape Resort, Aptos, California" 中进行了简单描述。

[0181] 已表明在很多情况下疫苗的微粒制剂可增加蛋白抗原的免疫原性,因此这也是本发明的另一个优选实施方案。以抗原与聚合物、脂类、糖或其它适于制备颗粒的分子的共-制剂制备微粒,或者微粒可以是仅包含抗原本身的均一颗粒。

[0182] 基于聚合物的微粒的实施例是基于 PLGA 和 PVP 的颗粒(Gupta, R. K. 等, 1998), 其中聚合物和抗原缩合成固体颗粒。基于脂类的微粒可制备成脂类胶粒(也称为脂质体), 在胶粒中包封抗原(Pietrobon, P. J. 1995)。基于糖的微粒典型地是由合适的可降解糖例如淀粉或脱乙酰壳多糖来制备。糖和抗原混合, 并以与聚合物颗粒类似的制作过程缩合成颗粒(Kas, H. S. 等. 1997)。

[0183] 仅包含抗原的颗粒可通过各种喷雾和冷冻干燥技术来制备。特别适于本发明的目的是超临界流体技术, 它可用来制备可控大小的非常均一的颗粒(York, P. 1999 & Shekunov, B. 等. 1999)。

[0184] 预期疫苗应每年给药 1-6 次, 例如一年中对有需要个体进行 1、2、3、4、5 或 6 次给药。以前已表明, 使用依照本发明的优选的自身疫苗所诱导的记忆性免疫并不是永久性的, 因此免疫系统需要用淀粉样蛋白原性多肽或修饰的淀粉样蛋白原性多肽进行定期刺激。

[0185] 由于遗传差异, 不同个体可能对相同多肽产生不同强度的免疫应答。因此, 本发明的疫苗可包含几种不同的多肽以增强免疫应答, 参见以上关于导入外源 T 细胞表位导入的选择。疫苗可包括两个或多个多肽, 其中所有这些多肽如上所定义。

[0186] 因此疫苗可包括 3-20 个不同的修饰或非修饰的多肽,例如 3-10 个不同的多肽。

[0187] 核酸接种

[0188] 作为传统的基于肽的疫苗给药方式的备选,核酸接种技术(也称为“核酸免疫”,“遗传免疫”和“基因免疫”)提供了大量吸引人的特征。

[0189] 首先,相对于传统疫苗方式,核酸接种不需要大规模生产具有免疫原性的试剂(例如以工厂规模来发酵产生修饰的淀粉样蛋白原性多肽的微生物的方式)的资源消耗。另外,不需要设备对免疫原进行纯化和再折叠。最后,因为核酸接种依赖于被接种个体的生化装备来产生所导入核酸的表达产物,所以希望发生表达产物的最适翻译后加工过程;这在自身疫苗接种情况中是特别重要的,因为如上所述,原始 B 细胞表位的有效部分应在修饰分子中得到保留,而且因为原理上 B 细胞表位可通过任何(生物)分子(例如糖、脂类、蛋白等)的部分进行构建。因此,免疫原的天然糖基化和脂化模式对整个免疫原性非常重要,最好通过具有产生免疫原的宿主来保证这一点。

[0190] 因此,本发明变体 a-c 的优选实施方案包含,将编码类似物的核酸引入到动物细胞,从而获得被导入核酸的细胞的体内表达,从而实现将类似物呈递到免疫系统。

[0191] 在该实施方案中,导入的核酸优选的是 DNA,它的形式可以是,裸露的 DNA、与带电荷或不带电荷的脂类配制的 DNA、配制在脂质体中的 DNA、包括在病毒载体中的 DNA、与利于转染的蛋白或多肽配制的 DNA、与导向蛋白或多肽配制的 DNA、与钙沉积试剂配制的 DNA、偶联惰性载体分子的 DNA、包封在聚合物例如 PLGA(参见 WO 98/31398 中描述的技术)或壳多糖或脱乙酰壳多糖中的 DNA,和与佐剂配制的 DNA。在本文中应注意,实际上所有关于在传统疫苗制剂中适于使用的佐剂的考虑都可应用于 DNA 疫苗制剂。因此,此处关于在基于多肽的疫苗中使用佐剂的所有内容加以变更适于在核酸接种技术中使用。

[0192] 关于上面已详述的基于多肽的疫苗的给药途径和给药方案,它们也可应用于本发明的核酸疫苗中,及以上关于适于多肽的给药途径和给药方案的所有讨论加以变更适用于核酸。对此应增加的是,核酸疫苗适于静脉内和动脉内给药。另外,在本领域中众所周知,核酸疫苗可通过使用所谓基因枪进行给药,因此给药的这种方式和等价方式也是本发明的一部分。最后,已报道在核酸给药中应用 VLN 得到良好的结果,因此这种特别给药方式是特别优选的。

[0193] 另外,作为免疫试剂的核酸可以包括编码第一、第二和/或第三部分,例如上述免疫调节物质如作为有用佐剂讨论的细胞因子,的区域。本实施方案的优选方案包括使类似物的编码区和免疫调节物的编码区在不同的阅读框中或至少在不同启动子控制下。从而避免类似物或表位作为对于免疫调节物的融合配偶体产生。备选地,可使用两个不同核苷酸片段,但这并不是优选的,因为在同一个分子中具有二者的编码区有利于保证其进行共表达。

[0194] 因此,本发明也涉及一种诱导产生抗 APP 或 A β 抗体的组合物,该组合物包含

[0195] - 本发明的核酸片段或载体(参见以下载体的论述),和

[0196] - 如上讨论的药用和免疫上可接受的媒介物和/或载体和/或佐剂。

[0197] 在正常情况下,编码变异体的核酸以载体形式导入,其中在病毒启动子的控制下进行表达。关于本发明载体的更详细讨论参见以下讨论。而且可获得核酸疫苗制剂和应用的详细描述,参见,Donnelly JJ 等,1997, Annu. Rev. Immunol. 15 :617-648 和 Donnelly JJ

等,1997,Life Sciences 60 :163-172。这些参考文件均结合于此作为参考。

[0198] 活疫苗

[0199] 第三个将如在变体 a-c 中所定义的类似物有效呈递给免疫系统的备选是应用活疫苗技术。在活体接种中,对免疫系统的呈递通过对动物给药一种转化了编码类似物的核酸片段或整合这种核酸片段的载体的非致病性微生物而得以实现。该非致病性微生物可以是任何合适的减弱的细菌菌株(通过传代或通过重组 DNA 技术除去致病性表达产物而被减弱),例如,牛分支杆菌 BCG、非致病性链球菌属菌种、大肠杆菌、沙门氏菌属菌种、霍乱弧菌、志贺氏菌属等。关于制备活疫苗的技术发展水平的综述可参见,如 Saliou P,1995,Rev. Prat. 45 :1492-1496 和 Walker PD,1992,Vaccine 10 :977-990,二者均结合于此作为参考。

[0200] 关于在这种活疫苗中所用核酸片段和载体的详细信息,参见以下讨论。

[0201] 作为细菌活疫苗的备选,以下讨论的本发明的核酸片段可以整合到无毒的病毒疫苗载体,例如牛痘菌株或任何其他合适的痘病毒中。

[0202] 通常,非致病性微生物或病毒仅对动物进行一次给药,但在特定情况下,在一生中可能有必要多于一次给药该微生物以维持保护性免疫。甚至预期以上对多肽接种的详细免疫方案也可用于活疫苗或病毒疫苗中。

[0203] 备选地,活或病毒疫苗接种与之前或之后的多肽和 / 或核酸接种相结合。例如,可以用活疫苗或病毒疫苗产生初级免疫,随后用多肽或核酸方法进行增强免疫。

[0204] 微生物或病毒可以用包含编码第一、第二和 / 或第三部分区域的核酸,例如以上所述的免疫调节物质例如作为有用佐剂的细胞因子的形式,进行转化。本实施方案的优选方案包括使类似物的编码区和免疫调节物的编码区在不同的阅读框中或至少在不同启动子控制下。从而避免类似物或表位作为对于免疫调节物的融合配偶体而产生。备选地,可使用两种不同核苷酸片段作为转化试剂。当然,可以提供在同一个阅读框具有第一和 / 或第二和 / 或第三部分作为表达产物,本发明的类似物,根据本发明,这种实施方案是特别优选的。

[0205] 本发明的方法在疾病治疗中的应用

[0206] 如以上讨论所理解,本发明提供的方法允许控制以淀粉样蛋白沉积物为特征的疾病。在本文中,AD 是本发明方法的主要靶目标,但其他以包含淀粉样蛋白沉积物的 A β 为特征的疾病也是可行的靶目标。因此,本发明下调淀粉样蛋白活性的方法的一个重要实施方案包括治疗和 / 或预防和 / 或改善 AD 或其他以淀粉样蛋白沉积物为特征的疾病,根据本发明的方法,该方法包含将 APP 或 A β 下调至淀粉样蛋白的量显著下降的程度。

[0207] 特别优选地是淀粉样蛋白的下降导致淀粉样蛋白形成和淀粉样蛋白降解 / 清除之间的平衡发生倒置,即,淀粉样蛋白降解 / 清除的速度超过淀粉样蛋白形成的速度。通过仔细控制对有需要个体免疫的数量和免疫效果,有可能得到一种随着时间过去的平衡,其导致淀粉样蛋白沉积物的净下降而没有额外的副作用。

[0208] 备选地,如果在一个个体中,本发明的方法不能清除或降低已存在的淀粉样蛋白沉积物,本发明的方法可用于达到新淀粉样蛋白形成的临床上的显著降低,从而显著延长疾病症状没有恶化的时间。应通过测定淀粉样蛋白(认为它与沉积的物质达到平衡)的血清浓度,或通过利用正电子发射断层扫描(positron-emission tomography)(PET)来扫描,参见 SmallGW,等,1996,Ann N Y Acad Sci 802 :70-78,来监测淀粉样蛋白沉积速度。

[0209] 本手段和方法可用于以类似方式治疗或改善的其它疾病和症状已在“发明背景”中进行提及,或列于以下以“其他淀粉样疾病和与之相关的蛋白”为标题的部分。

[0210] 发明的肽,多肽和组合物

[0211] 如同从上述内容而言是显然的,本发明是基于以下概念,即对个体进行抗 APP 或 A β 抗原免疫,以达到致病性相关的淀粉样蛋白沉积物的数量降低。达到这种免疫的优选方式是使用此处所述的类似物,从而提供本领域中以前没有公开的分子。

[0212] 认为,此处讨论的类似物自身具有发明性,因此本发明的一个重要部分适于如上所述的类似物。因此,任何此处所阐述的关于修饰的 APP 或 A β 的内容与本发明描述的淀粉样蛋白原性类似物相关,而且任何这样的内容加以变更适于这些类似物的描述。

[0213] 应注意,优选的修饰的 APP 或 A β 分子包含的修饰应使多肽与 APP 或 A β 或与其至少有 10 个氨基酸长度的亚序列具有至少 70% 的序列同源性。更高的序列同源性是优选的,例如,至少为 75% 或甚至至少为 80、85、90 或 95%。蛋白和核酸的序列同源性可通过 $(N_{\text{ref}} - N_{\text{dif}}) * 100 / N_{\text{ref}}$ 进行计算,其中 N_{dif} 是比对时两个序列中的不同残基的总数,其中 N_{ref} 是一个序列中残基数目。因此, DNA 序列 AGTCAGTC 与序列 AATCAATC 具有 75% 序列同源性 ($N_{\text{dif}} = 2$ 和 $N_{\text{ref}} = 8$)。

[0214] 本发明也适于用于检测本发明方法的组合物。因此,本发明也涉及一种包含免疫有效量的上述类似物的免疫组合物,所述组合物进一步包含药用和免疫上可接受的稀释剂和 / 或媒介物和 / 或载体和 / 或赋形剂和任选的佐剂。换句话说,该发明部分涉及类似物的制剂,本质上如上所述。当涉及修饰和非修饰的淀粉样蛋白原性多肽的制剂用于本发明的方法来下调 APP 或 A β 时,佐剂、载体和媒介物的选择相应地符合上述已经讨论的。

[0215] 根据本领域中众所周知的方法制备多肽。更长的多肽通常通过重组基因技术进行制备,包括将编码类似物的核酸序列导入合适的载体,用该载体转化合适的宿主细胞,通过宿主细胞表达该核酸序列,从宿主细胞或其培养上清中回收表达产物,及随后的纯化和任选地进一步修饰,例如,再折叠或衍生化。

[0216] 优选地较短的肽通过熟知的固相或液相肽合成技术来制备。然而,最近该技术的进展以使可能通过这些方法生产全长的多肽和蛋白,因此它也包括在本发明的范围内以通过合成方法制备长的构建体。

[0217] 本发明的核酸片段和载体

[0218] 从以上内容可以理解,多聚氨基酸类似物可通过重组基因技术来制备,也可以通过化学合成或半合成进行制备;当修饰包括偶联到蛋白载体(例如, KLH、白喉类毒素、破伤风类毒素和 BSA) 及非蛋白分子如糖聚合物时,以及当修饰包括在 APP 或 A β 衍生的肽链上增加侧链或侧链基团时,后两种选择是特别相关的。

[0219] 对于重组基因技术而言,当然也对核酸免疫而言,编码类似物的核酸片段是非常重要的化学产物。因此,本发明的一个重要部分适于编码本发明的类似物的核酸片段,即,所述类似物是 APP 或 A β 衍生的多肽,其包含已被添加或插入融合配偶体的天然序列,或者优选地 APP 或 A β 衍生的多肽,其中其已被通过插入和 / 或增加,优选地通过取代和 / 或删除,引入了外源 T 细胞表位。本发明的核酸片段是 DNA 或 RNA 片段。

[0220] 本发明的核酸片段通常被插入到合适载体中形成携带本发明的核酸片段的克隆或表达载体;这种新型载体也是本发明的一部分。关于本发明的这些载体的构建的详细描

述在以下关于转化细胞和微生物中进行讨论。根据应用的目的和类型,载体可以是质粒、噬菌体、粘粒、微型染色体或病毒形式,而且在特定细胞中瞬时表达的裸露 DNA 也是一种重要的载体。优选的本发明的克隆和表达载体是可以自主复制的,因此为了高水平表达或随后克隆的高水平复制而可以达到高拷贝数。

[0221] 本发明载体的一般轮廓以 5' → 3' 方向和可操作连接而言包括以下特征:一个用于启动本发明核酸片段表达的启动子,任选地编码使多肽片段分泌(到细胞外相,或可应用的,到周质中)或整合到膜中的引导肽的核酸序列,本发明的核酸片段,和任选地编码终止子的核酸序列。当对生产菌株或细胞系中的表达载体进行操作时,为了转化细胞的遗传稳定性,优选当导入到宿主细胞时,载体整合到宿主细胞基因组上。相反,当用载体在动物中实现体内表达时(即,当在 DNA 接种中应用载体时),由于安全原因,优选该载体不能整合到宿主细胞基因组中;典型地,使用裸露 DNA 或非整合病毒载体,其选择对熟悉本领域的人来说是熟知的。

[0222] 本发明的载体用于转化宿主细胞以产生本发明的类似物。这种也是本发明一部分的转化细胞可以是用于增殖本发明的核酸片段和载体,或用于重组生产本发明的类似物的培养细胞或细胞系。备选地,转化的细胞可以是合适的活疫苗株,其中已被插入了核酸片段(一个单一的或多个拷贝)以实现将类似物分泌或整合到细菌细胞膜或细胞壁中。

[0223] 本发明优选的转化细胞是微生物,例如,细菌(例如,埃希氏菌属菌种[例如大肠杆菌]、芽孢杆菌属[例如枯草芽孢杆菌]、沙门氏菌属或分枝杆菌属[优选地非致病性,例如牛分枝杆菌 BCG])、酵母(例如酿酒酵母)和原生动物。备选地,转化细胞来源于多细胞机体,例如真菌、昆虫细胞、植物细胞或哺乳动物细胞。最优选的是来源于人的细胞,参见以下细胞系和载体的讨论。最近的结果已表明使用可商业获得的 *Drosophila melanogaster* 细胞系(可从 Invitrogen 获得的 Schneider 2(S₂) 细胞系和载体系统)在本申请人的实验室重组生产多肽具有很好的前景,因此,该表达系统是特别优选的。

[0224] 为了克隆和/或优化表达,优选转化的细胞能够复制本发明的核酸片段。表达核酸片段的细胞是本发明优选的有用实施方案;它们可用于小规模或大规模制备本发明的类似物,或在非致病性细菌情况下,作为活疫苗的疫苗组分。

[0225] 当通过转化细胞生产本发明的类似物时,表达产物输送到培养基中或展现在转化细胞表面是非常方便的,但远非是必须的。

[0226] 当已鉴定出一个有效的生产细胞时,优选地是以此为基础,建立一个携带本发明的载体,并表达编码修饰的淀粉样蛋白原性多肽的核酸片段的稳定细胞系。优选地,该稳定的细胞系分泌或携带本发明的类似物,从而利于其纯化。

[0227] 一般来说,来源于与宿主细胞兼容的物种并包含复制子和调控序列的质粒载体与宿主联合使用。这种载体通常带有复制位点,以及能够在转化细胞中提供表型筛选的标记序列。例如,大肠杆菌典型地用 pBR322,一种来源于大肠杆菌种(参见,例如 Bolivar 等,1977)的质粒进行转化。pBR322 质粒包含氨苄青霉素和四环素抗性基因,从而提供容易的方式来鉴定转化细胞。pBR 质粒或其他微生物质粒或噬菌体也必须包括,或被修饰而包括可用于原核微生物表达的启动子。

[0228] 那些最常用于重组 DNA 构建的启动子包括 β -内酰胺酶(青霉素酶)和乳糖启动子系统(Chang 等,1978;Itakura 等,1977;Goeddel 等,1979)和色氨酸(trp)启动子系统

(Goeddel 等, 1979 ;EP-A-0036776)。虽然这些启动子是最常用的, 但其他微生物启动子已被发现和使用, 关于其核苷酸序列的详细信息已进行报道, 从而使熟练技术人员将它们有功能地连接到质粒载体上 (Siebwenlist 等, 1980)。来源于原核生物的某些基因可在大肠杆菌中从其自身启动子序列进行有效表达, 从而排除通过人工方式增加另一个启动子的需要。

[0229] 除了原核生物, 也可以应用真核微生物, 例如酵母培养物, 此处启动子应该能够启动表达。虽然通常可获得大量其他菌株, 但酿酒酵母或普通的用包酵母是真核微生物中最常用的。例如, 在酿酒酵母表达中, 质粒 YRp7 是常用的 (Stinchcomb 等, 1979 ;Kingsman 等, 1979 ;Tschemper 等, 1980)。该质粒已经包含 trp1 基因, 它为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株, 例如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1 (Jones, 1977), 提供一个选择标记。通过在缺乏色氨酸条件下生长, 作为酵母宿主基因组的一个特征的 trp1 损伤随后提供一个检测转化的有效环境。

[0230] 酵母载体中合适的启动序列包括 3- 磷酸甘油酸激酶 (Hitzman 等, 1980) 或其他糖酵解酶类 (Hess 等, 1968 ;Holland 等, 1978), 例如烯醇化酶、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖 -6- 磷酸异构酶、3- 磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、丙糖磷酸异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶的启动子。在构建合适的表达质粒过程中, 与这些基因相关的终止序列也连接到表达载体中所需表达序列的 3' 端以提供 mRNA 的聚腺苷酸化和终止作用。

[0231] 其他具有生长条件调控的转录的附加优势的启动子是, 乙醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、和上述甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、以及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区域。任何包括酵母兼容的启动子、复制起始点和终止序列的质粒载体是适用的。

[0232] 除了微生物, 来源于多细胞机体的细胞培养物也可用作宿主。原则上, 不论来自脊椎动物或无脊椎动物培养物, 任何这种细胞培养物是可用的。但是, 对脊椎动物细胞的兴趣最大, 而且近年来以培养物的形式 (组织培养物) 脊椎动物的增殖已成为常规操作程序 (Tissue Culture, 1973)。这种有用宿主细胞系的例子是 VERO 和 HeLa 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系和 W138, BHK, COS-7293, 草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (SF) 细胞 (作为完整表达系统而商品化获自, 加以变更 (i. a.) Protein Sciences, 1000 Research Parkway, Meriden, CT 06450, U. S. A. 和获自 Invitrogen), 以及 MDCK 细胞系。在本发明中, 特别优选的细胞系是从 Invitrogen, PO Box 2312, 9704 CH Groningen, The Netherlands 获得的 S₂。

[0233] 这种细胞的表达载体通常包括 (如果必须) 复制起始位点、位于待表达基因前面的启动子、以及任何必须的核糖体结合位点、RNA 剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。

[0234] 对于在哺乳动物细胞中使用, 表达载体上的调控功能通常由病毒物质提供。例如, 通常所用的启动子来源于多瘤病毒、腺病毒 2、更经常为猿猴病毒 40 (SV40)。由于 SV40 病毒的早期和晚期启动子很容易作为也包括 SV40 病毒复制起点的片段从病毒中获得, 因此二者是特别有用的 (Fiers 等, 1978)。只要包括从 HindIII 位点开始向位于病毒复制起点的 Bgl I 位点延伸大约 250bp 的序列, 也可使用更小或更大的 SV40 片段。另外, 也可能, 而

且通常是想要的,利用与所需基因序列正常相关的启动子或调控序列来提供与宿主细胞系统兼容的调控序列。

[0235] 复制起点可通过载体构建来提供以包括外源起点,例如可来源于 SV40 或其他病毒(例如多瘤病毒、腺病毒、VSV、BSV),或者通过宿主细胞染色体复制机制来提供。如果载体整合到宿主细胞染色体中,后者通常是足够的。

[0236] 有用类似物的鉴定

[0237] 对熟练技术人员来说,很清楚地知道并不是天然存在的 APP 或 A β 的所有可能的变异或修饰均能够在动物中引起与天然形式交叉反应的抗体。但是,建立一个对达到此处所述的免疫反应性的最低要求的修饰的淀粉样蛋白原性分子进行有效标准筛选并不困难。因此,可能利用一种方法来鉴定能够在动物物种中诱导产生抗非修饰的淀粉样蛋白原性多肽的抗体的修饰的淀粉样蛋白原性多肽,其中非修饰的淀粉样蛋白原性多肽是(无免疫原性的)自身蛋白,该方法包含

[0238] - 通过肽合成或遗传工程技术制备一组本发明的互不相同的类似物,其中氨基酸已被增加到、插入到、删除自或取代到动物物种的 APP 或 A β 的氨基酸序列中,从而产生一组包含对动物物种而言是外源的 T 细胞表位的氨基酸序列,或制备一组编码一组互不相同的类似物的核酸片段,

[0239] - 检测该组类似物或核酸片段的成员通过动物物种诱导产生抗非修饰的 APP 或 A β 抗体的能力,和

[0240] - 鉴定和任选分离在物种中显著诱导抗非修饰的 APP 或 A β 抗体产生的该组类似物的成员,或者鉴定和任选分离由该组核酸片段的成员编码的,在动物物种中显著诱导抗非修饰的 APP 或 A β 抗体产生的多肽表达产物。

[0241] 在该文中,“互不相同的修饰的淀粉样蛋白原性多肽组”是不相同的类似物的集合,例如,它可以根据上述讨论的标准进行选择(例如,结合圆二色性、NMR 光谱学和/或 X-射线衍射图谱分析的研究)。该组仅由少数成员组成,但可以预料该组可能包括几百个成员。

[0242] 对组中成员的检测最终在体内进行,但可使用许多缩小适于本发明目的的修饰分子数量的体外试验。

[0243] 由于引入外源 T 细胞表位的目的是通过 T 细胞的辅助来支持 B 细胞应答,因此先决条件是由类似物诱导 T 细胞增殖。可通过标准的体外增殖检测来检测 T 细胞增殖。简而言之,从受试者中获得富含 T 细胞的样本并随后保持培养。将培养的 T 细胞与受试者的 APCs 接触,该 APCs 预先吸收了修饰的分子,并进行处理以呈递其 T 细胞表位。监测 T 细胞的增殖,并与合适的对照(例如,培养基中的 T 细胞与具有处理的完整天然淀粉样蛋白原性多肽的 APCs 接触)进行比较。备选地,可通过测定 T 细胞应答它们的外源 T 细胞的识别而释放的相关细胞因子的浓度来测定增殖。

[0244] 已经赋予了高度的可能性,即每种类型组的至少一个类似物能够诱导产生抗 APP 或 A β 的抗体,可能制备一种免疫组合物,其包含至少一种能够在动物物种中诱导抗非修饰的 APP 或 A β 的抗体的类似物,其中非修饰的 APP 或 A β 是自身蛋白,该方法包含将组中在动物物种中显著诱导与 APP 或 A β 反应的抗体产生的成员与药用和免疫上可接受的载体和/或媒介物和/或稀释剂和/或赋形剂混合,任选地结合以至少一种药用和免疫上可接

受的佐剂。

[0245] 上述多肽组的检测通过以下方法可简便地完成,首先制备大量本发明的互不相同的核酸序列或载体,将这些插入到合适的表达载体中,用载体转化合适的宿主细胞(或宿主动物),及实现本发明的核酸序列的表达。在这些步骤之后进行表达产物的分离。优选地,核酸序列和/或载体用包含实行分子扩增技术,例如 PCR 或通过核酸合成的方法进行制备。

[0246] 特异的淀粉样蛋白原性靶目标

[0247] 除了最常与阿尔兹海默氏病相关的蛋白,APP、ApoE4 和 Tau 外,其他通过直接存在于 AD 脑的病斑或缠结中或通过与发展 AD 的危险增加有明显遗传关系,而以某种方式与 AD 相关的蛋白有很长的名单。这些抗原的大部分,如果不是所有,与上述 A β 、APP、早老素基因和 ApoE4 一起是本发明的特定实施方案中假定的靶蛋白。这些假定的靶蛋白已经在 W001/62284 中详细讨论。因此,这些假定的靶目标在此处仅简要提及,而更详细的背景讨论可在 W0 01/62282 中找到,该文结合于此作为参考:

[0248] α 1-抗胰凝乳蛋白酶(ACT); α 2-巨球蛋白;ABAD(结合 A β 肽的醇脱氢酶);APLP1 和 -2(淀粉样蛋白前体样蛋白 1 和 -2);AMY117;Bax;Bcl-2;博来霉素水解酶;BRI/ABRI;嗜铬粒蛋白 A;Clusterin/ApoJ;CRF(促肾上腺皮质激素释放因子)结合蛋白;EDTF(内皮衍生的毒素因子);类肝素硫酸蛋白聚糖;人脑衰蛋白应答介导蛋白 -2;Huntingtin(亨廷顿舞蹈病蛋白质);ICAM-1;IL-6;溶酶体相关抗原 CD68;P21ras;PLC- δ 1(磷脂酶 C 同工酶 δ 1);血清淀粉样 P 成分(SAP);突触泡蛋白;Synuclein(α -synuclein 或 NACP);和 TGF- β 1(转化生长因子 β 1)。

[0249] 此前所述的用于下调 APP 或 A β 的方式和方法可与治疗例如,活性特异性免疫治疗结合对抗任何这些其他淀粉样蛋白原性多肽,。

[0250] 除了阿尔兹海默氏病,脑部淀粉样蛋白血管病也是一种当前公开的技术的合适靶目标的疾病。

[0251] 应考虑到多数抗 APP 或 A β 的免疫方法限制为产生对天然 APP 或 A β 交叉反应的抗体的免疫。然而,在某些情况下,诱导 CTL 应答形式的细胞免疫来抗提呈来自淀粉样蛋白原性多肽的 MHC I 类表位的细胞,是令人感兴趣的——这在以下情况是有利的,即产 APP 或 A β 的细胞数量的降低并不造成严重的副作用。在需要 CTL 应答情况下,优选利用申请人 W000/20027 中的教导。这两个文献的内容因此结合于此作为参考。

[0252] 免疫原载体

[0253] 如上所述,可以获得包含 T 辅助细胞表位和代表或包括 B 细胞表位的 APP 或 A β 肽、共价连接到作为媒介物的无免疫原性的聚合物上,例如多价的活化的多羟基聚合物上、将作为仅包含免疫相关部分的疫苗分子发挥作用的分子,而且是上述公开的变体 d 和 e 中感兴趣的实施方案。例如,如果疫苗的靶目标是自身抗原,例如 APP 或 A β ,可使用混杂的或所谓通用的 T 辅助细胞表位。另外,增强免疫应答的成分也可以共偶联到媒介物上,从而作为佐剂。这些成分可以是甘露糖,吞噬作用激素、胞壁酰二肽、CpG 基序等。在这种情况下,不必进行随后的疫苗产物的佐剂配制,产物可以以纯水或盐水的形式给药。

[0254] 通过与 T 辅助细胞表位一起偶联细胞毒性 T 细胞(CTL)表位,也可能产生特异于产生 CTL 表位的抗原的 CTL。APC 例如巨噬细胞的促进产物吸收到细胞溶胶中的物质,例如

甘露糖,也可与 CTL 和 T 辅助细胞表位一起共偶联到媒介物上,并增强 CTL 应答。

[0255] B 细胞表位和 T 辅助细胞表位 (P2 和 P30) 在终产物中的比例根据合成步骤中这些肽浓度的改变而改变。如上所述,免疫原性分子可以在合成步骤中通过在碳酸盐缓冲液中添加如下物质,例如甘露糖、吞噬作用激素、CpG 基序或其他免疫刺激物质 (此处所述) 而被标记,如果必要,使用这些物质的胺化了的衍生物进行标记。

[0256] 如上所述,如果用不溶的活化的多羟基聚合物与包含 APP 或 A β B 细胞表位和 T 辅助细胞表位的肽进行连接,则可通过固相合成来进行,收获终产物并通过洗涤和过滤纯化。与三氟乙基磺酰基活化的多羟基聚合物偶联的成分 (肽,标记物等) 可在低 pH 下,例如 pH4-5,加入到多羟基聚合物中,从而通过被动扩散在“凝胶”中进行均匀发布。随后,升高 pH 到 pH 9-10,启动肽和标记物上伯氨基团与多羟基聚合物上的三氟乙基磺酰基基团反应。当肽和如免疫刺激物质偶联后,将凝胶磨碎,形成大小适于免疫的颗粒。

[0257] 因此这种免疫原包含

[0258] a) 至少一个来源于 APP 或 A β 的第一氨基酸序列,其中至少一个第一氨基酸序列包含至少一个 B 细胞和 / 或至少一个 CTL 表位,和

[0259] b) 至少一个包含外源 T 辅助细胞表位的第二氨基酸序列,其中至少第一和至少第二氨基酸序列的每一个均偶联到药用活化的多羟基聚合物载体上。

[0260] 为了将氨基酸序列偶联到多羟基聚合物上,通常需要使用合适的能与氨基酸序列形成必要连接的反应基团“活化”多羟基聚合物。

[0261] 术语“多羟基聚合物”意图具有与 WO 00/05316 相同的含义,即,多羟基聚合物确实具有该申请中详细教导的相同特征。因此,多羟基聚合物可以是水溶性的或水不溶性的 (从而在制备免疫原时需要不同合成步骤)。多羟基聚合物可选自天然存在的多羟基化合物和合成的多羟基化合物。

[0262] 特定的和优选的多羟基聚合物是多糖,选自 acetan、支链淀粉、树胶琼脂 - 琼脂、琼脂糖、藻酸盐、阿拉伯树胶、角叉藻聚糖 (carregeenan)、纤维素、环糊精、葡聚糖、丹麦琼脂、半乳甘露聚糖、明胶、ghatti、葡聚糖、糖元、瓜耳胶、刺梧桐、konjac/A、刺槐豆胶、甘露聚糖、果胶、车前草、出芽短梗霉聚糖、淀粉、tamarine、黄蓍胶、黄原胶、木聚糖、和木葡聚糖,葡聚糖是特别优选的。

[0263] 然而,多羟基聚合物也可以选自高度分支的聚乙烯亚胺 (PEI)、tetrathienylene vinylene、纤维 B (poly-paraphenyl terephthalamide 的长链)、聚氨基甲酸乙酯、聚硅氧烷、聚二甲基硅氧烷、硅氧烷、聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)、聚乙烯基醇、聚乙烯基吡咯烷酮、聚 (2- 羟基甲基丙烯酸乙酯)、聚 (N- 乙烯基吡咯烷酮)、聚乙烯基醇、聚丙烯酸、聚四氟乙烯 (PTFE)、聚丙烯酰胺、聚乙烯 - 共 - 乙烯基乙酸酯、聚乙二醇和衍生物、聚甲基丙烯酸、聚交酯 (PLA)、聚乙交酯 (PGA)、聚 (乙交酯 - 共 - 交酯) (PLGA)、聚酐和聚原酸酯。

[0264] 所述多羟基聚合物的 (重) 均分子量 (即活化前) 典型地是至少 1,000,例如至少 2,000,优选地在 2,500-2,000,000 的范围,更优选地在 3,000-1,000,000 的范围,特别是在 5,000-500,000 范围。已在实施例表明平均分子量在 10,000-200,000 范围的多羟基聚合物是特别有利的。

[0265] 优选地,多羟基聚合物水溶性程度在室温下至少为 10mg/ml,优选地至少为 25mg/ml,例如至少为 50mg/ml,特别是至少为 100mg/ml,例如至少为 150mg/ml。已知葡聚糖甚至

如此处活化后,仍可以达到水溶性的要求。

[0266] 对一些最感兴趣的多羟基聚合物,未活化的多羟基聚合物(即,活化前的天然多羟基聚合物)中C(碳原子)和OH基团(羟基)之间的比例在1.3-2.5的范围,例如1.5-2.3,优选地为1.6-2.1,特别是在1.85-2.05的范围。不受任何特定理论所限制,认为未活化的多羟基聚合物的这种C/OH比例代表亲水性高度有利的水平。聚乙烯醇和多糖是达到该要求的多羟基聚合物的实例。认为上述比例对活化的多羟基聚合物来说大约是一样的,因为活化比例应该是相当低的。

[0267] 术语“多羟基聚合物载体”意图指携带氨基酸序列的免疫原部分。作为一般规律,多羟基聚合物载体具有其外部限制,其中的氨基酸序列可被肽酶,例如加工免疫原的抗原呈递细胞中的肽酶切割。因此,多羟基聚合物载体可以是具有活化基团的多羟基聚合物,其中活化基团和氨基酸序列之间的键可被APC中的肽酶切割,或者多羟基聚合物载体可以是具有活化基团和例如连接物,如单个L-氨基酸或多个D-氨基酸的多羟基聚合物,其中连接物的最后部分可与氨基酸序列连接,并被APC中的肽酶切割。

[0268] 如上所述,多羟基聚合物具有官能团(活化基团),它促进将肽锚定到载体上。本领域中已知许多可应用的官能团,例如, tresyl(三氟乙基磺酰基)、马来酰亚胺基、p-nitrophenyl chloroformate、溴化氰、甲苯磺酰基(对-甲苯磺酰基)、triflyl(三氟甲磺酰基)、五氟苯磺酰基和乙烯基磺基团。本发明中官能团的优选实施例是三氟乙基磺酰基、马来酰亚胺基、甲苯磺酰基、三氟甲磺酰基、五氟苯磺酰基、p-nitrophenyl chloroformate和乙烯基磺基团,在它们中三氟乙基磺酰基、马来酰亚胺基和甲苯磺酰基是特别相关的。

[0269] 如WO 00/05316 实施例1中活化葡聚糖所述或如Gregorius等, J. Immunol. Meth. 181(1995)65-73所述,三氟乙基磺酰基活化的多羟基聚合物可用三氟乙基磺酰基氯化物来制备。

[0270] 马来酰亚胺活化的多羟基聚合物可用对-马来酰亚胺基苯基异氰酸酯如WO 00/05316 实施例3中所述活化葡聚糖进行制备。备选地,通过用二胺化合物(通常为 $H_2N-C_nH_{2n}-NH_2$,其中n为1-20,优选地为1-8),例如1,3-二氨基丙烷,过量地衍生三氟乙基磺酰基活化的多羟基聚合物(例如三氟乙基磺酰基活化的葡聚糖(TAD)),可以将马来酰亚胺基团引入到多羟基聚合物例如葡聚糖中,随后用试剂,例如琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、磺基-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)、磺基-琥珀酰亚胺基4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(SMPB)、磺基-琥珀酰亚胺基4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-SMPB)、N-γ-马来酰亚胺基丁酰氧基-琥珀酰亚胺酯(GMBS)或N-γ-马来酰亚胺基丁酰氧基-磺基琥珀酰亚胺酯与引入到TAD中的氨基进行反应。虽然活化的不同试剂和途径会导致马来酰亚胺活化产物的马来酰亚胺功能性和活化所进行的母体羟基基团的剩余物之间的连接略有不同,但全部都看作“马来酰亚胺活化的多羟基聚合物”。

[0271] 甲苯磺酰基活化的多羟基聚合物可如WO 00/05316 实施例2中活化葡聚糖所述用甲苯磺酰基氯化物制备。三氟甲磺酰基和五氟苯磺酰基活化的多羟基聚合物如甲苯磺酰基或三氟乙基磺酰基活化的类似物制备,例如,使用相应的酸式氯化物。

[0272] 溴化氰活化的多羟基聚合物可通过利用常规方法使多羟基聚合物与溴化氰反应而制备。得到的官能团通常是具有两个多羟基聚合物的羟基的氰酸酯。

[0273] 活化程度可表示为自由羟基和活化基团（即，官能化的羟基）之间的比例。认为多羟基聚合物的自由羟基和活化基团间的比例应在 250 : 1 和 4 : 1 之间，以在多羟基聚合物的亲水性和反应性之间达到有利平衡。优选地比例是在 100 : 1 和 6 : 1 之间，更优选地是在 60 : 1 和 8 : 1 之间，特别是在 40 : 1 和 10 : 1 之间。

[0274] 根据本发明，用于产生通常应用的免疫原的方法中的特别感兴趣的活化多羟基聚合物是三氟乙基磺酰基、甲苯磺酰基和马来酰亚胺基活化的多糖，特别是三氟乙基磺酰基活化的葡聚糖 (TAD)、甲苯磺酰基活化的葡聚糖 (TosAD) 和马来酰亚胺基活化的葡聚糖 (MAD)。

[0275] 优选地，多羟基聚合物载体和所连接的氨基酸序列之间的键可被肽酶切割，例如，在 APC 中在加工抗原过程中具有活性的肽酶。因此优选地，至少第一和至少第二氨基酸序列通过酰胺键或肽键偶联到活化的多羟基聚合物上。特别优选地是至少第一和至少第二个氨基酸序列每个都供给它们的各自酰胺键的氮部分。

[0276] 多羟基聚合物载体可以充分摆脱氨基酸残基，迫使活化基团提供肽酶切割键部分，但如上所述，载体也可以仅包括一个间隔区，所述间隔区包括至少一个 L-氨基酸。然而，至少第一和至少第二氨基酸序列通常通过氨基酸序列的 N-末端的氮连接到多羟基聚合物的活性形式上。

[0277] 上述本发明通常应用的免疫原可在基本上如此处描述的多肽疫苗的免疫方法中使用。也就是说，此处讨论的所有涉及剂量、给药方式和用于下调淀粉样蛋白原性多肽的多肽疫苗制剂的描述加以变更适于通常使用的免疫原。

[0278] 常规应用的安全接种技术

[0279] 如上所述，本发明的一个优选实施方案是使用不能提供自源的可引起抗淀粉样蛋白原性多肽的免疫应答的 T_H 表位的淀粉样蛋白原性多肽的变异体。

[0280] 然而，本发明人认为设计抗自身疫苗和有效抗自身免疫的策略是一般可用的技术，其本身具有发明性。应证明特别适于以下情况，即它试图下调的自身抗原在体内是足够多的，以至于可能产生免疫应答的自身刺激。因此，所有以上本实施方案范围的内容涉及的提供抗 APP 或 A β 的抗自身免疫应答加以变更可适用于抗其它自身多肽的免疫，特别是那些存在足够数量以维持非控制的自动免疫疾病形式的免疫应答，由于相关自身多肽的 T_H 表位引发免疫应答。

[0281] 实施例 1

[0282] 抗 AD 免疫的自动接种方法

[0283] A β 蛋白敲除小鼠没有表现出任何异常或不利的副作用的事实表明，A β 的清除或数量的降低是安全的，Zheng H. (1996)。

[0284] 已发表的关于转基因动物进行抗转基因人 A β 蛋白的免疫实验提示，如果可能破坏自身耐受，则可能通过自动反应的抗体实现 A β 的下调。这些实验进一步提示，这种 A β 的下调潜在地将同时阻断病斑的形成，和甚至从脑中清除已形成的 A β 病斑，参见 Schenk 等 (1999)。但传统上，不可能增加抗自身蛋白的抗体。

[0285] 因此已发表的数据不能提供阻断针对真正的自身蛋白的自身耐受的方法。这些数据也不能提供关于如何确保免疫反应仅直接或主要针对 A β 沉积物，而不针对细胞膜结合的 A β 前体蛋白 (APP)，如果这一点看来是必要的话。用现有技术所产生的免疫应答假定可

能以一种非控方式产生针对自身蛋白的免疫应答,从而可以产生针对 A β 蛋白部分的不必要的和额外的自动反应。因此,使用现有免疫策略最大可能是不能产生针对自身蛋白的强免疫应答,另外,由于对 CNS 中大量细胞上存在的膜结合的 APP 潜在的强交叉反应,所以也是不安全的。

[0286] 本发明提供针对真正的自身蛋白有效产生强的调控的免疫应答的方法,所述自身蛋白潜在地可能形成病斑并在 CNS 或机体其他区域造成严重疾病。通过该技术开发出一种安全而有效的人 A β 蛋白治疗疫苗,用于治疗 AD。

[0287] 据此,可能预料 AD,一种预计在下个世纪将消弱健康护理系统的疾病,可以被治愈,或这种所述的疫苗至少能够建立一个治疗该病症状和发展的有效治疗方法。该技术阐述一个完全新颖的阻断 AD 和其他神经疾病中淀粉样蛋白沉积的免疫方法。

[0288] 在下表中,显示了 35 个预期的构建体。所有表中给出的位置是相对于 APP 的起始甲硫氨酸 (SEQ ID NO :2 中第一个氨基酸),并包括起始和终止氨基酸,例如 672-714 片段包括氨基酸 672 和 714。P2 和 P30 的起始和终止位置表示在所示位置表位取代 APP 片段一部分(两个位置均包括在取代中)-在大多数构建体中,引入的表位取代表位长度的片段。表中的星号有以下含义:

[0289] *) 仅有一个 P2 和 P30 位置表明表位已在所示位置插入到 APP 衍生物中(表位在临近给定位置的氨基酸的 C 末端开始)。

[0290] **) 构建体 34 包含三个分别被 P30 和 P2 隔开的相同的 APP 片段。

[0291] ***) 构建体 35 包含九个被交替的 P30 和 P2 表位隔开的相同的 APP 片段。

[0292]

APP自身疫苗构建体

变体号	相对 APP aal 的 APP 片段的起始	相对 APP aal 的 APP 片段的终止	相对 APP aal 的 P2 表位的位置	相对 APP aal 的 P30 表位的位置	分子长度
1	630	770	656 - 670	635 - 655	141
2	630	714	656 - 670	635 - 655	85
3	672	770	656 - 670	635 - 655	99
4	672	770	735 - 749	714 - 728	99
5	672	770	714 - 728	714 - 728	99
6	672	770	723*	723*	135
7	672	770	723*	723*	120
8	672	770	723*	723*	114
9	672	714	723*	723*	64
10	672	714	723*	723*	64
11	672	714	672*	672*	58
12	672	714	714*	714*	58
13	672	714	714*	714*	73
14	672	714	714*	714*	43
14	672	714	680 - 694	675 - 695	43
16	672	714	685 - 799	680 - 700	43
17	672	714	690 - 704	685 - 705	43
18	672	714	695 - 709	690 - 710	43
19	672	714		680*	79
20	672	714		690*	79
21	672	714		700*	79
22	672	714		710*	79
23	672	714		680*	64
24	672	714		690*	64
25	672	714		700*	64
26	672	714		710*	64
27	672	714		680*	58
28	672	714		690*	58
29	672	714		700*	58
30	672	714		710*	58
31	672	714		rep. 1** 之后 34 x 3*	165
32	672	714		rep. 2** 之后 34 x 3**	165
33	672	714			
34	672	714			
35	672	714			

[0293] 最感兴趣对其产生应答的 APP 部分是 43 个氨基酸的 A β 核心肽 (A β -43, 相应于 SEQ ID NO:2 中残基 672-714), 它是 AD 脑中淀粉样蛋白斑的主要组分。该 APP 片段是以上列出的所有构建体的一部分。

[0294] 变体 1 和 2 包含 A β -43 的 APP 上游部分, 在此处已放置模式表位 (modelepitopes) P2 和 P30。变体 1 和 3-8 均包含 C-100 片段, 已表明它是神经毒性的 -C-100 片段相应于

SEQ ID NO:2 中氨基酸残基 714-770。在变体 3-5 中,表位取代 C-100 片段的部分,而在变体 6-8 中已插入 C-100。

[0295] 变体 9-35 仅包含核心 A β -43 蛋白。变体 9-13 中,P2 和 P30 融合在 A β -43 的任何一末端;在 14-21 中,P2 和 P30 取代 A β -43 的部分;在 22-33 中,P2 和 P30 插入到 A β -43 中;34 包含三个分别被 P30 和 P2 间隔的相同的 A β -43 片段;35 包含 9 个由交替的 P2 和 P30 表位间隔的 A β -43 重复。

[0296] 根据本发明,上述 A β -43 蛋白的截短部分也应用在免疫原性的类似物中。特别优选的是截短体 A β (1-42)、A β (1-40)、A β (1-39)、A β (1-35)、A β (1-34)、A β (1-34)、A β (1-28)、A β (1-12)、A β (1-5)、A β (13-28)、A β (13-35)、A β (17-28)、A β (25-35)、A β (35-40)、A β (36-42) 和 A β (35-42) (其中括号中的数字表示构成相关片段的 A β -43 的氨基酸序列,-例如 A β (35-42) 与 SEQ ID NO:2 中氨基酸 706-711 相同)。所有这些具有 A β -43 截短部分的变体,可用此处描述的 A β 片段制备,特别是变体 9、10、11、12 和 13。

[0297] 在某些情况下,优选 A β -43 或其片段是突变的。特别优选的是取代变异体,其中 A β -43 的 35 位的甲硫氨酸已被取代,优选被亮氨酸或异亮氨酸取代,或简单的被删除。特别优选的是,由于在淀粉样蛋白原性多肽或外源 T_H 表位中天然存在,或者由于它已被插入或添加,而仅包含一个在 C-末端的单个甲硫氨酸的类似物。因此,除了可能位于 C-末端的一个甲硫氨酸外,还优选包括外源 T_H 表位的类似物部分无甲硫氨酸。

[0298] 实际上,通常优选根据本发明使用的 APP 或 A β 的所有类似物均具有以下特征,即仅包括一个作为类似物中 C-末端氨基酸的单个甲硫氨酸,其他在淀粉样蛋白原性多肽或外源 T_H 表位中的甲硫氨酸被删除或被另一种氨基酸取代。

[0299] 一个更感兴趣的突变是 A β -43 中 19 位的苯丙氨酸被删除或取代,特别优选的突变是用脯氨酸取代该苯丙氨酸。

[0300] 下表中列出一组特别优选的用 A β -43 的截短体或突变体构建的构建体:

[0301]

变体号	在相对于 A β (1-42/43) aa1 的分子中使用的 A β 片段	相对于分子的 aa1 的 A β 片段位置	相对于分子的 aa1 的 P2 表位的位置	相对于分子的 aa1 的 P30 表位的位置	分子的总长 (aa)
36	1-28	22-49	50-64	1-21	64
37	1-12 (a)+13-28(b)	1-12 (a)+49-64 (b)	34-48	13-33	64
38	1-12 (x 3)	1-12, 34-45, 61-72	46-60	13-33	72
39	13-28(x 3)	1-16, 38-53, 69-84	54-68	17-37	84
40	1-12 (a)+13-35(b) +36-42 (c)	1-12 (a)+34-56 (b) + 72-78 (c)	57-71	13-33	78
41	1-28(x3)	1-28, 50-77, 93-120	73-92	29-49	120
42	1-43 (F19P/M35K)	1-43	65-79	44-64	79

[0302] 在该表中,分子中所用的 A β 片段由相对于 A β (1-42/43) 分子的 aa 1 的氨基酸数表示,即,1-28 表示在分子中使用 A β (1-42/43) 的片段 1-28。如果使用 2 个或多个不同片段,二者都表示在表中,即,1-12(a)+13-28(b) 表示在分子中使用 A β (1-42/43) 的片段 1-12 和片段 13-28。

[0303] 而且,如果在构建体中存在多于1个拷贝的相同片段,它在表中指出,即,1-12(x3)表示A β (1-42/43)的片段1-12在构建体中存在3个拷贝。

[0304] 另外,分子中A β 片段的位置由相对于分子第一个氨基酸的氨基酸位置表示,即,22-49表示所述A β 片段在分子中位于从氨基酸22到氨基酸49的位置,包括二者的位置。P2和P30表位的位置同样所示。如果在分子中使用2个或多个不同A β 片段,它们的位置均表示出来,即,1-12(a)+49-64(b)表示片段(a)在分子中aa 1-12的位置,而片段(b)在aa 49-64的位置。

[0305] 而且,如果在分子中存在多于1个拷贝的相同片段,所有这些拷贝的位置均表示出来,即,1-12、34-45、61-72表示在分子中存在3个拷贝的A β 片段,分别在位置1-12、34-45和61-72。

[0306] 最后,每个分子所示的总长度包括A β 片段和P2及P30表位。

[0307] 变体42包含2个氨基酸取代,在位置19(苯丙氨酸被脯氨酸取代),在位置35(甲硫氨酸被赖氨酸取代),如在显示A β 片段的列中所示。

[0308] 关于在特定位点引入外源T细胞表位的详细信息,参见图1和以上图表。

[0309] 一种另外类型的构建体是特别优选的。因为本发明的一个目标是避免破坏产生APP的细胞,而需要清除A β ,因此制备仅包含当存在于APP中时不暴露在细胞外相的A β 部分的自身疫苗构建体似乎是可行的。因此,这种构建体需要包含至少一个来源于SEQ ID NO:2中氨基酸700-714所确定的氨基酸片段的B细胞表位。因为这种短的多肽片段预计只有很弱的免疫原性,因此优选这种自身疫苗构建体包括几个拷贝的B细胞表位,例如,以具有在本发明的详细内容中公式I所示的结构的构建体,参见如上所述。在公式I的形式中,术语淀粉样蛋白_{e1}-淀粉样蛋白_{ex}是指x个包含来源于SEQ ID NO:2中氨基酸700-714的氨基酸序列的B细胞表位。优选的备选物是上述淀粉样蛋白原性(多)肽和选择的外源T辅助细胞表位经过酰胺键偶联到多糖载体分子上--在这种方法中,可能进行由SEQ ID NO:2中氨基酸700-714所组成的“弱”的表位的多重呈递,而且也可能选择B细胞和T细胞表位的最适比例。

[0310] 实施例2

[0311] 用本发明的A β 和修饰的蛋白免疫转基因小鼠

[0312] 构建编码hA β 43+-34的DNA

[0313] hA β 43+-34基因通过几个步骤进行构建。首先用引物ME#801(SEQ ID NO:10)和ME#802(SEQ ID NO:11),以引物ME#800(SEQ ID NO:9)为模板产生PCR片段。ME#800编码具有大肠杆菌最适密码子的人A β -43片段。ME#801和802对片段增加合适的限制性位点。

[0314] 纯化PCR片段,用Nco I和Hind III进行消化,再次进行纯化,并克隆到Nco I-Hind III消化并纯化的pET28b+大肠杆菌表达载体中。得到的编码野生型人A β -43质粒命名为pAB1。

[0315] 在下一步中,T辅助细胞表位P2加入到分子的C-末端。引物ME#806(SEQ ID NO:12)包含编码P2表位的序列,从而通过PCR反应得到P2和A β -43的融合体。

[0316] 克隆通过用引物ME#178(SEQ ID NO:8)和ME#806,并以pAB1作为模板制备PCR片段而进行。纯化该片段,用Nco I和Hind III进行消化,再次进行纯化,并克隆到Nco I-Hind III消化并纯化的pET28b+载体中。得到的质粒命名为pAB2。

[0317] 以类似的方式,制备另一个具有 A β -43 编码序列并将另一个 T 辅助细胞表位 P30 增加到 N 末端的质粒。这是通过用引物 ME#105 (SEQ ID NO:7) 和 ME#807 (SEQ ID NO:13) 并以 pAB1 为模板制备 PCR 片段而进行。

[0318] 纯化该片段,用 Nco I 和 Hind III 进行消化,再次进行纯化,并克隆到 Nco I-Hind III 消化并纯化的 pET28b+ 载体中。得到的质粒命名为 pAB3。

[0319] 在第三步中,第二个 A β -43 重复通过引物 ME#809 (SEQ ID NO:14) 加入到质粒 pAB2 的 P2 表位的 C 末端。同时 ME#809 紧随在 A β -43 重复之后,创造一个 BamHI 位点。PCR 片段用引物 ME#178 和 ME#809 以 pAB2 为模板进行制备。该片段用 Nco I 和 Hind III 进行消化,纯化并克隆到 Nco I-Hind III 消化并纯化的 pET28b+ 载体中。得到的质粒命名为 pAB4。

[0320] 最后,来自 pAB3 的 P30 表位 -A β -43 重复序列克隆到 pAB4 质粒中。这通过用引物 ME#811 (SEQ ID NO:16) 和 ME#105 以 pAB3 为模板制备 PCR 片段而进行。该片段经纯化,并在随后的 PCR 中与 ME#810 (SEQ ID NO:15) 一起作为引物,并以 pAB3 为模板进行 PCR。得到的片段进行纯化,用 BamHI 和 Hind III 进行消化,并克隆到 BamHI-Hind III 消化并纯化的 pAB4 质粒中。得到的质粒 pAB5 编码 hAB43+-34 分子。

[0321] 所有 PCR 和克隆程序基本上如 Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989 "Molecular cloning: a laboratory manual" . 第 2 版. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 所述来进行。

[0322] 对所有的克隆程序,使用的是大肠杆菌 K-12 细胞、菌株 Top-10F' (Stratagene, 美国)。pET28b+ 载体从 Novagen, 美国购买。所有引物在 DNA Technology, 丹麦合成。

[0323] hAB43+-34 的表达和纯化

[0324] 如 pET28b+ 系统 (Novagen) 供应商所述,由 pAB5 编码的 hAB43+-34 蛋白在大肠杆菌 BL21-Gold (Novagen) 细胞中进行表达。

[0325] 表达的 hAB43+-34 蛋白通过洗涤包含体及随后用 BioCad 纯化工作站 (PerSeptive Biosystems, USA) 在存在 6M 脲的情况下进行阳离子交换色谱而纯化到超过 85% 的纯度。脲随后以包含降低数量的脲溶液进行逐级透析而除去。最终缓冲液是 10mM Tris, pH 8.5。

[0326] 免疫研究

[0327] 人 APP (阿尔兹海默氏病前体蛋白) 转基因小鼠用于研究。这些小鼠称为 TgRND8+, 表达 APP 的一种突变形式,其在小鼠脑中导致高浓度 A β -40 和 A β -42 的产生 (Janus, C 等)。

[0328] 小鼠 (每组 8-10 只小鼠) 用 A β -42 (SEQ ID NO:2, 残基 673-714 通过标准的 Fmoc 策略合成) 或 hAB43+-34 变体 (实施例 1 表中构建体 34, 重组产生) 进行免疫,以 2 周间隔共免疫 4 次。剂量是 100mg A β 或 50mg hAB43+-34。小鼠在第 43 天 (三次注射后) 和第 52 天 (四次注射后) 进行放血,用血清通过直接 A β -42 ELISA 测定抗 A β -42 特异滴度的水平。

[0329] 下表所示的是平均相对抗 A β -42 滴度。

[0330]

免疫原	第43天（三次免疫后）	第52天（四次免疫后）
A β -42	4000	3000
hAB43+-34	16000	23000

[0331] 显然,当用 hAB43+-34A β 变体进行免疫时在三和四次免疫后得到的抗体滴度分别大约是用未改变的野生型 A β -42 作为抗原得到的滴度的 4 倍和 7.5 倍。当考虑用于免疫的变体的量仅是用于免疫的野生型序列量的 50% 的事实时,该事实被正确地对待。

[0332] 实施例 3

[0333] 用活化的多羟基聚合物作为交联剂合成 A β 肽共聚物疫苗

[0334] 简介

[0335] 传统的结合物疫苗包括共价偶联到载体蛋白上的(多)肽。该肽包含 B 细胞表位,载体蛋白提供 T 辅助细胞表位。但是,载体蛋白的大部分作为 T 辅助细胞表位的来源通常是无关的,因为整个序列中仅有一小部分包含相关的 T 辅助细胞表位。这种表位作为肽,例如 12-15 个氨基酸的肽,来被定义和合成。如果这些肽共价连接到包含 B 细胞表位的肽上,例如通过多价活化的多羟基聚合物,可获得仅包含相关部分的疫苗分子。进一步可能提供一种包含 B 细胞和 T 细胞表位之间优化比例的疫苗结合物。活化的(activated)多羟基聚合物的合成

[0336] 多羟基聚合物,例如葡聚糖、淀粉、琼脂糖等,可用 2,2,2-三氟乙基磺酰基氯(三氟乙基磺酰基氯),或者通过溶解在 N-甲基吡咯烷酮(NMP)中的同质合成(葡聚糖),或者通过在例如丙酮中的异质合成(淀粉、琼脂糖、交联的葡聚糖)进行活化。

[0337] 在干燥条件下,在补充了磁铁用于搅拌的 500ml 圆底烧瓶中,向冷冻干燥的水溶性葡聚糖(4.5g,83mmol,临床用等级,平均分子量 78000)中加入 225ml 干燥的 N-甲基吡咯烷酮(NMP)。将烧瓶放在 60℃ 油浴中并进行磁力搅拌。温度在 20 分钟内增加到 92℃。当葡聚糖溶解时,立即将烧瓶从油浴中移去,而且油浴温度降低到 40℃。烧瓶再放入油浴中,仍进行磁力搅拌,并逐滴加入三氟乙基磺酰基氯(2.764ml,25mmol)。15 分钟后,逐滴加入干燥的吡啶(无水,2.020ml,25mmol)。将烧瓶从油浴中移去,并在室温下搅拌 1 小时。产物(三氟乙基磺酰基活化的葡聚糖,TAD)在 1200ml 冷乙醇(99.9%)中沉淀。在离心机中 2000rpm 进行离心,轻轻倒出上清,在 50ml 聚丙烯管中收集沉淀。沉淀溶解在 50ml 0.5%醋酸中,在 5000ml 0.5%醋酸中透析 2 次,并进行冷冻干燥。TAD 以冷冻干燥粉末形式存在 -20℃。

[0338] 不溶性多羟基聚合物,例如琼脂糖或交联的葡聚糖,可通过在例如丙酮中制备多羟基聚合物的混悬液而被三氟乙基磺酰基活化,并以固相合成技术进行合成。活化的多羟基聚合物可通过过滤进行收集。合适的方法在,例如 Nilsson K 和 Mosbach K(1987),Methods in Enzymology 135,67 页和在 Hermansson GT 等(1992),in "Immobilized Affinity Ligand Techniques",Academic Press, Inc.,87 页中进行报道。

[0339] A β 肽共聚物疫苗的合成

[0340] TAD(10mg)溶解在 100 μ l H₂O 中,并加入 1000 μ l 碳酸盐缓冲液,pH 9.6 中,其含 5mg A β -42(SEQ ID NO:2,残基 673-714)、2.5mg P2(SEQ ID NO:4)和 2.5mg P30(SEQ ID NO:6)。A β -42 和 P2 及 P30 肽均包含被保护的赖氨酸基团:它们是 1-(4,4-二甲基-2,6-二

氧环己-1-亚基)乙基(Dde)保护形式的赖氨酸基团。通过标准的Fmoc策略制备肽,其中传统的Fmoc-Lys(Boc)-OH已被Fmoc-Lys(Dde)-OH(获自Novabiochem,目录号04-12-1121)取代,即,赖氨酸中的 ϵ -氨基用Dde取代Boc进行保护。

[0341] 测定pH值并用1M HCl调节到9.6。在室温下2.5小时后,加入80%的胍溶液至胍的终浓度为8%,溶液在室温下再温育30分钟,然后立即进行冷冻干燥。将冷冻干燥的产物溶解在水中,并在最终冷冻干燥前用水进行充分地透析。

[0342] 终产物中B细胞表位(A β)和T辅助细胞表位(P2和P30)的比例可在合成步骤中通过使用不同浓度的这些肽而进行改变。另外,终产物可进行标记,例如用甘露糖(以将结合物定位到APCs上),通过在合成步骤向碳酸盐缓冲液中加入胺化了的甘露糖而实现。

[0343] 如果使用不溶性活化的多羟基聚合物连接包含B细胞表位和T辅助细胞表位的肽,可以以固相合成来完成到多聚物的偶联,收获终产物并通过洗涤和过滤纯化。

[0344] 如在一般描述中所提及的,当前描述的用于制备基于肽的疫苗的方法可应用于任何其他多肽抗原中,其中制备纯合成的肽疫苗是方便的,及其中所述多肽抗原以一个单一的肽提供足够的免疫原性。

[0345] 实施例4

[0346] 肽共聚物疫苗的合成

[0347] 将TAD(10mg)溶解在100 μ l H₂O中,并加入1000 μ l碳酸盐缓冲液,pH 9.6中,含1-5mg肽A(任何感兴趣的具有免疫原性的肽!),1-5mg P2(白喉类毒素P2表位)和1-5mg P30(白喉类毒素P30表位)。测定pH值并用0.1M HCl调节到9.6。在室温下2.5小时后,将溶液随后立即进行冷冻干燥。将冷冻干燥的产物溶解在水中,在最终冷冻干燥前,用水进行充分透析,或在凝胶过滤柱上进行脱盐。在肽序列中有赖氨酸的情况下,赖氨酸侧链的 ϵ -氨基在合成中应用Fmoc-Lys(Dde)-OH衍生物通过Dde进行保护(Gregorius和Theisen 2001,投稿中)。偶联后,加入80%的胍溶液至胍的终浓度为1-20%,溶液在室温下再温育30分钟,随后立即进行冷冻干燥,并在最终冷冻干燥前,用水进行充分透析,或在凝胶过滤柱上进行脱盐。该原理在图2的示意图中进行阐述。

[0348] 这类免疫原已被本发明人应用,以布氏疏螺旋体蛋白OspC的C-末端短片段作为“肽A”,并以白喉类毒素(diphtheria toxoid)表位(P2或P30)作为肽B。用该抗原的免疫研究结果表明,只有本发明的包括OspC片段和与接种小鼠的与MHC单元型相匹配的外源白喉类毒素表位的免疫原能在这些小鼠中诱导与OspC反应的抗体产生。相反,一个仅包含OspC肽的分子不能诱导抗体产生,对2种免疫原,其中一个包含OspC,另一个包含表位,的混合物同样是这样。因此断定在相同的多羟基聚合物载体中的内含体是优选的,如果不是必需的,以诱导抗短肽半抗原,例如OspC,的抗体产生。

[0349] 参考文献

[0350] Brookmeyer, R.; Gray, S.; Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer's Disease in the United States and the Public Health Impact of Delaying Disease Onset. American Journal of Public Health, 88(9), 1337-1342.

[0351] Buttini, M.; Orth, M.; Bellosta, S.; Akeefe, H.; Pitas, R. E.; Wyss-Coray, T.; Mucke, L.; Mahley, R. W. (1999). Expression of Human Apolipoprotein E3 or E4 in the Brains of ApoE^{-/-} Mice: Isoform-Specific Effects on Neurodegeneration. Journal of

Neuroscience, 19, 4867-4880.

[0352] Clark, L. N. ;Poorkaj, P. ;Wszolek, Z. ;Geschwind, D. H. ;Nasreddine, Z. S. ; Miller, B. ;Li, D. ;Payami, H. ;Awert, F. ;Markopoulou, K. ;Andreadis, A. ;D' Souza, I. ;Lee, V. M. ;Reed, L. ;Trojanowski, J. Q. ;Zhukareva, V. ;Bird, T. ;Schellenberg, G. ;Wilhelmsen, K. C. (1998). Pathogenic Implications of Mutations in the Tau Gene in Pallido-Ponto-Nigral Degeneration and Related Neurodegenerative Disorders Linked to Chromosome 17. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 95(22), 13103-13107.

[0353] Gupta, R. K. et al. (1998), Dev Biol Stand. 92 :63-78.

[0354] Hsiao K. et al. (1998) Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins", Exp. Gerontol. 33(7-8), 883-889

[0355] Hutton, M. ;London, C. L. ;Rizzu, P. ;Baker, M. ;Froelich, S. ;Houlden, H. ; Pickering-Brown, S. ;Chakraborty, S. ;Isaacs, A. ;Grover, A. ;Hackett, J. ;Adamson, J. ;Lincoln, S. ;Dickson, D. ;Davies, P. ;Petersen, R. C. ;Stevens, M. ;de Graaff, E. ; Wauters, E. ;van Baren, J. ;Hillebrand, M. ;Joosse, M. ;Kwon, J. M. ;Nowotny, P. ;Che, L. K. ;Norton, J. ;Morris, J. C. ;Reed, L. E. ;Trojanowski, J. ;Basun, H. ;Lannfelt, L. ; Neystat, M. ;Fahn, S. ;Dark, F. ;Tannenberg, T. ;Dodd, P. ;Hayward, N. ;Kwok, J. B. J. ; Schofield, P. R. ;Andreadis, A. ;Snowden, J. ;Craufurd, D. ;Neary, D. ;Owen, F. ;Oostra, B. A. ;Hardy, J. ;Goate, A. ;van Swieten, J. ;Mann, D. ;Lynch, T. ;Heutink, P. (1998).

[0356] Association of Missense and 5' -Splice-Site Mutations in Tau with the Inherited Dementia FTDP-17. Nature, 393, 702-705.

[0357] Janus, C. et al. (2000), Nature 408 :979-982.

[0358] Kas, H. S. (1997) J Microencapsul 14 :689-711

[0359] Leon, J. ;Cheng, C. K. ;Neumann, P. J. (1998). Alzheimer's Disease Care :Costs and Potential Savings. Health Affairs, 17(6), 206-216.

[0360] Lippa C. F. et al. (1998) Ab-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. Lancet 352, 1117-1118

[0361] Luo, J. -J. ;Wallace, W. ;Riccioni, T. ;Ingram, D. K. ;Roth, G. S. ; Kusiak, J. W. (1999). Death of PC12 Cells and Hippocampal Neurons Induced by Adenoviral-Mediated FAD Human Amyloid Precursor Protein Gene Expression. Journal of Neuroscience Research, 55(5), 629-642.

[0362] Naruse, S. ;Thinakaran, G. ;Luo, J. -J. ;Kusiak, J. W. ;Tomita, T. ;Iwatsubo, T. ; Qian, X. ;Ginty, D. D. ;Price, D. L. ;Borchelt, D. R. ;Wong, P. C. ;Sisodia, S. S. (1998). Effects of PS1 Deficiency on Membrane Protein Trafficking in Neurons. Neuron, 21(5), 1213-1231.

[0363] National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999, NIH Publication No. 99-4664.

[0364] Pietrobon, P. J. (1995), Pharm Biotechnol. 6 :347-61 Poorkaj, P. ;Bird, T. D. ; Wijsman, E. ;Nemens, E. ;Garruto, R. M. ;Anderson, L. ;Andreadis, A. ;Wiederhold, W. C. ;

Raskind, M. ;Schellenberg, G. D. (1998). Tau Is aCandidate Gene for Chromosome 17 Frontotemporal Dementia. Annals ofNeurology, 43, 815-825.

[0365] Schenk, D. ;Barbour, R. ;Dunn, W. ;Gordon, G. ;Grajeda, H. ;Guido, T. ;Hu, K. ;Huang, J. ;Johnson-Wood, K. ;Khan, K. ;Kholodenko, D. ;Lee, M. ;Liao, Z. ;Lieberburg, I. ;Motter, R. ;Mutter, L. ;Soriano, F. ;Shopp, G. ;Vasquez, N. ;Vandever, C. ;Walker, S. ;Wogulis, M. ;Yednock, T. ;Games, D. ;Seubert, P. (1999). Immunization with A-beta Attenuates Alzheimer ' s Disease-LikePathology in the PDAPP Mouse. Nature, 400(6740), 173-177.

[0366] Shekunov, B. et. al. (1999), J. Crystal Growth 198/199 :1345-1351.

[0367] Spillantini, M. G. ;Murrell, J. R. ;Goedert, M. ;Farlow, M. R. ;Klug, A. ;Ghetti, B. (1998). Mutation in the Tau Gene in Familial Multiple System Tauopathywith Presenile Dementia. Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. , 95(13), 7737-7741.

[0368] Strittmatter, W. J. ;Saunders, A. M. ;Schmechel, D. ;Pericak-Vance, M. ;Enghild, J. ;Salvesen, G. S. ;Roses, A. D. (1993). A polipoprotein E :High-Avidity Binding to A β and Increased Frequency of Type 4 Allele inLate-Onset Familial Alzheimer Disease. Proceedings of the National Academyof Sciences U. S. A. , 90, 1977-1981.

[0369] Vidal, R. ;Frangione, B. ;Rostagno, A. ;Mead, S. ;Revesz, T. ;Plant, G. ;Ghisso, J. (1999). A Stop-Codon Mutation in the BRI Gene Associated with FamilialBritish Dementia. Nature, 399 :776-781.

[0370] Zheng H. (1996) " Mice deficient for the amyloid precursor protein gene. Ann. N Y Acad. Sci. , 777, 421-426.

[0371] York, P. (1999), PSTT 11 :430-440

[0372] 序列表

[0373] <110> 法麦克萨有限公司

[0374] <120> 下调淀粉样蛋白的新方法

[0375] <130> P1014PC1

[0376] <140>

[0377] <141>

[0378] <160> 16

[0379] <170> PatentIn Ver. 3. 1

[0380] <210> 1

[0381] <211> 2313

[0382] <212> DNA

[0383] <213> 人

[0384] <220>

[0385] <221> CDS

[0386] <222> (1).. (2313)

[0387] <220>
 [0388] <221>misc_feature
 [0389] <222>(2098)..(2169)
 [0390] <223> 编码跨膜区的核苷酸
 [0391] <220>
 [0392] <221>misc_feature
 [0393] <222>(2014)..(2313)
 [0394] <223> 编码 C-100 的核苷酸
 [0395] <220>
 [0396] <221>misc_feature
 [0397] <222>(2016)..(2144)
 [0398] <223>(42/43
 [0399] <220>
 [0400] <221>misc_feature
 [0401] <222>(2014)..(2142)
 [0402] <223>(42/43
 [0403] <400>1
 [0404] atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg ctg gcc gcc tgg acg gct cgg 48
 [0405] Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
 [0406] 1 5 10 15
 [0407] gcg ctg gag gta ccc act gat ggt aat gct ggc ctg ctg gct gaa ccc 96
 [0408] Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
 [0409] 20 25 30
 [0410] cag att gcc atg ttc tgt ggc aga ctg aac atg cac atg aat gtc cag 144
 [0411] Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
 [0412] 35 40 45
 [0413] aat ggg aag tgg gat tca gat cca tca ggg acc aaa acc tgc att gat 192
 [0414] Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
 [0415] 50 55 60
 [0416] acc aag gaa ggc atc ctg cag tat tgc caa gaa gtc tac cct gaa ctg 240
 [0417] Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 [0418] 65 70 75 80
 [0419] cag atc acc aat gtg gta gaa gcc aac caa cca gtg acc atc cag aac 288
 [0420] Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 [0421] 85 90 95
 [0422] tgg tgc aag cgg ggc cgc aag cag tgc aag acc cat ccc cac ttt gtg 336
 [0423] Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 [0424] 100 105 110
 [0425] att ccc tac cgc tgc tta gtt ggt gag ttt gta agt gat gcc ctt ctc 384

[0426]	Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu	
[0427]	115 120 125	
[0428]	gtt cct gac aag tgc aaa ttc tta cac cag gag agg atg gat gtt tgc	432
[0429]	Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys	
[0430]	130 135 140	
[0431]	gaa act cat ctt cac tgg cac acc gtc gcc aaa gag aca tgc agt gag	480
[0432]	Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu	
[0433]	145 150 155 160	
[0434]	aag agt acc aac ttg cat gac tac ggc atg ttg ctg ccc tgc gga att	528
[0435]	Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile	
[0436]	165 170 175	
[0437]	gac aag ttc cga ggg gta gag ttt gtg tgt tgc cca ctg gct gaa gaa	576
[0438]	Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu	
[0439]	180 185 190	
[0440]	agt gac aat gtg gat tct gct gat gcg gag gag gat gac tcg gat gtc	624
[0441]	Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val	
[0442]	195 200 205	
[0443]	tgg tgg ggc gga gca gac aca gac tat gca gat ggg agt gaa gac aaa	672
[0444]	Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys	
[0445]	210 215 220	
[0446]	gta gta gaa gta gca gag gag gaa gaa gtg gct gag gtg gaa gaa gaa	720
[0447]	Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu	
[0448]	225 230 235 240	
[0449]	gaa gcc gat gat gac gag gac gat gag gat ggt gat gag gta gag gaa	768
[0450]	Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu	
[0451]	245 250 255	
[0452]	gag gct gag gaa ccc tac gaa gaa gcc aca gag aga acc acc agc att	816
[0453]	Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile	
[0454]	260 265 270	
[0455]	gcc acc acc acc acc acc acc aca gag tct gtg gaa gag gtg gtt cga	864
[0456]	Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg	
[0457]	275 280 285	
[0458]	gag gtg tgc tct gaa caa gcc gag acg ggg ccg tgc cga gca atg atc	912
[0459]	Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile	
[0460]	290 295 300	
[0461]	tcc cgc tgg tac ttt gat gtg act gaa ggg aag tgt gcc cca ttc ttt	960
[0462]	Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe	
[0463]	305 310 315 320	
[0464]	tac ggc gga tgt ggc ggc aac cgg aac aac ttt gac aca gaa gag tac	1008

[0465]	Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr	
[0466]	325 330 335	
[0467]	tgc atg gcc gtg tgt ggc agc gcc atg tcc caa agt tta ctc aag act	1056
[0468]	Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr	
[0469]	340 345 350	
[0470]	acc cag gaa cct ctt gcc cga gat cct gtt aaa ctt cct aca aca gca	1104
[0471]	Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala	
[0472]	355 360 365	
[0473]	gcc agt acc cct gat gcc gtt gac aag tat ctc gag aca cct ggg gat	1152
[0474]	Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp	
[0475]	370 375 380	
[0476]	gag aat gaa cat gcc cat ttc cag aaa gcc aaa gag agg ctt gag gcc	1200
[0477]	Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala	
[0478]	385 390 395 400	
[0479]	aag cac cga gag aga atg tcc cag gtc atg aga gaa tgg gaa gag gca	1248
[0480]	Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala	
[0481]	405 410 415	
[0482]	gaa cgt caa gca aag aac ttg cct aaa gct gat aag aag gca gtt atc	1296
[0483]	Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile	
[0484]	420 425 430	
[0485]	cag cat ttc cag gag aaa gtg gaa tct ttg gaa cag gaa gca gcc aac	1344
[0486]	Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn	
[0487]	435 440 445	
[0488]	gag aga cag cag ctg gtg gag aca cac atg gcc aga gtg gaa gcc atg	1392
[0489]	Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met	
[0490]	450 455 460	
[0491]	ctc aat gac cgc cgc cgc ctg gcc ctg gag aac tac atc acc gct ctg	1440
[0492]	Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu	
[0493]	465 470 475 480	
[0494]	cag gct gtt cct cct cgg cct cgt cac gtg ttc aat atg cta aag aag	1488
[0495]	Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys	
[0496]	485 490 495	
[0497]	tat gtc cgc gca gaa cag aag gac aga cag cac acc cta aag cat ttc	1536
[0498]	Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe	
[0499]	500 505 510	
[0500]	gag cat gtg cgc atg gtg gat ccc aag aaa gcc gct cag atc cgg tcc	1584
[0501]	Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser	
[0502]	515 520 525	
[0503]	cag gtt atg aca cac ctc cgt gtg att tat gag cgc atg aat cag tct	1632

[0504]	Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser	
[0505]	530 535 540	
[0506]	ctc tcc ctg ctc tac aac gtg cct gca gtg gcc gag gag att cag gat	1680
[0507]	Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp	
[0508]	545 550 555 560	
[0509]	gaa gtt gat gag ctg ctt cag aaa gag caa aac tat tca gat gac gtc	1728
[0510]	Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val	
[0511]	565 570 575	
[0512]	ttg gcc aac atg att agt gaa cca agg atc agt tac gga aac gat gct	1776
[0513]	Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala	
[0514]	580 585 590	
[0515]	ctc atg cca tct ttg acc gaa acg aaa acc acc gtg gag ctc ctt ccc	1824
[0516]	Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro	
[0517]	595 600 605	
[0518]	gtg aat gga gag ttc agc ctg gac gat ctc cag ccg tgg cat tct ttt	1872
[0519]	Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe	
[0520]	610 615 620	
[0521]	ggg gct gac tct gtg cca gcc aac aca gaa aac gaa gtt gag cct gtt	1920
[0522]	Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val	
[0523]	625 630 635 640	
[0524]	gat gcc cgc cct gct gcc gac cga gga ctg acc act cga cca ggt tct	1968
[0525]	Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser	
[0526]	645 650 655	
[0527]	ggg ttg aca aat atc aag acg gag gag atc tct gaa gtg aag atg gat	2016
[0528]	Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp	
[0529]	660 665 670	
[0530]	gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa ttg	2064
[0531]	Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu	
[0532]	675 680 685	
[0533]	gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa ggt gca atc att gga	2112
[0534]	Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly	
[0535]	690 695 700	
[0536]	ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg aca gtg atc gtc atc acc ttg	2160
[0537]	Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu	
[0538]	705 710 715 720	
[0539]	gtg atg ctg aag aag aaa cag tac aca tcc att cat cat ggt gtg gtg	2208
[0540]	Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val	
[0541]	725 730 735	
[0542]	gag gtt gac gcc gct gtc acc cca gag gag cgc cac ctg tcc aag atg	2256

[0543] Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
 [0544] 740 745 750
 [0545] cag cag aac ggc tac gaa aat cca acc tac aag ttc ttt gag cag atg 2304
 [0546] Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
 [0547] 755 760 765
 [0548] cag aac tag 2313
 [0549] Gln Asn
 [0550] 770
 [0551] <210>2
 [0552] <211>770
 [0553] <212>PRT
 [0554] <213>人
 [0555] <400>2
 [0556] Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
 [0557] 1 5 10 15
 [0558] Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
 [0559] 20 25 30
 [0560] Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
 [0561] 35 40 45
 [0562] Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
 [0563] 50 55 60
 [0564] Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 [0565] 65 70 75 80
 [0566] Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 [0567] 85 90 95
 [0568] Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 [0569] 100 105 110
 [0570] Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
 [0571] 115 120 125
 [0572] Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 [0573] 130 135 140
 [0574] Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 [0575] 145 150 155 160
 [0576] Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 [0577] 165 170 175
 [0578] Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 [0579] 180 185 190
 [0580] Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 [0581] 195 200 205

[0582]	Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
[0583]	210 215 220
[0584]	Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
[0585]	225 230 235 240
[0586]	Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
[0587]	245 250 255
[0588]	Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
[0589]	260 265 270
[0590]	Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
[0591]	275 280 285
[0592]	Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
[0593]	290 295 300
[0594]	Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
[0595]	305 310 315 320
[0596]	Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
[0597]	325 330 335
[0598]	Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
[0599]	340 345 350
[0600]	Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
[0601]	355 360 365
[0602]	Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp
[0603]	370 375 380
[0604]	Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
[0605]	385 390 395 400
[0606]	Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
[0607]	405 410 415
[0608]	Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
[0609]	420 425 430
[0610]	Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
[0611]	435 440 445
[0612]	Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
[0613]	450 455 460
[0614]	Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
[0615]	465 470 475 480
[0616]	Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
[0617]	485 490 495
[0618]	Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
[0619]	500 505 510
[0620]	Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser

[0621]	515	520	525
[0622]	Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser		
[0623]	530	535	540
[0624]	Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp		
[0625]	545	550	555
[0626]	Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val		
[0627]	565	570	575
[0628]	Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala		
[0629]	580	585	590
[0630]	Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro		
[0631]	595	600	605
[0632]	Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe		
[0633]	610	615	620
[0634]	Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val		
[0635]	625	630	635
[0636]	Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser		
[0637]	645	650	655
[0638]	Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp		
[0639]	660	665	670
[0640]	Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu		
[0641]	675	680	685
[0642]	Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly		
[0643]	690	695	700
[0644]	Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu		
[0645]	705	710	715
[0646]	Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val		
[0647]	725	730	735
[0648]	Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met		
[0649]	740	745	750
[0650]	Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met		
[0651]	755	760	765
[0652]	Gln Asn		
[0653]	770		
[0654]	<210>3		
[0655]	<211>45		
[0656]	<212>DNA		
[0657]	<213> 破伤风梭菌 (Clostridium tetani)		
[0658]	<220>		
[0659]	<221>CDS		

[0660]	<222>(1).. (45)	
[0661]	<223> 编码 P2 表位的 DNA	
[0662]	<400>3	
[0663]	cag tac atc aaa gct aac tcc aaa ttc atc ggt atc acc gag ctg	45
[0664]	Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu	
[0665]	1 5 10 15	
[0666]	<210>4	
[0667]	<211>15	
[0668]	<212>PRT	
[0669]	<213> 破伤风梭菌 (Clostridium tetani)	
[0670]	<400>4	
[0671]	Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu	
[0672]	1 5 10 15	
[0673]	<210>5	
[0674]	<211>63	
[0675]	<212>DNA	
[0676]	<213> 破伤风梭菌 (Clostridium tetani)	
[0677]	<220>	
[0678]	<221>CDS	
[0679]	<222>(1).. (63)	
[0680]	<223> 编码 P30 表位的 DNA	
[0681]	<400>5	
[0682]	ttc aac aac ttc acc gta agc ttc tgg ctg cgt gtt ccg aaa gtt agc	48
[0683]	Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser	
[0684]	1 5 10 15	
[0685]	gct agc cac ctg gaa	63
[0686]	Ala Ser His Leu Glu	
[0687]	20	
[0688]	<210>6	
[0689]	<211>21	
[0690]	<212>PRT	
[0691]	<213> 破伤风梭菌 (Clostridium tetani)	
[0692]	<400>6	
[0693]	Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser	
[0694]	1 5 10 15	
[0695]	Ala Ser His Leu Glu	
[0696]	20	
[0697]	<210>7	
[0698]	<211>21	

[0699]	<212>DNA	
[0700]	<213> 合成的	
[0701]	<223> 合成的 PCR 引物	
[0702]	<400>7	
[0703]	caactcagct tcctttcggg c	21
[0704]	<210>8	
[0705]	<211>21	
[0706]	<212>DNA	
[0707]	<213> 合成的	
[0708]	<223> 合成的 PCR 引物	
[0709]	<400>8	
[0710]	agatctcgat cccgcgaaat t	21
[0711]	<210>9	
[0712]	<211>135	
[0713]	<212>DNA	
[0714]	<213> 合成的	
[0715]	<223> 合成的 PCR 引物	
[0716]	<400>9	
[0717]	atggatgcag aattccgtca cgactccggt tacgaagttc accaccagaa actggttttc	60
[0718]	ttcgcagaag atgttggttc caacaaaggt gcaatcatcg gtctgatggt tggcggtggt	120
[0719]	gttatcgcca cctag	135
[0720]	<210>10	
[0721]	<211>31	
[0722]	<212>DNA	
[0723]	<213> 合成的	
[0724]	<223> 合成的 PCR 引物	
[0725]	<400>10	
[0726]	gccggccatg gatgcagaat tccgtcacga c	31
[0727]	<210>11	
[0728]	<211>39	
[0729]	<212>DNA	
[0730]	<213> 合成的	
[0731]	<223> 合成的 PCR 引物	
[0732]	<400>11	
[0733]	gccggaagct tctaggtcgc gataacaaca ccgccaacc	39
[0734]	<210>12	
[0735]	<211>84	
[0736]	<212>DNA	
[0737]	<213> 合成的	

[0738]	<223> 合成的 PCR 引物	
[0739]	<400>12	
[0740]	ccggcaagct tctacagctc ggtgataccg atgaatttgg agttagcttt gatgtactgg	60
[0741]	gtcgcgataa caacaccgcc aacc	84
[0742]	<210>13	
[0743]	<211>101	
[0744]	<212>DNA	
[0745]	<213> 合成的	
[0746]	<223> 合成的 PCR 引物	
[0747]	<400>13	
[0748]	gccggccatg ggtttcaaca acttcaccgt tagcttctgg ctgcgtgttc cgaaagttag	60
[0749]	cgcgagccac ctggaagatg cagaattccg tcacgactcc g	101
[0750]	<210>14	
[0751]	<211>172	
[0752]	<212>DNA	
[0753]	<213> 合成的	
[0754]	<223> 合成的 PCR 引物	
[0755]	<400>14	
[0756]	gggccaaagct tggatccggt cgcgataaca acaccgcca ccatcagacc gatgattgca	60
[0757]	cctttgttgg aaccaacatc ttctgcgaag aaaaccagtt tctggtggtg aacttcgtaa	120
[0758]	ccggagtcgt gacggaactc tgcattccagc tcggtgatac cgatgaattt gg	172
[0759]	<210>15	
[0760]	<211>30	
[0761]	<212>DNA	
[0762]	<213> 合成的	
[0763]	<223> 合成的 PCR 引物	
[0764]	<400>15	
[0765]	ctggaagatg cagagttccg tcacgactcc	30
[0766]	<210>16	
[0767]	<211>35	
[0768]	<212>DNA	
[0769]	<213> 合成的	
[0770]	<223> 合成的 PCR 引物	
[0771]	<400>16	
[0772]	gcgcgggate cttcaacaac ttcaccgtta gcttc	35
[0773]	<210>17	
[0774]	<211>13	
[0775]	<212>PRT	
[0776]	<213> 合成的	

[0777] <223> 合成的 HLA DR 结合序列

[0778] <400>17

[0779] Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala

[0780] 1 5 10

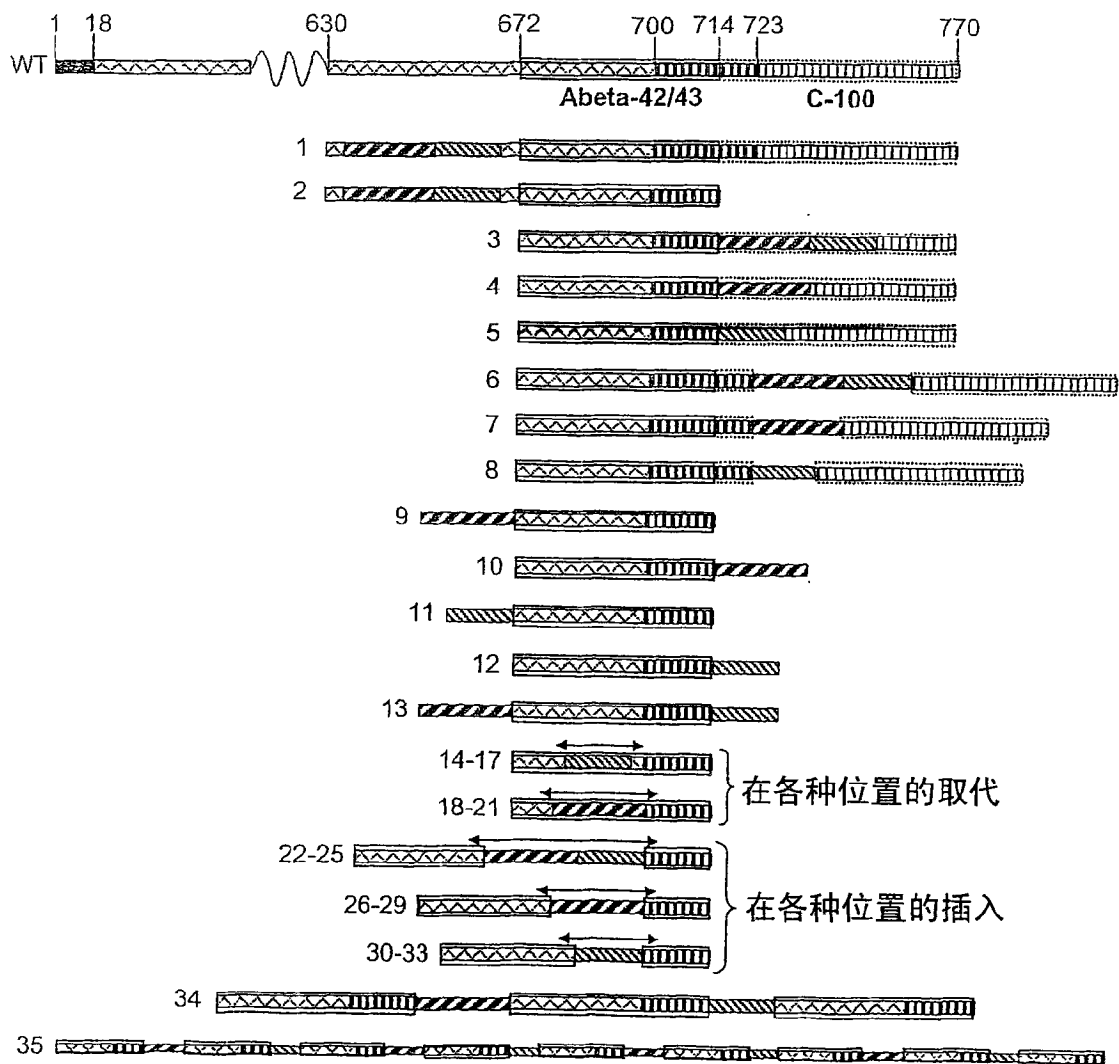


图 1

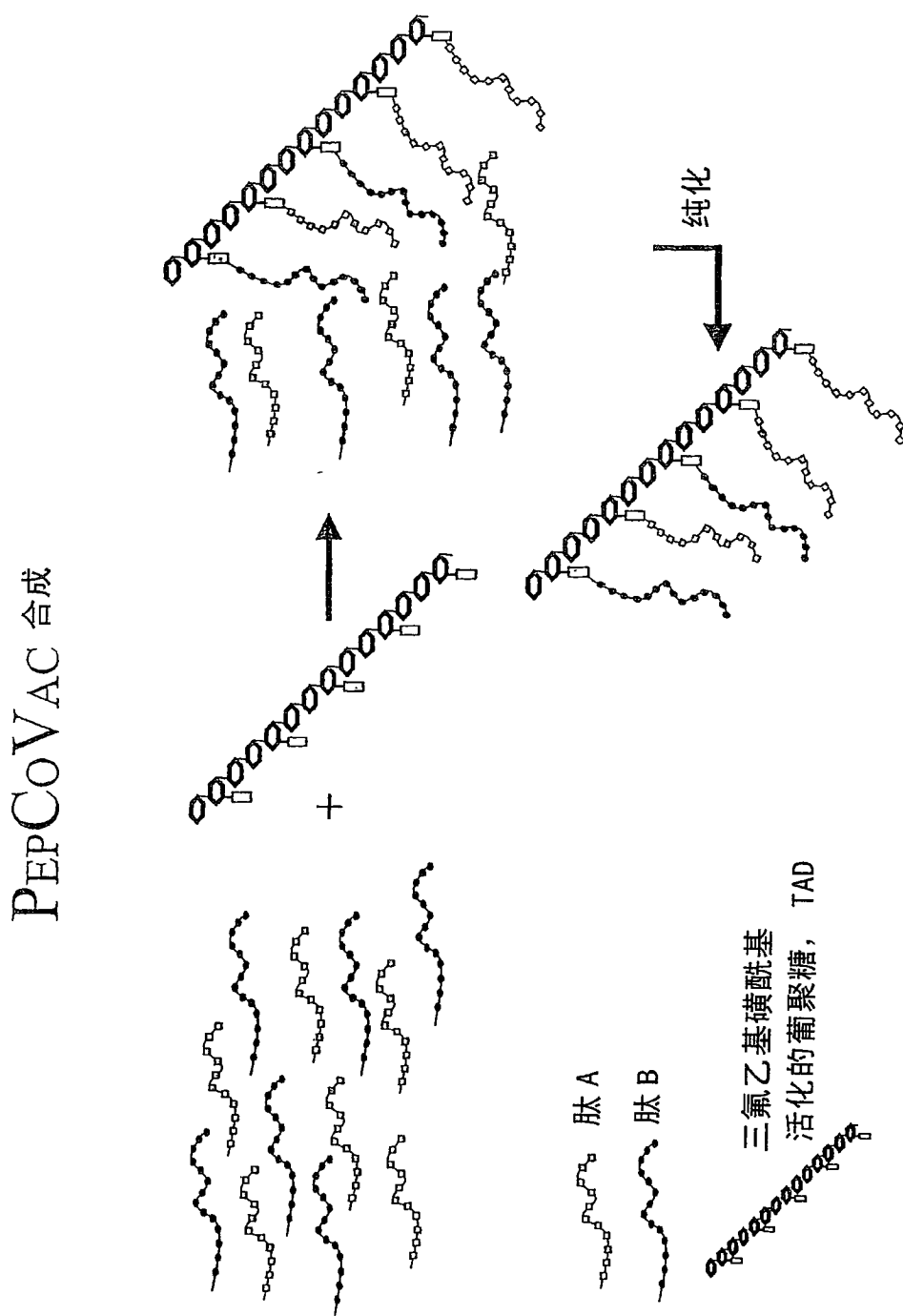


图 2