



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I827557 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：107137586

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 10 月 24 日

(51)Int. Cl. : **A61K38/16 (2006.01)** **A61K31/713 (2006.01)**
 A61K9/127 (2006.01) **A61K47/24 (2006.01)**
 A61K47/28 (2006.01) **A61K47/54 (2017.01)**
 A61P25/28 (2006.01)

(30)優先權：2017/10/25 美國 62/577,157

(71)申請人：美商健生醫藥公司(美國) JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC. (US)

美國

瑞士商 A C 免疫學製藥股份有限公司(瑞士) AC IMMUNE SA (CH)

瑞士

(72)發明人：藍斯布格 伊麗莎白 RAMSBURG, ELIZABETH ANNE (US)；德瑪爾科 多娜塔 DE MARCO, DONATA (IT)；查庫卡爾 阿尼西 CHAKKUMKAL, ANISH (IN)；沙達卡 夏洛特 SADAKA, CHARLOTTE (FR)；古德史密特 加波 GOUDSMIT, JAAP (NL)；穆斯 安德列斯 MUHS, ANDREAS (DE)；菲爾格瑞 包區 瑪麗亞 PIHLGREN BOSCH, MARIA (SE)；凡希拉 馬里加 VERHILLE, MARIJA VUKICEVIC (RS)；希克曼 大衛 HICKMAN, DAVID (GB)；皮歐特 尼可拉斯 PIOT, NICOLAS (FR)；吉米瑞 沙羅 GHIMIRE, SAROJ RAJ (NP)

(74)代理人：陳彥希；何愛文

(56)參考文獻：

WO 2012/055933A1

期刊 Melissa C Hanson et al, "Liposomal vaccines incorporating molecular adjuvants and intrastuctural T-cell help promote the immunogenicity of HIV membrane-proximal external region peptides", Vaccine. 2015 Feb 11;33 (7): 861-8.

審查人員：余家嫻

申請專利範圍項數：22 項 圖式數：18 共 124 頁

(54)名稱

T a u 胜肽之組成物及其用途

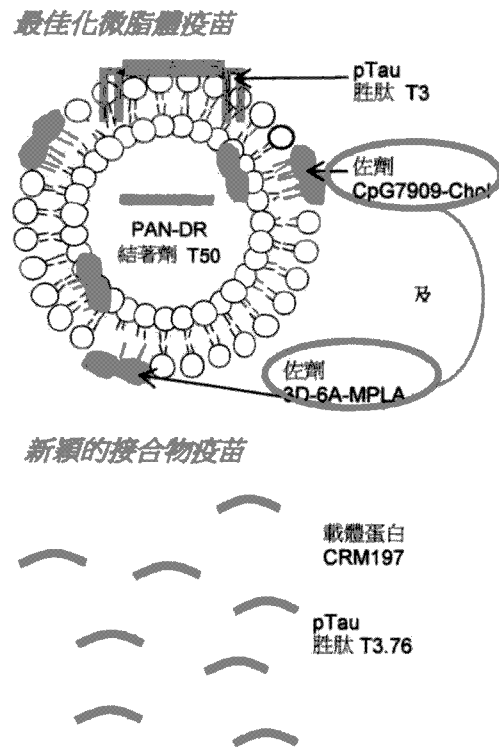
(57)摘要

本文係描述含有 tau 胜肽，較佳地磷酸化 tau 胜肽的微脂體，以及含有 tau 胜肽，較佳地磷酸化 tau 胜肽與致免疫載體接合之接合物。亦描述用於治療或防止神經退化疾病或病症，例如阿茲海默症之微脂體及/或接合物的醫藥組成物和用途。

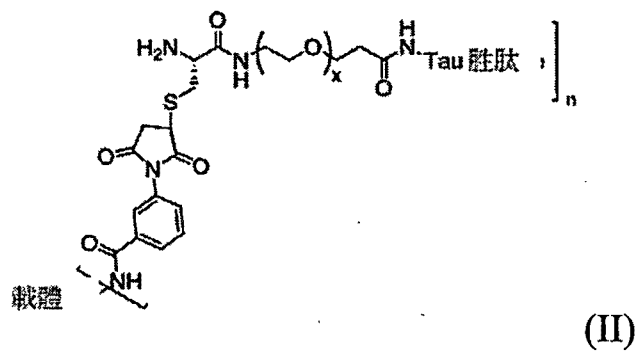
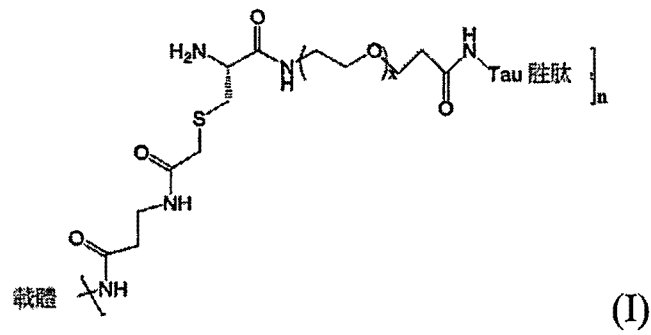
Liposomes containing tau peptides, preferably phosphorylated tau peptides, and conjugates containing tau peptides, preferably phosphorylated tau peptides, conjugated to an immunogenic carrier are described. Pharmaceutical compositions and uses of the liposomes and/or conjugates for treating or preventing a neurodegenerative disease or disorder, such as Alzheimer's Disease, are also described.

指定代表圖：

圖 1



特徵化學式：



發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

Tau胜肽之組成物及其用途

COMPOSITIONS OF TAU PEPTIDES AND USES THEREOF

【中文】

本文係描述含有 tau 胜肽，較佳地磷酸化 tau 胜肽的微脂體，以及含有 tau 胜肽，較佳地磷酸化 tau 胜肽與致免疫載體接合之接合物。亦描述用於治療或防止神經退化疾病或病症，例如阿茲海默症之微脂體及/或接合物的醫藥組成物和用途。

【英文】

Liposomes containing tau peptides, preferably phosphorylated tau peptides, and conjugates containing tau peptides, preferably phosphorylated tau peptides, conjugated to an immunogenic carrier are described. Pharmaceutical compositions and uses of the liposomes and/or conjugates for treating or preventing a neurodegenerative disease or disorder, such as Alzheimer's Disease, are also described.

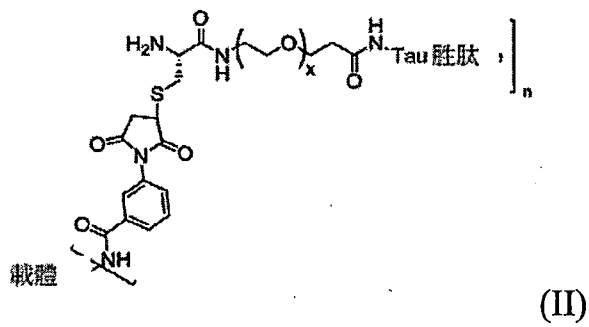
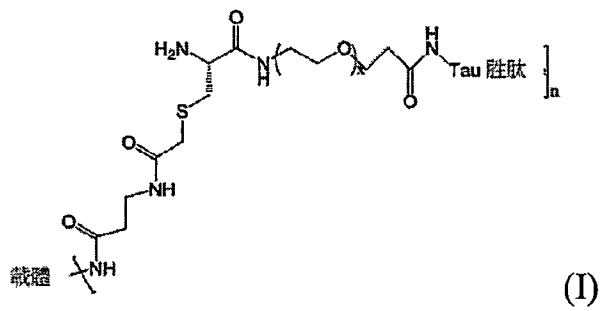
【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖1。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

Tau胜肽之組成物及其用途

COMPOSITIONS OF TAU PEPTIDES AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係在醫藥領域中。本發明特言之係關於用於防止或治療tau病症，例如阿茲海默症之tau胜肽的微脂體或接合物以及其用途。

【先前技術】

【0002】 阿茲海默症(AD)為一種進行性衰弱的神經退化性疾病，影響全世界大約4,400萬人(Alzheimers.net)。目前在臨床上可用的AD治療係針對延緩臨床癥狀之惡化，而非以潛藏在疾病下的致病過程為目標。不幸地，這些治療僅有最低的功效，因此對於開發和檢測另外的預防性和治療性方法有迫切的需要。

【0003】 阿茲海默症的病理標幟為包括聚集的澱粉樣β蛋白之胞外斑痕和胞內「纏結」累積或過度磷酸化tau蛋白聚集。導致這些蛋白累積的分子機理之特徵描述仍貧乏。就澱粉樣蛋白，其係假設澱粉樣前驅蛋白異常裂解，導致包括胺基酸1-42之聚集-傾向的片段堆積。就tau而言，其係假設激酶、磷酸酶或二者失調，導致tau異常磷酸化。一旦tau變成過度磷酸化，則喪失有效和安定微管之能力，取而代之的係堆積在受影響的神經元細胞質中。未結合和過度磷酸化的tau似乎係先形成寡聚物及然後更高程度的聚集物，其存在據推測，或許經由擾亂正常軸突運輸，負面影響其形成在其中的神經元之功能。

【0004】 在開發中國家中，經診斷患有阿茲海默症或其他失智tau病症之個體通常係以膽鹼酶抑制劑(例如Aricept®)或美金剛(memantine)(例如Namenda™)治療。這些藥物，雖然合理地完全耐受，但不太具有效用。例如，在約50%治療的個體中，Aricept®延遲症狀的惡化達6-12個月。其餘的

治療為非藥物性，且係集中在當病患認知能力減退時，其較能管理每復一日的事務。

【0005】 數個公開的研究(Asuni AA *et al.*, J Neurosci. 2007 Aug 22;27(34):9115-29., Theunis C *et al.*, PLoS One. 2013; 8(8): e72301., Kontsekova E *et al.*, Alzheimers Res Ther. 2014 Aug 1;6(4):44)驗證了含有tau 胜肽的活性疫苗可在小鼠或大鼠中引發抗-tau免疫反應；在啮齒類中降低病理性tau聚集物在腦中之堆積；及在阿茲海默症的動物模型中降低大鼠的認知退化之進行。對抗病理性tau蛋白之活性疫苗顯示在患有阿茲海默症的人類病患中為致免疫的(Novak P *et al.*, *Lancet Neurology* 2017, 16:123-134)。WO2010/115843描述了模擬tau蛋白之主要病理磷酸化-表位的抗原磷酸化胜肽及在治療tau病症，包括阿茲海默症中用於治療和診斷用途的相關組成物。然而，目前在市面上仍無核可有效的疫苗可用於防止tau-媒介疾病的發生。一旦病症發生，市面上仍無截擊或延緩疾病過程的有效藥物。因此，需要鑑定出可防止這些疾病之新的預防性方法(例如疫苗)。

【發明內容】

【0006】 在一通用態樣中，本發明係關於一微脂體，其係包括：

- a. tau 胜肽，較佳的該 tau 胜肽為 tau 磷酸化胜肽；及
- b. 幫手 T-細胞表位，

其中該 tau 胜肽係存在微脂體的表面。

【0007】 在一實施例中，微脂體進一步係包括至少一包含toll樣受體配體之佐劑。較佳地，該微脂體進一步係包括至少其中一項toll樣受體4配體和一toll樣受體9配體。

【0008】 在一較佳的實施例中，本發明係關於一微脂體，其係包括：

- a. tau 胜肽，較佳的該 tau 胜肽為 tau 磷酸化胜肽；
- b. 幫手 T-細胞表位；及
- c. 至少下列之一
 - i. toll 樣受體 9 配體，較佳地脂質化 CpG 寡核苷酸；及
 - ii. toll 樣受體 4 配體，較佳地 toll 樣受體 4 促效劑，

其中 tau 胜肽係存在微脂體表面。

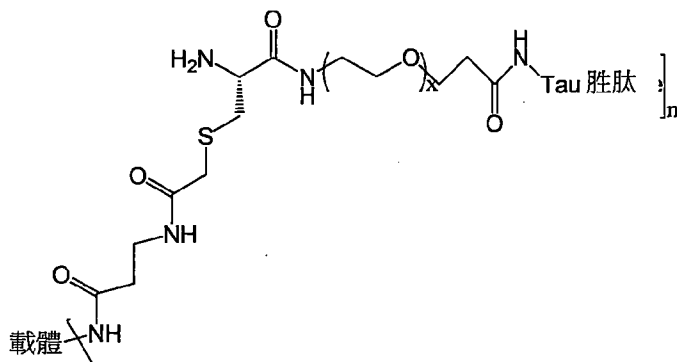
【0009】 在另一較佳的實施例中，本發明係關於一微脂體，其係包括：

- tau 磷酸化胜肽；
- 幫手 T-細胞表位；
- 脂質化 CpG 寡核苷酸；及
- 含有 toll 樣受體 4 配體之佐劑，

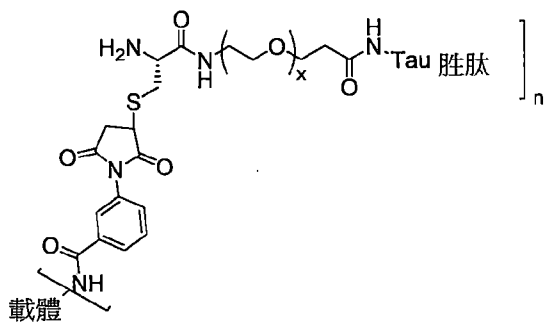
其中 tau 胜肽係存在微脂體表面。

【0010】 在另外的通用態樣中，本發明係關於包括tau胜肽，較佳地tau磷酸化胜肽及與其接合之致免疫載體的接合物，其中該tau胜肽係經由一連接子與載體接合。該連接子可包括一或多個聚乙二醇(PEG)、琥珀醯亞胺基 3-(溴乙醯胺基)丙酸酯(SBAP)和間-馬來醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯(MBS)。可用於本發明之致免疫載體的實例包括(但不限於鑰孔帽貝血藍素(KLH)、破傷風類毒素(TT)、CRM197及來自腦膜炎雙球菌(*N. meningitidis*)的外膜蛋白混合物(OMP)或其衍生物。

【0011】 在一較佳的實施例中，本發明係關於一具有式(I)結構：



或式(II)結構之接合物：



其中

x 為 0 至 10 之整數，較佳地 2 至 6，最佳地 3；及
n 為 2 至 11 之整數，較佳地 3 至 11。

【0012】 本發明另外的態樣係關於包括本發明之微脂體或接合物以及醫藥上可接受載劑的醫藥組成物，製備醫藥組成物的方法，以及該醫藥組成物於有此需要之對象中引發抗tau免疫反應或治療或防止神經退化疾病或病症的用途。

【0013】 在一實例中，本發明係關於在一患有神經退化病症的對象中引發抗tau免疫反應，或用於有此需要之對象中治療或防止神經退化疾病或病症。此方法包括投予該對象一包括本發明之微脂體和醫藥上可接受載劑的醫藥組成物，或包括本發明之接合物和醫藥上可接受載劑的醫藥組成物。較佳地，此方法係包括投予該對象一供啟動免疫作用之本發明醫藥組成物，及供提升免疫作用之本發明醫藥組成物。

【0014】 在閱讀下列本發明之詳細說明和申請專利範圍後，將更了解本發明之其他態樣、特色和優點。

【圖式簡單說明】

【0015】 當結合所附的圖式閱讀時，將會更了解前面概述以及下列本申請案之較佳實施例的詳細說明。然而，應了解，本申請書不限於圖式中所示的確切實施例。

【0016】 圖1係說明根據本發明實施例之新穎疫苗：根據本發明實施例之微脂體(上方)，及根據本發明實施例之tau接合物(下方)；

【0017】 圖2係說明根據本發明實施例之包括微脂體的疫苗(第2代微脂體)，其係含有包封的幫手T-細胞表位(例如破傷風多肽(tet)，活化幫手T-細胞)；

【0018】 圖3係說明根據本發明實施例之包括接合物的疫苗(該接合物係含有非本身或致免疫載體蛋白)，活化幫手T-細胞；

【0019】 圖4係顯示根據本發明實施例之tau疫苗在恆河獼猴(Rhesus macaque)中引發持續高效價抗-tau磷酸化抗體：如酵素連接免疫吸附分析(ELISA)所測，每組的終點效價之幾何平均，隨時間，相較於無幫手T細胞

表位的對照微脂體疫苗，根據本發明實施例之包括微脂體(微脂體Z)的疫苗或根據本發明實施例之包括接合物(接合物A)的疫苗為較高；

【0020】 圖5係顯示來自以根據本發明實施例之微脂體(微脂體Z)免疫的恆河獼猴之血清與病變人類AD腦部中tau結構結合(左圖)，與健康的人類腦部(右圖)相比較；

【0021】 圖6係顯示來自以根據本發明實施例之接合物(接合物A)調配於含有可溶性CpG和氫氧化鋁之組成物免疫的恆河獼猴之血清與病變人類AD腦部中tau結構結合(上一行)，與健康的人類腦部(下一行)相比較；

【0022】 圖7係顯示由根據本發明實施例之微脂體疫苗引發的恆河獼猴中抗-磷酸化tau抗體之效價，微脂體X、Y和Z，各含有包封的T-細胞表位T50和一或多種佐劑；效價係以ELISA所測量及以個別獼猴中隨時間之末端效價表示。特言之：

【0023】 圖7A係顯示以TLR4配體，MPLA (3D-(6-醯基)PHAD®)單獨作為佐劑之微脂體X所引發的抗-磷酸化tau抗體之效價；

【0024】 圖7B係顯示以TLR9配體(脂質化CpG寡核苷酸)單獨作為佐劑之微脂體Y所引發的抗-磷酸化tau抗體之效價；

【0025】 圖7C係顯示以TLR4配體MPLA(3D-(6-醯基)PHAD®)與TLR9配體(脂質化CpG寡核苷酸)組合作為佐劑之微脂體Z所引發的抗-磷酸化tau抗體之效價，其亦顯示二種佐劑之組合在各個獼猴中引發較低的抗體效價變異；

【0026】 圖7D係顯示上述免疫組和含有TLR4配體MPLA但無T-細胞表位之對照組微脂體疫苗之抗體效價的幾何平均，並顯示根據本發明實施例之疫苗比對照微脂體疫苗產生更高的抗-磷酸化tau抗體之抗體效價；效價係以ELISA所測量及以每組隨時間之終點效價的幾何平均 \pm 95%信賴區間表示；

【0027】 圖8係顯示使用根據本發明實施例之微脂體疫苗(例如微脂體X、Y或Z)或接合物疫苗(接合物A)之免疫作用引發對富含成對細螺旋絲(ePHF)專一性之抗體IgG效價，該ePHF係分離自死後阿茲海默症病患腦部；抗體效價係藉由Meso Scale Discovery (MSD)技術所測，並以個別獼猴於第

50天之值及第一次免疫後之幾何平均 \pm 95% CI表示；

【0028】 圖9係顯示以含有包封的T50與TLR4配體(3D-(6-醯基)PHAD®)和TLR9配體(脂質化CpG寡核苷酸)組合作為佐劑之根據本發明實施例的微脂體疫苗(微脂體Z)免疫，引發主要結合磷酸化tau胜肽(SEQ ID NO: 2)之N-端的抗體(圖9A)，然而以根據本發明實施例之接合物(接合物A)疫苗免疫的獼猴產生IgG抗體，其主要係結合磷酸化胜肽(左)和非磷酸化胜肽(右)之C-端部分(圖9B)；

【0029】 圖10 A和B係顯示以含有包封的T-細胞表位T50和TLR4配體MPLA(3D-(6-醯基)PHAD®)作為佐劑之根據本發明實施例的微脂體疫苗(微脂體S)免疫在小鼠中引發明顯高於對照微脂體疫苗(含TLR4配體(3D-(6-醯基)PHAD®)但無T-細胞表位T50，微脂體R)，以及含有表面T-細胞表位T57(二棕櫚酸化T50)和TLR4配體(3D-(6-醯基)PHAD®，微脂體T)之根據本發明實施例之微脂體疫苗的抗體效價：抗體效價係在第一次免疫後第21天(圖10A)和第35天(圖10B)藉由ELISA所測並以個體的數值和每組的幾何平均 \pm 95% CI表示；(**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)；

【0030】 圖11係顯示將T-細胞胜肽T48或T52包封至微脂體內(分別為微脂體M或N)在小鼠中引發對包封胜肽專一性之T-細胞反應：T-細胞反應係以IFN- γ (圖11A)和 IL-4(圖11B) ELISPOT來評估；

【0031】 圖12係顯示含有包封的T-細胞表位(微脂體L)之微脂體疫苗及含有錨定的T-細胞表位(微脂體O)之微脂體疫苗各自引發比無T-細胞表位之對照微脂體疫苗更高的tau磷酸化胜肽專一性抗體效價；各微脂體L、微脂體O進一步係含有MPLA作為佐劑；

【0032】 圖13係顯示Tau接合物(KLH-TAUVAC-p7.1或KLH-TAUVAC-p22.1)在野生小鼠中引發T_H細胞和強大的抗tau胜肽之Ab效價，特言之：

【0033】 圖13A係說明將成年雌性Balb/C小鼠組(每組 $n=14$)以100 ug佐劑化KLH-tau接合物疫苗(KLH-TAUVAC-p7.1或KLH-TAUVAC-p22.1)、活性安慰劑疫苗(KLH加上alum或Ribi)，或非活性的安慰劑(PBS)，根據所示的時程進行4次免疫：將來自各免疫組的4隻動物在初次免疫的7天後安樂死，

並收集注射位置的淋巴結引流；

【0034】 圖13B係顯示免疫組引流淋巴結中Tfh之幾何平均百分比(個別分析的每組n=4隻小鼠)：所有接受活性疫苗或安慰劑的組係具有可測量的Tfh；再者接受KLH-TAUVAC-p7.1、KLH-TAUVAC-p22.1或活性安慰劑KLH加上alum之動物具有比給予非活性安慰劑之動物更明顯的Tfh(就多重比較係使用ANOVA檢測接著Dunnett調整，KLH-TAUVAC-p7.1為p=0.0044；KLH-TAUVAC-p22.1為p=0.0482；KLH為p=0.0063)；

【0035】 圖13C-H係顯示在免疫後的4個時間點(第14、28、56和84天)與基線(第0天)相比之血清效價變化，就各組平均(n=5-10)係具有95%信賴區間：星號係表示KLH-TAUVAC-引發的抗體反應明顯高於活性安慰劑所引發之時間點(p≤0.05，就多重比較係使用ANOVA檢測接著Tukey調整)，更特言之：

【0036】 圖13C係顯示對磷酸化tau胜肽p7.1之結合效價；

【0037】 圖13D係顯示對磷酸化tau胜肽p22.1之結合效價；

【0038】 圖13E係顯示對非-磷酸化tau胜肽7.1之結合效價；

【0039】 圖13F係顯示對非-磷酸化tau胜肽22.1之結合效價；及

【0040】 圖13G和H各自係顯示對載體蛋白KLH之結合效價；

【0041】 圖14係顯示來自以Tau結合物免疫的小鼠血清亦與來自其他tau病症之病理tau結構結合：使用收集的血清(n=6)，其係來自各免疫組初次免疫後的第84天，染色來自帶有MAPT突變(MAPT P301S，額葉皮質)之額顳葉失智症案例、具有皮克氏病(Pick's disease)(額葉皮質)案例、進行性核上麻痺(PSP, 尾狀核)和原發性老化有關的tau病症(PART, 海馬迴)的腦組織；來自接受活性疫苗之血清，各典型tau病症之tau-相關結構突出而來自以活性安慰劑(KLH-alum或KLH-Ribi)或非活性的安慰劑(PBS)免疫的動物血清，任何的該等結構皆未染色；以對應區域的AT8免疫染色作為參照；定標線 = 50 um；

【0042】 圖15係顯示在一加速tau病症模型中疫苗-引發的抗體降低了聚集的tau，特言之：

【0043】 圖15A：三個月大的P301L基因轉殖小鼠(每組n=15)，接受

以來自經KLH-TAUVAC-p7.1加上RIBI或以活性安慰劑KLH加上RIBI免疫的小鼠之純化IgG預培養的人類ePHF立體定位注射；注射後二個月，將所有的小鼠安樂死並測定小鼠中聚集的tau總分量和十二烷基肌胺酸(sarkosyl)-不可溶分量；

【0044】 圖15B和15C：收集來自各動物注射腦半球之總分量(B)和十二烷基肌胺酸-不可溶分量(C)；圖示係顯示以MSD所測量的tau之量；在總分量和不可溶分量，接受以來自KLH-TAUVAC-p7.1免疫的小鼠之IgG預培養的ePHF比接受以對照抗體預培養的ePHF之小鼠，小鼠腦部具有明顯較低的聚集tau。(p<0.0001，就多重比較係使用ANOVA檢測接著Holm-Bonferroni調整)；及

【0045】 圖16係顯示根據本發明實施例之Tau接合物(接合物B)在非人類靈長類中引發高效價的抗磷酸化Tau和ePHF之抗體：在第1、29、85和169天將恆河獼猴以alum和CpG作為佐劑的KLH-TAUVAC-p7.1 (n=6) 或以KLH (n=2)免疫；每14天收集血液；特言之：

【0046】 圖16A：使用ELISA檢測來自以KLH-TAUVAC-p7.1免疫的動物血清對免疫化胜肽p7.1之反應性；

【0047】 圖16B：從初次免疫後50天所收集的所有動物血清，使用MSD皆具有可測量的抗人類ePHF之抗體量，其中6隻動物中有3隻顯示對此抗原的高反應性；

【0048】 圖16C：將從初次免疫後50天所收集的所有動物血清施用於來自健康個體或AD病患之人類腦部，來自KLH-TAUVAC-p7.1組之免疫後血清使病理tau結構，亦即AD腦組織中的神經原纖維纏結、神經纖維網線和神經炎斑點染色，而來自KLH-免疫小鼠的血清並未顯示任何反應性，且在對照組織中未觀察到染色；

【0049】 圖16D：當以tau免疫耗竭分析檢測時，接受KLH-TAUVAC-p7.1的動物具有能結合及消耗tau種子之抗體(p= 0.03就多重比較在第50天使用ANOVA檢測接著Dunnett調整)，而以KLH免疫的並未觸發此等抗體；

【0050】 圖16E：以中和分析檢測免疫前後連續稀釋的個體樣本；計

算與基線相比的變化(CFB)為FRET計數間的差異，分別為接種前-14天(基線)及接種後50、106和190天之讀數。就特定免疫後天數(day_i)之反應則如下計算： $反應 = \%FRET_{day_i} - \%FRET_{基線}$ ；對前述反應之泛線性混合模型，以動物作為隨機效應，應用變數疫苗組，檢測的天數和血清量作為類別變項及其交互作用；

【0051】 圖17係顯示以根據本發明一實施例之接合物疫苗(接合物A)及氫氧化鋁(alum)和寡CpG(CpG)佐劑之組合免疫的小鼠產生對疫苗胜肽較高的效價抗體反應：將成年雌性C57BL/6小組(每組 $n=5-6$)以肌肉內2ug或0.2ug的接合物A疫苗免疫，而接合物疫苗係單獨投予或與alum、CpG，或組合的alum和CpG一起投予；所有的小鼠在研究的第0天接受初次免疫，接著在第28天接受單一加強免疫；alum佐劑的劑量為每隻小鼠每次注射500 ug，而CpG佐劑為20 ug/每隻小鼠每次注射；圖式係顯示使用從以疫苗胜肽T3.5作為披覆抗原免疫的小鼠所收集的血清之結合ELISA結果，其中係以每組T3.5特定平均終點效價作圖，在免疫前(第0天)和免疫後二個時間點(第28和42天)，及其中誤差線係代表標準差；表格係顯示結果的統計分析，其中抗體效價係使用非-參數Kruskal-Wallis檢定比較，組間逐對比較係使用Wilcoxon符號排序檢定作為Kruskal Wallis檢定的事後比較(post-hoc)來評估，特言之：

【0052】 圖17A：經2 ug的接合物A疫苗免疫的小鼠；及

【0053】 圖17B：經0.2 ug的接合物A疫苗免疫的小鼠；及

【0054】 圖18係顯示具有不同Tau胜肽與T-細胞表位比例之根據本發明實施例的tau疫苗，在恆河獼猴中引發持續高效價抗-磷酸化tau抗體。

【實施方式】

【0055】 在先前技術和整個說明書中引述了各種出版刊物、文章和專利；這些參考文獻各自係以全文引用的方式併入本文中。已包括在本說明書中的文件、法規、資料、裝置、品項或其類似物之論述係作為提供本發明背景之目的。此等論述並非承認就有關所揭示或所申請的任何發明而言，任何或所有這些事宜構成先前技術之部分。

【0056】 除非另有定義，否則文中所用的所有技術和科學術語係具有如同熟習本發明所屬技術之一般技術者通常理解的相同意義。另外，文中所用的特定術語係有說明書中所陳述之意義。

【0057】 請注意，如文中和所附的申請專利範圍中所用，除非內容有明確指出，否則單數型「一」和「此」係包括多數型參照物。

【0058】 除非另有說明，否則文中所述的任何數值，例如濃度或濃度範圍，應了解在所有情況下為術語「大約」之修改。因此，一數值典型地係包括所述數值之 $\pm 10\%$ 。例如1 mg/mL的濃度係包括0.9 mg/mL至1.1 mg/mL。同樣地，1%至10% (w/v)的濃度範圍係包括0.9% (w/v)至11% (w/v)。如文中所用，除非內容有明確指出，否則使用數字範圍明確地包括所有可能的子範圍，該範圍內的所有個別數值，包括此範圍內的整數和此數值之分數。

【0059】 除非另有指明，否則術語「至少」置於一連串元件要素前面應了解係指該系列中的每個元件要素。熟習本項技術者只要使用例行實驗應能識別，或能確認許多文中所述之特定實施例的等同物。本發明希望涵蓋此等等同物。

【0060】 如文中所用術語「包括」、「包含」、「具有」或「含有」，或其任何變化，應了解係意味包括所述的整體或整體群組，但並非排除任何其他整體或整體群組，且希望為非專屬或開放式。例如，包括一系列元素之組成物、混合物、程序、品項或裝置並不一定僅限於該等元素，而是可包括其他未明確列出或此等組成物、混合物、程序、品項或裝置所固有之元素。另外，除非另有明確說明為相反的，否則「或」係指包括在內或，且並非排除的。例如滿足A或B條件之下列其中之一：A為對的(或存在)而B為錯的(或不存在)，A為錯的(或不存在)和B為對的(或存在)，A和B二者皆為對的(或存在)。

【0061】 亦應了解，術語「大約」、「一般」、「實質上」及其類似術語，用於文中當指較佳的本發明之量度範圍或特徵時，係表示所述的量度範圍或特徵並非嚴格界線或參變量，且不應排除來自其功能上相同或類似之次要變異，如具有本項技術之一般技術者所應瞭解的。最低限度，包括一數字

參數的此參照物應包括使用本項技術中接受的數學和工業準則(例如，四捨五入、測量或其他系統誤差、製造耐受性等)之變異，不應變更最低有效數位。

【0062】 如文中所用，術語「tau」或「tau蛋白」亦稱為微管-相關蛋白tau、MAPT、神經原纖維纏結蛋白、成對細螺旋絲-tau、PHF-tau、MAPTL、MTBT1，係指具有多個同功型之豐富中樞和周圍神經系統蛋白。在人類中樞神經系統(CNS)中，六種主要tau同功型，由於選擇性剪接長度存有大小範圍從352至441個胺基酸(Hanger et al., *Trends Mol Med.* 15:112-9, 2009)。tau之實例包括(但不限於)CNS中的tau同功型，例如441-個胺基酸最長的tau同功型(4R2N)，其有四個重複和二個插入，以及352-個胺基酸長之最短的(胎兒)同功型(3R0N)，其具有三個重複並無插入。tau之實例亦包括表現在周圍神經之「大的tau」，其係含有300個額外的殘基(外顯子4a)。Friedhoff et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1502 (2000) 122-132。tau之實例包括人類的大tau，其為758個胺基酸長，由mRNA轉錄6762核苷酸長(NM_016835.4)所編碼，或其同功型。示例的人類大tau之胺基酸序列係以GenBank登陸號NP_058519.3代表。如文中所用，術語「tau」係包括來自人類以外的其他物種，例如食蟹獼猴(*Macaca Fascicularis*)或黑猩猩(*Pan troglodytes*)之tau的同源物。如文中所用，術語「tau」係包括含有突變的蛋白，例如全長野生型tau之點突變、片段、插入、刪除和剪切變體。術語「tau」亦涵蓋tau胺基酸序列之後轉譯修飾。後轉譯修飾包括(但不限於)磷酸化。

【0063】 如文中所用，術語「胜肽」或「多肽」係指由胺基酸殘基所組成之聚合物、相關的天然生成結構變體以及經由胜肽鍵連接的其合成的非天然生成類似物。此術語係指任何大小、結構或功能的胜肽。典型地，一胜肽為至少三個胺基酸長。胜肽可為自然生成的、重組的或合成的，或其任何組合。合成的胜肽可，例如，使用自動化多肽合成器來合成。tau蛋白之實例包括長度約5至約30個胺基酸，較佳地長度約10至約25個胺基酸，更佳地長度約16至約21個胺基酸之tau蛋白的任何胜肽。在本揭示文中，胜肽係使用標準三個或一個字母的胺基酸縮寫從N至C端列出，其中磷酸殘基係以「p」表示。可用於本發明中的tau胜肽之實例包括(但不限於)，包含任

何SEQ ID NO: 1-12之胺基酸序列的tau胜肽，或具有至少75%、80%、85%、90%或95%與任何SEQ ID NOs: 1-12胺基酸序列相同之胺基酸序列的tau胜肽。

【0064】 如文中所用，術語「磷酸化胜肽」係指在一或多個胺基酸經磷酸化的胜肽。tau磷酸化胜肽之實例包括含有一或多個磷酸化胺基酸殘基之任何tau胜肽。可用於本發明之tau磷酸化胜肽的實例包括(但不限於)含有任何SEQ ID NO: 1-3或5-12胺基酸序列的tau磷酸化胜肽，或具有至少75%、80%、85%、90%或95%與任何SEQ ID NOs: 1-3或5-12胺基酸序列相同之胺基酸序列的tau磷酸化胜肽。

【0065】 本發明之tau胜肽可藉由固相胜肽合成或藉由重組表現系統來合成。自動化胜肽合成器可在市面上從許多供應商購得，例如Applied Biosystems (Foster City, Calif.)。重組表現系統可包括細菌，例如大腸桿菌(*E. coli*)、酵母菌、昆蟲細胞或哺乳動物細胞。用於重組表現之程序係如Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.S.H.P. Press, NY 2d ed., 1989)所述。

【0066】 Tau為人類「自體」的蛋白。其係指，基本上，帶有tau專一性受體的所有淋巴細胞在發育期間應已刪除(中央耐受性)或藉由周邊耐受性機制呈現無反應。此問題已證實為一抗自體或「自體修飾」蛋白(例如腫瘤抗原)之疫苗開發的明顯路障。

【0067】 產生高品質對抗抗原(本身或感染的)之抗體不僅需要產生抗體之B淋巴細胞作用，亦需要CD4⁺ T「幫手」淋巴細胞之作用。CD4⁺ T細胞係提供重要的存活和成熟訊號給B淋巴細胞，而CD4⁺ T細胞缺陷的動物受到極度免疫壓制。CD4⁺ T細胞受耐受性機制影響，且產生強力的抗自體(例如抗-tau)抗體反應之另外的路障為tau-反應性CD4⁺ T細胞亦可能鮮少至不存在人類/動物個體中。

【0068】 不希望受限於理論，咸信，不希望在任何方面限制本發明之範圍，藉由本發明之疫苗組成物可克服此問題。

【0069】 在一實施例中，係製造包括tau胜肽之微脂體(一實例係如圖1中所示，上方)，其亦包括能結合大部分或所有HLA DR (人類白細胞抗原-

抗原D相關)分子之T-細胞表位。T-細胞表位然後能活化CD4⁺ T-細胞並提供必須的成熟和存活訊後給tau-專一性B-細胞(圖2)。在另外的實施例中，係製造帶有載體蛋白之tau胜肽的接合物(一實例係如圖1中所示，下方)，其係產生一強力的幫手T-細胞反應(圖3)。在此實施例中，係使用「非連接辨識」，其中載體專一性T-細胞係提供存活和成熟訊號給自體反應性B-細胞。因此，tau-專一性B-細胞接收關鍵訊號，觸發親和力成熟、免疫球蛋白種類移轉，及建立長期的記憶池。tau微脂體和tau接合物可在同源或異源免疫流程中用來產生高品質的抗tau抗原之抗體，其中微脂體或接合物係用於啟動及/或增強。

【0070】 微脂體

【0071】 在一通用態樣中，本發明係關於一微脂體，其係包括：

- a. tau 胜肽，較佳地該 tau 胜肽為 tau 磷酸化胜肽；及
- b. 幫手 T-細胞表位，

其中該 tau 胜肽係存在微脂體的表面。

【0072】 根據本發明之微脂體在文中亦指「改良的微脂體」、「改良的微脂體疫苗」或「根據本發明之微脂體疫苗」或「Tau微脂體」或「第2代微脂體」之「最佳化微脂體疫苗」。

【0073】 如文中所用，術語「微脂體」一般係指由具有高脂質含量之物質，例如磷脂質、膽固醇所製造的脂質囊泡。這些囊泡之脂質一般係以雙層脂質形式組織。雙層脂質一般係包封一穿插在雙層脂質之多重類洋蔥殼層的容積，形成多層的脂質囊泡(MLV)或包含在無定形中央孔洞內。具有無定形中央孔洞之脂質囊泡為多層的脂質囊泡，亦即在孔洞周圍帶有單一週邊雙層。大的單層囊泡(LUV)一般係具有100 nm至數微米之直徑，例如100-200 nm或更大，而小的單層脂質囊泡(SUV)一般係具有低於100 nm之直徑，例如20-100 nm，典型的15-30 nm。

【0074】 根據特定的實施例，微脂體係包括一或多條胜肽。根據特定的實施例，微脂體中的tau胜肽可相同或不同。

【0075】 就本揭示文之觀點，熟習本項技術者已知的任何適合的tau胜肽皆可用於本發明。根據特定的實施例，根據特定的實施例，一或多條tau

胜肽係包括其中一組SEQ ID NO: 1-12之胺基酸序列。在其他的實施例中，一或多條tau胜肽係包括至少75%、80%、85%、90%或95%與SEQ ID NOs: 1-12胺基酸序列之一相同的胺基酸序列，其中並無胺基酸殘基經磷酸化，或有一或多個胺基酸殘基經磷酸化。

【0076】 根據特定的實施例，一或多條tau胜肽為tau磷酸化胜肽。根據特定的實施例，一或多條tau 磷酸化胜肽係包括其中一組SEQ ID NO: 1-3或5-12之胺基酸序列或至少75%、80%、85%、90%或95%與任何SEQ ID NOs: 1-3或5-12胺基酸序列之一相同的胺基酸序列，其中一或多個所指的胺基酸殘基係經磷酸化。較佳地，tau磷酸化胜肽係包括其中一組SEQ ID Nos: 1-3之胺基酸序列。tau胜肽可具有C-端醯胺化。

【0077】 根據本申請書之實施例，tau胜肽係存在微脂體表面。tau胜肽，較佳地，就本揭示文之觀點，使用熟習本項技術者已知的方法，tau磷酸化胜肽可存在微脂體表面。參見，例如，美國專利第8,647,631和9,687,447號中相關的揭示，其內容係以引用的方式併入本文中。根據特定的實施例，一或多條tau胜肽，包括磷酸化胜肽，進一步係包括一或多個修飾，例如棕櫚酸化或十二烷基化修飾，讓tau胜肽得以存在微脂體表面。另外的胺基酸殘基，例如Lys、Cys，或有時候為Ser或Thr，可加到tau胜肽中以幫助此修飾。已有報告指出，脂質錨定位置引發胜肽序列的不同構形(Hickman et al., J. Biol. Chem. vol. 286, NO. 16, pp. 13966–13976, April 22, 2011)。不希望受限於理論，咸信在二端加入疏水基團可能增加tau胜肽之病態 β -摺疊構形。因此，一或多條tau胜肽進一步在二端係包括疏水性基團。經修飾的tau胜肽可具有C-端醯胺化。較佳地，存在微脂體表面的tau胜肽係由SEQ ID NO:27至SEQ ID NO:38之一的胺基酸序列所組成。

【0078】 如文中所用，術語「幫手T-細胞表位」係指包括能被幫手T-細胞辨識之表位的多肽。幫手T-細胞表位之實例包括(但不限於)破傷風類毒素(例如，P2和P30表位，分別又稱為T2和T30)、B型肝炎表面抗原、霍亂毒素B、類毒素、白喉類毒素、麻疹病毒F蛋白、砂眼衣原體(*Chlamydia trachomatis*)主要外膜蛋白、惡性瘧原蟲環子孢子(*Plasmodium falciparum circumsporozite*)T、熱帶瘧原蟲(*P. falciparum*)CS抗原、曼森氏住血吸蟲

(*Schistosoma mansoni*)磷酸丙糖異構酶、百日咳博德特氏桿菌(*Bordetella pertussis*)、破傷風桿菌(*Clostridium tetani*)、雞皮衣(*Pertusaria trachythallina*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)TraT和流感病毒血球凝集素(*Influenza virus hemagglutinin*)(HA)。

【0079】 就本揭示文之觀點，熟習本項技術者已知的任何適合幫手T-細胞表位皆可用於本發明。根據特定的實施例，幫手T-細胞表位係包括至少一組由SEQ ID NO:23至SEQ ID NO:26組成之群中選出的胺基酸序列。較佳地，幫手T-細胞表位係包括二或多組SEQ ID NO:23至SEQ ID NO:26之胺基酸序列，其係經由連接子，例如，包括一或多個胺基酸，例如Val (V)、Ala (A) Arg (R) Gly (G) Ser (S) Lys (K)之胜肽連接子融合一起。連接子的長度可不同，較佳地1-5個胺基酸。較佳地，幫手T-細胞表位係包括三或多組SEQ ID NO:23至SEQ ID NO:26之胺基酸序列，其係經由一或多個經由VVR、GS、RR、RK組成之群中選出的連接子融合一起。幫手T-細胞表位可具有其C-端醯胺化。

【0080】 根據本申請書之實施例，幫手T-細胞表位可併入微脂體表面，例如藉由共價鍵結疏水基團錨定，其中該疏水基團為烷基、脂肪酸、三酸甘油酯、二酸甘油酯、類固醇、鞘脂、醣脂或磷脂，特別是烷基或脂肪酸，特別是含有至少3個碳原子之碳主鏈，特別是至少4個碳原子之碳主鏈，特別是至少6個碳原子之碳主鏈，特別是至少8個碳原子之碳主鏈，特別是至少12個碳原子之碳主鏈，特別是至少16個碳原子之碳主鏈。在本發明之一實施例中，該疏水基團為棕櫚酸。另外，幫手T-細胞表位可包膠在微脂體中。根據特定的實施例，幫手T-細胞表位係包封在微脂體中。

【0081】 就本揭示文之觀點，幫手T-細胞表位可使用已知的方法就其在微脂體中的所欲位置作修飾。根據特定的實施例，可用於本發明之幫手T-細胞表位係包括SEQ ID NO:39至SEQ ID NO:44之一的胺基酸序列。較佳地，幫手T細胞表位係由SEQ ID NO:13至SEQ ID NO:17組成之群中選出的胺基酸序所組成。

【0082】 根據特定的實施例，微脂體係包括重量比1:1、2:1、3:1、4:1、5:1或6:1之tau胜肽和幫手T-細胞表位。

【0083】 在一實施例中，微脂體進一步係包括至少一包括一toll樣受體配體之佐劑。因此，在另外的通用態樣中，本發明係關於一微脂體，其係包括：

- a. tau 胜肽，較佳地 tau 磷酸化胜肽；
- b. 幫手 T-細胞表位；及
- c. 至少下列之一
 - i. toll 樣受體 9 配體，及
 - ii. toll 樣受體 4 配體。

【0084】 如文中所用，術語「toll樣受體」或「TLR」係指模式辨識受體(PRR)蛋白類別，其係在先天免疫反應上扮演關鍵角色。TLR係辨識來自微生物病原之病原-相關的分子模式(PAMP)，例如細菌、真菌、寄生物和病毒，其可與宿主分子區別。TLR為跨膜蛋白，典型地係以二聚體來運作且係藉由涉及先天免疫反應的細胞所表現，包括抗原呈現樹突細胞和吞噬性巨噬細胞。有至少10個人類TLR家族成員TLR1至TLR10，及至少12個鼠科TLR家族成員TLR1至TLR9以及TLR11至TLR13，且其差異在於其辨識的抗原類型不同。例如，TLR4係辨識脂多糖(LPS)，一種存在許多革蘭氏陰性菌中的組份，以及病毒蛋白、多糖，和內生性蛋白例如低密度脂蛋白、β-防禦素(beta-defensin)和熱休克蛋白；而TLR9為核苷酸-感測TLR，其係被在原核細胞基因體中富含但脊椎動物中鮮少的未甲基化胞嘧啶-磷酸-鳥嘌呤(CpG)單股或雙股二核苷酸所活化。TLR之活化導致一連串的訊號傳遞事件，造成第I型干擾素(IFN)、發炎細胞激素和趨化素產生，並引發免疫反應。事實上，此發炎作用亦活化了適應性免疫系統，其然後造成入侵的病原和感染的細胞被清除。

【0085】 如文中所用，術語「配體」係指與一生物分子(例如受體)形成一複合物用以進行生物目的之分子。根據特定的實施例，toll樣受體配體為toll樣受體促效劑。

【0086】 如文中所用，術語「促效劑」係指與一或多個TLR結合並引發受體媒介反應之分子。例如，一促效劑可引發、刺激、增加、活化、幫助、增進或上調受體的活性。此活化係稱為「促效性活化」。例如，TLR4

或TLR9促效劑可通過結合受體活化或增加細胞訊號傳遞。促效劑包括(但不限於)與受體結合或相互作用的核酸、小分子、蛋白、碳水化合物、脂質或任何其他分子。促效劑可模擬天然受體配體的活性。促效劑，就有關序列、構形、帶電或其他特徵可與這些天然受體配體為同源的，使其可被受體辨識。此變識可造成細胞內生理及/或生化變化，使得細胞如同天然受體配體存在時一樣，對促效劑的存在作出反應。根據特定的實施例，該toll樣受體促效劑為至少toll樣受體4促效劑或toll樣受體9促效劑其中之一。

【0087】 如文中所用，術語「toll樣受體4促效劑」係指作為TLR4促效劑之任何化合物。就本揭示文之觀點，熟習本項技術者已知的任何適合toll樣受體4促效劑皆可用於本發明。可用於本發明之toll樣受體4促效劑的實例包括TLR4促效劑，包括(但不限於)單磷醯脂質A (MPLA)。如文中所用，術語「單磷醯脂質A」或「MPLA」係指脂質A之修飾型，其為革蘭氏陰性菌脂多糖(LPS)內毒素的生物活性部分。MPLA比LPS毒性更低同時維持免疫刺激活性。作為疫苗佐劑，MPLA刺激細胞和體疫對疫苗抗原的反應。MPLA之實例包括(但不限於)3-O-去醯基-4'-單磷醯基脂質A、單磷醯基六醯脂質A、3-去醯基單磷醯基3-去醯基脂質A和其結構上相關的變體。可用於本發明之MPLA可使用本項技術中已知的方法，或由市售來源，例如Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA)之3D-(6-醯基) PHAD[®]、PHAD[®]、PHAD[®]-504、3D-PHAD[®]，或來自各種市售來源的MPLTM加以製得。根據特定的實施例，該toll樣受體4促效劑為MPLA。

【0088】 如文中所用，術語「toll樣受體9促效劑」係指作為TLR9促效劑之任何化合物。就本揭示文之觀點，熟習本項技術者已知的任何適合toll樣受體9促效劑皆可用於本發明。可用本發明之toll樣受體9配體的實例包括TLR9促效劑，包括(但不限於)CpG寡核苷酸。

【0089】 如文中所用，術語「CpG寡核苷酸」、「CpG寡去氧核苷酸」或「CpG ODN」係指包括至少一CpG模組之寡核苷酸。如文中所用，「寡核苷酸」、「寡去氧核苷酸」或「ODN」係指由多數個相連的核苷酸單元所形成的聚核苷酸。此等寡核苷酸可由現存的核酸來源來製得或可藉由合成的方法來製造。如文中所用，術語「CpG模組」係指核苷酸序列，其含有藉由

磷酸鍵或磷酸二酯主鏈或其他核苷酸內鍵聯相連接之未甲基化半胱胺酸-磷酸-鳥嘌呤(CpG)二核苷酸(亦即，半胱胺酸(C)，接著鳥嘌呤(G))。

【0090】 根據特定的實施例，CpG寡核苷酸為脂質化，亦即與脂質基團接合(共價連接)的CpG。

【0091】 如文中所用，「脂質基團」係指含有親脂結構之基團。脂質基團，例如烷基基團、脂肪酸、三酸甘油酯、二酸甘油酯、類固醇、鞘脂、醣脂或磷脂，特別是固醇，例如膽固醇或脂肪酸，當連接高親脂性分子，例如核酸時，可實質上增進血漿蛋白結合及因此增進親水性分子之循環半衰期。此外，與特定的血漿蛋白結合，例如脂蛋白，已顯示在表現對應脂蛋白受體(例如LDL-受體、HDL-受體或清除SR-B1)之特定組織中增加吸收。特言之，與磷酸化胜肽及/或CpG寡核苷酸接合之脂質基團得以讓該胜肽及/或寡核苷酸經由一疏水基團錨定在微脂體的膜內。

【0092】 根據特定的實施例，就本揭示文之觀點，CpG寡核苷酸可包括任何適合的核苷酸間鍵聯。

【0093】 如文中所用，術語「核苷酸間鍵聯」係指經由其糖類連接二個核苷酸之化學鍵聯，其係由相鄰核苷酸間一磷原子和一帶電或中性電荷基團所組成。核苷酸間鍵聯之實例包括磷酸二酯(po)、硫代磷酸酯(ps)、二硫代磷酸酯(ps2)、甲基磷酸酯(mp)和甲基硫代磷酸酯(rp)。硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、甲基硫代磷酸酯係安定核苷酸間鍵聯，而磷酸二酯為天然生成的核苷酸間鍵聯。寡核苷酸硫代磷酸酯典型地係合成為Rp和Sp硫代磷酸酯鍵聯之隨機外消旋混合物。

【0094】 就本揭示文之觀點，熟習本項技術者已知的任何適合CpG寡核苷酸皆可用於本發明。此等CpG寡核苷酸之實例包括(但不限於)CpG2006(亦稱為CpG 7909)、CpG 1018、CpG2395、CpG2216或CpG2336。

【0095】 CpG寡核苷酸，就本揭示文之觀點可使用本項技術已知的方法脂質化。在某些實施例中，CpG寡核苷酸的3'端係與膽固醇分子經由一磷酸鍵，視需要經由PEG連接子共價連接。其他的親脂基團亦可共價連接CpG寡核苷酸的3'端。例如，CpG寡核苷酸可共價連接與微脂體之磷脂質相同長度的脂質錨定：一棕櫚酸鏈(使用Pal-OH或類似、活化供偶合用)或二個棕櫚

酸(例如，使用1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油-3-磷醯乙醇胺-N-(琥珀基)或類似、活化供偶合用)，視需要經由PEG連接子。參見，例如美國專利第7,741,297號中的相關揭示，其內容係以引用的方式併入文中。PEG的長度可不同，例如，1至5個PEG單元。

【0096】 其他的連接子亦可用於共價連接CpG寡核苷酸與親脂基團(例如膽固醇分子)，其實例包括(但不限於)具有3至12個碳的烷基間隔鏈。需要與寡核苷酸化學相容的短連接子如胺基二醇。在某些實施例中，並未使用連接子進行共價鍵結。參見，例如Ries et al., “Convenient synthesis and application of versatile nucleic acid lipid membrane anchors in the assembly and fusion of liposomes, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13, 9673，其相關的揭示係以引用的方式併入文中。

【0097】 根據特定的實施例，可用於本發明之脂質化CpG寡核苷酸包括由SEQ ID NO:18至SEQ ID NO:22組成之群中選出的核苷酸序列，其中該核苷酸序列係包括一或多個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯，且該核苷酸序列係經由連接子共價連接至少一個膽固醇。任何適合的連接子皆可用於共價連接CpG寡核苷酸與膽固醇分子。較佳地，該連接子係包括聚乙二醇(PEG)。

【0098】 根據特定的實施例，該微脂體係包括：

- a. tau 磷酸化胜肽；
- b. 幫手 T-細胞表位；
- c. 脂質化 CpG 寡核苷酸；及
- d. toll 樣受體 4 配體，

其中 tau 胜肽係存在微脂體表面，且該幫手 T-細胞表位係包封在微脂體中。

【0099】 根據特定的實施例，該微脂體係包括：

- a. tau 胜肽，其係具有由 SEQ ID NO:27 至 SEQ ID NO:38 組成之群中選出的胺基酸序列
- b. 幫手 T-細胞表位，其係具有由 SEQ ID NO:39 至 SEQ ID NO:44 組成之群中選出的胺基酸序列，較佳地，該幫手 T-細胞表位係由 SEQ ID NO:13 至 SEQ ID NO:17 組成之群中選出的胺基酸序列所組成；

- c. 脂質化 CpG 寡核苷酸，其係具有由 SEQ ID NO:18 至 SEQ ID NO:22 組成之群中選出的核苷酸序列，其中該 CpG 寡核苷酸係包括一或多個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯，且該 CpG 寡核苷酸係經由一連接子與至少一膽固醇共價連接；及
- d. 單磷醯脂質 A (MPLA).

【0100】 根據特定的實施例，該微脂體進一步係包括一或多個由下列組成之群中選出的脂質：1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DMPC)、1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷醯基-3'-rac-甘油(DMPG)和膽固醇。

【0101】 根據特定的實施例，該微脂體進一步係包括一緩衝劑。就本揭示文之觀點，熟習本項技術者已知的任何適合緩衝劑皆可用於本發明。在一實施例中，該微脂體係包括一磷酸鹽緩衝食鹽水。根據特定的實施例，該緩衝劑係包括組胺酸和蔗糖。

【0102】 根據特定的實施例，該微脂體係包括莫耳比為9:1:7:0.07:0.04之DMPC、DMPG、膽固醇、tau磷酸化胜肽和幫手T-細胞表位。

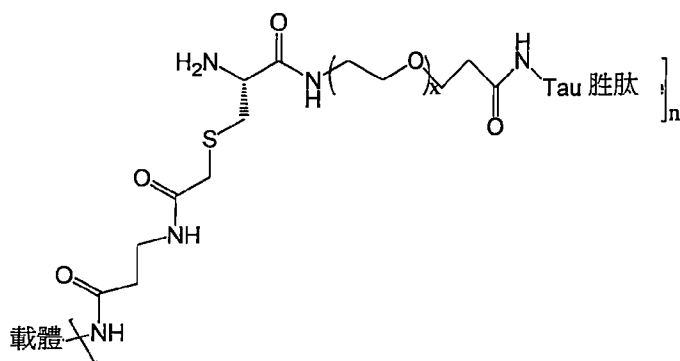
【0103】 本發明之微脂體就本揭示文之觀點可使用本項技術已知的方法來製造。

【0104】 本案例示的微脂體係說明於圖1中。更特言之，tau四棕櫚酸化磷酸化胜肽(pTau胜肽T3, SEQ ID NO: 28)係經由在二個tau胜肽之各端點上的棕櫚酸存在微脂體的表面。包括脂質化CpG(佐劑CpG7909-Chol)之TLR-9配體係經由共價連接的膽固醇併入微脂體膜中。TLR-4配體(佐劑3D-(6-醯基) PHAD[®])亦併入膜中。幫手T-細胞表位(PAN-DR結合劑T50)係包封於內。

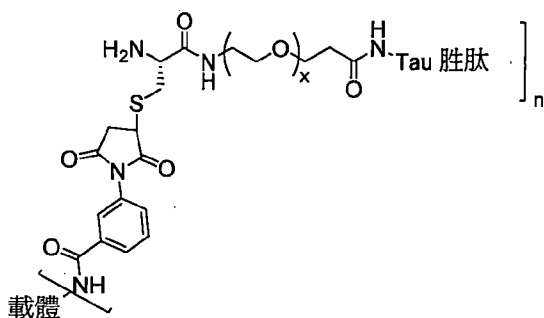
【0105】 接合物

【0106】 在一通用態樣中，本發明係關於包括一tau胜肽及一與其接合之致免疫載體的接合物。

【0107】 根據特定的態樣，該接合物係具有下列結構：



或式(II)結構：



其中

x 為 0 至 10 之整數；及

n 為 2 至 15 之整數，較佳地 3 至 11。

【0108】 根據特定的實施例，x 為 0 至 10，2 至 9，2 至 8，2 至 7，2 至 6，2 至 5，2 至 4，或 2 至 3 之整數。根據特定的實施例，x 為 3。

【0109】 根據特定的實施例，n 為 2 至 15，3 至 11，3 至 9，3 至 8，或 3 至 7 之整數。

【0110】 根據特定的實施例，該接合物係包括一或多個 tau 胜肽。根據特定的實施例，接合物之 tau 胜肽可相同或不同。

【0111】 根據特定的實施例，就本揭示文之觀點，任何適合的 tau 胜肽皆可用於本發明中。根據特定的實施例，一或多個 tau 胜肽係包括 SEQ ID NO: 1-12 之胺基酸序列之一，或包括至少 75%、80%、85%、90% 或 95% 與 SEQ ID NO: 1-12 胺基酸序列之一相同的胺基酸序列，其中並無胺基酸殘基經磷酸化，或有一或多個胺基酸殘基經磷酸化。

【0112】 根據特定的實施例，一或多個 tau 胜肽為 tau 磷酸化胜肽。根據特定的實施例，一或多個 tau 磷酸化胜肽係包括 SEQ ID NO: 1-3 或 5-12 之

一的胺基酸序列，或至少75%、80%、85%、90%或95%與SEQ ID NOs: 1-3或5-12胺基酸序列之一相同的胺基酸序列，其中一或多個所指的胺基酸殘基係經磷酸化。

【0113】 根據特定的實施例，該tau磷酸化胜肽係由SEQ ID NO: 1-3之一的胺基酸序列所組成。

【0114】 如文中所用，術語「致免疫載體」係指可與tau胜肽偶合的致免疫物質。與tau胜肽偶合的致免疫基團可引發免疫反應及引出可專一結合tau胜肽之抗體產生。致免疫基團為經辨識為外來物並藉此從宿主引出免疫反應之包括蛋白、多肽、糖蛋白、複合多糖、顆粒、核酸、聚核苷酸及其類似物的可操作基團。就本揭示文之觀點，熟習本項技術者已知的任何適合免疫載體皆可用於本發明。根據特定的實施例，該致免疫載體為鑰孔帽貝血藍素(KLH)、破傷風類毒素、CRM197(非毒素型或白喉毒素)及來自腦膜炎雙球菌的外膜蛋白混合物(OMP)或其衍生物。根據特定的實施例，該致免疫載體為KLH或CRM197。

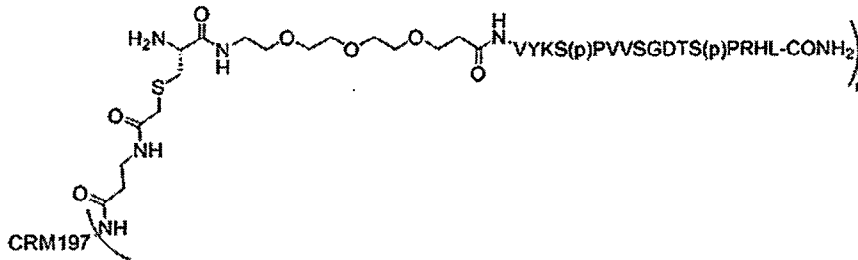
【0115】 根據特定的實施例，tau胜肽係經由一連接子與載體接合。如文中所用，術語「連接子」係指連接致免疫載體與tau胜肽之化學基團。就本揭示文之觀點，熟習本項技術者已知的任何適合連接子皆可用於本發明。連接子可為，例如單共價鍵烷基、經取代或未經取代的烷基、經取代或未經取代的雜芳基基團、聚乙二醇(PEG)連接子、胜肽連接子、糖基連接子或可裂解連接子，例如雙硫鍵或蛋白酶裂解位或胺基酸，或其組合。連接子的實例可包括一或多種乙二醇(PEG)、琥珀醯亞胺基3-(溴乙醯胺)丙酸酯(SBAP)、間-馬來醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯(MBS)，或一或多種胺基酸，例如Cys、Lys，或有時為Ser或Thr，或其組合。

【0116】 根據特定的實施例，連接子係包括 $(C_2H_4O)_x$ -半胱胺酸-乙醯胺基丙醯胺或間-馬來醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯-半胱胺酸- $(C_2H_4O)_x$ ，其中x為0至10之整數，例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

【0117】 根據特定的實施例，該載體係經由連接子共價連接tau胜肽的N-端。

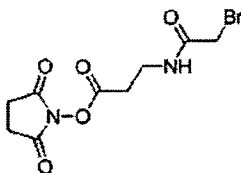
【0118】 根據其他特定的實施例，該載體係經由連接子共價連接tau 胜肽的C-端。

【0119】 根據特定的實施例，該接合物具有下列結構：



其中 n 為 2 至 15，較佳地 3-11，更佳地 3-7 之整數。

【0120】 本發明之接合物可就本揭示文之觀點，藉由本項技術中已知的方法來製造。例如上述的皆合物可藉由將琥珀醯亞胺基3-(溴乙醯胺)丙酸酯(SBAP)：



與 CRM197 的胺基基團反應，形成醯胺鍵聯。此 CRM197 前驅物隨後可與在其 N-端或在其 C-端與帶有一游離的親核性硫醇基的 PEG-半胱胺酸連接子接合的 tau 胜肽反應(例如，SEQ ID NO：2 之磷酸化 tau 胜肽)，形成 tau 磷酸化胜肽接合物。

【0121】 根據本申請案之一實施例例示的接合物係說明於圖1中。更特言之，多數個tau磷酸化胜肽(pTau胜肽T3.76)係與一載體蛋白CRM197共價連接。

【0122】 醫藥組成物

【0123】 在一通用態樣中，本發明係關於包括治療上有效量之本發明微脂體或接合物，以及一醫藥上可接受賦形劑及/或載劑之醫藥組成物。醫藥上可接受賦形劑及/或載劑已為本項技術所熟知(參見Remington's Pharmaceutical Science (15th ed.), Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980)。醫藥組成物之較佳的調配物係依照所希望的給藥模式和治療應用而定。組成物可包括醫藥上可接受的無毒載劑或稀釋劑，其係定義為通常用

於調配供動物或人類給藥之醫藥組成物的媒劑。稀釋劑係就不會影響此組合的生物活性來選擇。此等稀釋劑的實例有水、生理磷酸鹽緩衝食鹽水、林格氏液(Ringer's solution)、右旋糖溶液和漢克溶液(Hank's solution)。此外，醫藥組成物或調配物亦可包括其他載劑、佐劑或無毒、非治療性、非致免疫安定劑及其類似物。應了解，載劑、賦形劑或稀釋劑的特性將依照供特定施用的給藥路徑而定。

【0124】 醫藥組成物可含有相同的致免疫tau胜肽之混合物。另一種選擇，醫藥組成物可含有不同的本發明之致免疫tau胜肽的混合物。

【0125】 另外與抗神經元疾病疫苗有關的問題為可能需要異常高的抗體效價來確保效用。此項係因為疫苗之目標抗原係位於腦中。腦係藉由一稱為血液-腦屏障(BBB)的特化細胞結構與循環系統分開。BBB限制了物質從循環系統通行至腦中。此舉係防止毒素、微生物等進入中樞神經系統。BBB亦具有潛在較低所欲的防止有效的免疫媒介(例如抗體)進入環繞在腦周圍之間質液和腦脊髓液之效應。

【0126】 大約0.1%存在全身循環中的抗體穿過BBB並進入腦中。此項係代表藉由以CNS抗原為標靶之疫苗所引發的全身效價必須大於在腦中有效之最小有效效價的至少1000倍。

【0127】 根據特定的實施例，本發明之醫藥組成物因此進一步係包括一或多種適合的佐劑。因此，本發明之tau胜肽，存在微脂體或接合物中，可與適合的佐劑組合給藥以達到在該對象中所欲的免疫反應。適合的佐劑可在本發明之微脂體或接合物給藥前、後或一起投予。較佳的佐劑，係在無造成影響反應質化形式之致免疫原構形改變下，增加對致免疫原的內在反應。佐劑之實例有鋁鹽(alum)，例如氫氧化鋁、磷酸鋁和硫酸鋁。此等佐劑可在有或無其他專一免疫刺激劑下使用，例如MPLA類(3去-O-醯化單磷醯基脂質A(MPL™)、單磷醯基六-醯基脂質A、3-去醯基合成的(3D-(6-醯基)PHAD®)、PHAD™、PHAD®-504、3D-PHAD®)脂質A)，聚合或單體胺基酸，例如聚麩胺酸或聚離胺酸。此等佐劑可在有或無其他專一免疫刺激劑下使用，例如胞壁醯基胜肽(例如，N-乙醯-胞壁醯基-L-蘇胺酸-D-異麩醯胺(thr-MDP)、N-乙醯-去甲胞壁醯-L-丙氨醯-D-異麩醯胺(nor-MPD)、N-乙醯

基胞壁醯基-L-丙醯胺基-D-異麩醯胺酸-L-丙胺酸-2-(1'-2'二棕櫚醯基-sn-甘油-3-羥基磷醯氧基)-乙醇胺(MTP-PE)、N-乙醯基葡萄糖胺基-N-乙醯基胞壁醯基-L-Ala-D-異麩-L-Ala-二棕櫚醯基丙醯胺(DTP-DPP) Theramide™，或其他細菌細胞壁組份。水包油乳化液包括MF59(參見WO 90/14837)，其係含有5%角鯊烯、0.5% Tween 80和0.5% Span 85(視需要含有不同量的MTP-PE)使用微射流機(microfluidizer)調配成亞微米粒子；SAF，含有10%角鯊烯、0.4% Tween 80、5% pluronic-嵌段聚合物L121和thr-MDP，其係經微流化成亞微米乳化液或窩流產生較大粒子的乳化液；及Ribi™佐劑系統(RAS)(Ribi ImmunoChem, Hamilton, Mont.) 0.2% Tween 80和一或多種由下列組成之群中選出的細菌細胞壁組份：單磷醯基脂質A(MPL™)、海藻糖二黴菌酸酯(TDM)和細胞壁主幹(CWS)，較佳地MPL™+CWS (Detox™)。其他佐劑包括完全弗氏佐劑(Complete Freund's Adjuvant)(CFA)和細胞激素，例如介白素(IL-1、IL-2和IL-12)、巨噬細胞集落刺激因子(M-CSF)和腫瘤細胞壞死因子(TNF)。

【0128】 如文中所用，術語「組合」在給予一對象二或多種治療的內容中係指使用一種以上的治療。使用術語「組合」並非限制給予一對象治療之順序。例如，第一治療(例如文中所述之組成物)可在第二治療投予一對象之前(例如5分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、1小時、2小時、4小時、6小時、12小時、16小時、24小時、48小時、72小時、96小時、1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週或12週之前)，同時，或之後(例如，5分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、1小時、2小時、4小時、6小時、12小時、16小時、24小時、48小時、72小時、96小時、1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週或12週之後)給藥。

【0129】 本發明組成物可根據本項技術中熟知的方法來調配。組成物中各組份的最佳比率就本揭示文之觀點，可由熟習本項技術者熟知的技術來決定。

【0130】 使用方法

【0131】 本發明之另外的通用態樣係關於在患有神經退化疾病、病症、或症狀之對象中引發抗tau蛋白之免疫反應的方法，其係包括投予該對

象一根據本發明實施例之醫藥組成物。根據特定的態樣，係引發免疫反應對抗磷酸化tau蛋白，較佳地ePHF。

【0132】 本發明之另外的通用態樣係關於治療或預防神經退化疾病、病症、或症狀之方法，其係包括將根據本發明實施例之醫藥組成物投予該對象。

【0133】 如文中所用，術語「引發」和「刺激」及其變化係指任何可測量的細胞活性增加。引發免疫反應可包括，例如，免疫細胞群族之活化、增生或成熟，增加細胞激素產生，及/或增加免疫功能的另外指標。在特定的實施例中，引發免疫反應可包括增加B細胞增生，產生抗原專一性抗體，增加抗原專一性T細胞增生，促進樹突細胞抗原呈現及/或增加特定的細胞激素、趨化素和共同刺激標記之表現。

【0134】 在動物或人類中投予後引發或刺激抗-tau免疫反應之能力可藉由活體外或活體內，使用各種本項技術中標準分析來評估。就可用於評估免疫反應發生和活化之技術的一般說明請參見，例如Coligan et al. (1992 and 1994, Current Protocols in Immunology; ed. J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health)。測量細胞免疫力可藉由本項技術中已知的方法來進行，例如，藉由測量由活化效應子細胞，包括該等衍生自CD4⁺和CD8⁺T細胞所分泌的細胞激素性質(例如由ELISPO定量IL-4或IFN γ -產生細胞)，藉由測定免疫效應子之活化狀態(例如，經典[3H]胸腺嘧啶吸收之T細胞增生分析)，藉由分析在一敏化對象中抗原-專一性T淋巴細胞(例如，細胞毒性分析中之胜肽-專一性解離等)。

【0135】 刺激細胞及/或體液反應之能力可藉由檢測來自該對象的生物樣本(例如血液、血漿、血清、PBMC、尿液、唾液、糞便、CSF或淋巴液)，測定有無針對醫藥組成物中投予的致免疫tau胜肽之抗體存在(參見，例如Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press)。例如，回應所投予之提供致免疫原的組成物而產生的抗體效價可藉由酵素連結免疫吸附分析(ELISA)、墨點、SDS-PAGE凝膠、ELISPOT或抗體依賴的細胞吞噬作用(ADCP)分析來測定。

【0136】 如文中所用，術語「對象」係指動物。根據特定的實施例，

該對象為哺乳動物，包括非靈長類(例如駱駝、驢、斑馬、牛、豬、馬、山羊、綿羊、貓、狗、兔、天竺鼠或小鼠)或靈長類(例如猴子、黑猩猩或人類)。根據特定的實施例，該對象為人類。

【0137】 如文中所用，術語「治療上有效量」係指在一對象中引起所欲的生物或醫療反應之活性成份或組份的量。治療上有效量可以實驗和例行的方式，就有關所述目的來測定。例如，可視需要應用活體內分析來幫助鑑別最佳的劑量範圍。特定的有效劑量之選擇可由熟習本項技術者以考量的數個因素來測定(例如經由臨床試驗)，包括所欲治療或防止的疾病、涉及的癥狀、病患體重、病患免疫狀態和其他熟習技術者已知的因素。用於調配物中的精確劑量亦將依照給藥路徑和疾病嚴重性而定，且應根據執業醫師之判斷和各病患的狀況來決定。有效劑量可從活體外或動物模型試驗系統所衍生的劑量反應曲線外推。

【0138】 如文中所用，術語「治療」希望係指改善或反轉至少一種與神經退化疾病、病症或症狀有關的可測量身體參數，其在該對象中不一定為可識別的，但在該對象中可能識別。術語「治療」亦指造成減退、防止進行或至少延緩疾病、病症或症狀惡化。在一特別的實施例中，「治療」係指緩和、防止發展或發生，或降低一或多種與神經退化疾病、病症或症狀相關癥狀的持續時間。在一特別的實施例中，「治療」係指防止疾病、病症或症狀再發生。在一特別的實施例中，「治療」係指增加具有該疾病、病症或症狀之病患的存活。在一特別的實施例中，「治療」係指消除該對象中的疾病、病症或症狀。

【0139】 根據特定的實施例，治療上有效量係指足以達到一、二、三、四個或更多下列效果之治療量：(i)降低或改善所欲治療的疾病、病症或症狀或與其相關之癥狀的嚴重性；(ii)降低所欲治療的疾病、病症或症狀或與其相關之癥狀的持續時間；(iii)防止所欲治療的疾病、病症或症狀或與其相關之癥狀的進行；(iv)造成所欲治療的疾病、病症或症狀或與其相關之癥狀減退；(v)防止所欲治療的疾病、病症或症狀或與其相關之癥狀的發展或發生；(vi)防止所欲治療的疾病、病症或症狀或與其相關之癥狀的再發生；(vii)降低具有該所欲治療的疾病、病症或症狀或與其相關癥狀之病患的住院治

療；(viii)降低具有該所欲治療的疾病、病症或症狀或與其相關癥狀之病患的住院時間；(ix)增加患有該所欲治療的疾病、病症或症狀或與其相關癥狀之對象的存活；(x)於一對象中抑制或降低所欲治療的疾病、病症或症狀或與其相關之癥狀；及/或(xi)增進或促進另外的治療之預防性或治療性效用。

【0140】 如文中所用「神經退化疾病或症狀」，就本揭示文之觀點，包括任何熟習本項技術者已知的神經退化疾病、病症或症狀。神經退化疾病、病症或症狀之實例包括由形成神經原纖維病灶或與其相關所造成的神經退化疾病或病症，例如tau-相關的疾病、病症或症狀，稱為tau病症。根據特定的實施例，神經退化疾病、病症或症狀包括任何顯現tau和澱粉樣病變共同存在之疾病和病症，其包括(但不限於)阿茲海默症、帕金森氏症、克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、拳擊手失智症、唐氏症(Down's syndrome)、格斯特曼-施特勞斯納-杉克病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、包涵體肌炎、普里昂蛋白(prion protein)腦澱粉樣血管病、創傷性腦損傷、肌萎縮性脊髓側索硬化症、關島帕金森-失智症複合症、具有神經原纖維纏結之非關島運動神經元病、嗜銀顆粒性失智症、皮質基底退化、路易氏體型失智症肌萎縮性脊髓側索硬化症、伴有鈣化之瀰散性神經原纖維纏結、額顳失智症，較佳地與染色體17有關伴隨帕金森氏症的額顳葉失智症(FTDP-17)、額顳葉型失智症、哈勒沃登-施帕茨病(Hallervorden-Spatz disease)、多系統萎縮、C型尼曼-皮克病(Niemann-Pick disease)、皮克病(Pick's disease)、進行性皮質下神經膠質增生、進行性核上性麻痺、亞急性硬化性全腦炎、僅纏結性失智症、腦炎後帕金森氏症、肌強直性營養不良、慢性創傷性腦病變(CTE)、原發性老化相關tau病症(PART)或路易氏體失智症(LBD)。根據特定的實施例，該神經退化疾病、病症或症狀為阿茲海默症或另外的tau病症。

【0141】 本發明亦提供提高一對象之腦中tau聚集物清除率的方法，該方法係包括，於有效提高該對象腦中tau聚集物清除率的條件下，投予該對象一根據本發明實施例之醫藥組成物。根據特定的實施例，該tau聚集物為神經原纖維纏結或其病理性tau前驅物。

【0142】 本發明亦提供延緩一對象之tau-病理相關行為表現型惡化的方法，該方法係包括，於有效延緩該對象中tau-病理相關行為表現型惡化

的條件下，投予該對象一根據本發明實施例之醫藥組成物。

【0143】 在本發明一較佳的實施例中，經由根據本發明實施例之醫藥組成物投予一tau胜肽，係引發該對象對tau胜肽及對tau病理形式之活性免疫反應，藉此幫助清除相關的tau聚集物，延緩tau-病理相關行為表現型惡化，及/或治療該潛藏的tau病症。依照本發明之此態樣，免疫反應係涉及對抗tau胜肽的有利體液(抗體媒介的)反應和對抗T-細胞表位或致免疫載體之細胞(由抗原-專一性T細胞或其分泌產物)反應的發展。

【0144】 如文中所用，tau-病理相關行為表現型包括，不限於，認知障礙、早期性格改變和抑制解除、冷漠、意志缺失、緘默、失用症、持續動作、刻板性移動/行為、多食、混亂、無法計畫或組織依順序的事、自私/無情、反社會特質、缺乏同理心、語法失能伴隨經常性錯語但相對保留的理解、理解障礙和詞彙搜索困難、緩慢進行性步態異常、後退步態、僵硬反應、經常性跌倒、非-左旋多巴反應性軸向剛度、核上凝視麻痺、對稱性眼震、垂直方向運動變慢、假延髓麻痺、肢體失用症、肌張力障礙、皮層感覺性喪失和顫抖。

【0145】 在施行本發明之方法時，較佳的係在投予致免疫胜肽或本發明抗體之前，選擇具有或處於具有阿茲海默症或其他tau病症風險之對象，在腦中具有tau聚集物之對象，或具有行為表現行相關纏結之對象。適合治療的對象包括處於疾病風險但未顯現癥狀之個體，以及目前顯現癥狀之病患。就阿茲海默症的情況，實際上任何人皆處於罹患阿茲海默症之風險中。因此，本發明方法可預防性投予普遍人群，無須任何病患的風險評估。本方法可特別用於具有已知的阿茲海默症風險基因的個體。此等個體包括該等具有罹患此疾病之親戚者，及該等藉由基因或生化標記分析測定出其風險者。

【0146】 在無症狀的病患中，可在任何年齡(例如10、20、30歲)時開始治療。然而，通常是在病患到達40、50、60或70歲時才需要開始治療。治療典型地在一段期間內需要多個劑量。治療可藉由隨時間分析抗體，或活化的T-細胞或B-細胞對治療劑的反應來監測。若反應降低，則表示需加強劑量。

【0147】 在預防性應用上，係將含有tau胜肽的醫藥組成物，以足夠消除或降低風險，減輕嚴重性，或延緩疾病開始之量(包括疾病的生化、組織及/或行為癥狀、其併發症和在疾病發展期間出現的中間病理表現型)，投予有罹患傾向，或另外處於阿茲海默症或其他tau病症風險之病患。在治療應用上，係將含有tau胜肽的醫藥組成物，以足夠治癒或至少部分抑制疾病的癥狀之量(生化、組織及/或行為)，包括其併發症和在疾病發展期間出現的中間病理表現型，投予疑似罹患，或已罹患此疾病之病患。

【0148】 本發明組成物的有效劑量，就防止及/或治療神經退化性疾病、病症或症狀，係依照許多不同的因素而變，其係包括給藥模式、目標位置、病患的生理狀態、投予的其他醫藥，以及該治療為預防性或治療性。胜肽的量係依照是否亦投予佐劑而定，其中在缺乏佐劑下係需要較高的劑量。注射的時程從一天一次，一年一次，十年一次差異甚大。典型的療程係包括免疫，接著以時間間隔，例如間隔6週，加強注射。另外的療程包括免疫，接著在1、2、6、9和12個月後加強注射。另外的療程為終身必須每二個月注射一次。另一種選擇，可藉由監測免疫反應所顯示的，以不定期基準加強注射。

【0149】 熟習本項技術者能容易瞭解啟動和加強給藥之療程可以給藥後所測量的免疫反應為基準作調整。例如，加強組成物一般係在啟動組成物給藥後的數週或數月給藥，例如啟動組成物給藥後約2-3週或4週，或8週，或16週，或20週，或24週，或26週，或28週，或30週，或32週，或36週，或一至二年。

【0150】 胜肽可藉由非經腸、局部、靜脈內、口服、皮下、動脈內、顱內、腹膜內、皮內、鼻內或肌肉內方法給藥用於預防性及/或治療性治療。最典型的致免疫藥劑的給藥路徑為皮下或肌肉內注射。肌肉內注射最典型係在手臂或腿部肌肉進行。

【0151】 根據特定的態樣，可投予一或多個加強免疫。然而使用許多的加強組成物，就反應性啟動和加強組成物中的抗原，不需要相同，但應共享抗原決定位或實質上彼此相類似。

【0152】 組成物，若需要，可以套組、包套或分配器存在，其可含有一或多個包含活性成份的單位劑型。套組，例如可包括金屬或塑膠箔膜，例如泡罩包裝。套組、包套或分配器可隨附給藥說明書。

【0153】 根據特定的實施例，該套組係包括至少其中一項包括根據本發明一實施例之微脂體的醫藥組成物和包括根據本發明一實施例之接合物的醫藥組成物。

實施例

【0154】 本發明亦提供下列非限定實施例。

【0155】 實施例1為微脂體，其係包括：

- a. tau 胜肽；及
- b. 幫手 T-細胞表位，

其中該 tau 胜肽係存在微脂體的表面。

【0156】 實施例1為實施例2之微脂體，其中該tau胜肽為tau磷酸化胜肽。

【0157】 實施例3為實施例1或2之微脂體，進一步係包括一toll樣受體配體。

【0158】 實施例4為實施例3之微脂體，其中該toll樣受體配體係包括至少toll樣受體4配體和toll樣受體9配體之一。

【0159】 實施例5為實施例3或4之微脂體，其中該toll樣受體配體為toll樣受體4配體。

【0160】 實施例6為實施例5之微脂體，其中該toll樣受體4配體係包括單磷醯脂質A (MPLA)。

【0161】 實施例7為實施例3或4之微脂體，其中該toll樣受體配體為toll樣受體9配體。

【0162】 實施例8為實施例7之微脂體，其中該toll樣受體9配體係包括脂質化CpG寡核苷酸。

【0163】 實施例9為實施例1之微脂體，其係包括：

- a. tau 胜肽；
- b. 幫手 T-細胞表位；及

c. 至少下列之一

- i. toll 樣受體 9 配體，及
- ii. toll 樣受體 4 配體。

【0164】 實施例10為實施例9之微脂體，其中該tau胜肽為tau磷酸化胜肽。

【0165】 實施例11為實施例9或10之微脂體，其中該toll樣受體9配體為一脂質化CpG寡核苷酸。

【0166】 實施例12為實施例9或11之微脂體，其中該微脂體係包括toll樣受體4配體和toll樣受體9配體。

【0167】 實施例13為實施例12之微脂體，其中該toll樣受體4配體係包括單磷醯基脂質A (MPLA)。

【0168】 實施例14為一微脂體，其係包括：

- a. tau 磷酸化胜肽；
- b. 幫手 T-細胞表位；
- c. 脂質化 CpG 寡核苷酸；及
- d. 含有 toll 樣受體 4 配體之佐劑，

其中 tau 磷酸化胜肽係存在微脂體表面。

【0169】 實施例15為實施例14之微脂體，其中該toll樣受體4配體係包括單磷醯脂質A (MPLA)。

【0170】 實施例16為實施例1至15任一項中之微脂體，其中該幫手T細胞表位係包封在微脂體中。

【0171】 實施例16a為實施例1至15任一項中之微脂體，其中該幫手T細胞表位係併入微脂體的膜中。

【0172】 實施例16b為實施例1至15任一項中之微脂體，其中該幫手T細胞係存在微脂體表面。

【0173】 實施例17為一微脂體，其係包括：

- a. tau 磷酸化胜肽；
- b. 幫手 T-細胞表位；
- c. 脂質化 CpG 寡核苷酸；及

d. 單磷醯基脂質 A (MPLA) ,

其中 tau 磷酸化磷酸化胜肽係存在微脂體表面,而該幫手 T 細胞表位係包封在微脂體中。

【0174】 實施例17a為實施例17之微脂體,其中該MPLA為3-O-去醯基-4'-單磷醯基脂質A,較佳地MPL™。

【0175】 實施例17b為實施例17之微脂體,其中該MPLA為單磷醯基六-脂質3-去醯基,較佳地3D-(6-醯基) PHAD®。

【0176】 實施例17c為實施例17之微脂體,其中該MPLA為單磷醯基3-去醯基脂質A,較佳地3D-PHAD®。

【0177】 實施例18為實施例1至17c任一項中之微脂體,進一步係包括一或多種由下列組成之群中選出的脂質: 1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DMPC)、1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷醯基-3'-rac-甘油(DMPG)和膽固醇。

【0178】 實施例19為實施例1至18任一項中之微脂體,其中該tau胜肽係具有由SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 12組成之群中選出的胺基酸序列,或至少75%、80%、85%、90%或95%與由SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 12組成之群中選出的胺基酸序列相同。

【0179】 實施例19-1為實施例19之微脂體,其中該tau胜肽為一磷酸化胜肽,其係包括由SEQ ID NOs: 1-3和5-12組成之群中選出的胺基酸序列。

【0180】 實施例19-2為實施例19-1之微脂體,其中該tau磷酸化胜肽係包括SEQ ID NO: 1之胺基酸序列。

【0181】 實施例19-3為實施例19-1之微脂體,其中該tau磷酸化胜肽係包括SEQ ID NO: 2之胺基酸序列。

【0182】 實施例19-4為實施例19-1之微脂體,其中該tau磷酸化胜肽係包括SEQ ID NO: 3之胺基酸序列。

【0183】 實施例19a為實施例19、19-1、19-2、19-3和19-4任一項中之微脂體,其中該胺基酸序列進一步係包括一或多個修飾,使tau胜肽得以存在微脂體的表面。

【0184】 實施例19b為實施例19a之微脂體，其中該一或多個修飾係包括至少一棕櫚酸化和十二烷基化修飾。

【0185】 實施例19c為實施例19a或19b之微脂體，其中該tau胜肽係在其N-端藉由一或多個修飾作用經修飾。

【0186】 實施例19d為實施例19a至19c任一項中之微脂體，其中該tau胜肽係在其C-端藉由一或多個修飾作用經修飾。

【0187】 實施例19e為實施例19d之微脂體，其中該tau胜肽係在其二端N-端和C-端經棕櫚酸化。

【0188】 實施例19f為實施例19a-19e任一項中之微脂體，其中該tau胜肽進一步係包括一或多個另外的胺基酸用以促進一或多個修飾。

【0189】 實施例19g為實施例19f之微脂體，其中一或多個另外的胺基酸係由Lys、Cys、Ser和Thr組成之群中選出。

【0190】 實施例19h為實施例19至19g任一項中之微脂體，其中該tau胜肽係在其C-端經醯胺化。

【0191】 實施例19i為實施例19至19h任一項中之微脂體，其中該tau胜肽係由SEQ ID NO：27至SEQ ID NO：38組成之群中選出的胺基酸序列所組成。

【0192】 實施例19j為實施例19-19i任一項中之微脂體，其中該tau胜肽係由SEQ ID NO：27之胺基酸序列所組成。

【0193】 實施例19k為實施例19-19i任一項中之微脂體，其中該tau胜肽係由SEQ ID NO：28之胺基酸序列所組成。

【0194】 實施例19l為實施例19-19i任一項中之微脂體，其中該tau胜肽係由SEQ ID NO：29之胺基酸序列所組成。

【0195】 實施例20為實施例1至19l任一項中之微脂體，其中該幫手T細胞表位係包括至少一組由SEQ ID NO：23至SEQ ID NO：26組成之群中選出的胺基酸序列。

【0196】 實施例20a為實施例20之微脂體，其中該幫手T細胞表位係包括至少二組由SEQ ID NO：23至SEQ ID NO：26組成之群中選出的胺基酸序列。

【0197】 實施例20b為實施例20之微脂體，其中該幫手T細胞表位係包括至少三組由SEQ ID NO：23至SEQ ID NO：26組成之群中選出的胺基酸序列。

【0198】 實施例20c為實施例20之微脂體，其中該幫手T細胞表位係包括至少四組由SEQ ID NO：23至SEQ ID NO：26組成之群中選出的胺基酸序列。

【0199】 實施例20d為實施例20a至20c任一項中之微脂體，其中二或多組由SEQ ID NO：23至SEQ ID NO：26組成之群中選出的胺基酸序列係藉由連接子共價連接。

【0200】 實施例20e為實施例20d之微脂體，其中該連接子係包括一或多個由Val (V)、Ala (A)、Arg (R)、Gly (G)、Ser (S)、Lys (K)組成之群中選出的胺基酸。

【0201】 實施例20f為實施例20e之微脂體，其中該連接子係包括由VVR、GS、RR和RK組成之群中選出的胺基酸序列。

【0202】 實施例20g為實施例20至20f任一項中之微脂體，其中該幫手T細胞表位係在其C-端經醯胺化。

【0203】 實施例20h為實施例20至20g任一項中之微脂體，其中幫手T細胞表位係依照所欲的幫手T細胞表位位置經修飾供插入微脂體的膜中，而存在微脂體的表面或包封在微脂體中。

【0204】 實施例20i為實施例20至20h任一項中之微脂體，其中該幫手T細胞表位係由SEQ ID NO：13至SEQ ID NO：17組成之群中選出的胺基酸序列所組成。

【0205】 實施例20j為實施例1至20i任一項中之微脂體，其中該微脂體係包括重量比6：1之tau胜肽和幫手T細胞表位。

【0206】 實施例20k為實施例1至20i任一項中之微脂體，其中該微脂體係包括重量比5：1之tau胜肽和幫手T細胞表位。

【0207】 實施例20l為實施例1至20i任一項中之微脂體，其中該微脂體係包括重量比4：1之tau胜肽和幫手T細胞表位。

【0208】 實施例20m為實施例1至20i任一項中之微脂體，其中該微脂體係包括重量比3：1之tau胜肽和幫手T細胞表位。

【0209】 實施例20n為實施例1至20i任一項中之微脂體，其中該微脂體係包括重量比2：1之tau胜肽和幫手T細胞表位。

【0210】 實施例20o為實施例1至20i任一項中之微脂體，其中該微脂體係包括重量比1：1之tau胜肽和幫手T細胞表位。

【0211】 實施例21為實施例1至20o任一項中之微脂體，其中該脂質化CpG寡核苷酸係包括由SEQ ID NO：18至SEQ ID NO：22組成之群中選出的核苷酸序列。

【0212】 實施例21a為實施例21之微脂體，其中該CpG寡核苷酸係具有一或多個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯。

【0213】 實施例21b為實施例21a之微脂體，其中該CpG寡核苷酸係具有全部硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯。

【0214】 實施例21c為實施例21至21b任一項中之微脂體，其中該脂質化CpG寡核苷酸係包括經由一連接子與至少一親脂性基團共價連接的CpG寡核苷酸。

【0215】 實施例21d為實施例21c之微脂體，其中該連接子係包括 $(C_2H_4O)_n$ ，其中n為0至10之整數。

【0216】 實施例21e為實施例21c之微脂體，其中該連接子係包括具有3至12個碳之烷基間隔鏈。

【0217】 實施例21f為實施例21至21e任一項中之微脂體，其中該至少一個親脂性基團為膽固醇。

【0218】 實施例21g為實施例21至21f任一項中之微脂體，其中該脂質化CpG寡核苷酸係包括SEQ ID NO：18或SEQ ID NO：19之核苷酸序列，其係經由一包括 $(C_2H_4O)_n$ 之連接子共價連接一膽固醇，其中n為3至5之整數。

【0219】 實施例22為一微脂體，其係包括：

- a. tau 胜肽，其係具有由 SEQ ID NO：27 至 SEQ ID NO：38 組成之群中選出的胺基酸序列；

- b. 幫手 T 細胞表位，其係具有 SEQ ID NO : 39 至 SEQ ID NO : 44 組成之群中選出的胺基酸序列，較佳地，該幫手 T 細胞表位係由 SEQ ID NO : 13 至 SEQ ID NO : 17 組成之群中選出的胺基酸序列所組成；
- c. 脂質化 CpG 寡核苷酸，其係具有 SEQ ID NO : 18 至 SEQ ID NO : 22 組成之群中選出的核苷酸序列，其中該 CpG 寡核苷酸係包括一或多個硫代磷酸酯核苷酸內鍵聯，且該 CpG 寡核苷酸係經由一連接子與至少一膽固醇共價連接；及
- d. 單磷醯脂質 A (MPLA)。

【0220】 實施例222a為實施例22之微脂體，其係包括：

- a. 一 tau 磷酸化胜肽，其係由 SEQ ID NO : 27、SEQ ID NO : 28 或 SEQ ID NO : 29 之胺基酸序列所組成；
- b. 一幫手 T 細胞表位，其係由 SEQ ID NO : 13 之胺基酸序列所組成；
- c. 一脂質化 CpG 寡核苷酸，其係由 SEQ ID NO : 18 或 SEQ ID NO : 19 之核苷酸序列所組成，其係經由一包括(C₂H₄O)_n 之連接子共價連接一膽固醇，其中 n 為 3 至 7 之整數；及
- d. 單磷醯脂質 A (MPLA)。

【0221】 實施例22b為實施例22或22a之微脂體，其中該MPLA為3-O-去醯基-4'-單磷醯基脂質A，較佳地MPL™。

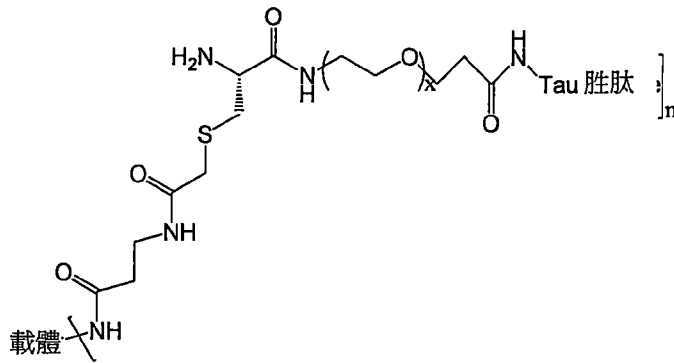
【0222】 實施例22c為實施例22或22a之微脂體，其中該MPLA為單磷醯基六-醯基脂質A，3-去醯基，較佳地3D-(6-醯基)PHAD®。

【0223】 實施例22d為實施例22或22a之微脂體，其中該MPLA為單磷醯基3-去醯基脂質A，較佳地3D-PHAD®。

【0224】 實施例23為實施例22至22d任一項中之微脂體，其中該幫手 T細胞表位係包封在微脂體中。

【0225】 實施例24為一醫藥組成物，其係包括實施例1至23任一項中之微脂體及一醫藥上可接受載劑。

【0226】 實施例25為一接合物，其係包括一tau磷酸化胜肽和一經由一連接子與其接合的致免疫載劑，其係具有下列結構：

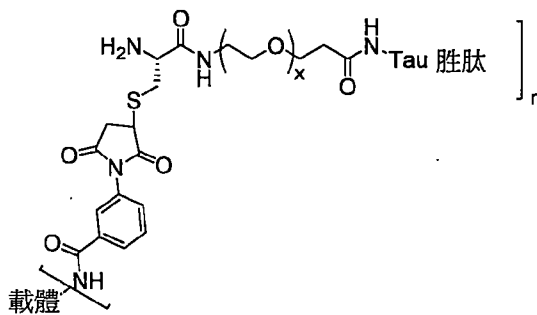


其中

x 為 0 至 10 之整數；及

n 為 2 至 15 之整數。

【0227】 實施例25a為一接合物，其係包括一tau磷酸化胜肽和一經由一連接子與其接合的致免疫載劑，其係具有式(II)之結構：



其中

x 為 0 至 10 之整數；及

n 為 2 至 15 之整數。

【0228】 實施例26為實施例25或25a之接合物，其中x為2至6之整數。

【0229】 實施例27為實施例25或25a之接合物，其中x為3。

【0230】 實施例28為實施例25或25a之接合物，其中n為3至7。

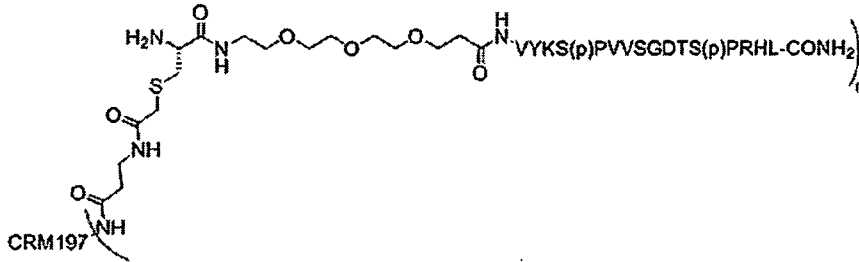
【0231】 實施例29為實施例25至28任一項中之接合物，其中該致免疫載劑係由下列組成之群中選出：鑰孔帽貝血藍素(KLH)、破傷風類毒素、CRM197及來自腦膜炎雙球菌的外膜蛋白混合物(OMP)或其衍生物。

【0232】 實施例30為實施例25至29任一項中之接合物，其中該tau 磷酸化胜肽係由SEQ ID NO：1至SEQ ID NO：12組成之群中選出的胺基酸序列所組成。

【0233】 實施例30a為實施例30之接合物，其中該tau磷酸化胜肽係由 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2或SEQ ID NO：3之胺基酸序列所組成。

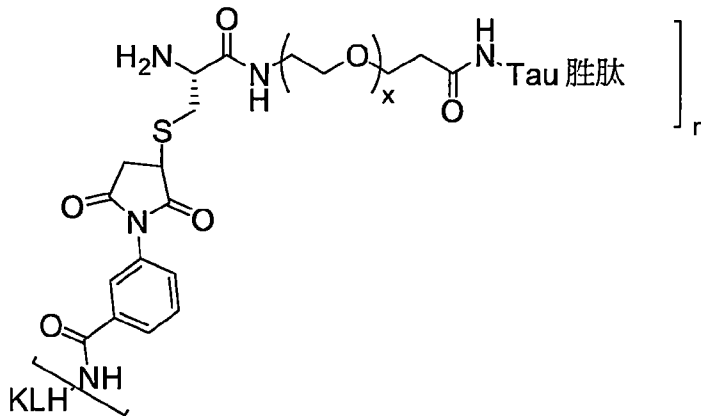
【0234】 實施例31為實施例25至30任一項中之接合物，其中該載劑為 CRM197。

【0235】 實施例32為實施例25之接合物，其係具有下列結構：



其中 n 為 3-7。

【0236】 實施例32a為實施例25之接合物，其中該 KLH-[間-馬來醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯-半胱胺酸-(C₂H₄O)_x-Tau 胜肽]_n



其中

該 Tau 胜肽係由 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO：3 所組成；

x 為 0 至 10 之整數；及

n 為 2 至 15 之整數。

【0237】 實施例33為一醫藥組成物，其係包括實施例25至32a任一項中之接合物及一醫藥上可接受載劑。

【0238】 實施例33a為一實施例33之醫藥組成物，進一步係包括一佐劑。

【0239】 實施例33b為一實施例33a之醫藥組成物，其中該佐劑係包括至少其中一項的TLR-4配體和TLR-9配體。

【0240】 實施例34為一於患有神經退化病症之患者中引發免疫反應之方法，其係包括投予該對象至少一實施例24及33至33b任一項中之醫藥組成物。

【0241】 實施例35為實施例34之方法，其係包括投予該對象至少一實施例24及33至33b之醫藥組成物供啟動免疫，以及投予該對象至少一實施例24及33至33b之醫藥組成物供加強免疫。

【0242】 實施例36為一種於一有此需要之對象中治療或防止神經退化性疾病或病症之方法，其係包括投予該對象至少一實施例24或33之醫藥組成物。

【0243】 實施例37為實施例36之方法，其係包括投予該對象至少一實施例24及33至33b之醫藥組成物供啟動免疫，以及投予該對象至少一實施例24及33至33b之醫藥組成物供加強免疫。

【0244】 實施例38為實施例34至37任一項中之方法，其中該神經退化性疾病或病症係由形成神經原纖維纏結病灶所造成或與其相關。

【0245】 實施例39為實施例34至38任一項中之方法，其中該神經退化性疾病或病症為阿茲海默症、帕金森氏症、克雅氏病、拳擊手失智症、唐氏症、格斯特曼-施特勞斯納-杉克病、包涵體肌炎、普里昂蛋白腦澱粉樣血管病、創傷性腦損傷、肌萎縮性脊髓側索硬化症、關島帕金森-失智症複合症、帶有神經原纖維纏結之非關島運動神經元病、嗜銀顆粒性失智症、皮質基底退化、路易氏體型失智症肌萎縮性脊髓側索硬化症、伴有鈣化之瀰散性神經原纖維纏結、額顳失智症，較佳地與染色體17有關伴隨帕金森氏症的額顳葉失智症(FTDP-17)、額顳葉型失智症、哈勒沃登-施帕茨病、多系統萎縮、C型尼曼-皮克病、皮克病、進行性皮質下神經膠質增生、進行性核上性麻痺、亞急性硬化性全腦炎、僅纏結性失智症、腦炎後帕金森氏症、肌強直性營養不良、慢性創傷性腦病變(CTE)、原發性老化相關tau病症(PART)或路易氏體失智症(LBD)。

【0246】 實施例40為實施例34至39任一項中之方法，其中該神經退化

性疾病或病症為阿茲海默症、帕金森氏症、唐氏症、進行性核上性麻痺(PSP)、與染色體17有關的額顳葉失智症和帕金森氏症(FTDP-17)、皮克病、皮質基底退化、路易氏體型失智症肌萎縮性脊髓側索硬化症、肌強直性營養不良、慢性創傷性腦病變(CTE)、原發性老化相關tau病症(PART)或路易氏體失智症(LBD)。

【0247】 實施例40b為實施例34至39任一項中之方法，其中該神經退化性疾病或病症為阿茲海默症、進行性核上性麻痺(PSP)、與染色體17有關的額顳葉失智症和帕金森氏症(FTDP-17)或皮克病和PART(原發性老化相關tau病症)。

【0248】 實施例40c為實施例34至39任一項中之方法，其中該神經退化性疾病或病症為阿茲海默症、帕金森氏症、唐氏症、與染色體17有關的額顳葉失智症和帕金森氏症(FTDP-17)、皮質基底退化、路易氏體型失智症肌萎縮性脊髓側索硬化症、肌強直性營養不良、慢性創傷性腦病變(CTE)、原發性老化相關tau病症(PART)或路易氏體失智症(LBD)。

【0249】 實施例40b為一套組，其係包括至少一項實施例24之醫藥組成物和實施例33、33a或33b之醫藥組成物。

【0250】 實施例42為一幫手T細胞表位，其係由SEQ ID NO: 13至SEQ ID NO: 17組成之群中選出的胺基酸序列所組成。

【0251】 實施例43為一醫藥組成物，其係包括實施例42之幫手T細胞表位。

【0252】 實施例44為於一有此需要之對象中提升對抗原之免疫反應的方法，其係包括投予該對象此抗原以及實施例43之醫藥組成物。

實例

【0253】 下列本發明實例係進一步說明本發明之性質。應了解，下列實例並非限制本發明且本發明之範圍係由所附的申請專利範圍決定。

【0254】 除非另有指出，否則用於下列時例的實驗方法皆為一般的方法。除非另有指出，否則用於下列實施例的試劑皆購自一般試劑供應商。

【0255】 實例1：製備微脂體疫苗

【0256】 製備對照的微脂體疫苗(乙醇注射技術)

【0257】 對照微脂體疫苗係藉由乙醇(EtOH)注射技術接著擠壓所製造。首先，將DMPC(Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)、DMPG (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)、膽固醇(Dishman, Netherlands)和MPLA (Avanti Polar Lipids, AL, USA)以9:1:7:0.05於60°C溶於20:1 (V/V)的EtOH和第三丁醇(t-BuOH)之混合物中。將脂質/乙醇溶液以磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS) pH 7.4於60°C稀釋，維持10% EtOH濃度並產生多層的微脂體囊泡(MLV)。然後將MLV使用Emulsiflex-C5 (Avestin, Canada)經由連續三個0.08 um孔徑的聚碳酸酯過濾器進行5次連續擠壓。在加入tau胜肽之前將產生的微脂體以PBS pH 7.4稀釋並加熱至60°C，得到微脂體溶液。

【0258】 將乙酸四棕櫚酸化的SEQ ID NO: 2之磷酸化tau胜肽(Bachem AG, Switzerland)，文中稱為活性醫藥成份(API)，溶於含有2.0%β-D-吡喃葡萄糖苷辛酯(Sigma-Aldrich, USA)濃度1 mg/mL之PBS pH 11.4，並將胜肽溶液於60°C注射至微脂體溶液中，接著於60°C攪拌30分鐘。經由超過濾進行濃縮至最終目標體積，及在透析期間以PBS pH 7.4進行10次緩衝液交換。然後將帶有API存在微脂體表面之所生成的微脂體，藉由通過連續2個0.2 um聚碳酸酯注射過濾器除菌過濾，及將最終產物儲存於5°C。

【0259】 製備微脂體X、Y、Z和Z⁺疫苗

【0260】 微脂體X和Y疫苗係藉由薄脂質薄膜技術接著均質化和擠壓所製造。

【0261】 具有1200ug/ml最終API濃度和1200 ug/ml最終T50濃度之微脂體Z⁺疫苗係藉由乙醇注射技術接著擠壓所製造，而具有400 ug/ml最終API濃度和100 ug/ml最終T50濃度之微脂體Z疫苗係藉由薄脂質薄膜技術接著均質化和擠壓所製造。

【0262】 具有400 ug/ml最終API濃度和400 ug/ml最終T50濃度之微脂體Z⁺⁺疫苗係藉由薄脂質薄膜技術接著均質化和擠壓所製造。

【0263】 具有1200 ug/ml最終API濃度和300 ug/ml最終T50濃度之微脂體Z⁺⁺⁺疫苗係藉由乙醇注射技術接著擠壓所製造。

【0264】 以薄脂質薄膜技術製備微脂體X、Y、Z和Z⁺⁺疫苗

【0265】 微脂體X、Y、Z和Z⁺⁺疫苗係藉由薄脂質薄膜技術接著均質

化和擠壓所製造。首先，將DMPC (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)、DMPG (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)、膽固醇 (Dishman, Netherlands)和單磷醯基六-醯基脂質A 3-去醯基合成的(3D-(6-醯基)PHAD[®]) (Avanti Polar Lipids, AL, USA)以9:1:7:0.05之莫耳比於60°C溶於EtOH，但微脂體Y除外，其不含有3D-(6-醯基)PHAD[®]。於真空蒸發器下蒸發乙醇，得到薄脂質薄膜。

【0266】 將脂質薄膜以含有0.15 mg/mL T50 胜肽 (Peptides & Elephants, Germany)之PBS pH 7.4, 5% DMSO(皆為Sigma-Aldrich)再水合。將樣本緩和攪拌15 min及進一步劇烈渦旋以溶解薄脂質薄膜。將所產生的多層囊泡進行10個冷凍-解凍循環(液態N₂和37°C水浴)及進行均質化，接著經由0.08 μm孔徑的聚碳酸酯膜(Whatman, UK)依序擠壓。均質化和擠壓二個步驟係於EmulsiFlex-C5(Avestin, Canada)中進行。將帶有包封的T50胜肽之擠壓微脂體藉由超過濾濃縮，藉由透析將緩衝劑與PBS pH 7.4交換。在加入tau胜肽和佐劑之前，將生成的微脂體以PBS pH7.4稀釋並加熱至60°C，得到微脂質溶液。

【0267】 CpG2006-膽固醇 (CpG2006-Chol)(Microsynth, Switzerland)為帶有全部核苷酸間鍵聯皆為硫磷酯之DNA寡核苷酸，其係在5'端依靠PEG間隔鍵通過一磷酸鍵經一膽固醇分子修飾。將CpG2006-膽固醇 (CpG2006-Chol)(Microsynth, Switzerland)溶於1 mg/mL之PBS pH 7.4並注射至微脂體溶液中(微脂體X除外，其不含有CpG2006-Chol)，接著溫育15分鐘，之後插入API。

【0268】 將API (Bachem AG, Switzerland)溶於含有2.0%β-D-吡喃葡萄糖苷辛酯(Sigma-Aldrich, USA)濃度1 mg/mL之PBS pH 11.4，並將胜肽溶液於60°C注射至微脂體溶液中，接著於60°C攪拌30分鐘。經由超過濾進行濃縮至最終目標值(就微脂體X、Y、Z微400ug/ml API和100 ug/ml T50；而微脂體Z⁺⁺為400ug/ml API和400ug/ml T50)，及在透析期間以PBS pH 7.4進行10次緩衝液交換。然後將帶有API存在微脂體表面之所生成的微脂體，藉由通過0.2 μm聚碳酸酯注射過濾除菌過濾，及將最終產物儲存於5°C。

【0269】 以乙醇注射技術製備微脂體O

【0270】 微脂體O疫苗係藉由乙醇(EtOH)注射技術接著擠壓所製造。首先，將DMPC(Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)、DMPG(Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)、膽固醇(Dishman, Netherlands)和MPLA (Avanti Polar Lipids, AL, USA)以9:1:7:0.05於60°C溶於20:1 (V/V)的EtOH和第三丁醇(t-BuOH)之混合物中。將脂質/乙醇溶液以磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS) pH 7.4於60°C稀釋，維持10% EtOH濃度並產生多層的微脂體囊泡(MLV)。然後將MLV使用Emulsiflex-C5 (Avestin, Canada)經由連續三個0.08 μm 孔徑的聚碳酸酯過濾器進行5次連續擠壓。在加入tau胜肽之前將產生的微脂體以PBS pH 7.4稀釋並加熱至60°C，得到微脂體溶液。

【0271】 將T46胜肽(Pepscan, the Netherlands)溶於1 mg/mL之PBS pH 7.4並注射至微脂體溶液中，接著溫育15分鐘，之後插入API。

【0272】 將API (Bachem, Switzerland)溶於含有2.0% β -D-吡喃葡萄糖苷辛酯(Sigma-Aldrich, USA)濃度1 mg/mL之PBS pH 11.4，並將胜肽溶液於60°C注射至微脂體溶液中，接著於60°C攪拌30分鐘。經由超過濾進行濃縮，得到目標值(400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ API和100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ T46)，及在透析期間以PBS pH 7.4進行10次緩衝液交換。然後將帶有API存在微脂體表面的所生成微脂體，藉由通過0.2 μm 聚碳酸酯注射過濾器除菌過濾，及將最終產物儲存於5°C。

【0273】 以乙醇注射技術製備微脂體 Z^+ 和微脂體 Z^{+++} 疫苗

【0274】 微脂體 Z^+ 和微脂體 Z^{+++} 疫苗係使用乙醇注射基礎的方法所製造，首先，將DMPC(Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)、DMPG(Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)、膽固醇(Dishman, Netherlands)和3D-(6-醯基)PHAD[®](Avanti Polar Lipids, AL, USA)以9:1:7:0.04於60°C溶於EtOH。將T50胜肽(Bachem AG, Switzerland)溶於10 mM His/270 mM蔗糖(pH 5.8-6.0)。然後，將乙醇溶液注射至含有T50胜肽的溶液中並緩和攪拌15 min，產生多層囊泡(MLV)。將MLV均質化(微脂體 Z^+ 為6次而微脂體 Z^{+++} 則未均質化)，接著經由0.08 μm 孔徑的聚碳酸酯膜(Whatman, UK)連續擠壓(微脂體 Z^+ 通過5次，而微脂體 Z^{+++} 為3-5次)。就微脂體 Z^+ ，均質化和擠壓二個步驟皆以EmulsiFlex-C5 (Avestin, Canada)來進行。微脂體 Z^{+++} 之擠壓係使用

LIPEX過濾擠壓機來進行。將擠壓過的微脂體以超過濾加以濃縮，並藉由透析將緩衝液與20 mM His/145 mM NaCl pH 7.4交換。在添加API和佐劑之前，將所產生之含有包封T50胜肽的微脂體以20 mM His/145 mM NaCl pH 7.4稀釋並加熱至60°C，得到微脂體溶液。

【0275】 將CpG2006-Chol(微脂體Z⁺為Microsynth, Switzerland；微脂體Z⁺⁺⁺為Avecia, USA)溶於1 mg/mL之20 mM His/145 mM NaCl pH 7.4並注射至微脂體溶液中，接著溫育15分鐘，之後插入API。

【0276】 將API (Bachem AG, Switzerland)溶於含有1%β-D-吡喃葡萄糖苷辛酯(Sigma-Aldrich, USA)濃度1 mg/mL之碳酸鹽緩衝液pH 10.2，並將胜肽溶液於60°C注射至微脂體Z⁺溶液中，接著於60°C攪拌30 min。將胜肽溶液使用T-Line Mixing於60°C混入微脂體Z⁺溶液中，接著於60°C攪拌30 min。經由超過濾進行濃縮，得到目標值(微脂體Z⁺為1200ug/ml API和1200ug/ml T50；而微脂體Z⁺⁺⁺為1200ug/ml API和300ug/ml T50)，及在透析期間以10 mM His/270 mM蔗糖pH 6.5進行10次緩衝液交換。然後將所生成帶有API存在微脂體表面的Z⁺微脂體，藉由通過0.2 um聚碳酸酯注射器/囊式過濾器除菌過濾，及將最終產物儲存於5°C。

【0277】 製備微脂體L、M & N疫苗

【0278】 微脂體L、M和N疫苗係藉由薄脂質薄膜技術接著均質化和擠壓所製造。省先，將DMPC(Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)、DMPG(Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)、膽固醇(Dishman, Netherlands)和MPLA(Avanti Polar Lipids, AL, USA)以9：1：7：0.05於60°C溶於EtOH中。將乙醇於真空蒸發器下蒸發，得到薄脂質薄膜。

【0279】 將脂質薄膜以含有下列之PBS pH 7.4, 5% DMSO(皆為Sigma-Aldrich)再水合：

- 0.15 mg/mL T48 胜肽(Peptides&Elephants, Germany)–微脂體 M；或
- 0.13 mg/mL T50 胜肽(Peptides&Elephants, Germany)–微脂體 L；或
- 0.15 mg/mL T52 胜肽(Peptides&Elephants, Germany)–微脂體 N。

【0280】 將樣本緩和攪拌15 min及進一步劇烈渦旋以溶解薄脂質薄膜。將所產生的多層囊泡進行10個冷凍-解凍循環(液態N₂和37°C水浴)及進

行均質化，接著經由0.08 μm 孔徑的聚碳酸酯膜(Whatman, UK)依序擠壓。均質化和擠壓二個步驟係於EmulsiFlex-C5(Avestin, Canada)中進行。將經擠壓的微脂體藉由超過濾濃縮，及藉由透析將緩衝劑與PBS pH 7.4交換。在加入tau胜肽之前將所產生帶有包封T48、T50或T52胜肽的微脂體以PBS pH 7.4稀釋並加熱至60°C，得到微脂體溶液。

【0281】 將API (Bachem AG, Switzerland)溶於含有2.0% β -D-吡喃葡萄糖苷辛酯(Sigma-Aldrich, USA)濃度1 mg/mL之PBS pH 11.4，並將胜肽溶液於60°C注射至微脂體溶液中，接著於60°C攪拌30分鐘。經由超過濾進行濃縮，得到目標值(400ug/ml API和100 ug/ml T48、T50或T52)，及在透析期間以PBS pH 7.4進行10次緩衝液交換。然後將所生成帶有存在微脂體表面之API的微脂體，藉由通過0.2 μm 聚碳酸酯注射過濾除菌過濾，及將最終產物儲存於5°C。

【0282】 製備微脂體R、S和T疫苗

【0283】 微脂體R、S和T疫苗係使用乙醇注射為基準的方法接著擠壓所製造。首先，將DMPC (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)、DMPG (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)、膽固醇(Dishman, Netherlands)和3D-(6-醯基)PHAD[®](Avanti Polar Lipids, AL, USA)以9:1:7:0.04於60°C溶於EtOH中。就微脂體R和T，係將上述脂質乙醇溶液與添加270 mM蔗糖之10 mM組胺酸pH 5.8混合，達到10%溶劑(EtOH)及然後於60°C溫育30分鐘。就微脂體S，係將T50胜肽(Bachem AG, Switzerland)溶於10 mM His/270 mM蔗糖(pH 5.8-6.0)。將有關微脂體R、S和T之脂質-緩衝劑混合液溫和攪拌15 min，產生多層囊泡(MLV)。將生成的多層囊泡以EmulsiFlex-C5高壓系統(Avestin, Canada)經由0.08 μm 孔徑(5X)的聚碳酸酯膜(Whatman, UK)進行擠壓。

【0284】 將經擠壓的微脂體藉由超過濾濃縮，及藉由透析將緩衝液交換成20 mM His/145 mM NaCl pH 7.4。在加入API及微脂體T在加入T57之前，將所產生帶有包封T50之微脂體S，以及所產生的微脂體R和T進一步以20 mM His/145 mM NaCl pH 7.4稀釋並加熱至60°C，得到微脂體溶液。

【0285】 就微脂體T，係將T57溶於1 mg/mL之1% β -D-吡喃葡萄糖苷辛酯(Sigma-Aldrich, USA)之去離子蒸餾水溶液中並插入微脂體中，接著於60°C溫育15分鐘，之後插入API。

【0286】 將API(Bachem AG, Switzerland)溶於含有1% β -D-吡喃葡萄糖苷辛酯(Sigma-Aldrich, USA)濃度1 mg/mL之PBS pH 10.2，並將胜肽溶液於60°C混入微脂體溶液中，接著於60°C攪拌30分鐘。經由超過濾進行濃縮得到下列目標值：

- 就微脂體 R 為 1200ug/ml API ；
- 就微脂體 S 為 1200ug/ml API 和 300ug/ml T50 ；及
- 就微脂體 T 為 1200ug/ml API 和 300ug/ml T57 ；

【0287】 在透析期間以10 mM His/270 mM蔗糖pH 6.5進行10次緩衝液交換。然後將所生成帶有API存在微脂體表面的微脂體，藉由通過0.2 μ m聚碳酸酯注射過濾器除菌過濾，及將最終產物儲存於5°C。

【0288】 實例2：製備接合物疫苗

【0289】 胜肽和佐劑

【0290】 二個多磷酸化胜肽表位之序列(TAUVAC-p7.1和TAUVAC-p22.1其分別具有三和二個磷酸化胺基酸)係藉由最佳化長度加以精製化，使其更能結合B細胞的表面免疫球蛋白，及使該等序列不含有預期以高親和力結合人類HLA第I型A、B和C分子之表位。後項的準則對於避免引發可能造成明顯神經元損傷之抗tau細胞毒性CD8⁺ T細胞反應為重要的。使用免疫表位資料庫和分析資源(Immune Epitope Database and Analysis Resources)之T細胞表位預測工具，胜肽TAUVAC-p7.1顯示並無能以高親和力結合人類HLA第I型A、B和C和HLA第II型DQ及DR分子之預測表位，而胜肽 TAUVAC-p22.1經預測係含有以中度/高親和力(數據未顯示)結合HLA第II型DQ及DR分子之表位。

【0291】 用於本研究之磷酸化tau胜肽(SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3)係以在合成期間加入磷酸-殘基所合成產生(Pepsan, NL)。包含具有SEQ ID NO : 1或SEQ ID NO : 3經由一連接子共價連接KLH載體之胺基酸序列的磷酸化tau胜肽接合物，文中係分別稱為接合物B或接合物C。

包含具有SEQ ID NO: 2經由一連接子共價連接CRM載體之胺基酸序列的磷酸化tau胜肽接合物，文中係稱為接合物A。

【0292】 就製造接合物B和C，係將疫苗胜肽經由一間-馬來醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯(MBS)連接子和胜肽N-端上的額外半胱胺酸與載體蛋白KLH接合。使用Sephadex G25管柱移除未結合的胜肽，之後濃縮接合物。依照製造商說明混合接合物，之後注入一強力多組份佐劑(Sigma Adjuvant System, Sigma-Aldrich)或單一組份儲存佐劑(氫氧化鋁，Alhydrogel®, Invivogen)。

【0293】 將疫苗胜肽經由聚乙二醇(PEG)-半胱胺酸-乙醯胺基丙醯胺連接子與載體蛋白CRM197接合。以磷酸殘基及在合成期間加入PEG3間隔鏈，合成產生具有SEQ ID NO: 2胺基酸序列之磷酸化tau胜肽(Polypeptide Laboratories SAS)。接合物A係藉由將載體蛋白CRM197經由琥珀醯亞胺基3-(溴乙醯胺基)丙酸酯(SBAP)連接子與胜肽N-端上的半胱胺酸接合所製造。經由NHS酯反應化學將SBAP與CRM197蛋白一級胺(-NH₂)連接。使用超過濾和透析(UF/DF)移除過量的SBAP。將CRM197-SBAP中間物與磷酸化tau胜肽接合，且一旦反應完成，藉由加入過量的L-胱胺酸中止接合反應。使用Capto Q ImpRes (GE Healthcare)層析管柱及使用鹽等度法溶離，純化粗CRM197-胜肽接合產物。然後將純化的CRM197-胜肽產物使用UF/DF調配於20mM Tris, 250mM蔗糖, pH 8.1至濃度0.5 mg/mL。藉由加入10% PS80儲存緩衝液，達到0.01% PS80最終濃度，產生CRM197-tau胜肽原料藥(DS)。將溶液完全混合，之後過濾。

【0294】 實例3：引發對Tau磷酸化胜肽具專一性之IgG抗體的疫苗

【0295】 所有的動物實驗係經核准並依照當地的動物實驗法規進行。恆河獼猴(*Macaca mulatta*)係得自中國的科靈生物科技公司、中國的雲南英茂生物科技公司和中國的雲南靈長類實驗動物。在免疫開始時，動物為二至五歲大，且其最小體重為2.5 kg。在治療開始前及之後的每週，進行詳細的臨床檢驗。再者，每天觀察獼猴二次，並記錄臨床徵狀。

【0296】 將成年的恆河獼猴(每組n=3隻雄猴和3隻雌猴)以每劑1800 µg的乙酸四棕櫚醯基化磷酸化tau胜肽之SEQ ID NO: 2的對照微脂體疫苗

(含有四棕櫚醯基化磷酸化tau胜肽之SEQ ID NO: 2和MPLA的微脂體), 或根據本申請書實施例的微脂體疫苗, 例如微脂體Z(含有四棕櫚醯基化磷酸化tau胜肽之SEQ ID NO: 2、3D-(6-醯基) PHAD[®]、脂質化CpG寡核苷酸CpG 2006及T-細胞胜肽T50之微脂體), 或每劑15 µg之根據本發明實施例的接合物疫苗(例如接合物A, 連接CRM197之SEQ ID NO: 2的磷酸化tau胜肽)與alum和CpG寡核苷酸CpG 2006共注射, 在第1、29和85天以皮下免疫。在免疫前及在第8、22、36、50、64、78、92、106、120、134和148天進行抽血並分離血清。

【0297】 藉由ELISA, 使用SEQ ID NO: 2之磷酸化tau胜肽作為被覆抗原, 測定專一性IgG抗體效價。將來自個別免疫獼猴的血清以分析緩衝液(PBS, 0.05% Tween20, 1% BSA)連續稀釋及施用於塗覆上相關胜肽的96-孔盤。培養2小時後, 移出樣本並以PBST (PBS, 0.05% Tween20)沖洗測定盤。使用HRP接合的抗猴IgG (KPL), 接著ABTS基質(Roche)偵測抗體。所有的樣本皆進行8次的二倍稀釋, 其中各測定盤係包括正對照和負對照樣本。數據係以每組終點效價之幾何平均表示(引發正面反應之最後血清稀釋度)。

【0298】 如圖4中所示, 相較於對照微脂體疫苗, 微脂體Z疫苗和接合物A二者引發較高的磷酸化胜肽-專一性IgG效價。

【0299】 實例4: 引發人類腦中病理性Tau結構專一性抗體之疫苗

【0300】 所有的腦組織係得自Netherlands Brain Bank (NBB)且係收集自簽署腦部屍體解剖和使用樣本以及其臨床資訊作為研究目的之知情同意書的捐贈者。使用來自非失智對照組(健康)、阿茲海默症(AD)、帶有tau病理之額顳葉失智症(FTD-tau)、原發性老化有關的tau病症(PART)及進行性核上麻痺(PSP)之石蠟切片。腦區域包括頂葉皮質、額中回、海馬迴或尾核。

【0301】 特言之, 將來自對照人類對象(健康)和患有阿茲海默症人類對象(AD Braak V/VI)之頂葉皮質的福馬林-固定石蠟包埋切片以經1:100一般抗體稀釋劑(Immunologic)稀釋的免疫後血清染色。然後清洗切片並以山羊抗-猴-HRP (Abcam)染色。最後使用3,3'-二氨基苯聯苯胺(DAB; Dako)可視化, 其係在辣根過氧化酶(HRP)的存在下沉澱一棕色特異性染色。將玻片以

蘇木素(haematoxylin)對比染色，脫水及封入Quick D封固劑(Klinipath)。以Leica DC500顯微鏡攝取影像。

【0302】 圖5之結果顯示，來自以微脂體Z(含有四棕櫚醯基化磷酸化tau胜肽的SEQ ID NO：2、3D-(6-醯基) PHAD[®]、脂質化CpG寡核苷酸CpG 2006及T-細胞胜肽T50之微脂體)免疫的恆河獼猴的免疫後血清，人類腦切片中的病理性tau結構被染色。在以改良的微脂體初次免疫後106天，收集恆河獼猴的血清。此獼猴係在收集血清前0、1和3個月接受免疫。左圖(AD Braak V/VI)顯示來自阿茲海默症第V期捐贈者(Braak stage V)之頂葉皮質的染色。箭頭係指出tau纏結之染色。右圖(健康)係顯示來自阿茲海默症0期捐贈者(Braak stage 0)之頂葉皮質的染色。將血清以1：100稀釋度塗覆於切片，接著以1：100塗覆山羊抗-猴抗體，及使用DAB顯影劑使染色可視化。

【0303】 圖6之結果係顯示來自經接合物A免疫的恆河獼猴之血清與人類AD腦切片中的病理性tau結構結合，而接合物A係含有SEQ ID NO：2之磷酸化tau胜肽加上可溶性CpG及氫氧化鋁。在以CRM接合物疫苗初次免疫後第106天，收集血清。這些獼猴係在收集血清前0、1和3個月接受免疫。上方圖(AD)係顯示來自阿茲海默症第V期捐贈者(Braak stage V)之頂葉皮質的染色，包括tau纏結。下方圖(CTRL)係顯示來自阿茲海默症0期捐贈者(Braak stage 0)之頂葉皮質的染色。將血清以1：100稀釋度塗覆於切片，接著以1：100塗覆山羊抗-猴抗體，及使用DAB顯影劑使染色可視化。

【0304】 實例5：帶有一或二種佐劑之微脂體疫苗

【0305】 在改良的疫苗中加入二種佐劑增加 tau磷酸化胜肽-專一性IgG抗體效價，以及個體間抗體反應之一致性。

【0306】 將成年的恆河獼猴(每組n=3隻雄猴和3隻雌猴)以每劑1800 µg的SEQ ID NO：2之乙酸四棕櫚醯基化磷酸化tau胜肽的對照微脂體疫苗，或含有單獨3D-(6-醯基)PHAD[®]佐劑(微脂體X, 圖7A)、單獨脂質化CpG 2006寡核苷酸佐劑(微脂體Y, 圖7B)，或3D-(6-醯基) PHAD[®]及脂質化CpG 2006寡核苷酸佐劑二者(微脂體Z, 圖7C)之帶有包封T50 T-細胞表位的改良微脂體疫苗，於第1、29、85和169天以皮下免疫。在免疫前及在第8、22、36、50、64、78、92、106、120、134、148、162、176和190天進行抽血並分離

血清。藉由ELISA，使用SEQ ID NO：2之磷酸化tau胜肽作為被覆抗原及一抗-IgG猴第二抗體，測定血清中專一性IgG抗體效價。生成的抗體量係以各個別獼猴隨時間之終點效價表示(引發正面反應之最後血清稀釋度)。各個免疫組係以一圖式代表(圖7A-C)。圖7D中係以每組的終點效價之幾何平均 $\pm 95\%$ 信賴區間表示。總言之，圖7A-D係顯示包含二種佐劑之含有包封T50的微脂體疫苗提升了tau磷酸化胜肽之抗體反應量和一致性，造成較小的獼猴個體間之抗體反應變異性。更特言之，如圖7D中所示，含有SEQ ID NO：2之磷酸化tau胜肽、T50 T-細胞表位(微脂體X、Y和Z)及1或2種佐劑之改良的微脂體疫苗，引發高於無T-細胞表位之對照微脂體疫苗之抗tau 磷酸化胜肽效價。當以各改良的微脂體疫苗注射時，所有的獼猴皆具有反應，而6隻獼猴中有4隻對於對照的微脂體疫苗具有反應。

【0307】 實例6：引發富含成對細螺旋絲(ePHF)專一性抗體之疫苗

【0308】 將恆河獼猴各組(每組n=3隻雄猴和3隻雌猴)於第1天和第29天，以(i)含有T50 T-細胞表位和單獨3D-(6-醯基)PHAD®佐劑之改良的微脂體疫苗(微脂體X)，(ii)含有T50 T-細胞表位和單獨脂質化CpG 2006佐劑之改良的微脂體疫苗(微脂體Y)，(iii)含有T50 T-細胞表位和(3D-(6-醯基) PHAD®及脂質化CpG2006二種佐劑之改良的微脂體疫苗(微脂體Z)或(iv)接合物疫苗(連接CRM197之SEQ ID NO：2的磷酸化tau胜肽)與alum和CpG寡核苷酸CpG 2006共注射(接合物A)之疫苗，經皮下免疫。

【0309】 從組織學確認AD的患者之死後腦組織，使用Greenberg和Davies修改的方法藉由不可溶tau之十二烷基肌胺酸萃取，得到富含成對細螺旋絲(ePHF)之製備物(Greenberg and Davies, 1991, Proc Natl Acad Sci U S A, 87(15)：5827-31)。使用Mesoscale Discovery (MSD)平台評估對於富含成對細螺旋絲(ePHF)專一的抗體效價。將MSD鏈徽親和素盤塗覆上生物素化抗-tau捕捉抗體(HT7-生物素, ThermoScientific)，之後以分離自阿茲海默症病患的ePHF培養，同時使用與猴子IgG抗體交叉反應之Sulfo Tag-標定的抗-人類IgG抗體進一步偵測ePHF專一性IgG抗體。更特言之，將ePHF加入先前以1% BSA使其飽和及塗覆生物素化HT-7(Thermo Scientific)的MSD Gold small spot鏈徽親和素96-孔盤(MSD)。培養1小時後，以PBST沖洗測定盤及加入連

續稀釋的血清並培養2小時。使用SulfoTag標定的抗-人類IgG抗體偵測結合的抗體，接著1% PFA之固定步驟，之後加入判讀緩衝液T。使用Sector Imager (MSD)分析測定盤。各獼猴個體之結果係以每毫升之任意單位(AU/mL)，以及每組的幾何平均來表示。以第一次免疫後第50天之ePHF專一性抗體效價來代表。

【0310】 圖8係顯示所有的疫苗皆引發高效價的ePHF-專一性IgG抗體。

【0311】 其他的微脂體，例如微脂體Z+，經由肌肉內給藥投予恆河獼猴亦得到具有高效價的ePHF-專一性IgG抗體之類似結果。

【0312】 實例7：由微脂體疫苗和接合物疫苗於恆河獼猴中引發的Tau磷酸化胜肽-專一性抗體之廣泛性

【0313】 將恆河獼猴各組(每組n=3隻雄猴和3隻雌猴)於第1天和第29天，以(i)含有T50 T-細胞表位和二種佐劑：TLR4配體(3D-(6-醯基) PHAD®)及脂質化CpG2006之改良的微脂體疫苗(微脂體Z)，及(ii)接合物疫苗(連接CRM之SEQ ID NO：2的磷酸化tau胜肽)(接合物A)與alum和CpG寡核苷酸CpG 2006共注射之疫苗，經皮下免疫。於第二次免疫後3週(第50天)使用N-端生物素化8-mer胜肽(移動一個胺基酸)及涵蓋SEQ ID NO：2之磷酸化tau胜肽序列，以及SEQ ID NO：4序列(VYKSPVVS GDTSPRHL，具有與SEQ ID NO：2相同的胺基酸之非-磷酸化tau胜肽)和對應的生物素化全長胜肽的資料庫，藉由表位定序ELISA測定抗體的表位辨識性質。

【0314】 圖9係顯示經微脂體Z免疫的獼猴產生的IgG抗體，其大部分係與SEQ ID NO：2之磷酸化胜肽的N-端部分結合(圖9A)，而經接合物疫苗(連接CRM之SEQ ID NO：2的磷酸化tau胜肽)免疫的獼猴產生的IgG抗體，其大部分係與SEQ ID NO：2之磷酸化胜肽的C-端部分結合(圖9B)。

【0315】 實例8：由含有包封的T-細胞表位之微脂體疫苗引發增加的Tau磷酸化胜肽專一性IgG抗體效價

【0316】 將三組C57BL/6J小鼠(每組n=10)於第0和14天以i)含有TLR4促效劑(3D-(6-醯基) PHAD®)之微脂體疫苗(微脂體R)，ii)含有包封T-細胞表位T50和TLR4配體(3D-(6-醯基) PHAD®)作為佐劑之微脂體疫苗(微脂體S)，

或iii)在微脂體表面含有錨定的T-細胞表位T57之微脂體疫苗(亦即二棕櫚酸化T50)和TLR4配體(3D-(6-醯基) PHAD®)作為佐劑之微脂體疫苗(微脂體T),經皮下免疫。於第一次注射後21和35天,以ELISA測量小鼠血漿中抗SEQ ID NO:2之磷酸化tau胜肽專一性IgG抗體量;結果係以個別小鼠之值,以及每毫升之任意單位(AU)表示的每組幾何平均 \pm 95% CI來呈現。如圖10A中所示,在第一次免疫後21天,含有微脂化T50之微脂體疫苗(微脂體S)引發明顯高於對照微脂體疫苗(微脂體R)和含有錨定的T-細胞表位之微脂體疫苗(微脂體T)的抗體效價(Kruskal-Wallis試驗:分別為 $p=0.0089$ 和 $p=0.002$),以及在第一次免疫後35天,高於對照疫苗的抗體效價以及比含有錨定的T-細胞表位之微脂體疫苗明顯更高的抗體效價(Kruskal-Wallis試驗:分別為 $p=0.7591$ 和 $p=0.0053$)(圖10B)。

【0317】 實例9：引發對併入的T-細胞表位專一之T-細胞反應的微脂體疫苗

【0318】 將三組C57BL/6J小鼠(每組 $n=5$)於第0、14和28天以(i)含有包封T-細胞胜肽T48(含有以GS連接子隔開的T-細胞表位PADRE、T2、T30和T17)和TLR4促效劑作為佐劑(MPLA)之改良的微脂體疫苗(微脂體M)。(ii)含有包封T52(含有以RK連接子隔開的T-細胞表位PADRE、T2和T30)和TLR4促效劑(MPLA)作為佐劑之改良的微脂體疫苗(微脂體N)或(iii)PBS,經皮下免疫。於第一次免疫後42天從小鼠收取脾臟進行IL-4和IFN- γ ELISPOT的T-細胞反應分析。將單一細胞懸浮液以10 μ g/mL培養基T48或T52胜肽培養48小時。將測定盤以生物素化抗-小鼠IL-4或IFN- γ 單株抗體及以鏈黴親和素鹼性磷酸鹽(AP)培養。藉由加入AP基質展開斑點。圖11係顯示,以如同包封於微脂體中的相同胜肽再刺激小鼠脾細胞引發IL-4 (圖11B)和IFN- γ 斑點形成細胞(圖11A),而注射PBS的小鼠之脾細胞則無。此項確認了於疫苗中加入T-細胞表位引發專一性T-細胞之活化,使其進一步提供tau-專一性B-細胞產生抗體之協助。

【0319】 實例10：含有包封的T-細胞表位和錨定的T-細胞表位之微脂體疫苗

【0320】 將恆河獼猴各組(每組 $n=6$)於第1、29、85和169天以(i)含有

包封的T-細胞表位T50和TLR4配體(MPLA)作為佐劑之微脂體疫苗(微脂體L)，(ii)含有錨定的T-細胞表位T46和TLR4配體(MPLA)作為佐劑之微脂體疫苗(微脂體O)和(iii)含有TLR4配體(MPLA)作為佐劑而無T-細胞表位之對照微脂體疫苗，經皮下免疫。在免疫前(第-14天)及在第8、22、36、50、64、78、92、106、120、134、148、162、176和190天進行抽血並分離血清。以ELISA，使用SEQ ID NO：2之磷酸化tau胜肽作為被覆抗原及抗-猴IgG第二抗體，測定專一性IgG抗體效價。計算生成的抗體量為終點效價(引發正面反應之最後血清稀釋度)，及數據係以每組的幾何平均表示。如圖12中所示，含有包封T-細胞表位之微脂體疫苗(微脂體L)及含有錨定T-細胞表位之微脂體疫苗(微脂體O)各自引發高於無T-細胞表位之對照微脂體疫苗的tau磷酸化胜肽-專一性抗體效價。

【0321】 實例11：以接合物疫苗在小鼠中引發抗體反應

【0322】 將雌性BALB/c小鼠(每組14隻小鼠)，依照圖13A中所述的時程及使用加入強力多組份佐劑(Sigma Adjuvant System®, Sigma-Aldrich，以下稱為Ribi)或單組份儲存佐劑(Alhydrogel® adjuvant 2%或氫氧化鋁凝膠, InvivoGen，以下稱為alum)之候選疫苗，以接合物B或接合物C(含有共價連接KLH之SEQ ID NO：1或SEQ ID NO：3)免疫。SEQ ID NO：1的胺基酸序列，相較於小鼠蛋白僅含有一個胺基酸差異，而SEQ ID NO：3序列為100%保守的介於人類和小鼠之間。因此，所選的表位可合理的視為小鼠的「自體」蛋白且小鼠應為研究免疫耐受性可能在於致免疫性之限制的恰當模型。

【0323】 就第一次測量疫苗致免疫性，係使用流式細胞儀測量在頸椎淋巴結引流疫苗注射位置引發的T濾泡幫手細胞(T_{fh})(每組四隻小鼠)。T_{fh}為CD4⁺T細胞之特異化群族其特徵在於，除了其他分子外，係表現CXCR5、PD-1和ICOS。在暴露於疫苗或其他免疫刺激後，T_{fh}擴增並支持發生中心的B細胞親和力成熟(Crotty, 2011, Annual Reviews of Immunology. Vol 29：p621-663)。引發的T_{fh}的數目在人類和小型動物中與疫苗的保護功效正相關(Bentebibel et al., 2013, Sci Transl Med., 5(176):176ra32; Spensieri et al., 2013, Proc Natl Acad Sci U S A., 110(35)：14330-5)。如圖13B中所示，二種疫苗，以及KLH加上佐劑的對照免疫在接種的小鼠中引發可測量的T_{fh}。再者，當

在第一次免疫後7天採集引流頸椎淋巴結時，所有接受活性疫苗(接合物B和接合物C組)或活性安慰劑(KLH)加上alum的動物，明顯地具有比給予非活性安慰劑(PBS組)更多的TfH(就多重比較係使用ANOVA檢定，接著Dunnnett調整，KLH-TAUVAC-p7.1為 $P=0.0044$ ；KLH-TAUVAC-p22.1為 $P=0.0482$ ；KLH為 $P=0.0063$)。

【0324】 在第0天及在免疫後的另外4個時間點(第14、28、56和84天，參見圖13C、D、G和H)進行ELISA測定與tau磷酸化胜肽和與KLH結合的血清抗體效價。如圖13C所示，以接合物B免疫引發反應性抗對應疫苗胜肽之結合抗體。就以接合物B和Ribi佐劑免疫的動物，在所有測量的時間點，抗疫苗胜肽之結合效價顯著高於活性安慰劑引發的結合效價(接合物B加上Ribi與KLH加上Ribi相比較)(就多重比較係使用ANOVA檢定，接著Tukey調整； $P<0.001$)。就alum佐劑組，僅在第56和84天有明顯的差異(分別為 $P=0.001$ 和 0.012)。

【0325】 接合物C的tau專一性抗體反應(圖13D)整體低於接合物B的反應，雖然分析差異(不同的披覆胜肽)排除了二種疫苗間的直接統計比較。然而，在免疫後28和84天，抗接合物C的抗體效價在接種接合物C加上Ribi疫苗的小鼠中明顯高於接受活性安慰劑KLH Ribi的小鼠(分別為 $P=0.001$ 和 0.008)；alum接合物組的效價與活性安慰劑組並無明顯差異。

【0326】 雖然載體蛋白在活體中於某程度上保護磷酸化胜肽免於降解，但活體內胜肽抗原的磷酸酶消化作用可能將某些非磷酸化胜肽暴露於免疫系統中。為了測定此暴露是否能使結合接合物B和接合物C中非磷酸化胜肽之抗體產生，係使用非磷酸化胜肽作為批覆抗原進行ELISA。如圖13E-F中所示，相較於活性安慰劑對相同非磷酸化胜肽的反應，非磷酸化胜肽之反應為低的。再者，在以接合物B和Ribi免疫的動物中，於所有測量的時間點，抗磷酸化胜肽的結合效價明顯高於抗非磷酸化胜肽的結合效價(使用ANOVA檢定，在第14天 $P=0.009$ ；在第28、56和84天 $P<0.0001$)。就alum佐劑組，僅在第56和84天有明顯的差異(分別為 $P=0.0002$ 和 0.001)。就以接合物C免疫的動物，對磷酸化胜肽的反應僅在使用Ribi佐劑時為較高(在第28天 $P<0.0001$ ；在第56和84天 $P=0.0001$)。

【0327】 實例12：接合物疫苗引發的抗體與生理上相關tau變化型結合

【0328】 為了進一步測定疫苗引發的抗體是否能與生理上相關的tau變化型結合，係使用來自接種疫苗小鼠的免疫後血清將收集自阿茲海默症病患(5個AD個案)，來自患有其他tau病症之病患(3個PART、FTD、PICK及PSP個案)，或來自年齡相符的健康對照組(5個對照組案例，CTRL)的死後人類腦切片染色。如預測的，來自對照動物的血清(PBS和活性安慰劑組)並未結合腦切片，而AT8，一種與得自鼠科選殖體之pTau [pSer202, pThr 205]結合的單株抗體，在對應區域的鄰近組織切片中顯示強力的tau病理的免疫反應性(圖14)。來自經活性疫苗接合物B和接合物C免疫的動物血清僅在AD切片(數據未顯示)，以及來自其他病症者的切片，與病理性tau結構結合(圖14)。接合物B引發的抗體係與AD個案中纏結(前期)、神經纖維網線和神經炎斑點反應。這些免疫後血清亦能與PART腦組織中的神經原纖維纏結和神經纖維網線，FTD-tau (*MAPT P301S*)組織中的神經元包涵體和神經纖維網線，某些皮克病案例中的包含體和星狀細胞及最後典型PSP的神經元包含體、神經纖維網線和星狀細胞進行免疫反應。接合物C引發的多株血清亦與各tau病症中的病理性tau結構特徵反應。在AD個案中，染色主要係集中在神經原纖維纏結，及較小程度的神經炎斑點和神經纖維網線。較低放大率之對應區域顯示類似的結果(數據未知)。

【0329】 實例13：疫苗引發的抗體在小鼠中為有作用的

【0330】 以一tau病症的注射模型檢測接合物B疫苗的保護效用(Peeraer et al., 2015, *Neurobiol Dis.*, 73: 83-95)。在此模型中，將經由一基因突變(P301L)而使其易罹患tau病症之小鼠，依照圖15A中所示的時間線接受腦內注射從人類AD腦中分離出的富含PHF。此注射，在基因轉殖引發tau病症之發生前進行，加速了這些動物中tau病症的發展。相反的，當PHF「種子」與能抑制tau播種活性的抗體如AT8預混合時，降低了tau病症的誘發(未公開的數據，未顯示)。

【0331】 依照圖15A中的流程，吾等評估了立體定位注射與純化自經接合物B、Ribi或經活性對照KLH Ribi免疫動物血清之IgG預混合的富含人

類PHF後，tau病症的發展。注射後二個月，收取這些小鼠的腦部並使用標準生化分析測定聚集的tau總分量和十二烷基肌胺酸-不可溶分量。所得到的數據顯示，當小鼠注射了與來自接種接合物B小鼠的IgG預混合的ePHF時，相較於接受對照注射的動物，在總分量(圖15B)和十二烷基肌胺酸-不可溶分量(圖15C)上具有明顯較少的聚集磷酸化-tau(就多重比較係使用ANOVA檢定接著Holm-Bonferroni調整， $p < 0.0001$ KLH Ribi 對 KLH-TAUVAC-p7.1 Ribi)。完全認可十二烷基肌胺酸-不可溶tau與tau病症的病理特性相關，此結果驗證了由KLH-TAUVAC-p7.1疫苗接種所引發的抗體在活體內為防護性的。

【0332】 實例14：疫苗引發的抗體在非人類靈長類中為有作用的

【0333】 將恆河獼猴經以alum和CpG寡核苷酸作為佐劑之接合物B(n=6)或經KLH(n=2)於第1、29、85和169天免疫。每14天從以接合物B免疫的動物收集血液和血清，使用ELISA進行免疫胜肽上的反應性檢測(圖16A)，及使用MSD檢測人類ePHF(圖16B)。經接合物B免疫產生持續和一致的疫苗磷酸化胜肽之抗體反應。再者，所有的動物皆具有可測量的抗人類ePHF之抗體量，其中6隻動物中有3隻對此抗原顯示高反應性。將由動物初次免疫後50天所收集的血清施用於來自健康個體或AD病患之人類腦切片(圖16C)。來自接合物B組的免疫後血清將病理tau結構，亦即AD腦組織中的神經原纖維纏結、神經纖維網線和神經炎斑點染色，而來自KLH-免疫小鼠的血清並未顯示任何反應性。在對照組織中未觀察到染色。當以tau免疫耗竭分析檢測時，接受接合物B的動物具有能結合和消耗tau種子之抗體(就多重比較係使用ANOVA檢定接著Dunnett調整，於第50天 $p = 0.03$)，而以KLH免疫則無觸發任何抗體(圖16D)。亦以中和分析檢測免疫前和免疫後血清之連續稀釋個體樣本(圖16E)。計算與基線相比的變化(CFB)為接種疫苗前第-14天和分別於接種疫苗後50、106和190天之FRET計數的讀數(基線)間之差異。然後如下計算接種疫苗後特定日的反應(天_i)：

$$\text{反應} = \%FRET_{\text{天}_i} - \%FRET_{\text{基線}}$$

【0334】 前述反應的泛線性混合模型，以動物為隨機效應，用於變數疫苗組，天數和血清量視為類別變項及其所有相互作用。有鑒於本研究的

探索性質，並未考慮多重檢定調整。假設檢定係以5%的顯著水準來進行。

【0335】 實例15：以接合物疫苗與alum和CpG寡核苷酸佐劑組合免疫的小鼠產生較高的疫苗胜肽之抗體反應

【0336】 將成年雌性C57BL/6小鼠(每組n=5-6)以2ug (圖17A)或0.2ug (圖17B)的接合物A疫苗經肌肉內免疫。接合物疫苗係單獨給藥(無佐劑)，與氫氧化鋁，與CpG寡核苷酸，或與組合的alum和CpG寡核苷酸一起給藥。所有的小鼠在研究的第0天接受初次免疫，接著於第28天單一加強免疫。alum佐劑的劑量為每隻小鼠每次注射500 ug，而CpG寡核苷酸佐劑的劑量為每次注射20ug/小鼠。圖17的圖形係顯示使用收集自小鼠免疫前(第0天)和以疫苗胜肽T3.5作為批覆抗原免疫後二個時間點(第28和42天)之血清，結合ELISA之結果。就每組T3.5特定平均終點效價作圖，其中誤差線係代表標準差。表格中係顯示結果之統計分析，其中係將抗體效價使用非參數Kruskal-Wallis檢定比較，而組的逐對比較係使用Wilcoxon符號排序檢定作為Kruskal Wallis檢定的事後比較來評估。

【0337】 圖17中所顯示的結果驗證了二種劑量，無佐劑疫苗無法引發強力的免疫反應。使用alum或CpG寡核苷酸或二者組合者提升了抗體反應的幅度($p \leq 0.0152$)。再者，就以2 ug疫苗免疫的動物，在第28天佐劑組合物給予明顯比單一佐劑更高的抗體效價28 ($p=0.0028$)。對於以0.2 ug疫苗免疫的動物在第42天，alum-CpG寡核苷酸組合物比單獨的CpG寡核苷酸表現更佳($p=0.0497$)。這些數據支持了使用alum和CpG寡核苷酸佐劑組合。

【0338】 實例16：含有不同比率Tau胜肽：T-細胞表位之微脂體疫苗引發高的及持續程度的tau磷酸化胜肽-專一性IgG抗體效價

【0339】 將成年恆河獼猴(每組n=6)於第1、29、85和169天以1800 μ g的SEQ ID NO：2之乙酸四棕櫚酸化磷酸化tau胜肽每劑帶有包封T50 T-細胞表位之改良微脂體疫苗中，含有3D-(6-醯基) PHAD®和脂質化CpG 2006寡核苷酸佐劑二者，以及：i) 400ug/mL的SEQ ID NO：2之磷酸化tau胜肽和100ug/mL的T50(微脂體Z)，ii) 1200ug/mL的SEQ ID NO：2之磷酸化tau胜肽和1200ug/mL的T50(微脂體Z⁺)，iii) 400ug/mL的SEQ ID NO：2之磷酸化tau胜肽和400ug/mL的T50(微脂體Z⁺⁺)，iv) 1200ug/mL的SEQ ID NO：2之磷酸

化tau胜肽和300ug/mL的T50 (微脂體Z⁺⁺⁺)，經皮下免疫。在免疫前及在第8、22、36、50、64、78、92、106、120、134、148、162、176和190天進行抽血並分離血清。以ELISA，使用SEQ ID NO：2之磷酸化tau胜肽作為被覆抗原及抗-猴IgG第二抗體，測定血清中專一性IgG抗體效價。計算生成的抗體量為各個獼猴隨時間之終點效價(引發正面反應之最後血清稀釋度)。每組終點效價之幾何平均±95%信賴區間係如圖18中所示，其顯示全部四組受試的微脂體疫苗引發高持續的抗tau磷酸-胜肽之效價。

參考文獻

- Asuni AA et al., J Neurosci. 2007 Aug 22;27(34) : 9115-29
- Bentebibel et al., 2013, Sci Transl Med., 5(176) : 176ra32
- Crotty, 2011, Annual Reviews of Immunology. Vol 29 : p621-663
- Friedhoff et al., Biochimica et Biophysica Acta 1502 (2000) 122-132
- Greenberg and Davies, 1991, Proc Natl Acad Sci U S A, 87(15) : 5827-31
- Hanger et al., Trends Mol Med. 15 : 112-9, 2009
- Hickman et al., J. Biol. Chem. vol. 286, NO. 16, pp. 13966–13976, April 22, 2011
- Kontsekova E et al., Alzheimers Res Ther. 2014 Aug 1;6(4) : 44
- Novak P et al., Lancet Neurology 2017, 16 : 123-134
- Peeraer et al., 2015, Neurobiol Dis., 73 : 83-95
- Ries et al., 2015, Org. Biomol. Chem., 13 : 9673
- Spensieri et al., 2013, Proc Natl Acad Sci U S A., 110(35) : 14330-5
- Theunis C et al., PLoS One. 2013; 8(8) : e72301
- US7,741,297
- US8,647,631
- US9,687,447
- WO90/14837
- WO2010/115843

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

無

【序列表】**SEQ ID NO : 1-磷酸-tau 胜肽 (7.1)**

GDRSGYS[pS]PG[pS]PG[pT]PGSRRT

SEQ ID NO : 2-磷酸-tau 胜肽 (T3.5)

VYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHL

SEQ ID NO : 3-磷酸-tau 胜肽 (22.1)

SSTGSIDMVD[pS]PQLA[pT]LA

SEQ ID NO : 4-tau 胜肽

VYKSPVSGDTSPRHL

SEQ ID NO : 5-磷酸-tau 胜肽

RENAKAKTDHGAEIVYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHL

SEQ ID NO : 6-磷酸-tau 胜肽

RQEFVMEHDHAGT[pY]GL

SEQ ID NO : 7-磷酸-tau 胜肽

PGSRSR[pT]P[pS]LPTPTR

SEQ ID NO : 8-磷酸-tau 胜肽

GYSSPG[pS]PG[pT]PGSRSR

SEQ ID NO : 9-磷酸-tau 胜肽

GDT[pS]PRHL[pS]NVSSTGSID

SEQ ID NO : 10-磷酸-tau 胜肽

PG[pS]PG[pT]PGSRSR[pT]P[pS]LP

SEQ ID NO : 11-磷酸-tau 胜肽

HL[pS]NVSSTGSID

SEQ ID NO : 12-磷酸-tau 胜肽

VSGDT[pS]PRHL

SEQ ID NO : 13-T50 T 細胞表位

AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNFTVSWLWLVPKV
SASHLE-NH₂

SEQ ID NO : 14-T46 T 細胞表位

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNFTVSWLWLVPKVSAS
HLEK(Pal)K(Pal)-NH₂

SEQ ID NO : 15-T48 幫手 T 細胞表位

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNFTVSWLWLVPKVSAS
HLEGLINSTKIYSYFPSVISKVNQ-NH₂

SEQ ID NO : 16-T51 幫手 T 細胞表位

AKFVAAWTLKAAARRQYIKANSKFIGITELRRFNFTVSWLWLVPKVSAS
HLE-NH₂

SEQ ID NO : 17-T52 幫手 T 細胞表位

AKFVAAWTLKAAARKQYIKANSKFIGITELRKFNNFTVSWLWLVPKVSA
SHLE-NH₂

SEQ ID NO : 18-CpG 2006 (亦稱為 CpG 7909)

5'-tcgtcgttttgcgtttgcggtt-3'

其中小寫係指硫代磷酸酯(ps)核苷酸內鍵聯

SEQ ID NO : 19-CpG 1018

5'-tgactgtgaacgttcgagatga-3'

其中小寫係指硫代磷酸酯核苷酸內鍵聯

SEQ ID NO : 20 – CpG2395

5'-tcgtcgttttcggcgcgcgccg-3'

其中小寫係指硫代磷酸酯核苷酸內鍵聯

SEQ ID NO : 21 – CpG2216

5'-ggGGGACGATCGTCgggggg-3'

其中小寫係指硫代磷酸酯核苷酸內鍵聯而大寫字母係指磷酸二酯(po)鍵聯

SEQ ID NO : 22 – CpG2336

5'- gggGACGACGTCGTGgggggg -3',

其中小寫係指硫代磷酸酯核苷酸內鍵聯而大寫字母係指磷酸二酯(po)鍵聯

SEQ ID NO : 23-Pan DR 表位(PADRE)胜肽

AKFVAAWTLKAAA

SEQ ID NO : 24 – P2

QYIKANSKFIGITEL

SEQ ID NO : 25 – P30

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

SEQ ID NO : 26-TT₅₈₆₋₆₀₅

LINSTKIYSYFPSVISKVNQ

SEQ ID NO : 27 – 棕櫚酸化磷酸-tau 胜肽(棕櫚酸化 7.1)

K(pal)K(pal)GDRSGYS[pS]PG[pS]PG[pT]PGSRSRTK(pal)K(pal)

SEQ ID NO : 28-棕櫚酸化磷酸-tau 胜肽(T3, 棕櫚酸化 T3.5)

K(pal)K(pal)VYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHLK(pal)K(pal)

SEQ ID NO : 29-棕櫚酸化磷酸-tau 胜肽(棕櫚酸化 22.1)

K(pal)K(pal)SSTGSIDMVD[pS]PQLA[pT]LAK(pal)K(pal)

SEQ ID NO : 30-棕櫚酸化 tau 胜肽

K(pal)K(pal)VYKSPVVSAGDTSPRHLK(pal)K(pal)

SEQ ID NO : 31-棕櫚酸化磷酸-tau 胜肽

K(pal)K(pal)RENAKAKTDHGAEIVYK[pS]PVVSGDT[pS]PRHLK(pal)K(pal)

SEQ ID NO : 32-棕櫚酸化磷酸-tau 胜肽

K(pal)K(pal)RQEFVMEHDHAGT[pY]GLK(pal)K(pal)

SEQ ID NO : 33-棕櫚酸化磷酸-tau 胜肽

K(pal)K(pal)PGSRSR[pT]P[pS]LTPPTRK(pal)K(pal)

SEQ ID NO : 34-棕櫚酸化磷酸-tau 胜肽

K(pal)K(pal)GYSSPG[pS]PG[pT]PGSRSRK(pal)K(pal)

SEQ ID NO : 35-棕櫚酸化磷酸-tau 胜肽

K(pal)K(pal)GDT[pS]PRHL[pS]NVSSTGSIDK(pal)K(pal)

SEQ ID NO : 36-棕櫚酸化磷酸-tau 胜肽

K(pal)K(pal)PG[pS]PG[pT]PGSRSR[pT]P[pS]LPK(pal)K(pal)

SEQ ID NO : 37-棕櫚酸化磷酸-tau 胜肽

K(pal)K(pal)HL[pS]NVSSTGSIDK(pal)K(pal)

SEQ ID NO : 38-棕櫚酸化磷酸-tau 胜肽

K(pal)K(pal)VSGDT[pS]PRHLK(pal)K(pal)

SEQ ID NO : 39-T50 無 C-端醯胺化

AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNNFTVSFWLRVPKV
SASHLE

SEQ ID NO : 40-T46 在 C-端無-Lys(Pal)-Lys(Pal)-NH₂

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSA
SHLE

SEQ ID NO : 41-T48 無 C-端醯胺化

AKFVAAWTLKAAAGSQYIKANSKFIGITELGSFNNFTVSFWLRVPKVSA
SHLEGLINSTKIYSYFPSVISKVNQ

SEQ ID NO : 42-T51 無 C-端醯胺化

AKFVAAWTLKAAARRQYIKANSKFIGITELRRFNNFTVSFWLRVPKVSA
SHLE

SEQ ID NO : 43-T52 無 C-端醯胺化

AKFVAAWTLKAAARKQYIKANSKFIGITELRKFNNFTVSFWLRVPKVSA
SHLE

SEQ ID NO : 44-T57

I827557

AKFVAAWTLKAAAVVRQYIKANSKFIGITELVVRFNFTVSFWLRVPKV
SASHLE-K(Pal)K(Pal)-NH2

<110> 美商健生醫藥公司(Janssen Pharmaceuticals, Inc.)
瑞士商 AC 免疫學製藥股份有限公司(AC Immune S.A.)

<120> Tau 肽之組成物及其用途

<130> 689001-57WO

<150> US62/577,157

<151> 2017-10-25

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 磷酸-tau 胜肽 7.1

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (8)..(8)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (11)..(11)

<220>

<221> 磷酸化蘇胺酸

<222> (14)..(14)

<400> 1

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

Ser Arg Ser Arg Thr
 20

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 磷酸-tau 胜肽 T3.5

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (4)..(4)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (12)..(12)

<400> 2

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

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 磷酸-tau 胜肽 22.1

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (11)..(11)

<220>

<221> 磷酸化蘇胺酸

<222> (16)..(16)

<400> 3

Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> tau 胜肽

<400> 4

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

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 磷酸-tau 胜肽

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (18)..(18)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (26)..(26)

<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
 20 25 30

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 磷酸-tau 胜肽

<220>

<221> 磷酸化酪胺酸

<222> (14)..(14)

<400> 6

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (7)..(7)

<220>

<221> 磷酸化蘇胺酸

<222> (10)..(10)

<400> 8

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

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 磷酸-tau 胜肽

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (4)..(4)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (9)..(9)

<400> 9

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

Ile Asp

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 磷酸-tau 胜肽

<220>
<221> 磷酸化絲胺酸
<222> (3)..(3)

<220>
<221> 磷酸化蘇胺酸
<222> (6)..(6)

<220>
<221> 磷酸化蘇胺酸
<222> (13)..(13)

<220>
<221> 磷酸化絲胺酸
<222> (15)..(15)

<400> 10

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

Pro

<210> 11

<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 磷酸-tau 胜肽

<220>
<221> 磷酸化絲胺酸
<222> (3)..(3)

<400> 11

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

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 磷酸-tau 胜肽

<220>
<221> 磷酸化絲胺酸
<222> (6)..(6)

<400> 12

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

<210> 13

<211> 55
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> T50 T 細胞表位

<220>
 <221> C-端醯胺化
 <222> (55)..(55)

<400> 13

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Val Arg
 1 5 10 15

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Val
 20 25 30

Val Arg Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys
 35 40 45

Val Ser Ala Ser His Leu Glu
 50 55

<210> 14
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> T46 T 細胞表位

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (54)..(54)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (55)..(55)

<220>

<221> C-端醯胺化

<222> (55)..(55)

<400> 14

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Gly Ser Gln
 1 5 10 15

Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Gly Ser
 20 25 30

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 35 40 45

Ala Ser His Leu Glu Lys Lys
 50 55

<210> 15

<211> 75

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T48 幫手 T 細胞表位

<220>

<221> C-端醯胺化

<222> (75)..(75)

<400> 15

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Gly Ser Gln
 1 5 10 15

Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Gly Ser
 20 25 30

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 35 40 45

Ala Ser His Leu Glu Gly Ser Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile Tyr Ser
 50 55 60

Tyr Phe Pro Ser Val Ile Ser Lys Val Asn Gln
 65 70 75

<210> 16

<211> 53

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T51 幫手 T 細胞表位

<220>

<221> C-端醯胺化

<222> (53)..(53)

<400> 16

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Arg Arg Gln
1 5 10 15

Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Arg Arg
 20 25 30

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 35 40 45

Ala Ser His Leu Glu
 50

<210> 17

<211> 53

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T52 幫手 T 細胞表位

<220>

<221> C-端醯胺化

<222> (53)..(53)

<400> 17

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Arg Lys Gln
1 5 10 15

Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Arg Lys
 20 25 30

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 35 40 45

Ala Ser His Leu Glu
 50

<210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CpG 2006

<220>
 <221> 硫代磷酸酯 (ps) 核甘酸間鍵聯
 <222> (1)..(24)

<400> 18
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CpG 1018

<220>

<221> 硫代磷酸酯 (ps) 核苷酸間鍵聯

<222> (1)..(22)

<400> 19

tgactgtgaa cgttcgagat ga

22

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CpG 2395

<220>

<221> 硫代磷酸酯 (ps) 核苷酸間鍵聯

<222> (1)..(22)

<400> 20

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg

22

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CpG 2216

<220>

<221> 硫代磷酸酯 (ps) 核苷酸間鍵聯

<222> (1)..(3)

<220>

<221> 磷酸二酯 (po) 核苷酸間鍵聯

<222> (3)..(14)

<220>

<221> 硫代磷酸酯 (ps) 核苷酸間鍵聯

<222> (14)..(20)

<400> 21

gggggacgat cgtcgggggg

20

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CpG 2336

<220>

<221> 硫代磷酸酯 (ps) 核苷酸間鍵聯

<222> (1)..(4)

<220>

<221> 磷酸二酯 (po) 核苷酸間鍵聯

<222> (4)..(15)

<220>

<221> 硫代磷酸酯 (ps) 核苷酸間鍵聯

<222> (15)..(21)

<400> 22

ggggacgacg tcgtgggggg g

21

<210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Pan DR 表位 (PADRE) peptide

<400> 23

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

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P2

<400> 24

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

<210> 25
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P30

<400> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕櫚酸化 磷酸-tau 胜肽 (T3, 棕櫚酸化 T3.5)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (2)..(2)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (6)..(6)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (14)..(14)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (19)..(19)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (20)..(20)

<400> 28

Lys Lys Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg

1

5

10

15

His Leu Lys Lys

20

- <210> 29
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 棕櫚酸化 磷酸-tau 胜肽 (棕櫚酸化 22.1)

- <220>
- <221> 棕櫚酸化離胺酸
- <222> (1)..(1)

- <220>
- <221> 棕櫚酸化離胺酸
- <222> (2)..(2)

- <220>
- <221> 磷酸化絲胺酸
- <222> (13)..(13)

- <220>
- <221> 磷酸化蘇胺酸
- <222> (18)..(18)

- <220>
- <221> 棕櫚酸化離胺酸
- <222> (21)..(21)

- <220>
- <221> 棕櫚酸化離胺酸
- <222> (22)..(22)

- <400> 29

His Leu Lys Lys
20

<210> 31

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕櫚酸化 磷酸-tau 胜肽

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (2)..(2)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (20)..(20)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (28)..(28)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (33)..(33)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (34)..(34)

<400> 31

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

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

Lys Lys

<210> 32

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕櫚酸化 磷酸-tau 胜肽

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (2)..(2)

<220>

<221> 磷酸化酪胺酸

<222> (16)..(16)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (19)..(19)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (20)..(20)

<400> 32

Lys Lys Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr

1

5

10

15

Gly Leu Lys Lys

20

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕櫚酸化 磷酸-tau 胜肽

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (2)..(2)

<220>

<221> 磷酸化蘇胺酸

<222> (9)..(9)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (11)..(11)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (19)..(19)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (20)..(20)

<400> 33

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

Thr	Arg	Lys	Lys
			20

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕櫚酸化 磷酸-tau 胜肽

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (2)..(2)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (9)..(9)

<220>

<221> 磷酸化蘇胺酸

<222> (12)..(12)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (19)..(19)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (20)..(20)

<400> 34

Lys Lys Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg

1

5

10

15

Ser Arg Lys Lys

20

<210> 35

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕櫚酸化 磷酸-tau 胜肽

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (2)..(2)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (6)..(6)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (11)..(11)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (21)..(21)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (22)..(22)

<400> 35

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

Gly Ser Ile Asp Lys Lys
20

<210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕櫚酸化 磷酸-tau 胜肽

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (2)..(2)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (5)..(5)

<220>

<221> 磷酸化蘇胺酸

<222> (8)..(8)

<220>

<221> 磷酸化蘇胺酸

<222> (15)..(15)

<220>

<221> 磷酸化絲胺酸

<222> (17)..(17)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (20)..(20)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (21)..(21)

<400> 36

Lys Lys Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro

1

5

10

15

<210> 38
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 棕櫚酸化 磷酸-tau 胜肽

<220>
 <221> 棕櫚酸化離胺酸
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> 棕櫚酸化離胺酸
 <222> (2)..(2)

<220>
 <221> 磷酸化絲胺酸
 <222> (8)..(8)

<220>
 <221> 棕櫚酸化離胺酸
 <222> (13)..(13)

<220>
 <221> 棕櫚酸化離胺酸
 <222> (14)..(14)

<400> 38

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

<210> 39

<211> 55
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> T50 無C-端醯胺化

<400> 39

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Val Arg
 1 5 10 15

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Val
 20 25 30

Val Arg Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys
 35 40 45

Val Ser Ala Ser His Leu Glu
 50 55

<210> 40
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> T46 無棕櫚酸化離胺酸及C-端醯胺化

<400> 40

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Gly Ser Gln
 1 5 10 15

Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Gly Ser
 20 25 30

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 35 40 45

Ala Ser His Leu Glu
 50

<210> 41

<211> 75

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T48 無C-端醯胺化

<400> 41

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Gly Ser Gln
 1 5 10 15

Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Gly Ser
 20 25 30

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 35 40 45

Ala Ser His Leu Glu Gly Ser Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile Tyr Ser
 50 55 60

<400> 43

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Arg Lys
 20 25 30

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 35 40 45

Ala Ser His Leu Glu
 50

<210> 44

<211> 57

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T57

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (56)..(56)

<220>

<221> 棕櫚酸化離胺酸

<222> (57)..(57)

<220>

<221> C-端醯胺化

<222> (57)..(57)

<400> 44

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Val Arg
1 5 10 15

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Val
 20 25 30

Val Arg Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys
 35 40 45

Val Ser Ala Ser His Leu Glu Lys Lys
 50 55

申請專利範圍

1. 一種微脂體，其係包括：
 - a. tau 磷酸化胜肽，其具有選自由 SEQ ID NO: 2、5、9、和 12 組成之群組之胺基酸序列；
 - b. 幫手 T-細胞表位，其包括選自由 SEQ ID NO: 23、24、25、和 26 組成之群組之至少一胺基酸序列；
 - c. 脂質化 CpG 寡核苷酸，其中該脂質化 CpG 寡核苷酸包括一或多個硫代磷酸酯核苷酸內鍵聯，且其中該脂質化 CpG 寡核苷酸係經由一連接子共價連接至少一膽固醇；及
 - d. 單磷醯脂質 A (MPLA)，其中該 tau 磷酸化胜肽係存在微脂體表面。
2. 如請求項 1 之微脂體，其中：
 - a. 該 tau 磷酸化胜肽具有選自由 SEQ ID NO: 28、31、35、和 38 組成之群組之胺基酸序列；
 - b. 該脂質化 CpG 寡核苷酸具有 SEQ ID NO:18 之核苷酸序列；以及
 - c. 該幫手 T-細胞表位包括 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO:24、或 SEQ ID NO:25 之胺基酸序列，其中該胺基酸序列彼此直接或經由一或多個連接子共價連接。
3. 如請求項 2 之微脂體，其中該幫手 T-細胞表位包括選自由 SEQ ID NO: 39、40、41、42、和 43 組成之群組之胺基酸序列。
4. 如請求項 2 之微脂體，其中該幫手 T-細胞表位包括選自由 SEQ ID NO: 13、14、15、16、17、和 44 組成之群組之胺基酸序列。
5. 如請求項 1 之微脂體，其中該 tau 磷酸化胜肽具有 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列。
6. 如請求項 1 之微脂體，其中該 tau 磷酸化胜肽具有 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列。
7. 如請求項 1 之微脂體，其中該脂質化 CpG 寡核苷酸具有 SEQ ID NO: 18 之核苷酸序列。
8. 一種微脂體，其係包括：

- a. tau 磷酸化胜肽，其具有 SEQ ID NO: 2 之胺基酸序列；
 - b. 幫手 T-細胞表位，其包括選自由 SEQ ID NO: 39、40、41、42、和 43 組成之群組之胺基酸序列；
 - c. 脂質化 CpG 寡核苷酸，其具有選自由 SEQ ID NO: 18 至 SEQ ID NO: 22 組成之群組之核苷酸序列，且該脂質化 CpG 寡核苷酸係經由一連接子共價連接至少一膽固醇；以及
 - d. 單磷醯脂質 A (MPLA)；
其中該 tau 磷酸化胜肽係存在微脂體表面。
9. 如請求項 8 之微脂體，其中該脂質化 CpG 寡核苷酸具有 SEQ ID NO: 18 之核苷酸序列。
 10. 如請求項 8 之微脂體，其中該 tau 磷酸化胜肽具有 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列。
 11. 如請求項 8-10 中任一項之微脂體，其中該幫手 T-細胞表位具有 SEQ ID NO: 39 之胺基酸序列。
 12. 如請求項 8-10 中任一項之微脂體，其中該幫手 T-細胞表位具有 SEQ ID NO: 40 之胺基酸序列。
 13. 如請求項 8-10 中任一項之微脂體，其中該幫手 T-細胞表位具有 SEQ ID NO: 41 之胺基酸序列。
 14. 如請求項 8-10 中任一項之微脂體，其中該幫手 T-細胞表位具有 SEQ ID NO: 42 之胺基酸序列。
 15. 如請求項 8-10 中任一項之微脂體，其中該幫手 T-細胞表位具有 SEQ ID NO: 43 之胺基酸序列。
 16. 一種微脂體，其係包括：
 - a. tau 胜肽，其具有 SEQ ID NO: 28 之胺基酸序列，其中該 tau 胜肽係存在微脂體表面；
 - b. 幫手 T-細胞表位，其包括選自由 SEQ ID NO: 13、14、和 15 組成之群組之胺基酸序列；
 - c. 脂質化 CpG 寡核苷酸，其具有 SEQ ID NO: 18 之核苷酸序列，其中該脂質化 CpG 寡核苷酸係經由一連接子共價連接至少一膽固醇；以及

d. 單磷醯脂質 A (MPLA)。

17. 如請求項 16 之微脂體，其中該幫手 T-細胞表位具有 SEQ ID NO: 13 之胺基酸序列。
18. 如請求項 16 之微脂體，其中該幫手 T-細胞表位具有 SEQ ID NO: 14 之胺基酸序列。
19. 如請求項 16 之微脂體，其中該幫手 T-細胞表位具有 SEQ ID NO: 15 之胺基酸序列。
20. 如請求項 1 至 10 和 16 至 19 中任一項之微脂體，進一步係包括一或多種由下列組成之群組中選出的脂質：1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DMPC)、1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷醯基-3'-rac-甘油(DMPG) 和膽固醇。
21. 一種醫藥組成物，其係包括如請求項 1 至 10 及 16 至 19 任一項中之微脂體及一醫藥上可接受載劑。
22. 一種醫藥組成物，其係包括如請求項 16 之微脂體及醫藥上可接受載劑。

圖式

圖 1

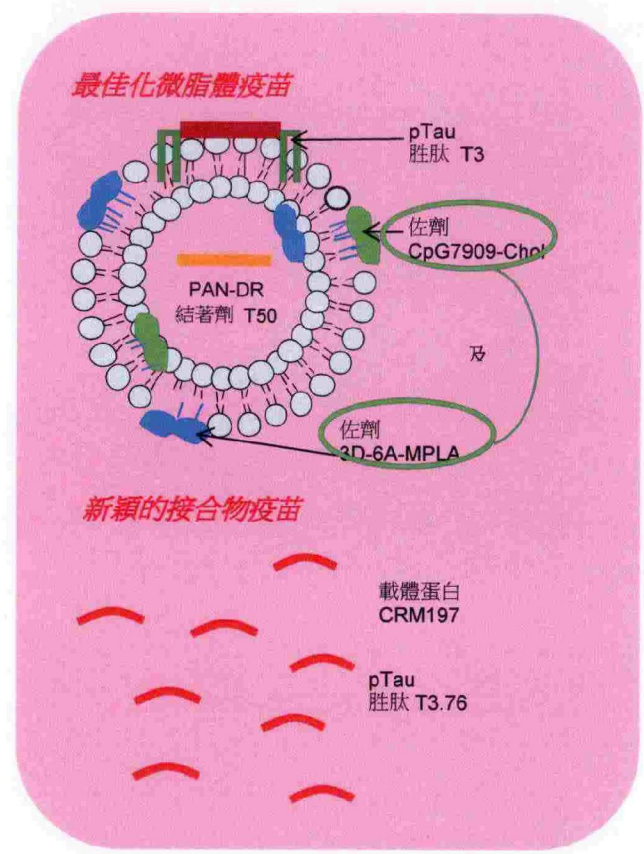


圖 2

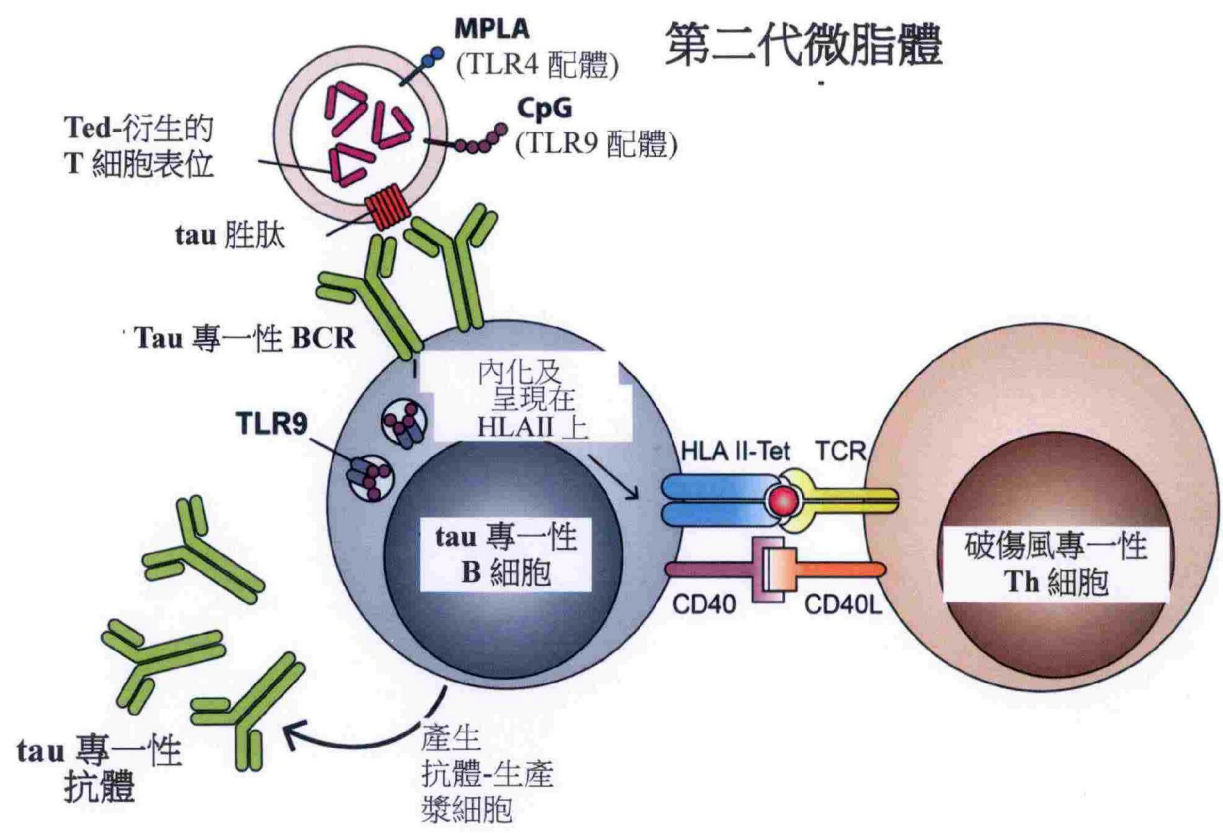


圖 3

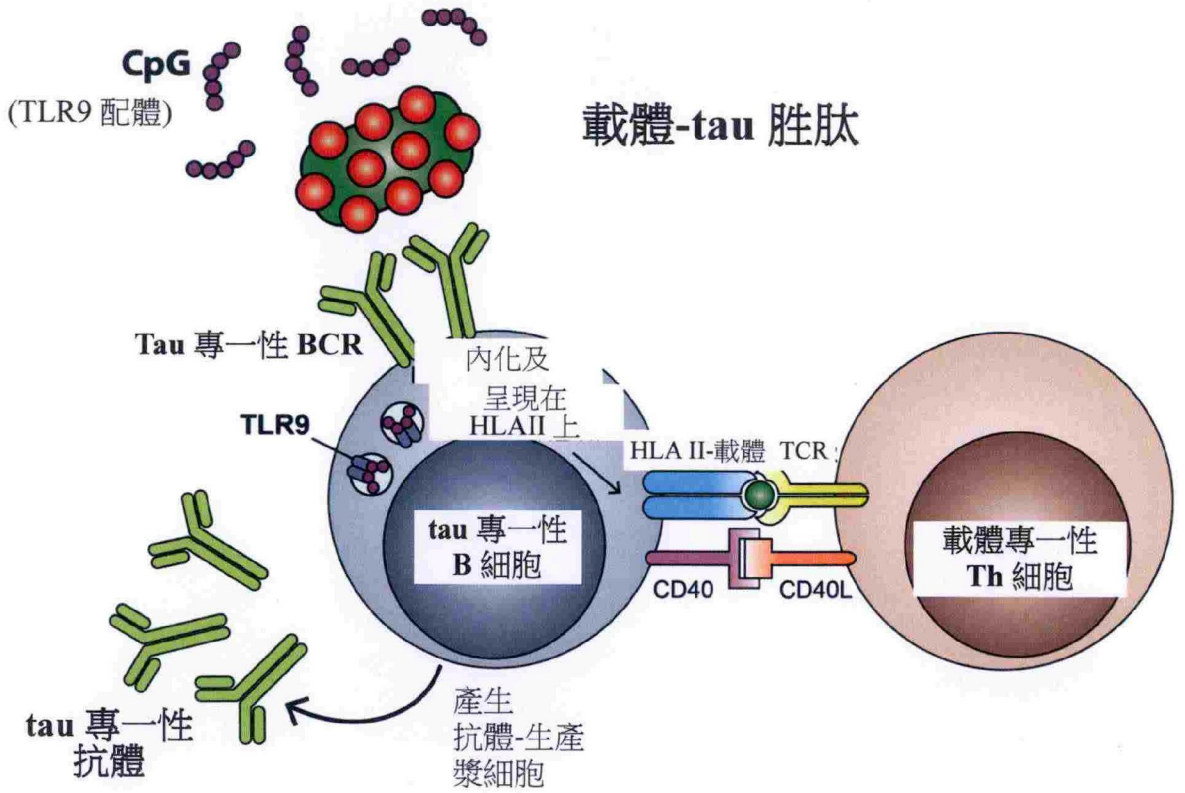


圖 4

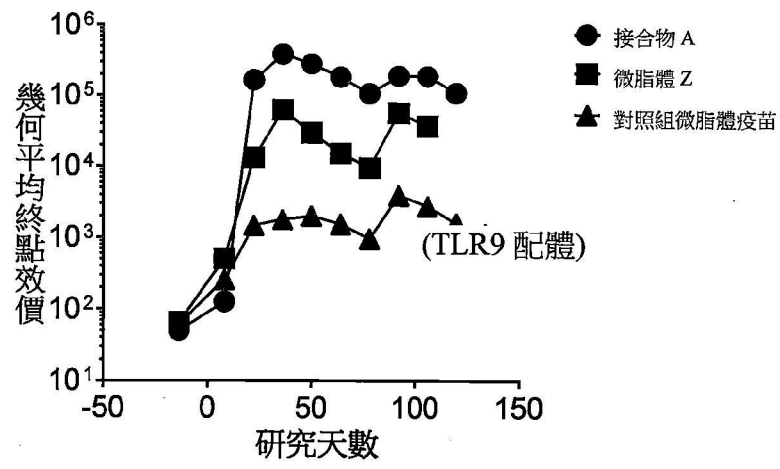


圖 5

AD Braak V/VI



健康

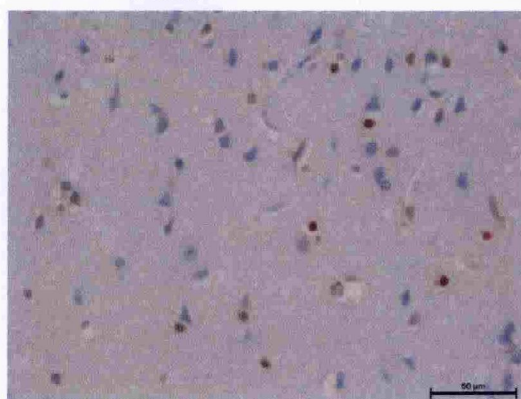


圖 6

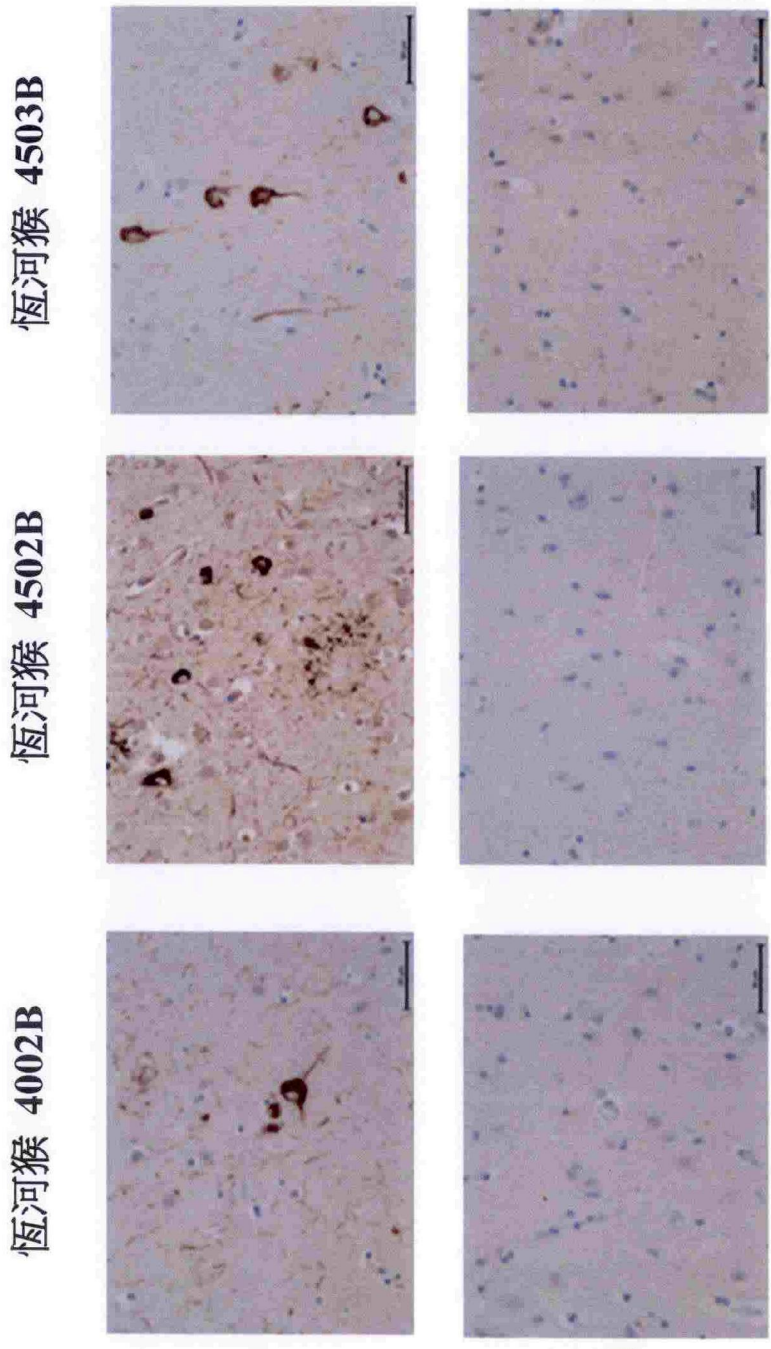


圖 7

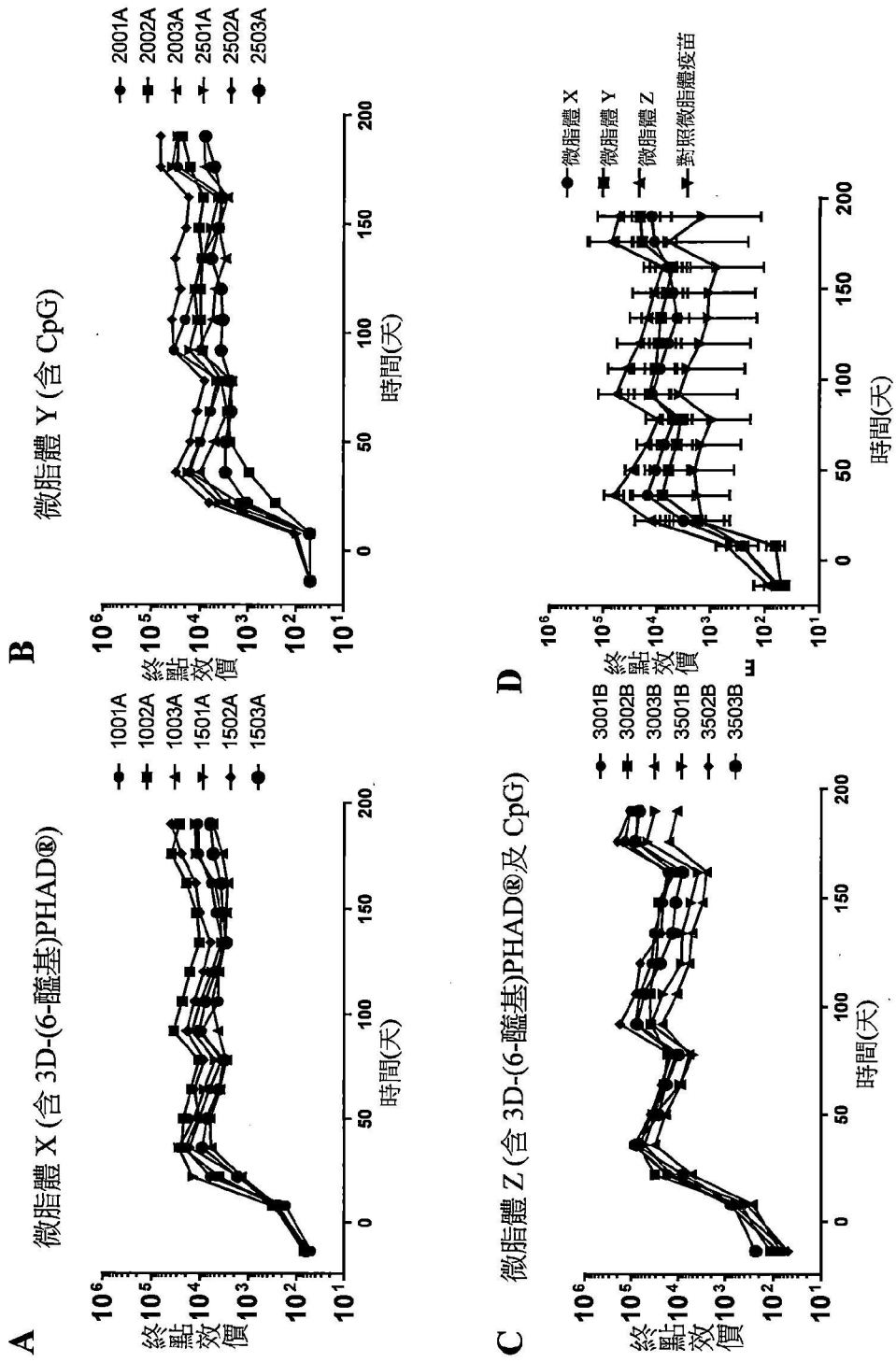


圖 8

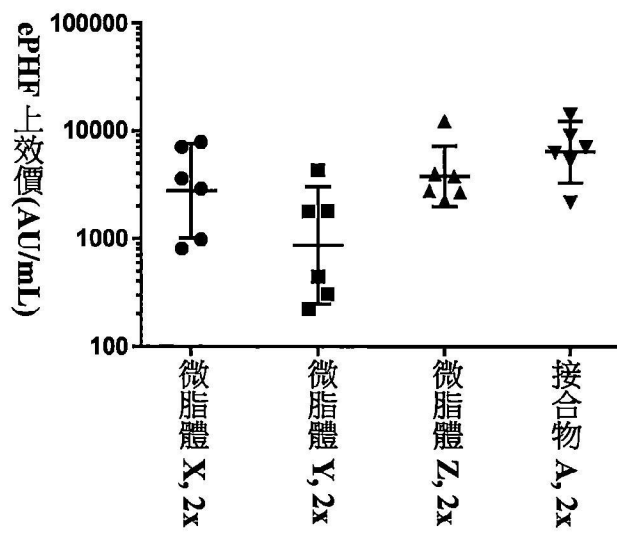


圖 9

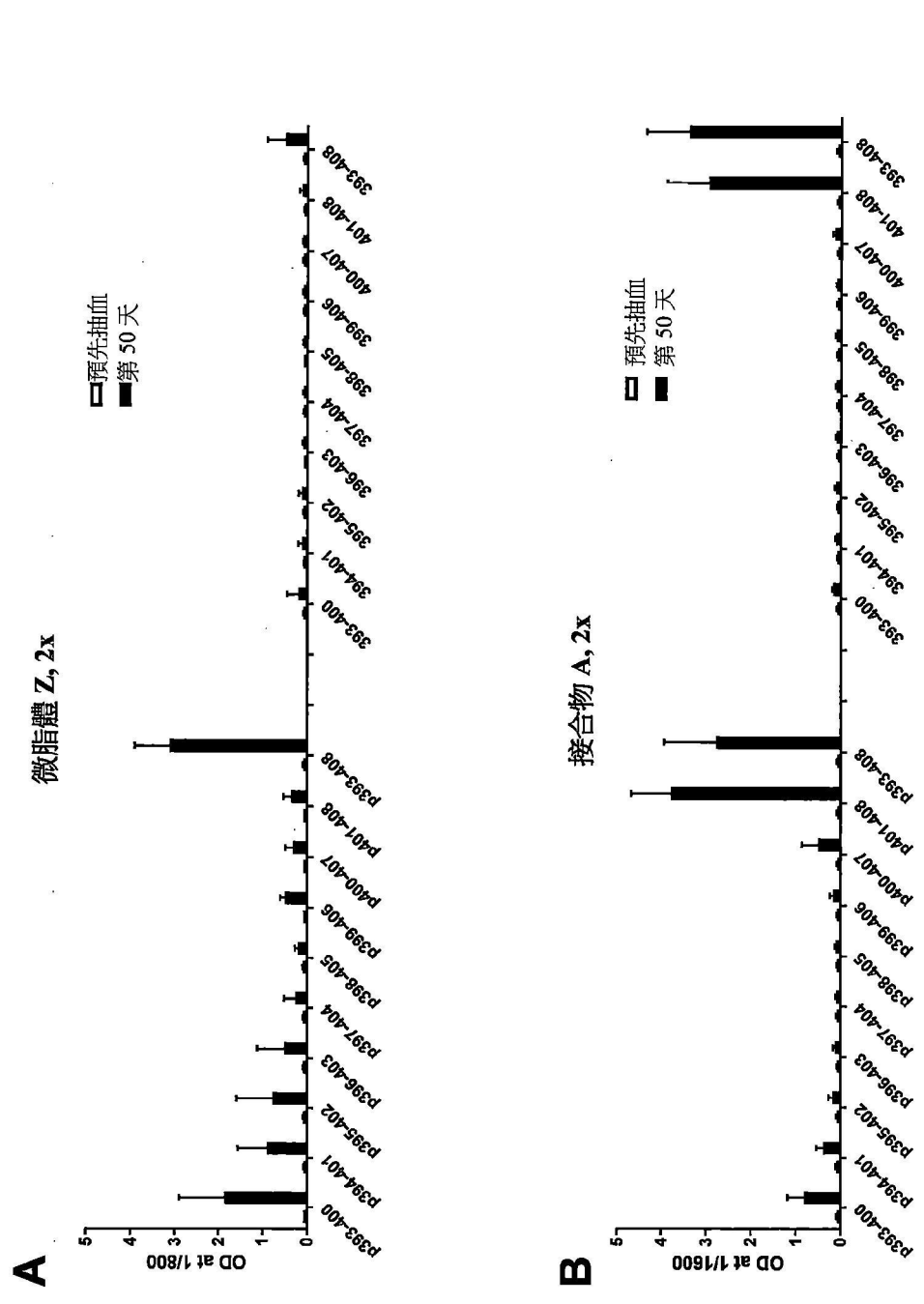


圖 10

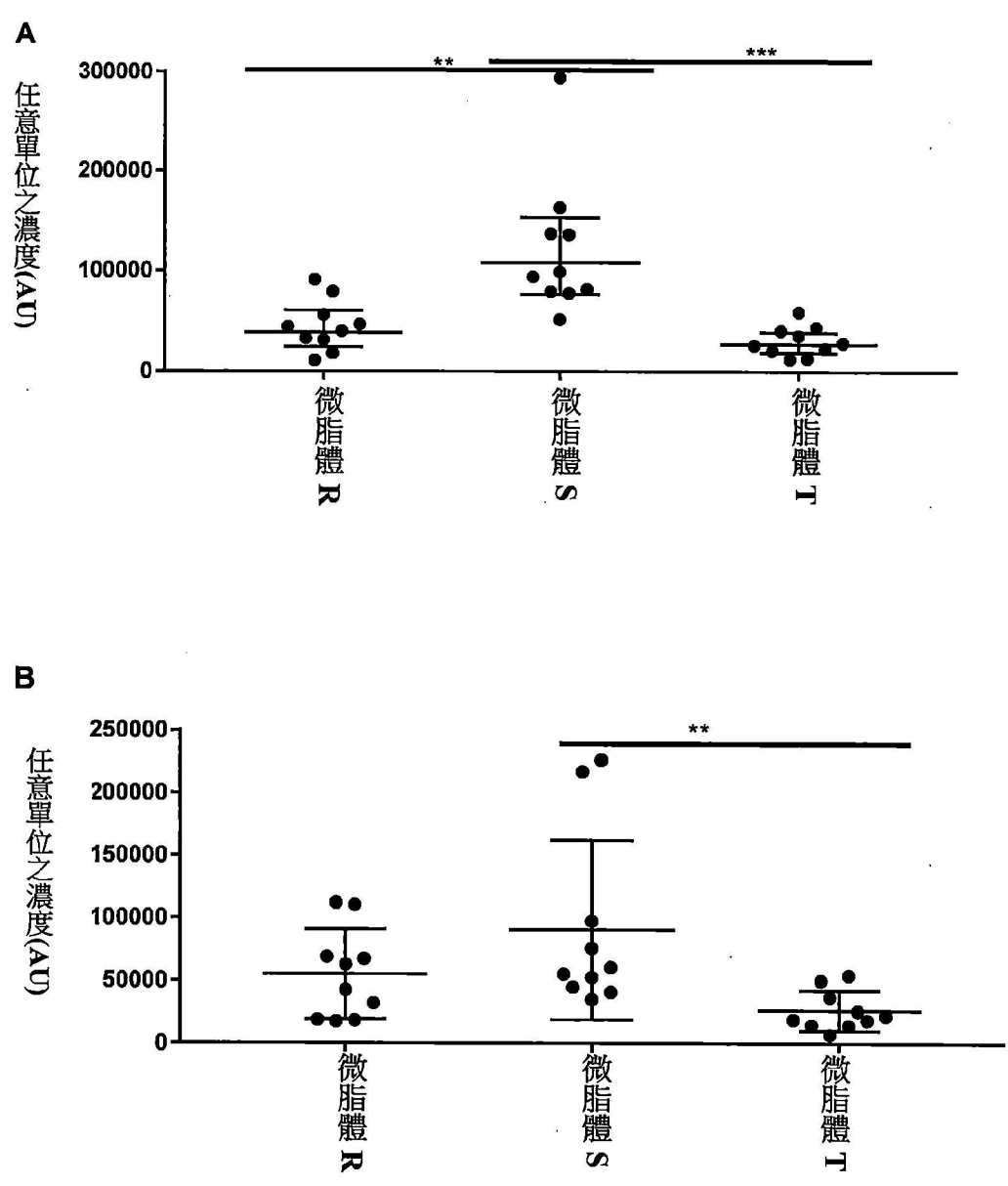


圖 11

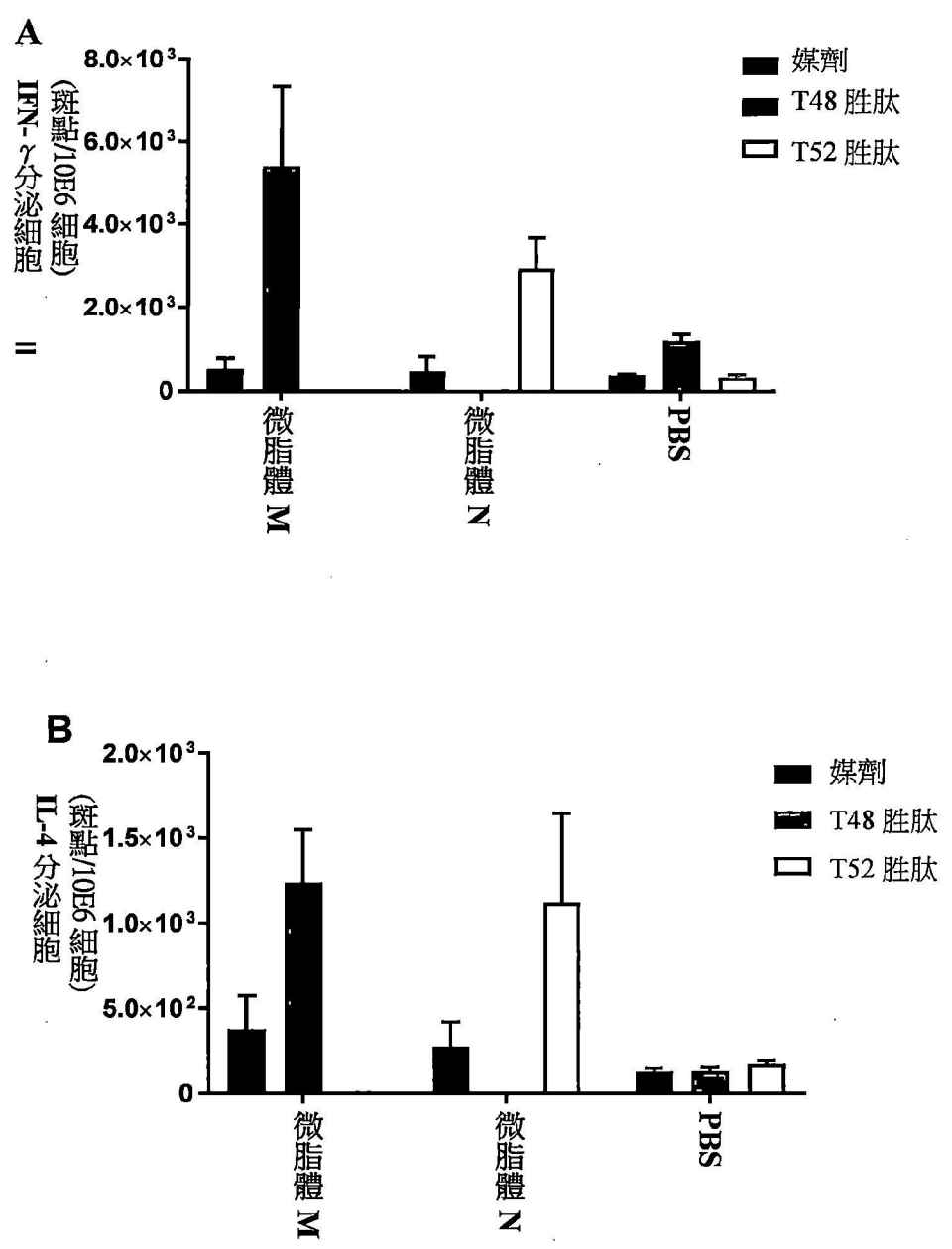


圖 12

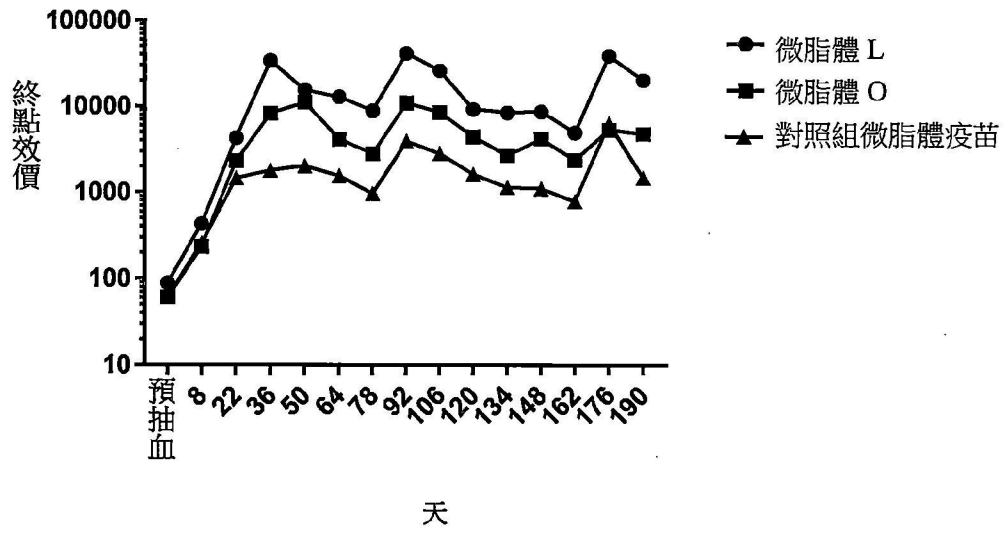


圖 13

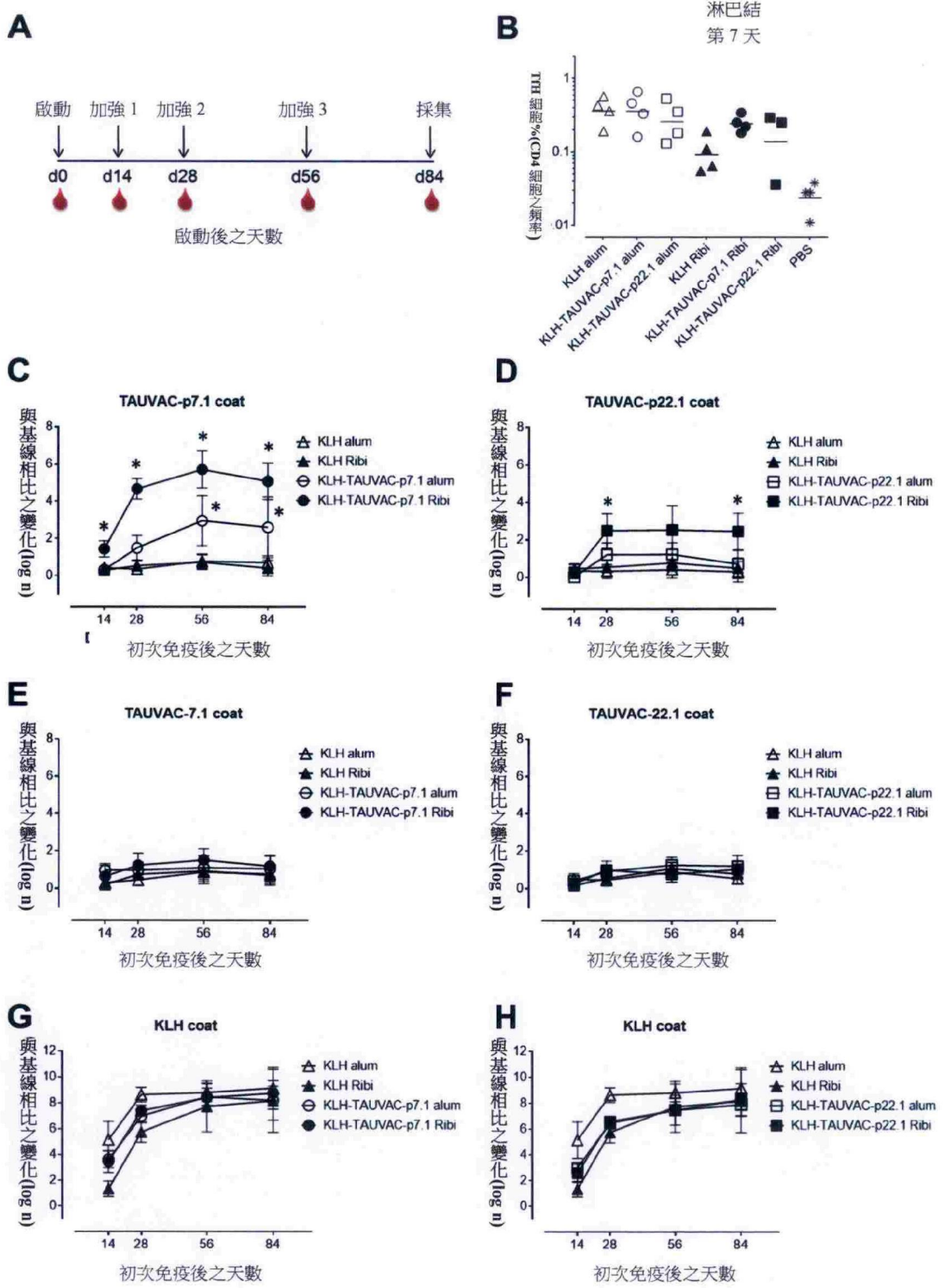


圖 14

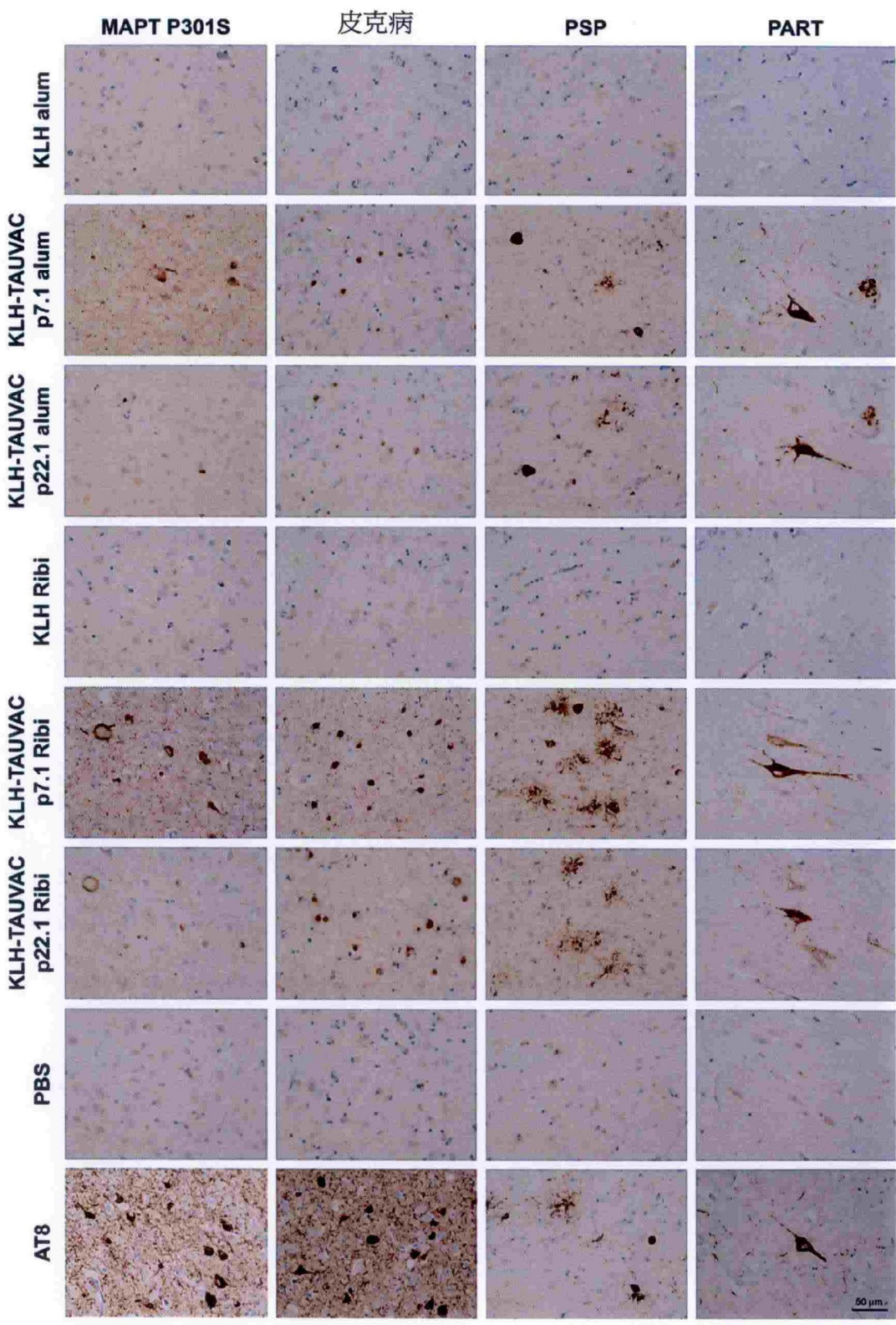


圖 15

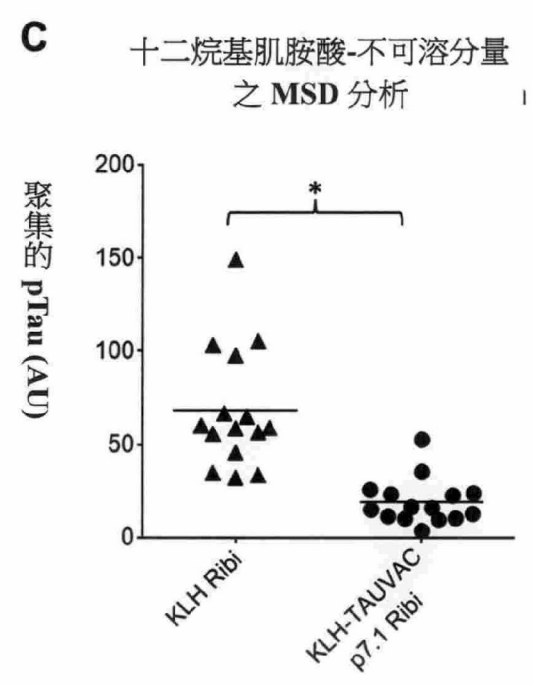
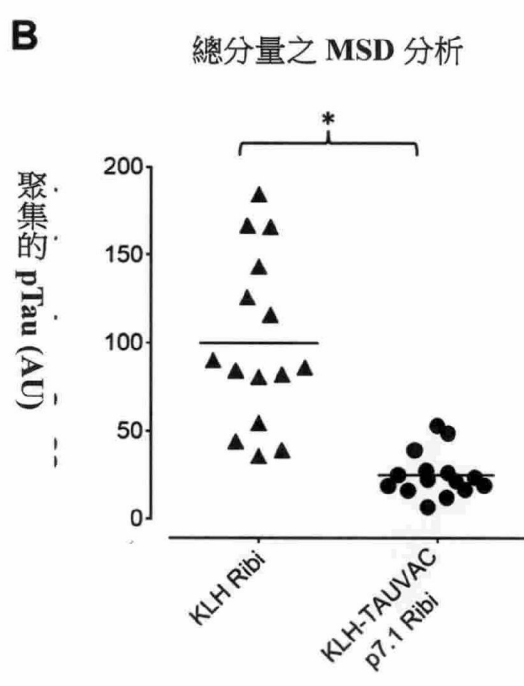
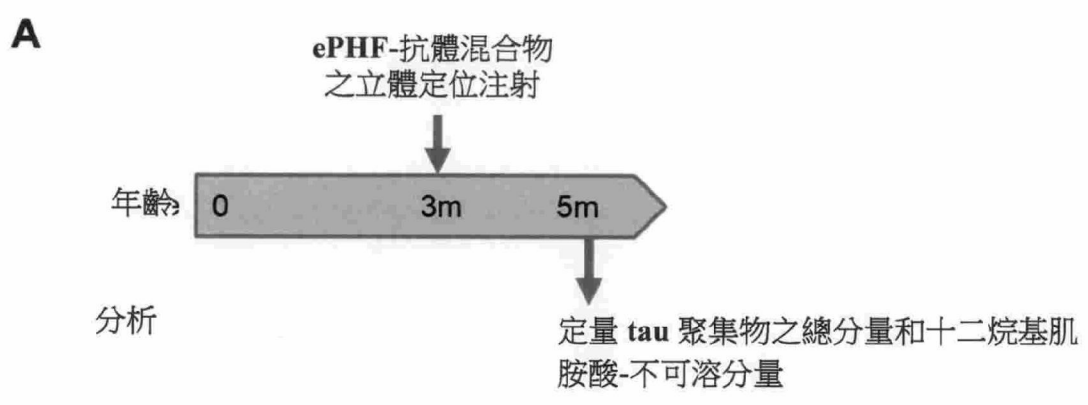
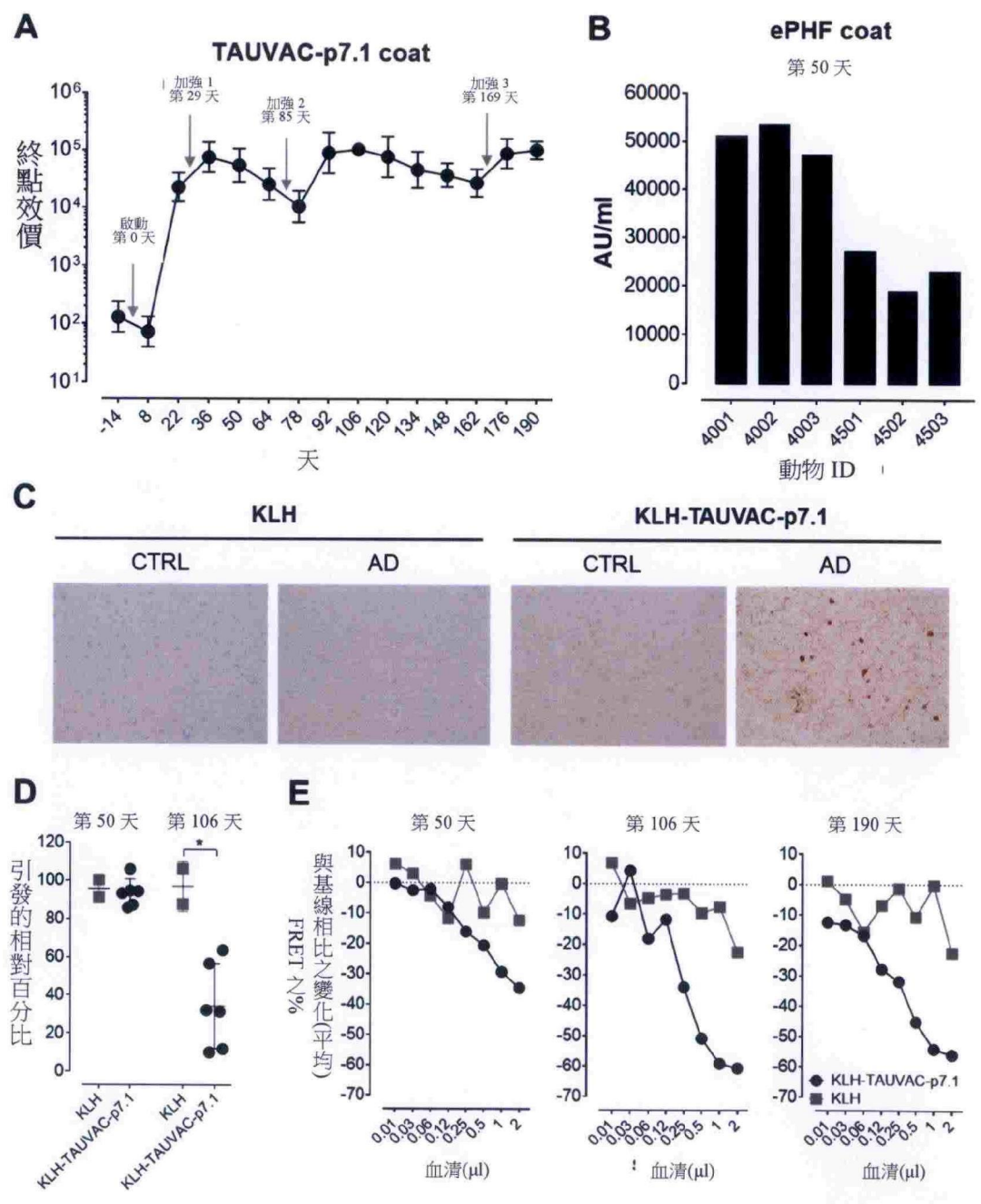


圖 16

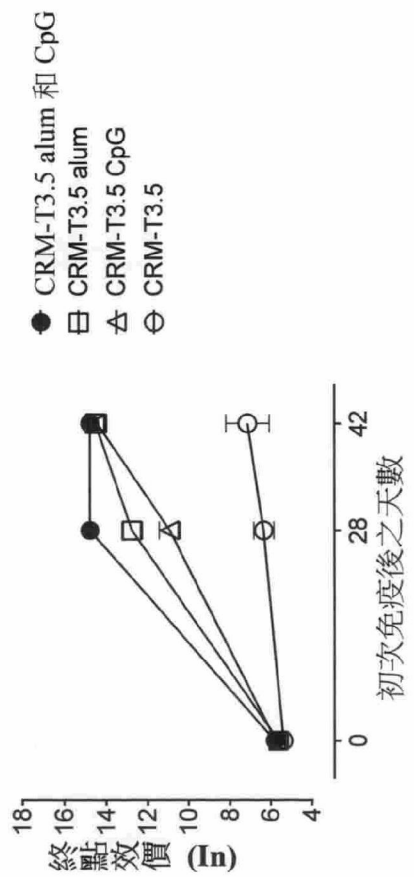


CRM-T3.5 alum 和 CpG

各組比較

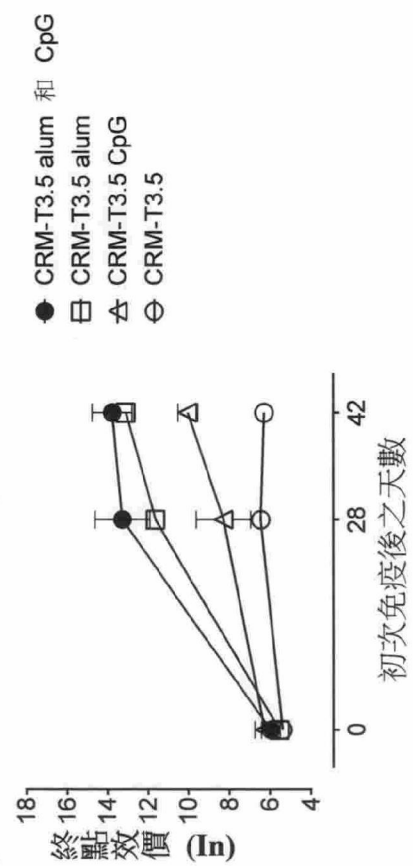
圖 17

A CRM-T3.5 - 2 μg/動物



- CRM-T3.5 alum 和 CpG
- CRM-T3.5 alum
- △ CRM-T3.5 alum 和 CpG
- CRM-T3.5 alum

B CRM-T3.5 - 0.2 μg/動物



- CRM-T3.5 alum 和 CpG
- CRM-T3.5 alum
- △ CRM-T3.5 alum 和 CpG
- CRM-T3.5 alum

第 1 組	第 2 組	未調整 p-值
第 28 天		
CRM-T3.5 alum	CRM-T3.5	0.0022
CRM-T3.5 CpG	CRM-T3.5	0.0022
CRM-T3.5 alum 和 CpG	CRM-T3.5	0.0028
CRM-T3.5 alum 和 CpG	CRM-T3.5 alum	0.0028
CRM-T3.5 alum 和 CpG	CRM-T3.5 CpG	0.0028
第 42 天		
CRM-T3.5 alum	CRM-T3.5	0.0075
CRM-T3.5 CpG	CRM-T3.5	0.0075
CRM-T3.5 alum 和 CpG	CRM-T3.5	0.0039
CRM-T3.5 alum 和 CpG	CRM-T3.5 alum	0.0740
CRM-T3.5 alum 和 CpG	CRM-T3.5 CpG	0.0740
第 28 天		
CRM-T3.5 alum	CRM-T3.5	0.0022
CRM-T3.5 CpG	CRM-T3.5	0.1320
CRM-T3.5 alum 和 CpG	CRM-T3.5	0.0152
CRM-T3.5 alum 和 CpG	CRM-T3.5 alum	0.0649
CRM-T3.5 alum 和 CpG	CRM-T3.5 CpG	0.1994
第 42 天		
CRM-T3.5 alum	CRM-T3.5	0.0022
CRM-T3.5 CpG	CRM-T3.5	0.0043
CRM-T3.5 alum 和 CpG	CRM-T3.5	0.0043
CRM-T3.5 alum 和 CpG	CRM-T3.5 alum	0.0609
CRM-T3.5 alum 和 CpG	CRM-T3.5 CpG	0.0497

圖 18

