



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105524160 B

(45)授权公告日 2019.07.19

(21)申请号 201510822296.X

专利权人 鲁汶大学

(22)申请日 2010.04.01

(72)发明人 A·普法伊费尔 A·穆斯

F·范勒旺 M·皮尔格伦

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105524160 A

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

(43)申请公布日 2016.04.27

代理人 凌立 黄革生

(30)优先权数据

09157303.0 2009.04.03 EP

(51)Int.Cl.

C07K 14/47(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

(62)分案原申请数据

201080024398.2 2010.04.01

(83)生物保藏信息

DSM ACC3043 2010.03.03

DSM ACC3044 2010.03.10

DSM ACC3045 2010.03.10

DSM ACC3046 2010.03.10

DSM ACC3047 2010.03.10

DSM ACC3048 2010.03.10

DSM ACC3049 2010.03.10

DSM ACC3050 2010.03.10

(56)对比文件

US 2008050383 A1,2008.02.28,

WO 9822120 A1,1998.05.28,

WO 2007068105 A1,2007.06.21,

CN 101330923 A,2008.12.24,

审查员 黄炎

(73)专利权人 AC免疫有限公司

地址 瑞士洛桑

权利要求书3页 说明书66页

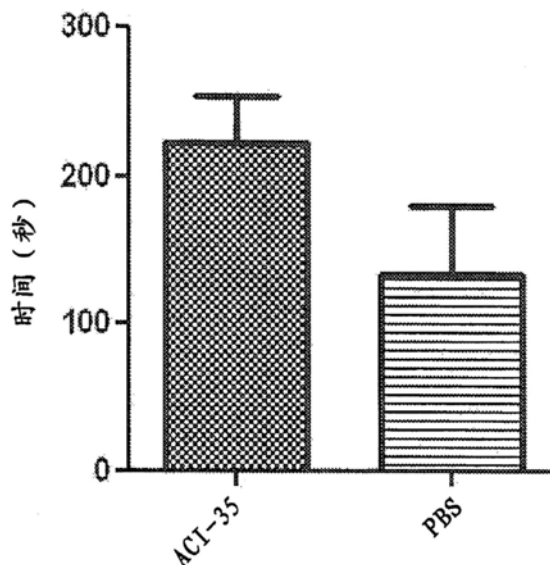
序列表4页 附图29页

(54)发明名称

药物组合物

(57)摘要

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



1. 产生抗原构建体的方法,其包括

i) 获得肽或其功能片段,所述肽或其功能片段是模拟tau蛋白的病理磷酸化表位的磷酸肽或其功能片段,

ii) 通过与便于插入脂质体的脂双层的亲脂或疏水部分与抗原肽或其功能片段的每个末端共价连接修饰所述肽,所述亲脂或疏水部分是含有C12和C24之间的碳链的脂肪酸、甘油三酯或磷脂;且

iii) ii) 的修饰的肽重构在脂质体中,由此所述肽呈递在脂质体的表面上,

其中所述抗原肽具有如下所示的氨基酸序列:

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

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

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

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

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

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

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

h. SEQ ID NO:9,其中对应于SEQ ID NO:9的氨基酸残基404 (P-Ser<sub>404</sub>) 的氨基酸残基是磷酸化的。

2. 权利要求1的方法,其中所述i) 的抗原肽或其功能片段通过固相肽合成获得,其中将序列的C端氨基酸与不可溶支持物连接,然后连续添加序列中的其余氨基酸。

3. 权利要求1或2的方法,其中亲脂或疏水部分与抗原肽或其功能片段的每个末端的共价连接通过氨基酸残基介导,所述氨基酸残基在N端和C末端延伸抗原肽或其功能片段的氨基酸序列。

4. 权利要求2或3的方法,其中包括:

i) 用标准Fmoc/tBu化学,通过固相肽合成逐步组装抗原肽,

ii) 去除末端氨基酸的正交保护基团,和

iii) 用棕榈酸酰化自由侧链基团。

5. 权利要求1-4中任一项的方法,其中i) 的抗原肽或其功能片段通过重组核酸法获得,所述重组核酸法包括:

i) 产生编码权利要求1中定义的肽或其片段的核酸序列,

ii) 将核酸放置在表达盒的特定启动子控制下,

iii) 在宿主中表达肽或其功能片段,

iv) 分离所表达的肽或其片段,并根据需要

v) 复性肽或其片段。

6. 权利要求1-5中任一项的方法,其中通过与抗原肽的N端和C末端末端共价结合至少两分子棕榈酸,来修饰所述抗原肽或其功能片段。

7. 权利要求6的方法,其中抗原肽或其功能片段偶联四分子棕榈酸。

8. 权利要求1-7中任一项的方法,其中脂质体由选自二豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(DMPEA)、二豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)和胆固醇的组分组成。

9. 权利要求1-8中任一项的方法,其中抗原构建体包含佐剂。

10. 权利要求9的方法,其中佐剂选自脂质A、磷酸钙、白细胞介素1、多糖和蛋白质的微囊、去毒脂质A,和明矾。

11. 权利要求10的方法,其中佐剂是单磷酸脂质A或二磷酸脂质A。

12. 产生组合物的方法,所述组合物包含权利要求1-11中任一项定义的抗原构建体,所述方法包括将抗原构建体与可药用载体、稀释剂和/或赋形剂一起配制。

13. 权利要求12的方法,其中抗原构建体包含含有佐剂、免疫调节剂或二者的脂质体。

14. 权利要求12或13的方法,其中抗原构建体包含SEQ ID NO:5的抗原肽,所述抗原肽通过棕榈酸与其每个末端共价结合而修饰。

15. 权利要求12或13的方法,其中抗原构建体包含SEQ ID NO:3的抗原肽,所述抗原肽通过棕榈酸与其每个末端共价结合而修饰。

16. 权利要求12或13的方法,其中抗原构建体包含SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的抗原肽,所述抗原肽通过棕榈酸与其每个末端共价结合而修饰。

17. 权利要求12-16中任一项的方法,其中SEQ ID NO:5的抗原肽、SEQ ID NO:3的抗原肽,和SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的抗原肽是四棕榈酰化肽,其中两个棕榈酸部分与抗原肽的每个末端结合。

18. 权利要求12-17中任一项的方法,其中免疫调节剂是去毒脂质A。

19. 权利要求14的方法,其中抗原肽是SEQ ID NO:5的肽,所述肽是四棕榈酰化的,且佐剂是单磷酸脂质A。

20. 权利要求19的方法,其中两分子棕榈酸与抗原肽的N末端末端共价连接,且两分子棕榈酸与抗原肽的C末端末端共价连接。

21. 药物组合物,其包含重构在脂质体中的SEQ ID NO:5的抗原肽,还包含可药用佐剂和/或免疫调节剂,所述抗原肽通过棕榈酸与其每个末端共价结合而修饰。

22. 药物组合物,其包含重构在脂质体中的SEQ ID NO:3的抗原肽,还包含可药用佐剂和/或免疫调节剂,所述抗原肽通过棕榈酸与其每个末端共价结合而修饰。

23. 药物组合物,其包含重构在脂质体中的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的抗原肽,还包含可药用佐剂和/或免疫调节剂,所述抗原肽通过棕榈酸与其每个末端共价结合而修饰。

24. 权利要求21-23中任一项的药物组合物,其中SEQ ID NO:5的抗原肽、SEQ ID NO:3的抗原肽,和SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的抗原肽是四棕榈酰化肽,其中两个棕榈酸部分与抗原肽的每个末端结合。

25. 权利要求21-24中任一项的药物组合物,其中免疫调节剂是去毒脂质A。

26. 权利要求21的药物组合物,其包含四棕榈酰化的SEQ ID NO:5的肽,和单磷酸脂质A。

27. 权利要求26的药物组合物,其中两分子棕榈酸与抗原肽的N端末端共价连接,且两分子棕榈酸与抗原肽的C端末端共价连接。

28. 权利要求21-27中任一项的药物组合物,其用于治疗阿尔茨海默病。

29. 使用权利要求21-28中任一项的药物组合物,来制备用于预防和/或治疗性治疗阿尔茨海默病的影响的药物组合物的方法。

30. 权利要求29的方法,其中所述药物是用于减轻阿尔茨海默病的影响的药物。



## 药物组合物

[0001] 本申请是申请人于2010年4月1日提交的题为“药物组合物”的中国专利申请201080024398.2的分案申请。

[0002] 本发明涉及在由神经原纤维缠结引起或与神经原纤维缠结相关的疾病和障碍的治疗中用于治疗 and 诊断用途的方法和组合物。具体而言,本发明涉及在包括阿尔茨海默病(AD)的tau病(tauopathy)的治疗中用于治疗 and 诊断用途的方法和组合物。

[0003] 神经原纤维缠结是AD中主要的神经病理学标志。它们通过超磷酸化tau蛋白及其构象异构体的聚集而发生。AD与许多神经变性tau病,尤其是与指定类型的额颞痴呆(FTD)共享此病理。

[0004] Tau蛋白是积极与微管(MT)结合来促进它们的组装和稳定性的易溶、“天然未折叠”的蛋白质。MT对神经元的细胞骨架完整性具有重要意义——从而对神经元回路的正确形成和执行功能具有重要意义,因此对学习和记忆具有重要意义。如主要在体外和在非神经元细胞中所表明,tau与MT的结合受动态的磷酸化和去磷酸化控制。由于许多可能的磷酸化位点(>80),基本上仍未在体内确定各位点的确切贡献和负责的激酶的同源性。

[0005] 在AD脑中,tau病理发展晚于淀粉状蛋白病理,并因此很可能响应于淀粉状蛋白病理,这构成淀粉状蛋白级联假说的精髓。这基于AD和唐氏综合症患者中的研究并由这些研究显示,并为具有组合的淀粉状蛋白病理和tau病理的转基因小鼠中的研究所证明(Lewis等,2001;Oddo等,2004;Ribe等,2005;Muyllaert等,2006;2008;Terwel等,2008)。

[0006] 两种病理在人AD患者中的精确计时以及将淀粉状蛋白病理与tau病理相联系的机制基本上仍未知,但已提出其涉及神经元信号传导途径的活化,该途径作用于作为主要“tau激酶”的GSK3和cdk5,或者通过GSK3和cdk5发挥作用(Muyllaert等,2006,2008的综述)。

[0007] tau病不是AD中无害的副作用而是主要的病理执行者的假说基于彼此充分证实的可靠的遗传、病理和实验观察:

[0008] ■在由淀粉状蛋白前体(APP)或早老蛋白中的突变引起的早发型家族性AD病例中,专性病因是淀粉状蛋白累积,但与迟发型散发性AD病例中的情况一致,病理毫无例外地包含并发的tau病;

[0009] ■最近通过几项临床1期和2期研究例证,认知功能障碍和痴呆的严重度与tau病相关,而不与淀粉状蛋白病理相关,该研究包括淀粉状蛋白的PIB-PET成像,并鉴定了许多“假阳性”:具有高脑淀粉状蛋白负荷的认知正常个体;

[0010] ■在家族性FTD中,tau病由突变体tau引起,并在无淀粉状蛋白病理的情况下直接引起神经变性;

[0011] ■在实验小鼠模型中,tau蛋白的存在几乎完全缓解了由淀粉状蛋白病理引起的认知缺陷(Roberson等,2007)。

[0012] 组合的论据支持tau蛋白是AD和相关神经变性tau病中的认知死亡中的主要参与者的假说。

[0013] 突出涌现的AD治疗是通过使用特异性mAb的被动免疫治疗来清除推测具有神经毒

性或突触毒性的淀粉状肽和它们的聚集物。

[0014] 预期此处提出的靶向tau病理的免疫治疗对抗已知或推测引起神经变性的病理tau蛋白构象异构体。已提出AD中的淀粉状蛋白病理和神经元内超磷酸化tau蛋白聚集物在导致从轻微认知损伤(MCI)至AD的严重痴呆的病理事件的认知和变性级联中协同作用。因此,定向tau的药疗法与定向淀粉状蛋白(或任意其他)的药疗法的组合将构成优选的,且基本上更有效的AD治疗。

[0015] 靶向tau蛋白的其他治疗途径少见,且主要包括:

[0016] ■认为其将tau的磷酸化增加至病理水平的激酶的抑制剂;

[0017] ■阻断超磷酸化tau蛋白的胞质聚集的化合物。

[0018] 这些途径具有特异性和功效的多种缺点,这是它们与修饰APP和淀粉状蛋白的代谢的尝试所共有的问题,这些全都强调继续寻找包括针对tau的免疫治疗的其他治疗选择的重要性。

[0019] 实际上,尚未致力于在体内确定——更不必说靶向——病理tau构象异构体。在A $\beta$ 42的II期临床试验中,似乎未很好地考虑也未较深入地分析缠结病理(Nicoll等,2003;Masliah等,2005)。另一方面,虽然tau聚集物存留,但在具有组合的AD样病理的临床前小鼠模型中靶向淀粉状蛋白的实验性免疫治疗也显示对tau病理的作用(Oddo等,2004)。

[0020] 已对通过免疫治疗接近胞内tau蛋白的可行性提出了一些质疑。Asuni和同事最近在tau病小鼠模型中的实验研究(Asuni等,2007)反击了这些质疑。他们通过用tau蛋白衍生的磷酸肽接种显示了缠结病理的减少和功能改善。这些数据支持之前的报道:在帕金森综合症(PD)模型中靶向 $\alpha$ -突触核蛋白(Masliah等,2005)和在肌萎缩性侧索硬化(ALS)模型中靶向超氧化物歧化酶(Urushitiani等,2007)的免疫治疗。这两种疾病是通过尚未充分了解的机制导致神经变性的胞内蛋白质的实例。另一方面,在细菌中产生并从细菌分离的全长重组tau蛋白质似乎不适合作为疫苗,虽然所使用的佐剂,即完全弗氏佐剂和百日咳毒素可以促成该研究的阴性结果(Rosenmann等,2006)。

[0021] 存在对有效对抗病理蛋白质构象异构体的被动和/或主动免疫治疗的未得到满足的需要,已知——或推测——该病理蛋白质构象异构体引起神经变性障碍,如由例如神经元内的超磷酸化tau蛋白聚集物引起的AD中的淀粉状蛋白病理,该聚集物对AD而言与淀粉状蛋白一样典型。

[0022] 可以通过提供使用基于脂质体的疫苗(Nicolau等,2002;Muhs等,2007)和基于模拟tau蛋白的主要病理磷酸化表位的磷酸肽的mAb的被动和主动免疫方法来在本发明的范围内满足此未得到满足的需要。这些组合作用产生针对被认为在包括AD的tau病中负责突触毒性和神经毒性的tau蛋白上的线性和构象、简单和复杂的磷酸化表位的新的特异性mAb。

[0023] 本发明提供用于在生物中,但尤其是在动物,尤其是哺乳动物或人内引出高特异性,尤其是构象特异性免疫应答的新方法,及根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽及其功能片段,包括含有该抗原肽或其片段的组合物,其高度有效,且能够预防或缓解tau病或与tau病相关的症状,tau病是与神经原纤维损伤的形成相关的一组疾病和障碍,神经原纤维损伤的形成是此组神经变性障碍中的主要脑病理。

[0024] 本发明还涉及用于预防或缓解tau病或与tau病相关的症状的抗体,尤其是单克隆

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

[0025] 此组神经变性障碍可以进一步划分为两个亚类。第一类中包含显示tau病理和淀粉状蛋白病理的共存的疾病和障碍,其包括但不限于阿尔茨海默病、克-雅综合症、拳击员痴呆、唐氏综合症、格-施-沙病、包涵体肌炎、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病和外伤性脑损伤。

[0026] 第二类中包含无明显的淀粉状蛋白病理的疾病或障碍,其包括但不限于肌萎缩性侧索硬化/帕金森综合症-痴呆综合症、嗜银颗粒性痴呆、皮层基底节(corticobasal)变性、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、17号染色体连锁额颞痴呆伴帕金森综合症、哈-施病(Hallevorden-Spatz disease)、多系统性萎缩、C型尼-皮病、皮克病、进行性皮层下神经胶质增生、进行性核上性全脑炎。

[0027] 具体而言,本发明提供用于在患有与神经原纤维损伤的形成相关的疾病或障碍的哺乳动物,尤其是人中保持或改善,但尤其是恢复,更尤其是完全恢复认知记忆能力的新的方法,及包含根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽或其功能片段的药物组合物,及可通过对宿主动物施用根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽或其功能片段获得的抗体,尤其是单克隆抗体,包括其功能部分。

[0028] 本发明的目的是提供抗原肽,尤其是修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽可获自tau蛋白。具体而言,本发明涉及用于治疗由神经原纤维损伤的形成引起或与神经原纤维损伤的形成相关的疾病和障碍的:模拟tau蛋白的主要病理磷酸化表位的抗原肽,尤其是抗原磷酸肽,或其功能片段,通过附着在载体上或重构在载体中来进一步修饰该肽或片段;包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物;及分别产生这种肽或其功能片段和药物组合物的方法;神经原纤维损伤的形成是tau病中的主要脑病理,tau病包含一组异质性神经变性疾病或障碍,该组异质性神经变性疾病或障碍包含:显示tau病理和淀粉状蛋白病理的共存的疾病或障碍,其包括但不限于阿尔茨海默病、克-雅综合症、拳击员痴呆、唐氏综合症、格-施-沙病、包涵体肌炎和朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、外伤性脑损伤;及不显示明显的淀粉状蛋白病理的其他疾病和障碍,其包括但不限于关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森综合症-痴呆综合症、非关岛运动神经元病伴神经原纤维缠结、嗜银颗粒性痴呆、皮层基底节变性、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、17号染色体连锁额颞痴呆伴帕金森综合症、Hallevorden-Spatz病、多系统性萎缩、C型尼-皮病、皮克病、进行性皮层下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结型痴呆(tangle only dementia)、脑炎后帕金森综合症、强直性肌营养不良。

[0029] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽或其功能片段和包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段分别包含选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示序列的氨基酸序列的5个氨基酸残基至30个氨基酸残基、尤其是10个氨基酸残基至25个氨基酸残基、尤其是12个氨基酸残基至22个氨基酸残基、尤其是14个氨基酸残基至20个氨基酸残基、尤其是16个氨基酸残基至18个氨基酸残基,其中该序列表征为与病理病症或障碍,尤其是与神经原纤维损伤的形成相关的病症或障碍相关的特征性磷酸化模式。

[0030] 在一个实施方案中,本发明涉及编码选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示序列的抗原肽或其功能片段的核酸分子或其片段。

[0031] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与SEQ ID NO:2中所示序列显示至少80%、尤其是至少85%、尤其是至少90%、尤其是至少95%、尤其是至少98%、尤其是至少99%序列同一性的氨基酸序列,且具有与该SEQ ID NO:2的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于SEQ ID NO:2的氨基酸残基18 (P-Tyr<sub>18</sub>) 的氨基酸残基是磷酸化的 (T1)。

[0032] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列,其中氨基酸残基18 (P-Tyr<sub>18</sub>) 是磷酸化的 (T1)。

[0033] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段分别显示与SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4中所示序列显示至少80%、尤其是至少85%、尤其是至少90%、尤其是至少95%、尤其是至少98%、尤其是至少99%序列同一性的氨基酸序列,且具有与该SEQ ID NO:3的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中分别对应于SEQ ID NO:3和4的氨基酸残基202 (P-Ser<sub>202</sub>)、205 (P-Thr<sub>205</sub>)、212 (P-Thr<sub>212</sub>) 和214 (P-Ser<sub>214</sub>) 的氨基酸残基中的至少一个、尤其是至少两个、尤其是至少三个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0034] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段分别显示SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列,其中氨基酸残基202 (P-Ser<sub>202</sub>)、205 (P-Thr<sub>205</sub>)、212 (P-Thr<sub>212</sub>) 和214 (P-Ser<sub>214</sub>) 中的至少一个、尤其是至少两个、尤其是至少三个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0035] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与SEQ ID NO:4中所示序列显示至少80%、尤其是至少85%、尤其是至少90%、尤其是至少95%、尤其是至少98%、尤其是至少99%序列同一性的氨基酸序列,且具有与该SEQ ID NO:4的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于SEQ ID NO:4的氨基酸残基202 (P-Ser<sub>202</sub>) 和205 (P-Thr<sub>205</sub>) 的氨基酸残基中的至少一个、尤其是至少两个是磷酸化的。

[0036] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列,其中氨基酸残基202 (P-Ser<sub>202</sub>) 和205 (P-Thr<sub>205</sub>) 中的至少一个、尤其是至少两个是磷酸化的。

[0037] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与SEQ ID NO:3中所示序列显示至少80%、尤其是至少85%、尤其是至少90%、尤其是至少95%、尤其是至少98%、尤其是至少99%序列同一性的氨基酸序列,且具有与该SEQ ID NO:3的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基212 (P-Thr<sub>212</sub>) 和214 (P-Ser<sub>214</sub>)

的氨基酸残基中的至少一个、尤其是至少两个是磷酸化的。

[0038] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列,其中氨基酸残基212 (P-Thr<sub>212</sub>) 和214 (P-Ser<sub>214</sub>) 中的至少一个、尤其是至少两个是磷酸化的。

[0039] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与SEQ ID NO:5中所示序列显示至少80%、尤其是至少85%、尤其是至少90%、尤其是至少95%、尤其是至少98%、尤其是至少99%序列同一性的氨基酸序列,且具有与该SEQ ID NO:5的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于SEQ ID NO:5的氨基酸残基396 (P-Ser<sub>396</sub>) 和404 (P-Ser<sub>404</sub>) 的氨基酸残基中的至少一个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0040] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列,其中氨基酸残基396 (P-Ser<sub>396</sub>) 和404 (P-Ser<sub>404</sub>) 中的至少一个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0041] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与SEQ ID NO:6中所示序列显示至少80%、尤其是至少85%、尤其是至少90%、尤其是至少95%、尤其是至少98%、尤其是至少99%序列同一性的氨基酸序列,且具有与该SEQ ID NO:6的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于SEQ ID NO:6的氨基酸残基404 (P-Ser<sub>404</sub>) 和409 (P-Ser<sub>409</sub>) 的氨基酸残基中的至少一个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0042] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列,其中氨基酸残基404 (P-Ser<sub>404</sub>) 和409 (P-Ser<sub>409</sub>) 中的至少一个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0043] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与SEQ ID NO:7中所示序列显示至少80%、尤其是至少85%、尤其是至少90%、尤其是至少95%、尤其是至少98%、尤其是至少99%序列同一性的氨基酸序列,且具有与该SEQ ID NO:7的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于SEQ ID NO:7的氨基酸残基202 (P-Ser<sub>202</sub>)、205 (P-Thr<sub>205</sub>)、212 (P-Thr<sub>212</sub>) 和214 (P-Ser<sub>214</sub>) 的氨基酸残基中的至少一个、尤其是至少两个、尤其是至少三个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0044] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示SEQ ID NO:7中所示的序列,其中氨基酸残基202 (P-Ser<sub>202</sub>)、205 (P-Thr<sub>205</sub>)、212 (P-Thr<sub>212</sub>) 和214 (P-Ser<sub>214</sub>) 中的至少一个、尤其是至少两个、尤其是至少三个、但尤其是全部是磷酸化的。

[0045] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与SEQ ID NO:8中所示序列显示至少80%、尤其是至少85%、尤其是至少90%、尤其是至少95%、尤其是至少

98%、尤其是至少99%序列同一性的氨基酸序列,且具有与该SEQ ID NO:8的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于SEQ ID NO:8的氨基酸残基409 (P-Ser<sub>409</sub>) 的氨基酸残基是磷酸化的。

[0046] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列,其中对应于SEQ ID NO:8的氨基酸残基409 (P-Ser<sub>409</sub>) 的氨基酸残基是磷酸化的。

[0047] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示与SEQ ID NO:9中所示序列显示至少80%、尤其是至少85%、尤其是至少90%、尤其是至少95%、尤其是至少98%、尤其是至少99%序列同一性的氨基酸序列,且具有与该SEQ ID NO:9的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于SEQ ID NO:9的氨基酸残基404 (P-Ser<sub>404</sub>) 的氨基酸残基是磷酸化的。

[0048] 在一个实施方案中,本发明涉及抗原肽,尤其是按照本发明修饰的抗原肽,或其功能片段,及包含该抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽或片段显示SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列,其中对应于SEQ ID NO:9的氨基酸残基404 (P-Ser<sub>404</sub>) 的氨基酸残基是磷酸化的。

[0049] 本发明还包含按照本发明修饰的抗原肽或其功能片段,及含有该修饰的抗原肽或其功能片段的药物组合物,该肽与上文提到的SEQ ID NO:2至9中所示的抗原肽基本上同一,且具有与该SEQ ID NO:2至9的抗原肽基本上相同的免疫原活性,但尤其是变体肽片段,其是该片段的保守性修饰变体,其中该改变导致用化学上相似的氨基酸取代一个或多个氨基酸,尤其是1至10个氨基酸,更尤其是1至6个氨基酸,甚至更尤其是1至4个氨基酸,但尤其是1至3个氨基酸。提供功能上相似的氨基酸的保守性取代表为本领域公知,并公开于本文下文中。优选这样产生保守性取代,使得肽的总体净电荷以及肽分子上的电荷分布保持基本上相同。

[0050] 本发明还包含变体肽片段,尤其是按照本发明修饰的变体抗原肽,及包含该变体肽片段的药物组合物,该肽与上文鉴定的本发明的片段基本上同一,且具有与该片段基本上相同的生物活性,其中缺失一个或多个氨基酸残基。

[0051] 在另一实施方案中,以选自二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体、十聚体、十一聚体、十二聚体、十三聚体、十四聚体、十五聚体、十六聚体、二十聚体、三十聚体和五十聚体的多聚体形式提供本发明的肽或其功能片段,其中组成该多聚体的单体单位总是同一的或是不同的单体单位,且选自根据本发明和如本文中所述的肽,尤其是SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示的肽,或其功能片段,及变体肽。

[0052] 在一个实施方案中,通过附着在载体上或重构在载体中来修饰根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽或其功能片段,该载体尤其是还具有作为产生超分子抗原构建体的佐剂的功能性的载体。在具体实施方案中,通过附着在例如脂质体上或重构在例如脂质体中来修饰根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽,或其功能片段,以产生WO公开WO 2005/081872中所述的“超分子抗原构建体”,该WO公开的描述在此以其整体引入作为

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

[0053] 在本发明的另一实施方案中,亲脂或疏水部分是脂肪酸、甘油三酯或磷脂,尤其是含有C12和C24之间的碳链的脂肪酸、甘油三酯或磷脂,但尤其是棕榈酸。

[0054] 在本发明的具体实施方案中,通过至少两分子棕榈酸与该抗原肽或其功能片段的N端和C末端共价结合和通过重构在脂质体载体中来修饰根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽,或其功能片段。

[0055] 在本发明的一个实施方案中,缀合物中的肽或片段各与四分子棕榈酸偶联;因此它们是四棕榈酰化的。

[0056] 在本发明的一个实施方案中,两分子棕榈酸与肽或片段的N末端偶联,两分子棕榈酸与肽或片段的C末端偶联。

[0057] 还在另一实施方案中,本发明提供根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽,或其功能片段,其通过与亲脂或疏水部分,例如棕榈酸结合来修饰并重构在脂质体中,其中该脂质体制剂可以还包含产生超分子抗原构建体的佐剂,例如脂质A、明矾、磷酸钙、白细胞介素1和/或多糖和蛋白质的微囊,但尤其是去毒脂质A,如单磷酸或二磷酸脂质A,或明矾。

[0058] 在一个实施方案中,本发明涉及本发明的超分子构建体和如本文中所述的超分子构建体,其每个载体分子包含根据本发明和如本文中所述的一个或多个抗原肽,尤其是两个或多个抗原肽,或其功能片段。

[0059] 在本发明的一个实施方案中,该载体分子是脂质体。

[0060] 在本发明的一个实施方案中,该两个或多个抗原肽是相同的或不同的肽,尤其是选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的肽或其功能片段和变体肽。

[0061] 在一个实施方案中,本发明涉及本发明的超分子构建体和如本文中所述的超分子构建体,其每个载体分子包含两个或多个SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的抗原肽或其功能片段的组合。

[0062] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体识别和结合磷酸化病理tau蛋白构象异构体,或导致该构象异构体的病理特性的那些构象异构体部分,尤其是tau蛋白的病理磷酸化表位。

[0063] 具体而言,本发明提供抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体以高特异性识别和结合磷酸化病理tau蛋白构象异构体,或导致该构象异构体的病理特性的那些构象异构体部分,尤其是tau蛋白的病理磷酸化表位。

[0064] 在具体实施方案中,本发明的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分以比对未磷酸化的非病理tau构象异构体的结合亲和力高至少40%、尤其是至少50%、尤其是至少60%、尤其是至少70%、尤其是至少80%、尤其是至少90%、尤其是至少95%和至多100%的亲和力结合病理tau蛋白构象异构体或导致该构象异构体的病理

特性的那些构象异构体部分。

[0065] 在具体实施方案中,提供本发明的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,其特异性结合人阿尔茨海默病脑中的神经原纤维缠结(NFT)和神经毡细丝(neuropil thread)。

[0066] 本发明的另一目的是提供抗体,尤其是单克隆抗体,或其功能部分,其直接和特异地与tau蛋白上的表位,或与表位的组合,尤其是与磷酸化病理tau蛋白构象异构体特异的表位,尤其是tau蛋白的病理磷酸化表位,例如选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中给出的序列的肽序列及其变体片段所代表或包含于其中的表位结合。

[0067] 具体而言,本发明提供包括任意功能上等同的抗体的抗体或其功能部分,尤其是包括任意功能上等同的抗体的单克隆抗体或其功能部分,其可以通过用抗原肽,尤其是根据本发明和如之前本文中所述的肽组合物,尤其是包含含有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中给出的氨基酸序列的抗原肽,包括其功能片段或变体片段的组合物免疫适宜的动物来获得。

[0068] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月3日保藏为DSM ACC3043的杂交瘤细胞系ACI-41-Ab1产生的抗体的特性。

[0069] 更具体而言,本发明涉及由2010年3月3日保藏为DSM ACC3043的杂交瘤细胞系ACI-41-Ab1产生的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分。

[0070] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3044的杂交瘤细胞系2B6产生的抗体的特性。

[0071] 更具体而言,本发明涉及由2010年3月10日保藏为DSM ACC3044的杂交瘤细胞系2B6产生的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分。

[0072] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3045的杂交瘤细胞系3A8产生的抗体的特性。

[0073] 更具体而言,本发明涉及由2010年3月10日保藏为DSM ACC3045的杂交瘤细胞系3A8产生的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分。

[0074] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3046的杂交瘤细胞系4C1产生的抗体的特性。

[0075] 更具体而言,本发明涉及由2010年3月10日保藏为DSM ACC3046的杂交瘤细胞系4C1产生的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分。

[0076] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3047的杂交瘤细胞系5D10A3产生的抗体的特性。

[0077] 更具体而言,本发明涉及由2010年3月10日保藏为DSM ACC3047的杂交瘤细胞系5D10A3产生的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分。



[0078] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3048的杂交瘤细胞系6C10产生的抗体的特性。

[0079] 更具体而言,本发明涉及由2010年3月10日保藏为DSM ACC3048的杂交瘤细胞系6C10产生的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分。

[0080] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3049的杂交瘤细胞系6H1产生的抗体的特性。

[0081] 更具体而言,本发明涉及由2010年3月10日保藏为DSM ACC3049的杂交瘤细胞系6H1产生的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分。

[0082] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3050的杂交瘤细胞系7C2产生的抗体的特性。

[0083] 更具体而言,本发明涉及由2010年3月10日保藏为DSM ACC3050的杂交瘤细胞系7C2产生的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分。

[0084] 可以以仍显示上文公开的特异性结合特征的嵌合抗体或人源化抗体的形式提供抗体。

[0085] 在一个实施方案中,本发明涉及产生本文中所述的本发明的抗体的细胞系。

[0086] 在具体实施方案中,本发明涉及于2010年3月3日保藏为DSM ACC3043的杂交瘤细胞系ACI-41-Ab1。

[0087] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于2010年3月10日保藏为DSM ACC3044的杂交瘤细胞系2B6。

[0088] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于2010年3月10日保藏为DSM ACC3045的杂交瘤细胞系3A8。

[0089] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于2010年3月10日保藏为DSM ACC3046的杂交瘤细胞系4C1。

[0090] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于2010年3月10日保藏为DSM ACC3047的杂交瘤细胞系5D10A3。

[0091] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于2010年3月10日保藏为DSM ACC3048的杂交瘤细胞系6C10。

[0092] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于2010年3月10日保藏为DSM ACC3049的杂交瘤细胞系6H1。

[0093] 在另一具体实施方案中,本发明涉及于2010年3月10日保藏为DSM ACC3050的杂交瘤细胞系7C2。

[0094] 本文还包含上文所列的具体杂交瘤细胞系的亚克隆和变体克隆,其仍产生具有本发明的特异性tau结合特性的抗体。

[0095] 在具体实施方案中,本发明提供药物组合物和产生药物组合物的方法,该药物组合物包含根据本发明的抗原肽片段和如本文中所述的抗原肽片段,尤其是通过附着在载体、尤其是脂质体载体上和/或重构在载体、尤其是脂质体载体中修饰的抗原肽片段,或其

功能片段,连同可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂,用于保持或改善,尤其是用于完全恢复患有记忆损伤的动物,尤其是哺乳动物或人的认知记忆能力。

[0096] 在一个实施方案中,提供以治疗有效量包含本发明的包括任意功能上等同的抗体的抗体或其功能部分,尤其是包括任意功能上等同的抗体的单克隆抗体或其功能部分,连同可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂的药物组合物。

[0097] 提供根据本发明和如本文中所述的药物组合物和/或用于治疗由神经原纤维损伤的形成引起或与神经原纤维损伤的形成相关的疾病和障碍的方法也是本发明的目的,神经原纤维损伤的形成是tau病中的主要脑病理,tau病包含一组异质性神经变性疾病或障碍,该组异质性神经变性疾病或障碍包括:显示tau病理和淀粉状蛋白病理的共存的疾病或障碍,其包括但不限于阿尔茨海默病、克-雅综合症、拳击员痴呆、唐氏综合症、格-施-沙病、包涵体肌炎和朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、外伤性脑损伤;及不显示明显的淀粉状蛋白病理的其他疾病或障碍,其包括但不限于关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森综合症-痴呆综合症、非关岛运动神经元病伴神经原纤维缠结、嗜银颗粒性痴呆、皮层基底节变性、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、17号染色体连锁额颞痴呆伴帕金森综合症、Halleorden-Spatz病、多系统性萎缩、C型尼-皮病、皮克病、进行性皮层下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结型痴呆、脑炎后帕金森综合症、强直性肌营养不良,该方法包括以治疗有效量对动物,尤其是哺乳动物或人施用根据本发明和如本文中所述的药物组合物,连同可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0098] 在具体实施方案中,本发明提供根据本发明和如本文中所述的药物组合物,和/或用于保持或增加患有记忆损伤的动物,尤其是哺乳动物或人的认知记忆能力,但尤其是用于完全恢复患有记忆损伤的动物,尤其是哺乳动物或人的认知记忆能力的方法,该方法包括以治疗有效量对动物,尤其是哺乳动物或人施用根据本发明和如本文中所述的药物组合物,连同可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0099] 本发明的另一目的是提供药物组合物和产生这种药物组合物的方法,以及用于通过与可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂一起,以治疗有效量对动物或人施用本发明的药物组合物来在患有由神经原纤维损伤的形成引起,或与神经原纤维损伤的形成相关的疾病和病症的动物,尤其是哺乳动物或人中诱导免疫应答的方法。

[0100] 在本发明的一个实施方案中,提供以这样的程度在患有导致tau病的神经原纤维损伤的动物,尤其是哺乳动物或人中诱导免疫应答,使得可以获得与此疾病或病症相关的症状,例如记忆损伤的保持或改善,尤其是最初病症的完全恢复的方法。

[0101] 在对动物,尤其是哺乳动物,但尤其是人施用,包含根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽的药物组合物主要导致非炎性Th2亚型,例如同种型IgG1和IgG2b的抗体和/或独立于T细胞的IgG亚类,例如IgG3的抗体的产生,和/或不导致脑中炎症标志,尤其是选自IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 和TNF $\alpha$ 的炎症标志的显著增加。

[0102] 在本发明的另一方面,在患者,尤其是动物或人患者,尤其是需要这种独立于T细胞的应答的患者,例如免疫耐受患者或T细胞活化患者中治疗疾病、病症或障碍时,可以用包含根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽的药物组合物来诱导独立于T细胞的免疫应答,其中,通过附着在载体、尤其是脂质体载体上和/或重构在载体、尤其是脂质体载体中来修饰该抗原肽,使得抗原呈递在载体、尤其是脂质体的表面上。

[0103] 在一个实施方案中,本文中所述的本发明的抗原组合物作为免疫刺激剂是有效的。

[0104] 在本发明的具体实施方案中,该肽抗原以高度重复阵列呈递在脂质体的表面上。在另一具体实施方案中,该抗原不包含T细胞表位。

[0105] 在本发明的一个实施方案中,本文中所述的本发明的抗原组合物用于治疗免疫耐受患者或T细胞活化患者,尤其是无免疫应答的患者,尤其是患有自身免疫病的患者,尤其是患有T细胞缺乏,尤其是由CD4T细胞在该患者内的缺失和/或CD4T细胞上CD14和/或CD40L的减少的表达引起的T细胞缺乏的患者。

[0106] 本发明的抗体可以用于在患者中诊断tau蛋白相关疾病或病症的方法中,该方法包括在样品中或在原位检测抗体或其活性片段与tau蛋白表位的免疫特异性结合,其包括以下步骤:

[0107] (a) 使疑似包含tau蛋白的样品或具体身体部分或身体区域与该抗体接触,该抗体结合tau蛋白的表位;

[0108] (b) 使抗体与tau蛋白结合,以形成免疫复合物;

[0109] (c) 检测免疫复合物的形成;和

[0110] (d) 使免疫复合物的存在或缺乏与tau蛋白在样品或具体身体部分或区域中的存在或缺乏相关。

[0111] 在一个实施方案中,提供用于在患者中诊断对tau蛋白相关疾病或病症的诱因的方法,该方法包括在样品中或在原位检测单克隆抗体或其活性片段与tau蛋白表位的免疫特异性结合,其包括以下步骤:

[0112] (a) 使疑似包含tau抗原的样品或具体身体部分或身体区域与根据本发明的抗体和如之前本文中所述的抗体接触,该抗体结合tau蛋白的表位;

[0113] (b) 使抗体与tau抗原结合,以形成免疫复合物;

[0114] (c) 检测免疫复合物的形成;和

[0115] (d) 使免疫复合物的存在或缺乏与tau抗原在样品或具体身体部分或区域中的存在或缺乏相关;

[0116] (e) 将该免疫复合物的量与正常对照值相比;

[0117] 其中,与正常对照值相比,该聚集物的量的增加指示该患者患有tau蛋白相关疾病或病症,或处于发展tau蛋白相关疾病或病症的风险。

[0118] 在另一实施方案中,本发明涉及用于在用任意前述抗体或药物组合物治疗后在患者中监测微小残留病(minimal residual disease)的方法,其中该方法包括:

[0119] (a) 使疑似包含tau抗原的样品或具体身体部分或身体区域与根据本发明的抗体和如之前本文中所述的抗体接触,该抗体结合tau蛋白的表位;

[0120] (b) 使抗体与tau抗原结合,以形成免疫复合物;

[0121] (c) 检测免疫复合物的形成;和

[0122] (d) 使免疫复合物的存在或缺乏与tau抗原在样品或具体身体部分或区域中的存在或缺乏相关;

[0123] (e) 将该免疫复合物的量与正常对照值相比;

[0124] 其中,与正常对照值相比,该聚集物的量的增加指示该患者仍患有微小残留病。

[0125] 还在另一实施方案中,本发明提供用于预测用任意前述抗体或药物组合物治疗的患者的反应性的方法,其包括:

[0126] (a) 使疑似包含tau抗原的样品或具体身体部分或身体区域与根据本发明的抗体和如之前本文中所述的抗体接触,该抗体结合tau蛋白的表位;

[0127] (b) 使抗体与tau抗原结合,以形成免疫复合物;

[0128] (c) 检测免疫复合物的形成;和

[0129] (d) 使免疫复合物的存在或缺乏与tau抗原在样品或具体身体部分或区域中的存在或缺乏相关;

[0130] (e) 比较起始治疗之前和之后免疫复合物的量;

[0131] 其中,该聚集物的量的增加指示该患者具有对治疗具有反应的高可能性。

[0132] 在本发明的另一实施方案中,本发明的抗体可以用于用于检测和诊断tau相关疾病和病症的测试试剂盒中。

[0133] 具体而言,提供包含本发明的抗体的用于检测和诊断tau蛋白相关疾病和病症的测试试剂盒,尤其是包含装有本发明的一种或多种抗体的容器,及为了与tau抗原结合形成免疫复合物和检测免疫复合物的形成,使得免疫复合物的存在或缺乏与tau抗原的存在或缺乏相关的目的而使用抗体的说明的测试试剂盒。

[0134] 本发明的这些和其他目的、特征和优势将在参阅以下所公开的实施方案和所附权利要求的详细描述后变得显而易见。

[0135] 附图和序列简述

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

[0137] 图1b:用ACI-33免疫的TK0小鼠中的抗-Tau5-20[pY18] IgG抗体。在d0、d13和d28接受三次ACI-33注射,并在d-1、d27和d47采血的C57BL/6野生型小鼠的血清中的抗-Tau5-20[pY18] IgG抗体的分析。结果表示为在6只小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差。

[0138] 图2a:用ACI-35免疫的WT小鼠中的抗-Tau393-408[pS396/pS404] IgG抗体。在d0、d16、d30、d99和d113接受五次ACI-35注射,并在d-1、d28、d42、d98和d126采血的C57BL/6野生型小鼠的血清中的抗-Tau393-408[pS396/pS404] IgG抗体的分析。结果表示为在6只小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差。

[0139] 图2b:用ACI-35免疫的TK0小鼠中的抗-Tau393-408[pS396/pS404] IgG抗体。在d0、d16、d30、d99和d113接受五次ACI-35注射,并在d-1、d28、d42、d98和d126采血的TK0小鼠的血清中的抗-Tau393-408[pS396/pS404] IgG抗体的分析。结果表示为在6只小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差。

[0140] 图3a:用ACI-36免疫的WT小鼠中的抗-Tau401-418[pS404/S409] IgG抗体。在d0、d13和d28接受三次ACI-36注射,并在d-1、d27和d47采血的C57BL/6野生型小鼠的血清中的抗-Tau401-418[pS404/S409] IgG抗体的分析。结果表示为在6只小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差。

[0141] 图3b:用ACI-36免疫的TK0小鼠中的抗-Tau401-418[pS404/S409] IgG抗体。在d0、d13和d28接受三次ACI-36注射,并在d-1、d27和d47采血的TK0小鼠的血清中的抗-Tau401-

418[pS404/S409] IgG抗体的分析。对于d-1/d27, 结果表示为在6只小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差; 对于d47, 结果表示为在5只小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差。

[0142] 图4a/4b: 用ACI-41免疫的WT小鼠中的抗-Tau206-221[pT212/pS214]和抗-Tau196-211[pS202/pT205] IgG抗体。在d0、d20、d35接受三次ACI-41注射, 并在d-1、d34、d48采血的C57BL/6野生型小鼠的血清中的抗-Tau206-221[pT212/pS214]和抗-Tau196-211[pS202/pT205] IgG抗体的分析。结果表示为在6只小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差。在两种pTau肽上都测试了相同的血清。

[0143] 图4c/4d: 用ACI-41免疫的TK0小鼠中的抗-Tau206-221[pT212/pS214]和抗-Tau196-211[pS202/pT205] IgG抗体。在d0、d20、d35接受三次ACI-41注射, 并在d-1、d34、d48采血的TK0小鼠的血清中的抗-Tau206-221[pT212/pS214]和抗-Tau196-211[pS202/pT205] IgG抗体的分析。结果表示为在6只小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差。在两种pTau肽上都测试了相同的血清。

[0144] 图5a: 用ACI-33免疫的WT小鼠中的抗-Tau5-20[pY18] IgG同种型和IgM抗体。第一次ACI-33免疫后47天的C57BL/6小鼠的血清中的抗-Tau5-20[pY18] IgG1、2a、2b、3和IgM抗体的分析。结果表示为1/100 (gG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和1/3200 (IgM) 的稀释度下的O.D., 显示在6只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0145] 图5b: 用ACI-33免疫的TK0小鼠中的抗-Tau5-20[pY18] IgG同种型和IgM抗体。第一次ACI-33免疫后47天的TK0小鼠的血清中的抗-Tau5-20[pY18] IgG1、2a、2b、3和IgM抗体的分析。结果表示为1/100 (gG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和1/3200 (IgM) 的稀释度下的O.D., 显示在6只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0146] 图6a: 用ACI-35免疫的WT小鼠中的抗-Tau393-408[pS396/pS404] IgG同种型和IgM抗体。第一次ACI-35免疫后42天的C57BL/6小鼠的血清中的抗-Tau393-408[pS396/pS404] IgG1、2a、2b、3和IgM抗体的分析。结果表示为1/100 (gG1)、1/1600 (IgG2a)、1/1600 (IgG2b)、1/800 (IgG3) 和1/600 (IgM) 的稀释度下的O.D., 显示在6只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0147] 图6b: 用ACI-35免疫的TK0小鼠中的抗-Tau393-408[pS396/pS404] IgG同种型和IgM抗体。第一次ACI-35免疫后42天的TK0小鼠的血清中的抗-Tau393-408[pS396/pS404] IgG1、2a、2b、3和IgM抗体的分析。结果表示为1/100 (gG1)、1/1600 (IgG2a)、1/1600 (IgG2b)、1/800 (IgG3) 和1/1600 (IgM) 的稀释度下的O.D., 显示在6只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0148] 图7a: 用ACI-36免疫的WT小鼠中的抗-Tau401-418[pS404/S409] IgG同种型和IgM抗体。第一次ACI-36免疫后47天的C57BL/6小鼠的血清中的抗-Tau401-418[pS404/S409] IgG1、2a、2b、3和IgM抗体的分析。结果表示为1/100 (IgG1)、1/400 (IgG2a)、1/400 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和1/400 (IgM) 的稀释度下的O.D., 显示在6只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0149] 图7b: 用ACI-36免疫的TK0小鼠中的抗-Tau401-418[pS404/S409] IgG同种型和IgM抗体。第一次ACI-36免疫后47天的TK0小鼠的血清中的抗-Tau401-418[pS404/S409] IgG1、2a、2b、3和IgM抗体的分析。结果表示为1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和1/400 (IgM) 的稀释度下的O.D., 显示在5只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0150] 图8a:用ACI-41免疫的WT小鼠中的抗-Tau196-211 [pS202/pT205] IgG同种型和IgM抗体。第一次ACI-41免疫后48天的C57BL/6小鼠的血清中的抗-Tau196-211 [pS202/pT205] IgG1、2a、2b、3和IgM抗体的分析。结果表示为1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/3200 (IgG2b)、1/1600 (IgG3) 和1/3200 (IgM) 的稀释度下的O.D., 显示在6只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0151] 图8b:用ACI-41免疫的TK0小鼠中的抗-Tau196-211 [pS202/pT205] IgG同种型和IgM抗体。第一次ACI-41免疫后48天的TK0小鼠的血清中的抗-Tau196-211 [pS202/pT205] IgG1、2a、2b、3和IgM抗体的分析。结果表示为1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/3200 (IgG2b)、1/1600 (IgG3) 和1/3200 (IgM) 的稀释度下的O.D., 显示在6只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0152] 图9a/9b:来自T25瓶的ACI-36杂交瘤上清:TAUPIR和Tau ELISA筛选。9a. 使用未稀释的上清的老年biGT小鼠的TAUPIR染色。9b. 未稀释的克隆上清样品的抗-pTau肽T4.5、抗-Tau肽T4.6、抗-pTau蛋白和抗-Tau蛋白效价的分析。结果表示为O.D.。

[0153] 图10a/10b/10c:来自T25瓶的ACI-41杂交瘤上清:TAUPIR和Tau ELISA筛选。10a. 使用未稀释的上清的老年biGT小鼠的TAUPIR染色。10b. 未稀释的克隆上清样品的抗-pTau肽T8.5、抗-Tau肽T8.6、抗-pTau蛋白和抗-Tau蛋白效价的分析。结果表示为O.D.。10c. 未稀释的克隆上清样品的抗-pTau肽T9.5、抗-Tau肽T9.6、抗-pTau蛋白和抗-Tau蛋白效价的分析。结果表示为O.D.。

[0154] 图11:用T8:Tau206-221 [pT212/pS214]、T9:Tau196-211 [pS202/pT205] 和hP-Tau包被的平板上的杂交瘤上清。来自杂交瘤克隆上清的抗-Tau206-221 [pT212/pS214]、抗-Tau196-211 [pS202/pT205] 和抗-hP-Tau抗体的分析。结果表示为O.D.。在pTau肽和hP-Tau上都未稀释地测试了相同的上清。

[0155] 图12:抗体克隆ACI-41-Ab1 (T89-F4) 染色人AD脑中的NFT。按1/1 (b、e和h) 或按1/30 (c、f和i) 稀释度用AT100 (a、d和g) 或ACI-41-Ab1 (T89-F4) 染色来自AD (a、b和c)、PSP (进行性核上性麻痹) (d、e和f) 和健康对照 (g、h和i) 受试者的脑切片。

[0156] 图13:抗体5D10染色人AD脑中的NFT。用5D10 (a) 或AT100 (b) 抗体染色来自AD患者的皮层脑切片。

[0157] 图14:用ACI-35免疫的小鼠中的抗-Tau393-408 [pS396/pS404] IgG抗体。在d0、d14和d28接受三次ACI-35注射,并在d-7、d7、d21、d35和d56采血的C57BL/6小鼠的血浆中的抗-Tau393-408 [pS396/pS404] IgG抗体的分析。结果表示为在10只小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差。

[0158] 图15:用ACI-35免疫的小鼠中的抗-Tau393-408 [pS396/pS404] IgG同种型抗体。第一次ACI-35免疫后35天的C57BL/6小鼠的血浆中的抗-Tau393-408 [pS396/pS404] IgG1、2a、2b和3抗体的分析。结果表示为1/1600 (IgG1)、1/3200 (IgG2a)、1/3200 (IgG2b) 和1/800 (IgG3) 的非饱和稀释度下的O.D., 显示在10只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0159] 图16a:用ACI-35免疫的小鼠中的抗-Tau393-408 [pS396/S404] IgM抗体。第一次ACI-35免疫后35天的C57BL/6小鼠的血浆中的抗-Tau393-408 [pS396/S404] IgM抗体的分析。结果表示为1/6400的稀释度下的O.D., 显示在10只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0160] 图16b:用ACI-35免疫的小鼠中的抗-Tau393-408 IgG抗体。第一次ACI-35免疫后35

天的C57BL/6小鼠的血浆中的抗-Tau393-408IgG抗体的分析。结果表示为1/100的稀释度下的O.D.,显示在10只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0161] 图17:来自用Con A或pTau/Tau肽再刺激的脾的细胞的增殖。d56的Tau特异性T细胞增殖的MTT分析。混合来自各组的10只小鼠的脾细胞,并用ConA、Tau393-408[pS396/S404]或Tau393-408肽再刺激。

[0162] 图18:用Tau393-408[pS396/S404]和Tau393-408肽再刺激的脾细胞的ELISPOT的细胞因子产生。P-Tau/Tau特异性T细胞的细胞因子产生的ELISPOT分析。混合来自各组的10只小鼠的脾细胞,并用Tau393-408[pS396/S404]和Tau393-408肽再刺激。

[0163] 图19:用ACI-33免疫的小鼠中的抗-Tau5-20[pY18] IgG抗体。在d0、d13、d28、d91和d133接受五次ACI-33注射,并在d-1、d27、d41、d76、d104和d135采血的TPLH小鼠的血清中的抗-Tau5-20[pY18] IgG抗体的分析。结果表示为在小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差。d-1, n=10只小鼠; d27、d41和d76, n=9只小鼠, 1只小鼠因打架死亡; d104, n=6, 3只小鼠因病死亡; d135, n=2, 4只小鼠因病死亡。

[0164] 图20:用ACI-35免疫的小鼠中的抗-Tau393-408[pS396/pS404] IgG抗体。在d0、d13、d27、d91和d133接受五次ACI-35注射,并在d-1、d26、d40、d75、d103、d145和d155采血的TPLH小鼠的血清中的抗-Tau393-408[pS396/pS404] IgG抗体的分析。结果表示为在小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差。d-1、d26, n=10只小鼠; d40, n=9只小鼠; d75, n=6; d103和d145, n=4; d155, n=3。所有小鼠都是因病死亡。

[0165] 图21:用ACI-39免疫的小鼠中的抗-Tau206-221[pT212, pS214] IgG抗体。在d0、d13、d28、d91和d133接受五次ACI-39注射,并在d-1、d27、d41、d76、d104和d135采血的TPLH小鼠的血清中的抗-Tau206-221[pT212, pS214] IgG抗体的分析。结果表示为在小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差。d-1、d27和d41, n=10只小鼠; d76, n=7只小鼠; d104, n=6; d135, n=2。所有小鼠都是因病死亡。

[0166] 图22:用ACI-40免疫的小鼠中的抗-Tau196-211[pS202, pT205] IgG抗体。在d0、d13、d28、d91和d133接受五次ACI-40注射,并在d-1、d27、d41、d76、d104和d135采血的TPLH小鼠的血清中的抗-Tau196-211[pS202, pT205] IgG抗体的分析。结果表示为在小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差。d-1、d27和d41, n=10只小鼠; d76, n=8只小鼠; d104, n=6; d135, n=2。所有小鼠都是因病死亡。

[0167] 图23:用ACI-33免疫的小鼠中的抗-Tau5-20[pY18] IgG同种型和IgM抗体。三次ACI-33免疫后d41的TPLH小鼠的血清中的抗-Tau5-20[pY18] IgG1、2a、2b、3和IgM抗体的分析。结果表示为1/100 (IgG1)、1/200 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和1/100 (IgM) 的稀释度下的非饱和O.D.,显示在9只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0168] 图24:用ACI-35免疫的小鼠中的抗-Tau393-408[pS396/pS404] IgG同种型和IgM抗体。三次ACI-35免疫后d40的TPLH小鼠的血清中的抗-Tau393-408[pS396/pS404] IgG1、2a、2b、3和IgM抗体的分析。结果表示为1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和1/100 (IgM) 的稀释度下的非饱和O.D.,显示在9只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0169] 图25:用ACI-39免疫的小鼠中的抗-Tau206-221[pT212, pS214] IgG同种型和IgM抗体。三次ACI-39免疫后d41的TPLH小鼠的血清中的抗-Tau206-221[pT212, pS214] IgG1、2a、

2b、3和IgM抗体的分析。结果表示为1/100 (IgG1)、1/200 (IgG2a)、1/200 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和1/100 (IgM) 的稀释度下的非饱和O.D., 显示在10只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0170] 图26: 用ACI-40免疫的小鼠中的抗-Tau196-211 [pS202, pT205] IgG同种型和IgM抗体。三次ACI-40免疫后d41的TPLH小鼠的血清中的抗-Tau196-211 [pS202, pT205] IgG1、2a、2b、3和IgM抗体的分析。结果表示为1/100 (IgG1)、1/400 (IgG2a)、1/200 (IgG2b)、1/800 (IgG3) 和1/100 (IgM) 的稀释度下的非饱和O.D., 显示在10只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0171] 图27: 用ACI-33免疫的小鼠中的不同Tau肽和蛋白质上的IgG抗体效价。三次ACI-33注射后TPLH小鼠的d-1和d41血清中的IgG抗体效价的分析。结果表示为O.D., 显示在9只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0172] 图28: 用ACI-35免疫的小鼠中的不同Tau肽和蛋白质上的IgG抗体效价。三次ACI-35注射后TPLH小鼠的d-1和d40血清中的IgG抗体效价的分析。结果表示为O.D., 显示在9只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0173] 图29: 用ACI-39免疫的小鼠中的不同Tau肽和蛋白质上的IgG抗体效价。三次ACI-39注射后TPLH小鼠的d-1和d41血清中的IgG抗体效价的分析。结果表示为O.D., 显示在9只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0174] 图30: 用ACI-40免疫的小鼠中的不同Tau肽和蛋白质上的IgG抗体效价。三次ACI-40注射后TPLH小鼠的d-1和d41血清中的IgG抗体效价的分析。结果表示为O.D., 显示在10只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0175] 图31: 用ACI-33免疫的小鼠对PBS注射的小鼠的转棒 (rotarod)。在参考TPLH小鼠的年龄 (月) 的五个不同时机进行了转棒试验。

[0176] 图32: 抗-Tau5-20 [pY18] 抗体效价与转棒测试之间的相关性。在7.8月龄时针对注射ACI-33的TPLH测量了相关性。通过ELISA测量小鼠血清中的抗体效价 (O.D.), 转棒测试测量动物在仪器上停留的时间 (时间)。

[0177] 图33: 用ACI-35免疫的小鼠对PBS注射的小鼠的转棒。用ACI-35免疫的9.5月龄TPLH小鼠对PBS对照组的转棒结果。ACI-35n=5, PBS n=4, 其他小鼠因该模型所显示的病理而死亡。

[0178] 图34: 用ACI-33处理的裸鼠和野生型小鼠中的CD3+CD4+的FACS定量。接受ACI-33的裸鼠或wt小鼠的百分比门控 (gated) 细胞, 其是CD3和CD4染色阳性。左图: 裸鼠组和wt组的两只小鼠中的FACS分析的图示。右图: 各柱代表6只小鼠的组的平均值和SD。小鼠#5和6: 裸鼠; 小鼠#7和8: 野生型小鼠。

[0179] 图35: 用ACI-33免疫的裸鼠和wt小鼠中的抗-Tau5-20 [pY18] IgG抗体。在d0、d14和d28接受三次ACI-33注射, 并在d2、d7、d21、d35和d56采血的裸鼠和wt小鼠的血清中的抗-Tau5-20 [pY18] IgG抗体的分析。结果表示为在6只小鼠的组中获得的平均O.D.+标准差。

[0180] 图36: 用ACI-33免疫的裸鼠和wt小鼠中的抗-Tau5-20 [pY18] IgG同种型和IgM抗体。三次ACI-33免疫后d35的裸鼠和wt小鼠的血清中的抗-Tau5-20 [pY18] IgG1、2a、2b、3和IgM抗体的分析。结果表示为1/100 (IgG1)、1/100 (IgG2a)、1/100 (IgG2b)、1/100 (IgG3) 和1/100 (IgM) 的稀释度下的非饱和O.D., 显示在6只小鼠的组中获得的平均值+标准差。



[0181] 图37:用ACI-33免疫的裸鼠和wt小鼠中的不同Tau肽和蛋白质上的IgG抗体效价。三次ACI-33注射后裸鼠和wt小鼠的d35血清中的IgG抗体效价的分析。结果表示为O.D.,显示在6只小鼠的组中获得的平均值+标准差。

[0182] SEQ ID NO:1对照序列T5: Tau 379-408 [pS396, pS404]的氨基酸序列

[0183] SEQ ID NO:2序列1 (T1): Tau 5-20 [pY18]的氨基酸序列

[0184] SEQ ID NO:3序列8 (T8): Tau 206-221 [pT212, pS214]的氨基酸序列

[0185] SEQ ID NO:4序列9 (T9): Tau 196-211 [pS202, pT205]的氨基酸序列

[0186] SEQ ID NO:5序列3 (T3): Tau 393-408 [pS396, pS404]的氨基酸序列

[0187] SEQ ID NO:6序列4 (T4): Tau 401-418 [pS404, pS409]的氨基酸序列

[0188] SEQ ID NO:7序列2 (T2): Tau 200-216 [pS202+pT205和pT212+pS214]的氨基酸序列

[0189] SEQ ID NO:8序列10 (T10): Tau 407-418 [pS409]的氨基酸序列

[0190] SEQ ID NO:9序列11 (T11): Tau 399-408 [pS404]的氨基酸序列

[0191] 术语定义

[0192] 本文中使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换,且定义为意指由通过肽键连接的氨基酸组成的生物分子。

[0193] 术语“肽”是氨基酸(通常是L-氨基酸)的链,该氨基酸的 $\alpha$ 碳通过肽键连接,该肽键由一个氨基酸的 $\alpha$ 碳的羧基与另一氨基酸的 $\alpha$ 碳的氨基之间的缩合反应形成。链一端(即氨基端)的末端氨基酸具有自由氨基,而链另一端(即羧基端)的末端氨基酸具有自由羧基。因此,术语“氨基端”(缩写为N端)指肽的氨基酸端氨基酸上的自由 $\alpha$ 氨基,或指肽内任意其他位置上的氨基酸的 $\alpha$ 氨基(参与肽键时为亚氨基)。类似地,术语“羧基端”(缩写为C端)指肽的羧基端氨基酸上的自由羧基,或指肽内任意其他位置上的氨基酸的羧基。

[0194] 本文中使用的术语“其片段”或“片段”指具有与本文中定义的肽(例如,分别如SEQ ID NO 2至9中所示)基本上相同的(生物)活性的功能肽片段,即该片段仍能够在生物中,但尤其是在动物,尤其是哺乳动物或人内引出高特异性,尤其是构象特异性免疫应答,其高度有效,且能够预防或缓解tau病,或与tau病相关的症状。具体而言,该片段仍包含本文中使用和定义的tau肽的特异性病理磷酸化表位。

[0195] 通常,从肽的氨基端起始并向肽的羧基端方向增加,按顺序编号组成肽的氨基酸。因此,说一个氨基酸“跟随”另一个氨基酸时,该氨基酸比前一氨基酸更靠近肽的羧基端定位。

[0196] 本文中用术语“残基”来指通过酰胺键掺入肽中的氨基酸。因此,氨基酸可以是天然存在的氨基酸,或者,除非另有限制,可以包含以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥作用的天然氨基酸的已知类似物(即氨基酸模拟物)。此外,酰胺键模拟物包含本领域技术人员公知的肽主链修饰。

[0197] 本文中用短语“基本上由...组成”来排除将实质性改变该短语所指的肽的本质属性的任意元件。因此,“基本上由...组成”的肽的描述排除了将实质性改变该肽的生物活性的任意氨基酸取代、添加或缺失。

[0198] 此外,技术人员将理解,如上文所述,在编码的序列中改变、添加或缺失单个氨基酸或小百分比的氨基酸(通常少于5%,更通常少于1%)的单个取代、缺失或添加是保守性

修饰变异,其中该改变导致用化学上相似的氨基酸取代氨基酸。提供功能上相似的氨基酸的保守性取代表为本领域公知。以下六组各包含对彼此而言是保守性取代的氨基酸:

[0199] 1) 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);

[0200] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0201] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0202] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0203] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);和

[0204] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0205] 短语“分离的”或“生物纯的”指实质上或本质上游离于见于它的天然状态中的正常伴随它的成分的物质。因此,本文中所述的肽不包含正常情况下与它们的原位环境结合的物质。通常,通过银染凝胶上的条带强度测量,本文中所述的分离的免疫原肽至少约80%纯,通常至少约90%和优选至少约95%(纯)。

[0206] 可以通过本领域公知的许多方法来显示蛋白质纯度或同质性,如蛋白质样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳后通过染色显示。为了某些目的,将需要高分辨率,利用HPLC或类似的手段进行纯化。

[0207] 当免疫原肽的长度相对短(即少于约50个氨基酸)时,通常用标准的化学肽合成技术合成它们。

[0208] 固相合成是用于化学合成本文中所述的免疫原肽的优选方法,其中将序列的C端氨基酸与不可溶支持物连接,然后连续添加序列中的其余氨基酸。用于固相合成的技术为本领域技术人员已知。

[0209] 备选地,用重组核酸法合成本文中所述的免疫原肽。一般而言,这涉及产生编码肽的核酸序列,将核酸在特定启动子控制下放置在表达盒中,在宿主中表达肽,分离所表达的肽或多肽,并根据需要复性肽。足以指导技术人员完成这类方法的技术见于文献中。

[0210] 一旦表达,即可以按照包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、凝胶电泳等的标准方法纯化重组肽。对于用作治疗剂,优选约50%至95%同质性,且最优选80%至95%或更大同质性的基本上纯的组合物。

[0211] 本领域技术人员将理解,化学合成、生物表达或纯化后,免疫原肽可以具有实质上不同于组成肽的天然构象的构象。在这种情况下,通常有必要变性和还原抗增殖肽,然后使肽重新折叠为优选构象。还原和变性蛋白质并诱导重新折叠的方法为本领域技术人员公知。

[0212] 可以例如通过显示与免疫血清或与针对该蛋白质本身产生的抗血清的反应来确认纯化的蛋白质的抗原性。

[0213] 除非背景不适合,本文中使用的术语“一”、“一个”和“该”定义为意指“一个或多个”,且包含复数形式。

[0214] 本文中使用的术语“检测”意指使用已知的生物分子检测技术,如免疫化学或组织学方法,并意指:定性或定量测定所研究的生物分子的存在或浓度。

[0215] “分离的”意指游离于它与之天然存在的成分中的一些的生物分子。

[0216] 本文中使用的术语“抗体”或“其功能部分”是本领域公知的术语,且理解为指与已知抗原结合的分子或分子的活性片段,尤其是指免疫球蛋白分子和指免疫球蛋白分子的免

疫学活性部分,即包含免疫特异性结合抗原的结合部位的分子。本发明的免疫球蛋白可以是任意类型(IgG、IgM、IgD、IgE、IgA和IgY)或种类(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类的免疫球蛋白分子。

[0217] “抗体”在本发明的范围内旨在包含单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、双特异性抗体、猿源化(simianized)抗体、人抗体和人源化抗体及其活性片段。与已知抗原结合的分子的活性片段的实例包含Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段,其包括Fab免疫球蛋白表达文库的产物及上述任意抗体和片段的表位结合片段。

[0218] 可以通过许多技术从本发明的抗体衍生这些活性片段。例如,可以用酶,如胃蛋白酶切割纯化的单克隆抗体,并进行HPLC凝胶过滤。然后可以收集包含Fab片段的适当级分,并通过膜过滤等浓缩。用于分离抗体的活性片段的一般技术的进一步描述见例如Khaw, B.A.等J.Nucl.Med.23:1011-1019(1982);Rousseaux等Methods Enzymology,121:663-69, Academic Press,1986。

[0219] “人源化抗体”指一类改造抗体,其具有它的源自非人供体免疫球蛋白的CDR,分子的其余源自免疫球蛋白的部分源自一个(或多个)人免疫球蛋白。

[0220] 人源化抗体还可以指具有可变区的抗体,其中该可变区的构架区中的一个或多个具有人或灵长类氨基酸。此外,可以改变构架支持残基来保留结合亲和力。获得“人源化抗体”的方法为本领域技术人员公知(见例如Queen等,Proc.Natl Acad Sci USA,86:10029-10032(1989);Hodgson等,Bio/Technology,9:421(1991))。

[0221] 还可以通过新的遗传工程方法获得“人源化抗体”,该方法使得能够在大型动物,例如兔中产生亲和力成熟的人样多克隆抗体(<http://www.rcitech.com/bioventures/therapeutic.php>)。

[0222] 术语“单克隆抗体”也为本领域公知,且指在实验室中从单克隆大量产生,且仅识别一种抗原的抗体。通常通过使正常情况下存活时间短的产抗体B细胞与快速生长的细胞,如癌细胞(有时称为“永生”细胞)融合来产生单克隆抗体。产生的杂交细胞或杂交瘤快速倍增,产生大量产生抗体的克隆。

[0223] 术语“抗原”指可以在生物,尤其是动物,更尤其是包括人的哺乳动物中诱导免疫应答的实体或其片段。该术语包含免疫原和负责抗原性的区域或抗原决定簇。

[0224] 本文中使用的术语“可溶的”意指部分或完全溶解在水溶液中。

[0225] 同样如本文中所使用,术语“免疫原性的”指在人类或动物中引出或增强定向针对免疫原性剂的抗体、T细胞和其他反应性免疫细胞的产生并促成免疫应答的物质。

[0226] 个体针对所施用的本发明的免疫原组合物产生足以缓和或缓解待治疗的障碍的抗体、T细胞和其他反应性免疫细胞时发生免疫应答。

[0227] 术语“杂交瘤”为本领域公知,且本领域普通技术人员将其理解为指通过产抗体细胞和永生细胞,例如多骨髓瘤细胞的融合产生的细胞。此杂交细胞能够产生持续的抗体供给。融合方法的更详细的描述见上文“单克隆抗体”的定义和下文实施例。

[0228] 本文中使用的术语“载体”意指抗原肽或超分子构建体可以掺入其中或可以与之结合,从而将抗原肽或肽的部分呈递或暴露给人或动物的免疫系统的结构。在本发明的背景内,可以将可以适宜地用于动物或人治疗的任意颗粒,例如小泡、颗粒或颗粒体用作载体。

[0229] 术语“载体”还包括递送方法,其中可以通过递送机制将包含抗原肽的超分子抗原构建体组合物转运至希望的部位。这种递送系统的一个实例利用胶体金属,如胶体金。

[0230] 可以用于本发明的超分子抗原构建体组合物中的载体蛋白包括但不限于麦芽糖结合蛋白“MBP”、牛血清白蛋白“BSA”、匙孔梗血蓝蛋白“KLH”、卵清蛋白、鞭毛蛋白、甲状腺球蛋白、任意物种的血清白蛋白、任意物种的 $\gamma$ 球蛋白、同源细胞、具有1a抗原的同源细胞及D-和/或L-氨基酸的多聚体。

[0231] 在本发明的“超分子抗原构建体”中,脂质体可以具有双重功能,因为它可以用作包含之前本文中所述的超分子构建体的载体,同时作为佐剂发挥作用来在待用本发明的治疗性疫苗治疗的靶动物或人内增加或刺激免疫应答。还应理解,本发明的超分子抗原构建体组合物可以进一步包含其他佐剂,其包括但不限于匙孔梗血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)和其他佐剂,例如脂质A、明矾、磷酸钙、白细胞介素1,和/或多糖和蛋白质的微囊,但尤其是去毒脂质A,如单磷酸或二磷酸脂质A,或明矾;其他防腐剂;稀释剂;乳化剂;稳定剂;和已知并用于现有技术的疫苗中的其他成分。此外,可以将本领域已知的任意佐剂系统用于本发明的组合物中。这类佐剂包括但不限于弗氏不完全佐剂;弗氏完全佐剂;多分散 $\beta$ -(1,4)连接乙酰化甘露聚糖(“Acemannan”); **Titermax**<sup>®</sup> (来自CytRx Corporation的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物佐剂);来自Chiron Corporation的修饰的脂质佐剂;来自Cambridge Biotech的皂苷衍生物佐剂;灭活百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*);革兰氏阴性菌的脂多糖(LPS);大的聚合阴离子,如硫酸葡聚糖;和无机凝胶,如明矾、氢氧化铝或磷酸铝。

[0232] 此外,术语“有效量”指在对人或动物施用时应引起免疫应答的抗原/免疫原组合物的量。本领域技术人员易于按照常规方法测定有效量。

[0233] 本文中使用的“免疫耐受患者”指动物或人患者,其显示有限的应答抗原,尤其是非自身抗原,但尤其是新抗原,例如存在于新出现的疾病中的新抗原的能力。此限制可以至少部分由CD4<sup>+</sup>T细胞的实足年龄引起。此外,由于回忆应答期间记忆T细胞的增殖和细胞因子分泌的缺陷,“免疫耐受患者”可以对抗原暴露显示受损的长期CD4<sup>+</sup>T细胞免疫应答。

[0234] 本文中使用的“T细胞活化患者”指显示T细胞活化,且其中进一步刺激T细胞应答将导致医疗风险的动物或人患者。

[0235] 本文中使用的“无免疫应答的患者”指具有因年龄、诸如HIV或癌症的疾病,或因治疗,例如针对包括但不限于类风湿性关节炎、银屑病、系统性红斑狼疮、韦格纳肉芽肿等的炎性疾病的治疗而受损的免疫系统的动物或人患者。

[0236] 在本发明的范围内,已显示抗体诱导的对本发明的抗原组合物的应答基本上是独立于T细胞的。将裸鼠模型用于此方面,接种裸鼠并测量抗体应答来评价本发明的抗原组合物在免疫的裸鼠中诱导的AB特异性抗体应答。裸鼠携带Foxn1nu突变,结果由于缺乏适当的胸腺而具有减少的T细胞功能。

[0237] 本文中使用的“药物有效量”指药物组合物中足以治愈,或至少部分阻断待治疗的疾病、障碍或病症的症状或与之相关的任意并发症的症状的活性成分剂量。

[0238] 在具体实施方案中,本发明利用尤其是在诸如脂质体的载体分子的表面上的抗原呈递,其导致优选抗原构象的增强的暴露和稳定化,其最终导致高特异性免疫应答,尤其是独立于T细胞的免疫应答,并导致具有独特特性的抗体的产生。

[0239] 具体而言,以高度重复阵列,尤其是包含至少10个重复抗原单位/载体分子、尤其是至少50个重复抗原单位/载体分子、尤其是至少100个重复抗原单位/载体分子、尤其是至少200个重复抗原单位/载体分子、尤其是至少300个重复抗原单位/载体分子、尤其是至少400个重复抗原单位/载体分子、尤其是至少500个重复抗原单位/载体分子的重复阵列将抗原肽呈递在载体分子的表面上。

[0240] 可以按照Nicolau等(2002)Proc Natl.Acad.Sci USA 99,2332-2337中报道的改进方法合成根据本发明和如本文中所述的修饰的磷酸肽抗原,尤其是模拟tau蛋白的主要病理磷酸化表位的磷酸肽抗原。此方法涉及用标准Fmoc/tBu化学在酰胺树脂上通过固相肽合成逐步组装构建体。然后去除末端赖氨酸的正交保护基团,并用棕榈酸酰化自由氨基。

[0241] 在酸性条件下达到侧链保护基团的脱保护和肽从树脂的并行释放,作为粗产物提供希望的四棕榈酰化磷酸肽。

[0242] 然后可以以高纯度获得终产物,并通过本领域已知的方法,例如电喷射质谱分析法和/或HPLC分析来确认其身份(identity)和纯度。

[0243] 在一个实施方案中,本发明提供包含模拟tau蛋白的主要病理磷酸化表位的根据本发明和如本文中所述的磷酸肽抗原的免疫原组合物,这样修饰该肽抗原,使得它能够保持和稳定确定的抗原构象。此确定的构象导致在引入动物或人中时诱导强烈和高度特异的免疫应答。

[0244] 达到形成和稳定化希望的抗原肽构象的一种方式是通过将抗原肽附着在载体、尤其是还可以作为佐剂发挥作用的载体上,或部分或完全掺入或重构在载体、尤其是还可以作为佐剂发挥作用的载体中来呈递抗原肽。

[0245] 在本发明的范围内可以考虑的载体是例如小泡、颗粒体或分子;细菌膜蛋白、肠杆菌Omp蛋白、纳米颗粒、微胶粒、金颗粒、微球和/或病毒体或可以适宜地作为抗原肽的载体/佐剂的任意其他手段,但尤其是脂质体。

[0246] 在本发明的具体实施方案中,通过弱相互作用,例如范德瓦耳斯相互作用、疏水或静电相互作用、或该相互作用中的两种或多种的组合将抗原肽附着在载体上,或掺入或重构在载体中,使得以特异性构象呈递肽,通过在它的三维运动自由中限制该抗原肽来保持和稳定该特异性构象,使得构象变化被阻止或严格限制。

[0247] 在将小泡、颗粒或颗粒体用作载体/佐剂,例如脂质体时,可以这样选择抗原肽的组成,使得它的总体净电荷与该肽所附着的载体/佐剂表面的总体净电荷相同。在带相同电荷的载体/佐剂表面和抗原肽之间,但尤其是带相同电荷的载体表面和组成抗原肽的氨基酸残基之间,且更尤其是带相同电荷的载体表面和包含于抗原肽中的带相同电荷的氨基酸残基之间有效的静电排斥力可以导致抗原肽采取确定、高度特异和稳定化的构象,这保证了高生物活性。结果,抗原肽以具有高生物活性的构象暴露和呈递,因为它允许靶生物的免疫系统自由地与以生物活性构象包含于抗原构建体中的抗原决定簇相互作用,在对动物或人施用,其导致强烈和构象特异性的免疫应答,在靶生物中产生例如高抗体效价。

[0248] 可以通过用脂质体作为载体来进一步增加免疫原应答,该脂质体可以作为佐剂发挥用来在待用本发明的药物组合物治疗的靶动物或人内增加或刺激免疫应答。可选地,此外,脂质体可以包含其他佐剂,例如脂质A、明矾、磷酸钙、白细胞介素1和/或多糖和蛋白质的微囊,但尤其是去毒脂质A,如单磷酰或二磷酰脂质A,或明矾。

[0249] 在本发明的具体实施方案中,将根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽,尤其是其总体净电荷为负的抗原肽重构在脂质体,尤其是这样选择其组分,使得脂质体头部基团的总体净电荷为负的脂质体中来使用。具体而言,脂质体由选自双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、双肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(DMPEA)、双肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)和胆固醇的组分组成,且可选地进一步包含单磷脂脂质A或可以适宜地在本发明的范围内使用的任意其他佐剂,例如明矾、磷酸钙、白细胞介素1和/或多糖和蛋白质的微囊。

[0250] 在本发明的另一具体实施方案中,提供与锚型分子共价结合的根据本发明和如之前本文中所述的修饰的肽抗原,该锚型分子能够插入载体/佐剂,从而将肽固定于载体/佐剂,并将它呈递在载体/佐剂分子的表面上或靠近载体/佐剂分子的表面呈递,使得静电力如之前本文中所述变得有效。

[0251] 用脂质体作为载体/佐剂时,抗原肽构建体在它形成时一般具有插入脂质体膜中的疏水尾部。此外,可以修饰抗原肽为包含疏水尾部,使得它可以插入脂质体中。

[0252] 本发明的抗原组合物尤其包含修饰来增强抗原作用的肽,其中这类肽可以通过聚乙二醇化(使用聚乙二醇或修饰的聚乙二醇)来修饰,或通过其他方法,如通过之前本文中所述的棕榈酸、聚氨基酸(例如聚甘氨酸、聚组氨酸)、多糖(例如聚半乳糖醛酸、聚乳酸、聚乙醇酸交酯、壳多糖、脱乙酰壳多糖)、合成聚合物(聚酰胺、聚氨基甲酸酯、聚酯)或共聚物(例如聚(甲基丙烯酸)和N-(2-羟基)丙基甲基丙烯酰胺)等来修饰。

[0253] 在本发明的具体实施方案中,提供根据本发明和如之前本文中所述的抗原肽,将其修饰为包含疏水尾部,使得该肽可以插入脂质体中。具体而言,可以通过便于插入载体/佐剂的脂双层中的亲脂或疏水部分来修饰模拟tau蛋白的主要病理磷酸化表位的根据本发明和如本文中所述的磷酸肽抗原。本发明的亲脂或疏水部分可以是脂肪酸、甘油三酯和磷脂,尤其是其中脂肪酸碳主链具有至少10个碳原子的脂肪酸、甘油三酯和磷脂,尤其是包含具有至少约14个碳原子和至多约24个碳原子的碳主链的脂肪酸的亲脂部分,此范围内的各单个碳原子数也是本发明的部分。具体而言,本发明涉及根据本发明和如之前本文中所述的抗原肽,将其修饰为包含疏水尾部,尤其是包含具有至少14个碳原子,但尤其是16个碳原子的碳主链的疏水部分的疏水尾部。疏水部分的实例包括但不限于棕榈酸、硬脂酸、豆蔻酸、月桂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸和胆固醇或1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DSPE)。在本发明的具体实施方案中,疏水部分是棕榈酸。

[0254] 在一个实施方案中,根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽与亲脂或疏水部分共价连接。在本发明的背景中,可以利用氨基酸残基来介导抗原肽的共价连接,该氨基酸残基尤其是在它们的末端,尤其是在它们的N端和C末端延伸对应于本发明的抗原肽的序列的氨基酸序列,且脂肪酸残基与该氨基酸残基偶联。

[0255] 具体而言,各缀合物包含至少四分子脂肪酸,该脂肪酸包含C12和C24之间的碳链,尤其是C16的碳链,其中脂肪酸分子在抗原肽的N端和C末端共价连接。还可以考虑包括在氨基酸序列内连接的其他分布。这些肽还与脂肪酸分子共价偶联。

[0256] 因此,本发明的药物组合物可以包含通过在存在根据本发明和如本文中所述的纯化或部分纯化或修饰的抗原肽的情况下重构脂质体产生的脂质体。此外,可以将肽片段重构在脂质体中。本发明还包含为了增加它们的抗原性而修饰的抗原肽片段。例如,可以将抗原部分和佐剂与肽连接或混合。抗原部分和佐剂的实例包括但不限于亲脂性胞壁酰二肽衍

生物、非离子型嵌段聚合物、氢氧化铝或磷酸铝佐剂及其混合物。

[0257] 可以用于本发明的组合物中的脂质体包含本领域技术人员公知的那些。可以使用用于制备脂质体的任意标准脂质。可以用标准的双层和多层脂质体来制备本发明的组合物。虽然可以使用本领域技术人员已知的制备脂质体的任意方法,但按照Alving等, *Infect. Immun.* 60:2438-2444, 1992的方法制备最优的脂质体,该文献在此引入作为参考。脂质体可以可选地包含佐剂或/和免疫调节剂或二者。优选的免疫调节剂是脂质A,尤其是去毒脂质A,例如单磷酰或二磷酰脂质A。

[0258] 可以通过例如Wagner等(2002) *Journal of Liposome Research*, 第12(3)卷,第259-270页中所述的交叉流注射技术来制备脂质体。在脂质溶液注射入水性缓冲系统期间,脂质趋向于形成“沉淀物”,然后自排列为小泡。所获得的小泡大小取决于诸如脂质浓度、搅拌速度、注射速度和脂质的选择的因素。制备系统可以由交叉流注射模块、用于极性相(例如PBS缓冲溶液)的容器、乙醇/脂质溶液容器和压力装置但尤其是氮气压力装置组成。通过交叉流注射模块泵入水溶液或极性溶液,同时应用不同压力将乙醇/脂质溶液注射入极性相。

[0259] 在一个实施方案中,因此可以通过重构在由不同摩尔比的磷脂和胆固醇(磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、胆固醇)组成的脂质体中来进一步修饰根据本发明和如本文中所述的修饰的抗原肽。可以使用其他磷脂。按约40 $\mu$ g/ $\mu$ mole磷脂的浓度使用脂质A。

[0260] 脂质体可以具有双重功能,因为它可以用作包含之前本文中所述的超分子构建体的载体,同时作为佐剂发挥作用来在待用本发明的治疗性疫苗治疗的靶动物或人内增加或刺激免疫应答。可选地,此外,脂质体可以包含其他佐剂或/和免疫调节剂或二者,例如脂质A、明矾、磷酸钙、白细胞介素1和/或多糖和蛋白质的微囊,但尤其是脂质A,更尤其是去毒脂质A,如单磷酰或二磷酰脂质A,或明矾。

[0261] 在本发明的具体实施方案中,用具有脂质A的脂质体作为佐剂来制备本发明的药物组合物。尤其是以9:1:7的摩尔比混合双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、双肉豆蔻酰磷脂酰甘油和双肉豆蔻酰磷脂酰胆固醇。然后按适宜的浓度,尤其是按每毫摩尔磷脂20mg和50mg之间的浓度,更尤其是按每毫摩尔磷脂30mg和40mg之间的浓度加入强免疫调节剂,例如单磷酰脂质A。然后按肽与磷脂的摩尔比在1:30和1:200之间,尤其是摩尔比在1:50和1:120之间,更尤其是1:100加入修饰的抗原肽。例如通过蒸发去除溶剂,并用无菌缓冲溶液,例如PBS水化产生的膜。

[0262] 在本发明的具体实施方案中,提供根据本发明的抗原肽和如本文中所述的抗原肽,通过与该抗原肽的N端和C末端末端共价结合的至少两分子棕榈酸和通过重构在脂质体载体中来修饰该抗原肽。

[0263] 在提供肽在脂质体双层中的锚的同时,由于C<sub>16:0</sub>脂肪酸部分的相对减少的长度,棕榈酰化导致肽暴露在脂质体表面上或靠近脂质体表面呈递。

[0264] 在例如下文所述的利用本组合物的试剂盒的背景中,可以以液体溶液或可注射悬液的形式,或者以适合在注射前溶解的固体形式制备本发明的药物组合物,该药物组合物尤其是以药物有效量包含根据本发明的肽抗原和如本文中所述的肽抗原,尤其是模拟tau蛋白的主要病理磷酸化表位的磷酸肽。

[0265] 适宜的药物载体、稀释剂和/或赋形剂为本领域公知,且包含例如磷酸缓冲盐溶

液、水、诸如油/水乳剂的乳剂、多种类型的湿润剂、无菌溶液等。

[0266] 可以按照本领域技术人员已知的标准方法完成本发明的药物组合物的配制。

[0267] 可以对患有tau病或与tau病相关的症状的人或动物施用本发明的药物组合物来在该人或动物中诱导免疫应答,以缓解与该疾病相关的症状或恢复见于未患该疾病的健康个体中的条件,该药物组合物尤其是以药物有效量包含根据本发明的肽抗原和如本文中所述的肽抗原,尤其是模拟tau蛋白的主要病理磷酸化表位的磷酸肽。

[0268] 按适宜的药物有效剂量以固体、液体或气溶胶的形式通过任意适当的标准给药途径对人或动物施用本发明的组合物。一般而言,可以通过局部、口服、直肠、鼻或肠胃外(例如静脉内、皮下或肌内)途径施用组合物。此外,可以将组合物掺入持续释放基质,如生物降解聚合物中,将该聚合物植入希望递送的部位附近,例如肿瘤部位处。该方法包括施用单剂量、按预定的时间间隔施用重复剂量和持续施用预定的一段时间。

[0269] 在本发明的具体实施方案中,按1周和20周之间的时间间隔,尤其是按1周和10周之间的时间间隔,尤其是按1周和6周之间的时间间隔,更尤其是按1周和4周之间的时间间隔,甚至更尤其是按2周和3周之间的时间间隔,以重复剂量,尤其是以1至15个剂量,更尤其是以2至10个剂量,更尤其是以3至5个剂量,甚至更尤其是以3个剂量施用本发明的抗原构建体,尤其是以可药用形式包含该抗原构建体的疫苗组合物。可以通过在强化后适宜的时间,尤其是强化后3至10天,更尤其是强化后4至8天,更尤其是强化后7天采集血清/血浆样品,并用已知的方法,尤其是常用免疫测定中的一种,例如ELISA实验测定抗原构建体的免疫原性来监测免疫应答。

[0270] 具体而言,通过肠胃外,尤其是通过腹膜内、静脉内、皮下和肌内注射施用本发明的抗原肽组合物。

[0271] 用于肠胃外施用的制剂包含无菌水溶液或非水溶液、悬液和乳剂。非水溶剂非限制性地包括丙二醇;聚乙二醇;植物油,如橄榄油;和可注射的有机酯,如油酸乙酯。水性溶剂可以选自水、醇/水溶液、包括盐水和缓冲介质的乳剂或悬液。肠胃外载体包含氯化钠溶液、Ringer's葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸化Ringer's或固定油类。静脉内载体包含液体和营养物补充剂、电解质补充剂(如基于Ringer's葡萄糖的那些)等。还可以存在防腐剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0272] 组合物的剂量将取决于所治疗的病症、所使用的具体组合物和其他临床因素,如患者的体重、大小和病症、体表面积、待施用的具体化合物或组合物、同时施用的其他药物和给药途径。

[0273] 本发明的药物组合物可以与其他生物活性物质和用于治疗疾病,尤其是神经变性疾病的方法组合施用。其他生物活性物质可以是已经以混合物的形式包含本发明的药物组合物的相同组合物的部分,其中本发明的药物组合物和其他生物活性物质混合在相同的可药用溶剂和/或载体中或与相同的可药用溶剂和/或载体混合,或者可以作为分开的组合物的部分分别提供,该分开的组合物可以以一套组件的形式分开或一起提供。

[0274] 本发明的药物组合物可以间歇地或顺次地与其他生物活性物质并行施用。例如,用本发明的药物组合物可以与第一其他生物活性物质同时或顺次地在施用药物组合物之后或之前施用。如果选择与本发明的至少一种药物组合物一起施用一种以上其他生物活性物质的应用方案,则可以以多种组合部分同时地、部分顺次地施用该化合物或物质。



[0275] 本发明的另一目的是提供本发明的药物组合物与可选的一种或多种其他生物活性物质的混合物,以及用本发明的药物组合物或其混合物,包括含有该复合肥组合物的组合物或复合肥组合物的混合物来预防和/或治疗性处理和/或缓解tau病的作用的方法,tau病是与神经原纤维损伤的形成相关的一组疾病和障碍,神经原纤维损伤的形成是此组神经变性障碍中的主要脑病理,此组神经变性障碍包括但不限于阿尔茨海默病、克-雅综合症、拳击员痴呆、唐氏综合症、格-施-沙病、包涵体肌炎和阮病毒蛋白脑淀粉样血管病、外伤性脑损伤,及其他关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森综合症-痴呆综合症、非关岛运动神经元病伴神经原纤维缠结、嗜银颗粒性痴呆、皮层基底节变性、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、17号染色体连锁额颞痴呆伴帕金森综合症、Hallevorden-Spatz病、多系统性萎缩、C型尼-皮病、皮克病、进行性皮层下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结型痴呆、脑炎后帕金森综合症、强直性肌营养不良。

[0276] 除本发明的药物组合物外,本发明的混合物可以包含生物活性物质,例如已知的用于tau病和/或淀粉状蛋白病(amyloidoses)的药物中的化合物,淀粉状蛋白病是与淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白质,如涉及阿尔茨海默病的淀粉状蛋白 $\beta$ 蛋白质相关的一组疾病和障碍。

[0277] 在本发明的另一实施方案中,其他生物活性物质或化合物还可以是治疗剂,该治疗剂可以用于治疗由淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白质引起或与淀粉状蛋白或淀粉状蛋白样蛋白质相关的疾病和障碍,包括由淀粉状蛋白 $\beta$ 引起的淀粉状蛋白病,或者可以用于其他神经障碍的疗法中。

[0278] 其他生物活性物质或化合物可以通过与本发明的治疗性疫苗相同或相似的机制,或者通过不相关的作用机制,或者通过相关和/或不相关的作用机制的多重性发挥其生物效应。

[0279] 一般而言,其他生物活性化合物可以包含神经传递增强剂;精神病治疗药物;乙酰胆碱酯酶抑制剂;钙通道封闭剂;生物胺;苯二氮杂安定药;乙酰胆碱合成、保存或释放的增强剂;乙酰胆碱突触后受体激动剂;单胺氧化酶-A或-B抑制剂;N-甲基-D-天冬氨酸谷氨酸受体拮抗剂;非类固醇抗炎药;抗氧化剂;和5-羟色胺能受体拮抗剂。

[0280] 具体而言,本发明的混合物可以包含选自以下的至少一种其他生物活性化合物:抗氧化应激的化合物;抗凋亡化合物;金属螯合剂;DNA修复的抑制剂,如哌仑西平和代谢物3-氨基-1-丙磺酸(3APS)、1,3-丙二磺酸(1,3PDS);分泌酶激活剂; $\beta$ -和 $\gamma$ -分泌酶抑制剂;tau蛋白;神经递质; $\beta$ -折叠封闭剂;抗炎分子;或胆碱酯酶抑制剂(ChEI),如他克林、利斯的明、多奈哌齐和/或加兰他敏;和其他药物和营养补充剂;连同本发明的治疗性疫苗和可选的可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0281] 在另一实施方案中,本发明的混合物可以包含烟酸或二甲金刚烷,连同本发明的治疗性疫苗和可选的可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0282] 还在本发明的另一实施方案中,提供包含“非典型抗精神病药”,连同本发明的治疗性疫苗和可选的可药用载体和/或稀释剂和/或赋形剂的混合物,该非典型抗精神病药例如用于治疗包括幻觉、妄想、思维障碍(表征为明显的不连贯、偏向、离题症)和奇异或紊乱行为,以及快感缺乏、情感淡漠、无欲貌和回避社交的阳性和阴性精神病症状的氯氮平、齐培西酮、利培酮、阿立哌唑或奥氮平。

[0283] 在本发明的具体实施方案中,根据本发明和如之前本文中所述的组合物和混合物分别以治疗或预防有效量包含本发明的药物组合物和生物活性物质。

[0284] 可以适宜地与本发明的药物组合物组合用于混合物中的其他化合物描述于例如 WO 2004/058258 中(尤其见16和17页),其包含治疗性药物靶标(36-39页)、链烷磺酸和链烷醇硫酸(39-51页)、胆碱酯酶抑制剂(51-56页)、NMDA受体拮抗剂(56-58页)、雌激素(58-59页)、非类固醇抗炎药(60-61页)、抗氧化剂(61-62)、过氧化物增殖物激活受体(PPAR)激动剂(63-67页)、降胆固醇剂(68-75页)、淀粉状蛋白抑制剂(75-77)、淀粉状蛋白形成抑制剂(77-78页)、金属螯合剂(78-79页)、抗精神病药和抗抑郁药(80-82页)、营养补充剂(83-89)和增加生物活性物质在脑中的有效性的化合物(见89-93页)和前体药物(93和94页),该文件在此引入作为参考,尤其是上文所指出的页面上提到的化合物在此引入作为参考。

### 实施例

[0285] 实施例1:疫苗

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

[0287] 表1:Tau序列描述

[0288]

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

[0289]

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

[0290] 实施例2: Tau衍生的四棕榈酰化磷酸肽的制备

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

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

[0293] Tau衍生的四棕榈酰化磷酸肽的序列:

[0294] T1: H-K (Pal) -K (Pal) -RQFEVMDHAGTY (P) CL-K (Pal) -K (Pal) -NH<sub>2</sub>[0295] T2: H-K (Pal) -K (Pal) -PGS (p) PGT (p) PGSRSR (p) PS (p) LP-K (Pal) -K (Pal) -NH<sub>2</sub>[0296] T3: H-K (Pal) -K (Pal) -VYKS (p) PVVSGDTS (p) PRHL-K (Pal) -K (Pal) -NH<sub>2</sub>[0297] T4: H-K (Pal) -K (Pal) -GDTS (p) PRNLS (p) NVSSTGSID-K (Pal) -K (Pal) -NN<sub>2</sub>[0298] T8: H-K (Pal) -K (Pal) -PGSRSR (p) PS (p) LPTPPTR-K (Pal) -K (Pal) -NH<sub>2</sub>[0299] T9: H-K (Pal) -K (Pal) -CYSSPGS (p) PGT (p) PGSRSR-K (Pal) -K (Pal) -NH<sub>2</sub>[0300] T10: H-K (Pal) -K (Pal) -NLS (p) NVSSTGSID-K (Pal) -K (Pal) -NH<sub>2</sub>[0301] T11: H-K (Pal) -K (Pal) -VSGDTS (p) PRHL-K (Pal) -K (Pal) -NH<sub>2</sub>

[0302] 2.1肽抗原T1的合成

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

之前所述的偶联流程自动掺入随后16个具有Fmoc标准侧链保护基团的氨基酸。作为磷酸基团上的单苄基酯引入磷酸氨基酸。各偶联步骤后进行使用DMF的洗涤步骤(3×30秒)、使用含25%哌啶的DMF的Fmoc去除步骤(3×3分钟)和使用DMF的第二洗涤步骤(6×30秒)。偶联Tyr (PO (OBzl) 2) 之后,用含0.5%DBU的DMF进行Fmoc脱保护步骤。肽序列的组装以用含2当量PyBOP/HOBt/DIEA的DMF添加最后两个Fmoc-Lys (Mtt) -OH结束。

[0304] 然后,通过在几个10分钟的循环期间用10mL TIPS/TFA/DCM (1:1:98) 的脱气混合物处理树脂(1当量,600mg,0.092mmol) 来在氮气下选择性切割末端赖氨酸残基的Mtt基团。用DCM(×3) 和DMF(×3) 洗涤树脂。然后用含TBTU (20当量,593mg,1.85mmol) 和DIEA (40当量,643μL,3.70mmol) 的DCM/DMF (1:1) (6mL) 将棕榈酸(20当量,473mg,1.85mmol) 偶联至这些脱保护的氨基。然后用DCM(×5) 和DMF(×5) 洗涤树脂。然后用脱气的含20%哌啶的DMF (3×10分钟) 去除N端Fmoc基团,并用DMF(×3) 和DCM(×5) 洗涤树脂。最后,在4.5小时内用TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O/EDT (95:1:2.5:2.5) 的脱气混合物(4mL) 在氮气下进行同时的树脂切割和侧链脱保护。作为具有56%纯度(来自HPLC分析) 的白色固体(189mg,60%产率),从冷乙醚研磨产生了粗产物T1。MALDI-TOF质谱分析法确认了主产物的身份(预期m/z:3427.12[MH<sup>+</sup>],实测:3426.87)。

#### [0305] 2.2肽抗原T3的合成

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

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

#### [0308] 2.3肽抗原T4的合成

[0309] 用DCCI和HOBt作为DMF中的激活剂将正交保护的氨基酸Fmoc-Lys (Mtt) -OH (5倍过量) 自动连接至Tentagel R RAM酰胺树脂(0.19mm/g,750mg,0.1425mmol)。去除N端Fmoc基团后,在存在DCCI和HOBt的情况下偶联Fmoc-Lys (Mtt) -OH的第二残基(5倍过量)。应用相似

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

[0310] 然后,通过在几个10分钟的循环期间用10mL TIPS/TFA/DCM (1:1:98) 处理树脂 (1当量,750mg,0.075mmol) 来选择性切割末端赖氨酸残基的Mtt基团。用DCM (×3) 和DMF (×3) 洗涤树脂。然后用DCM/DMF (1:1) (7mL) 中的TBTU (20当量,482mg,1.5mmol) 和DIEA (40当量,536μL,3.0mmol) 将棕榈酸 (20当量,51mg,0.2mmol) 偶联至这些脱保护的氨基。然后用DCM (×5) 和DMF (×5) 洗涤树脂。然后用含20%哌啶的DMF (3×10分钟) 去除N端Fmoc基团,并用DMF (×3) 和DCM (×5) 洗涤树脂。最后,在3.5小时内用TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) 的混合物 (6mL) 进行同时的树脂切割和侧链脱保护。作为具有50%纯度 (来自HPLC分析) 的白色固体 (96mg,37%产率),从冷乙醚研磨产生了粗产物T4。MALDI-TOF质谱分析法确认了主产物的身份 (预期m/z:3455.10 [MH<sup>+</sup>],实测:3456.13)。

#### [0311] 2.4肽抗原T8的合成

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

[0313] 然后,通过在几个10分钟的循环期间用10mL TIPS/TFA/DCM (1:1:98) 处理肽基树脂 (1当量,385mg,0.019mmol) 来选择性切割末端赖氨酸残基的Mtt基团。用DCM (×3) 和DMF (×3) 洗涤树脂。然后用DCM/DMF (1:1) (4mL) 中的TBTU (20当量,1.21g,3.8mmol) 和DIEA (40当量,1.31mL,7.6mmol) 将棕榈酸 (20当量,968mg,3.8mmol) 偶联至这些脱保护的氨基。然后用DCM (×5) 和DMF (×5) 洗涤树脂。然后用含20%哌啶的DMF (3×10分钟) 去除N端Fmoc基团,并用DMF (×3) 和DCM (×5) 洗涤树脂。最后,在3.5小时内用TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) 的混合物 (4mL) 进行同时的树脂切割和侧链脱保护。作为具有55%纯度 (来自HPLC分析) 的白色固体 (50.2mg,10%产率),从冷乙醚研磨产生了粗产物T8。MALDI-TOF质谱分析法确认了主产物的身份 (预期m/z:3331.17 [MH<sup>+</sup>],实测:3335.19)。

#### [0314] 2.5肽抗原T9的合成

[0315] 在存在DMF中的PyBOP/HOBt/DIEA的情况下将正交保护的氨基酸Fmoc-Lys (Mtt) -OH (3当量) 手动装载至酰胺树脂 (Rink酰胺MBHA树脂,1当量,0.4mmol)。然后用DMF洗涤树脂 (3×1分钟)。用含25%哌啶的DMF (1×1分钟和2×15分钟) 去除N端Fmoc基团后,用相同的装载条件偶联Fmoc-Lys (Mtt) -OH的第二残基 (3当量)。应用之前所述的偶联流程掺入随后16个具有Fmoc标准侧链保护基团的氨基酸。作为磷酸基团上的单苄基酯引入磷酸氨基酸。脯氨酸之后通过TNBT测试或chloranil测试测定偶联时间。根据需要,在存在DIC/HOBt或

HATU/DIEA的情况下用2当量Fmoc-氨基酸进行第二偶联。各偶联步骤后跟随使用DMF的洗涤步骤(3×1分钟)、使用含25%哌啶的DMF的Fmoc去除步骤(1×1分钟和2×15分钟)和使用DMF的第二洗涤步骤(7×1分钟)。偶联Thr(PO(OBzl)OH)之后,用DMF中的0.5%DBU进行Fmoc脱保护步骤。肽序列的组装以最后两个Fmoc-Lys(Mtt)-OH的添加结束。

[0316] 然后,通过几个10分钟的循环期间用10mL TIPS/TFA/DCM(1:1:98)处理树脂(1当量,650mg,0.156mmol)来选择性切割末端赖氨酸残基的Mtt基团。用DCM(×3)和DMF(×3)洗涤后,用DCM/DMF(1:1)(6mL)中的TBTU(20当量,814mg,3.15mmol)和DIEA(40当量,1.1mL,6.30mmol)将棕榈酸(20当量,1.01g,3.15mmol)偶联至那些脱保护的氨基。用DCM(×5)和DMF(×5)充分洗涤树脂。然后用含20%哌啶的DMF(3×10分钟)去除N端Fmoc基团,并用DMF(×3)和DCM(×5)洗涤树脂。最后,在3小时内用TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O(95:2.5:2.5)的混合物(9mL)进行同时的树脂切割和侧链脱保护。作为具有69%纯度(来自HPLC分析)的白色固体(291mg,59%产率),从冷乙醚研磨产生了粗产物T9。MALDI-TOF质谱分析法确认了主产物的身份(预期m/z:3172.98[MH<sup>+</sup>],实测:3172.90)。

#### [0317] 2.6肽抗原T10的合成

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

#### [0319] 2.7肽抗原T11的合成

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

#### [0321] 实施例3:疫苗制备(方法A)

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

#### [0323] 实施例4: Tau脂质体疫苗的特征

##### [0324] 4.1方法

##### [0325] 4.1.1肽、DMPC和胆固醇的HPLC定量

[0326] 为了分析脂质体tau疫苗(ACI-33、ACI-35、ACI-36、ACI-39、ACI-40和ACI-41,均按照实施例3中所述的方法A制备),通过向玻璃HPLC管中的疫苗样品(20μl)加入水(20μl),然后加入异丙醇(140μl)和TFA(20μl)来制备样品。注射(20μl)前短暂涡旋5倍稀释的样品。用保持75℃恒温的C3反相Zorbax 300SB-B3柱(250×4.6mm,5μm, **300Å**, Agilent)进行分析,在207和214nm下检测。洗脱溶剂如下:溶剂B:95%异丙醇、5%水、0.1%TFA;溶剂A:10%乙

腈、90%水、0.1%TFA。以1ml/分钟的流速在20分钟内应用从40%B至60%B的梯度。为了校准目的,分别按不同的浓度使用tau肽(T1、T3、T4、T8和T9)和DMPC/胆固醇的标准品。对于tau肽,制备TFA/iPrOH/H<sub>2</sub>O(1:7:2)中的1mg/ml的储液,并从400μg/ml(1:1)系列稀释至12.5μg/ml。对于脂质,制备70%异丙醇和30%水中的8.0mg/ml DMPC和3.5mg/ml胆固醇的储液,并用相同的混合物(1:5)、(1:10)和(1:50)稀释。

#### [0327] 4.1.2 MPLA的HPLC定量

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

#### [0329] 4.1.3 脂质体表面电势

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

#### [0331] 4.1.4 圆二色性构象分析

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

#### [0333] 4.1.5 ThT荧光测定

[0334] 在酶标仪Infinite M200(Tecan Group Ltd,瑞士)上获得ThT荧光测量结果。作为一般方法,用PBS将tau脂质体构建体稀释至不同浓度(表2)。类似地稀释具有相同组成但缺乏tau肽的脂质体,以用作阴性对照(批次ACI-35-081015-B)。向98μl的各疫苗或空白溶液加入ThT(2μl,1.2mM于水中),以产生24μM的终浓度。短暂涡旋后,将来自各样品的整分试样(70μl)加至黑色不透明的384孔Perkin Elmer微量滴定板上,在440nm下激发30分钟后在485nm下测量荧光发射。激发带宽为9nm,发射带宽为20nm。用γ-环糊精作为内部对照。从PBS中的640mM储液制备PBS中的系列2倍稀释液,以获得320、160和80mM γ-环糊精对照溶液。

#### [0335] 表2:制备用于ThT测定的样品

[0336]

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

[0337] 4.2. 结果

[0338] 4.2.1 肽、DMPC和胆固醇的HPLC定量

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

[0340] 4.2.2 MPLA的HPLC定量



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

[0342] 4.2.3脂质体表面电势

[0343] 测量到的tau脂质体疫苗的 $\zeta$ 电势显示在表4中。

[0344] 4.2.4脂质体疫苗内tau肽的CD构象分析

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

[0346] 4.2.5脂质体疫苗内tau肽的ThT测定

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

[0348] 表3.疫苗特征的总结

[0349]

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

[0350] 实施例5:tau棕榈酰化抗原在野生型和Tau-/-K0小鼠中的免疫原性

[0351] 5.1方法

[0352] 5.1.1tau敲除小鼠 (TK0)

[0353] 用靶向载体达到tau基因的敲除,该靶向载体在该基因的外显子1中与内源起始密

码子符合读框地插入EGFP(增强型绿色荧光蛋白)cDNA。这产生了融合蛋白质,其具有tau的前31个氨基酸,随后是EGFP(由Tucker KL.等,Nature Neuroscience,2001描述)。通过全脑裂解物的Western印迹确认了基因的缺失。使用几种抗-tau抗体的tau蛋白水平显示,所有tau同种型都在纯合突变体中缺乏,在杂合突变体中减少50%。将突变维持在C57BL/6背景上。

[0354] 5.1.2疫苗的制备

[0355] 通过实施例3中所述的方法A制备疫苗。

[0356] 5.1.3免疫

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

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

[0359] 表4:小鼠免疫

[0360]

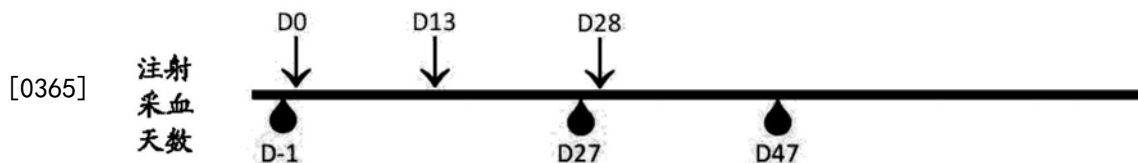
组	小鼠	月龄	动物数目和性别	处理/体积 <sup>a</sup>	疫苗批次	给药途径 <sup>b</sup>	剂量水平肽的量 ug/剂量 <sup>c</sup>	MPLA 的量 ug/剂量 <sup>c</sup>
ACI-33 (T1 肽)	WT	6	3 ♀ 3 ♂	ACI-33 0.2 ml	ACI-33-0 81031-A	腹膜内	9	12
	KO	4-5	3 ♀ 3 ♂	ACI-33 0.2 ml	ACI-33-0 81031-A	腹膜内	9	12
ACI-35 (T3 肽)	WT	6	3 ♀ 3 ♂	ACI-35 0.2 ml	ACI-35-0 81015-A	腹膜内	16	23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

[0361] <sup>a</sup>:理论体积

[0362] <sup>b</sup>:i.p.:腹膜内

[0363] <sup>c</sup>:分析后测定的测量量

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



[0366] 5.1.4Tau肽特异性抗体的定量

[0367] 在3个血清采血样品中通过ELISA测定针对pTau肽的特异性IgG抗体。在来自d-1和d47的血清中测定了Tau肽特异性IgG。在d47血清采血样品中通过ELISA测定了肽pTau特异性IgM和IgG同种型抗体。用10ug/ml的对应的Tau肽在4℃下过夜包被平板。用PBS-0.05% Tween 20洗涤各孔并用PBS-0.05% Tween 20中的1%BSA封闭后,将血清的系列稀释液加至平板,并在37℃下孵育2小时。洗涤后,用碱性磷酸酶 (AP) 缀合的抗-小鼠IgG总抗体 (Jackson Laboratories,Baltimore,PA,美国) 或同种型特异性抗体 (购自Pharmingen BD, San Diego,CA,USA的辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的抗-小鼠IgM、AP缀合的抗-小鼠IgG1、生物素缀合的抗-小鼠IgG2a和IgG3,及来自Zymed Laboratories, San Francisco,CA的HRP缀合的抗-小鼠IgG2b) 在37℃下孵育平板2小时。洗涤后,用AP的磷酸酶底物pNPP (对-硝基-苯基-磷酸盐) 或HRP的底物ABTS (2,2'-连氨基-双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)) 孵育平板,并用ELISA酶标仪在405nm下读数。对生物素缀合的抗体进行了补充步骤,其中在用ABTS检测前在链霉抗生物素蛋白-HRP (R&D Systems,Minneapolis,MN,美国) 中孵育平板45分钟。对于IgG,结果表示为第一稀释度和非饱和稀释度下的0.D. (光密度),对于IgG同种型和IgM,结果表示为非饱和0.D.下的0.D.。

[0368] 5.1.5抗-Tau抗体与来自转基因动物的脑片上的Tau缠结的结合 (TAUPIR)

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

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

[0371] 在PBS中洗涤脑切片5分钟,然后在PBS:MeOH (1:1) 中的1.5% $H_2O_2$ 中在RT下孵育15分钟,以封闭内源过氧化物酶。在PBST (PBS/0.1% TritonX100) 中洗涤切片三次后,在PBST+10%FCS (胎牛血清) 封闭溶液在RT下孵育它们30分钟。在4℃下过夜进行包含抗-tau抗体的血清的孵育。用从1/2'500至1/10'000的几个不同稀释度将血清稀释在PBST/10%FCS中。在PBST中洗涤切片三次,然后用PBST/10%FCS中的HRP缀合的山羊抗-小鼠 (购自Dako, Glostrup, 丹麦) 第二抗体在RT下孵育1小时。检测前,用PBST洗涤切片三次,并在50mM Tris/HCl pH7.6中孵育5分钟。通过在二氨基联苯胺 (DAB:1片于10ml 50mM Tris.HCl+3ul  $H_2O_2$ 30%中;MP Biomedicals,Solon,OH,美国) 中孵育切片3分钟来进行检测。通过在PBST中洗涤切片三次来终止反应。然后将切片转移至硅烷化玻璃板上,并在50℃下在加热板上风干2小时。用Mayers苏木精 (Fluka Chemie,Buchs,瑞士) 孵育1分钟进行复染,然后在流动的自来水中洗涤4分钟。通过在50%、70%、90%和两次100%的乙醇浴中,然后在二甲苯中2次

1分钟传递来脱水切片。最后,用DePeX (BDH Chemicals Ltd., Poole, 英格兰) 将切片封固在玻璃盖片下。

#### [0372] 5.1.6 Western印迹 (WB)

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

[0374] 在以下缓冲液中进行野生型FVB、TPLH、biGT和Tau敲除 (TKO) 小鼠的脑匀浆: 25mM Tris/HCl pH7.6、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、30mM NaF、0.2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1nM冈田软海绵酸 (Okadaic acid)、1mM苯甲基磺酰氟 (PMSF)、5mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>、每12ml总体积1片全蛋白酶抑制剂混合物 (CPIC)。为了获得总脑匀浆, 用以700转/分钟使用的电机驱动potter-like (玻璃管/聚四氟乙烯研杵) 在1体积/重量半球 (ml/g) 中在冰上匀浆脑。

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

#### [0376] 5.2结果

##### [0377] 5.2.1来自接种小鼠的血清的抗体的特异性

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

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

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

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

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

差分析 $P<0.0001$ d-1对d34/48) (图4d:TKO小鼠,抗-Tau196-211[pS202/pT205])-IgG,单因素方差分析 $P<0.0001$ d-1对d34/48)。

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

[0384] 表5:来自接种小鼠的血清的抗体特异性提要

[0385]

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

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

[0387] ACI-33

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

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

[0390] ACI-35

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

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

[0393] ACI-36

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

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

[0396] ACI-41

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

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

抗-Tau196-211[pS202/pT205]抗体效价(图8b;TK0小鼠)。

### [0399] 5.3结论

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

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

### [0402] 实施例6:杂交瘤和抗体的产生和筛选

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

### [0404] 6.1方法

#### [0405] 6.1.1融合

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

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

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

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

#### [0410] 6.1.2选择克隆的筛选方法

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

#### [0412] 6.1.3IgG筛选

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

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

#### [0414] 6.1.4杂交瘤Tau ELISA筛选

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

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

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

[0418] 按照来自实施例5.1.5的流程进行TAUPIR实验。

#### [0419] 6.1.6T25瓶IgG筛选

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

#### [0421] 6.2结果

##### [0422] ACI-33杂交瘤

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

##### [0424] 表6:



[0425]

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

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

[0427] ACI-36杂交瘤

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

[0429] 表7:

[0430]

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

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

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

[0433] 表8:ELISA和TAUPIR中的阳性克隆的排序

	按 ELISA 排序	按 TAUPIR 排序
	<b>3A8</b>	<b>6H1</b>
	<b>2B6</b>	<b>4C1</b>
	<b>4C1</b>	<b>3A8</b>
	<b>6H1</b>	<b>4C12</b>
[0434]	<b>4C12</b>	<b>2B6</b>
	<b>2G1</b>	<b>2F9</b>
	<b>2F9</b>	<b>3B9</b>
	<b>7D6</b>	<b>2G1</b>
	<b>3B9</b>	<b>7D6</b>
	<b>4E12</b>	<b>4E12</b>

[0435] ACI-41杂交瘤

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

[0437] 表9

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

[0439] 克隆5D10和7C2是仅有的两个在3次筛选中都为阳性的克隆,选择它们进行了亚克

隆。克隆5D10只结合肽T8.5,而克隆7C2与ACI-41疫苗的两种肽(T8.5和T9.5)结合(图10)。

[0440] 源自5D10的亚克隆5D10A4对pTau肽特异。

[0441] 8.3结论

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

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

[0444] 表10:所保藏的杂交瘤的列表

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

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

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

[0448] 7.1.方法

[0449] 7.1.1 5D10抗体产生

[0450] 按实施例9中所述产生5D10。

[0451] 7.1.2ACI-41-Ab1产生

[0452] 7.1.2.1融合

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

[0454] 7.1.2.2杂交瘤ELISA筛选

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

[0456] 用2ug/ml的hP-Tau在室温 (RT) 下过夜包被平板。用PBS洗涤各孔并用PBS中的2% FCS封闭后,将杂交瘤上清加至平板,并在RT下孵育1小时。洗涤步骤后,用PBS 1%FCS中的过氧化物酶缀合的AffiniPure山羊抗-小鼠总Ig (IgG+IgM的检测,Dako Glostrup,丹麦) 在RT下孵育平板1小时。用TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 显色平板。用2N  $H_2SO_4$ 终止反应,并用ELISA酶标仪在405nm下读数。结果表示为各杂交瘤克隆的光密度 (O.D.)。

[0457] 对于肽,用10ug/ml的Tau206-221 [pT212/pS214]或Tau196-211 [pS202/pT205]在4℃下过夜包被平板。用PBS洗涤并用PBS中的2%NHS封闭后,将杂交瘤上清加至平板,并在室温 (RT) 下孵育1小时。洗涤步骤后,用PBS 1%NHS中的生物素化抗-小鼠IgG (购自Vector labs) 在RT下孵育平板1小时。对生物素缀合的抗体进行了补充步骤,检测前在链霉抗生物素蛋白-HRP (ABC试剂盒,Vector labs) 中孵育平板30分钟。洗涤步骤后,用TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 显色平板。用2N  $H_2SO_4$ 终止反应,并用ELISA酶标仪在405nm下读数。结果表示为各杂交瘤克隆的光密度 (O.D.)。

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

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

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

[0461] 按照来自实施例5.1.5的流程进行TAUPIR染色。

[0462] 7.1.2.4杂交瘤Western印迹筛选 (WB)

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

[0464] 在以下缓冲液中进行野生型FVB、TPLH、biGT和Tau敲除 (TKO) 小鼠的脑匀浆:25mM Tris/HCl pH7.6、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、30mM NaF、0.2mM  $Na_3VO_4$ 、1nM冈田软海绵酸、1mM苯甲基磺酰氟 (PMSF)、5mM  $Na_4P_2O_7$ 、每12ml总体积1片全蛋白酶抑制剂混合物 (CPIC)。为了获得总脑匀浆,用以700转/分钟使用的电机驱动potter-like (玻璃管/聚四氟乙烯研杵) 在10体积/重量半球 (ml/g) 中在冰上匀浆脑。

[0465] 对于hP-Tau提取,用以下缓冲液匀浆TPLH和TKO小鼠的脑:100mM MES pH 6.8、1mM  $\beta$ -巯基乙醇、5mM EDTA、2.5mM PMSF、5 $\mu$ g/ml甲苯磺酰基-L-赖氨酸氯甲基酮 (TLCK)、100mM NaF、1nM冈田软海绵酸、0.2mM  $Na_3VO_4$ 和每12ml总体积1片全蛋白酶抑制剂混合物 (CPIC)。用

以700转/分钟使用的电机驱动potter-like(玻璃管/聚四氟乙烯研杵)在6体积/重量半球(ml/g)中在冰上匀浆脑。在4℃下20000×g离心匀浆30分钟,转移上清并迅速加热至95℃,在95℃保持10分钟,然后在融化的冰中冷却。进行离心步骤,然后进行上清分装并作为“hP-Tau”保存于-20℃。

[0466] 将总脑匀浆1/2稀释在样品缓冲液(125mM Tris/HCl pH6.8、4% (w/v) 十二烷基硫酸钠(SDS)、20%甘油、0.01%溴酚蓝)+5%β-巯基乙醇中,然后迅速加热至95℃。将样品保持5分钟,1/4稀释在样品缓冲液中,再次加热至95℃,然后冷却,并于14000转/分钟离心5分钟,以清除未溶解的碎片。收集上清并上样在SDS-PAGE凝胶上。在转移缓冲液(25mM Tris pH 8.6、190mM甘氨酸、20%甲醇)中进行向硝酸纤维素膜(Hybond-ECL)的转移。将膜转移至封闭溶液(TBS(50mM Tris.HCl、pH7.6、150mM NaCl)中的0.1%Tween+5%奶粉),然后用未稀释的杂交瘤上清在4℃下过夜孵育。1/10'000稀释在封闭溶液中的第二抗体HRP缀合的山羊抗-小鼠(Dako,Glostrup,丹麦)的孵育在RT下进行1小时。用来自GE Healthcare的ECL Western Blotting Detection Reagents进行检测。

[0467] 7.1.3抗-磷酸化Tau抗体与人AD脑中的Tau缠结的结合

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

[0469] 7.2结果

[0470] 7.2.1杂交瘤筛选

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

hP-Tau的特异性(图11)。

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

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

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

[0475] 7.2.2人阿尔茨海默病脑切片中神经原纤维缠结的染色

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

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

[0478] 7.3结论

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

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

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

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

[0483] 8.1.方法

[0484] 8.1.1疫苗ACI-35方法A ACI的制备

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

[0486] 8.1.2疫苗ACI-35方法L3ACI的制备

[0487] 称取Tau衍生的四棕榈酰化磷酸肽Tau393-408[pS396/pS404] (S396和S404上具有磷酸基团的人Tau 393-408) (4.0mg)放入25ml玻璃管,向其中加入六氟异丙醇(HFIP) (5ml)。然后将此澄清溶液加至氯仿(35ml)中的双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、双肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、胆固醇和佐剂单磷酸脂质A (MPLA) (均来自Avanti Polar Lipids Inc. AL, 美国) (摩尔比分别为9:1:7:0.2)的搅拌溶液。然后通过0.2um疏水PTFE滤膜将产生的溶液滤入250ml玻璃圆底瓶中。然后通过40℃下在降低的压力下和然后在高真空下蒸

发3小时来去除有机溶剂。通过加入PBS (40ml) 并在RT下轻轻搅拌18小时来再水化产生的薄膜。然后在保存于2-8℃之前分装脂质体悬液 (批号ACI-35-081103-A)。最终的肽/磷脂摩尔比为1:100。

[0488] 8.1.3免疫

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

[0490] 表11: 小鼠免疫

[0491]

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

[0492] <sup>a</sup>: 理论体积

[0493] <sup>b</sup>: s.c.: 皮下

[0494] <sup>c</sup>: 分析后测定的测量量

[0495] 8.1.4Tau肽特异性抗体的定量

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

测前在链霉抗生物素蛋白-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, 美国) 中孵育平板45分钟。对于IgG, 结果表示为第一稀释度和非饱和稀释度下的O.D. (光密度), 对于IgG同种型和IgM, 结果表示为非饱和O.D. 下的O.D.。

[0497] 8.1.5产生Tau肽特异性细胞因子的T细胞的ELISPOT定量

[0498] 通过ELISPOT评估了Tau393-408[pS396/pS404]和Tau393-408特异性T细胞的细胞因子产生。按照厂家的说明(Pharmingen BD, San Diego, CA, 美国)用抗-小鼠IFN- $\gamma$ 和IL-4单克隆抗体过夜包被Multiscreen 96孔硝酸纤维素板(Millipore, Molsheim, 法国)。从免疫小鼠的脾制备单细胞悬液, 并在系列稀释度下与Tau393-408[pS396/pS404]和Tau393-408(10和1 $\mu$ g/ml)及Concavalin A(5 $\mu$ g/ml, Amersham)在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下孵育72小时。然后洗涤平板, 并用生物素化抗-小鼠IFN- $\gamma$ 和IL-4单克隆抗体在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。洗涤后, 用链霉抗生物素蛋白-HRP在37 $^{\circ}$ C下孵育平板1小时, 洗涤后, 通过加入底物(AEC, 3-氨基-9-乙基咔唑)来显色斑点。在立体显微镜下目测计数每孔的斑点数, 结果表示为斑点/10<sup>6</sup>细胞。将首次用于实验的小鼠的脾用作阴性对照。

[0499] 8.1.6非放射性细胞增殖测定

[0500] 从免疫小鼠的脾制备单细胞悬液, 并在系列稀释度下与Tau393-408[pS396/pS404]和Tau393-408(10和1 $\mu$ g/ml)及Concavalin A(5 $\mu$ g/ml, Amersham)在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下孵育72小时。为了测量增殖, 按照厂家的说明使用了非放射性细胞增殖测定(MTT)试剂盒(Promega, Dübendorf, 瑞士)。简言之, 将15 $\mu$ l染料溶液加至各孔, 并在37 $^{\circ}$ C下孵育平板4小时。随后, 每孔加入100 $\mu$ l固定/终止溶液, 并在4 $^{\circ}$ C下孵育平板最少再1小时。在570nm和690nm波长下测量O.D.。

[0501] 8.2.结果

[0502] 8.2.1不同疫苗诱导的抗体应答的评价

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

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

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



[0506] 就抗-pTau393-408[pS396/pS404] IgM抗体而言,所测试的两种方法间不存在差异,而与皮下注射相比,腹膜内注射具有显著高的IgM效价(图16a,单因素方差分析, $P < 0.001$ )。

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

[0508] 不同Tau肽的前3个IgG效价的平均值显示于表12中:

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

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

[0511] 8.2.2ACI-35诱导的T细胞应答的评价

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

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

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

[0515] 8.3结论

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

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

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

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

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

[0520] 9.1.方法

[0521] 9.1.1Tau P301L转基因小鼠(TPLH)

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

[0523] 9.1.2疫苗ACI-33和ACI-35和制备

[0524] 按照实施例3中所述的方法A制备疫苗。

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

[0526] 9.1.3免疫

[0527] ACI-33、ACI-39和ACI-40

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

[0529] ACI-35

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

[0531] 表13:小鼠免疫

[0532]

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

[0533] N.A. = 不适合

[0534] <sup>a</sup>: 理论体积[0535] <sup>b</sup>: s.c.: 皮下[0536] <sup>c</sup>: 分析后测定的测量量

[0537] 9.1.4 Tau肽特异性抗体的定量

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

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

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

自Zymed Laboratories, San Francisco, CA的HRP缀合的抗-小鼠IgG2b)在37℃下孵育平板2小时。洗涤后,用AP的磷酸酶底物pNPP (对-硝基-苯基-磷酸盐)或HRP的底物ABTS (2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸))孵育平板,并用ELISA酶标仪在405nm下读数。对生物素缀合的抗体进行了补充步骤,其中在用ABTS检测前在链霉抗生物素蛋白-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, 美国)中孵育平板45分钟。对于IgG、IgG同种型和IgM,结果表示为非饱和0.D.下的0.D. (光密度)。

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

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

[0543] 按照来自实施例5.1.5的流程进行TAUPIR染色。

[0544] 9.1.6Western印迹 (WB)

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

[0546] 9.2.结果

[0547] 9.2.1IgG抗体应答

[0548] 所有疫苗构建体都产生了特异性IgG抗体效价。

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

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

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

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

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

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

[0555] 9.2.2同种型分析

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

差分析 $P<0.05$  IgG1对IgG2a/2b,  $P<0.001$  IgM对IgG2a/2b)。

[0557] 三次皮下免疫后, ACI-35接种诱导了主要属于IgG2a和2b亚类的抗体效价(图24)。IgG1水平较低, IgG1和IgG2a之间存在显著差异(图24, 单因素方差分析 $P<0.05$  IgG1对IgG2a)。IgG3和IgM水平低, 且IgG2a/2b和IgG3/IgM的水平之间存在显著差异(图24, 单因素方差分析 $P<0.05$  IgG3/IgM对IgG2b,  $P<0.0001$  IgG3/IgM对IgG2a)。

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

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

[0560] 9.2.3抗体特异性

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

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

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

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

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

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

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

[0568] 数据总结在下文表14中。

[0569] 表14: TPLH接种小鼠上的TAUPIR和WB实验的总结

[0570]

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

[0571] 9.3结论

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

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

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

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

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

[0577] 10.1.方法

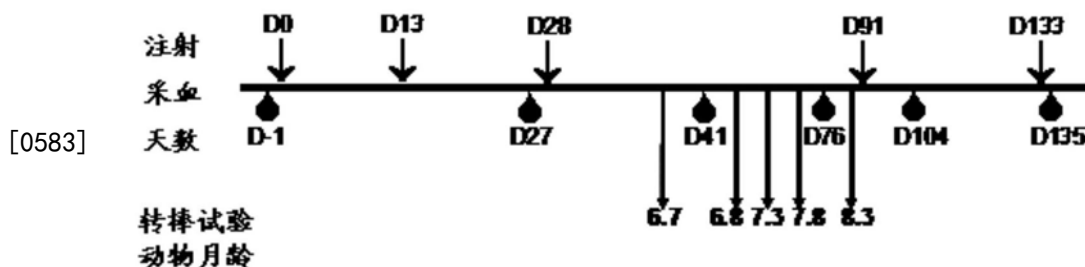
[0578] 10.1.1疫苗制备

[0579] 按照来自实施例3的流程制备ACI-33和ACI-35疫苗。

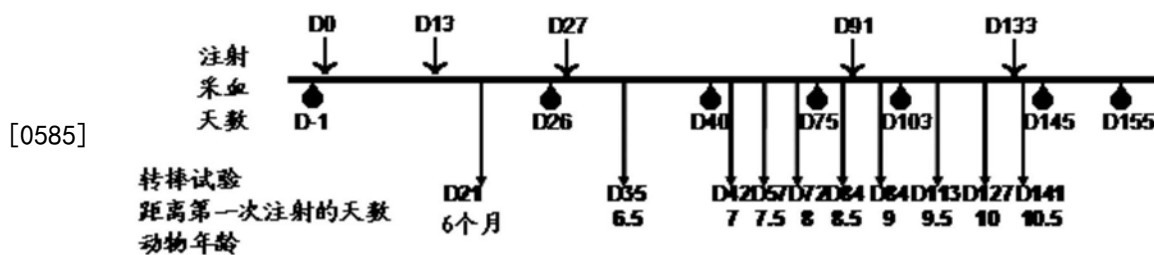
[0580] 10.1.2免疫

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

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



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



[0586] 10.1.3行为(转棒)

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

[0588] 10.2.结果

[0589] 为了评价ACI-33或PBS处理后TPLH的运动条件,在5个不同时机对小鼠进行了转棒测试(图31)。在7.3月龄观察到了注射ACI-33和PBS的动物间的显著差异(图31,双因素方差分析 $P < 0.0017.3$ 月龄)。ACI-33对小鼠运动行为的此影响与7.8月龄时小鼠血清中的抗-Tau5-20[pY18]抗体效价相关(图32,Spearman  $r$   $P < 0.001$ )。

[0590] 为了评价ACI-35或PBS处理后TPLH的运动条件,对小鼠进行了转棒测试(图33)。虽然治疗组和对照组之间不存在显著差异,但可以在小鼠9.5月龄时进行的转棒试验中观察到ACI-35功效的趋势(图33,Mann-Whitney检验 $P = 0.19059.5$ 月龄)。

[0591] 10.3结论

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

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

[0594] 实施例11:雌性裸鼠中的抗-pTau抗体应答

[0595] 此研究的目的是在雌性裸鼠中评价ACI-33(Tau5-20[pY18])疫苗的注射诱导的抗-pTau抗体应答。裸鼠携带Foxn1<sup>nu</sup>突变,由于缺乏正确执行功能的胸腺而具有减少的T细胞功能。因此,此研究的目的是分析ACI-33诱导的抗体应答是否独立于T细胞。

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

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

[0598] 11.1方法

[0599] 11.1.1疫苗ACI-33的制备

[0600] 按照实施例3制备ACI-33疫苗。

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

[0602] 11.1.2免疫

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

[0604] 11.1.3Tau肽特异性抗体的定量

[0605] 通过ELISA在5个血清采样样品 (d2、d7、d21、d35和d56) 中测量了Tau5-20[pY18]的特异性IgG抗体。在来自d35的血清中测定了Tau5-20-特异性IgG、全长 (441aa) Tau蛋白特异性IgG和磷酸化全长 (441aa) Tau蛋白特异性IgG。通过ELISA在d35血清采样样品中测定了Tau5-20[pY18]特异性IgM和IgG同种型抗体。用10ug/ml的对应的Tau肽和1ug/ml的对应的Tau蛋白在4℃下过夜包被平板。用PBS-0.05%Tween 20洗涤各孔并用PBS-0.05%Tween 20中的1%BSA封闭后,将血清的系列稀释液加至平板,并在37℃下孵育2小时。洗涤后,用碱性磷酸酶 (AP) 缀合的抗小鼠IgG总抗体 (Jackson Laboratories,Baltimore,PA,美国) 或同种型特异性抗体 (购自PharMingen BD San Diego,CA,USA的辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的抗小鼠IgM、AP缀合的抗-小鼠IgG1、生物素缀合的抗-小鼠IgG3;购自Invitrogen CA,USA的生物素缀合的抗-小鼠IgG2a;和来自Zymed Laboratories,San Francisco,CA的HRP缀合的抗-小鼠IgG2b) 在37℃下孵育平板2小时。洗涤后,用AP的磷酸酶底物pNPP (对-硝基-苯基-磷酸盐) 或HRP的底物ABTS (2,2'-连氨基-双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)) 孵育平板,并用ELISA酶标仪在405nm下读数。对生物素缀合的抗体进行了补充步骤,其中在用ABTS检测前在链霉抗生物素蛋白-HRP (R&D Systems,Minneapolis,MN,美国) 中孵育平板45分钟。对于IgG、IgG同种型和IgM,结果表示为非饱和0.D.下的0.D. (光密度)。

[0606] 11.1.4CD3+/CD4+细胞定量

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

[0608] 表15:小鼠免疫



[0609]

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

[0610] <sup>a</sup>:理论体积[0611] <sup>b</sup>:s.c.:皮下[0612] <sup>c</sup>:分析后测定的测量量

[0613] 11.2结果

[0614] 11.2.1一般观察

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

[0616] 11.2.2CD3+/CD4+细胞定量

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

[0618] 11.2.3免疫应答分析

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

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

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

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

## [0623] 11.3结论

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

## [0625] 参考文献列表

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

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

## [0649]

杂交瘤名称	检索号	保藏日期
ACI-41-Ab1	DSM ACC3043	2010年3月3日
2B6	DSM ACC3044	2010年3月10日
3A8	DSM ACC3045	2010年3月10日

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

[0650] 1. 抗原肽或其功能片段, 所述肽可获自 tau 蛋白并通过附着于载体上和/或重构在载体中来修饰。

[0651] 2. 小项1的抗原肽或片段, 其中所述肽是模拟 tau 蛋白的主要病理磷酸化表位的磷酸肽。

[0652] 3. 小项1和2的肽或片段, 其中所述载体还具有作为佐剂的功能性。

[0653] 4. 前述小项中任一项的肽或片段, 其中所述载体是脂质体。

[0654] 5. 前述小项中任一项的肽或片段, 其中通过与便于插入所述脂质体载体的脂双层的亲脂或疏水部分连接来进一步修饰所述肽。

[0655] 6. 前述小项中任一项的肽或片段, 其中所述亲脂或疏水部分是脂肪酸、甘油三酯、甘油二酯、类固醇、鞘脂、糖脂或磷脂。

[0656] 7. 前述小项中任一项的肽或片段, 其中所述亲脂或疏水部分是脂肪酸, 尤其是具有至少10个碳原子、尤其是至少12个碳原子、尤其是至少16个碳原子的碳主链的脂肪酸。

[0657] 8. 前述小项中任一项的肽或片段, 其中所述疏水部分是棕榈酸。

[0658] 9. 前述小项中任一项的肽或片段, 其中所述亲水或疏水部分通过至少一个, 尤其是一个或两个氨基酸, 例如赖氨酸、谷氨酸和半胱氨酸与所述肽或肽片段的末端中的每一个共价连接。

[0659] 10. 前述小项中任一项的肽或片段, 其中通过与亲水部分连接来进一步修饰所述肽。

[0660] 11. 小项10的肽或片段, 其中所述亲水部分是聚乙二醇。

[0661] 12. 前述小项中任一项的肽或片段, 其中所述 tau 蛋白是人蛋白质。

[0662] 13. 小项12的肽或片段, 其具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列, 或通过至少一个但不超过五个氨基酸的保守性取代、缺失或插入修饰, 且仍具有与未修饰的序列相同或基本上相同的抗原潜能的 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

[0663] 14. 小项12的肽或片段, 其具有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列, 或通过至少一个但不超过五个氨基酸的保守性取代、缺失或插入修饰, 且仍具有与未修饰的序列相同或基本上相同的抗原潜能的 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列。

[0664] 15. 小项12的肽或片段, 其具有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列, 或通过至少一个但不超过五个氨基酸的保守性取代、缺失或插入修饰, 且仍具有与未修饰的序列相同或基本上相同的抗原潜能的 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列。

[0665] 16. 小项12的肽或片段, 其具有 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列, 或通过至少一个但不超过五个氨基酸的保守性取代、缺失或插入修饰, 且仍具有与未修饰的序列相同或基本上相同的抗原潜能的 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列。

[0666] 17. 小项12的肽或片段, 其具有 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列, 或通过至少一个但不超过五个氨基酸的保守性取代、缺失或插入修饰, 且仍具有与未修饰的序列相同或基本上

相同的抗原潜能的SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0667] 18.小项12的肽或片段,其具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或通过至少一个但不超过五个氨基酸的保守性取代、缺失或插入修饰,且仍具有与未修饰的序列相同或基本上相同的抗原潜能的SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0668] 19.小项12的肽或片段,其具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或通过至少一个但不超过五个氨基酸的保守性取代、缺失或插入修饰,且仍具有与未修饰的序列相同或基本上相同的抗原潜能的SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0669] 20.小项12的肽或片段,其具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列,或通过至少一个但不超过五个氨基酸的保守性取代、缺失或插入修饰,且仍具有与未修饰的序列相同或基本上相同的抗原潜能的SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0670] 21.小项13的肽或片段,其可获自位置5和20之间的人tau蛋白,且其中位置18上的酪氨酸是磷酸化的。

[0671] 22.小项14和15的肽或片段,其可获自位置196-221之间的人tau蛋白,且其中位置202、205、212、214上的氨基酸中的至少一个,尤其是至少两个,尤其是至少三个,但尤其是全部四个是磷酸化的。

[0672] 23.小项16的肽或片段,其可获自位置393和408之间的人tau蛋白,且其中位置396、404上的氨基酸中的至少一个,但尤其是全部氨基酸是磷酸化的。

[0673] 24.小项17的肽或片段,其可获自位置401和418之间的人tau蛋白,且其中位置404和409上的氨基酸中的至少一个,但尤其是全部氨基酸是磷酸化的。

[0674] 25.小项18的肽或片段,其可获自位置200和216之间的人tau蛋白,且其中位置202和205上和/或位置212和214上的氨基酸中的至少一个,但尤其是全部氨基酸是磷酸化的。

[0675] 26.小项19的肽或片段,其可获自位置407和418之间的人tau蛋白,且其中位置409上的丝氨酸是磷酸化的。

[0676] 27.小项20的肽或片段,其可获自位置399和408之间的人tau蛋白,且其中位置404上的丝氨酸是磷酸化的。

[0677] 28.小项12的肽或片段,其中所述tau蛋白与SEQ ID NO:2具有至少95%的氨基酸序列同一性,且具有与所述SEQ ID NO:2的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于SEQ ID NO:2的氨基酸残基18 (P-Tyr<sub>18</sub>) 的氨基酸残基是磷酸化的 (T1)。

[0678] 29.小项12的肽或片段,其中所述tau蛋白与SEQ ID NO:3具有至少95%的氨基酸序列同一性,且具有与所述SEQ ID NO:3的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于SEQ ID NO:3的氨基酸残基212 (P-Thr<sub>212</sub>) 和214 (P-Ser<sub>214</sub>) 的氨基酸残基中的至少一个,尤其是至少两个是磷酸化的。

[0679] 30.小项12的肽或片段,其中所述tau蛋白与SEQ ID NO:4具有至少95%的氨基酸序列同一性,且具有与所述SEQ ID NO:4的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于SEQ ID NO:4的氨基酸残基202 (P-Ser<sub>202</sub>) 和205 (P-Thr<sub>205</sub>) 的氨基酸残基中的至少一个,尤其是至少两个是磷酸化的。

[0680] 31.小项12的肽或片段,其中所述tau蛋白与SEQ ID NO:5具有至少95%的氨基酸序列同一性,且具有与所述SEQ ID NO:5的抗原肽基本上相同的免疫原活性,其中对应于SEQ ID NO:5的氨基酸残基396 (P-Ser<sub>396</sub>) 和404 (P-Ser<sub>404</sub>) 的氨基酸残基中的至少一个,但

尤其是全部是磷酸化的。

[0681] 32. 小项12的肽或片段, 其中所述tau蛋白与SEQ ID NO:6具有至少95%的氨基酸序列同一性, 且具有与所述SEQ ID NO:6的抗原肽基本上相同的免疫原活性, 其中对应于SEQ ID NO:6的氨基酸残基404 (P-Ser<sub>404</sub>) 和409 (P-Ser<sub>409</sub>) 的氨基酸残基中的至少一个, 但尤其是全部是磷酸化的。

[0682] 33. 小项12的肽或片段, 其中所述tau蛋白与SEQ ID NO:7具有至少95%的氨基酸序列同一性, 且具有与所述SEQ ID NO:7的抗原肽基本上相同的免疫原活性, 其中对应于SEQ ID NO:7的氨基酸残基202 (P-Ser<sub>202</sub>)、205 (P-Thr<sub>205</sub>)、212 (P-Thr<sub>212</sub>) 和214 (P-Ser<sub>214</sub>) 的氨基酸残基中的至少一个, 尤其是至少两个, 尤其是至少三个, 但尤其是全部是磷酸化的。

[0683] 34. 小项12的肽或片段, 其中所述tau蛋白与SEQ ID NO:8具有至少95%的氨基酸序列同一性, 且具有与所述SEQ ID NO:8的抗原肽基本上相同的免疫原活性, 其中对应于SEQ ID NO:8的氨基酸残基409 (P-Ser<sub>409</sub>) 的氨基酸残基是磷酸化的。

[0684] 35. 小项12的肽或片段, 其中所述tau蛋白与SEQ ID NO:9具有至少95%的氨基酸序列同一性, 且具有与所述SEQ ID NO:9的抗原肽基本上相同的免疫原活性, 其中对应于SEQ ID NO:9的氨基酸残基404 (P-Ser<sub>404</sub>) 的氨基酸残基是磷酸化的。

[0685] 36. 小项28的肽, 其中所述tau蛋白具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0686] 37. 小项29的肽, 其中所述tau蛋白具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0687] 38. 小项30的肽, 其中所述tau蛋白具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0688] 39. 小项31的肽, 其中所述tau蛋白具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0689] 40. 小项32的肽, 其中所述tau蛋白具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0690] 41. 小项33的肽, 其中所述tau蛋白具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

[0691] 42. 小项34的肽, 其中所述tau蛋白具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0692] 43. 小项35的肽, 其中所述tau蛋白具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0693] 44. 前述小项中任一项的肽或片段或其组合, 其用于治疗神经变性障碍, 如tau病。

[0694] 45. 小项44的肽或片段, 其用于治疗阿尔茨海默病。

[0695] 46. 药物组合物, 其包含前述权利要求中任一项的肽或片段或其组合。

[0696] 47. 小项46的药物组合物, 其包含可药用佐剂和/或免疫调节剂。

[0697] 48. 小项47的药物组合物, 其中所述免疫调节剂是去毒脂质A, 如单磷酸脂质A或二磷酸脂质A。

[0698] 49. 前述小项中任一项的药物组合物, 其用于治疗神经变性障碍, 如tau病。

[0699] 50. 小项49的药物组合物, 其用于治疗由神经原纤维损伤的形成引起或与神经原纤维损伤的形成相关的疾病和障碍, 神经原纤维损伤的形成是tau病中的主要脑病理, 该tau病包含一组异质性神经变性疾病或障碍, 该组异质性神经变性疾病或障碍包含: 显示tau病理和淀粉状蛋白病理的共存的疾病或障碍, 其包括但不限于阿尔茨海默病、克-雅综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、格-施-沙病、包涵体肌炎和阮病毒蛋白脑淀粉样血管病、外伤性脑损伤; 及不显示明显的淀粉样蛋白病理的其他疾病或障碍, 其包括但不限于关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森综合征-痴呆综合征、非关岛运动神经元病伴神经原纤维缠结、嗜银颗粒性痴呆、皮层基底节变性、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、17号染色体连锁额颞痴呆伴帕金森综合征、Hallevorden-Spatz病、多系统性萎缩、C型尼-皮病、皮克病、进行性皮层

下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结型痴呆、脑炎后帕金森综合症、强直性肌营养不良。

[0700] 51. 小项50的药物组合物,其用于治疗阿尔茨海默病。

[0701] 52. 用于治疗诸如tau病的神经变性疾病或障碍的方法,其包括对患有这种疾病或障碍的动物,尤其是对哺乳动物,但尤其是对人施用前述权利要求中任一项的治疗性药物组合物。

[0702] 53. 权利要求52的方法,其用于治疗由神经原纤维损伤的形成引起或与神经原纤维损伤的形成相关的疾病和障碍,神经原纤维损伤的形成是tau病中的主要脑病理,该tau病包含一组异质性神经变性疾病或障碍,该组异质性神经变性疾病或障碍包含:显示tau病理和淀粉状蛋白病理的共存的疾病或障碍,其包括但不限于阿尔茨海默病、克-雅综合症、拳击员痴呆、唐氏综合症、格-施-沙病、包涵体肌炎和朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、外伤性脑损伤;及不显示明显的淀粉状蛋白病理的其他疾病或障碍,其包括但不限于关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森综合症-痴呆综合症、非关岛运动神经元病伴神经原纤维缠结、嗜银颗粒性痴呆、皮层基底节变性、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、17号染色体连锁额颞痴呆伴帕金森综合症、Halleworden-Spatz病、多系统性萎缩、C型尼-皮病、皮克病、进行性皮层下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结型痴呆、脑炎后帕金森综合症、强直性肌营养不良。

[0703] 54. 用于在患有诸如tau病的神经变性障碍的动物,尤其是哺乳动物或人中诱导免疫应答的方法,其通过对所述动物或人施用前述小项中任一项的抗原肽或治疗性组合物。

[0704] 55. 抗体,尤其是单克隆抗体,或其功能部分,其能够在体外和/或在体内识别和结合tau蛋白。

[0705] 56. 小项47的抗体,尤其是单克隆抗体,或其功能部分,其中所述tau蛋白是磷酸化的。

[0706] 57. 小项48的抗体,尤其是单克隆抗体,或其功能部分,其能够识别和结合前述小项中任一项的肽片段。

[0707] 58. 前述小项中任一项的抗体,尤其是单克隆抗体,或其功能部分,该抗体识别和结合磷酸化病理tau蛋白构象异构体或导致所述构象异构体的病理特性的那些构象异构体部分,尤其是tau蛋白的病理磷酸化表位。

[0708] 59. 前述小项中任一项抗体,尤其是单克隆抗体,或其功能部分,其可通过用前述小项中任一项的抗原肽,尤其是包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中给出的氨基酸序列的抗原肽,包括其功能片段或变体片段免疫适宜的动物来获得。

[0709] 60. 前述小项中任一项的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月3日保藏为DSM ACC3043的杂交瘤细胞系ACI-41-Ab1产生的抗体的特性。

[0710] 61. 小项60的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,其由2010年3月3日保藏为DSM ACC3043的杂交瘤细胞系ACI-41-Ab1产生。

[0711] 62. 前述小项中任一项的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3044的杂交瘤细胞系2B6产生

的抗体的特性。

[0712] 63. 小项62的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,其由2010年3月10日保藏为DSM ACC3044的杂交瘤细胞系2B6产生。

[0713] 64. 前述小项中任一项的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3045的杂交瘤细胞系3A8产生的抗体的特性。

[0714] 65. 小项64的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,其由2010年3月10日保藏为DSM ACC3045的杂交瘤细胞系3A8产生。

[0715] 66. 前述小项中任一项的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3046的杂交瘤细胞系4C1产生的抗体的特性。

[0716] 67. 小项66的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,其由2010年3月10日保藏为DSM ACC3046的杂交瘤细胞系4C1产生。

[0717] 68. 前述小项中任一项的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3047的杂交瘤细胞系5D10A3产生的抗体的特性。

[0718] 69. 小项68的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,其由2010年3月10日保藏为DSM ACC3047的杂交瘤细胞系5D10A3产生。

[0719] 70. 前述小项中任一项的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3048的杂交瘤细胞系6C10产生的抗体的特性。

[0720] 71. 小项70的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,其由2010年3月10日保藏为DSM ACC3048的杂交瘤细胞系6C10产生。

[0721] 72. 前述小项中任一项的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3049的杂交瘤细胞系6H1产生的抗体的特性。

[0722] 73. 小项72的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,其由2010年3月10日保藏为DSM ACC3049的杂交瘤细胞系6H1产生。

[0723] 74. 前述小项中任一项的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,该抗体具有由2010年3月10日保藏为DSM ACC3050的杂交瘤细胞系7C2产生的抗体的特性。

[0724] 75. 小项74的抗体,尤其是单克隆抗体,包括任意功能上等同的抗体,或其功能部分,其由2010年3月10日保藏为DSM ACC3050的杂交瘤细胞系7C2产生。

[0725] 76. 前述小项中任一项的抗体,其是多克隆抗体。

[0726] 77. 前述小项中任一项的抗体,其是单克隆抗体。

[0727] 78. 前述小项中任一项的抗体,尤其是单克隆抗体,或其功能部分,其直接和特异地与tau蛋白上的表位,尤其是与磷酸化病理tau蛋白构象异构体的表位,尤其是与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示序列的肽序列及其变体片段所代表或包含于其中的表位结合。

[0728] 79. 药物组合物, 其包含前述小项中任一项的抗体, 连同可药用载体。

[0729] 80. 小项79的药物组合物, 其用于治疗由神经原纤维损伤的形成引起或与神经原纤维损伤的形成相关的疾病和障碍, 神经原纤维损伤的形成是tau病中的主要脑病理, 该tau病包含一组异质性神经变性疾病或障碍, 该组异质性神经变性疾病或障碍包含: 显示tau病理和淀粉状蛋白病理的共存的疾病或障碍, 其包括但不限于阿尔茨海默病、克-雅综合征、拳击员痴呆、唐氏综合征、格-施-沙病、包涵体肌炎和朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、外伤性脑损伤; 及不显示明显的淀粉状蛋白病理的其他疾病或障碍, 其包括但不限于关岛肌萎缩性侧索硬化/帕金森综合症-痴呆综合症、非关岛运动神经元病伴神经原纤维缠结、嗜银颗粒性痴呆、皮层基底节变性、弥漫性神经原纤维缠结伴钙化、17号染色体连锁额颞痴呆伴帕金森综合症、Halleorden-Spatz病、多系统性萎缩、C型尼-皮病、皮克病、进行性皮层下神经胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结型痴呆、脑炎后帕金森综合症、强直性肌营养不良。

[0730] 81. 用于治疗诸如tau病的神经变性疾病或障碍的方法, 其包括对患有这种疾病或障碍的动物, 尤其是对哺乳动物, 但尤其是对人施用前述小项中任一项的抗体或包含前述小项中任一项的抗体的药物组合物。

[0731] 82. 在患者中诊断tau蛋白相关疾病、障碍或病症的方法, 该方法包括在样品中或在原位检测抗体或其活性片段与tau蛋白的表位的免疫特异性结合, 其包括以下步骤:

[0732] (a) 使疑似包含tau蛋白的样品或具体身体部分或身体区域与所述抗体接触, 该抗体结合tau蛋白的表位;

[0733] (b) 使抗体与tau蛋白结合形成免疫复合物;

[0734] (c) 检测免疫复合物的形成; 和

[0735] (d) 使免疫复合物的存在或缺乏与tau蛋白在样品或具体身体部分或区域中的存在或缺乏相关。

[0736] 83. 在患者中诊断对tau蛋白相关疾病、障碍或病症的诱因的方法, 该方法包括在样品中或在原位检测单克隆抗体或其活性片段与tau蛋白的表位的免疫特异性结合, 其包括以下步骤:

[0737] (a) 使疑似包含tau抗原的样品或具体身体部分或身体区域与根据本发明的抗体和如之前本文中所述的抗体接触, 该抗体结合tau蛋白的表位;

[0738] (b) 使抗体与tau抗原结合, 以形成免疫复合物;

[0739] (c) 检测免疫复合物的形成; 和

[0740] (d) 使免疫复合物的存在或缺乏与tau抗原在样品或具体身体部分或区域中的存在或缺乏相关;

[0741] (e) 将所述免疫复合物的量与正常对照值相比;

[0742] 其中, 与正常对照值相比, 所述聚集物的量的增加指示所述患者患有tau蛋白相关疾病或病症, 或处于发展tau蛋白相关疾病或病症的风险。

[0743] 84. 用于在用前述小项中任一项的抗体或药物组合物治疗后在患者中监测微小残留病的方法, 其中所述方法包括:

[0744] (a) 使疑似包含tau抗原的样品或具体身体部分或身体区域与根据本发明的抗体和如之前本文中所述的抗体接触, 该抗体结合tau蛋白的表位;



- [0745] (b) 使抗体与tau抗原结合,以形成免疫复合物;
- [0746] (c) 检测免疫复合物的形成;和
- [0747] (d) 使免疫复合物的存在或缺乏与tau抗原在样品或具体身体部分或区域中的存在或缺乏相关;
- [0748] (e) 将所述免疫复合物的量与正常对照值相比;
- [0749] 其中,与正常对照值相比,所述聚集物的量的增加指示所述患者仍患有微小残留病。
- [0750] 85. 用于预测用前述小项中任一项的抗体或药物组合物治疗的患者的反应性的方法,其包括:
- [0751] (a) 使疑似包含tau抗原的样品或具体身体部分或身体区域与根据本发明的抗体和如之前本文中所述的抗体接触,该抗体结合tau蛋白的表位;
- [0752] (b) 使抗体与tau抗原结合,以形成免疫复合物;
- [0753] (c) 检测免疫复合物的形成;和
- [0754] (d) 使免疫复合物的存在或缺乏与tau抗原在样品或具体身体部分或区域中的存在或缺乏相关;
- [0755] (e) 比较起始治疗之前和之后所述免疫复合物的量;
- [0756] 其中,所述聚集物的量的减少指示所述患者具有对治疗具有反应的高可能性。
- [0757] 86. 用于检测和诊断tau蛋白相关疾病、障碍或病症的测试试剂盒,其包含前述小项中任一项的抗体。
- [0758] 87. 小项86的测试试剂盒,其包含装有本发明的一种或多种抗体的容器,及为了与tau抗原结合形成免疫复合物和检测免疫复合物的形成,使得免疫复合物的存在或缺乏与tau抗原的存在或缺乏相关的目的而使用抗体的说明。
- [0759] 88. 表位,其为选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示序列的肽序列及其变体片段所代表或包含于其中。
- [0760] 89. 细胞系,其产生前述小项中任一项的抗体。
- [0761] 90. 小项89的细胞系,其是于2010年3月3日保藏为DSM ACC3043的杂交瘤细胞系ACI-41-Ab1。
- [0762] 91. 小项89的细胞系,其是于2010年3月10日保藏为DSM ACC3044的杂交瘤细胞系2B6。
- [0763] 92. 小项89的细胞系,其是于2010年3月10日保藏为DSM ACC3045的杂交瘤细胞系3A8。
- [0764] 93. 小项89的细胞系,其是于2010年3月10日保藏为DSM ACC3046的杂交瘤细胞系4C1。
- [0765] 94. 小项89的细胞系,其是于2010年3月10日保藏为DSM ACC3047的杂交瘤细胞系5D10A3。
- [0766] 95. 小项89的细胞系,其是于2010年3月10日保藏为DSM ACC3048的杂交瘤细胞系6C10。
- [0767] 96. 小项89的细胞系,其是于2010年3月10日保藏为DSM ACC3049的杂交瘤细胞系

6H1。

[0768] 97. 小项89的细胞系,其是于2010年3月10日保藏为DSM ACC3050的杂交瘤细胞系7C2。

## 序 列 表

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

<120> 药物组合物

<130> P2654 PCT BS

<150> 09157303.0  
<151> 2009-04-03

<160> 9

<170> PatentIn 版本 3.4

<210> 1  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> 人 (Homo Sapiens)

<220>  
<221> 变体  
<222> (18).. (18)  
[0001] <223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<220>  
<221> 变体  
<222> (26).. (26)  
<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 1

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

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

<210> 2  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人

<220>  
<221> 变体  
<222> (14).. (14)  
<223> /取代="磷酸化的酪氨酸"

<400> 2

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

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (7)..(7)

<223> /取代="磷酸化的苏氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (9)..(9)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 3

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

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (7)..(7)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (10)..(10)

<223> /取代="磷酸化的苏氨酸"

<400> 4

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

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (4)..(4)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

[0002]

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

<400> 5

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

<210> 6  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人

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

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

[0003] <400> 6

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

Ile Asp

<210> 7  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人

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

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

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (13)..(13)

<223> /取代="磷酸化的苏氨酸"

<220>

<221> 变体

<222> (15).. (15)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 7

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

Pro

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (3).. (3)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 8

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

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 变体

<222> (6).. (6)

<223> /取代="磷酸化的丝氨酸"

<400> 9

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

[0004]

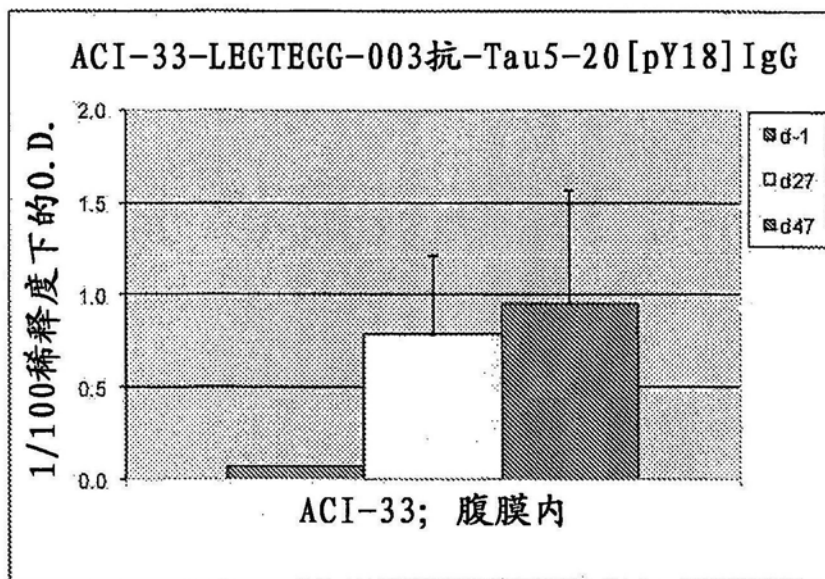


图1a

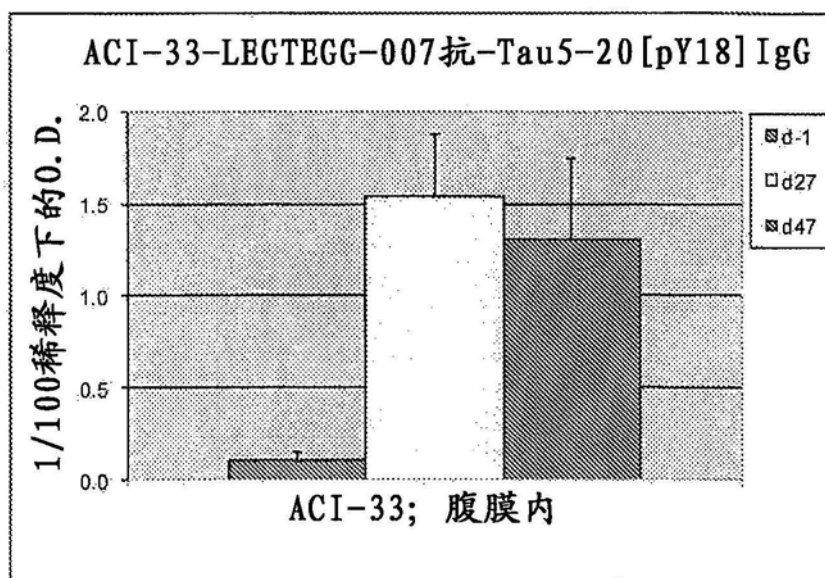


图1b

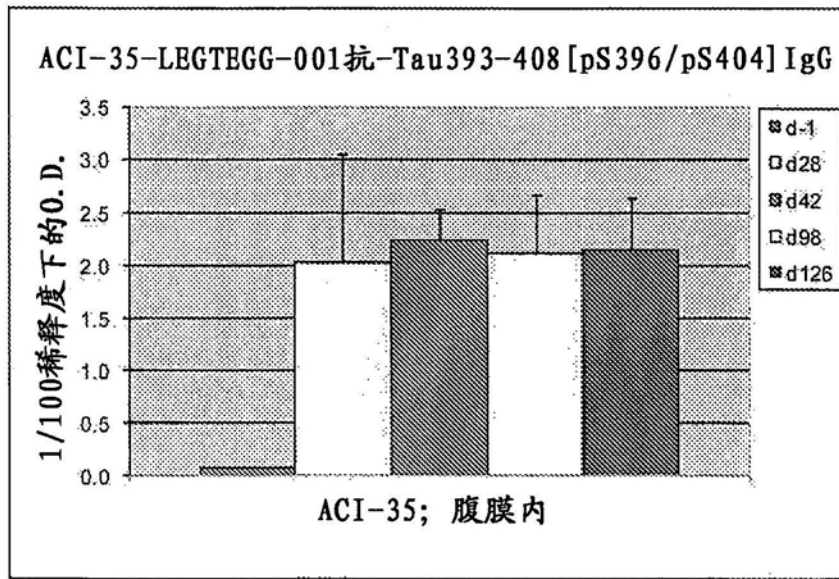


图2a

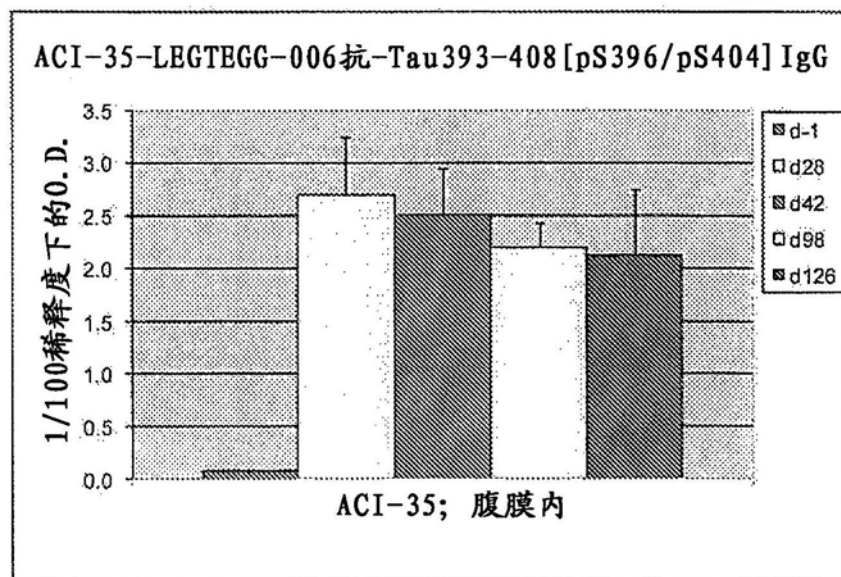


图2b



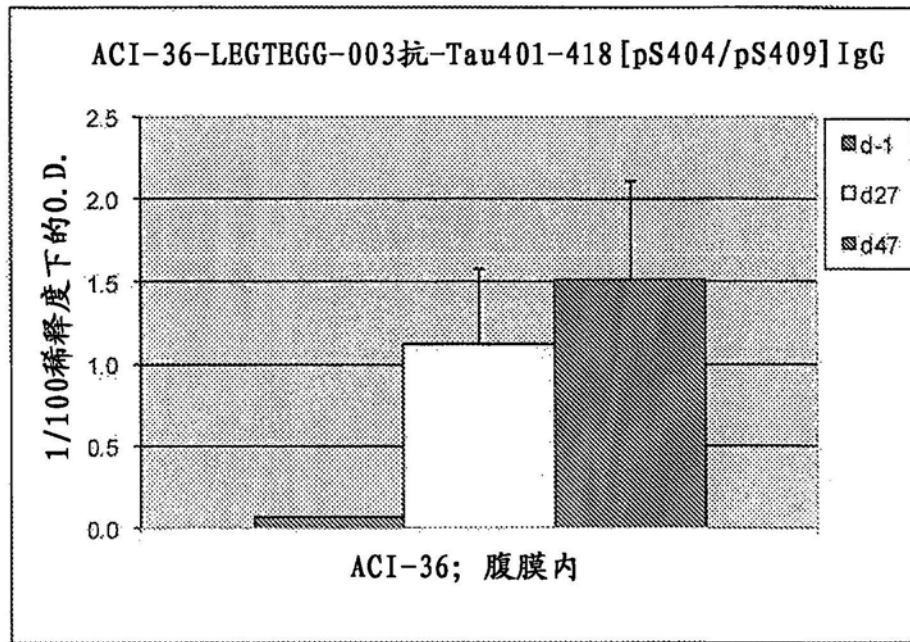


图3a

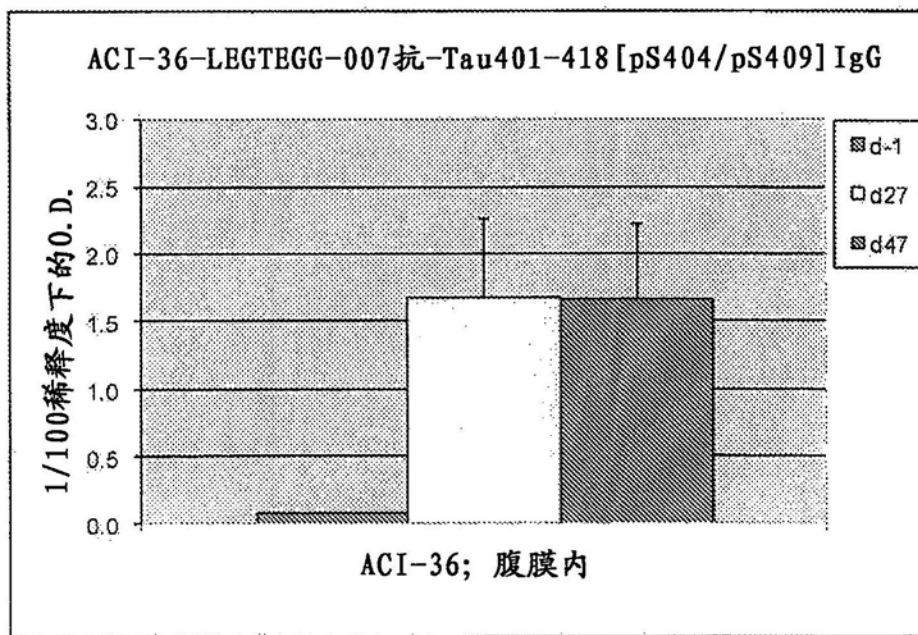


图3b

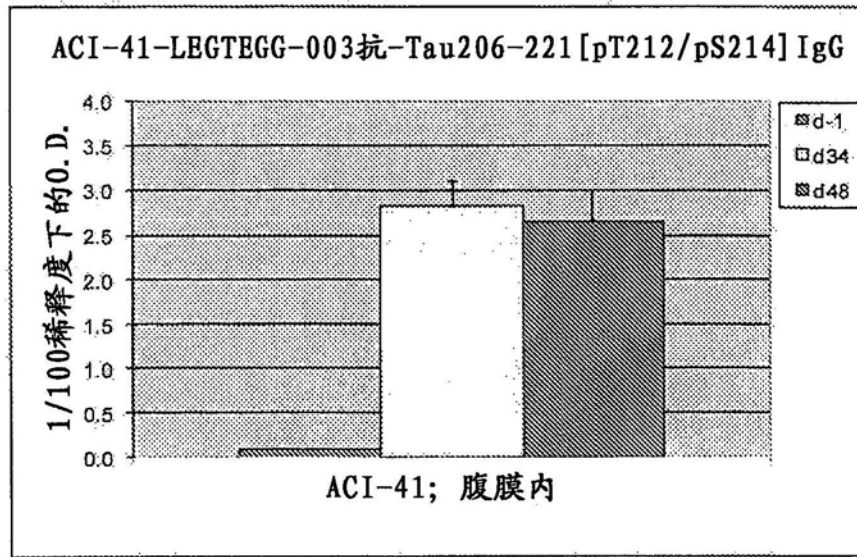


图4a

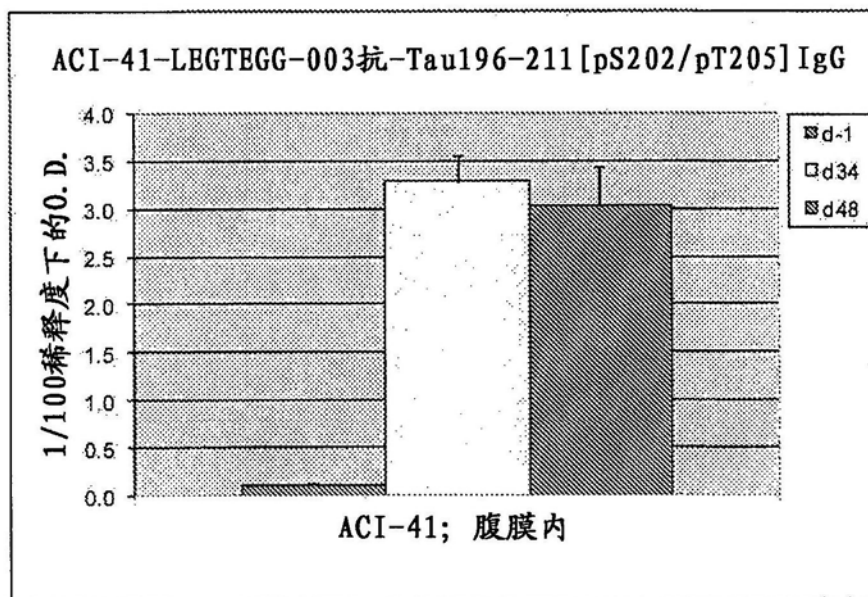


图4b

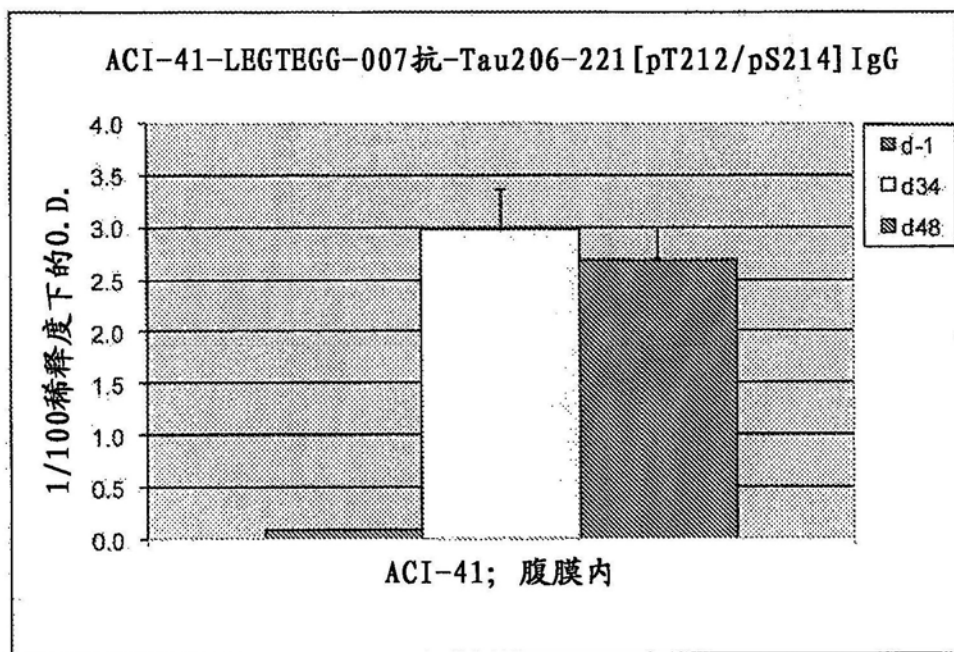


图4c

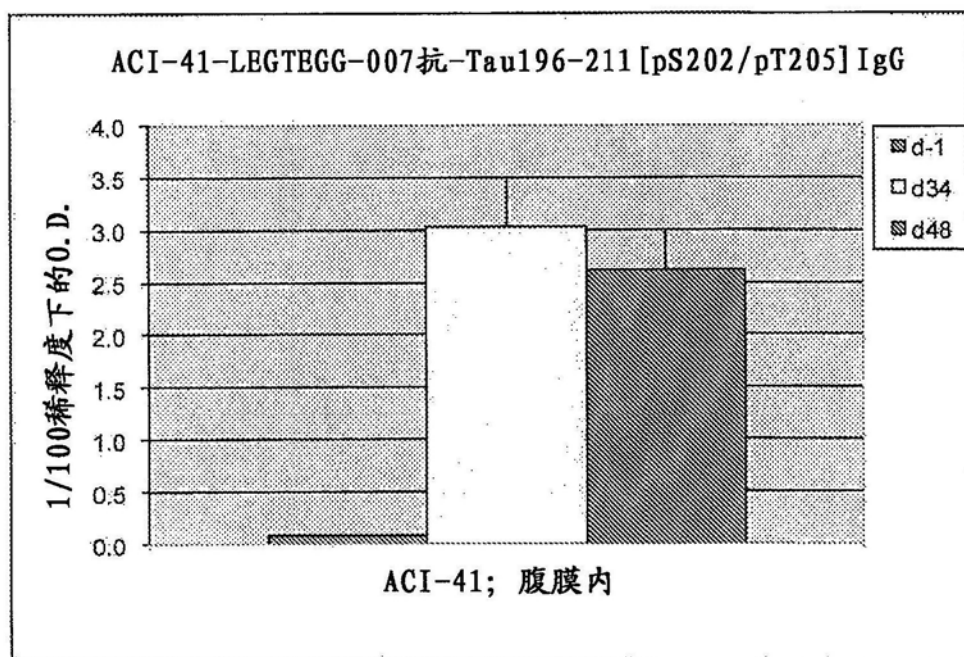


图4d

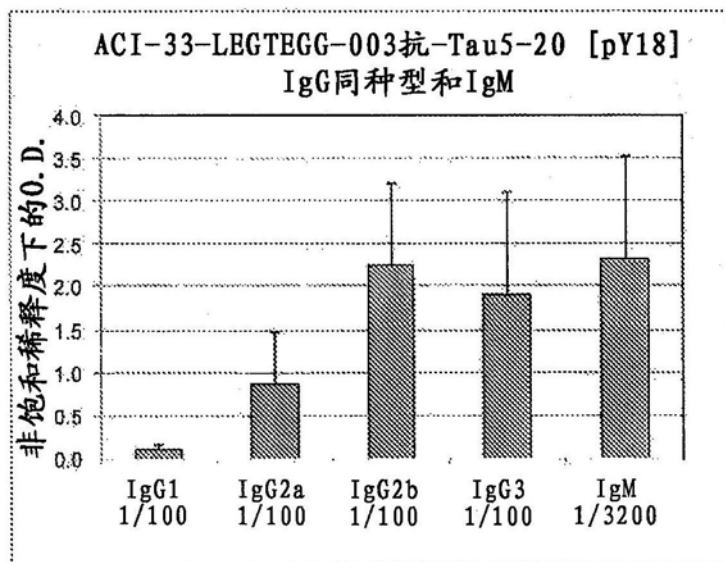


图5a

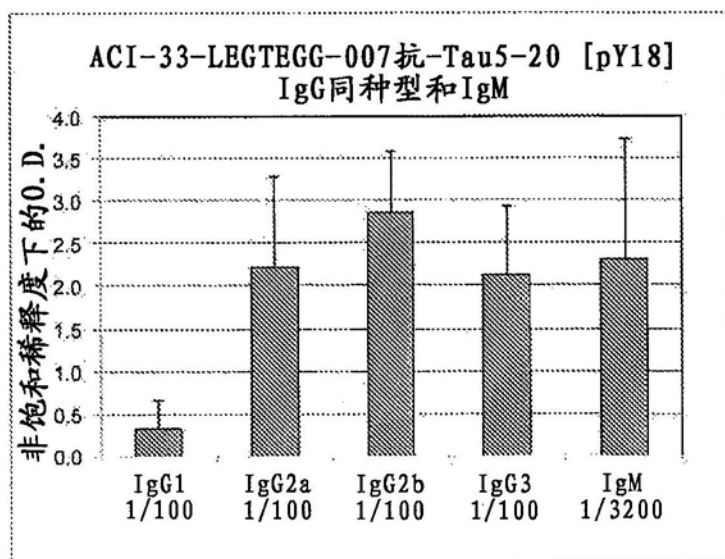


图5b

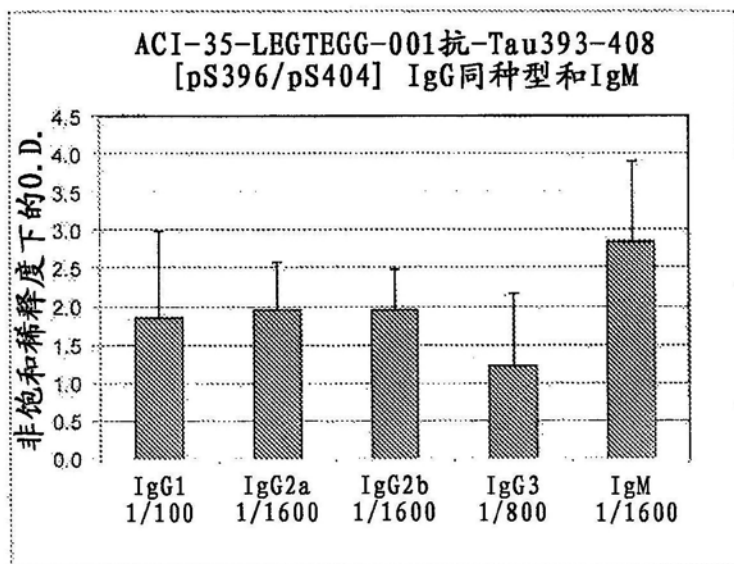


图6a

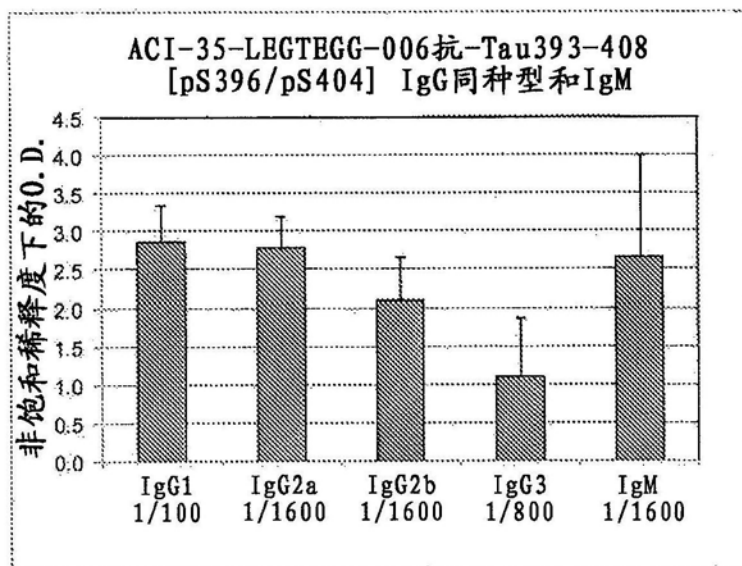


图6b

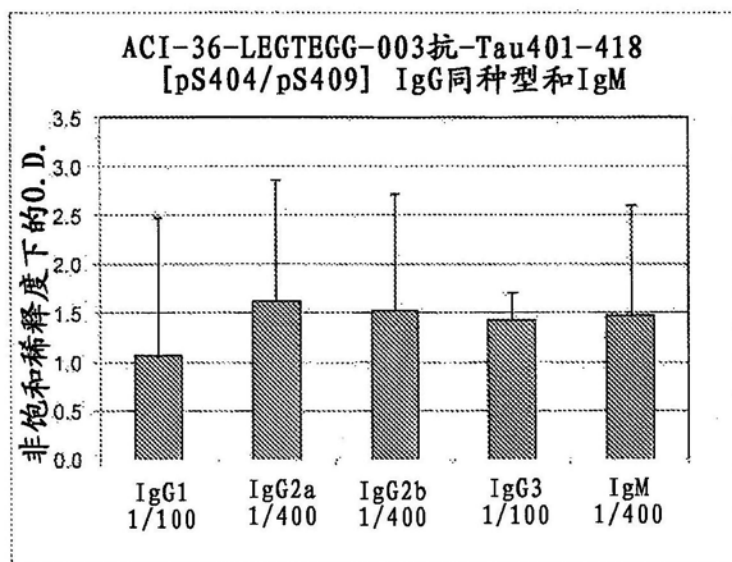


图7a

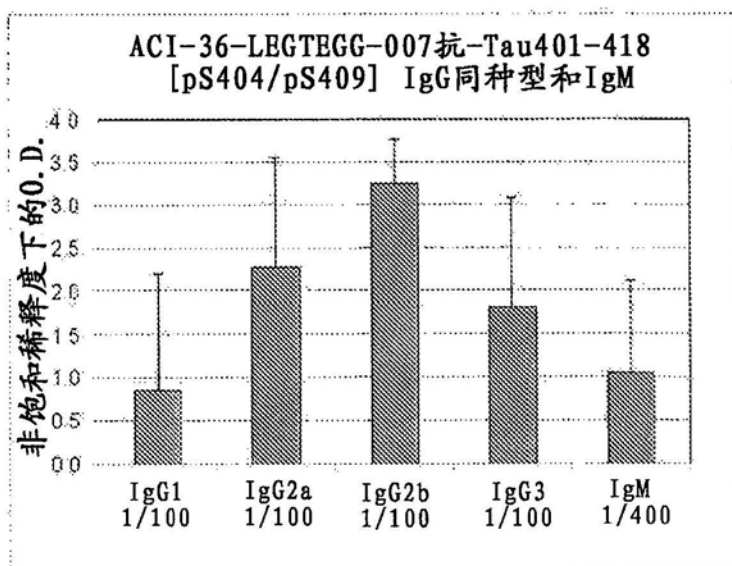


图7b

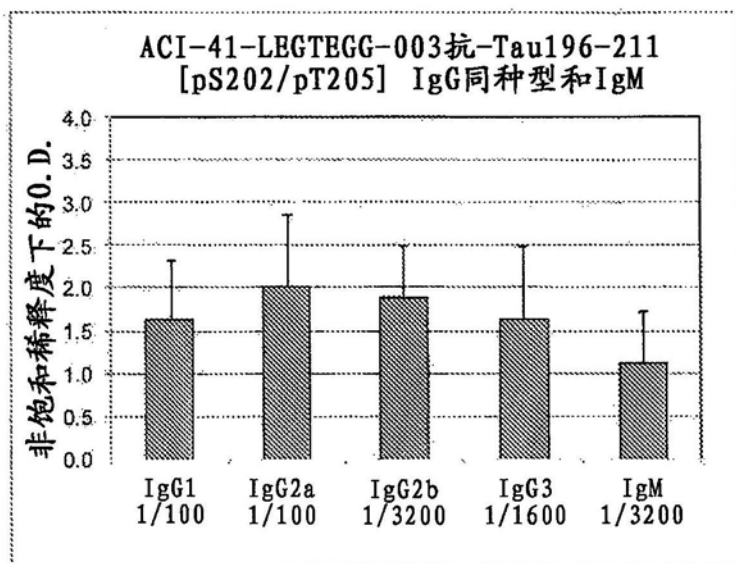


图8a

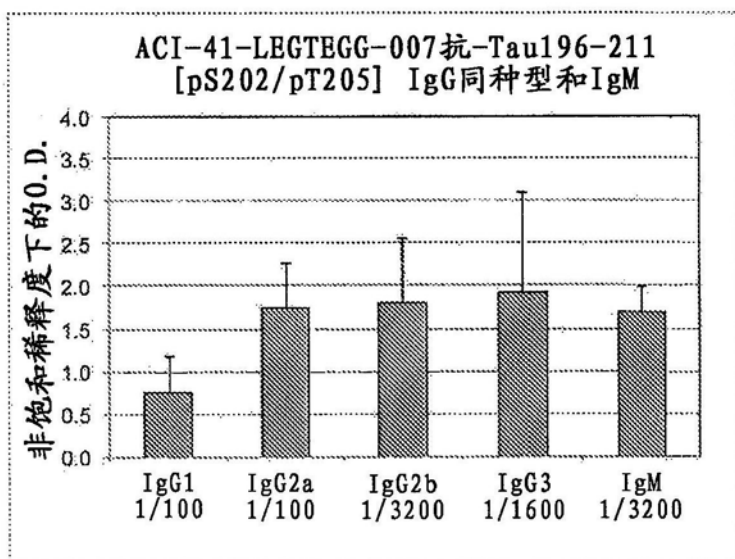


图8b

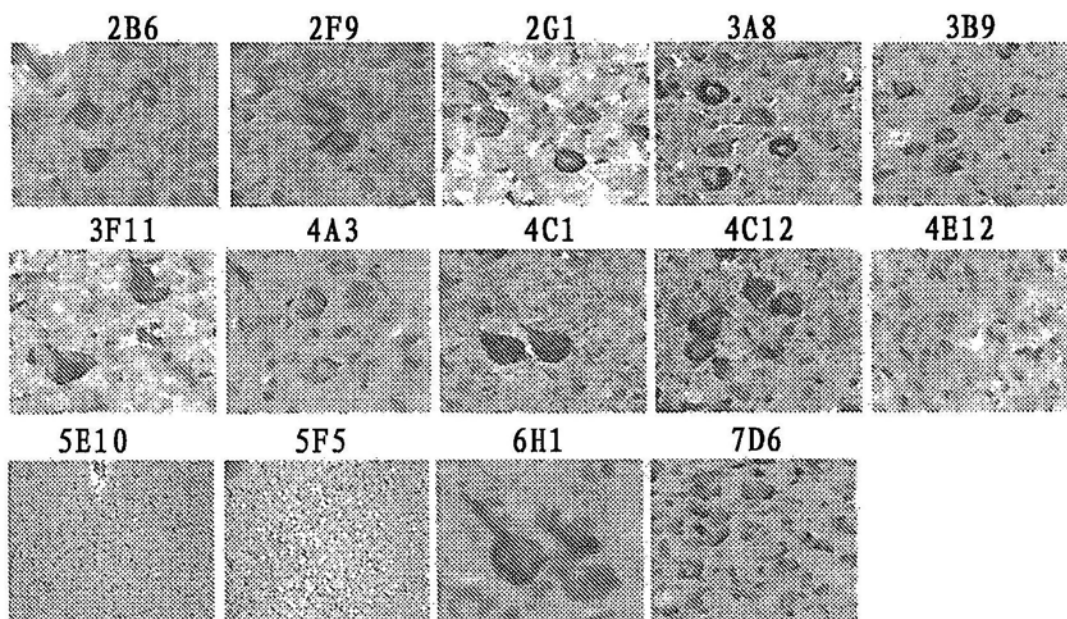


图9a

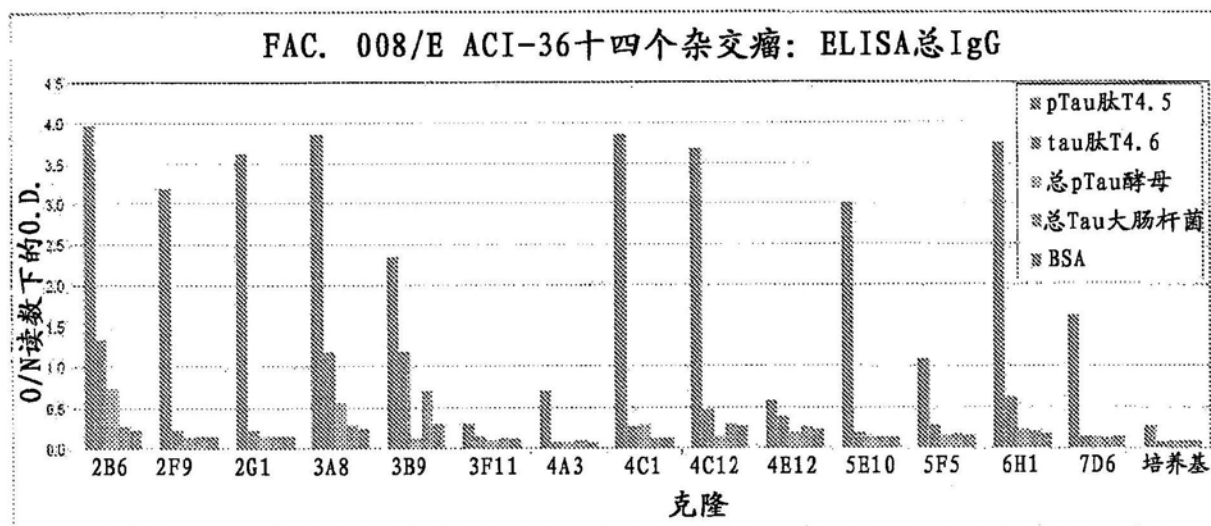


图9b



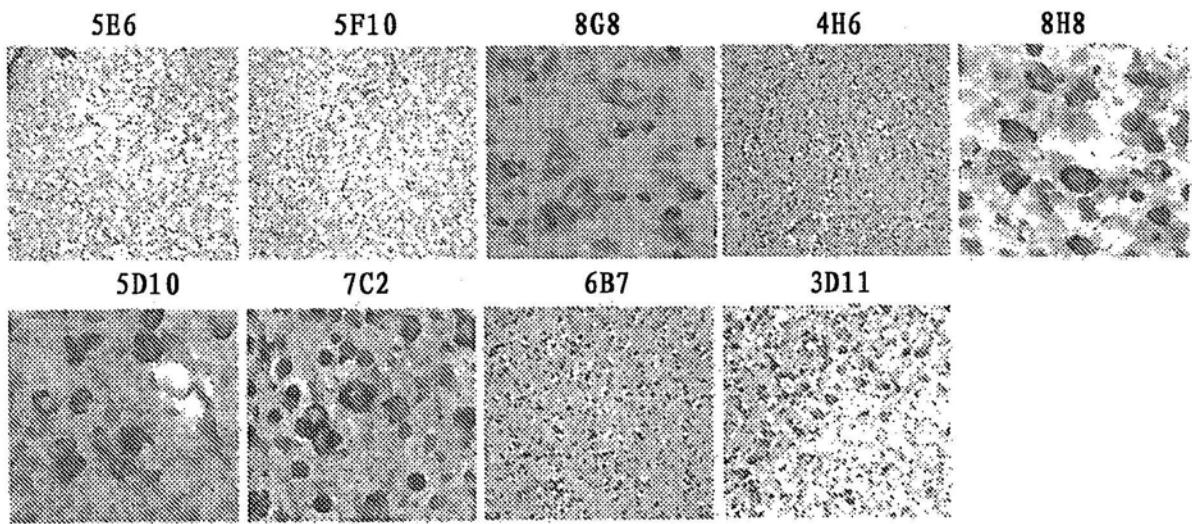


图10a

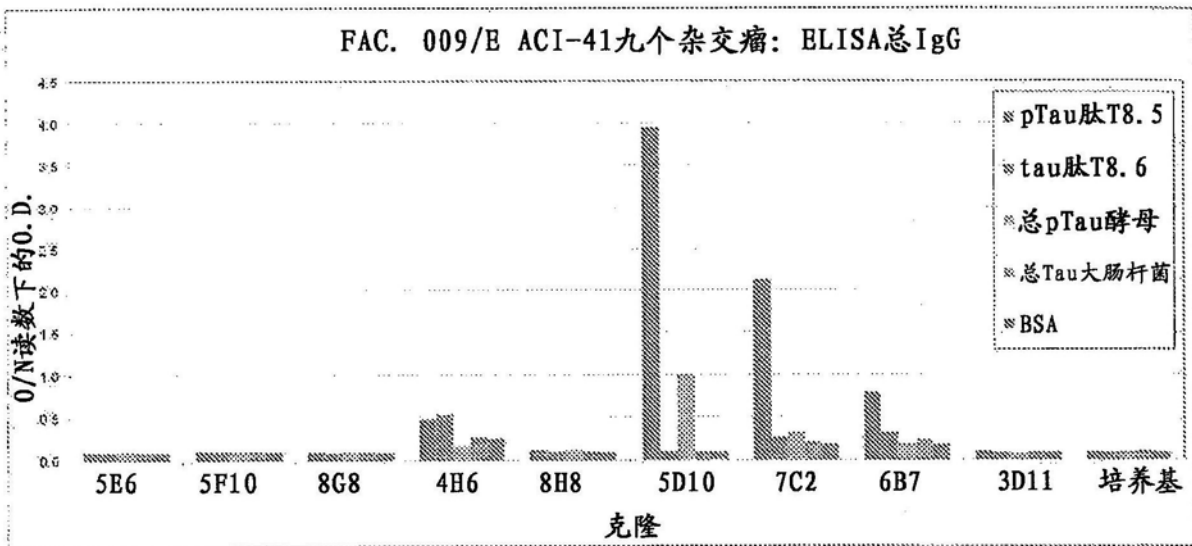


图10b

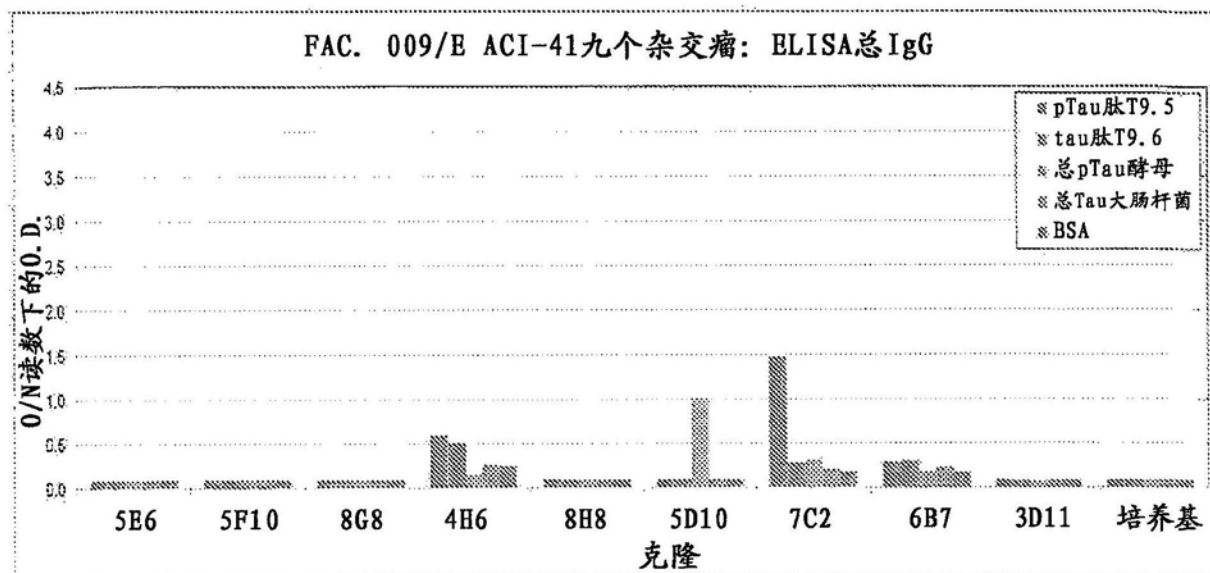


图10c

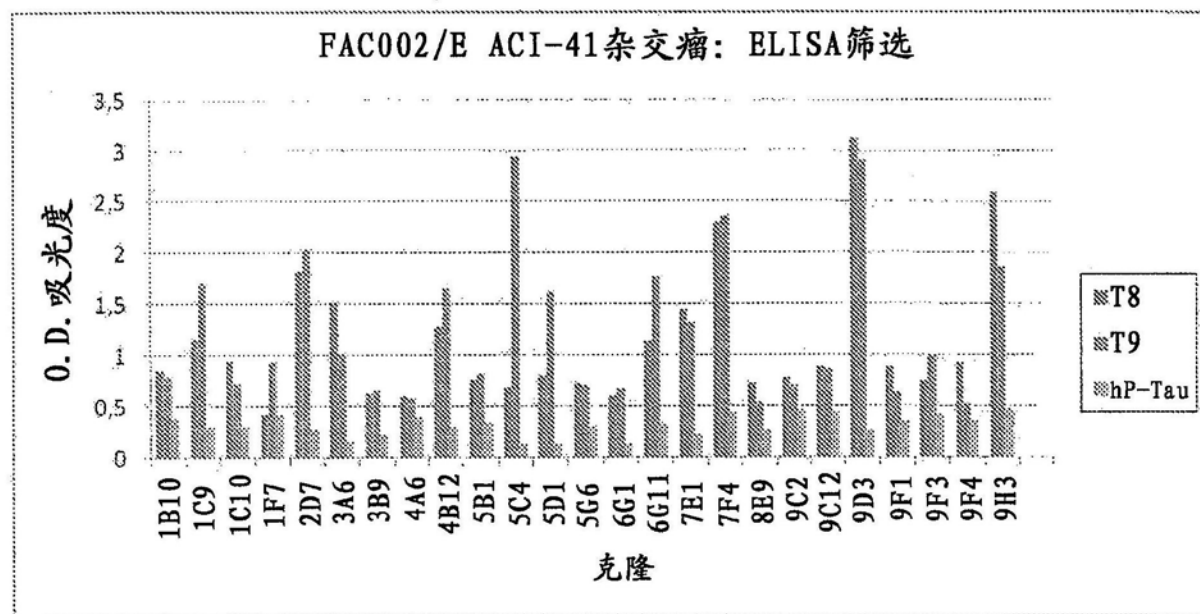
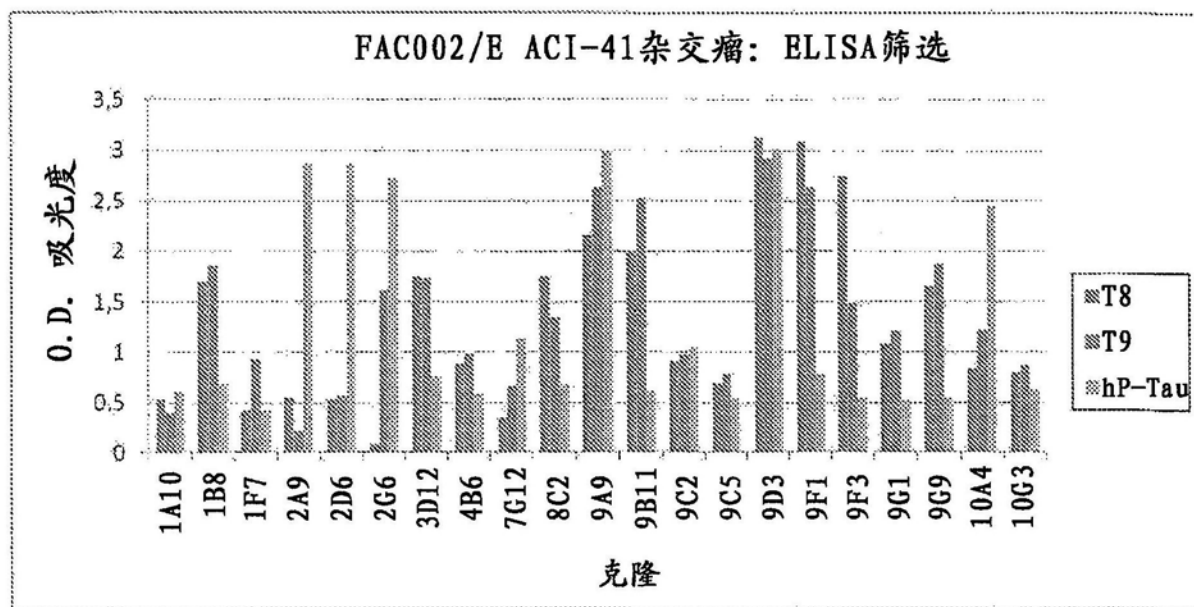


图11

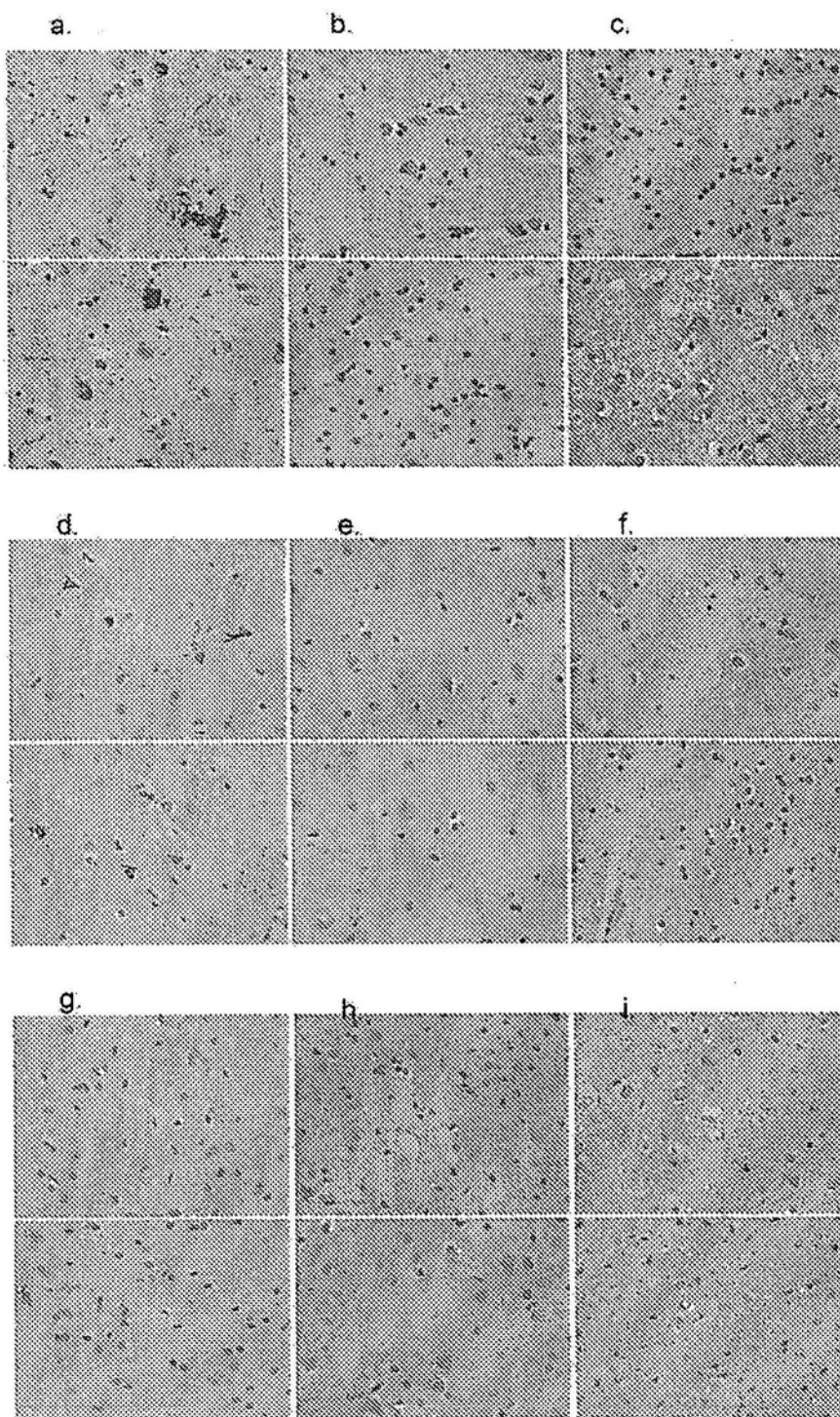


图12

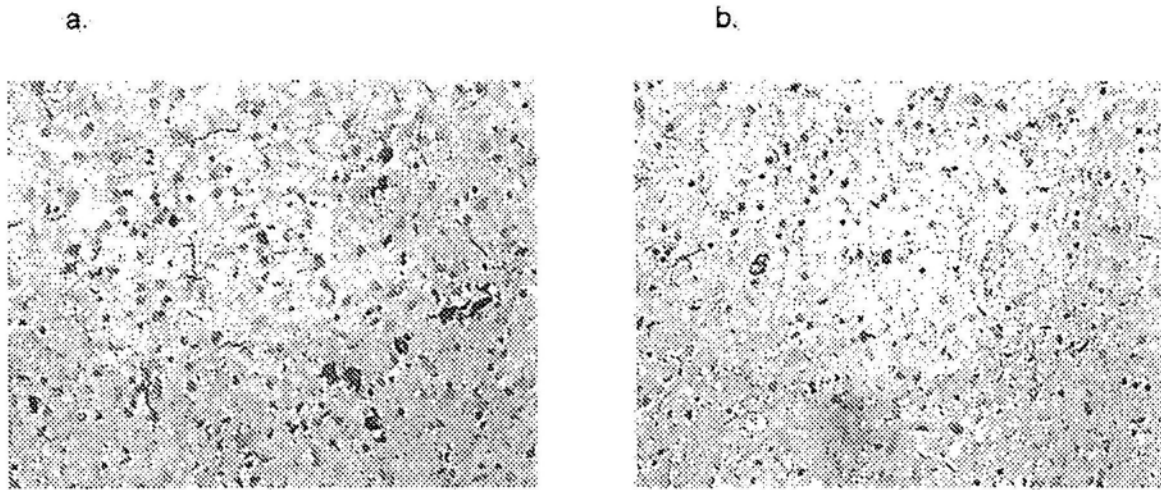


图13

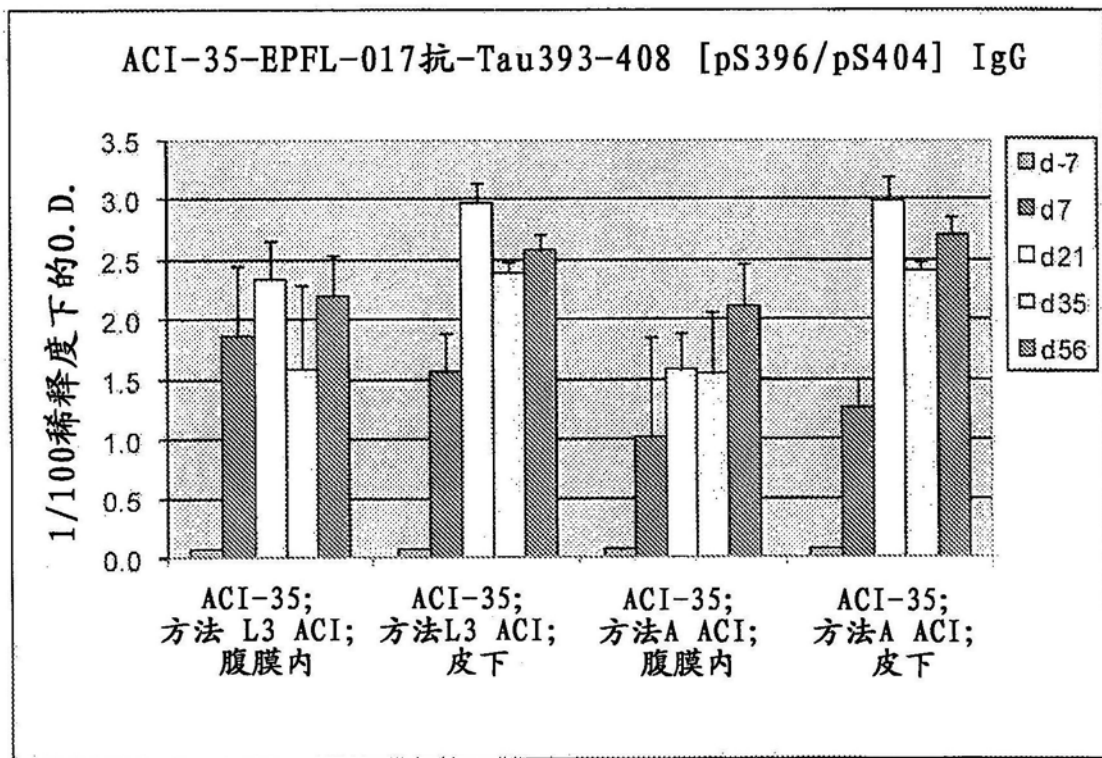


图14

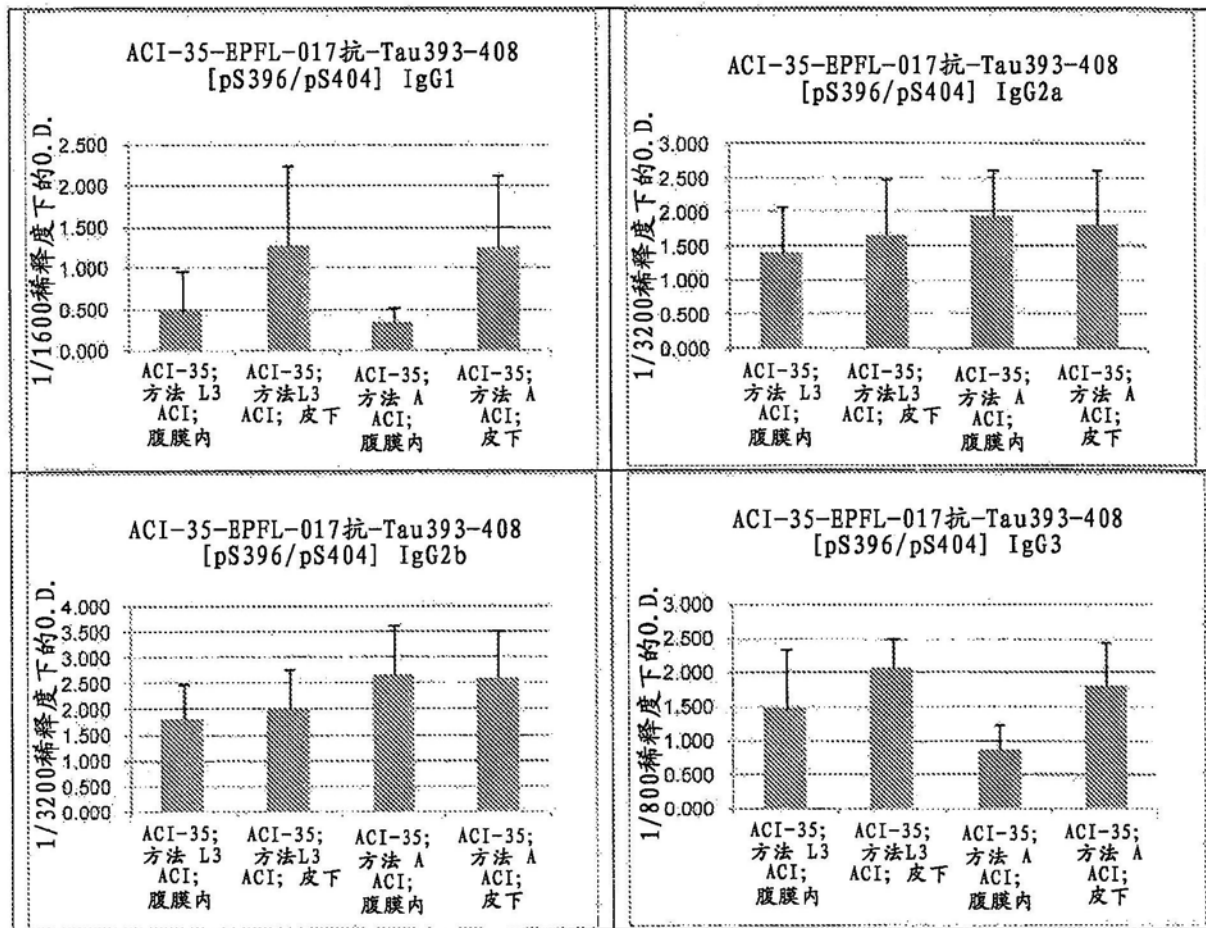


图15

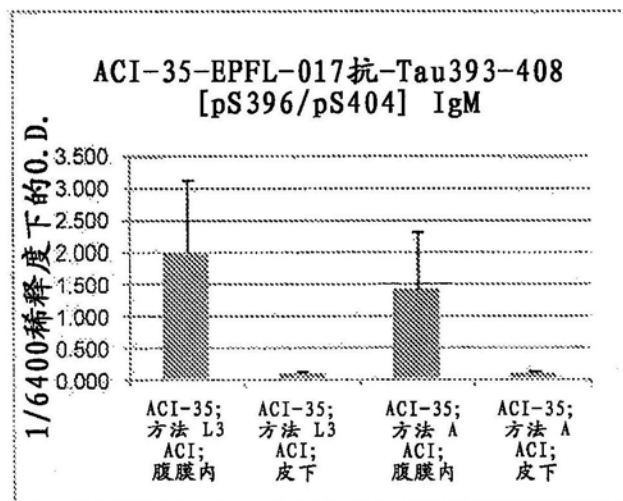


图16a



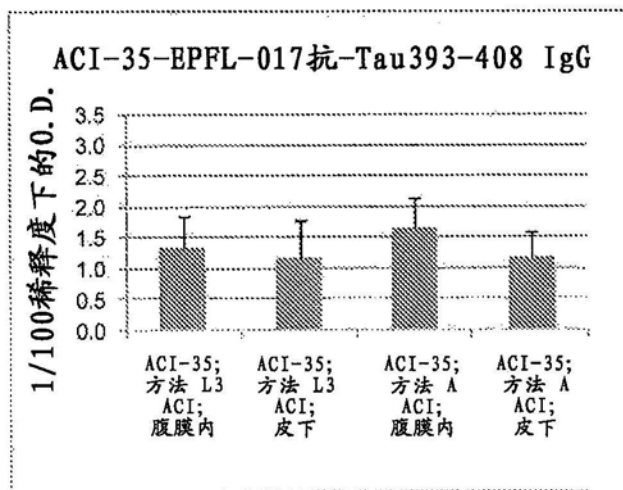


图16b

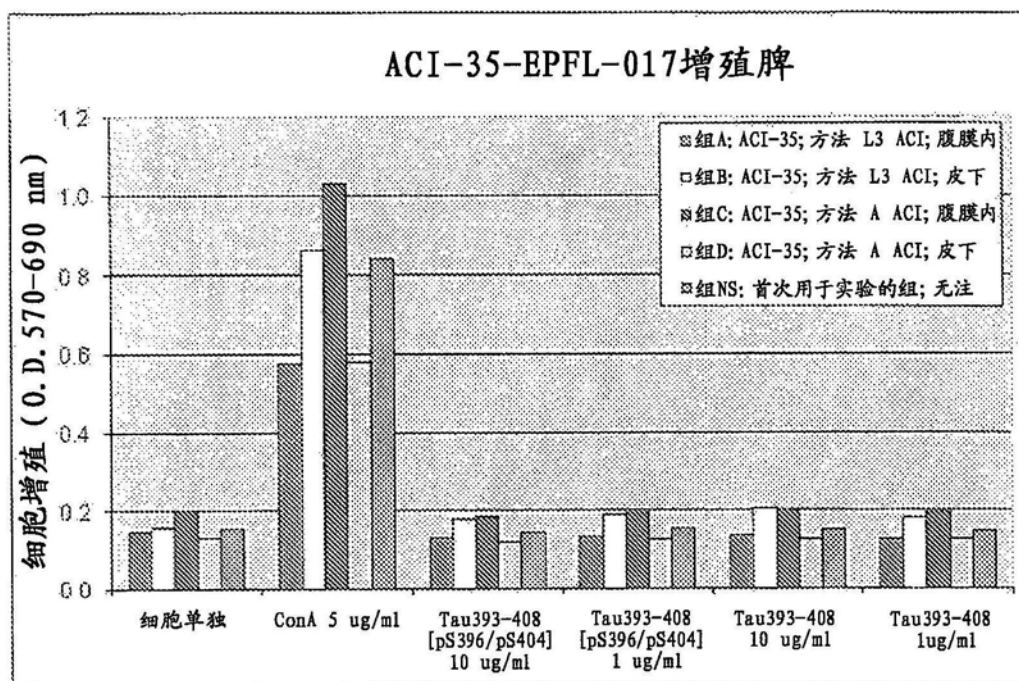


图17

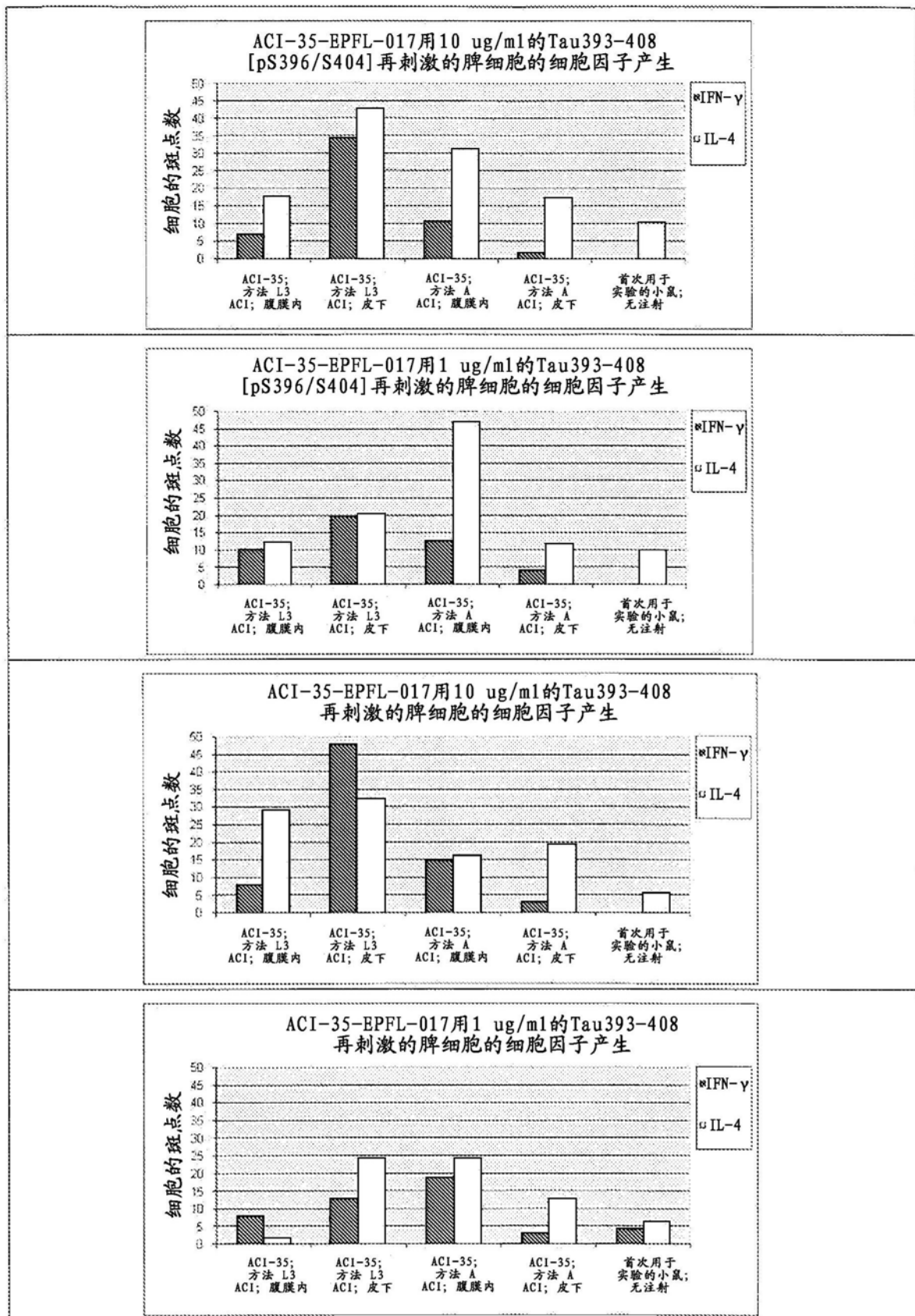


图18



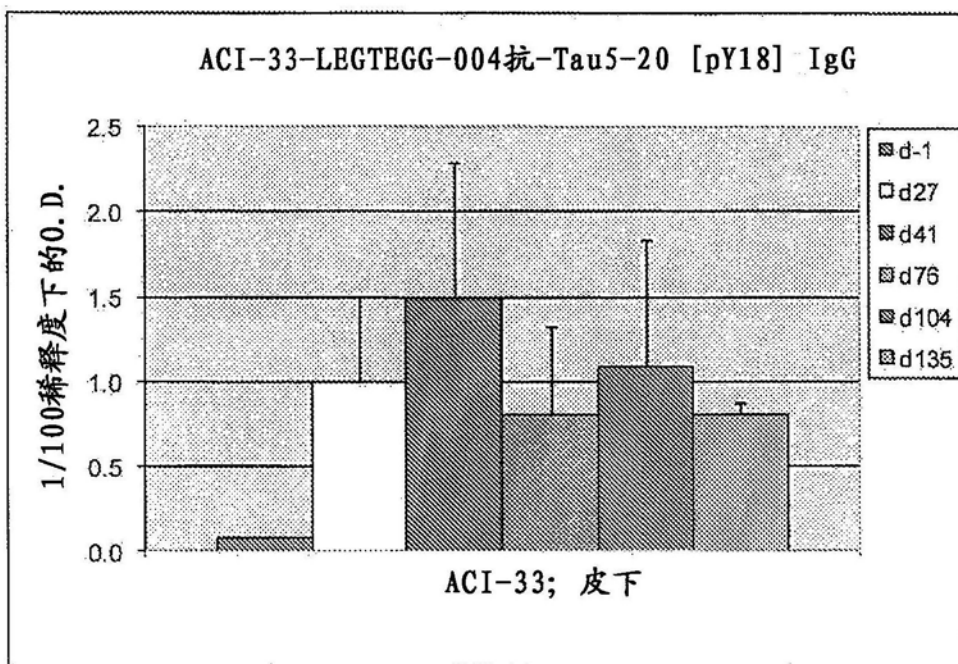


图19

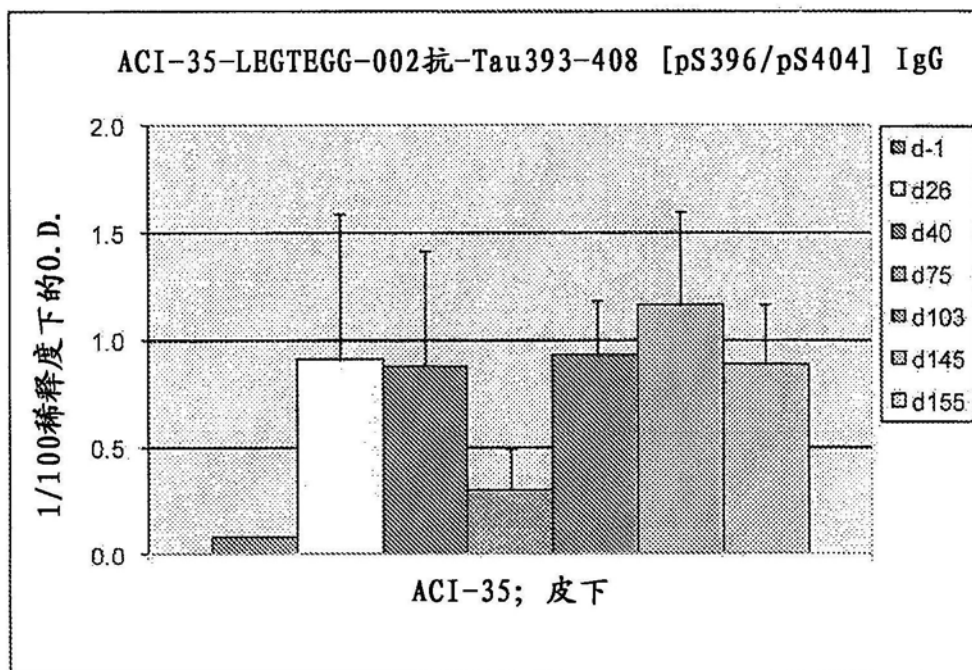


图20

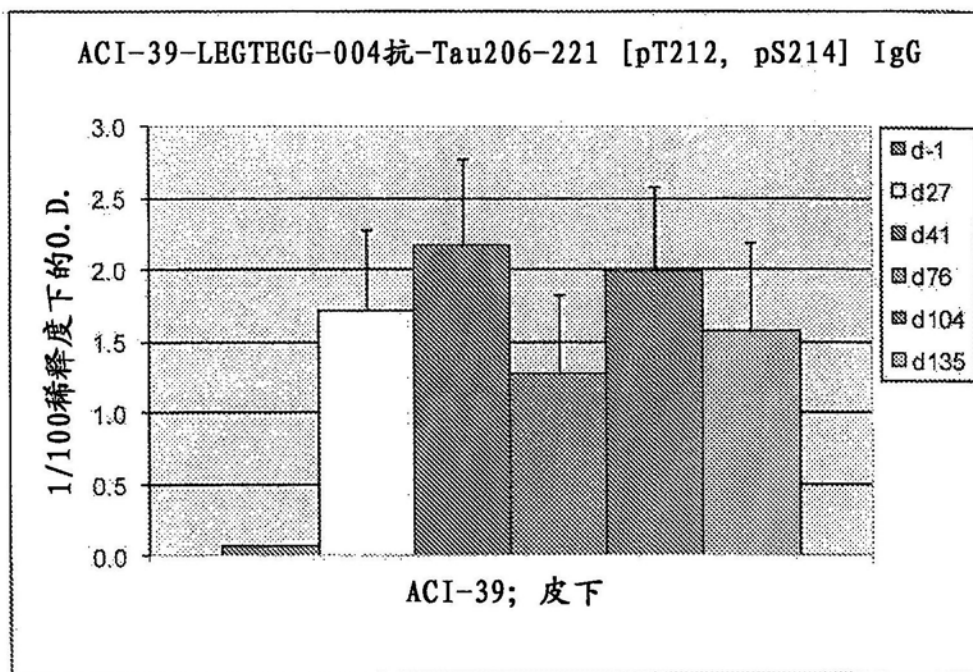


图21

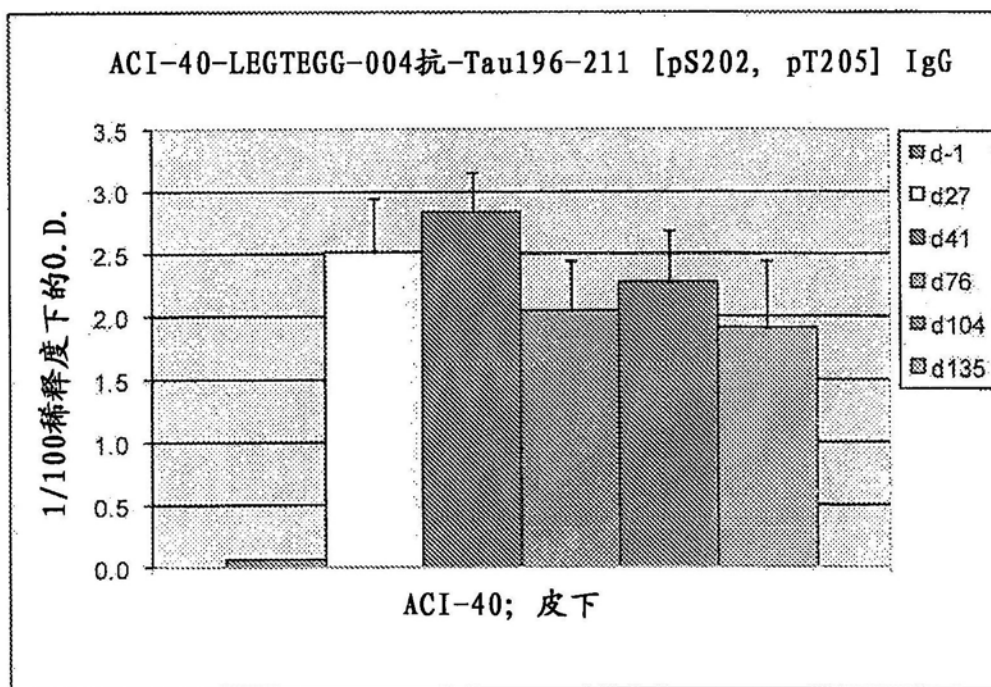


图22

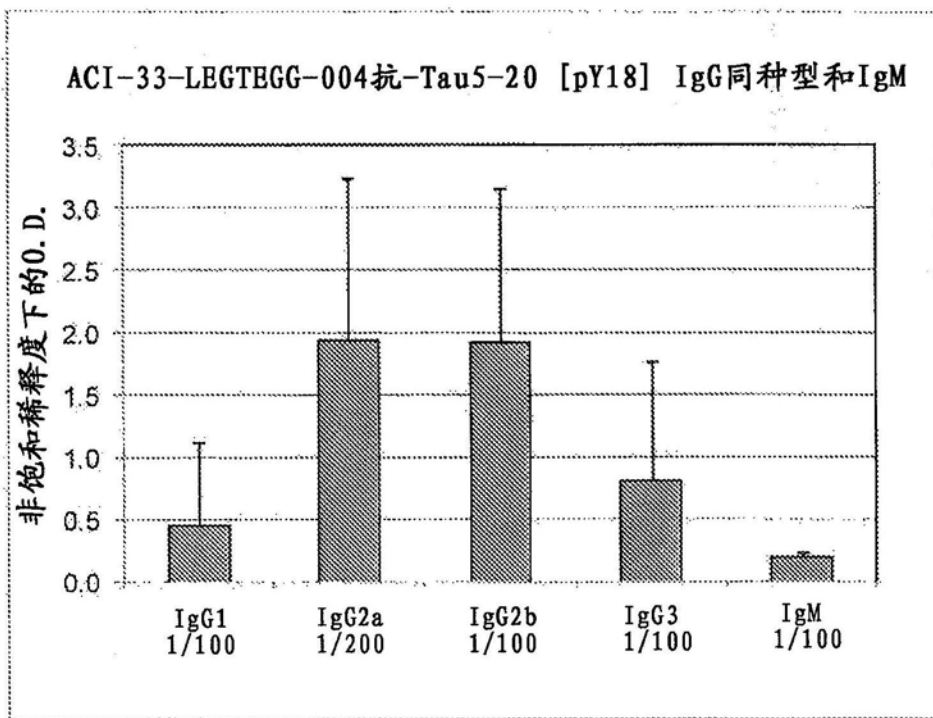


图23

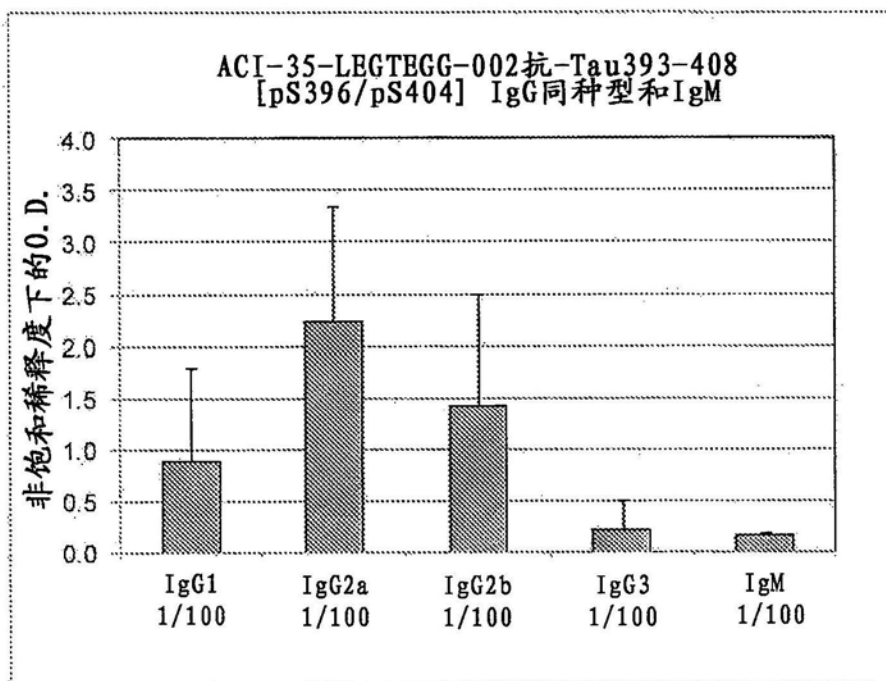


图24

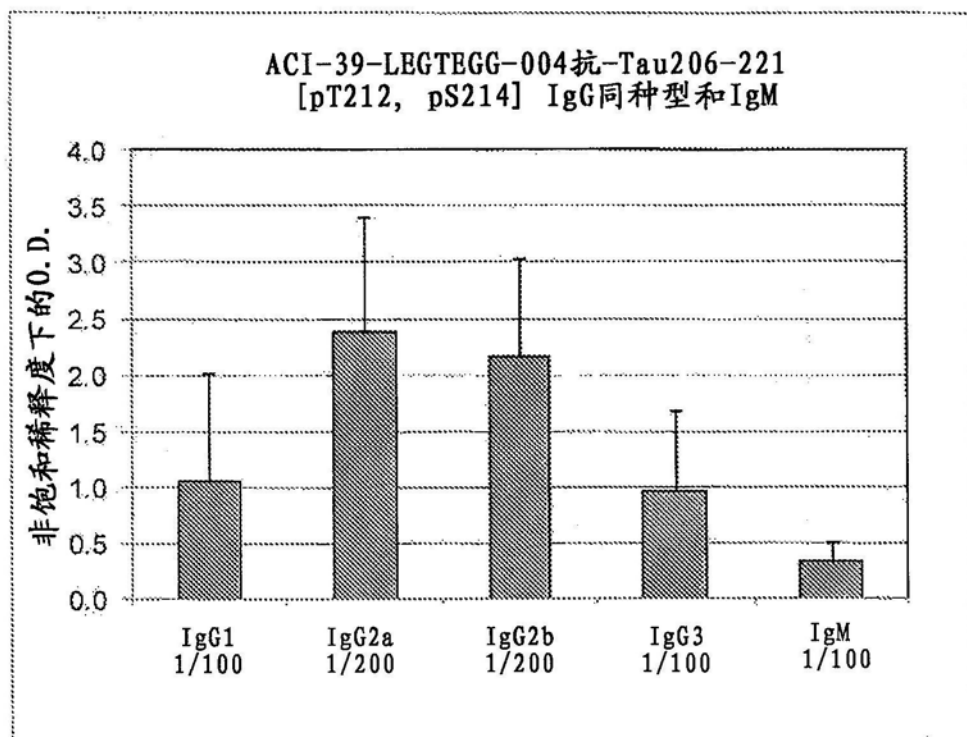


图25

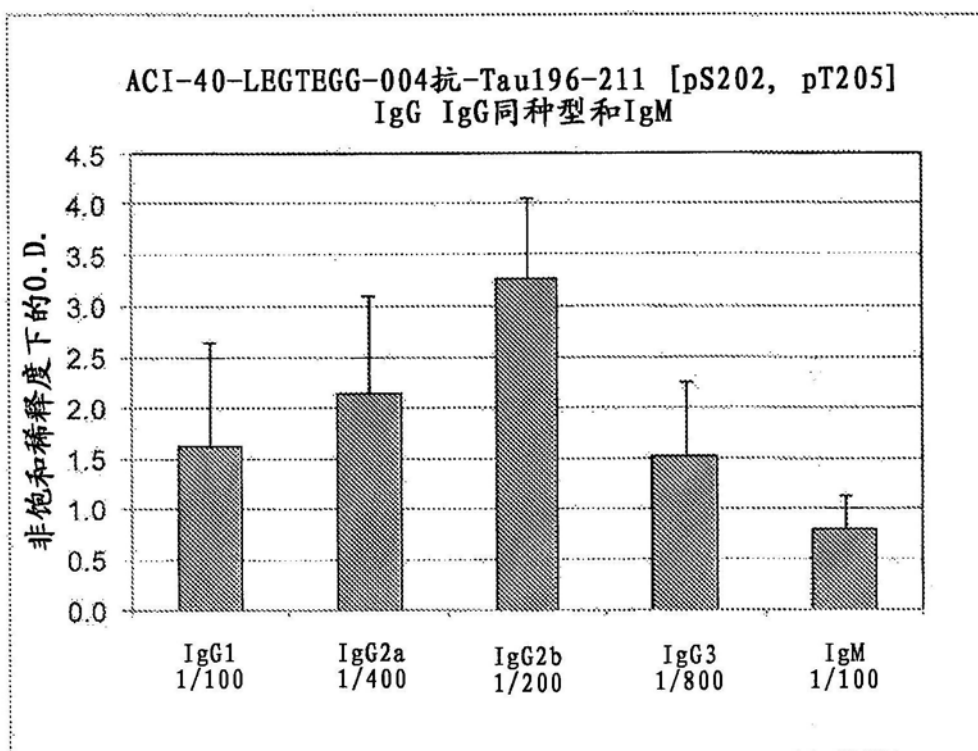


图26

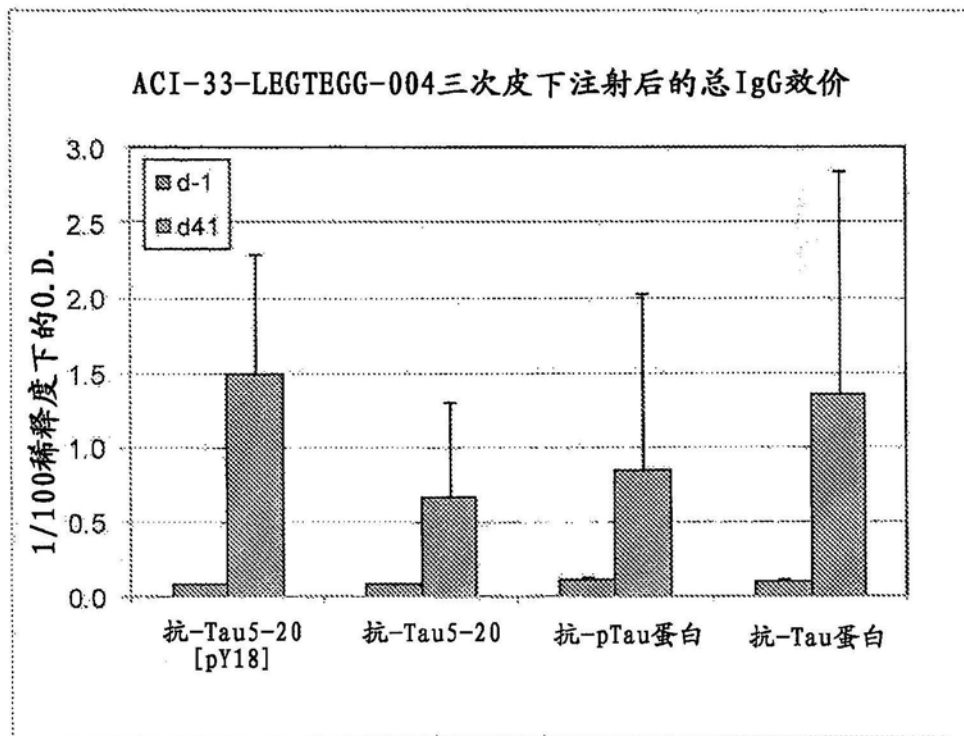


图27

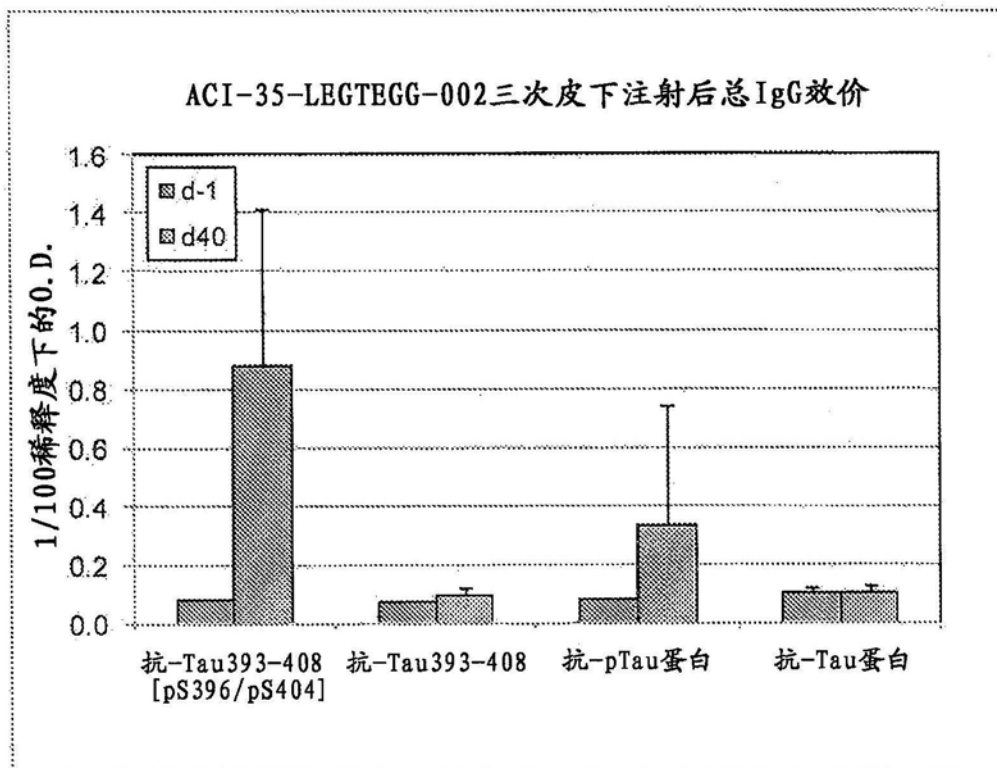


图28

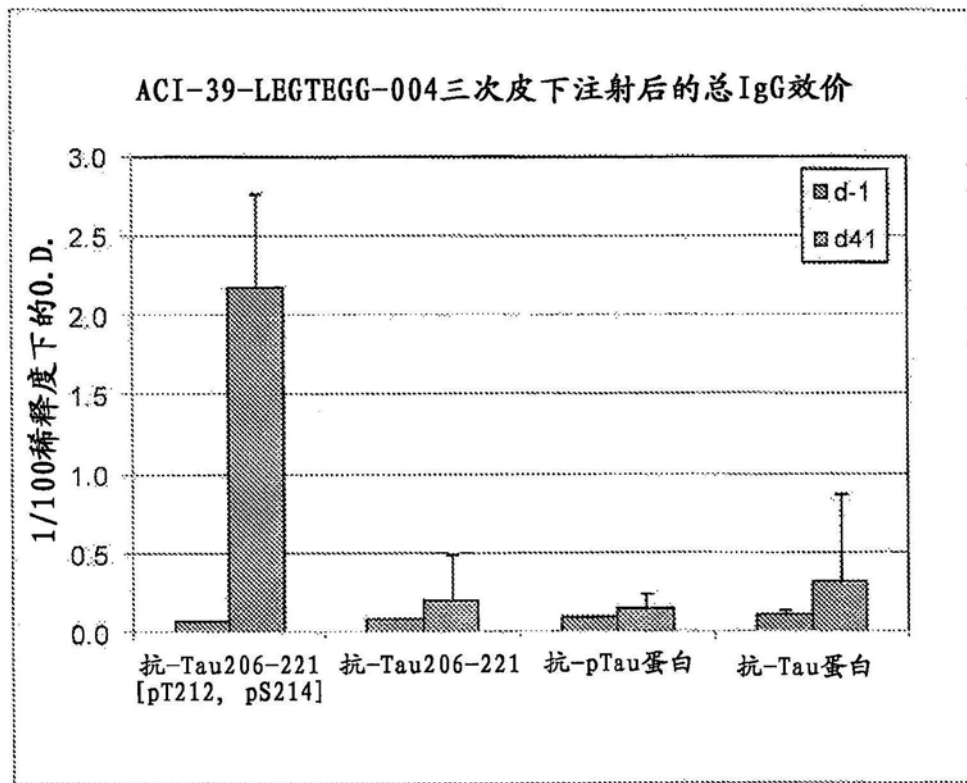


图29

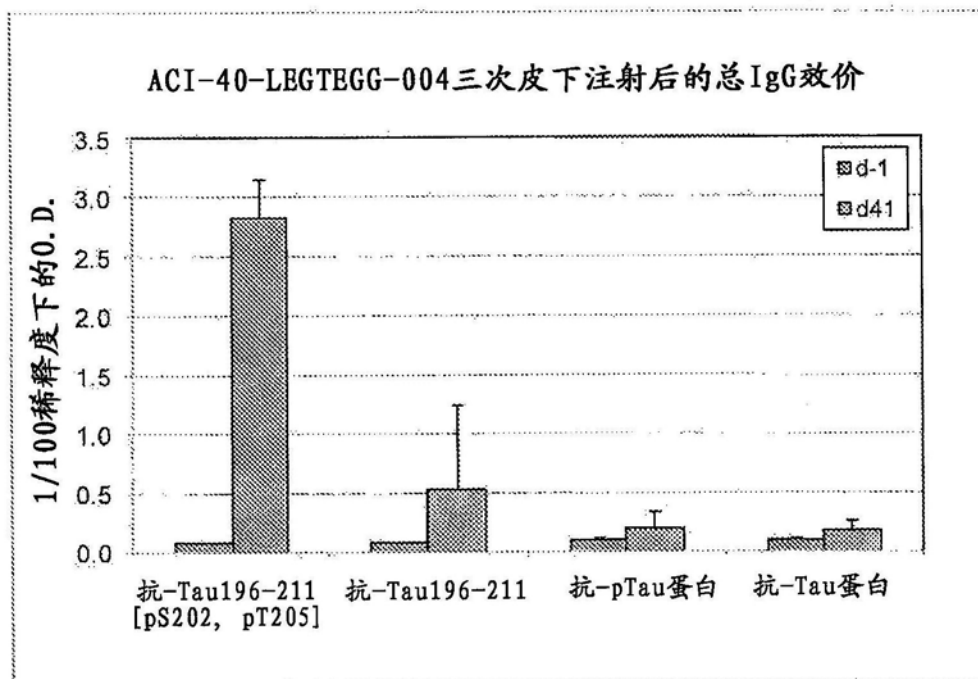


图30

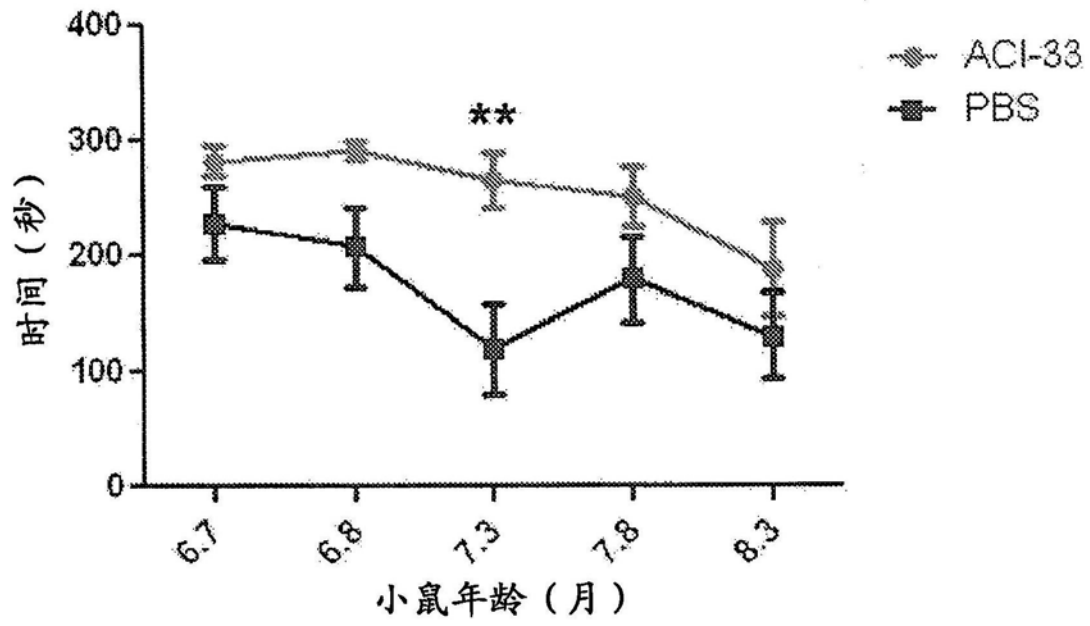


图31

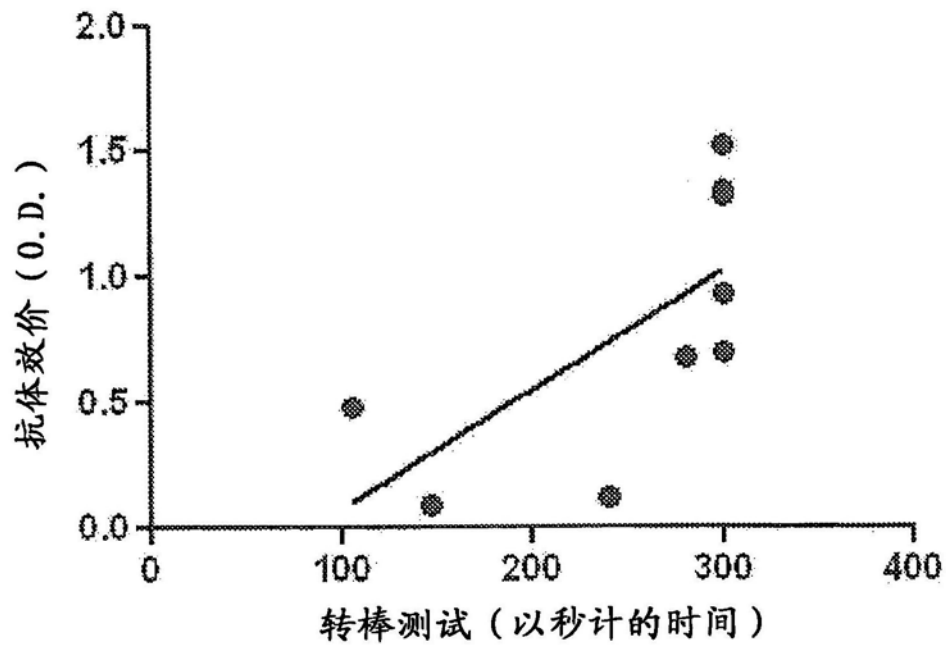


图32

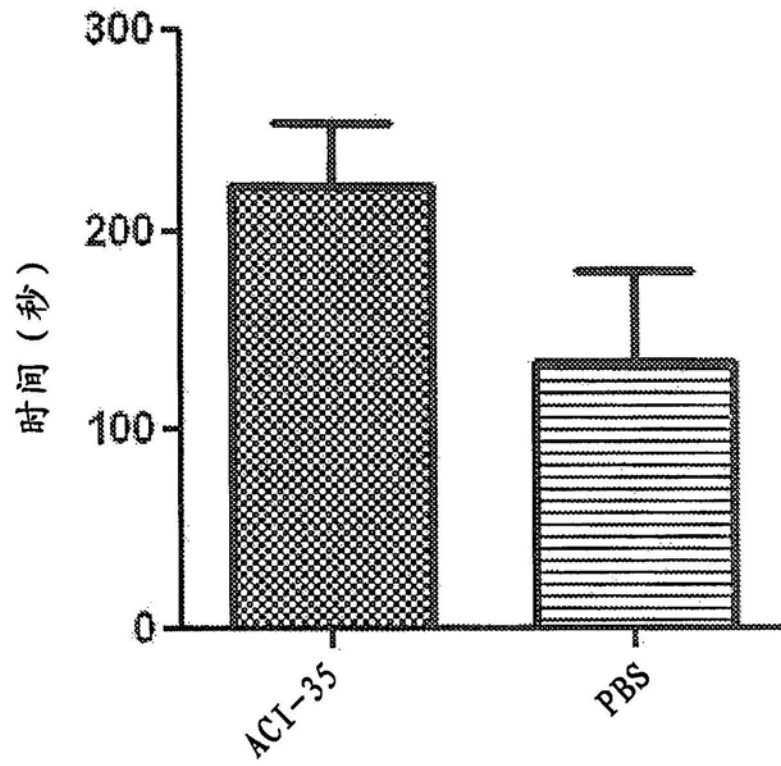


图33



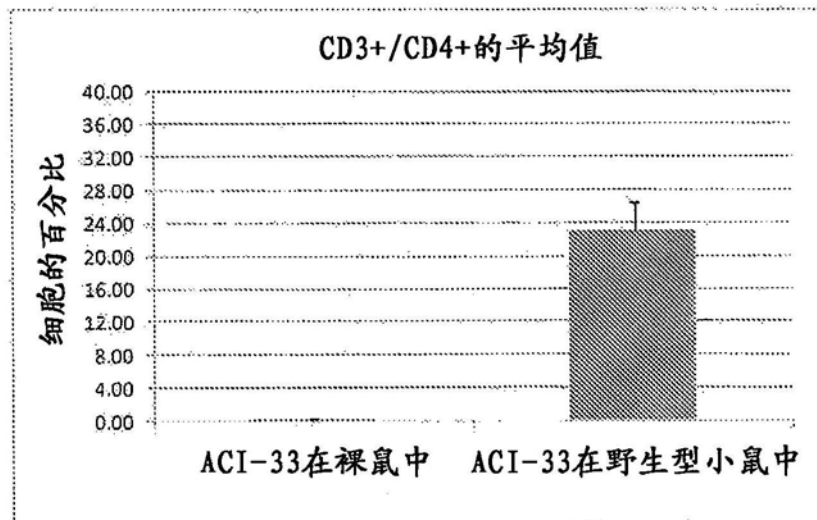
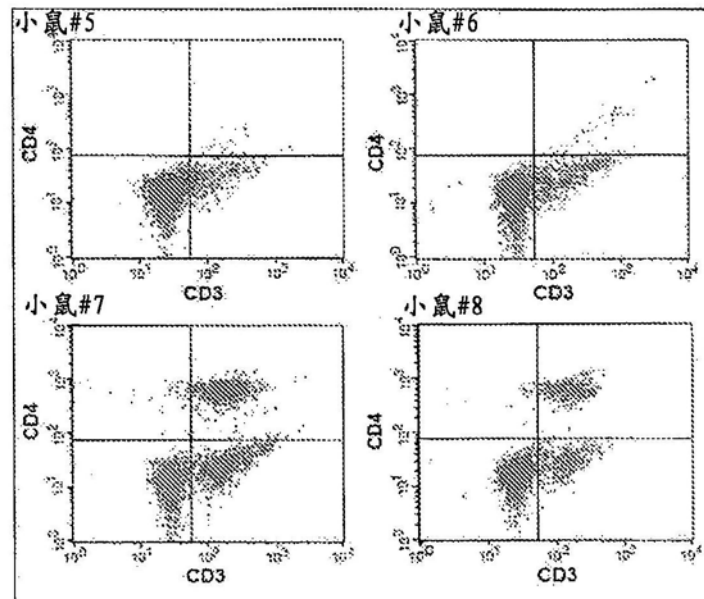


图34

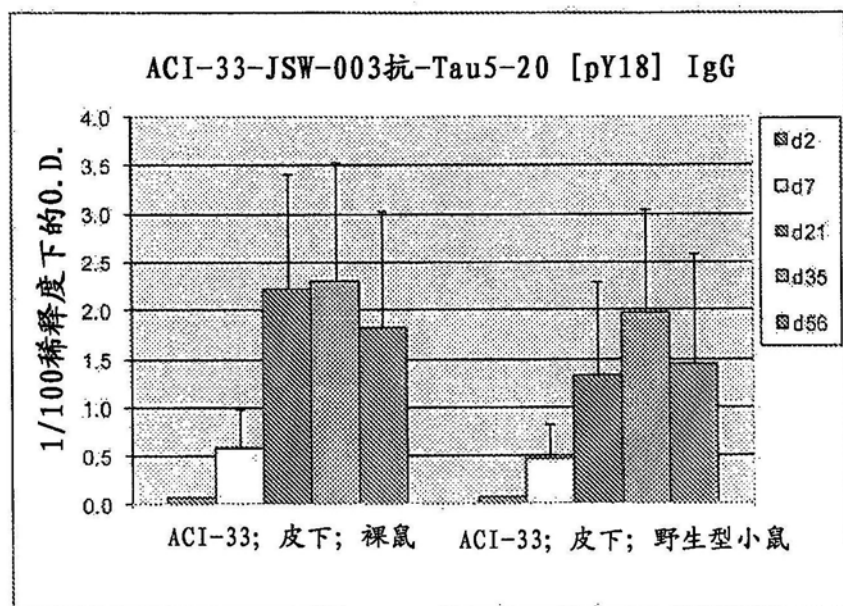


图35

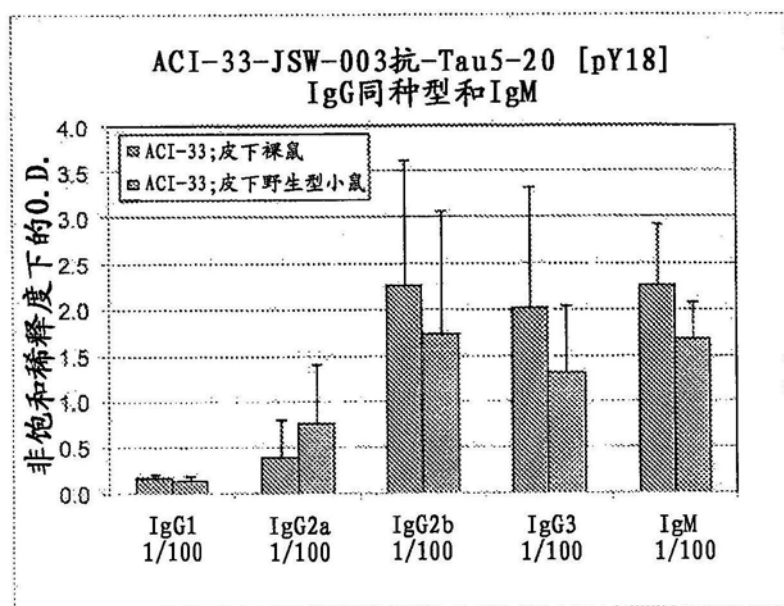


图36

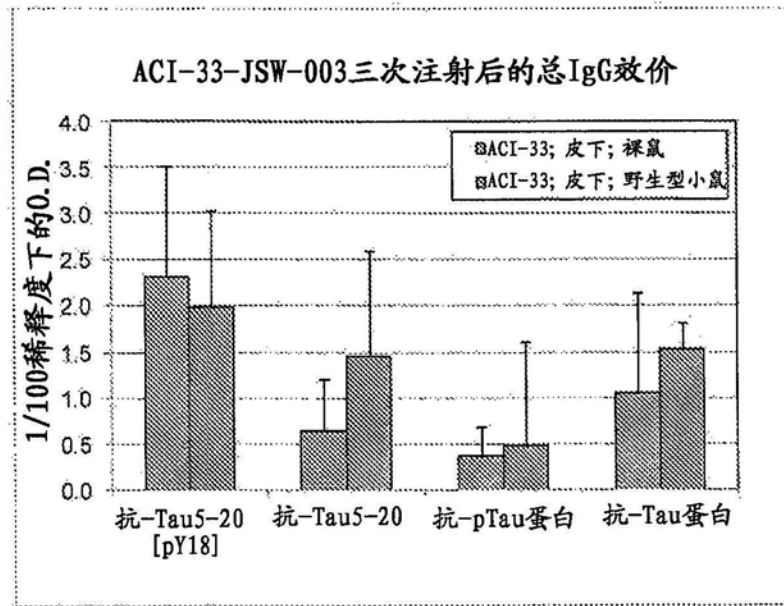


图37