



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 103189050 B

(45)授权公告日 2017.09.29

(21)申请号 201180051932.3

(22)申请日 2011.10.26

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103189050 A

(43)申请公布日 2013.07.03

(30)优先权数据

10188832.9 2010.10.26 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.04.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/068797 2011.10.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/055933 EN 2012.05.03

(73)专利权人 AC免疫有限公司

地址 瑞士洛桑

(72)发明人 P·雷斯 D·希克曼

M·皮尔格伦 博施 A·穆斯

A·普法伊费尔

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51)Int.Cl.

A61K 9/127(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61K 47/61(2017.01)

(56)对比文件

US 2004248799 A1,2004.12.09,说明书实施例3,8.

EP 0203676 A2,1986.12.03,说明书第5页第25-30段.

ANTHONY HUANG, ET.AL..

“CHARACTERIZATION OFANTIBODY COVALENTLY COUPLED TO LIPOSOMES”.《BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA》.1982,PP. 140-150.

审查员 刘南岑

权利要求书3页 说明书36页

序列表4页 附图9页

(54)发明名称

包含通过疏水部分修饰的肽的基于脂质体的构建体

(57)摘要

本发明涉及制备基于脂质体的构建体的方法,所述构建体包含在脂质体中重构的通过疏水性部分修饰的目标肽,尤其是目标抗原性肽,并涉及关于使用所述方法获得的抗原性构建体。本发明进一步涉及所述构建体在用于治疗蛋白质构象病(proteopathy)引起或相关的疾病及病症(诸如阿尔兹海默氏病)中的治疗性及诊断性用途。

1. 制备基于脂质体的构建体的方法,所述方法包括以下步骤
 - i 在溶液中制备脂质体;
 - ii 通过将至少一个疏水性部分添加至肽的N及/或C端来制备经修饰的肽;
 - iii 在表面活性剂存在下溶解经修饰的肽,以使得经修饰的肽是微团形式;
 - iv 通过将溶解的修饰的肽添加到制备的脂质体中并且将溶解的修饰的肽稀释至表面活性剂的临界微团浓度以下,从而修饰的肽的微团形式被破坏因而驱动修饰的肽的疏水部分整合至预形成的脂质体的外层中,来装载步骤(i)的制备的脂质体;从而至少72%的经重构的肽存在于脂质体的外表面上。
2. 权利要求1的方法,其中所述修饰的肽是淀粉样蛋白或类淀粉样蛋白,所述淀粉样蛋白或类淀粉样蛋白选自朊病毒蛋白、 τ 蛋白质、 α -突触核蛋白、亨廷顿蛋白、糊精和淀粉样蛋白- β 或者一种或多种上述肽的组合。
3. 权利要求1的方法,还包括用佐剂装载预形成的脂质体,其中(a)在用经稀释的溶解的修饰的肽装载脂质体之前;(b)与其一起;或(c)在其之后进行佐剂装载。
4. 权利要求3中的方法,其中佐剂是脂A。
5. 权利要求3中的方法,其中所述佐剂是去毒脂A。
6. 权利要求3的方法,其中所述佐剂是单磷酸或二磷酸脂A、明矾、Pam 2CSK4、Pam3CSK4、Pam3CAG、皂苷、CpG、脂化CpG、阳离子型脂类、硫代磷酸化的PS-CpG-ODN,或CpG寡脱氧核苷酸(CpG-ODN)。
7. 权利要求6的方法,其中所述佐剂是CpG-A、CpG-B或CpG-C。
8. 权利要求1至3中任一项的方法,其中至少80%的经重构的抗原性肽存在于脂质体的外表面上。
9. 权利要求1至3中任一项的方法,其中至少90%的经重构的抗原性肽存在于脂质体的外表面上。
10. 权利要求1至3中任一项的方法,其中100%的经重构的抗原性肽存在于脂质体的外表面上。
11. 权利要求1至3中任一项的方法,其中肽是通过添加脂肪酸、甘油三酯、甘油二酯、类固醇、鞘脂、糖脂或磷脂来修饰的。
12. 权利要求11的方法,其中脂肪酸是棕榈酸。
13. 权利要求1至3中任一项的方法,其中肽是通过共价附着的棕榈酰基化的氨基酸残基来修饰的。
14. 权利要求13的方法,其中介于2个与4个之间的残基分别共价附着于肽的N及C端。
15. 权利要求14的方法,其中肽是通过4个棕榈酰基化的氨基酸残基来修饰的,其中两个残基分别共价附着于肽的N及C端。
16. 根据权利要求1-15的任一项的方法产生的基于脂质体的构建体,所述构建体包含在脂质体中重构的通过疏水性部分修饰的抗原性肽和佐剂,其中至少72%的经重构的肽存在于脂质体的外表面上,并且其中所述肽通过其疏水性部分插入脂双层中而不借助任何化学反应或额外的分子修饰,并且其中所述抗原性肽能够在施用给哺乳动物时,在所述动物中产生免疫应答。
17. 权利要求16的构建体,其中所述抗原性肽来自淀粉样蛋白或类淀粉样蛋白,所述淀

粉样蛋白或类淀粉样蛋白选自阮病毒蛋白、 τ 蛋白质、 α -突触核蛋白、亨廷顿蛋白、糊精和淀粉样蛋白- β 或者一种或多种上述肽的组合。

18. 权利要求16或权利要求17的构建体,其中肽不通过共价缀合与脂质体膜结合。

19. 权利要求16至17中任一项的构建体,其中至少80%的经重构的抗原性肽存在于脂质体的外表面上。

20. 权利要求16至17中任一项的构建体,其中至少90%的经重构的抗原性肽存在于脂质体的外表面上。

21. 权利要求16至17中任一项的构建体,其中100%的经重构的抗原性肽存在于脂质体的外表面上。

22. 权利要求16至17中任一项的构建体,其中佐剂是脂A。

23. 权利要求16至17中任一项的构建体,其中佐剂是去毒脂A。

24. 权利要求16至17中任一项的构建体,其中所述佐剂是单磷酸或二磷酸脂A、明矾、Pam2CSK4、Pam3CSK4、Pam3CAG、皂苷、CpG、脂化CpG、阳离子型脂类、硫代磷酸化的PS-CpG-ODN,或CpG寡脱氧核苷酸(CpG-ODN)。

25. 权利要求24的构建体,其中所述佐剂是CpG-A、CpG-B或CpG-C。

26. 权利要求16至17中任一项的构建体,其中肽是通过添加脂肪酸、甘油三酯、甘油二酯、类固醇、鞘脂、糖脂或磷脂来修饰的。

27. 权利要求26的构建体,其中脂肪酸是棕榈酸。

28. 权利要求16至17中任一项的构建体,其中肽是通过共价附着的棕榈酰基化的氨基酸残基来修饰的。

29. 权利要求28的构建体,其中2至4个之间的残基分别共价附着至肽的N及C端。

30. 权利要求29的构建体,其中肽是通过4个棕榈酰基化的氨基酸残基来修饰的,其中两个残基分别共价附着至肽的N及C端。

31. 权利要求16或17的构建体,其中所述哺乳动物是人。

32. 组合物,其包含根据权利要求16至31中任一项的构建体。

33. 权利要求32的组合物,所述组合物是包含治疗有效量的基于脂质体的构建体以及可药用的载剂的药物组合物。

34. 根据权利要求16至31中任一项的构建体或根据权利要求32或33的组合物在制备用于诱导哺乳动物中的免疫应答的药物中的用途,其中所述构建体包含修饰的肽,其来自淀粉样蛋白或类淀粉样蛋白,所述淀粉样蛋白或类淀粉样蛋白选自阮病毒蛋白、 τ 蛋白质、 α -突触核蛋白、亨廷顿蛋白、糊精和淀粉样蛋白- β 或者一种或多种上述肽的组合。

35. 根据权利要求16至31中任一项的构建体或根据权利要求32或33的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于在哺乳动物中治疗性或预防性治疗阿尔兹海默氏病,其中所述构建体包含修饰的肽,其来自淀粉样蛋白或类淀粉样蛋白,所述淀粉样蛋白或类淀粉样蛋白选自阮病毒蛋白、 τ 蛋白质、 α -突触核蛋白、亨廷顿蛋白、糊精和淀粉样蛋白- β 或者一种或多种上述肽的组合。

36. 根据权利要求34或35的用途,其中

a) 所述哺乳动物是人;和/或

b) 所述修饰的肽是修饰的AB肽或修饰的 τ 肽。

37. 产生抗体的非治疗性方法,所述方法包括向哺乳动物施用根据权利要求16至31中任一项的抗原性构建体或根据权利要求32或33的组合物和分离由所述哺乳动物产生的抗体。

38. 权利要求37的方法,所述方法还包括从获得自经免疫的哺乳动物的脾细胞制备杂交瘤细胞和分离由所述杂交瘤细胞产生的抗体的步骤。

包含通过疏水部分修饰的肽的基于脂质体的构建体

[0001] 本发明涉及用于制备基于脂质体的构建体的经改良方法,所述构建体包含在脂质体中经重构的通过疏水性部分修饰的目标肽、尤其是目标抗原性肽,且涉及利用所述方法获得的抗原性构建体。本发明还涉及此类构建体用于治疗性及诊断性目的的用途,尤其涉及在治疗疾病及病症中的用途,所述疾病及病症由诸如阿尔兹海默氏病 (Alzheimer's Disease) 的蛋白质构象病 (proteopathy) 引起或与其相关。

[0002] 脂质体已取得长足发展,从生物物理研究的仅仅另一异物变成所选用于多种实际应用的药物载体 (Torchilin, Nature Reviews, 2005, 4, 145-160)。脂质体是主要由(磷)脂类构成的人工囊泡,且可含有在其内部水性体积内的药物或可溶性抗原或掺入双层中的两亲性抗原(例如膜蛋白质)。已将来自许多微生物及肿瘤细胞的抗原掺入此类具有详细特征且进行体内测试的脂质体中。使用含有抗原的脂质体的临床研究已显示,其是安全的且通常不会诱导严重副作用 (Kersten及Crommelin, Biochimica et Biophysica Acta 1995, 1241, 117-138)。

[0003] 人们已于30多年前对使用脂质体作为呈递抗原的运载体的想法进行了测试 (Allison及Gregoriadis, Nature, 1974, 252, 252)。举例而言,已显示,掺入脂质体中的白喉类毒素的免疫原性高于其游离形式。通过脂质体呈递的抗原可诱导体液以及细胞免疫应答。迄今所研发的多数脂质体疫苗是通过在脂质体的水性腔内抗原包封来制备。另外,文献中最近报导了脂质体的应用,所述脂质体载有随机分布于其表面上的疏水性或两亲性抗原(即偶尔面向内部或外部水溶液的抗原) (Muhs等人, PNAS, 2007, 104, 9810-9810; Nicolau等人, PNAS, 2002, 99, 2332-2337; W02007/068411)。Frisch等人已观察到,与经囊封(encapsulated)的肽相反,含有单磷酸脂A (MPLA) 作为佐剂的囊泡的表面上表达小B细胞表位能够诱导强且有特异性的体液(产生抗体) (Frich, Eur J Immunol 1991; 21:185; Alving等人, Immunol Rev 1995; 145:5)。因此,期望非炎性应答时,则脂质体的表面上呈递的抗原可能更适于治疗性疫苗。因此,在脂质体形成后添加抗原,随后将其整合于脂质体中应当提供抗原在外部脂质体脂质层中的单一分布。实际上,已研发出后插入方法且其广泛报导于文献中,所述方法可概述为抗原与脂质体外部脂质表面上的反应物之间的偶合,或使用聚乙二醇化肽 (Allen等人, Cellular & Molecular Biology Letters, 2002, 7, 217-219; Guan等人, Bioconjugate Chem, 1998, 9, 451-458; Moreira等人, Pharmaceutical Research, 2002, 19, 265-269)。然而,本领域所述使用化学缀合(例如稳定的硫醚键或生物可还原二硫连接)的后插入方法的主要限制是缺乏位置特异性,需要脂质体反应基团的插入及额外下游过程。由此产生的基于脂质体的构建体不能进行无菌过滤。此外,肽与外部脂质体层的共价缀合尚不适用于不同种类的抗原,例如疏水性肽。

[0004] 一种常用方法涉及聚乙二醇化肽的应用,其基于通过肽-PEG-磷脂缀合物(有时借助额外表面活性剂)形成的微团。在与预形成的脂质体孵育后,此方法在优化条件下导致肽缀合物自发转移(分子易位)至脂质体的外膜小叶中。然而,此方法易于发生囊泡去稳定(若需要额外表面活性剂)且可诱导副免疫应答(由于PEG可具有免疫原性)。

[0005] 因此仍需要提供基于脂质体的构建体的方法,其中该方法允许克服现有技术的多

数或全部缺点且提供经改良的抗原性构建体,其在以下方面表现理想的性质

- [0006] • 产率,
- [0007] • 囊泡稳定性,
- [0008] • 均质性,
- [0009] • 区域特异性(肽的拓扑结构、外部及内部分布),
- [0010] • 过滤性,
- [0011] • 多数抗原在脂质体的表面上的呈递,等。

[0012] 本发明通过提供如独立权利要求的特征所定义的方法及构建体来处理及解决此尚未满足的需要。优选的实施方案是从属权利要求的主体。

[0013] 根据本发明的方法现在使得可将不同肽(例如抗原)类型及/或佐剂类型以不同浓度后插入预形成的脂质体的外层中。根据本发明的方法包含在溶液中预形成脂质体及通过疏水性部分修饰肽、尤其是抗原性肽,以使得经修饰肽可以微团形式获得。该方法还包括通过诱导微团分解从微团释放肽,随后将其整合至预形成脂质体中。此整合过程是由经修饰的肽、抗原、及/或佐剂与脂质体的(磷)脂双层的疏水性相互作用驱动的。特别地,将经修饰的肽、尤其经修饰抗原肽及/或佐剂溶解于脂质体外层中是通过以下方式达成:不借助任何化学反应或额外分子修饰,将经溶解的肽、尤其经溶解的抗原性肽或佐剂(初始以微团形式存在)稀释至低于表面活性剂的临界微团浓度。然后游离形式的肽、尤其游离形式的抗原性肽及/或佐剂由于磷脂的酰基部分中疏水性结构域的溶解性而整合于脂质体的外层中。因此,根据本发明的方法提供根据各种需要用于装载的一次性“空脂质体”存贮物。

[0014] 有利地,本文所公开及主张的方法及构建体导致以高产率掺入肽及/或佐剂且在脂质体上具有面向脂质体双层的外层的独特分子展示。本发明方法还产生脂质体制剂,其显示多分散性指数在介于0.2和0.6范围之间、尤其为0.22至0.35、尤其为0.25的均匀大小分布。此外,所述方法及构建体允许肽及/或佐剂用于免疫系统的高生物利用度及因此经改良的免疫应答。在本发明方法内,不发生佐剂降解(例如MPLA降解)且因此提供增加的批次再现性。通过本发明方法制备的构建体是稳定的,能够进行无菌过滤(粒径<200nm)且不诱导副免疫应答。

[0015] 特别地,通过本发明方法制备的构建体可储存于0于与10于之间、尤其是2于与6于之间、但尤其是5℃的温度且仍保持稳定达1个月和6个月或更长之间、尤其是2个月与4个月之间,但尤其为3个月的时期。

[0016] 此外,本发明且如本文多个实施方案中所述的方法使得可快速并以工业规模制造构建体,且可在制备过程期间降低肽(<25%)及佐剂(<25%)的损失,从而降低制造期间的成本。

[0017] 特别地,肽及/或佐剂的任何损失小于30%、尤其小于25%,但尤其小于20%或更低。

[0018] 特别地,本发明涉及根据本发明且如本文多个实施方案中所述的制备基于脂质体的构建体的方法,所述构建体包含目标肽、尤其是目标抗原性肽,其中所述肽通过疏水性部分修饰且在脂质体中重构,该方法包括以下步骤:i)在溶液中制备脂质体;ii)通过向肽分子的N-及/或C-末端添加至少一个疏水性部分来制备经修饰的肽、尤其是经修饰的抗原性肽;iii)在表面活性剂存在下溶解经修饰的肽或抗原性肽;iv)将经溶解的肽及任选地,佐

剂稀释至低于表面活性剂的临界微团浓度(CMC)；及v)用经稀释的、溶解的肽及任选地，佐剂装载预形成的脂质体，此装载是通过将所述肽及任选地，所述佐剂添加至预形成的脂质体制剂中且将所添加的肽及任选地，所添加的佐剂溶解至脂质体的外层中来达成，尤其不借助任何化学反应或额外分子修饰，例如，通过使脂质体外部脂质表面上的应答物偶合，或使用聚乙二醇化肽。

[0019] 在一个实施方案中，本发明涉及如本文多个实施方案中所述的方法，其中在将肽及任选地，佐剂添加至含有预形成脂质体的脂质体溶液的过程中，进行经溶解的肽、尤其是经溶解的抗原性肽及任选地，经溶解的佐剂的稀释。

[0020] 在一个实施方案中，本发明涉及如本文多个实施方案中所述的方法，其中稀释含有经溶解的肽、尤其是经溶解的抗原性肽及任选地，经溶解佐剂的溶液以达到小于表面活性剂的临界微团浓度(CMC)的50%、特别是40%、30%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%。

[0021] 在一个实施方案中，本发明涉及制备基于脂质体的构建体、尤其是基于脂质体的抗原性构建体的方法，其中在步骤v)中，用如本文所定义的一或多种不同的、经稀释、经溶解的肽、尤其是经溶解的抗原性肽及/或佐剂装载预形成脂质体。

[0022] 在一个实施方案中，本发明涉及根据本发明且如本文多个实施方案中所述的制备基于脂质体的构建体、尤其基于脂质体的抗原性构建体的方法，其中通过向制剂中添加选自以下组成的组的洗涤剂，在添加至预形成脂质体中之前，将肽溶解，所述洗涤剂选自阴离子型、阳离子型、非离子型及两性离子型表面活性剂，例如辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷(B-OG)或Tween-20。

[0023] 在一个实施方案中，本发明涉及前述实施方案中任一者的方法，其中用佐剂装载预形成的脂质体。

[0024] 在一个实施方案中，可在形成脂质体后将佐剂添加至预形成的脂质体中，即首先将经稀释溶解的抗原性肽添加至预形成的脂质体制剂中，随后添加佐剂、尤其是经溶解的佐剂。备选地，首先可将佐剂、尤其是经溶解的佐剂添加至预形成的脂质体制剂中，随后或一起添加经稀释溶解的抗原性肽。

[0025] 因此，本发明提供前述实施方案中任一者的方法，其中(a)在用经稀释溶解的抗原性肽装载脂质体之前、(b)与其一起或(c)在其之后进行佐剂装载。

[0026] 在本发明一个实施方案中，可在如本文多个实施方案中所述的方法内组合并使用两种或更多种类型的脂质体。作为非限制性实例，可混合两个脂质体群体，即一个群体包含含有抗原性肽的脂质体且另一群体包含仅含有佐剂的脂质体，以用于诱导哺乳动物的免疫应答。

[0027] 在备选实施方案中，可混合包含不同抗原性肽及/或佐剂的不同脂质体群体。举例而言，一个脂质体群体可包含具有或不具有佐剂的脂质体，所述脂质体在其外表面上含有第一抗原性肽(例如τ蛋白片段)，而第二脂质体群体可包含具有或不具有佐剂的脂质体，所述脂质体含有第二和不同抗原性肽(例如β-淀粉样肽片段)。则第三脂质体群体可包含仅含有佐剂的脂质体。

[0028] 在一个实施方案中，方法包括筛选(sizing)步骤、尤其是涉及选自以下组成的组的方法的筛选步骤：均质化、挤出、微流体及超音波法、或所述方法的任何组合。

[0029] 在本发明一个实施方案中,在根据本发明且如本文多个实施方案中所述的方法内制备的脂质体颗粒的筛选包括均质化及挤出,可彼此独立地实施或在所述筛选方法内的一个步骤中继续(resume)。此外,脂质体颗粒的筛选亦可包括微流体及超音波法,其可独立地或与另一颗粒筛选方法组合使用。

[0030] 脂质体的大小小于300nm、尤其小于250nm、尤其小于200nm。

[0031] 特别地,脂质体在20nm与300nm之间的大小范围内,尤其在40nm与250nm之间的大小范围内,尤其在50nm与200nm之间的大小范围内,尤其在100nm与200nm之间的大小范围内。

[0032] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的方法,其中佐剂选自由以下组成的组:脂A、去毒脂A(例如单磷酸或二磷酸脂A)、明矾、Pam2CSK4、Pam3CSK4、Pam3CAG、皂苷、CpG、脂质化CpG、阳离子型脂质、脂质化CpG、硫代磷酸化的PS-CpG-ODN、CpG寡脱氧核苷酸(CpG-ODN)(例如CpG-A、CpG-B或CpG-C)。可与本发明方法一起使用的其他佐剂是(不欲限于)磷酸铝或氢氧化铝($Al(OH)_3$ 、 $AlPO_4$)、钙、铁或锆的盐、QuilA、QS-21、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)、脂磷壁酸(自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)纯化)、DDAB(二甲基双十八烷基溴化铵盐)、MF59、L18-MDP&B30-MDP(疏水性胞壁酰二肽衍生物)、C12-iE-DAP(二胺基庚二酸)。

[0033] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的方法,其中至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的通过其疏水性部分插入脂双层中的经重构的肽、尤其是经重构的抗原性肽存在于脂质体的外表面上。

[0034] 特别地,100%的通过其疏水性部分插入脂双层中的经重构的肽、尤其是经重构的抗原性肽存在于脂质体的表面上。

[0035] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的方法,其中肽、尤其是抗原性肽是通过添加脂肪酸、甘油三酯、甘油二酯、类固醇、鞘脂、糖脂或磷脂来修饰。

[0036] 特别地,肽、尤其是抗原性肽是通过添加脂肪酸、尤其是具有至少6个碳原子的碳骨架的脂肪酸来修饰。

[0037] 在一特定实施方案中,疏水性部分是棕榈酸。

[0038] 在再一实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的方法,其中肽、尤其是抗原性肽是通过使用脂质化的聚乙二醇或经修饰的脂质化的聚乙二醇的聚乙二醇化进一步修饰的。

[0039] 特别地,聚乙二醇或经修饰的聚乙二醇包含8至150000个之间、尤其是10至80000个之间、尤其是10个至10000个之间或8个至5000个之间、尤其是2-1000个之间、尤其是5-500个之间、尤其是10-200个之间的环氧乙烷部分。

[0040] 特别地,PEG链含有不超过 $n=45$ 个的环氧乙烷部分、尤其是介于 $n=5$ 个与 $n=40$ 个之间、更尤其是介于 $n=10$ 个与 $n=30$ 个之间且甚至更尤其 $n=10$ 个的环氧乙烷部分。

[0041] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的方法,其中肽、尤其是抗原性肽是通过共价附着的棕榈酰基化的氨基酸残基、尤其是共价附着至肽的N-或C-端、尤其是附着至肽的N-和C-端的2个与4个之间、更尤其是4个残基来修饰的。

[0042] 在特定实施方案中,肽、尤其是抗原性肽是由4个棕榈酰基化的氨基酸残基来修饰

的,其中两个残基分别共价附着至肽的N-和C-端。

[0043] 在一个实施方案中,本发明涉及基于脂质体的构建体、尤其是基于脂质体的抗原性构建体,所述构建体包含通过疏水性部分修饰的、在由根据前述实施方案中任一者的方法可获得的脂质体中重构的目标肽、尤其是抗原性肽,其中至少70%的经重构的抗原性肽存在于脂质体的外表面上,其中所述肽通过其疏水性部分插入脂双层中,而不借助任何化学反应或额外分子修饰,例如通过耦合脂质体的外部脂质表面上的反应物或使用聚乙二醇化的肽。

[0044] 肽、尤其是抗原性肽,通过其疏水性或亲脂性延伸锚定并稳定于脂质体的脂双层中,该疏水性或亲脂性延伸与脂质体双层的(磷)脂质发生弱相互作用,但不会与脂质体双层的任何成份形成强共价化学键。

[0045] 特别地,本发明涉及前述实施方案的基于脂质体的构建体、尤其基于脂质体的抗原性构建体,其中至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的经重构的肽、尤其是经重构的抗原性肽存于脂质体的表面上。

[0046] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的基于脂质体的构建体、尤其是基于脂质体的抗原性构建体,其中至少80%的经重构的肽、尤其是经重构的抗原性肽存在于脂质体的外表面上。

[0047] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的基于脂质体的构建体、尤其是基于脂质体的抗原性构建体,其中至少85%的经重构的肽、尤其是经重构的抗原性肽存在于脂质体的外表面上。

[0048] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的基于脂质体的构建体、尤其是基于脂质体的抗原性构建体,其中至少90%的经重构的肽、尤其是经重构的抗原性肽存在于脂质体的外表面上。

[0049] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的基于脂质体的构建体、尤其是基于脂质体的抗原性构建体,其中至少100%的经重构的肽、尤其是经重构的抗原性肽存在于脂质体的外表面上。

[0050] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的基于脂质体的抗原性构建体,其中所述抗原性构建体包含在脂质体中重构的佐剂。

[0051] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案的抗原性构建体,其中至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的经重构的佐剂存在于脂质体的外表面上。

[0052] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的抗原性构建体,其中至少80%的经重构的佐剂存在于脂质体的外表面上。

[0053] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的抗原性构建体,其中至少85%的经重构的佐剂存在于脂质体的外表面上。

[0054] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的抗原性构建体,其中至少90%的经重构的佐剂存在于脂质体的外表面上。

[0055] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的抗原性构建体,其中至

少100%的经重构的佐剂存在于脂质体的外表面上。

[0056] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的抗原性构建体,其中佐剂选自由以下组成的组:去毒脂A(例如单磷酸或二磷酸脂A)、明矾、Pam2CSK4、Pam3CSK4、Pam3CAG、或CpG、CpG寡脱氧核苷酸(CpG-ODN)(例如CpG-A、CpG-B或CpG-C)。可与本发明方法一起使用的其他佐剂是(不欲限于)磷酸铝或氢氧化铝($Al(OH)_3$ 、 $AlPO_4$)、钙、铁或锆的盐、QuilA、QS-21、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)、脂磷壁酸(自金黄色葡萄球菌纯化)、DDAB(二甲基双十八烷基溴化铵盐)、MF59、L18-MDP&B30-MDP(疏水性胞壁酰二肽衍生物)、C12-iE-DAP(二胺基庚二酸)。

[0057] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的基于脂质体的构建体、尤其是基于脂质体的抗原性构建体,其中肽、尤其是抗原性肽是通过添加以下来修饰的:脂肪酸、甘油三酯、甘油二酯、类固醇、鞘脂、糖脂或磷脂、尤其是具有至少6个碳原子的碳骨架的脂肪酸,但尤其为棕榈酸。

[0058] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的基于脂质体的构建体、尤其是基于脂质体的抗原性构建体,其中肽、尤其是抗原性肽,是使用脂质化的聚乙二醇或经修饰的脂质化的聚乙二醇通过聚乙二醇化来修饰。

[0059] 其体而言,聚乙二醇或经修饰的聚乙二醇包含8个与150000个之间、尤其是10个与80000个之间、更尤其是10个至10000个之间、或8个至5000个之间、尤其是2个至1000个之间、尤其5个至500个之间、尤其是10个至200个之间的环氧乙烷。特别地,PEG链的长度不超过 $n=45$ 个、尤其在 $n=5$ 与 $n=40$ 之间、更尤其是在 $n=10$ 与 $n=30$ 个之间且甚至更尤其是 $n=10$ 的环氧乙烷部分。

[0060] 在一个实施方案中,本发明涉及前述实施方案中任一者的基于脂质体的构建体、尤其是基于脂质体的抗原性构建体,其中肽、尤其是抗原性肽,是通过共价附着的棕榈酰基化的氨基酸残基、尤其是共价附着于肽的N-或C-端、尤其是肽的N-及C-端的2个与4个之间、更尤其是4个残基来修饰的。

[0061] 在一特定实施方案中,前述实施方案中任一者的肽、尤其是抗原性肽是通过4个棕榈酰基化氨基酸残基来修饰的,其中两个残基分别共价连接至肽的N-及C-末端。

[0062] 在本发明又一实施方案中,提供包含根据前述实施方案中任一者的构建体、尤其是抗原性构建体的组合物。

[0063] 在一个实施方案中,前述实施方案的组合物是药物组合物,其包含治疗有效量的本发明的构建体、尤其是抗原性构建体以及可药用的载剂。

[0064] 脂质体可用作药物递送系统,旨在达成“活性”药物对疾病部位(例如肿瘤或炎症组织)的选择性靶向。选择性靶向需要位于脂质体表面上的靶向装置(抗体、受体配体等),如此脂质体可识别靶细胞,与其选择性地结合,且被所述细胞内在化或通过酶促水解或诸如超音波辐照等过程分解,以在细胞表面附近释放药物,因此该药物可被靶细胞摄入。

[0065] 在本发明一个实施方案中,药物组合物包含根据前述实施方案中任一者的构建体,其中肽具有靶向功能且可代表为抗体或其功能性部分、受体配体或任一其他能够识别并结合抗原、受体、特异性组织或特异性细胞类型的肽。

[0066] 在本发明一个方面中,所提供的囊封于根据本发明且如本文所述的基于脂质体的构建体中的活性药物可为细胞毒性药物,例如,阿霉素(doxorubicin)、紫杉醇

(paclitaxel)、长春新碱(vincristine)或勒托替康(lurtotecan);抗真菌药物,例如两性霉素B(amphotericin B);基于核酸的药物,例如供全身施用的反义寡核苷酸或质粒DNA(pDNA)、RNA;或适于预防炎症或再狭窄的药物,例如雷帕霉素(rapamycin)、紫杉醇、放线菌素D(actinomycin D)、反义C-Myc、地塞米松(dexamethasone)或基质金属蛋白酶抑制剂。

[0067] 在本发明另一方面中,所提供的囊封于根据本发明且如本文所述的基于脂质体的构建体中的活性药物可为人工氧载剂,例如经囊封的血红蛋白。

[0068] 在本发明另一实施方案中,提供诱导哺乳动物的免疫应答的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用前述实施方案中任一者的构建体或组合物。

[0069] 在再一实施方案中,本发明涉及产生抗体的方法,所述方法包括向哺乳动物施用前述实施方案中任一者的抗原性构建体或组合物及分离由所述哺乳动物产生的抗体。在特定实施方案中,此方法进一步包括从获得自经免疫的哺乳动物的脾细胞制备杂交瘤细胞及分离该杂交瘤细胞产生的抗体的步骤。

[0070] 在一个实施方案中,本发明涉及由前述实施方案中任一者的方法产生的抗体、尤其是多克隆或单克隆抗体。

[0071] 在备选的实施方案中,本发明涉及根据前述实施方案中任一者的构建体、尤其是抗原性构建体、组合物或抗体用于治疗性或预防性治疗哺乳动物、尤其是人类,尤其是用于对哺乳动物、尤其人类实施治疗性或预防性疫苗接种的用途。

[0072] 在本发明特定实施方案中,根据前述实施方案中任一者的构建体、尤其是抗原性构建体、组合物或抗体可用于哺乳动物、尤其是人类、尤其是罹患与传染性疾病、CNS相关疾病或肿瘤学或过敏领域的疾病及病症或炎症有关的疾病、病症或病况,尤其是罹患蛋白质构象病、涉及蛋白质错误折叠的疾病及/或涉及蛋白质累积或聚集的疾病有关的疾病、病症或病况的哺乳动物或人类的治疗性或预防性治疗、尤其用于所述哺乳动物或人类的治疗性或预防性疫苗接种。

[0073] 在再一实施方案中,本发明涉及本发明抗体在用于检测或诊断疾病、病症或病况,尤其与传染性疾病、CNS相关疾病或肿瘤学或过敏领域疾病及病症或炎症有关的疾病、病症或病况,尤其与蛋白质构象病、涉及蛋白质错误折叠的疾病及/或涉及蛋白质累积或聚集的疾病有关的疾病或病症的方法中的用途。

[0074] 在一个实施方案中,本发明涉及诊断试剂盒,其用于检测或诊断疾病或病症,尤其与传染性疾病、CNS相关疾病或肿瘤学或过敏领域疾病及病症或炎症有关的疾病、病症或病况,尤其与蛋白质构象病、涉及蛋白质错误折叠的疾病及/或涉及蛋白质累积或聚集的疾病有关的疾病或病症的方法:。

[0075] 在一个实施方案中,本发明提供药物组合物,其包含治疗有效量的本发明的基于脂质体的构建体、尤其是基于脂质体的抗原性构建体以及可药用的载剂。

[0076] 适宜的医药载剂、稀释剂及/或赋形剂为本领域所熟知且包括(例如)磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(例如油/水乳液)、多种类型的润湿剂、无菌溶液等。

[0077] 使用已知技术,能够以生理上可接受的制剂制备本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括用其产生的抗体、尤其是单克隆抗体及其活性片段)且可包含可药用的载剂、稀释剂及/或赋形剂。举例而言,将本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括用其产生的抗体、特别地本发明的单克隆抗体,包括任何功能等价抗体或其功能性部分)与可药用的载

剂、稀释剂及/或赋形剂组合以形成治疗性组合物。适宜的药物载剂、稀释剂及/或赋形剂为本领域所熟知且包括,例如,磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(例如油/水乳液)、多种类型的润湿剂、无菌溶液等。

[0078] 可根据本领域技术人员已知的标准方法完成根据本发明的药物组合物的制剂。

[0079] 可以以适宜的药物上有效的剂量的固体、液体或气溶胶形式向对象施用本发明的组合物。固体组合物的实例包括丸剂、乳霜及可植入剂量单元。丸剂可经口施用。治疗性乳霜可经局部施用。可植入剂量单元可于,例如,肿瘤部位局部施用,或可,例如,经皮下植入用于治疗性组合物的全身性

[0080] 释放。液体组合物的实例包括适合于经肌肉、经皮下、经静脉内、和经动脉内注射的制剂及用于局部及眼内施用的制剂。气溶胶制剂的实例包括用于对肺施用的吸入器制剂。

[0081] 组合物可通过标准施用途径施用。一般而言,组合物可通过局部、口、直肠、鼻、皮肤内、腹膜内或非经肠(例如,静脉内、皮下或肌肉内)途径施用。

[0082] 另外,可将组合物掺入持续释放的基质(例如生物可降解聚合物)中,在期望递送处(例如肿瘤部位)的附近植入该聚合物。该方法包括施用单次剂量、以预定时间间隔施用重复剂量,并在预定时段内持续施用。

[0083] 本文所用持续释放的基质是由可通过酶促或酸/碱水解或通过溶解降解的材料(一般为聚合物)制得的基质。在将基质插入体内后,酶与体液对基质起作用。理想地通过诸如以下生物相容性材料来选择持续释放的基质:脂质体、聚乳酸(poly lactide, polylactide acid)、聚乙醇酸交酯(乙醇酸聚合物)、聚乳酸共乙交酯(乳酸与乙醇酸的共聚物)、聚酸酐、聚(原酸)酯、多肽、透明质酸、胶原、硫酸软骨素、羧酸、脂肪酸、磷脂、多糖、核酸、聚氨基酸、氨基酸(例如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸)、多核苷酸、聚乙烯丙烯、聚乙烯基吡咯烷酮及聚硅氧烷。优选的生物可降解基质是聚乳酸、聚乙醇酸交酯或聚乳酸共乙交酯(乳酸与乙醇酸的共聚物)中一者的基质。

[0084] 本领域技术人员已熟知,组合物的剂量应取决多种因素而定,例如所治疗的病况、所用具体组合物及其他临床因素,例如患者的重量、尺寸、性别及一般健康状况、身体表面积、待施用的特别的化合物或组合物、同时施用的其他药物,及施药途径。

[0085] 根据本发明的组合物可与其他组合物组合施用,所述其他组合物包含生物活性物质或化合物,例如已知用于蛋白质构象病、涉及蛋白质错误折叠的疾病及涉及蛋白质累积或聚集的疾病、 τ 蛋白病变及/或淀粉样变性(一类与淀粉样或淀粉样蛋白质(诸如阿尔兹海默病中涉及的淀粉样 β 蛋白)相关的疾病及病症)用药的化合物。

[0086] 其他生物活性物质或化合物可通过与根据本发明的治疗性组合物相同或类似的机制或通过不相关的作用机制或通过多种相关的/或不相关的作用机制来产生其生物学作用。

[0087] 本发明的药物组合物可伴随一或多种其他生物活性物质间歇或顺序施用。例如,根据本发明的药物组合物可与第一种额外生物活性物质同时施用或在施用药物组合物之后或之前依序施用。若选择其中将一种以上的额外生物活性物质与至少一种根据本发明的药物组合物一起使用的应用方案,则化合物或物质可以以多种组合部分地同时、部分地依序施用。

[0088] 通常,另一生物活性化合物可包括神经元传递增强剂、精神治疗性药物、乙酰胆碱酯酶抑制剂、钙通道阻断剂、生物胺、苯二氮平安定剂、乙酰胆碱合成、储存或释放增强剂、乙酰胆碱突触后受体激动剂、单胺氧化酶-A或-B抑制剂、N-甲基-D-天冬氨酸谷氨酸盐受体拮抗剂、非类固醇抗炎药物、抗氧化剂及血清素能受体拮抗剂。

[0089] 具体而言,生物活性剂或化合物可包含至少一种选择由以下组成的群的化合物:抵抗氧化应激的化合物;抗细胞凋亡化合物;金属螯合剂;DNA修复抑制剂,例如哌仑西平(pirenzepin)及代谢物;3-氨基-1-丙磺酸(3APS);1,3-丙二磺酸盐(1,3PDS);分泌酶活化剂;[β]-及7-分泌酶抑制剂;-蛋白质;神经递质、 β -折叠破坏剂;消炎分子;“非典型抗精神病剂”,例如氯氮平(clozapine)、齐拉西酮(ziprasidone)、利培酮(risperidone)、阿立哌唑(aripiprazole)或奥氮平(olanzapine);或胆碱酯酶抑制剂(ChEI),例如他克林(tacrine)、里斯的明(rivastigmine)、多奈哌齐(donepezil)及/或加兰他敏(galantamine);及其他药物及营养添加剂,例如维生素B12、半胱氨酸、乙酰胆碱前体、卵磷脂、胆碱、银杏提取物(Ginkgo biloba)、乙酰基-L-肉碱、艾地苯醌(idebenone)、丙戊茶碱(propentofylline)或黄嘌呤衍生物;以及本发明的基于脂质体的抗原性构建体,包括用其产生的抗体、尤其是单克隆抗体及其活性片段及任选地可药用的载剂及/或稀释剂及/或赋形剂及疾病治疗说明书。

[0090] 在再一实施方案中,本发明组合物可包含烟碱酸(niacin)或美金刚(memantine)以及本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括用其产生的抗体、尤其是单克隆抗体及其活性片段)及任选地可药用的载剂及/或稀释剂及/或赋形剂。

[0091] 在本发明又一实施方案中,提供组合物,其包含“非典型抗精神病剂”,例如氯氮平、齐拉西酮、利培酮、阿立哌唑或奥氮平,所述药剂用于治疗阳性及阴性精神病症状,包括幻觉、妄想、思维障碍(表现为显著的不连贯、思维脱轨(derailment)、言语岔开)及古怪或错乱性行为,以及快感缺乏、冷漠感情、情成淡漠及社交退缩;以及本发明的基于脂质体的抗原性构建体包括用其产生的抗体、特别是单克隆抗体及其活性片段及任选地,可药用的载剂及/或稀释剂及/或赋形剂。

[0092] 除根据本发明的结合肽外,可适用于组合物中的其他化合物为揭示于,例如,WO 2004/058258 (尤其参见第16及17页)中的化合物,包括治疗药物靶(第36-39页)、链烷磺酸及烷醇磺酸(第39-51页)、胆碱酯酶抑制剂(第51-56页)、NMDA受体拮抗剂(第56-58页)、雌激素(第58-59页)、非类固醇消炎药物(第60-61页)、抗氧化剂(第61-62页)、过氧化物酶体增殖剂活化受体(PPAR)激动剂(第63-67页)、胆固醇降低剂(第68-75页);淀粉样抑制剂(第75-77页)、淀粉样形成抑制剂(第77-78页)、金属螯合剂(第78-79页)、抗精神病剂及抗抑郁剂(第80-82页)、营养添加剂(第83-89页)及提高脑中生物活性物质的可用性的化合物(参见第89-93页)及前药(第93及94页),该文件以引用方式并入本文中,但尤其为上文所述页面所提及的化合物。

[0093] 组合物的剂量应取决于所治疗病况、所用具体组合物及其他临床因素而定,其他临床因素(例如患者的重量、大尺寸及状况、身体表面积)、待施用的具体化合物或组合物、同时施用的其他药物及施用途径。

[0094] 蛋白质性医药活性物质可以以1ng/剂量与10mg/剂量之间的量存在。通常,施药方案应在0.1 μ g与10mg的本发明抗体之间的范围内、尤其在1.0 μ g至1.0mg的范围内且更尤其

在1.0 μ g与100 μ g之间的范围内,其中所有落入所述范围内的个别数字亦为本发明的一部分。若通过连续输注进行施药,则更恰当剂量可在0.01 μ g与10mg单位/公斤体重/小时之间的范围内,其中所有落入所述范围内的个别数字亦为本发明的一部分。

[0095] 在本发明特定实施方案中,以下述方式施用治疗有效量的根据前述实施方案中任一者的抗原性构建体或包含所述抗原性构建体的组合物:以重复的剂量、尤其是1次至15次剂量、更尤其是2次至10次剂量、更尤其是3次至5次剂量且甚至更尤其是3次剂量,以1周与20周之间的时间间隔、尤其是1周与10周之间的时间间隔、尤其是1周与6周之间的时间间隔、更尤其是1周与4周之间的时间间隔且甚至更尤其是2周与3周之间的时间间隔。可通过在加强后的适宜时间、尤其是在加强后的第3天至第10天、更尤其是在加强后第4天至第8天且更尤其在加强后第7天获得血清/血浆样品,并使用已知方法、尤其是常用免疫测定之一(例如ELISA测定)确定抗原性构建体的免疫原性,来监测免疫反应。

[0096] 通常应进行非经肠(例如经静脉内)施药。用于非经肠的制剂包括无菌水溶液或非水溶液。组合物的剂量将取决于所治疗的病况、所用具体组合物及其他临床因素,例如患者的重量、尺寸及状况、身体表面积、待施用的其体化合物或组合物、同时施用的其他药物及施药途径。

[0097] 非水性溶剂包括(但不限于)丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油),及可注射的有机酯(例如油酸乙酯)。水性溶剂可选自由以下组成的组:水、醇/水溶液、包括盐水及缓冲介质的乳液或悬浮液。非经肠媒剂(vehicle)包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖及氯化钠、乳酸林格氏液或固定油。静脉内媒剂包括流体及养分补充剂、电解质补充剂(例如,基于林格氏葡萄糖的那些)及其他。亦可存在防腐剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0098] 药物组合物可进一步包含蛋白质性载剂,例如血清白蛋白或免疫球蛋白,尤其是人类来源的。在本发明的药物组合物中可存在其他生物活性剂,此取决于期望用途。

[0099] 当结合靶位于脑内时,本发明某些实施方案提供本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括用其产生的抗体、尤其是单克隆抗体及其活性片段),以穿过血脑屏障。某些神经退化性疾病与血脑屏障的渗透性增加相关,使得可容易地将本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括用其产生的抗体、尤其是单克隆抗体或其活性片段)引入至脑中。当血脑屏障仍保持完整时,存在若干本领域已知的方法跨过其运送分子,包括但不限于物理方法、基于脂质的方法,及基于受体及通道的方法。

[0100] 跨过血脑屏障运送本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括用其产生的抗体、尤其是单克隆抗体或其活性片段)的物理方法包括但不限于完全绕开血脑屏障或通过血脑屏障中产生开口。绕开方法包括但不限于直接注射至脑(例如,参见Papanastassiou等人, *Gene Therapy* 9:398-406 (2002))及在脑中植入递送装置(例如,参见Gill等人, *Nature Med.* 9:589-595 (2003);及Gliadel Wafers(TM), Guildford Pharmaceutical)。在屏障中制造开口的方法包括,但不限于,超音波(例如,参见美国专利公开案第2002/0038086号)、渗透压(例如,通过施用高渗甘露醇 (Neuwelt, E.A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, 第1及2卷, Plenum Press, N.Y. (1989)))、通过例如,缓激肽或透化剂A-7的透化(例如,参见美国专利第5,112,596号、第5,268,164号、第5,506,206号及第5,686,416号)及用含有编码结合肽或抗原结合片段的基因的载体转染跨越血脑屏

障的神经元(例如,参见美国专利公开案第2003/0083299号)。

[0101] 跨过血脑屏障运送本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括用其产生的抗体、尤其单克隆抗体或其活性片段)的基于脂质的方法包括但不限于将所述分子囊封于脂质体中,所述脂质体偶合至结合血脑屏障的血管内皮上的受体的活性片段(例如,参见美国专利申请公开案第20020025313号),及以低密度脂蛋白颗粒(例如,参见美国专利申请公开案第20040204354号)或载脂蛋白E(例如,参见美国专利申请公开案第20040131692号)涂覆本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括用其产生的抗体、尤其是单克隆抗体或其活性片段)。

[0102] 跨过血脑屏障运送本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括用其产生的抗体、尤其是单克隆抗体或其活性片段)的基于受体及通道的方法包括但不限于使用糖皮质激素阻断剂来增加血脑屏障的渗透性(例如,参见美国专利申请公开案第2002/0065259号、第2003/0162695号及第2005/0124533号);激活的钾通道(例如,参见美国专利申请公开案第2005/0089473号),抑制ABC药物运送体(例如,参见美国专利申请公开案第2003/0073713号);用转铁蛋白涂覆抗体并调节一或多种转铁蛋白受体的活性(例如,参见美国专利申请公开案第2003/0129186号)及将抗体阳离子化(例如,参见美国专利第5,004,697号)。

[0103] 在其他实施方案中,本发明提供用于检测及诊断疾病、病症或病况,尤其是与传染性疾病、CNS相关疾病或肿瘤学或过敏领域疾病及病症有关的疾病、病症或病况,尤其是与蛋白质构象病、涉及蛋白质错误折叠的疾病及/或涉及蛋白质积累或聚集的疾病有关的疾病、病症或病况的方法及试剂盒。

[0104] 此外,本发明提供方法及试剂盒,其用于诊断对疾病、病症或病况的素因(predisposition),尤其是对与传染性疾病、CNS相关疾病或肿瘤学或过敏领域疾病及病症有关的疾病、病症或病况的素因,尤其是对与蛋白质构象病、涉及蛋白质错误折叠的疾病及/或涉及蛋白质积累或聚集的疾病有关的疾病、病症或病况的素因,或用于监测患者的最小残留疾病,或用于预测患者对使用本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括抗体、尤其是单克隆抗体及其活性片段)或根据本发明且如本文多个实施方案中所述的组合物的治疗的反应。这些方法包括常用于检测或对生物样品中或原位条件中的物质定量的已知免疫学方法。

[0105] 对个体、尤其是哺乳动物、更尤其是人类的疾病、病症或病况,尤其与传染性疾病、CNS相关疾病或肿瘤学或过敏领域疾病及病症有关的疾病、病症或病况,尤其与蛋白质构象病、涉及蛋白质错误折叠的疾病及/或涉及蛋白质积累或聚集的疾病有关的疾病、病症或病况的诊断,或对上述疾病、病症或病况的素因的诊断可通过检测根据本发明的抗体、尤其是单克隆抗体或其活性片段与在样品中或原位的致病性蛋白质区中的表位的免疫特异性结合来实现,所述诊断包括使样品或怀疑含有引起该疾病的蛋白质或蛋白质聚集物的特定身体部分或身体区域与结合引起疾病的所述蛋白质区中的表位的抗体相接触,允许抗体结合蛋白质以形成免疫复合物,检测免疫复合物的形成并将该免疫复合物的存在或不存在与该样品或特定身体部分或区域中的致病性蛋白质或蛋白质聚集体的存在或不存在相关联,任选地比较该免疫复合物的量与正常对照值,其中免疫复合物的量与正常对照值相比有所增加指示对象罹患与蛋白质构象病、涉及蛋白质错误折叠的疾病及/或涉及蛋白质积累或聚集的疾病有关的疾病或病况或处于发生该疾病的风险。

[0106] 在用根据本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括抗体、尤其是单克隆抗体及其活性片段)或根据本发明且如本文多个实施方案中所述的组合物治疗后,监测个体、尤其是哺乳动物、更尤其是人类的最小残留疾病可通过检测本发明的抗体、尤其是单克隆抗体或其活性片段与在样品中或原位的引起该疾病的蛋白质区中的表位的免疫特异性结合来实现,所述监测包括使样品或怀疑含有致病性蛋白质或蛋白质聚集体的特定身体部分或身体区域与结合引起该疾病的所述蛋白质区中的表位的抗体相接触,允许抗体结合蛋白质以形成免疫复合物,检测免疫复合物的形成并将该免疫复合物的存在或不存在与该样品或特定身体部分或区域中的致病性蛋白质或蛋白质聚集体的存在或不存在相关联,任选地比较所述免疫复合物的量与正常对照值,其中所述免疫复合物的量与正常对照值相比增加指示对象可能仍罹患最小残留疾病。

[0107] 预测对象、尤其是哺乳动物、更尤其是人类对于使用根据本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括抗体、尤其单克隆抗体及其活性片段)或根据本发明且如本文多个实施方案中所述的组合物治疗的反应可通过检测结合肽、尤其是单克隆抗体或其活性片段与在样品中或原位的引起该疾病的蛋白质区中的表位的免疫特异性结合来实现,所述预测包括使该试样或怀疑含有该致病蛋白质或蛋白质聚集体的特定身体部分或身体区域与结合引起该疾病的该蛋白质区中的表位的抗体接触,允许抗体结合该蛋白质以形成免疫复合物,检测免疫复合物的形成并将免疫复合物的存在或不存在与该样品或特定身体部分或区域中的致病性蛋白质或蛋白质聚集体的存在或不存在相关联,任选地比较在治疗开始之前及之后所述免疫复合物的量,其中所述免疫复合物的量减少指示所述患者有极高潜能对该治疗有反应。

[0108] 特别地,待在本文上文中所报告的诊断方法中检测的疾病或病况及/或通过使用本文上文中所报告的抗原性构建体及/或抗体来治疗性或预防性地治疗的疾病或病况尤其为选自AA淀粉样变性、AH(重链)淀粉样变性、AL(轻链)淀粉样变性、亚历山大病(Alexander disease)、阿兹海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、大动脉内侧淀粉样变性、apoA1淀粉样变性、apoA2淀粉样变性、apoA4淀粉样变性、大动脉内侧淀粉样变性、CADASIL、心房淀粉样变性、白内障、脑淀粉样血管病、角膜乳铁蛋白淀粉样变性、危重病肌病、皮肤苔藓型淀粉样变性、囊性纤维化、透析性淀粉样变性、家族性淀粉样神经病、家族性英国型痴呆、家族性丹麦型痴呆、家族性内脏淀粉样变性、纤维蛋白原淀粉样变性、芬兰遗传性淀粉样变性、额颞叶痴呆、青光眼、具有淀粉样变性的遗传性脑出血-荷兰型、具有淀粉样变性的遗传性脑出血-冰岛型、亨廷顿氏病及其他三联体病症、遗传性格子状角膜营养不良、包涵体肌炎/肌病、溶菌酶淀粉样变性、马洛里小体、髓质性甲状腺癌、牙源性(平堡)淀粉样瘤(Odontogenic (Pindborg) tumor amyloid)、帕金森氏病、垂体催乳素瘤、原发性全身性淀粉样变性、原发性皮肤淀粉样变性、朊病毒病、肺泡蛋白沉积症、青光眼中的视网膜神经节细胞退化、朊病毒病、精囊淀粉样病、seipinopathy、老年全身性淀粉样变性、serpinopathy、镰形细胞病、共核蛋白病(synucleinopathy)、 τ 蛋白病及2型糖尿病或炎症。

[0109] 可用于诊断此类疾病或病况、用于诊断对此类疾病或病况的素因或用于监测患者的最小残留疾病或用于预测患者对使用根据本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括抗体、尤其是单克隆抗体及其活性片段)或根据本发明且如本文多个实施方案中所述的组合物的治疗的反应性的生物样品是,例如,自生物体获得的流体(诸如血清、血浆、唾液、胃分

泌物、黏液、脑脊液、淋巴液等)或组织或细胞样品,诸如神经、脑、心脏或血管组织。为了测定样品中存在或不存在致病蛋白质或蛋白质聚集体时,可使用本领域技术人员已知的任何免疫测定,例如利用使用二级试剂检测的间接检测方法的测定、ELISA及免疫沉淀及凝集测定。所述测定的详细说明示于例如Harlow及Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, New York) 1988555-612; Maertens及Stuyver、Zrein等人的WO 96/13590 (1998) 及WO 96/29605。

[0110] 对于原位诊断,可通过本领域已知的方法(例如静脉内、鼻内、腹膜内、脑内、动脉内注射)将根据本发明的结合肽(包括根据本发明的抗体、尤其是单克隆抗体及其活性片段或其任何活性及功能部分)施用于待诊断的生物体,如此使得在根据本发明的抗体与致病蛋白质或蛋白质聚集体上的表位区之间可发生特异性结合。通过附着于根据本发明的结合肽(包括抗体、尤其是单克隆抗体或其功能片段)的标签或任何其他本领域已知的检测方法可以方便地检测结合肽/抗原复合物。

[0111] 用于诊断应用,或用于诊断对蛋白质相关疾病或病况(包括蛋白质构象病、涉及蛋白质错误折叠的疾病及/或涉及蛋白质积累或聚集的疾病)的素因,或用于监测患者的最小残留疾病,或用于预测患者对使用本发明的基于脂质体的抗原性构建体(包括抗体、尤其是单克隆抗体及其活性片段)或根据本发明且如本文多个实施方案中所述的组合物的治疗的应用中的免疫测定通常依赖于经标记的抗原、结合肽或用于检测的二级试剂。可用通常为本领域技术人员已知的化合物(包括酶、放射性同位素以及荧光剂、发光剂及生色物质,包括但不限于有色颗粒,例如胶体金及乳胶珠粒)标记这些蛋白质或试剂。当然,放射性标记可用于几乎所有类型的测定并且具有多种变化。当必须避免放射性时或当需要快速获得结果时,酶缀合的标签特别有用。尽管荧光染料的应用需要昂贵的设备,但可提供极灵敏的检测方法。用于这些测定中的结合肽是本文所主张公开的,包括抗体、尤其是单克隆抗体、多克隆抗体及经亲和力纯化的多克隆抗体。

[0112] 备选地,本发明的抗体、尤其是单克隆抗体及其活性片段可通过与经标记的物质反应来间接地标记,所述经标记的物质对免疫球蛋白具有亲和力,例如蛋白质A或G或第二抗体。根据本发明的抗体、尤其是单克隆抗体及其活性片段可与第二种物质缀合且用对缀合至该抗体的第二种物质具有亲和力的经标记的第三种物质检测。举例而言,本发明的抗体、尤其是单克隆抗体及其活性片段可缀合至生物素并且使用经标记的抗生物素蛋白(avidin)或链霉亲和素来检测结合肽/生物素缀合物。类似地,结合肽可缀合至半抗原并且使用经标记的抗半抗原结合肽来检测结合肽/半抗原缀合物。

[0113] 本领域技术人员将知晓这些及其他可用于本发明中的适宜标记。可使用本领域技术人员熟知的标准技术实现这些标记与抗体或其片段的结合。典型的技术由Kennedy, J.H., 等人, 1976 (*Clin. Chim. Acta* 70:1-31) 及Schurs, A.H.W.M., 等人, 1977 (*Clin. Chim. Acta* 57:1-40) 阐述。下文所提及的偶合技术是戊二醛法、高碘酸盐法、二马来酰亚胺法及其他,所有方法皆以引用方式并入本文中。

[0114] 现行免疫测定利用双抗体法来检测分析物的存在,其中通过与第二抗体的反应性来间接地标记抗体,所述第二抗体已经用可检测的标签进行了标记。第二抗体优选为结合获得单克隆抗体的动物的抗体的抗体。换言之,若单克隆抗体是小鼠抗体,则经标记的第二抗体是抗小鼠抗体。对于待在本文所述测定中使用的抗体而言,此标签优选为抗体涂覆的

珠、尤其是磁珠。对于待在本文所述免疫测定中应用的抗体而言，标签优选为可检测的分子，例如放射性、荧光或电化学发光物质。

[0115] 备选的双抗体系统因其适于快速确定分析物的存在而经常被称作快速格式化系统 (fast format system)，其亦可在本发明范围内应用。该系统需要在抗体与分析物之间具有高亲和力。根据本发明的一个实施方案，使用每一抗体皆对致病性蛋白质或蛋白质聚集体具有特异性的成对抗体来确定所述蛋白质的存在。所述成对抗体中之一在本文中称作“检测抗体”且该成对抗体中的另一个在本文中称作“捕获抗体”。本发明的单克隆抗体可用作捕获抗体或检测抗体。本发明单克隆抗体亦可在单个测定中一起用作捕获与检测抗体。

[0116] 因此本发明的一个实施方案使用双抗体夹层法来检测生物流体样品中的致病性蛋白质或蛋白质聚集体。在此方法中，将分析物（淀粉样蛋白质）夹在检测抗体与捕获抗体之间，捕获抗体不可逆地固定至固体支持物上。检测抗体将含有可检测的标签以鉴别抗体-分析物夹层的存在并因此分析物的存在。

[0117] 示例性固相物质包括但不限于微量滴定板、聚苯乙烯试管、磁性、塑料或玻璃珠及载玻片，其为放射分免疫测定及酶免疫测定领域内所熟知。将抗体偶合至固相的方法亦为本领域技术人员所熟知。最近，已采用多种多孔材料（例如尼龙、硝化纤维素、乙酸钠纤维素、玻璃纤维及其他多孔聚合物）作为固体支持物。

[0118] 本发明也涉及包含如上文所定义的组合物的诊断套试剂盒，其用于检测生物样品中的致病性蛋白质或蛋白质聚集体。此外，本发明涉及后一诊断试剂盒，其除如上文所定义的组合物外，也包含如上文所定义的检测试剂。术语“诊断试剂盒”一般而言指本领域内已知的任何诊断试剂盒。更特别地，后一术语指如Zrein等人(1998)中所述的诊断试剂盒。

[0119] 本发明的又一目的是提供新颖的免疫探针及包含根据本发明的抗体的测试试剂盒，其用于检测及诊断与蛋白质构象病、涉及蛋白质错误折叠的疾病及/或涉及蛋白质积累或聚集的疾病有关的疾病及病况。对于免疫探针，抗体直接或间接地附着至适宜的报告分子，例如酶或放射性核素。测试试剂盒包括装有根据本发明的一种或多种抗体和抗体使用说明书的容器，其用于与致病性抗原结合以形成免疫学复合物并检测免疫复合物的形成，使得该免疫复合物的存在或不存在与该致病性蛋白质或蛋白质聚集体的存在或不存在相关联。

[0120] 定义

[0121] 除非上下文另外明确指出，否则本说明书及随附权利要求中所用单数形式“a”、“an”及“the”包括多个指示物。因此，举例而言，在提及“肽”时包括一或多种肽。

[0122] 术语“基本上”、“约”、“大约”等特别地在与属性或值结合时亦分别准确定义该属性或准确定义该值。

[0123] 此外，在权利要求中，词语“包含”不排除其他要素或步骤。单个步骤可满足权利要求中所引述的若干特征的功能。

[0124] 本文所用术语“多肽”、“肽”及“蛋白质”可互换且定义为意指由通过肽键连接的两个或更多个氨基酸组成的生物分子。

[0125] 术语“肽”是其 α 碳经由肽键连接的氨基酸（通常为L-氨基酸）链，所述肽键是通过一个氨基酸的 α 碳的羧基与另一氨基酸的 α 碳的氨基间的缩合反应形成的。链的一端（即，氨基末端）处的末端氨基酸具有游离氨基，而链的另一端（即，羧基末端）处的末端氨基酸具有

游离羧基。因此,术语“氨基末端”(缩写为N-末端)指肽的氨基末端处的氨基酸的游离 α 氨基、或指肽内任何其他位置处的氨基酸的 α 氨基(当参与肽键时为亚氨基)。相似地,术语“羧基末端”(缩写为C-末端)指肽的羧基末端处的氨基酸上的游离羧基、或肽内任何其他位置处的氨基酸的羧基。

[0126] 通常,构成肽的氨基酸是顺序编号的,从氨基末端开始且沿朝向肽的羧基末端的方向增加。因此,当称一个氨基酸“跟随”另一个时,该氨基酸的位置比前一氨基酸更靠近肽的羧基末端。

[0127] 本文所用术语“残基”指通过酰胺键掺入肽中的氨基酸。因此,氨基酸可为天然存在的氨基酸,或除非另有限制,否则可涵盖天然氨基酸的已知类似物,所述类似物以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用(即,氨基酸模拟物)。此外,酰胺键模拟物包括本领域技术人员熟知的肽骨架修饰。

[0128] 本文所用术语“经修饰的肽”用于指通过添加疏水性部分以此使得经修饰的肽可以微团形式获得的经修饰的任何肽。该肽可具有靶向功能且因此可指抗体或抗体的结合片段、配体、抗原、受体、载剂蛋白,或能够识别并结合抗原、受体、组织或细胞类型(包括成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、血液细胞、肿瘤细胞等)的任何其他肽。特别地,经修饰的肽可以能够将脂质体靶向肿瘤组织或肿瘤细胞。如本文多个实施方案中所述的用于本发明的脂质体构建体中的经修饰的肽亦可为靶向实体瘤的血管的肽。

[0129] 在一个方面,如本文多个实施方案中所述的用于本发明的脂质体构建体中的经修饰的肽是靶向肽,所述靶向肽在蛋白质-蛋白质相互作用(例如受体-配体相互作用)中用作识别组份。

[0130] 在一个方面,如本文多个实施方案中所述的用于本发明的脂质体构建体中的经修饰的肽是如本文下文中所述的抗原性肽。

[0131] 在另一方面,如本文多个实施方案中所述的用于本发明的脂质体构建体中的经修饰的肽是RGD-肽、生长激素抑制素、趋化性肽、血管活性肽以及其模拟物。通常,这些肽使用配体-受体缔合以高亲和力结合靶细胞并且通过受体调介的胞吞作用进入细胞间区室(关于进一步信息,参见US20030229013)。

[0132] 在又一方面,如本文多个实施方案中所述的用于本发明的脂质体构建体中的经修饰的肽是抗体、尤其是单克隆抗体或抗体片段,例如特异性识别B细胞或T细胞表位的抗体或抗体片段,如美国专利第5,620,689号中所述。举例而言,该抗体可为识别B细胞表位CD19、CD20、CD22或CD77的抗体。该抗体可为识别T细胞表位CD4、CD7或CD8的抗体。

[0133] 嵌入脂质体的外表面上的肽的靶向功能可用于递送小的生物活性分子,例如治疗剂及/或寡核苷酸。通过脂质体肽与受限的细胞类型的结合能力来限制递送特异性。

[0134] 治疗剂包括天然及合成化合物,特别是具有以下活性的化合物:抗关节炎活性、抗心律不齐活性、抗细菌活性、抗胆碱能活性、抗凝活性、抗利尿活性、解毒活性、抗癫痫活性、抗真菌活性、抗炎活性、抗代谢活性、抗偏头痛活性、抗肿瘤活性、抗寄生虫活性、退热活性、抗发作活性、抗血清活性、镇痉挛活性、镇痛活性、麻醉活性、 β 阻断活性、生物反应调节活性、骨代谢调节活性、心血管活性、利尿活性、酶促活性、增强生育力的活性、促进生长的活性、止血活性、激素活性、激素抑制活性、高血钙缓解活性、低血钙缓解活性、低血糖缓解活性、高血糖缓解活性、免疫抑制活性、免疫增强活性、肌肉松弛活性、神经传递活性、拟副

交感神经活性、拟交感神经血浆伸张活性、血浆扩张活性、治疗精神病活性、血栓溶解活性或血管舒张活性。

[0135] 特别地,待用于根据本发明且如本文多个实施方案中所述的脂质体上的经修饰的肽可为嵌入脂质体的外表面上的肿瘤靶向肽,所述脂质体包含包埋于其中的抗肿瘤化合物以形成治疗性组合物。抗肿瘤化合物可为化学治疗及/或细胞毒性剂,例如终止DNA构建合成的化合物(例如,甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、羟基脲及巯嘌呤)、直接损害DNA的化合物(例如,蒽环类抗生素例如柔红霉素、阿霉素、表柔比星及伊达比星及其类似物例如epirubicin及米托蒽醌;或依托泊苷及铂化合物,例如顺铂、卡铂、奥马铂、奥沙利铂、折尼铂、恩洛铂、洛铂、螺铂、((-)-(R)-2-氨基甲基吡咯啉(1,1-环丁烷-二羧酸基(2-)-(DWA2114R)、(SP-4-3(R)-1,1-环丁烷-二羧酸基(2-)-(2-甲基-1,4-丁烷二胺-N,N')铂)(CI-973)、奈达铂(254-S)及(双-乙酸合-氨络-二氯-环己基胺-铂(IV))(JM-216))(Weiss,R.B.,等人,Drugs,46(3):360-377(1993))、影响有丝分裂纺锤体合成或分解的化合物(例如,选自以下组成的组的长春花生物碱:长春新碱、长春花碱、长春罗新、长春罗定(vinorelbine)、长春瑞滨(vinorelbine)及长春地辛(vindesine)或紫杉醇),或破坏血管生成的化合物(例如,抗VEGF抗体、血管抑制素、内皮抑素(endostatin)、肿瘤抑素(tumstatin)及TNF[α])。备选地,抗肿瘤药物可为拓扑异构酶I抑制剂(例如喜树碱及其类似物)或放射治疗剂(例如,⁹⁰Y-¹²⁵I-¹⁸⁸Re-¹¹¹In DTPA或¹³¹I碘化钠)。

[0136] 经包埋的生物活性分子亦可为核酸,例如反义寡核苷酸或核酶、siRNA或含有治疗基因的质粒,该质粒在被靶细胞内化时实现治疗基因的表达以产生治疗基因产物,所述基因产物用于治疗例如病毒性、恶性及炎性疾病及病况,例如囊性纤维化、腺苷脱氨酶缺乏症及AIDS。在一个方面中,寡核苷酸可为待用于癌症治疗的肿瘤抑制基因,例如APC、DPC4、NF-1、NF-2、MTS1、RB、p53、WT1、BRCA1、BRCA2及VHL(关于进一步信息,参见US2010119444)。

[0137] 在本发明一个方面中,待用于根据本发明且如本文多个实施方案中所述的脂质体上的肽可为靶向实体瘤的血管的肽。示例性血管靶向剂(VTA)描述于美国专利第5,855,866号、第5,965,132号、第6,261,535号、第6,051,230号及第6,451,312号中,所述专利描述了将抗细胞剂和毒素靶向递送至肿瘤血管系统的标记物。

[0138] 血管靶向方法的另一有效形式是将凝集因子靶向至在肿瘤血管或基质内表达或吸附的标记物(Huang等人,1997;美国专利第6,093,399号、第6,004,555号、第5,877,289号及第6,036,955号)。

[0139] 在本发明的另一方面中,待用于根据本发明且如本文多个实施方案中所述的脂质体上的肽可为抗体、尤其是单克隆抗体或抗体片段,例如特异性识别B细胞或T细胞表位的抗体或抗体片段,并且被包埋的生物活性分子可为阿霉素、长春新碱、洛莫司汀、干扰素、美法仑、环磷酰胺、泼尼松、笨丁酸氮芥、卡莫司汀及地塞米松,用于治疗血液性病况。

[0140] 术语“抗原性肽”或“目标抗原性肽”涉及施用于哺乳动物、尤其是人类后能够在该哺乳动物或人类中产生免疫应答的任何肽。在本发明的特定方面中,抗原性肽涉及衍生自淀粉样蛋白或类淀粉样蛋白质的肽,例如朊病毒蛋白、τ蛋白质、α-突触核蛋白、亨廷顿蛋白、糊精或淀粉样蛋白-β或一或多种上述肽的组合。

[0141] Aβ抗原性肽片段可对应于Aβ肽的N-末端部分、尤其对应于包含至少5个、尤其是至少6个、尤其是至少7个、尤其是至少8个、尤其是至少9个、尤其是至少10个、尤其是至少11

个、尤其是至少12个、尤其是至少13个、尤其是至少14个、尤其是来自Aβ1-15片段或Aβ1-16片段的全部的氨基酸残基的N-末端部分。

[0142] Aβ抗原性肽片段可还对应于Aβ肽的N-末端部分,其包含至少5个、尤其是至少6个、尤其是至少7个、尤其是至少8个、尤其是至少9个、尤其是至少10个、尤其是至少11个、尤其是至少12个、尤其是至少13个、尤其是至少14个、尤其是至少15个、尤其是来自Aβ1-16片段、Aβ1-17片段、Aβ1-18片段、Aβ1-19片段、Aβ1-19片段、Aβ1-20片段、Aβ1-22片段、Aβ1-23片段、Aβ1-24片段或Aβ1-25片段,Aβ1-26片段或3-15Aβ片段的全部的氨基酸残基。

[0143] Aβ抗原性肽片段可还对应于Aβ肽的C-末端部分,其包含至少5个、尤其是至少6个、尤其是至少7个、尤其是至少8个、尤其是至少9个、尤其是至少10个、尤其是至少11个、尤其是至少12个、尤其是至少13个、尤其是至少14个、尤其是至少15个、尤其是全部的来自Aβ20-40或20-42片段、Aβ21-40或21-42片段、Aβ22-40或22-42片段、Aβ23-40或23-42片段、Aβ24-40或24-42片段、Aβ25-40或25-42片段、Aβ26-46或27-42片段、Aβ27-40或27-42片段、或Aβ29-40片段的氨基酸残基。

[0144] 在一个方面中,Aβ抗原性肽片段可对应于Aβ肽的中间部分,其包含至少5个、尤其是至少6个、尤其是至少7个、尤其是至少8个、尤其是至少9个、尤其是至少10个、尤其是至少11个、尤其是至少12个、尤其是至少13个、尤其是至少14个、尤其是至少15个、尤其是来自Aβ15-35、尤其是Aβ20-35片段的全部的氨基酸残基。

[0145] 在本发明的另一方面中,可在根据本发明且如本文所述的构建体内使用全长Aβ1-39、Aβ1-40、Aβ1-42片段。

[0146] 在本发明的某些方面中,如本文所公开的Aβ抗原性肽片段可含有一或多个经修饰的或非天然的氨基酸残基。

[0147] 在本发明的某些实施方案中,考虑使用Aβ抗原性肽片段,其由来自Aβ肽、尤其是其片段的N-末端部分的介于13个与15个之间的邻接的氨基酸残基的单个或重复的一段序列组成,其中所述13个至15个氨基酸残基的邻接的一段序列获得自Aβ肽的N-末端片段1-16或1-17、尤其是获得自Aβ肽的N-末端部分,所述Aβ肽的N-末端部分选自残基1-15、1-14,和1-13、尤其是由W02007/068411中公开的如SEQ ID NO:1中所给出的Aβ₁₋₁₅肽抗原及如SEQ ID NO:3中所给出的Aβ₁₋₁₆(Δ14)组成。

[0148] 特别地,衍生自淀粉样蛋白质或类淀粉样蛋白质的抗原性肽可为肽,例如Aβ肽、特别地来自Aβ肽的N-末端部分的Aβ肽片段、但尤其是由选自以下的氨基酸残基所组成的Aβ肽片段:1-15、2-15、3-15、1-14、2-14、1-13;1-16(Δ2)、1-16(Δ4)、1-16(Δ5)、1-16(Δ6)、1-16(Δ8)、1-16(Δ9)、1-16(Δ10);1-16(Δ12)、1-16(Δ13)、1-16(Δ14)、1-16(Δ15)、1-15(Δ2)、1-15(Δ4)、1-15(Δ5)、1-15(Δ6)、1-15(Δ8)、1-15(Δ9)、1-15(Δ10);1-15(Δ12)、15(Δ13)、15(Δ14),尤其是Aβ₁₋₁₆(Δ15)肽抗原、更尤其是Aβ₁₋₁₆(Δ14)或Aβ₁₋₁₆(Δ13)肽抗原、甚至更尤其是Aβ₁₋₁₄肽抗原、特别地是Aβ₁₋₁₅肽抗原、但尤其是由如所给出氨基酸残基1-15组成的Aβ肽片段,其中存在的抗原性肽附着至载体或掺入该载体中或在该载体中重构,所述载体例如为囊泡、微粒体或分子,但尤其为脂质体。

[0149]

说明	疫苗	序列
Ac 1-15: 乙酰基 A β 1-15 囊封于脂质体中 (肽展示的对照)	ACI-16	H-K(Ac)K(Ac)-DAEFRHDSGYEVHHQ- K(Ac)K(Ac)-OH (SEQ ID NO: 11)
具有四棕榈酰基化的 A β 肽的疫苗	ACI-24	H-K(Pal)K(Pal)-DAEFRHDSGYEVHHQ- K(Pal)K(Pal)-OH (SEQ ID NO: 12)

[0150] 备选地,根据各需要,“目标抗原性肽”亦可为设计为用于疫苗研发的抗原的磷- τ 蛋白质或如上文多个实施方案中所述的A β 肽抗原与磷- τ 蛋白质的混合物。此类磷- τ 蛋白质可表示为下表中所描述的以下序列(T5至T11)中的一个或多个。先前所用的免疫原性肽可用作对照(Asuni, 等人, 2007)。

[0151]

说明	疫苗	序列
<u>T5</u> : 对照序列: τ 379-408 [pS396, pS404]	ACI-37	RENAKAKTDHGAEIVYKS(p)PVVSGDTS(p)P RHL (n = 30) (SEQ ID NO: 1)
<u>T1</u> : τ 5-20 [pY18]	ACI-33	RQEFVEMEDHAGTY(p)GL (n = 16) (SEQ ID NO: 2)
<u>T8</u> : τ 206-221 [pT212, pS214]	ACI-39	PGSRRT(p)PS(p)LPTPPTR (n = 16) (SEQ ID NO: 3)
<u>T9</u> : τ 196-211 [pS202, pT205]	ACI-40	GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRRT (n = 16) (SEQ ID NO: 4)
<u>T8</u> : τ 206-221 [pT212, pS214] and <u>T9</u> : τ 196-211 [pS202, pT205]	ACI-41	PGSRRT(p)PS(p)LPTPPTR (n = 16) (SEQ ID NO: 3) and GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRRT (n = 16) (SEQ ID NO: 4)
<u>T3</u> : τ 393-408 [pS396, pS404]	ACI-35	VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL (n = 16) (SEQ ID NO: 5)
<u>T4</u> : τ 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	GDTS(p)PRHLS(p)NVSTGSID (n = 18) (SEQ ID NO: 6)
<u>T2</u> : τ 200-216 [pS202+ pT205 & pT212+pS214]	ACI-34	PGS(p)PGT(p)PGSRRT(p)PS(p)LP (n = 17) (SEQ ID NO: 7)
<u>T10</u> : τ 407-418 [pS409]	ACI-42	HLS(p)NVSTGSID (n = 12) (SEQ ID NO: 8)
<u>T11</u> : τ 399-408 [pS404]	ACI-43	VSGDTS(p)PRHL (n = 10) (SEQ ID NO: 9)

[0152] 根据本发明的肽或抗原性肽是经由协助插入脂质体载剂/免疫佐剂的脂双层中的

亲脂性或疏水性部分来修饰的、尤其是通过包括但不限于脂肪酸、甘油三酯、甘油二酯、类固醇、鞘脂、糖脂或磷脂,但尤其为脂肪酸、甘油三酯或磷脂的亲脂性或疏水性部分来修饰的,其中举例而言,脂肪酸碳骨架具有至少6个用作脂质体双层中的肽的锚定物的碳原子且具有使肽紧密靠近脂质体表面定位且稳定的尺寸。特别地,亲脂性或疏水性部分是具有至少大约14个碳原子及至多大约24个碳原子的碳骨架的脂肪酸,其中落入此范围内的每一个碳原子数亦为本发明的一部分。更特别地,亲脂性或疏水性部分具有至少14个碳原子、但尤其是16个碳原子的碳骨架。疏水性部分的实例包括,但不限于,棕榈酸、硬脂酸、肉豆蔻酸、月桂酸、油酸、亚油酸及亚麻酸、胆固醇或1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DSPE)。

[0153] 在本发明又一实施方案中,疏水性部分是棕榈酸。脂质体制剂可另外含有佐剂,例如脂A、明矾、磷酸钙、白介素1,及/或多糖及蛋白质的微胶囊,但尤其为去毒脂A(例如单磷酸基或二磷酸脂A)、明矾、Pam3CSK4、Pam3CAG、CpG、脂质化的CpG、硫代磷酸化的PS-CpG-ODN,或CpG寡脱氧核苷酸(CpG-ODN)(例如CpG-A、CpG-B或CpG-C)。

[0154] 因此,用于如本文多个实施方案中所述的本发明的脂质体构建体中的佐剂是CpG寡脱氧核苷酸(CpG-ODN),例如CpG-A、CpG-B或CpG-C。经寡核苷酸修饰的CpG可用作合成刺激物,其在病毒感染后诱导大量抗病毒细胞因子I型干扰素或诱导Toll样受体(TLR)过表达。

[0155] 通过将位于肽分子的N-末端及/或C-末端处的氨基酸残基,或备选地位于添加至肽分子的N-或C-末端的氨基酸残基处的氨基酸残基脂质化来对根据本发明的肽、尤其是抗原性肽进行修饰。若天然肽序列不提供用于通过脂质化修饰的N-及/或C-末端氨基酸,则添加氨基酸残基可能成为必需的。备选地,作为修饰过程的一部分,肽片段的N-及/或C-末端处的第二个或第三个氨基酸残基可被脂质化。

[0156] 在预形成时,使用空脂质体,修饰本发明的肽、尤其是抗原性肽以提供在脂质体膜形成时插入其中的疏水性尾。另外,肽可经修饰以含有疏水性尾,使得其可插入脂质体中。

[0157] 本发明的抗原性构建体通常包含经修饰以增强抗原性效应的肽,其中此类肽可被如本文上文多个实施方案中所述的棕榈酸、聚氨基酸(例如聚甘氨酸、聚组氨酸)、多糖(例如聚半乳糖醛酸、聚乳酸、聚乙醇酸交酯、几丁质、壳聚糖)、合成的聚合物(聚酰胺、聚氨酯、聚酯)或共聚物(例如聚(甲基丙烯酸)及N-(2-羟基)丙基甲基丙烯酰胺)等修饰,或可还通过聚乙二醇化(使用聚乙二醇或经的修饰聚乙二醇)修饰。

[0158] 在本发明的“基于脂质体的构建体”中,脂质体可具有双功能,因为其可用作包含在脂双层中重构的、根据本发明且如本文多个实施方案中所述的经修饰的肽的载剂,且同时用作活性药物或化合物的递送系统。在根据本发明的“基于脂质体的抗原性构建体”的情况下,脂质体可具有作为增加或刺激待用治疗性疫苗治疗的靶动物或人类内的免疫应答的佐剂的其他功能。亦应了解,本发明的基于脂质体的抗原性构建体组合可还包含额外的佐剂,包括但不限于钥孔虫血兰素(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)及其他佐剂,例如,脂A、明矾、磷酸钙、白介素1,及/或多糖及蛋白质的微胶囊,但尤其是去毒脂A(例如单磷酸基或二磷酸脂A)、明矾、Pam3CSK4、Pam3CAG、CpG、脂质化的CpG、硫代磷酸化的PS-CpG-ODN,或CpG寡脱氧核苷酸(CpG-ODN)(例如CpG-A、CpG-B或CpG-C)、其他防腐剂、稀释剂、乳化剂、稳定剂及已知且用于现有技术的疫苗中的其他组份。此外,可在本发明组合中使用本领域已知的

任何佐剂系统。此类佐剂包括,但不限于,弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂、经多分散 β -(1,4)连接的乙酰化的甘露聚糖(“乙酰吗喃(Acemannan)”)、**Titermax®**(来自CytRx公司的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物佐剂)、来自Chiron公司的经修饰的脂质佐剂、来自Cambridge Biotech的皂苷衍生物佐剂、经杀灭的百日咳博德特氏杆菌(*Bordetella pertussis*)、革兰氏阴性细菌的脂多糖(LPS)、大聚合阴离子(例如硫酸葡聚糖),及无机凝胶(例如明矾、氢氧化铝或磷酸铝)。

[0159] 术语“免疫有效量”指对人类或动物施用诱发生免疫应答的抗原性/免疫原性组合物的量。本领域技术人员容易依照常规规程确定有效量。

[0160] 术语“治疗有效量”或“药学有效量”指对人类或动物施用足以在所述人类或动物中产生治疗效应的根据本发明且如本文所述的构建体、尤其是抗原性构建体(包含经修饰的肽、尤其是经修饰的抗原性肽)的量。本领域技术人员容易依照常规规程确定有效量。

[0161] 本文所用术语“临界微团浓度”,亦称作CMC,被定义为在高于此浓度时微团自发形成的表面活性剂的浓度。在将表面活性剂(或任何表面活性材料)引入至系统中后,表面活性剂将首先分配至界面中,从而通过a)降低界面能量(以面积 $\times$ 表面张力计算)及b)从与水的接触处去除表面活性剂的疏水性部分来降低系统自由能。随后,当表面活性剂的表面覆盖度增加且表面自由能(表面张力)降低并且表面活性剂开始聚集成微团时,从而通过降低表面活性剂的疏水性部分与水的接触面积来再次降低系统的自由能。在达到CMC后,表面活性剂的任何进一步添加将仅仅增加微团数。(IUPAC.Compendium of Chemical Terminology,第2版,Blackwell Scientific Publications,Oxford(1997))

[0162] 本文所用术语“基本上由...组成”排除了会实质上改变该词组所提及的肽的基本性质的任何要素。因此,对肽“基本上由...组成”的说明排除了会实质上改变该肽的生物活性的任何氨基酸替换、添加或缺失。

[0163] 此外,本领域技术人员将认识到,如上文所提及的,改变、添加或缺失所编码的序列中的单个氨基酸或较小百分比的氨基酸(通常小于5%、更通常小于1%)的个别的替换、缺失或添加是经保守修饰的变异,其中改变导致用化学相似的氨基酸替换氨基酸。提供功能相似的氨基酸的保守替换表为本领域所熟知。以下6组每组含有可彼此进行保守替换的氨基酸:

[0164] 1) 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);

[0165] 2) 天门冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0166] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0167] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0168] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);及

[0169] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0170] 词组“经分离的”或“生物纯的”指实质上或基本上不合如在其天然状态中发现的通常其所伴随的组分的物质。因此,本文所述肽不含有通常与其原位环境相关的物质。通常,本文所述经分离的、免疫原性肽及/或抗体是至少约80%纯、通常至少约90%纯,且优选至少约95%纯,如通过银染色凝胶上的带强度所量测量的。

[0171] 本文所用术语“溶液”指用于在本发明方法内制备脂质体的溶液。举例而言,溶液由乙醇、磷酸盐缓冲液(PBS)或二者组成。脂质体是由二肉豆蔻磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆

蔻磷脂酰乙醇胺 (DMPEA)、二肉豆蔻磷脂酰甘油 (DMPG) 及胆固醇制成。特别地,脂质体是由 DMPC、DMPG 及胆固醇,尤其是以 9.0:1.0:7.0 的摩尔比在例如乙醇中混合制成的。备选地,脂质体是由二肉豆蔻磷脂酰胆碱 (DMPC)、二肉豆蔻磷脂酰乙醇胺 (DMPEA)、二肉豆蔻磷脂酰甘油 (DMPG) 及胆固醇,尤其分别以 9.0:1.0:1.0:7.0 的摩尔比在例如乙醇中混合制成的。

[0172] 如本文所用,术语“脂质体”意指含有由脂双层包围的内部水性区室的自组装的球形结构,所述脂双层通常由磷脂和固醇类组成。脂质体广泛用作细胞膜的模型系统并且用作药物递送系统中的药物载体。

[0173] 可用于本发明的组合物中的脂质体包括本领域技术人员已知的那些。可以使用可用于制备脂质体的任何标准的脂类。标准的双层和多层脂质体可用于制备本发明的组合物。尽管可以使用本领域技术人员所知晓的任何制备脂质体的方法,最优的脂质体是根据 Alving., 等人, *Infect. Immun.* 60:2438-2444, 1992 的方法制备的,所述文献在此引入作为参考。

[0174] 脂质体可具有双重功能,因为其可以用作将经修饰的肽呈现于脂质体外表面的平台,并且,同时作为增加或刺激治疗时靶动物或人类内的免疫应答的佐剂发挥功能,所述治疗使用根据本发明如本文所述的多种实施方案中的抗原性构建体。

[0175] 脂质体由包含亲水性头部基团和疏水性尾的(磷)脂分子构成。(磷)脂分子在水性溶液中组装,使得疏水部分采取朝向彼此的取向以避免与水性相接触,而亲水头部基团处于使它们与水性环境有最大接触的取向。这导致自发地自组装为球形结构,所述球形结构含有由脂双层包围的内部水性区室。

[0176] 因此脂质体含有取向朝向包围脂质体的水性溶液的外表面和标出内部水性区室的内表面。

[0177] 因此如本文所用的术语脂质体的“外表面”意指取向为朝向包围脂质体的水性相的脂质体表面。

[0178] 脂质体可含有佐剂或免疫调节剂或二者。优选的佐剂是明矾、Pam3CSK4、Pam3CAG、CpG,尤其是去毒脂 A (例如单磷酸或二磷酸脂 A)。可以适宜的浓度、尤其是以介于 1mg/mmol 与 10mg/mmol 磷脂之间的浓度、更特别地以 5mg/mmol 磷脂的浓度添加单磷酸脂 A (MPLA)。

[0179] 可将 MPLA 与辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷 (B-OG) 混合且可将所述混合物添加至脂质体制剂中。作为在本发明方法内的此步骤的备选方式,可将佐剂与其他脂质 (DMPC、DMPG 及胆固醇) 一起掺入诸如乙醇等溶液中。

[0180] 本文所用术语“可溶”或“溶解的”意为部分或完全溶解于水性溶液中。特别地,在本发明方法内,可在诸如 B-OG、PBS 或其混合物等表面活性剂存在的条件下溶解经修饰的肽。具体的溶解条件取决于不同参数,例如 pH、缓冲液、表面活性剂、浓度及温度。

[0181] 本文所用术语“检测”意指使用已知技术 (例如免疫化学或组织学方法) 来检测生物分子,并且指定性或定量地确定所研究的生物分子的存在或浓度。

[0182] 本文所用术语“抗体”或“其功能性部分”是本领域内认可的术语,并且应理解为指结合已知抗原的分子或分子的活性片段、尤其是指免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有免疫特异性结合地抗原的结合位点的分子。根据本发明的免疫球蛋白可为任何类型 (IgG、IgM、IgD、IgE、IgA 及 IgY) 或类别 (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2) 或亚类的免疫球蛋白分子。

[0183] “抗体”在本发明范围内旨在包括单克隆抗体、多克隆、嵌合、单链、双特异性、猿猴化(simianized)抗体、人类及人源化抗体以及其活性片段。结合已知抗原的分子的活性片段的实例包括Fab及F(ab')₂片段,包括Fab免疫球蛋白表达文库的产物及上述抗体及片段中任一者的表位结合片段。

[0184] 这些活性片段可通过多种技术从本发明的抗体获得。举例而言,可用酶(例如胃蛋白酶)切割纯化的单克隆抗体,并且对其进行HPLC凝胶过滤。然后可收集含有Fab片段的适当级分并通过膜过滤等进行浓缩。关于用于分离抗体活性片段的一般技术的进一步说明,参见例如Khaw, B. A. 等人, J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux 等人, Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986。

[0185] “人源化抗体”指其CDR源自非人供体免疫球蛋白,分子的剩余的免疫球蛋白来源的部分源自一(或多种)人类免疫球蛋白的经改造的抗体类别。

[0186] 人源化抗体还可以指具有这样的可变区的抗体,所述可变区中的一个或多个框架区具有人类或灵长类动物氨基酸。另外,可改变框架支持残基以保持结合亲和力。获得“人源化抗体”的方法是本领域技术人员所熟知的。(例如,参见Queen等人, Proc Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson等人, Bio/Technology, 9:421 (1991))。

[0187] “人源化抗体”亦可通过新颖遗传工程方法获得,该方法使得能在诸如兔等大型动物中生产亲和力成熟的人样多克隆抗体 (<http://www.rcitech.com/bioventures/therapeutic.php>)。

[0188] 术语“单克隆抗体”亦为本领域内所公认并且指在实验室中从单个克隆大量生产的且仅识别一种抗原的抗体。单克隆抗体通常由通过将正常的短命的生产抗体的B细胞与快速生长细胞,例如癌细胞(有时称作“永生”细胞)融合来制得。所得的杂交细胞,或杂交瘤快速繁殖,创造出生产大量抗体的克隆。

[0189] 术语“抗原”指可在生物体、尤其是动物、更尤其是哺乳动物(包括人)中诱导免疫应答的实体或其片段。该术语包括免疫原及负责抗原性或抗原性决定簇的区域。

[0190] 本文所用术语“免疫原性”指这样的物质,其诱发或增强生产针对免疫原性活性剂的抗体、T-细胞及其他反应性免疫细胞且有助于人类或动物中的免疫应答。

[0191] 当个体生产针对所施用的用于减轻或缓解待治疗的病症的本发明的免疫原性组合物的足够的抗体、T-细胞及其他反应性免疫细胞时,发生免疫应答。

[0192] 术语“杂交瘤”或“杂交瘤细胞”是本领域所认可的并且被本领域技术人员理解为由通过融合生产抗体的细胞与永生细胞(例如多发性骨髓瘤细胞)来生产的细胞。此杂交细胞能够生产连续供应的抗体。关于融合方法的更详细的说明,参见上文对“单克隆抗体”的定义。

[0193] 在本发明另一特定实施方案中,提供根据本发明且如本文上文多个实施方案中所述的共价结合至锚定型分子上的经修饰的抗原性肽,所述锚定型分子能够插入载剂/佐剂中,由此将肽固定至载剂/佐剂上并将其呈递于载剂/佐剂分子的表面上或紧密靠近所述分子的表面处,使得疏水性相互作用可变得有效,如本文上文多个实施方案中所述。

[0194] 本文所用术语“疾病或病症”基本上涉及可通过根据本发明且如本文多个实施方案中所述的基于脂质体的构建体来治疗的任何疾病。

[0195] 特别地,术语“疾病或病症”涉及需要此类治疗的动物或人类患者中的蛋白质构象

病、涉及蛋白质错误折叠的疾病及/或涉及蛋白质积累或聚集的疾病,例如,可选自由以下组成的组的疾病或病症:AA淀粉样变性、AH(重链)淀粉样变性、AL(轻链)淀粉样变性、亚历山大病、阿兹海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、大动脉内侧淀粉样变性、apoA1淀粉样变性、apoA2淀粉样变性、apoA4淀粉样变性、大动脉内侧淀粉样变性、CADASIL、心房淀粉样变性、白内障、脑淀粉样血管病、角膜乳铁蛋白淀粉样变性、危重病肌病、皮肤苔藓型淀粉样变性、囊性纤维化、透析性淀粉样变性、家族性淀粉样神经病、家族性英国型痴呆、家族性丹麦型痴呆、家族性内脏淀粉样变性、纤维蛋白原淀粉样变性、芬兰遗传性淀粉样变性、额颞叶痴呆、青光眼、具有淀粉样变性的遗传性脑出血-荷兰型、具有淀粉样变性的遗传性脑出血-冰岛型、亨廷顿氏病及其他三联体病症、遗传性格子状角膜营养不良、包涵体肌炎/肌病、溶菌酶淀粉样变性、马洛里小体、髓质性甲状腺癌、牙源性(平堡)淀粉样瘤、帕金森氏病、垂体催乳素瘤、原发性全身性淀粉样变性、原发性皮肤淀粉样变性、朊病毒病、肺泡蛋白沉积症、青光眼中的视网膜神经节细胞退化、朊病毒病、精囊淀粉样病、seipinopathy、老年全身性淀粉样变性、serpinopathy、镰形细胞病、共核蛋白病、 τ 蛋白病及2型糖尿病,真菌感染(真菌病、念珠菌病、癣、利什曼病)或炎症。

[0196] 术语“疾病或病症”还涉及细胞增殖性疾病及病症,包括多发性骨髓瘤及其他癌症,例如结肠直肠癌、黑素瘤;IL-2癌、尤其是乳癌、肺癌、肝癌、胃癌及脾癌、及肿瘤;IL-4癌;TNF癌;IGF-1反义脑肿瘤;IFN神经母细胞瘤;GM-CSF肾细胞瘤;MDR-1癌、尤其是晚期癌、乳癌及卵巢癌;及HSV胸苷激酶脑肿瘤、头颈肿瘤、间皮瘤、卵巢癌、白血病。术语“疾病或病症”也涉及真菌感染,例如真菌病、念珠菌病、癣,和利什曼病。

[0197] 附图和表格简述

[0198] 图1显示L16方法的流程图。

[0199] 图2显示在C5BL/6小鼠接受使用薄膜方法(方法A)或使用方法L15制造的ACI-33疫苗后,对其血浆中的抗 τ 5-20[pY18] IgG抗体的分析。在第-7天进行预先取血,随后在初次免疫后第7天、第21天及第35天取血。结果表示为在10只小鼠的组中获得的平均值+标准偏差。

[0200] 图3显示在C5BL/6小鼠接受使用薄膜方法(方法A)或使用方法L15制造的ACI-35疫苗后,对其血浆中的抗 τ 396-408[pS396/pS404] IgG抗体的分析。在第-7天预先取血,随后在初次免疫后第7天、第21天及第35天取血。结果表示为在10只小鼠的组中获得的平均值+标准偏差。

[0201] 图4显示在C5BL/6小鼠接受使用方法D(ACI-24方法D#2)或使用方法L15制造的Pa11-15疫苗后,对其血浆中的抗A β IgG抗体的分析。在第-7天预先取血,随后在初次免疫后第7天、第21天及第35天取血。结果表示为在10只小鼠的组中获得的平均值+标准偏差。

[0202] 图5显示在C5BL/6小鼠接受使用方法D(ACI-24方法D#1)、使用方法L15(ACI-24方法L15A;L15B及L15C)或使用ACI-24方法L16制造Pa11-15疫苗后,对其血浆中的抗A β IgG抗体的分析。在第-7天预先取血,随后在初次免疫后第7天、第21天及第35天取血。结果表示为在10只小鼠的组中获得的平均值+标准偏差。

[0203] 图6a显示在C5BL/6小鼠接受使用L15方法制造的ACI-41(肽T8及T9)疫苗后,对其血浆中的抗T8IgG抗体效价的分析。在第-7天预先取血,随后在初次免疫后第7天、第21天及第35天取血。结果表示为在10只小鼠的组中获得的平均值+标准偏差。

[0204] 图6b显示在C5BL/6小鼠接受使用L15方法制造的ACI-41(肽T8及T9)疫苗后,对其

血浆中的抗T9IgG抗体效价的分析。在第-7天预先取血,随后在初次免疫后第7天、第21天及第35天取血。结果表示为在10只小鼠的组中获得的平均值+标准偏差。

[0205] 图7显示在溶解于PBS或2.25% SDS中后,Ac1-15肽的二辛可宁酸蛋白定量测定(BCA)标准曲线。

[0206] 图8显示在PBS或SDS存在下,具有或没有BCA试剂的ACI-24的吸光度谱。

[0207] 图9显示在用BCA试剂处理并且针对固有的脂质体吸光度进行校正后对ACI-24吸光度谱的比较。

[0208] 图10显示没有肽的脂质体(空脂质体,ACI-24E)的吸光度谱。

[0209] 图11显示仅含有经囊封的Ac1-15肽(疫苗ACI-16)的脂质体的吸光度谱。

[0210] 图12显示对使用方法D(ACI240908-A)或方法L15(ACI-24-100316-A)制备的多个批次的ACI-24的吸光度谱的比较。

[0211] 图13显示在使用以方法L15或L20生成的ACI-35疫苗实施免疫后第-7天、第7天、第21天及第35天的IgG效价。

[0212] 图14显示在小鼠中注射疫苗ACI-17(方法L15,其中用脂质化CpG佐剂替代MPLA)或疫苗ACI-18(方法L15,其中用Pam2CSK4佐剂替代MPLA)后第7天、第21天或第35天后获得的总抗AB效价。

[0213] 表1至3描述了L15方法产生的Pa1 1-15疫苗的批次。生成以下批次以评价使用方法L15产生的ACI-24疫苗的物理化学及体内再现性:ACI-24-100316-A;ACI-24-100316-B及ACI-24-100316-C。三种疫苗均是独立地生成的。

[0214] 表4描述了使用正常MPLA浓度的L16方法产生的Pa1 1-15疫苗的批次。使用方法L16(在脂质体形成后添加抗原及佐剂)制造批次-ACI-24-091127-A。

[0215] 表5描述了使用高MPLA浓度的L16方法产生的Pa1 1-15疫苗的批次。使用方法L16(在脂质体形成后添加抗原及佐剂)制造批次-ACI-24-091127-B。

[0216] 表6描述了L15方法产生的T1疫苗的批次-ACI-33-091127。

[0217] 表7描述了薄膜方法产生的T1疫苗的批次-ACI-33-091808-A。

[0218] 表8描述了L15方法产生的T3疫苗的批次-ACI-35-091127。

[0219] 表9描述了薄膜方法产生的T3疫苗的批次-ACI-35-0910820-A。

[0220] 表1描述了L15方法产生的T8/T9疫苗的批次-ACI-41-100531。

[0221] 表11及12描述了分别通过用于产生Pa1 1-15疫苗的交叉流动乙醇注射方法(方法D)-ACI-24方法D#1及D#2生成的两个独立批次。

[0222] 表13显示使用BCA测定对ACI-24-100316-A实施一式三份分析的吸光度值。

[0223] 表14显示不同ACI-24方法及批次的分析结果的总结。

[0224] 通过参考以下实施例可更全面地理解上文说明。然而,此类实例是示例性实践本发明的方法且不欲限制本发明的范围。

[0225] 以下实施例阐释本发明。

实施例

[0226] 实施例1:基于脂质体的抗原性构建体的制备(方法L15;L16及L20)

[0227] 1.1.方法L16

[0228] 1.1.1脂质体的制备:将磷脂二肉豆蔻磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻磷脂酰甘油(DMPG)及胆固醇(Avanti Polar Lipids,Alabaster,Alabama)分别以9.0、1.0及7.0的摩尔比例混合于乙醇(100ml)中。在60℃下连续搅动15min后形成完全澄清溶液(参见图1)。然后将该溶液(100ml)注射至1600ml磷酸盐缓冲液(PBS) (pH7.4)中来稀释(17x)此脂混合物,允许形成多层囊泡(多层囊泡-阶段1)。然后通过超滤(Vivaflow200-100,000MWC0聚醚砜,流速为200ml/min)来浓缩所得制剂且反应体积从1700ml降至250ml(超滤步骤)。在Vivaflow200装置中对经浓缩的溶液进一步实施透析,其中用PBS (pH7.4)实施10x体积交换(渗滤步骤)。然后在来自Avestin的Emulsiflex C5装置中将经透析的溶液(多层囊泡-阶段2)均质化(在15,000-20,000Psi下7次循环)(均质化步骤),随后通过直径为47mm的0.2μm聚碳酸酯膜进行3次挤出循环(使用相同Emulsiflex仪器)(挤出步骤)。在所述最后两个筛选步骤后,形成无抗原及佐剂的单层脂质体(空脂质体制剂)。

[0229] 1.1.2佐剂溶液的制备:在具有1.6% (wt/v) 辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷(B-OG)的20ml PBS (pH7.4)中制备765μg/ml的MPLA溶液。所得溶液含有浓度高于0.73% (wt/v)的临界微团浓度(CMC)的洗涤剂(B-OG)。然后在60℃将此溶液加热30min并手工注射至250ml空脂质体的制剂中。在此稀释步骤期间,将洗涤剂浓度稀释低13.5x,获得0.12% (wt/v)的最终浓度,此浓度低于B-OG的CMC(第1稀释步骤)。然后通过注射1450ml PBS (pH7.4)来稀释(7x)含有佐剂(MPLA)的脂质体溶液(第2稀释步骤)。

[0230] 1.1.3肽溶液的制备:在具有2.0% (wt/v) B-OG的PBS (pH11.8)中制备1.33mg/ml肽Aβ-Pa1 1-15(总体积为45ml)。所得溶液包含浓度高于0.73% (wt/v)的临界微团浓度(CMC)的洗涤剂。将此溶液在60℃搅拌加热并且搅拌15min,直至形成澄清溶液。然后将肽溶液(45ml)添加至具有佐剂的脂质体溶液(1700ml)中并在60℃搅拌1h,获得最终B-OG浓度为0.05%的溶液,该浓度远低于洗涤剂的CMC(0.73%) (稀释步骤)。然后通过超滤(与上文所述相同的条件)浓缩所得溶液且将最终疫苗体积定为100ml。通过渗滤对经浓缩的溶液实施透析,其中用PBS (pH7.4)实施10x体积交换。

[0231] 在最终步骤中,通过0.2μm聚醚砜膜过滤器(Sartorius16541-K)无菌过滤疫苗溶液。使用每个过滤器将5ml疫苗溶液无菌过滤至15ml Falcon管中。在无菌环境(分层通风橱)中执行此最后的方法步骤。

[0232] 1.2.方法L15

[0233] 方法L15与方法L16的不同仅在于在脂质体形成及筛选步骤之前将佐剂(例如MPLA)与脂一起添加于乙醇溶液中。因此,取消在脂质体形成后添加佐剂的方法。

[0234] 1.3.方法L20

[0235] 1.3.1脂质体的制备:将磷脂二肉豆蔻磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻磷脂酰甘油(DMPG)及胆固醇(Avanti Polar Lipids,Alabaster,Alabama)分别以9.0、1.0及7.0的摩尔比混合于乙醇(8.55ml)中。在60℃连续搅动15min后形成完全澄清溶液。在60℃将MPLA(7.5mg)溶解于0.45ml叔丁醇中并添加至乙醇溶液中。然后通过将该溶液(9.0ml)注射至90ml磷酸盐缓冲液(PBS) pH7.4中来稀释(10x)此脂混合物,允许形成多层囊泡。然后使用来自Avestin的Emulsiflex C5装置或来自Northern Lipids的Lipex Extruder通过一包3个的孔径为0.08μm的聚碳酸酯膜挤出获得的制剂并用PBS pH7.4稀释至425ml的最终体积。

[0236] 1.3.2肽溶液的制备:在具有5.0% (wt/v) B-OG的PBS pH11.8中制备1.33mg/mlτ肽

T3 (总体积为22.5ml)。所得溶液包含浓度高于0.73% (wt/v) 的临界微团浓度 (CMC) 的洗涤剂。将此溶液在60℃搅拌加热且搅拌15min,直至形成澄清溶液。然后将肽溶液 (22.5ml) 添加至具有佐剂的脂质体溶液 (425ml) 中且在60℃搅拌30min,从而获得最终B-OG浓度为0.20%的溶液,该浓度远低于洗涤剂的CMC (0.73%) (稀释步骤)。然后通过超滤 (与上文所述相同的条件) 来浓缩所得溶液且将最终疫苗体积定为50ml。通过渗滤对经浓缩的溶液实施透析,其中用PBS (pH7.4) 实施10x体积交换。

[0237] 在最终步骤中,通过0.2μm乙酸纤维素过滤器 (Minisart 16534) 无菌过滤疫苗溶液。使用每个过滤器来将5ml疫苗溶液无菌过滤至15ml Falcon管中。在无菌环境 (分层通风橱) 中执行此最后的方法步骤。

[0238] 已通过产生具有不同体积 (50ml及150ml) 且具有相同生物物理及免疫性质的批次来证实方法L20的可扩缩性。

[0239] 1.4结果

[0240] 表4描述了具有正常MPLA浓度的L16方法生产的Pa1 1-15疫苗的批次 (ACI-24-091127-A)。使用如实例1中所述的方法L16 (在脂质体形成后添加抗原及佐剂) 来制造此批次 (ACI-24-091127-A)。正常MPLA浓度意指与上文段落中所述方法L15所采用的相等的MPLA掺入。

[0241] 表5描述了具有高MPLA浓度的L16方法生产的Pa1 1-15疫苗的批次 (ACI-24-091127-B)。使用如实例1中所述的方法L16 (在脂质体形成后添加抗原及佐剂) 来制造此批次。高MPLA浓度意指最终疫苗制剂中的MPLA负载比方法L15中的MPLA负载高大约8倍。此类高MPLA产率不能利用交叉流动乙醇注射方法 (方法D) 获得。

[0242] 当比较用于产生Pa1 1-15疫苗的方法D的结果时,用于产生Pa1 1-15疫苗的L16/L15方法的优点是明显的 (分别参见表1至3、11及12)。如在表中可发现,方法L15/L16中的MPLA水解 (通过同类物B的形成而报告) 与方法D相比显著减少。此外,使用方法L15/L16的肽分布报告了与方法D相比增加的抗原暴露于外部水性表面 (表14)。

[0243] 图13显示使用以方法L15或L20生成的τ疫苗免疫的小鼠的IgG效价。如可观察到,对于两种方法获得相同效价产率。

[0244] 已通过产生具有不同体积 (50ml及150ml) 且具有相同生物物理及免疫性质的批次来证实方法L20的可扩缩性。

[0245] 所有已研究的方法皆是理论上稳定的,虽然仅有L20方法的数据。

[0246] 实施例2:比较产生ACI-33疫苗的L15方法与薄膜方法

[0247] 表6及7分别描述了产生ACI-33疫苗的L15方法及薄膜方法 (如W02007/068411中所述的方法A)。在图2中,显示了在C5BL/6小鼠接受使用薄膜方法 (方法A) 或使用方法L15制造的ACI-33疫苗后,其血浆中的抗τ5-20 [pY18] IgG抗体效价。使用以方法L15制造的ACI-33疫苗刺激的小鼠给出高于使用方法A疫苗刺激的小鼠的抗体效价。此作用归因于L15疫苗性质,其不仅展示具有专一的肽分布的较高的肽负载,且亦归因于L15方法产生小于由薄膜方法所制得的脂质体 (<200nm) 的事实。

[0248] 实施例3:比较产生ACI-35疫苗的L15方法与薄膜方法

[0249] 表8及9分别描述了产生ACI-35疫苗的L15方法及薄膜方法 (如W02007/068411中所述的方法A)。在图3中,显示在C5BL/6小鼠接受使用薄膜方法或使用方法L15制造的ACI-35

疫苗后,其血浆中的抗 τ 396-408[pS396/pS404] IgG抗体效价。使用以方法L15制造的ACI-35疫苗刺激的小鼠给出高于使用方法A疫苗刺激的小鼠的抗体效价。此作用归因于L15疫苗性质,其不仅允许具有转移的肽分布的较高的肽负载,且亦归因于L15方法产生小于薄膜方法的脂质体($<200\text{nm}$)的事实。

[0250] 实施例4:比较产生T1疫苗的L15方法与交叉流动乙醇注射方法(方法D)

[0251] 图4显示在C5BL/6小鼠接受使用方法D(ACI-24方法D#2)或使用方法L15制造的Pa11-15疫苗后,其血浆中的抗A β IgG抗体效价。结果显示两种疫苗具有相同抗体效价。然而,较之另一方法(方法D),L15方法仅含有可忽略量的MPLA水解产物(例如MPLA同类物B),其中MPLA水解极大程度地以非受控方式发生。不同MPLA同类物(例如对应于其非水解形式的同类物A和是同类物A的水解产物的同类物B)的免疫原性未知。不含有MPLA水解产物的方法具有高批次再现性的优点并且通过此方法产生的疫苗显示改良的质量及稳定性。

[0252] 实施例5:体内比较方法L15与L16和方法L15的免疫再现性

[0253] 图5显示在C5BL/6小鼠接受使用方法D(ACI-24方法D#1)制造的Pa11-15疫苗、3个独立产生的L15疫苗及一个使用L16方法产生的疫苗后,其血浆中的抗A β IgG抗体效价。结果显示3个个别L15疫苗具有相同抗体效价,突出了体内免疫再现性。在免疫后第35天,L15疫苗与方法D疫苗间的抗体效价无重大差异。然而,较之L15或L16方法,在乙醇交叉流动注射方法(方法D)中的MPLA水解程度大得多。

[0254] 第35天时,较之L15批次,使用L16方法获得的抗体效价略低。此结果可归因于与方法L15相比在外部磷脂双层上的过量MPLA。应对两种方法进行不同剂量MPLA的测试以获得佐剂浓度对免疫应答的作用的较明显的反应。然而,可在脂质体形成后添加MPLA的事实提供了仅在需要时将佐剂掺入储存的空脂质体中的优点。此方法可防止MPLA在储存期间在脂质体制剂中水解。

[0255] 实施例6:通过使用L15方法产生含有两种抗原(ACI-41疫苗上的T8及T9抗原)的脂质体来体内产生两种不同抗体

[0256] 表10描述了用于产生含有T8与T9肽序列混合物的疫苗的L15方法的批次。T8与T9肽的溶解度及纯度差异可影响疫苗制剂中的最终抗原产率。图6a及6b中显示,ACI-41疫苗(含有两种不同抗原-T8及T8)可诱导对存在于相同脂质体上的两个表位的特异性抗体应答。

[0257] 实施例7:通过使用L15方法产生含有不同于MPLA的佐剂:脂质化CpG佐剂(疫苗ACI-17)或Pam2CSK4(疫苗ACI-18)的脂质体来体内产生抗体

[0258] 如先前于实施例1.2中所述制备通过方法L15制造的疫苗ACI-17及ACI-18,不同的处仅在于佐剂选择。用于疫苗ACI-17及ACI-18中的佐剂分别是脂质化的CpG及Pam2CSK4。

[0259] 图14显示在C5BL/6小鼠接受使用方法L15制造的Pa11-15疫苗后,其血浆中的抗A β IgG抗体效价,其中用脂质化CpG佐剂(疫苗ACI-17)或用Pam2CSK4(疫苗ACI-18)替代MPLA。结果突出了在用不同于MPLA的佐剂装载脂质体且仍诱导产生结合A β 的抗体的免疫应答中的技术灵活性。

[0260] 实施例8:使用BCA比色测定法确定在ACI-24中Pa11-15的膜拓扑学

[0261] 进行二辛可宁酸(Bicinchoninic acid)蛋白质定量测定(BCA)且对线性、特异性及精度进行测试。最后实施该测定以分析通过不同方法制备的ACI-24不同批次的肽拓扑

学。BCA测定基于两步式反应,其中首先在肽存在下,在碱性条件下将铜(II)还原为铜(I)(双缩脲反应)。在第二步骤中,铜(I)与试剂二辛可宁酸螯合以产生紫色复合物,其可通过吸光度测量且与肽含量成比例。由于铜(II)及二辛可宁酸的电荷,预期这些试剂不会穿过脂质体双层并因此应仅对外膜上的肽进行定量。为对总肽含量进行定量,可在洗涤剂存在下裂解脂质体且随后使用BCA试剂实施定量。随后可从外表面上的肽与总肽的比率确定外表面上Pa1 1-15的比例。作为用于特异性的对照,使用无肽脂质体(空脂质体)。同样,为确保可对外表面上的肽进行定量且二辛可宁酸及铜将不会穿过脂质体膜,测试由完全囊封于脂质体内部中的水溶性肽Ac1-15构成的对照批次。

[0262] 修改标准BCA测定条件以优化信号/噪音比以及反应特异性。所优化的参数包括i) 二辛可宁酸及铜(II)的浓度、ii) ACI-24的浓度、iii) 反应温度及iv) 反应时间(数据未显示)。

[0263] 8.1外脂质体表面上的肽

[0264] 用PBS将脂质体稀释2倍且将240μL添加至96孔平底透明板上。添加60μL4x浓缩的BCA试剂(微-BCA蛋白质测定试剂盒,1.88mL试剂A,1.80mL试剂B,256μL试剂C)并混合样品并在RT下无光放置90min。

[0265] 8.2总肽含量

[0266] 为裂解脂质体以对总肽含量进行定量,用SDS将脂质体稀释2倍,获得2.25%(v/v)的最终SDS浓度。然后在密封塑料eppendorf中在70℃加热SDS中的300μL脂质体2h并随后经2h冷却至RT。可以通过监测在320-600nm范围内的吸光度来关注裂解效率。然后将240μL此透明溶液添加至96孔平底透明板中。添加60μL4x浓缩BCA试剂并混合样品并在RT下无光放置90min。

[0267] 8.3吸光度分析

[0268] 在410-700nm范围内进行吸光度测量并使用562nm处的Abs来计算外脂质体表面上的肽的比例。由于脂质体因其大尺寸而散射光,故根据下通过从使用BCA测定所测量的脂质体吸光度减去背景吸光度来进行校正:

[0269] 外膜上的肽% = (Abs脂质体+BCA) - (Abs脂质体) / (Abs经裂解的脂质体+BCA) - (Abs经裂解的脂质体)

[0270] 8.4结果

[0271] 8.4.1线性

[0272] 为确定测定的线性范围,使用BCA测定,在6.25→100μM最终肽浓度范围内分析溶于PBS后的水溶性肽Ac1-15 (Polypeptides,France)的标准物。发现在此范围内具有良好线性($R^2 > 0.97$) (图7)。分析2倍稀释的ACI-24样品,此稀释意为60μM的理论肽浓度,其因此正好属于测定的线性范围。

[0273] 8.4.2特异性

[0274] 8.4.2.1 SDS的影响:为确保2.25%SDS洗涤剂的存在不会干扰测定,如针对脂质体样品所述在SDS中制备Ac1-15肽的标准物。如在图7中可发现,溶解于SDS中的Ac1-15给出与溶解于PBS中相比相似的标准曲线。

[0275] 8.4.2.2ACI-24脂质体样品的影响:ACI-24批次(方法L15)的吸光度谱显示于图8中。对于在PBS或SDS存在下用BCA试剂处理的ACI-24,都观察到了BCA-Cu(I)复合物特征性

的562nm处的强吸光度。对于没有用BCA试剂处理的PBS或SDS中的脂质体而言,未观察到峰。如所预期,在PBS中的单独的脂质体在562nm处给出背景吸光度,而用SDS裂解以给出微团的脂质体在410→700nm范围内仅显示小的吸光度。当校正背景吸亮度时,在PBS或SDS中的ACI-24的吸光度谱是相似的,仅在接近562nm处的信号强度有所不同(图9)。

[0276] 8.4.2.3脂质体基质的影响:为确定脂质体基质是否能干扰BCA测定,对与ACI-24相同但没有肽的脂质体批次(ACI-24E-100316)进行分析。如在图10中可发现,在562nm处未观察到峰,证实所观察到的ACI-24脂质体在562nm处的abs峰是由于肽的存在。

[0277] 8.4.2.4对于仅外膜上的肽的特异性:为测试使用以PBS稀释的脂质体实施的BCA测定是否仅与存在于外脂质体膜上的肽特异性反应,使用含有经囊封的水溶性肽Ac1-15(ACI-16)的脂质体批次进行测定。如在图11中可见,在562nm处基本上观察不到峰,由此证明仅暴露于双层外表面上的肽发生BOA反应。

[0278] 8.4.3精度

[0279] 为评估测定精度,使用方法L15制备的ACI-24批次(ACI-24-100316-A)实施一式三份(triplicate)分析。结果显示,PBS与SDS中的吸光度读数分别具有1.77%及0.57%变异系数(CV)(表13)。

[0280] 8.4.4批次分析

[0281] 比较使用不同方法制备的脂质体

[0282] 对ACI-24的不同批次进行分析以确定不同脂质体产生方法对肽在脂质体中的膜拓扑学的影响。所选择的批次的吸光度谱显示于图12中且总结于表14中。

[0283] 提供于表14中的结果在以下方面证实方法灵活性

[0284] ●体积,

[0285] ●佐剂(多于一种佐剂),

[0286] ●抗原(多于一种抗原),

[0287] ●脂组合物

[0288] 所述方面可用于本发明的方法。

[0289] 对批次分析实施测定显示,通过不同方法制备的脂质体具有不同比例的存在于外膜表面上的肽。特别地,发现用方法L15制备的脂质体比用薄膜方法A制备的脂质体展示出多接近30%的外表面上的肽。

[0290] 尽管已在附图及上文说明中详细地阐释及描述了本发明,但此类阐释及描述应视为阐释性或示例性且不具有限制性。应理解,本领域技术人员可在以下权利要求的范围及精神内作出变化及修改。特别地,本发明涵盖具有来自上文及下文所述不同实施方案的特征的任何组合的其他实施方案。

[0291] 本发明亦涵盖在附图中单独地显示的所有其他特征,尽管这些特征可能未在上文或以下描述中阐述。

[0292] 表

[0293] 表1.

[0294] ACI-24-100316-A

[0295]

特征	测试方法	结果
外观	目视检查	白色、乳状悬浮液
内含物 Pal1-15	HPLC	424 ug/ml
内含物膜结合的 Pal1-15	HPLC	98%
内含物 MPLA	HPLC	101 ug/ml
- 同类物 A	HPLC	99 ug/ml
- 同类物 B	HPLC	2 ug/ml
大小	DLS	110 nm
多分散性	DLS	0.25

[0296] 表2.

[0297] ACI-24-100316-B

[0298]

特征	测试方法	结果
外观	目视检查	白色、乳状悬浮液
内含物 Pal1-15	HPLC	482 ug/ml
内含物膜结合的 Pal1-15	HPLC	110%
内含物 MPLA	HPLC	103 ug/ml
- 同类物 A	HPLC	100 ug/ml
- 同类物 B	HPLC	3 ug/ml
大小	DLS	110 nm
多分散性	DLS	0.25

[0299] 表3.

[0300] ACI-24-100316-C

[0301]

特征	测试方法	结果
外观	目视检查	白色、乳状悬浮液
内含物 Pal1-15	HPLC	406 ug/ml
内含物膜结合的 Pal1-15	HPLC	93%
内含物 MPLA	HPLC	102 ug/ml
- 同类物 A	HPLC	99 ug/ml
- 同类物 B	HPLC	3 ug/ml
大小	DLS	110 nm
多分散性	DLS	0.25

[0302] 表4.

[0303] ACI-24-091127-A

[0304]

特征	测试方法	结果
外观	目视检查	白色、乳状悬浮液
内含物 Pal1-15	HPLC	647 ug/ml
内含物膜结合的 Pal1-15	HPLC	73%
内含物 MPLA	HPLC	250 ug/ml
- 同类物 A	HPLC	214 ug/ml
- 同类物 B	HPLC	36 ug/ml
大小	DLS	109 nm
多分散性	DLS	0.29

[0305] 表5.

[0306] ACI-24-091127-B

[0307]

特征	测试方法	结果
外观	目视检查	白色、乳状悬浮液
内含物 Pal1-15	HPLC	543 ug/ml
内含物膜结合的 Pal1-15	HPLC	88%
内含物 MPLA	HPLC	884 ug/ml
- 同类物 A	HPLC	818 ug/ml
- 同类物 B	HPLC	66 ug/ml
大小	DLS	117 nm
多分散性	DLS	0.30

[0308] 表6.

[0309] ACI-33-091127

[0310]

特征	测试方法	结果
外观	目视检查	白色、乳状悬浮液
内含物 T1	HPLC	348 ug/ml
内含物膜结合的 T1	HPLC	87%
内含物 MPLA	HPLC	96 ug/ml
- 同类物 A	HPLC	81 ug/ml
- 同类物 B	HPLC	15 ug/ml
大小	DLS	106 nm
多分散性	DLS	0.18

[0311] 表7.

[0312] ACI-33-091808-A

[0313]

特征	测试方法	结果
外观	目视检查	白色、乳状悬浮液
内含物 T1	HPLC	63 ug/ml
内含物膜结合的 T1	HPLC	ND
内含物 MPLA	HPLC	79 ug/ml
- 同类物 A	HPLC	79 ug/ml
- 同类物 B	HPLC	0 ug/ml
大小	DLS	ND
多分散性	DLS	ND

[0314] 表8.

[0315] ACI-35-091127

[0316]

特征	测试方法	结果
外观	目视检查	白色、乳状悬浮液
内含物 T3	HPLC	321 ug/ml
内含物膜结合的 T3	HPLC	109%
内含物 MPLA	HPLC	101 ug/ml
- 同类物 A	HPLC	96 ug/ml
- 同类物 B	HPLC	5 ug/ml
大小	DLS	102 nm
多分散性	DLS	0.25

[0317] 表9.

[0318] ACI-35-0910820-A

[0319]

特征	测试方法	结果
外观	目视检查	
内含物 T3	HPLC	61 ug/ml
内含物膜结合的 T3	HPLC	ND
内含物 MPLA	HPLC	141 ug/ml
- 同类物 A	HPLC	141 ug/ml
- 同类物 B	HPLC	0 ug/ml
大小	DLS	ND
多分散性	DLS	ND

[0320] 表10.

[0321] ACI-41-100531

[0322]

特征	测试方法	结果
外观	目视检查	
内含物T8	HPLC	362ug/ml
内含物T9	HPLC	189ug/ml
内含物MPLA	HPLC	93ug/ml
-同类物A	HPLC	88ug/ml
-同类物B	HPLC	5ug/ml
大小	DLS	79nm
多分散性	DLS	0.25

[0323] 表11.

[0324] ACI-24方法D#1

[0325]

特征	测试方法	结果
外观	目视检查	白色、乳状 悬浮液
内含物Pal1-15	HPLC	388 ug/ml
内含物膜 结合的Pal1-15	HPLC	ND
内含物MPLA	HPLC	58 ug/ml
- 同类物 A	HPLC	12 ug/ml
- 同类物 B	HPLC	46 ug/ml
大小	DLS	115 nm
多分散性	DLS	0.14

[0326] 表12.

[0327] ACI-24方法D#2

[0328]

特征	测试方法	结果
外观	目视检查	白色、乳状 悬浮液
内含物Pal1-15	HPLC	375 ug/ml
内含物膜 结合的Pal1-15	HPLC	ND
内含物MPLA	HPLC	52 ug/ml
- 同类物 A	HPLC	11 ug/ml
- 同类物 B	HPLC	41 ug/ml
大小	DLS	105 nm
多分散性	DLS	0.15

[0329] 表13.

[0330]

样品条件	Abs 1	Abs 2	Abs 3			
具有BCA的SDS	1.174	1.152	1.157			
无 BCA 的 SDS	0.052	0.042	0.045	平均	S.D.	CV (%)
差异	1.122	1.110	1.112	1.115	0.006	0.57
具有 BCA 的 PBS	1.315	1.313	1.281			
无 BCA 的 PBS	0.464	0.454	0.451	平均	S.D.	CV (%)
差异	0.852	0.859	0.830	0.847	0.015	1.77

[0331] 表14.

[0332]

生产方法	在脂质体 形成之前 或之后 添加肽	批次 名称	外膜上 的相对 的肽 (%)	大小 (nm)	MPLA 水解	过滤性	可扩缩	方法 灵活性	在脂质 体形成 后添加 抗原	在脂质 体形成 后添加 佐剂
A(薄膜) 如 WO2007/ 068411 所述	之前	ACI-24- 090813-A	54	>500 nm	否	否	否	低	否	否
D(交叉流 动乙醇 注射)	之前	ACI24010 8-B	62	96	是	是	是	低	否	否
		ACI24070 9-A	58	115	是	是	是	低	否	否
		ACI24100 8-A	67	97	是	是	是	低	否	否
		ACI24090 8-A	64	105	是	是	是	低	否	否
L15	之后	ACI-24- 091016-B	81	116	否	是	是	高	是	否
		ACI-24- 100316-A	81	110	否	是	是	高	是	否
L16 L20	之后	ACI-24- 091127-A	82	109	否	是	是	高	是	是
		ACI-24- 091127-B	84	117	否	是	是	高	是	是
		ACI-24- 100317-C	72	113	否	是	是	高	是	是
		ACI001J	84	101	否	是	是	高	是	否

[0333] “方法灵活性”意为方法可以用于多种

[0334] 体积,

[0335] 佐剂(多于一种佐剂),

[0336] 抗原(多于一种抗原),

[0337] 脂组合物

[0338] 参考文献列表

[0339] Allen等人,Cellular & Molecular Biology Letters,2002,7,217-219

[0340] Allison及Gregoriadis,Nature,1974,252,252

[0341] Alving等人,Immunol Rev 1995;145:5

[0342] Frisch,Eur J Immunol 1991;21:185

[0343] Gill等人,Nature Med.9:589-595 (2003)

- [0344] Guan等人,Bioconjugate Chem,1998,9,451-458
- [0345] Harlow及Lane,Antibodies:A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory,New York 1988 555-612
- [0346] Hodgson等人,Bio/Technology,9:421 (1991)
- [0347] Huang等人,1997,Carcinogenesis18,83-88
- [0348] IUPAC.Compendium of Chemical Terminology,第2版(the“Gold Book”)。A.D.McNaught及A.Wilkinson编译.Blackwell Scientific Publications,Oxford(1997).XML在线校正版:<http://goldbook.iupac.org>(2006-),M.Nic,J.Jirat,B.Kosata创建;A.Jenkins编译更新。
- [0349] Kennedy,J.H.等人,1976(Clin.Chim.Acta70:1-31)
- [0350] Kersten及Crommelin,Biochimica et Biophysica Acta 1995,1241,117-138
- [0351] Khaw,B.A.等人J.Nucl.Med.23:1011-1019 (1982)
- [0352] Moreira等人,Pharmaceutical Research,2002,19,265-269
- [0353] Muhs等人,PNAS,2007,104,9810-9810
- [0354] Neuwelt,E.A.,Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation,第1&2卷,Plenum Press,N.Y. (1989))
- [0355] Nicolau等人,PNAS,2002,99,2332-2337;W02007/068411
- [0356] Queen等人,Proc.Natl Acad Sci USA,86:10029-10032 (1989)
- [0357] Papanastassiou等人,Gene Therapy9:398-406 (2002)
- [0358] Rousseaux等人,Methods Enzymology,121:663-69,Academic Press,1986
- [0359] Schurs,A.H.W.M.等人,1977(Clin.Chim Acta 57:1-40)
- [0360] Torchilin,Nature Reviews,2005,4,145-160
- [0361] Weiss,R.B.等人,Drugs,46 (3) :360-377 (1993)
- [0362] Zrein等人,Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology,第5卷,No.1:45-49
- [0363] 专利文献:
- [0364] 美国专利第5,855,866号,第5,965,132号,第6,261,535号,第6,051,230号及第6,451,312号
- [0365] 美国专利第6,093,399号,第6,004,555号,第5,877,289号及第6,036,955号
- [0366] 美国专利第5,112,596号,第5,268,164号,第5,506,206号及第5,686,416号
- [0367] 美国专利第5,004,697号
- [0368] 美国专利第5,620,689号
- [0369] 美国专利第5,620,689号
- [0370] US 20020065259,2003/0162695,和2005/0124533
- [0371] US 20100119444
- [0372] US 20020038086
- [0373] US 20020025313
- [0374] US 20030083299
- [0375] US 20030229013

- [0376] US 20030073713
- [0377] US 20030129186
- [0378] US 20030229013
- [0379] US 20050089473
- [0380] WO 96/13590
- [0381] WO 96/29605
- [0382] WO 2004/058258
- [0383] WO 2007/068411

序列表

<110> AC免疫有限公司 等人

<120> 制备抗原性构建体

<130> S1914 PCT BS

<150> EP 10 18 8832.9

<151> 2010-10-26

<160> 12

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (18)..(18)

<223> /替代="磷酸化的丝氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (26)..(26)

<223> /替代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 1

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

[0001]

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

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (14)..(14)

<223> /替代="磷酸化的酪氨酸"

<400> 2

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

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (7)..(7)

<223> /替代="磷酸化的苏氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (9)..(9)

<223> /替代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 3

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

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 变体
<222> (7).. (7)
<223> /替代="磷酸化的丝氨酸"

<220>
<221> 变体
<222> (10).. (10)
<223> /替代="磷酸化的苏氨酸"

<400> 4

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

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

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

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

<400> 5

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

<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> 人

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

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

<400> 6

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

Ile Asp

[0002]

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人

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

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

<220>
 <221> 变体
 <222> (13)..(13)
 <223> /替代="磷酸化的苏氨酸"

<220>
 <221> 变体
 <222> (15)..(15)
 <223> /替代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 7

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

Pro

[0003]

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人

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

<400> 8

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

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> 变体
 <222> (6)..(6)
 <223> /替代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 9

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

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 10

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

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (1)..(1)

<223> /替代="乙酰化的赖氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (2)..(2)

<223> /替代="乙酰化的赖氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (18)..(18)

<223> /替代="乙酰化的赖氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (19)..(19)

<223> /替代="乙酰化的赖氨酸"

<400> 11

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

[0004]

His Gln Lys Lys

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (1)..(1)

<223> /替代="棕榈酰化的赖氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (2)..(2)

<223> /替代="棕榈酰化的赖氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (18)..(18)

<223> /替代="棕榈酰化的赖氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (19)..(19)

<223> /替代="棕榈酰化的赖氨酸"

<400> 12

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

His Gln Lys Lys

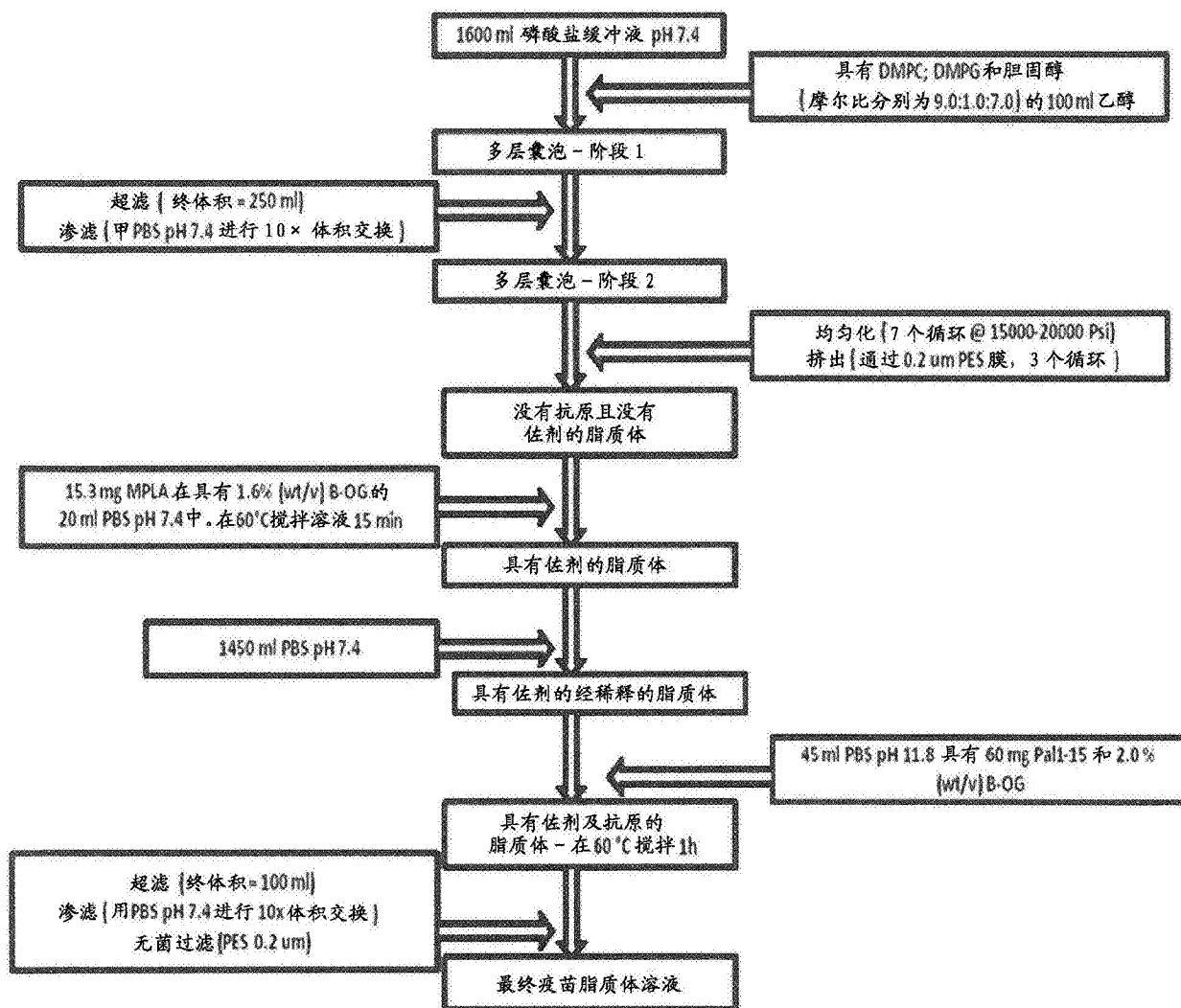


图1

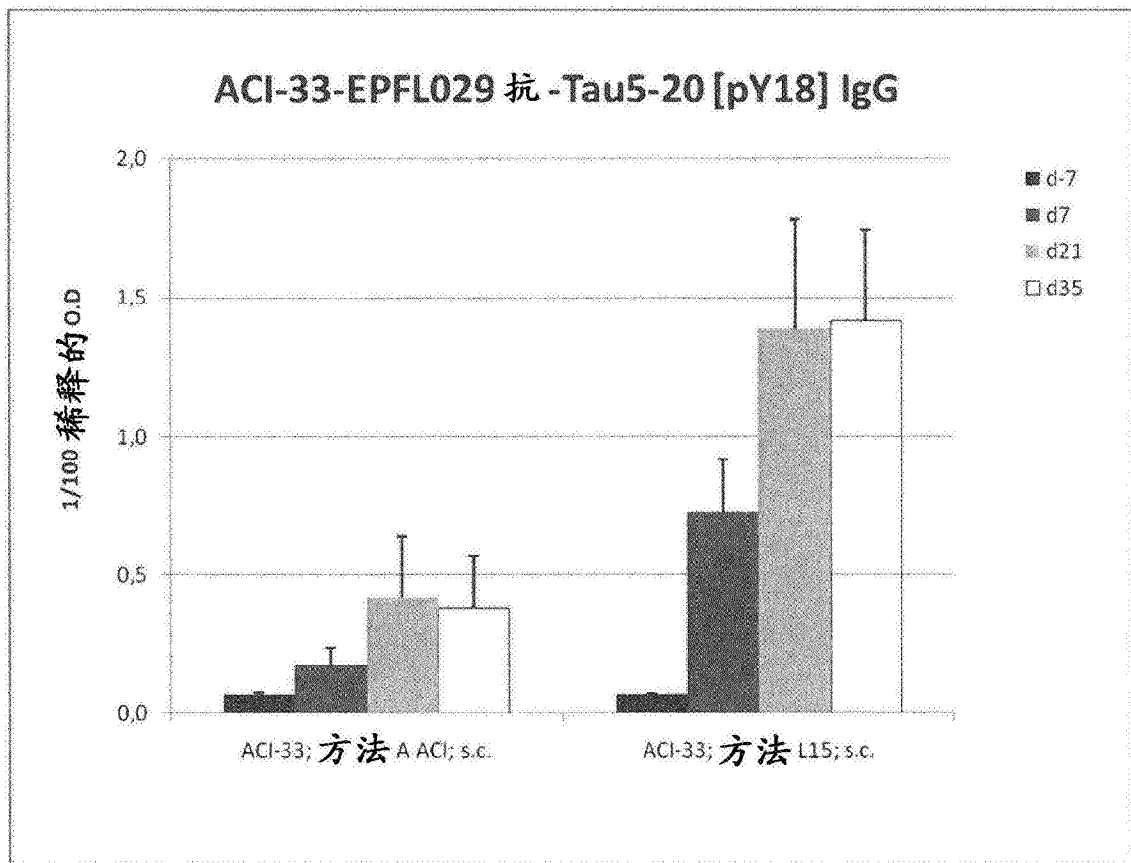


图2

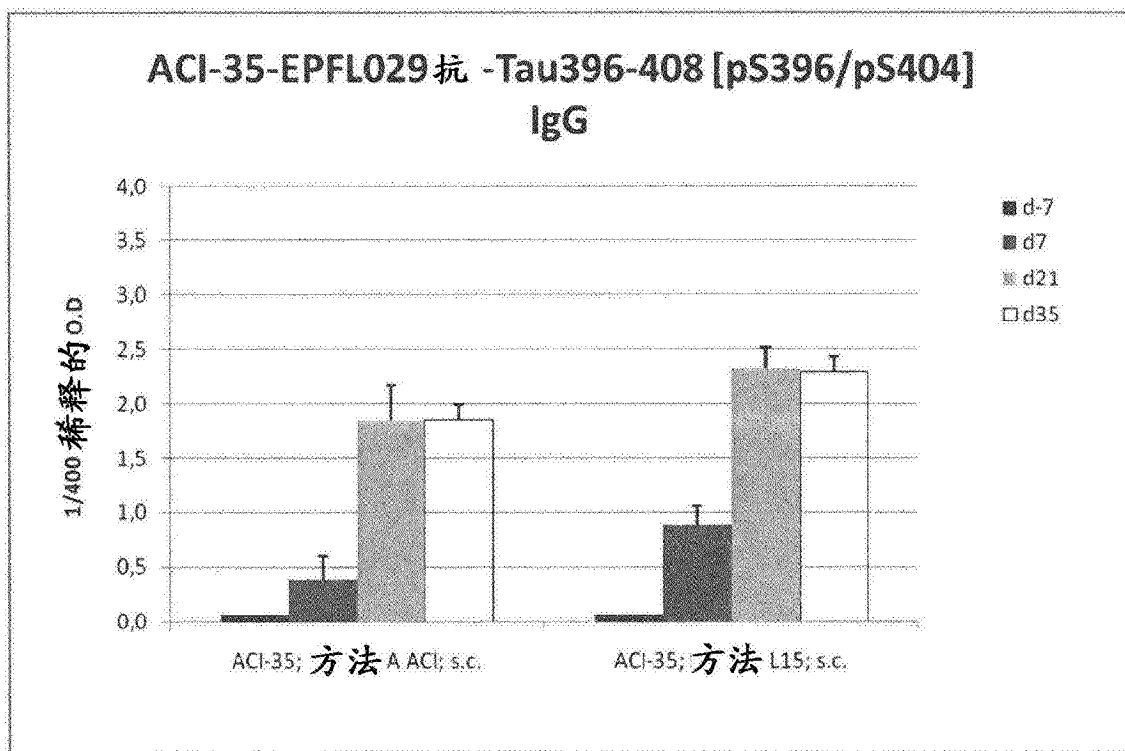


图3

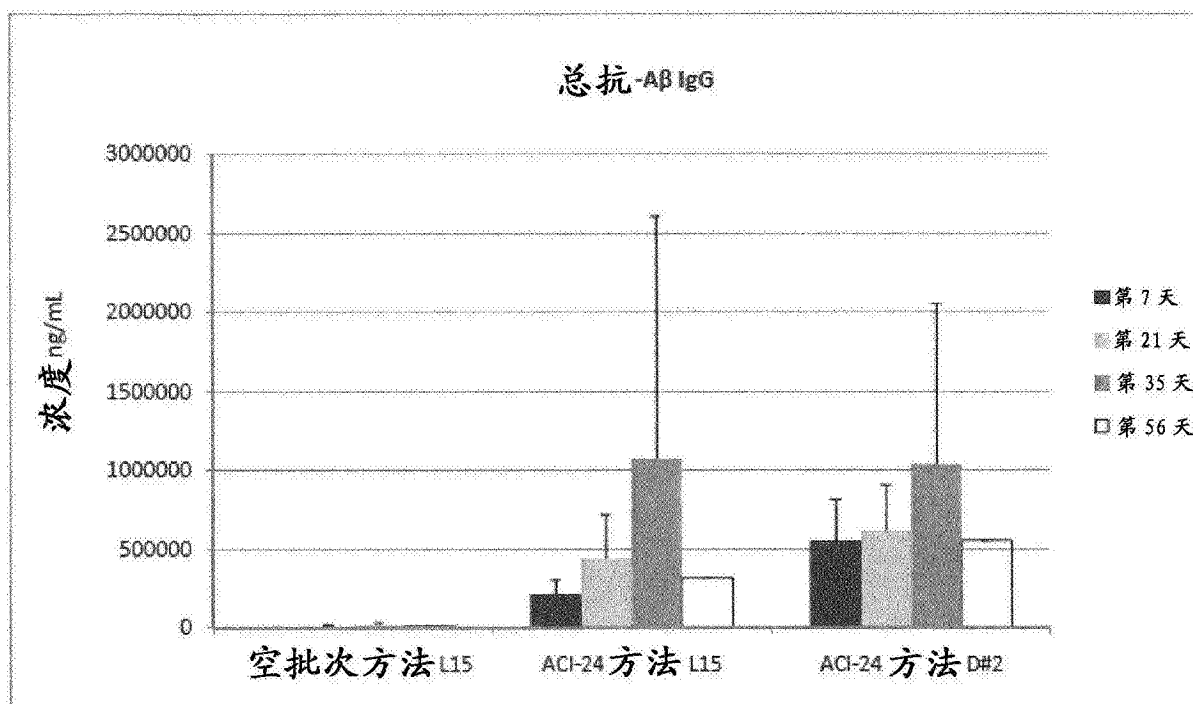


图4

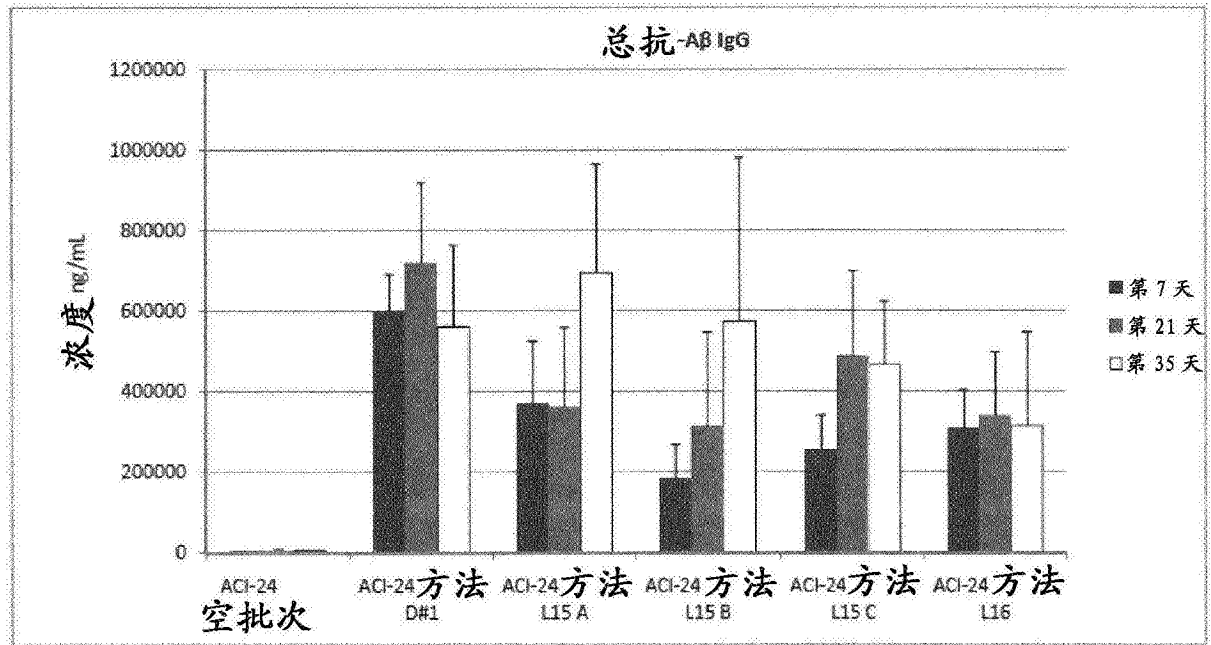


图5

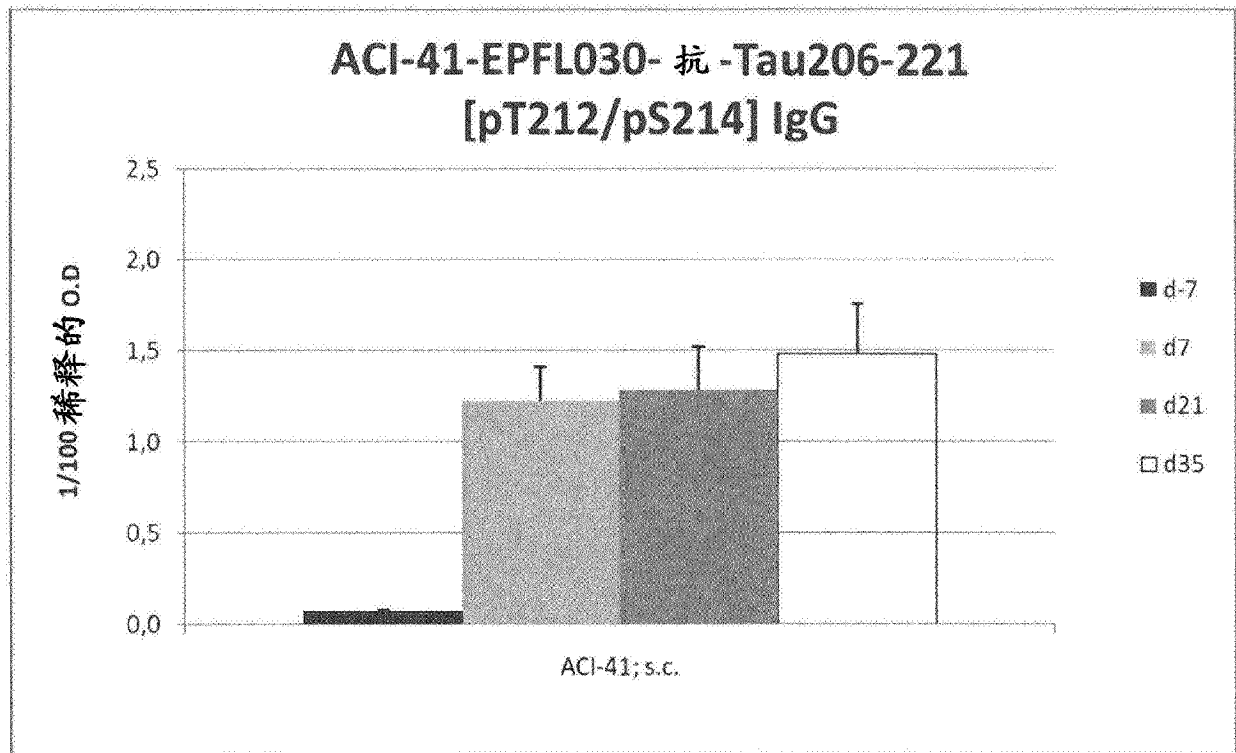


图6a

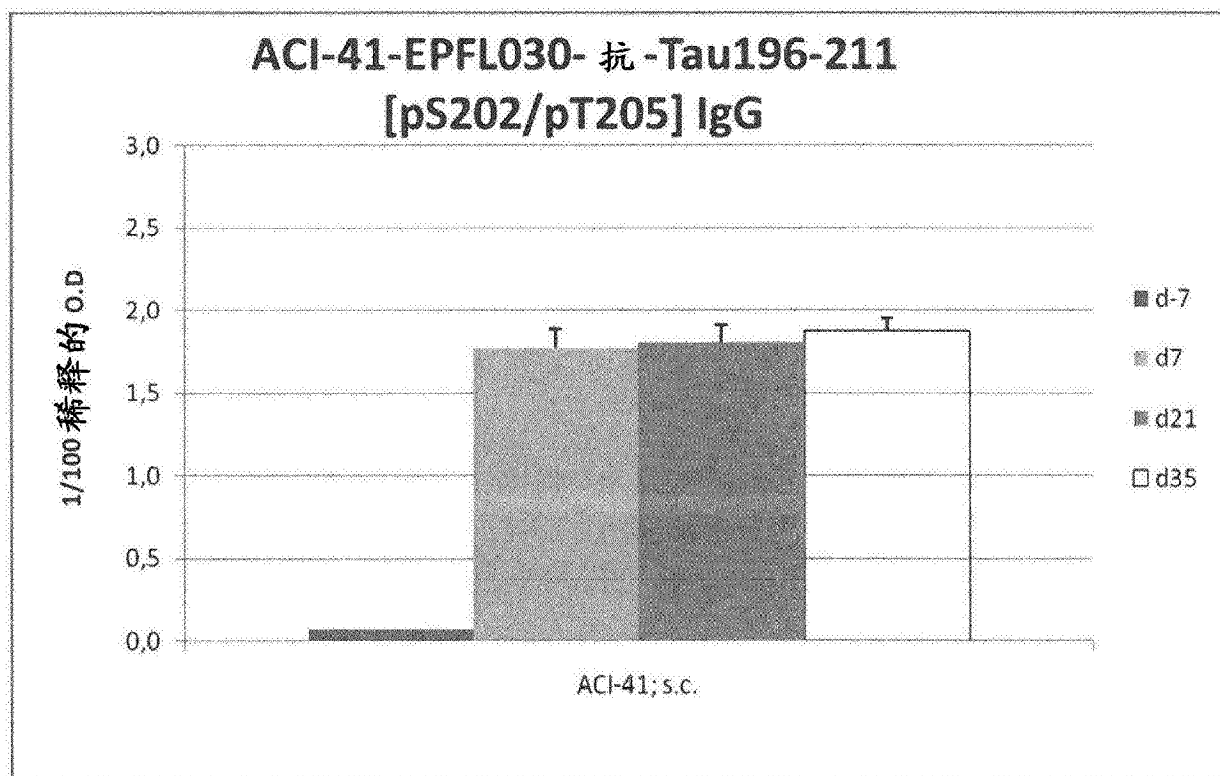


图6b

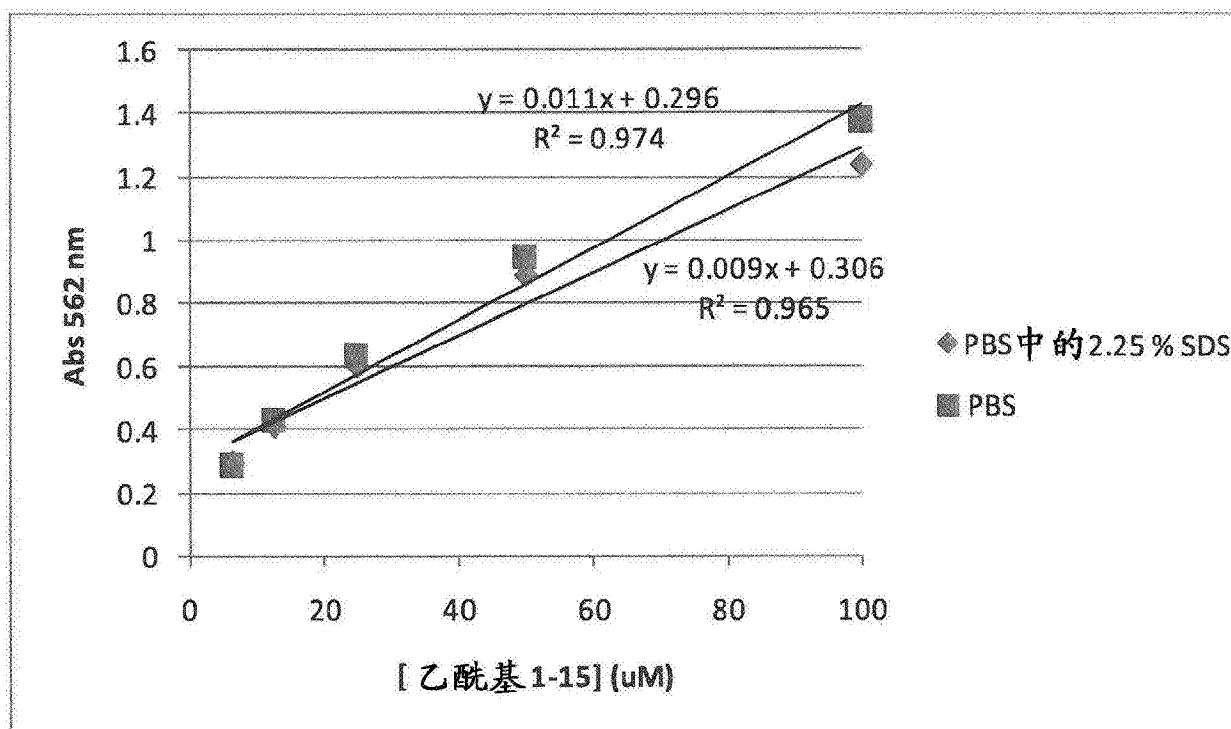


图7

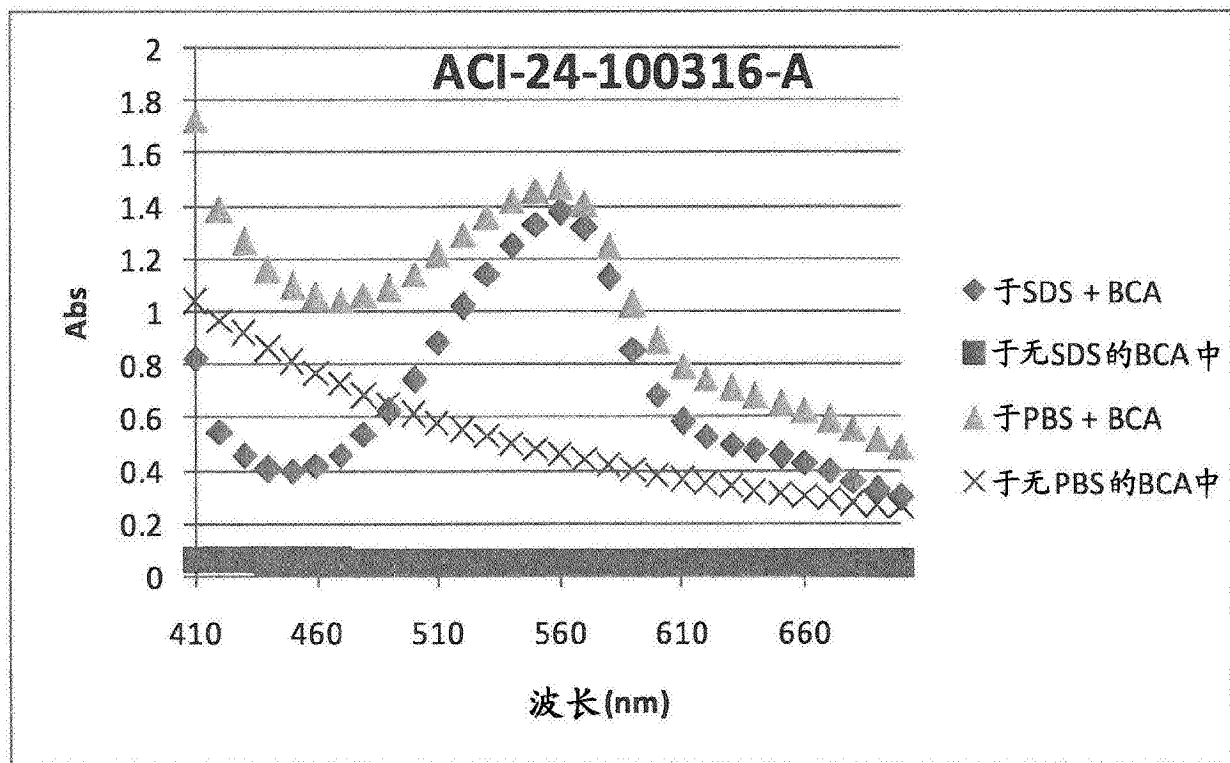


图8

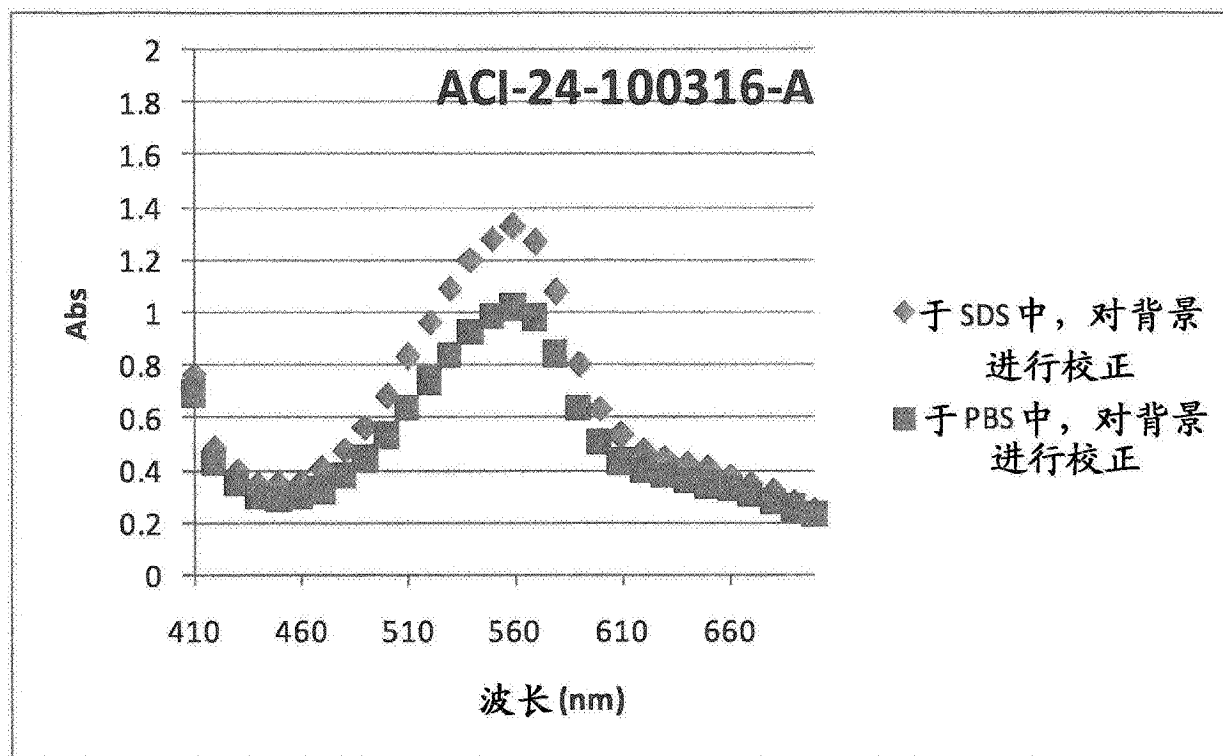


图9

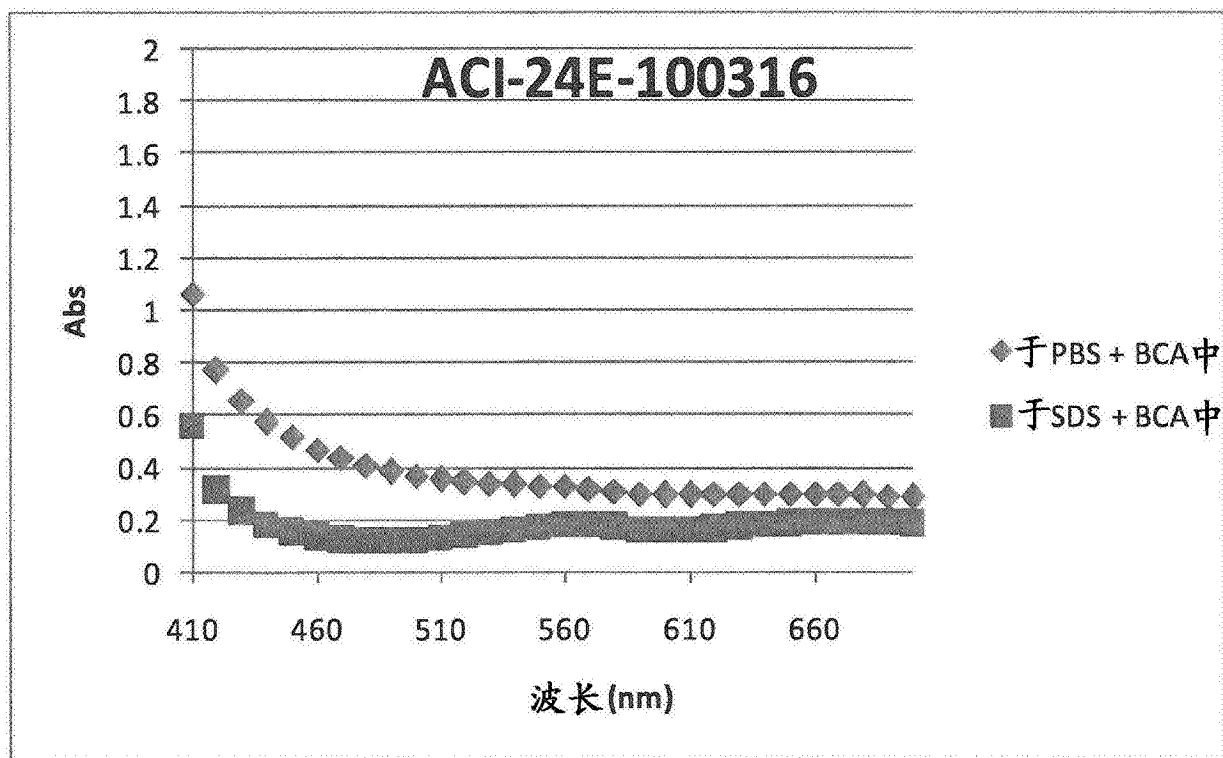


图10

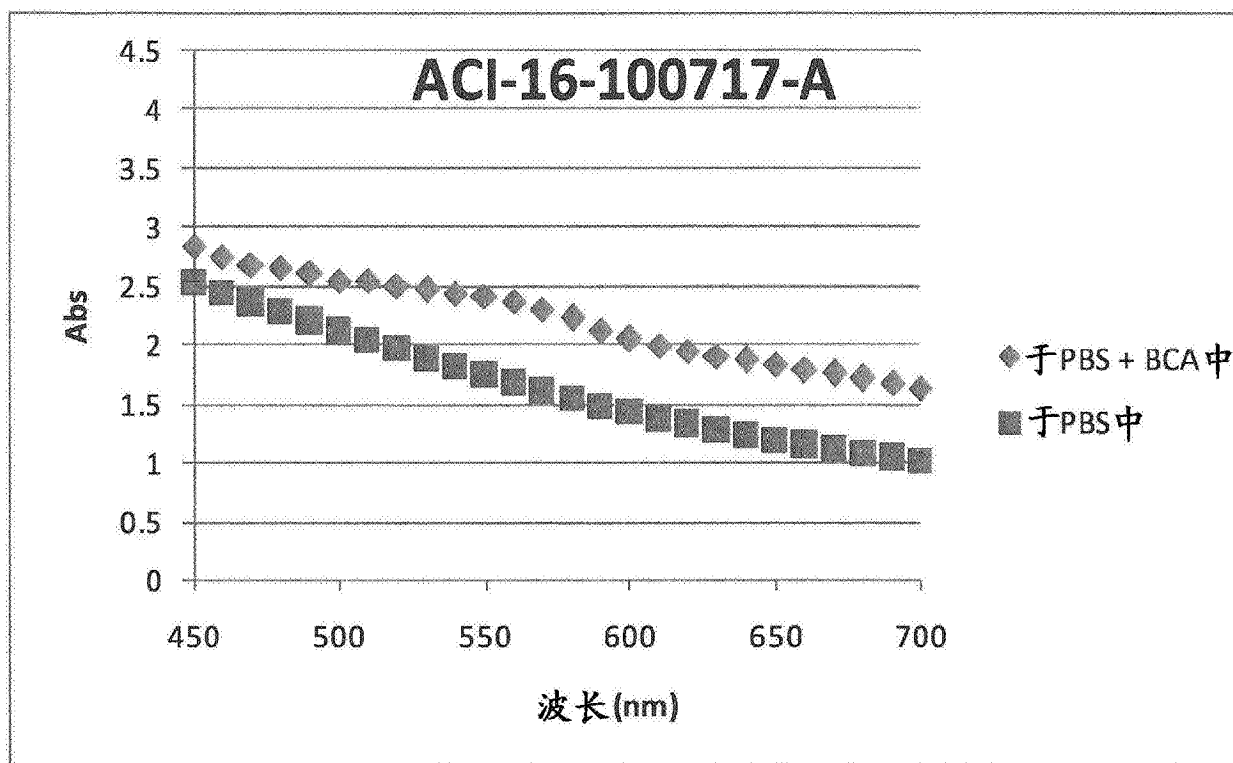


图11

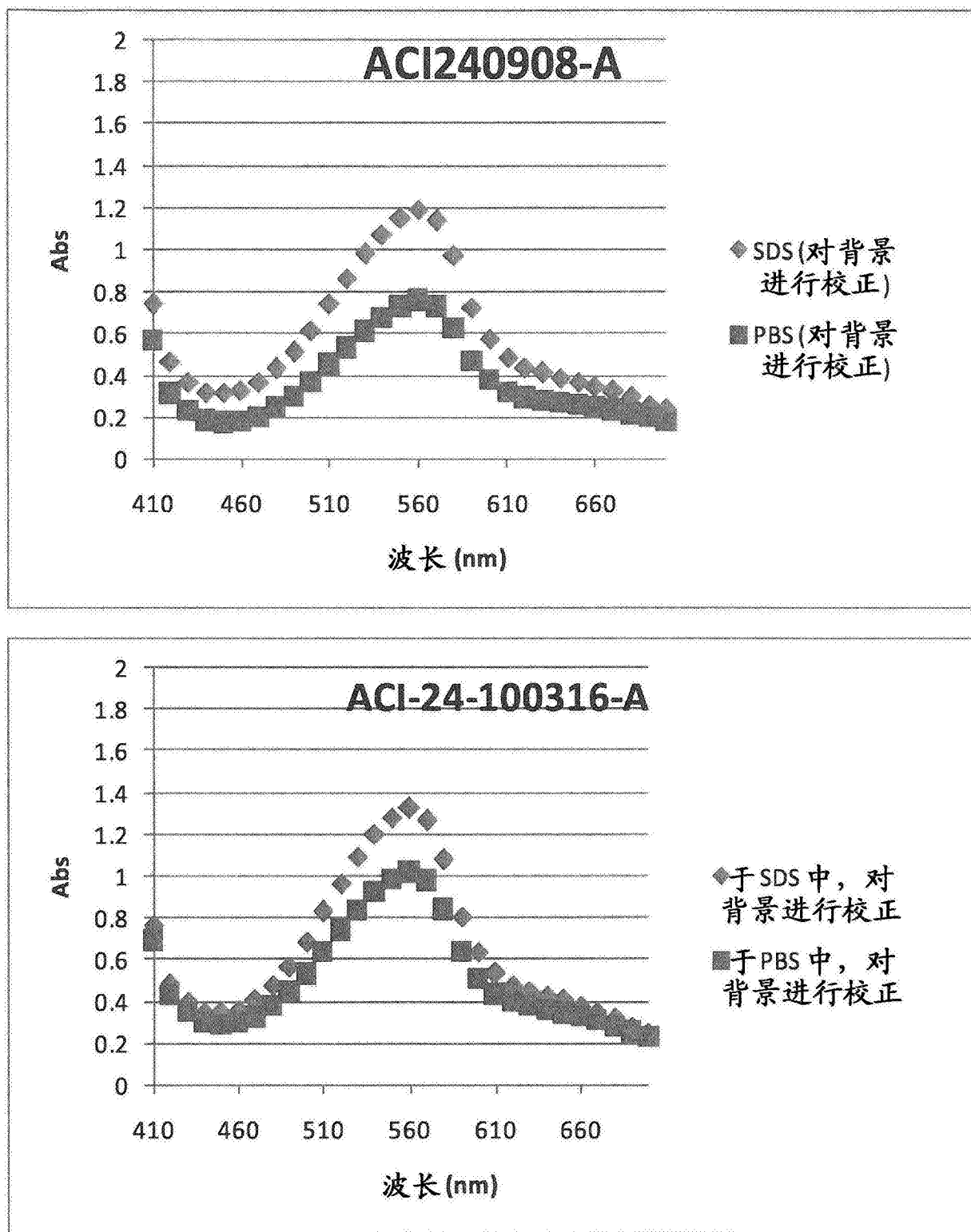


图12

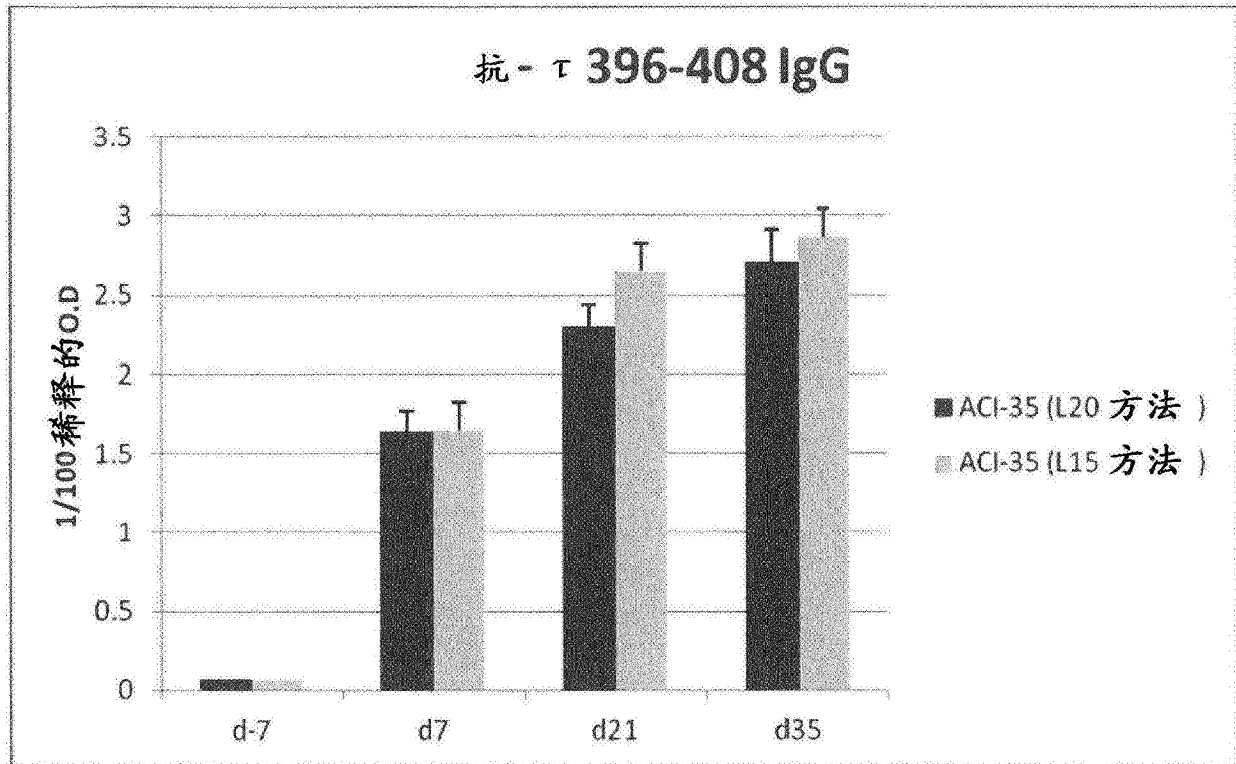


图13

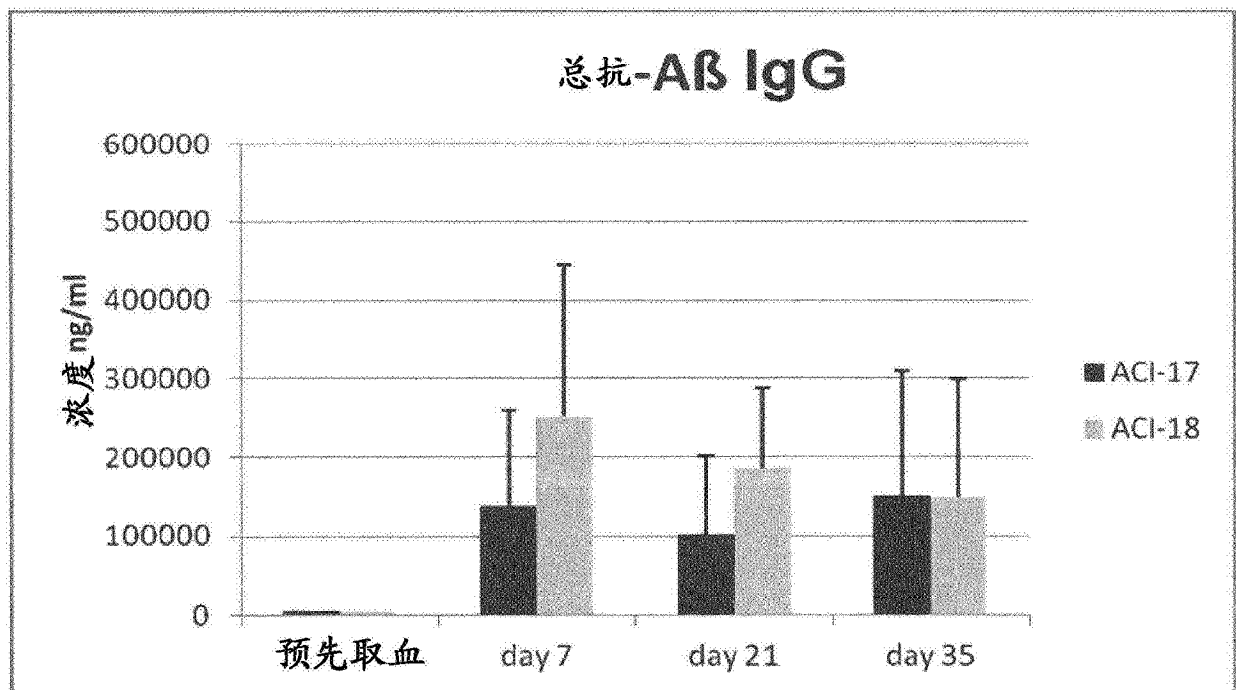


图14