



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102711812 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201180005511. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 01. 11

A61K 39/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 35/76(2006. 01)

2010-003424 2010. 01. 08 JP

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 25/14(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61P 25/22(2006. 01)

2012. 07. 06

A61P 25/28(2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2011/050616 2011. 01. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02011/083881 JA 2011. 07. 14

(71) 申请人 国立大学法人京都大学

地址 日本京都府

申请人 独立行政法人放射线医学综合研究所

(72) 发明人 井上治久 竹内启喜 高桥良辅

樋口真人 季斌 须原哲也

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 申基成 郑霞

权利要求书 1 页 说明书 20 页

序列表 8 页 附图 28 页

(54) 发明名称

Tau 蛋白病治疗用疫苗

(57) 摘要

本发明涉及一种 Tau 蛋白病的预防或治疗用疫苗, 该疫苗包含含有编码连接于分泌信号序列的突变体 Tau 蛋白的核酸的载体作为有效成分, 其中, 与突变体 Tau 蛋白的直接施用相比, 该疫苗在受试者中可以更持续地诱导对 Tau 蛋白 (任选地磷酸化的) 的抗体。

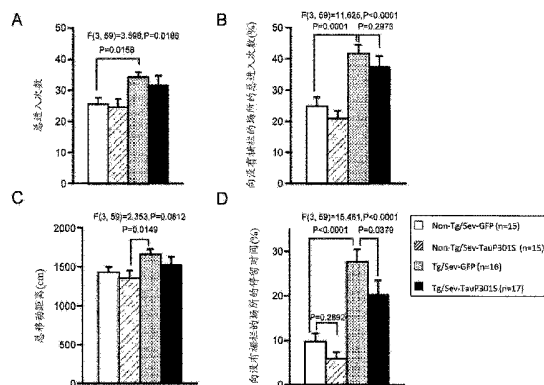


图 8

1. 一种 Tau 蛋白病的预防或治疗用疫苗,该疫苗包含含有编码连接于分泌信号序列的突变体 Tau 蛋白的核酸的载体作为有效成分,其中,所述突变体 Tau 蛋白包含在 Tau 蛋白的氨基酸序列中对应于选自由序列号 1 的 257 位、260 位、266 位、272 位、279 位、280 位、284 位、296 位、301 位、303 位、305 位、315 位、317 位、320 位、335 位、336 位、337 位、342 位、352 位、369 位、389 位及 406 位构成的组中的至少 1 个位置的位置的氨基酸残基的突变,并且与突变体 Tau 蛋白的直接施用相比,该载体在受试者中可以更持续地诱导对 Tau 蛋白的抗体。

2. 如权利要求 1 所述的疫苗,其中,所述突变为选自由 K257T、I260V、L266V、G272V、N279K、K280 Δ 、L284L、N296 Δ 、N296H、P301L、P301S、G303V、S305N、L315R、K317M、S320F、G335S、G335V、Q336R、V337M、E342V、S352L、K369I、G389R 及 R406W 构成的组中的至少 1 种突变,其中 Δ 为缺失。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的疫苗,其中,所述突变至少包含 P301L、P301S 或 P301T 的突变。

4. 如权利要求 1~3 中任一项所述的疫苗,其中,所述分泌信号序列为淀粉样前体蛋白信号序列或 CD59 信号序列。

5. 如权利要求 1~4 中任一项所述的疫苗,其中,所述载体为仙台病毒载体。

6. 如权利要求 1~4 中任一项所述的疫苗,其中,所述载体为质粒载体。

7. 如权利要求 1~6 中任一项所述的疫苗,该疫苗被配制为用于鼻内施用。

8. 如权利要求 1~7 中任一项所述的疫苗,该疫苗具有改善 Tau 蛋白病型痴呆症的作用。

9. 如权利要求 1~8 中任一项所述的疫苗,该疫苗在受试者中具有改善社会行为异常、焦虑行为异常及记忆障碍的至少 1 种症状的作用。

10. 如权利要求 1~9 中任一项所述的疫苗,其中,该疫苗具有将受试者脑内的小神经胶质细胞活化、由此抑制突变体 Tau 蛋白的积累的作用。

11. 如权利要求 1~10 中任一项所述的疫苗,其中,Tau 蛋白是磷酸化的。

Tau 蛋白病治疗用疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及一种表达可以用于 Tau 蛋白病 (tauopathy) 的预防或治疗的突变体 Tau 蛋白的载体及该载体作为医药品的用途。

背景技术

[0002] Tau(tau) 蛋白质是在正常脑内以结合于细胞内的微管的状态存在的可溶性的磷酸化蛋白质,有助于微管的聚合促进和稳定化,并且在重复进行与微管的结合和解离时保持平衡状态。该平衡状态因磷酸化 / 脱磷酸化酶异常等崩溃时,细胞质中的游离 Tau 蛋白增加,并导致聚集或纤维化。在以阿尔茨海默氏病或额颞叶型痴呆症为主的高龄者的痴呆症的大多数中,将其中不一定伴随淀粉样蛋白的积累的 Tau 蛋白聚集体的积累被认为是特征性的病变的神经变性疾病总称为 Tau 蛋白病 (非专利文献 1)。

[0003] 在我国,在 65 岁以上高龄者中约 7% 被认为是痴呆症,加上轻度痴呆症达到约 10%。其中 7 成被认为是 Tau 蛋白病型痴呆症,患者数约为 200 万人。关于痴呆症的研究开发迄今为止先施行对 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 蛋白的研究,通过 β 淀粉样蛋白的肽免疫进行临床试验,但在试验中途,接种患者的 6% 发生脊髓脑膜炎,因此试验中止 (非专利文献 2)。虽然该试验中止,但根据对疫苗接种后引起脑炎并康复、随后因其它疾病而死亡的患者的病例报告,确认疫苗接种具有消除老人斑或神经变性突起的效果 (非专利文献 3)。另外,根据对疫苗接种患者的后续的随访,在疫苗接种后,疾病甚至在通过尸检确认老人斑消失的患者中进展,暗示该疫苗不具有对疾病进展的预防效果 (非专利文献 4)。

[0004] 另外,在迄今为止的研究中也得知,对由 β 淀粉样蛋白的抗体引起的被动免疫是有效的,但关于抑制疾病进展的效果不明显 (非专利文献 5)。

[0005] 而且,也验证了在腺伴随病毒 (AAV) 载体上搭载有 β 淀粉样蛋白的口服疫苗的效果。在小鼠的实验中,虽然观察到该 AAV 载体的口服施用具有对经由肠管粘膜的 β 淀粉样蛋白产生抗体的效果、学习功能改善的效果 (非专利文献 6),但在其后的猴的实验中,可以确认老人斑的减少,却不能确认明确的病情进展的抑制效果。

[0006] 与此相对,关于 Tau 蛋白,以前没有作为阿尔茨海默氏病等的治疗的目标被重视,近年来,Tau 蛋白替代 β 淀粉样蛋白作为阿尔茨海默氏的治疗药的目标,正在成为伴有 Tau 蛋白过量积累的 Tau 蛋白病的治疗及疫苗的目标 (非专利文献 7)。

[0007] 作为与本发明有关的治疗剂,虽然报道有在腺伴随病毒上搭载有编码 β 淀粉样蛋白的基因的阿尔茨海默氏病治疗剂 (专利文献 1、2、非专利文献 8)、通过 Tau 蛋白的接种治疗阿尔茨海默氏病及 Tau 蛋白病的方法 (专利文献 3、非专利文献 9) 等,但在 Tau 蛋白接种的 Tau 蛋白病模型小鼠中确认有协调运动 / 运动学习的改善效果,却在社交性的缺乏、记忆力下降的痴呆症患者中,没有确认有被看作特征性的症状的改善效果。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献 1: 日本特表 2008-536476

[0010] 专利文献 2: 日本特开 2005-021149

- [0011] 专利文献 3 :US2008/0050383A
- [0012] 非专利文献 1 :齐藤裕子, 临床检查, Vol. 50, No. 10, p. 1121-1129 (2006) (日本)
- [0013] 非专利文献 2 :Orgogozo, J. M. et al., Neurology, 61 :46-54 (2003)
- [0014] 非专利文献 3 :Nicoll, J. A. et al., Nature Medicine, 9 :448-452 (2003)
- [0015] 非专利文献 4 :Holmes, C. et al., Lancet, 372 :216-223 (2008)
- [0016] 非专利文献 5 :松冈康治, 实验医学, Vol. 26, No. 16, p. 2572-2576 (2008) (日本)
- [0017] 非专利文献 6 :田平武, 老年精神医学杂志第 20 卷增刊号, p. 68-74 (2009) (日本)
- [0018] 非专利文献 7 :Martin-Jones, Z and Lasagna-Reeves, C., Alzheimer Disease Associate Disorder, 22 (2) :111 (2008)
- [0019] 非专利文献 8 :Mouri, A. et al., The FASEB Journal, 21 :2135-2148 (2007)
- [0020] 非专利文献 9 :Asuni, A. A. et al., J. Neurosci., 27 :9115-9129 (2007)
- [0021] 发明概述
- [0022] 本发明的目的在于提供一种 Tau 蛋白病、尤其是 Tau 蛋白病型痴呆症的预防或治疗用疫苗。
- [0023] 本发明人等发现, 通过使用 Tau 蛋白病模型小鼠的试验, 确认含有编码突变体 Tau 蛋白的核酸的载体与该蛋白质相比具有长期的持续的抗体诱导作用, 而且, 该载体具有 Tau 蛋白病、尤其是 Tau 蛋白病型痴呆症的显著的改善作用, 从而完成了本发明。
- [0024] 因此, 本发明概括为包含以下的特征。
- [0025] 本发明在其第 1 方面中提供一种 Tau 蛋白病的预防或治疗用疫苗, 该疫苗, 其是含有编码连接于分泌信号序列的突变体 Tau 蛋白的核酸的载体作为有效成分, 其中, 该突变体 Tau 蛋白包含在 Tau 蛋白的氨基酸序列中对应于选自自由序列号 1 的 257 位、260 位、266 位、272 位、279 位、280 位、284 位、296 位、301 位、303 位、305 位、315 位、317 位、320 位、335 位、336 位、337 位、342 位、352 位、369 位、389 位及 406 位构成的组中的至少 1 个位置的位置的氨基酸残基的突变, 并且与突变体 Tau 蛋白的直接施用相比, 该载体在受试者中可以更持续地诱导对 Tau 蛋白 (任选地磷酸化的) 的抗体。
- [0026] 在该实施方式中, 所述突变为选自自由 K257T、I260V、L266V、G272V、N279K、K280 Δ 、L284L、N296 Δ 、N296H、P301L、P301S、P301T、G303V、S305N、L315R、K317M、S320F、G335S、G335V、Q336R、V337M、E342V、S352L、K369I、G389R 及 R406W (在此, Δ 为缺失) 构成的组中的至少 1 种突变。
- [0027] 在其它的实施方式中, 所述突变为至少包含 P301L、P301S 或 P301T 的突变。
- [0028] 在其它的实施方式中, 所述分泌信号序列为淀粉样前体蛋白信号序列或 CD59 分泌信号序列。
- [0029] 在其它的实施方式中, 所述载体为仙台病毒载体。
- [0030] 在其它的实施方式中, 所述载体为质粒载体。
- [0031] 在其它的实施方式中, 所述疫苗被配制为用于鼻内施用。
- [0032] 在其它的实施方式中, 所述疫苗具有改善 Tau 蛋白病型痴呆症的作用。
- [0033] 在其它的实施方式中, 所述疫苗在受试者中具有改善记忆力下降和 / 或社会行为异常、焦虑行为异常及记忆障碍的至少 1 种症状的作用。
- [0034] 在其它的实施方式中, 所述疫苗具有将受试者的脑内的小神经胶质细胞进行活

化、由此抑制突变体 Tau 蛋白的积累的作用。

[0035] 在其它的实施方式中, Tau 蛋白(包含突变体 Tau 蛋白)是任选地磷酸化的。

[0036] 本发明的疫苗对于有 Tau 蛋白病的受试者,具有改善痴呆症的记忆力下降和/或社会行为异常和/或焦虑行为异常和/或记忆障碍的显著的效果,尤其具有在现有的疫苗中无效的、抑制(或延迟)Tau 蛋白病的症状进展的作用。

[0037] 本说明书包含在作为本申请的优先权的基础的日本专利申请 2010-3424 号的说明书和/或附图中所记载的内容。

[0038] 附图简述

[0039] 图 1 表示通过搭载 GFP 的 F 基因缺失型仙台病毒载体 (Sev-GFP) 的经鼻施用对于 Tau 蛋白病模型小鼠 (P301S Tau 转基因小鼠) 的感染效率的研究结果。用多功能显微镜 (BZ-9000, Keyence) 进行荧光成像 (A) 和亮视场像 (B) 的拍摄,对 Sev-GFP 接种小鼠的脑进行 GFP 表达分析。

[0040] 图 2 表示对 Tau 蛋白病模型小鼠接种搭载 Tau 蛋白的 F 基因缺失型仙台病毒载体 (Sev-TauP301S) 并进行关于磷酸化 Tau 蛋白表达抑制效果的分析的结果。作为对照,使用 Sev-GFP(在此,GFP 表示编码绿色荧光蛋白的核酸)。在接种后第 5 个月,在小鼠海马冠状剖面上通过抗磷酸化 Tau 蛋白抗体 (AT8, Innogenetics) 进行免疫染色。箭头表示 Tau 病变。免疫染色后,用多功能显微镜 (BZ-9000, Keyence) 附属分析软件测定在海马 CA3 区域内积累的区域面积。对于 Sev-GFP 接种组、Sev-TauP301S 接种组,分别用学生 t 检验进行平均值 ± 标准误差、统计学的分析。

[0041] 图 3 的 (A) 表示在野生型小鼠 (Non-Tg) 或 Tau 蛋白病模型小鼠 (Tg) 上经鼻接种 Sev-TauP301S 或 Sev-GFP、用蛋白质印迹法评价接种 5 个月后整个海马中的磷酸化 Tau 蛋白 (pTAU) 的积累的结果。而且,就蛋白量而言, (B) 表示用图像分析软件 (NIH Image, Ver. 1. 63, NIH, US) 测定条带的信号强度、取得作为内部对照蛋白的 β -肌动蛋白和信号强度之比并定量化的结果。对于 Sev-GFP 接种组、Sev-TauP301S 接种组,分别用学生 t 检验进行平均值 ± 标准误差、统计学的分析。用于试验的小鼠组及对照如下所述。

[0042] Non-Tg/Sev-GFP :对野生型小鼠经鼻接种 Sev-GFP 的组, Non-Tg/Sev-TauP301S :对野生型小鼠经鼻接种 Sev-TauP301S 的组, Tg/Sev-GFP :对 Tau 蛋白病模型小鼠经鼻接种 Sev-GFP 的组, Tg/Sev-TauP301S :对 Tau 蛋白病模型小鼠经鼻接种 Sev-tauP301S 的组, - :阴性对照(从野生型小鼠中提取的蛋白质)、+ :阳性对照(从不进行任何施用的 tau 蛋白病模型小鼠海马中提取的蛋白质)。

[0043] 图 4 的 (a) 表示对 Tau 蛋白病模型小鼠或野生型小鼠接种 Sev-TauP301S 后、采取血清并基于各自的小鼠的海马组织(白盒部分)中的反应性对血清中与组织 Tau 反应的抗体的效价进行评价的结果。

[0044] 将施用 Sev-TauP301S 的小鼠的血清分别稀释为 30 倍、100 倍、300 倍、1000 倍、3000 倍,在 4℃ 下反应过夜,将作为 2 次抗体的 Alexa546 标记的抗小鼠 IgG 抗体在室温下反应 1 小时。

[0045] (b) 表示作为对照、不使 Tau 蛋白病模型小鼠与抗体反应而进行免疫染色的结果。

[0046] (c) 表示对接种 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S 的 Tau 蛋白病模型小鼠的血清中抗体效价用观察到与组织的反应的最大稀释倍率进行评价的结果。对 Sev-GFP 接种组、

Sev-TauP301S 接种组,分别由曼-惠特尼 U 检验进行平均值 \pm 标准误差、统计学的分析。

[0047] 图 5 表示对 Sev-TauP301S 接种引起的脑内的小神经胶质细胞的活化进行分析的结果。接种 Sev-TauP301S,施用 5 个月后,使用识别接种小鼠的海马的组织中的活化小神经胶质细胞的抗 Iba1 抗体进行免疫染色 (A)。作为对照,接种 Sev-GFP (B)。箭头表示不与 IgG 共同存在的小神经胶质细胞。

[0048] 图 6 表示对野生型小鼠或 Tau 蛋白病模型小鼠的 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S 的接种引起的血清中的抗磷酸化 Tau 抗体的产生及脑脊髓液中磷酸化 Tau 蛋白的产生进行分析的结果。关于抗体产生的分析,使用接种 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S 的小鼠的血清,进行以重组突变体 Tau 蛋白 (TAUP301S) 为抗原的 ELISA。

[0049] 关于磷酸化 Tau 蛋白的产生,使用接种 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S 的小鼠的脑脊髓液,进行与抗磷酸化 Tau 抗体 (AT8 抗体) 的结合的 ELISA。

[0050] (a) 表示接种 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S 后第 5 个月的血清中的对人 P301S 突变 Tau 蛋白的抗体效价。

[0051] (b) 表示接种 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S 后第 5 个月的 CSF 中的磷酸化 Tau 的量。

[0052] 图 7 的 (A) 表示对野生型小鼠或 Tau 蛋白病模型小鼠接种 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S、进行社会行为测定实验 (Social interaction test) 的结果。在 tau 蛋白病患者中确认有许多社会行为的异常,因此,进行与社会行为有关的“Social interaction test (社会行为测定实验)” (在箱中放入 2 只小鼠,测定 10 分钟期间的接触时间)。(B): 进一步根据 Crawley's Social Interaction test (记忆力及社会行为测定实验),通过测定在笼子的附近的停留时间来评估对最初见到的小鼠具有多大接近的兴趣。

[0053] 图 8 表示对野生型小鼠或 Tau 蛋白病模型小鼠接种 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S、进行了高架十字迷宫实验 (焦虑行为的实验) 的结果。在接种 Sev-TauP301S 或 Sev-GFP 的小鼠中,对从迷宫中心向 4 个方向的每一个方向的总进入次数 (A)、向没有栅栏的方向的进入次数的比例 (B)、小鼠的总移动距离 (C)、在没有栅栏的场所的停留时间的比例 (D) 观察 10 分钟,使用 Image EP 软件自动地测量。就统计学的分析而言,单因素方差分析,事后比较检验用 Fisher 的 Protected Least Significant Difference (PLSD) 法进行。

[0054] 图 9 表示对野生型小鼠或 Tau 蛋白病模型小鼠接种重组 Tau 蛋白、进行了旷场实验 (用于测定活动量或情绪性的实验) 的结果。接种重组 Tau 蛋白 (TAUP301S),在接种后第一个月进行旷场实验。关于接种小鼠的移动距离 (A)、伸腰的次数 (B)、在旷场中央的停留时间 (C)、刻板行为 (D),观察 120 分钟的自由行为并进行评价。

[0055] 图 10 表示对野生型小鼠或 Tau 蛋白病模型小鼠接种重组 Tau 蛋白、进行了高架十字迷宫实验 (焦虑行为的实验) 的结果。将重组 Tau 蛋白 (TAUP301S) $100 \mu\text{g}/\text{只}/\text{次}$ 、每 2 周一次总计 3 次皮下施用接种的 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠分别在迷宫中心的正方形的部分 ($5 \times 5\text{cm}$) 以朝向闭合臂的方向的方式放置,记录 10 分钟行为。作为对照,接种 Sev-GFP。使用 Image EP 软件自动地测量从迷宫中央向 4 个方向的每一个方向的总进入次数 (A)、向没有栅栏的方向的进入次数的比例 (B)、小鼠的总移动距离 (C)、在没有栅栏的场所的停留时间的比例 (D)。就统计学的分析而言,单因素方差分析,事后比较检验用 Fisher 的 Protected Least Significant Difference (PLSD) 法进行。

[0056] 图 11 表示对野生型小鼠或 Tau 蛋白病模型小鼠接种 pcDNA3.1-CD59-Tau

P301S(ATG-) (以下为 cDNA-Tau P301S)、进行旷场试验的结果。接种 cDNA-Tau P301S, 在接种后第一个月进行旷场试验。关于接种小鼠的移动距离 (A)、伸腰的次数 (B)、在旷场中央的停留时间 (C)、刻板行为 (D), 观察 120 分钟的自由行为并进行评价。

[0057] 图 12 表示对野生型小鼠或 Tau 蛋白病模型小鼠接种 cDNA-Tau P301S、进行社会行为测定实验 (Social interaction test) 的结果。在 Tau 蛋白病患者中经常观察到社会行为的异常, 因此, 进行与社会行为有关的“Social interaction test (社会行为测定实验)” (在箱中放入 2 只小鼠, 测定 10 分钟期间的接触时间)。

[0058] 图 13 表示 cDNA-Tau P301S 的结构和插入序列 (序列号 12)。

[0059] 图 14 的 (a) 表示对于 P301S, Tau 蛋白的最长同种型中的序列号中第 301 位的氨基酸的突变。Sev/ Δ F 表示仙台病毒的 F 基因缺失的情况。(b) 表示淀粉样前体蛋白 (APP) 信号序列从人突变体 Tau 蛋白 (P301S, 同种型 1N4R) 的 N 末端连接于缺失蛋氨酸的位点。C 表示 pcDNA3-APP-TauP301S 中的插入序列 (序列号 13)。在此的 APP 信号序列用 NT_011512.11、NW_001838706.1、NM_201414.1、NM_201413.1、NM_000484.2、NM_001136130.1、NM_001136129.1 的登录号码注册于序列数据库。及 P301S Tau 的序列以用 NM_001123067.2 的登录号码注册于序列数据库的序列为基础加以突变。

[0060] 图 15 的 (A) 表示对于接种 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S 的野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠的巴恩斯迷宫试验 (空间记忆) 的结果。放入筒中, 对小鼠进行蒙眼并固定在规定的位置, 取下筒使其自由地行走, 在正解的孔上安装暗箱, 使其记住暗箱的场所 (训练)。(B): 训练后, 记录在卸下暗箱的孔 (靶点) 的周围的停留时间 (探测试验)。

[0061] 测定在训练期间至到达靶点的时间、在探测试验中至到达靶点的时间、在各孔的周围停留的时间。

[0062] 图 16 表示对于接种 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S 的野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠的恐怖条件反射试验 (情景记忆) 的结果。在箱中对小鼠使用声音和电休克组合以对小鼠进行条件反射、再放入同一箱中, 对引起的冻结 (フリージング) (畏缩行为) 的出现比例进行评价。

[0063] 图 17 表示对于接种 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S 的野生型小鼠及 tau 蛋白病模型小鼠的身体测定 (体重 (A)、体温 (B)、握力 (C)、钢丝绳悬挂实验 (D)) 的结果。

[0064] 图 18 表示对于接种有 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S 的野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠的社会行为测定实验 (接触的总持续时间 (A)、接触次数 (B)、活跃接触的总持续时间 (C)、接触的持续时间的平均值 (D)、总移动距离 (E)) 的结果。

[0065] 图 19 表示对于接种 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S 的野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠的前脉冲抑制试验 (惊愕反应 (A)、前脉冲引起的惊愕反应的抑制效果 (B)) 的结果。通过首先使其听到弱的声音、比较其后听到大的声音时的惊愕反应的抑制效果而进行评价。

[0066] 图 20 表示对于接种 Sev-GFP 或 Sev-TauP301S 的野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠的旷场实验的结果。(A) 表示总移动距离, (B) 表示垂直方向的活动量, (C) 表示在中心部的停留时间, (D) 表示刻板行为次数。

[0067] 图 21 表示对于野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠的旷场实验的结果。(A) 表示总移动距离, (B) 表示垂直方向的活动量, (C) 表示在中心部的停留时间, (D) 表示刻板行为次数。

[0068] 图 22 表示对于野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠的高架十字迷宫实验的结果。(A) 表示侵入于开放臂的数, (B) 表示侵入于开放臂的比例, (C) 表示移动距离, (D) 表示停留在开放臂上的时间。

[0069] 图 23 表示对于野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠的前脉冲抑制试验的结果。(A) 表示由声音的不同引起的惊愕反应的不同, (B) 表示前脉冲抑制的比例(预先发出小的声音、其后发出大的声音时存在惊愕反应的抑制效果的比例)。

[0070] 图 24 的 (A) ~ (D) :4 个月龄的 Tau 蛋白病模型小鼠, (E) ~ (H) :4 个月龄的野生型小鼠, (A)、(E) :外侧淡苍白球, (B)、(F) :大脑皮质扁桃核、(C)、(G) :听觉皮质, (CA3 ;D、H) :腹侧海马。行为学的分析后的 6 个月龄的小鼠的分析, (I、L) :扣带回皮质, (J, M) :大脑皮质扁桃核, (CA3 ;K, N) :海马。

[0071] 红的染色部位表示磷酸化 Tau, 蓝的染色部位表示细胞核。

[0072] 箭头表示磷酸化 Tau 蛋白的积累, 圆圈表示对血管的抗小鼠 IgG 抗体的非特异反应。

[0073] 图 25 表示对于 13 周龄的野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠的一般的身体测定的结果。(A) 表示体重, (B) 表示直肠温度, (C) 表示握力, (D) 表示钢丝绳悬挂实验的结果。

[0074] 图 26 表示社会行为测定实验的结果。(A) 表示接触的继续时间, (B) 表示接触次数, (C) 表示活跃接触的持续时间, (D) 表示每次接触的平均持续时间, (E) 表示实验中的总移动距离。

[0075] 图 27 表示对于野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠的恐怖条件反射试验(情景记忆)的结果。

[0076] 图 28 表示对野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠的巴恩斯迷宫试验(空间记忆)的结果。(A) ~ (C) 表示训练期间的分析结果, (D) 表示训练后的探测试验的结果。

[0077] 发明的最佳实施方式

[0078] 对本发明进一步详细地进行说明。

[0079] 本发明的特征在于, 使用含有编码突变体 Tau 蛋白的核酸的载体作为有效成分的疫苗用于 Tau 蛋白病的预防或治疗。

[0080] 本说明书中使用的“Tau 蛋白病”是指:在中枢神经系统中磷酸化的 Tau 蛋白异常地积累、与神经障碍(神经变性等)有关的疾病群。

[0081] 本说明书中使用的“核酸”是指 DNA 或 RNA。

[0082] 本说明书中使用的“受试者”是指哺乳动物, 优选灵长类, 进一步优选人。

[0083] < 突变体 Tau 蛋白 >

[0084] Tau 蛋白为微管相关结合蛋白的 1 种, 也称为 MAPT(microtubule-associated protein tau), 存在通过 Tau 基因的选择性剪接而产生的 6 种同种型, 根据 C 末端侧的微管结合位点的重复次数, 分类为 3 次重复型 Tau 和 4 次重复型 Tau(齐藤裕子, 临床检查, Vol. 50, No. 10, p. 1121-1129(2006)(日本))。人 MAPT 存在于 17 号染色体上(NG_007398.1), 例如转录变体(transcript variant)1~6 分别以注册号码 NM_016835.3、NM_005910.4、NM_016834.3、NM_016841.3、NM_001123067.2、NM_001123066.2 注册于序列数据库(美国)。Tau 蛋白可以是 3 次重复型 Tau、4 次重复型 Tau 的任一种, 尤其是众所周知 4 次重复型 Tau 为在人脑中表达最多的同种型。“Tau 蛋白”优选为人 Tau 蛋白。

[0085] 本发明的突变体 Tau 蛋白包含在 Tau 蛋白的氨基酸序列中对应于选自由序列号 1(NM_005910.4;同种型 2N4R 型)的 257 位、260 位、266 位、272 位、279 位、280 位、284 位、296 位、301 位、303 位、305 位、315 位、317 位、320 位、335 位、336 位、337 位、342 位、352 位、369 位、389 位及 406 位构成的组中的至少 1 个位置的位置的氨基酸残基的突变。优选的突变位置为在 Tau 蛋白的氨基酸序列中对应于序列号 1 的 257 位、260 位、272 位、279 位、296 位、301 位、303 位、305 位、335 位、337 位、342 位、369 位、389 位或 406 位的位置,更优选的突变位置为在 Tau 蛋白的氨基酸序列中对应于序列号 1 的至少 301 位的位置。该情况是指:突变位置可以为仅对应于序列号 1 的 301 位的位置,或者,除对应于序列号 1 的 301 位的位置之外,可以含有对应于选自由上面指定的序列号 1 的 257 位、260 位、266 位、272 位、279 位、280 位、284 位、296 位、303 位、305 位、315 位、317 位、320 位、335 位、336 位、337 位、342 位、352 位、369 位、389 位及 406 位构成的组中的至少 1 个位置的位置的氨基酸残基的突变。

[0086] 所述突变为取代或缺失。取代的情况, Tau 蛋白的所述位置的氨基酸残基取代之为其它氨基酸残基、优选在自然突变体中被认定的氨基酸残基的,这种取代的例子在序列号 1 的氨基酸序列中为 K257T、I260V、L266V、G272V、N279K、L284L、N296H、P301L、P301S、G303V、S305N、L315R、K317M、S320F、G335S、G335V、Q336R、V337M、E342V、S352L、K369I、G389R 或 R406W 的氨基酸取代。另外,缺失的情况,为在自然突变体中被认定的缺失、例如序列号 1 的 280 位的 K 或 296 位的 N 的缺失。在本发明中,所述突变由所述位置中的 1 个或多个(例如数个(例如 2~10 的整数))突变构成。

[0087] 本发明中优选的突变为所述 301 位的氨基酸残基的取代,例如 P301S、P301L 或 P301T 的氨基酸取代。

[0088] 关于本说明书中使用的氨基酸取代,例如“P301S”这样的记载是指:序列号 1 的氨基酸序列的 301 位的脯氨酸残基(P)被丝氨酸残基(S)取代。

[0089] 关于 301 位的突变,已知有额颞叶型痴呆的患者的发病年龄比较小、发病时进展快速(Sperfeld AD et al, Ann Neurol. 1999Nov ;46(5) :708-715 ;Yasuda M et al., Neurology, 55 :1224-1227, 2000)等,因此,作为起因于该 301 位的突变的青少年年龄中的发病或(一旦发病时)进展快速的 Tau 蛋白病的治疗或预防的靶点,301 位的突变是重要的,本发明的疫苗对这种 Tau 蛋白病是有效的。

[0090] <载体>

[0091] 本发明的载体包含编码上面说明的突变体 Tau 蛋白的核酸。在该突变体 Tau 蛋白的 N 末端侧上连接有分泌信号序列,由此,被载入细胞内的载体表达该核酸,利用细胞内的翻译机构翻译成突变体 Tau 蛋白前体后,转移至细胞膜,利用信号肽酶切断信号序列,该突变体 Tau 蛋白分泌到细胞外。

[0092] 编码连接于分泌信号序列的突变体 Tau 蛋白的 DNA 可以使用常用的基因重组技术进行合成。这种技术记载于例如 J. Sambrook et al., Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、F. M. Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 5th Ed., John Wiley&Sons(2002)等。

[0093] 编码突变体 Tau 蛋白的 DNA 可以通过如下方法来制备,即,例如由利用 Tau 蛋白基因编码的 mRNA,使用逆转录酶合成 cDNA,将该 cDNA 编入适当的质粒载体中,以所得的载

体为模板,且使用导入有目的突变的引物进行聚合酶链式反应(PCR),将含有该突变的编码 Tau 蛋白的序列部分进行扩增,进行限制酶处理,取得含有该序列部分的片段,将该片段编入用同一限制酶进行处理的质粒载体中,以所得载体为模板,使用可以扩增 Tau 蛋白编码序列全长的引物同样地进行 PCR 并扩增。

[0094] PCR 包含将由变性、退火及扩增构成的 3 个步骤设定为 1 个循环、将其进行约 20 ~ 45 个循环。变性是使双链 DNA 变成单链的步骤,在 92 ~ 98°C 的温度下热处理约 30 秒 ~ 2 分钟。退火是在单链 DNA 上结合引物的步骤,在 50 ~ 65°C 的温度下处理约 10 秒 ~ 60 秒。扩增是以结合有引物的单链 DNA 为模板合成互补链的步骤,在约 72°C 的温度下处理约 10 秒 ~ 7 分钟。在开始循环之前,可以在约 94°C 下热处理约 30 秒 ~ 5 分钟,另外,在循环结束后,在约 72°C 下进行约 1 分钟 ~ 10 分钟的扩增反应。反应是使用 PCR 缓冲液、dNTP(N = A, T, C, G)、耐热性 DNA 聚合酶进行的。作为耐热性 DNA 聚合酶,可以使用 Taq 聚合酶、Pfu 聚合酶等市售的聚合酶。使用如用于自动地进行 PCR 的热循环仪等市售的 PCR 装置(宝酒造、Applied Biosystems、Perkin-Elmer、Bio-Rad 等)非常便利。

[0095] 分泌信号序列为利用存在于人细胞内的信号肽酶可切断的任何信号序列。在这种信号序列中也包含细胞特异的信号序列。分泌信号序列的非限制性例子是编码淀粉样前体蛋白(APP)的信号序列的 DNA(NT_011512.11、NW_001838706.1、NM_201414.1、NM_201413.1、NM_000484.2、NM_001136130.1、NM_001136129.1):5' ggtctagaatgctgccccggt ttggcactgctcctgctggccgctggacggctcgggcgctt-3'(序列号 2)(在此,实际的 APP 信号序列由起始密码子 atg(下划线)开始。另外,其 5' 侧的 tctaga 序列为限制酶位点。)、编码 CD59 的信号序列的 DNA(NM_001127227.1、NM_001127226.1、NM_000611.5、NM_203331.2、NM_001127225.1、NM_203329.2、NM_203330.2、NM_001127223.1):5' -atgggaatccaaggagggt ctgtcctgttcgggctgctgctcgtcctggctgtcttctgccattcagggtcatagc-3'(序列号 3)等。

[0096] 由 5' 侧依次连接编码分泌信号序列的 DNA 和编码突变体 Tau 蛋白的 DNA,以该连接体为模板进行 PCR 扩增,在用适当的限制酶进行消化之后,在质粒载体上进行亚克隆。

[0097] 在上述方法中能够使用的质粒载体可以是克隆用载体的任一种。这种载体的非限制性例子是 pBluescript 系、pUC 系、pBR 系、pET 系等。

[0098] 就用于搭载编码连接有如上述那样得到的分泌信号的突变体 Tau 蛋白的核酸的载体而言,只要是可以在人细胞等哺乳动物细胞内表达该核酸的载体,可以为任一种载体,包含例如基因治疗用的质粒、病毒载体等。

[0099] 非限制性基因治疗用质粒含有例如 pBK-CMV、pcDNA3.1、pZeoSV(Invitrogen 公司、Stratagene 公司)、pCAGGS(Gene Bridges 公司)等。

[0100] 非限制性基因治疗用病毒载体含有例如仙台病毒(SeV)载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体、慢病毒载体、单纯疱疹病毒载体、复制缺陷逆转录病毒载体、麻疹病毒载体、狂犬病病毒载体、流感病毒载体、呼吸道合胞病毒(RSV)载体、水疱性口炎病毒(VSV)载体、牛痘病毒载体、辛德毕斯病毒载体等。优选这些载体的复制缺陷型等安全性高的载体。

[0101] 在本发明中,上述的任一种载体都可以使用,可以优选使用的载体为质粒载体、仙台病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体或慢病毒载体,其中,特别优选的病毒载体为仙台病毒载体。

[0102] 在载体上可插入在外来 DNA 的表达所需要的真核生物细胞内可以工作的启动子、

例如 CMV IE、dectin-1、dectin-2、人 CD11c、F4/80、MHC II 类等各启动子。除该元件之外，可以在载体中含有增强子、复制起始点、核糖体结合位点、终止子、多聚腺苷酸化位点等调节序列、药物抗性基因等选择标记等。

[0103] 另外，所述载体可以是作为目的核酸能够组成地、自主地或诱导地表达的任一种载体，但在安全性方面，优选自主地表达核酸的载体。

[0104] 仙台病毒载体不仅基因表达率比较高，而且具有不存在染色体插入突变引起的致癌危险的高的安全性。该载体在细胞质内进行复制而不进入细胞核内，可以以高的外来蛋白质水平进行表达。

[0105] 众所周知，在仙台病毒中参与自主复制的基因是 NP、P/C 及 L 基因，另外，参与传播性的基因为 M、F 及 HN 基因。在利用该病毒作为载体的情况下，其可以具备所述的基因类型，或其中一部分基因例如 F 基因、M 基因、HN 基因等也可以缺失（蛋白质·核酸·酶 Vol. 51, 27-37, 2006）。特别是通过缺失作为参与侵入宿主细胞的膜融合蛋白的 F 蛋白的基因，确保高的安全性（日本特开 2009-268471、日本特表 2008-536476、WO 00/70070）。

[0106] 仙台病毒的所述基因的核苷酸序列注册于如下所述序列数据库等（日本特表 2008-536476）。

[0107] 关于 NP 基因，M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218 等。

[0108] 关于 P 基因，M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008 等。

[0109] 关于 L 基因，D00053、M30202、M30203、M30204、M69040、X00587、X58886 等。

[0110] 关于 M 基因，D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056 等。

[0111] 关于 F 基因，D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、M69046、X00152、X02131 等。

[0112] 关于 HN 基因，D26475、M12397、M30202、M30203、M30204、M69046、X00586、X02808、X56131 等。

[0113] 另外，仙台病毒基因组 cDNA 可以按照例如 Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466, 1997、Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997 等中所记载的方法构建。而且，来自该 cDNA 的病毒的重建可以按照 WO97/16539; WO 97/16538; WO 00/70055; WO 00/70070; WO 01/18223; WO 03/025570; 日本特表 2008-536476; Tokusumi, T. et al., Virus Res. 86: 33-38 (2002); Li, H. et al., J. Virol. 74: 6564-6569 (2000) 等中所记载的方法进行。作为可以用于重建病毒载体的宿主细胞，已知有例如来自猴肾脏的 LLC-MK2 细胞 (ATCC CCL-7) 及 CV-1 细胞 (例如 ATCC CCL-70)、来自仓鼠肾脏的 BHK 细胞 (例如 ATCC CCL-10) 等培养细胞、来自人的 293T 细胞等，而且，为了得到大量的病毒载体，可以使鸡胚感染由上述的宿主细胞得到的病毒载体并对其进行扩增，然后纯化 (日本特表 2008-536476、W000/70055、WO 00/70070)。被回收的病毒的滴度可以通过测定例如 CIU (Cell-Infectious Unit, 细胞感染单位) 或红细胞凝集活性 (HA) 来确定 (W000/70070)。

[0114] 关于 F 基因缺失型仙台病毒载体的重建，也可以按照 WO 00/70055、WO 00/70070、

日本特表 2008-536476 等中所记载的方法进行。此时,建立表达仙台病毒 F 蛋白的辅助细胞株,使用其由 F 基因缺失基因组回收感染病毒粒子。

[0115] 根据后述的实施例,参考上述的方法,并用限制酶 NotI 消化 F 基因缺失型仙台病毒载体(Z 株)的 cDNA,在仙台病毒核壳体(NP)蛋白质基因的转录起始序列和翻译区域(ORF)之间的非翻译区域内插入分泌信号序列(例如 APP 信号序列或 CD59 信号序列)和突变体 Tau 蛋白(TAU(P301S))的结合片段,由此,构建搭载突变体 Tau 基因的 F 基因缺失型仙台病毒载体(Sev-TauP301S)。实际上构建的仙台病毒载体重建用质粒为 pcDNA3-APP-TauP301S(图 14),在分泌信号序列的 5' 末端上结合起始密码子(atg),而且,可以在起始密码子之前连接科兹(kozak)的共有序列(例如 gccacc 或 ccacc)。为了载体的重建,使用表达仙台病毒 F 蛋白的辅助细胞株(WO 00/70070)。

[0116] 在腺病毒载体的情况下,可以使用 E1 区域缺失型腺病毒载体。除 E1 区域之外, E3 区域也可以缺失,但 E3 区域的缺失不一定是必须的。关于腺病毒载体,记载于日本特开 2008-017849、日本特开 2000-166581、日本特表 2003-518915、Hitt, M. 等,“Construction and propagation of human adenovirus vectors” In Cell Biology: A Laboratory Handbook(Celis, J. E. ed.), Third Ed., Vol. 1, Academic Press(2005)、Hitt, M. 等,“Techniques for human adenovirus vector construction and characterization” In Methods in Molecular Genetics(Adolph, K. W. ed.), Vol. 7, Academic Press(1995)等。

[0117] 关于其它病毒载体,在基因治疗用中被改良的载体记载于文献中,因此,可以用于本发明。

[0118] <疫苗>

[0119] 本发明的疫苗可以用于 tau 蛋白病的预防或治疗。与突变体 Tau 蛋白的直接施用相比,该疫苗在受试者中可以更持续地诱导对于 Tau 蛋白(任选地磷酸化的)的抗体(参照图 4、图 6)。

[0120] 本发明的疫苗将受试者的脑内的小神经胶质细胞进行活化,由此吞噬突变体 Tau 蛋白。作为 tau 蛋白病的原因物质的突变体 Tau 蛋白利用小神经胶质细胞被清除,由此,阻碍该蛋白质的积累,抑制 tau 蛋白病的症状的进展。

[0121] 根据 tau 蛋白病模型小鼠(P301S Tau 转基因小鼠)中的体内试验得知:本发明的疫苗具有改善 tau 蛋白病、尤其是 tau 蛋白病型痴呆症的作用。即,被认为痴呆症的记忆力下降或社交性的缺乏通过接种本发明的疫苗而得以改善,但在接种重组突变体 Tau 蛋白时,没有看到该改善效果,因此,确认本发明的疫苗的优越性。另外,与重组突变体 Tau 蛋白一样,观察到本发明的疫苗对痴呆症中经常观察到的多动性(丧失沉着)的改善效果。这样,本发明的疫苗具有改善痴呆症中观察到的记忆力下降和/或社会行为异常和/或焦虑行为异常和/或记忆障碍的效果。

[0122] 就本发明的疫苗而言,由于具有上述的功效,可以用于 tau 蛋白病、尤其是阿尔茨海默氏病、FTDP-17(伴有与第 17 号染色体有关的帕金森的额颞叶型痴呆症)、唐氏综合征、匹克病、帕金森病-痴呆症复合病、神经原纤维变化优越型痴呆症、拳击手痴呆症、进行性核上性麻痹、嗜银颗粒性痴呆症、大脑皮质基底核变性症、脑炎后帕金森症、亚急性硬化性全脑炎、肌肉紧张性营养不良、福山型肌肉营养不良、关岛肌肉萎缩性侧索硬化症-帕金森病复合病、伴有纪伊半岛的神经原纤维变化的肌肉萎缩性侧索硬化症等疾病的预防或治

疗。

[0123] 本发明的疫苗可以根据需要含有药学上允许的载体及添加剂,例如生理盐水、林格液、缓冲液、植物油、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、防腐剂等。另外,可以在疫苗中添加用于提高免疫原性的佐剂。作为佐剂,包含例如铝盐(alum)、皂甙类、胞壁酰(二)肽、细胞因子类(IL-2、4、6等)、霍乱毒素、沙门氏菌毒素等免疫促进剂。

[0124] 本发明的疫苗的接种可以通过皮下、皮内、鼻内、肌肉内、静脉内、腹腔内等施用路径来进行。优选的制剂为注射剂、吸入剂等。吸入剂被封入于可以通过量取用量而吸入的吸入装置内。施用量应该根据受试者(哺乳动物、优选人)的症状、严重度、年龄、性别、体重等而从临床医学方面适当判断,可以根据疫苗的形态或施用方法等而变动,对于病毒载体的情况,非限制的量是例如 $10^4 \sim 10^{14}$ pfu(噬菌斑形成单位)、优选 $10^5 \sim 10^{13}$ pfu、更优选 $10^6 \sim 10^{11}$ pfu或 $10^5 \sim 10^9$ CIU(细胞感染单位),另外,对于质粒载体的情况,为例如约 $1 \mu\text{g} \sim 500 \mu\text{g}$,无论如何,只要发挥疫苗效果,可以在上述的范围外。

[0125] 另外,为了促进细胞膜的透过,也可以利用脂质体。作为脂质体优选的物质为阳离子性脂质体。已显示阳离子性脂质体介导质粒DNA的细胞内运送(Nature 337:387(1989))。阳离子性脂质体还可以通过结合膜透过性肽而容易进行细胞内运送。关于脂质体,可以参照例如Brigham等,Am. J. Med. Sci.,298:278(1989)、Osaka等,J. Pharm. Sci.,85(6):612-618(1996)、San等,Human Gene Therapy,4:781-788(1993)、Senior等,Biochemica et Biophysica Acta,1070:173-179(1991)、Kabanov and Kabanov,Bioconjugate Chem.1995;6:7-20、Remy等,Bioconjugate Chem.,5:647-654(1994);Behr, J-P., Bioconjugate Chem.,5:382-389(1994)、Wyman等,Biochem.,36:3008-3017(1997)等文献。

实施例

[0126] 以下,列举实施例具体地说明本发明,但本发明的范围不受这些实施例限制。

[0127] [实施例1]

[0128] 搭载突变体Tau基因的F基因缺失型仙台病毒载体的构建

[0129] 1) 分泌信号序列和表达Tau蛋白的仙台病毒载体的构建

[0130] 分泌型信号序列以淀粉样前体蛋白(APP,序列数据库登录号:NT_011512.11、NW_001838706.1、NM_201414.1、NM_201413.1、NM_000484.2、NM_001136130.1、NM_001136129.1)为基础,使用以下的序列。

[0131] 5'-ggctctagaatgctgccccggtttggcactgctcctgctggccgcctggacggctcgggcgctt-3(序列号2)

[0132] 突变体Tau蛋白(TauP301S)的cDNA以在人1N4R型Tau蛋白(序列数据库登录号:NM_001123067.2)的碱基序列上加入了突变的序列[从记载于NM_001123067.2的氨基酸序列的272位(对应于序列号1的301位的位置)的脯氨酸(P)密码子向丝氨酸(S)密码子的突变;序列号13的884~886位的丝氨酸密码子(tcg)]为模板,使用以下的引物用PCR进行扩增。

[0133] 5'侧正向引物:gctgagccccgccaggag(序列号4)

[0134] 3'侧反向引物:tcacaaaccctgcttggccag(序列号5)

[0135] 将 APP 分泌信号和用 PCR 进行扩增的 Tau 蛋白的 cDNA 结合,以其为模板,使用以下的引物进行 PCR。

[0136] 5' 侧正向引物 :aaagaattcggccttggtctagaatgctgcccggtttggcac (序列号 6)

[0137] 3' 侧反向引物 :aaagaattctcacaaccctgcttgccag (序列号 7)

[0138] 将所得的 PCR 产物用限制酶 EcoRI 进行消化,接着,在 pcDNA3 (Invitrogen) 上进行亚克隆。

[0139] 搭载突变体 Tau 基因的 F 基因缺失型仙台病毒载体的构建按照 Li 等的报道 (Li H et al. J. Virology. 74. 6564-6569 (2000) ;WO 00/70070) 中记载的方法进行。将 F 基因缺失型仙台病毒载体 (Z 株) 的 cDNA 用限制酶 NotI 进行消化,将分泌信号序列和突变体 Tau 蛋白的结合片段插入于仙台病毒核壳体 (NP) 蛋白基因的转录起始序列和翻译区域之间的非翻译区域,由此,构建搭载突变体 Tau 基因的 F 基因缺失型仙台病毒载体。

[0140] 另外,用作对照的表达 EGFP 的 F 基因缺失型仙台病毒载体也使用 pTRES2-EGFP 载体 (Clonetech) 的 EGFP 部分进行构建。

[0141] 2) 搭载突变体 Tau 基因的 F 基因缺失型仙台病毒载体的重建和扩增

[0142] 缺失有 F 基因的仙台病毒载体的重建以上述的 Li 等的报道 (Li H et al. J. Virology. 74. 6564-6569 (2000) ;WO 00/70070) 为参考来实施。由于该仙台病毒载体为 F 基因缺失型,因此,使用表达 F 蛋白的包装细胞,制备搭载突变体 Tau 基因的 F 基因缺失型仙台病毒载体 (以下称为 “Sev-TauP301S”) 及搭载 EGFP 基因的 F 基因缺失型仙台病毒载体 (以下称为 “Sev-GFP”)。

[0143] [实施例 2]

[0144] 搭载有突变体 Tau 基因的质粒载体的构建

[0145] 1) 分泌信号序列和表达 Tau 蛋白的质粒载体的构建

[0146] 分泌信号序列使用 CD59 蛋白 (序列数据库登录号 :NM_001127227. 1、NM_001127226. 1、NM_000611. 5、NM_203331. 2、NM_001127225. 1、NM_203329. 2、NM_203330. 2、NM_001127223. 1) 的碱基序列中的以下的序列。

[0147] 5' -atgggaatccaaggagggtctgtctctgttcgggetgctgctcgtcctggctgtcttctgccattcaggtcatagc-3' (序列号 3)

[0148] 突变体 Tau 蛋白 (TauP301S) 的 cDNA 以在人 1N4R 型 Tau 蛋白 (序列数据库登录号 :NM_001123067. 2) 的序列上加入了突变的序列 [从记载于 NM_001123067. 2 的氨基酸序列的 272 位 (对应于序列号 1 的 301 位的位置) 的脯氨酸 (P) 密码子向丝氨酸 (S) 密码子的突变 ; 序列号 12 的 898 ~ 900 位的丝氨酸密码子 (agt)] 为模板,使用以下的引物用 PCR 进行扩增。另外,为了对搭载于本质粒载体的突变体 Tau 与搭载于仙台病毒载体的突变体 Tau 进行区别,使其具有不同的丝氨酸密码子的序列。

[0149] 5' 侧正向引物 :gctgagccccgccaggag (序列号 8)

[0150] 3' 侧反向引物 :tcacaaaccctgcttgccag (序列号 9)

[0151] 将 CD59 分泌信号和用 PCR 进行扩增的 Tau 蛋白的 cDNA 结合,以其为模板,使用以下的引物进行 PCR。

[0152] 5' 侧正向引物 :ttgaattcgccaccatgggaatccaaggag (序列号 10)

[0153] 3' 侧反向引物 :aattctcgagtcacaaaccctgcttgcc (序列号 11)

[0154] 将所得的 PCR 产物用限制酶 EcoRI 和 XhoI 进行消化,接着,将 pcDNA3.1(+) 质粒载体 (Invitrogen) 的多克隆位点用限制酶 EcoRI 和 XhoI 进行消化,插入于各自的切断位点间。

[0155] 2) 搭载突变体 Tau 基因的质粒载体的扩增

[0156] 质粒载体的扩增以 Invitrogen 公司发行的 pcDNA3.1 制品使用说明书为基础,按照以下的要领进行。将大肠杆菌 DH5 α 株用质粒载体转化。接着,播种于 LB- 氨苄青霉素培养基,对每个单一克隆进行少量培养并纯化。用 Nucleobond 质粒纯化试剂盒 (MACHERY Y-NAGEL) 提取质粒,进行测序以确认是否正确地复制,选择有效的克隆。接种于小鼠的质粒载体的扩增通过选择的克隆的大量培养进行,在质粒的提取中使用无内毒素等级的 Nucleobond 质粒纯化试剂盒。

[0157] [实施例 3]

[0158] 利用搭载突变体 Tau 基因的 F 基因缺失型仙台病毒载体的体内试验

[0159] 1) 表达 GFP 的 F 基因缺失型仙台病毒载体对小鼠的经鼻施用

[0160] 使用 3 个月龄的 Tau 蛋白病模型小鼠 (P301S Tau 转基因小鼠) (由 Yoshiyama, Y, et al. Neuron 53, 337-351 (2007); University of Pennsylvania Dr. Trojanowski 提供), 进行本发明的搭载 GFP 的 F 基因缺失型仙台病毒载体 (以下称为“Sev-GFP”) 的经鼻施用, 并进行感染效率的探讨。

[0161] 每 1 只小鼠施用 Sev-GFP 5×10^6 CIU, 用多功能显微镜 (BZ-9000, Keyence) 进行荧光成像和亮视场像的拍摄, 对 1 周后鼻粘膜中的 GFP 的表达进行分析。

[0162] 分析的结果, 在鼻粘膜的宽广的范围看到 GFP 的表达, 确认仙台病毒载体的经鼻施用是有效的 (图 1)。

[0163] 2) Sev-TauP301S 接种对磷酸化 Tau 蛋白表达的抑制效果 (其 1)

[0164] 对 3 个月龄的 Tau 蛋白病模型小鼠经鼻 (鼻内) 施用 Sev-TauP301S 5×10^6 CIU/ 只, 在施用 5 个月后进行解剖, 制备海马冠状的组织切片。作为对照疫苗, 使用 Sev-GFP。另外, 在上述 2 个组中, 分别对 13 只、11 只 tau 蛋白病模型小鼠进行接种。

[0165] 为了测定磷酸化 Tau 的表达水平, 对海马的组织切片进行免疫染色。在小鼠海马冠状剖面中使抗磷酸化 Tau 蛋白质抗体 (AT8, Innogenetics) 反应并清洗后, 进行使用作为 2 次抗体的生物素标记的马抗小鼠 IgG 抗体 (Vector) 的免疫染色。免疫染色后, 用多功能显微镜 (BZ-9000, Keyence) 附属分析软件测定在海马 CA3 区域内积累的区域面积。用学生 t 检验进行 Sev-GFP 组、Sev-TauP301S 组各自的平均值 \pm 标准误差、统计学的分析。作为结果, 与 Sev-GFP 施用组相比, 在 Sev-TauP301S 施用组中, 暗示了海马中磷酸化 Tau 的表达的抑制 (图 2)。

[0166] 3) Sev-TauP301S 接种对磷酸化 Tau 蛋白表达的抑制效果 (2)

[0167] 关于 Sev-TauP301S 或 Sev-GFP 接种对 Tau 蛋白表达的抑制效果, 使用来自海马的蛋白质利用免疫印迹法进行分析。

[0168] 免疫印迹法的方法如下所述。用 RAB-HS 缓冲液将海马组织均质化后, 在 4 $^{\circ}$ C 下用 50,000 \times g, 进行 40 分钟离心分离, 将上清液进行 SDS 处理, 用 15 μ g/ 样品在 SDS-PAGE 上电泳。电泳后, 进行 PVDF 膜转移, 与抗磷酸化 Tau 蛋白质抗体 (AT8, Innogenetics) 反应, 清洗后, 使用作为 2 次抗体的 HR 标记的绵羊抗小鼠 IgG 抗体 (GE Healthcare), 利

用 ECL(GE Healthcare) 的化学发光进行检测。磷酸化 Tau 蛋白的评价后,用 Stripping solution(Nakalai) 剥离抗体,然后使用抗 β -肌动蛋白抗体(SIGMA) 再次用同样的方法进行检测。

[0169] 就积累的磷酸化 Tau 蛋白质量而言,用图像分析软件(NIH Image, Ver. 1. 63, NIH, US) 测定条带的信号强度,取得作为内部对照蛋白质的 β -肌动蛋白和信号强度之比,并进行定量化。对照疫苗(Sev-GFP) 接种组、Tau 疫苗(Sev-TauP301S) 接种组各自的平均值 \pm 标准误差、统计学的分析用学生 t 检验进行。作为结果得知,与 Sev-GFP 接种组相比,在 Sev-TauP301S 接种组中,抑制了海马中磷酸化 Tau 的表达(图 3)。

[0170] 4) 与海马中磷酸化 Tau 反应的抗体的诱导

[0171] 血清中与组织 Tau 反应的抗体效价用相对于没有施用 Sev-TauP301S 的 Tau 蛋白病模型小鼠海马组织的反应性进行评价。将施用有 Sev-TauP301S 或 Sev-GFP(各 5×10^6 CIU/ 只) 的小鼠的血清分别稀释 30 倍、100 倍、300 倍、1000 倍、3000 倍,在 4°C 下放置一晚,与 Tau 蛋白病模型小鼠海马组织切片反应后,使 Alexa546 标记的抗小鼠 IgG 抗体(Invitrogen) 在室温下用 1 小时反应并进行检测。各小鼠的抗体效价用观察到与组织反应的最大稀释倍率进行评价。用 Mann-Whitney 的 U 检验进行 Sev-GFP 接种组、Sev-TauP301S 接种组各自的平均值 \pm 标准误差、统计学的分析。

[0172] 作为结果,与来自施用有 Sev-GFP 的小鼠的血清相比,使来自 Sev-TauP301S 接种小鼠的血清反应时,在海马中进行反应的抗体效价显著地高。由以上的结果确认,通过接种 Sev-TauP301S,在血清中所产生的抗体与表达磷酸化 Tau 的海马进行反应(图 4a、4c)。

[0173] 5) Sev-TauP301S 接种对脑内的小神经胶质细胞的活化

[0174] 进行实验以确认 Sev-TauP301S 接种引起的脑内的神经免疫活性细胞小神经胶质细胞的变化。

[0175] 对 3 个月龄的 Tau 蛋白病模型小鼠接种 Sev-TauP301S 5×10^6 CIU/ 只,接种 5 个月取出脑组织,制备海马的组织切片,如下进行免疫染色。

[0176] 在小鼠海马冠状剖面中使抗 Iba1 抗体(WAKO) 在 4°C 下反应一晚,清洗后,与作为二次抗体的 Alexa488 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(Invitrogen) 和检测组织中小鼠 IgG 的 Alexa546 标记的抗小鼠 IgG 抗体(Invitrogen) 的组合在室温下反应 1 小时,用荧光双重免疫染色进行检测。免疫染色后,用多功能显微镜(BZ-9000, Keyence) 对海马 CA3 区域拍摄荧光成像。其结果,与作为对照的 Sev-GFP 施用组相比,就 Sev-TauP301S 施用组而言,在海马中看到许多 Iba1 阳性细胞,这些阳性细胞的许多与抗小鼠 IgG 抗体共染色。报道 Iba1(Ionized calcium binding adapter molecule 1) 伴随小神经胶质细胞的活化而增加其表达量,因此, Iba1 是与小神经胶质细胞的活化有关的分子(Ito D. et al., Brain Res. Mol. Brain Res. 57. 1-9, 1998), 而且认为,小鼠 IgG 识别组织中的 TauP301S, 因此认为,通过 Sev-TauP301S 的接种,活化小神经胶质细胞与 TauP301S 的反应(图 5)。

[0177] 关于由 Tau 疫苗接种引起的小神经胶质细胞的活化增加,暗示如下可能性:1) 在外周血中,巨噬细胞受到抗原呈递而活化,通过血脑屏障聚集于脑,成为活化小神经胶质细胞,吞噬突变体 Tau 蛋白;或 2) 突变体 Tau 蛋白通过血脑屏障,在脑内小神经胶质细胞直接受到抗原呈递而活化,吞噬突变体 Tau 蛋白。

[0178] 6) 以重组磷酸化 Tau 蛋白为抗原的 ELISA

[0179] 为确认接种 Sev-TauP301S 导致的血清中所产生的抗体是否为磷酸化 Tau 特异的抗体,因此,进行了以重组突变体 Tau 蛋白 (TAUP301S) 为抗原的 ELISA。

[0180] 重组突变体 Tau 蛋白的制备基于坂上等 (Sakaue F et al. J. Biol. Chem. 280. 31522-31529, 2005) 的方法进行。具体而言,使插入有 TauP301S(1N4R 型) 的 pRK172 载体在大肠杆菌 (BL21-DE3 株) 中表达,由菌体利用磷酸纤维素柱 (P11)、50%硫酸铵沉淀、热处理、进而反相 HPLC 纯化,并进行冷冻干燥,在 4℃ 下保存。

[0181] 关于血清中的抗磷酸化 Tau 抗体的产生,利用以下的 ELISA 法进行分析。将用前述的方法制备的重组 TAUP301S 蛋白质 (1 μ g/ml/孔) 在 96 孔板上、在 4℃ 下过夜进行固相化。

[0182] 在临接种 Sev-TauP301S 或 Sev-GFP 之前及接种后第 1 个月采集血清,使用将从接种小鼠上采取的血清稀释了 50 倍的血清,在室温下放入平板上 2 小时并使其反应。反应后,经过清洗,使 HR 标记的绵羊抗小鼠 IgG 抗体 (GE Healthcare) 在室温下反应 1 小时。反应后进行清洗,用 Opti-EIATMB Substrate Reagent Set (BD) 进行显色,通过 450nm 的波长中的吸光度测定进行定量化。在测定的阳性对照血清中使用皮下接种有重组 TAUP301S 蛋白质的小鼠血清进行系列稀释,使用将血清原液中的抗体滴度作为 1,000 单位制备的吸光度 - 单位间的标准曲线,将吸光度变换为单位。根据这样求出的每个小鼠的接种后单位量评价抗体效价的增加。该 ELISA 的结果可以确认,通过接种 Sev-TauP301S,在血清中较多地产生抗磷酸化 Tau 抗体 (图 6a)。

[0183] 在接种有重组蛋白质的小鼠中显著产生 Tau 特异的抗体,认为是因为进行接种后早期的血液中存在大量突变体 Tau 蛋白,因而大量抗原呈递细胞暴露于突变体 Tau 蛋白。

[0184] 另外,脑脊髓液中的磷酸化 Tau 蛋白的量利用以下的方法进行测定。

[0185] 96 孔板预先用 3 μ g/ml 抗磷酸化抗体 (AT8 抗体) 在 4℃ 下包覆处理过夜。将从接种有 Sev-TauP301S 或 Sev-GFP 的小鼠上采取的脑脊髓液 (CSF) 稀释 50 倍,添加于各孔并使其反应。作为阳性对照,将 14 个月龄的 Tau 蛋白病模型小鼠的脑进行均质化,使用将所得的液体系列稀释为 100 ~ 102400 倍的液体。作为 2 次抗体,使兔抗人 Tau 蛋白抗体、其后过氧化物酶标记的绵羊抗兔 IgG F(ab')₂ 抗体反应,使用 Tetramethyl Benzidine 液体进行显色。

[0186] 450nm 的吸光度利用自动平板检测仪 (Model 353 ;Thermo Scientific, Japan) 进行测量。作为结果,在进行了 Sev-TauP301S 接种的 Tau 蛋白病模型小鼠的脑脊髓液中观察到高浓度的磷酸化 Tau 蛋白 (图 6b)。

[0187] 7) 小鼠行为分析

[0188] 全部的行为实验在受到京都大学医学研究科动物实验委员会 (京都,日本) 认可的基础上进行。通过对本实验中使用的 Tau 蛋白病模型小鼠 (P301STau 转基因小鼠) 施用 Tau 疫苗,用以下的方法评价痴呆症患者中观察到的行为学的异常 (记忆力下降、社交性的缺乏、焦虑行为、多动性、活动量、空间学习、参照记忆、感觉中枢、听力等) 的改善效果。

[0189] (1) 对 tau 蛋白病模型小鼠的 Sev-TauP301S 接种的新奇环境下的社会行为实验 (Social interaction test)

[0190] 社会行为实验是用于评价在新奇场面中的行为的实验。

[0191] 将接种有 Sev-TauP301S (5 × 10⁶ CIU/只) 的 Tau 蛋白病模型小鼠或接种有

Sev-GFP(5×10^6 CIU/只)的 Tau 蛋白病模型小鼠在接种后第 3 个月,与至今没有进入过同一笼子的小鼠每 1 只放入 1 个箱($40 \times 40 \times 30$ cm)中,使其自由地探寻 10 分钟。社会行为通过 CCD 照相机(Sony DXC-151A)进行监视,将图像载入计算机并使用 Image SI 软件自动地测定接触次数、每 1 次接触的平均时间、移动距离。进行了分析,与施用有 Sev-GFP 的 Tau 蛋白病模型小鼠相比,接种 Sev-TauP301S 的 Tau 蛋白病模型小鼠对陌生小鼠接触的时间长。根据该分析,确认了社会行为、以及对新的小鼠的出现的响应能力的改善效果(图 7A)。

[0192] (2) 对 Tau 蛋白病模型小鼠的 Sev-TauP301S 接种产生的社会行为测定实验(Crawley version)

[0193] 社会行为测定实验(Crawley's social interaction test, Crawley 社会行为测定实验)是用于对各类的小鼠的记忆力、社会关系的形成、社交性的评价的实验。

[0194] 装置利用嵌板隔成 3 个空间,在两端的空间的一角落分别设定小的笼子各 1 个。将至今没有进入过同一笼子的小鼠放入笼子中,其后,对 Tau 蛋白病模型小鼠接种 Sev-TauP301S(5×10^6 CIU/只)或 Sev-GFP(5×10^6 CIU/只),将接种后第 3 个月的小鼠放置于笼子之外,10 分钟期间原封不动放置。10 分钟后,在另外的笼子中放入其它的至今没有进入过同一笼子的小鼠后,接种 Sev-TauP301S 或接种 Sev-GFP 的 Tau 蛋白病模型小鼠在已经进入了 10 分钟的小鼠(Familiar Side, 熟悉侧)、新的陌生小鼠(Stranger Side, 陌生侧)中哪一个小鼠的附近长时间停留,通过测定停留时间进行社会行为的评价。

[0195] 作为结果,与 Sev-GFP 接种 Tau 蛋白病模型小鼠在熟悉侧的停留时间长相比,接种 Sev-TauP301S 的 Tau 蛋白病模型小鼠在陌生侧的停留时间长,确认了社会行为、以及对不同小鼠的记忆力的改善效果(图 7B)。

[0196] (3) 对 tau 蛋白病模型小鼠的 Sev-TauP301S 接种的高架十字迷宫实验

[0197] 高架十字迷宫是用于评价焦虑行为的装置,由相同大小的 2 个开放臂和附有高度 15cm 的透明的壁的 2 个闭合臂构成。在闭合臂上安装有高度 15cm 的透明的壁。

[0198] 臂以及中心的正方形的部分由白的塑料板形成,位于离地板 50cm 的高度。将接种 Sev-TauP301S(5×10^7 CIU/只,每 1 周一次,共 3 次)的 Tau 蛋白病模型小鼠或同滴度的 Sev-GFP 接种给 Tau 蛋白病模型小鼠,将接种后第 3 个月的小鼠分别在迷宫中心的正方形的部分(5×5 cm)以朝向闭合臂的方向的方式放置,记录 10 分钟行为。使用 Image EP 软件自动地测量从迷宫中心向 4 个方向的每一个方向的全部出入次数(A)、向没有栅栏的方向的出入次数的比例(B)、小鼠的总移动距离(C)、向没有栅栏的场所的停留时间的比例(D)。接种 Sev-TauP301S 的 Tau 蛋白病模型小鼠,向没有栅栏的场所的停留时间显著地变少,确认了焦虑行为、以及对落下的危险的判断力的改善(图 8D)。

[0199] (4) 对 Tau 蛋白病模型小鼠的重组 Tau 蛋白接种的旷场试验

[0200] 旷场试验是用于测定活动量或情绪性的实验。

[0201] 随着将重组 Tau 蛋白(TAUP301S) $100 \mu\text{g}$ /只/次、每 2 周一次共 3 次、用 Adju-Phos 佐剂(Gentaur 公司)对 Tau 蛋白病模型小鼠进行皮下接种,在接种后第一个月进行旷场试验。对接种小鼠,在附有高度 30cm 的栅栏的 40cm 见方的旷场试验用装置(Accuscan Instruments)中放入小鼠,将 120 分钟的自由行为划分为 5 分钟时段,评价移动距离(A)、伸腰的次数(B)、在视野中央的停留时间(C)、刻板行为(D)。对于接种 TAUP301S 的 Tau 蛋白病模型小鼠,移动距离显著地变短,确认有多动性(沉着的丧失)的改善效果(图 9A)。

[0202] (5) 对 Tau 蛋白病模型小鼠的重组 Tau 蛋白接种的高架十字迷宫实验

[0203] 随着将重组 Tau 蛋白 (TAUP301S) 100 μ g/只/次、每2周一次共3次、用 Adju-Phos 佐剂 (Gentaur 公司) 对 Tau 蛋白病模型小鼠进行皮下接种, 在接种后第一个月进行高架十字迷宫的分析。将接种小鼠分别在迷宫中心的正方形的部分 (5 \times 5cm) 以朝向闭合臂的方向放置, 记录 10 分钟行为。使用 Image EP 软件自动地测量从中央向 4 个方向的每一个方向的全部的出入次数 (A)、出入于没有栅栏的方向的的次数的比例 (B)、小鼠的总移动距离 (C)、向没有栅栏的场所的停留时间的比例 (D)。接种 TAUP301S 的 Tau 蛋白病模型小鼠, 与对照 (佐剂施用) 的小鼠的结果相比, 在高架十字迷宫分析中没有确认有大的差异 (图 10)。

[0204] (6) 对 Tau 蛋白病模型小鼠的 DNA-Tau P301S 接种的旷场试验

[0205] 在开始的时刻, 在 5 个月龄的 Tau 蛋白病模型小鼠左后肢大腿肌肉上进行肌肉内接种 cDNA-Tau P301S 100 μ g/只/次, 每周一次共 6 次, 接着, 每 2 周一次共 3 次, 总计 9 次, 在接种后第一个月进行旷场试验。对接种小鼠, 在附有高度 30cm 的栅栏的 40cm 见方的旷场试验用装置 (Accuscan Instruments) 中放入小鼠, 将 120 分钟的自由行为划分为 5 分钟时段, 评价移动距离 (A)、伸腰的次数 (B)、在视野中央的停留时间 (C)、刻板行为 (D)。接种 cDNA-Tau P301S 的 Tau 蛋白病模型小鼠证实移动距离缩短, 确认有多动性 (沉着的丧失) 的改善效果 (图 11A)。

[0206] (7) 对 Tau 蛋白病模型小鼠的 cDNA-Tau P301S 接种的新奇环境下的社会行为实验

[0207] 在开始的时刻, 在 5 个月龄的 Tau 蛋白病模型小鼠左后肢大腿肌肉上进行肌肉内接种 cDNA-Tau P301S 100 μ g/只/次, 每周一次共 6 次, 接着, 每 2 周一次共 3 次, 总计 9 次, 在接种后第一个月与至今没有进入过同一笼子的小鼠每 1 只放入 1 个箱 (40 \times 40 \times 30cm) 中, 自由地探寻 10 分钟。就社会行为而言, 通过 CCD 照相机 (Sony DXC-151A) 进行监视, 将图像载入计算机, 使用 Image SI 软件自动地测定接触次数、每 1 次接触的平均时间、移动距离。进行了分析, 接种 cDNA-Tau P301S 的 Tau 蛋白病模型小鼠与作为对照的接种有 pcDNA3.1 (ATG-) (以下为 cDNA-空白) 的 Tau 蛋白病模型小鼠相比, 对陌生小鼠接触的时间显著缩短 ($p = 0.0164$, 学生 t 检验) (图 12A)。另外, 接种 cDNA-Tau P301S 的 Tau 蛋白病模型小鼠与接种 cDNA-空白的 Tau 蛋白病模型小鼠相比, 移动距离也缩短。(图 12B)。其结果, 与旷场试验同样地, 通过 cDNA-Tau P301S 接种, 确认有对多动性的改善。

[0208] (8) 对 Tau 蛋白病模型小鼠的 Sev-TauP301S 接种的巴恩斯迷宫试验

[0209] 巴恩斯迷宫试验是用于研究空间学习或参照记忆的实验。在 1 张圆状的板上打 12 个孔, 仅在其中的 1 个孔的下面放置有暗箱。对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠接种 Sev-TauP301S (5×10^6 CIU/只) 或 Sev-GFP (5×10^6 CIU/只), 在接种后第 4 个月进行本实验。首先, 在一定期间内以使小鼠记忆暗箱的空间的位置的方式进行训练 (训练期间), 训练结束后经过 24 小时后, 根据停留于 (放置有暗箱) 靶点的孔的周围的时间, 评价空间学习或参照记忆 (探测试验)。通过 Sev-TauP301S 接种, 在 Tau 蛋白病模型小鼠中, 至到达靶点的时间减少 (图 15B), 而且, 停留于靶点的孔的周围的时间变长 (图 15C), 因此, 确认有改善效果。

[0210] (9) 对 Tau 蛋白病小鼠的 Sev-TauP301S 接种的恐怖条件反射试验

[0211] 恐怖条件反射试验是用于测定情景记忆或注意能力的实验。对 Tau 蛋白病小鼠及

野生型小鼠接种 Sev-TauP301S (5×10^6 CIU/ 只) 或 Sev-GFP (5×10^6 CIU/ 只), 在接种后第 4 个月进行实验。对放入箱中的小鼠施加电休克, 在该体验有电休克的同一箱中给予其它的刺激 (例如声音), 经过一定的时间后, 在同一箱中放入小鼠或者放入其它箱中并进行同一声音引起的刺激的, 由此在小鼠中产生冻结 (畏缩行为) 现象。根据该冻结的出现率评价情景记忆或注意能力。通过 Sev-TauP301S 接种, 在 Tau 蛋白病模型小鼠中, 冻结的出现率减少, 确认有改善效果 (图 16C)。

[0212] (10) 对 Tau 蛋白病模型小鼠的 Sev-TauP301S 接种的身体测定

[0213] 图 17 表示对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠接种 Sev-TauP301S (5×10^6 CIU/ 只) 或 Sev-GFP (5×10^6 CIU/ 只)、在接种后第一个月进行与体重、体温、握力、抓住金属丝的时间有关的测定的结果。没有确认有各组中的优势差。

[0214] (11) 对 Tau 蛋白病模型小鼠的 Sev-TauP301S 接种产生的社会行为测定试验

[0215] 社会行为测定试验是将被试小鼠 2 只放入箱中、对 10 分钟的接触次数或接触持续时间、小鼠的移动距离等进行测定的用于社会行为测定的实验。对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠接种 Sev-TauP301S (5×10^6 CIU/ 只) 或 Sev-GFP (5×10^6 CIU/ 只), 在接种后第 2 个月进行本实验。作为结果, 在接种 Sev-TauP301S 的 Tau 蛋白病模型小鼠中, 确认在接触次数的增加 (图 18B)、活跃接触的持续时间的延长 (图 18C) 及总移动距离的增加 (图 18E) 方面有改善效果。

[0216] (12) 通过对 Tau 蛋白病模型小鼠的 Sev-TauP301S 接种的前脉冲抑制实验

[0217] 前脉冲抑制实验是进行感觉中枢或听力、(对于刺激) 跳起的反应等的评价的实验。对于接种 Sev-TauP301S (5×10^6 CIU/ 只) 的 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠或接种 Sev-GFP (5×10^6 CIU/ 只) 的 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠, 在接种后第 3 个月进行了前脉冲抑制实验。

[0218] 作为结果, 也没有确认有通过 Sev-TauP301S 接种的冻结抑制效果, 在各组间没有确认有优势的差异 (图 19)。

[0219] (13) 对 Tau 蛋白病模型小鼠的 Sev-TauP301S 接种的旷场试验

[0220] 对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠接种 Sev-TauP301S (5×10^6 CIU/ 只) 或 Sev-GFP (5×10^6 CIU/ 只), 在接种后第一个月进行了旷场试验。(A) 表示总移动距离, (B) 表示垂直方向的活动量, (C) 表示在中心部的停留时间, (D) 表示刻板行为次数。

[0221] 在各组间没有确认有优势的差异 (图 20)。

[0222] (14) 对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠的旷场试验

[0223] 对野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠进行了旷场实验。(A) 表示总移动距离, (B) 表示垂直方向的活动量, (C) 表示中心部中的停留时间, (D) 表示刻板行为次数。

[0224] 与野生型小鼠相比, Tau 蛋白病模型小鼠总移动距离长 (A), 垂直方向的运动量多 (B), 停留在中心部的时间 (C) 长。对于刻板行为次数 (D), 没有确认有优势的差异 (图 21)。

[0225] (15) 对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠的高架十字迷宫实验

[0226] 对 Tau 蛋白病小鼠或野生型小鼠进行了高架十字迷宫实验。

[0227] 作为结果, 对于 Tau 蛋白病小鼠, 侵入没有栅栏的开放臂的比例 (B) 和停留在没有栅栏的开放臂的时间 (D) 与野生型小鼠相比显示优势高的值 (图 22)。

[0228] (16) 对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠的前脉冲抑制实验

[0229] 对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠进行了前脉冲抑制实验。Tau 蛋白病模型小鼠与野生型小鼠相比,对声音的惊愕反应低(图 23A),但通过预先发出小的声音后发出大的声音的惊愕反应的抑制的比例显示高的值(图 23B)。

[0230] (17) 对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠的脑组织的 Tau 蛋白的表达

[0231] 对于 Tau 蛋白病模型小鼠和野生型小鼠的脑组织中的 Tau 蛋白的表达水平的比较在病理组织学上进行了探讨。

[0232] 虽然没有观察到 Tau 的聚集图像或包含体,但是,与野生型小鼠相比,在 Tau 蛋白病小鼠的脑组织中显著地确认有磷酸化 Tau 蛋白(图 24)。可以认为,较多地看到磷酸化 Tau 的带状回皮质、大脑皮质扁桃核、海马等与不安障碍有关,海马与记忆障碍有关,因此暗示:这些组织中磷酸化 Tau 的积累可能导致呈现行为异常。

[0233] (18) 对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠的身体测定

[0234] 对 13 周龄的 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠进行了一般的身体测定。

[0235] (A) 表示体重,(B) 表示直肠温度,(C) 表示握力,(D) 表示钢丝绳悬挂实验的结果。

[0236] 在 Tau 蛋白病模型小鼠和野生型小鼠之间没有确认有优势的差异(图 25)。

[0237] (19) 对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠的社会行为测定实验(新奇场面)

[0238] 对 Tau 蛋白病小鼠或野生型小鼠进行了社会行为测定实验。

[0239] 社会行为测定实验的结果,是在 Tau 蛋白病模型小鼠和野生型小鼠之间没有确认有优势的差异(图 26)。

[0240] (20) 对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠的恐怖条件反射试验

[0241] 对野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠进行了恐怖条件反射试验。在 Tau 蛋白病模型小鼠中,冻结的出现率与野生型小鼠相比显示低的值,但总体上没有大的优势差异(图 27)。

[0242] (21) 对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠的巴恩斯迷宫试验

[0243] 对野生型小鼠及 Tau 蛋白病模型小鼠进行了巴恩斯迷宫试验。图 28 的 (A) ~ (C) 表示训练期间的结果。图 28 的 (D) 表示训练后经过 24 小时后的探测实验。

[0244] 训练期间,在 Tau 蛋白病模型小鼠和野生型小鼠之间没有确认有优势的差异(图 28A-C)。

[0245] 在探测实验中,在 Tau 蛋白病模型小鼠和野生型小鼠之间,Tau 蛋白病模型小鼠在靶点的邻近孔周围及靶点的孔周围的停留时间短(图 28D)。

[0246] (22) 对 Tau 蛋白病模型小鼠及野生型小鼠的脑组织的 Tau 蛋白的表达

[0247] 对于 Tau 蛋白病模型小鼠和野生型小鼠的脑组织中的 Tau 蛋白的表达水平的比较在病理组织学上进行了探讨。

[0248] 虽然没有确认有 Tau 蛋白的聚集图像或包含体,但是,与野生型小鼠相比,在 Tau 蛋白病小鼠的脑组织中显著地确认有磷酸化 Tau 蛋白(图 24)。可以认为,较多地看到酸化 Tau 的带状回皮质、大脑皮质扁桃核、海马等与不安障碍有关,海马与记忆障碍有关,因此暗示:这些组织中磷酸化 Tau 蛋白的积累可能导致呈现行为异常。工业上的可应用性

[0249] 本发明的疫苗在 Tau 蛋白异常地积累于中枢神经系而引起的疾病(Tau 蛋白病)的症状中,尤其是对 Tau 蛋白病型痴呆症的改善是有效的,因此,医疗上是有用的。序列表自由文本

-
- [0250] 序列号 4 ~ 11 引物
- [0251] 序列号 12、13 合成 DNA
- [0252] 将本说明书中引用的全部的出版物、专利及专利申请通过引用并入本说明书中。

[0001]

序列表

<110> 国立大学法人京都大学
 独立行政法人放射线医学综合研究所

<120> Tau 蛋白病治疗用疫苗

<130> PH-4623-PCT

<150> JP 2010-3424
 <151> 2010-01-08

<160> 13

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

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

[0002]

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

[0003]

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 Glu 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> 2

<211> 62

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

ggctetagaat gctgcccggg ttggcactgc tectgctggc cgcttggaag gctcggggcg 60

tt

62

<210> 3

<211> 75

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

atgggaatec aaggagggtc tgctctgttc gggetgctgc tctctctggc tctctctctgc 60

[0004]

cattcaggtc atagc	75
<210> 4	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 4	
gctgagccccc gccaggag	18
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 5	
tcacaaaccc tgccttgcca g	21
<210> 6	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 6	
aaagaattcg gcttggtcfa gaatgctgcc cggtttggca c	41
<210> 7	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 7	
aaagaattct cacaaacccct gcttgccag	30

[0005]

<210> 8	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 8	
gctgagccccc gccaggag	18
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 9	
tcacaaaccc tgcttggeca g	21
<210> 10	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 10	
ttgaattcgc caccatggga atccaaggag	30
<210> 11	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 11	
aattctcgag tcacaaaccc tgcttgge	28
<210> 12	
<211> 1323	

[0006]

<212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成 DNA
 <220>
 <221> CD59 信号序列
 <222> (13).. (87)
 <400> 12
 gaattcgcca ceatgggaat ccaaggaggg tctgtcctgt tgggctgct gctcgtcctg 60
 gctgtcttct gccattcagg teatagecct gagcccccgc aggagttega agtgatggaa 120
 gatcaecgtg ggaectacgg gttgggggac aggaaagatc aggggggeta caccatgcac 180
 caagaccaag aggggtgacac ggaecgtgge ctgaaagaat ctcccctgca gacccccact 240
 gaggacggat ctgaggaacc gggctctgaa acctctgatg ctaagagcac tccaacagcg 300
 gaagctgaag aagcaggcat tggagacacc cccagcctgg aagacgaagc tctgtggfca 360
 gtgacccaag ctccgatggt cagtaaaage aaagacggga ctggaagoga tgacaaaaaa 420
 gccaaagggg ctgatggtaa aacgaagatc gccacaccgc ggggagcagc cccctcagge 480
 cagaagggcc aggccaacgc caccaggatt ccagcaaaaa ccccgcgcgc tccaaagaca 540
 ccaccagct ctggtgaacc tccaaaatca ggggatcgca gcggctacag cagcccccgc 600
 tccccagca ctcccgcag ccctcccgc accccgtccc ttccaacccc acccaccgg 660
 gagcccaaga aggtggcagt ggtccgtact ccaccaagt cgcctctctt cccaagage 720
 cgcctgcaga cagccccctg gcccatgcca gacctgaaga atgtaagtc caagatcgge 780
 tccactgaga acctgaagca ccagccggga ggcgggaagg tgcagataat taataagaag 840
 ctggatctta gcaacgtcca gtccaagtgt ggtccaaagg ataatatcaa acacgtcagt 900
 ggagggcgca gtgtgcaaat agttacaaa ccagttgacc tgagcaaggt gacctccaag 960
 tgtggctcat taggcaacat ccatcataaa ccaggagtg gccaggtgga agtaaaatct 1020
 gagaagcttg acttcaagga cagagtcag tgaagattg gtcctctgga caatatcacc 1080
 cagtcctctg gggaggaaa taaaagatt gaaaccaca agctgacct cgcgagaac 1140
 gccaaagcca agacagacca cggggcggag atcgtgtaca agtcgccagt ggigtctggg 1200

[0007]

gacaagtctc caaggeatct eagcaatgtc tectccaccg geagcatega catggtagac	1260
tegecccage tegccacgct agetgacgag gtgtctgect cectggccaa gcagggtttg	1320
tga	1323
<210> 13	
<211> 1315	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 合成 DNA	
<220>	
<221> APP 信号序列	
<222> (20)..(73)	
<400> 13	
gaattcggct tggctagaa tgetgceegg ttggcactg ctctctgtgg ccgcctggac	60
ggctcggggcg cttgtgagc cccgccagga gttegaagtg atggaagate acgtcgggac	120
gtacgggttg gggacagga aagatcaggg gggetacacc atgcaccaag accaagaggg	180
tgacacggac getggcctga aagaatctcc cctgcagacc cccactgagg acggatctga	240
ggaaccgggc tetgaaacct ctgatctaa gagcactcca acagoggag ctgaagaage	300
aggeattgga gacaccccca gcctggaaga cgaagctget ggtcacgtga cccaagetg	360
catggtcagt aaaagcaaag acgggactgg aagcagatgac aaaaaagcca aggggctga	420
tggtaaaacg aagatgccca caccgcgggg agcagcccct ccaggccaga agggccaggc	480
caacgccacc aggattecag caaaaacccc gcccgctcca aagacaccac ccagetctgg	540
tgaacctcca aaatcagggg atgcagcgg ctacagcagc cccggetccc caggeactcc	600
cggcagccgc tcccgcaccc egtecttcc aaccccaccc acccgggagc ccaagaaggt	660
ggcagtggtc cgtactccac ccaagtcgce gtcttcgcc aagagccgce tgcagacagc	720
ccccgtgccc atgccagacc tgaagaatgt caagtcgaag atcggtcca ctgagaacct	780
gaagcaccag cgggagggc ggaaggtgca gataattaat aagaagctgg atcttagcaa	840
cgtcagctcc aagtgtggct caaaggataa tatcaaacac gtctcgggag gcgagctgt	900
gcaaatagtc tacaaccag ttgacctgag caaggtgacc tccaagtgtg gctcattagg	960

[0008]

caacatccat cataaaccag gaggtggcca ggtggaagta aaatctgaga agcttgactt	1020
caaggacaga gtccagtcca agattgggtc cctggacaat atcaccacag tccctggcgg	1080
aggaaataaa aagattgaaa cccacaaget gaccttcgc gagaacgcca aagccaagac	1140
agaccacggg gcgagatcg tgtacaagtc gccagtgggtg tctggggaca cgtctccaag	1200
gcattctcagc aatgtctect ccaccggeag catcgacatg gtagactcgc cccagctcgc	1260
cacgctagct gacgaggtgt ctgcctcct ggccaagcag ggtttgtgag aattc	1315

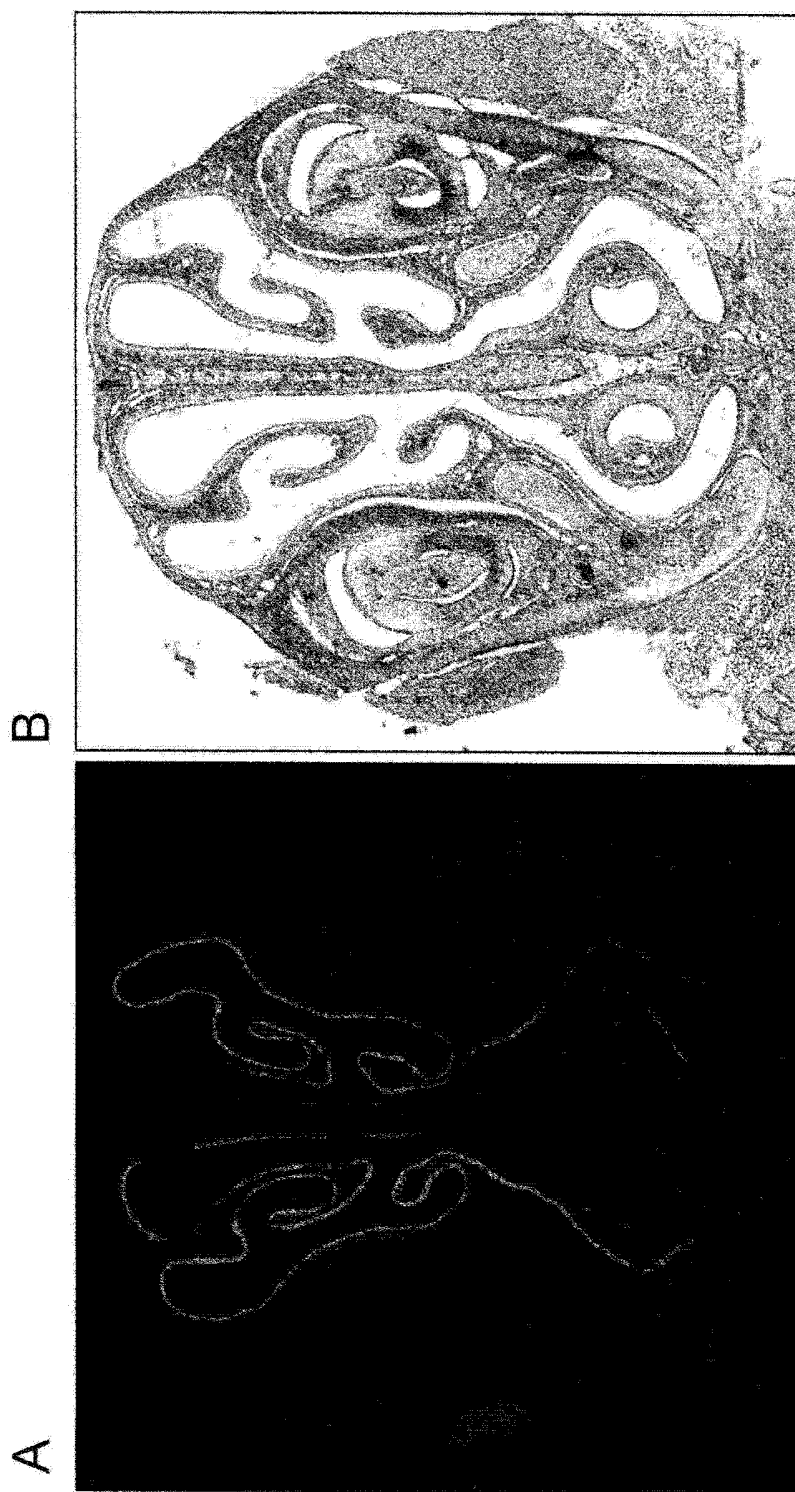


图 1

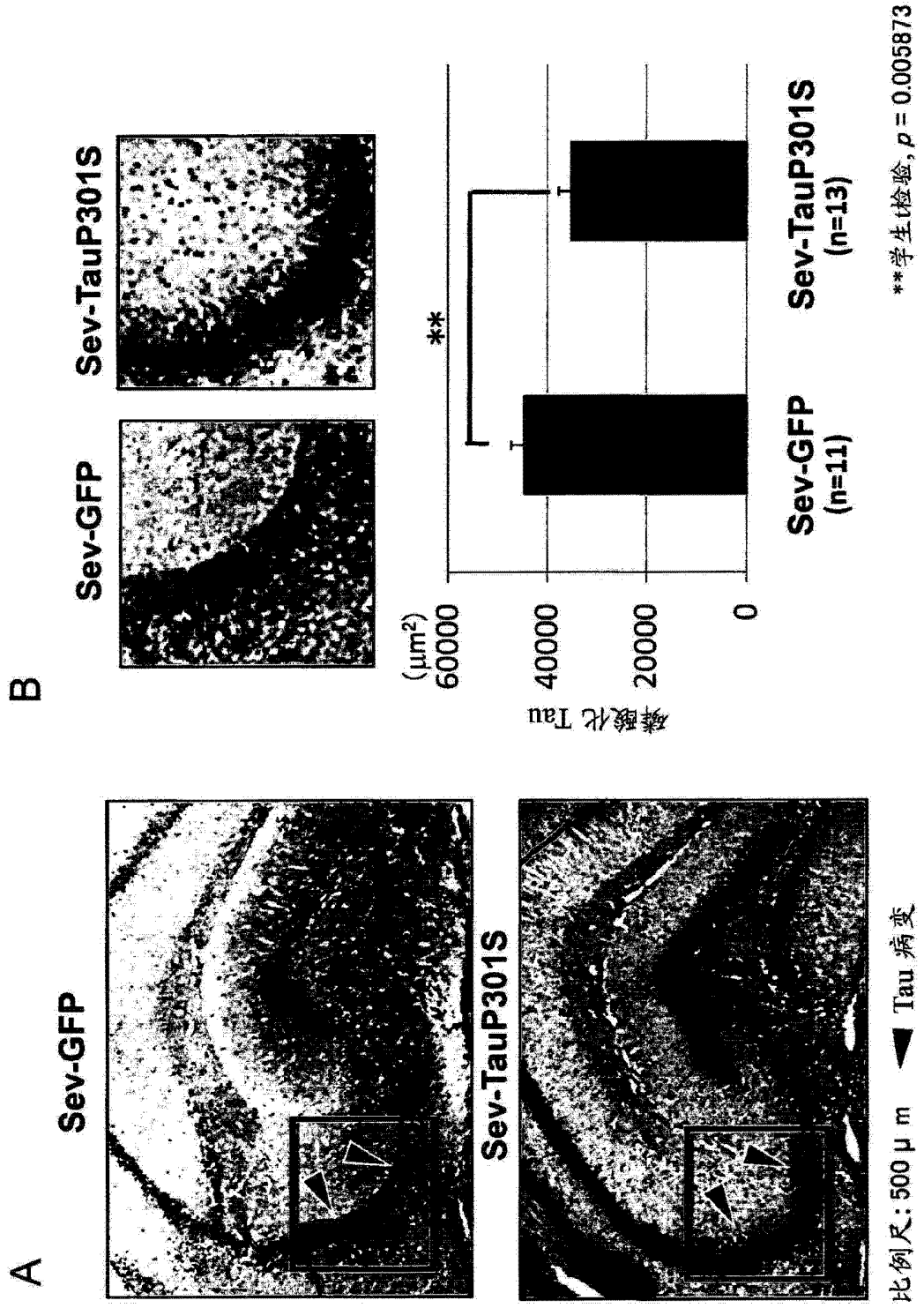


图 2

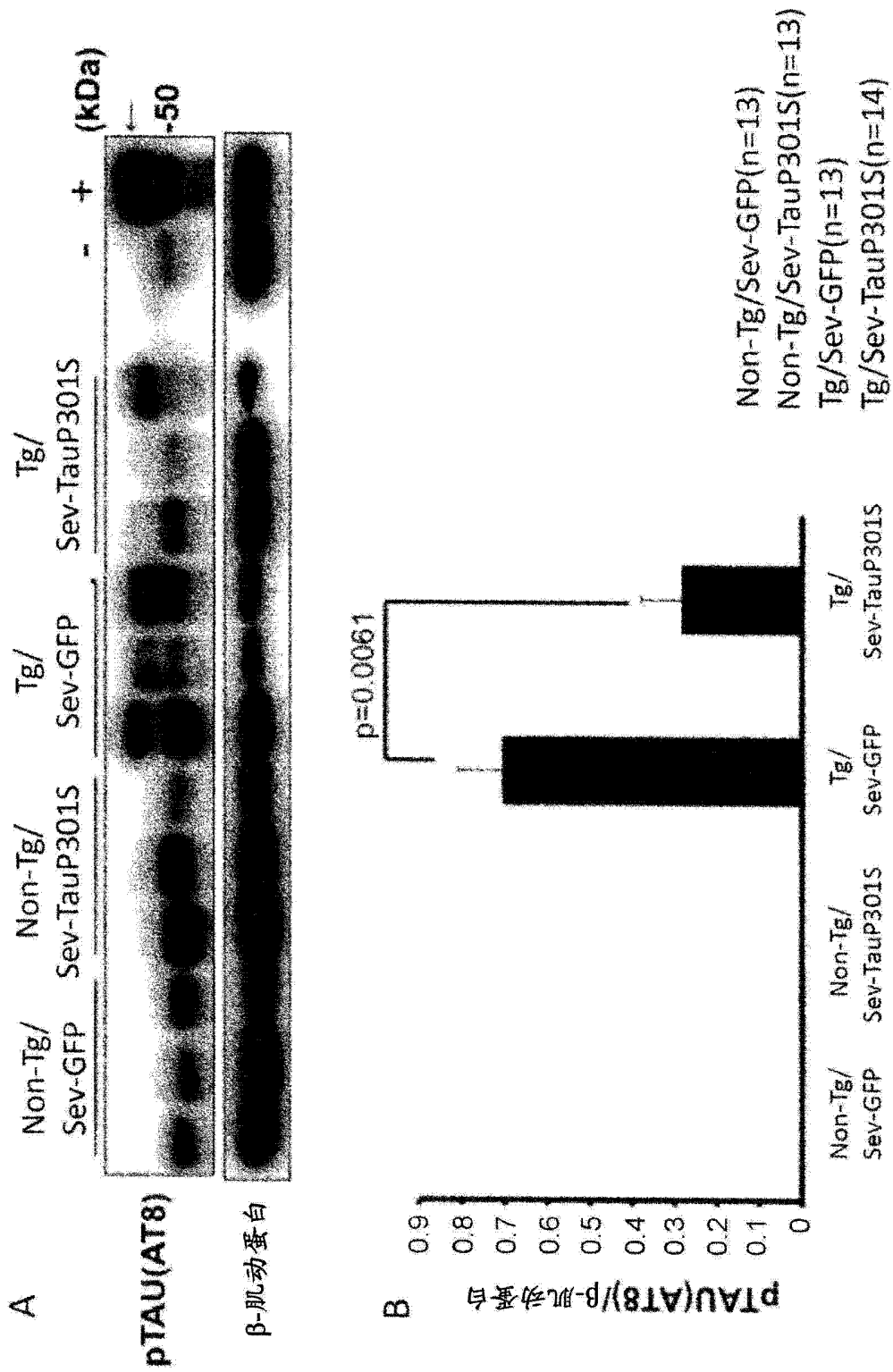


图 3

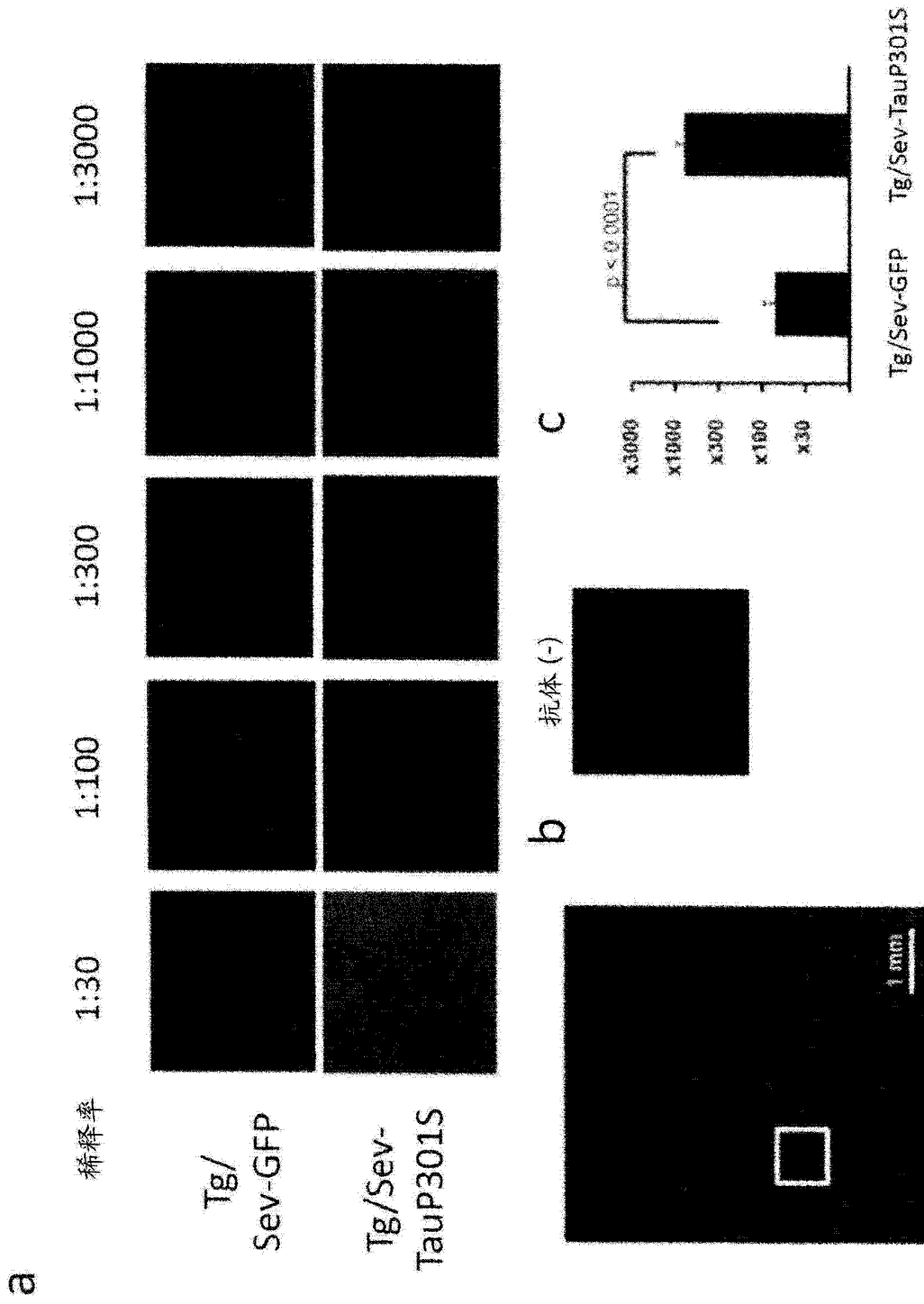


图 4

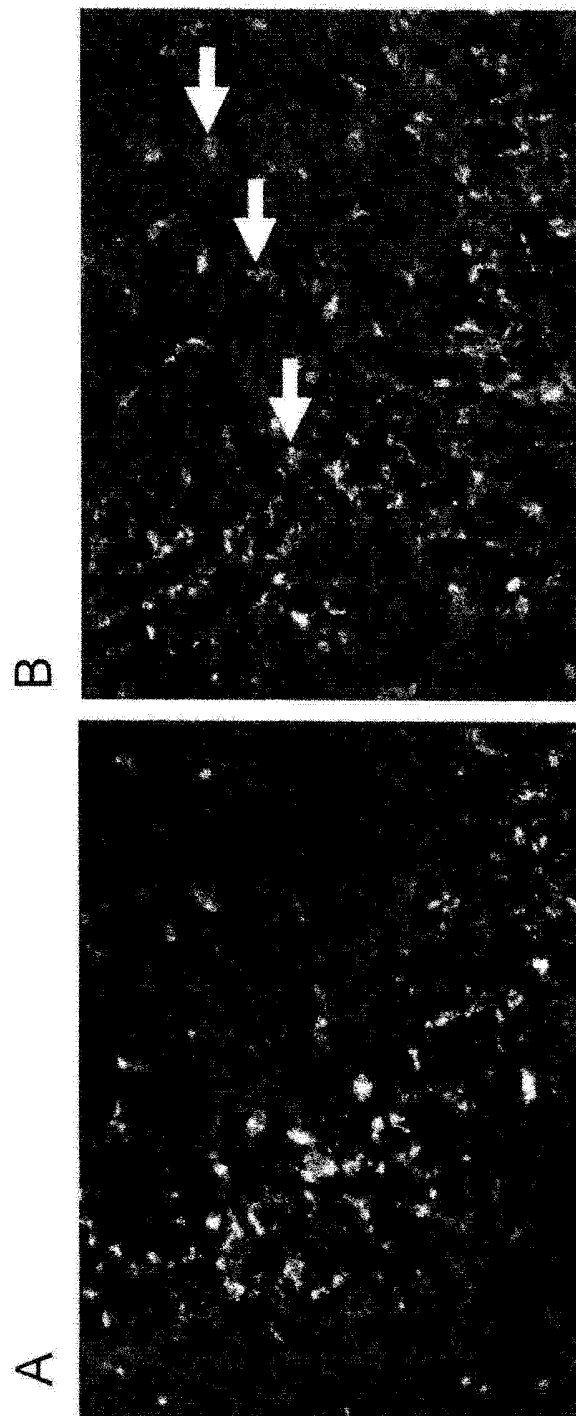


图 5

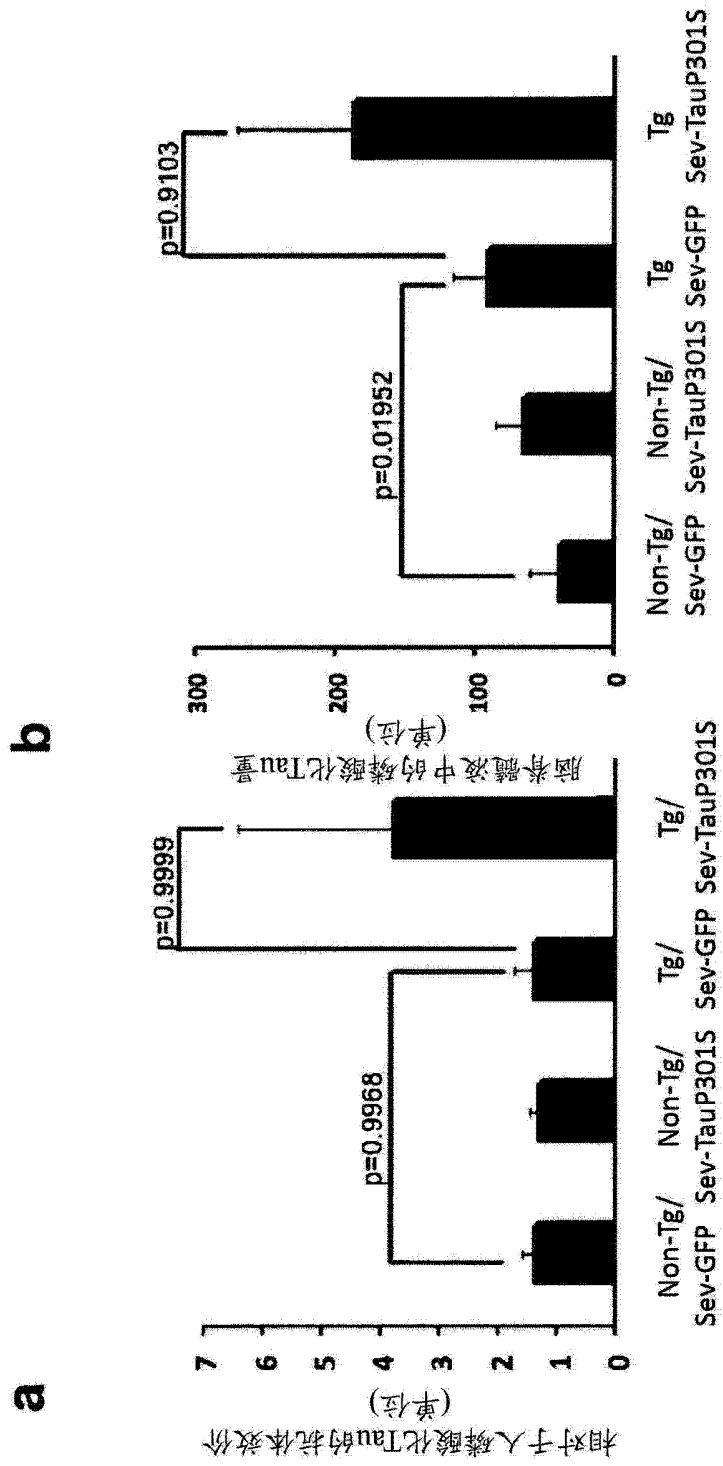
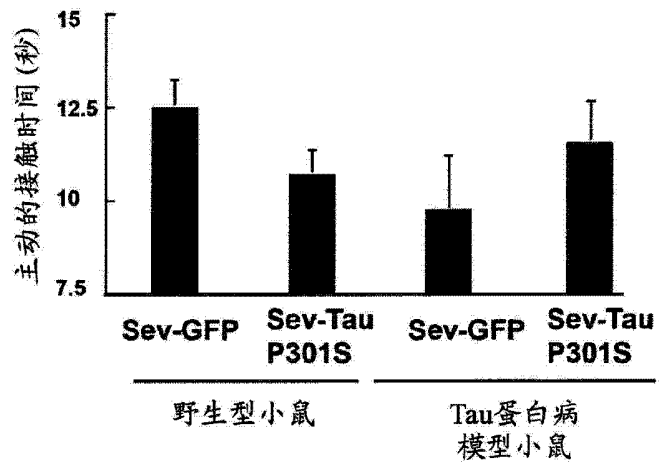


图 6

A



B

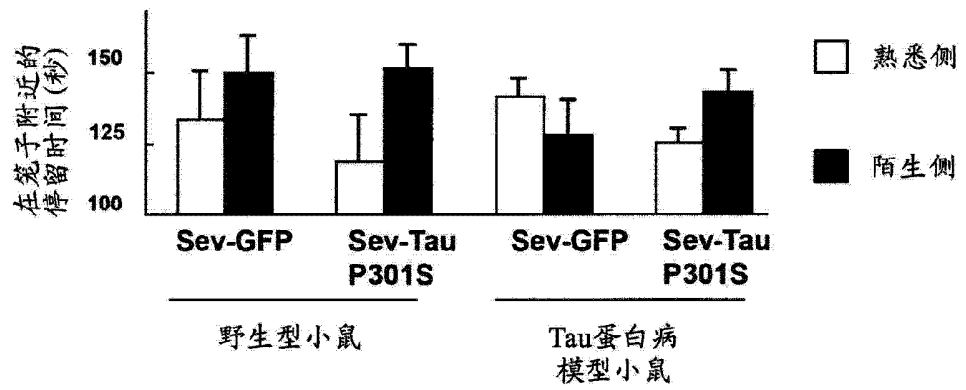


图 7

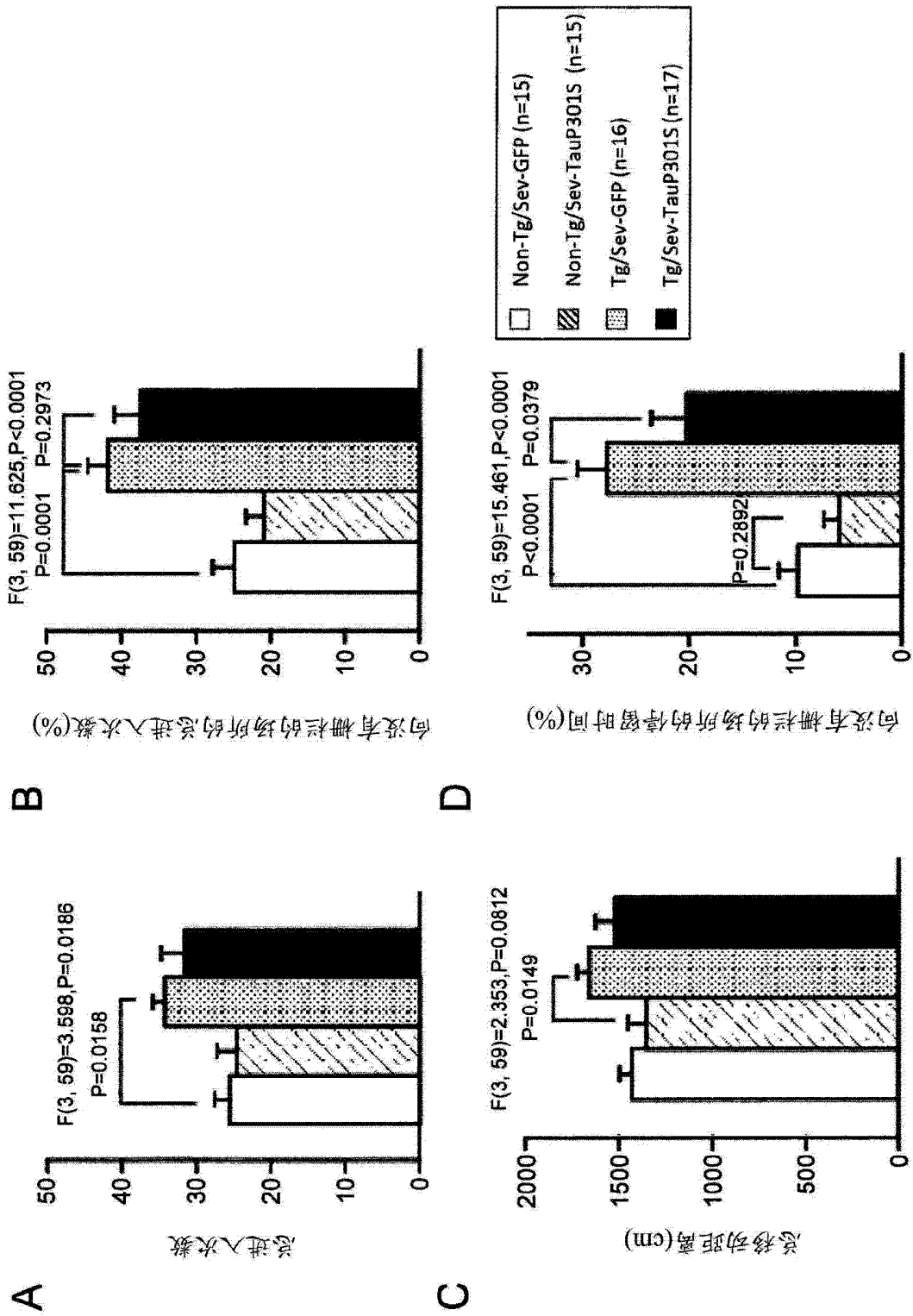


图 8

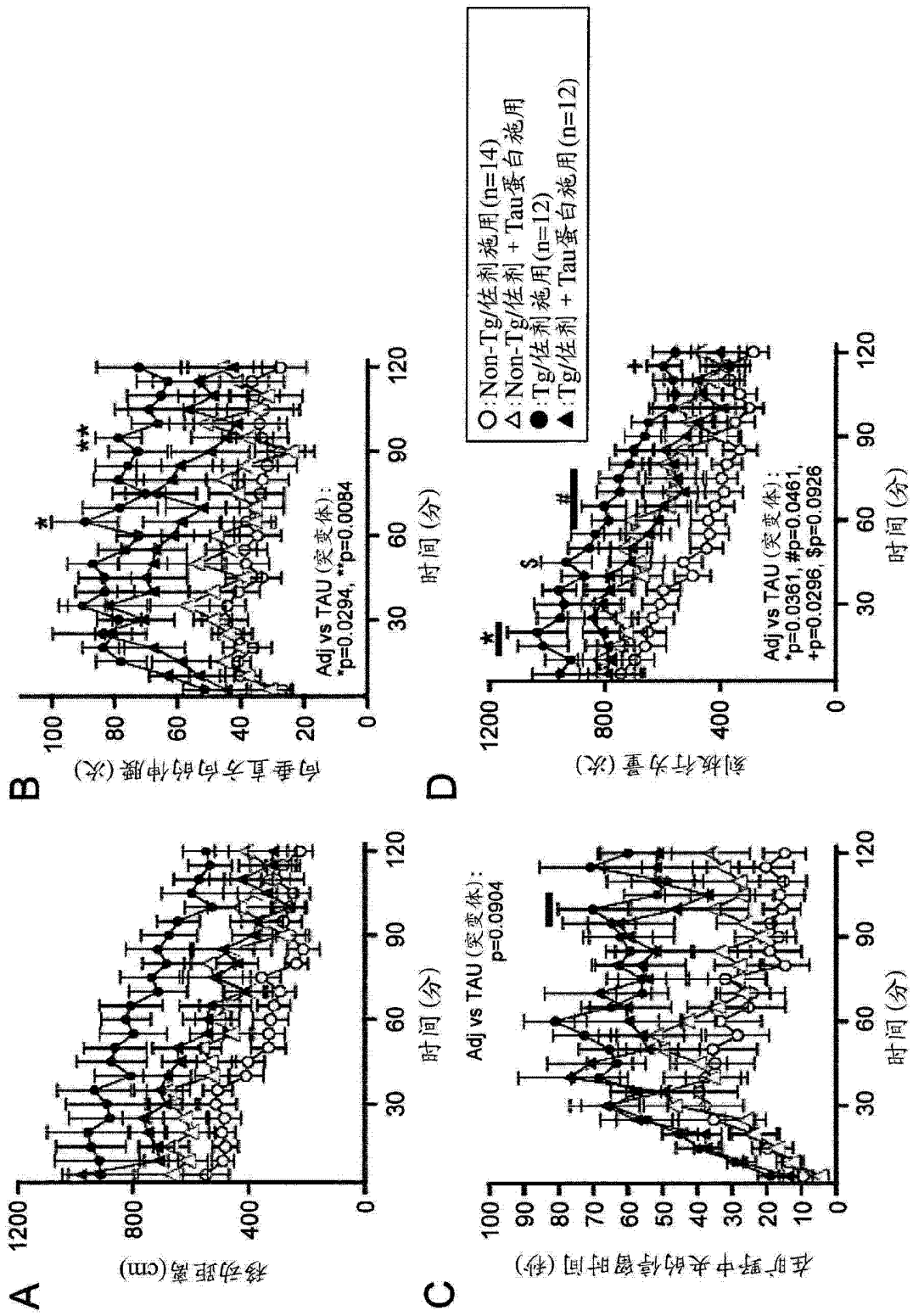


图 9

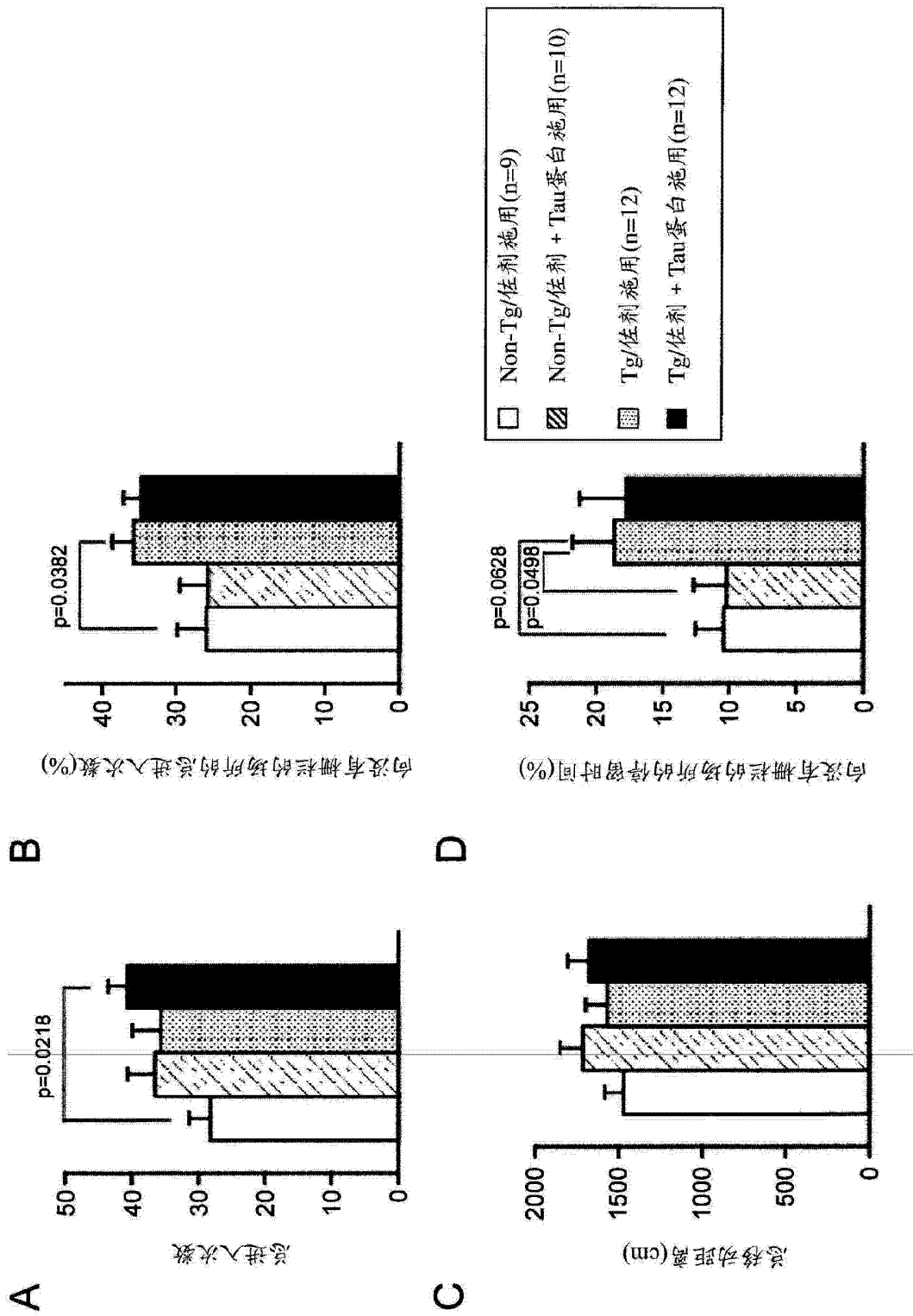


图 10

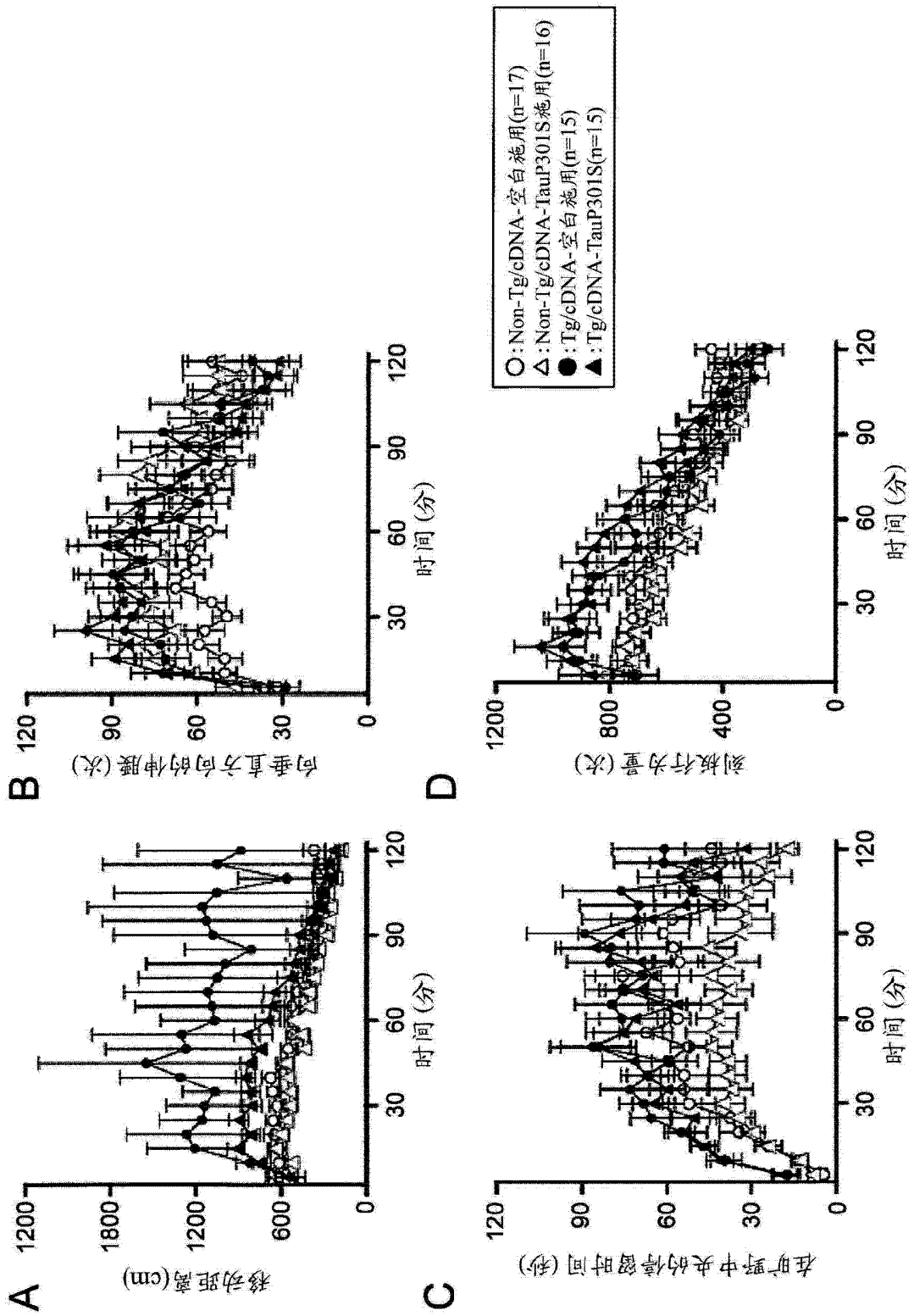


图 11

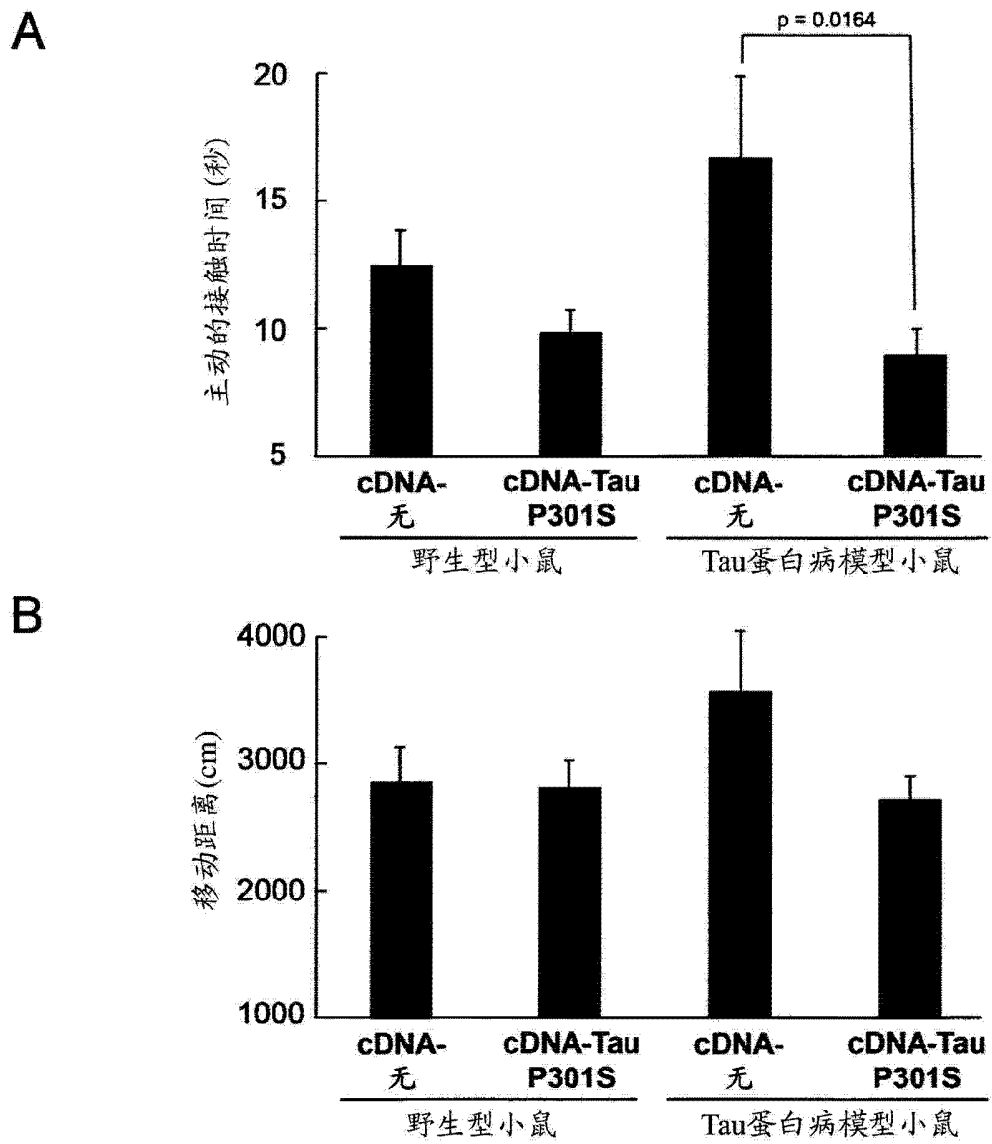
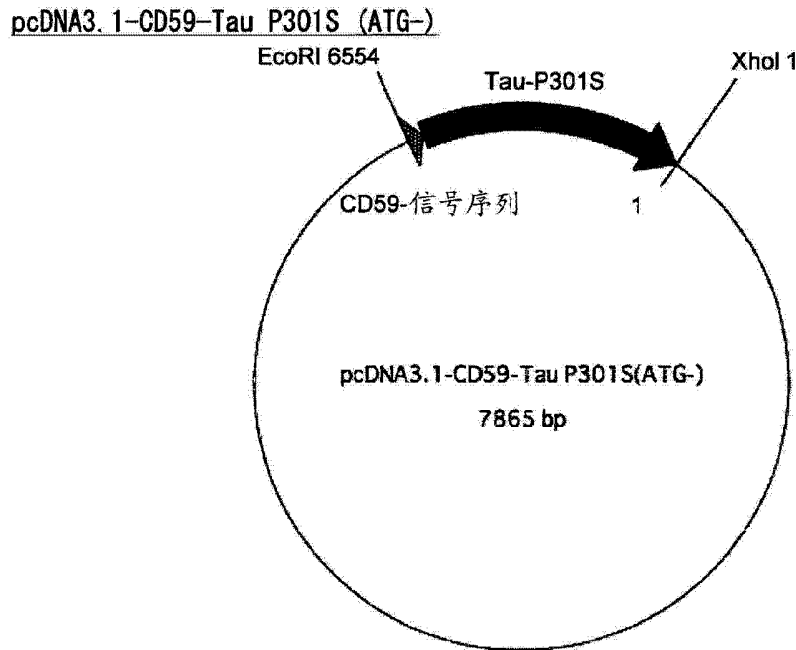


图 12



质粒名: pcDNA3.1-CD59-Tau P301S(ATG-)
 质粒大小: 7865 bp

EcoRI kozak →CD59 信号序列 (NT 009237.18)

gaattcggcaccATGGGAATCCAAGGAGGGTCTGTCTGTTCCGGGCTGCTGCTCGTCTGGCTGTCTTCTGC

→Tau P301S

CATT CAGGTCATAGCgctgagccccgccaggagttcgaagtgatggaagatcacgctggg
 acgtacgggttggggacaggaagatcaggggggctacaccatgcaccaagaccaagag
 ggtgacacggacgctggcctgaaagaatctcccctgcagacccccactgaggacggatct
 gaggaaccgggctctgaaacctctgatgctaagagcactccaacagcggagctgaagaa
 gcaggcattggagacacccccagcctggaagacgaagctgctggtcacgtgaccaagct
 cgcattggtcagtaaaagcaaaagacgggactggaagcagtgacaaaaagccaaggggct
 gatggtaaaacgaagatgccacaccggggagcagcccctccaggccagaaggccag
 gccaacgccaccaggattccagcaaaaacccgcccgtccaaagacaccaccagctct
 ggtgaacctccaaaatcaggggatgcagcggctacagcagccccggctccccaggcact
 cccggcagccgctcccgcaacccgctcccttccaaccccaccacccgggagccaagaag
 gtggcagtggtccgtactccaccaagtcgcccgtcttccgccaagagccgctgcagaca
 gcccccgtgccatgccagacctgaagaatgtcaagtccaagatcggtccactgagaac
 ctgaagcaccagccgggaggggaaggtgcagataattaataagaagctggatcttagc
 aacgtccagtcgaagtgtggctcaaaggataatatcaaacacgtcagtgaggcggcagt
 gtgcaaatagctcaaaaccagttgacctgagcaaggtgacctccaagtgtggctcatta
 ggcaacatccatcataaaccaggaggtggccaggtggaagtaaaatctgagaagcttgac
 tcaaggacagagtcagtcgaagattgggtccctggacaatatcaccacgtccctggc
 ggaggaaataaaaagattgaaaccacaagctgaccttccgagagaacgcaaagccaag
 acagaccacggggcggagatcgtgtacaagtcgcaagtggtgtctggggacacgtctcca
 cggcatctcagcaatgtctcctccaccggcagcatcgacatggttagactgccccagctc
 gccacgctagctgacgaggtgtctgcctccctggccaagcagggttgcga

终止

图 13

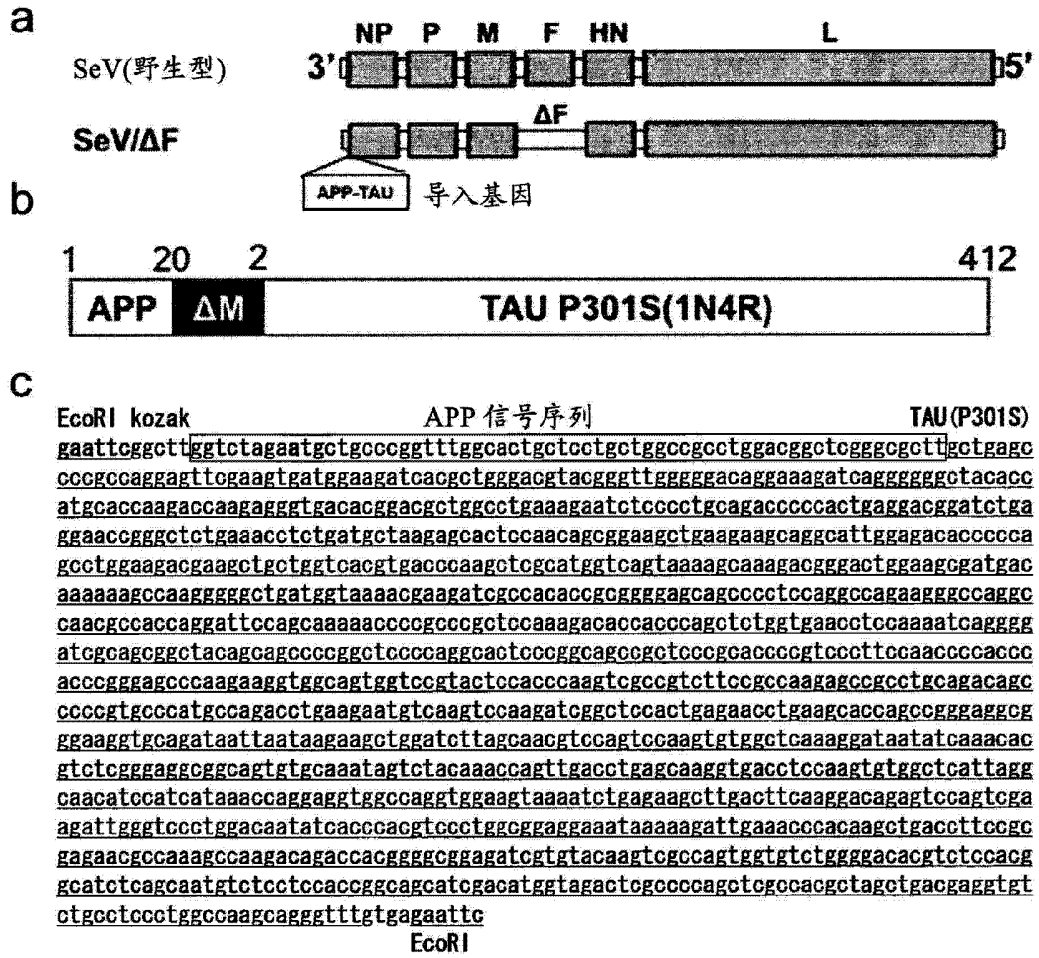


图 14

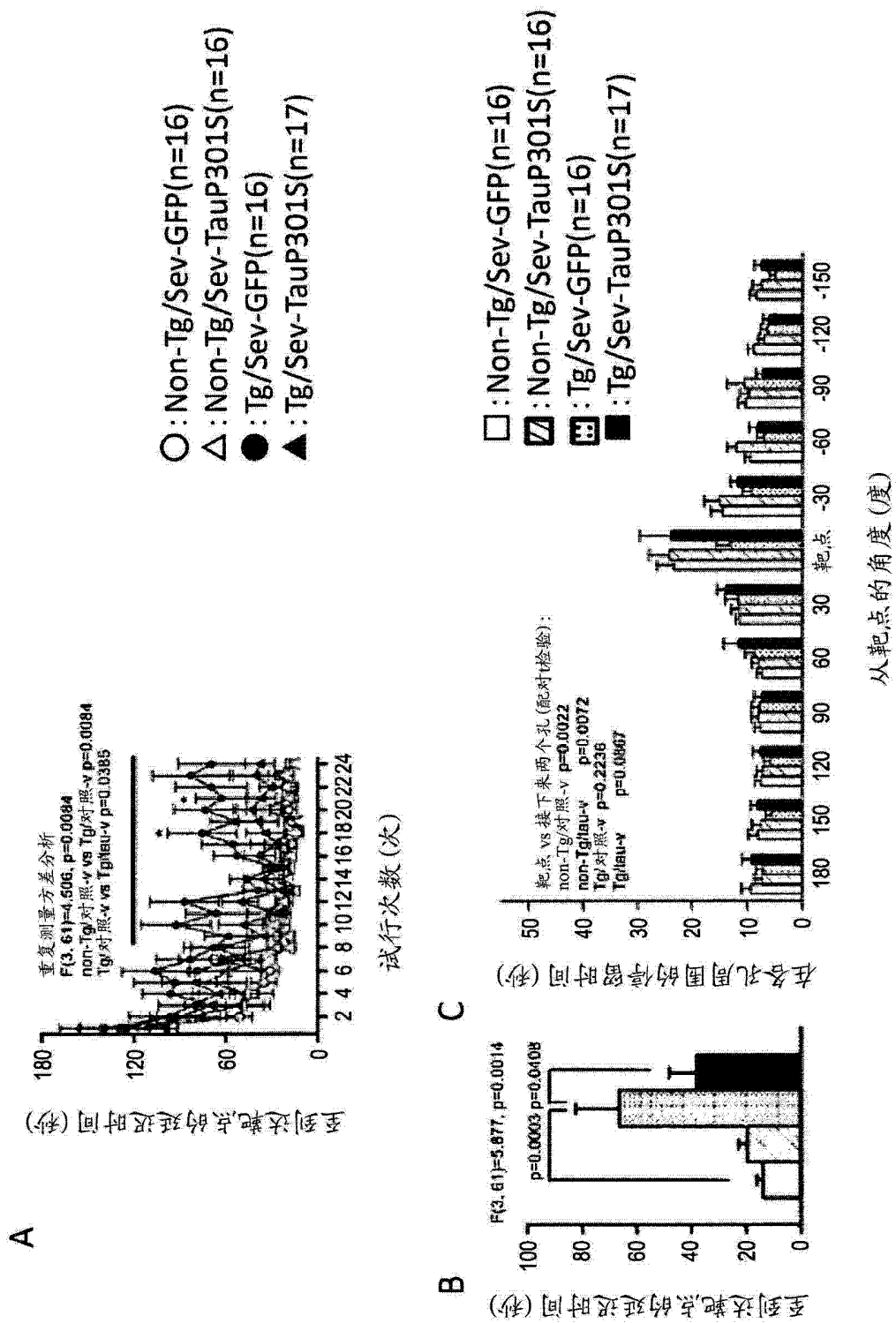


图 15

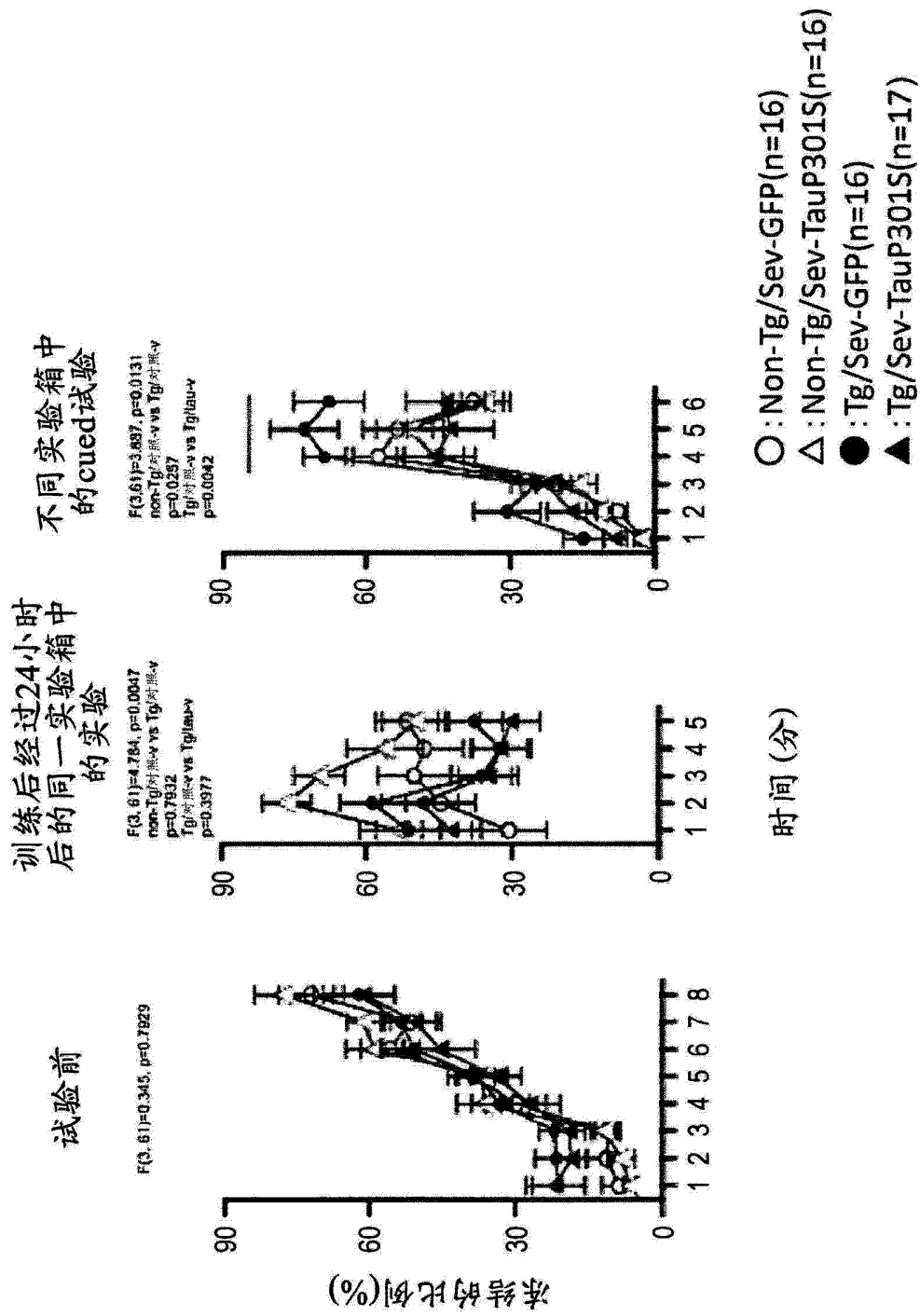


图 16

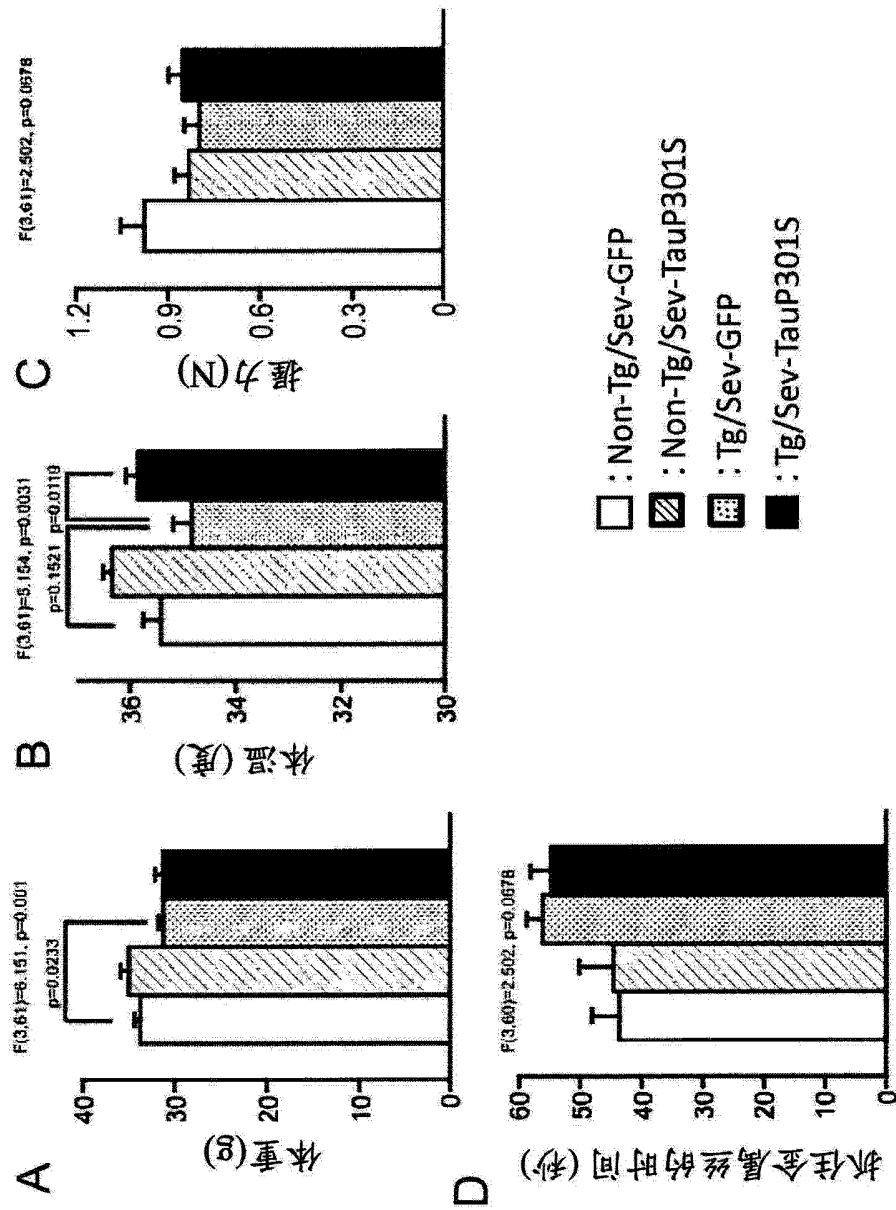


图 17

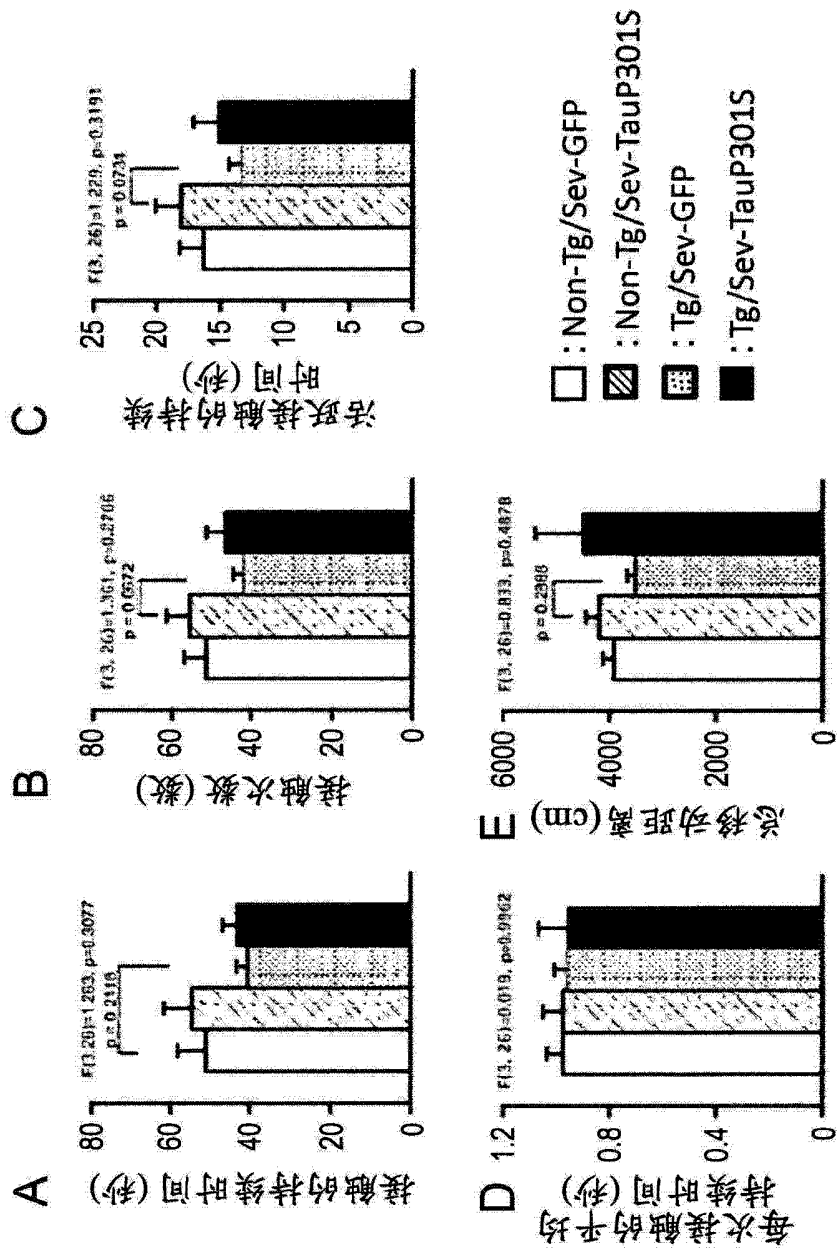


图 18

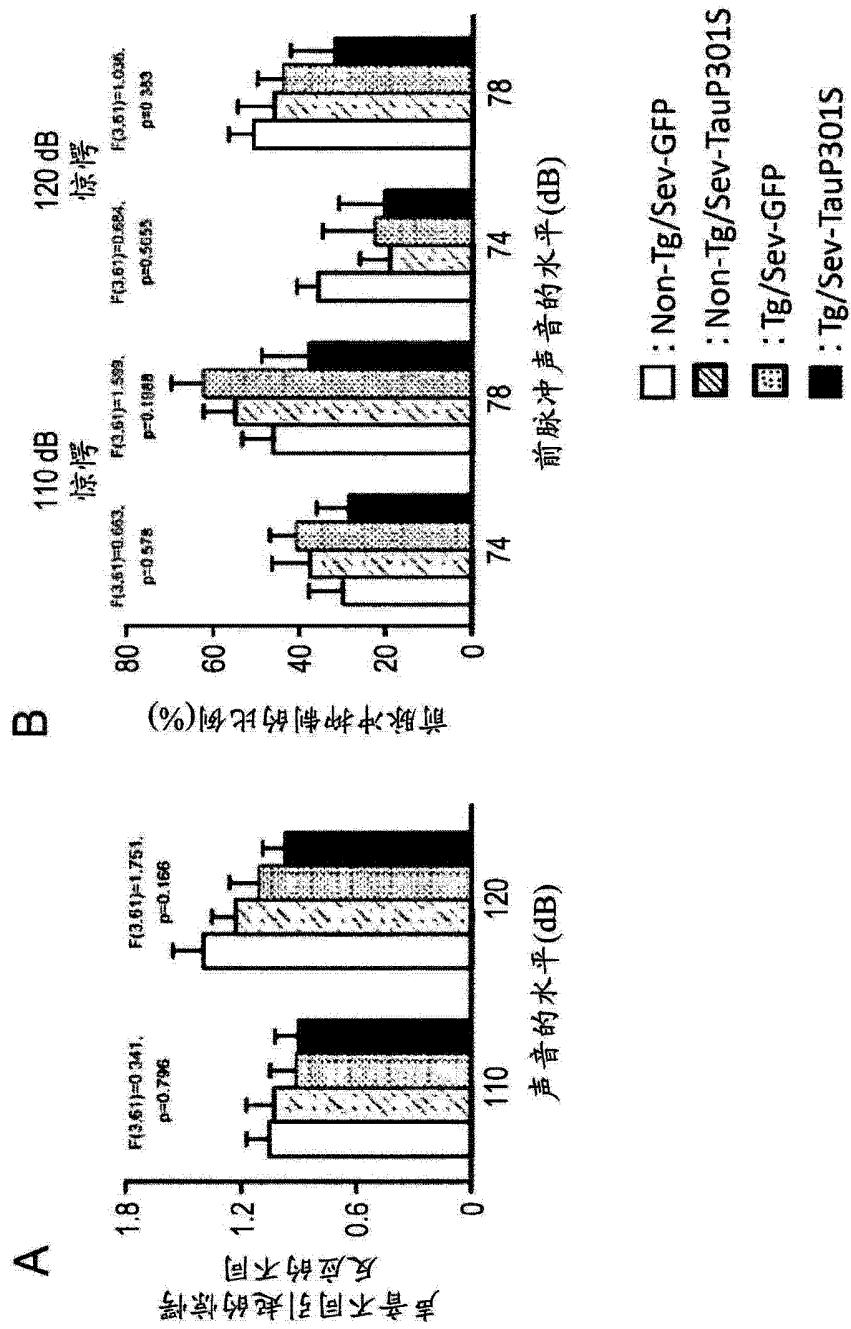


图 19

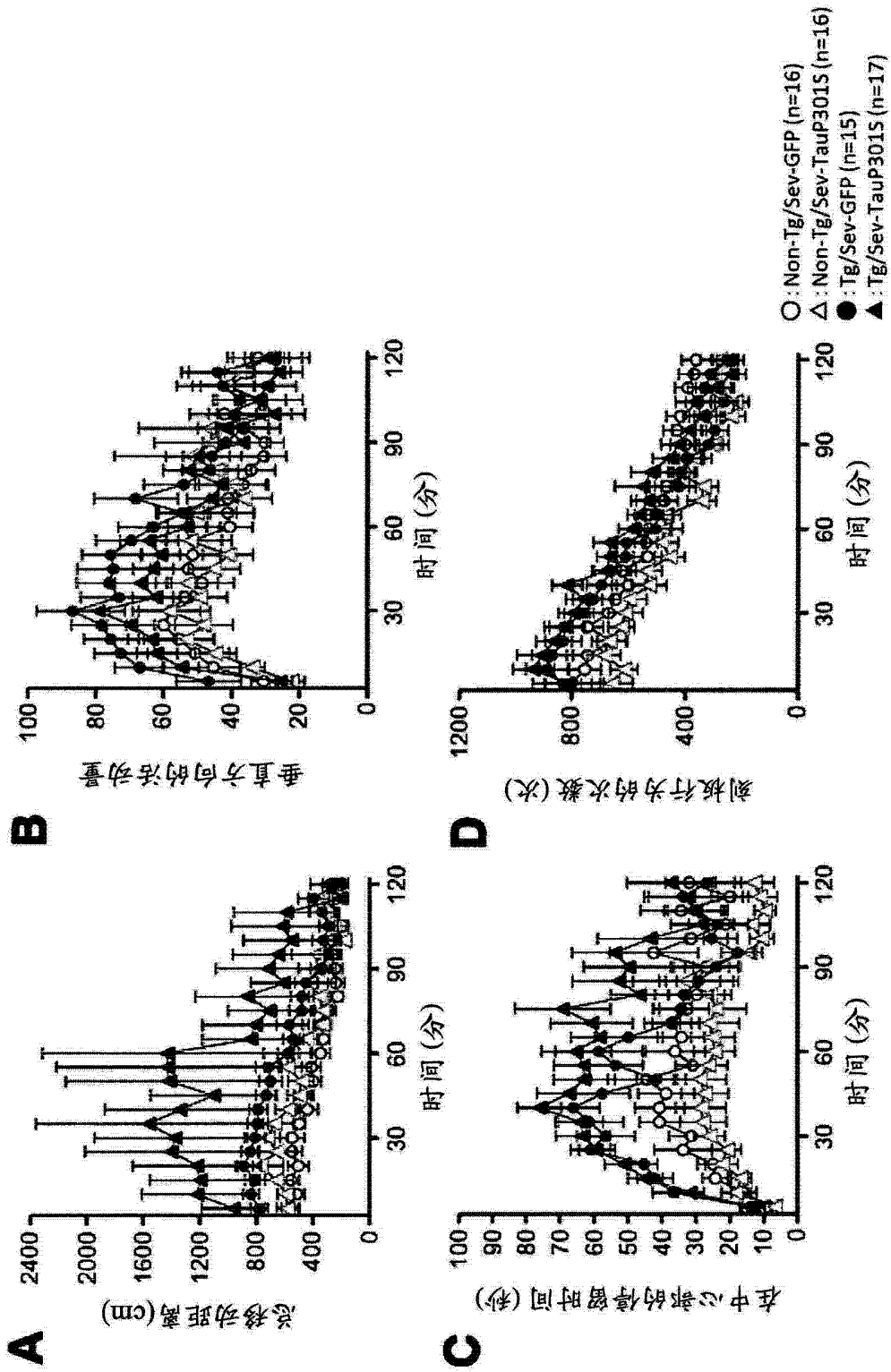


图 20

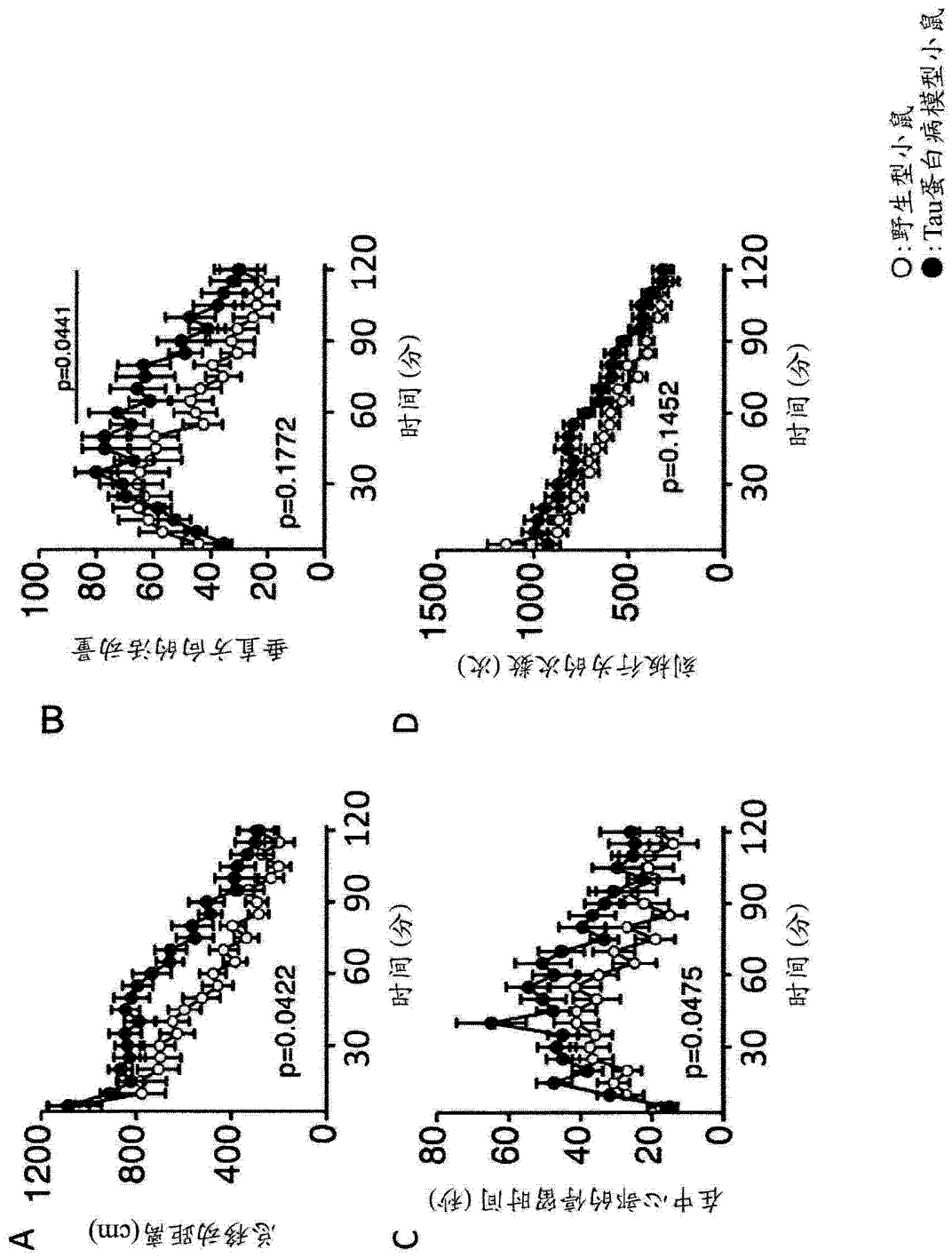


图 21

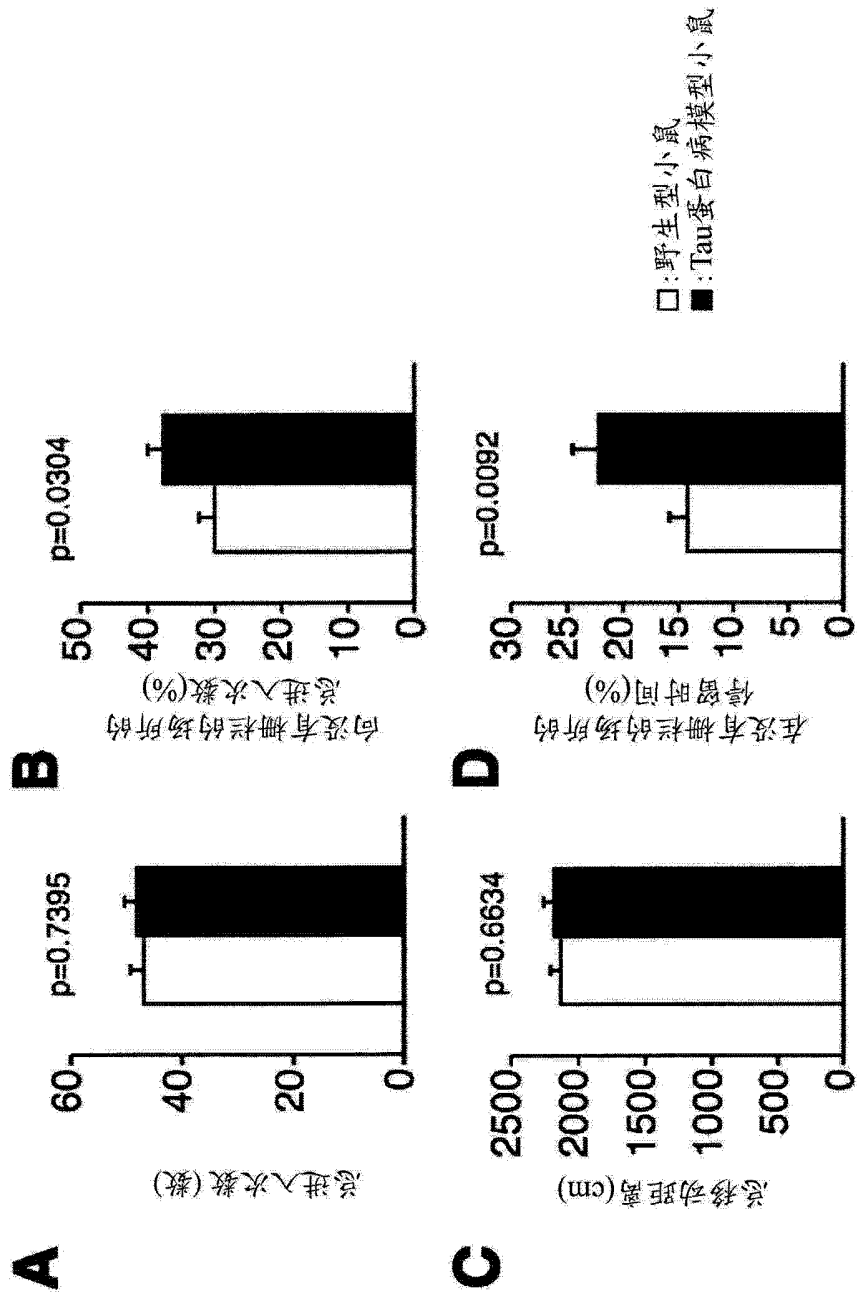


图 22

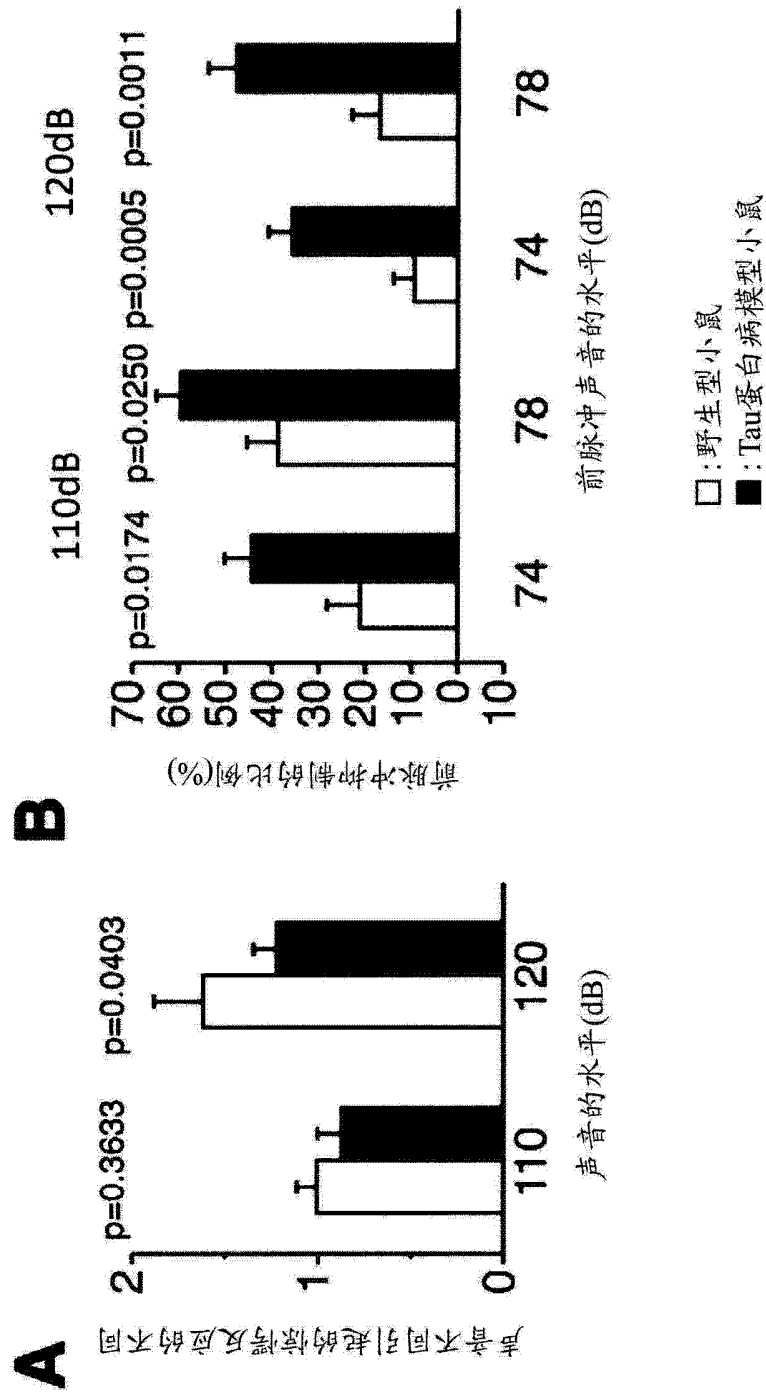


图 23

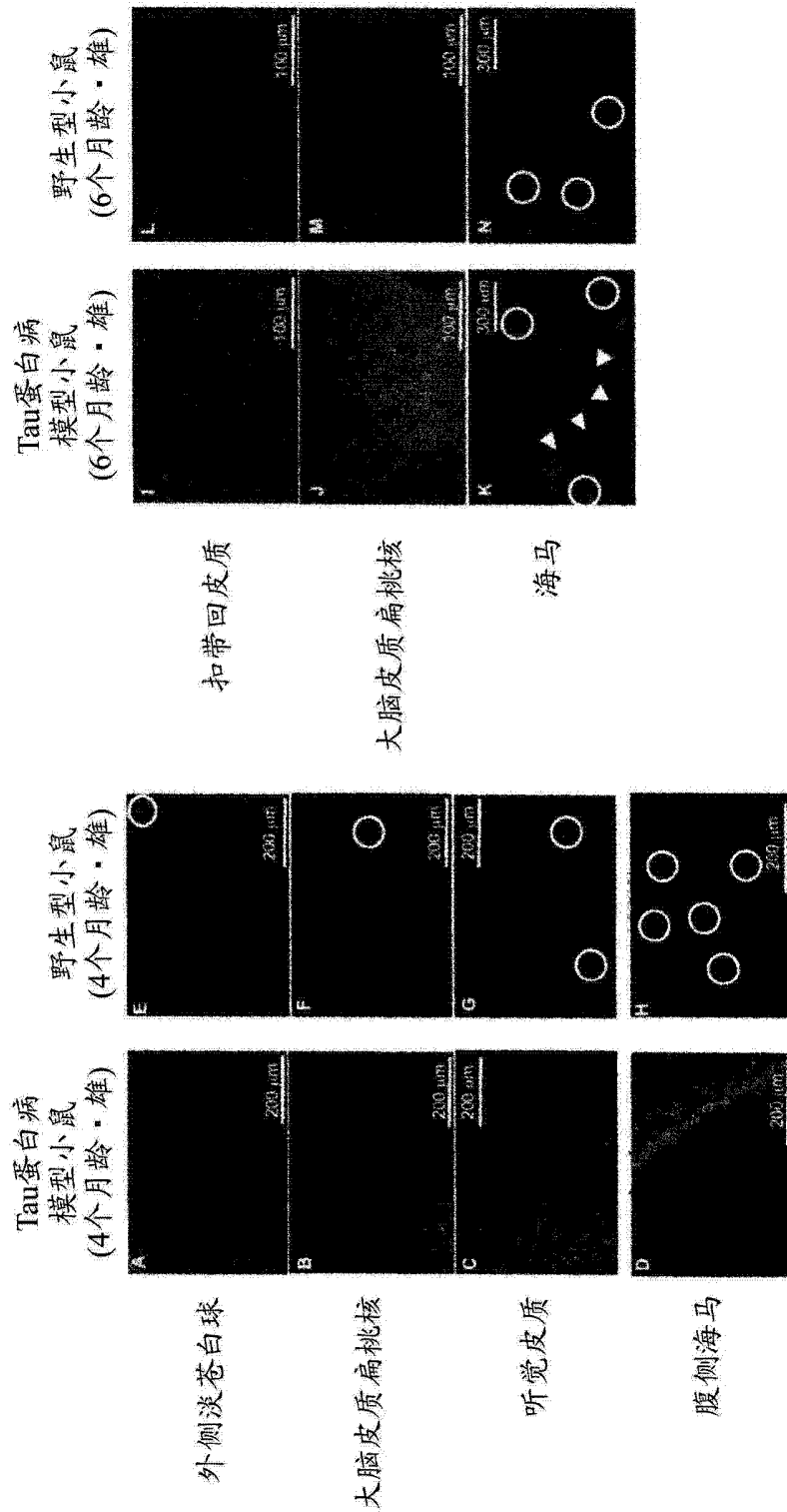


图 24

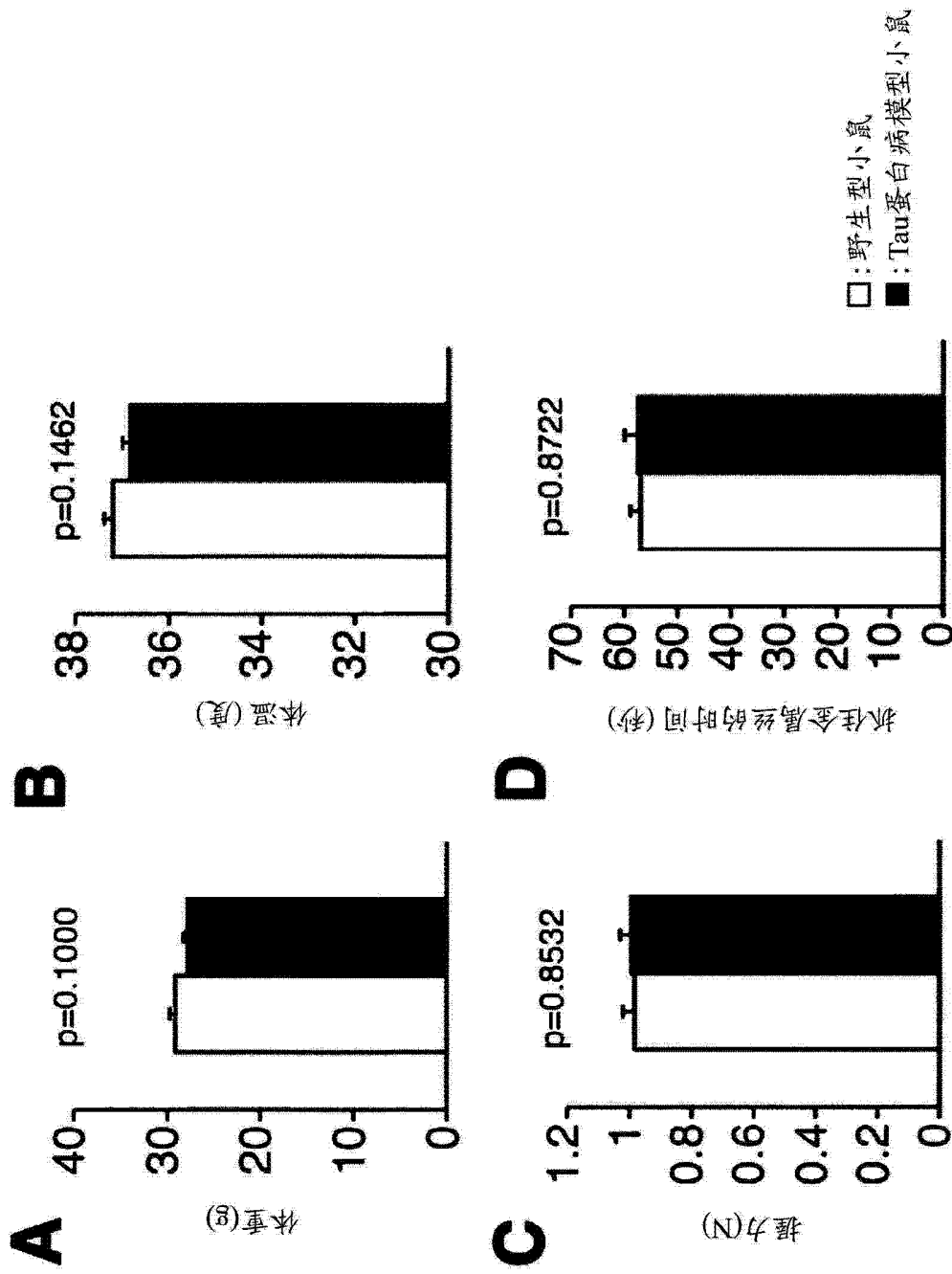


图 25

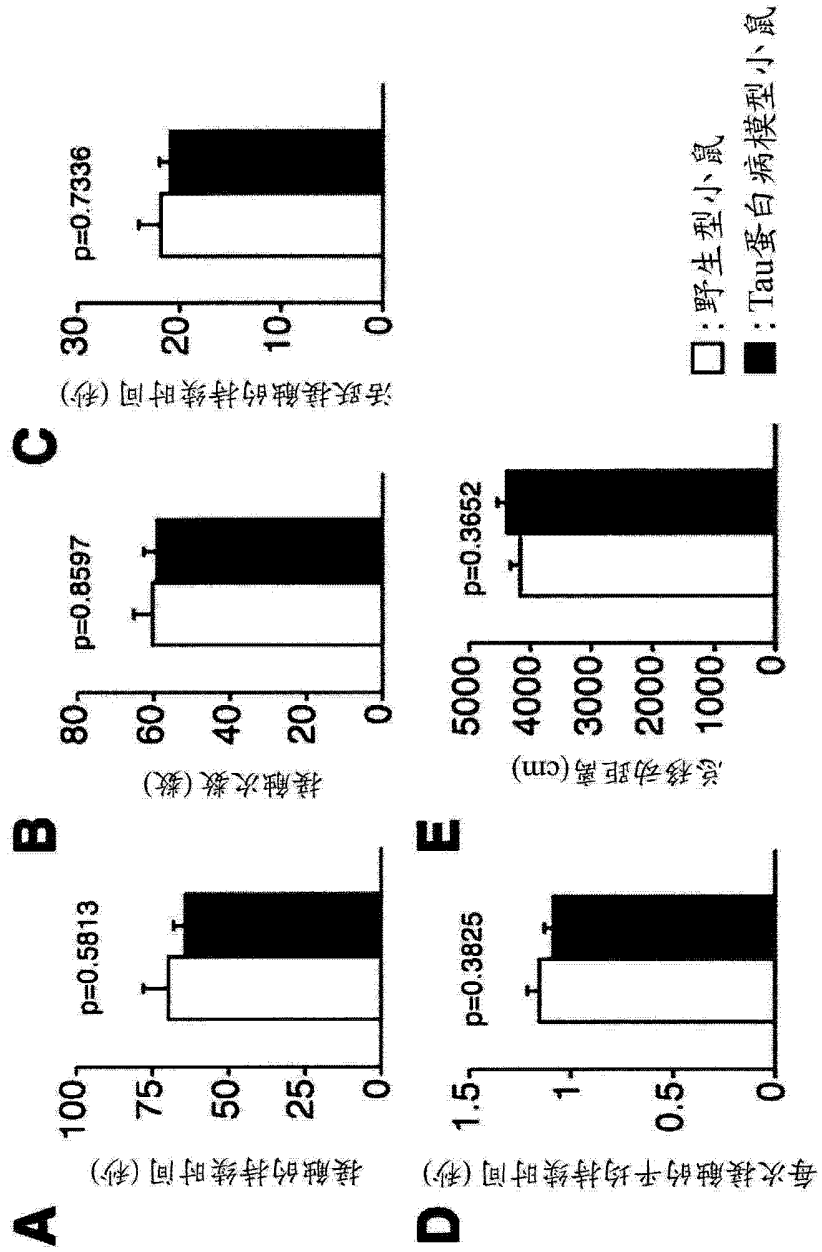


图 26

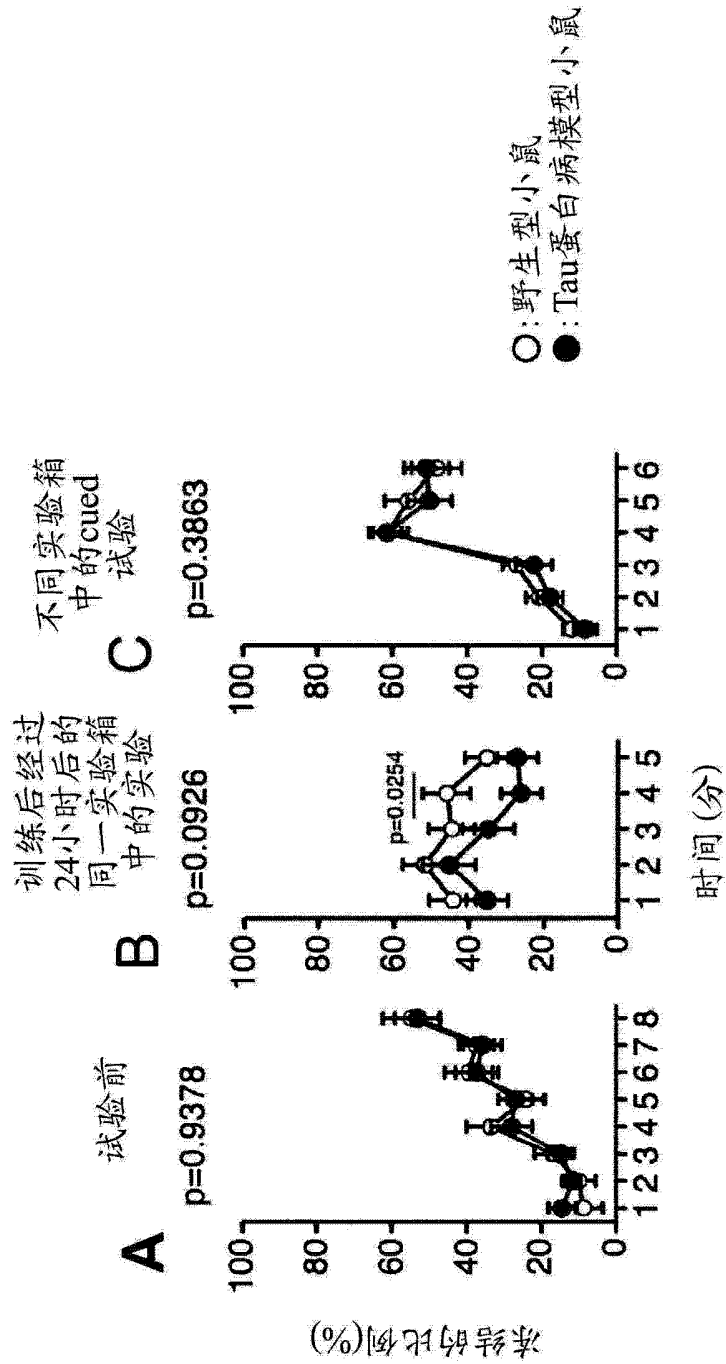


图 27

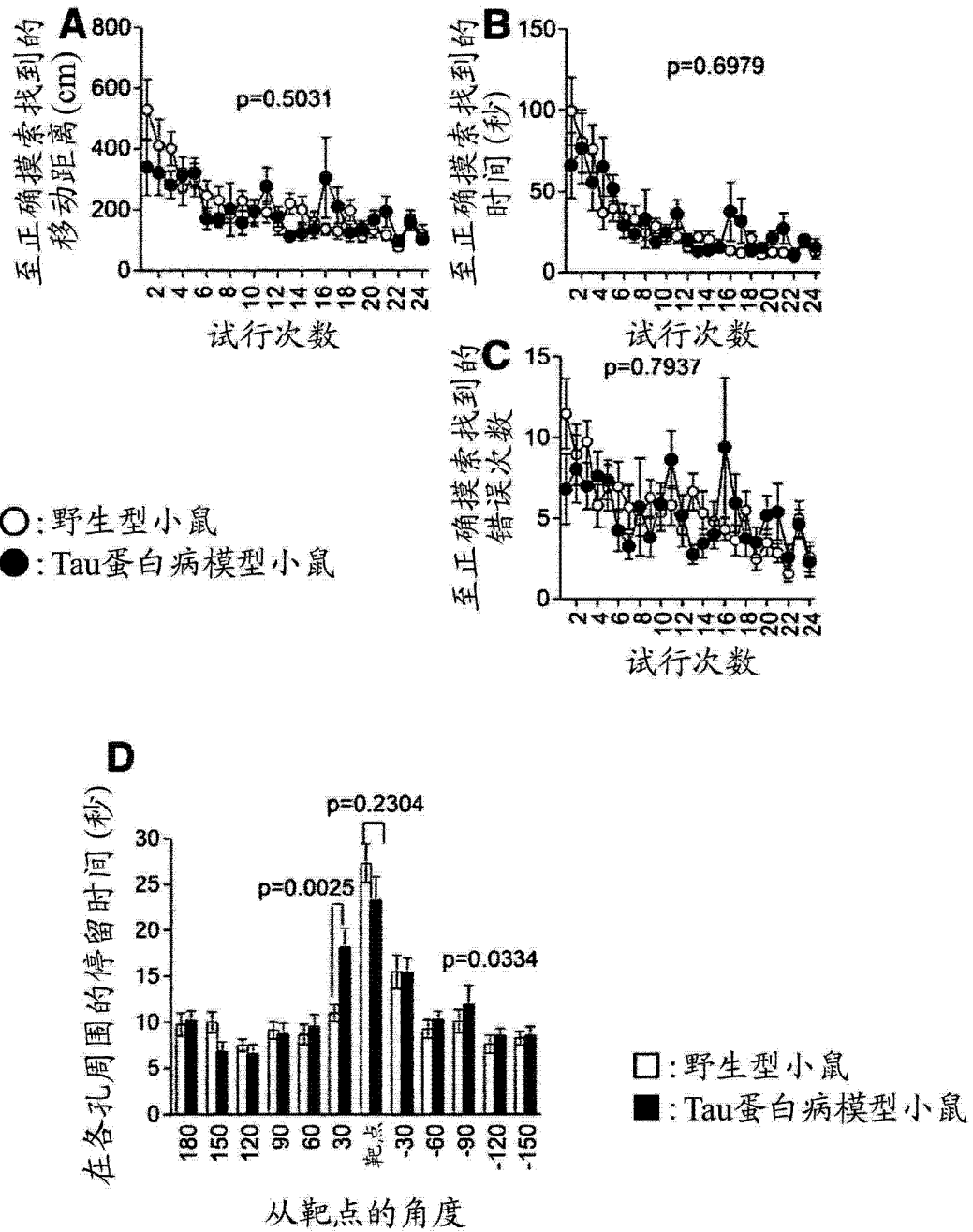


图 28