



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201106968 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：099125165

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 29 日

(51)Int. Cl. : A61K39/385 (2006.01)

(30)優先權：2009/07/30 美國 61/229,860

(71)申請人：輝瑞疫苗有限責任公司(英國) PFIZER VACCINES LLC (GB)  
美國

(72)發明人：史密斯 喬治 約瑟夫 SMITH III, GEORGE JOSEPH (US)；威爾斯 肯尼斯 尼爾森 WILLS, KENNETH NELSON (US)；朱 傑夫 賢兆 ZHU, JEFF XIANCHAO (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：10 共 160 頁

(54)名稱

抗原 T A U 肽及其用途

ANTIGENIC TAU PEPTIDES AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明係關於包含較佳連接至免疫原性載體之抗原 tau 肽的新穎免疫原及組合物，其用於治療 tau 相關神經病症。本發明另外係關於製備該等免疫原及組合物之方法及其於醫藥中之用途。

群組	疫苗	µg 明膠 (Al(OH) <sub>3</sub> )	N	ELISA 抗原	第 21 天或第 28 天之 IgG 滴度	ELISA 抗原	第 21 天或第 28 天之 IgG 滴度	選擇性	ELISA 抗原	第 21 天或第 28 天之 IgG 滴度	ELISA 抗原	第 21 天或第 28 天之 IgG 滴度	選擇性
1	A-1P-VLP	750	3	A-1P	3.86E+05	A-1	< 2.72E+04	> 17.2	A-1P	5.00E+05	A-1	< 2.72E+04	> 24.4
2	A-3P-VLP	750	3	A-3P	5.00E+05	A-3	< 2.72E+04	> 24.4	A-1P	2.36E+06	A-1	< 1.58E+04	> 149
3	A-2P-VLP	750	3	A-2P	1.58E+05	A-2	1.22E+05	1.7	A-1P	1.58E+05	A-1	< 1.58E+04	> 10.0
4	A-7P-VLP	750	3	A-7P	1.11E+05	A-7	< 1.58E+04	> 7.0	A-1P	5.00E+04	A-1	< 1.58E+04	> 3.2
5	A-8P-VLP	750	3	A-8P	1.58E+05	A-8	< 1.58E+04	> 10.0	A-1P	5.00E+05	A-1	< 1.58E+04	> 31.6
6	B-1P-VLP	750	3	B-1P	3.86E+05	B-1	1.11E+05	5.4	B-1P	3.86E+05	B-1	3.86E+04	14.9
7	B-3P-VLP	750	3	B-3P	2.25E+05	B-3	< 1.58E+04	> 14.2	B-1P	2.36E+05	B-1	< 1.58E+04	> 14.9
8	B-5P-VLP	750	3	B-5P	< 2.72E+04	B-5	< 1.58E+04	1.7	B-1P	6.32E+04	B-1	< 1.58E+04	> 4.0
9	B-6P-VLP	750	3	B-6P	1.22E+05	B-6	< 1.58E+04	> 7.7	B-1P	2.72E+06	B-1	< 1.58E+04	> 172
10	C-1P-VLP	750	3	C-1P	1.22E+06	C-1	6.32E+05	4.7	C-1P	7.46E+05	C-1	6.32E+05	1.7
11	C-2P-VLP	750	2	C-2P	1.58E+05, 5.00E+05	C-2	< 1.58E+04, < 1.58E+04	> 20.8	C-1P	5.00E+04, 5.00E+05	C-1	< 1.58E+04, < 1.58E+04	> 17.4
12	C-3P-VLP	750	3	C-3P	> 1.85E+06	C-3	< 1.58E+04	> 117	C-1P	2.36E+05	C-1	< 1.58E+04	> 14.9
13	C-5P-VLP	750	3	C-5P	> 2.36E+06	C-5	< 1.58E+04	> 149	無	ND	無	ND	ND
14	C-1P-VLP	無	3	C-1P	> 2.72E+06	C-1	1.11E+05	> 47.2	C-1P	2.72E+06	C-1	< 1.58E+04	> 172
15	未治療	無	3	A-1P	< 1.58E+04	A-1	< 1.58E+04	1.0					
				B-1P	< 1.58E+04	B-1	< 1.58E+04	1.0					
				C-1P	< 1.58E+04	C-1	< 1.58E+04	1.0					
16	F-1P-VLP	252	6	F-1P	1.22E+05	F-1	1.58E+05	0.77	無	ND	無	ND	ND
17	A-8P-VLP	252	6	無	ND	無	ND	ND	A-1P	2.36E+06	A-1	< 5.00E+02	> 4729
18	未治療	無	6	A-1P	< 5.00E+02	A-1	< 5.00E+02	1.0					
				F-1P	< 5.00E+02	F-1	< 5.00E+02	1.0					



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201106968 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：099125165

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 29 日

(51)Int. Cl. : A61K39/385 (2006.01)

(30)優先權：2009/07/30 美國 61/229,860

(71)申請人：輝瑞疫苗有限責任公司(英國) PFIZER VACCINES LLC (GB)  
美國

(72)發明人：史密斯 喬治 約瑟夫 SMITH III, GEORGE JOSEPH (US)；威爾斯 肯尼斯 尼爾森 WILLS, KENNETH NELSON (US)；朱 傑夫 賢兆 ZHU, JEFF XIANCHAO (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：10 共 160 頁

(54)名稱

抗原 T A U 肽及其用途

ANTIGENIC TAU PEPTIDES AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明係關於包含較佳連接至免疫原性載體之抗原 tau 肽的新穎免疫原及組合物，其用於治療 tau 相關神經病症。本發明另外係關於製備該等免疫原及組合物之方法及其於醫藥中之用途。

群組	疫苗	µg 明膠 (Al(OH) <sub>3</sub> )	N	ELISA 抗原	第 21 天或第 28 天之 IgG 滴度	ELISA 抗原	第 21 天或第 28 天之 IgG 滴度	選擇性	ELISA 抗原	第 21 天或第 28 天之 IgG 滴度	ELISA 抗原	第 21 天或第 28 天之 IgG 滴度	選擇性
1	A-1P-VLP	750	3	A-1P	3.86E+05	A-1	< 2.72E+04	> 17.2	A-1P	5.00E+05	A-1	< 2.72E+04	> 24.4
2	A-3P-VLP	750	3	A-3P	5.00E+05	A-3	< 2.72E+04	> 24.4	A-1P	2.36E+06	A-1	< 1.58E+04	> 149
3	A-2P-VLP	750	3	A-2P	1.58E+05	A-2	1.22E+05	1.7	A-1P	1.58E+05	A-1	< 1.58E+04	> 10.0
4	A-7P-VLP	750	3	A-7P	1.11E+05	A-7	< 1.58E+04	> 7.0	A-1P	5.00E+04	A-1	< 1.58E+04	> 3.2
5	A-8P-VLP	750	3	A-8P	1.58E+05	A-8	< 1.58E+04	> 10.0	A-1P	5.00E+05	A-1	< 1.58E+04	> 31.6
6	B-1P-VLP	750	3	B-1P	3.86E+05	B-1	1.11E+05	5.4	B-1P	3.86E+05	B-1	3.86E+04	14.9
7	B-3P-VLP	750	3	B-3P	2.25E+05	B-3	< 1.58E+04	> 14.2	B-1P	2.36E+05	B-1	< 1.58E+04	> 14.9
8	B-5P-VLP	750	3	B-5P	< 2.72E+04	B-5	< 1.58E+04	1.7	B-1P	6.32E+04	B-1	< 1.58E+04	> 4.0
9	B-6P-VLP	750	3	B-6P	1.22E+05	B-6	< 1.58E+04	> 7.7	B-1P	2.72E+06	B-1	< 1.58E+04	> 172
10	C-1P-VLP	750	3	C-1P	1.22E+06	C-1	6.32E+05	4.7	C-1P	7.46E+05	C-1	6.32E+05	1.7
11	C-2P-VLP	750	2	C-2P	1.58E+05, 5.00E+05	C-2	< 1.58E+04, < 1.58E+04	> 20.8	C-1P	5.00E+04, 5.00E+05	C-1	< 1.58E+04, < 1.58E+04	> 17.4
12	C-3P-VLP	750	3	C-3P	> 1.85E+06	C-3	< 1.58E+04	> 117	C-1P	2.36E+05	C-1	< 1.58E+04	> 14.9
13	C-5P-VLP	750	3	C-5P	> 2.36E+06	C-5	< 1.58E+04	> 149	無	ND	無	ND	ND
14	C-1P-VLP	無	3	C-1P	> 2.72E+06	C-1	1.11E+05	> 47.2	C-1P	> 2.72E+06	C-1	< 1.58E+04	> 172
15	未治療	無	3	A-1P	< 1.58E+04	A-1	< 1.58E+04	1.0					
				B-1P	< 1.58E+04	B-1	< 1.58E+04	1.0					
				C-1P	< 1.58E+04	C-1	< 1.58E+04	1.0					
16	F-1P-VLP	252	6	F-1P	1.22E+05	F-1	1.58E+05	0.77	無	ND	無	ND	ND
17	A-8P-VLP	252	6	無	ND	無	ND	ND	A-1P	2.36E+06	A-1	< 5.00E+02	> 4729
18	未治療	無	6	A-1P	< 5.00E+02	A-1	< 5.00E+02	1.0					
				F-1P	< 5.00E+02	F-1	< 5.00E+02	1.0					

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於包含連接至諸如病毒樣粒子(VLP)等免疫原性載體之抗原tau肽的免疫原、免疫原性組合物及醫藥組合物，其用於治療tau相關神經病症或病狀，例如阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)及輕度認知障礙。本發明另外係關於製備該等免疫原、免疫原性組合物及醫藥組合物之方法及其於醫藥中之用途。

### 【先前技術】

阿茲海默氏症亦稱為阿茲海默氏癡呆或AD，其係一種造成記憶喪失及嚴重精神衰退之進行性神經變性病或病狀。AD係最常見之癡呆形式，佔所有癡呆的一半以上。據估計，全世界超過2600萬人遭受AD影響，預計隨著人口老齡化在2050年以前該數字會變成四倍(Brookmeyer等人，Alzheimer's & Dementia 3:186-191 (2007))。假定AD患者在診斷後平均存活8至10年且需要高層面的日常護理，除喪失生命及降低生活質量外，對社會造成的經濟成本亦非常巨大。在早期，抱怨自己略微記憶喪失及意識錯亂之患者被定性為患有輕度認知障礙(MCI)，在一些情況下其會發展成典型阿茲海默氏症症狀，導致嚴重的智力及社會能力障礙。

通常，阿茲海默氏症(AD)之特徵在於腦中神經斑及神經原纖維纏結堆積，導致神經元細胞死亡，隨後進行性認知衰退。大多數當前可用之AD療法集中於治療症狀，但不

一定終止疾病進展。因此，顯然期望獲得可識別能夠保護神經元免於AD衰弱效應之療法的新穎途徑。

大多數當前用於治療AD之治療途徑係基於廣為接受之「澱粉樣蛋白級聯假說(amyloid cascade hypothesis)」。此觀點將病理生理學作用歸因於澱粉樣蛋白- $\beta$  ( $A\beta$ )，該澱粉樣蛋白- $\beta$ 係呈單體至寡聚物形式之神經毒素(neurotoxin)及突觸毒素(synaptotoxin)、同時以聚合物形式沈積於澱粉樣蛋白斑塊中(AD病變之特徵之一)。據信對抗一系列 $A\beta$ 形式之單株抗體有效，此乃因其使血腦平衡(brain-blood equilibrium)向血液偏移，由此降低腦中的 $A\beta$ 儲量。

AD病理生理學之特徵不僅在於 $A\beta$ 沈積於老年斑中，且亦包括神經原纖維纏結(NFT)堆積。NFT係由成對螺旋纖維與高度磷酸化tau蛋白連接在一起而形成之原纖維。Tau可在多於30個不同絲胺酸及蘇胺酸殘基(Hanger等人，J. Neurochem. 71:2465-2476 (1998))以及數個酪胺酸殘基(Lebouvier等人，JAD 18: 1-9 (2009))處經多種激酶短暫磷酸化。在AD中，激酶與磷酸酶活性明顯不平衡，導致產生以NFT形式聚集及堆積之tau蛋白的高度磷酸化形式。

輕度認知障礙(MCI)最通常定義為具有可量測之記憶障礙，該記憶障礙超出了對於衰老所通常預期者，但未顯示其他癡呆或AD症狀。MCI似乎代表介於與正常衰老及早期癡呆有關之認知變化之間的過渡狀態。當主要症狀係記憶喪失時，此類型之MCI進一步細定義為遺忘型MCI。患有此亞型MCI之個體最可能以每年約10-15%之比率發展成

AD(Grundman M等人, Arch Neurol. 61, 59-66, 2004)。2005年公佈的一項大規模研究作為第一臨床試驗展示在第一年試驗期間對MCI患者進行治療可延遲過渡至AD(Petersen RC等人, NEJM 352, 2379-2388, 2005), 表明該等患者亦為治療干預對於AD切實可行之群體。

最近的研究報導, 在致病tau之纏結小鼠模型中接種對抗磷酸化tau肽之疫苗可導致腦中聚集的tau減少且改善與纏結有關之行為缺陷(Asuni等人, J. Neurosci. 27:9115-9129 (2007))。儘管高度磷酸化tau及NFT對認知喪失及AD進展之影響尚未完全瞭解, 但最近的意見表明僅靶向澱粉樣蛋白並不足以在整個病程期間看到改善, 此使得必需靶向其他或替代靶標(Oddo等人, J. Biol. Chem. 281:39413 (2006))。鑒於此, 可能需要靶向tau蛋白之疾病構象之活性疫苗途徑來產生對於AD及MCI有效之治療疫苗。

此外, 除AD及MCI外還有許多疾病亦與tau病變(tau pathology或tauopathies)有關, 其亦可能受益於特異性靶向所涉及致病形式之tau疫苗。該等疾病包括例如額顳癡呆、帕金森氏症(Parkinson's disease)、匹克氏病(Pick's disease)、進行性核上麻痺及肌萎縮側索硬化/帕金森氏症-癡呆綜合症(參見, 例如Spires-Jones等人, TINS 32:150-9 (2009))。

### 【發明內容】

本發明提供包含至少一種抗原tau肽之新穎免疫原、免疫原性組合物及醫藥組合物, 該抗原tau肽能夠誘導免疫

應答、尤其抗體應答而產生對抗呈致病的高度磷酸化狀態之自身抗原tau之抗體滴度。該等免疫原、免疫原性組合物及醫藥組合物呈現多種期望特性，例如能夠誘導免疫應答、尤其抗體應答，對與高度磷酸化tau有關之神經變性疾病(例如阿茲海默氏症及MCI)之誘導及發展具有治療效果。

在一個態樣中，本發明提供包含至少一種連接至免疫原性載體之抗原tau肽的免疫原，其中該抗原tau肽包含選自以下之磷酸-tau抗原決定基：pSer-396磷酸-tau抗原決定基、pThr-231/pSer-235磷酸-tau抗原決定基、pThr-231磷酸-tau抗原決定基、pSer-235磷酸-tau抗原決定基、pThr-212/pSer-214磷酸-tau抗原決定基、pSer-202/pThr-205磷酸-tau抗原決定基及抗原決定基。

在一個實例中，該磷酸-tau抗原決定基係pSer-396磷酸-tau抗原決定基。在又一實例中，該磷酸-tau抗原決定基係pThr-231/pSer-235磷酸-tau抗原決定基。在又一實例中，該磷酸-tau抗原決定基係pThr-231磷酸-tau抗原決定基，在又一實例中，該磷酸-tau抗原決定基係pSer-235磷酸-tau抗原決定基。在又一實例中，該磷酸-tau抗原決定基係pThr-212/pSer-214磷酸-tau抗原決定基。在又一實例中，該磷酸-tau抗原決定基係pSer-202/pThr-205磷酸-tau抗原決定基。在又一實例中，該磷酸-tau抗原決定基係pTyr 18磷酸-tau抗原決定基。

在另一態樣中，本發明提供包含至少一種連接至免疫原

性載體之抗原tau肽的免疫原，其中該抗原tau肽包含選自SEQ ID NO: 4、6-26、105及108-112之胺基酸序列。

在一個實例中，該抗原tau肽經由式 $(G)_nC$ 表示之連接體共價連接至該免疫原性載體，其中該連接體位於該肽之C端(肽 $-(G)_nC$ )或N端( $C(G)_n$ -肽)，且其中n係0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在又一實例中，該連接體位於該tau肽之N端，且其中n係1或2。在另一實例中，該連接體位於該tau肽之C端，且其中n係1或2。在又一實例中，該抗原tau肽包含選自SEQ ID NO: 4及6-13之胺基酸序列。在又一實例中，該抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 4及6-13之胺基酸序列組成。在又一實例中，該抗原tau肽由SEQ ID NO:11中所示之胺基酸序列組成。

在另一實例中，該抗原tau肽包含選自SEQ ID NO:14-19之胺基酸序列。在又一實例中，該抗原tau肽由選自SEQ ID NO:14-19之胺基酸序列組成。在又一實例中，該抗原tau肽由SEQ ID NO:16中所示之胺基酸序列組成。

在另一實例中，該抗原tau肽包含選自SEQ ID NO:20-24之胺基酸序列。在又一實例中，該抗原tau肽由選自SEQ ID NO:20-24之胺基酸序列組成。在又一實例中，該抗原tau肽由SEQ ID NO:21中所示之胺基酸序列組成。

在另一實例中，該抗原tau肽包含選自SEQ ID NO: 105及108-112之胺基酸序列。在又一實例中，該抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 105及108-112之胺基酸序列組成。在又一實例中，該抗原tau肽由SEQ ID NO:105中所示之胺基酸序

列組成。

在一個態樣中，本發明提供任一本文所述免疫原，其中該免疫原性載體係血藍蛋白(例如KLH)、血清白蛋白、球蛋白、提取自蛔蟲之蛋白質或失活細菌毒素。

在一個態樣中，本發明提供任一本文所述免疫原，其中該免疫原性載體係選自由HBcAg VLP、HBsAg VLP及Qbeta VLP組成之群的病毒樣粒子。在一個實例中，本發明提供包含至少兩種本文所述免疫原之組合物。在又一實例中，該組合物包含至少三種本文所述免疫原。

在一個實例中，本發明提供包含至少兩種本文所述免疫原之組合物，其中：

a)第一免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 4及6-13之胺基酸序列組成；且

b)第二免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 14-19之胺基酸序列組成。

在另一實例中，本發明提供包含至少兩種本文所述免疫原之組合物，其中：

a)第一免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 4及6-13之胺基酸序列組成；且

b)第二免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 20-24之胺基酸序列組成。

在另一實例中，本發明提供包含至少兩種本文所述免疫原之組合物，其中：

a)第一免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 14-19之胺

基酸序列組成；且

b)第二免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 20-24之胺基酸序列組成。

在又一實例中，本發明提供包含至少兩種本文所述免疫原之組合物，其中：

a)第一免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 4及6-13之胺基酸序列組成；且

b)第二免疫原之抗原tau肽選自SEQ ID NO: 105及108-112。

在又一實例中，本發明提供包含至少兩種本文所述免疫原之組合物，其中：

a)第一免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 14-19之胺基酸序列組成；且

b)第二免疫原之抗原tau肽選自SEQ ID NO: 105及108-112。

在又一實例中，本發明提供包含至少兩種本文所述免疫原之組合物，其中：

a)第一免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 20-24之胺基酸序列組成；且

b)第二免疫原之抗原tau肽選自SEQ ID NO: 105及108-112。

在另一實例中，本發明提供包含本文所述四種免疫原中之至少三種免疫原的組合物，其中：

a)第一免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 4及6-13之

胺基酸序列組成；

b) 第二免疫原之抗原 tau 肽由選自 SEQ ID NO: 14-19 之胺基酸序列組成；且

c) 第三免疫原之抗原 tau 肽由選自 SEQ ID NO: 20-24 之胺基酸序列組成；

d) 第四免疫原之抗原 tau 肽選自 SEQ ID NO: 105 及 108-112。

在又一實例中，本發明提供任一本文所述組合物，其中該等抗原 tau 肽中之每一者獨立地經由式  $(G)_n C$  表示之連接體共價連接至該免疫原性載體，其中該等連接體中之每一者獨立地位於該 tau 肽之 C 端 (肽  $-(G)_n C$ ) 或 N 端 ( $C(G)_n$ -肽)，且其中各  $n$  獨立地為 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在又一實例中，本發明提供任一本文所述組合物，其中該等連接體中之每一者位於該 tau 肽之 N 端且其中各  $n$  獨立地為 1 或 2。

在另一態樣中，本發明提供包含四種免疫原中之至少三種免疫原的組合物，其中：

a) 第一免疫原包含至少一種連接至 Qbeta VLP 之抗原 tau 肽，其中該抗原 tau 肽由 SEQ ID NO: 11 組成，且其中該肽經由式  $(G)_n C$  表示之連接體共價連接至該 VLP，其中該連接體位於該 tau 肽之 C 端 (肽  $-(G)_n C$ ) 或 N 端 ( $C(G)_n$ -肽)，且其中  $n$  係 1 或 2；

b) 第二免疫原包含至少一種連接至 Qbeta VLP 之抗原 tau 肽，其中該抗原 tau 肽由 SEQ ID NO: 16 組成，且其中 said 肽

經由式 $(G)_nC$ 表示之連接體共價連接至該VLP，其中該連接體位於該tau肽之C端(肽 $-(G)_nC$ )或N端( $C(G)_n$ -肽)，且其中n係1或2；且

c)第三免疫原包含至少一種連接至Qbeta VLP之抗原tau肽，其中該抗原tau肽由SEQ ID NO:21組成，且其中該肽經由式 $(G)_nC$ 表示之連接體共價連接至該VLP，其中該連接體位於該tau肽之C端(肽 $-(G)_nC$ )或N端( $C(G)_n$ -肽)，且其中n係1或2；

d)第四免疫原包含至少一種連接至Qbeta VLP之抗原tau肽，其中該抗原tau肽由SEQ ID NO:105組成，且其中該肽經由式 $(G)_nC$ 表示之連接體共價連接至該VLP，其中該連接體位於該tau肽之C端(肽 $-(G)_nC$ )或N端( $C(G)_n$ -肽)，且其中n係1或2。

在一個實例中，第一、第二及第三免疫原之該等連接體中之每一者位於該等抗原tau肽中之每一者的N端，且其中對於該等連接體中之每一者，n係2。

在另一態樣中，本發明提供包含任一本文所述免疫原或組合物之組合物，其進一步包含至少一種選自明礬、含CpG寡核苷酸及基於皂苷之佐劑的佐劑。

在又一態樣中，本發明提供包含任一本文所述免疫原或組合物、及醫藥上可接受之賦形劑的醫藥組合物。在一個實例中，至少一種佐劑係選自CpG 7909 (SEQ ID NO: 27)、CpG 10103 (SEQ ID NO:28)及CpG 24555 (SEQ ID NO: 29)之含CpG寡核苷酸。

在又一態樣中，本發明提供包含任一本文所述免疫原或組合物、及醫藥上可接受之賦形劑的醫藥組合物。

在另一態樣中，本發明提供一種免疫方法，其包含向哺乳動物投予任一本文所述免疫原、組合物或醫藥組合物。例如，在一個態樣中，該投予係藉由使用醫藥有效劑量之任一本文所述免疫原、組合物或醫藥組合物來實施。

在另一態樣中，本發明提供治療哺乳動物tau相關神經病症之方法，其包含向該哺乳動物投予治療有效量之任一本文所述免疫原、免疫原性組合物或醫藥組合物。

在一個態樣中，該投予係藉由使用醫藥有效劑量之任一本文所述免疫原、組合物或醫藥組合物來實施。

在另一態樣中，本發明提供治療哺乳動物tau相關神經病症之方法，其包含向該哺乳動物投予：a) 醫藥有效劑量之任一本文所述免疫原、免疫原性組合物或醫藥組合物；及b) 醫藥有效劑量之至少一種佐劑。在一個實例中，該至少一種佐劑選自明礬、含CpG寡核苷酸及基於皂苷之佐劑。在又一實例中，該至少一種佐劑係選自CpG 7909 (SEQ ID NO: 27)、CpG 10103 (SEQ ID NO:28)及CpG 24555 (SEQ ID NO: 29)之含CpG寡核苷酸。

在又一實例中，該神經病症係阿茲海默氏症。在另一實例中，該神經病症被診斷為輕度認知障礙。在另一實例中，該神經病症被診斷為遺忘型MCI。

在另一實例中，本發明提供任一本文所述免疫原、組合物或醫藥組合物用於製造藥劑之用途。例如，在一個態樣

中，該等藥劑可用於治療哺乳動物tau相關神經病症。在一個實例中，該神經病症係阿茲海默氏症。在另一實例中，該神經病症被診斷為輕度認知障礙(MCI)。在另一實例中，該神經病症被診斷為遺忘型MCI。

在又一態樣中，本發明提供因應任一本文所述免疫方法而產生之分離抗體，其中該抗體特異性結合高度磷酸化形式之人類tau。

在又一態樣中，本發明提供治療哺乳動物tau相關神經病症之方法，其包含向該哺乳動物投予特異性結合高度磷酸化形式之人類tau的抗體，且其中該抗體因應任一本文所述免疫方法而產生。

在又一態樣中，本發明提供任一本文所述抗體用以製造用於治療哺乳動物tau相關神經病症之藥劑的用途。在一個實例中，該神經病症係阿茲海默氏症。在另一實例中，該神經病症被診斷為輕度認知障礙(MCI)。在另一實例中，該神經病症被診斷為遺忘型MCI。

在又一態樣中，本發明提供一種分離肽，其由選自SEQ ID NO: 4、6至26、31至76及105至122之胺基酸序列組成或基本上由該等胺基酸序列組成。在又一態樣中，本發明提供編碼該等分離肽中之任一者的分離核酸。在又一態樣中，本發明提供包含該等核酸中之任一者的表現載體。在又一態樣中，本發明提供包含該等表現載體中之任一者的宿主細胞。

## 【實施方式】

### 定義及通用技術

除非本文另有定義，否則結合本發明使用之科學及技術術語將具有彼等熟習此項技術者所通常瞭解之含義。通常，結合以下使用之命名及關於以下之技術已為業內所熟知且在業內常用：本文所述之細胞及組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學及蛋白質與核酸化學、雜交、分析化學、合成有機化學、及醫學與醫藥化學。

除非另有說明，否則本發明方法及技術通常按照熟習此項技術者所熟知之習用方法且如整篇本說明書中所引用及論述之各個概括及更具體參考文獻中所述來實施。參見，例如，Sambrook J. & Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第3版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)；Ausubel等人，*Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons公司(2002)；Harlow及Lane，*Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998)；及Coligan等人，*Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons公司(2003)。酶促反應及純化技術係按照製造商說明書、按照業內習用方法或如本文所述實施。

本文所用之術語「輕度認知障礙(MCI)」係指一種記憶及認知障礙等級，其通常特徵在於臨床癡呆評定量表

(clinical dementia rating) (CDR)為0.5(參見，例如 Hughes 等人，Brit. J. Psychiat. 140: 566-572, 1982)，且其另外特徵在於記憶障礙，但其他認知領域之功能未出現障礙。記憶障礙較佳使用諸如「段落測試(paragraph test)」等測試來量測。診斷為輕度認知障礙之患者通常呈現受損且延遲之回憶表現。輕度認知障礙通常與衰老有關，且通常發生於45週歲或更大年齡之患者。

本文所用之術語「癡呆」在其最廣泛意義上係指一種精神病狀，如美國精神病學學會(American Psychiatric Association)：Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders，第4版，Washington, D. C., 1994(「DSM-IV」)中所定義。DSM-IV將「癡呆」定義為特徵在於包括記憶障礙在內之多種認知缺陷，且按照推測的病因列出各種癡呆。DSM-IV闡述通常可接受之用於癡呆及相關精神障礙之診斷、分級及治療的標準。

術語「Tau」或「tau蛋白」係指與神經細胞中微管之穩定化有關之tau蛋白及寬廣範圍之tau聚集體(例如，神經原纖維纏結)的組份。具體而言，本文所用之術語「tau蛋白」涵蓋任何多肽，該多肽包含SEQ ID NO: 30之人類tau、或經修飾或未經修飾之其他人類同種型、或來自任何其他動物之對應直向同源物(ortholog)或由此等組成。本文所用之術語「tau蛋白」進一步涵蓋轉譯後修飾，包括但不限於對如上文所定義tau蛋白之糖基化、乙醯化及磷酸化。

術語「Tau病變」係指tau相關病症或病狀，例如，阿茲海默氏症、進行性核上麻痺(PSP)、皮質基底節變性(CBD)、匹克氏病、與染色體17有關之額顳癡呆與帕金森氏症(FTDP-17)、帕金森氏症、中風、外傷性腦損傷、輕度認知障礙及諸如此類。

術語「抗原」與「免疫原」在本文中意欲可交換使用，其係指由MHC分子呈遞之能夠與抗體、B細胞受體(BCR)或T細胞受體(TCR)結合之分子。本文所用之術語「抗原」及「免疫原」亦涵蓋T細胞抗原決定基。另外，抗原能夠被免疫系統識別及/或能夠誘導體液免疫應答及/或細胞免疫應答，導致B-淋巴細胞及/或T-淋巴細胞激活。然而，至少在某些情形下，此可能需要抗原含有或連接至T輔助細胞抗原決定基且提供抗原一種佐劑。抗原可具有一或多種抗原決定基(例如，B-抗原決定基及T-抗原決定基)。上文提及之特異性反應意欲表明，抗原較佳與其對應抗體或TCR反應(通常以高度選擇性方式)，且不與可能由其他抗原誘發之大量其他抗體或TCR反應。本文所用之抗原亦可為數種單個抗原之混合物。術語「抗原」及「免疫原」均涵蓋(但不限於)多肽。

術語「抗原位點」與術語「抗原抗原決定基」在本文中可互換使用，其係指多肽之可被抗體或T細胞受體(在MHC分子的情況下)免疫特異性地結合的連續或不連續部分。免疫特異性結合排除非特異性結合，但不一定排除交叉反應性。抗原位點通常在為該抗原位點所特有之空間構象中

包含5至10個胺基酸。

就胺基酸殘基而言，本文所用之術語「磷酸化」係指在原本通常存在羥基之殘基側鏈上存在磷酸酯基團。該磷酸化通常以羥基之氫原子被磷酸酯基團(-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)取代之形式發生。彼等熟習此項技術者認識到，端視局部環境之pH，此磷酸酯基團可以不帶電荷的中性基團(-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)、或帶一個負電荷(-PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>)、或帶兩個負電荷(-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>)之形式存在。通常可被磷酸化之胺基酸殘基包括絲胺酸、蘇胺酸及酪胺酸側鏈。在通篇本發明中，磷酸化之胺基酸殘基以粗體表示且標以下劃線。

如本文所用，以單字母或三字母代碼來表示提及的胺基酸殘基(參見，例如 Lehninger, Biochemistry, 第2版, Worth Publishers, New York, 1975, 第72頁)。

冠詞「一」(a及an)在本文中用以指一個或一個以上(即指至少一個)的該冠詞之文法受詞。例如，「一元件」意指一個元件或一個以上的元件。此外，除非上下文另有需要，否則單數形式應包括複數，且複數形式應包括單數，除非本文另外明確說明。

術語「肽」或「多肽」係指胺基酸之聚合物且不考慮聚合物之長度；因此，蛋白質片段、寡肽及蛋白質均包括於肽或多肽之定義內。此術語亦未指定或排除多肽之表現後修飾，例如，術語多肽明確地涵蓋包括糖基、乙醯基、磷酸酯基團、脂質基團及諸如此類之共價附接的多肽。此定義亦包括含有一或多種胺基酸類似物(包括，例如，非天

然存在之胺基酸、僅天然存在於不相關生物系統中之胺基酸、來自哺乳動物系統之經修飾胺基酸等)之多肽、具有經取代鍵以及熟習此項技術者習知之其他修飾(包括天然存在及非天然存在者)之多肽。

本文所用之術語「tau片段」涵蓋包含本文所定義tau蛋白之至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30個鄰接胺基酸或由其組成之任何多肽。

本文所用之術語「pSer-396磷酸-tau抗原決定基」係指包含胺基酸序列KSP(即人類tau序列之Lys-395 Ser-396 Pro-397)之肽，其中絲胺酸殘基經磷酸化，且其中序列編號係基於SEQ ID NO:30提供之人類tau同種型2。pSer-396磷酸-tau抗原決定基之長度通常為約3個至約25個胺基酸。

本文所用之術語「pThr-231/pSer-235磷酸-tau抗原決定基」係指包含胺基酸序列TPPKS (SEQ ID NO:1)(即人類tau序列之Thr-231 Pro-232 Pro-233 Lys-234 Ser-235)之肽，其中蘇胺酸及絲胺酸殘基各自經磷酸化，且其中序列編號係基於SEQ ID NO:30提供之人類tau同種型2。該等抗原決定基之長度通常為約5個至約25個胺基酸。該pThr-231/pSer-235磷酸-tau抗原決定基亦可指該抗原決定基之包含磷酸化Thr-231殘基但不包括磷酸化Ser-235殘基或包含磷酸化Ser-235殘基但不包括磷酸化Thr-231抗原決定基之形式。該抗原決定基之該等形式的長度通常為約3個至約20個胺基酸。

本文所用之術語「pThr-212/pSer-214磷酸-tau抗原決定基」係指包含胺基酸序列 TPS(即人類 tau 序列之 Thr-212 Pro-213 Ser-214)之肽，其中蘇胺酸及絲胺酸殘基各自經磷酸化，且其中序列編號係基於 SEQ ID NO:30 提供之人類 tau 同種型 2。pThr-212/pSer-214 磷酸-tau 抗原決定基之長度通常為約 3 個至約 25 個胺基酸。

本文所用之術語「pSer-202/pThr-205磷酸-tau抗原決定基」係指包含胺基酸序列 SPGT (SEQ ID NO:3)(即人類 tau 序列之 Ser-202 Pro-203 Gly-204 Thr-205)之肽，其中絲胺酸及蘇胺酸殘基各自經磷酸化，且其中序列編號係基於 SEQ ID NO:30 提供之人類 tau 同種型 2。pSer-202/pThr-205 磷酸-tau 抗原決定基之長度通常為約 4 個至約 25 個胺基酸。

本文所用之術語「純化」及「分離」係同義詞。例如，就多肽而言，術語「分離」或「純化」根據起源或衍生源係指如下多肽：(1)不與在其天然狀態下伴隨其之天然結合組份相結合；(2)基本上不含來自相同物種之其他蛋白質；(3)由來自不同物種之細胞表現；或(4)在天然狀態下不存在。因此，經化學合成或在不同於多肽天然起源之細胞的細胞系統中合成之多肽係與其天然結合組份「分離」的。亦可使用熟習此項技術者所熟知之蛋白質純化技術藉由分離使多肽基本上不含天然結合組份。當至少約 60% 至 75% 之試樣呈現單一種類之多肽時，多肽係「基本上純淨」、「基本上均質」或「基本上純化」。多肽可以為單體或聚合物。基本上純淨之多肽通常可佔蛋白質試樣的約 50%、

60%、70%、80%或90% w/w，更通常約95%，且較佳地可為99%以上純淨。蛋白質純度或均質性可由業內熟知的多種方式來展現，例如實施蛋白質試樣之聚丙烯醯胺凝膠電泳，隨後在用業內熟知染色劑染色凝膠後目測單個多肽條帶。出於某些目的，可藉由使用HPLC或業內熟知的其他方式進行純化來提供更高之分辨率。

本文所用之術語tau相關神經病症意指據信tau(尤其tau之高度磷酸化形式)起作用之任何疾病或其他病狀。該等病症、疾病及/或病狀通常與存在神經原纖維纏結(通常涉及tau之高度磷酸化形式)有關，且包括(但不限於)阿茲海默氏症、MCI、額顳癡呆、匹克氏病、進行性核上麻痺、皮質基底節變性、關島型帕金森氏症-癡呆綜合症及其他tau病變。

本文所用之術語「抗原tau肽」涵蓋所有tau衍生多肽，例如來自哺乳動物物種，例如來自人類，以及其呈現「抗原tau肽生物活性」之變體、類似物、直向同源物、同源物及衍生物、及其片段。例如，術語「抗原tau肽」係指包含選自SEQ ID NO: 1至26、31至76、及105-122之胺基酸序列、由該等胺基酸序列組成或基本上由該等胺基酸序列組成之多肽、以及其呈現基本上相同生物活性之變體、同源物及衍生物。

本文所用之術語「抗原tau肽生物活性」係指本發明抗原tau肽在個體中誘導具有拮抗性質之自身tau抗體的能力，該等自身抗體能夠降低高度磷酸化之致病形式的tau

的含量，同時基本上不能夠結合正常的非高度磷酸化、非致病形式的tau。此外，可對具有抗原tau肽生物活性之抗原tau肽進行設計以使投予至患者後tau特異性T細胞應答降低至最低程度。彼等熟習此項技術者應明瞭可使用何種技術來證實特定構建體是否在本發明範圍內。該等技術包括(但不限於)本發明實例部分中所述之技術以及以下技術。可對具有推定抗原tau肽生物活性之肽進行分析以確定該肽之免疫原性(例如，確定由推定肽產生之抗血清是否結合高度磷酸化形式之tau，而基本上不結合非高度磷酸化、非致病形式的tau)。此外，可對具有推定抗原tau肽生物活性之肽進行分析以確定該肽是否實質上誘導tau特異性T細胞調介之應答。

本文所用之術語「高度磷酸化」或「異常磷酸化」係指每個tau分子含有至少約7個(即約7個或更多個)磷酸酯基團之tau(參見，例如Kopke等人，*J. Biol Chem* 268:24374-84 (1993))。高度磷酸化tau係發現於AD患者中之神經原纖維纏結(NFT)及成對螺旋纖維(PHF)之主要組份，且高度磷酸化係造成tau之正常生物活性喪失及自聚集之原因。一些tau殘基通常僅在其致病的高度磷酸化形式(例如PHF及NFT)中發現被磷酸化。該等殘基包括Ser-202、Thr-205、Thr-212、Ser-214、Thr-231、Ser-235、Ser-396及/或Ser-404、Tyr-18。因此，在通常不參與tau與微管之結合的多個位點上、尤其在tau之微管結合區域兩側之脯胺酸富集區域中發現之位點上磷酸化且包含PHF及NFT之主要組份

的tau蛋白亦包括於術語高度磷酸化tau或異常磷酸化tau之範圍內。

#### 抗原tau肽

人類tau蛋白係微管相關蛋白，其中樞神經系統之神經元中相對富集，但在其他區域中並不常見。在腦組織中，作為tau基因之外顯子2、3及10選擇性剪接之結果，tau以六種不同同種型存在。對於本發明之所有tau肽，人類tau同種型2 (SEQ ID NO:30)在本文中用作胺基酸編號之參考。Tau通常與微管蛋白相互作用以穩定微管並促進微管蛋白組裝成微管，以及提供蛋白質之軸突運輸。Tau係由發育調控之磷蛋白，在成人腦中在正常狀態下通常每個分子含有2個至3個磷酸酯基團。然而，tau可在多於30個不同殘基處、主要在Ser/Thr-Pro基序處經不同激酶短暫磷酸化(Hanger等人，J. Neurochem. 71:2465-2476 (1998))。

本發明之抗原tau肽通常具有較小大小，由此其模擬發現致病形式之tau中之抗原決定基的選自整個tau蛋白之區域。如先前所述，該等致病形式之tau通常特徵在於tau蛋白內某些胺基酸處經磷酸化。因此，本發明之抗原tau肽之長度通常小於100個胺基酸，例如小於75個胺基酸，例如小於50個胺基酸。本發明之抗原tau肽之長度通常為約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或約30個胺基酸。序列表中提供之本發明抗原tau肽之具體實例包括長度介於4個至31個胺基酸範圍內之肽。彼等

熟習此項技術者應明瞭，該等抗原肽通常具有游離N端，且可具有羧基化或醯胺化之C端。

本發明之抗原肽包含衍生自高度磷酸化或致病形式之人類tau之一部分的胺基酸序列。具體而言，該等抗原tau肽通常包含特異性磷酸-tau抗原決定基，其在文獻中可參考結合該等抗原決定基之抗體提及(例如PHF1、TG3、AT8及/或AT100；參見，例如Hanger等人，*J. Biol. Chem.* 282(32):23645-23654 (2007)；Pennanen等人，*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 337:1097-1101 (2005)；Porzig等人，*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 358:644-649 (2007))。

本發明已識別出人類tau蛋白之特異性抗原區，當單獨或彼此組合使用時其可有利地用於引發對抗致病形式之高度磷酸化tau的免疫應答。例如，pSer-396磷酸-tau抗原決定基通常係包括磷酸化絲胺酸殘基Ser-396之人類tau片段。該等片段之長度通常為約3個至約20個胺基酸(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個)，且在Ser-396之N端及C端側包括至少一個來自天然人類tau序列之胺基酸。例如，pSer-396磷酸-tau抗原決定基通常包含如SEQ ID NO:30中所示人類tau序列之殘基395、396及397(即Lys-395 Ser-396 Pro-397，其中Ser-396經磷酸化)。該等pSer-396抗原決定基亦可進一步包含天然人類序列之磷酸化絲胺酸殘基Ser-404。包含pSer-396磷酸-tau抗原決定基之tau肽的實例以SEQ ID NO:4及6-13提供。

此外，例如，pThr-231/pSer-235磷酸-tau抗原決定基通常係包括磷酸化蘇胺酸殘基 Thr-231及磷酸化絲胺酸殘基 Ser-235二者之人類 tau 片段。或者，pThr-231/pSer-235磷酸-tau抗原決定基僅包括 Thr-231或 Ser-235之一。該等抗原決定基之長度通常為約3個至約20個胺基酸(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個)，且在 Thr-231之N端側包括至少一個來自天然人類 tau 序列之胺基酸(即 Arg-230)及/或在 Ser-235之C端側包括至少一個胺基酸(即 Pro-236)。包含 pThr-231/pSer-235抗原決定基之 tau 肽的實例以 SEQ ID NO: 14-19提供。

此外，例如，pThr-212/pSer-214磷酸-tau抗原決定基通常係包括磷酸化蘇胺酸殘基 Thr-212及磷酸化絲胺酸殘基 Ser-214之人類 tau 片段。該等抗原決定基之長度通常為約3個至約20個胺基酸(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個)，且在 Thr-212之N端側包括至少一個來自天然人類 tau 序列之胺基酸(即 Arg-211)及在 Ser-214之C端側包括至少一個胺基酸(即 Leu-215)。包含 pThr-212/pSer-214抗原決定基之 tau 肽的實例以 SEQ ID NO: 20-24提供。

此外，例如，pSer-202/pThr-205磷酸-tau抗原決定基通常係包括磷酸化絲胺酸殘基 Ser-202及磷酸化蘇胺酸殘基 Thr-205之人類 tau 片段。該等抗原決定基之長度通常為約6個至約20個胺基酸(例如6、7、8、9、10、11、12、13、

14、15、16、17、18、19或20個)，且在Ser-202之N端側通常包括至少一個來自天然人類tau序列之胺基酸(即Gly-201)及在Thr-205之C端側包括至少一個胺基酸(即Pro-206)。包含pSer-202/pThr-205抗原決定基之tau肽的實例以SEQ ID NO: 25提供。

此外，例如，pTyr-18磷酸-tau抗原決定基通常係包括磷酸化酪胺酸殘基Tyr-18之人類tau片段。該等抗原決定基之長度通常為約6個至約20個胺基酸(例如6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個)，且在Tyr-18之N端側通常包括至少一個來自天然人類tau序列之胺基酸(即Thr-17)及在Tyr-18之C端側包括至少一個胺基酸(即Gly-19)。包含pTyr-18抗原決定基之tau肽的實例以SEQ ID NO:112提供。

本發明之抗原tau肽亦可包括包含上文所述磷酸-tau抗原決定基之tau肽，包括少數胺基酸已經取代、添加或缺失但基本上仍保留相同免疫特性之肽。另外，該等衍生的抗原tau肽可進一步經胺基酸修飾，尤其在N端及C端末端，以使抗原tau肽構象受限及/或使抗原tau肽與免疫原性載體在實施適當化學處理後偶合。

本發明之抗原tau肽亦涵蓋衍生自胺基酸已經缺失、插入或取代但其免疫特性基本上未減弱之tau之胺基酸序列的功能活性變體肽，即該等功能變體肽保留實質的抗原tau肽生物活性。通常，該等功能變體肽與SEQ ID NO: 1至26、31至76及105-122中之任一者中所述的胺基酸序列具

有胺基酸序列同源性，較佳高度同源性。

在一個態樣中，該等功能活性變體肽呈現與選自由SEQ ID NO: 1至26、31至76及105-122組成之群之胺基酸序列至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的一致性。

多肽之胺基酸序列一致性可使用諸如Bestfit、FASTA或BLAST等習知電腦程式以習用方式來確定(參見，例如Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Altschul等人, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul等人, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997))。當使用Bestfit或任何其他序列比對程式來確定特定序列是否與參考胺基酸序列(例如)95%一致時，可設置參數以在參考胺基酸序列之全長範圍內計算一致性百分比，且容許引入佔參考序列中之全部胺基酸殘基高達5%之同源性空位(gap)。此上文提及之確定多肽間之一致性百分比的方法可適用於本文所揭示之所有蛋白質、其片段或變體。

功能活性變體包含天然存在之功能活性變體，例如等位基因變體及種類變體(species variant)；以及可藉由例如誘變技術或藉由直接合成來製備的非天然存在之功能活性變體。

功能活性變體與SEQ ID NO: 1至26及31至76中所示之任一種肽相差約例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸殘基，但仍保留抗原tau生物活性。當此比較需要比

對時，可針對最大同源性對序列進行比對。變化位點可位於肽中的任何地方，只要生物活性與SEQ ID NO: 1至26、31至76及105-122中所示之任一種肽基本上類似即可。

關於如何實施表型沉默胺基酸取代之指導提供於Bowie等人，*Science*, 247: 1306-1310 (1990)中，該文獻教示主要有兩種策略用於研究胺基酸序列對變化之耐受性。

第一種策略利用進化過程期間自然選擇之胺基酸取代耐受性。藉由比較不同物種中之胺基酸序列，可識別在各物種間保守之胺基酸位置。該等保守胺基酸對於蛋白質功能可能非常重要。相比之下，自然選擇耐受之取代所處之胺基酸位置表示對於蛋白質功能並不重要的位置。因此，可對耐受胺基酸取代之位置進行修飾，同時仍保留經修飾肽之特定免疫原性活性。

第二種策略利用基因工程在選殖基因之特定位置上引入胺基酸變化以識別對於蛋白質功能極為重要之區域。例如，可利用定點誘變或丙胺酸掃描誘變(Cunningham等人，*Science*, 244: 1081-1085 (1989))。隨後可針對特定抗原tau生物活性對所得變體肽進行測試。

按照Bowie等人，該兩種策略揭示蛋白質對於胺基酸取代令人驚奇地耐受。作者進一步指出在蛋白質中之某些胺基酸位置上何種胺基酸變化可能係許可的。例如，最隱匿或最內部(在蛋白質之三級結構中)的胺基酸殘基需要非極性側鏈，然而很少表面或外部側鏈特徵通常係保守的。

向蛋白質之胺基酸中引入突變之方法已為熟習此項技術

者所熟知(參見, 例如, Ausubel(編輯), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons公司(1994); T. Maniatis, E. F. Fritsch及J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989))。

亦可使用諸如「QuikChange™定點誘變套組」(Stratagene)等市售套組來引入突變。熟習此項技術者能夠藉由替代不顯著影響抗原tau肽之功能的胺基酸來製備該抗原tau肽的功能活性變體。保守胺基酸取代係可在本發明肽之一中實施的一種胺基酸取代。「保守胺基酸取代」係其中一胺基酸殘基由另一具有有著相似化學特性(例如, 電荷或疏水性)之側鏈R基團的胺基酸殘基所取代之取代。通常, 保守胺基酸取代不會實質改變蛋白質之功能特性。在其中兩個或更多個胺基酸序列因保守取代而彼此不同之情形下, 可上調百分比序列一致性或相似度以校正取代之保守性質。用於進行此調整之方法已為熟習此項技術者所熟知(參見例如, Pearson, Methods Mol. Biol. 243:307-31 (1994))。

具有有著相似化學特性之側鏈的各組胺基酸之實例包括: 1)脂肪族側鏈: 甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸; 2)脂肪族羥基側鏈: 絲胺酸及蘇胺酸; 3)含醯胺側鏈: 天冬醯胺及麩醯胺酸; 4)芳香族側鏈: 苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸; 5)鹼性側鏈: 離胺酸、精胺酸及組胺酸; 6)酸性側鏈: 天冬胺酸及麩胺酸; 以及7)含硫側

鏈：半胱胺酸及甲硫胺酸。較佳之保守胺基酸取代基團係：纈胺酸-白胺酸-異白胺酸、苯丙胺酸-酪胺酸、離胺酸-精胺酸、丙胺酸-纈胺酸、麩胺酸-天冬胺酸及天冬醯胺-麩醯胺酸。

或者，保守替代係在 Gonnet 等人，Science 256:1443-45 (1992) 中揭示之 PAM250 對數相似度矩陣中具有正值之任何改變。「中度保守」替代係在 PAM250 對數相似度矩陣中具有非負值之任何改變。

功能活性變體肽亦可使用雜交技術進行分離。簡言之，使用與編碼目標肽、多肽或蛋白質(例如 SEQ ID NO: 1 至 26、31 至 76 及 105-122)之完整或部份核酸序列具有高度同源之 DNA 來製備功能活性肽。因此，本發明之抗原 tau 肽亦包括與 SEQ ID NO: 1 至 26 及 31 至 76 中之任一者具同等功能且可由與編碼 SEQ ID NO: 1 至 26、31 至 76 及 105-122 中之任一者之核酸雜交之核酸分子編碼的肽、或其補體。熟習此項技術者可使用容易獲得之密碼子列表很容易即可決定編碼本文所揭示肽之核酸序列。因此，本文中並未提供該等核酸序列。

編碼功能活性變體之肽、多肽或蛋白質之核酸的雜交嚴格性係例如 10% 甲醯胺、5×SSPE、1×Denhart 溶液及 1×鮭魚精子 DNA(低度嚴格條件)。更佳條件係 25% 甲醯胺、5×SSPE、1×Denhart 溶液及 1×鮭魚精子 DNA(中度嚴格條件)，且甚至更佳之條件係 50% 甲醯胺、5×SSPE、1×Denhart 溶液及 1×鮭魚精子 DNA(高度嚴格條件)。然而，

除上述甲醯胺濃度外，數種因素會影響雜交嚴格性，且熟習此項技術者可適當地選擇該等因素以達成類似的嚴格性。

編碼功能活性變體之核酸分子亦可使用編碼目標肽、多肽或蛋白質之核酸分子DNA的一部分(例如SEQ ID NO: 1至26、31至76及105-122中所示肽中之任一者)作為探針，藉由基因擴增方法(例如PCR)分離。

#### 肽/蛋白質之製備

本發明多肽可衍生自天然來源及自哺乳動物分離得到，該哺乳動物係(例如)人類、靈長類動物、貓、狗、馬、小鼠或大鼠。因此，本發明多肽可使用標準蛋白質純化技術自細胞或組織來源分離得到。

或者，多肽可由化學方式合成或使用重組DNA技術製備。例如，本發明多肽(例如tau片段)可藉由熟習此項技術者所熟知之固相程序合成。可使用「T-boc」或「F-moc」程序來適當地合成。環肽可使用熟知的「F-moc」程序及聚醯胺樹脂在全自動設備中藉由固相方法來合成。或者，彼等熟習此項技術者應了解手動實施此過程所需要的實驗室程序。固相合成之技術及程序闡述於**Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**，E. Atherton及R. C. Sheppard，由IRL在Oxford University Press出版(1989)；以及**Methods in Molecular Biology**，第35卷：肽合成方案(M. W. Pennington及B. M. Dunn編輯)，第7章，第91-171頁，D. Andreau等人著。

或者，可使用熟習此項技術者所熟知之技術將編碼本發明多肽之聚核苷酸引入至可在適宜表現系統中表現之表現載體中，隨後分離或純化所表現之目標多肽。業內可得到各種細菌、酵母、植物、哺乳動物及昆蟲表現系統，且可使用該表現系統中之任一者。視情況，可在無細胞轉譯系統中轉譯編碼本發明多肽之聚核苷酸。

本發明之抗原tau肽亦可包含由於存在多種基因、選擇性轉錄事件、選擇性RNA剪接事件及選擇性轉譯及轉譯後事件而產生者。多肽可在以下系統中表現：獲得的轉譯後修飾與在天然細胞中表現多肽時所存在者基本上相同的系統，例如培養的細胞；或導致在天然細胞中表現時存在之轉譯後修飾(例如糖基化或裂解)改變或刪除之系統。

本發明多肽(例如抗原tau多肽)可以含有其他非tau或非tau衍生胺基酸序列之融合蛋白形式來製備，該等其他非tau或非tau衍生胺基酸序列係例如本文所述之胺基酸連接體或信號序列或免疫原性載體、以及可用於蛋白質純化之配體，例如麩胱甘肽-S-轉移酶、組胺酸標籤及葡萄球菌蛋白質A。融合蛋白中可存在不止一種本發明抗原tau多肽。例如，可將異源多肽融合至本發明多肽之N端或C端。本發明多肽亦可以包含同源胺基酸序列(即，其他tau或tau衍生序列)之融合多肽形式來製備。

#### 受限肽

本發明之抗原tau肽可為線性肽或構象受限肽。如本文所用，就分子而言，術語「構象受限」意指隨時間流逝分

子(例如多肽)之三維結構基本上保持一種空間排列。構象受限分子可具有改良特性，例如增強之親和性、免疫原性、代謝穩定性、膜通透性或溶解性。另外，預期該等構象受限分子會以與天然構象類似之構象提供抗原tau抗原決定基，由此誘導更易識別自身tau分子之抗-tau抗體。構象限制方法已為熟習此項技術者所熟知，且包括(但不限於)橋連及環化。

先前技術中已知數種向線性肽或多肽鏈中引入構象限制之途徑。例如，使肽中之兩個鄰近胺基酸橋連產生局部構象修飾，與規則肽之撓性相比，其撓性有限。形成該等橋鍵之一些可能方式包括納入內醯胺及六氫吡嗪酮(參見，例如 Giannis及 Kolter，*Angew. Chem. Int. Ed.*, 32:1244 (1993))。

如本文所用，就肽而言，術語「環狀」係指在兩個非毗鄰胺基酸或胺基酸類似物之間包括分子內鍵之結構。環化可通過共價或非共價鍵來達成。分子內鍵包括(但不限於)骨架與骨架、側鏈與骨架、側鏈與側鏈、側鏈與端基、及端部與端部之間的鍵。環化方法包括(但不限於)在非毗鄰胺基酸或胺基酸類似物之側鏈之間形成二硫鍵；在Lys與Asp/Glu殘基側鏈之間形成醯胺鍵；在絲胺酸殘基與Asp/Glu殘基之間形成酯鍵；形成內醯胺鍵，例如，在一種胺基酸或其類似物之側鏈基團與胺基末端殘基之N端胺之間；及形成離胺酸正白胺酸及二酪胺酸鍵。亦可使用碳形式之二硫鍵，例如乙烯基或乙基鍵(*J. Peptide Sc.*

14:898-902 (2008))，以及使用經適當多取代之親電試劑(例如二-、三-或四鹵代烷烴)實施烷基化反應(PNAS, 105(40), 15293-15298 (2008); ChemBioChem, 6:821-824 (2005))。亦可使用經各種修飾之脯胺酸類似物來向肽中納入構象限制(Zhang等人, J. Med Chem., 39:2738-2744 (1996); Pfeifer及Robinson, Chem. Comm., 1977-1978 (1998))。可利用化學方式使本發明肽環化，以產生利用包括但不限於以下之鍵環化之肽：內醯胺、脘、脞、噻唑啉、硫醚或銻鍵。

設計構象受限肽之再一途徑(闡述於美國專利公開案第2004-0176283號中)係將較短的目標胺基酸序列附接至模板上以產生環狀受限肽。該等環肽不僅藉由其模板在結構上保持穩定，由此提供可模仿病毒及寄生蟲上之構象抗原決定基的三維構象，而且與線性肽相比其對血清中之蛋白水解降解更具抗性。美國專利公開案第2004-0176283號進一步揭示構象受限交聯肽之合成，其藉由製備骨架偶合至適當定位之胺基酸以穩定肽之超二級結構的合成胺基酸來實施。交聯可藉由使經正交保護之(2S, 3R)-3-胺基脯胺酸殘基之一級胺基與麩胺酸鹽之適當定位之側鏈羧基進行醯胺偶合來達成。已遵循該途徑來製備CS蛋白質之構象受限四肽重複，其中至少一個脯胺酸由(2S, 3R)-3-胺基脯胺酸替代，而且為引入側鏈羧基，已納入麩胺酸鹽作為丙胺酸之替代。

交聯策略還包括應用Grubbs閉環置換反應來形成經設計

以模擬 $\alpha$ -螺旋構象之「U型釘(stapled)」肽(Angew. Int. Ed. Engl. 37:3281 (1998); JACS 122:5891 (2000)); 使用多官能化糖類; 使用胺基羧乙基硫色胺酸(tryptathionine)鍵(Chemistry Eu. J. 24:3404-3409 (2008)); 以及利用疊氮化物與炔烴之「點擊(click)」反應, 該兩種物質可以側鏈胺基酸殘基納入或位於肽序列之骨架中(Drug Disc. Today 8(24):1128-1137 (2003))。亦自文獻中瞭解到, 金屬離子可通過螯合與金屬陽離子配位之特定殘基(例如組胺酸)來穩定線性肽之受限構象(Angew. Int. Ed. Engl. 42:421 (2003))。類似地, 可利用使用非天然酸及胺官能團或多胺及多酸官能團官能化線性肽序列、隨後激活及形成醯胺鍵來達成環狀結構。

根據一個實施例, 藉由使抗原tau肽之兩個非毗鄰胺基酸(例如N端及C端胺基酸)彼此分子內共價鍵合來使該抗原tau肽構象受限。根據另一實施例, 藉由使本發明抗原tau肽共價結合至支架分子來使其構象受限。根據又一實施例, 抗原tau肽簡單受限, 即在一端(C端或N端)或通過不位於任一端之另一胺基酸偶合至支架分子。根據再一實施例, 抗原tau肽雙重受限, 即C端及N端均偶合至支架分子。

支架(亦稱為「平臺(platform)」)可為能夠通過共價鍵合來減少抗原tau肽可呈現之構象數量的任何分子。構象受限支架之實例包括蛋白質及肽, 例如脂質運載蛋白相關分子, 例如含有 $\beta$ -桶之硫氧還蛋白及硫氧還蛋白樣蛋白質、

核酸酶(例如RNA酶A)、蛋白酶(例如胰蛋白酶)、蛋白酶抑制劑(例如水蛭抑制劑(eglin) C)、抗體或其結構剛性片段、螢光蛋白(例如GFP或YFP)、芋螺毒素(conotoxin)、纖維連接蛋白III型結構域之環區域、CTLA-4及病毒樣粒子(VLP)。

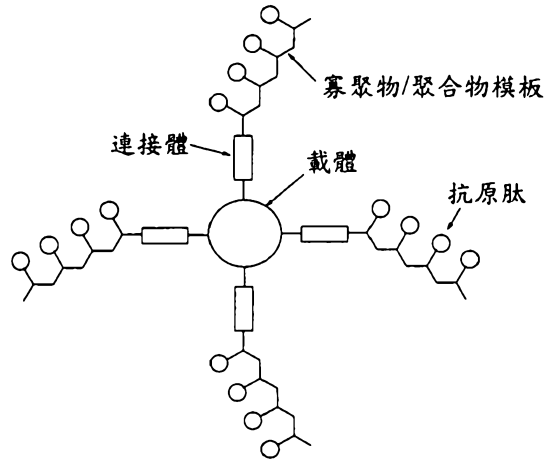
其他適宜平臺分子包括碳水化合物，例如瓊脂糖。平臺可為線性分子或例如閉合形成環之環形分子。平臺通常與抗原tau肽異源。吾人認為，與線性肽相比該等連接至平臺之構象受限肽對蛋白水解降解更具抗性。

根據一個實施例，支架係如本發明中所定義之免疫原性載體，例如異源載體蛋白或VLP。在另一實施例中，抗原tau肽簡單受限至免疫原性載體上。在又一實施例中，抗原tau肽雙重受限至免疫原性載體上。以此方式，抗原tau肽形成構象受限之環結構，已證實其為細胞內識別分子之尤其適宜的結構。

可對本發明之抗原tau肽進行修飾以便於偶聯至平臺上，例如藉由在一端或兩端添加末端半胱胺酸及/或藉由添加連接體序列，例如雙甘胺酸頭或尾、以離胺酸殘基封端之連接體、或熟習此項技術者所習知的可實施此功能之任何其他連接體。亦可利用生物正交化學(Bioorthogonal chemistry)(例如上文所述之點擊反應)將完整的肽序列偶合至載體上，由此避免任何區域化學及化學選擇性問題。已知剛性連接體(例如闡述於Jones等人，(Angew. Chem. Int. Ed. 2002, 41:4241-4244)中者)可引發改良之免疫應答，而

且亦可使用。

在又一實施例中，使抗原tau肽附接至多價模板上，其本身偶合至載體上，由此增加抗原密度(見下文)。多價模板可為適當官能化之聚合物或寡聚物，例如(但不限於)寡聚麩胺酸鹽或殼寡糖(oligochitosan)。



該連接體可位於肽之N端、或位於肽之C端、或位於肽之兩端。該連接體之長度可為0至10個胺基酸，例如0至6個胺基酸。或者，可添加或取代一或多個胺基酸之D-立體異構體形式以產生有益衍生物，例如以增強肽之穩定性。

下文提供使用各種連接體之實例性偶聯組合(所有均在本發明範圍內且構成各個實施例)：

肽 -GGGGGC (SEQ ID NO: 79)- 支架；肽 -GGGGC (SEQ ID NO: 80)- 支架；肽 -GGGC (SEQ ID NO: 81)- 支架；肽 -GGC- 支架；肽 -GC- 支架；肽 -C- 支架；肽 -GGGGGK (SEQ ID NO: 82)；肽 -GGGGK (SEQ ID NO: 83)

肽 -GGGK (SEQ ID NO: 84)；肽 -GGK；肽 -GK；肽 -K；  
肽 -GGGGSC (SEQ ID NO: 85)；肽 -GGGSC (SEQ ID NO: 86)；肽 -GGSC (SEQ ID NO: 87)；肽 -GSC；肽 -SC；肽 -

GGGGC (SEQ ID NO:80)；肽-GGGC (SEQ ID NO:81)；肽-GGC；肽-GC；CSGGGG (SEQ ID NO:88)-肽；CSGGG (SEQ ID NO:89)-肽；CSGG (SEQ ID NO:90)-肽；CSG-肽；CS-肽；CGGGG (SEQ ID NO:91)-肽；CGGG (SEQ ID NO:92)-肽；CGG-肽；CG-肽

下文提供使用各種連接體及雙重受限肽之實例性偶聯組合，其中載體可為一致的載體單體或差異的載體單體。在下文實例中，GC連接體可由上文所例示GK連接體或GSC連接體中之任一者或熟習此項技術者所習知之任何其他連接體取代：

載體-CGGGGG (SEQ ID NO: 93)-肽-GGGGGC (SEQ ID NO:79)-載體；載體-CGGGG (SEQ ID NO:91)-肽-GGGGC (SEQ ID NO:80)-載體；載體-CGGG (SEQ ID NO: 92)-肽-GGGC (SEQ ID NO:81)-載體；載體-CG-肽-GC-載體；載體-C-肽-C-載體

在一個實施例中，將末端半胱胺酸殘基(若先前未存在於抗原tau肽之胺基酸序列中)添加至包含SEQ ID NO: 1至26中所示序列中之任一者或由其組成之抗原tau肽的一端或兩端以產生構象受限肽。

在另一實施例中，將包含可變數量之甘胺酸殘基及一個末端半胱胺酸殘基之GC連接體添加至包含SEQ ID NO: 1至26中所示序列中之任一者或由其組成之抗原tau肽的一端或兩端以產生構象受限肽。較佳地，GC連接體包含1至10個甘胺酸殘基，更佳地，包含1、2、3、4或5個甘胺酸殘

基。

在再一實施例中，將包含可變數量之甘胺酸殘基及一個末端半胱胺酸殘基之GC連接體添加至包含SEQ ID NO: 1至26中所示序列中之任一者或由其組成之抗原tau肽的一端，並將末端半胱胺酸殘基(若先前未存在於抗原tau肽之另一端)添加至抗原tau肽之另一端。較佳地，GC連接體包含1至10個甘胺酸殘基，更佳地，包含1、2、3、4或5個甘胺酸殘基。

#### 免疫原性載體

在本發明之一個實施例中，將本發明之抗原tau肽或多肽連接至免疫原性載體分子以形成供疫苗接種方案用之免疫原。術語「免疫原性載體」在本文中包括以下物質：具有獨立地在宿主動物中引發免疫原性應答之特性，且可連接(例如共價偶合)至肽、多肽或蛋白質，此連接係直接經由在肽、多肽或蛋白質之游離羧基、胺基或羥基與免疫原性載體物質之對應基團之間形成肽或酯鍵，或另一選擇為藉由通過習用雙功能連接基團或以融合蛋白形式鍵合。

彼等熟習此項技術者可容易地獲知用於本發明免疫原中之載體類型。該等免疫原性載體之實例係：病毒樣粒子(VLP)；血清白蛋白，例如牛血清白蛋白(BSA)；球蛋白；甲狀腺球蛋白；血紅蛋白；血藍蛋白(尤其鑰孔戚血藍蛋白(KLH))；提取自蛔蟲之蛋白質；失活細菌毒素或類毒素，例如破傷風或白喉毒素(TT及DT)或CRM197；結核菌素之純化蛋白質衍生物(PPD)；或來自流感嗜血菌

(*Haemophilus influenzae*)之蛋白質D(PCT公開案第WO 91/18926號)或其重組片段(例如, TT之片段C之結構域1、或DT之易位結構域、或包含流感嗜血菌蛋白質D之N端100個至110個胺基酸之1/3蛋白質D (GB 9717953. 5)); 聚離胺酸; 聚麩胺酸; 離胺酸-麩胺酸共聚物; 含有離胺酸或鳥胺酸之共聚物; 脂質體載體等。

在一個實施例中, 免疫原性載體係KLH。在另一實施例中, 免疫原性載體係病毒樣粒子(VLP), 較佳為重組病毒樣粒子。

本文所用之術語「病毒粒子」係指病毒之形態形式。在一些病毒類型中, 其包含由蛋白質衣殼包圍之基因組; 另一些病毒類型則具有其他結構, 例如包膜、尾部等。

本文所用之術語「病毒樣粒子」(VLP)係指非複製性及/或非感染性病毒粒子, 或係指與病毒粒子類似之非複製性及/或非感染性結構, 例如病毒衣殼。本文所用之術語「非複製性」係指VLP所包含之基因組不能複製。本文所用之術語「非感染性」係指不能進入宿主細胞。在一個實施例中, 由於病毒樣粒子缺少全部病毒基因組或基因組功能或其一部分而呈現非複製性及/或非感染性。例如, 病毒樣粒子係病毒基因組已以物理方式或以化學方式失活之病毒粒子。此外, 例如, 病毒樣粒子缺少病毒基因組之全部複製性及感染性組件或其一部分。病毒樣粒子可含有不同於病毒基因組之核酸。病毒樣粒子之一個實施例係病毒衣殼, 例如對應病毒之病毒衣殼, 例如噬菌體, 例如RNA-

噬菌體。術語「病毒衣殼」或「衣殼」係指由病毒蛋白亞基構成之大分子組裝。例如，可有60、120、180、240、300、360及多於360個病毒蛋白亞基。該等亞基相互作用可形成具有內在重複組織結構之病毒衣殼或病毒衣殼樣結構，其中該結構係例如球形或管形。

本文所用之術語「RNA噬菌體之病毒樣粒子」係指包含RNA噬菌體之外殼蛋白、其變體或片段、或基本上由其組成、或由其組成之病毒樣粒子。例如，RNA噬菌體之病毒樣粒子可能與非複製性及/或非感染性且至少缺少編碼RNA噬菌體複製機構之基因的RNA噬菌體之結構類似，且亦可缺少編碼負責病毒附接至宿主或進入宿主之蛋白質的基因。然而，該定義亦應涵蓋上述基因仍然存在但失活(且因此亦導致產生RNA噬菌體之非複製性及/或非感染性病毒樣粒子)之RNA噬菌體之病毒樣粒子。在本發明中，術語「亞基」與「單體」在此上下文中可互換及等效使用。此外，在本發明中，術語「RNA-噬菌體(RNA-phage)」與術語「RNA-噬菌體(RNA-bacteriophage)」可互換使用。

本發明提供用於誘導及/或增強哺乳動物中對抗磷酸化tau之免疫應答的組合物及方法。本發明組合物可包含與至少一種抗原tau肽連接之病毒樣粒子(VLP)。例如，抗原tau肽可連接至VLP以形成有序且重複的抗原-VLP陣列。例如，在一種情形下，至少20種、至少30種、至少60種、至少120種、至少180種、至少360種或至少540種本文所述

肽連接至VLP。

自RNA噬菌體外殼蛋白之180個亞基之自組裝形成且視情況含有宿主RNA之衣殼結構在本文中稱為「RNA噬菌體外殼蛋白之VLP」。一具體實例係Qbeta外殼蛋白之VLP。在此特定情形下，Qbeta外殼蛋白之VLP可僅自Qbeta CP亞基(由Qbeta CP基因之表現而產生，該Qbeta CP基因含有例如通過抑制來阻止較長A1蛋白質之任何表現的TAA終止密碼子，參見Kozlovska, T. M.等人，*Intervirology* 39: 9-15 (1996))組裝，或在衣殼組裝中額外含有A1蛋白質亞基。通常，限制衣殼組裝中Qbeta A1蛋白質相對於Qbeta CP之百分比以確保衣殼形成。

在本發明上下文中適宜作為免疫原性載體之VLP的實例包括(但不限於)以下之衣殼蛋白：乙型肝炎病毒(Ulrich等人，*Virus Res.* 50: 141-182 (1998))、麻疹病毒(Warnes等人，*Gene* 160: 173-178 (1995))、辛德畢斯病毒(Sindbis virus)、輪狀病毒(美國專利第5,071,651號及第5,374,426號)、口蹄疫病毒(Twomey等人，*Vaccine* 13: 1603-1610, (1995))、諾沃克病毒(Norwalk virus)(Jiang, X.等人，*Science* 250: 1580-1583 (1990)；Matsui, S. M.等人，*J Clin. Invest.* 87: 1456-1461 (1991))、反轉錄病毒GAG蛋白質(PCT公開案第WO 96/30523號)、反轉錄轉座子Ty蛋白質pl、乙型肝炎病毒之表面蛋白(PCT公開案第WO 92/11291號)、人類乳頭瘤病毒(PCT公開案第WO 98/15631號)、人類多瘤病毒(Sasnauskas K.等人，*Biol. Chem.* 380 (3): 381-

386 (1999) ; Sasnauskas K. 等人 , Generation of recombinant virus-like particles of different polyomaviruses in yeast , 第3屆國際研討會「病毒樣粒子作為疫苗(Virus-like particles as vaccines)」, Berlin , 9月26日-29日(2001))、RNA噬菌體、Ty、fr噬菌體(frphage)、GA-噬菌體、AP 205-噬菌體及尤其Qbeta-噬菌體。

彼等熟習此項技術者應容易地明瞭，擬用作本發明免疫原性載體之VLP並不限於任何特定形式。粒子可以化學方式或通過生物過程加以合成，其可為天然的或非天然的。例如，此類型實施例包括病毒樣粒子或其重組形式。在一更具體實施例中，VLP可包含已知形成VLP之任一病毒之重組多肽、或另一選擇為由其組成。VLP可進一步包含該等多肽之一或多個片段以及該等多肽之變體、或另一選擇為由其組成。多肽變體與其野生型對應物在胺基酸層面上可具有例如至少80%、85%、90%、95%、97%或99%的一致性。適用於本發明之變體VLP可衍生自任何生物體，只要其能夠形成「病毒樣粒子」且可用作如本發明所定義之「免疫原性載體」即可。

較佳之本發明VLP包括HBV之衣殼蛋白或核心及表面抗原(分別為HBcAg及HBsAg)或其重組蛋白質或片段、及RNA-噬菌體之外殼蛋白或其重組蛋白質或片段，更佳地，Qbeta之外殼蛋白或其重組蛋白質或片段。

在一個實施例中，與本發明抗原tau肽組合使用之免疫原性載體係HBcAg蛋白質。熟習此項技術者可容易地確定

可用於本發明上下文中之HBcAg蛋白質的實例。實例包括(但不限於)闡述於以下文獻中之HBV核心蛋白質：Yuan等人，J. Virol. 73:10122-10128 (1999)；及PCT公開案第WO 00/198333號、第WO 00/177158號、第WO 00/214478號、第WO 00/32227號、第WO 01/85208號、第WO 02/056905號、第WO 03/024480號及第WO 03/024481號。適用於本發明之HBcAg可衍生自任何生物體，只要其能夠形成「病毒樣粒子」且可用作如本發明所定義之「免疫原性載體」即可。

可用於本發明上下文中之尤其感興趣的HBcAg變體係其中一或多個天然存在之半胱胺酸殘基已經缺失或取代之變體。熟習此項技術者已熟知，游離半胱胺酸殘基可參與諸多化學副反應，包括二硫化物交換、與例如注射或形成於與其他物質之組合療法中之化學物質或代謝物反應、或暴露於UV光後直接氧化及與核苷酸反應。由此可產生毒性加合物，尤其考慮到HBcAg具有較強之結合核酸之趨勢的事實。因此，該等毒性加合物會分佈於諸多種物質中，其單獨地可各自以低濃度存在，但合在一起即會達到毒性含量。鑒於上文，在疫苗組合物中使用已經修飾而移除天然存在之半胱胺酸殘基之HBcAg的一個優點係，當附接抗原或抗原決定簇時毒性物質可結合之位點數量減少或完全消除。

另外，HBcAg之缺少乙型肝炎核心抗原前體蛋白之N端前導序列的經處理形式亦可用於本發明上下文中，尤其當

HBcAg係在不會發生處理作用之條件下產生時(例如於細菌系統中表現)。

本發明之其他HBcAg變體包括i)使用標準序列比較電腦算法與野生型HBcAg胺基酸序列之一或其子部分至少80%、85%、90%、95%、97%或99%一致的多肽序列；ii) C端截短型突變體，包括至少1、5、10、15、20、25、30、34或35個胺基酸已自C端移除之突變體；iii) N端截短型突變體，包括至少1、2、5、7、9、10、12、14、15或17個胺基酸已自N端移除之突變體；iv) N端及C端均截短之突變體，包括至少1、2、5、7、9、10、12、14、15或17個胺基酸已自N端移除且至少1、5、10、15、20、25、30、34或35個胺基酸已自C端移除之HBcAg。

本發明範圍內之再一些其他HBcAg變體蛋白質係經修飾以增強外來抗原決定基之免疫原性呈遞之變體，其中4個精胺酸重複中之一或多個缺失，但仍保留C端半胱胺酸(參見例如PCT公開案第WO 01/98333號)；及嵌合C端截短型HBcAg，例如闡述於PCT公開案第WO 02/14478號、第WO 03/102165號及第WO 04/053091號中者。

在另一實施例中，與本發明抗原tau肽組合使用之免疫原性載體係HBsAg蛋白質。熟習此項技術者可容易地確定可用於本發明上下文中之HBsAg蛋白質。實例包括(但不限於)闡述於以下文獻中之HBV表面蛋白：美國專利第5,792,463號、及PCT公開案第WO 02/10416號及第WO 08/020331號。適用於本發明之HBsAg可衍生自任何生物

體，只要其能夠形成「病毒樣粒子」且可用作如本發明所定義之「免疫原性載體」即可。

在又一實施例中，與本發明抗原tau肽組合使用之免疫原性載體係Qbeta外殼蛋白。已發現，當Qbeta外殼蛋白表現於大腸桿菌(*E. coli*)中時，其自組裝成衣殼(Kozlovska T.M.等人，GENE 137: 133-137 (1993))。所獲得之衣殼或病毒樣粒子顯示直徑為25 nm且T=3准對稱之二十面體噬菌體樣衣殼結構。此外，已解析出噬菌體Qbeta之晶體結構。該衣殼含有180拷貝外殼蛋白，其以共價五聚體及六聚體藉由二硫鍵連接(Golmohammadi, R.等人，Structure 4: 5435554 (1996))，使得Qbeta外殼蛋白之衣殼具有顯著穩定性。Qbeta衣殼蛋白亦顯示對有機溶劑及變性劑之不尋常抗性。Qbeta外殼蛋白之衣殼的高度穩定性尤其對於其在本發明上下文中於哺乳動物及人類之免疫及疫苗接種中之用途而言係一個有利的特徵。

熟習此項技術者可容易地確定可用於本發明上下文中之Qbeta外殼蛋白的實例。實例已詳盡闡述於PCT公開案第WO 02/056905號、第WO 03/024480號、第WO 03/024481號中，且包括(但不限於)揭示於PIR數據庫中之胺基酸序列，登記號為VCBPQbeta，稱為Qbeta CP；登記號為AAA16663，稱為Qbeta A1蛋白質；及其變體，包括N端甲硫胺酸已裂解之變體蛋白質；Qbeta A1之失去多達100個、150個或180個胺基酸之C端截短形式；藉由缺失或取代而移除離胺酸殘基或藉由取代或插入而添加離胺酸殘基

之變體蛋白質(參見例如揭示於PCT公開案第WO 03/024481號中之Qbeta-240、Qbeta-243、Qbeta-250、Qbeta-251及Qbeta-259);及與本文所述之任一Qbeta核心蛋白質展示至少80%、85%、90%、95%、97%或99%之一致性的變體。適用於本發明之變體Qbeta外殼蛋白可衍生自任何生物體,只要其能夠形成「病毒樣粒子」且可用作如本發明所定義之「免疫原性載體」即可。

### 鍵

本發明之抗原tau肽可經由化學偶聯或藉由表現基因工程融合伴侶而偶合至免疫原性載體。偶合不一定需要直接偶合,而是可以通過連接體序列來實施。更通常地,在抗原肽融合、偶聯或以其他方式附接至免疫原性載體之情形下,通常將間隔區或連接體序列添加至抗原肽之一端或兩端。該等連接體序列通常包含由蛋白酶體、核內體或細胞之其他囊泡室之蛋白酶識別之序列。

在一個實施例中,本發明肽以與免疫原性載體之融合蛋白形式表現。肽之融合可藉由插入至免疫原性載體之基本序列中或藉由融合至免疫原性載體之N端或C端來實現。在下文中,當提及肽與免疫原性載體之融合蛋白時,涵蓋融合至亞基序列之任一端或將肽內部插入於載體序列中。如下文中所提及,融合可藉由將抗原肽插入至載體序列中、藉由使用抗原肽取代載體序列之一部分、或藉由缺失、取代或插入之組合來實施。

當免疫原性載體係VLP時,嵌合的抗原肽-VLP亞基通常

能夠自組裝成VLP。展示融合至其亞基之抗原決定基的VLP在本文中亦稱為嵌合VLP。例如，EP 0 421 635 B闡述在病毒樣粒子中使用嵌合的嗜肝性DNA病毒核心抗原粒子來呈遞外來肽序列。

側翼胺基酸殘基可添加至擬融合至VLP亞基序列之任一端之抗原肽序列的任一端，或用於將該肽序列內部插入至VLP之亞基序列中。甘胺酸及絲胺酸殘基係用於添加至擬融合肽之側翼序列中的尤其有利的胺基酸。甘胺酸殘基賦予額外撓性，此可降低將外來序列融合至VLP亞基序列中之潛在不穩定效應。

在本發明之一具體實施例中，免疫原性載體係HBcAg VLP。已闡述抗原肽融合至HBcAg之N端之融合蛋白(Neyrinck, S.等人，Nature Med. 5:1157-1163 (1999))或插入於所謂的主要免疫顯性區(MIR)中(Pumpens等人，Intervirology 44:98-114 (2001)；PCT公開案第WO 01/98333號)，且為本發明之具體實施例。亦已闡述天然存在之MIR缺失之HBcAg變體(Pumpens等人，Intervirology 44:98-114 (2001))，且融合至N端或C端以及插入於與野生型HBcAg相比對應於缺失位點之MIR位置係本發明之其他實施例。亦已闡述融合至C端(Pumpens等人，Intervirology 44:98-114 (2001))。熟習此項技術者將容易地找到如何使用經典分子生物學技術來構建融合蛋白之指導。已闡述編碼HBcAg及HBcAg融合蛋白且可用於表現HBcAg及HBcAg融合蛋白之載體及質粒(Pumpens等人，Intervirology

44:98-114 (2001)；Neyrinck, S.等人，Nature Med. 5:1157-1163 (1999))，且可用於實施本發明。使自組裝及擬插入於HBcAg MIR中之抗原決定基展示的效率最佳化之重要因素係所選擇的插入位點，以及插入後MIR內擬自HBcAg序列缺失之胺基酸的數量(歐洲專利第EP 0421635號；美國專利第6,231,864號)，或換言之擬使用新抗原決定基取代之形成HBcAg之胺基酸的數量。例如，已闡述使用外來抗原決定基來取代HBcAg胺基酸76-80、79-81、79-80、75-85或80-81(Pumpens等人，Intervirology 44:98-114 (2001)；歐洲專利第EP 0421635號；美國專利第6,231,864號；PCT專利公開案第WO00/26385號)。HBcAg含有對於衣殼組裝及能夠結合核酸非必要之較長精胺酸尾部。包含或缺少此精胺酸尾部之HBcAg係本發明之兩個實施例。

在本發明之另一具體實施例中，免疫原性載體係RNA噬菌體之VLP，較佳為Qbeta。在表現於細菌且尤其大腸桿菌中之後，RNA噬菌體之主要外殼蛋白自發組裝成VLP。已闡述抗原肽已融合至截短形式之Qbeta之A1蛋白質之C端或插入於A1蛋白質內部之融合蛋白構建體(Kozlovskaja等人，Intervirology, 39:9-15 (1996))。該A1蛋白質係藉由抑制UGA終止密碼子而產生，且其具有329個胺基酸，或若將N端甲硫胺酸之裂解考慮在內具有328個胺基酸之長度。丙胺酸(由Qbeta CP基因編碼之第二胺基酸)之前的N端甲硫胺酸之裂解通常發生於大腸桿菌中，且Qbeta外殼蛋白之N端即為此種情況。A1基因之該部分(UGA琥珀密碼子之3'

端)編碼具有195個胺基酸之長度的CP延伸部分。在CP延伸部分之位置72與73之間插入抗原肽獲得本發明之其他實施例(Kozlovska等人, Intervirology 39:9-15 (1996))。將抗原肽融合於C端截短型Qbeta A1蛋白質之C端獲得本發明之其他較佳實施例。例如, Kozlovska等人, Intervirology, 39:9-15 (1996)闡述抗原決定基融合於位置19處經截短之Qbeta CP延伸部分之C端的Qbeta A1蛋白質融合物。

如Kozlovska等人, Intervirology, 39:9-15 (1996)所述, 展示融合抗原決定基之粒子的組裝通常需要存在A1蛋白質-抗原融合物及野生型CP二者以形成鑲嵌粒子(mosaic particle)。然而, 包含病毒樣粒子且由此尤其RNA噬菌體Qbeta外殼蛋白之VLP(其僅由與抗原肽融合之VLP亞基構成)的實施例亦在本發明之範圍內。

鑲嵌粒子之產生可以多種方式實施。Kozlovska等人, Intervirology 39:9-15 (1996)闡述了三種方法, 所有方法均可用於實施本發明。在第一途徑中, 融合抗原決定基於VLP上之有效展示係由編碼Qbeta A1蛋白質融合物之質粒在大腸桿菌菌株中的表現來調介, 該融合物在CP與CP延伸部分之間具有UGA終止密碼子, 該大腸桿菌菌株含有編碼選殖UGA抑制基因tRNA之質粒, 此使得UGA密碼子轉譯至Trp (pISM3001質粒中(Smiley等人, Gene 134:33-40 (1993)))。在另一途徑中, 將CP基因終止密碼子修飾成UAA, 且將表現A1蛋白質-抗原融合物之第二質粒共轉化。第二質粒編碼不同的抗生素抗性, 且複製起始點與第

一質粒一致。在第三途徑中，CP及A1蛋白質-抗原融合物以雙順反子方式編碼，且可操作連接至諸如Trp啟動子等啟動子，如Kozlovska等人，Intervirolology, 39:9-15 (1996)之圖1中所述。

適於融合抗原或抗原決定簇之其他VLP闡述於PCT公開案第WO 03/024481號中，且包括噬菌體fr、RNA噬菌體MS-2、乳頭瘤病毒之衣殼蛋白、反轉錄轉座子Ty、酵母以及反轉錄病毒樣粒子、HIV2 Gag、豇豆花葉病毒(Cowpea Mosaic Virus)、細小病毒VP2 VLP、HBsAg(美國專利第4,722,840號及歐洲專利第EP 0020416B1號)。適於實施本發明之嵌合VLP之實例亦為彼等闡述於Intervirolology 39:1 (1996)中者。涵蓋用於本發明之VLP的其他實例係：HPV-1、HPV-6、HPV-11、HPV-16、HPV-18、HPV-33、HPV-45、CRPV、CPOV、HIV GAG及煙草花葉病毒。其他實例包括SV-40、多瘤病毒、腺病毒、單純皰疹病毒、輪狀病毒及諾沃克病毒之VLP。

對於構成本發明之一部分的任何重組表現肽或蛋白質(包括偶合或未偶合至免疫原性載體之本發明抗原tau肽)，編碼該肽或蛋白質之核酸亦構成本發明之一態樣，包含該核酸之表現載體以及含有該表現載體之宿主細胞(自發地或染色體插入)亦如此。藉由將肽或蛋白質表現於上文宿主細胞中並自宿主細胞分離免疫原以重組產生肽或蛋白質之方法係本發明之又一態樣。

在另一實施例中，使用熟習此項技術者所熟知之技術將

本發明肽化學偶合至免疫原性載體。可以如下方式實施偶聯：經由單點偶聯(例如N端或C端點)以容許肽自由移動或作為肽之兩端均偶聯至免疫原性載體蛋白質或支架結構(例如VLP)之鎖定結構(locked down structure)。該偶聯可經由熟習此項技術者所習知之偶聯化學來實施，例如經由半胱胺酸殘基、離胺酸殘基或通常已知作為偶聯點之其他羧基部分，例如麩胺酸或天冬胺酸。因此，例如，對於直接共價偶合，可使用碳化二亞胺、戊二醛或(N-[ $\gamma$ -馬來醯亞胺基丁醯氧基]琥珀醯亞胺酯，使用諸如CDAP及SPDP等常見市售異型雙功能連接體(使用製造商說明書)。肽(尤其環肽)與蛋白質載體經由醯肼肽衍生物之偶聯的實例闡述於PCT公開案第WO 03/092714號中。在偶合反應後，可藉助透析方法、凝膠過濾方法、分級分離方法等容易地分離及純化免疫原。以半胱胺酸殘基封端之肽(較佳地在環狀區域外部有連接體)可經由馬來醯亞胺化學方便地偶聯至載體蛋白。

當免疫原性載體係VLP時，可將數種具有相同胺基酸序列或不同胺基酸序列之抗原肽偶合至單一VLP分子，較佳產生重複且有序的結構，以定向方式呈遞數個抗原決定簇，如PCT公開案第WO 00/32227號、第WO 03/024481號、第WO 02/056905號及第WO 04/007538號中所述。

在本發明之一個態樣中，抗原肽經由化學交聯、通常且較佳地藉由使用異型雙功能交聯劑結合至VLP。數種異型雙功能交聯劑已為熟習此項技術者所習知。在一些實施例

中，異型雙功能交聯劑含有可與第一附接位點，即與VLP或VLP亞基之離胺酸殘基之側鏈胺基反應之官能團；及可與較佳第二附接位點，即融合至抗原肽且視情況可實施還原反應之半胱胺酸殘基反應之另一官能團。該程序之第一步驟(通常稱為衍生化)係VLP與交聯劑之反應。該反應之產物係激活VLP，其亦稱為激活載體。在第二步驟中，使用諸如凝膠過濾或透析等標準方法來移除未反應之交聯劑。在第三步驟中，使抗原肽與激活VLP反應，且此步驟通常稱為偶合步驟。在第四步驟中，可視情況藉由例如透析來移除未反應之抗原肽。數種異型雙功能交聯劑已為熟習此項技術者所習知。該等包括較佳的交聯劑SMPH (Pierce)、Sulfo-MBS、Sulfo-EMCS、Sulfo-GMBS、Sulfo-SIAB、Sulfo-SMPB、Sulfo-SMCC、SVSB、SIA及其他交聯劑，該等其他交聯劑可自例如Pierce化學公司(Rockford, IL, USA)購得且具有一個對胺基具有反應性之官能團及一個對半胱胺酸殘基具有反應性之官能團。上文提及之交聯劑全部導致形成硫醚鍵。

適於實施本發明之另一類交聯劑之特徵在於偶合後在抗原肽與VLP之間引入二硫鍵。屬於此類之較佳交聯劑包括例如SPDP及Sulfo-LC-SPDP (Pierce)。VLP與交聯劑之衍生化程度可能受諸如下述各種實驗條件影響：各反應伴侶之濃度、一種試劑相比於另一種試劑是否過量、pH、溫度及離子強度。偶合度，即每一VLP亞基之抗原肽的量可藉由改變上文所述之實驗條件加以調節以與疫苗要求相匹配。

使抗原肽結合至VLP之另一種方法係使VLP表面上之離胺酸殘基與抗原肽上之半胱胺酸殘基連接。在一些實施例中，可能需要含有半胱胺酸殘基作為第二附接位點或作為其一部分之胺基酸連接體與用於偶合至VLP之抗原肽的融合。通常，撓性胺基酸連接體較有利。胺基酸連接體之實例選自由下列組成之群：(a) CGG；(b) N端 $\gamma$ 1-連接體；(c) N端 $\gamma$ 3-連接體；(d) Ig鉸鏈區；(e) N端甘胺酸連接體；(f)  $(G)_kC(G)_n$ ，其中 $n=0$ 至 $12$ 且 $k=0$ 至 $5$ ；(g) N端甘胺酸-絲胺酸連接體；(h)  $(G)_kC(G)_m(S)_i(GGGGS)_n$ ，其中 $n=0$ 至 $3$ ， $k=0$ 至 $5$ ， $m=0$ 至 $10$ ， $i=0$ 至 $2$ ；(i) GGC；(k) GGC-NH<sub>2</sub>；(l) C端 $\gamma$ 1-連接體；(m) C端 $\gamma$ 3-連接體；(n) C端甘胺酸連接體；(o)  $(G)_nC(G)_k$ ，其中 $n=0$ 至 $12$ 且 $k=0$ 至 $5$ ；(p) C端甘胺酸-絲胺酸連接體；(q)  $(G)_m(S)_t(GGGGS)_n(G)_oC(G)_k$ ，其中 $n=0$ 至 $3$ ， $k=0$ 至 $5$ ， $m=0$ 至 $10$ ， $t=0$ 至 $2$ ，且 $o=0$ 至 $8$ 。胺基酸連接體之其他實例係免疫球蛋白之鉸鏈區、甘胺酸絲胺酸連接體 $(GGGGS)_n$ 及甘胺酸連接體 $(G)_n$ ，所有均進一步含有半胱胺酸殘基作為第二附接位點且視情況進一步含有甘胺酸殘基。該等胺基酸連接體之通常較佳實例係N端 $\gamma$ 1：CGDKTHTSPP (SEQ ID NO:94)；C端 $\gamma$ 1：DKTHTSPPCG (SEQ ID NO:95)；N端 $\gamma$ 3：CGGPKPSTPPGSSGGAP (SEQ ID NO:96)；C端 $\gamma$ 3：PKPSTPPGSSGGAPGGCG (SEQ ID NO:97)；N端甘胺酸連接體：GCGGGG (SEQ ID NO:98)及C端甘胺酸連接體：GGGGCG (SEQ ID NO:99)。

當疏水性抗原肽結合至VLP時，尤其適於實施本發明之

其他胺基酸連接體係用於N端連接體之CGKKGG (SEQ ID NO: 100)或CGDEGG (SEQ ID NO: 101)；或用於C端連接體之GGKKGC (SEQ ID NO: 102)及GGEDGC (SEQ ID NO: 103)。對於C端連接體，末端半胱胺酸視情況經C端醯胺化。

在本發明之一些實施例中，位於肽之C端的GGCG (SEQ ID NO: 104)、GGC或GGC-NH<sub>2</sub>(「NH<sub>2</sub>」代表醯胺化)連接體或位於肽之N端的CGG係較佳之胺基酸連接體。通常，將甘胺酸殘基插入於較大胺基酸與擬用作第二附接位點之半胱胺酸之間以避免偶合反應中較大胺基酸之潛在空間位阻。在本發明之又一實施例中，使胺基酸連接體GGC-NH<sub>2</sub>融合至抗原肽之C端。

存在於抗原肽上之半胱胺酸殘基較佳呈還原態與激活VLP上之異型雙功能交聯劑反應，即應可得到游離半胱胺酸或半胱胺酸殘基與游離巰基。在半胱胺酸殘基以氧化形式起結合位點之作用的情形下，例如，若其形成二硫鍵，則使用例如DTT、TCEP或p-巰基乙醇還原該二硫鍵較佳。低濃度之還原劑與PCT公開案第WO 02/05690號中所述之偶合相容，而較高濃度會抑制偶合反應，如熟習此項技術者所瞭解，在此情形下應在偶合之前藉由例如透析、凝膠過濾或反相HPLC移除還原劑或降低其濃度。

藉由使用異型雙功能交聯劑按照上文所述之方法使抗原肽與VLP結合使得抗原肽與VLP能夠以定向方式偶合。使抗原肽與VLP結合之其他方法包括使用碳化二亞胺EDC及

NHS使抗原肽交聯至VLP之方法。

在其他方法中，使用同型雙功能交聯劑使抗原肽附接至VLP，該交聯劑係例如戊二醛、DSGBM [PEO] 4、BS3 (Pierce化學公司，Rockford, IL, USA)或其他已知的帶有對VLP之胺基團或羧基具有反應性之官能團的同型雙功能交聯劑。

使VLP與抗原肽結合之其他方法包括其中VLP經生物素化且抗原肽以抗生物素蛋白-融合蛋白形式表現之方法，或其中抗原肽與VLP二者均經生物素化之方法，例如如PCT公開案第WO 00/23955號中所述。在此情形下，可首先使抗原肽結合至抗生物素蛋白或抗生物素蛋白上，此藉由調節抗原肽與抗生物素蛋白之比率以在隨後步驟中添加之VLP仍然能夠結合游離的結合位點來實施。或者，可將所有組份混合於「一鍋」反應中。可使用可得到可溶形式之受體及配體且能夠交聯至VLP或抗原肽的其他配體-受體對作為結合劑來使抗原肽結合至VLP上。或者，可使配體或受體融合至抗原肽，且由此調介與分別化學結合或融合至受體或配體之VLP的結合。亦可藉由插入或取代來實施融合。

若空間上容許，可將一個或數個抗原分子附接至RNA噬菌體外殼蛋白之衣殼或VLP之一個亞基上，此較佳通過RNA噬菌體之VLP之暴露的離胺酸殘基。因此，RNA噬菌體外殼蛋白之VLP且尤其Qbeta外殼蛋白VLP之一個具體特徵係每一亞基可能偶合數種抗原。此能夠產生密集的抗原

陣列。

在本發明之一個實施例中，至少一種抗原或抗原決定簇與病毒樣粒子之分別結合及附接係藉由病毒樣粒子之至少一個第一附接位點與抗原肽之至少一個第二附接位點之間分別相互作用及締合來實施。

Qbeta外殼蛋白之VLP或衣殼在其表面上展示界定數量之離胺酸殘基，其具有界定之拓撲結構，其中三個離胺酸殘基指向衣殼之內部且與RNA相互作用，且四個其他離胺酸殘基暴露於衣殼之外部。該等界定特性有利於抗原附接至粒子外部而非離胺酸殘基與RNA相互作用之粒子內部。其他RNA噬菌體外殼蛋白之VLP在其表面上亦具有界定數量之離胺酸殘基且具有該等離胺酸殘基之界定拓撲結構。

在本發明之又一實施例中，第一附接位點係離胺酸殘基及/或第二附接位點包含巯基或半胱胺酸殘基。在本發明之還又一實施例中，第一附接位點係離胺酸殘基且第二附接位點係半胱胺酸殘基。在又一些實施例中，抗原或抗原決定簇經由半胱胺酸殘基結合至RNA噬菌體外殼蛋白之VLP的離胺酸殘基，且尤其結合至Qbeta外殼蛋白之VLP。

衍生自RNA噬菌體之VLP的另一優點係其在細菌中之表現量很高，此能夠以擔負得起之成本製備大量物質。而且，使用VLP作為載體能夠以可變的抗原密度分別形成穩健的抗原陣列及偶聯物。具體而言，使用RNA噬菌體之VLP、且由此尤其使用RNA噬菌體Qbeta外殼蛋白之VLP能夠達成非常高的抗原決定基密度。

在一些實施例中，免疫原性組合物可包含免疫原性偶聯物之混合物，即免疫原性載體偶合至一種或數種抗原tau肽。因此，該等免疫原性組合物可由胺基酸序列不同之免疫原性載體構成。例如，可製備包含「野生型」VLP及其中一或多個胺基酸殘基已改變(例如，缺失、插入或取代)之經修飾VLP蛋白質的疫苗組合物。或者，可使用相同的免疫原性載體，但使其偶合至具有不同胺基酸序列之抗原tau肽。

因此，本發明亦係關於產生免疫原之方法，其包含：i) 提供本發明抗原tau肽；ii) 提供本發明免疫原性載體，較佳為VLP；及iii) 將該抗原tau肽與該免疫原性載體組合。在一個實施例中，該組合步驟通過化學交聯、較佳地通過異型雙功能交聯劑來實施。

#### *包含抗原tau肽之組合物*

本發明亦係關於組合物，尤其亦稱為「標的免疫原性組合物」之免疫原性組合物，其包含本發明抗原tau肽及視情況至少一種佐劑，該抗原tau肽較佳連接至免疫原性載體，更佳地連接至VLP，甚至更佳地連接至HBsAg、HBcAg或Qbeta VLP。認為該等免疫原性組合物(尤其調配成醫藥組合物時)可用於預防、治療或減輕tau相關病症，例如阿茲海默氏症。

#### *免疫原性組合物*

在一些實施例中，本發明之標的免疫原性組合物包含抗原tau肽，該抗原tau肽包含選自SEQ ID NO: 1至26、31至

76及105至122之胺基酸序列。在一些實施例中，該抗原tau肽連接至免疫原性載體，較佳地連接至VLP，更佳地連接至HBsAg、HBcAg或Qbeta VLP。

包含本發明抗原tau肽之標的免疫原性組合物可以諸多方式如下文更詳細闡述進行調配。

在一些實施例中，標的免疫原性組合物包含單一種類之抗原tau肽，例如，免疫原性組合物包含一群抗原tau肽，基本上全部抗原tau肽都具有相同的胺基酸序列。在其他實施例中，標的免疫原性組合物包含兩種或更多種不同抗原tau肽，例如，免疫原性組合物包含一群抗原tau肽，該群體之成員的胺基酸序列可能有所不同。

例如，在一些實施例中，標的免疫原性組合物包含第一抗原tau肽，其較佳地連接至免疫原性載體，更佳地連接至VLP，甚至更佳地連接至HBsAg、HBcAg或Qbeta VLP，且包含選自SEQ ID NO: 1至26、31至76及105至122之第一胺基酸序列；及至少一種第二抗原tau肽，較佳地連接至免疫原性載體，更佳地連接至VLP，甚至更佳地連接至HBsAg、HBcAg或Qbeta VLP，且包含較佳選自SEQ ID NO: 1至26、31至76及105至122之第二胺基酸序列，其中第二胺基酸序列與第一胺基酸序列相差至少1、2、3、4、5、6至10、或15個胺基酸。

作為另一實例，標的免疫原性組合物包含第一抗原tau肽，其較佳地連接至免疫原性載體，更佳地連接至VLP，甚至更佳地連接至HBsAg、HBcAg或Qbeta VLP，且包含

選自 SEQ ID NO: 1至26、31至76及105至122之第一胺基酸序列；第二抗原 tau 肽，其較佳地連接至免疫原性載體，更佳地連接至 VLP，甚至更佳地連接至 HBsAg、HBcAg 或 Qbeta VLP，且包含較佳選自 SEQ ID NO: 1至26、31至76及105至122之第二胺基酸序列，其中第二胺基酸序列與第一胺基酸序列相差至少 1、2、3、4、5、6至10、或15個胺基酸；及至少一種第三抗原 tau 肽，其較佳地連接至免疫原性載體，更佳地連接至 VLP，甚至更佳地連接至 HBsAg、HBcAg 或 Qbeta VLP，且包含較佳選自 SEQ ID NO: 1至26、31至76及105至122之第三胺基酸序列，其中第三胺基酸序列與第一及第二胺基酸序列均相差至少 1、2、3、4、5、6至10、或15個胺基酸。

在其他實施例中，標的免疫原性組合物包含如上文所述之多聚抗原 tau 肽。本文所用之術語「包含抗原 tau 肽之免疫原性組合物」或「本發明之免疫原性組合物」或「標的免疫原性組合物」係指包含單一種類(多聚或未多聚)或多種偶合或未偶合至免疫原性載體之抗原 tau 肽的免疫原性組合物。

#### 佐劑

在一些實施例中，標的免疫原性組合物包含至少一種佐劑。適宜佐劑包括適用於哺乳動物、較佳適用於人類者。可用於人類之已知適宜佐劑的實例包括(但不一定限於)明礬、磷酸鋁、氫氧化鋁、MF59™(4.3% w/v 角鯊烯、0.5% w/v 聚山梨酯 80 (Tween 80)、0.5% w/v 山梨醇酐三油酸酯

(Span 85))、含 CpG 核酸(其中胞嘧啶未甲基化)、QS21(皂苷佐劑)、MPL(單磷醯脂質 A)、3DMPL(3-O-去醯基化 MPL)、沉香(Aquilla)提取物、ISCOMS(參見,例如, Sjölander 等人, J. Leukocyte Biol. 64:713 (1998); PCT 公開案第 WO 90/03184 號、第 WO 96/11711 號、第 WO 00/48630 號、第 WO 98/36772 號、第 WO 00/41720 號、第 WO 06/134423 號及第 WO 07/026190 號)、LT/CT 突變體、聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLG)微粒、Quil A、白細胞介素及諸如此類。對於包括但不限於動物實驗在內之獸醫應用,可以使用弗氏佐劑(Freund's)、N-乙醯基-胞壁醯基-L-蘇胺醯基-D-異麩醯胺酸(thr-MDP)、N-乙醯基-正-胞壁醯基-L-丙胺醯基-D-異麩醯胺酸(CGP 11637, 稱為正-MDP)、N-乙醯基胞壁醯基-L-丙胺醯基-D-異麩醯胺酸基-L-丙胺酸-2-(1'-2'-二棕櫚醯基-sn-甘油-3-羥基磷醯基氧基)-乙胺(CGP 19835A, 稱為 MTP-PE)、及 RIBI(其含有三種提取自細菌之組份)、單磷醯脂質 A、海藻糖二黴菌酸酯及存於 2% 角鯊烯/Tween 80 乳液中之細胞壁支架(MPL+TDM+CWS)。

可增強組合物效力之其他實例性佐劑包括但不限於：  
(1) 水包油乳液調配物(含有或不含有其他特定免疫刺激劑, 例如胞壁醯肽(見下文)或細菌細胞壁組份), 例如 (a) MF59™(PCT 公開案第 WO 90/14837 號; 第 10 章, Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, Powell & Newman 編輯, Plenum Press 1995), 其含有 5% 角鯊烯、

0.5% Tween 80(聚氧乙烯山梨醇酐單油酸酯)及0.5% Span 85(山梨醇酐三油酸酯)(視情況含有共價連接至二棕櫚醯基磷脂醯基乙醇胺之胞壁醯三肽(MTP-PE))，使用微射流均質機調配成亞微米粒子，(b) SAF，其含有10%角鯊烯、0.4% Tween 80、5%普朗尼克嵌段聚合物(pluronic-blocked polymer) L121及thr-MDP，微流化成亞微米乳液或實施渦旋以產生較大粒徑乳液，及(c) RIBI™佐劑系統(RAS)(Ribi Immunochem, Hamilton, MT)，其含有2%角鯊烯、0.2% Tween 80及一或多種細菌細胞壁組份，例如單磷醯脂質A (MPL)、海藻糖二黴菌酸酯(TDM)及細胞壁支架(CWS)，較佳為MPL+CWS (DETOX™)；(2)皂苷佐劑，例如QS21、STIMULON™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA)、Abisco® (Isconova, Sweden)或免疫刺激複合物基質(Iscomatrix)® (Commonwealth Serum Laboratories, Australia)，可使用該等物質或自其產生之粒子，例如ISCOM(免疫刺激複合物)，ISCOMS可不含其他洗滌劑，例如PCT公開案第WO 00/07621號；(3)完全弗氏佐劑(CFA)及不完全弗氏佐劑(IFA)；(4)細胞因子，例如白細胞介素(例如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12(PCT公開案第WO 99/44636號)等)、干擾素(例如 $\gamma$ 干擾素)、巨噬細胞集落刺激因子(M-CSF)、腫瘤壞死因子(TNF)等；(5)單磷醯脂質A (MPL)或3-O-去醯基化MPL (3dMPL)，例如英國專利第GB-2220221號及歐洲專利第EP-A-0689454號，當與肺炎球菌糖一起使用時視情況於實質上不存在明礬下

使用，例如PCT公開案第WO 00/56358號；(6) 3dMPL與例如QS21及/或水包油乳液之組合，例如EP-A-0835318、EP-A-0735898、EP-A-0761231；(7)包含CpG基序之寡核苷酸 [Krieg, Vaccine (2000) 19:618-622；Krieg, Curr Opin Mol Ther (2001) 3:15-24；Roman等人，Nat. Med. (1997) 3:849-854；Weiner等人，PNAS USA (1997) 94:10833-10837；Davis等人，J. Immunol (1998) 160:870-876；Chu等人，J. Exp. Med (1997) 186:1623-1631；Lipford等人，Ear. J. Immunol. (1997) 27:2340-2344；Moldoveami等人，Vaccine (1988) 16:1216-1224；Krieg等人，Nature (1995) 374:546-549；Klinman等人，PNAS USA (1996) 93:2879-2883；Ballas等人，J. Immunol, (1996) 157:1840-1845；Cowdery等人，J. Immunol (1996) 156:4570-4575；Halpern等人，Cell Immunol. (1996) 167:72-78；Yamamoto等人，Jpn. J. Cancer Res., (1988) 79:866-873；Stacey等人，J. Immunol., (1996) 157:2116-2122；Messina等人，J. Immunol, (1991) 147:1759-1764；Yi等人，J. Immunol (1996) 157:4918-4925；Yi等人，J. Immunol (1996) 157:5394-5402；Yi等人，J. Immunol, (1998) 160:4755-4761；及Yi等人，J. Immunol, (1998) 160:5898-5906；PCT公開案第WO 96/02555號、第WO 98/16247號、第WO 98/18810號、第WO 98/40100號、第WO 98/55495號、第WO 98/37919號及第WO 98/52581號]，即含有至少一種CG二核苷酸，其中胞嘧啶未甲基化；(8)聚氧乙烯醚或聚氧乙

烯酯，例如PCT公開案第WO 99/52549號；(9)聚氧乙烯山梨醇酐酯表面活性劑與辛苯昔醇之組合(PCT公開案第WO 01/21207號)或聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性劑與至少一種其他非離子型表面活性劑(例如辛苯昔醇)之組合(PCT公開案第WO 01/21152號)；(10)皂苷及免疫刺激性寡核苷酸(例如CpG寡核苷酸)(PCT公開案第WO 00/62800號)；(11)免疫刺激劑及金屬鹽顆粒，例如PCT公開案第WO 00/23105號；(12)皂苷及水包油乳液，例如PCT公開案第WO 99/11241號；(13)皂苷(例如QS21)+3dMPL+IM2(視情況+固醇)，例如PCT公開案第WO 98/57659號；(14)可作為免疫刺激劑增強組合物功效之其他物質，例如胞壁醯肽，包括N-乙醯基-胞壁醯基-L-蘇胺醯基-D-異麩醯胺酸(thr-MDP)、N-25乙醯基-正胞壁醯基-L-丙胺醯基-D-異麩醯胺酸(正-MDP)、N-乙醯基胞壁醯基-L-丙胺醯基-D-異麩醯胺酸基-L-丙胺酸-2-(1'-2'-二棕櫚醯基-sn-甘油-3-羥基磷醯基氧基)-乙胺(MTP-PE)；(15)鐸樣受體(toll-like receptor)(TLR)之配體，天然或合成的(例如，如Kanzler等人，Nature Med. 13:1552-1559 (2007)中所述)，包括TLR3配體，例如聚肌苷酸胞苷酸(polyI:C)及類似化合物，例如和托諾(Hiltonol)及安普濟(Ampligen)。

在一個實施例中，本發明之免疫原性組合物包含至少一種佐劑。在一特定實施例中，該佐劑係免疫刺激性寡核苷酸，且更佳為CpG寡核苷酸。在一個實施例中，CpG寡核苷酸具有核酸序列5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3'

(CpG 7909; SEQ ID NO:27)。在另一實施例中，CpG寡核苷酸具有核酸序列 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (CpG 24555; SEQ ID NO:29)。SEQ ID NO:29之免疫刺激性寡核苷酸核酸序列與先前報導之免疫刺激性寡核苷酸(CpG 10103) 5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (SEQ ID NO:28) 之不同之處在於最靠近3'之CG二核苷酸之顛倒。該兩種免疫刺激性寡核苷酸之活性具有驚人的相似性，此乃因先前已報導CpG寡核苷酸之免疫刺激活性取決於CpG基序之數量、CG二核苷酸兩側之序列、CpG基序之位置及各CpG基序之間的時間距(Ballas等人，1996, J. Immunol. ; Hartmann等人，2000, J. Immunol. ; Klinman等人，2003, Clin. Exp. Immunol.)。如根據先前揭示內容所預期，移除免疫刺激性寡核苷酸CpG 24555中最靠近3'之CG二核苷酸不會對此免疫刺激性寡核苷酸增強抗原特異性免疫應答之能力造成負面影響。CpG 24555呈現與CpG 10103相比類似的且在一些情形下增強之免疫刺激活性。

免疫刺激性寡核苷酸可為雙鏈或單鏈。通常，雙鏈分子在活體內更穩定，而單鏈分子具有增強之免疫活性。因此，在本發明之一些態樣中，核酸較佳為單鏈；且在其他態樣中，核酸較佳為雙鏈。

對於本文所揭示CpG序列中之任一者(例如CpG 24555、CpG 10103及CpG 7909)，核苷酸間鍵中之任一者可為硫代磷酸酯或磷酸二酯鍵。

術語「核酸」與「寡核苷酸」在本文中可互換使用，其

意指多個核苷酸(即包含連接至磷酸酯基團及可交換有機鹼基之糖(例如核糖或去氧核糖)之分子，該有機鹼基為經取代嘧啶(例如胞嘧啶(C)、胸苷(T)或尿嘧啶(U))或經取代嘌呤(例如腺嘌呤(A)或鳥嘌呤(G))。本文所用之該等術語係指寡核糖核苷酸(即去除磷酸酯之聚核苷酸)及任何其他含有機鹼基之聚合物。核酸分子可自現有核酸來源(例如基因組DNA或cDNA)獲得，但較佳為合成的核酸分子(例如藉由核酸合成來產生)。

在一個實施例中，免疫刺激性寡核苷酸可相比於天然RNA及DNA涵蓋各種化學修飾及取代，包括核苷間磷酸二酯橋、 $\beta$ -D-核糖(去氧核糖)單元及/或天然核苷鹼基(腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶)。化學修飾之實例已為熟習此項技術者所習知，且闡述於(例如)Uhlmann E.等人，(1990), Chem. Rev. 90:543；「Protocols for Oligonucleotides and Analogs」，Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal編輯，Humana Press, Totowa, USA 1993；Crooke, S.T.等人，(1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36:107-129；及Hunziker J.等人，(1995), Mod. Synth. Methods 7:331-417中。本發明寡核苷酸可具有一或多種修飾，其中相比於由天然DNA或RNA組成之具有相同序列之寡核苷酸，各修飾位於特定的核苷間磷酸二酯橋及/或位於特定的 $\beta$ -D-(去氧)核糖單元及/或位於特定的天然核苷鹼基位置。

例如，寡核苷酸可包含一或多種修飾。該等修飾可選自：a)用經修飾核苷間橋替代位於核苷3'及/或5'端之核苷間磷酸二酯橋，b)用去磷橋替代位於核苷3'及/或5'端之磷酸二酯橋，c)用另一單元替代糖磷酸酯骨架中之糖磷酸酯單元，d)用經修飾糖單元替代 $\beta$ -D-核糖單元，及e)替代天然核苷鹼基。

核酸亦包括經取代嘌呤及嘧啶，例如C-5丙炔嘧啶及7-去氫-7-經取代嘌呤修飾鹼基(Wagner等人，1996, *Nat. Biotechnol.* 14:840-4)。嘌呤及嘧啶包括(但不限於)腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、胸苷、5-甲基胞嘧啶、2-氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、次黃嘌呤、及其他天然及非天然存在之核鹼基、經取代及未經取代之芳香族部分。其他該等修飾已為熟習此項技術者所熟知。

經修飾鹼基係在化學上與通常在DNA及RNA中所發現天然存在鹼基(例如T、C、G、A及U)不同之任何鹼基，但其與該等天然存在鹼基共用基本化學結構。經修飾核苷鹼基可選自(例如)次黃嘌呤、尿嘧啶、二氫尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-氨基尿嘧啶、5-(C1-C6)-烷基尿嘧啶、5-(C2-C6)-烯基尿嘧啶、5-(C2-C6)-炔基尿嘧啶、5-(羥基甲基)尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羥基胞嘧啶、5-(C1-C6)-烷基胞嘧啶、5-(C2-C6)-烯基胞嘧啶、5-(C2-C6)-炔基胞嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、N2-二甲基鳥嘌呤、2,4-二氨基-嘌呤、8-氯雜嘌呤、經取代7-去氫嘌呤(較佳7-去氫-7-經取

代及/或7-去氮-8-經取代嘌呤)、5-羥基甲基胞嘧啶、N4-烷基胞嘧啶(例如N4-乙基胞嘧啶)、5-羥基去氧胞苷、5-羥基甲基去氧胞苷、N4-烷基去氧胞苷(例如N4-乙基去氧胞苷)、6-硫去氧鳥苷、及硝基吡咯之去氧核糖核苷、C5-丙炔基嘧啶、及二胺基嘌呤(例如2,6-二胺基嘌呤)、肌苷、5-甲基胞嘧啶、2-胺基嘌呤、2-胺基-6-氯嘌呤、次黃嘌呤或天然核苷鹼基之其他修飾。此列表意欲具有實例性且不欲理解為具有限制性。

在本發明之一些態樣中，本文所述免疫刺激性寡核苷酸之CpG二核苷酸較佳未甲基化。未甲基化CpG基序係未甲基化胞嘧啶-鳥嘌呤二核苷酸序列(即未甲基化5'胞嘧啶以及隨後之3'鳥苷，且藉由磷酸酯鍵來連接)。在其他態樣中，CpG基序經甲基化。甲基化CpG基序係甲基化胞嘧啶-鳥嘌呤二核苷酸序列(即甲基化5'胞嘧啶以及隨後之3'鳥苷，且藉由磷酸酯鍵來連接)。

在本發明之一些態樣中，免疫刺激性寡核苷酸可含有經修飾胞嘧啶。經修飾胞嘧啶係胞嘧啶之天然存在或非天然存在之嘧啶鹼基類似物，其可替代此鹼基且不損害寡核苷酸之免疫刺激活性。經修飾胞嘧啶包括(但不限於)5-經取代胞嘧啶(例如5-甲基-胞嘧啶、5-氯-胞嘧啶、5-氟-胞嘧啶、5-溴-胞嘧啶、5-碘-胞嘧啶、5-羥基-胞嘧啶、5-羥基甲基-胞嘧啶、5-二氯甲基-胞嘧啶、及未經取代或經取代5-炔基-胞嘧啶)、6-經取代胞嘧啶、N4-經取代胞嘧啶(例如N4-乙基-胞嘧啶)、5-氮雜-胞嘧啶、2-巰基-胞嘧啶、異

胞嘧啶、假異胞嘧啶、具有稠環系統之胞嘧啶類似物(例如N,N'-丙烯胞嘧啶或吩噁嗪)、及尿嘧啶及其衍生物(例如5-氟-尿嘧啶、5-溴-尿嘧啶、5-溴乙烯基-尿嘧啶、4-硫-尿嘧啶、5-羥基-尿嘧啶、5-丙炔基-尿嘧啶)。一些較佳胞嘧啶包括5-甲基-胞嘧啶、5-氟-胞嘧啶、5-羥基-胞嘧啶、5-羥基甲基-胞嘧啶、及N4-乙基-胞嘧啶。在本發明之另一實施例中，胞嘧啶鹼基經通用鹼基(例如3-硝基吡咯、P-鹼基)、芳香族環系統(例如氟苯或二氟苯)或氫原子(d間隔區)取代。

在本發明之一些態樣中，免疫刺激性寡核苷酸可含有經修飾鳥嘌呤。經修飾鳥嘌呤係鳥嘌呤之天然存在或非天然存在之嘌呤鹼基類似物，其可替代此鹼基而不損害寡核苷酸之免疫刺激活性。經修飾鳥嘌呤包括(但不限於)7-去氮鳥嘌呤、7-去氮-7-經取代鳥嘌呤、次黃嘌呤、N2-經取代鳥嘌呤(例如N2-甲基-鳥嘌呤)、5-胺基-3-甲基-3H,6H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2,7-二酮、2,6-二胺基嘌呤、2-胺基嘌呤、嘌呤、嘧啶、腺嘌呤、經取代腺嘌呤(例如N6-甲基-腺嘌呤、8-側氧基-腺嘌呤)、8-經取代鳥嘌呤(例如8-羥基鳥嘌呤及8-溴鳥嘌呤)、及6-硫鳥嘌呤。在本發明之另一實施例中，鳥嘌呤鹼基經通用鹼基(例如4-甲基-嘧啶、5-硝基-嘧啶、及K-鹼基)、芳香族環系統(例如苯并咪唑或二氯-苯并咪唑、1-甲基-1H-[1,2,4]三唑-3-甲醯胺)或氫原子(d間隔區)取代。

在某些態樣中，寡核苷酸可包括經修飾核苷酸間鍵。該

等經修飾鍵可部分抵抗降解(例如經穩定)。「經穩定核酸分子」意指核酸分子對活體內降解(例如經由外切或內切核酸酶)具有相對強抗性。穩定性可隨長度或二級結構而變化。長度為數萬至數十萬鹼基之核酸對活體內降解之抗性相對較強。對於較短核酸而言，二級結構可穩定且增強其效應。莖環結構之形成可穩定核酸分子。例如，若核酸之3'端對上游區域具有自身互補性而使其可向後摺疊並形成莖環結構，則該核酸可變得穩定且呈現更強活性。

對於活體內應用而言，核酸較佳對降解(例如經由內切及外切核酸酶)具有相對強抗性。已證實，修飾核酸骨架可在活體內投予時增強核酸活性。諸如莖環等二級結構可穩定核酸以對抗降解。或者，核酸穩定可經由磷酸酯骨架修飾來達成。較佳之經穩定核酸具有至少部分硫代磷酸酯修飾骨架。硫代磷酸酯可使用採用胺基磷酸酯或H-膦酸酯化學物質之自動化技術來合成。芳基-及烷基-膦酸酯可如(例如)美國專利第4,469,863號中所述來製備；且烷基磷酸三酯(其中荷電氧部分如美國專利第5,023,243號及歐洲專利第092,574號中所述經烷基化)可藉由自動化固相合成使用市售試劑來製備。已闡述製備其他DNA骨架修飾及取代之方法(Uhlmann, E. 及 Peyman, A. (1990) Chem. Rev. 90:544； Goodchild, J. (1990) Bioconjugate Chem. 1:165)。具有CpG基序之2'-O-甲基核酸亦造成免疫激活，與乙氧基修飾之CpG核酸一樣。事實上，尚未發現任何骨架修飾可完全消除CpG效應，但可藉由用5-甲基C替代C來顯著降低

該效應。具有硫代磷酸酯鍵之構造提供最大活性且保護核酸免受細胞內外切及內切核酸酶降解。其他經修飾核酸包括磷酸二酯修飾核酸、磷酸二酯與硫代磷酸酯核酸之組合、甲基膦酸酯、甲基硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、p-乙氧基、及其組合。該等組合中之每一者及其對免疫細胞之特定影響就CpG核酸而言更詳細地論述於PCT公開案第WO 96/02555號及第WO 98/18810號及美國專利第6,194,388號及第6,239,116號中。據信，該等經修飾核酸由於增強之核酸酶抗性、增加之細胞攝取、增加之蛋白質結合及/或改變之細胞內定位而可顯示更強之刺激活性。

活體內投予時，核酸可與某種分子締合，該分子可導致與靶細胞(例如樹突細胞、B細胞、單核細胞及天然殺傷(NK)細胞)表面之較高親和力結合及/或提高靶細胞之細胞攝取，從而形成「核酸遞送複合物」。可使用業內熟知之技術使核酸以離子方式或共價方式與適宜分子締合。可使用多種偶合或交聯劑，例如蛋白質A、碳化二亞胺、及3-(2-吡啶基二硫)丙酸N-琥珀醯亞胺基酯(SPDP)。或者可使用熟知技術將核酸囊封於脂質體或病毒體中。

其他經穩定核酸包括(但不限於)非離子型DNA類似物，例如烷基-及芳基-磷酸酯(其中荷電膦酸酯氧經烷基或芳基替代)、磷酸二酯及烷基磷酸三酯(其中荷電氧部分經烷基化)。在一端或兩端含有二醇(例如四乙二醇或六乙二醇)之核酸亦已表現可實質上抵抗核酸酶降解。在一些實施例中，本發明免疫刺激性寡核苷酸可包括至少一種親脂性經

取代核苷酸類似物及/或嘧啶-嘌呤二核苷酸。

寡核苷酸可具有一個或兩個可及5'端。可產生具有兩個可及5'端之經修飾寡核苷酸，其係藉由(例如)經由3'-3'鍵附接兩個寡核苷酸以生成具有一個或兩個可及5'端之寡核苷酸來達成。3'-3'鍵可為磷酸二酯、硫代磷酸酯或任何其他經修飾核苷間橋。達成該等鍵之方法已為熟習此項技術者所習知。例如，該等鍵已闡述於以下文獻中：Seliger, H.等人，Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleosides & Nucleotides* (1991), 10(1-3), 469-77；及Jiang等人，Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999), 7(12), 2727-2735。

此外，可使用諸如三-或四-乙二醇磷酸酯部分等其他間隔區來製備3'端核苷之間之鍵並非磷酸二酯、硫代磷酸酯或其他經修飾橋之3'-3'連接寡核苷酸(Durand, M.等人，Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)<sub>12</sub> and two (dT)<sub>12</sub> sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* (1992), 31(38), 9197-204；美國專利第5,658,738號及美國專利第5,668,265號)。或者，非核苷酸連接體可使用標準亞磷醯胺化學自乙二醇、丙二醇或無鹼基去氧核糖(d間隔區)單元獲得(Fontanel, Marie Laurence等人，*Nucleic Acids Research* (1994), 22(11), 2022-7)。可一次或多次納入非核苷酸連接

體，或可將其彼此組合，從而使得欲連接之兩個寡核苷酸的3'端之間可存在任一期望距離。

可藉由經修飾核苷間橋來替代位於核苷3'及/或5'端之核苷間磷酸二酯橋，其中經修飾核苷間橋選自(例如)硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、 $\text{NR}_1\text{R}_2$ -胺基磷酸酯、硼烷磷酸酯、 $\alpha$ -羥基苄基磷酸酯、磷酸-( $\text{C}_1$ - $\text{C}_{21}$ )-O-烷基酯、磷酸-[( $\text{C}_6$ - $\text{C}_{12}$ )芳基-( $\text{C}_1$ - $\text{C}_{21}$ )-O-烷基]酯、( $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ )烷基磷酸酯及/或( $\text{C}_6$ - $\text{C}_{12}$ )芳基磷酸酯橋、( $\text{C}_7$ - $\text{C}_{12}$ )- $\alpha$ -羥基甲基-芳基(例如揭示於PCT公開案第WO 95/01363號中者)，其中( $\text{C}_6$ - $\text{C}_{12}$ )芳基、( $\text{C}_6$ - $\text{C}_{20}$ )芳基及( $\text{C}_6$ - $\text{C}_{14}$ )芳基視情況經鹵素、烷基、烷氧基、硝基、氰基取代且其中 $\text{R}_1$ 及 $\text{R}_2$ 彼此獨立地為氫、( $\text{C}_1$ - $\text{C}_{18}$ )-烷基、( $\text{C}_6$ - $\text{C}_{20}$ )-芳基、( $\text{C}_6$ - $\text{C}_{14}$ )-芳基、( $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ )-烷基，較佳為氫、( $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ )-烷基，較佳為( $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ )-烷基及/或甲氧基乙基，或 $\text{R}_1$ 及 $\text{R}_2$ 與攜帶其之氮原子一起形成可另外含有選自O、S及N之群之另一雜原子的5員或6員雜環。

藉由去磷橋來替代位於核苷3'及/或5'端之磷酸二酯橋(去磷橋闡述於(例如)以下文獻中：Uhlmann E.及Peyman A.，「Methods in Molecular Biology」，第20卷，「Protocols for Oligonucleotides and Analogs」，S. Agrawal編輯，Humana Press, Totowa 1993，第16章，第355頁以後)，其中去磷橋選自(例如)以下去磷橋：甲縮醛、3'-硫代甲縮醛、甲基羥胺、肟、亞甲基二甲基-亞肼基、二甲砜及/或甲矽烷基。

本發明之免疫刺激性寡核苷酸可視情況具有嵌合骨架。嵌合骨架係包含不止一種類型之鍵之骨架。在一個實施例

中，嵌合骨架可由下式表示： $5' Y_1 N_1 Z N_2 Y_2 3'$ 。Y<sub>1</sub>及Y<sub>2</sub>係具有1至10個核苷酸之核酸分子。Y<sub>1</sub>及Y<sub>2</sub>各自包括至少一個經修飾核苷酸間鍵。由於嵌合寡核苷酸中至少2個核苷酸包括骨架修飾，故該等核酸係一類「經穩定免疫刺激性核酸」之實例。

對於嵌合寡核苷酸而言，應認為Y<sub>1</sub>與Y<sub>2</sub>彼此獨立。此意指在同一分子中，Y<sub>1</sub>及Y<sub>2</sub>可各自具有或不具有彼此不同之序列及彼此不同之骨架鍵。在一些實施例中，Y<sub>1</sub>及/或Y<sub>2</sub>具有3至8個核苷酸。N<sub>1</sub>及N<sub>2</sub>係具有0至5個核苷酸之核酸分子，只要N<sub>1</sub>ZN<sub>2</sub>總共具有至少6個核苷酸即可。N<sub>1</sub>ZN<sub>2</sub>之核苷酸具有磷酸二酯骨架且不包括具有經修飾骨架之核酸。Z係免疫刺激性核酸基序，其較佳選自本文所列舉者。

式Y<sub>1</sub>N<sub>1</sub>ZN<sub>2</sub>Y<sub>2</sub>之中心核苷酸(N<sub>1</sub>ZN<sub>2</sub>)具有磷酸二酯核苷酸間鍵，且Y<sub>1</sub>及Y<sub>2</sub>具有至少一個經修飾核苷酸間鍵，但可能具有不止一個經修飾核苷酸間鍵，或甚至可具有所有經修飾核苷酸間鍵。在較佳實施例中，Y<sub>1</sub>及/或Y<sub>2</sub>具有至少兩個或2個至5個經修飾核苷酸間鍵，或Y<sub>1</sub>具有5個經修飾核苷酸間鍵且Y<sub>2</sub>具有2個經修飾核苷酸間鍵。在一些實施例中，經修飾核苷酸間鍵係硫代磷酸酯修飾鍵、二硫代磷酸酯鍵或p-乙氧基修飾鍵。

核酸亦包括骨架糖共價附接至除2'位之羥基及5'位之磷酸酯基團以外的低分子量有機基團之核酸。因此，經修飾核酸可包括2'-O-烷基化核糖基團。此外，經修飾核酸可包

括諸如阿拉伯糖或2'-氟阿拉伯糖等糖來代替核糖。因此，各核酸可具有不同骨架組成，由此含有任何可能組合之連接在一起之聚合物單元，例如肽-核酸(其具有胺基酸骨架及核酸鹼基)。在一些實施例中，各核酸具有相同骨架組成。

糖磷酸酯骨架(即，糖磷酸酯骨架由糖磷酸酯單元組成)之糖磷酸酯單元(即 $\beta$ -D-核糖與核苷間磷酸二酯橋一起形成糖磷酸酯單元)可由另一單元替代，其中該另一單元適於例如構建「嗎啉基-衍生物」寡聚物(如(例如)Stirchak E. P.等人，(1989) *Nucleic Acid Res.* 17:6129-41中所述)，即，例如，由嗎啉基-衍生物替代；或構建聚醯胺核酸(「PNA」；如(例如)Nielsen P. E.等人，(1994) *Bioconjug. Chem.* 5:3-7中所述)，例如，由PNA骨架單元、例如2-胺基乙基甘胺酸替代。寡核苷酸可具有其他碳水化合物骨架修飾及替代，例如具有磷酸酯基團之肽核酸(PHONA)、鎖核酸(LNA)、及骨架區段具有烷基連接體或胺基連接體之寡核苷酸。烷基連接體可具有支鏈或無支鏈，經取代或未經取代，且為對掌性純或外消旋混合物。

$\beta$ -核糖單元或 $\beta$ -D-2'去氧核糖單元可由經修飾糖單元來替代，其中該經修飾糖單元選自(例如) $\beta$ -D-核糖、 $\alpha$ -D-2'-去氧核糖、L-2'-去氧核糖、2'-F-2'-去氧核糖、2'-F-阿拉伯糖、2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基-核糖，較佳2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基-核糖係2'-O-甲基核糖、2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烯基-核糖、2'-[O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基]-核糖、2'-NH<sub>2</sub>-2'-去氧核糖、 $\beta$ -D-木-呋

喃糖、 $\alpha$ -阿拉伯呔喃糖、2,4-二去氧- $\beta$ -D-赤蘚-己-吡喃糖、及碳環(例如 Froehler J. (1992) *Am. Chem. Soc.* 114:8320 中所述)及/或開鏈糖類似物(例如 Vandendriessche 等人(1993), *Tetrahedron* 49:7223 中所述)及/或二環糖類似物(例如 Tarkov M. 等人(1993), *Helv. Chim. Acta.* 76:481 中所述)。

在一些實施例中，糖係 2'-O-甲基核糖，對於一個或兩個藉由磷酸二酯或磷酸二酯樣核苷間鍵連接之核苷酸而言尤其如此。

本發明寡核苷酸可使用多種業內熟知程序中之任一種來從頭合成。例如，b-氰基乙基亞磷醯胺方法(Beaucage, S. L. 及 Caruthers, M. H., (1981) *Tet. Let.* 22:1589)；核苷 H-磷酸酯方法(Garegg 等人，(1986) *Tet. Let.* 27:4051-4054；Froehler 等人，(1986) *Nucl. Acid Res.* 14:5399-5407；Garegg 等人，(1986) 27:4055-4058；Gaffney 等人，(1988) *Tet. Let.* 29:2619-2622)。該等化學方法可藉由多種市售自動化核酸合成儀來實施。該等寡核苷酸稱作合成寡核苷酸。或者，可在質粒中大規模製造富含 T 之核酸及/或 TG 二核苷酸(參見 Sambrook T. 等人，「*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*」，Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989)，並將其分離成較小部分或以完整形式投予。可自現有核酸序列(例如基因組 DNA 或 cDNA)使用已知技術來製備核酸，例如彼等採用限制性酶、外切核酸酶或內切核酸酶之技術。

諸如硫代磷酸酯等經修飾骨架可使用採用胺基磷酸酯或H-磷酸酯化學物質之自動化技術來合成。芳基-及烷基-磷酸酯可如(例如)美國專利第4,469,863號中所述來製備，且烷基磷酸三酯(其中荷電氧部分係如美國專利第5,023,243號中所述來烷基化)可藉由自動化固相合成使用市售試劑來製備。已闡述製備其他DNA骨架修飾及取代之方法(例如Uhlmann, E.及Peyman, A., Chem. Rev. 90:544, 1990; Goodchild, J., Bioconjugate Chem. 1:165, 1990)。

以此方式製備之核酸稱為分離核酸。「分離核酸」通常係指與一起自細胞、自細胞核、自線粒體或自染色質分離之組份及任何其他可視作雜質之組份分開之核酸。

在一些實施例中，可按照熟習此項技術者所習知之方法(參見例如PCT公開案第WO 03/024480號)將含CpG寡核苷酸與免疫原性載體簡單地混合。在本發明之其他實施例中，可將含CpG寡核苷酸封裝於VLP內(參加例如PCT公開案第WO 03/024481號)。

在本發明上下文中佐劑之實例包括明礬；含CpG寡核苷酸，例如CpG 7909、CpG 10103及CpG 24555；及基於皂苷之佐劑，例如免疫刺激複合物基質，其可單獨或組合使用。

因此，本發明提供包含抗原tau肽及至少一種佐劑之免疫原性組合物，該抗原tau肽較佳包含選自由SEQ ID NO: 1至26、31至76及105至122組成之群的胺基酸序列。該抗原tau肽較佳連接至免疫原性載體，較佳地連接至VLP，更佳

地連接至 HBsAg、HBcAg 或 Qbeta VLP。在一個實施例中，該佐劑係基於皂苷之佐劑，較佳為免疫刺激複合物基質。在另一實施例中，該佐劑係明礬。在又一實施例中，該佐劑係含 CpG 寡核苷酸。較佳地，該佐劑係 CpG 7909 或 CpG 10103。更佳地，該佐劑係 CpG 24555。

在又一實施例中，該至少一種佐劑包含兩種佐劑，其較佳選自由下列組成之群：明礬、基於皂苷之佐劑及含 CpG 寡核苷酸。在一較佳實施例中，該等佐劑係明礬及含 CpG 寡核苷酸，較佳為 CpG 7909，較佳為 CpG 10103，更佳為 CpG 24555。在另一較佳實施例中，該等佐劑係基於皂苷之佐劑，較佳為免疫刺激複合物基質；及含 CpG 寡核苷酸，較佳為 CpG 7909，較佳為 CpG 10103，更佳為 CpG 24555。在另一較佳實施例中，該等佐劑係明礬及基於皂苷之佐劑，較佳為免疫刺激複合物基質。

在又一實施例中，該至少一種佐劑包含三種佐劑，其較佳選自由下列組成之群：明礬；基於皂苷之佐劑，較佳為免疫刺激複合物基質；及含 CpG 寡核苷酸，例如 CpG 7909、CpG 10103 及 CpG 24555。

#### 調配物

本發明亦提供包含本發明抗原 tau 肽或其免疫原性組合物之醫藥組合物，其呈與一或多種醫藥上可接受之賦形劑之調配物形式。術語「賦形劑」在本文中用以描述除活性成份以外的任何成份，活性成份即為最終偶合至免疫原性載體且視情況與一或多種佐劑組合之本發明抗原 tau 肽。

對賦形劑之選擇在很大程度上取決於(例如)以下因素：具體投予方式、賦形劑對溶解性及穩定性之影響、及劑型之性質。本文所用之「醫藥上可接受之賦形劑」包括任何及所有生理上相容之溶劑、分散介質、塗佈劑、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲劑及吸收延遲劑、及諸如此類。醫藥上可接受之賦形劑之一些實例係水、鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及諸如此類、以及其組合。在許多情形下，較佳將等滲劑，例如，糖、多元醇(例如，甘露醇、山梨醇)或氯化鈉納入組合物中。醫藥上可接受之物質的其他實例係潤濕劑或少量輔助物質，諸如潤濕或乳化劑、防腐劑或緩衝劑，其可延長活性成份之存架壽命或增強其效力。

本發明之醫藥組合物及其製備方法易於為熟習此項技術者所瞭解。該等組合物及其製備方法可參見(例如) Remington's Pharmaceutical Sciences，第19版(Mack出版公司，1995)。醫藥組合物較佳在GMP條件下製造。

本發明之醫藥組合物可以散裝形式、作為單一單位劑量或作為複數個單一單位劑量加以製備、包裝或出售。本文所用之「單位劑量」係包含預定量活性成份之醫藥組合物的離散量。活性成份之量通常等於擬投予個體之活性成份的劑量或此一劑量之適宜分數(例如，此一劑量的二分之一或三分之一)。

本發明之醫藥組合物通常適於非經腸投予。本文所用之醫藥組合物之「非經腸投予」包括特徵在於個體組織之物

理破裂及通過組織中之裂口投予醫藥組合物，由此通常直接投予至血流、肌肉或內臟器官中的任何投予途徑。因此，非經腸投予包括(但不限於)藉由注射組合物、藉由通過外科切口施用組合物、藉由通過穿透組織之非外科傷口施用組合物及諸如此類等方式投予醫藥組合物。具體而言，預期非經腸投予包括(但不限於)皮下、腹膜腔內、肌內、胸骨內、靜脈內、動脈內、鞘內、心室內、尿道內、顱內、滑膜內注射或輸注；及腎透析輸注技術。較佳實施例包括靜脈內、皮下、皮內及肌內途徑。

適於非經腸投予之醫藥組合物的調配物通常包含活性成份與醫藥上可接受之載劑(例如無菌水或無菌等滲鹽水)之組合。該等調配物可以適於濃注投予或持續投予之形式加以製備、包裝或出售。可注射調配物可以存於例如含有防腐劑之安瓿或多劑量容器中之單位劑型加以製備、包裝或出售。用於非經腸投予之調配物包括(但不限於)存於油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液、乳液、糊劑及諸如此類。該等調配物可進一步包含一或多種其他成份，包括但不限於懸浮劑、穩定劑或分散劑。在用於非經腸投予之調配物的一個實施例中，活性成份係以乾燥(即粉末或顆粒)形式提供以使用適宜媒劑(例如無菌無熱原水)進行重構，隨後非經腸投予重構之組合物。非經腸調配物亦包括水性溶液，其可含有賦形劑(例如鹽、碳水化合物)及緩衝劑(較佳至3至9之pH)，但對於一些應用，可能更適合將其調配成無菌非水性溶液或調配成乾燥形式以同適宜媒劑(例如無

菌無熱原水)結合使用。實例性非經腸投予形式包括存於無菌水性溶液(例如，水性丙二醇或右旋糖溶液)中之溶液或懸浮液。若需要，該等劑型可適當地進行緩衝。其他可用之可非經腸投予之調配物包括包含呈微晶形式或脂質體製劑形式之活性成份的調配物。用於非經腸投予之調配物可經調配而能夠直接釋放及/或改良釋放。改良釋放調配物包括延遲釋放、持續釋放、脈衝釋放、受控釋放、靶向釋放及程式性釋放。

例如，在一個態樣中，無菌可注射溶液可藉由將所需量的抗原tau肽(較佳偶合至免疫原性載體，最終與一或多種佐劑組合)納入於視需要含有一種上文所列舉成份或各成份組合之合適溶劑中隨後進行無菌過濾來製備。通常，可藉由將活性化合物納入於含有基本分散介質及所需的選自上文所列舉成份之其他成份的無菌媒劑中來製備分散液。對於使用無菌粉末來製備無菌可注射溶液來說，較佳之製備方法是真空乾燥及冷凍乾燥，此可產生由活性成份及任何所需附加成份(來自其先前經無菌過濾之溶液)構成之粉末。可藉由(例如)使用諸如卵磷脂等包衣、藉由保持所需粒徑(對於分散液來說)以及藉由使用表面活性劑來保持溶液之適當流動性。可藉由將可延遲吸收之試劑(例如，單硬脂酸鹽及明膠)納入於組合物中來延長可注射組合物之吸收。

本發明之實例性非限制性醫藥組合物係呈無菌水性溶液形式之調配物，該無菌水性溶液之pH介於約5.0至約6.5之

間且包含約1 mg/mL至約200 mg/mL之本發明肽、約1毫莫耳至約100毫莫耳組胺酸緩衝劑、約0.01 mg/mL至約10 mg/mL聚山梨酯80、約100毫莫耳至約400毫莫耳海藻糖及約0.01毫莫耳至約1.0毫莫耳二水EDTA二鈉。

本發明之抗原tau肽亦可以下列方式來投予：經鼻內或藉由吸入，通常以乾燥粉末形式(單獨、作為混合物、或作為混合組份顆粒，例如，與適宜的醫藥上可接受之賦形劑混合)自乾燥粉末吸入器投予；作為氣溶膠噴霧自加壓容器、幫浦、噴射器、霧化器(較佳係使用電流體動力學以生成細霧之霧化器)、或噴霧器投予(其中使用或不使用適宜推進劑)；或作為滴鼻劑。

該加壓容器、幫浦、噴射器、霧化器或噴霧器通常含有本發明組合物之溶液或懸浮液，本發明組合物包含(例如)適宜的分散劑、增溶劑或延長活性物質釋放之試劑、及推進劑作為溶劑。

在乾燥粉末或懸浮液調配物中使用之前，通常將藥品微粉化至適於藉由吸入遞送之大小(通常小於5微米)。此可藉由任一適宜粉碎方法來達成，例如螺旋噴射研磨、流化床噴射研磨、超臨界流體處理以形成奈米粒子、高壓均質化或噴霧乾燥。

用於吸入器或吹入器中之膠囊、泡罩及藥筒可經調配而含有本發明化合物、適宜粉末基質及性能改良劑之粉末混合物。

適用於使用電流體動力學以生成細霧之霧化器之溶液調

配物每次噴射可含有適宜劑量之本發明之抗原tau肽，且噴射體積可在例如1 µl至100 µl間變化。

可將適宜矯味劑(例如薄荷醇及左薄荷醇)或甜味劑(例如糖精或糖精鈉)添加至彼等意欲用於吸入/鼻內投予之本發明調配物中。

用於吸入/鼻內投予之調配物可經調配而能夠直接釋放及/或改良釋放。改良釋放調配物包括延遲釋放、持續釋放、脈衝釋放、受控釋放、靶向釋放及程式性釋放。

在乾燥粉末吸入劑及氣溶膠之情形下，劑量單位係藉助遞送計量量之閥來確定。本發明之單位通常經設置以投予計量劑量或「噴霧量(puff)」之本發明組合物。總日劑量通常以單次劑量或更通常地以分次劑量全天投予。

包含抗原tau肽之醫藥組合物亦可調配用於口服途徑投予。口服投予可包括吞嚥(以使化合物進入胃腸道)及/或口腔、舌或舌下投予(藉此，該化合物可直接自口腔進入血流)。

適於口服投予之調配物包括固體、半固體及液體系統(例如，錠劑)；含有多顆粒或奈米顆粒、液體或粉末之軟質或硬質膠囊；糖錠(包括填充有液體者)；咀嚼錠；凝膠劑；快速分散劑型；薄膜；陰道錠；噴霧劑；及口腔/黏膜黏著性貼片。

液體調配物包括懸浮液、溶液、糖漿劑及醃劑。該等調配物可作為軟質或硬質膠囊(例如，由明膠或羥丙基甲基纖維素製成)內的填充劑使用，且通常包含載劑(例如，

水、乙醇、聚乙二醇、丙二醇、甲基纖維素或適宜油)及一或多種乳化劑及/或懸浮劑。液體調配物亦可藉由(例如)對藥袋中之固體實施重構來製得。

### 劑量

本發明組合物可用於治療、減輕或預防個體之tau相關病症或症狀，該個體具有患該病症或症狀之風險或患有該病症或症狀，此藉由實施免疫療法刺激該個體中之免疫應答來進行。免疫療法可包含初始免疫及隨後的額外(例如一次、兩次、三次或更多次)加強免疫。

本發明抗原tau肽或其組合物之「免疫有效量」係以單次劑量或作為一系列之一部分遞送至哺乳動物個體以在該個體中有效誘導對抗致病形式之tau之免疫應答的量。該量端視以下因素而有所變化：所治療個體之健康及身體狀況、所治療個體之分類學群組、個體免疫系統引發體液及/或細胞免疫應答之能力、疫苗調配物及其他相關因素。預期該量在相對較寬之範圍內，且該範圍可通過合適試驗來確定。

「醫藥有效劑量」或「治療有效劑量」係治療或預防、或減輕個體之一或多種tau相關病症或症狀所需要的劑量。醫藥有效劑量可端視以下因素而定：投予之特定化合物、症狀之嚴重程度、個體對副作用之感受性、疾病類型、所使用之組合物、投予途徑、所治療哺乳動物之類型、所考慮特定哺乳動物之身體特徵，例如健康及身體狀況、同時實施之藥物治療、個體免疫系統之能力、所期望

之保護程度及彼等熟習醫學人員認識到的其他因素。出於預防目的，將典型疫苗中誘導免疫保護性應答而無明顯不利副作用之量選擇作為每一劑量中肽的量。初始疫苗接種後，個體可以適當間隔接受一或數次加強免疫。

應瞭解，用於任何特定患者之特定劑量應端視多種因素而定，所述因素包括所用具體化合物之活性、年齡、體重、總體健康狀況、性別、飲食、投予時間、投予途徑、排泄速率、藥物組合及經受療法之特定疾病的嚴重程度。

例如，本發明之抗原tau肽(偶合至免疫原性載體)可以以下劑量投予至個體：每次約0.1  $\mu\text{g}$ 至約200 mg，例如，約0.1  $\mu\text{g}$ 至約5  $\mu\text{g}$ 、約5  $\mu\text{g}$ 至約10  $\mu\text{g}$ 、約10  $\mu\text{g}$ 至約25  $\mu\text{g}$ 、約25  $\mu\text{g}$ 至約50  $\mu\text{g}$ 、約50  $\mu\text{g}$ 至約100  $\mu\text{g}$ 、約100  $\mu\text{g}$ 至約500  $\mu\text{g}$ 、約500  $\mu\text{g}$ 至約1 mg、約1 mg至約10 mg、約10 mg至約50 mg、或約50 mg至約200 mg，且視情況在例如1週、2週、3週、4週、2個月、3個月及/或1年後給與加強免疫。在一些實施例中，每一劑量之抗原tau肽的量係基於單位體重來確定。例如，在一些實施例中，抗原肽係以下列量投予：每一劑量約0.5 mg/kg至約100 mg/kg，例如，約0.5 mg/kg至約1 mg/kg、約1 mg/kg至約2 mg/kg、約2 mg/kg至約3 mg/kg、約3 mg/kg至約5 mg/kg、約5 mg/kg至約7 mg/kg、約7 mg/kg至約10 mg/kg、約10 mg/kg至約15 mg/kg、約15 mg/kg至約20 mg/kg、約20 mg/kg至約25 mg/kg、約25 mg/kg至約30 mg/kg、約30 mg/kg至約40 mg/kg、約40 mg/kg至約50 mg/kg、約50 mg/kg至約60

mg/kg、約 60 mg/kg 至約 70 mg/kg、約 70 mg/kg 至約 80 mg/kg、約 80 mg/kg 至約 90 mg/kg、或約 90 mg/kg 至約 100 mg/kg、或大於約 100 mg/kg。

在一些實施例中，投予本發明抗原 tau 肽之單一劑量。在其他實施例中，投予本發明抗原 tau 肽之多次劑量。投予頻率可端視以下多種因素中之任一因素而有所變化：例如，症狀之嚴重程度、所期望之免疫保護程度、組合物是用於預防抑或治癒目的等。例如，在一些實施例中，本發明抗原 tau 肽係以下列頻率投予：一個月一次、一個月兩次、一個月三次、每隔一週一次 (qow)、一週一次 (qw)、一週兩次 (biw)、一週三次 (tiw)、一週四次、一週五次、一週六次、每隔一天一次 (qod)、一天一次 (qd)、一天兩次 (qid) 或一天三次 (tid)。當本發明組合物係用於預防目的時，其通常以初免劑量 (priming dose) 及加強劑量來投予。預期加強劑量會適當地間隔開，或較佳地一年給與一次，或者在循環抗體之含量降低至期望含量以下時給與。加強劑量可由不存在最初免疫原性載體分子之抗原 tau 肽組成。該等加強構建體可包含替代的免疫原性載體或可不含任何載體。所調配之該等加強組合物可含有或不含佐劑。

本發明抗原 tau 肽之投予持續時間 (例如，投予抗原 tau 肽所經歷之時間段) 可端視多種因素中之任一因素而變化：例如，患者應答等。例如，抗原 tau 肽可經以下時間段來投予：約 1 天至約 1 週、約 2 週至約 4 週、約 1 個月至約 2 個月、約 2 個月至約 4 個月、約 4 個月至約 6 個月、約 6 個月至

約8個月、約8個月至約1年、約1年至約2年、或約2年至約4年、或更長時間。

#### 用途及治療方法

本發明亦涵蓋包含投予本發明抗原tau肽之各種治療方法。治療方法包括在個體中誘導對抗致病形式之自身tau之免疫應答的方法以及預防、減輕或治療個體之tau相關病症或症狀的方法。

在一個態樣中，本發明提供治療、預防或減輕個體之tau相關病症或症狀的方法，其包含向該個體投予治療有效量之本發明抗原tau肽或其免疫原性組合物或醫藥組合物。

在另一態樣中，本發明提供在個體中誘導對抗致病形式之自身tau之免疫應答的方法，其包含向該個體投予治療或免疫原性有效量之本發明抗原tau肽或其免疫原性組合物或醫藥組合物。

「治療(treat、treating及treatment)」係指減輕或消除生物學病症及/或至少一種其伴隨症狀之方法。本文所用之「減輕」疾病、病症或病狀意指降低疾病、病症或病狀之症狀的嚴重程度及/或發生頻率。此外，在本文中提及「治療」包括提及治癒性、緩和性及預防性治療。該個體較佳為人類，且可為任何年齡之男性或女性。

本發明之其他態樣係關於本發明抗原tau肽或其免疫原性組合物或醫藥組合物用作藥劑，較佳用於治療tau相關病症。

在再一態樣中，本發明提供本發明抗原tau肽或其免疫原性組合物或醫藥組合物用以製造較佳用於治療tau相關病症之藥劑的用途。

本發明將藉由以下實例進一步闡述，且不應將其視為進一步限制。本發明通篇所引用之所有圖及所有參考文獻、專利及公開之專利申請案之全部內容明確地以引用方式併入本文中。

### 實例

已經努力確保所用數字(例如量、溫度等)之精確性，但應計及一些實驗誤差及偏差。除非另有說明，否則份數係重量份數，分子量係重量平均分子量，溫度係以攝氏度計，且壓力係大氣壓力或接近大氣壓力。如下文實例中所使用，以下縮寫具有以下含義，且除非另有說明，其均可容易地自商業供應商購得：DMF：二甲基甲醯胺；TFA：三氟乙酸；TIPS：三異丙基甲矽烷基三氟甲磺酸鹽；TCEP：叁(2-羧基乙基)膦；mcKLH：海水養殖之鑰孔戚血藍蛋白；HBTU：六氟磷酸O-苄并三唑-N,N,N'-四甲基-脲鎘鹽；EDTA：乙二胺四乙酸；DMSO：二甲基亞砜。

#### 實例1：Qbeta質粒構建

天然Qbeta外殼蛋白：藉由DNA 2.0 (DNA 2.0, Menlo Park, CA)來合成對應於Qbeta外殼蛋白核苷酸1304至1705(來自GenBank登記號AY099114)之編碼序列。包括引入NcoI位點之5'修飾(CCatgg)及引入兩個終止密碼子及XhoI位點之3'修飾(gtaTTAATGACTCGAG-SEQ ID NO:

78)。

密碼子優化之Qbeta外殼蛋白：亦使用Gene Designer針對表現對Qbeta外殼蛋白編碼序列進行優化(Villalobos等人，BMC Bioinformatics 7:285 (2006))。將相同的5'及3'修飾納入至密碼子優化之Qbeta外殼蛋白中。

利用習用DNA亞選殖方法(包括限制酶切消化及連接反應)將天然及密碼子優化之Qbeta外殼蛋白序列引入pET28表現載體中。

### 實例2：合成Tau肽之製備

如下製備Tau肽(稱為A-1至A-11；B-1至B-6；C-1至C-5；D-1；E-1及F1；以及該等肽之磷酸化形式-表示為A-1P、A-2P、A-3P等)，該等肽係如SEQ ID NO. 31-76、105-107中所示及如下表5中所顯示，表5中亦顯示以下所有實例中所用之其對應名稱。含有連接體序列(CGG或GGC)之磷酸化或未磷酸化tau肽的合成係使用固相合成技術在Symphony肽合成儀(Protein Technologies公司)上實施。使用經單保護之胺基酸Fmoc-Ser[PO(O-Bzl)OH]-OH、Fmoc-Thr[PO(O-Bzl)OH]-OH及Fmoc-Tyr[PO(O-Bzl)OH]-OH(EMD Chemicals公司)將磷酸絲胺酸、磷酸蘇胺酸及磷酸酪胺酸納入於磷酸化形式之序列中。藉由使含有第一胺基酸之NovaSyn TGA樹脂(EMD Chemicals公司)與6.25倍過量之經Fmoc保護之第二胺基酸(1 mmol)(使用1 mmol HBTU激活1小時)混合來開始反應。對於每一胺基酸，偶合反應均重複一次。在存於DMF中之20%六氫吡啶中經2×5分鐘移除

Fmoc基團。藉由將樹脂與5 mL含有2.5% TIPS及2.5% 苯甲硫醚之TFA溶液在室溫下一起培育3小時自樹脂釋放合成的肽。在過濾、二乙醚調介之沉澱及真空乾燥後，回收粗肽。在配備有BEH 130製備型C18管柱之反相HPLC (Waters 2525 Binary Gradient Module)上對肽實施純化。流動相由存於水中之0.1% TFA(作為緩衝液A)及存於乙腈中之0.1% TFA(作為緩衝液B)組成。將所收集的含有肽之流份組合並在真空中凍乾。自典型注射100 mg粗肽純化得到約20 mg肽，其中純度高於95%。利用LC-MS驗證所有純化肽。

以類似方式合成及純化其他tau肽(SEQ ID: 108-122)。

### 實例3：Qbeta-VLP：表現、純化及與tau肽之偶聯

Qbeta於大腸桿菌中之表現：將含有Qbeta cDNA之質粒pET28轉化至大腸桿菌BL21 (DE3)感受態細胞中。將單一集落接種於5 mL含有50 µg/mL卡那黴素(kanamycin)之2xYT培養基中，在37°C下保持過夜。將過夜接種物稀釋於500 mL含有50 µg/mL卡那黴素之TB培養基中，在37°C下於250 rpm下生長至0.8 OD600，並使用0.4 mM IPTG(異丙基β-D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷)誘導過夜。藉由在2500 RCF下離心15分鐘來收穫細胞。將細胞沉澱物儲存於-80°C下。

自大腸桿菌純化Qbeta VLP：所有純化步驟均在4°C下實施。將表現Qbeta之細胞沉澱物再懸浮於含有25 mM Tris pH 8.0、150 mM NaCl、5 mM EDTA、0.1% Triton-100且

補加有蛋白酶抑制劑混合液(Roche)之裂解緩衝液中。使再懸浮溶液通過微射流均質機(Microfluidics公司)，隨後超速離心。藉由添加硫酸銨至50%飽和、隨後在15,000 RCF下離心30分鐘使蛋白質沉澱。將沉澱物再懸浮並於含有25 mM Hepes pH 7.5、100 mM NaCl、1 mM EDTA之緩衝液中於4°C下透析過夜。離心所透析的溶液，並隨後加載至在25 mM HEPES pH 7.5、100 mM NaCl、1 mM EDTA中平衡之Capto Q管柱(GE)中。洗滌管柱並以存於含有25 mM HEPES pH 7.5、1 mM EDTA之緩衝液中之100 mM NaCl至1 M NaCl的梯度運行。使用SDS-PAGE鑒定Qbeta蛋白質。將含有Qbeta之流份在10 mM磷酸鉀pH 7.4、150 mM KCl中透析過夜，並加載至羧基磷灰石管柱(II型，Bio-Rad公司)中。洗滌管柱，並使用自100%之含有10 mM磷酸鉀pH 7.5、150 mM KCl之緩衝液至100%之含有500 mM磷酸鉀pH 7.5、0.5 M KCl之緩衝液的梯度進行溶析。集中含有Qbeta之流份，透析，並加載至在25 mM Tris-Cl pH 8.0、150 mM NaCl、0.7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中平衡之苯基管柱中。使用自100%之含有25 mM Tris-Cl pH 8.0、150 mM NaCl、0.7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>之緩衝液至100%之含有25 mM Tris-Cl pH 8.0、50 mM NaCl之緩衝液的梯度溶析蛋白質。集中含有純淨Qbeta之流份，並在PBS中於4°C下透析過夜。藉由Bradford分析來測定蛋白質之濃度。

tau肽與Qbeta VLP之偶合：藉助雙功能交聯劑SMPH(琥珀醯亞胺基-6-[β-馬來醯亞胺基丙醯胺基]己酸酯)(Thermo

Scientific)來調介tau肽與Qbeta-VLP之偶合(Freer等人, Virology 322(2):360-369 (2004))。將肽以10 mg/mL溶解於含有5 mM EDTA之PBS (Invitrogen) (pH 7.0)中,並藉由與固定的TCEP二硫化物還原凝膠以等體積在室溫下一起培育1小時來還原。藉由在1000 × g下離心2分鐘來回收肽溶液。藉由將存於PBS (Invitrogen)中之2 mg/mL Qbeta-VLP蛋白質與存於DMSO中之7 mM SMPH在室溫下一起培育1小時來將前者激活。藉由以1000× g經2分鐘通過Zeba除鹽離心柱(Desalt Spin column) (Thermo Scientific)來除去衍生化VLP中之鹽分。將激活之VLP溶液與10倍莫耳過量之還原肽在室溫下混合2至3小時。濃縮反應混合物,並在PBS或25 mM組胺酸pH 7.4(含有50 mM NaCl)中於4°C下透析過夜。利用Thermo Scientific之Coomassie Plus蛋白質分析來測定蛋白質之濃度。

#### 實例4：肽-KLH偶聯物之製備

使含有CGG連接體之tau肽A-1P (SEQ ID NO:31)偶聯至mκKLH(Thermo Scientific, 目錄號為77605)以評估其在小鼠中之免疫原性。藉助雙功能交聯劑SMPH(琥珀醯亞胺基-6-[β-馬來醯亞胺基丙醯胺基]己酸酯)(Thermo Scientific)來調介偶聯。以存於含有5 mM EDTA之PBS pH 7.0中的10 mg/mL之A-1P肽首先使用等體積的固定化TCEP二硫化物還原凝膠,藉由在室溫下攪動1小時進行處理。藉由在1000 × g下離心2分鐘,回收肽溶液。由存於PBS中之10 mg/mL KLH與200 μL存於DMSO中之100 mM SMPH在

室溫下一起培育1小時，將KLH激活。使反應混合物通過Zeba除鹽離心管柱(Zeba Desalt Spin column, Thermo Scientific)。隨後將所收集之衍生化KLH與還原A-1P在室溫下混合2小時。將反應混合物在含有0.6 M NaCl之PBS中於4°C下透析過夜。利用Thermo Scientific之Coomassie Plus蛋白質分析法測定蛋白質之濃度。

#### 實例5：針對免疫原性及B細胞記憶之肽免疫研究

進行實驗，以測定示於表5之所選肽是否具有免疫原性並確定是否產生免疫記憶。在第0天使用肽或偶聯至Qbeta VLP之肽，對每組3隻Balb/c小鼠進行初免，並在第14天及第101天加強免疫，但是一些小鼠僅在第101天進行初免，如圖1A、1B及2中所示。在第28、101、104、108及115天採集血清。在第94天採集所選小鼠之血清。利用抗原特異性滴度測定分析(如實例13中所述)分析免疫動物之抗體應答。

抗原特異性IgG滴度結果概述於圖1B中，其利用第28天之血清試樣顯示該等肽具有免疫原性。該研究顯示，當使用TiterMax Gold(Alexis Biochemicals)作為佐劑進行免疫時，肽A-1、A-1P、B-1P及C-1P具有免疫原性。使用A-1P肽及TiterMax Gold或使用偶聯至Qbeta-VLP之A-1P初免，隨後在第14天使用A-1P-Qbeta-VLP加強免疫，產生之抗體滴度大於A-1P TiterMax初免加強群組。使用偶聯至KLH之A-1P(如實例4中所述來製備)作為佐劑初免並在第14天加強免疫時，所產生之抗體滴度亦大於A-1P TiterMax初免加

強群組。

亦檢測用於免疫之磷酸化肽(A-1P、B-1P、D-1P、C-1P)或未磷酸化肽(A-1)所引發抗體之選擇性。其作法係比較用於免疫之每一種肽之磷酸化及未磷酸化形式之抗體滴度(參見圖1B)。計算特異性滴度對非特異性滴度之比值。在此實驗中，對抗A-1之抗體應答(群組1)對為動物免疫接種之肽之磷酸化狀態具有選擇性(小於0.1倍)，而對抗C-1P之抗體(群組5)似乎具有選擇性(C-1P/C-1滴度比值大於7)。群組2(A-1P)不具有選擇性。

顯示A-1P B細胞記憶回憶應答之結果顯示於圖2中。將群組A(使用A-1P與TiterMax初免，使用A-1P-Qbeta-VLP加強免疫)及群組B(使用A-1P-Qbeta-VLP初免及加強免疫)與群組C進行比較，群組C在第101天使用偶聯至Qbeta-VLP之A-1P初免。所有三個群組均具有IgM應答。於第101天加強免疫之兩個群組中，在第104天檢測到IgG，但對於在第101天初免之群組直至初免後第7天才檢測到。第104天之滴度大於第94天之滴度。第7天及第14天之IgG滴度亦大於第101天初免群組(群組C)。在第108天及第115天群組A及B之IgG滴度相同，而群組C之IgG滴度直至第115天才達到峰值。該等數據表明長期抗體應答及B細胞記憶回憶。

#### 實例6：針對免疫原性之肽初免及肽-VLP加強免疫研究

實施實驗以測定當使用以明礬( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ；鋁膠2%「85」，Brenntag Biosector)作為佐劑之肽初免、隨後使用

偶聯至 Qbeta-VLP 之肽加強免疫來進行免疫時表 5 中之所選肽是否具有免疫原性。如圖 3 中所示，在第 0 天使具有 4 隻 Balb/c 小鼠之群組初免，並在第 28 天及第 56 天加強免疫。在第 70 天採集血清。利用抗原特異性滴度測定分析(如實例 13 中所述)對免疫動物之抗體應答進行研究。

結果概述於圖 3 中。在群組 1-6 中，在所測試之最大稀釋度(1:1,749,600)下檢測到對抗用於免疫之肽之 IgG 抗體，表明對免疫肽抗原具有穩健之抗體應答。在未經治療群組(群組 7)中未檢測到抗體。藉由使用肽 D-1P 及 C-1P 免疫而產生之抗體識別肽 E-1P。肽 D-1P 及 C-1P 完全包含於 E-1P 中。

檢測用於免疫之磷酸化肽(A-1P、B-1P、D-1P、C-1P、E-1P)或未磷酸化肽(A-1)所引發抗體之選擇性。此藉由測定磷酸化肽之未磷酸化形式與未磷酸化肽之磷酸化形式的抗體滴度來實施(參見圖 3)。計算特異性滴度對非特異性滴度之比。在此實驗中，對抗 D-1P(群組 4)、C-1P(群組 5)及 E-1P(群組 6)之抗體對磷酸化狀態之肽(使用其對動物進行免疫)具有選擇性(滴度比大於 10)。

#### 實例 7：針對免疫原性之肽-VLP 免疫研究

實施實驗以測定當使用各種佐劑以 Qbeta-VLP 偶聯物進行免疫時表 5 中之所選肽及肽組合是否具有免疫原性。如圖 4 中所示，在第 0 天使具有 4 隻 TG4510+/+(轉基因雙陽性，參見 Ramsden 等人，J. Neuroscience 25(46):10637 (2005))或 TG4510 -/-(野生型同窩對照)小鼠之群組初免，

並在第56天及第28或29天加強免疫。在第63天採集血清。利用如實例13中所述之抗原特異性IgG滴度測定分析對免疫動物之抗體應答進行研究。

第63天之試樣結果概述於圖4中。在每一群組中，以介於 $7.7E+04$ 至 $1.58E+06$ 範圍內之平均滴度檢測到對抗用於免疫之肽或肽組合之抗體(IgG)。使用三種肽-Qbeta-VLP偶聯物以 $100\ \mu\text{g}$ 或 $10\ \mu\text{g}$ 之組合進行免疫各自引發之滴度與單獨使用 $100\ \mu\text{g}$ 肽-Qbeta-VLP偶聯物進行免疫所引發之滴度類似。組合投藥群組1及2之A-1P、B-1P及C-1P滴度係相關單一投藥群組(群組3、4及5)之滴度的1.7至4.4倍。組合投藥群組11及12之A-1P、B-1P及C-1P滴度係相關單一投藥群組(群組13、14及15)之滴度的0.32至2.8倍。在使用佐劑(明礬、或CpG-24555(美國臨時專利申請案第61/121,022號，2008年12月9日申請)、或ABISCO-100 (Isconova)與CpG-24555)或不使用佐劑時，檢測到抗體。在未經治療對照中未檢測到對抗肽之抗體。

在所選群組中檢測用於免疫之磷酸化肽(A-1P、B-1P、D-1P、C-1P、E-1P)所引發抗體之選擇性。此藉由測定群組1-7中磷酸化肽之未磷酸化形式之抗體滴度來實施(圖4)。計算特異性滴度對非特異性滴度之比。在此實驗中，在所有投藥群組中，抗體對B-1P之選擇性優於B-1(滴度比大於10倍)。僅在群組6(不含有明礬之群組)中抗體對C-1P之選擇性優於C-1。在群組2、3及6中，抗體對A-1P之選擇性優於A-1，但在群組1(以明礬作為佐劑使用高劑量組合

進行免疫)中並非如此。在未經治療對照中未檢測到對抗未磷酸化肽之抗體。

#### 實例8：針對途徑、佐劑及同種型之肽-VLP免疫研究

實施實驗以比較使用不同佐劑及投予途徑時所引發抗體之免疫原性及同種型。如圖5中所示，在第0天使具有3隻Balb/c小鼠之群組初免，並在第17天加強免疫。在第24天採集血清。利用抗原特異性滴度測定分析(如實例13中所述)對免疫動物之抗體應答進行研究。

將偶聯至Qbeta-VLP之A-1P經由皮下或肌內注射遞送至BALB/c。亦經由肌內途徑測試不同抗原組合。使用第27天試樣之結果概述於圖5中。皮下及肌內投予偶聯至Qbeta-VLP且以明礬作為佐劑之A-1P均引發IgG抗體應答。肌內投藥群組(70)比皮下投藥群組(11)具有較大之A-1P對A-1滴度比。此表明投予途徑會影響應答之選擇性。

如圖5中所示，所用之所有佐劑組合皆引發IgG1及IgG2a抗體，其中含有明礬之群組之IgG1對IgG2a比(對於群組2及5，比分別為21及12)遠遠大於不包括明礬作為佐劑之群組3(0.17)及4(0.17)。此與已知的明礬使免疫應答偏向Th2型之效應一致(參見Lindblad, Immunol Cell Biol. 82(5):497-505 (2004); Marrack等人, Nature Rev. 9:287-293 (2009))。該等結果表明，可使用佐劑來改變此實例中所用疫苗之抗體應答。在未經治療對照中未檢測到對抗肽之抗體。

#### 實例9：針對連接體分析之肽-VLP免疫

實施實驗以測定免疫原性是否受表5中所選肽之連接體(CGG或GGC)的位置影響。此處，使用連接體位於肽之N端(即SEQ ID NO:31-A-1P)或C端(即SEQ ID NO:41-A-11P)之A-1P肽。如下表1中所示，在第0天使具有4隻TG4510+/+小鼠之群組初免，並在第14天加強免疫。在第20天抽取小鼠血液。利用如實例13中所述之抗原特異性滴度測定分析對免疫動物之抗體應答進行研究。

基於顯示於表1中之結果，至Qbeta-VLP之連接體序列可置於tau特異性序列之N端(CGG)或C端(GGC)，且仍然引發磷酸化選擇性IgG應答(滴度比大於10倍，表1)。該實驗中所用之肽(SEQ ID NO:31及41)具有相同序列，只是CGG連接體位於SEQ ID NO:31之N端，而連接體GGC位於SEQ ID NO:41之C端。二者在第20天試樣中引發類似之IgG滴度。如表1中所示，如藉由磷酸化對未磷酸化IgG滴度比為49及大於132所測定，由該兩個肽序列引發之抗體具有選擇性。在第56天未經治療對照(圖4中之群組7)中未檢測到對抗肽之抗體。

表1：經肌內使小鼠免疫。使用100 µg肽-VLP及750 µg明礬(Al(OH)<sub>3</sub>)。在抗原特異性滴度測定分析(參見實例13)中測試之血清稀釋度介於1:5,000至1:15,800,000範圍內。

疫苗	佐劑	小鼠	數量	第20天之IgG滴度			選擇性
				A-1P IgG (mg/mL)	A-1P滴度	A-1滴度	A-1P/A-1
A-1P-VLP	明礬	TG4510++	4	0.62	6.85E+05	1.90E+04	49.0
A-11P-VLP	明礬	TG4510++	4	0.42	6.58E+05	<5.00E+03	>132

**實例 10：多株抗體與截短肽之結合**

實施實驗以測定表 5 中之所選肽是否含有存在於 A-1P、B-1P 或 C-1P (引發對抗其之抗體) 中之免疫原性抗原決定基。如下表 2 中所示，自接種 A-1P、B-1P 或 C-1P 之小鼠採集血清。利用抗原特異性滴度測定分析 (如實例 13 中所述) 對免疫動物之抗體應答進行研究，其中對數據分析進行以下修正：為未經塗敷孔平均值之兩倍的信號視為陽性，而低於未經塗敷孔平均值之兩倍的信號視為陰性。

實施 ELISA 以測定來自使用 A-1P、B-1P 或 C-1P 肽之肽-VLP 偶聯物進行免疫之動物的抗體是否結合該等肽中之每一者的縮短形式。使用所測試 tau 肽中之每一者作為板抗原 (plate antigen)，且對以  $1:4 \times 10^4$  及  $1:4 \times 10^5$  稀釋之來自 A-1P-、B-1P- 或 C-1P-VLP 免疫小鼠之血清進行測試以測定其是否能夠結合相關肽 (參見表 3)。先前顯示該等血清含有抗原特異性抗體。血清係來自使用相關親代肽 (對於 A-1P 及衍生物為 A-1P；對於 B-1P 及衍生物為 B-1P；對於 C-1P 及 C-1P/E-1P 衍生物為 C-1P) 免疫之小鼠 (參見表 2)。每一抗血清以 2 種稀釋度 ( $1:4 \times 10^4$  及  $1:4 \times 10^5$ ) 使用。若檢測到與肽之結合，則列為陽性結果。若自任一血清稀釋物均未檢測到信號，則列為陰性結果。除 A-5P、A-10P 及 B-2P 外，所有測試試樣皆具有陽性信號，表明由全長 (親代) 肽引發之抗體亦結合大多數所測試之縮短衍生物。

表 2：經肌內使小鼠免疫。在列出的情況下使用 100  $\mu\text{g}$  肽、100  $\mu\text{g}$  肽-VLP 及 750  $\mu\text{g}$  明礬 ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ )。在抗原特異性

滴度測定分析(實例13)中測試之每一血清的稀釋度為 $1:4 \times 10^4$ 及 $1:4 \times 10^5$ 。

血清	初免(第0天)	加強免疫		小鼠品系	血清採集(天數)
	疫苗	疫苗	天數		
1	A-1P-VLP+明礬	A-1P-VLP+明礬	14、28	TG4510 -/-	42
2	A-1P-VLP+明礬	A-1P-VLP+明礬	14	TG4510 -/-	20
3	B-1P	B-1P-VLP	28、56	Balb/c	70
4	B-1P	B-1P-VLP	28、56	Balb/c	70
5	C-1P-VLP+明礬	C-1P-VLP+明礬	14、28	TG4510 -/-	42
6	C-1P	C-1P-VLP	28、56	Balb/c	70

表3：「陽性」表示該孔之OD係背景(未經塗敷孔)OD平均值之至少兩倍。「陰性」表示該孔之OD小於背景(未經塗敷孔)OD平均值之兩倍。

肽	血清A	血清B
A-1P	陽性	陽性
A-2P	陽性	陽性
A-4P	陽性	陰性
A-5P	陰性	陰性
A-6P	陽性	陽性
A-7P	陽性	陽性
A-8P	陽性	陽性
A-9P	陽性	陽性
A-10P	陰性	陰性
B-1P	陽性	陽性
B-2P	陰性	陰性
B-3P	陽性	陽性
B-4P	陽性	陰性
B-5P	陽性	陰性
B-6P	陽性	陰性
C-1P	陽性	陽性
C-2P	陽性	陽性
C-3P	陽性	陽性
C-4P	陽性	陽性
C-5P	陽性	陽性

#### 實例11：針對免疫原性及記憶之截短肽免疫研究

實施兩項實驗以測定當以Qbeta-VLP偶聯物進行免疫時

表5中之所選肽是否具有免疫原性。亦利用該等研究之一來測定是否產生免疫記憶。為努力避免肽抗原與I類MHC及II類MHC T細胞配體之潛在結合，對A-1P、B-1P及C-1P「親代」肽之縮短形式進行測試。選擇7至11個胺基酸之肽長度，此乃因II類MHC分子通常結合具有13-17個胺基酸之肽，且I類MHC結合需要至少8個胺基酸之肽長度(Murphy等人，Janeway's Immunobiology, Garland Science (2007))。因此，具有11個或較少胺基酸之肽不應誘導II類MHC限制性CD4 T細胞應答，而具有7個胺基酸之肽不應誘導CD4 T細胞應答，亦不應誘導I類MHC限制性CD8 T細胞應答。亦對長度為7個胺基酸之肽F-1P進行測試。如圖6中所示，在第0天使具有3或6隻Balb/c小鼠之群組初免，且在第14天加強免疫。三個群組亦在第108天加強免疫，且三個群組在第108天初免(參見圖7)。在第21天、或第28天、或第111天、第115天及第122天或第21天、第105天、第111天、第115天及第122天採集血清。利用抗原特異性滴度測定分析(如實例13中所述)對免疫動物之抗體應答進行研究。

結果概述於圖6中。除B-5P外，所有肽-Qbeta-VLP偶聯物皆在所有ELISA測試小鼠中引發抗原特異性IgG抗體，對於B-5P，3隻小鼠中僅有2隻小鼠在1:15,800之血清稀釋度下具有可檢測抗體。該等結果表明，具有CGG連接體之具有7至11個胺基酸之tau肽具有免疫原性且能夠引發對免疫原具有特異性之抗體。

檢測用於免疫之磷酸化肽形式所引發抗體之選擇性(參見圖6)。大多數該等肽對磷酸化形式之肽之選擇性優於未磷酸化形式(滴度比大於10倍)。當以未磷酸化形式之免疫肽用作板抗原時，許多縮短之A-1P、B-1P及C-1P衍生物不產生可檢測之ELISA信號。許多縮短之A-1P、B-1P及C-1P衍生物的選擇性等於或大於親代肽。已報導，在JNPL3 Tau P301L過表現動物模型中，不具有CGG連接體之肽A-2P之主動免疫會降低腦中之聚集Tau並減緩纏結相關性感覺運動損傷之進展(Asuni等人，J. Neurosci. 27:9115 (2007))。偶聯至Qbeta-VLP之A-2P具有免疫原性。然而，在ELISA分析中，所引發抗體對磷酸化形式之肽(A-2P)相對於未磷酸化形式之肽(A-2)不具有選擇性(A-2P/A-2滴度比為1.7)。相比之下，該等抗體對A-1P之選擇性優於A-1(A-1P/A-1滴度比大於10.0)。使用A-2P及A-1P作為ELISA抗原時，滴度相同。此表明，大多數非磷酸特異性抗體(non-phosphospecific antibody)之抗原決定基包括肽A-2P之12個胺基酸，此12個胺基酸並不包含於A-1P中。在此實驗中，不使用明礬作為佐劑比使用明礬作為佐劑進行測試(分別為群組14及10)時，C-1P具有較高選擇性。可使用佐劑(例如明礬)來改變對磷酸化與未磷酸化肽之選擇性。在未經治療對照中未檢測到對抗肽之抗體。該等結果表明，具有CGG連接體之具有7至11個胺基酸之tau肽能夠引發磷酸-肽選擇性抗體。

測試A-1P、B-1P及C-1P之記憶回憶應答之結果顯示於圖

7中。將在第0、14及108天初免及加強免疫之肽-Qbeta-VLP免疫小鼠第111天、第115天及第122天(距最後一次免疫分別為+3天、+7天及+14天)之IgG滴度與彼等在第108天初免之小鼠的IgG滴度進行比較。群組1、2及3在第105天、最後一次加強免疫後84天具有較高IgG滴度。與第108天初免群組(群組4、5及6)相比，該等群組在第111天與第115天期間亦具有較大之IgG滴度增加。該等數據表明長期抗體應答及記憶回憶。

#### 實例12：與明礬組合及不與明礬組合時針對免疫原性及T細胞應答之截短肽免疫研究

實施實驗以測定當使用100 µg Qbeta-VLP偶聯物與0或504 µg明礬( $\text{Al}(\text{OH})_3$ )進行免疫時或當以肽-Qbeta-VLP偶聯物與明礬之組合形式或以肽-Qbeta-VLP偶聯物形式給與時衍生自A-1P、B-1P及C-1P之肽(表5)是否具有免疫原性。亦分析脾中之T細胞應答。如圖8中所示，在第0天使具有3隻TG4510 -/- 野生型同窩小鼠之群組初免，並在第14天加強免疫。在第21天採集血清及脾。利用抗原特異性滴度測定分析(如實例13中所述)及IFN- $\gamma$  ELISPOT分析(如實例14中所述)對免疫動物之抗體應答進行研究。

抗原特異性IgG滴度顯示，當使用504 µg明礬( $\text{Al}(\text{OH})_3$ )或不使用明礬以Qbeta-VLP偶聯物進行免疫時，所有測試肽皆具有免疫原性(參見圖8)。使用A-8P、B-3P及C-2P與總共750 µg明礬之組合以300 µg肽-Qbeta-VLP偶聯物進行免疫對所有3種肽皆產生選擇性抗體應答。

藉由ELISA來檢測用於免疫之磷酸化肽與未磷酸化形式之肽所引發抗體之選擇性(圖8)。計算特異性滴度對非特異性滴度之比，其中較大比值表示較高選擇性。不管在初免及加強免疫中是否包括明礬，亦不管肽-Qbeta-VLP偶聯物是單獨抑或以組合形式進行免疫，所引發抗體對磷酸化形式之肽具有選擇性。

利用IFN- $\gamma$  ELISPOT分析來分析使用單一肽Qbeta-VLP免疫後脾中之T細胞應答(參見圖9)。在第21天、最後一次肽Qbeta-VLP加強免疫後7天分析分泌對親代tau肽(A-1P、B-1P、C-1P)及其對應截短形式具有特異性之IFN- $\gamma$ 之T細胞的頻率。相對於無關肽對照(HBV-1)，在使用B-3P-Qbeta-VLP及C-2P-Qbeta-VLP於存在或不存在明礬下免疫後，未產生大量分泌對B-1P、B-1、B-3P、B-3、C-1P、C-1、C-2P或C-2具有特異性之IFN- $\gamma$ 的T細胞。在使用A-3P-Qbeta-VLP免疫後，誘導顯著( $p < 0.05$ )程度之A-3P特異性IFN- $\gamma$  T細胞應答。A-3P肽含有預測之小鼠I類MHC  $K^b$ 結合抗原決定基(IVYKSPVV，參見Lundegaard等人，Bioinformatics 24:1397-1398 (2008))，且該抗原決定基可能促成A-3P免疫動物中所觀察到之T細胞應答。此抗原決定基亦存在於A-1P、A-1、A-2P、A-2及A-3中。當將A-1P肽縮短成長度為7個胺基酸之肽(A-8P Qbeta-VLP)時，A-8P Qbeta-VLP免疫小鼠中之IFN- $\gamma$ 特異性T細胞應答降低至背景層面。

CD4 T輔助細胞為產生同種型轉換抗體應答及產生記憶B細胞所需要(參見Murphy等人，Janway's Immunobiology,

Garland Science, (2007))。因此，在使用截短型磷酸-tau肽 Qbeta-VLP免疫後產生之IgG抗體應答對應於其各自肽抗原決定基之發現表明，CD4 T輔助應答係針對疫苗而誘導。由於在使用截短肽偶聯物免疫後未產生顯著含量之tau-肽特異性T細胞，故測試對疫苗另一組份之T細胞應答。對VLP蛋白質之T細胞應答的分析顯示，IFN- $\gamma$ 特異性T細胞係針對VLP抗原決定基而產生(4-15倍高於無關蛋白質對照(BSA, Sigma Aldrich A9418))。

### 實例 13：抗原特異性抗體滴度測定

利用以下分析來測定如上文實例5至12中所述之免疫動物的抗體應答。

利用比色ELISA來測定具有可檢測抗原特異性抗體(如藉由陽性信號所代表)之最高血清稀釋度。自血清試樣製備連續稀釋物並在分析中進行測試。在一些分析中，使用對磷酸-tau肽具有特異性之單株抗體作為陽性對照或標準物。使用來自未接種疫苗小鼠(BALB/c、TG4510+/+或Tg4510 -/-)之血清作為陰性對照。將96孔高結合力聚苯乙烯板(CoStar 9018)用100  $\mu$ L稀釋於0.1M碳酸鈉 pH 8.2 (Sigma S7795)中之肽在4 $^{\circ}$ C下塗敷18至21小時。除C-1P及C-1之濃度為3  $\mu$ g/mL外，所有其他肽之濃度均為0.3  $\mu$ g/mL。第二天，移除塗敷溶液，並在室溫下使用含有0.05% Tween 20 (Sigma P2287)及1% BSA (Sigma A9418)之PBS溶液(EMD OmniPure 6507)在使用Heildolph Titramax 1000以600 rpm振盪下將該等板阻斷1小時。移除阻斷溶

液，隨後將試樣添加至該等板中。

將小鼠血清及用作標準物之單株抗體利用0.5或1對數稀釋於含有0.5% Tween 20之PBS (PBS-T)中進行連續稀釋。對於每一試樣，測試自1:500、1:5000或1:15,800開始之6至8份血清試樣稀釋物。用作標準物及陽性對照之單株抗體係：針對A-1P之抗-Tau 396 (Zymed 35-5300)；針對B-1P之AT-180 (Thermo Pierce MN1040)；針對D-1P及E-1P之AT-8 (Thermo Pierce MN1020)；針對C-1P之AT-100 (Thermo Pierce MN1060)。用於標準曲線之所用單株抗體之濃度係每孔50、15.8、5、1.58、0.5、0.158及0.05 ng。

將試樣及標準物以每孔100  $\mu$ L添加至板中，每孔一式兩份。將該等板在室溫下於600 rpm振盪下培育1小時。隨後使用PBS-T將該等板洗滌3次，並以100  $\mu$ L/孔添加以1:3000稀釋於PBS-T中之二級抗體(偶聯HRPO之抗-小鼠IgG，Caltag #M30107)。使用不同二級抗體來檢測IgG<sub>1</sub> (Caltag #M32107 1:2000)、IgG<sub>2a</sub> (Caltag #M32307 1:2000)及IgM (Caltag #31507 1:3000)。使二級抗體在室溫下於振盪下在該等板上結合1小時。將該等板再次使用PBS-T洗滌三次，並在最後一次洗滌後將該等板吸幹。為顯影，向每一孔中添加100  $\mu$ L TMB過氧化物酶EIA受質(Bio-Rad #172-1067)，並在室溫下保持11分鐘。向每一孔中添加100  $\mu$ L 1 N硫酸以終止反應。在Molecular Devices Spectramax plus 384上在450 nm下讀取吸光度。藉由取用PBS-T處理之所有孔之平均值並加上該等孔之標準偏差的3倍來計算各板之

OD閾值。若不能計算得到標準偏差，則使用兩倍於PBS-T OD的值作為閾值。自第一試樣稀釋物測定試樣滴度，其中450 nm吸光度值大於所計算之閾值。對於一些分析，使用基於相關陽性對照單株抗體之稀釋物的標準曲線來計算相對於標準曲線之滴度濃度。當未檢測到信號時，使用最低稀釋值或所測試標準物來計算，而當最高稀釋係陽性時，則使用最高稀釋值或所測試標準物來計算。當N大於2時，計算平均滴度，而當N係1或2時，則顯示各值。藉由將對於每一試樣磷酸化肽之試樣滴度除以未磷酸化形式之相同肽的滴度，隨後取不同試樣比值之平均值來測定選擇性比值。大於10或小於0.1之值視為具有選擇性。使用第一陽性稀釋來測定選擇性係最保守之方法。使用其他方法(例如閾值OD為1或1/2之最大OD)可能得到較大之選擇性值。

#### 實例14：IFN- $\gamma$ ELISPOT分析

使用IFN- $\gamma$  ELISPOT套組(BD Biosciences; 551083)來量測使用肽-Qbeta-VLP免疫後之T細胞應答。對自A-8P、A-3P、B-3P、C-2P(在低劑量明礬存在下或無明礬)免疫小鼠以及未免疫小鼠採集之脾(N=3)實施ELISPOT。給96孔ELISPOT板鋪板5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 捕獲抗-小鼠IFN- $\gamma$ 抗體，並在4°C下保持過夜。洗滌塗敷抗體之板並使用含有10%胎牛血清(VWR A15-204)之RPMI 1640完全培養基(Invitrogen 11875-119)實施阻斷。

隨後將脾細胞以每孔500,000個脾細胞接種至塗敷有抗-

IFN- $\gamma$ 抗體之板上，使用10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 肽或蛋白質抗原在37°C且含有5%  $\text{CO}_2$ 之培育箱中刺激20至24小時。無關肽對照係肽HBV-1 (SEQ ID NO:77)且使用牛血清白蛋白(Sigma Aldrich; A9418)作為Qbeta-VLP之無關蛋白質對照。使用以每孔55,555個及18,520個細胞接種之經佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMA, Sigma Aldrich; P8139)及離子黴素(ionomycin) (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma Aldrich; I0634)刺激之脾細胞作為陽性對照。培育20至24小時後，使用蒸餾水洗滌ELISPOT板兩次，隨後再使用洗滌緩衝液(1 $\times$ PBS (Invitrogen 10010072)，含有0.05% Tween-20 (Sigma P2287))洗滌三次。藉由以下來檢測IFN- $\gamma$ 細胞因子：將稀釋於含有10% FBS之PBS中之2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 生物素化抗-IFN- $\gamma$ 檢測抗體在室溫下培育2小時，隨後與以1:100稀釋於PBS 10% FBS中之抗生蛋白鏈菌素HRP一起培育。使用洗滌緩衝液洗滌板4次且使用PBS洗滌板2次後，使用AEC發色團-受質(在室溫下培育11分鐘)來顯現IFN- $\gamma$ 斑點。

掃描IFN- $\gamma$ 陽性斑點，捕獲，並使用Cellular Technology ELISpot分析儀及5.0 Professional Immunospot軟體計數，並取每孔計數之平均值。無關肽係肽抗原之陰性對照，而BSA係未偶聯VLP之陰性對照。利用Student T檢驗時平均斑點值必須顯著大於( $p < 0.05$ )相關陰性對照才能視為陽性。

#### 實例 15：佐劑調配物及免疫

如下製備本文所述特定實例(例如實例5-14)中所用之佐劑。將CpG-24555製備成存於水中之2 mg/mL原液。所用明礬係含有10 mg/mL鋁之鋁膠「85」(Brenntag Biosector)。將鋁膠「85」與100 µg肽或VLP偶聯肽以1:1之比率混合。通常，將高達25 µL(對於肌肉疫苗接種)或50 µL(對於皮下疫苗接種)添加至含有100 µg VLP之溶液中，並立即實施渦旋並置於冰上。以與肽溶液1:1之比率添加TiterMax Gold(Alexis Biochemicals)。將50 µL TiterMax Gold添加至用於100 µL皮下劑量之50 µL 2 mg/mL肽溶液中，並使用Mixermill (SPEX Sample Prep)在4°C下乳化10分鐘。將25 µL (12 µg) AbISCO-100 (Isconova)添加至高達100 µg VLP-肽溶液及5 µL (10 µg) CpG-24555中，實施渦旋並置於冰上。

按照普遍認可之方法實施本文所述特定實例(例如實例5-14)中所進行之免疫及動物操作。疫苗接種時，在尾巴根部經皮下注射高達100 µL疫苗，或者將50 µL疫苗注射至脛骨後肌及脛骨前肌之一或二者中。經由下頷下切縫或在結束時經由心臟穿刺採集血液。在驅血法及頸椎脫位後取出脾，並置於含有5% PBS及Penn/Strep(Invitrogen，目錄號為15140-122)之冷的無菌HBBS(Invitrogen，目錄號為14170)中。在70 µm篩網(Falcon)上磨碎脾。在冰冷的HBBS中洗滌細胞，並使用ACK裂解緩衝液(Invitrogen)裂解紅細胞。在Guava PCA 96(Guava Technologies公司)上計數脾細胞。

### 實例 16：優化 pTau 肽至 Qbeta/VLP 之偶聯密度以獲得期望免疫應答

實施實驗以確定 pTau 肽抗原決定基至 Qbeta/VLP 之偶聯密度(每一 Qbeta 單體亞基之肽數量)是否影響 pTau 特異性抗體應答。利用藉由改變 SMPH 之莫耳過量與 pTau 肽過量產生之不同偶合條件來產生 8 種具有不同抗原決定基密度之 pTau/VLP 偶聯物(表 4)。在第 0 天及第 14 天(sc)使用 100  $\mu\text{g}$  存於 750  $\mu\text{g}$  明礬( $\text{Al}(\text{OH})_3$ )中之不同密度偶聯物中的每一者使具有 5 隻雌性 BalbC 小鼠(8 週齡)之群組免疫。在第 26 天採集血清。利用如實例 13 中所述之抗原特異性滴度測定分析對免疫動物之抗體應答進行研究。

基於顯示於表 4 中之第 26 天之滴度結果，對於 A-8P/Qbeta，2.3 之偶聯密度與較高(3.6)密度偶聯形式相比產生較高之滴度免疫應答。對於不同的 B-3P/Qbeta 偶聯物，滴度類似且 2.2 及 3.6 偶聯密度形式之滴度最高。對於 C-2P/Qbeta，2.2 及 3.5 抗原決定基偶聯密度產生類似滴度，其略微高於 4.3 偶聯密度形式。結果表明，抗原決定基偶聯密度可以抗原特異性方式影響抗體應答，且通常，導致偶聯密度為每一 Qbeta 單體 2-3 個 pTau 肽抗原決定基之偶合條件較佳。

表 4：在第 0 天及第 14 天使用 10  $\mu\text{g}$  或 100  $\mu\text{g}$  指定的不同偶合密度之存於 750  $\mu\text{g}$  明礬( $\text{Al}(\text{OH})_3$ )中之 pTau-肽/Qbeta/VLP 偶聯物經皮下使小鼠免疫。在實例 13 所述之抗原特異性滴度測定分析中測試第 26 天之血清稀釋物。顯示滴度結果。

		A-8P/Qbeta		B-3P/Qbeta			C-2P/Qbeta		
		群組1	群組2	群組3	群組4	群組5	群組6	群組7	群組8
衍生化	SMPH 過量	10X	40X	7.5X	20X	80X	7.5X	20X	80X
偶合	肽過量	5X	10X	5X	10X	10X	5X	10X	10X
偶聯密度		2.3	3.6	2.2	3.6	4.4	2.2	3.5	4.3
第26天之 IgG滴度		9.00E+04	3.00E+04	1.50E+05	1.20E+05	8.00E+04	1.00E+05	1.80E+05	4.00E+04

表 5：序列表概述

在下表中，且如本文先前所述，磷酸化之胺基酸以粗體表示且標以下劃線。

序列號：	說明	序列
1	pThr-231/pSer-235 磷酸-tau抗原決定基	<u>T</u> PPKS
2	替代pThr-231/pSer-235 磷酸-tau抗原決定基	PPKS
3	pSer-202/pThr-205 磷酸-tau抗原決定基	S <u>P</u> G <u>T</u>
4	不帶有連接體之肽A-1P	EIVYK <u>S</u> PVVSGDT <u>S</u> PRHLS
5	不帶有連接體之肽A-2P	RENAKAKTDHGAEIVYK <u>S</u> PVVSGDT <u>S</u> PRHLS
6	不帶有連接體之肽A-3P	EIVYK <u>S</u> PVVS
7	不帶有連接體之肽A-4P	GDT <u>S</u> PRH
8	不帶有連接體之肽A-5P	K <u>S</u> PVVSGDT <u>S</u> P
9	不帶有連接體之肽A-6P	EIVYK <u>S</u> P
10	不帶有連接體之肽A-7P	IVYK <u>S</u> PV
11	不帶有連接體之肽A-8P	VYK <u>S</u> PVV
12	不帶有連接體之肽A-9P	YK <u>S</u> PVVS
13	不帶有連接體之肽A-10P	K <u>S</u> PVVS
14	不帶有連接體之肽B-1P	KVAVVRT <u>P</u> PK <u>S</u> SSAKS
15	不帶有連接體之肽B-2P	VRT <u>P</u> PK <u>S</u> PS
16	不帶有連接體之肽B-3P	VVRT <u>P</u> PK <u>S</u> P
17	不帶有連接體之肽B-4P	R <u>T</u> PK <u>S</u> SS
18	不帶有連接體之肽B-5P	R <u>T</u> PK <u>S</u> P
19	不帶有連接體之肽B-6P	PK <u>S</u> SS
20	不帶有連接體之肽C-1P	SRSRT <u>P</u> SL <u>P</u> T <u>P</u> T
21	不帶有連接體之肽C-2P	SRT <u>P</u> SL <u>P</u>
22	不帶有連接體之肽C-3P	R <u>T</u> PSL <u>P</u> T
23	不帶有連接體之肽C-4P	RSRT <u>P</u> SL
24	不帶有連接體之肽C-5P	PGSR <u>S</u> RT <u>P</u> SL <u>P</u>
25	不帶有連接體之肽D-1P	GYSSPG <u>S</u> PG <u>T</u> PG <u>S</u> RS

序列號：	說明	序列
26	不帶有連接體之肽E-1P	GYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPT
27	CpG 7909	5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3'
28	CpG 10103	5' TCGTCGTTTTTCGGTTCGTTTT 3'
29	CpG 24555	5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3'
30	人類tau同種型2	Genbank登記號為NP_005901
31	帶有連接體之肽A-1P	CGGEIVYKSPVVSGDTSPRHLS
32	帶有連接體之肽A-2P	CGGRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLS
33	帶有連接體之肽A-3P	CGGEIVYKSPVVS
34	帶有連接體之肽A-4P	CGGGDTSPRH
35	帶有連接體之肽A-5P	CGGKSPVVSGDTSP
36	帶有連接體之肽A-6P	CGGEIVYKSP
37	帶有連接體之肽A-7P	CGGIVYKSPV
38	帶有連接體之肽A-8P	CGGVYKSPVV
39	帶有連接體之肽A-9P	CGGYKSPVVS
40	帶有連接體之肽A-10P	CGGKSPVVSG
41	帶有連接體之肽A-11P	EIVYKSPVVSGDTSPRHLSGGC
42	帶有連接體之肽B-1P	CGGKVAVVRTPPKSPSSAKS
43	帶有連接體之肽B-2P	CGGVRTPPKSPS
44	帶有連接體之肽B-3P	CGGVVRTPPKSP
45	帶有連接體之肽B-4P	CGGRTPPKSPSS
46	帶有連接體之肽B-5P	CGGRTPPKSP
47	帶有連接體之肽B-6P	CGGPPKSPSS
48	帶有連接體之肽C-1P	CGGSRSRTPSLPTPPT
49	帶有連接體之肽C-2P	CGGSRTPSLP
50	帶有連接體之肽C-3P	CGGRTPSLPT
51	帶有連接體之肽C-4P	CGGRSRTPSL
52	帶有連接體之肽C-5P	CGGPGSRSRTPSLP
53	帶有連接體之肽D-1P	CGGYSSPGSPGTPGSRRS
54	帶有連接體之肽E-1P	CGGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPT
55	帶有連接體之肽A-1	CGGEIVYKSPVVSGDTSPRHLS
56	帶有連接體之肽A-2	CGGRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLS
57	帶有連接體之肽A-3	CGGEIVYKSPVVS
58	帶有連接體之肽A-4	CGGGDTSPRH
59	帶有連接體之肽A-5	CGGKSPVVSGDTSP
60	帶有連接體之肽A-6	CGGEIVYKSP
61	帶有連接體之肽A-7	CGGIVYKSPV
62	帶有連接體之肽A-8	CGGVYKSPVV
63	帶有連接體之肽A-9	CGGYKSPVVS
64	帶有連接體之肽A-10	CGGKSPVVSG
65	帶有連接體之肽B-1	CGGKVAVVRTPPKSPSSAKS
66	帶有連接體之肽B-2	CGGVRTPPKSPS
67	帶有連接體之肽B-3	CGGVVRTPPKSP

序列號：	說明	序列
68	帶有連接體之肽B-4	CGGRTPPKSPSS
68	帶有連接體之肽B-5	CGGRTPPKSP
69	帶有連接體之肽B-6	CGGPPKSPSS
70	帶有連接體之肽C-1	CGGSRRTPSLPTPPT
71	帶有連接體之肽C-2	CGGSRTPSLP
72	帶有連接體之肽C-3	CGGRTPSLPT
73	帶有連接體之肽C-4	CGGRSRTPSL
74	帶有連接體之肽C-5	CGGPGSRRTPSLP
75	帶有連接體之肽D-1	CGGYSSPGSPGTPGSRS
76	帶有連接體之肽E-1	CGGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPT
77	肽HBV-1	IPQLDSWWTSL
78	含有XhoI位點之Qbeta 的3'序列	5'-GTATTAATGACTCGAG-3'
79	連接體	GGGGGC
80	連接體	GGGGC
81	連接體	GGGC
82	連接體	GGGGGK
83	連接體	GGGGK
84	連接體	GGGK
85	連接體	GGGGSC
86	連接體	GGGSC
87	連接體	GGSC
88	連接體	CSGGGG
89	連接體	CSGGG
90	連接體	CSGG
91	連接體	CGGGG
92	連接體	CGGG
93	連接體	CGGGGG
94	連接體	CGDKTHTSPP
95	連接體	DKTHTSPPCG
96	連接體	CGGPKSTPPGSSGGAP
97	連接體	PKPSTPPGSSGGAPGGCG
98	連接體	GCGGGG
99	連接體	GGGGCG
100	連接體	CGKKGG
101	連接體	CGDEGG
102	連接體	GGKKGC
103	連接體	GGEDGC
104	連接體	GGCG
105	不帶有連接體之肽F-1P	AGTYGLG
106	帶有連接體之肽F-1P	CGGAGTYGLG
107	帶有連接體之肽F-1	CGGAGTYGLG

序列號：	說明	序列
108	不帶有連接體之肽F-2P	DHAGTYG
109	不帶有連接體之肽F-3P	HAGTYGL
110	不帶有連接體之肽F-4P	GTYGLGD
111	不帶有連接體之肽F-5P	TYGLGDR
112	不帶有連接體之肽F-6P	DHAGTYGLG DR
113	帶有連接體之肽F-2P	CGGDHAGTYG
114	帶有連接體之肽F-3P	CGGHAGTYGL
115	帶有連接體之肽F-4P	CGGGTYGLGD
116	帶有連接體之肽F-5P	CGGTYGLGDR
117	帶有連接體之肽F-6P	CGGDHAGTYGLG DR
118	帶有連接體之肽F-2	CGGDHAGTYG
119	帶有連接體之肽F-3	CGGHAGTYGL
120	帶有連接體之肽F-4	CGGGTYGLGD
121	帶有連接體之肽F-5	CGGTYGLGDR
122	帶有連接體之肽F-6	CGGDHAGTYGLG DR

### 【圖式簡單說明】

圖1A及1B顯示如實例5中所述之經皮下免疫之Balb/c小鼠群組的描述、及滴度及選擇性結果。使用300 µg肽、100 µg肽-KLH或100 µg肽-VLP經皮下使Balb/c小鼠免疫。在列出的情況下使用50 µL TiterMax Gold(Alexis Biochemicals)作為佐劑。在抗原特異性滴度測定分析(參見實例13)中測試之血清稀釋度介於1:30至1:7,290範圍內。

圖2顯示如實例5中所述之免疫Balb/c小鼠群組的描述、及滴度結果。經皮下使Balb/c小鼠免疫。在列出的情況下使用50 µL TiterMax Gold作為佐劑。在抗原特異性滴度測定分析(參見實例13)中測試之血清稀釋度介於1:900至1:1,968,300範圍內。

圖3顯示如實例6中進一步闡述之經皮下免疫之Balb/c小鼠的描述。使用100 µg肽初免，且使用100 µg肽-VLP加強

免疫。在列出的情況下使用 750  $\mu\text{g}$  明礬 ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) 作為佐劑。在抗原特異性滴度測定分析(參見實例 13)中測試之血清稀釋度介於 1:800 至 1:1,750,000 範圍內。ND 意指未進行測定。

圖 4A、4B 及 4C 顯示如實例 7 中所述之經肌內免疫之 TG4510++ 小鼠的結果。圖 4A 顯示群組 1 至 7 之滴度結果，而圖 4B 顯示群組 8 至 17 之滴度結果。圖 4C 顯示群組 1 至 6 之選擇性結果。CPG 係 CpG-24555。明礬係  $\text{Al}(\text{OH})_3$ 。在抗原特異性滴度測定分析(參見實例 13)中測試之血清稀釋度介於 1:5,000 至 1:15,800,000 範圍內。ND 意指未進行測定。

圖 5 顯示如實例 8 中所述之免疫小鼠的描述。經由肌內 (IM) 或皮下 (SC) 途徑使 Balb/c 小鼠免疫。在列出的情況下使用 90  $\mu\text{g}$  肽-VLP。在列出的情況下使用 1,595  $\mu\text{g}$  明礬 ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ )、20  $\mu\text{g}$  CpG-24555 及 12  $\mu\text{g}$  ABISCO-100。在抗原特異性滴度測定分析(參見實例 13)中測試之血清稀釋度介於 1:5,000 至 1:15,800,000 範圍內。標準曲線檢測之下限係 0.0025 mg/mL。NA 意指不適用。

圖 6 顯示如實例 11 中所述之免疫小鼠的描述。經肌內使 Balb/c 小鼠免疫。使用 100  $\mu\text{g}$  肽-VLP。在列出的情況下使用 252 (750)  $\mu\text{g}$  明礬 ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ )。在抗原特異性滴度測定分析(參見實例 13)中測試之血清稀釋度介於 1:500 至 1:2,720,000 範圍內。ND 意指未進行測定。

圖 7 顯示如實例 11 中所述之免疫小鼠的描述。經肌內使 Balb/c 小鼠免疫。使用 750  $\mu\text{g}$  明礬 ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) 作為佐劑。在

抗原特異性滴度測定分析(參見實例13)中測試之血清稀釋度介於1:500至1:15,800,000範圍內。

圖8顯示如實例12中所述之免疫小鼠的描述。經肌內使TG4510-/- (野生型同窩)小鼠免疫。列出時，使用100 µg各肽-VLP進行第0天之初免及第14天之加強免疫。使用所列表量之明礬( $Al(OH)_3$ )。採集「未治療」群組之血清。在抗原特異性滴度測定分析(參見實例13)中測試之血清稀釋度介於1:5,000至1:15,800,000範圍內。

圖9顯示如實例12中所述之免疫小鼠的描述。經肌內使TG4510-/- (野生型同窩)小鼠免疫。使用100 µg各肽-VLP進行第0天之初免及第14天之加強免疫。不使用明礬或使用504 µg明礬( $Al(OH)_3$ )。在第21天採集脾。顯示如藉由干擾素- $\gamma$  T細胞ELIspot(參見實例14)所量測之每 $5 \times 10^5$ 個脾細胞的斑點數量。獲得一組3隻脾的結果。肽HBV-1 (SEQ ID NO:77)係無關肽。BSA係無關蛋白質。ND表示未進行測定。\*表示相對於適當之無關肽或蛋白質p小於0.05。

圖10顯示人類tau同種型2(Genbank登記號為NP\_005901)之胺基酸序列(SEQ ID NO:30)。

## 序列表

<110> 美商辉瑞疫苗有限责任公司

<120> 抗原TAU肽及其用途

<130> PC33815A

<140> 099125165

<141> 2010-07-29

<150> 61/229,860

<151> 2009-07-30

<160> 123

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

Thr Pro Pro Lys Ser  
1 5

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

Pro Pro Lys Ser  
1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 3

Ser Pro Gly Thr  
1

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 4

Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg  
1 5 10 15

His Leu Ser

<210> 5  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 5

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 Ser  
 20 25 30

<210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 6

Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 7

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His  
 1 5

<210> 8  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 8

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro  
 1 5 10

<210> 9  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 9

Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro  
 1 5

<210> 10

# 201106968

<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 10

Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val  
1 5

<210> 11  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 11

Val Tyr Lys Ser Pro Val Val  
1 5

<210> 12  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 12

Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser  
1 5

<210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 13

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly  
1 5

<210> 14  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 14

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 15  
<211> 9

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 15

Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser  
1 5

<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 16

Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro  
1 5

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 17

Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser  
1 5

<210> 18  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 18

Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro  
1 5

<210> 19  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 19

Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser  
1 5

<210> 20  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 20

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

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 21

Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro  
1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 22

Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr  
1 5

<210> 23

<211> 7

<212> 人工序列

<213>

<220> 合成的

<223> Synthetic

<400> 23

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu  
1 5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 24

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

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 25

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

<210> 26  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 26

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

Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr  
 20 25

<210> 27  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 27

tcgtcgtttt gtcgttttgc cgtt 24

<210> 28  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 28

tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

<210> 29  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 29

tcgtcgtttt tcggtgcttt t 21

<210> 30  
 <211> 441  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 30

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly  
 1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His  
 20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu  
 35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser  
 50 55 60  
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu  
 85 90 95  
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro  
 100 105 110  
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val  
 115 120 125  
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly  
 130 135 140  
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro  
 145 150 155 160  
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro  
 165 170 175  
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly  
 180 185 190  
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser  
 195 200 205  
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys  
 210 215 220  
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val  
 245 250 255  
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly  
 260 265 270  
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln  
 275 280 285  
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly  
 290 295 300  
 Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser  
 305 310 315 320  
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln  
 325 330 335  
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser  
 340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn  
 355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala  
 370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser  
 385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser  
 405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val  
 420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
 435 440

<210> 31  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 31

Cys Gly Gly Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr  
 1 5 10 15

Ser Pro Arg His Leu Ser  
 20

<210> 32  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 32

Cys Gly Gly Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu  
 1 5 10 15

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

Leu Ser

<210> 33  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 33

Cys Gly Gly Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser  
1 5 10

<210> 34  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 34

Cys Gly Gly Gly Asp Thr Ser Pro Arg His  
1 5 10

<210> 35  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 35

Cys Gly Gly Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro  
1 5 10

<210> 36  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 36

Cys Gly Gly Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro  
1 5 10

<210> 37  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 37

Cys Gly Gly Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val  
1 5 10

<210> 38  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 38

Cys Gly Gly Val Tyr Lys Ser Pro Val Val  
1 5 10

<210> 39

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 39

Cys Gly Gly Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser  
 1 5 10

<210> 40  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 40

Cys Gly Gly Lys Ser Pro Val Val Ser Gly  
 1 5 10

<210> 41  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 41

Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg  
 1 5 10 15

.His Leu Ser Gly Gly Cys  
 20

<210> 42  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 42

Cys Gly Gly Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser  
 1 5 10 15

Ser Ala Lys Ser  
 20

<210> 43  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 43

Cys Gly Gly Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser  
 1 5 10

<210> 44  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 44

Cys Gly Gly Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro  
 1 5 10

<210> 45  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 45

Cys Gly Gly Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser  
 1 5 10

<210> 46  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 46

Cys Gly Gly Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro  
 1 5 10

<210> 47  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 47

Cys Gly Gly Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser  
 1 5 10

<210> 48  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 48

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

<210> 49  
 <211> 10  
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 49

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

<210> 50  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 50

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

<210> 51  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 51

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

<210> 52  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 52

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

<210> 53  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 53

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

Ser

<210> 54  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> 人工序列

201106968

<220>  
<223> 合成的

<400> 54

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

Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr  
20 25

<210> 55  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 55

Cys Gly Gly Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr  
1 5 10 15

Ser Pro Arg His Leu Ser  
20

<210> 56  
<211> 34  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 56

Cys Gly Gly Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu  
1 5 10 15

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

Leu Ser

<210> 57  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 57

Cys Gly Gly Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser  
1 5 10

<210> 58  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

&lt;400&gt; 58

Cys Gly Gly Gly Asp Thr Ser Pro Arg His  
 1 5 10

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 59

Cys Gly Gly Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro  
 1 5 10

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 60

Cys Gly Gly Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro  
 1 5 10

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 61

Cys Gly Gly Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val  
 1 5 10

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 62

Cys Gly Gly Val Tyr Lys Ser Pro Val Val  
 1 5 10

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 63

Cys Gly Gly Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser  
 1 5 10

<210> 64  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 64

Cys Gly Gly Lys Ser Pro Val Val Ser Gly  
 1 5 10

<210> 65  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 65

Cys Gly Gly Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser  
 1 5 10 15

Ser Ala Lys Ser  
 20

<210> 66  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 66

Cys Gly Gly Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser  
 1 5 10

<210> 67  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 67

Cys Gly Gly Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro  
 1 5 10

<210> 68  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 68

Cys Gly Gly Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser  
 1 5 10

<210> 69  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 69

Cys Gly Gly Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser  
 1 5 10

<210> 70  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 70

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

<210> 71  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 71

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

<210> 72  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 72

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

<210> 73  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 73

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

<210> 74  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 74

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

<210> 75  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 75

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

Ser

<210> 76  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 76

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

Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr  
20 25

<210> 77  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 77

Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu  
1 5 10

<210> 78  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 78  
gtattaatga ctcgag

16

<210> 79  
<211> 6  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 79

Gly Gly Gly Gly Gly Cys  
1 5

<210> 80  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 80

Gly Gly Gly Gly Cys  
1 5

<210> 81  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 81

Gly Gly Gly Cys  
1

<210> 82  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 82

Gly Gly Gly Gly Gly Lys  
1 5

<210> 83  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 83

Gly Gly Gly Gly Lys  
1 5

<210> 84  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

# 201106968

<400> 84

Gly Gly Gly Lys  
1

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 85

Gly Gly Gly Gly Ser Cys  
1 5

<210> 86

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 86

Gly Gly Gly Ser Cys  
1 5

<210> 87

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 87

Gly Gly Ser Cys  
1

<210> 88

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 88

Cys Ser Gly Gly Gly Gly  
1 5

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 89

Cys Ser Gly Gly Gly  
1 5

<210> 90  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 90

Cys Ser Gly Gly  
 1

<210> 91  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 91

Cys Gly Gly Gly Gly  
 1 5

<210> 92  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 92

Cys Gly Gly Gly  
 1

<210> 93  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 93

Cys Gly Gly Gly Gly Gly  
 1 5

<210> 94  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 94

Cys Gly Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro  
 1 5 10

<210> 95  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 95

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Gly  
1 5 10

<210> 96  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 96

Cys Gly Gly Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala  
1 5 10 15

Pro

<210> 97  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 97

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Cys Gly

<210> 98  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 98

Gly Cys Gly Gly Gly Gly  
1 5

<210> 99  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 99

Gly Gly Gly Gly Cys Gly  
1 5

<210> 100

<211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 100

Cys Gly Lys Lys Gly Gly  
 1 5

<210> 101  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 101

Cys Gly Asp Glu Gly Gly  
 1 5

<210> 102  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 102

Gly Gly Lys Lys Gly Cys  
 1 5

<210> 103  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 103

Gly Gly Glu Asp Gly Cys  
 1 5

<210> 104  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 104

Gly Gly Cys Gly  
 1

<210> 105  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

# 201106968

<223> 合成的

<400> 105

Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly  
1 5

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 106

Cys Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly  
1 5 10

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 107

Cys Gly Gly Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly  
1 5 10

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 108

Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly  
1 5

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 109

His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu  
1 5

<210> 110

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 110

Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp

1

5

<210> 111  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 111

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg  
 1 5

<210> 112  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 112

Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg  
 1 5 10

<210> 113  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 113

Cys Gly Gly Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly  
 1 5 10

<210> 114  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 114

Cys Gly Gly His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu  
 1 5 10

<210> 115  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 115

Cys Gly Gly Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp  
 1 5 10

<210> 116  
 <211> 10

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 116

Cys Gly Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg  
1 5 10

<210> 117  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 117

Cys Gly Gly Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg  
1 5 10

<210> 118  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 118

Cys Gly Gly Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly  
1 5 10

<210> 119  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 119

Cys Gly Gly His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu  
1 5 10

<210> 120  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 120

Cys Gly Gly Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp  
1 5 10

<210> 121  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 121

Cys Gly Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg  
1 5 10

<210> 122

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220> 合成的

<400> 122

Cys Gly Gly Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg  
1 5 10

<210> 123

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220> 合成的

<400> 123

Cys Gly Gly Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro  
1 5 10

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 99125165

※申請日： 99.7.29

※IPC 分類：A61P; C07K

一、發明名稱：(中文/英文)

A61k 39/385 (2006.01)

抗原TAU肽及其用途

ANTIGENIC TAU PEPTIDES AND USES THEREOF

二、中文發明摘要：

本發明係關於包含較佳連接至免疫原性載體之抗原 tau 肽的新穎免疫原及組合物，其用於治療 tau 相關神經病症。本發明另外係關於製備該等免疫原及組合物之方法及其於醫藥中之用途。

三、英文發明摘要：

The present disclosure relates to novel immunogens and compositions comprising an antigenic tau peptide, preferably linked to an immunogenic carrier for use in the treatment of tau-related neurological disorders. The disclosure further relates to methods for production of these immunogens and compositions and their use in medicine.

## 七、申請專利範圍：

1. 一種免疫原，其包含至少一種連接至免疫原性載體之抗原tau肽，其中該抗原tau肽包含選自以下之磷酸-tau抗原決定基：pSer-396磷酸-tau抗原決定基、pThr-231/pSer-235磷酸-tau抗原決定基、pThr-231磷酸-tau抗原決定基、pSer-235磷酸-tau抗原決定基、pThr-212/pSer-214磷酸-tau抗原決定基、pSer-202/pThr-205磷酸-tau抗原決定基及pTyr 18磷酸-tau抗原決定基。
2. 一種免疫原，其包含至少一種連接至免疫原性載體之抗原tau肽，其中該抗原tau肽包含選自SEQ ID NO: 4、6-26、105及108-112之胺基酸序列。
3. 如請求項2之免疫原，其中該抗原tau肽經由式 $(G)_nC$ 表示之連接體共價連接至該免疫原性載體，其中該連接體位於該肽之C端(肽 $-(G)_nC$ )或N端( $C(G)_n$ -肽)，且其中n係0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。
4. 如請求項3之免疫原，其中該抗原tau肽包含選自SEQ ID NO: 4及6-13之胺基酸序列。
5. 如請求項4之免疫原，其中該抗原tau肽由SEQ ID NO: 11中所示之胺基酸序列組成。
6. 如請求項3之免疫原，其中該抗原tau肽包含選自SEQ ID NO: 14-19之胺基酸序列。
7. 如請求項6之免疫原，其中該抗原tau肽由SEQ ID NO: 16中所示之胺基酸序列組成。
8. 如請求項3之免疫原，其中該抗原tau肽包含選自SEQ ID

NO: 20-24之胺基酸序列。

9. 如請求項8之免疫原，其中該抗原tau肽由SEQ ID NO: 21中所示之胺基酸序列組成。
10. 如請求項3之免疫原，其中該抗原tau肽包含選自SEQ ID NO: 105及108-112之胺基酸序列。
11. 如請求項10之免疫原，其中該抗原tau肽由SEQ ID NO: 105中所示之胺基酸序列組成。
12. 如請求項1至11中任一項之免疫原，其中該免疫原性載體係選自由HBcAg VLP、HBsAg VLP及Qbeta VLP組成之群的病毒樣粒子。
13. 一種組合物，其包含至少兩種如請求項2之免疫原，其中：
  - a)第一免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 4及6-13之胺基酸序列組成；且
  - b)第二免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 14-19之胺基酸序列組成。
14. 一種組合物，其包含至少兩種如請求項2之免疫原，其中：
  - a)第一免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 4及6-13之胺基酸序列組成；且
  - b)第二免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 20-24之胺基酸序列組成。
15. 一種組合物，其包含至少兩種如請求項2之免疫原，其中：

a)第一免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 14-19之胺基酸序列組成；且

b)第二免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 20-24之胺基酸序列組成。

16. 一種組合物，其包含至少兩種如請求項2之免疫原，其中：

a)第一免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 4及6-13之胺基酸序列組成；且

b)第二免疫原之抗原tau肽選自SEQ ID NO: 105及108-112。

17. 一種組合物，其包含至少兩種如請求項2之免疫原，其中：

a)第一免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 14-19之胺基酸序列組成；且

b)第二免疫原之抗原tau肽選自SEQ ID NO: 105及108-112。

18. 一種組合物，其包含至少兩種如請求項2之免疫原，其中：

a)第一免疫原之抗原tau肽由選自SEQ ID NO: 20-24之胺基酸序列組成；且

b)第二免疫原之抗原tau肽選自SEQ ID NO: 105及108-112。

19. 一種組合物，其包含如請求項2之四種免疫原中的至少三種免疫原，其中：

a) 第一免疫原之抗原 tau 肽由選自 SEQ ID NO: 4 及 6-13 之胺基酸序列組成；

b) 第二免疫原之抗原 tau 肽由選自 SEQ ID NO: 14-19 之胺基酸序列組成；且

c) 第三免疫原之抗原 tau 肽由選自 SEQ ID NO: 20-24 之胺基酸序列組成；

d) 第四免疫原之抗原 tau 肽由選自 SEQ ID NO: 105 及 108-112 之胺基酸序列組成。

20. 一種醫藥組合物，其包含如請求項 1 至 12 中任一項之免疫原、或如請求項 13 至 19 中任一項之組合物、及醫藥上可接受之賦形劑。

## 八、圖式：

群組	初免(第0天)		加強免疫(第14天)		N
	疫苗	佐劑	疫苗	佐劑	
1	300 µg A-1	TiterMax	300 µg A-1	TiterMax	3
2	300 µg A-1P	TiterMax	300 µg A-1P	TiterMax	3
3	300 µg B-1P	TiterMax	300 µg B-1P	TiterMax	3
4	300 µg D-1P	TiterMax	300 µg D-1P	TiterMax	3
5	300 µg C-1P	TiterMax	300 µg C-1P	TiterMax	3
6	300 µg A-1P	TiterMax	100 µg A-1P-VLP		3
7	100 µg A-1P-VLP		100 µg A-1P-VLP		3
8	100 µg A-1P-KLH		100 µg A-1P-KLH		3

圖 1A

群組	第 28 天之 IgG 滴度		選擇性	第 28 天之 IgG 滴度		選擇性	第 28 天之 IgG 滴度		選擇性	第 28 天之 IgG 滴度		選擇性					
	A-1P	A-1		A-1P/A-1	B-1P		B-1	B-1P/B-1		D-1P	D-10		D-1P/D-10	C-1P	C-1	C-1P/C-1	
1	< 290	4050	< 0.045														
2	50.0	50.0	1.0														
3				> 7290	> 7290	1.0											
4								< 30.0	< 30.0			1.0					
5															270	< 50.0	> 7.0
6	> 7290	> 7290															
7	> 7290	> 7290															
8	> 7290	> 7290															

圖 1B

群組	初免			加強免疫			天數					
	疫苗	佐劑	天數	疫苗	佐劑	天數	94 (N=1)	104	108	115		
IgM	A	A-1P	TiterMax	0	A-1P-VLP	無	14, 101	3	2.70E+03	2.67E+05	2.67E+05	1.05E+05
	B	A-1P-VLP	無	0	A-1P-VLP	無	14, 101	3	2.43E+04	4.05E+04	2.19E+05	8.91E+04
	C	A-1P-VLP	無	101	無	無	無	3		7.29E+04	1.70E+05	2.43E+04
IgG	群組								IgG 滴度	IgG 滴度	IgG 滴度	IgG 滴度
	A	A-1P	TiterMax	0	A-1P-VLP	無	14, 101	3	7.29E+04	1.70E+05	1.97E+06	1.97E+06
	B	A-1P-VLP	無	0	A-1P-VLP	無	14, 101	3	2.19E+05	6.56E+05	1.97E+06	1.97E+06
C	A-1P-VLP	無	101	無	無	無	3		9.00E+02	1.22E+05	5.10E+05	

圖 2

疫苗									
	A-1	A-1P	B-1P	D-1P	C-1P	E-1P	未治療		
疫苗初免 (第0天)	A-1-VLP	A-1P-VLP	B-1P-VLP	D-1P-VLP	C-1P-VLP	E-1P-VLP	未治療		
(第28天、第56天)	4	4	4	4	4	4	未治療		
N							3		
第70天之IgG滴度									
A-1P滴度	> 1.75E+06	> 1.75E+06					< 8.00E+02		
A-1滴度	> 1.75E+06	> 1.75E+06					< 8.00E+02		
B-1P滴度			> 1.75E+06				< 8.00E+02		
B-1滴度			> 1.17E+06				< 8.00E+02		
D-1P滴度				> 1.75E+06			< 8.00E+02		
D-1滴度				7.08E+04			< 8.00E+02		
C-1P滴度					> 1.75E+06		< 8.00E+02		
C-1滴度					3.56E+05		ND		
E-1P滴度				> 1.75E+06	> 1.75E+06	> 1.75E+06	ND		
E-1滴度						1.80E+05	ND		
選擇性									
A-1P/A-1	1.0	1.0							
B-1P/B-1			2.0						
D-1P/D-1				> 212					
C-1P/C-1					> 10.5				
E-1P/E-1						> 75			
E-1P/D-1				> 212					
E-1P/D-1P				1.0					
E-1P/C-1					> 10.5				
E-1P/C-1P					1.0				

圖 3

群組	疫苗	每一 VLP 的量	佐劑	N	第 63 天之 IgG 滴度							
					A-1P IgG (mg/mL)	A-1P 滴度	A-1 滴度	B-1P IgG (mg/mL)	B-1P 滴度	B-1 滴度	C-1P 滴度	C-1 滴度
1	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	100 µg	1160 µg 明礬	4	0.40	7.70E+04	9.55E+04	0.44	1.04E+05	< 5.00E+03	2.17E+05	1.31E+05
2	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	10 µg	116 µg 明礬	4	0.19	9.55E+04	< 5.00E+03	0.15	6.85E+04	< 5.00E+03	2.17E+05	1.31E+05
3	A-1P-VLP	100 µg	386 µg 明礬	3	0.41	1.58E+05	1.22E+04					
4	B-1P-VLP	100 µg	386 µg 明礬	4				0.59	2.44E+05	1.63E+04		
5	C-1P-VLP	100 µg	386 µg 明礬	4							9.55E+05	2.17E+05
6	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	100 µg	無	4	0.37	2.44E+05	2.17E+04	0.41	1.90E+05	< 1.90E+04	2.44E+05	4.33E+04
7	未治療	無	無	3		< 5.00E+03	< 5.00E+03		< 5.00E+03	< 5.00E+03	< 5.00E+03	< 5.00E+03

圖 4A

群組	疫苗	每一 VLP 的量	佐劑	N	第 63 天之 IgG 滴度							
					A-1P IgG (mg/mL)	A-1P 滴度	A-1 滴度	B-1P IgG (mg/mL)	B-1P 滴度	B-1 滴度	C-1P 滴度	C-1 滴度
8	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	100 µg	20 µg CPG 24555	3	0.51	8.60E+05	ND	0.41	8.60E+04	ND	3.86E+05	ND
9	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	100 µg	1160 µg 明礬	4	0.45	1.58E+06	ND	0.25	7.70E+04	ND	4.87E+05	ND
10	未治療	無	無	4		< 5.00E+03	ND		< 5.00E+03	ND	< 5.00E+03	ND
11	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	100 µg	20 µg CPG 24555	3	0.55	2.72E+05	ND	0.64	3.86E+05	ND	3.86E+05	ND
12	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	10 µg	20 µg CPG 24555	4	0.40	4.87E+05	ND	0.26	1.90E+05	ND	1.31E+05	ND
13	A-1P-VLP	100 µg	20 µg CPG 24555	4	0.79	7.70E+05	ND					
14	B-1P-VLP	100 µg	20 µg CPG 24555	4				0.53	2.17E+05	ND		
15	C-1P-VLP	100 µg	20 µg CPG 24555	3							1.22E+05	ND
16	A-1P, B-1P, C-1P-VLP	100 µg	12 µg AbISCO + 20 µg CPG 24555	4	0.96	3.88E+05	ND	0.88	3.02E+05	ND	6.85E+05	ND
17	未治療	無	無	3		< 5.00E+03	ND		< 5.00E+03	ND	< 5.00E+03	ND

圖 4B

選擇性			
群組	A-1P / A-1	B-1P / B-1	C-1P / C-1
1	2.9	> 20.8	1.5
2	> 19.1	> 13.7	1.5
3	17.2		
4		26.2	
5			6.0
6	15.4	> 13.7	24.5

圖 4C

群組	疫苗	佐劑	途徑	N	A-1P IgG (mg/mL)	第 27 天之 A-1P IgG 滴度	第 27 天之 A-1 IgG 滴度	選擇性 (A-1P/A-1)	第 27 天之 A-1P IgG1 滴度	第 27 天之 A-1P IgG2a 滴度	IgG1/IgG2a 比率
1	A-1P-VLP	明礬	SC	3	0.44	8.60E+05	3.50E+05	11.3	5.00E+06	2.21E+06	34.8
2	A-1P-VLP	明礬, CpG 24555	IM	3	0.45	8.60E+05	1.22E+05	7.7	2.36E+06	2.36E+05	21.4
3	A-1P-VLP	CpG 24555	IM	3	0.97	1.58E+06	3.86E+05	5.4	8.60E+05	5.00E+06	0.17
4	A-1P-VLP	AbISCO, CpG 24555	IM	3	3.04	5.00E+06	8.60E+05	7.7	1.58E+06	1.22E+07	0.17
5	A-1P-VLP	明礬	IM	3	0.50	1.22E+06	5.96E+04	70.0	8.60E+05	5.85E+05	12.0
6	未治療	無	NA	3	< 0.0025	< 5.00E+03	< 5.00E+03	1.00	< 5.00E+03	< 5.00E+03	1.0

圖 5

群組	疫苗	µg 明礬 (Al(OH) <sub>3</sub> )	N	ELISA 抗原	第 21 天或 第 28 天之 IgG 滴度	ELISA 抗原	第 21 天或 第 28 天之 IgG 滴度	選擇性	ELISA 抗原	第 21 天或 第 28 天之 IgG 滴度	ELISA 抗原	第 21 天或 第 28 天之 IgG 滴度	選擇性
1	A-1P-VLP	750	3	A-1P	3.86E+05	A-1	< 2.72E+04	> 17.2	A-1P	5.00E+05	A-1	< 2.72E+04	> 24.4
2	A-3P-VLP	750	3	A-3P	5.00E+05	A-3	< 2.72E+04	> 24.4	A-1P	2.36E+06	A-1	< 1.58E+04	> 149
3	A-2P-VLP	750	3	A-2P	1.58E+05	A-2	1.22E+05	1.7	A-1P	1.58E+05	A-1	< 1.58E+04	> 10.0
4	A-7P-VLP	750	3	A-7P	1.11E+05	A-7	< 1.58E+04	> 7.0	A-1P	5.00E+04	A-1	< 1.58E+04	> 3.2
5	A-8P-VLP	750	3	A-8P	1.58E+05	A-8	< 1.58E+04	> 10.0	A-1P	5.00E+05	A-1	< 1.58E+04	> 31.6
6	B-1P-VLP	750	3	B-1P	3.86E+05	B-1	1.11E+05	5.4	B-1P	3.86E+05	B-1	3.86E+04	14.9
7	B-3P-VLP	750	3	B-3P	2.25E+05	B-3	< 1.58E+04	> 14.2	B-1P	2.36E+05	B-1	< 1.58E+04	> 14.9
8	B-5P-VLP	750	3	B-5P	< 2.72E+04	B-5	< 1.58E+04	1.7	B-1P	<	B-1	< 1.58E+04	> 4.0
9	B-6P-VLP	750	3	B-6P	1.22E+05	B-6	< 1.58E+04	> 7.7	B-1P	2.72E+06	B-1	< 1.58E+04	> 172
10	C-1P-VLP	750	3	C-1P	1.22E+06	C-1	6.32E+05	4.7	C-1P	7.46E+05	C-1	6.32E+05	1.7
11	C-2P-VLP	750	2	C-2P	1.58E+05, 5.00E+05	C-2	< 1.58E+04, < 1.58E+04	> 20.8	C-1P	5.00E+04, 5.00E+05	C-1	< 1.58E+04, < 1.58E+04	> 17.4
12	C-3P-VLP	750	3	C-3P	> 1.85E+06	C-3	< 1.58E+04	> 117	C-1P	2.36E+05	C-1	< 1.58E+04	> 14.9
13	C-5P-VLP	750	3	C-5P	> 2.36E+06	C-5	< 1.58E+04	> 149	無	ND	無	ND	ND
14	C-1P-VLP	無	3	C-1P	> 2.72E+06	C-1	1.11E+05	> 47.2	C-1P	2.72E+06	C-1	< 1.58E+04	> 172
15	未治療	無	3	A-1P B-1P C-1P	< 1.58E+04 < 1.58E+04 < 1.58E+04	A-1 B-1 C-1	< 1.58E+04 < 1.58E+04 < 1.58E+04	1.0 1.0 1.0	無	無	無	無	無
16	F-1P-VLP	252	6	F-1P	1.22E+05	F-1	1.58E+05	0.77	無	ND	無	ND	ND
17	A-8P-VLP	252	6	無	ND	無	ND	ND	A-1P	2.36E+06	A-1	< 5.00E+02	> 4729
18	未治療	無	6	A-1P F-1P	< 5.00E+02 < 5.00E+02	A-1 F-1	< 5.00E+02 < 5.00E+02	1.0 1.0	無	無	無	無	無

圖 6

群組	疫苗	佐劑	初免天數	加強免 疫天數	N	天數				
						105 滴度	111 滴度	115 滴度	122 滴度	
1	A-8P- VLP	明礬	0	14, 108	3	2.36E+06	7.46E+05	1.11E+07	7.46E+06	
2	B-3P- VLP	明礬	0	14, 108	3	2.72E+05	2.36E+05	1.58E+06	6.32E+06	
3	C-2P- VLP	明礬	0	14, 108	2	1.58E+04, 1.58E+05	1.58E+04, 1.58E+05	5.00E+05, 5.00E+05	1.58E+06, 1.58E+06	
4	A-8P- VLP	明礬	108	無	3	< 5.00E+02	< 5.00E+02	3.86E+04	1.22E+05	
5	B-3P- VLP	明礬	108	無	3	ND	< 5.00E+02	8.60E+04	5.96E+06	
6	C-2P- VLP	明礬	108	無	3	ND	< 5.00E+02	2.72E+04	2.36E+05	

IgG

圖 7

群組	群組平均 值	明礬 ( $\mu\text{g}$ )	N	第 21 天之 IgG 滴度			選擇性 A- 1P/A-1	第 21 天之 IgG 滴度		選擇性 B- 1P/B-1	第 21 天之 IgG 滴度		選擇性 E- 1P/E-1
				A-1P	A-1	A-1		B-1P	B-1		E-1P	E-1	
1	A-8P -VLP	0	3	2.36E+06	< 5.00E+03	> 472							
2	A-8P -VLP	504	3	5.00E+06	< 5.00E+03	> 1000							
3	A-3P -VLP	0	3	5.00E+06	2.72E+04	244							
4	A-3P -VLP	504	3	1.58E+07	2.25E+05	377							
5	B-3P -VLP	0	3				5.00E+06	< 5.00E+03	> 1000				
6	B-3P -VLP	504	3				8.60E+06	< 5.00E+03	> 1720				
7	C-2P -VLP	0	3								1.22E+06	< 5.00E+03	> 244
8	C-2P -VLP	504	3								1.58E+06	< 5.00E+03	> 316
9	C-5P -VLP	0	3								2.72E+06	< 5.00E+03	> 544
10	C-5P -VLP	504	3								3.86E+06	< 5.00E+03	> 772
11	A-8P -VLP, B-3P -VLP, C-2P -VLP	0	3	2.72E+06	< 5.00E+03	> 544	3.86E+06	< 5.00E+03	> 772		5.00E+05	< 5.00E+03	> 100
12	A-8P -VLP, B-3P -VLP, C-2P -VLP	750	3	7.46E+06	< 5.00E+03	> 1492	3.86E+06	< 5.00E+03	> 772		2.72E+05	< 5.00E+03	> 54.4
13	未治療	0	3 雙 一組	< 5.00E+03	< 5.00E+03	1.0	< 5.00E+03	< 5.00E+03	1.0		< 5.00E+03	< 5.00E+03	1.0

圖 8

免疫群組	B-3P 無明脊 斑點	B-3P 504 µg 明脊 斑點	未免疫 斑點
測試抗原	斑點	斑點	斑點
B-1P	6	5	0
B-1	10	4	1
B-3P	7	1	2
B-3	12	7	3
無關肽	10	5	ND
未偶聯 VLP	267 *	356 *	10
無關蛋白質	17	35	8

免疫群組	C-2P 無明脊 斑點	C-2P 504 µg 明脊 斑點	未免疫 斑點
測試抗原	斑點	斑點	斑點
C-1P	24	9	0
C-1	22	6	3
C-2P	47	15	2
C-2	29	9	1
無關肽	22	11	ND
未偶聯 VLP	350 *	402 *	10
無關蛋白質	58	112	8

免疫群組	A-8P 無明脊 斑點	未免疫 斑點
測試抗原	斑點	斑點
A-1P	16	1
A-1	26	3
A-8P	27	2
A-8	25	2
無關肽	17	ND
未偶聯 VLP	469 *	10
無關蛋白質	53	8

免疫群組	A-3P 無明脊 斑點	未免疫 斑點
測試抗原	斑點	斑點
A-1P	7	1
A-1	11	3
A-3P	60 *	1
A-3	29	0
無關肽	16	ND
未偶聯 VLP	204 *	10
無關蛋白質	47	8

圖 9

1 MAEPRQEFFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDEGSEEPG  
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG  
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK  
 181 TPPSSGEPPK SGRSGYSSP GSPGTPGSRs RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK  
 241 SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHOP GGGKVOINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV  
 301 PGGGSVQIVY KPVDLKSVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV QSKIGSLDNI  
 361 THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSGTGSIDMV  
 421 DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

圖 10

**四、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第( 6 )圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

**五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

(無)