

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 39/00

A61K 39/385 A61K 39/39

G01N 33/68 A61K 39/395

A61K 48/00 A61P 25/28

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00808358.4

[43] 公开日 2002 年 10 月 30 日

[11] 公开号 CN 1377278A

[22] 申请日 2000.6.1 [21] 申请号 00808358.4

[30] 优先权

[32] 1999.6.1 [33] US [31] 60/137,010

[86] 国际申请 PCT/US00/15239 2000.6.1

[87] 国际公布 WO00/72876 英 2000.12.7

[85] 进入国家阶段日期 2001.11.30

[71] 申请人 神经实验室有限公司

地址 百慕大群岛史密斯

[72] 发明人 戴尔·B·申克

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 王维玉 丁业平

权利要求书 7 页 说明书 111 页 附图页数 16 页

[54] 发明名称 淀粉样变性疾病的预防和治疗

[57] 摘要

公开了预防或治疗一些淀粉样疾病,包括阿尔茨海默氏病、蛋白感染素家族性淀粉样神经病等的药物组合物和方法。该药物组合物包含免疫反应有效量的淀粉样原纤维组分,特别是原纤维形式的肽或蛋白质。此外公开了使用与这样的原纤维组分反应的免疫试剂的治疗组合物和方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种药物组合物，包含一种有效诱导针对患者淀粉样组分的免疫反应的药剂，和一种药用的赋形剂。
- 5  
2. 权利要求1的药物组合物，其中的淀粉样组分是原纤维肽或蛋白质。
- 10  
3. 权利要求2的药物组合物，其中淀粉样组分源于原纤维前体蛋白，该原纤维前体蛋白选自由血清淀粉样A蛋白( ApoSSA)，免疫球蛋白轻链、免疫球蛋白重链、ApoAI、运甲状腺素蛋白、溶菌酶、纤维根 $\alpha$ 链、凝溶胶蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白C、淀粉样 $\beta$ 蛋白质前体( $\beta$  - APP)、 $\beta_2$ 微球蛋白、蛋白感染素前体蛋白( PrP)、心钠素、角蛋白、胰岛淀粉样多肽、肽类激素和合成核素所组成的蛋白或肽的组中；包  
15  
括突变株蛋白质、蛋白质片段及其溶解蛋白肽。
- 20  
4. 权利要求3的药物组合物，其中所述的药剂诱导直接针对由所述的原纤维蛋白质或肽形成的与原纤维前体蛋白有关的新表位的免疫反应。
- 25  
5. 权利要求3的药物组合物，其中所述的淀粉样组分选自由AA，AL，ATTR，AapoAl，Alys，Agel，Acys，A $\beta$ ，AB<sub>2</sub>M，AScr，Acal，AIAPP和合成核素 - NAC片段组成的组中。
- 30  
6. 权利要求5的药物组合物，其中所述的药剂选自由AA，AL，ATTR，AapoAl，Agel，Acys，A $\beta$ ，AB<sub>2</sub>M，AScr，Acal，AIAPP和合成核素 - NAC片段组成的组中。
7. 权利要求1的药物组合物，其中所述的组合物包含一种有效诱导针对至少两种不同的淀粉样组分产生免疫性反应的药剂。

8. 权利要求1的药物组合物，其中所述的药剂是与载体蛋白连接的肽。

5 9. 权利要求1至8中任何一项的药物组合物，其中该组合物包括一种辅剂。

10. 权利要求9的药物组合物，其中所述的辅剂选自由QS21，单磷酸酯，明矾和弗氏佐剂组成的组中。

10

11. 一种预防或治疗哺乳动物患者以淀粉样沉淀为特征的疾病的方法，其中包括给患者有效量的药剂，使其针对所述疾病的淀粉样组分特征产生免疫反应。

15

12. 权利要求11的方法，其中所述的淀粉样组分是原纤维蛋白质或肽。

20

13. 权利要求12的方法，其中所述的免疫反应直接针对原纤维组分，该原纤维组分源于前体蛋白，该前体蛋白选自由血清淀粉样A蛋白(ApoSSA)、免疫球蛋白轻链、免疫球蛋白重链、ApoAI、运甲状腺素蛋白、溶菌酶、纤维根 $\alpha$ 链、凝溶胶蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白C、淀粉样 $\beta$ 蛋白质前体( $\beta$ -APP)、 $\beta_2$ 微球蛋白、蛋白感染素前体蛋白(PrP)、心钠素、角蛋白、胰岛淀粉样多肽、肽类激素和合成核素组成的组中；包括突变株蛋白质，蛋白质片段或其肽。

25

14. 权利要求13的方法，其中所述的药剂诱导直接针对与所述的前体蛋白有关的由所述的淀粉样组分形成的新表位。

30

15. 权利要求13的方法，其中所述的淀粉样组分选自由AA，AL，ATTR，ApoAI，Alysi，Agel，Acys，A $\beta$ ，AB<sub>2</sub>M，AScr，Acal，AIAPP

和合成核素 - NAC片段组成的组中。

5 16. 权利要求15的方法，其中所述的药剂选自由AA, AL, ATTR, AapoA1, Agel, Acys, A $\beta$ , AB2M, AScr, Acal, AIAPP和合成核素 - NAC片段组成的组中。

17. 权利要求11的方法，其中所述的药剂有效地诱导针对至少两种不同的淀粉样组分的免疫性反应。

10 18. 权利要求17的方法，其中所述的给药包括至少两种淀粉样原纤维组分的给药。

15 19. 权利要求11的方法，其中所述的药剂是与载体蛋白连接的肽。

20. 权利要求11 - 19中任何一项的方法，其中所述的给药还包括一种辅剂。

20 21. 权利要求20的方法，其中所述的辅剂选自QS21, 单磷脂, 明矾和弗氏佐剂。

22. 权利要求11的方法，其中所述的免疫学反应的特征为与所述的淀粉样组分有关的血清滴度至少为1:1000。

25 23. 权利要求22的方法，其中所述的与原纤维组分有关的血清滴度至少为1:5000。

30 24. 权利要求11的方法，其中所述的免疫学反应的特征为相应的血清免疫活性量比在预处理对照血清样品中测量的血清免疫活性的水平高约四倍。

25. 权利要求24的方法，其中所述的免疫活性的血清量在约1:100的血清稀释物中测量。

5           26. 一种确定经淀粉样疾病治疗的患者预后的方法，包括测量患者针对选择的淀粉样组分的血清免疫活性量，其中当患者的血清免疫活性量至少为血清免疫活性的基准对照水平的四倍时，表示与所述疾病有关的预后状态得到改善。

10           27. 权利要求26的方法，其中所述的患者针对上述选择的淀粉样组分的免疫活性的血清量的特征为血清滴度至少为约1:1000。

28. 权利要求27的方法，其中所述的患者针对上述选择的淀粉样组分的血清免疫活性量的特征为血清滴度至少为1:5000。

15           29. 一种预防或治疗以患者淀粉样沉淀为特征的疾病的方法，包括给予所述的患者有效剂量的特异地与存在于上述的沉淀上的淀粉样组分结合的抗体或抗体片段。

20           30. 权利要求29的方法，其中所述的淀粉样组分是原纤维组分。

31. 权利要求30的方法，其中所述的抗体或抗体片段与上述的原纤维组分的表位结合。

25           32. 权利要求31的方法，其中抗体或抗体片段特别地与上述的原纤维组分结合，而不与上述的原纤维组分的前体结合。

30           33. 权利要求30的方法，其中抗体是人类对所述原纤维组分产生的抗体，上述的原纤维组分由来自用原纤维组分表位免疫的人类B细胞制备。

34. 权利要求30的方法，其中所述的淀粉样原纤维组分源于前体蛋白，该前体蛋白选自由血清淀粉样A蛋白(ApoSSA)、免疫球蛋白轻链、免疫球蛋白重链、ApoAI、运甲状腺素蛋白、溶菌酶、纤维根 $\alpha$ 链、凝溶胶蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白C、淀粉样 $\beta$ 蛋白质前体( $\beta$ -APP)、 $\beta_2$ 微球蛋白、蛋白感染素前体蛋白(PrP)、心钠素、角蛋白、胰岛淀粉样多肽、肽类激素和合成核素组成的组中；包括突变株蛋白质、蛋白质片段或其肽。

35. 权利要求34的方法，其中所述的淀粉样原纤维组分选自由AA, AL, ATTR, AapoAI, Alys, Agel, Acys, A $\beta$ , AB<sub>2</sub>M, AScr, Acal, AIAPP和合成核素 - NAC片段组成的组中。

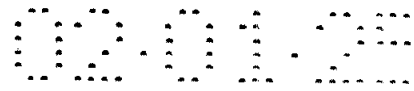
36. 权利要求29的方法，其中所述的给药包括至少结合两种淀粉样原纤维组分的抗体给药。

37. 权利要求29的方法，其中所述的有效剂量的特征为患者体中针对所述的淀粉样组分的血清免疫活性量水平比在预处理对照血清样品中测量的针对所述组分的血清免疫活性水平至少高约四倍。

38. 权利要求29的方法，其中抗体或抗体片段与载体一起作为药物组合物给药。

39. 权利要求29的方法，其中抗体或抗体片段通过腹膜下，口服，皮下，肌内注射，鼻腔内，局部或静脉内给药。

40. 权利要求29的方法，其中通过给用编码至少一种抗体链的多核苷酸将抗体给药到患者，其中表达多核苷酸以在患者体内产生抗体链。



41. 权利要求40的方法，其中多核苷酸编码抗体的重链和轻链，多核苷酸被表达以在患者体内产生重链和轻链。

5 42. 权利要求29的方法，其中抗体或抗体片段在至少六个月内多剂量给药。

43. 权利要求29的方法，其中抗体以持续释放组合物形式给药。

10 44. 一种预防或治疗以患者淀粉样沉淀为特征的疾病的药物组合物，该组合物含有有效剂量的特异地与存在于所述的沉淀上的淀粉样组分结合的抗体或抗体片段。

15 45. 权利要求44的药物组合物，其中所述的淀粉样组分是原纤维组分。

46. 权利要求45的药物组合物，其中所述的抗体与所说的原纤维组分的表位结合。

20 47. 权利要求46的药物组合物，其中抗体特异地与所说的原纤维组分结合，而不与所说的原纤维组分的前体结合。

25 48. 权利要求46的药物组合物，其中抗体是人类对所述原纤维产生的抗体，所说的原纤维组分由来自用原纤维组分表位免疫的人类B细胞制备。

30 49. 权利要求45的药物组合物，其中所述的淀粉样原纤维组分源于一种前体蛋白，该前体蛋白选自由血清淀粉样A蛋白(ApoSSA)、免疫球蛋白轻链、免疫球蛋白重链、ApoAI、运甲状腺素蛋白、溶菌酶、纤维根 $\alpha$ 链、凝溶胶蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白C、淀粉样 $\beta$ 蛋白质前体( $\beta$ -APP)、 $\beta_2$ 微球蛋白、蛋白感染素前体蛋白(PrP)、心钠素、

角蛋白、胰岛淀粉样多肽、肽类激素和合成核素所组成的组中；包括突变株蛋白质、蛋白质片段或其肽。

50. 权利要求49的药物组合物，其中所述的淀粉样原纤维组分选自AA, AL, ATTR, AapoA1, Alys, Agel, Acys, A $\beta$ , AB<sub>2</sub>M, AScr, Acal, AIAPP和合成核素 - NAC片段。

51. 权利要求44的药物组合物，其中所述的组合物包括结合至少两种淀粉样原纤维组分的抗体或抗体片段。

52. 权利要求44的药物组合物，其中所述的有效剂量的特征为在患者体内有效产生针对所述的淀粉样组分的血清免疫活性的水平的抗体或抗体片段的量，该血清水平比在预处理的对照血清样品中测量的针对所述组分的血清免疫活性水平至少高约四倍。

53. 权利要求44的药物组合物，其中该药物组合物包括一种载体。

54. 权利要求44的药物组合物，其中药物组合物配制适于通过腹膜下，口服，皮下，肌内注射，鼻腔内，局部或静脉内给药。

55. 权利要求44的药物组合物，其中该药物组合物包括有效表达患者的抗体链的编码至少一根抗体链的多核苷酸。

56. 权利要求55的药物组合物，其中多核苷酸编码所述抗体的重链和轻链，该多核苷酸能表达在患者体内产生重链和轻链。

57. 权利要求 44 的药物，其中所述的药物组合物以持续释放组合物的形式配制。

# 说明书

## 淀粉样变性疾病的预防和治疗

5           本申请要求的优先权为1999年6月1日提出的美国临时申请  
60/137,010，因此该申请全部合入本申请中。

### 发明领域

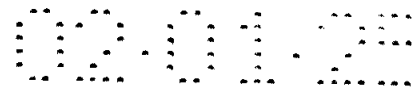
10           本发明涉及人及其他哺乳类脊椎动物淀粉样变性疾病的治疗方法和  
和组合物。

### 发明背景

15           淀粉样变性是描述一些可以局部或全身地出现的蛋白质原纤维细胞  
外沉淀，形成许多的“淀粉样沉淀”的疾病通用术语。这些沉淀的  
原纤维组分为各种形式的淀粉样疾病的识别特征。例如，以主要由 $\beta$   
淀粉样蛋白肽( $\beta$ -AP)原纤维组成的脑内和脑血管的沉淀为特征的阿  
尔茨海默氏病(家族性和偶尔发生的)，以胰岛淀粉样蛋白质肽(IAPP;  
20           糊精)为特征的与II型糖尿病有关的胰岛细胞淀粉样蛋白沉淀中的原纤维，  
和由于长期的血液透析治疗形成的以 $\beta$ 2-微球蛋白为主要组分的  
淀粉样蛋白沉淀。新近，与蛋白感染素有关的疾病，例如克雅氏病  
(Creutzfeld - Jacob)，也被认为是淀粉样蛋白疾病。

25           主要根据淀粉样变性病是否与原发性系统疾病有关，将各种形式  
的疾病分类。因此，某些疾病被认为是原发性淀粉样变性，先前存在  
或共存的疾病中并无证据。通常，原发性淀粉样变性疾病的特征为存在  
“轻链型淀粉样蛋白”(AL型)蛋白质原纤维，因此将AL原纤维 N-  
末端区的同源性称为免疫球蛋白轻链的可变的片段( $\kappa$  或 $\lambda$ )。

30           二级或“反应性”淀粉样变性的特征为源自血清淀粉样蛋白质  
A(ApoSSA)的AA型原纤维沉淀。这些淀粉样变性形式的特征为原发

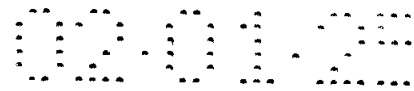


性慢性炎症或传染病状(例如, 风湿性关节炎, 骨髓炎, 肺结核, 麻疯病)。

5 家族遗传性的淀粉样变性可能与 ATTR 运甲状腺素蛋白型的神经性的、肾的或心血管的沉淀有关。其他的家族遗传性的淀粉样变性包括其他的综合症, 并可能具有不同的淀粉样组分(例如, 以 AA 原纤维为特征的家族性的地中海热)。其他形式的淀粉样变性包括出现于离体器官的、以病灶的, 通常为肿块样沉淀为特征的局部形式。Other 淀粉样变性与年龄有关, 通常以在心或脑形成蚀斑为特征。淀粉样沉淀通常也与长期的血液透析有关。这些及其他形式的淀粉样蛋白病概括于表 1 ( Tan, S.Y.和 Pepys, (Histopathology, 25:403-414, 1994; Harrison 的 Harrison's Handbook of Internal Medicine, 第十三版, Isselbacher, K. J.等, 编著, McGraw - Hill, San Francisco, 1995)。

10

表1 淀粉样疾病分类			
淀粉样蛋白肽	蛋白前体	蛋白变体	临床病症
AA	血清淀粉样蛋白 A(ApoSSA)		反应性(二级)淀粉样变性: 家族性的地中海热、伴随荨麻疹和耳聋的家族性淀粉样肾病(Muckle-Wells综合症)
AA	血清淀粉样蛋白 A(ApoSSA)		与全身炎症有关的反应性系统淀粉样变性
AL	单克隆免疫球蛋白轻链( $\kappa$ , $\lambda$ )	AK, A, (例如, AKIII)	自发性(原发性)淀粉样变性: 与骨髓瘤或巨球蛋白血症有关的; 与免疫细胞体液不调有关的系统淀粉样变性;
			单克隆丙球蛋白病; 隐性体液不调; 与慢性炎症疾病有关的局部结节性淀粉样变性
AH	IgG(I( $\gamma$ 1))	A $\gamma$ 1	与个别免疫细胞体液不调有关的重链淀粉样变性



ATTR	运甲状腺素蛋白	至少30个已知点突变	家族淀粉样多发性神经病(如, Met30, 葡萄牙)
ATTR	运甲状腺素蛋白	如, Met 111	家族淀粉样心肌症(丹麦)
ATTR	运甲状腺素蛋白	野生型TTR或Ile122	系统老年淀粉样变性
AapoAI	AopAI	Arg26	家族淀粉样多发性神经病
Agel	凝溶胶蛋白	Asn187	家族淀粉样变性(芬兰)
Acys	抑半胱氨酸蛋白酶蛋白	Gln68	伴有淀粉样变性的遗传性脑出血(冰岛)
A $\beta$	淀粉样 $\beta$ 蛋白前体	多种: Gln618,	阿尔茨海默氏病; 唐氏综合症; 遗传性脑出血淀粉样变性(荷兰); 突发性大脑淀粉样血管病; 包含体肌炎
AB <sub>2</sub> M	$\beta_2$ 微球蛋白		与慢性血液透析有关的淀粉样变性
Acal	(前)降血钙素	(前)降血钙素	甲状腺髓样癌
AANF	心钠素		病灶性老年淀粉样变性: 隔离的前房淀粉样变性
A $\beta$ SVEP <sup>a</sup> AB <sub>2</sub> M	$\beta$ -淀粉样前体蛋白 $\beta_2$ 微球蛋白		脑 精囊 前列腺
	角蛋白		原发性局部皮肤淀粉样病(斑点, 丘疹)
PrP	蛋白感染素前体蛋白(33-35kDa细胞形式)	痒病蛋白27-30 k Da	突发性克雅氏病 库鲁病(传染性海绵状脑病, 蛋白感染素疾病)
AIAPP	胰岛淀粉样多肽		胰岛II型糖尿病胰岛瘤
肽激素片段	例如, 前降血钙素		与APUDomas有关的外分泌淀粉样变性

<sup>a</sup>精囊腺外分泌蛋白质

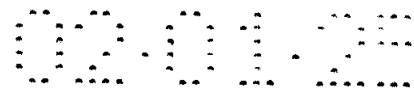
通常, 形成大部分淀粉样沉淀的原纤维源自于一种或多种初级前体蛋白质或肽, 通常与硫酸盐化氨基葡聚糖有关。另外, 如下文详述, 淀粉样沉淀可以包括各种型式的较小的蛋白质和肽, 以及其他组分, 例如含蛋白多糖, 神经节苷脂和其他糖。

5 目前，对于任何淀粉样疾病没有特效的、直接针对淀粉样疾病的治疗。对于原发疾病或相关的疾病状态，治疗是通过治疗原发疾病从而减少淀粉样变性蛋白质的产生。例如，用抗生素治疗肺结核，从而减少微生物负荷，导致炎症的减少和相关的SSA蛋白质的减少。对于由多发性骨髓瘤引起的AL淀粉样变性，化疗有助于病人减少浆细胞，降低骨髓瘤免疫球蛋白水平。随该水平下降，可以清除AL淀粉样变性。共同拥有的1998年11月30日提出的美国专利申请USSN 09/201,430和10 1999年5月28日提出的USSN 09/322,289显示通过给用产生或给予直接针对 $\beta$ 淀粉样变性肽(A $\beta$ )及其片段的药剂，可以大大地减少(和预防)与阿尔茨海默氏病有关的淀粉样血小板负荷。本发明发现诱导针对各种淀粉样血小板组分的免疫反应可有效地治疗广谱淀粉样疾病。

#### 发明概述

15 本发明涉及用于治疗多种淀粉样疾病的药物组合物和方法。本发明一个方面包括一种药物组合物，其中包括活性成分，即有效地诱导病人的针对淀粉样的成分的免疫反应的药剂。这样的组合物通常也包括赋形剂，在最优方案中可以包括辅剂。在进一步优选的方案中，辅剂包括，例如，氢氧化铝，磷酸铝，MPL™，QS-21( Stimulon™)或弗氏不完全佐剂。按照有关的实施方案，药物组合物可以包括有效诱导病人针对超过一种的淀粉样成分的免疫反应的药剂。

25 在有关的实施方案中，药剂有效地产生直接针对原纤维肽或蛋白质淀粉样成分的免疫反应。优选这样的原纤维肽或蛋白质源自于如本文所描述的，已知与某些形式的淀粉样疾病有关的原纤维前体蛋白。这样的前体蛋白质包括，但不局限于血清淀粉样A蛋白质(ApoSSA)、免疫球蛋白轻链、免疫球蛋白重链、ApoAI、运甲状腺素蛋白、溶菌酶、纤维根(fibrogen) $\alpha$ 链、凝溶胶蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白C、淀粉样 $\beta$ 蛋白质前体( $\beta$ -APP)、 $\beta_2$ 微球蛋白、蛋白感染素前体蛋白(PrP)、心钠素、角蛋白、胰岛淀粉样多肽、肽类激素和合成核素



(synuclein)。这样的前体也包括突变株蛋白质、蛋白质片段和这样的前体的溶解蛋白肽。在一个优选方案中，药剂有效地诱导直接针对由有关原纤维前体蛋白的原纤维蛋白质或肽形成的新的表位的免疫反应。即，如本申请更详细的描述，许多形成原纤维的肽或蛋白质是如上述的这样的前体蛋白质的片段。当例如通过溶解蛋白分裂形成这样的片段时，表位可能显示不存在该前体，因此当片段是前体蛋白的一部分时，表位对免疫系统不具有免疫可用性。针对这样的表位的药剂可能是优选的治疗剂，因为它们诱导病人的自身免疫反应的可能性更小。

10

按照有关实施方案，本发明药物组合物包括针对淀粉样组分的药剂，这些组分例如选自，但不限于下列原纤维肽或蛋白质:AA、AL、ATTR、ApoA1、Alys、Agel、Acys、A $\beta$ 、AB<sub>2</sub>M、Ascr、Acal、AIAPP和合成核素-NAC片段。这些肽的全称和组成描述于此。如本申请所述，这样的肽可按照本领域众所周知的方法制备。

15

按照另一个有关的实施方案，在这样的药物组合物中包含的药剂也包括某些硫酸盐化含蛋白多糖。在一个有关的实施方案中，该含蛋白多糖是硫酸肝素氨基多糖，优选基底膜聚糖、硫酸皮肤素、软骨素-4-硫酸酯或戊聚糖多硫酸酯。

20

按照另一个有关方面，本发明包括预防或治疗哺乳动物患者的淀粉样的沉淀病症的方法。按照本发明的该方面，对患者给用有效量的药剂，使其产生针对患者患有的以淀粉样的病症为特征的淀粉样组分的免疫反应。本质上来讲，该方法包括给用包含如上所述的对上述病症特效的致免疫的淀粉样组分的药物组合物。这样的方法的另外的特征是有效地诱导患者的致免疫反应。按照一个优选方案，该方法产生有效的免疫学反应，该反应的特征是相对于致免疫药剂直接针对的淀粉样组分的血清滴定度至少为1:1000。在另一优选方案中，对于原纤维成分的最小血清滴定度为1:5000。按照一个有关实施方案，免疫反

30



应的特征为免疫活性血清的量比在预处理对照血清样品中测量的免疫活性的血清水平高四倍。后面的特征特别适于通过ELISA技术测量血清免疫活性，但是它也可适用于任何相对的或绝对的血清免疫活性的测量。按照优选方案，在血清稀释约1:100时测量免疫活性。

5

按照另一个有关方面，本发明包括确定正在进行淀粉样病症治疗的患者预后的方法。此时，测量针对以选定的病症为特征的淀粉样组分的病人免疫活性的血清量，并且病人血清的免疫活性至少为血清免疫活性的基线对照水平的4倍，说明与特定淀粉样病症相关的预后状态得到改善。按照优选方案，针对存在于患者血清中的选定的淀粉样的成分的免疫活性的量的特征为关于淀粉样的成分具有至少约1:1000，或至少1:5000的血清滴定度。

按照另外的有关方面，本发明也包括用于预防或治疗淀粉样的疾病的所谓的“被动免疫”方法和药物组合物。按照本发明的这个方面，对病人给用有效剂量的与选择的淀粉样的成分特异结合的抗体，优选存在于作为被治疗疾病特征的淀粉样沉淀中的原纤维成分。通常，选择这样的抗体是因为它们具有特异结合本申请前述的药物组合物和方法中描述的各种的蛋白质、肽和组分的能力。按照有关实施方案，这样的方法和组合物可以包括结合至少两个淀粉样的原纤维组分的抗体的组合。通常，给用药物组合物可使针对目标淀粉样成分的血清免疫活性量比针对对照血清样品中测量的血清免疫活性水平高至少约四倍。如本申请所述，给用抗体时可能同时使用载体。通常，按照本发明的这个方面，这样的抗体可通过腹膜、口服、鼻腔内、皮下、肌内、局部或静脉内给药(或为给药将抗体制成制剂)，但是可以通过任何药

15

20

25

学上有效的途径(即，如上述及此处所述，可有效地产生明显的治疗水平)给药或制成制剂。

按照有关实施方案，治疗抗体可能通过给用一种编码至少一个抗体链的多核苷酸进行给药。按照本发明的这个方面，在患者体内该表

30

达多核苷酸以在患者体内产生药学上有效量的抗体链。这样的多核苷酸可以编码抗体的重链和轻链，从而在患者体内产生重链和轻链。

5 按照优选方案，上面描述的免疫疗法可以包括按照本领域已知方法，或按照患者需要，根据免疫学的反应评定以多剂量给用包括抗体在内的药剂，例如6月以上的周期，例如首次免疫一定间隔后例如6星期间隔加强注射。选择性地，或另外这样的疗法可以包括使用“持续释放”制剂，如本领域已知的那些。

10 当结合附图阅读下列本发明的详细说明时，更容易理解本发明的这些及其他目的和特征。

#### 附图的简要描述

图1:用A $\beta$ -42注射后转基因小鼠的抗体滴定度。

15 图2:海马体中的淀粉样蛋白的负荷。通过脑切片免疫活性的计算机辅助定量图像分析测定淀粉样的斑点占据海马体面积的百分比，由与A $\beta$ -1特异的单克隆抗体3D6的反应性定义。个体小鼠的数值显示为按处理组排序。各组水平线表示分布的中值。

20 图3:海马体中的神经炎性营养不良。通过免疫活性脑切片的计算机辅助定量图像分析测定营养不良的轴突占据海马体面积的百分比，由与人体APP特异的单克隆8ES的反应性定义。个体小鼠的数值显示为AN1792处理组和PBS处理控制组。各组水平线表示分布的中值。

25 图4:脾后皮层中的星形细胞增生。通过免疫活性脑切片定量计算机辅助图像分析测定神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)阳性星形细胞占据皮层面积的百分比。通过处理组排序方式显示个体小鼠的值，水平线表示中间组值。

图5:用包括0.14, 0.4, 1.2, 3.7, 11, 33, 100或300  $\mu$ g的八种剂量的A $\beta$  42(“AN1792”)免疫后的A $\beta$  42几何平均抗体滴定度。

30 图6:AN1792免疫的抗体反应动力学。滴定度用每组6只动物的几何平均值来表示。

图7:用PBS和用AN1792处理过的小鼠的皮层淀粉样蛋白负荷的定量图像分析。

图8:用PBS和用AN1792处理过的小鼠的神经炎斑点负荷的定量图像分析。

5 图9:用PBS和用AN1792处理过的小鼠星形细胞增生占据脾后皮层百分比的定量图像分析。

图10: 用AN 1792处理过(上组)或用PBS处理过(下组)的小鼠的脾细胞淋巴细胞增生试验。

10 图11:大脑皮质总的A $\beta$ 水平。使用同弗氏佐剂相结合的A $\beta$ 或APP衍生物对小鼠进行免疫作用的个体A $\beta$ 轮廓分布图。

图12:通过使用A $\beta$ 肽共轭物A $\beta$  1-5、A $\beta$  1-12和A $\beta$  13-28使小鼠免疫的免疫活性脑切片的定量图像分析测定的皮层淀粉样的负荷；全长A $\beta$ 集合A $\beta$  42(“AN1792”)和A $\beta$  1-40(“AN1528”)和PBS处理对照组。

15 图13:用同弗氏佐剂相结合的A $\beta$ 或APP衍生物免疫的小鼠组的A $\beta$ 特异抗体的几何平均数滴定度。

图14:用同各种辅剂相结合的AN1792或其棕榈酰基化衍生物免疫作用的豚鼠组的A $\beta$ 特异性抗体的几何平均数滴定度。

20 图15(A-E):用含不同辅剂的AN或AN1528处理的12个月大的PDAPP小鼠的皮层A $\beta$ 水平。

图16:用A $\beta$ 的多克隆抗体处理的小鼠的平均滴定度。

图17:用A $\beta$ 的单克隆抗体10d5处理的小鼠的平均滴定度。

图18:用A $\beta$ 的单克隆抗体2F12处理的小鼠的平均滴定度。

25 发明的详细说明

#### A.定义

除非另有说明，本申请使用的全部术语具有与本发明领域技术人员已知的相同的含义。专业人员可具体参照 Sambrook 等的 Molecular Cloning (1989): A Laboratory Manual (第二版), Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 和 Ausubel, F.M. 等的 Current Protocols in

30

Molecular Biology(1998), John Wiley & Sons, New York, NY中生物化学和分子生物学领域已知的定义、术语和标准方法。当然本发明不局限于特别描述的方法、规定和试剂，因为它们可以变化而产生相同的结果。

5

术语“辅剂”指当与抗原一起给药时，会增加抗原的免疫反应，但是当其单独施用时不产生抗原免疫反应的化合物。辅剂可以通过若干机制包括补充淋巴细胞，刺激B和/或T细胞，以及刺激巨噬细胞增加免疫反应。

10

“淀粉样蛋白病”或“淀粉样变性”指症状或部分症状为淀粉样的斑点病理学累积或形成的所有病症。

15

“淀粉样的斑点”是主要由蛋白质的原纤维组成的细胞外的沉淀。通常，原纤维由占优势的蛋白质或肽组成；但是如本申请描述，斑点可能也包括另外的肽或非肽分子组分。

20

“淀粉样组分”是存在于淀粉样的斑点中的任何分子实体，包括此种分子的抗原部分。淀粉样组分包括但是不局限于蛋白质、肽、蛋白聚糖和碳水化合物。“特定的淀粉样的组分”指主要地或仅在所述的淀粉样的斑点中发现的分子实体。

25

“药剂”是合成的或生物学来源的化学分子。在本发明中，药剂通常为可被用于药物组合物的分子。

30

“抗淀粉样变性的药剂”是通过主动或被动免疫技术给药时，能够针对脊椎动物患者淀粉样的斑点组分产生免疫反应的药剂。

术语“多核苷酸”和“核酸”在本申请可互换使用，指具有可支撑基底的主链的聚合分子，该基底可通过氢键键合到典型的多核苷酸



5 上，该聚合物主链具有这样的基底，它在某种意义上允许可以一系列特殊方式在聚合的分子和典型的多核苷酸(例如，单链DNA)之间建立氢键。代表性的这样的基底为次黄嘌呤核苷、腺苷、鸟嘌呤核苷、胞嘧啶、尿嘧啶和胸苷。聚合的分子包括双链和单链RNA和DNA及其主链修饰，例如，磷酸甲酯连接。

本申请使用的术语“多肽”指由通过肽键连接的单链氨基酸残基组成的化合物。术语“蛋白质”可以与术语“多肽”同义或可以指两个或更多多肽的复合体。

10

术语“肽”也指由通过肽键连接的氨基酸残基组成的化合物。通常肽由100或更少氨基酸组成，而多肽或蛋白质具有100个以上的氨基酸。本申请使用的术语“蛋白质片段”也可以指肽。

15

“原纤维肽”或“原纤维蛋白质”指单体的或集合形式的蛋白质或肽，它们形成存在于淀粉样的斑点中的原纤维。本申请提供这样的肽和蛋白质的例子。

20

“药物组合物”指适于对哺乳动物个体给药的化学的或生物学的组合物。这样的组合物可以为通过一个或多个途径给药而制成特殊的制剂，该途径包括但并非限于口服、肠胃外、静脉内、动脉内、皮下、鼻腔内、舌下、脊柱内，大脑室内等等。

25

“药物赋形剂”或“药学上可接受的赋形剂”是一种载体，通常是液体，在其中配制活性治疗剂。在制剂中赋形剂通常不提供任何药理学的活性，可是它可以提供化学和/或生物学的稳定性、释放特性等等。制剂的例子可以从，例如，《雷氏药物科学》(Remington 's Pharmaceutical Sciences)，第19版，Grennaro，A著，1995中找到。

30

“糖蛋白”是在其上可共价地连接至少一个碳水化合物链(寡糖/

多糖)的蛋白质。

“含蛋白多糖”是其中至少一个碳水化合物链是氨基多糖的糖蛋白，该氨基多糖为重复二糖的长线型聚合物，其中一个通常是糖酸(糖醛酸)，另一个是氨基糖。

术语“免疫学的”或“免疫的”或“致免疫的”反应指脊椎动物个体中针对抗原的体液的(抗体介导的)和/或细胞的(通过抗原特异的T细胞或它们的分泌产品介导的)反应。这样的反应可以通过给用免疫原诱导的主动反应，或通过给用抗体或预处理的T细胞诱导的被动反应。通过与Class I或Class II MEC分子相联系的多肽表位的表达激活抗原特异的CD4<sup>+</sup>T辅助细胞和/或CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞诱导细胞的免疫反应。该反应也可包括活化单核细胞、巨噬细胞、NK细胞、嗜碱细胞、树状细胞、星形细胞、小神经胶质细胞、嗜酸性粒细胞或其他先天免疫的组分。通过本领域已知的标准增殖试验(CD4<sup>+</sup>T细胞)或CTL(细胞毒性T细胞)试验可以测定细胞介导的免疫反应的存在。体液反应和细胞反应对免疫原的保护或治疗的效果的相对贡献可以通过分别地离析同种同基因的动物的免疫球蛋白(IgG)和T细胞片断，并测量第二名患者的保护或治疗效果来辨别。

20

“免疫药剂”或“免疫原”或“抗原”是对患者给药后能诱导针对它本身的免疫学反应的分子，既可与辅剂同时使用，也可无辅剂时使用。这样的分子包括，例如，与载体蛋白如钥孔血蓝素、Cd3或破伤风毒素共轭的淀粉样的原纤维肽或片段。

25

“表位”或“抗原决定区”指与抗体的抗原结合区域结合的抗原部分。

术语“Aβ”，“Aβ肽”和“淀粉样的β”肽是同义的，指一种或多种源自如本申请描述的β淀粉样的前体蛋白(βAPP)约38-43氨基

30

酸的肽组合物。“A $\beta$  xx”指淀粉样的 $\beta$ 肽1-xx，其中xx是显示肽中氨基酸数目的数字；例如A $\beta$  42与A $\beta$  1-42相同，在本申请中也相当于“AN1792”，A $\beta$  40与A $\beta$  1-40相同，在本申请中也相当于“AN1578”。

5                    解聚的或单体的A $\beta$ 指可溶解的、A $\beta$ 的单体肽单位。一种制备单体A $\beta$ 的方法是使用超声处理将冻干的肽溶解在纯的DMSO中。将所得溶液离心除去不溶性颗粒。聚集的A $\beta$ 是其中单体的单位通过非共价键结合在一起的低聚物。

10                    术语“裸多核苷酸”指没有与胶态物质复合的多核苷酸。裸多核苷酸有时在质粒载体中克隆。

术语“患者”包括接受预防或治疗的人及其他哺乳动物患者。

15                    术语“显著不同的”，“统计上显著的”，“显著地高(或低)”和类似的字句指数据或其它测量值之间的比较，其中两个比较的个体或组的差异对于有训练的观测者显著地或相当不同，或统计上显著(如果本短语包括术语“统计上地”或如果有一些统计试验的指标，例如p-值或通过本领域已知的标准统计检验分析时，数据产生统计的差  
20                    异)。

“包括”一种或多种叙述要素的组合物或方法可以包括其他的不特定叙述的要素。例如，包括原纤维成分肽的组合物也包括离析肽和作为较大的多肽序列的组分的肽。还例如包括要素A和B的组合物也包  
25                    括由A，B和C组成的组合物。

## B.淀粉样的疾病

### 1.综述和发病机理

淀粉样的疾病或淀粉样变性包括一些具有各式各样的外在症状的疾病状态。这些病症都具有蛋白质原纤维的反常细胞外沉淀，称为“淀  
30

粉样沉淀”或“淀粉样斑点”，它们的直径通常约10-100 μ m，位于特定的器官或组织区域。这样的斑点主要由天然的可溶解的蛋白质或肽组成。这些不溶的沉淀通常由直径为大约10-15nm的原纤维侧向聚集体组成。当用刚果红染料着色时，淀粉样原纤维在偏振光下产生特有的苹果绿双折射。如下所述，根据形成斑点沉淀的主要原纤维组分将病症分类。

形成斑点沉淀的肽或蛋白质经常由较大的前体蛋白产生。更具体地说，淀粉样的原纤维沉淀的发病机理通常包括“反常的”前体蛋白溶解蛋白分裂成片段。这些片段通常聚集变成逆平行β折叠片；可是，在家族性淀粉样多发性神经病(变体运甲状腺素蛋白原纤维)和与渗析有关的淀粉样变性(β<sub>2</sub>微球蛋白原纤维)中，某些前体蛋白的未离解形式聚集并形成原纤维(Tan等，1994，同上)。

## 2. 临床综合症

本部分描述主要的淀粉样变性类型，包括它们特有的斑点原纤维成分。本发明发现，可以通过给与用来刺激针对各种病原特异的淀粉样的沉淀的一种或多种组分的免疫反应的药剂治疗淀粉样的疾病。如下面C章节更详细的论述，这样的组分优选是形成斑点的原纤维的组分。以下章节用来列举主要的淀粉样变性的形式，但并不打算限制本发明。

### a. AA(反应性)淀粉样变性

通常，AA淀粉样变性是引起持续急性阶段反应的疾病的表现形式。这样的疾病包括慢性的炎症性的病症、慢性的局部或全身的生物感染和恶性肿瘤。

AA原纤维通常由通过血清淀粉样的A蛋白质(apoSSA)，一种存在于HDL粒子并且响应如IL-1，IL-6和TNF的细胞活素而合成的循环脱脂蛋白，溶解蛋白切割形成的8000 道尔顿片段(AA肽或蛋白质)组

成。沉淀可在身体内广泛分布，尤其是实质器官。脾为常见的沉淀位置，并且也可能影响肾。沉淀也常见于心脏和胃肠道。

5 AA淀粉样疾病包括，但是不局限于炎症性的疾病，例如类风湿性的关节炎、少年慢性关节炎、僵硬性脊椎炎、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、瑞特氏综合症、成人斯蒂尔病、贝切特氏综合症和克罗恩氏病。AA沉淀也产生于慢性的微生物感染，例如麻疯病、肺结核、支气管扩张、褥疮、慢性肾盂肾炎、骨髓炎和惠普尔病。某些恶性肿瘤也会导致AA原纤维淀粉样沉淀。其中包括如霍奇金淋巴瘤、肾癌、肠癌、肺癌和泌尿生殖道癌、皮肤基底细胞癌和毛细胞白血病。

10

#### b. AL淀粉样变性

AL淀粉样的沉淀通常与几乎所有B淋巴细胞血统的体液不调有联系，从浆细胞恶性肿瘤(多发性骨髓瘤)到良性的单株丙种球蛋白病。有时，淀粉样沉淀的存在可能是原发性体液不调的主要指标。

15

AL淀粉样沉淀的原纤维由单克隆免疫球蛋白轻链或其片段组成。更具体地说，该片段源自于轻链( $\kappa$ 或 $\lambda$ )的N-末端区域并包含全部或一部分可变的( $V_L$ )范围。沉淀通常出现于间叶组织，导致周围和自发神经病、腕管综合症、舌肥大、限制性心肌病、大关节病、免疫的体液不调、骨髓瘤以及隐性体液不调。可是，应当注意到可能包括几乎所有组织，特别是脏器，例如心脏。

20

#### C.遗传性的系统性淀粉样变性

25 有许多形式的遗传性系统性淀粉样变性。虽然它们相对较少，但是由于症状从成人开始以及它们的遗传图谱(通常染色体占优势)，导致这样的病症在总人口中持久存在。通常，该综合症可归因于导致产生变体淀粉样变性肽或蛋白质的前体蛋白中的点突变。表2概括了这些病症的示例形式的原纤维组合物。

30



已经描述了超过40个运甲状腺素蛋白基因的独立的点突变，都引起了临床上相似形式的家族性淀粉样多发性神经病。

运甲状腺素蛋白(TTR)是14千道尔顿蛋白质，有时也称为前清蛋白。它是通过肝脏和脉络丛产生的，它的功能为运输甲状腺激素和维生素A。至少有50种蛋白质变体形式，各以单一氨基酸变化为特征，是各种形式的家族淀粉样多发性神经病的原因。例如，在丹麦病人中，将位置55的亮氨酸置换为脯氨酸导致特别的进行性神经病形式；将位置111的亮氨酸置换为甲硫氨酸导致严重的心脏病。从系统性淀粉样变性病人心脏组织分离的淀粉样的沉淀显示该沉淀由TTR和其片段的非均匀混合物组成，总起来称为ATTR，其全长序列已经被鉴定。ATTR原纤维组分可以从这样的斑点中提取，可按照本领域已知的方法例如，Gustavsson, A.等, *Laboratory Invest.* 73 : 703 - 708, 1995; Kametani, F.等, “生物化学、生物物理研究通讯” (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*), 125 : 622 - 628, 1984; Pras, M.等, *PNAS* 80 : 539-42, 1983)测定它们的结构和序列。

在分子脱脂蛋白AI中具有点突变(例如, Gly→Arg6; Trp→Arg50; Leu→Arg60)的人显示以蛋白质脱脂蛋白AI或其片段(AApoAI)沉淀为特征的淀粉样变性(“奥斯特塔格型”)。这些病人具有低水平的高密度脂蛋白(DHL), 并存在周围神经病或肾衰竭。

在溶菌酶的 $\alpha$ 链中的突变(例如, Ile→Thr56或Asp→His57)是在英国家庭中报道的奥斯特塔格型非神经性的遗传性淀粉样变性的另一个形式。这里, 突变株溶菌酶蛋白质(Alys)的原纤维沉淀, 病人通常显示削弱的肾功能。这种蛋白质不同于本申请描述的大多数形成原纤维的蛋白质, 通常以整体形式(非片段)存在(Benson, M.D.等, *CIBA Fdn. Symp.* 199:104 - 131, 1996)。

$\beta$ -淀粉样的肽(A $\beta$ )是通过解脎作用从称为 $\beta$ 淀粉样的前体蛋白

( $\beta$  APP) 的大蛋白质衍生而来的39-43氨基酸肽。 $\beta$  APP中的突变导致阿尔茨海默氏病、唐氏综合症和/或老年性痴呆的家族形式，其特征为由A $\beta$ 原纤维及其他组分组成的大脑斑点沉淀，这将在以下更详细地描述。与阿尔茨海默氏病有关的已知的APP中的突变发生于 $\beta$ 或 $\gamma$ 分泌酶切割位点的附近，或A $\beta$ 内部。例如，位置717距APP $\gamma$ -分泌酶切割转化为A $\beta$ 的位置很近，而位置670/671距 $\beta$ 分泌酶切割的位置最近。通过增加从APP产生的A $\beta$ 形式的42/43氨基酸的数量，在任何残基上的突变都可能导致阿尔茨海默氏病。各种长度的A $\beta$ 肽的结构和序列在本领域为大家所熟知。可按照本领域已知的方法(例如Glenner和Wong, *Biochem Biophys. Res. Comm.* 129 : 885-890, 1984; Glenner和Wong, *Biochem Biophys. Res. Comm.* 122:1131 - 1135, 1984) 制备这样的肽。另外，各种形式的肽可以购得。

合成核素是与脂蛋白类似的与突触有关的蛋白质，有很多神经元细胞溶质和突触前的末端。源自 $\alpha$ -合成核素的肽片段，称为NAC，也是阿尔茨海默氏病淀粉样斑点的组分。(Clayton, 等, 1998)。如下文详细描述，这些组分也是本发明免疫治疗的目标。

凝溶胶蛋白是钙结合蛋白，与肌动蛋白微丝结合并将其打断。在蛋白质位置187的突变(例如，Asp $\rightarrow$ Asn; Asp $\rightarrow$ Tyr)导致遗传性的系统性淀粉样变性的形成，通常发现于芬兰，以及荷兰或日本患者。在患病的个体中，由凝溶胶蛋白片段(Agel)形成的原纤维，通常由氨基酸173-243 ( 68 kDa羧基末端片段)组成，在血管和基底膜沉淀，导致角膜营养不良和头盖神经病，并发展为周围神经病、皮肤营养不良以及在其他器官的沉淀。( Kangas, H. 等, 人类分子遗传学(*Human Mol. Genet.*)5 ( 9) : 1237-1243, 1996)。

其他突变的蛋白质例如纤维蛋白原的突变株 $\alpha$ 链( AfibA)和抑半胱氨酸蛋白酶蛋白 C 突变株( Acys)也形成原纤维，并产生特有的遗传性的病症。AfibA 原纤维形成特征为并发肾病的非神经性遗传性淀粉样

沉淀；Acys 沉淀的特征为冰岛报道的遗传性大脑淀粉样血管病。  
 (Isselbacher, 等, Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, San Francisco, 1995; Benson, 等, 同上)。在至少某些情况下,  
 具有大脑淀粉样血管病(CAA)的病人已经显示具有包含与  $\beta$  蛋白质结  
 5 合的抑半胱氨酸蛋白酶蛋白 C 非突变株的淀粉样的原纤维(Nagal, A.  
 等, Molec. Chem. Neuropathol. 33 : 63 - 78, 1998)。

蛋白感染素疾病的某些形式现在被认为是可遗传的, 这解释了  
 至多15%的情况, 它们以前被认为主要是传染性的。(Baldwin等, 《阿  
 10 尔茨海默氏病及相关疾病的研究进展》(Research Advances in  
 Alzheimer's Disease and Related Disorders), John Wiley and Sons, New  
 York, 1995)。在这样的蛋白感染素病症中, 病人生长了由正常蛋白感  
 染素蛋白质(PrP<sup>c</sup>)的反常的异构体组成的斑点。一种主要的突变株异构  
 体PrP<sup>Sc</sup>, 也称为AScr, 与正常细胞的蛋白质的不同之处在于它对抗蛋  
 15 白酶退化, 在抽出溶剂后不溶解, 在次级溶酶体中沉淀, 平移后接合  
 以及具有高  $\beta$ -折叠片含量。遗传连锁发展了至少五种突变, 导致克雅  
 氏症(CJD), 格-施-沙综合症(GSS)和致命家族性失眠(FFI)。Baldwin从  
 痒病原纤维提取原纤维肽, 测定序列以及制备这样的肽的方法在本领  
 域是已知的。(例如Beekes, M.等, J. Gen. Virol. 76:2567 - 76, 1995)。

20

例如, 一种GSS形式与遗传密码102位置的PrP突变有关系, 而终  
 脑(telencephalic)GSS与遗传密码117位置的突变隔离。在遗传密码198  
 和217位的突变导致的GSS形式中, 作为阿尔茨海默氏病特征的神经炎  
 斑点包含PrP代替了A $\beta$ 肽。家族性CJD的某些形式与遗传密码200和210  
 25 位的突变有联系; 已经在家族性CJD和FFI找到遗传密码129和178位的  
 突变(Baldwin, 同上)。

#### d. 老年系统性淀粉样变

系统的或局部的淀粉样沉淀随着年龄增加而增加。例如, 野生型  
 30 运甲状腺素蛋白(TTR)原纤维通常发现于年长个体的心脏组织中。它

们可能无症状，临床上无反应，或可以导致心力衰竭。无症状的原纤维局部的沉淀也可能出现在脑部(A $\beta$ )、前列腺的全部淀粉样蛋白(A $\beta$ 2微球蛋白)、关节和精囊腺中。

5 e.大脑的淀粉样变性

淀粉样的局部沉淀常见于脑，尤其是年长的个体。脑部最常见类型的淀粉样蛋白主要由A $\beta$ 肽原纤维组成，导致痴呆或突发性(非遗传性的)阿尔茨海默氏病。事实上，突发性阿尔茨海默氏病的发生率大大地超过遗传性的形式。关于阿尔茨海默氏病的遗传性类型(AD)，形成这些斑点的原纤维肽非常类似于上面的描述。

10

f.与透析有关的淀粉样变性

由 $\beta_2$ 微球蛋白(A $\beta_2$ M)原纤维组成的斑点通常发生在长期接受血液透析或腹膜透析的病人中。 $\beta_2$ 微球蛋白是11.8千道尔顿多肽，存在于所有的有核细胞中的Class I MHC 抗原的轻链。在正常的环境下，它连续地从细胞膜脱落并通常被肾过滤。间隙破坏，例如肾功能损伤，导致在肾及其他位置(主要是关节的富含胶原的组织)沉淀。与其他原纤维蛋白质不同，A $\beta_2$ M分子通常以非片段形式存在于原纤维中(Benson, 同上)。

15

20

g.激素衍生的淀粉样变性

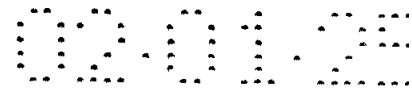
内分泌器官可以藏匿淀粉样的沉淀，尤其是在老化的个体中。分泌激素的肿块可能同时包含激素衍生的淀粉样的斑点，其中原纤维由多肽激素例如降血钙素(甲状腺髓样癌)、胰岛淀粉样多肽(糊精；出现在大多数II型糖尿病患者中)和心钠素(分离的前房淀粉样变性)组成。这些蛋白质的序列和结构在本领域为大家所熟知。

25

h.混杂的淀粉样变性

有多种其他淀粉样蛋白病的形式，通常表现为淀粉样蛋白的局部化沉淀。通常来讲，这些疾病可能源自特定的原纤维前体的局部化产

30



生和/或分解代谢的缺少或特定的组织(例如关节)形成原纤维沉淀的倾向性。这样的自发沉淀的例子包括小节的AL淀粉样变性、皮肤的淀粉样变性、内分泌的淀粉样变性和与肿瘤有关的淀粉样变性。

5 C.药物组合物

本发明发现能够诱导或提供针对淀粉样斑点的某些组分的免疫反应的组合物可有效地治疗或预防淀粉样的疾病的发展。特别是，按照本申请提供的发明，当给予患者免疫刺激剂量的抗淀粉样变性药剂，或相应的抗淀粉样的免疫试剂时，可预防症状的发展，改善症状和/或减少患者淀粉样的斑点负荷。本节描述产生主动的以及被动的对淀粉样的斑点的免疫反应的抗淀粉样变性药剂的例子，并提供显示在淀粉样的斑点负荷上使用这样的组合物的治疗效果的示例数据。

通常，如上述章节所述和下面的例证，本发明抗淀粉样蛋白的药剂由特定的斑点组分，优选原纤维形成组分，通常是特有的蛋白质，肽或其片段组成。更一般来说，本发明使用的治疗剂产生或诱导针对斑点，或更特别地，其原纤维组分的免疫反应。因此这样的药剂包括，但是不局限于诱导抗体和/或与抗体交叉反应的组分本身和其变体，类似物和模拟物，以及与淀粉样组分特异反应的抗体或T细胞。按照本发明一个重要的特征，药物组合物不选自非特异性的组分，即通常循环于体内或遍及体内的组分。例如，血清淀粉样蛋白(SAP)是在肝脏产生的循环血浆糖蛋白，它与大多数已知形式的淀粉样沉淀结合。治疗组合物优选涉及这些组分。

25 当给用免疫原诱导抗体或T细胞与患者组分反应时，免疫反应可以是主动的，当给用本身与患者组分结合起来的抗体时，免疫反应可以是被动的。诱导或产生针对淀粉样的斑点的免疫反应的药剂的例子在以下章节描述。

30 除致免疫的药剂之外，本发明药物组合物可以包括有效量的辅剂

和/或赋形剂。药学上有效的有用的辅剂和赋形剂在本领域为大家所熟知，在下述的章节将更详细地描述。

### I. 免疫刺激药剂(主动免疫反应)

#### 5 a. 抗原纤维组合物

普通类优选的抗淀粉样变性药剂由源自淀粉样的原纤维蛋白质的药剂组成。如上所述，淀粉样的疾病的标志是主要由原纤维组成的在器官或淀粉样的斑点的器官中的沉淀，该原纤维又由特定的原纤维蛋白质或肽组成。按照本发明，这样的原纤维或肽组分是诱导抗淀粉样免疫反应的有用药剂。

表1和2概括了作为各种淀粉样的疾病特征的形成原纤维的蛋白质的例子。按照本发明的这个方面，对患者或易受影响的个体给用免疫刺激组合物，该组合物包括适当的原纤维蛋白质或肽，包括其类似物或片段，可治疗或预防淀粉样蛋白病。

例如， $A\beta$ ，亦称 $\beta$ -淀粉样的肽，或A4肽(见美国专利4, 666, 829; Glenner & Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 1131(1984))，是39-43个氨基酸的肽，是阿尔茨海默氏病特有的斑点的主要成分。 $A\beta$ 是通过两个酶， $\beta$ 和 $\gamma$ 分泌酶处理较大的蛋白质APP而产生的(见Hardy, TINS 20, 154(1997))。

实施例 I 描述了支持本发明的实验结果，其中对过量表达在位置717具有突变的人类APP的杂合子转基因小鼠给用 $A\beta_{42}$ 肽。这些被称为“PDAPP小鼠”的小鼠显示阿尔茨海默氏病样的病状，被认为是阿尔茨海默氏病的动物模型(Games, 等, 《自然》(Nature)373: 523-7, 1995。如在本例中的详细描述，这些小鼠从约6月龄开始可在脑内检测到神经病理学斑点，斑点沉淀随时间而发展。本申请描述的该实验中，将集合的 $A\beta_{2}$ (AN1792)给予小鼠。在大多数被处理的13月龄小鼠(7/9)的脑中并没有检测到淀粉样变性，与此相反，在此年龄段对照小

鼠(盐水注射或未经处理的)都显示显著的脑淀粉样蛋白的负荷(图 2)。这些差异在海马体更明显(图 3)。处理过的小鼠也显示显著的针对 A $\beta$  的血清抗体滴定度(全部大于 1:1000, 8/9 大于 1/10,000; 图 1, 表 3A)。通常, 在 1:100 稀释试验中, 盐水-处理小鼠一直显示小于 4-5 倍针对 A $\beta$  的抗体的本底水平, 因此认为相对于对照组没有明显应答(表 3B)。这些研究证明注射形成肽 A $\beta$  的特定的原纤维可防止 A $\beta$  淀粉样的斑点沉淀。

血清淀粉样蛋白(SAP)是产生于肝脏的循环血浆糖蛋白, 以依赖钙的方式与所有形式的淀粉样的原纤维结合, 包括阿尔茨海默氏病中的大脑淀粉样斑点的原纤维。作为上述实验的一部分, 对一组小鼠注射 SAP; 这些小鼠对 SAP 产生了显著的血清滴定度(1:1000-1:30000), 但是对 A $\beta$  肽没有产生可检测的血清滴定度, 产生大脑斑点神经病理学机制(图2)。

在实施例II详细描述的另一一些实验证明在5周到约8月龄之间的被处理小鼠中, 注射 A $\beta$  的致免疫的效果依赖于剂量。在这些小鼠中, 抗 A $\beta$  肽抗体的平均血清滴定度随免疫接种数目和剂量增加而增加; 可是, 四次免疫接种后, 测量免疫接种后五天的滴定度高于高剂量(1-300  $\mu$ g)免疫接种, 稳定在约 1:10000 的水平(图5)。

实施例III描述支持本发明的另外的试验, 其中在淀粉样的斑点已经存在于PDAPP模型小鼠(约11月龄)的脑中之后, 在一个时间点用 A $\beta$  42 处理它们。在这些研究中, 用 A $\beta$  42 或盐水使动物免疫, 该动物在 15 或 18 月龄时为进行淀粉样的负荷试验被杀死。图7说明, 在 18 月龄, 用 A $\beta$  42 处理的小鼠表现出比 PBS 处理的 18 个月大对照动物(斑点负荷, 4.7%)或者 12 月大的未经处理的动物(0.28%)明显低的平均淀粉样的斑点负荷(斑点负荷, 0.01%), 如部分 8 的实施例 XIII 详细描述, 其中斑点负荷通过图像分析测量。这些实验证明本发明治疗方法在减少患病个体的斑点负荷和预防斑点负荷发展很有效果。

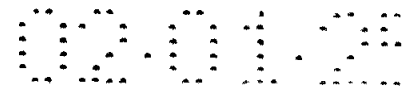
按照本发明的这个方面，治疗剂源自于包含作为所研究疾病特征的斑点的原纤维肽或蛋白质。作为选择，从抗原的角度看，这样的药剂与这样的组分足够相似，可以诱导与原纤维组分交叉反应的免疫反应。表1和2提供了这样的原纤维肽和蛋白质的例子，其中组合物和序列在该领域是已知的，或可以按照本领域已知的方法方便地测定(见下面引用的参考文献和特别地讲授各种原纤维肽组分的提取方法和/或组合物的章节B2；另外的原纤维组分的例子描述如下)。

因此，按照本发明，以临床检查和/或活组织检查为基准，进行淀粉样蛋白病的诊断时，熟练的专业人员能够确定淀粉样沉淀的原纤维组成，并提供诱导针对原纤维肽或蛋白质的免疫反应的药剂。

例如，如上所述，用于治疗阿尔茨海默氏病或其他的以A $\beta$ 沉淀为特征的淀粉样疾病的治疗剂可以是任何天然存在的A $\beta$ 肽形式，特别是人类形式(即，A $\beta$  39，A $\beta$  40，A $\beta$  41，A $\beta$  42或A $\beta$  43)。这些肽的序列及它们与APP前体的关系在本领域是已知的，并且在本领域为大家所熟知(例如，Hardy等，TINS 20，155-158(1997))。例如，A $\beta$  42具有如下序列：

H2N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH. (SEQ ID NO: 1)

A $\beta$  41，A $\beta$  40和A $\beta$  39不同于A $\beta$  42，它们分别在该肽C末端缺失Ala，Ala-Ile和AlaIle-Val。A $\beta$  43不同于A $\beta$  42，其在C末端存在苏氨酸残基。按照本发明优选方案，治疗剂会诱导针对所研究疾病的全部的或一部分原纤维组分的免疫反应。例如，优选的A $\beta$ 致免疫的组合物是诱导A $\beta$ 的游离N-末端的特异抗体的药剂。这样的组合物的优点是不能识别前体蛋白 $\beta$ -APP，从而较少可能产生自体免疫。



5 作为另外的例子，可以适当地用AA肽，血清淀粉样蛋白质(ApoSSA)的一种已知的8千道尔顿的片段，治疗如上所述的以AA原纤维沉淀为特征的疾病，例如，某些慢性炎症、慢性的局部或全体的微生物感染和恶性肿瘤。AA淀粉样疾病的例子包括，但是不局限于，炎症性的疾病例如类风湿性关节炎、少年慢性关节炎、僵硬性脊椎炎、  
10 牛皮癣、牛皮癣性关节炎、瑞特氏综合征、成人斯蒂尔病、贝切特氏综合、克罗恩氏病，慢性微生物的感染例如麻疯病、肺结核、支气管扩张、褥疮、慢性肾盂肾炎、骨髓炎和惠普尔病，以及恶性肿瘤例如霍奇金氏淋巴瘤、肾癌、肠癌、肺癌、泌尿生殖道癌、皮肤基底细胞癌和毛细胞白血病。

15 AA肽指一个或多个源自淀粉样A血清前体蛋白(ApoSSA)的N-末端的肽，开始于前体蛋白的1，2或3残基，终止于残基58和84之间的任一点；通常AA原纤维由ApoSSA的1-76残基组成。按照在本领域众所周知的方法，可以测定精确的结构和组成，并合成适当的肽(Liepnieks, J.J., Biochem. Biophys Acta 1270 : 81-86, 1995)。

20 作为另外的例子，源自其中包含免疫球蛋白轻链( $\kappa$ 或 $\lambda$ 链)的全部或一部分可变( $V_L$ )区域的N-末端区域的片段通常包含间叶组织中的淀粉样的沉淀，导致周围的和自发的神经病、腕管综合征、舌肥大、限制性心肌病、大关节病、免疫体液失调、骨髓瘤以及隐蔽的体液失调。本发明组合物优选地诱导针对一部分轻链的免疫反应，优选针对“新表位”减少可能的自身免疫作用，“新表位”是由于母体分子形成片段而形成的。

25 可使用本发明方法治疗各种遗传性淀粉样疾病。这样的疾病描述于上述章节B.2。例如，各种形式的家族性淀粉样多发性神经病起源于运甲状腺素蛋白(TTR)的至少五十种突变株形式，各自的特征为单一氨基酸变化，TTR是一种通过肝脏产生的14千道尔顿蛋白质。虽然许多这类疾病可根据它们特定的病状和/或人口统计起源区别，但是治疗  
30

组合物也可由诱导针对超过一个的TTR形式，如两个或更多包括野生型TTR的ATTR形式的混合物形式的免疫反应的药剂组成，以提供通用的治疗组合物。

5           含ApoAI的淀粉样沉淀在分子脱脂蛋白AI中具有点突变的人中发现。具有这种疾病形式的病人通常存在周围神经病或肾衰竭。按照本发明，治疗组合物由一个或多个本申请描述的或本领域已知的不同ApoAI形式组成。

10           某些家族形式的阿尔茨海默氏病，以及唐氏综合症，是 $\beta$ 淀粉样的前体蛋白突变，导致具有主要由 $\beta$ 淀粉样肽(A $\beta$ )组成的原纤维斑点的沉淀的结果。如上文和本申请实施例所述，本发明治疗组合物中使用A $\beta$ 肽。

15           治疗上述遗传性类型的淀粉样变性的其他的剂型包括产生针对凝溶胶蛋白片段的免疫反应，以治疗遗传性的系统性淀粉样变性的组合物，产生针对溶菌酶蛋白质突变株(Alys)的免疫反应以治疗遗传性神经病，产生针对纤维蛋白原(AfibA)的突变株 $\alpha$ 链的免疫反应以治疗非神经形式的淀粉样变性如肾病，产生针对突变株抑半胱氨酸蛋白酶蛋白C(Acys)的免疫反应以治疗冰岛报道的遗传性脑血管病。另外，某些遗传性类型的蛋白感染素疾病（例如克雅氏症(CJD)、格-施-沙综合症(GSS)和致命性家族失眠(FFI))的特征为蛋白感染素蛋白质的突变株异构体，PrPSc。按照本发明，这种蛋白质可被用于治疗和预防PrP斑点沉淀的治疗组合物中。

25           如上所述，全身的或局部的淀粉样沉淀也与年龄增长有联系。根据本发明另外的方面，通过对敏感个体给用由与这样的年龄增长有关的一种或多种蛋白质组成的组合物，可以预防或治疗这样的沉淀。因此，由源自野生型TTR的ATTR组成的斑点经常地在老年人心脏组织  
30           中发现。同样地，某些年长的个体可能在他们的脑中生长无症状的原

纤维局部沉淀；如本申请详细描述，A $\beta$ 肽治疗可以应用于这样的个体。 $\beta_2$ 微球蛋白是前列腺全部淀粉样蛋白的常见的组分，因此是本发明另外一种候选药剂。

5            作为另外的例子然而并非限制，本发明治疗方法可选择另一些非遗传性类型的淀粉样蛋白病。 $\beta_2$ 微球蛋白原纤维斑点通常生长于长期接受血液透析或腹膜透析的病人中。按照本发明，这样的病人可通过针对 $\beta_2$ 微球蛋白，或更优选针对其致免疫的表位的组合物治疗。

10           分泌激素的肿瘤可能也包含激素衍生的淀粉样的斑点，其组成通常为特别的内分泌器官的特征。因此这样的原纤维可能由多肽激素如降血钙素(甲状腺髓样癌)、胰岛淀粉样多肽(出现于大多数II型糖尿病患者中)和心钠素(分离的前房淀粉样变性)组成。本发明也设计了针对在主动脉内膜动脉粥样硬化中形成淀粉样沉淀的组合物。例如，  
15           Westermarck等描述了一种形成这样的斑点的69个氨基酸的脱脂蛋白A的N-末端片段(Westermarck等Am. J. Path. 147:1186-92, 1995)；本发明治疗组合物包括针对这样的片段的免疫学的试剂以及该片段本身。

             上述讨论集中在可以用作治疗或预防各种形式的淀粉样蛋白病的治疗药剂的原纤维组分上。该治疗剂也可以是包含诱导使用药物的人的相似的保护或治疗的免疫反应的表位的天然存在的或突变株原纤维肽或蛋白质的活性片段或类似物。致免疫的片段典型地具有至少3, 5, 6, 10或20个邻近的来自天然肽的氨基酸的序列。示例性的A $\beta$ 肽致免疫的片段包括A $\beta$  1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 3-7, 1-3, 1-4, 1-12, 13-28,  
20           17-28, 1-28, 25-35, 35-40和35-42。缺乏至少一种，以及有时至少5或10种存在于天然形式的原纤维组分中的C末端氨基酸片段用于某些方法中。例如，缺乏从A $\beta$  43的C末端起的5个氨基酸的片段包括从AB的N-末端起的前38个氨基酸。在某些方法中优选从A $\beta$ 的N-末端一半起的片段。类似物包括等位的，特定的和诱导的变体。类似物经常由于存性置换，典型地在一个或一些位置不同于天然存在的肽。类似物  
25           30

典型地显示至少80或90%与天然肽相同的序列。某些类似物也包括非天然的氨基酸或N或C末端氨基酸修饰物。非天然的氨基酸的例子为  $\alpha$ ,  $\alpha$ -二取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸、4-羟脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸、 $\gamma$ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 $\gamma$ -N-乙酰基赖氨酸、O-磷酸基丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸和  $\omega$ -N-甲基精氨酸。

通常，本领域的专业人员能够理解可以按照如下所述的与天然存在的原纤维组分的交叉活性和/或在转基因动物中的预防或治疗效能，筛选按照本发明该方面的片段和类似物。如果它们的免疫活性和动物模型效果大致相当于或大于淀粉样的原纤维组分相应的参数，这样的片段或类似物可用于本发明的治疗组合物。

这样的肽，蛋白质或片段，类似物及其他淀粉样变性肽，可以按照本领域众所周知的标准方法，通过固相肽合成或重组体表达合成，或可以从天然源中获得。通过引用许多参考文献并结合对特定的原纤维组分的描述，提供了典型的原纤维组合物、原纤维提取方法及原纤维肽或蛋白质组分的序列。另外，其他的组合物、序列提取和测定的方法在本领域是已知的，需要制造和使用这样的组合物的人可以采用它们。肽自动合成仪可用来制造这样的组合物，它可在市场上从许多制造商，如Applied Biosystems (Perkin Elmer; Foster City, California) 买到，制备合成肽的方法在本领域是已知的。可以在细菌如大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞内进行重组体表达；作为选择，可以在本领域已知的体外转译系统中用自由细胞制造蛋白质。重组体表达方法描述于Sambrook等，分子克隆 (Molecular Cloning): A Laboratory Manual (C.S.H.P. Press, NY 2d ed., 1989)。某些肽和蛋白质也是可以买到的；例如，从供应商如美国肽公司 (American Peptides Company, Inc.), Sunnyvale, California, 和California Peptide Research, Inc. Napa, California可买到某种形式的A $\beta$ 肽。

30



5 治疗剂也可以由更长的多肽组成，多肽包括例如，活性肽原纤维片段或类似物，和其他的氨基酸。例如，A $\beta$ 肽可以是完整的APP蛋白质或其部分，如从A $\beta$ 的N-末端开始延伸至APP末端的C-100片段。这样的多肽可以在如下所述动物模型中筛选预防或治疗效能。A $\beta$ 肽、类似物、活性的片段或其他的多肽可以协作方式给药(即，作为一种淀粉样的肽)或以分离形式给药。治疗剂也可以包括单体致免疫药剂或结合体或载体蛋白质的多聚体，和/或如上所述，可以被加到其他的原纤维组分中，以提供大范围的抗淀粉样斑点的活性。

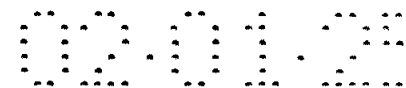
10 在进一步的变化中，致免疫的肽，如A $\beta$ 片段，可以作为致免疫的组合物的一部分被病毒或细菌表达。一个编码致免疫肽的核酸被合入到病毒或细菌的基因组或游离基因中。选择性地，核酸以一种方式合入，使得致免疫的肽表达为分泌性蛋白质或具有病毒外表面蛋白质的融合蛋白或细菌跨膜蛋白质，以便显示肽。此类方法使用的病毒或细菌应该是非病源性的或被稀释的。适当的病毒包括腺病毒、HSV、委内瑞拉马脑脊髓炎病毒及其他 $\alpha$ 病毒，水泡性口膜炎病毒及其他棒状病毒，牛痘和鸡痘。适当的细菌包括沙门氏菌和志贺氏菌属。致免疫的肽与HBV的HBsAg融合是特别适当的。治疗剂也包括未必具有与A $\beta$ 显著类似的氨基酸序列但可充当A $\beta$ 模拟物并诱导相似的免疫反应的肽和其他化合物。例如，任何形成 $\beta$ -折叠片的肽和蛋白质都可以用来筛选适用性。也可使用针对A $\beta$ 或其他淀粉样变性肽的单克隆抗体的抗特应抗体。这样的抗特应抗体摹拟抗原并产生对它的免疫反应(见

15 《基础免疫学》(Essential Immunology)(Roit著, Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 第6版), p.181)。除A $\beta$ 肽以外的药剂应当诱导针对一个或多个上列的A $\beta$ 的优选的部分(例如, 1-10, 1-7, 1-3, 和3-7)的致免疫反应。优选地, 此类药剂诱导特别针对特定片段而不针对A $\beta$ 的其他的部分的致免疫反应。

20

25

30 也可使用肽或其他化合物的随机文库来筛选适用性。可以制备组合文库以提供多种可通过逐步合成方式合成的化合物。这样的化合物



包括多肽、 $\beta$ -转酮模拟物、聚糖、磷脂、激素、前列腺素、类固醇、芳族化合物、杂环化合物、苯并二氮杂草、寡聚N-取代的甘氨酸和寡氨基甲酸酯。按Affymax, WO 95/12608, Affymax, WO 93 / 06121, 哥伦比亚大学, WO 94/08051, 药典 (Pharmacopeia), WO 95/35503  
5 和Scripps, WO 95/30642(各自引作参考文献)描述的方法, 化合物的大组合库可以通过编码合成库方法(ESL)构造。通过噬菌体展示方法也可产生肽库。请参见, 例如, Deylin, WO 91/18980。

通过测定与已知特异于A $\beta$ 或其他淀粉样变性肽如ATTR的抗体  
10 或淋巴细胞(B或T)结合的能力, 开始筛选组合库和其他化合物的适用性。例如, 最初的筛选可以用任何A $\beta$ 或其他所关心的淀粉样变性肽的多克隆的血清或单克隆抗体进行。然后将这样筛选后鉴定的化合物进行诱导A $\beta$ 或其他淀粉样变性肽抗体或反应性淋巴细胞能力的进一步分析。例如, 可以在已经预涂原纤维肽的微量滴定板上试验血清的  
15 多倍稀释物, 可以进行对A $\beta$ 的反应性抗体的标准ELISA试验。然后按实施例所述, 用预先具有淀粉样变性疾病倾向的转基因动物试验化合物的预防和治疗效能。这样的动物包括, 例如, Games 等, 同上中描述的进行具有APP的717突变的小鼠, Mc Conlogue等, US5,612,486和Hsiao  
20 等, Science 274, 99 (1996); Staufenbiel等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13287-13292(1997); Sturchler-Pierrat 等, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 94, 13287-13292(1997); Borchelt等, Neuron 19, 939-945(1997)中描述的具有APP的670/671 Swedish突变的小鼠。相同筛选方法可以应用于其他的潜在的药剂如上面描述的A $\beta$ 片段, A $\beta$ 类似物和包括A $\beta$ 在内的比较长的肽。

25

#### b.其他的斑点组分

能够理解针对其他淀粉样的斑点组分的免疫反应也可有效预防、延迟或减少淀粉样的疾病中的斑点沉淀。这样的组分可能是斑点中原纤维的或与原纤维有关的或形成原纤维的较少的组分, 值得说明的一点是, 那些组分遍及体内, 或对淀粉样的沉淀相对非特异性, 通常不  
30

太适用于治疗的目标。

因此本发明进一步发现，那些诱导特异斑点组分的免疫反应的药剂可应用于治疗或预防淀粉样疾病的发展。本部分提供若干典型的与淀粉样的斑点有关的分子的背景。按照本发明，诱导针对所有这些分子的免疫反应独自或与针对上述的原纤维组分或针对下述的所有不形成原纤维的组分的药物组合物结合，就提供了另一种抗淀粉样变性的治疗方案。如此处所述，依据这样的斑点组分的被动免疫方案也是本发明的组成部分。

10

例如，合成核素是在结构上类似于脱脂蛋白，但是在神经元细胞溶质，特别是在突触前末端附近发现的蛋白质。至少有三种形式的该蛋白质，称为  $\alpha$ ， $\beta$  和  $\gamma$  合成核素。最近已经发现  $\alpha$  和  $\beta$  合成核素包含于某些淀粉样疾病，特别是阿尔茨海默氏病中的淀粉样沉淀的核中 (Clayton, D.F.等, TINS 21(6) : 249-255, 1998)。更具体地说， $\alpha$  和  $\beta$  合成核素的NAC区域的片段(残基61-95)已经从阿尔茨海默氏病人的淀粉样斑点中分离得到；事实上这些片段组成约10%该斑点，其在用十二烷基硫酸钠(SDS)增溶之后仍不能溶解 (George, J.M.等Neurosci. News 1:12 -17, 1995)。此外，已经报道全长  $\alpha$  合成核素和其NAC片段在体外促进  $\beta$  淀粉样肽集合体变成不能溶解的淀粉样蛋白 (Clayton, 同上)。

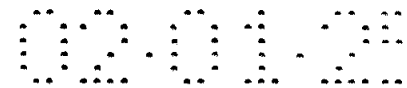
15

20

25

30

与淀粉样斑点有关的其他组分包括非肽组分。例如，基底膜聚糖和基底膜聚糖衍生的氨基多糖是存在于包含A  $\beta$  的阿尔茨海默氏病及其他CNS和全身淀粉样变性中的淀粉样斑点，包括与糖尿病有关的糊精斑点中的大型硫酸肝素含蛋白多糖。这些化合物已经显示增强A  $\beta$  原纤维的形成。核心蛋白质和基底膜聚糖的氨基多糖链已经显示参与与A  $\beta$  的结合。另外的氨基多糖，特别是硫酸皮肤素、软骨素-4-硫酸酯和戊聚糖多硫酸酯通常发现于各种型式的淀粉样斑点中，也显示增强原纤维的形成。葡聚糖硫酸酯也具有这些性质。当这些分子脱硫酸



酯后，增强显著减少。针对硫酸酯形式的氨基葡聚糖，包括氨基葡聚糖本身的致免疫治疗形成本发明的另一个实施方案，作为初级或二级处理。本领域普通的技术人员完全可以制备这样的分子以及包含这样的分子的适当的治疗组合物。

5

## 2. 诱导被动免疫反应的药剂

本发明治疗剂也包括免疫的试剂，如抗体，特别是与原纤维肽或淀粉样的斑点的其他的组分结合的抗体。这样的抗体可以是单克隆的或多克隆的，以及具有结合专一性的，即与目标淀粉样蛋白病种类一致。治疗组合物和治疗方案可以包括针对斑点特定的原纤维或非原纤维组分上的单一结合区域或表位的抗体，或可以包括针对两个或更多相同组分上的表位或斑点的多个组分上的表位的抗体。

10

例如，在支持本发明进行的实验中，对8<sup>1</sup>/<sub>2</sub>至10<sup>1</sup>/<sub>2</sub>个月大的PDAPP小鼠腹膜内 (i.p.) 注射针对A $\beta$ 肽特异的表位制备的抗A $\beta$  42多克隆抗体或抗A $\beta$ 单克隆抗体或盐水，详见本申请实施例XI。在这些实验中，监视循环抗体浓度，按需要加强注射以维持制备抗体的特异的抗原的循环抗体浓度大于1:1000。与对照组相比，抗体治疗的小鼠的皮质、海马体和小脑区域总的A $\beta$ 水平减少；减少最高的出现在用多克隆抗体处理的小鼠中。

15

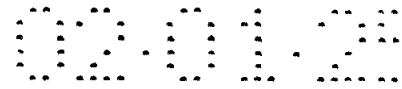
20

在进行的支持本发明进行的另外的实验中，一种预测性的体内试验(实施例XIV)用来试验针对称为NAC的合成核素片段的抗体的清除。已经证明合成核素为与淀粉样的斑点有关的蛋白质。NAC抗体与包含淀粉样的斑点和小神经胶质的细胞的脑组织样品接触。兔血清用作对照。随后的监视显示斑点的数目和大小显著地下降，表现出清除抗体的活性。

25

数据显示，通过使用有效减少淀粉样的斑点负荷的针对A $\beta$ 肽表位或针对合成核素 NAC片段的免疫试剂可以大大地减少与阿尔茨海

30



默氏病及其他淀粉样的疾病有关的淀粉样的斑点负荷。显然各式各样的抗体可被用于这样的组合物中。那些与集合形式的A $\beta$ 特异结合而不与分离形式结合的抗体及那些与分离形式特异结合而不与集合形式结合的抗体都适用于本发明。其他适当的抗体为与集合和分离形式都结合的抗体。某些这样的抗体与短形式的天然存在的A $\beta$  (即, A $\beta$  39, 40或41)结合, 而不与长形式的天然存在的A $\beta$  (即, A $\beta$  42和A $\beta$  43)结合。某些抗体与长形式结合而不与短形式结合。某些抗体与A $\beta$ 结合而不与全长的淀粉样前体蛋白结合。某些抗体与A $\beta$ 结合的亲合力大于或等于约 $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ 或 $10^{10}$  M $^{-1}$ 。

5

10

多克隆的血清典型地包含沿A $\beta$ 长度与若干表位结合起来的混合抗体群。单克隆抗体与A $\beta$ 中的特定的表位结合, 这些表位可以是构象的或非构象的表位。某些单克隆抗体与A $\beta$ 残基1-28中的表位结合(将天然的A $\beta$ 的第一个N末端残基指定为1)。其他的单克隆抗体与具有A $\beta$ 的残基1-10的表位结合。还有单克隆抗体与具有A $\beta$ 的残基1-16的表位结合。其他的单克隆抗体与A $\beta$ 的残基1-25的表位结合。某些单克隆抗体与A $\beta$ 的氨基酸1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 25-30, 10-20, 20, 30或10-25中的表位结合。抗体预防和治疗效能的试验可以使用实施例描述的转基因动物模型方法。

15

20

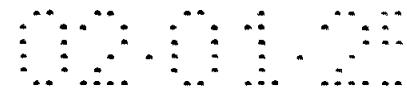
更一般来说, 从本申请提供的信息, 专业人员可以可使用本申请描述的组合物设计, 生产和试验针对原纤维蛋白质或其他的淀粉样的疾病的特性肽, 以及针对其他的淀粉样组分的抗体, 其中疾病如本申请章节2描述。

25

#### a. 免疫球蛋白的一般特性

已知碱性的抗体结构单元包含子单元的四聚体。各四聚体由两个相同的多肽链对组成, 每对均具有一个“轻链”(约25kDa)和一个“重链”(约5-70kDa)。各链氨基末端部分包括主要担负抗原识别的约100到110或更多氨基酸的可变区。各链羧基末端部分为主要担负效应子

30



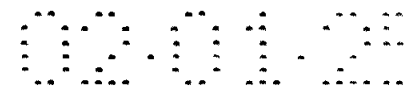
功能的恒定区。

5 轻链分为 $\kappa$ 或 $\lambda$ 。重链分为 $\gamma$ ， $\mu$ ， $\alpha$ ， $\delta$ 或者 $\xi$ ，分别地定义为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE抗体的同种型。轻链和重链中，可变区和恒定区通过约12或更多氨基酸的“J”区相连，重链也包括约10或更多氨基酸的“D”区。(通常参见，《基础免疫学》(Fundamental Immunology) (Paul, W.等，第2版。Raven Press, N.Y., 1989)，第7章(全部作为参考文献)。

10 各轻/重链对的可变区形成抗体结合部位。因此，一个完整的抗体具有两个结合部位。除了双官能的或双特异的抗体，两个结合部位是相同的。所有链表现出相同的通用结构的相对稳定的构架区(FR)，它通过三个高变区连接，也被叫作互补性测定区或CDRs。各对的两个链的CDRs通过构架区定位，启动与特定的表位的结合。从N-末端到C-  
15 末端，轻链和重链都包含区域FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3和FR4。各区域氨基酸的分配与Kabat的免疫有义的蛋白序列(Sequences Of Proteins of Immunological Interest) (国家健康研究院 National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987和1991)，或Chothia和Lesk, J.Mol. Biol. 196:901 - 917 (1987); Chothia等, Nature 342:878 - 883的定义一致。  
20

#### b.非人类抗体的制备

非人类，例如，鼠科动物、豚鼠、兔或大鼠的单克隆抗体的生产可以通过，例如，用斑点组分，如A $\beta$ 或其他原纤维组分使动物免疫来完成。也可使用包括A $\beta$ 或A $\beta$ 的致免疫的片段或A $\beta$ 抗体的抗特应  
25 抗体的更长的多肽。参见例如，Harlow和Lane，抗体(Antibodies)，实验手册(A Laboratory Manual) (CSHP NY, 1988) (均引作参考)。这样的免疫原可以通过肽合成或通过重组体表达从天然来源中获得。如下所述，该免疫原可以选择性地与载体蛋白融合或者复合给药。选择性地，该免疫原可以用辅剂给药。如可使用几种类型的辅剂。对于  
30



免疫接种实验动物，优选完全弗氏佐剂，然后是不完全佐剂。兔或豚鼠典型地被用来制造多克隆的抗体。小鼠典型地被用来制造单克隆抗体。筛选与该免疫原特异性结合的抗体。选择性地，进一步筛选抗体以与该抗原的特定区域结合。例如，当A $\beta$ 肽作为免疫原时，通过测定抗体与A $\beta$ 肽缺失突变体的集合的结合和测定与该抗体结合的缺失突变体可完成筛选。结合可以通过例如蛋白质印迹或ELISA评定。显示与该抗体特异结合的最小的片段限定该抗体的表位。选择性地，通过竞争试验可以测定表位的专一性，该试验中试验抗体与基准抗体竞争性地与组分结合。如果试验和基准抗体竞争，则它们与相同表位或十分近接的表位结合，两种表位十分接近的情况是，结合一种抗体会干扰与另一个抗体的结合。

### c.嵌合抗体和人源化抗体

嵌合的和人源化的抗体与为其提供原料的小鼠或其他非人类的抗体具有相同或相似的结合专一性和亲合力。嵌合抗体是其轻链或重链基因典型地通过遗传工程从属于不同种类的免疫球蛋白基因构造的抗体。例如，小鼠单克隆抗体基因的可变的(V)片段可以结合到人类常量(C)片段，如IgG1和IgG4上。因此，典型的嵌合抗体为由小鼠抗体的V或抗原结合区域组成的杂化蛋白或从人类抗体来的C或效应子区域。

人源化的抗体具有实质上来自人类抗体(称为受体抗体)的可变区骨架残基和实质上来自小鼠抗体(称为受体免疫球蛋白)的互补性测定区。见Queen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029 - 10033 (1989)和WO 90 / 07861, US 5, 693, 762, US 5, 693, 761, US 5, 585, 089, US 5, 530, 101和Winter, US 5, 225, 539 (均引作参考)。如果恒定区(s)存在，它实质上或完全来自人免疫球蛋白。人类可变区域通常选自其骨架序列与衍生CDRs的鼠科动物可变区域高度相同的人类抗体。重链和轻链可变区骨架残基源自于相同或不同的人类抗体序列。人类抗体序列可以是天然存在的人类抗体的序列也可以是若干人类抗体的

共有序列。参见Carter等，WO 92/22653。基于他们对CDR构象和/或与抗原的结合的可能的影响，选择某些人类可变区骨架残基的氨基酸用于替换。通过建立模型、检测该氨基酸在具体地点的特征或特殊的氨基酸的替代效应或诱变的经验观测，研究这些可能的影响。

5

例如，当鼠科动物可变区骨架残基和选择的人类可变区骨架残基的氨基酸不同时，该人类骨架氨基酸通常由相当于来自小鼠抗体的骨架氨基酸代替，该氨基酸适当地：

- (1)直接地与抗原非共价结合，
- 10 (2)与CDR区邻接，
- (3)否则与CDR区相互作用(如在CDR区约6 Å范围之内)，或
- (4)参与VL-VH界面。

其他候选替换试验对象是受体人类骨架氨基酸，该氨基酸在该位置对于人类免疫球蛋白是异常的。这些氨基酸可以用来自小鼠供体抗体等效位置的氨基酸或来自更典型的人免疫球蛋白的等效位置的氨基酸代替。其他的替换试验对象是受体人类骨架氨基酸，该氨基酸在该位置对于人免疫球蛋白是异常的。人源化的免疫球蛋白的可变区骨架通常显示最小85%与人类可变区骨架序列或这样的序列的共有序列一致。

15

20

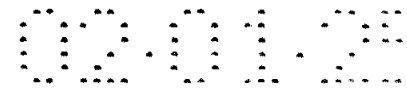
#### d.人类抗体

通过如下所述的各种技术提供针对A $\beta$ 的人类抗体。某些人类抗体通过竞争性结合实验选择，或者相反，通过与特殊的小鼠抗体，如实施例XI描述的小鼠单克隆抗体具有相同的表位专一性选择。通过使用A $\beta$ 作为唯一的免疫原片段，和/或通过筛选针对A $\beta$ 缺失突变体集合的抗体，筛选对于特殊的表位具有专一性的人类抗体。

25

##### (1) Trioma方法

30 该方法使用的基本途经和典型的细胞融合配对，SPAZ - 4已被公



5 开在 Oestberg 等, Hybridoma 2:361-367(1983); Oestberg, 美国专利 No.4,634,664; 和 Engleman 等, 美国专利 4,634,666(均引作参考)中。该方法得到的产生抗体的细胞系称为 triomas, 因为它们来自三个细胞—两个人类细胞和一个小鼠细胞。开始, 将小鼠骨髓瘤细胞系与人类 B 淋巴细胞融合, 得到非产生抗体的异种杂化细胞, 如上述 Oestberg 描述的 SPAZA 细胞系。然后将该异种细胞与免疫的人类 B 淋巴细胞融合, 得到产生抗体的 trioma 细胞系。已经发现 Triomas 产生比由人类细胞制造的普通杂交瘤更坚固的抗体。

10 该免疫的 B 淋巴细胞从人类供体的血、脾、淋巴结或骨髓中获得。如果需要针对特定的抗原或表位的抗体, 优选使用用于免疫接种的抗原或其表位。免疫接种可以在体内或体外进行。对于体内免疫接种, 从用 A $\beta$ 、其片段、包含 A $\beta$  或其片段的较大的多肽免疫的人体, 或 A $\beta$  抗体的抗特异性抗体中分离 B 细胞。在某些方法中, B 细胞从最终使用抗体治疗的相同患者分离。对于在体外免疫接种, B-淋巴细胞典型地在媒介如补充有 10% 人血浆的 RPMI 1640(见 Engleman 同上)中暴露于抗原 7-14 天。

20 该免疫的 B 淋巴细胞与异种的杂交细胞如 SPAZ-4 通过众所周知的方法融合。例如, 将该细胞在大约 37 摄氏度下, 用 40-50% 的分子量为 1000-4000 的聚乙二醇处理约 5-10 分钟。细胞从融合混合物中分离, 并在对所需要的杂化(例如, HAT 或 AH)具有选择性的介质中繁殖。通过化验能够与 A $\beta$  或其片段结合的 trioma 培养基, 辨认所需要的结合专一性的分泌抗体的克隆。通过有限稀释技术亚克隆具有所需要的专一性的产生人类抗体的 Triomas 并在体外培养基中生长。然后试验得到的 trioma 细胞系与 A $\beta$  或其片段的结合能力。

30 虽然 triomas 是遗传稳定的, 但它们并不产生很高水平的抗体。通过克隆抗体基因从 trioma 变成一种或多种表达载体, 可以增加表达水平, 按照该领域众所周知的方法将该载体变换变成标准哺乳动物、细

菌或酵母细胞系列。

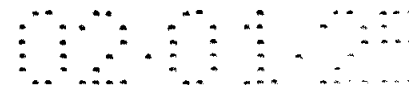
### (2)转基因的非人类哺乳动物

5 针对A $\beta$ 的人类抗体也可由具有编码至少一段人免疫球蛋白基因座的转基因的非人类转基因的哺乳动物产生。通常，这样的转基因哺乳动物的内生的免疫球蛋白基因座在功能上是非活性的。优选人免疫球蛋白基因座的片段包括重链和轻链组分的未重排序列。钝化内生的免疫球蛋白和引入外生的免疫球蛋白基因可以通过目标源重组或通过引导YAC染色体完成。通过这些处理所得的转基因哺乳动物能够在功  
10 能上重排免疫球蛋白组分序列，表达通过人免疫球蛋白基因编码的各种同种型的全部抗体，而不表达内生的免疫球蛋白基因。具有这些性质的哺乳动物的生产和性质详见，例如，Lonberg 等，WO93 / 12227 (1993); US 5, 877, 397, US 5, 874, 299, US 5, 814, 318, US 5, 789, 650, US 5, 770, 429, US 5, 661, 016, US 5, 633, 425, US 5, 625, 126, US 5, 569, 825, US 5, 545, 806, Nature 148, 1547 - 1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91 / 10741 (1991) (均引作参考)。转基因小鼠特别适于上述目的。如Lonberg  
15 或Kucherlapati，同上中的描述，用A $\beta$ 或其片段，通过转基因的非人类的哺乳动物免疫得到抗A $\beta$ 抗体。通过，例如，使用传统的Kohler Milstein技术从这样的哺乳动物得到的细胞与合适的骨髓瘤细胞系列融合，制备单克隆抗体。可以以从通过致免疫的药剂进行免疫的人获得的血清形式提供人类多克隆的抗体。选择性地，可以通过使用A $\beta$ 或其他的免疫原淀粉样的肽作为亲合试剂进行的亲合纯化浓缩这样的多克隆抗体。

25

### (3)噬菌体展示方法

按照Huse等，Science 246:1275 -1281(1989)提出的总的方案，可用另一种获得人类抗A $\beta$ 抗体的方法筛选人类B细胞DNA库。例如，如trioma方法所述，这样的B细胞可以用以A $\beta$ ，片段，包含A $\beta$ 或片  
30 段的比较长的多肽免疫的人或抗特异性抗体中得到。选择性地，可以



从最终接受抗体治疗的患者得到这样的B细胞。选择与感兴趣的淀粉样的组分如A $\beta$ 或其片段的表位结合的抗体。然后克隆和放大编码这样的抗体(或结合的片段)的序列。Huse描述的方案在与噬菌体展示技术结合方面更有效率。参见,例如,Dower等,WO 91/17271和  
5 McCafferty等,WO 92/01047,US 5,877,218,US 5,871,907,US 5,858,657,US 5,837,242,US 5,733,743和US 5,565,332(均引作参考)。在这些方法中,产生的噬菌体库中的成分在其外表面显示不同的抗体。抗体通常显示为Fv或Fab片段。通过A $\beta$ 或其片段的亲合富集,选择具有所需要的专一性的噬菌体展示抗体。

10

在噬菌体展示的改进方法中,可以产生具有选定的鼠科动物抗体结合专一性的人类抗体。见Winter,WO92/20791。在该方法中,选择的鼠科动物抗体的重链或轻链可变区用作原料。如果,例如,轻链可变区被选为原料,所构造的噬菌体基因库中的单元显示相同的轻链可变区(即,该鼠科动物原料)和不同的重链可变区。重链可变区从人类重链可变区重排的基因库中获得。选择对感兴趣的组分显示强的特异结合(例如,至少 $10^8$ ,优选至少 $10^9\text{M}^{-1}$ )的噬菌体。由此噬菌体得到的人类重链可变区充当进一步构造噬菌体基因库的原料。在这些基因库中,各噬菌体展示相同重链可变区(即,该区等同于原来显示的基因库)  
15 和不同的轻链可变区。轻链可变区从人类轻链可变区重排的基因库中获得。再一次选择对淀粉样的肽组分显示强的特异结合的噬菌体。这些噬菌体展示与人类抗淀粉样的肽抗体完全相同的可变区。这些抗体通常具有与鼠科动物原料相同或相似的表位。

#### 25 e. 恒定区的选择

嵌合的、人源化的或人类抗体的重链和轻链可变区可以与至少一部分人类恒定区有关。恒定区的选择部分地信赖于是否要求抗体依赖的补充和/或细胞介导毒性。例如,同种型IgG1和IgG3具有补体活性,同种型IgG2和IgG4没有。同种型的选择将会影响抗体进入脑的通道。  
30 轻链恒定区可以是 $\lambda$ 或 $\kappa$ 。可以表达为包含两个轻链和两个重链的四聚

体、单独的重链、轻链、Fab、Fab 'F ( ab ' ) 2和Fv，或其中重链和轻链可变区通过隔离物连接的单链抗体。

#### 5 f.重组体抗体的表达

嵌合的、人源化的和人类抗体典型地通过重组体表达产生。重组体多核苷酸构造典型地包括切实与编码抗体链序列有关的表达控制序列，包括天然关联的或异种的启动子区。优选表达控制序列为能够变换或转染真核生物的寄主细胞的载体中的启动子系统。一旦载体并入适当的宿主中后，该寄主维持在适于核苷酸序列的高水平表达，以及交叉反应抗体的收集和提纯的条件下。

这些表达载体作为游离基因或作为该寄主染色体的 DNA 不可分割的部分，一般在寄主有机体中是可复制的。

15

大肠杆菌是一个对克隆本发明 DNA 序列特别有用的原核生物寄主。微生物，如酵母也对表达有用。酵母属是优选的酵母寄主，按照需要带有具有表达控制序列合适的载体、复制起点、终止序列等等。典型的启动子包括 3-磷酸甘油酸激酶及其他糖解酶。可归纳的酵母启动子包括，尤其是，来自乙醇脱氢酶的启动子，异细胞色素 C 和应用

20

于麦芽糖和半乳糖的酶。

哺乳动物细胞对于表达编码免疫球蛋白或其片段的核苷酸片段是优选的寄主。见 Winnacker, 《从基因到克隆》(From Genes to Clones), (出片商 VCH, NY, 1987)。一些能够分泌完整的异种蛋白质的合适的寄主细胞系列已经在本领域得到发展，包括 CHO 细胞系、各种 COS 细胞系列、HeLa 细胞、L 细胞和骨髓瘤细胞系列。这些细胞的表达载体可以包括表达控制序列，如复制起点、启动子、增强剂(Queen 等, Immunol. Rev. 89:49 ( 1986))和必要的信息处理位置，如核糖体结合位

25

30

表达控制序列是源自内生基因、巨细胞病毒、SV40、腺苷病毒、牛乳头状瘤病毒等的启动子。见 Co 等, J. Immunol. 148:1149 (1992)。

5 抗体编码序列可以选择性地合入转基因, 以引入转基因动物的基因组, 随后在转基因动物乳中表达(例如, 按照 US 5,741,957, US 5,304,489, US 5,849,992 描述的方法, 这些文献均引作参考)。合适的转基因包括对于与来自乳腺特异基因, 如酪蛋白或 $\beta$ 乳球蛋白的启动子和增强子适当连接的轻链和/或重链的编码序列。

10 通过众所周知的方法, 包含感兴趣的 DNA 片段的载体可以转移进入寄主细胞, 这取决于细胞的寄主的种类。例如, 对于原核细胞通常使用氯化钙转染, 而磷酸钙治疗、电穿孔、脂转染、biolistics 或基于病毒的转染能用于其他的细胞寄主。用于变换哺乳动物细胞的其他方法包括使用聚凝胺、原生质体融合、脂质体、电穿孔法和显微注射(通常参见, Sambrook 等, 同上)。对于转基因动物的生产, 可以将转基因微量注射进入受精的卵母细胞中, 或可以合入胚胎干细胞的基因组中, 这样的细胞的细胞核转移进入去核的卵母细胞中。

15

表达后, 抗体可以按照本领域的标准程序纯化, 包括 HPLC 提纯, 柱色谱法, 凝胶电泳等等(通常见, Scopes, Protein Purification (Springer - Verlag, NY, 1982))。

20

#### 4. 其他的治疗剂

25 本发明方法使用的治疗剂也包括与斑点组分, 如 A $\beta$  肽结合的 T 细胞。例如, 通过从昆虫细胞系表达人类 MHC 类 I 基因和人类 $\beta$ -2 微球蛋白基因, 借此在细胞表面上形成空的可以与 A $\beta$  肽结合的复合体, T 细胞可以针对 A $\beta$  肽被激活。与细胞系结合的 T 细胞针对该肽特别地被激活。见 Peterson 等, US 5,314,813。表达 MHC 类 II 抗原的昆虫细胞系同样可以用于激活 CD4 细胞

30

## 5.载体蛋白质

某些诱导免疫反应的药剂包含诱导针对淀粉样沉淀的免疫反应的适当的表位，但是该免疫反应很小不足以致免疫。这时，可以将肽免疫原连接到合适的载体上帮助启发免疫反应。合适的载体包括血清清蛋白、钥孔血蓝素、免疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵清蛋白、破伤风类毒素或来自其他病原菌，如白喉、大肠杆菌、霍乱或 *H. pylori* 的类毒素，或稀释的毒素衍生物。其他的载体包括与多 MHC 等位基因，例如，至少 75%人类 MHC 等位基因结合的 T 细胞表位。这样的载体有时作为“通用的 T 细胞表位”在本领域是已知的。通用的 T 细胞表位的例子包括：

流感性红血球凝聚素：HA<sub>307-319</sub> PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO:1)

PADRE(common residues bolded): AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:2)

疟疾 CS: T3 表位: EKKIAKMEKASSVFNV (SEQ ID NO:3)

肝炎 B 表面抗原: HBsAg<sub>19-28</sub> FLLTRILTI (SEQ ID NO:4)

热休克蛋白 65: hsp65<sub>153-171</sub> DQSIGDLIAEAMDKVGNEG (SEQ ID NO:5)

卡介苗: QVHFQPLPPAVVKL (SEQ ID NO:6)

破伤风类毒素: TT<sub>830-844</sub> QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO:7)

破伤风类毒素: TT<sub>947-967</sub> FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO:8)

HIV gp120T1: KQIINMWQEVGKAMYA (SEQ ID NO:9)

其他刺激或增强免疫反应的载体包括细胞因子如 IL-1, IL-1  $\alpha$  和  $\beta$  肽, IL-2,  $\gamma$  INF, IL-10, GM-CSF, 和趋化因子, 如 MIP1 $\alpha$  和  $\beta$  和 RANTES。致免疫剂也可与如 O'Mahony, WO 97/17613 和 WO 97/17614 描述的增强组织间转运的肽连接。

致免疫的药剂可以通过化学交联与载体连接。将免疫原与载体连

5 接的技术包括使用 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶硫基)丙酸盐(SPDP)和琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)形成二硫键(如果肽缺乏巯基, 可以通过添加半胱氨酸残基得到)。这些试剂在它们本身和蛋白质上的肽半胱氨酸残基之间产生二硫键和通过赖氨酸上的  $\epsilon$ -氨基, 或其他氨基酸中的其他自由氨基形成酰胺键。许多这样的二硫化物/酰胺形成试剂描述于 *Immun. Rev.* 62, 185 (1982)。其他双官能的偶联剂形成硫醚而不是二硫键。这些硫醚形成试剂中有许多是市场上可买到的, 包括 6-马来酰亚胺基己酸, 2-溴乙酸, 和 2-碘乙酸的反应性酯, 4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷-1-羧酸。羧基可以通过使其与琥珀酰亚胺或 1-羟基-2-硝基-4-磺酸, 钠盐结合而激活。

15 致免疫的肽也可表达为与载体的融合蛋白(即, 异种的肽)。致免疫的肽可以在其氨基的末端, 羧基末端, 或二者与载体连接。选择性地, 多重复制的致免疫的肽可以存在于融合蛋白。选择性地, 致免疫的肽可以在肽的 N 和 C 末端与异种肽的复制体连接。某些载体肽用来诱导针对载体肽的辅助 T 细胞反应。诱导的辅助 T 细胞接着诱导针对与载体肽连接的致免疫的肽的 B 细胞反应。

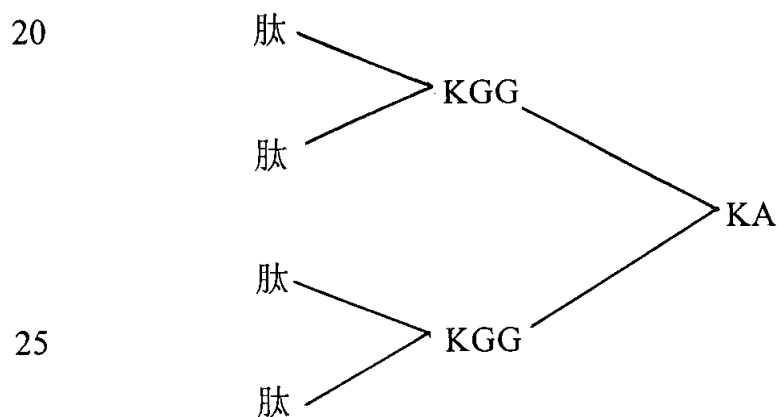
20 本发明的某些试剂包含融合蛋白, 其中 A $\beta$  的 N-末端片段在其 C 末端连接到载体肽上。在此类试剂中, A $\beta$  片段的 N-末端残基构成融合蛋白的 N-末端残基。因此, 这样的融合蛋白质有效地诱导与需要自由形式的 A $\beta$ N-末端残基的表位结合的抗体。本发明某些试剂包括在 C 末端与一种或多种载体肽复制体连接的 A $\beta$  N-末端片段的多次复制。合入这样的融合蛋白质的 A $\beta$  片段的 N-末端, 有时从 A $\beta$  1-3 开始, 到 A $\beta$  7-11 结束。A $\beta$  1-7, A $\beta$  1-3, 1-4, 1-5, 和 3-7 是优选的 A $\beta$  N-末端片段。某些融合蛋白质包含不同的串接的 A $\beta$  N-末端片段。例如, 融合蛋白可以包含 A $\beta$  1-7, 接着为 A $\beta$  1-3 接着为异种的肽。

30 在某些融合蛋白质中, A $\beta$  的 N-末端片段在其 N-末端与异种的载体肽融合。可使用相同种类的 A $\beta$  N-末端片段用于与 C-末端融合。

某些融合蛋白质包含与 A $\beta$  N-末端片段的 N-末端连接的异种肽，该末端依次与一种或多种另外的 A $\beta$  N-末端片段串接。

适用于本发明的某些融合蛋白质的例子显示如下。一些融合蛋白质包含与破伤风类毒素表位相连接的 A $\beta$  片段，如 US5,196,512, EP 378,881 和 EP 427,347 所述。一些融合蛋白质包含与 US 5,736,142 所述的载体肽相连接的 A $\beta$  片段。某些异种肽是通用的 T 细胞表位。在某些方法中，用于给药的试剂只不过是具有与直线结构的异种的片段相连接的 A $\beta$  片断的单一的融合蛋白。在某些方法中，该试剂是式 2x 表示的融合蛋白的多聚体，其中 x 是 1-5 的整数。优选的 x 是 1, 2 或 3, 最优选 2。当 x 为 2 时，这样的多聚体具有连接在称为 MAP4 的优选构型上的四个融合蛋白质(见 US 5,229,490)。将 A $\beta$  表位下划线。

MAP4 构型显示如下，其中通过在 N 末端和赖氨酸的侧链胺开始肽合成产生支链结构。依赖于合入该序列和允许分支的赖氨酸的数目，所得结构存在多个 N 末端。在本例子中，在包含赖氨酸的分支核心上已经产生了四个相同的 N 末端。这样的多重性大大地增强了同源的 B 细胞的响应度。



AN90549(A $\beta$  1-7/破伤风类毒素 830-844 MAP4 构型):

DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 10)

30

AN90550(A β 1-7/破伤风类毒素 947-967 MAP4 构型):

DAEFRHDFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 11)

AN90542(A β 1-7/破伤风类毒素 830-844+947-967 线性构型):

5 DAEFRHDQYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE  
(SEQ ID NO: 12)

AN90576: (A β 3-9/破伤风类毒素 830-844 MAP4 构型):

10 EFRHDSGQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 13)

美国专利 5, 736, 142 中描述的肽(全部是线性构型):

AN90562(A β 1-7/肽)AKXVAAWTLKAAADAEFRHD (SEQ ID  
NO: 14)

15 AN90543(A β 1-7x3/ 肽 ) : DAEFRHDDAEFRHDDAEFRHD  
AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 15)

融合蛋白的其他例子(黑体的 A β 致免疫的表位)包括

20 **AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD**  
(SEQ ID NO: 16)

**DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA** (SEQ ID NO: 17)

**DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR** (SEQ ID NO: 18)

**FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR** (SEQ ID NO: 19)

**EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR** (SEQ ID NO: 20)

25 **PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD**  
(SEQ ID NO: 21)

**DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD** (SEQ ID NO:  
22)

30 **DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT**  
(SEQ ID NO: 23)

**DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT** (SEQ ID NO:

24)

**DAEFRHD-PKYVVKQNTLKLAT-EKKLAKMEKASSVFNV-  
QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD  
DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-  
FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE**

5

(SEQ ID NO: 25)

**DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE**

(SEQ ID NO: 26)

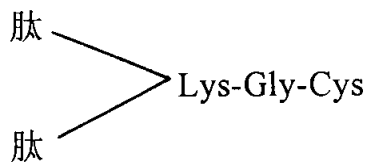
**DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-  
DAEFRHD**

10

(SEQ ID NO: 27)

**DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL**(SEQ ID NO: 28)在 2 位上带有支链的树脂上。

15



20

**EQVTNVGGAISQAVHAAHAEINEAGR**(合成核素融合蛋白 MAP-4 构型; SEQ ID NO: 29)

25

可使用相同或相似的载体蛋白质和连接方法制备免疫原, 该免疫原产生针对在被动免疫中所使用的 A $\beta$  的抗体。例如, 可以给予实验动物与载体连接的 A $\beta$  或片段, 使其产生 A $\beta$  的单克隆抗体。

### 6. 治疗剂核酸编码

30

也可通过给予编码所选择的用于被动免疫的肽免疫原或抗体及其组分链的核酸诱导针对淀粉样沉淀的免疫反应。这样的核酸可以是 DNA 或 RNA。编码免疫原的核酸片段一般与调控元件, 如启动子和增强子相连接, 调控元件允许在预期的患者目标细胞中表达 DNA 片

段。对于在血细胞中所需要的诱导免疫反应的表达，来自轻链或重链免疫球蛋白基因或 CMV 主要中间体早期启动子和增强子的启动子和增强子元件适于直接表达。连接的调控元件和编码序列经常克隆至一个载体中。对于双链抗体的给药，两个链可以克隆在相同或分离的载体中。

5

可以利用一些病毒载体体系，包括逆转录病毒的体系(见，例如，Lawrie 和 Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102 - 109, 1993); 腺病毒载体(见，例如 Belt 等, *J. Virol.* 67, 5911, 1993); 腺病毒相关病毒载体(见，例如，Zhou 等, *J. Exp. Med.* 179, 1867, 1994)，来自包括牛痘病毒和鸡痘病毒的痘族病毒载体，来自  $\alpha$  病毒属，如源自 Sindbis 和 Semliki Forest Viruses 的病毒的病毒载体(见，例如，Dubensky 等, *J. Virol.* 70, 508-519, 1996)，委内瑞拉(Venezuelan)马脑炎病毒(见 US 5, 643, 576)和弹状病毒，如水泡性口膜炎病毒(见 WO 96/34625)和乳头状瘤病毒(Ohe 等, *Human Gene Therapy* 6, 325-333, 1995); Woo 等, WO 94/12629 和 Xiao 和 Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630 - 2622, 1996)。

10

15

DNA 编码免疫原，或含有该免疫原的载体可以被包装成脂质体。合适的脂类和有关类似物描述于 US 5,208,036, 5,264,618, 5,279,833 和 5,283,185。载体和 DNA 编码免疫原也可被吸附到颗粒载体或与颗粒载体相伴，该例子包括聚甲基丙烯酸甲酯聚合体和聚交酯和聚(丙交酯-共-乙交酯)，见，例如，McGee 等, *J. Micro Encap.* (1996)。

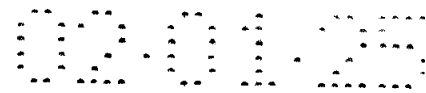
20

25

基因治疗载体或裸 DNA 可以通过向个体患者给药在活体内传递，一般通过全身给药(例如，静脉内的，腹膜内的，鼻腔内的，胃的，皮内的，肌肉的，皮下的或颅内的注入)或局部施用(见例如，US 5,399,346)。这样的载体可以进一步包括促进试剂如丁哌卡因(US 5,593,970)。DNA 也可使用基因枪给药。见 Xiao 和 Brandsma 同上。

30

DNA 编码免疫原沉淀在显微镜的金属珠的表面上。将该微粒用冲击波



或膨胀氦气加速，穿透组织达到若干细胞层的深度。例如，Agracetus, Inc., (Middleton, WI)制造的 Accel™ Gene Delivery Device 是合适的。选择性地，裸 DNA 可以简单地通过化学的或机械的刺激在皮肤上 DNA 点样透过皮肤进入血流(见 WO 95/05853)。

5

在进一步的变化中，载体编码免疫原可以被传递到体外的细胞，如从个体患者移植的细胞(例如，淋巴细胞，骨髓抽出物，活检组织)或万能供血者造血干细胞，然后将该细胞重新移植至病人体内，这通常在选定编入载体的细胞后进行。

10

#### 7.筛选具有清除活性的抗体

实施例 XIV 描述了筛选清除淀粉样的沉淀的抗体的方法。为筛选针对淀粉样的沉淀的活性，在体外培养基中将来自淀粉样变性患者的组织样品，如阿尔茨海默氏病的脑组织，具有淀粉样的病状的动物模型与负载 Fc 受体的吞噬细胞，如小神经胶质的细胞，和抗体接触。该吞噬细胞可以是原始培养物或细胞系，如 BV-2, C8-B4 或 THP-1。这些组分结合在载玻片上便于显微镜监视，或在微量滴定碟的孔中同时进行多个反应。在这样的形式中，独立的微型载玻片可以装在分离的孔上，或可使用非微量探测形式，如 A $\beta$  的 ELISA 探测。优选地，多次测量在体外反应混合物中淀粉样的沉淀的量，从反应进行以前的基准值开始，以及反应期间的一种或多种测试值。可以通过染色，例如，用 A $\beta$  或淀粉样的斑点的其他组分的放射性标记的抗体，检测抗原。在检验抗体的清除活性中，被用来染色的抗体可能是相同或不同的。淀粉样沉淀反应期间相对于基准线的减少显示在试验中的该抗体具有清除活性。这样的抗体可用于预防或治疗阿尔茨海默病及其他淀粉样变性疾病。如上所述，支持本发明的实验显示，合成核素的 NAC 片段的抗体有效清除阿尔茨海默氏病典型的淀粉样斑点。

15

20

25

#### D.可接受抗淀粉样变性治疗方案的病人

30, 可接受治疗的病人包括未显示症状但处于疾病危险中的病人，以

5 及目前显示淀粉样变性症状的病人。至于阿尔茨海默氏病，如果他或她一生足够长的话，事实上任何人都有患阿尔茨海默氏病的危险。因此，本方法可适用于不需要任何患病风险评估的一般群体的预防性给药。本方法尤其对已知具有阿尔茨海默氏病或任何其他的遗传性的淀粉样疾病遗传危险的个体有用。这样的个体包括经历这些疾病的患者的亲属，以及通过遗传的或生物化学的标识物分析测定具有风险的人。阿尔茨海默氏病的风险的遗传标志物包括 APP 基因的突变，特别是被分别称为 Hardy 和 Swedish 突变的位置 717 和位置 670 和 671 的突变(见 Hardy, TINS, 同上)。其他的风险标识物是早衰(presenilin)基因，PS1 和 PS2, ApoE4, AD 家族史，高胆固醇血或动脉粥样硬化中的突变。目前患有阿尔茨海默氏病个体可以通过特有的痴呆，以及上面描述的危险因素的存在而确定。另外，一些诊断性试验有助于鉴定 AD 个体。其中包括 CSF tau 和 A $\beta$  42 水平的测量。Tau 水平提升和 A $\beta$  42 水平降低是 AD 存在的信号。阿尔茨海默氏病的患病个体也可通过实施例章节论述的 MMSE 或 ADRDA 标准诊断。

20 对于无症状的病人，治疗可以从任何年龄开始(例如，10, 20, 30 岁)。但通常直到患者到达 40, 50, 60 或 70 岁才需要开始治疗。治疗一般需要在某一周期内使用多倍剂量。按照本申请实施例 I 和 II 描述，可以通过测试抗体或活化的 T 细胞或 B 细胞对治疗剂(如 A $\beta$  肽)随时间的反应监视治疗。如果该反应下降，显示需要支持剂量。对于潜在的唐氏先天愚症患者，可以通过对其母亲给药进行出生前治疗或在出生之后不久给药。

25 其他形式的淀粉样变性往往误诊，除非怀疑对于该疾病具有特殊的倾向。一个最初的症状是中年到老年患者存在的心脏病或肾病，该患者也具有其他的器官疾病的信号。心电图低压或极端的轴偏斜和心室组织变厚可能是心脏疾病的表现。蛋白尿是肾疾病的症状。如果患者体格检查中检测出肝肿大可能是肝脏的疾病。周围神经病也常在某些形式的淀粉样变性中发生；同时可能发现以体位性低血压为特征的

自发性神经病。任何不确定起因的进行性神经病患者可被怀疑为淀粉样变性。该疾病的确定的诊断可使用感染器官的组织活检方法。对于全身的淀粉样变性，可使用脂垫抽出物或直肠活检样品。活检材料用刚果红染色，阳性样品在偏振光显微术中显示苹果绿双折射。

5

#### E. 治疗方法

在预防应用中，给予易被特定疾病感染的，或者处于特定疾病危险中的患者，足够消除或减少该危险或延迟该疾病发生的剂量的药物组合物或药剂。在治疗应用中，给予怀疑或已经患有这样的疾病的患者足够治疗，或至少部分地抑制该疾病的症状及其并发症的剂量的组合物或药物。能够完成所述任务的剂量被称为治疗有效剂量或药理学有效剂量。在预防和治疗的治疗法中，药剂通常以不同的剂量给予直到免疫反应已经充分完成。一般地，该免疫反应被监视，如果免疫反应开始变小，就给予重复的剂量。

10

15

用于治疗以上所述疾病的本发明组合物的有效剂量因许多不同的因素，包括给药方式，目标区域，患者的生理状态，患者是否是人类或动物，使用的其他药物，治疗是预防性的或治疗性的而变化。通常患者是人类，但是某些疾病如朊病毒蛋白质关联的疯牛病，患者可以是非人类的哺乳动物，如牛。治疗剂量需要滴定以使安全性和有效性最优化。免疫原的量取决于是否使用辅剂，在没有辅剂的情况下通常需要高剂量。使用的免疫原的量取决于特定剂型的免疫原性，对于人类给药每位患者每次注射  $1\ \mu\text{g}$ - $500\ \mu\text{g}$ ，更优选  $5$ - $500\ \mu\text{g}$ 。偶而使用每次注射  $0.5$ - $5$  毫克的高剂量。一般地，每人每次注射至少约  $10$ ， $20$ ， $50$  或  $100\ \mu\text{g}$ 。注射次数可以从一天一次到一年一次，到十年一次明显不同，有时优选连续地“增加”免疫原。通常，按照本申请提供的学说，通过从患者得到液体样品，通常是血清样品，并使用本领域众所周知的适合于特异抗原测量的方法，测定针对免疫原的抗体的滴定度，可以监控有效剂量。理想地，在最初的剂量之前获得样品；在每次免疫接种之后获得后来的样品并滴定。通常，提供至少大于对照物

20

25

30

或 1:100 血清稀释物的“背景”水平四倍的可检测的滴定度的剂量或剂量表是合乎需要的，其中背景定义为相对于对照血清或相对于 ELISA 测定中的空白背景。按照本发明，优选至少为 1:1000 或 1:5000 的滴定度。

5

在给予免疫原剂量的任何一天，如果同时使用辅剂，通常剂量大于约  $1\ \mu\text{g}$ /患者，优选大于  $10\ \mu\text{g}$ /患者，如果没有使用辅剂，剂量至少大于  $10\ \mu\text{g}$ /患者。通常大于  $100\ \mu\text{g}$ /患者。按照本发明选择的个体免疫原剂量取决于符合本申请提供的学说的标准剂量和滴定方法。典型的疗法包括在免疫接种后一定时间间隔，如 6 周后，加强注射。另一个疗法包括在免疫接种后 1, 2 和 12 月加强注射。另一个疗法需要两月一次终身注射。选择性地，按照免疫反应的监控不规则地进行加强注射。

10

15

对于用抗体被动免疫接种，剂量范围从约 0.0001 到 100 毫克/千克，优选 0.01 到 5 毫克/千克寄主体重。例如剂量可以是 1 毫克/千克或 10 毫克/千克体重。典型的治疗方法需要每两周一次或一月一次或每 3 到 6 月一次给药，在某些方法中，两个或更多具有不同结合专一性的单克隆抗体同时地给药，在这情况下，每种抗体的给药剂量都在指出的范围内。抗体通常多次给药。单剂量之间的间隔可以是每周，每月或每年。按照针对  $A\beta$  的抗体在患者血液中的水平，间隔还可以是不规则的。选择性地，抗体可以作为持续释放剂型给药，在这种情况下需要的给药次数减少。剂量和频率的变化取决于抗体在患者体内的半衰期。通常，人类抗体显示最长的半衰期，后面是人源化的抗体，嵌合的抗体和非人类的抗体。给药的剂量和频率的变化还取决于是治疗还是预防。在预防应用中，给药剂量相对低，频率相对低，间隔时期长。某些病人的治疗时间延续至他们生命的剩余部分。在治疗的应用中，有时需要剂量相对高，间隔相对短，给药需要维持到疾病的进展被减缓或终止，优选直到患者的病症表现出部分的或完全的改善。此后，可以给予患者预防治疗。

20

25

30

核酸编码免疫原的剂量为每位患者约 10ng 到 1 克, 100ng 到 100mg, 1  $\mu$ g 到 10mg, 或 30-300  $\mu$ g DNA。传染性的病毒载体剂量为每剂量 10-100 或更多病毒粒子。

5

用于预防和/或治疗的诱导免疫反应的药剂的给药方式可为肠胃外的, 局部的, 静脉内的, 口服的, 皮下的, 腹膜内的, 鼻腔内的或肌肉的。致免疫的药剂典型的给药途径是肌肉的(i.m.), 静脉内的(i.v.)或皮下的(s.c.), 虽然其他途径可以同样地有效。最典型的肌肉注射在臂或腿肌肉内进行。在某些方法中, 药剂直接注射进入具有沉淀积聚的特定组织, 例如颅内的注射。对于抗体给药, 优选肌肉注射或静脉内的注入。在某些方法中, 特殊的治疗抗体直接地注射进入颅内。在某些方法中, 抗体以持续释放组合物或装置, 如 Medipad™ 装置给药。

15

本发明药剂可以选择性地与其他的药剂结合给药, 其他的药剂在淀粉样变性病的治疗中至少部分地有效。对于淀粉样的沉淀出现在脑中的阿尔茨海默病和唐氏先天愚症, 本发明药剂还可以与可增加本发明药剂越过血脑屏障的其他的药剂结合给药。此外, 如同针对一个斑点组分的抗体和针对不同的斑点组分的一种免疫原的组合, 包含用来引起针对超过一个淀粉样组分免疫反应的免疫原的治疗混合剂也属于本发明的范围。

20

本发明致免疫的药剂, 如肽, 有时与辅剂结合给药。许多辅剂可被用于与肽如 A $\beta$  结合, 引发免疫反应。优选的辅剂放大免疫原固有的反应, 而不导致影响反应性质的免疫原构象的变化。优选的辅剂包括氢氧化铝和磷酸铝, 3De-O-酰化的单磷酰基脂 A (MPL™) (见 GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, now part of Corixa)。Stimulon™ QS-21 是从在南美洲发现的皂树皮 (Quillaja Saponaria Molina) 中分离的三萜烯苷或皂草苷(见 Kensil 等人, in Vaccine Design : The Subunit and Adjuvant Approach ( eds. Powell &

30

Newman, Plenum Press, NY, 1995)US 专利 No. 5, 057, 540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA)。其他的辅剂是水包油乳化液(如角鲨烯或花生油),选择性地与免疫刺激剂结合,如单磷酸脂 A(见 Stoute 等, N. Engl. J. Med. 336, 86-91(1997))。另一个辅剂是 CpG(WO 98/40100)。选择性地, A $\beta$  可以与辅剂偶联。但是,这样的偶联不应该实质上转变 A $\beta$  的构象以致影响其免疫反应的性质。辅剂可以作为治疗组合物的组分与活性剂一起给药,或可以分别地给药,可在治疗剂给药之前,同时,或之后给药。

5

10 辅剂的优选类别是铝盐,如氢氧化铝,磷酸铝,硫酸铝。这样的辅剂使用时可以有或者没有其他特定的免疫刺激药剂如 MPL 或 3-DMP, QS-21 聚合的或单体的氨基酸如聚谷氨酸或聚赖氨酸。另一类辅剂是水包油型乳液制剂。使用这样的辅剂时可以有或者没有其他的特定的免疫刺激剂如胞壁酰肽(例如, N-乙酰胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酸胺( thr-MDP), N-乙酰基-去甲胞壁酰基-L-丙氨酸-D 异谷氨酸胺(nor-MDP), N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸-L-丙氨酸-2-(1'2'-二棕榈酰-sn-甘油基-3-羟基磷酸基氧基)-乙胺(MTP-PE), N-乙酰葡萄糖胺基-N-乙酰胞壁酰-L-Ala-D-异谷氨酸-L-Ala-二棕榈酰氧丙酰胺 (DTP-DPP) theramide™, 或其他的细菌细胞壁组分。水包油乳化剂包括(a)

15 MF59 (WO 90/14837), 含有 5%角鲨烯, 0.5%吐温 80 和 0.5%斯潘 85(选择性地含各种量的 MTP-PE)使用如 Model 110Y (Microfluidics, Newton MA)的微流化器配制成亚微细粒, (b)SAF, 含 10%角鲨烯, 0.4%吐温 80, 5%普卢兰尼克-嵌段聚合物 L121, 和 thr-MDP, 既可微流体化成亚微细粒乳剂或涡流产生较大粒子尺寸的乳剂, 和(c)Ribi™ 辅剂体系

20 (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT)含 2%角鲨烯, 0.2%吐温 80, 和一种或多种选自单磷酸脂 A, trehalose dimycolate (TDM)和细胞壁骨架(CWS)的细菌细胞组分, 优选 MPL+CWS(Detox™)。另一类优选的辅剂是皂草苷辅剂, 如 Stimulon™(OS 21; Aquila, Framingham, MA)或由如 ISCOMs(免疫刺激复合物)和 ISCOMATRIX 产生的颗粒。

25 其他的辅剂包括弗氏不完全佐剂(IFA), 细胞因子, 如白细胞间介素

30

(IL-1, IL-2 和 IL12), 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和肿瘤坏死因子(TNF)。这样的辅剂通常可以从市场中获得。

5 辅剂可以与免疫原作为单一的组合物给药, 或可以在免疫原给药之前, 同时或之后给药。免疫原和辅剂可以在同一个小瓶包装和供给, 或可以在分离的小瓶包装, 在使用之前混合。免疫原和辅剂通常用一个标明想要治疗的应用的标签包装。如果免疫原和辅剂分别包装, 该包装通常包括使用之前混合的指导。辅剂和/或载体的选择取决于以下因素: 包含辅剂的剂型的稳定性, 给药途径, 剂量日程表, 和辅剂对被接种物种的效果。对于人类, 优选的药学上可接受的辅剂是由相关的管理机构批准供人类使用的辅剂。这样的优选供人类使用的辅剂的例子包括明矾, MPL 和 QS-21。选择性地, 可同时使用两种或多种不同的辅剂。优选的组合包括明矾与 MPL, 明矾与 QS-21, MPL 与 QS-21, 和明矾、QS-21 和 MPL 共同使用。此外, 可使用弗氏不完全佐剂  
10 (Chang 等, *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186(1998)), 并可以选择性地与明矾, QS-21 和 MPL 以及它们的所有组合结合。  
15

20 本发明药剂经常作为含有活性治疗剂和许多其他药学上可接受的组分的药物组合物给药。见 *Remington's Pharmaceutical Science* (19th ed., 1995)。优选的形式取决于预定的给药方式和治疗的应用。该组合物还可以包括, 根据所要求的制剂, 药学上可接受的, 无毒的载体或稀释剂, 它们被称为赋形剂, 通常用于配制供动物或人类使用的药物组合物。需要选择该稀释剂, 以便不影响该组合的生物活性。这样的稀释剂的例子是蒸馏水, 生理磷酸缓冲盐水, 林格氏溶液, 葡萄糖溶液和汉克 (Hank) 溶液。另外, 该药物组合物或制剂还可能包括其他载体, 辅剂, 或无毒的, 非治疗的, 非免疫的稳定剂等等。  
25

30 药物组合物还可以包括大的, 新陈代谢慢的高分子物质如蛋白质, 多糖如脱乙酰壳多糖, 聚乙酸, 聚乙醇酸和共聚物(如乳胶功能化的琼脂糖凝胶, 琼脂糖, 纤维素等等), 聚合的氨基酸, 氨基酸共聚物

和脂质集合体(如油珠或脂质体)。另外，载体可以起免疫刺激药剂的作用(即，辅剂)。

5 对于肠胃外给药，本发明药剂可以作为可注射的溶液或悬浮液剂  
给药，其中活性物质分散于生理学可接受的稀释剂与药物载体，它们  
可以是无菌的液体如水、油类、盐水、甘油或乙醇。另外，组合物还  
可以存在辅助的物质，如润湿剂或乳化剂、表面活性剂、pH 缓冲物  
10 质等等。药物组合物的其他组分为石油产品、动物、植物或人造物质  
例如，花生油、豆油和矿物油中的成分。通常，二醇如丙二醇或聚乙  
二醇是优选的液体载体，特别是可注射的溶液。抗体可以以储留注射  
剂或注射制剂形式给药，注射制剂的配制方式应保证活性成分持续释  
放。典型的组合物包含 5 毫克/毫升单克隆抗体，配制于由 50 mM L-  
组氨酸，150mM NaCl 组成的含水缓冲液中，用 HCl 调节 pH 为 6.0。

15 典型地，可注射的组合物制剂既可作为液体溶液也可作为悬浮  
液；也可以制成适于在注射前在液体赋形剂中形成溶液或悬浮液的固  
体形式。如上所述，此外该制剂还可以在脂质体或微颗粒如聚交酯，  
聚乙交酯或共聚物中乳化或形成胶囊，以增强辅剂作用，(见 Langer,  
Science 249, 1527(1990)和 Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28,  
20 97-119(1997)。本发明药剂可以以储留注射剂或注射制剂的形成给药，  
注射制剂的配制方式应保证活性成分持续或脉冲释放。

适于以其他的方式给药的其他制剂包括口服的，鼻腔内的和肺吸  
入制剂，栓剂和透皮制剂。

25

对于栓剂，粘合剂和载体包括，例如，聚亚烷二醇或甘油三酯；  
这样的栓剂由含 0.5%到 10%，优选 1%-2%活性成分的混合物组成。  
口服制剂包括赋形剂，如药物品级的甘露糖醇，乳糖，淀粉，硬脂酸  
镁，糖精钠，纤维素和碳酸镁。这些组合物的形式可为溶液，悬浮液，  
30 片剂，丸剂，胶囊，持续释放制剂或粉末，含有 10%-95%，优选 25%-70%

的活性成分。

5 局部施用可以导致透皮或皮内释放。局部的给药可以通过与其他药物，包括霍乱菌毒素或其解毒衍生物或亚单位或其他相似的细菌毒素共同给药而便利(见 Glenn 等, *Nature* 391, 851(1998))。共同给药可以通过使用作为混合物或作为化学交联得到的连接分子或作为融合蛋白的表达实现。

10 选择性地，使用皮肤斑贴或使用转移体 (transferosomes) 可以完成透皮释放(Paul 等, *Eur. J. Immunol.* 25, 3521-24(1995); Cevc 等, *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201 -15(1998))。

#### F.诊断方法

15 本发明提供检测针对阿尔茨海默氏病患者或易患阿尔茨海默氏病患者的 A $\beta$  肽的免疫反应的方法。该方法对监控患者使用药物的治疗过程特别有用。该方法可用于监控对有症状病人的治疗和对无症状的病人的预防性治疗。该方法可用于监控自动免疫法(例如，在对免疫原给药作出响应而产生抗体)和被动免疫接种(例如，测量抗体给药的水平)。

20

##### 1.自动免疫法

25 某些方法需要测定给药之前患者的免疫反应基准值，并与治疗后的免疫反应比较。该免疫反应值显著增加(即，大于重复测量同一样品时的实验误差的一般的差额，该差额表示为该测量的一个标准偏差)为正性治疗结果的信号(即，该药剂给药实现或放大了免疫反应)。如果免疫反应值没有明显的变化或降低，表明为负性治疗结果。通常，经历过使用免疫原剂治疗的最初过程的患者预计显示随连续的剂量增加的免疫反应，最后到达平稳状态。尽管免疫反应增加，通常继续给药。达到平稳状态表示可以中止或降低给药剂量或频率。

30

在另外的方法中，免疫反应的对照值(即，平均加标准偏差)由对照群体决定。典型地，对照群体中的个体先前未接受治疗。然后将患者治疗剂给药后的免疫反应测定值与对照值相比较。相对于对照值的显著增加(例如，大于平均值的一个标准偏差)显示正性治疗结果。无显著的增加或降低显示负性治疗结果。尽管免疫反应相对于对照值增加，通常继续给药。如前所述，达到相对于对照值的平稳状态显示可以中止或降低给药剂量或频率。

在另外的方法中，免疫反应的对照值(例如，平均值加标准偏差)由具有使用治疗剂治疗的经历并且其对治疗的免疫反应达到平稳状态的个体的对照群体决定。患者免疫反应测定值与该对照值比较。如果患者的测量水平与对照值无明显的不同(例如超过一个标准偏差)，治疗可以停止。如果该水平显著地低于该对照值，药剂给药可以继续。如果患者的该水平持续在该对照值以下，应该改变治疗方法，例如，可能表示需要使用不同辅剂。

在另外的方法中，监控目前不接受治疗但是具有上述治疗经历的患者的免疫反应，以确定是否需要恢复治疗。可以将该患者的免疫反应测定值与患者以前疗程后实现的免疫反应值比较。相对于早先的测量值的显著降低(即，大于相同样品重复测量时的一般的误差界限)显示治疗可以重新开始。或者，患者的上述测量值可以与经历一个疗程后的病人群体的对照值(平均值加标准偏差)比较。或者，患者的该测定值可以与无病症的预防治疗病人的群体，或显示疾病特征改善的治疗病人的群体的对照值比较。在所有这些情况中，相对于对照水平显著的降低(即，超过一个标准偏差)显示患者的治疗应该重新开始。

用于分析的组织样品通常是来自患者的血液，血浆，血清，粘液或脑脊髓液。分析样品以指示对感兴趣的淀粉样组分，如任何形式的A $\beta$ 肽的免疫反应。可以从，例如，与感兴趣的组分，如A $\beta$ 肽结合的抗体或T细胞的存在测定免疫反应。检测对A $\beta$ 特异性的抗体的

ELISA 方法描述于实施例章节，并可以被用于另外的肽抗原。检测活性 T 细胞的方法在本领域为大家所熟知。

## 2.被动免疫接种

5           通常，用于监控被动免疫接种的方法类似于上面描述的监控自动免疫法的方法。可是，被动免疫接种后的抗体分布图通常显示抗体浓度快速的顶点，后面是指数式衰减。不加另外的剂量，在数天到数月的一段时期下降到接近处理前的水平，这取决于给药抗体的半衰期。例如某些人类抗体的半衰期为 20 多天。

10

          在某些方法中，给药之前测量患者对 A $\beta$  抗体的基准值，给药后，很快进行第二次测量，确定抗体水平的峰值，以一定的间隔进行一次或多次另外的测量以监控抗体水平的下降。当抗体水平降至基线或到达预定的顶点减基准值的百分比(例如，50%，25%或 10%)时，应给予另外剂量的抗体。在某些方法中，将峰值顶点或随后的测量值减去背景值与先前对其他病人测定的、具有有益的预防或治疗效果的参考值比较。如果该测量抗体水平显著地小于参考水平(例如，小于受益于治疗的病人群体的参考值的平均值减去一个标准偏差)，表明应该给予另外剂量的抗体。

15

20

## 3.诊断的试剂盒

          本发明还进一步提供了实施上述诊断方法的诊断试剂盒。典型地，这样的试剂盒包含特别地与淀粉样的斑点组分，如 A $\beta$  结合的抗体，或与对该组分特异的 T 细胞反应的药剂。该试剂盒还可以包括标记物。对于 A $\beta$  抗体的探测，该标记物通常是标记的抗个体基因型抗体的形式。对于抗体的探测，药剂可以预先结合到固相，如微量滴定碟的孔中。对于活性 T 细胞的探测，该标记物可以作为 3H-胸腺嘧啶脱氧核苷测量增殖反应。试剂盒也典型地包含该试剂盒用法说明的标记。该标记可能同时包括与具有 A $\beta$  抗体或与 A $\beta$  反应的 T 细胞的水  
25  
30 平的测量标记有关的图表或其他相应的体系。术语标记指在试剂盒的

制造，转运，销售或使用的任何时候附着于或以其他方式伴随试剂盒的任何书写或记录材料。例如，术语标记包括散页广告和小册子，包装原料，指导，录音带或录像带盒，电脑磁盘以及直接在试剂盒上的书写印记。

5

## 实施例

### I. 针对阿尔茨海默氏病(AD)A $\beta$ 的预防效果

这些实施例描述对在位置 717 突变(APP<sub>717V-F</sub>)而过度表达 APP，使其产生阿尔茨海默病样的神经病理的转基因小鼠使用 A $\beta$  42 肽。这些小鼠(PDAPP 小鼠)的准备和特征描述于 Games 等，Nature，同上。10 这些杂合子形式的动物在六月龄前开始沉淀 A $\beta$ 。到十五月龄，它们显示相当于阿尔茨海默氏病的 A $\beta$  沉淀水平。对 PDAPP 小鼠注射聚集的 A $\beta$  42(聚集的 A $\beta$  42)或磷酸盐缓冲盐水。选择聚集的 A $\beta$  42 是因为它具有诱导针对 A $\beta$  多表位的抗体的能力。

15

#### A. 方法

##### 1. 小鼠的来源

将三十只 PDAPP 异种的雌性小鼠随机地分成下列的组:10 只小鼠用于注射聚集的 A $\beta$  42(一只死于运输)，5 只小鼠注射 PBS/辅剂或 20 PBS，10 只为未注射对照组。五只小鼠注射从血清淀粉样蛋白(SAP)序列衍生的肽。

##### 2. 免疫原的制备

聚集的 A $\beta$  42 的制备：将二毫克 A $\beta$  42 (US Peptides Inc, lot K - 25 42 - 12)溶于 0.9 毫升水，通过添加 0.1 毫升 10x PBS 达到 1 毫升。将其涡流并在 37°C 温育过夜，以此条件下肽发生聚集。不用的 A $\beta$  以冻干粉末在 -20°C 保存直到下次注射。

应当注意的是，当使用市场上可买到的肽时，干重可能包括盐的重量；除非另有说明，本申请全部的实施例所述的重量包括盐的重量。30

可使用该制剂的标准测定法，如氮测定，与已知的组合物结合，测定肽的精确质量。

### 3.注射制剂

5           每次给小鼠注射处于PBS中的100  $\mu$ g聚合的A  $\beta$  42，用完全弗氏佐剂( CFA)乳化使乳剂最终体积为400  $\mu$ l，用于第一次免疫接种。2周内接着增加同样量的弗氏不完全佐剂( IFA)中的免疫原。以每月的间隔给予两次附加剂量(IFA中的)。随后按每月间隔以500  $\mu$ l PBS免疫接种。腹膜下注射(i.p.)。

10

按照相同的日程表注射PBS，每只小鼠注射400  $\mu$ l PBS/辅剂1:1混合物，或每只小鼠注射500  $\mu$ l PBS。SAP注射同样遵循相同的日程表，每次注射的剂量为100  $\mu$ g。

15

### 4.小鼠血液的滴定，组织制备和免疫组织化学

上述方法在下文的“一般原料和方法”中描述。

### B.结果

20           对PDAPP小鼠注射聚集的A  $\beta$  42(聚集的A  $\beta$  42)，SAP肽，或磷酸盐缓冲盐水。一组PDAPP小鼠剩下作为未注射的，阳性的对照。隔月监控小鼠对聚集的A  $\beta$  42的滴定度，从第四个月直到该小鼠一岁。小鼠在13月龄死亡。在所有测试点中，九分之八的聚集A  $\beta$  42的小鼠产生高抗体滴度，在全部一系列注射中持续很高(滴定度大于1/10000)。九分之一小鼠具有低的，但是可测量的滴定度，大约1/1000(图1，表3)。

25           对于这个免疫原，SAPP注射小鼠具有1:1,000到1:30,000的滴定度，只有唯一的小鼠超过1:10,000。

表 3A: 注射聚集 Aβ 的小鼠在 50%最高 O.D. 的滴度

PDAPP 月龄	100	101	102	103	104	105	106	107	108
4	70000	150000	15000	120000	1000	15000	50000	60000	100000
6	15000	65000	30000	55000	300	15000	15000	50000	60000
8	20000	55000	50000	50000	400	15000	18000	50000	60000
10	40000	20000	60000	50000	900	15000	50000	20000	40000
12	25000	30000	60000	40000	2700	20000	70000	25000	20000

表 3B: 注射 1/100 免疫原的 PBS 的小鼠在 50%最高 O.D.的滴度

PDAPP 月龄	113	114	115	116	117
6	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg
10	5 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg
12	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg

5            在六，十和十二月将来自PBS处理的小鼠的血清进行针对聚集的 Aβ42 滴定。以 PBS1/100 稀释物注射小鼠，针对聚集的 Aβ42 滴定，只有一个数据点超过背景4倍，而在所有其他时间点都小于背景的4倍(表 3)。SAP 特定反应在这些时间点可以忽略，滴定度都小于300。

10           聚集的 Aβ 1-42 处理组九只小鼠中的七只的脑中并没有检测到淀粉样变性。相反，SAP 和 PBS 组小鼠大脑的海马体，以及额侧和扣带皮层的脑组织包含许多的淀粉样的沉淀。沉淀图谱类似于未经处理的对照组，特征为包括有弱点的亚区，如海马体齿状脑回的外分子层。Aβ 1-42 注射组的一只小鼠大大地减少淀粉样的负荷，限于海马体内。

15           分离的斑点与另一只 Aβ 1-42 处理组小鼠等同。

             海马体淀粉样的负荷的定量图像分析证实了 Aβ 42(AN1792)处理动物实现极大的减少(图2)。PBS组(2.22%)和未经处理的控制组(2.65%)的淀粉样的负荷的平均值显著地大于 AN1792 免疫组(0.00%，p=0.0005)。相反，SAP 肽(SAPP)免疫组平均值是5.74%。未经处理的

20

对照组小鼠海马体，以及脾后皮层脑组织包含许多的A $\beta$ 淀粉样的沉淀，将其用A $\beta$ 特异的单克隆抗体(mAb)3D6检验。在SAPP或PBS免疫的小鼠中也可见淀粉样的沉淀的相似图谱(图2)。另外，后面的三个组的特征为包括有弱点的脑亚区，一般在AD可见，如海马齿状回的外分子层，三个组都可发现。

5

不包含A $\beta$ 沉淀的脑也没有在具有人类APP抗体8E5的PDAPP小鼠中检验的神经炎的斑点。来自其他组的所有脑(SAP-注射，PBS和未注射小鼠)具有许多的未经处理的PDAPP小鼠的一般的神经炎的斑点。少数神经炎斑点存在于用AN1792处理的一只小鼠中，在用AN1792处理的第二只小鼠中发现营养不良的轴突的单一的簇。海马体的图像分析显示于图3，证明AN1792处理小鼠(平均值0.00%)比PBS处理小鼠(平均值0.28%， $p=0.0005$ )更有效消除营养不良的轴突。

10

A $\beta$  1-42注射组脑中也没有星形细胞增生斑点有关的炎症。其他组小鼠的大脑包含大量的和成簇的GFAP-阳性的星形细胞，典型的A $\beta$ 斑点有关的神经胶质增生。将GFAP起作用的载玻片用硫代吡黄素S复染定位A $\beta$ 沉淀。在SAP，PBS和未经处理的对照组中GFAP阳性的星形细胞与A $\beta$ 斑点有关。在负性斑点A $\beta$  1-42处理的小鼠中没有发现此种相关性，而在一只用AN1792处理的小鼠中识别出了最低与斑点相关的神经胶质增生。

15

20

显示于图4的脾后皮层的图像分析证实，用AN1792处理组显著地减少星形细胞增生，平均值为1.56%，比SAP肽、PBS免疫组或未经处理的组平均值大6%( $p=0.0017$ )。

25

来自A $\beta$  1-42和PBS注射小鼠的子集的证据显示A $\beta$  1-42注射的小鼠未产生与斑点相关的MHCII免疫活性，与缺少A $\beta$ 有关的炎症性反应一致。

30

5 该小鼠脑切片也与MAC-1，一种细胞表面蛋白，特异的单克隆抗体mAb起反应。MAC-1(CD11b)是整联蛋白族单元，与CD18形成杂二聚物存在。CD11b/CD18复合体存在于单核细胞，巨噬细胞，嗜中性白细胞和天然杀伤细胞(Mak和Simard)。脑中MAC-1-反应细胞型可能是以MAC-1免疫反应中的相似表型的形态学为基准的小神经胶质。用AN1792处理小鼠的脑中的与斑点相关的MAC-1标记物小于PBS对照组，与缺乏A $\beta$ 诱导炎症性的反应一致。

### C.结论

10 A $\beta$  1-42注射小鼠脑中的A $\beta$ 斑点，反应性二乙基溴乙酰胺和神经胶质增生变化的缺乏显示它们的脑中没有或仅有很少的淀粉样的沉淀，不存在如神经胶质增生和神经炎病状的病理的结果。用A $\beta$  1-42处理的PDAPP小鼠基本上与对照组非转基因小鼠相同，无病理反常。因此，A $\beta$  1-42注射在防止人类脑组织A $\beta$ 沉淀或间隙，消除随后的二乙基溴乙酰胺和炎症性的退行性病变方面卓有成效。因此，使用A $\beta$ 肽  
15 可以预防和治疗AD。

### II.剂量反应研究

20 用300，100，33，11，3.7，1.2，0.4，或0.13 $\mu$ g配制于CFA/IFA中的A $\beta$ 腹膜下给药，使五周龄雌性Swiss Webster小鼠组(N=6每组)免疫。以双周间隔给药三次，一个月以后第四次给药。首次给药用CFA乳化，其余用IFA乳化。第二次给药后，免疫接种后4-7天给动物放血，测量抗体滴度。用11，33，300 $\mu$ g抗原免疫的动物以大约每月一次的间隔另外放血四个月，接着第四次免疫接种，监控大范围剂量致免疫  
25 制剂抗体反应的下降。开始研究后七个月动物接受最后的第五次免疫接种。一周以后将其杀死，测量对AN1792的抗体反应，进行毒理学分析。

30 观察从300到3.7 $\mu$ g的下降剂量反应，在两个最低的剂量没有反应。11-300 $\mu$ g抗原3个剂量后的平均抗体滴度约1:1000，4个剂量后约

1:10,000(见图5)。

5 尽管抗体滴度显著地增长，第三次免疫接种之后最低的剂量组使 GMTs在从5到25倍范围内增加。甚至0.4  $\mu$  g时也可检测到低抗体反应。 1.2和3.7  $\mu$  g组具有与约1000的GMTs可比较的滴定度，最高的四个剂 量与约25000 GMTs接近，只有33  $\mu$  g剂量组具有降低的3000 GMT。第 四次免疫接种后，对于大多数组滴定度增加更加缓慢。清晰的剂量反 应跨越从0.14  $\mu$  g到11  $\mu$  g的抗原剂量组，0.14  $\mu$  g时没有可检测出的抗 10 体，11  $\mu$  g时GMT为36000。此外，11到300  $\mu$  g四个最高的剂量组的滴 定度拥挤在一起。因此，两次免疫接种后，抗体滴度取决于抗原剂量， 该剂量跨越0.4到300  $\mu$  g的范围。通过第三次免疫接种，最高的四个剂 量的滴定度都类似，附加免疫接种后保留在平稳状态。

15 第四次免疫接种后一个月，300  $\mu$  g组滴定度比免疫接种后五天取 得的血液计算的滴定度高2到3倍(图6)。这个结果显示顶点记忆的抗体 反应发生于免疫接种后5天。在33  $\mu$  g剂量可观察到更适度的(50%)增 加。最后一次剂量后两个月，300  $\mu$  g剂量组GMTs急剧地下降约70%。 另一个月后，下降幅度减小，为45%(100  $\mu$  g)，33和11  $\mu$  g剂量组约为 14%。因此，免疫接种停止后循环抗体滴定度递减速度好象是双相的， 20 最大灵敏度后第一个月急剧下降，随后是适度比率的降低。

25 Swiss Webster小鼠的抗体滴度和反应动力学类似于以并行方式免 疫的年轻的杂合的PDAPP转基因小鼠。诱导人类免疫反应的有效剂量 典型地类似于小鼠的有效剂量。

### III. 针对形成的AD的治疗效能的筛选

这个测定用来试验致免疫的药剂阻止或换向年长的动物AD的神 经病理特征的活性。42个氨基酸的长链A  $\beta$  (AN1792)的免疫接种从淀 粉样的斑点已经存在于PDAPP小鼠的脑中开始。

30

在这个用于本研究的时间过程中，未经处理的PDAPP小鼠产生一些神经变性的变化，类似于AD中发现的变化(Games等，同上和Johnson-Wood等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550-1555(1997))。A $\beta$ 沉淀变成淀粉样的斑点与由称为营养不良的轴突异常的轴突和树突成份组成变性的二乙基溴乙酰胺反应有关。被营养不良的轴突包围并包含营养不良的轴突的淀粉样的沉淀被称为神经炎斑点。AD和PDAPP小鼠的具有与众不同的球状组织的营养不良的轴突是免疫活性的，具有辨认APP和细胞骨架组分的抗体的嵌板，并显示超微结构水平的复合体亚细胞退行性病变。这个特征对应于PDAPP脑中的神经炎的蚀斑形成的疾病，选择的和可重构的测量。用对于人类APP(单克隆抗体8E5)特定的抗体容易地检验PDAPP神经炎的斑点的营养不良的二乙基溴乙酰胺组分，也可通过计算机辅助的图像分析容易地测量。因此，除测量AN1792关于淀粉样的蚀斑形成的作用之外，我们监控这个治疗对于神经炎的营养不良的发展的作用。

15

星形细胞和小神经胶质是响应和反射二乙基溴乙酰胺伤害度的非二乙基溴乙酰胺细胞。GFAP-阳性的星形细胞和MHCII-阳性的小神经胶质常见于AD，随着疾病的严重，它们的活性提高。因此，我们也监控AN1792-处理小鼠的活性的星形细胞和小神经胶质细胞的发展。

20

#### A.原料和方法

将四十八只从Charles River得到的11到11.5月龄的杂合的雌性PDAPP小鼠随机地分成两个组：24只小鼠用100  $\mu$ g AN1792免疫，24只小鼠用PBS免疫，均与弗氏佐剂相结合。到达~15月龄时AN1792和PBS组再一次分组。在15月龄各将AN1792-和PBS-处理组大约一半的动物安乐死(n=10和9，分别地)，其余的继续接受免疫接种直到在18月时结束(n=9和12，分别地)。总共8只动物(5只AN1792，3只PBS)死于研究期间。除免疫动物之外，将一岁(n=10)，15个月大(n=10)和18个月大(n=10)未经处理的PDAPP小鼠进行ELISAs对比，测量脑中A $\beta$ 和APP水平；一岁动物也将包括在免疫组织化学的分析内。

30

除非另有说明，方法如同实施例I。AN1792的US肽lot 12和加利福尼亚肽lot ME0339用来制备抗原，用于在15个月时点之前的六种免疫接种给药。加利福尼亚肽lots ME0339和ME0439用于在15和18月之间的三次附加免疫接种给药。

为了免疫接种，将200  $\mu$  l PBS中的100  $\mu$  g AN1792或单独的PBS用完全弗氏佐剂(CFA)或弗氏不完全佐剂(IFA) 1:1 (vol:vol)乳化或PBS的最终体积为400  $\mu$  l。第一次免疫接种用CFA作为辅剂进行，接下来四个剂量用IFA进行，最后的四个剂量用不添加辅剂的PBS进行。总共九次免疫接种经历七个月周期，前三个剂量预定两周内完成，后面剩余的注射的间隔为四周。四个月试验组，安乐死在15月龄进行，只接收到第一个6次免疫接种。

## 15 B. 结果

### 1. A $\beta$ 42 ( AN1792)对于淀粉样的负荷的治疗效果

通过显示于图7的定量的图像分析测定AN1792治疗治疗皮层的淀粉样负荷的结果。未经处理的12个月大的PDAPP小鼠组的皮层的淀粉样负荷的平均值是0.28%，表示研究开始时小鼠产生斑点。在18个月，在PBS处理组淀粉样的负荷增加17倍达到4.87%，而AN1792处理小鼠大大地减少了淀粉样的负荷，仅为0.01%，明显小于12月龄未经处理的和15和18月龄PBS处理组。接受AN1792组在15月(96%减少； $p=0.003$ )和18月(>99%减少； $p=0.0002$ )显著地降低了淀粉样的负荷。

典型地，PDAPP小鼠皮层的淀粉样沉淀开始在额侧和脾后皮层(RSC)，在腹侧横向发展，到达颞部和内鼻部皮层(EC)。在12月龄小鼠EC中很少或没有发现淀粉样变性，这接近AN1792第一次给药的年龄。AN1792治疗4个月后，RSC中淀粉样的沉淀大大地减少，通过AN1792治疗，EC的进行性介入完全消除。后面的观测显示AN1792完全停止了一般侵入颞的和腹侧的皮层的淀粉样变性的的发展，而且阻止

或可能反转了RSC中的沉淀。

5 通过已经处理七个月的18月组可以进一步证明AN1792治疗PDAPP对小鼠生长的皮层淀粉样负荷的优良效果。AN1792处理小鼠中发现皮层的淀粉样变性接近完全消失，分散斑点总数减少，致密的沉淀也在减少。

## 2.A $\beta$ 42(AN1792)治疗有关的细胞和形态变异

10 A $\beta$ 阳性细胞群体发现于典型地包含淀粉样沉淀的脑区。明显地，接受AN1792的几例中，极少或没有发现细胞外的皮层淀粉样斑点。大多数A $\beta$ 免疫活性似乎包含在具有大量小叶片的细胞或块状体细胞内部。显形地，这些细胞类似激活的小神经胶质或单核细胞。它们是免疫活性的，具有辨认通过激活单核细胞和小神经胶质(MHC II和CD11b)表达的配位体的抗体，偶而与血管的壁或腔有关。比较用有A $\beta$ 和  
15 MHCII特异的抗体标记的邻近的切片，显示这些细胞的放射性物质通过两类抗体辨认。详细检查AN1792处理的脑，显示MHCII阳性的细胞只限于这些动物保留的淀粉样变性的邻近位置。在使用的固定条件下，该细胞对于辨认T细胞(CD3, CD3e)或B细胞(CD45RA, CD45RB)配位体或白血球共同抗原(CD45)的抗体没有免疫活性，但是对于辨认  
20 与单核细胞交叉反应的白涎(leukosialin)(CD43)是有活性的。在任何PBS处理小鼠中未发现这样的细胞。

25 PDAPP小鼠在海马体齿状回外分子层恒定地生长大量淀粉样沉淀。沉淀在穿通(perforant)通道内部形成明显的条纹，AD中传统地包含淀粉样的斑点的亚区。PBS处理小鼠特征性地出现这些沉淀，类似于未经处理的PDAPP小鼠先前的特性。由分散和致密的斑点组成的淀粉样的沉淀为连续带状形式。相反，一些来自AN1792处理小鼠大脑的图谱彻底改变了这种形式。海马体淀粉样的沉淀不再包含扩散的淀粉样变性，该带状的图谱完全分裂。反而，存在一些异常的疹壳构造，  
30 它们与抗A $\beta$ 抗体反应，有些好象是包含淀粉样变性的细胞。

MHC II阳性细胞经常在AN1792处理动物的细胞外的淀粉样变性附近观察到。与具有淀粉样变性的A $\beta$ 阳性细胞有关的图谱与某些来自AN1792处理小鼠的大脑非常相似。这些单核细胞的分布只限于淀粉样的沉淀的附近，缺少A $\beta$ 斑点的其他大脑区域完全不存在。

5

MHC II和MAC I标记的切片的定量图像分析显示AN1792处理小鼠的RSC和海马体免疫活性比PBS组趋向增加，这对于海马体MAC I活性的测量具有意义。

10

这些结果显示大脑区域斑点中的淀粉样变性可用活性的细胞调解的方法除去。

### 3. AN1792对A $\beta$ 水平的影响: ELISA测定

#### (a) 皮层水平

15

在未经处理的PDAPP小鼠中，12月龄皮层中总的A $\beta$ 水平的平均值是1,600ng/g，15月时增加到8,700ng/g(表4)。在18月该值为22,000ng/g，在实验的时间过程期间增加超过10倍。PBS处理动物15月时总的A $\beta$ 为8,600ng/g，在18月增加到19,000ng/g。相反，AN1792处理动物在15月时总的A $\beta$ 比PBS免疫组减少81%(1,600ng/g)。18月时AN1792组总的A $\beta$ (5,200ng/g)比PBS组显著地减少(p=0.0001)(表4)，换句话说A $\beta$ 的存在减少72%。比较皮层的A $\beta$  42水平得到相似的结果，即AN1792处理组包含少得多的A $\beta$  42，但在这种情况下，在15月(p=0.04)和18月(p=0.0001，表4)时，AN1792和PBS组的差异是显著的。

25

表4: 皮层中平均A $\beta$ 值 (ng/g)

	未处理			PBS			AN1792		
月龄	总值	A $\beta$ 42	(n)	总值	A $\beta$ 42	(n)	总值	A $\beta$ 42	(n)
12	1,600	1,300	10						
15	8,700	8,300	10	8,600	7,200	9	1,600	1,300*	10
18	22,200	18,500	10	19,000	15,900	12	5,200**	4,000**	9

\*p=0.0412

\*\*p=0.0001

(b)海马体水平

5 在未经处理的PDAPP小鼠中，十二月龄组海马体中总的Aβ水平的平均值是15,000ng/g，15月时增加到51,000ng/g，18月时增加到81,000ng/g(表5)。同样地，PBS免疫小鼠在15月和18月分别地显示40,000ng/g和65,000ng/g。

10 AN1792免疫动物显示较少的总的Aβ，在15月和18月各自为25000ng/g和51000ng/g。AN1792处理组18月时的值比PBS处理组显著地降低(p=0.0105；表5)。Aβ42的测量给出相同的结果图谱，即在18月时评价的AN1792处理组水平比PBS组显著地降低(分别为39,000ng/g对57,000ng/g，p=0.002)(表3)。

表 5: 海马体中平均 Aβ 值 (ng/g)

	未处理			PBS			AN1792		
月龄	总值	Aβ42	(n)	总值	Aβ42	(n)	总值	Aβ42	(n)
12	15,500	11,100	10						
15	51,500	44,400	10	40,100	35,70	9	24,50	22,100	10
18	80,800	64,200	10	65,400	57,10	12	50,90	38,900**	9

15 \*p=0.0105  
\*\*p=0.0022

(c)小脑的水平

20 12月时，未经处理的PDAPP小鼠小脑的总的Aβ水平的平均值是15ng/g(表6)。在15月，这些平均值增加到28ng/g，18月增加到35ng/g。PBS处理动物15月时总的Aβ的平均值为21ng/g，在18月增加到43ng/g。AN1792处理动物15月时总的Aβ为22ng/g，18月时的总的Aβ(25ng/g)明显少于(p=0.002)PBS组的相应值(表6)。

表 6: 小脑中平均 A $\beta$  值 (ng/g)

	未处理		PBS		AN1792	
月龄	总 A $\beta$	(n)	总 A $\beta$	(n)	总 A $\beta$	(n)
12	15.6	10				
15	27.7	10	20.8	9	21.7	10
18	35.0	10	43.1	12	24.8*	9

\* p=0.0018

#### 4. AN1792治疗对APP水平的效果

5 APP- $\alpha$  和全长的APP分子都包含全部的或部分的A $\beta$ 序列, 因此可能通过AN1792引导的免疫反应影响。在研究数据中, APP水平轻微的增加显示PDAPP小鼠神经病理学的增加。在皮层中, 通过治疗该皮层的APP- $\alpha$ /FL(全长)或者APP- $\alpha$ 的水平基本上无变化, 但是AN1792处理组比PBS处理组的APP- $\alpha$ 在18月时减少了19%。AN1792处理组18月时的APP值与未经处理组的12月和15月时和PBS组15月时的值没有显著的不同。

在所有情况下, APP值仍然处于通常在PDAPP小鼠中所发现的范围。

#### 5. AN 1792治疗神经变性的和神经胶质增生反常的效果

15 AN1792处理小鼠比PBS组在15(84%; p=0.03)和18(55%; p=0.01)月龄额侧的皮层神经炎的斑点负荷显著地降低(图8)。PBS组15到18月龄时的神经炎的斑点负荷的平均值从0.32%增加到0.49%。与此形成对照, ANI792组神经炎的斑点的发展大大地减少, 在15和18月组神经炎的斑点负荷平均值分别地为0.05%和0.22%。

25 ANI792免疫接种似乎具有良好的相容性, ANI792处理小鼠比PBS组在15(56%; p=0.011)和18(39%; p=0.028)月龄时在RSC中的反应性的星形细胞增生显著地降低(图9)。PBS组15和18月时的星形细胞增生百分率的平均值从4.26%增加到5.21%。ANI792处理组在同一时间星形细胞增生分别地降低到1.89%和3.2%。这显示神经纤维网没有被间

隙处理损害。

## 6. 抗体反应

5 如上所述，使十一个月大的，杂合的PDAPP小鼠(N=24)接受100  $\mu$ g被弗氏佐剂乳化的ANI792系列5次免疫接种，在0，2，4，8，和12周腹膜下给药，在16周用PBS单独进行(没有弗氏佐剂)第六次免疫接种。作为阴性对照，使24只相配转基因小鼠在并行位置接受用相同辅剂乳化的PBS的免疫接种，日程表相同。从第二次接种开始，在每次接种的三到七天内给动物放血。通过ELISA测定针对ANI792的抗体反  
10 应。第二，第三和最后(第六)给药后，用ANI792免疫的动物的几何平均滴度(GMT)大约分别为1900，7600，和45000。第六次免疫接种后没有测量到对照动物的A $\beta$ 特异性抗体。

15 大约一半的动物又处理另外的三个月，在大约20，24和27周接受免疫接种。这些剂量在没有弗氏佐剂的单独的PBS赋形剂给药。在此周期内平均抗体滴度无变化。事实上，从第四到第八次放血，抗体滴度看起来保持稳定，这相当于第五到第九次注射的周期。

20 为了测定免疫接种是否诱导A $\beta$ 特异的抗体，即AN1792处理小鼠的血清是否与大脑淀粉样的沉淀有关，将AN1792和PBS处理小鼠切片的子集与抗体特异的小鼠IgG起反应。与PBS相反，AN1792处理大脑中的A $\beta$ 斑点被内源的IgG包裹。两组之间的这些差异可见于15和18月组。特别惊人的是PBS组缺乏标记，尽管这些小鼠中存在大量的淀粉样的负荷。这些结果表明用合成的A $\beta$ 蛋白质免疫接种产生可辨认  
25 并且在体内与淀粉样的斑点中的A $\beta$ 结合的抗体。

## 7. 细胞介导的免疫反应

第九次免疫接种7天后，从九只ANI792免疫和12只PBS免疫的18个月大的PDAPP小鼠除掉脾。将脾细胞分离并且在A $\beta$  40，A $\beta$  42，  
30 或A $\beta$  40-I(倒序蛋白质)存在下培养72小时。促细胞分裂剂ConA充当

阳性对照。最优的反应由 $>1.7 \mu\text{M}$ 蛋白质得到。全部的九只AN1792处理动物的细胞响应A $\beta$  1-40或者A $\beta$  1-42蛋白质增殖，具有与两个蛋白质结合相等的水平(图10，上图)。对A $\beta$  40-1反转蛋白质未反应。对照动物细胞与任何A $\beta$  蛋白质没有反应(图10，下图)。

5

### C. 结论

10 这些研究结果表明PDAPP小鼠AN1792免疫接种使已有的淀粉样的沉淀发展减缓，阻止进行性的淀粉样的沉淀，延迟年长的PDAPP小鼠大脑继发性的神经病理改变。用AN1792免疫接种基本上停止一般属于淀粉样变性的结构的淀粉样的生长。因此，A $\beta$  肽给药可以治疗AD。

## IV. A $\beta$ 片段的筛选

15 用9个不同的区域的APP和A $\beta$  使100只9-11月龄PDAPP小鼠免疫，确定有效传达反应的表位。如上所述，将9种不同的免疫原和一种对照物腹膜内注射。免疫原包括四种人类A $\beta$  肽共轭体1-12、13-28、32-42、1-5，全部通过胱氨酸连接与羊抗小鼠IgG偶联；APP多肽氨基酸592-695，聚集的人类A $\beta$  1-40，聚集的人类A $\beta$  25-35，和聚集的啮齿动物A $\beta$  42。聚集的A $\beta$  42和PBS分别用作正反对照。每试验组使用  
20 十只小鼠。滴定度监控如上，注射4个月后处死小鼠。死后测定组织化学，A $\beta$  水平和毒理学分析。

### A. 材料和方法

#### 1. 免疫原的制备

25 偶联的A $\beta$  肽的制备：通过使用交联试剂硫代EMCS将加入A $\beta$  肽的人造的半胱氨酸偶联，制备四种人类A $\beta$  肽共轭体(氨基酸残基1-5、1-12、13-28和33-42，各自与羊抗小鼠IgG共轭)。该A $\beta$  肽衍生物可用下列最终的氨基酸序列合成。在所有情况下，嵌入半胱氨酸残基的位置通过下划线显示。如下所示，A $\beta$  13-28肽衍生物也具有两个加在羧基末端半胱氨酸之前的甘氨酸残基。  
30

	A β 1-12肽	NH <sub>2</sub> -DAEFRHDSGYEVC-COOH(SEQ ID NO:30)
	A β 1-5肽	NH <sub>2</sub> -DAEFR <u>C</u> -COOH(SEQ ID NO:31)
5	A β 33-42肽	NH <sub>2</sub> - <u>C</u> -氨基庚酸-GLMVGGVVIA-COOH (SEQ ID NO:32)
	A β 13-28肽	Ac-NH-HHQKLVFFAEDVGSNKGGC-COOH (SEQ ID NO:33)

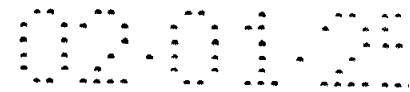
10 为了进行偶联反应，将十毫克羊抗小鼠IgG(Jackson Immuno Research Laboratories)用10mM硼酸钠缓冲液，pH8.5，透析过夜。然后使用Amicon Centriprep管将透析的抗体浓缩到2毫升体积。十毫克硫代-EMCS[N(γ-马来酰亚胺基己酰氧基)琥珀酰亚胺](Molecular Sciences Co.)溶于一毫升去离子水。搅拌下在羊抗小鼠IgG中滴加40倍摩尔过量的硫代-EMCS，然后将该溶液再搅拌十分钟。使激活的羊抗

15 小鼠IgG通过10毫升用0.1M NaPO<sub>4</sub>，5 mM EDTA，pH 6.5平衡的凝胶过滤柱(Pierce Presto Column，得自Pierce Chemicals)纯化并且更换缓冲液。通过280nm的吸收率测定包含片断的抗体，将其汇合并稀释到大约1毫克/毫升的浓度，使用1.4毫克/OD作为消光系数。将40倍摩尔过量的A β 肽溶于20毫升10mM NaPO<sub>4</sub>，pH8.0的缓冲液，其中10毫

20 克A β 33-42肽首先溶于0.5毫升DMSO，然后用10mM NaPO<sub>4</sub>缓冲液稀释到20毫升。肽溶液分别被加到10毫升激活羊抗小鼠IgG，并且在室温下摇动4小时。使用Amicon Centriprep管将所得共轭体浓缩到小于10毫升，然后针对PBS透析，更换缓冲液，并且除去游离的肽。将该共轭体通过0.22 μ m孔径大小过滤器灭菌，然后等分成1毫克的部分并且在

25 在-20℃冷冻存储。使用BCA蛋白质方法(Pierce Chemicals)，使用马IgG标准曲线，测定该共轭体浓度。根据相对于激活羊抗小鼠IgG的共轭的肽的分子量增加证明共轭作用。A β 1-5羊抗小鼠共轭是两个共轭作用的结合，其余来自于单一制剂。

## 30 2. 聚集的A β 肽的制备



将已经在-20℃存储干燥的人类1-40(AN1528; California Peptides Inc., Lot ME0541), 人类1 - 42 ( AN1792; California Peptides Inc.. Lots ME0339和ME0439), 人类25 - 35和啮齿动物1 - 42 ( California Peptides Inc., Lot ME0218)肽的冷冻干燥粉末新鲜溶液化, 制备各类注射剂。

5 为了这个目的, 将两毫克肽加入0.9毫升去离子水, 将该混合物涡旋产生相对均匀的溶液或悬浮液。在四个肽中, AN1528是唯一在此步骤溶解的肽。然后在AN1528开始沉淀时添加100  $\mu$ l 10X PBS等分试样 ( IX PBS : 0.15 NaCl, 0.01 M磷酸钠, pH 7.5)。将该悬浮液再涡旋一次在37℃培养过夜, 以备第二天使用。

10

pBx6蛋白质的制备:按照Oltersdorf 等, J. Biol. Chem. 265, 4492-4497(1990)所述, 制备表达质粒编码pBx6, 一种由100氨基酸噬菌体MS-2聚合酶氨基末端前导序列, 后面是氨基酸592-695的APP( $\beta$  app)组成的融合蛋白。将该质粒转入大肠杆菌, 并在引入启动子后表达蛋白质。该细菌在8M尿素中溶解, 制备SDS PAGE部分地纯化pBx6。通过

15 通过使用兔抗pBx6多克隆抗体通过蛋白质印迹法测定包含pBx6的片段, 合并, 使用Amicon Centriprep管浓缩并针对PBS透析。通过考马斯蓝染色的SDS PAGE判断该制剂的纯度大约是5到10%。

20

## B.结果与讨论

### 1.研究设计

一百只雌或雄的九到十一个月龄杂合的PDAPP转基因小鼠由Charles River 实验室和Taconic 实验室得到。将这些小鼠分成十组, 使用与弗氏佐剂相结合的不同区域的A $\beta$  或APP免疫。动物分配的原则是每组动物的性别、年龄、血统和来源尽可能接近。免疫原包括

25 四个源自人类序列的A $\beta$  肽: 1-5、1-12、13-28和33-42, 各与羊抗小鼠IgG共轭; 四个集合的A $\beta$  肽: 人类1-40(AN1528)、人类1-42(AN1792)、人类25-35和啮齿动物1-42; 以及融合的多肽, 指定为pBx6, 包含APP氨基酸残基592-695。第十组是同辅剂相结合的PBS免疫对照组。

30

5 对于各免疫接种组，将200  $\mu$  l PBS中的100  $\mu$  g各种A  $\beta$  肽或在相同量的PBS中的200  $\mu$  g APP衍生物或单独的PBS用完全弗氏佐剂(CFA)1:1乳化(体积: 体积)以400  $\mu$  l的最终容积进行第一次免疫接种，随后增加同样量的弗氏不完全佐剂(IFA)中的免疫原进行随后的四个剂量以及以PBS为最终的剂量。

前三个剂量两周一次，然后每月一次的免疫接种在腹膜下进行。第二次接种后，在每次免疫接种后4-7天给动物放血，测量抗体滴度。最终的剂量后约一周将动物处死。

10

## 2. 脑中的A $\beta$ 和APP水平

15 以各种A  $\beta$  肽或APP衍生物免疫接种约四个月后，除掉盐水灌注动物的大脑。一个大脑半球用于免疫组织化学的分析，第二个用于A  $\beta$  和APP水平的定量分析。为了测量各种形式 $\beta$ 淀粉样的肽和淀粉样的前体蛋白的浓度，将该大脑半球解剖，在5M胍中制备海马体、皮层和小脑区域的匀浆。将其稀释，通过与一系列已知浓度的A  $\beta$  肽或APP的标准样品的稀释物相比以ELISA形式用数量表示淀粉样变性或APP的水平。

20 以PBS免疫的转基因对照组的海马体中的总的A  $\beta$  的平均浓度比皮层高5.8倍(海马体组织平均值24, 318ng/g, 皮层4, 221ng/g)。对照组小脑的平均水平(23.4ng/g组织)比海马体低约1000倍。这些水平类似于我们先前报道的该年龄组杂合的PDAPP转基因小鼠的水平(Johnson-Woods等, 1997, 同上)。

25

30 对于皮层，试验组总的A  $\beta$  和A  $\beta$  1-42水平的平均值与对照组有很大的差别( $p < 0.05$ )，接受AN 1792，啮齿动物A  $\beta$  1-42或A  $\beta$  1-5肽共轭体的试验组动物示于图11。这些试验组与对照组相比，总的A  $\beta$  水平的平均值分别减少了75%，79%和61%。在任何组的脑的皮层的区域中的A  $\beta$  特异性抗体滴定度和A  $\beta$  水平之间具有很难辩别的相互关

系。

5 在海马体中，与AN1792治疗有关的总A $\beta$ 的平均减少值(46%，  
p=0.0543)不如在皮层中观察到的(75%，p=0.0021)大。可是，海马体  
中减少的数量却远大于皮层，海马体组织中的净减少为11,186ng/g，  
皮层组织为3,171ng/g。对于接受啮齿动物A $\beta$  1-42或A $\beta$  1-5组的动物，  
总的A $\beta$ 水平的平均值分别减少了36%和26%。可是，考虑到该  
10 组规模较小且两组内部动物之间淀粉样的肽水平的高变异性，这些减少并不显著。  
在海马体中测量A $\beta$  1-42的水平，未到达有意义的治疗诱导的减少。因此，  
由于皮层A $\beta$ 负荷较小，这一区域的变化是治疗效果更有意义的提示。通过ELISA测量的皮层A $\beta$ 水平的变化与免疫组织化学分析的结果相似，但并不相同(见下文)。

15 同时测量小脑中，通常受AD病理学影响最小的区域，总的A $\beta$ 。  
在所有的以各种的A $\beta$ 肽或APP衍生物免疫的组当中，A $\beta$ 浓度平均值  
在该脑区域均与对照组没有差别。这些结果表明非病理的A $\beta$ 水平不受治疗影响。

20 此外通过ELISA测定处理和对照小鼠皮层和小脑中的APP浓度。  
使用两种不同的APP测定方法。第一次，指定APP- $\alpha$ /FL，识别APP- $\alpha$ ( $\alpha$ ，  
劈开内部A $\beta$ 序列的APP隐藏形式)，和APP的全长形式，而第二次仅仅识别APP- $\alpha$ 。  
与试验组子集中的治疗有关的减少相反，所有处理组APP水平与对照动物相比无变化。  
这些结果显示A $\beta$ 肽免疫接种没有耗尽APP；处理效应相当地特定于A $\beta$ 。

25

总之，通过用AN1792，啮齿动物A $\beta$  1-42或A $\beta$  1-5共轭体治疗，  
皮层中总的A $\beta$ 和A $\beta$  1-42水平显著地降低。在海马体中，只有使用  
AN1792治疗实现总的A $\beta$ 显著地减少。在海马体，皮层或小脑区域，  
不存在与治疗相关的A $\beta$ 或APP水平的明显变化。

30

## 2.组织化学的分析

对来自六组子集的大脑进行免疫组织化学的分析，三个组用A $\beta$ 肽共轭体A $\beta$  1-5，A $\beta$  1-12，和A $\beta$  13-28免疫；两个组用全长A $\beta$ 集合体AN1792和AN1528免疫，对照组用PBS处理。这些组大脑切片淀粉样的负荷的图像分析的结果示于图12。三个治疗组的皮层区域的淀粉样的负荷比对照动物有明显减少。在AN1792组观察到最大的淀粉样的负荷的减少，其平均值减少了97%( $p=0.001$ )。用AN1528(95%， $p=0.005$ )和A $\beta$  1-5肽共轭体(67%， $p=0.02$ )处理的动物也观察到明显减少。

通过ELISA定量的总的A $\beta$ 或A $\beta$  1-42的结果在某种程度上不同于图像分析结果。定量的图像分析测量时，用AN1528治疗显著地影响皮层的淀粉样的负荷的水平，而ELISA测量的相同区域中的总的A $\beta$ 浓度没有同样的影响。在两个结果之间的差异可能应归于测定的专一性。图像分析测量仅限于斑点中的不能溶解的A $\beta$ 集合体。相反，ELISA可测量A $\beta$ 的全部形式，溶解的和不能溶解的，单体的和集合的。因为该疾病通常被认为与不能溶解的A $\beta$ 斑点有关，所以图像分析技术也许更灵敏地显示处理效果。可是，ELISA是更迅速的和更容易的测定方法，它对筛选非常有用。它可以显示与斑点的治疗相关的A $\beta$ 的减少比总的A $\beta$ 减少更大。

20

为了确定处理动物免疫接种引导的A $\beta$ 特异的抗体是否与大脑淀粉样沉淀起反应，使处理动物和对照小鼠切片的子集与抗体特异的小鼠IgG起反应。与PBS组相反，在用A $\beta$ 肽共轭体A $\beta$  1-5，A $\beta$  1-12，和A $\beta$  13-28和全长A $\beta$ 集合体AN1792和AN1528免疫的动物中，包含A $\beta$ 的斑点被内源的IgG包裹。没有对来自用其它A $\beta$ 肽或APP肽pBx6免疫的动物的的大脑进行此项分析。

25

## 3.抗体滴度的测量

从第二次接种后，在每次免疫接种后4-7天给小鼠放血，总共五次放血。使用涂有A $\beta$  1-42塑料多孔盘通过夹心式ELISA测量A $\beta$  1-42

30

结合抗体形式的抗体滴度。如图13所示，在第四剂量诱发抗体滴度峰值，引导AN1792特定的抗体的滴定度峰值的四个免疫接种剂型为：AN1792 (顶点GMT : 94647)，AN1528 (顶点GMT : 88231)，A β 1 - 12共轭体(顶点GMT : 47216)和啮齿动物A β 1-42 (顶点GMT : 10766)。在第五和第六剂量组后这些组的滴度有些下降。对于其余的五个免疫原，在第五或第六剂量时达到峰值滴度，其数值比四个最高的滴定度组低得多：A β 1-5共轭体(顶点GMT : 2356，pBx6 (顶点GMT : 1986)，A β 13 - 28共轭体(顶点GMT : 1183)，A β 33 - 42共轭体(顶点GMT : 658)，A β 25 - 35 (顶点GMT : 125)。

10

抗体滴度以用于该免疫原子集的不同ELISA夹心形式的相应的肽为标准作评价，这些组用A β 1-5，A β 13-28，A β 25-35，A β 33-42或啮齿动物A β 1-42免疫。除啮齿动物A β 1-42免疫原外，滴定度与针对A β 1-42测量的滴定度大致相同，使用啮齿动物A β 1-42免疫原时，针对相应的免疫原的抗体滴度大约高两倍。个体动物的AN1792特异性抗体的数值或试验组的平均值与所测量的皮层中A β 减少的效果不相关。

15

#### 4.淋巴组织增生的反应

20

使用最终的，第六次免疫接种后大约一周收获的脾细胞测量与A β 相关的淋巴增生反应。在A β 1-40存在下，在5 μ M的刺激浓度下，将每孔105个刚得到的细胞培养5天。在反转肽，A β 40-1存在下，将来自十组中七组的细胞培养。作为阳性对照，另外加入T细胞促细胞分裂剂，PHA培养另外的细胞，以及，作为阴性对照，在没有添加肽的情况下培养细胞。

25

来自大多数动物的淋巴细胞响应PHA增殖。对A β 40-1反转肽没有显著的反应。用A β 1-40刺激时来自用较大的集合体A β 肽，AN1792，啮齿动物A β 1-42和AN1528免疫的动物的细胞强健地增殖，接受AN1792时每分钟计数值 (cpm) 最高。用A β 1-12共轭体，A β 1328

30

共轭体和A $\beta$  25-35免疫的各组中的一只动物响应A $\beta$  1-40增殖。接受A $\beta$  1-5共轭体, A $\beta$  33-42共轭体, pBx6或PBS的其余组中, 没有动物对A $\beta$  刺激反应。结果概括于下面的表7。

5

表 7

免疫原	共轭	A $\beta$ 氨基酸	应答
A $\beta$ 1-5	是	5-mer	0/7
A $\beta$ 1-12	是	12-mer	1/8
A $\beta$ 13-28	是	16-mer	1/9
A $\beta$ 25-35		11-mer	1/9
A $\beta$ 33-42	是	10-mer	0/10
A $\beta$ 1-40		40-mer	5/8
A $\beta$ 1-42		42-mer	9/9
RA $\beta$ 1-42		42-mer	8/8
pBx6			0/8
PBS		0-mer	0/8

10

这些结果显示AN1792和AN1528刺激强T细胞反应, 很可能为CD4+表型。用A $\beta$  1-5免疫的动物没有A $\beta$  特定的T细胞反应并不奇怪, 因为CD4+T细胞辨认的肽表位通常约15个氨基酸长度, 但有时也对更短的肽产生低效的功能。因此四个共轭肽的大多数辅助性T细胞表位可能存在于IgG共轭配体中, 而不在A $\beta$  区域里。这些试验组中的动物极低的增殖反应发生率支持这些假设。因为A $\beta$  1-5共轭体可显著地减少脑中A $\beta$  的水平, 在明显缺少A $\beta$  特异的T细胞时, 通过使用这些肽诱导的免疫反应的效应子似乎是抗体。

15

融合肽pBx6, 包括包含所有A $\beta$  残基的APP氨基酸592-695缺少T细胞和低抗体反应可能是由于这些特殊的制剂缺乏免疫原性。A $\beta$  25-35集合体缺乏免疫原性可能是由于该肽太小不可能包含好的帮助诱导抗体反应的T细胞表位。可以预料这些肽与载体蛋白的共轭作用可使它产生更高的免疫性。

20

#### V.用于被动防护的多克隆抗体的制备

用A $\beta$ ，加辅剂使125只非转基因小鼠免疫并在4-5月处死。收集免疫小鼠血液。从其他的血液组分分离IgG。通过亲和色谱法部分地纯化对于该免疫原特异的抗体。从每只小鼠平均得到约0.5-1毫克免疫原特异性抗体，总共60-120毫克。

5

VI.用对A $\beta$ 的抗体被动免疫接种

如下所示，给7-9个月大PDAPP小鼠各注射0.5毫克在PBS中的多克隆抗A $\beta$ 或特异的抗A $\beta$ 单克隆抗体。全部抗体制剂纯化至具有低内毒素水平。通过对小鼠注射A $\beta$ 片段或更长的形式制备针对该片段的单克隆抗体，制备和筛选杂交瘤能够获得该抗体，该抗体特异地与要求的A $\beta$ 片段结合而不与其他的不相重叠的A $\beta$ 片段结合。

10

表 8

抗体	表位
2H3	A $\beta$ 1-12
10D5	A $\beta$ 1-12
266	A $\beta$ 13-28
21F12	A $\beta$ 33-42
鼠多克隆抗-人 A $\beta$ 42	抗-聚集的 A $\beta$ 42

15

小鼠需要腹膜内注射4个月，维持循环抗体浓度，该浓度通过ELISA滴度测定，ELISA滴度大于1/1000，ELISA限定A $\beta$  42或其他的免疫原。滴定度监控如上，注射6个月后处死小鼠。死后进行组织化学，A $\beta$ 水平和毒理学分析。每试验组使用十只小鼠。另外的被动免疫接种的研究描述于下面的实施例XI和XII。

20

VII.不同的辅剂的比较

这个实施例比较CFA、明矾、水包油型乳剂和MPL的刺激免疫反应的载量。

25

A.材料和方法

1.研究设计

将一百只由Elm Hill Breeding Laboratories, Chelmsford, MA得到的雌性Hartley系六周龄豚鼠分成十组用同各种助剂相结合的AN1792或其十六碳酸盐衍生物免疫。七组接受同a)PBS, b)弗氏助剂, c) MPL, d)角鲨烯, e)MPL/角鲨烯, f)小剂量明矾, 或g)高剂量明矾(300  $\mu$ g AN1792)相结合的AN1792(33  $\mu$ g, 除非另作说明)的注射。两组接受同a)PBS或b)角鲨烯相结合的AN1792(33  $\mu$ g)的十六碳酸盐衍生物的注射。最后的第十组接受没有抗原或另外的助剂的单独的PBS。对于接受弗氏佐剂的组, 第一个剂量用CFA乳化, 其余的四个剂量用IFA乳化。除高剂量明矾组之外给药的抗原的剂量为33  $\mu$ g, 后者为300  $\mu$ g AN1792。对于CFA /IFA为腹膜下注射给药, 其他的组在下肢四头肌左侧和右侧交替地肌内注射。前三个剂量两周一次的给药, 后面两次剂量每月一次。第二次给药后开始免疫的6-7天, 放血, 测量抗体滴度。

## 2. 免疫原的制备

两毫克A  $\beta$  42(加利福尼亚肽, Lot ME0339)加入0.9毫升去离子水, 将该混合物涡旋产生相对均匀的悬浮液。添加100  $\mu$ l 10X PBS等分试样( IX PBS, 0.15 NaCl, 0.01 M磷酸钠, pH 7.5)。将该悬浮液再涡旋一次并在37 $^{\circ}$ C培养过夜, 以备第二天使用。不用的A  $\beta$  1-42作为冷冻干燥粉末与干燥剂在20 $^{\circ}$ C存储。

在用氢氟酸处理从该树脂上除去新生肽之前, 通过溶于二甲基甲酰胺的棕榈酸酐与AN1792氨基末端残基偶联制备AN1792十六碳酸盐衍生物。

对于第一次免疫接种, 为了制备具有完全弗氏佐剂(CFA)的产生免疫性的剂型(CFA)(组2), 将33  $\mu$ g 200  $\mu$ l PBS中的AN1792用CFA乳化1:1 ( 体积:体积), 最终体积为400  $\mu$ l。对于随后的免疫接种, 同样地用弗氏不完全佐剂( IFA)乳化抗原。

30

5 对于5和8组，为了制备具有MPL的剂型，将冷冻干燥粉末(Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT)加入0.2%含水的三乙胺，最后浓度为1毫克/毫升，涡旋。将该混合物从65到70℃加热30秒，产生稍微不透明的均匀的胶粒悬浮液。每次注射前重新制备溶液。对于5组注射，使用前立即将16.5 μl PBS中的33 μg AN1792，50 μg MPL (50 μl)和162 μl PBS在硅酸硼盐管中混合。

10 为了制备具有低水包油型乳液的剂型，向PBS中的AN 1792加入PBS中的5%角鲨烯，0.5%吐温80，0.5%斯潘85，达到250 μl中的33 μg AN1792的最终单剂量浓度。将该混合物通过两室处理装置进行15到20次乳化直到显微镜下观察乳液滴直径等于标准乳胶粒子的1.0 μm的直径。所得悬浮液是乳白色的。每个系列注射前重新制备乳剂。对于8组，将0.2%三乙胺中的MPL以每剂量50 μg的浓度添加到上述乳化的角鲨烯和去垢剂的混合物。对于棕榈酰衍生物(7组)，将每剂量33 μg  
15 棕榈酰NH-A β 1-42加入角鲨烯并涡旋。然后在涡旋下加入吐温80和斯潘85。将该混合物加入PBS达到5%角鲨烯，0.5%吐温80，0.5%斯潘85的最后浓度，并按如上所述，乳化该混合物。

20 对于制备具有明矾的剂型(9和10组)，将PBS中的AN1792加入Alhydrogel(氢氧化铝凝胶，Accurate, Westbury, NY)，达到每5毫克明矾33 μg(小剂量，9组)或300 μg(高剂量，10组)AN1792的浓度，最终的剂量的体积为250 μl。将该悬浮液在室温下温和地混合4小时。

### 3. 抗体滴度的测量

25 第二次免疫接种后开始免疫的六到七天给豚鼠放血，总共四个次放血。按照General Materials and Methods描述测量针对A β 42的抗体滴度。

### 4. 组织制备

30 约14周后，通过二氧化碳给药处死全部豚鼠。收集脑脊髓液，除

去大脑，解剖三个大脑区域(海马体，皮层和小脑)，使用ELISA测量总的A $\beta$ 蛋白的浓度。

## B.结果

### 5 1.抗体反应

免疫接种后测量抗体AN 1792的反应时各种辅剂的效力范围很广。如图14所示，当PBS中的AN1792给药时，两或三次免疫接种后没有检测到抗体，第四和第五次剂量后检测到可以忽略的反应，几何平均滴度(GMTs)仅仅约45。第三剂量水包油乳剂诱导适度的滴度(GMT255)，第四剂量(GMT301)继续维持，随后落入最终的剂量(GMT54)。AN1792与300  $\mu$ g明矾结合总是比33  $\mu$ g时更易产生清楚的抗原剂量反应。第四免疫接种后达到抗体反应的顶点，两次剂量之间的差异为43%，GMTs约1940(33  $\mu$ g)和3400(300  $\mu$ g)。加入MPL的33  $\mu$ g AN1792的抗体反应比抗原(300  $\mu$ g)与明矾结合的剂量所产生的抗体反应的几乎高十倍。MPL加入水包油乳剂相对于MPL作为唯一的辅剂的剂型的效力差不多低75%。当AN1792的十六碳酸盐衍生物在PBS中给药时，完全不产生免疫性，当存在于水包油乳剂时得到适度的滴度，其第三和第四次放血的GMTs分别为340和105。弗氏佐剂产生最高的抗体滴度，顶点GMT约87,000，几乎比下两个最有效剂型，MPL和高剂量AN1792/明矾的GMT大30倍。

这个研究中最有前途的辅剂是MPL和明矾。其中，MPL更为可取，因为它产生相同抗体反应的抗原剂量比明矾低10倍。通过增加抗原和/或辅剂剂量以及优化免疫接种程序可以增加免疫反应。对于AN1792来说，水包油乳剂是非常弱的辅剂，将水包油乳剂加入MPL辅剂可减弱单独的MPL固有的辅剂活性。

### 2.脑中的A $\beta$ 水平

在大约14周，将豚鼠深度麻醉，取出脑脊髓液(CSF)，切除大脑，该豚鼠被弗氏佐剂(2组)，MPL(5组)，具有300  $\mu$ g高剂量AN1792的明

矾(10组)以及PBS(免疫对照组)(3组)免疫。为了测量A $\beta$ 肽水平,将一大脑半球解剖,在5M胍中制备海马体、皮层和小脑区域的匀浆。将其稀释并且通过与ELISA形式中的已知浓度的A $\beta$ 标准蛋白质的系列稀释物比较测定。对于所有四个组,A $\beta$ 蛋白质在海马体皮层和小脑中的水平非常相似,尽管由这些剂型引起的抗体对A $\beta$ 反应的范围很广。海马体中平均A $\beta$ 水平约25ng/g,皮层为21ng/g,小脑为12ng/g。因此,在一些动物中几乎三个月的A $\beta$ 高循环抗体滴度的存在不改变大脑中总的A $\beta$ 水平。各组的CSF中的A $\beta$ 水平也相当相似。AN1792免疫接种对内生的A $\beta$ 缺乏大的作用,显示免疫反应集中在A $\beta$ 病理形成过程。

#### VIII.小鼠中对不同的辅剂的免疫反应

每组10-13只六周龄雌性Swiss Webster小鼠用于这个研究。在0, 14, 28, 60, 90和20天,以200 $\mu$ l的剂量皮下给药,实现免疫接种。PBS用作所有剂型的缓冲液。在第二个剂量后开始免疫接种的7天给动物放血,通过ELISA分析抗体滴度。每组的处理方案概括于表9。

表9

研究010的实验设计					
组	N <sup>a</sup>	助剂	剂量	抗原	剂量 (μg)
1	10	MPL	12.5μg	AN1792	33
2	10	MPL	25 μg	AN1792	33
3	10	MPL	50μg	AN1792	33
4	13	MPL	125 μg	AN1792	33
5	13	MPL	50 μg	AN1792	150
6	13	MPL	50 μg	AN1528	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		无	
9	10	角鲨烯乳化的	5%	AN1792	33
10	10	角鲨烯混合的	5%	AN1792	33
11	10	明矾	2mg	AN1792	33
12	13	MPL + 明矾	50 μg/2 mg	AN1792	33
13	10	QS-21	5μg	AN1792	33
14	10	QS-21	10 μg	AN1792	33
15	10	QS-21	25 AN 1792	AN1792	33
16	13	QS-21	25 AN 1792	AN1792	150
17	13	QS-21	25 AN 1792	AN1528	33
18	13	QS-21+MPL	25 μg/50 μg	AN1792	33
19	13	QS-21 +明矾	25 μg/2 mg	AN1792	33

## 脚注

a 开始实验时小鼠在各组中的只数。

b 辅剂注解。所有这些剂型的缓冲液是PBS。对于8组，没有辅

5 剂，没有抗原。

各组针对A $\beta$ 42的抗体的ELISA滴度示于表10。

表10

几何平均抗体滴度					
放血周					
处理组	2.9	5.0	8.7	12.9	16.7
1	248	1797	2577	6180	4177
2	598	3114	3984	5287	6878
3	1372	5000	7159	12333	12781
4	1278	20791	14368	20097	25631
5	3288	26242	13229	9315	23742
6	61	2536	2301	1442	4504
7	37	395	484	972	2149
8	25	25	25	25	25
9	25	183	744	952	1823
10	25	89	311	513	817
11	29	708	2618	2165	3666
12	198	1458	1079	612	797
13	38	433	566	1080	626
14	104	541	3247	1609	838
15	212	2630	2472	1224	1496
16	183	2616	6680	2085	1631
17	28	201	375	222	1540
18	31699	15544	23095	6412	9059
19	63	243	554	299	441

5

该表显示最高滴度在4, 5和18组提供, 其中辅剂是125  $\mu$ g MPL, 50  $\mu$ g MPL和QS-21加MPL。

## IX.不同辅剂的治疗效能

治疗效能研究在PDAPP转基因小鼠中进行，使用适用于人类的一组辅剂，测定它们对A $\beta$ 免疫反应的加强能力，以及诱导大脑中的淀粉样沉淀的免疫介导的清除能力。

一百八十只雌或雄的，7.5到8.5个月大的，杂合的PDAPP转基因小鼠由Charles River实验室得到。将小鼠分成九组，每组包含15到23只动物，用AN1792或同各种辅剂相结合的AN1528免疫。将动物按性别、年龄以及血统分配，组内部尽可能接近。辅剂包括明矾，MPL，以及QS-21，各自同两抗原相结合，弗氏佐剂(FA)仅仅同AN1792相结合。一个额外的组为用在PBS缓冲液中配制的AN1792，加上防腐剂乙基汞硫代水杨酸钠，没有辅剂的免疫组。第九组是用单独的PBS免疫的阴性对照组。

15

集合的A $\beta$ 肽的制备:人类A $\beta$  1-40(AN1528; California Peptides Inc., Napa, CA; Lot ME0541)和人类A $\beta$  1-42 (AN1792; California Peptides Inc., Lot ME0439)肽被重新溶解用于从已经在-2 $^{\circ}$ C存储干燥的冷冻干燥粉末制备各组注射制剂。为了这个目的，将两毫克肽加入0.9毫升去离子水，将该混合物涡旋产生相对均匀的溶液或悬浮液。在这个步骤AN1528是可溶解的，AN1792正好相反。然后在AN1528开始沉淀时添加100 $\mu$ l 10X PBS等分试样(10X PBS: 0.15 NaCl, 0.01 M磷酸钠, pH 7.5)。将该悬浮液再涡旋一次并在37 $^{\circ}$ C培养过夜，以备第二天使用。

25

为了用明矾制备制剂(1和5组)，将PBS中的A $\beta$ 肽加入Alhydrogel(百分之二含水的氢氧化铝凝胶, Sargeant, Inc., Clifton, NJ)，达到每1毫克明矾100 $\mu$ g A $\beta$ 肽的浓度。加入10X PBS, 1X PBS中的最终的制剂的体积为200 $\mu$ l。在注射之前将该悬浮液在室温下温和地混合大约4小时。

30

5 对于2和6组，为了制备具有MPL的剂型，将冷冻干燥粉末(Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT; Lot 67039-E0896B)加入0.2%含水的三乙胺至最后浓度为1毫克/毫升，并涡旋。将该混合物在65到70℃加热30秒，产生稍微不透明的均匀的胶粒悬浮液。该溶液在4℃存储。对于各组注射剂，使用前立即将每剂量50 μl PBS中的100 μg 肽，50 μg MPL (50 μl)和100 μl PBS在硅酸硼盐管中混合。

10 为了制备具有QS-21(3和7组)的剂型，将冷冻干燥粉末(Aquila, Framingham MA; Lot A7018R)加入PBS, pH 6.6 - 6.7, 最后浓度为1毫克/毫升，并涡旋。该溶液在-20℃存储。对于各组注射剂，使用前立即将每剂量50 μl PBS中的100 μg 肽，25 μl PBS中的25 μg QS-21和125 μl PBS在硅酸硼盐管中混合。

15 对于第一次免疫接种，为了制备具有完全弗氏佐剂(CFA)的剂型(4组)，将100 μg 200 μl PBS中的AN1792用完全弗氏佐剂(CFA)乳化1:1(体积:体积)，最终体积为400 μl。对于随后的免疫接种，同样地用弗氏不完全佐剂(IFA)乳化抗原。对于包含辅剂明矾，MPL或QS-21的剂型，将每剂量100 μg AN1792或AN1528与明矾(每剂量1毫克)或MPL(每剂量50 μg)或QS-21(每剂量25 μg)在最终容积为200 μl的PBS中混合，后背在肩胛间皮下接种给药。对于接受FA组，将100 μg AN1792用完全弗氏佐剂(CFA)乳化1:1(体积:体积)使最终体积为400 μl，并用于第一次免疫接种腹膜下给药，接着对于随后的五个剂量，增加同样量的弗氏不完全佐剂(IFA)中的免疫原。对于接受没有辅剂的组，使10 μg AN1792与5 μg 乙基汞硫代水杨酸钠在最终容积为50 μl的PBS中混合，并皮下给药。第九对照组只接收200 μl PBS皮下给药。免疫接种的方案为前三个剂量两周一次，在此以后每月一次，也就是0, 16, 28, 25 56, 85和112天给药。第二剂量后开始免疫接种六到七天给动物放血，测量抗体滴度。最终的剂量后一周将动物处死。通过大脑中的Aβ和APP水平的ELISA测定和大脑切片中的淀粉样的斑点的免疫组织化学的评价得到结果。另外，测定Aβ特异性抗体滴度和Aβ有关的增殖的30

和细胞激动素反应。

5 表10显示FA和AN1792引导最高的A $\beta$  1-42抗体滴度，第四次免疫接种后为滴度顶点(顶点GMT:75386)，并且在最终的第六次免疫接种后下降59%。由MPL与AN1792引导的顶点平均滴度比FA (顶点GMT : 28867)产生的平均滴度低62%，3个剂量后也在最初免疫接种方案中达到，接着第六次免疫接种后降至顶点值的28%。QS-21同AN1792相结合产生的顶点平均滴度(GMT:1511)比由MPL得到的低5倍。另外该反应的

10 动力学减慢，因为另外的免疫接种要求达到顶点反应。由明矾结合AN1792产生的滴度或多或少地大于QS-21得到的滴度，该反应动力学更加迅速。对于在PBS中用乙基汞硫代水杨酸钠给药的AN1792，滴度的频率和大小仅仅大于单独的PBS。MPL和AN1528(顶点GMT3099)产生的顶点滴度比AN1792产生的低大约9倍。明矾结合的AN1528非常贫乏地产生免疫性，仅仅在一些动物中产生低滴度。在用单独的PBS

15 免疫的对照动物中没有观察到抗体反应。

表11

几何平均抗体滴度 <sup>a</sup>					
放血周					
处理	3.3	5.0	9.0	13.0	17.0
明矾/AN1792	102 (12/21) <sup>b</sup>	1,081 (17/20)	2,366 (21/21)	1,083 (19/21)	572 (18/21)
MPL/AN1792	6241 (21/21)	28,867 (21/21)	1,1242 (21/21)	5,665 (20/20)	8,204 (20/20)
QS-21/AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1,511 (17/18)	1,188 (14/18)
CFA/AN1792	10,076 (15/15)	61,279 (15/15)	75,386 (15/15)	41,628 (15/15)	30,574 (15/15)
明矾/AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/20)	31 (2/20)
MPL/AN1528	184 (15/21)	2,591 (20/21)	1,653 (21/21)	1,156 (20/20)	3,099 (20/20)
QS-21/AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2,994 (21/22)
PBS+乙基汞硫代水杨酸钠	25 (0/16)	33 (2/16)	39 (4/16)	37 (3/16)	47 (4/16)
PBS	25 (0/16)	25 (0/16)	25 (0/15)	25 (0/12)	25 (0/16)

脚注

a 针对A $\beta$  1-42测量的几何平均抗体滴度数

b 每组反应物数

20

由ELISA测定的用各种辅剂或乙基汞硫代水杨酸钠处理12个月大小鼠皮层淀粉样负荷的AN1792或AN1528的结果示于图15。在PBS对照PDAPP小鼠中，12月龄小鼠皮层中总的A $\beta$ 的平均水平是1,817ng/g。特别地观察用AN1792加CFA/IFA, AN1792加明矾, AN1792加MPL和QS-21加AN1792处理的小鼠的A $\beta$ 降低水平。只有AN1792加CFA/IFA组的降低达到统计上明显的水平( $p<0.05$ )。如实施例I和III所示,在15月和18月龄小鼠中减少A $\beta$ 水平的免疫接种作用实质上更大。因此,可以预料另外的剂型,特别是AN1792加上明矾,AN1792加MPL和AN1792加QS-21组合物在年长的小鼠的处理中将提供更大的阳性结果。相反,AN1792加防腐剂乙基汞硫代水杨酸钠显示的A $\beta$ 平均水平与PBS处理小鼠几乎相同。比较皮层的A $\beta$  42水平时得到相似的结果。PBS对照组的A $\beta$  42的平均水平是1624ng/g。特别地,在分别用AN1792加CFA/IFA, AN1792加明矾, AN1792加MPL和AN1792加QS-21处理的小鼠中观察到平均水平降低值为403, 1149, 620和714。AN1792 CFA/IFA试验组实现了统计学上显著的减少( $p=0.05$ )。AN1792乙基汞硫代水杨酸钠处理小鼠中的平均水平是1619ng/g A $\beta$  42。

## X.毒性分析

实施例II, III和VII描述的研究结束时收集组织用于病理组织学检查。另外,来自实施例III和VI的末端血样用于血液学和临床化学研究。评价大多数主要的器官,包括大脑,肺,淋巴,胃肠,肝脏,肾,肾上腺和生殖腺。尽管研究动物时偶尔发生伤害,但在AN1792处理和未经处理的动物之间没有明显的组织或严重伤害差异,与PBS处理或未经处理的动物相比较AN-1528免疫动物没有独特的组织病理学损伤。实施例VI中在辅剂组和PBS处理动物之间的临床化学剖面图没有差异。尽管在AN1792处理的动物和实施例VI中的弗氏佐剂相对于PBS处理的动物之间的一些血液学参数之间有显著的增加,但弗氏佐剂处理中的这类作用是预期的并且伴随腹膜炎,但不显示来自AN1792处理的任何副作用。虽然不属于毒性评价部分,但是作为端点效果的部分,PDAPP小鼠脑病理学被广泛地考核。在任何研究中没有发现关于大脑

形态学副作用的处理的信息。这个结果表明AN1792处理具有良好的相容性，至少实质上无副作用。

## XI.用抗A $\beta$ 抗体治疗

5            本节描述的试验是为了测试各种针对A $\beta$  的单克隆和多克隆抗体抑制A $\beta$  在杂合的转基因小鼠的大脑中的累积的能力。

### A. 研究1

#### 1.研究设计

10            六十只8.5到10.5月龄雌性和雄性杂合的PDAPP转基因小鼠从Charles River Laboratory获得。将小鼠分成六组，用针对A $\beta$  的的各种的抗体处理。动物分配的原则是每组动物的性别、年龄、血统和来源尽可能接近。如表12所示，抗体包括四个鼠科动物A $\beta$  特定的单克隆抗体，2H3(针对A $\beta$  残基1-12)，10D5(针对A $\beta$  残基1-16)，266(针对A $\beta$  残基13-28并且与单体的而不是集合的AN1792结合)，21F12(针对A $\beta$  残基33-42)。第五组用A $\beta$  特定的多克隆抗体部分处理(由集合的AN1792免疫接种进行)。阴性对照组接受稀释剂，单独的PBS，没有抗体。

20            单克隆抗体注射剂量约10毫克/千克(假定小鼠重50g)。平均每七天腹膜下注射给药，维持抗A $\beta$  滴度超过1000。尽管测量到mAb 266的较低的滴度，这是因为它不与测定中用作捕捉抗原的集合的AN1792很好地结合，为这个组提供了相同的剂量日程表。接受单克隆抗体2H3的组在第一个三周内被中止，因为该抗体在体内被清除得太快。在各剂量之前将动物放血测量抗体滴度。处理延续六个月总共196天。最终25 的剂量后一周将动物处死。

表12

研究的实验设计 006				
处理组	N <sup>a</sup>	处理抗体	抗体特异性	抗体
1	9	无(仅PBS)	NA <sup>b</sup>	NA
2	10	多克隆	A $\beta$ 1-42	混合的
3	0	mAbc2H3	A $\beta$ 1-12	IgG1
4	8	mAb 10D5	A $\beta$ 1-16	IgG1
5	6	mAb266	A $\beta$ 13-28	IgG1
6	8	mAb21F12	A $\beta$ 33-42	IgG2a

脚注

a. 实验结束时各组小鼠数。全部组开始时每组10只动物。

b. NA :不适用的

5 c. mAb :单克隆抗体

## 2.材料和方法

### a.抗体的制备

10 抗A $\beta$ 多克隆抗体用二组动物收集的血液制备。第一个组由100只6到8周龄的雌性Swiss Webster小鼠组成。它们在0, 15和29天用100  $\mu$ g同CFA/IFA相结合的AN1792免疫。第36天用一半剂量的AN1792进行第四次注射。在42天处死动物并抽血, 制备血清, 合并血清总共得到64毫升。第二组由24只6到9周龄与PDAPP小鼠同基因未转人类APP基因的雌性小鼠组成。它们在0, 14, 28和56天用100  $\mu$ g同CFA/IFA相结合的AN1792免疫。在63天处死动物并抽血, 制备血清, 合并血清共得14毫升。合并两次的血清。使用50%饱和硫酸铵的连续两次沉淀纯化抗体部分。将最终的沉淀针对PBS透析, 检验内毒素。内毒素水平

15 小于1EU/毫克。

5 由腹腔积液制备抗A $\beta$ 单克隆抗体。通过将浓缩的葡聚糖硫酸钠加入冰冷的腹腔积液，通过在冰上搅拌，首先使液体脱脂，达到的最后浓度为0.238%。然后搅拌下添加浓缩的CaCl<sub>2</sub>，至最后浓度为64mM。将该溶液在10000xg离心，丢弃小球。在冰上搅拌上层清液，滴加等量饱和硫酸铵。将该溶液在10000xg离心，丢弃上层清液。将该小球再悬浮，并针对20mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH7.5透析。这部分用Pharmacia FPLC Sepharose Q柱，以从0.4 M到0.275 M 的NaCl 20mM Tris - HCl, pH7.5溶液，反向梯度洗脱。

10 通过在280nm吸收率辨认抗体峰，合并适当的部分。使用BCA方法测量蛋白质浓度鉴别纯化的抗体制剂，纯度使用SDS-PAGE。同样检验合并物的内毒素。内毒素水平小于1EU/毫克滴度，小于100的滴度被指定为25的滴定度。

### 15 3. 脑中的A $\beta$ 和APP水平

以各种的抗A $\beta$ 抗体制剂处理约六月后，除掉盐水灌注的大脑。一个大脑半球用于免疫组织化学的分析，第二个用于A $\beta$ 和APP水平的定量分析。为了测量各种形式 $\beta$ 淀粉样的肽和淀粉样的前体蛋白(APP)的浓度，将该大脑半球解剖，在5M胍中制备海马体，皮层，和小脑区域的匀浆。将其系列稀释，通过与一系列在ELISA中已知浓度的A $\beta$ 肽或APP的标准样品的稀释物相比测定淀粉样变性或APP的水平。

25 通过ELISA测定的皮层和海马体中的总的A $\beta$ 和A $\beta$  1-42的水平和小脑中的总的A $\beta$ 的水平分别显示于表11, 12, 和13。海马体中的用PBS免疫的对照组的总的A $\beta$ 的平均浓度比皮层高3.6倍(海马体组织平均值63,389ng/g, 皮层为17,818ng/g)。对照组小脑的平均水平(30.6ng/g组织)比海马体降低约2000倍以上。这些水平类似于我们先前报道的该年龄组杂合的PDAPP转基因小鼠的水平(Johnson-Woods等, 1997)。

30

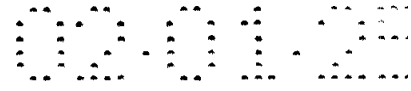
对于皮层，一个具有平均A $\beta$ 水平的处理组，按A $\beta$  1-42测量，它与对照组有很大的差别( $p < 0.05$ )，多克隆的抗A $\beta$ 抗体的动物如表13所示。对于这个处理组与对照组相比，A $\beta$  1-42平均水平降低了65%。与附加处理组的对照组相比，A $\beta$  1-42的平均水平同样显著地降低了55%，那些动物用mAb10D5给药( $p = 0.0433$ )。

5

表13

皮层										
处理组	N <sup>a</sup>	中间值						平均值		
		总 A $\beta$			A $\beta$ 42			总 A $\beta$	A $\beta$ 42	
		ELISA 值 <sup>b</sup>	P 值 <sup>c</sup>	% 变化	ELISA 值 <sup>b</sup>	P 值 <sup>c</sup>	% 变化	ELISA 值	ELISA 值	
PBS	9	17818	NA <sup>d</sup>	NA	13802	NA	NA	16150+/-7456 <sup>e</sup>	12621+/-5738	
多克隆抗-A $\beta$ 42	10	6160	0.0055	-65	4892	0.0071	-65	5912+/-4492	4454+/-3347	
mAb 10D5	8	7915	0.1019	-56	6214	0.0433	-55	9695+/-6929	6943+/-3351	
mAb266	6	9144	0.1255	-49	8481	0.1255	-39	9204+/-9293	7489+/-6921	
mAb21F12	8	15158	0.2898	-15	13578	0.7003	-2	12481+/-7082	11005+/-6324	

脚注 a. 实验结束时每组动物数; b. ng /g 组织; c. Mann Whitney 分析; d. NA :不适用的; e. 标准偏差



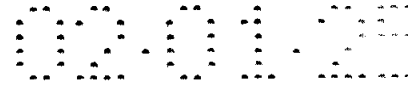
5 在海马体中，与用多克隆的抗A $\beta$ 抗体治疗有关的总的A $\beta$ 降低率的平均值(50%， $p=0.0055$ )不如在皮层观察到的(65%)大(表14)。可是，海马体中减少的绝对量却几乎大于皮层3倍，海马体组织中的净减少为31683ng/g，皮层组织为11658ng/g。当测量A $\beta$ ，A $\beta$  1-42，而不是总的A $\beta$ 形式的多种淀粉样变性的水平时，用多克隆抗体实现的减少是显著的( $p=0.0025$ )。用mAbs10D5和266处理的组的平均水平分别降低了33%和21%。

表14

海马体											
处理组	N <sup>a</sup>	中间值						平均值			
		总 Aβ			Aβ42			总 Aβ		Aβ42	
		ELISA 值 <sup>b</sup>	P 值 <sup>c</sup>	%变化	ELISA 值 <sup>b</sup>	P 值 <sup>c</sup>	%变化	ELISA 值	P 值 <sup>c</sup>	ELISA 值	%变化
PBS	9	63389	NA <sup>d</sup>	NA	54429	NA	NA	58351+/-13308 <sup>e</sup>		52801+/-14701	
多克隆抗-Aβ42	10	31706	0.0055	-50	27127	0.0025	-50	30058+/-22454		24853+/-18262	
mAb 10D5	8	46779	0.0675	-26	36290	0.0543	-33	44581+/-18632		36465+/-17146	
mAb 266	6	48689	0.0990	-23	43034	0.0990	-21	36419+/-27304		32919+/-25372	
mAb 21F12	8	51563	0.7728	-19	47961	0.8099	-12	57327+/-28927		50305+/-23927	

脚注:

- a. 实验结束时每组动物数
- b. ng/g组织
- c. Mann Whitney 分析
- d. NA :不适用的
- e. 标准偏差



同样测定小脑中总的A $\beta$  (表15)。多克隆的抗A $\beta$  和266抗体给药组显示总的A $\beta$  的水平明显减少(分别为43%和46%,  $p=0.0033$  和  $p=0.0184$ ), 10D5处理组具有相近的明显减少(29%,  $p=0.0675$ )。

5

表15

小脑					
处理组	N <sup>a</sup>	中间值			平均值
		总A $\beta$			总A $\beta$
		ELISA值 <sup>b</sup>	P值 <sup>c</sup>	%变化	ELISA值
PBS	9	30.64	NA <sup>d</sup>	NA	40.00+/-31.89 <sup>e</sup>
多克隆抗-A $\beta$ 42	10	17.61	0.0033	-43	18.15+/-4.36
mAb 10D5	8	21.68	0.0675	-29	27.29+/-19.43
mAb266	6	16.59	0.0184	-46	19.59+/-6.59
mAb21F12	8	29.80	>0.9999	-3	32.88+/-9.90

脚注:

a. 实验结束后每组动物数

b. ng/g 组织

c. Mann Whitney 分析

d. NA: 不适用

e. 标准偏差

10

此外通过ELISA测定抗体处理组和对照组, PBS处理组小鼠皮层和小脑中的APP浓度。使用两种不同的APP测定。第一次, 指定APP- $\alpha$ /FL, 识别APP- $\alpha$  ( $\alpha$ , A $\beta$  序列分解的APP的分泌形式), 和APP的全长形式(FL), 而第二次仅仅识别APP- $\alpha$ 。与处理组子集中的治疗有关的减少相反, 与对照动物相比在所有处理组中APP水平实际上无变化。这些结果显示用A $\beta$  抗体免疫接种耗尽A $\beta$  没有耗尽APP。

15

5 总之，用针对AN1792产生的多克隆抗体处理的动物的皮层，海马体和小脑中的A $\beta$ 水平显著地降低。针对A $\beta$  1-42氨基末端区域，特别是氨基酸1-16和13-28的较小区域的单克隆抗体同样显示显著的处理效果。

#### 4.组织化学的分析:

10 将PBS，多克隆的A $\beta$  42，21F12，266和10D5处理组小鼠大脑子集中的A $\beta$ 免疫活性的斑点的形态定性地和早先的研究对比，该研究中遵循利用A $\beta$  42的标准免疫接种方法。

15 用多克隆的A $\beta$  42抗体免疫的动物的淀粉样斑点的区域和外观都有最大量的改变。淀粉样的负荷的减少，斑点形态侵蚀和细胞关联的A $\beta$ 免疫活性，与通过标准免疫接种方法产生的效果非常相似。这些观察支持了总的A $\beta$ 和A $\beta$  42明显减少的ELISA结果是通过多克隆的A $\beta$  42抗体的给药实现的。

20 在相似的定性评价中，10D5组淀粉样的斑点同样降低了数目和外观，具有某些细胞关联的A $\beta$ 免疫活性的证明。21F12和266组与PBS对照组比较时，看不到明显的差异。

#### 5.抗体滴度的测量:

25 各腹腔内接种之前，将三只随机地从各组选择的小鼠的子集放血，总共放血30次。如the General Materials and Methods详细描写，使用涂有A $\beta$  1 - 42塑料多孔盘通过用夹心式ELISA测量A $\beta$  1-42结合抗体的抗体滴度。每次放血的平均滴度示于图16-18，分别对应多克隆抗体和单克隆抗体10D5和21f12。该时间范围内多克隆抗体制剂的滴度平均约为1:1000，并且对于10D5和21F12处理的动物来说稍微超过这个水平。

30

## 6. 淋巴组织增生的反应

5 使用最终的抗体注入后八天收获的脾细胞测量与A $\beta$ 相关的淋巴增生反应。在A $\beta$  1-40存在下，在S $\mu$ M的浓度刺激下，将每孔10<sup>5</sup>个新得到的细胞培养5天。作为阳性对照，用T细胞促细胞分裂剂，植物血细胞凝集素培养另外的细胞，以及，作为阴性对照，在没有添加肽的情况下培养细胞。

10 用AN1792体外刺激来自用各种的抗A $\beta$ 抗体被动免疫的年长的PDAPP小鼠的脾细胞，测量增殖和细胞激动素反应。这个测定的目的是测定被动免疫接种是否便于抗原呈递，因此引发特定于AN1792的T细胞反应。在用抗A $\beta$ 抗体被动免疫的小鼠中没有观察到AN1792特异性的增殖或细胞激动素反应。

## B. 研究2

15 在第二研究中，重复用抗体10D5处理，试验两种另外的抗A $\beta$ 抗体，单克隆抗体3D6(A $\beta$  1-5)和16C11(A $\beta$  33-42)。对照组接受PBS或无关系的同种异型匹配抗体(TM2a)。该小鼠比早先的研究中的年长(11.5-12个月大的杂合子)；换句话说试验设计是相同的。再一次，六个月的处理后，10D5降低的斑点负荷比PBS或同种异型匹配抗体对照组大80%(p=0.003)。另一个针对A $\beta$ 的抗体，3D6，同样有效，产生86%的减少(p=0.003)。相反，针对该肽的第三种抗体，16C11，对斑点负荷没有任何影响。由A $\beta$  42 ELISA测量得到相似的发现。这个结果证明在没有T细胞免疫性的情况下，针对A $\beta$ 肽的抗体反应足以降低PDAPP小鼠的淀粉样的沉淀，但不是所有的抗A $\beta$ 抗体都是有效的。

25 针对包含氨基酸1-5或3-7的A $\beta$ 的表位的抗体是特别有效的。

30 这个研究证明针对A $\beta$ 抗体的被动给药降低了小鼠阿尔茨海默氏病模型中的斑点沉淀的区域。血清浓度合适时(25-70  $\mu$ g/毫升)，得到的抗体在水平上接近CNS，足够修饰 $\beta$ 淀粉样的斑点。抗体进入CNS不是由于血脑屏障反常的渗漏，因为通过EvansBlue测量的PDAPP小鼠

的血管通透性没有增加。另外，成年PDAPP小鼠大脑软组织中的抗体浓度与非转基因小鼠相同，血清中抗体浓度为0.1%(无论是否同种异型)。

5 C.研究3 :抗体结合的监控

10 为了测定针对A $\beta$ 的抗体是否可以直接地作用于CNS内部，实施例XII结束时从盐水灌注的小鼠取出大脑，检查是否存在被动给药的抗体。使不稳定低温保存的大脑切片暴露于针对小鼠免疫球蛋白(山羊抗小鼠IgG Cy3)的荧光试剂。10D5和3D6组大脑内部斑点由抗体强烈地修饰，而16C11组没有着色。为了显示斑点沉淀的最大程度，首先用抗A $\beta$ 抗体，然后用二级的试剂免疫活化各大脑的系列切片。被动给药后，10D5和3D6获得接近CNS内的大多数斑点。与16C11组相比，处理组大大地降低斑点负荷。这些数据显示抗体被动给药可以进入CNS，在此直接地引发淀粉样的清除。16C11同样可以到达斑点但是不能与斑点结合。

15

XII.人类患者的预防和治疗

20 单一剂量试验阶段I测定对人类的安全性。以增加剂量的治疗剂对不同的病人给药，开始约0.01假定效果的水平，通过三次增加直到达到小鼠有效剂量的约10倍的水平。

25 试验的阶段II测定治疗效能。选择使用阿尔兹海默氏病和有关的疾病(AD/DRDA)标准对于可能的AD的确定早期到中期阿尔茨海默氏病患者。按照Mini-Mental State Exam (MMSE)，合适的患者得分为12-26。其他的选择标准为病人可能经受得住研究的持续时间，没有复杂的问题如可干扰的伴随的药物应用。患者机能的基准评价使用传统的智力测验，如MMSE，和ADAS，它们是评价阿尔茨海默氏病患者状态和机能的全面的尺度。这些智力测验的尺度提供了阿尔茨海默病发展的测量方法。合适的定性寿命尺度还可以用来监控治疗。疾病级数也可以通过MRI监控。病人的血液状况还可以监控免疫原特异性的抗体和

30

T细胞反应的测定。

5 按照基准方法，病人开始接受治疗。将它们随机化并且以盲试方式用治疗剂或者安慰剂治疗。患者监控至少六个月。通过治疗组相对于安慰剂组的发展明显降低测定效果。

10 试验第二期II评价患者从非阿尔茨海默氏病的早期的记忆损失，有时称为年龄有关的记忆损伤(AAMI)或温和的认知损伤(MCI)，到ADRD标准定义的可能的阿尔茨海默氏病的转化。从通过参照人群，对于记忆损失或与前阿尔茨海默氏病症状学有关的其他的困难的早期信号，阿尔茨海默氏病家族史，遗传危险性因素，年龄，性别，及其他预言高阿尔茨海默氏病危险的特征的筛选，从非临床人群选择具有转化为阿尔茨海默氏病高风险的患者。合适的测量学基准得分包括MMSE和ADAS和其他的测量学标准，用来评价多个收集的正态群体。  
15 这些患者群体被分成合适的组，有的使用安慰剂，有的使用药剂。这些患者群体遵循约六个月的间隔，患者的端点为，观察结束时，他或她是否转变成ADRD标准所定义的可能的阿尔茨海默氏病。

### XIII. 一般的材料和方法

#### 20 1. 抗体滴度的测量

25 通过在小鼠尾静脉作一个小放血，并在微型离心管中收集约200  $\mu$  l血液。首先剃掉豚鼠齿爪背面，然后使用18计量针在跖骨静脉刻痕，在微型离心管中收集豚鼠血液。血液在室温下(RT)凝结一小时，涡旋，然后在14000xg离心10分钟，从血清中分离凝块。然后将血清转入干净的微型离心管，在4 $^{\circ}$ C存储，直到滴定。

30 抗体滴度通过ELISA测定。96孔微量滴定板(Costar EIA plates)用100  $\mu$  l包含10  $\mu$  g /毫升A  $\beta$  42或SAPP或者其他的抗原的溶液，每一个体都是孔涂敷缓冲液 (0.1M磷酸钠, pH 8.5, 0.1%叠氮化钠)其他的抗原的溶液涂敷，并在RT下保存过夜。对孔吸气，加入血清，开始为

Specimen稀释剂( 0.014 M磷酸钠, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.6%牛血清清蛋白, 0.05%乙基汞硫代水杨酸钠)中的1 / 100稀释物。直接在该板上制备样品的七个系列稀释液, 三倍稀释, 最终的稀释物为1/218700。将该稀释物在涂敷板孔中在RT下培养一小时。然后将该板用包含0.05%吐温20PBS洗涤四次。第二抗体, 与辣根过氧化酶共轭的山羊抗小鼠Ig(从Boehringer Mannheim获得), 作为100  $\mu$ l Specimen稀释剂中的1 / 3000稀释物加入该孔, 并在RT下培养一小时。将该板再用PBS, 吐温20洗涤四次。为了生成色原, 将100  $\mu$ l TMB ( 3,3',5,5'-四甲基联苯胺, 从PierceChemicals获得)缓慢加入各孔, 在RT下培养15分钟。添加25  $\mu$ l 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。然后在分子装置上在V<sub>最大</sub> ( 450 nm - 650 nm)处读出颜色强度。

滴度被称为达到最大OD一半的血清稀释物的倒数。除滴度很高的情况之外, 最大OD通常为最初的1 / 100稀释物, 在这种情况下较高的最初的稀释物为形成最大OD所必需。如果50%点落在两稀释物之间, 可线性外推计算最终的滴度。为计算几何平均数抗体滴度, 小于100的滴度被指定为25的滴定度。

## 2.淋巴细胞增殖测定

用异氟烷小鼠麻醉。除去脾, 并用5毫升包含10%热灭活的胎儿牛血清(PBS-FBS)的PBS漂洗两次, 然后在50°C匀化。在1.5毫升PBS-FBS中在Medimachine(Dako)以100 rpm离心10秒的Centricon单位(DakoA/S, Denmark), 接着通过100微米孔径大小尼龙筛过滤。将脾细胞用15毫升PBS -FBS洗涤一次, 然后通过200xg5分钟的离心作用得到小球, 通过将该小球在RT下, 在5毫升包含0.15M NH<sub>4</sub>Cl, 1 M KHCO<sub>3</sub>, 0.1 M NaEDTA, pH 7.4的缓冲液中, 再悬浮五分钟, 溶解红细胞。然后如同上述洗涤白血球。将重新分离的脾细胞(每孔10<sup>5</sup>细胞)一式三份在96孔U型底组织培养处理微量滴定板(Coming, Cambridge, MA)中在补充有2.05 mL-谷氨酸盐, 1%青霉素/链霉素, 和10%热灭活FBS的RPMI 1640介质( JRH Biosciences Lenexa, KS)中, 在37°C,

培养96小时。各种的A $\beta$ 肽，A $\beta$  1-16，A $\beta$  1-40，A $\beta$  1-42或A $\beta$  40-1  
 逆层序蛋白质同样以从5到0.18微摩尔的剂量四步添加。对照孔细胞用  
 没有添加蛋白质的刀豆素A(ConA)(Sigma, cat.#\_C5275, 1微克/毫升)  
 培养。细胞用<sup>3</sup>H胸苷(1  $\mu$  Ci /孔, 从AmershamCorp., ArlingtonHeights IL  
 5 获得)脉冲最终的24小时。然后在UniFilter板上收获细胞, 用Top Count  
 微量滴定板闪烁计数器 ( Packard Instruments, Downers Grove, IL)计  
 算。结果用合入不能溶解的高分子的放射性的每分钟计数(cpm)来表  
 示。

#### 10 4.脑组织制剂

处死后, 除去大脑, 一个大脑半球免疫组织化学的分析, 三个大  
 脑区域(海马体, 皮层和小脑)从另一个大脑半球解剖, 用于按特定的  
 ELISAs测量各种A $\beta$ 蛋白质和APP形式的浓度(Johnson Wood 等, 同  
 上)。

15 ELISAs所用组织在10体积冰冷却的胍缓冲液( 5.0 M胍- HCl, 50  
 mM Tris - HCl, pH 8.0)中匀化。通过使用Adams Nutator ( Fisher)在RT  
 下和缓搅拌三到四小时混合匀浆, 然后在- 20 $^{\circ}$ C存储, 直到A $\beta$ 和APP  
 定量分析。早先的实验已经显示分析物在此储藏条件之下是稳定的,  
 而且合成的A $\beta$ 蛋白质(Bachem)可以定量地恢复阻止进入当来自小鼠  
 20 同窝仔畜(Johnson-Wood等)的对照脑组织匀浆。

#### 5.A $\beta$ 水平的测量

将大脑匀浆用冰冷的酪蛋白稀释剂(0.25%酪蛋白, PBS, 0.05%  
 叠氮化钠, 20  $\mu$  g/毫升抑肽酶, 5mM EDTA, pH 8.0, 10  $\mu$  g /ml亮肽  
 25 素)1:10稀释, 然后在4 $^{\circ}$ C, 在16000xg离心20分钟。合成的A $\beta$ 蛋白质  
 标准样品(1-42氨基酸)和APP标准样品制备于包括0.5M胍和0.1%牛血  
 清蛋白(BSA)的最终组合物中。“总的”A $\beta$ 夹层ELISA使用单克隆抗  
 体266, 特异于A $\beta$ 氨基酸13-28(Seubert等), 作为俘获抗体, 和生物素  
 化的单克隆抗体3D6, 特异于A $\beta$ 的氨基酸1-5(Johnson-Wood, 等),  
 30 作为指示器抗体。3D6单克隆抗体不辨认分泌的APP或全长的APP, 但

是只检测具有氨基末端天冬氨酸的A $\beta$ 。这些测定具有 $\sim 50\text{ng/毫升}$  ( $11\text{nM}$ )的下限敏感性，显示在至多 $1\text{ng/毫升}$ 的浓度下对内生的鼠科动物A $\beta$ 蛋白质无交叉活性(Johnson-Wood 等，同上)。

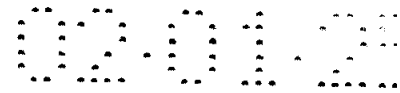
5           A $\beta$  1-42特异的夹层ELISA使用mA $\beta$  21F12，特异于A $\beta$  氨基酸33-42(Johnson-Wood, 等)，作为俘获抗体。生物素化的mA $\beta$  3D6同样是这些测定中的指示器抗体，具有约 $125\ \mu\text{g/毫升}$  ( $28\ \mu\text{M}$ , Johnson-Wood 等)的下限敏感性。对于A $\beta$  ELISAs,  $100\ \mu\text{l}$  mA $\beta$  266 ( $10\ \mu\text{g/ml}$ 或者mA $\beta$  21F12 ( $5\ \mu\text{g/ml}$ )被涂敷进入96孔免疫测定板(Costar)的孔中，在  
10           RT下培育过夜。通过吸气除去溶液，通过添加 $200\ \mu\text{l}$  0.25% PBS缓冲液  
中的人血清白蛋白在RT下阻塞该孔至少1小时。除去阻塞溶液，将该板在 $4^\circ\text{C}$ 干燥存储直到使用。在使用之前用洗涤缓冲液[Tris-缓冲的盐水( $0.15\ \text{M NaCl}$ ,  $0.01\ \text{M Tris - HCl}$ , pH 7.5), 加0.05%吐温20]将该板再水化。每孔添加 $100\ \mu\text{l}$ 样品和标准样品的一式三份的等分试样，  
15           然后在 $4^\circ\text{C}$ 培养过夜。各测定步骤之间用洗涤缓冲液将该板至少洗涤三次。在酪蛋白测定缓冲液( $0.25\%$ 酪蛋白, PBS,  $0.05\%$ 吐温20, pH 7.4)中稀释到 $0.5\ \mu\text{g/毫升}$ 的生物素化的mA $\beta$  3D6被添加，并在RT下，在该孔中培养1小时。1小时内，RT下，在酪蛋白测定缓冲液中稀释的抗生物素蛋白辣根过氧化酶共轭体(Avidin HRP从Vector, Burlingame, CA获得)被加入该孔。添加比色酶作用物Slow TMB-ELISA (Pierce)，  
20           在室温下反应15分钟，通过添加 $25\ \mu\text{l}$   $2\ \text{N H}_2\text{SO}_4$ 终止酶促反应。

使用分子装置在 $V_{\text{最大}}$ 处测量 $450\ \text{nm}$ 和 $650\ \text{nm}$ 的吸收率差定量反应产物。

25

## 6.APP水平的测量

使用两种不同的APP测定。第一个，指定APP- $\alpha$ /FL, 辨认APP-d( $\alpha$ )和全长的(FL)APP形式。第二测定特异于APP- $\alpha$ 。APP- $\alpha$ /FL测定辨认隐藏的APP，包括A $\beta$ 的第一个12氨基酸。因为指示器抗体(2H3)不特异于 $\alpha$ -回形处，发生在APP695的氨基酸612-613之间(Esch等, Science  
30



248, 1122 -1124 (1990)); 这些测定同样辨认全长APP ( APP-FL)。使用固定的APP抗体到APP-FL胞质尾区消耗大脑匀浆APP-FL的初步试验表明大约30-40%APP- $\alpha$  /FLAPP是FL(数据未显示)。APP- $\alpha$  FL和APP- $\alpha$  测定的俘获抗体是mAb8E5, 针对APP695形式的氨基酸444到592产生的(Games等, 同上)。APP- $\alpha$  /测定的指示器mAb是mAb中2H3, 特异于APP695的氨基酸597-608(Johnson-Wood等, 同上), 用于APP- $\alpha$  测定的指示器抗体是mAb16H9的生物素化的衍生物, 产生APP的氨基酸605到611。

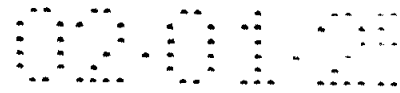
APP- $\alpha$  FL测定的敏感性的下限为大约11ng/ml(150  $\rho$  M)(JohnsonWood等), APP- $\alpha$  特定的测定的敏感性的下限是22ng/ml(0.3nM)。对于两种APP测定, mAb8E5涂敷在96孔EIA板的孔上, 如上文mAb266所述。纯化的隐藏APP- $\alpha$  的重组体用作APP- $\alpha$  测定和APP- $\alpha$  /FL测定的参考标准(Esch等, 同上)。将5M胍中的大脑匀浆样品在ELISA样品稀释剂(0.014M磷酸盐缓冲液, pH 7.4, 0.6%牛血清清蛋白, 0.05%乙基汞硫代水杨酸钠, 0.5M NaCl, 0.1% NP40)中稀释1:10。然后在包含0.5M胍的样品稀释剂中稀释1: 4。然后在室温下将稀释匀浆以16000xg离心15秒。APP标准样品和样品一式两份的等分试样加入板中, 在室温下培养1.5小时。将生物素酰化的指示器抗体2H3或16H9用样品在室温下培养1小时。抗生蛋白链菌素碱性磷酸酶(Boehringer Mannheim)在样品稀释剂中稀释1:1000, 在孔中在室温下培养1小时。加入荧光酶作用物4-甲基-伞花基-磷酸酯, 在室温下培育30分钟, 使用细胞氟tm 2350 荧光计(Millipore) at 365 nm激发和450 nm发射处读出该板数据。

25

### 7.免疫组织化学

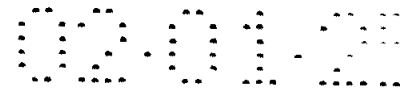
将大脑在40°C的含4%仲甲醛的PBS中保存三天, 然后在4°C的含1%仲甲醛的PBS中存储一到七天直到切片。在室温下用振动切片机切出四十微米厚的冠状面, 在免疫组织化学的处理之前, 在-20°C的防冻剂(30%甘油, 30%乙二醇, 磷酸盐缓冲液中)中存储。对于各个大脑,

30



六个海马体背面的水平切片，各间隔240微米，用下列之一的抗体培养过夜：(1)在PBS和1%马血清中稀释到2 $\mu$ g/毫升的浓度的生物素酰化的抗A $\beta$  (mAb, 3D6, 特异于人类A $\beta$ )；或(2)在PBS和1.0%马血清中稀释到3 $\mu$ g/毫升的浓度的生物素酰化的特异于人类APP, 8E5的mAb；或  
5 (3)用0.25%TritonX-100和1%马血清1:500稀释的特定于胶质原纤维酸性蛋白(GFAP; Sigma Chemical Co.)的mAb, 在Tris - 缓冲的盐水中, pH 7.4 (TBS); 或 (4)用TBS中的0.25% Triton X - 100和1%兔血清1:100稀释的特异于CD11b, MAC - 1抗原的mAb, ( Chemicon International); 或 (5)用TBS中的0.25% Triton X - 100和1%兔血清1:100稀释的特定于  
10 MHC II抗原( Pharmingen)的mAb; 或 (6)用PBS中的1 %兔血清1:100稀释的特定于CD43( Pharmingen)的大鼠mAb; 或(7)用PBS中的1%兔血清1:100稀释的特定于CD45RA(Pharmingen)的大鼠mAb; 或(8)用PBS中的1%兔血清1:100稀释的特定于CD45RB的大鼠单克隆抗体A $\beta$ ; 或(9)用PBS中的1%兔血清1:100稀释的特定于CD 45 ( Pharmingen)的大鼠单  
15 克隆抗体A $\beta$ ; 或(10)用PBS中的1%兔血清1:100稀释的特定于CDcd3e(Pharmingen)的生物素酰化的多克隆的仓鼠A $\beta$ ; 或(11)用PBS中的1%兔血清1:200稀释的特定于CD3(Serotec)的大鼠mAb; 或(12)包含1%正常的马血清, 缺乏初级抗体的PBS溶液。

20 在室温下, 将与列在上面1, 2和6-12上的抗体溶液起反应的切片用PBS中的1.0% Triton X-100, 0.4%过氧化氢预先处理20分钟阻挡内生的过氧化物酶。接下来将它们在4 $^{\circ}$ C用初级抗体培养过夜。然后在室温下, 将与3D6或8E5或CD3e mAbs起反应的切片与PBS中的用试剂盒的组分“A”和“B”1:75稀释的辣根过氧化物酶抗生物素蛋白生物素  
25 复合体反应一小时(Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.)。将与特定于CD 45RA, CD 45RB, CD 45, CD3和PBS溶液的抗体起反应的缺少初级抗体的切片, 在室温下, 分别用在PBS中1:75稀释的生物素酰化的抗鼠IgG(媒介物)或在PBS中1:75稀释的生物素酰化的抗小鼠IgG(媒介物), 培养1小时。然后在室温下, 将切片与PBS中的  
30 用试剂盒的组分“A”和“B”1:75稀释的辣根过氧化物酶抗生物素蛋



白生物素复合体反应一小时(Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.)。

5 在室温下, 将切片在0.01%过氧化氢, 0.05%3,3'-二氨基联苯胺 (DAB)中显色。在室温下, 将指定用GFAP-, MAC1-AND MHCII-特定的抗体培育的切片用0.6%过氧化氢预先处理, 以阻挡内生的过氧化物酶, 然后在4°C用初级抗体培养过夜。在室温下, 将与GFAP抗体起反应的切片用TBS1:200稀释的鼠的生物素酰化的抗小鼠IgG(Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit)培养1小时。接下来将该切片与  
10 用TBS 1:1000稀释的抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物 ( Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit)反应一小时。将MAC-1-或MHC II-特定的单克隆抗体培养的切片作为初级抗体, 随后在室温下与用TBS 1:200稀释的兔的生物素酰化的抗鼠IgG反应1小时, 随后用TBS 1:1000稀释的抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合体培育一小时。  
15 将切片用GFAP-, MAC-1-和MHC II特定的抗体培养, 然后通过室温下用0.05% DAB, 0.01%过氧化氢, 0.04%氯化镍, TBS分别处理4和11分钟检验。

20 将免疫标记切片安装在载玻片上(VWR, Superfrost载玻片), 空气干燥的过夜, 浸在Propar(Anatech)中, 使用Permout ( Fisher)作为封固剂用盖片覆盖。

25 对于复染色A $\beta$ 斑点, 将GFAP-阳性的切片的子集安装在Superfrost载玻片上, 在含1%硫黄素S (Sigma)的水中培养7分钟, 接着进行免疫组织化学的处理。然后将切片脱水, 在Propar中清除, 然后用盖片覆盖, 用Permout安装。

## 8.图像分析

30 通过CCD摄影机连接Nikon Microphot -FX显微镜的Videometric  
150 图像分析系统 ( Oncor, Inc., Gaithersburg, MD)和索尼公司

Trinitron监视器用于该免疫活性幻灯片的量化。将切片图像存入视频缓冲器，测定颜色和饱和度阈，计算通过免疫标记结构占据的总的象元面积。对于各切片，手工画出海马体轮廓，计算海马体占据的总的象元面积。淀粉样负荷的百分比为:(包含与mAb 3D6具有免疫活性的Aβ沉淀的海马体的部分)x100。同样地，神经炎负荷的百分比为:(包含与单克隆抗体8E5反应性的营养不良的轴突的海马体的部分) x100。将运行Simple 32 软件应用程序的C - 图像系统 ( Compix, Inc., Cranberry Township, PA)通过Optronics照相机连接到Nikon Microphot - FX 显微镜上，并用于测定GFAP阳性的星形细胞和MAC - 1和MHC II - 阳性的神经胶质占据脾后皮层的百分比。将免疫活化切片图像存入视频缓冲器，选择测定单色的-定位阈，计算通过免疫标记细胞占据的总的象元面积。对于各切片，手工画出脾后皮层(RSC)轮廓，计算RSC占据的总的象元面积。星形细胞增生的百分比限定为:(GFAP反应性的星形细胞占据RSC的部分)X100。同样地，神经胶质细胞的百分比定义为:(MAC1-或MHC II-反应性小胶质细胞占据RSC的部分)X100。对于所有的图像分析，六个海马体背面的水平切片，各间隔240微米，测定各个动物。在所有情况下，观测者不知道该动物的处理状态。

#### XIV :针对淀粉样沉淀的抗体活性的体外筛选测定

为了检验抗体清除斑点的效果，建立体外测定，其中用PDAPP小鼠或者人类AD大脑不固定低温箱切片培养初级神经胶质的细胞。神经胶质的细胞从婴儿DBA /2N小鼠(1-3天)的大脑皮质中获得。在HBSS-(Hanks平衡盐溶液, Sigma)中用50 μg /毫升脱氧核糖核酸酶I (Sigma)机械地分离皮层。用100 μm细胞过滤器(Falcon)过滤分离的细胞，在1000 rpm离心5分钟。将该小球再悬浮于菌种生长培养基(高葡萄糖DMEM, 10%FBS, 25ng/ml rmGM-CSF)，将该细胞以每T-75塑料培养瓶2只大脑的密度用板固定。7-9天后，在37℃下，使烧瓶以200rpm的速度在定轨振荡器上旋转2小时。将细胞悬浮液在1000rpm离心，再悬浮于测定媒介中。

30

将PDAPP小鼠或人类AD大脑(死后经过时间<3小时)的10- $\mu$ m低温箱切片解冻, 安装在聚赖氨酸涂敷的玻璃酒杯盖片上, 放入24孔组织培养板的孔中。用由H-SFM(杂种细胞 - 无血清介质, Gibco BRL) 与1% FBS, 谷氨酰胺, 青霉素/链霉素, 和5ng /毫升rmGM-CSF(R & D)组成的测定媒介将盖片洗涤两次。1小时内以2x浓度(5 $\mu$ g/毫升, 最终的)添加对照组或抗A $\beta$ 抗体。然后以0.8x10<sup>6</sup>细胞/毫升密度的测定媒介接种小神经胶质的细胞。在湿润的保温箱(37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>)培养24小时或更多。培育结束时, 将培养物用4%仲甲醛固定和用0.1% Triton - X100渗透。将切片用生物素酰化的3D6, 接着用抗生蛋白链菌素/Cy3共轭体(Jackson ImmunoResearch)染色。外生的小神经胶质的细胞通过核染剂(DAPI)检验。用反转荧光显微镜(Nikon, TE300)观察培养物, 用使用SPOT软件的SPOT数字式摄象机(Diagnostic instruments)显微照相。对于蛋白质印迹分析, 将培养物提取在8M尿素中, 在降低麦黄酮(tricine)样品缓冲剂中1:1稀释, 负荷在16%麦黄酮凝胶(Novex)上。转移在止动剂上后, 污点暴露于5 $\mu$ g /毫升的pab A $\beta$  42, 后面是HRP共轭的抗小鼠抗体, 用ECL展开(Amersham)。

当测定用存在抗体16C11(一种针对A $\beta$ 的抗体, 也就是说在体内无效)的PDAPP大脑切片进行,  $\beta$ 淀粉样斑点完整无损, 未观察到噬菌作用。相反, 当邻近的切片是存在10D5的培养物时, 淀粉样的沉淀大量地产生, 小神经胶质的细胞显示许多包含A $\beta$ 的噬菌细胞泡。相同的结果由AD大脑切片得到; 10D5诱发AD斑点吞噬作用, 而16C11没有影响。另外, 当用小鼠或人类小神经胶质的细胞, 和用小鼠, 兔, 或者灵长类针对A $\beta$ 的抗体时, 该测定提供类似的结果。

表16显示若干针对A $\beta$ 的抗体得到的结果, 比较它们在体外测定中的诱导噬菌作用和在被转移研究中的减少体内斑点负荷的能力。虽然16C11和21F12与集合的合成A $\beta$ 肽结合, 具有高抗体亲抗原性, 这些抗体不能在未固定的大脑切片中与 $\beta$ 淀粉样斑点反应, 不能在体外测定中触发噬菌作用, 并在体内是无效的。10D5, 3D6, 和针对A

$\beta$  的多克隆抗体在全部三项测量中都具有活性。22C8抗体更强烈地结合到天然的A  $\beta$  的模拟形式，其中位置1和7的天冬氨酸被替换为异天冬氨酸。这些结果表明体内效果起因于抗体直接介导的CNS内部斑点的清除，而且体外测定可预示体内效果。

5

相同的测定已经用于试验清除针对称为NAC的合成核素片段的抗体。合成核素已经被证明是与淀粉样斑点有关的蛋白质。对NAC的抗体与包含淀粉样的斑点的脑组织样品，如前所述，小神经胶质的细胞接触。兔血清用作对照。随后的监视显示斑点的数目和大小显著地减少，表现出清除抗体的活性。

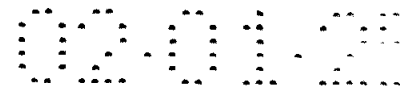
10

表16 体外评价作为体内效果的预测

抗体	同源异型	对于集合A $\beta$ 亲合力(pM)	与 $\beta$ -淀粉样斑点的结合	体外效果	体内效果
单克隆					
3D6	IgG2b	470	+	+	+
10D5	IgG1	43	+	+	+
16C11	IgG1	90	-	-	-
21F12	IgG2a	500	-	-	-
TM2a	IgG1	-	-	-	-
多克隆					
1-42	混合	600	+	+	+

共焦显微镜方法来证实体外测定期间A  $\beta$  被内在化。存在对照抗体的情况下，外生的小神经胶质的细胞保留在上面组织的共焦平面中，没有含A  $\beta$  的噬菌细胞的泡，且切片内部斑点完整无损。10D5存在下，几乎所有的斑点材料均列于外生的小神经胶质的细胞内部的泡内。为了测定内在化肽的走向用8M尿素以各种时间点提取10D5处理的培养物，通过蛋白质印迹分析检查。在一小时时点，仍无噬菌作用发生，用针对A  $\beta$  的多克隆抗体反应显示强烈的4kD带(相当于A  $\beta$  肽)。

20



A $\beta$  免疫活性在第1天降低，在第3天消失。因此，A $\beta$  抗体介异的噬菌作用导致其退化。

5 为测定体外评价中噬菌作用是否是Fc介异的，制备抗A $\beta$  抗体3D6的F(ab')<sub>2</sub>片段。虽然F(ab')<sub>2</sub>片段保持它们完全的与斑点反应的能力，但是它们不能通过小神经胶质的细胞触发噬菌作用。另外，整体抗体的噬菌作用可以被针对鼠科动物Fc受体(抗-CD16/32)的试剂阻塞。这些数据显示通过Fc受体介导的噬菌作用而发生A $\beta$  的体内清除。

#### 10 XV: 抗体通过血脑屏障的通道

本申请描述的实验为提供抗体静脉注射后进入大脑的能力的信息，提供抗体通过静脉注射进入正常的或者PDAPP小鼠的外周组织后，传递到大脑的抗体的浓度的测量方法。而进行这样的测量用于预报和测定有效剂量。

15

用0.9% NaCl灌注PDAPP或对照组正常的小鼠。解剖大脑区域(海马体或皮层)，并迅速冷冻。大脑在0.1% triton +蛋白酶抑制剂中匀化。通过ELISA提取发现免疫球蛋白。Fab'<sub>2</sub>山羊抗小鼠IgG被涂敷在作为俘获试剂的RIA板上。将血清或大脑提取物培养1小时。用抗小鼠IgG1-  
20 或IgG2a-HRP或IgG2b-HRP(Caltag)检测同种异型。抗体，无论是否同种异型，在1:1000的浓度存在于CNS中，可在血液中发现。例如，IgG1的浓度是血液中IgG2a的三倍时，在大脑中也是IgG2a的三倍，它们各自以血液中水平的0.1%存在。这些结果在转基因的和非转基因的小鼠中观察到，所以PDAPP不是唯一血脑屏障有漏洞的。

25

虽然为了清楚理解的目的上述发明已经详细描写，但是显然，某些修饰也属于附加权利要求的范围内。本申请引用的全部出版物和专利文件各自全部引入作为参考。

说明书附图

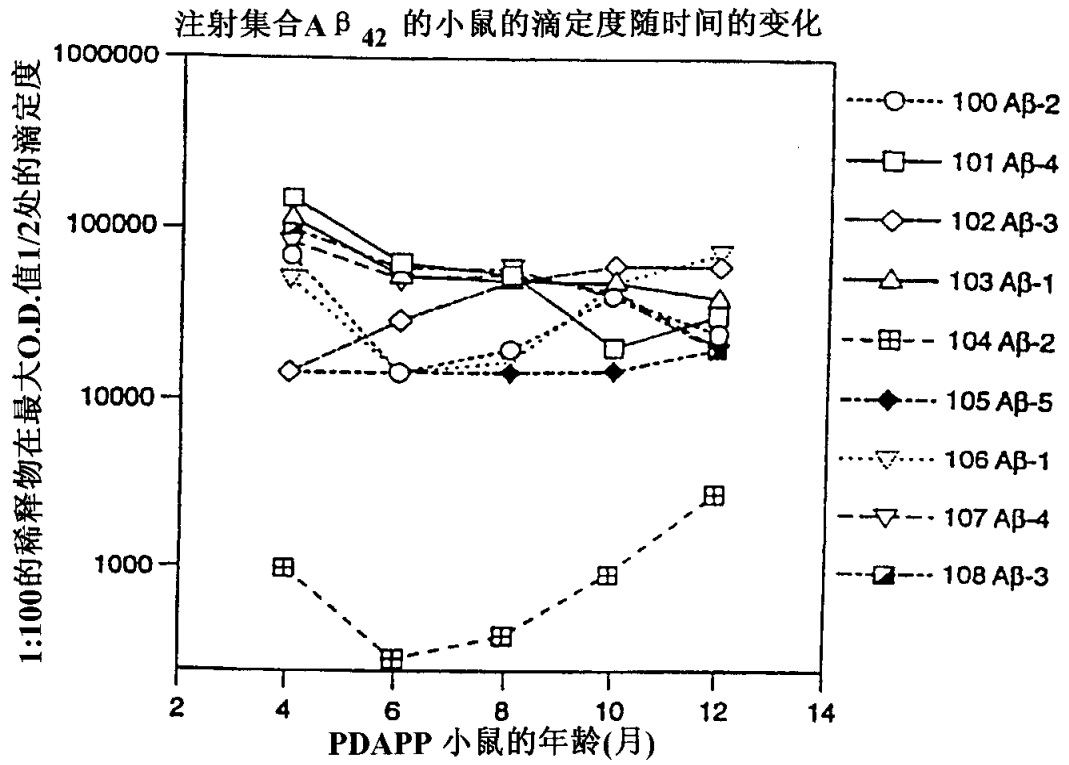


图1

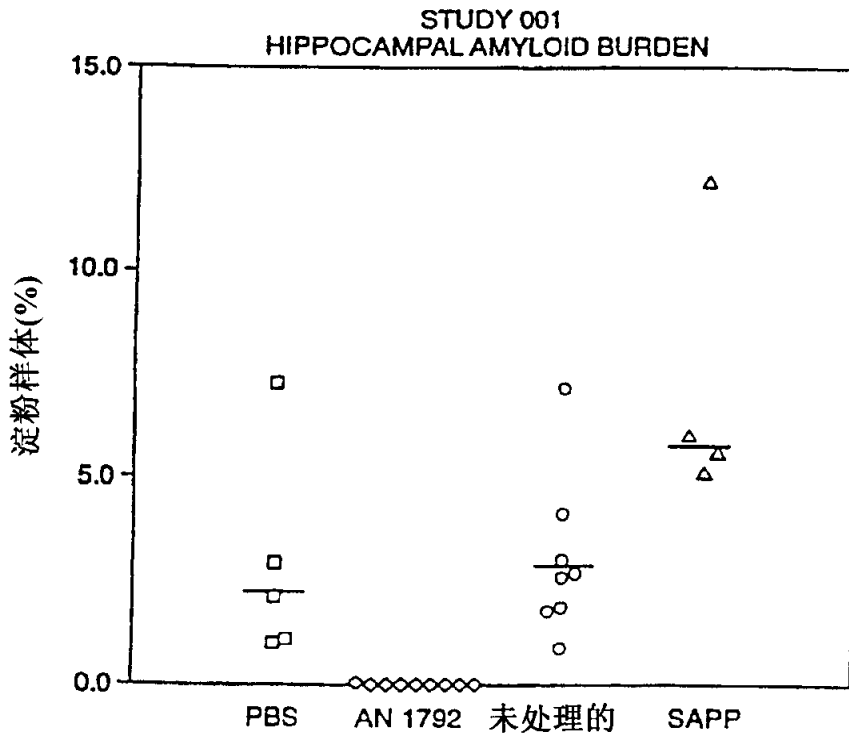


图2



2,3和4次免疫后对多种剂量的AN1792的  
抗体滴度应答

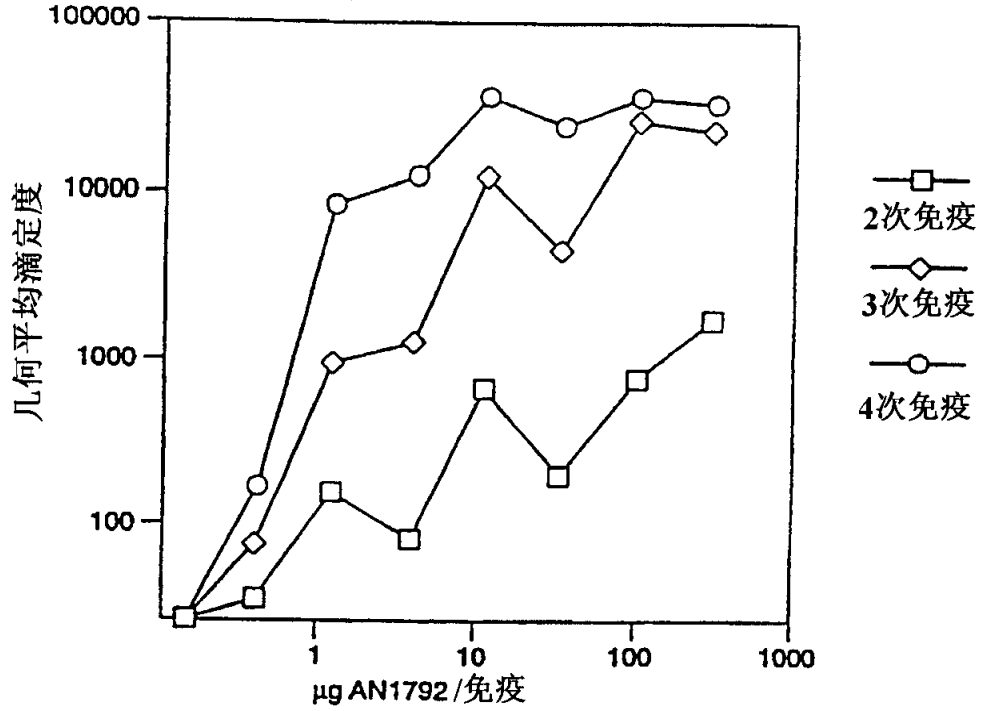


图5

AN1792的抗体应答动力学

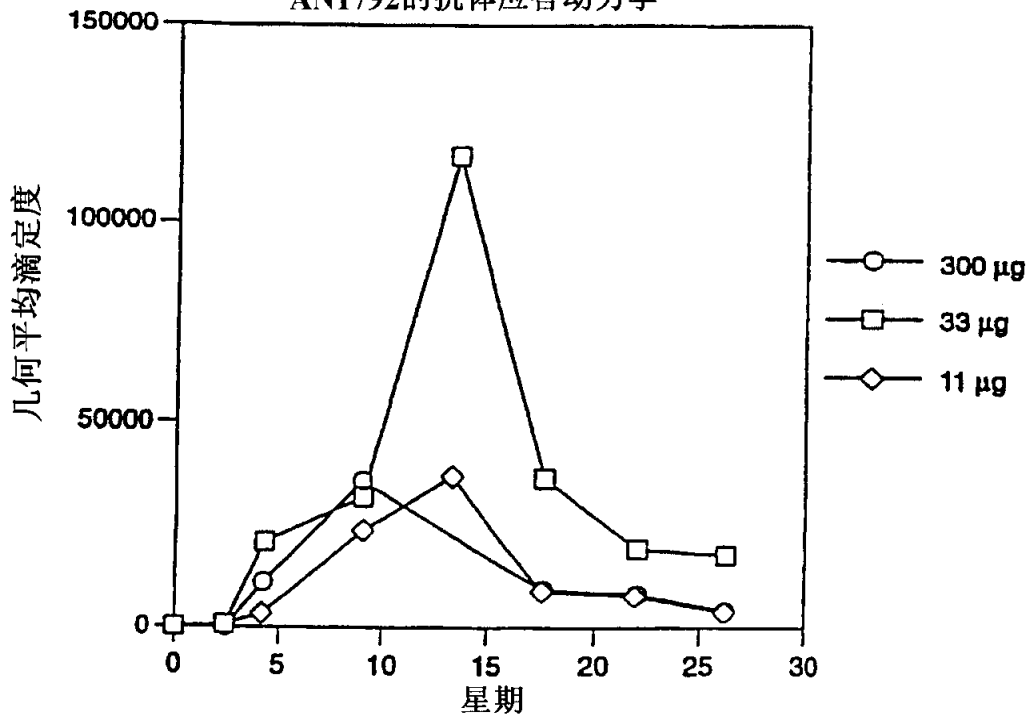


图6

研究002  
皮质淀粉样体负荷

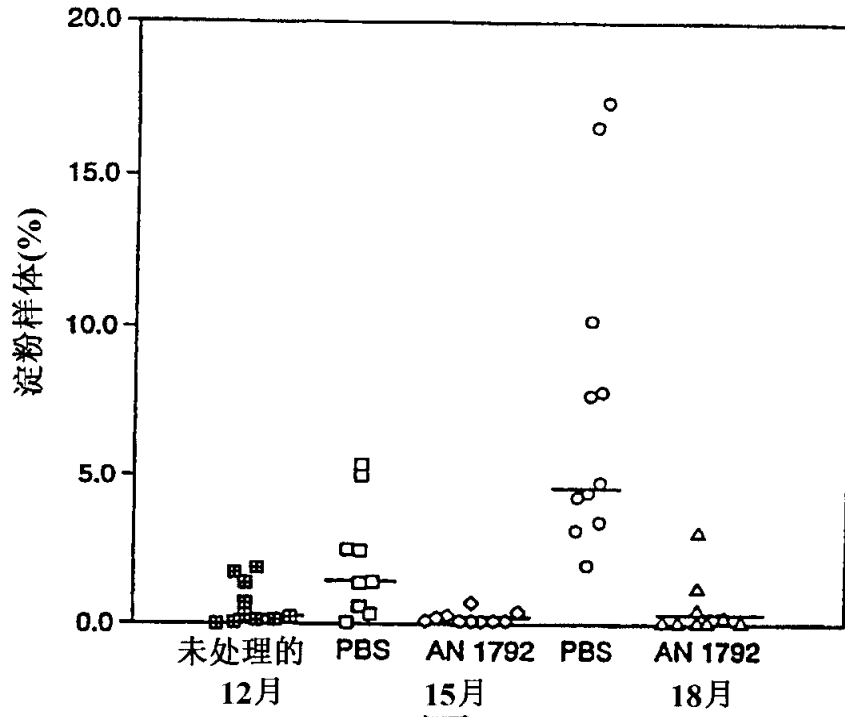


图7

研究002  
皮质神经炎斑点负荷

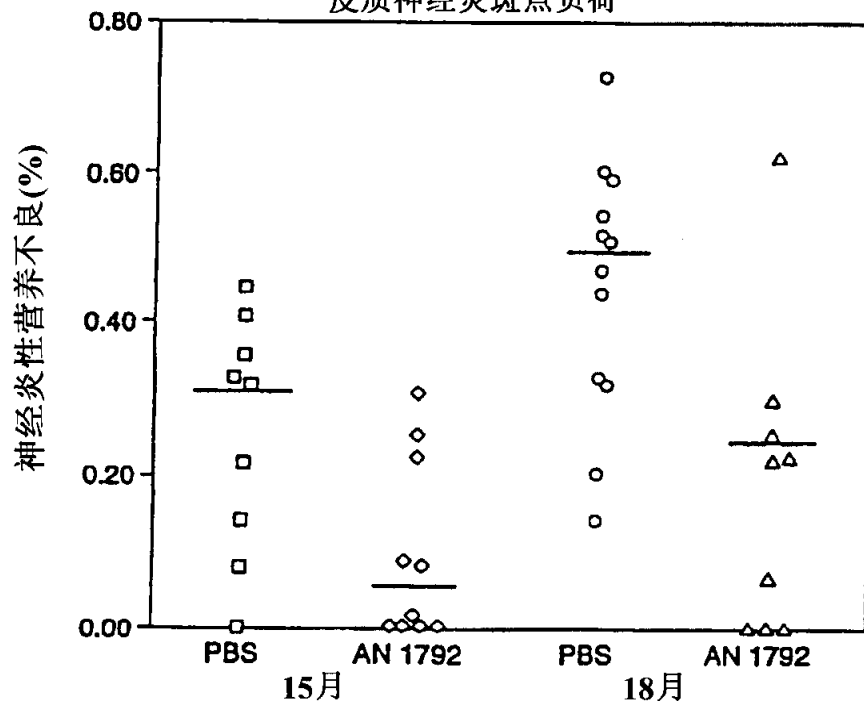


图8

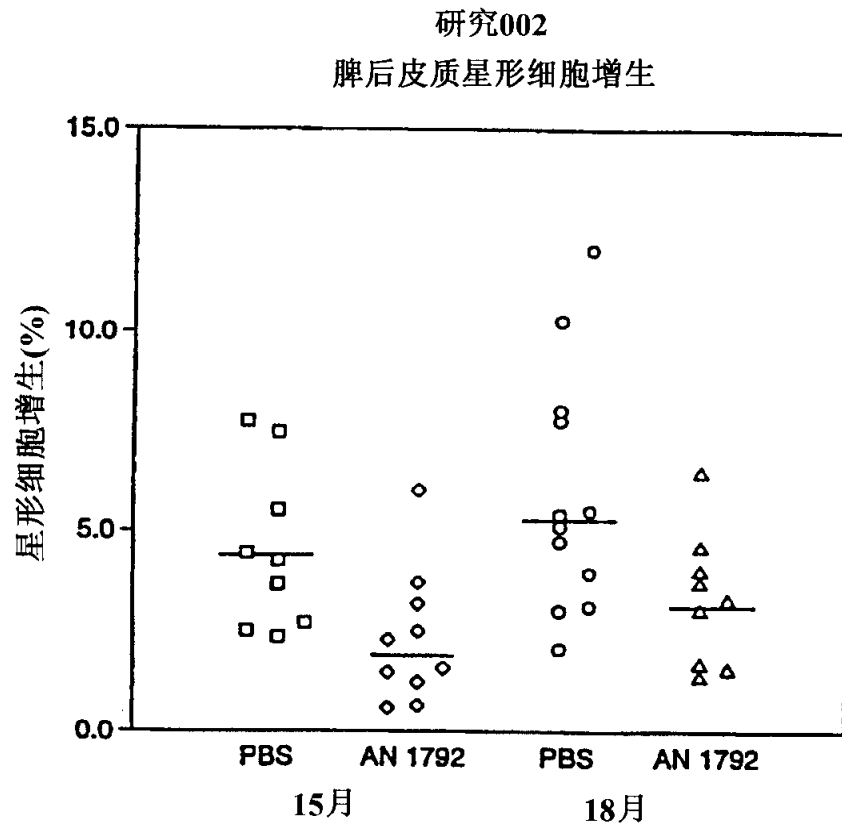


图9

研究002  
脾后皮质量形细胞增生

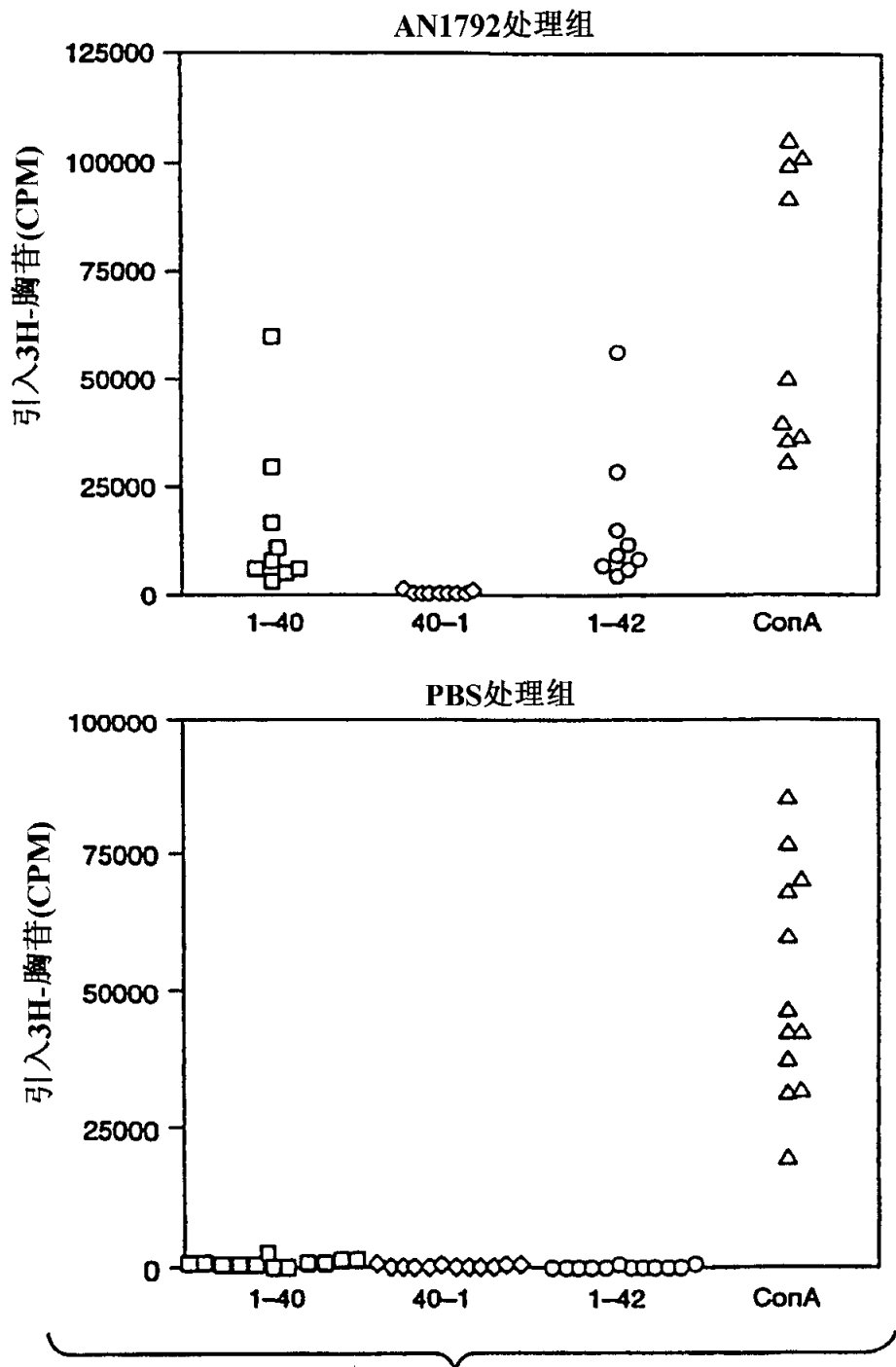


图10

研究006  
A $\beta$  片段的疗效  
全部A $\beta$  皮质数据

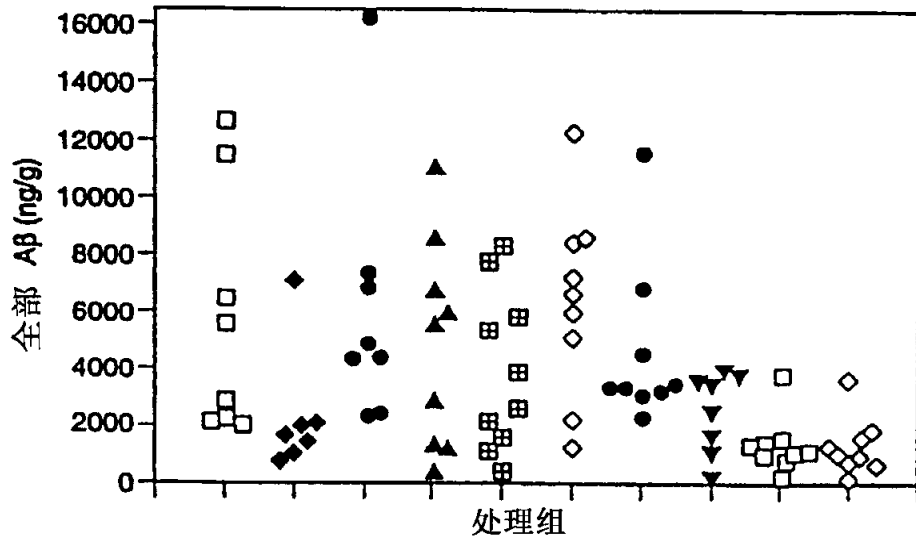


图11

研究006  
皮质淀粉样体负荷

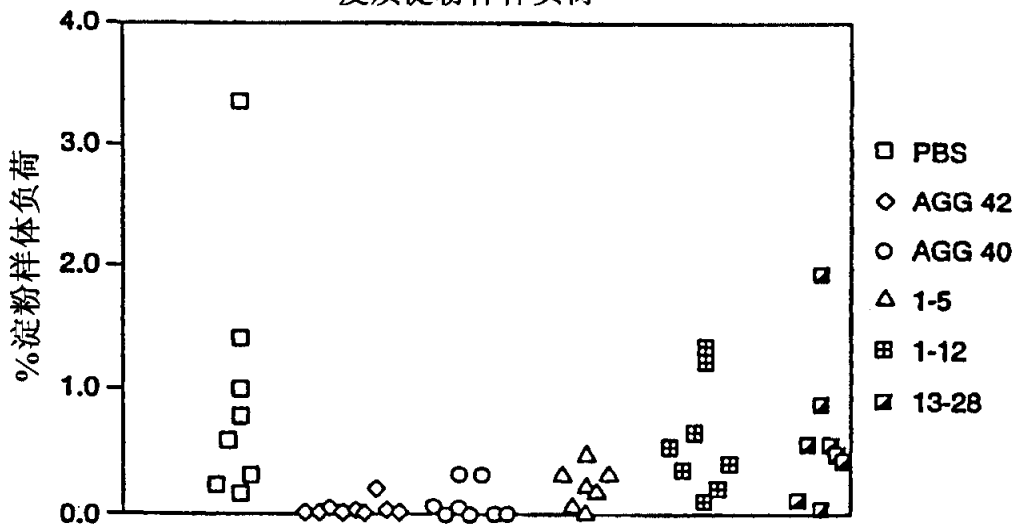


图12

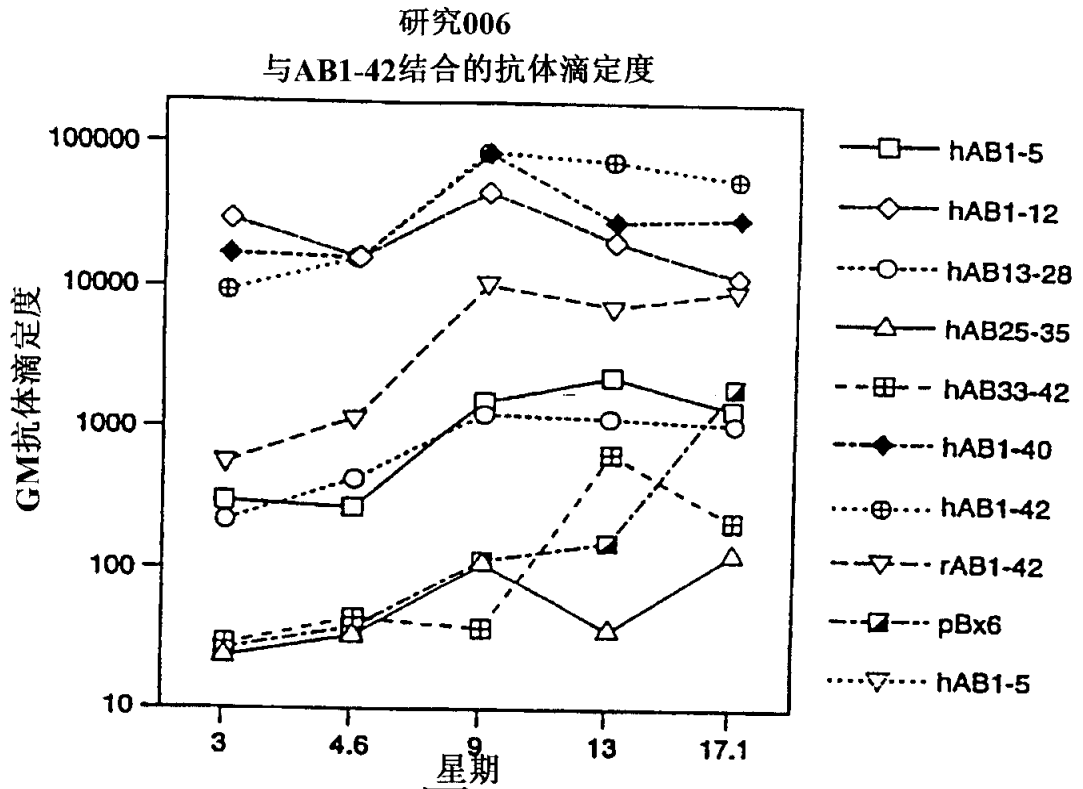


图13

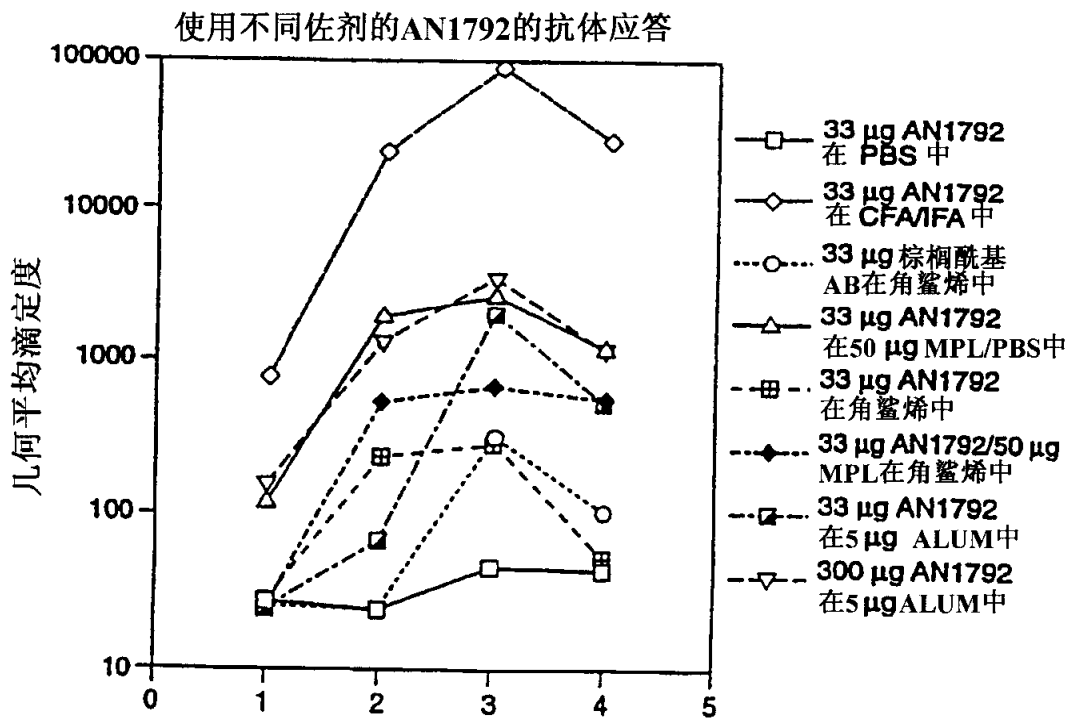


图14

## 皮质

PBS 对照		未处理的 CONTROL	
624-165	272	764-181	3470
625-166	1802	785-182	171
626-167	62	766-183	91
633-168	4696	767-184	6692
634-169	3090	768-185	1353
671-170	2417	771-186	1153
672-171	2840	772-187	3800
829-172	3320	780-188	3740
830-173	1833	843-189	163
831-174	416	844-190	122
792-175	126	845-191	427
793-176	2559	846-192	2674
794-177	289	887-193	453
732-178	179	888-194	2996
733-179	1329	889-195	1075
734-180	5665		
中值 p MALUE(M-W)	1817	中值 p MALUE(M-W)	1153
平均值 标准偏差 %变异系数 p值(t检验)	1931 1718 89 n=16	平均值 标准偏差 %变异系数 p值(t检验)	1825 1769 97 n=15

图15A

## 皮质

2 mg ALUM 100 µg AN1528		50 µg MPL 100 µg AN1528	
660-083	295	643-105	385
681-084	3180	644-106	2640
662-085	2480	645-107	2403
663-086	3014	654-108	1741
664-087	5870	655-109	3053
665-088	5978	656-110	5990
693-089	1620	678-111	3360
694-090	35	679-112	1230
695-091	3400	704-114	2680
697-092	2630	705-115	78
698-093	983	706-116	1290
699-094	5327	729-117	3180
701-095	1862	730-118	1833
702-096	1849	731-119	4590
703-097	2239	736-120	1112
739-098	806	737-121	1653
740-099	5303	757-122	992
741-100	459	758-123	4692
800-103	154	808-124	785
801-104	852	809-125	244
		810-126	32
中值	2051	中值	1741
p MALUE(M-W)		p MALUE(M-W)	
平均值	2407	平均值	2140
标准偏差	1913	标准偏差	1659
%变异系数	79	%变异系数	78
p值(t检验)	n=20	p值(t检验)	n=21

图15B

## 皮质

25 $\mu$ g QS21 100 $\mu$ g AN1528		CEA/IFA 100 $\mu$ g AN1792	
615-128	1257	539-068	693
616-129	361	640-069	508
617-130	1008	641-070	440
536-131	3290	642-071	467
637-132	2520	690-072	42
638-133	3880	691-073	2491
744-134	627	692-074	121
745-135	58	795-075	137
746-136	2610	796-076	822
747-137	1509	797-077	475
769-138	1788	748-087	600
770-139	988	749-079	78
773-140	1199	750-080	1267
774-141	339	751-081	1351
775-142	402	761-082	69
776-143	537		
840-144	1119		
841-145	194		
821-146	1259		
822-147	5413		
823-148	2233		
中值 p MALUE(M-W)	1199	中值 p MALUE(M-W)	475 0.0481
平均值 标准偏差 %变异系数 p值(t检验)	1552 1364 88 n=21	平均值 标准偏差 %变异系数 p值(t检验)	637 655 103 0.0106 n=15

图15C

## 皮质

5 $\mu$ g THIMEROSAL/PBS 10 $\mu$ g AN1792		2 $\mu$ g ALUM 100 $\mu$ g AN1792	
635-149	1337	610-001	432
669-150	4644	611-002	1012
670-151	6335	612-003	3607
673-152	3700	613-004	508
674-153	2750	620-005	465
676-154	1687	621-006	16
681-156	185	622-007	28
682-157	8031	623-008	217
683-158	3450	708-009	2738
754-159	157	709-010	927
755-160	6857	710-011	1609
756-161	482	716-012	1608
805-162	524	784-014	3890
806-163	397	785-015	1614
807-164	234	786-018	285
		787-017	3102
		788-018	1617
		789-019	1474
		815-020	424
		816-021	1375
		817-022	2323
中值	1687	中值	1375
p MALUE(M-W)		p MALUE(M-W)	0.5000
平均值	2718	平均值	1394
标准偏差	2685	标准偏差	1166
%变异系数	99	%变异系数	84
p值(t检验)		p值(t检验)	0.2650
	n=15		n=21

图15D

## 皮质

50 $\mu$ g MPL 100 $\mu$ g AN1792		25 $\mu$ g QS21 100 $\mu$ g AN1792	
646-023	2002	627-045	91
647-024	147	628-046	3397
648-025	1304	631-049	3702
649-026	34	632-050	1776
650-027	980	667-052	1832
724-028	1282	668-053	3023
726-030	1966	686-054	189
727-031	733	687-055	891
720-032	2563	688-056	240
721-033	5563	689-057	110
802-034	113	712-059	3311
803-035	671	825-061	1009
804-036	51	826-082	18165
811-037	613	827-063	73
812-038	332	828-064	78
813-039	1454	837-065	1051
814-040	2441	838-066	270
833-014	742	839-067	371
834-042	40		
836-044	807		
中值	774	中值	950
p MALUE(M-W)	0.1710	p MALUE(M-W)	0.4076
平均值	1192	平均值	2199
标准偏差	1299	标准偏差	4187
%变异系数	109	%变异系数	190
p值(t检验)	0.1506	p值(t检验)	0.8131
	n=21		n=18

图15E

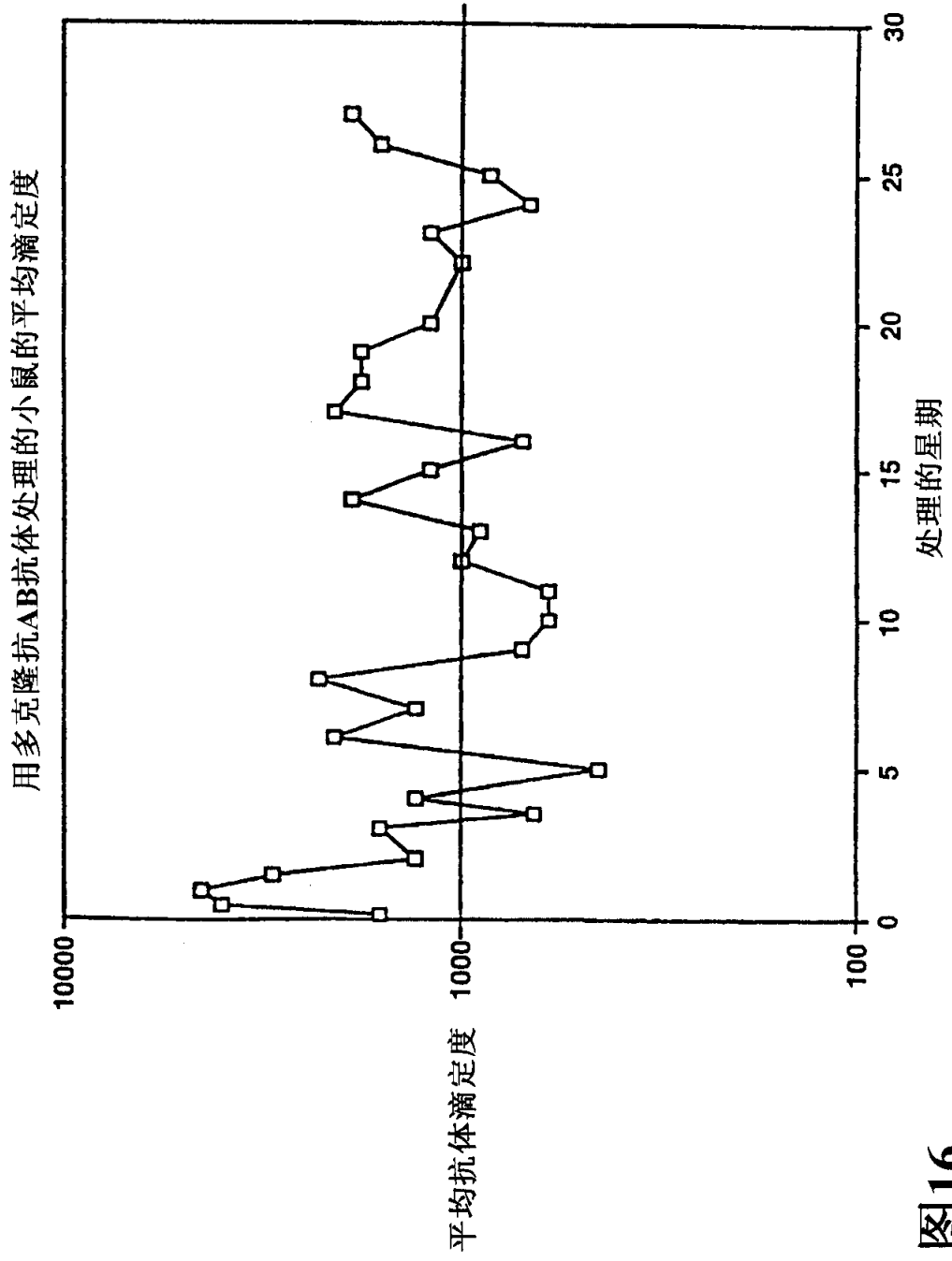


图16

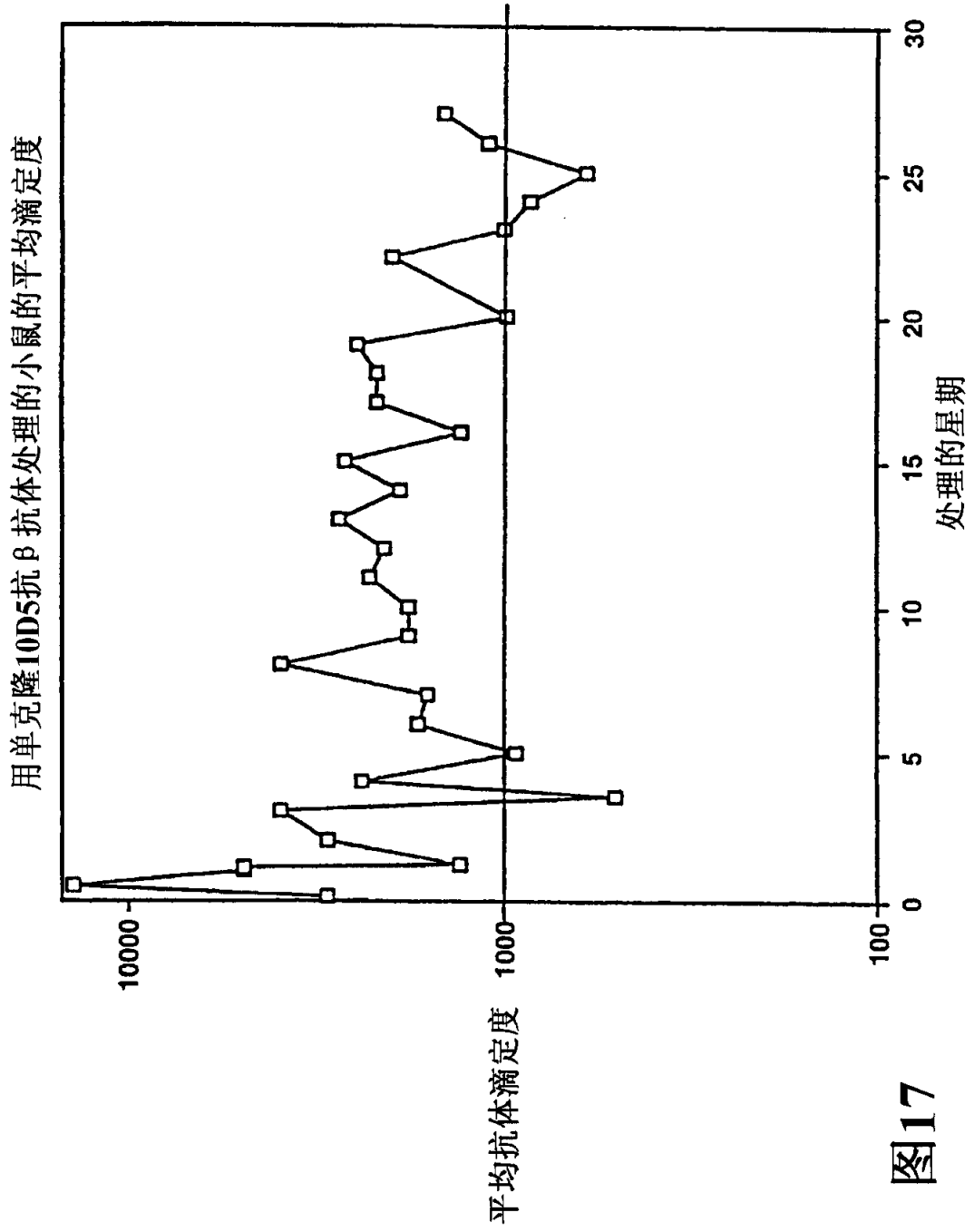


图17

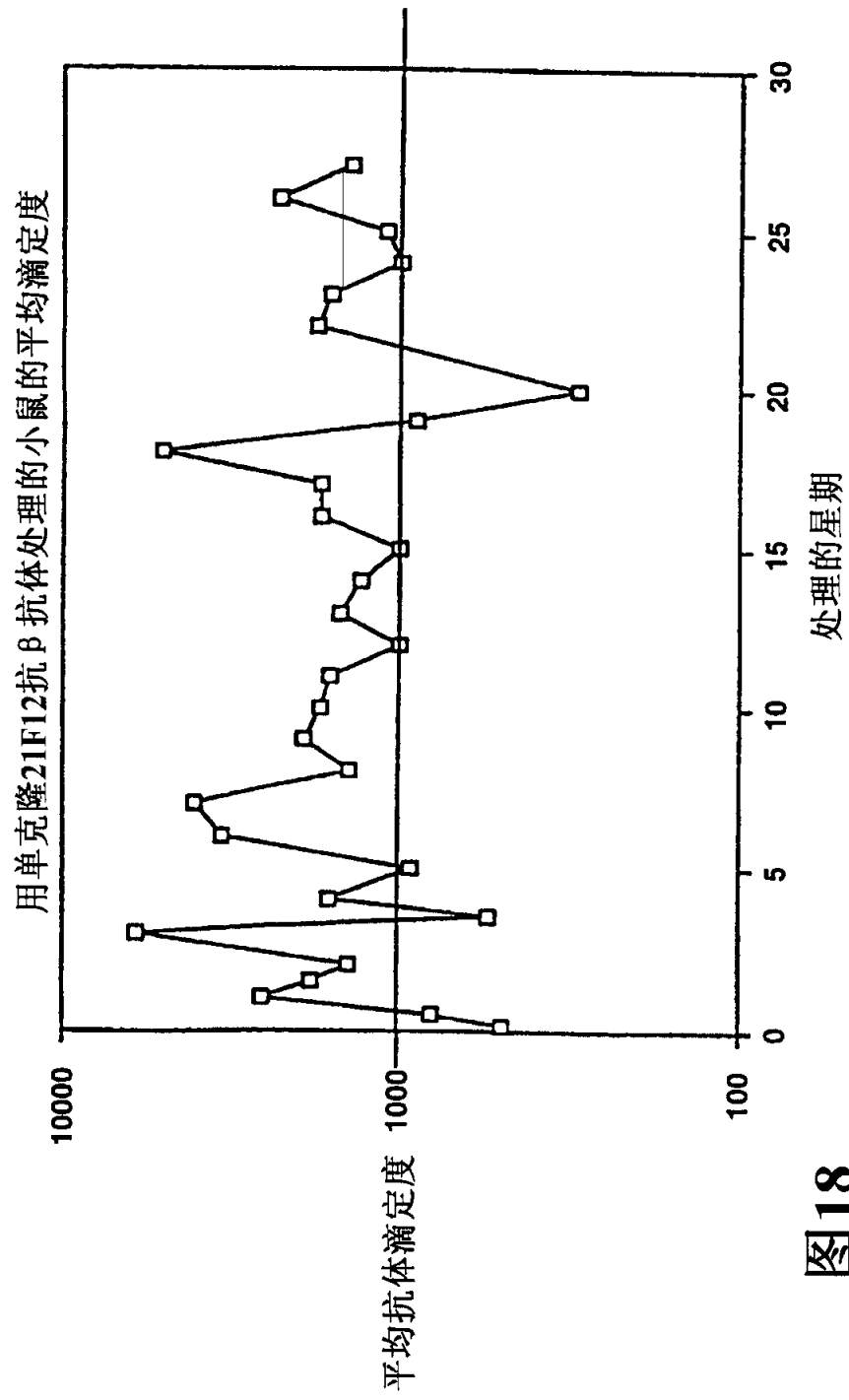


图18