



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104039346 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201280057432. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 09. 21

A61K 39/00 (2006. 01)

A61P 25/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

PCT/US2011/052992 2011. 09. 23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/056728 2012. 09. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/044147 EN 2013. 03. 28

(71) 申请人 AC 免疫有限公司

地址 瑞士洛桑

(72) 发明人 A·普法伊费尔 A·穆斯

R·马达尼 P·V·贝里琴科

W·C·莫布里

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书4页 说明书32页

序列表2页 附图8页

(54) 发明名称

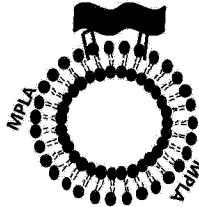
疫苗疗法

(57) 摘要

本发明提供了用于在患有唐氏综合症 (DS) 的青年至中年对象中治疗、减轻和预防淀粉样蛋白相关病理学的工具。特别是, 本发明提供了源自淀粉样蛋白或淀粉样蛋白蛋白质的抗原肽片段, 用于在患有唐氏综合症的青年至中年对象中预防性治疗淀粉样蛋白相关病理学的用途。

人 Aβ: Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln  
小鼠 Aβ: Asp-Ala-Glu-Phe-Gly-His-Asp-Ser-Gly-Phe-Glu-Val-Arg-His-Gln

棕榈酰化的 Aβ1-15



1. 源自淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质的抗原肽片段,所述抗原肽片段用于治疗 and / 或减轻和 / 或预防患有唐氏综合症的对象中的记忆和 / 或认知损伤或异常。

2. 权利要求 1 的抗原肽片段,所述抗原肽片段用于预防患有唐氏综合症的对象中的记忆和 / 或认知损伤或异常。

3. 权利要求 1 和 2 的抗原肽片段,其中所述记忆和 / 或认知损伤源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质。

4. 权利要求 1 至 3 的抗原肽片段,其中所述记忆和 / 或认知损伤是识别记忆损伤和 / 或情景联想记忆损伤和 / 或联想学习损伤和 / 或关于事实和事件的陈述性记忆损伤和 / 或情节记忆损伤和 / 或语言功能障碍,如失语症和 / 或视空间损伤,如物品乱放和对陌生和熟悉地区的探索困难和 / 或执行功能减少,如冷漠、去抑制、社会隔离、判断力低下、计划困难和 / 或抽象推理低下和 / 或人格改变和 / 或情绪改变,如冷漠、兴奋和精神病和 / 或失用症和 / 或实施学习运动任务损伤和 / 或其他神经学症状,包括锥体和锥体外系的发现,以及肌阵挛或抽搐。

5. 权利要求 1 至 4 的抗原肽片段,其中所述淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质是源自淀粉样蛋白- $\beta$  蛋白质的抗原肽片段。

6. 上述权利要求中任一项的抗原肽片段,其中所述患有唐氏综合症的对象尚未在脑中出现淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质相关的斑块。

7. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述对象在脑中已出现了 A $\beta$  相关的斑块。

8. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述斑块是 A $\beta$  相关的斑块。

9. 上述权利要求中任一项的抗原肽片段,其中患有唐氏综合症的对象中的所述记忆和 / 或认知损伤或异常是 AD 样记忆和 / 或认知损伤或异常。

10. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述患有唐氏综合症的对象是青年至中年对象。

11. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述患有唐氏综合症的对象是中年对象。

12. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述患有唐氏综合症的对象是青年对象。

13. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述患有唐氏综合症的对象是儿童对象。

14. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述对象小于 65 岁,特别是小于 60 岁,特别是小于 55 岁,特别是小于 50 岁,特别是小于 45 岁,特别是小于 40 岁,特别是小于 35 岁,特别是小于 30 岁,特别是小于 25 岁,特别是小于 20 岁,特别是小于 15 岁,特别是小于 10 岁,特别是小于 5 岁,特别是小于 3 岁。

15. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述治疗导致

a. 记忆的改善和 / 或恢复;和 / 或

b. 受治疗的对象中的记忆力增加或完全恢复认知能力。

16. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述治疗不诱导不想要的副作用,如脑膜炎和少量出血。

17. 上述权利要求中任一项的抗原肽,所述抗原肽用于预防脑中出现 A $\beta$  相关的斑块。

18. 上述权利要求中任一项的抗原肽,所述抗原肽用于降低脑中的 A $\beta$  相关的斑块的量。

19. 权利要求 16 或 17 的抗原肽,所述抗原肽用于降低海马和 / 或前额皮质和 / 或嗅内

皮质中的 A $\beta$  相关的斑块的量。

20. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质选自自由朊蛋白、 $\tau$  蛋白、 $\alpha$ -突触核蛋白、亨廷顿蛋白和淀粉样蛋白  $\beta$  组成的组。

21. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述 A $\beta$  抗原肽片段对应于 A $\beta$  肽的 N-末端部分,特别是 N-末端 A $\beta$  1-15 片段。

22. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述 A $\beta$  抗原肽片段对应于 A $\beta$  肽的中心部分,特别是 A $\beta$  14-29 片段。

23. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述 A $\beta$  抗原肽片段对应于 A $\beta$  肽的 C-末端部分,特别是 C-末端 A $\beta$  22-35 片段。

24. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中在脂质体中重建呈现 A $\beta$  肽抗原。

25. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中 A $\beta$  肽抗原被亲脂或疏水部分修饰,所述亲脂或疏水部分促进插入到脂质体载体 / 佐剂的脂质双层中。

26. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中 A $\beta$  肽抗原被与肽分子的 N 和 / 或 C 末端结合的棕榈酸修饰。

27. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中 A $\beta$  肽抗原被与肽分子的 N 和 / 或 C 末端结合的四个棕榈酸修饰。

28. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中 A $\beta$  肽抗原被与肽分子的 N 和 / 或 C 末端结合的二个棕榈酸修饰。

29. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中抗原肽以重复阵列呈现在脂质体的表面上。

30. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中载体或脂质体表面上的所述高重复阵列包含至少 10 个重复的抗原单位 / 载体分子。

31. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中至少 75%,特别是至少 80%,特别是至少 90%,但尤其是 100%的重建的抗原肽呈现在脂质体的表面上,通过其疏水部分插入到脂质双层中。

32. 组合物,包含治疗有效量的上述权利要求中任一项的抗原肽和可药用的载体和 / 或赋形剂,所述组合物用于治疗 and / 或减轻和 / 或预防患有唐氏综合症的对象中的记忆和 / 或认知损伤或异常。

33. 上述权利要求中任一项的组合物,其包含佐剂。

34. 上述权利要求中任一项的抗原肽,所述抗原肽用于增强或恢复患有唐氏综合症的对象中的所述损伤或异常。

35. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N 末端部分,特别是所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15、A $\beta$  1-16、A $\beta$  1-17、A $\beta$  1-18、A $\beta$  1-19、A $\beta$  1-20、A $\beta$  1-22 或 A $\beta$  1-23 的全部或部分组成。

36. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N 末端部分,特别是所述抗原肽由全部或部分氨基酸残基组成。

37. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述抗原肽由残基 A $\beta$  1-15 组成。

38. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述抗原肽源自 A $\beta$  肽的 C 末端部分,特别是所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  20-36、A $\beta$  20-40、A $\beta$  20-42、A $\beta$  21-36、A $\beta$  21-40、A $\beta$  21-42、A $\beta$  22-36、A $\beta$  22-40 或 A $\beta$  22-42 的全部或部分组成。

39. 上述权利要求中任一项的抗原肽,其中所述抗原肽由残基 A $\beta$  22-35 组成。

40. 治疗和 / 或减轻和 / 或预防患有唐氏综合症的对象中的记忆和 / 或认知损伤或异常的方法,所述方法包括向所述对象施用根据上述权利要求中任一项的抗原肽或组合物。

41. 权利要求 40 的方法,其中所述损伤或异常源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质。

42. 权利要求 40 和 41 的方法,其中所述损伤或异常涉及识别记忆和 / 或情景联想记忆损伤和 / 或联想学习损伤和 / 或关于事实和事件的陈述性记忆损伤和 / 或情节记忆损伤和 / 或语言功能障碍,如失语症和 / 或视空间损伤,如物品乱放和对陌生和熟悉地区的探索困难和 / 或执行功能减少,如冷漠、去抑制、社会隔离、判断力低下、计划困难和 / 或抽象推理低下和 / 或人格改变和 / 或情绪改变,如冷漠、兴奋和精神病和 / 或失用症和 / 或实施学习任务损伤和 / 或其他神经学症状,包括锥体和锥体外系的发现,以及肌阵挛或抽搐。

43. 上述权利要求中任一项的方法,其中用于在患有唐氏综合症的对象中增强或恢复识别记忆的方法中的所述抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N 末端部分,特别是所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15、A $\beta$  1-16、A $\beta$  1-17、A $\beta$  1-18、A $\beta$  1-19、A $\beta$  1-20、A $\beta$  1-22 或 A $\beta$  1-23 的全部或部分组成。

44. 上述权利要求中任一项的方法,其中用于在患有唐氏综合症的对象中增强或恢复识别记忆的方法中的所述抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N 末端部分,特别是所述抗原肽由全部或部分氨基酸残基组成。

45. 上述权利要求中任一项的方法,其中所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15 组成。

46. 上述权利要求中任一项的方法,其中用于在患有唐氏综合症的对象中增强或恢复情景联想记忆的方法中的所述抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N 末端部分,特别是所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15、A $\beta$  1-16、A $\beta$  1-17、A $\beta$  1-18、A $\beta$  1-19、A $\beta$  1-20、A $\beta$  1-22 或 A $\beta$  1-23 的全部或部分组成。

47. 上述权利要求中任一项的方法,其中用于在患有唐氏综合症的对象中增强或恢复联想学习的方法中的所述抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N 末端部分,特别是所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15、A $\beta$  1-16、A $\beta$  1-17、A $\beta$  1-18、A $\beta$  1-19、A $\beta$  1-20、A $\beta$  1-22 或 A $\beta$  1-23 的全部或部分组成。

48. 上述权利要求中任一项的方法,其中用于在患有唐氏综合症的对象中增强或恢复联想学习的方法中的所述抗原肽源自 A $\beta$  肽的 C 末端部分,特别是所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  20-36、A $\beta$  20-40、A $\beta$  20-42、A $\beta$  21-36、A $\beta$  21-40、A $\beta$  21-42、A $\beta$  22-36、A $\beta$  22-40 或 A $\beta$  22-42 的全部或部分组成。

49. 上述权利要求中任一项的方法,其中所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  22-35 组成。

50. 根据上述权利要求中任一项的方法,所述方法用于在患有唐氏综合症的对象中增加记忆力或完全恢复认知能力,所述方法包括向所述对象施用根据上述权利要求中任一项的抗原肽或组合物。

51. 根据上述权利要求中任一项的方法,其中所述对象在脑内尚未出现 A $\beta$  相关的斑块。

52. 根据上述权利要求中任一项的方法,其中所述对象的脑内已出现 A $\beta$  相关的斑块。

53. 根据上述权利要求中任一项的方法,其中所述患有唐氏综合症的对象是青年至中

年对象。

54. 根据上述权利要求中任一项的方法,其中所述患有唐氏综合症的对象是中年对象。

55. 根据上述权利要求中任一项的方法,其中所述患有唐氏综合症的对象是青年对象。

56. 根据上述权利要求中任一项的方法,其中所述患有唐氏综合症的对象是儿童对象。

57. 根据上述权利要求中任一项的方法,其中所述对象小于65岁,特别是小于60岁,特别是小于55岁,特别是小于50岁,特别是小于45岁,特别是小于40岁,特别是小于35岁,特别是小于30岁,特别是小于25岁,特别是小于20岁,特别是小于15岁,特别是小于10岁,特别是小于5岁,特别是小于3岁。

58. 用于在患有唐氏综合症的对象中预防记忆和 / 或认知损伤或异常的方法,所述方法包括向所述对象施用根据上述权利要求中任一项的抗原肽或组合物。

59. 用于在患有唐氏综合症的对象中预防记忆损伤或异常的方法,所述方法包括向所述对象施用根据上述权利要求中任一项的抗原肽或组合物。

60. 降低患有唐氏综合症的对象的大脑内斑块的方法,所述方法包括向所述对象施用根据上述权利要求中任一项的抗原肽或组合物。

61. 权利要求60的方法,其中根据上述权利要求中任一项的抗原肽或组合物降低了脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质中的斑块。

62. 权利要求60和61的方法,其中所述斑块降低导致了减轻和 / 或预防与识别记忆相关的损伤或异常和 / 或情景联想记忆损伤和 / 或联想学习损伤和 / 或关于事实和事件的陈述性记忆损伤和 / 或情节记忆损伤和 / 或语言功能障碍,如失语症和 / 或视空间损伤,如物品乱放和对陌生和熟悉地区的探索困难和 / 或执行功能减少,如冷漠、去抑制、社会隔离、判断力低下、计划困难和 / 或抽象推理低下和 / 或人格改变和 / 或情绪改变,如冷漠、兴奋和精神病和 / 或失用症和 / 或实施学习运动任务损伤和 / 或其他神经学症状,包括锥体和锥体外系的发现,以及肌阵挛或抽搐。

63. 上述权利要求中任一项的抗原肽、组合物和 / 或方法,其中所述抗原肽、组合物和 / 或方法用于预防神经退化。

64. 用于在患有唐氏综合症的对象中诱导针对淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质的免疫应答的方法。

65. 用于生产疫苗的方法,所述方法包括配制上述权利要求中任一项的抗原肽或组合物与可药用的载体或赋形剂和 / 或佐剂。

66. 抗体或抗体混合物,所述抗体或抗体混合物可从用通过权利要求65的方法获得的疫苗免疫的动物中获得。

67. 抗体或抗体混合物,所述抗体或抗体混合物可从用根据上述权利要求中任一项的抗原肽免疫的动物中获得。

68. 通过用上述权利要求中任一项的抗原肽免疫对象而生产的抗体。

69. 通过用上述权利要求中任一项的组合物免疫对象而生产的抗体。

## 疫苗疗法

[0001] 本发明提供了用于在患有唐氏综合症 (DS) 的青年至中年对象中治疗淀粉样蛋白相关病理学的工具。特别的是,本发明提供了源自淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质 (amyloid-like protein) 的抗原肽片段,用于在患有唐氏综合症 (DS) 的青年至中年对象中治疗阿兹海默病 (AD) 样痴呆。

[0002] 遗传病唐氏综合症 (DS) 是最常见的染色体三体,发病率为每 700-1000 名新生儿中 1 名。估计提示 25% 或更多在 35 岁以上的唐氏综合症个体表现出阿兹海默样痴呆的标志和症状 (Stanton L. R 和 Coetzee R. H, 2004)。百分比随年龄而增加。在 DS 中,全部的或至少一部分的 21 号染色体存在 3 份 (Antonarakis 等人, 2004 ;Moncaster 等人, 2010)。因此,三拷贝的淀粉样蛋白前体蛋白质 (APP) 基因导致生成过量的淀粉样蛋白- $\beta$  ( $A\beta$ ), 这是普遍已知对阿兹海默病 (AD) 负责的主要异常蛋白质之一 (Ballard 等人, 2011)。因此,提示  $A\beta$  可能在大部分 DS 人群的 AD 样痴呆中发挥作用 (Lee 等人, 2005 ;Liu 等人, 2005 ; Gilman 等人, 2005)。

[0003] 在患唐氏综合症的人中, AD 样记忆缺陷可以涉及若干种病理学蛋白质,如  $A\beta$ 、 $\tau$ 、Dyrk1A、Apo E 等。在胚胎阶段  $A\beta$  就已开始增加,在出生时进一步发展,并随年龄增长而持续累积 (Stoltzner 等人, 2000)。此外,在老龄 (>40 岁) 人群中,  $A\beta$  42 的脑脊液 (CSF) 水平低于年轻的 DS 人群,而  $\tau$  水平则高于年轻的 DS 人群 (Tapiola 等人, 2001)。一旦  $A\beta$  沉积为斑块,则在 12 岁时 Apo E 可以在许多斑块中检测到,并随年龄稳步增长 (Lemere 等人, 1996)。在生活史的第 4 个十年中,可以在 DS 的脑内检测到神经元纤维缠结 (NFT)。这些 NFT 被认为是  $\tau$  积累的结果。已显示,过表达被称为 Dyrk1A (双特异性酪氨酸磷酸化的和调控的激酶 1A) 的激酶可能导致过磷酸化 (Lemere 等人, 1996 ;Liu 等人, 2008)。因此,患有 DS 的人群可以到 40 岁时出现淀粉样蛋白相关病理学,且大部分到 60 岁时具有与阿兹海默病类似的临床症状,如认知衰退和记忆损伤 (Stanton 2004)。

[0004] 患有 DS 的个体接受的医学护理主要是针对其多种健康问题 (如心脏缺陷、感染和甲状腺机能减退),而几乎不考虑针对神经病理学性状,即,心理残疾和记忆缺陷的特定治疗。目前,仅在进行少数临床试验,其目标都是增强心理能力或降低神经损坏。用于治疗 DS 的药物也用于 AD,都是作用于胆碱能系统或谷氨酸能神经传递,如胆碱酯酶抑制剂利伐斯的明 (Rivastigmine) 或多奈哌齐 (Donepezil),和 NMDA 受体拮抗剂美金刚 (Memantine) (Prasher, 1993 ;Prasher, 2004)。然而,缺少对 DS 人群的效力的证据。目前,有许多淀粉样蛋白修饰性治疗正在审批,包括靶向  $A\beta$  免疫疗法 (Raffi, 2010)。在小鼠 AD 模型中表现出有效降低脑部  $A\beta$  负荷和逆转认知缺陷后,若干种疫苗目前已进入临床阶段 (Weiner 和 Frenkel, 2006)。与 AD 相反,DS 中还没有提出靶向  $A\beta$  的免疫疗法。

[0005] 在若干种用于治疗患有 DS 的成人的认知损伤的方法中,使用乙酰胆碱酯酶抑制剂 (AChEI) 或 NMDA 受体拮抗剂的现有研究表现出极少或没有效果 (Fernandez 等人, 2007, Hanney 等人, 2012)。相反,对于淀粉样蛋白在患有 DS 的人群的认知恶化中发挥作用的假说有显著的支持 ;Netzer 及其同事显示,用  $\gamma$ -分泌酶抑制剂改变 APP 切割对 DS 小鼠模型的记忆具有有益的效果 (Netzer 等人, 2010)。这些观察结果基于小鼠模型中的研究,

所述研究显示增加的APP基因剂量(对淀粉样蛋白沉积症负责的A $\beta$ 肽的亲代蛋白质),对于表征DS和AD的与年龄相关的神经元退化是必需的(Salehi等人,2006,2009)。因此,靶向淀粉样蛋白可以是用于预防AD发展的有前景的治疗对策。研发针对A $\beta$ 的免疫疗法是基于这样的假设,即,如果分子在原位靶向和隔离A $\beta$ (以可溶性形态和作为寡聚物),则分子可以增强A $\beta$ 的从脑部去除,并使患有DS的人群产生临床益处。可预期的是,通过抗A $\beta$ 疫苗生成的抗体将结合纤维状的A $\beta$ 沉积物,最终使前斑块溶解或抑制前斑块的生长。目前,认为A $\beta$ 寡聚物是毒性最高的A $\beta$ 种类,破坏DS人群中的大部分认知功能(Teller等人,1996)。

[0006] 因此,需要预防疗法,其目标是预防或减慢在患有唐氏综合症(DS)的对象中与淀粉样蛋白相关病理学相关联的临床症状的出现,例如,特别是记忆和/或认知损伤或异常。

[0007] 特别的是,需要在患有唐氏综合症(DS)的对象中与淀粉样蛋白相关病理学相关联的临床症状的治疗,所述治疗导致改善患有唐氏综合症(DS)的对象的学习能力和/或改善或恢复记忆和/或认知能力。

[0008] 在本发明的范围内,提供了帮助满足该需求的测量和工具。特别的是,本发明提供了抗原性肽,其用于在患有唐氏综合症的儿童和青年至中年对象中的预防疗法和AD样认知损伤的治疗。

[0009] 在第一个实施方案中,本发明提供了源自淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质的抗原肽片段,特别是源自淀粉样蛋白- $\beta$ 蛋白质的抗原肽片段,或包含所述抗原肽的组合物,用于在患有唐氏综合症的青年至中年对象中,特别是脑内还没有出现淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质相关的斑块,特别是A $\beta$ 相关斑块的患有唐氏综合症的青年对象中,治疗和/或减轻和/或预防记忆和/或认知损伤或异常,特别是AD样记忆和/或认知损伤或异常,特别是源自脑的海马和/或前额皮质和/或内嗅皮质的损伤和异常。

[0010] 在一个实施方案中,本发明提供了源自淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质的抗原肽片段,特别是源自淀粉样蛋白- $\beta$ 蛋白质的抗原肽片段,或包含所述抗原肽的组合物,用于在患有唐氏综合症的中年对象中,特别是脑内还没有出现淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质相关的斑块,特别是A $\beta$ 相关斑块的患有唐氏综合症的中年对象中,治疗和/或减轻和/或预防记忆和/或认知损伤或异常,特别是AD样记忆和/或认知损伤或异常,特别是源自脑的海马和/或前额皮质和/或内嗅皮质的损伤和异常。

[0011] 在另一个实施方案中,本发明提供了源自淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质的抗原肽片段,特别是源自淀粉样蛋白- $\beta$ 蛋白质的抗原肽片段,或包含所述抗原肽的组合物,用于在患有唐氏综合症的青年对象中,特别是脑内还没有出现淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质相关的斑块,特别是A $\beta$ 相关斑块的患有唐氏综合症的青年对象中,治疗和/或减轻和/或预防记忆和/或认知损伤或异常,特别是AD样记忆和/或认知损伤或异常,特别是源自脑的海马和/或前额皮质和/或内嗅皮质的损伤和异常。

[0012] 在仍然另一个实施方案中,本发明提供了源自淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质的抗原肽片段,特别是源自淀粉样蛋白- $\beta$ 蛋白质的抗原肽片段,或包含所述抗原肽的组合物,用于在患有唐氏综合症的儿童对象中,特别是脑内还没有出现淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质相关的斑块,特别是A $\beta$ 相关斑块的患有唐氏综合症的儿童对象中,治疗和/或减轻和/或预防记忆和/或认知损伤或异常,特别是AD样记忆和/或认知损伤或异常,

特别是源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质的损伤和异常。

[0013] 在其他实施方案中,本发明提供了源自淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质的抗原肽片段,特别是源自淀粉样蛋白- $\beta$  蛋白质的抗原肽片段,或包含所述抗原肽的组合物,用于在患有唐氏综合症的儿童和青年至中年对象中,特别是脑内还没有出现淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质相关的斑块,特别是 A $\beta$  相关斑块的患有唐氏综合症的青年对象中,治疗和 / 或减轻和 / 或预防记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是 AD 样记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质的损伤和异常。

[0014] 在本发明的仍然另一个实施方案中,将抗原肽施用给患有唐氏综合症的对象,特别是遭受记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是 AD 样记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质的损伤和异常的唐氏综合症对象,其中所述对象小于 60 岁,特别是小于 55 岁,特别是小于 50 岁,特别是小于 45 岁,特别是小于 40 岁,特别是小于 35 岁,特别是小于 30 岁,特别是小于 25 岁,特别是小于 20 岁,特别是小于 15 岁,特别是小于 10 岁,特别是小于 5 岁,特别是小于 3 岁。

[0015] 在本发明的特定实施方案中,将抗原肽施用给患有唐氏综合症的对象,特别是遭受记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是 AD 样记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质的损伤和异常的唐氏综合症对象,其中所述对象小于 35 岁,特别是小于 30 岁,特别是小于 25 岁,特别是小于 20 岁,特别是小于 15 岁。

[0016] 在本发明的特定实施方案中,将抗原肽施用给患有唐氏综合症的对象,特别是遭受记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是 AD 样记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质的损伤和异常的唐氏综合症对象,其中所述对象小于 15 岁,特别是小于 10 岁,特别是小于 5 岁,特别是小于 3 岁。

[0017] 在本发明的特定实施方案中,将抗原肽施用给患有唐氏综合症的对象,特别是遭受记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是 AD 样记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质的损伤和异常的唐氏综合症对象,其中所述对象小于 10 岁,特别是小于 5 岁,特别是 0 至 10 岁之间,特别是 1 至 10 岁之间,特别是 2 至 10 岁之间,特别是 3 至 10 岁之间,特别是 4 至 10 岁之间,特别是 5 至 10 岁之间。

[0018] 在一个实施方案中,用本发明提供的抗原肽的治疗阻止了脑内,特别是脑内的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质中出现 A $\beta$  相关的斑块。

[0019] 在某些实施方案中,本发明考虑在脑内已出现 A $\beta$  相关的斑块的儿童和青年至中年的唐氏综合症对象中,使用源自淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质的抗原肽片段或包含根据本发明和本文所述的所述抗原肽的组合物,治疗和 / 或减轻和 / 或预防记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是 AD 样记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是源自脑内的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质的损伤和异常。

[0020] 在本发明的另一个实施方案中,用本发明提供的抗原肽的治疗降低了脑内,特别是脑内的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质中的 A $\beta$  相关的斑块的量。

[0021] 在一个实施方案中,待用根据本发明的抗原肽或组合物治疗的患者组包含患有唐氏综合症的青年至中年对象,特别是小于 65 岁,特别是小于 60、55 或 50 岁的对象。在一个实施方案中,可以用根据本发明的抗原肽或组合物治疗年龄为 0 至 65 岁之间的对象,特别是 5 至 55 岁之间,特别是 10 至 50 岁之间,特别是 15 至 45 岁之间,特别是 20 至 40 岁之间,

特别是 25 至 35 岁之间的对象。

[0022] 出于本发明的目的,儿童指小于 18 岁的对象,特别是年龄在 0 至 18 岁之间的对象,特别是在 1 至 10 岁之间,特别是 2 至 9 岁之间,特别是 3 至 9 岁之间,特别是 4 至 9 岁之间,特别是 5 至 18 岁之间的对象。

[0023] 出于本发明的目的,青年对象指小于 35 岁的对象,特别是年龄在 0 至 35 岁之间的对象,特别是在 1 至 30 岁之间,特别是 5 至 25 岁之间的对象。

[0024] 出于本发明的目的,中年对象指年龄在 36 至 65 岁之间的对象,特别是在 40 至 60 岁之间,特别是 45 至 55 岁之间的对象。

[0025] 在一个实施方案中,使用根据本发明和本文所述的抗原肽或组合物,治疗患有唐氏综合症并遭受记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是 AD 样记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质的损伤和异常的儿童或青年至中年对象,导致所述损伤或异常的改善或恢复,特别是记忆改善,特别是改善或恢复识别记忆和 / 或情景联想记忆。

[0026] 在一个实施方案中,使用根据本发明和本文所述的抗原肽或组合物,治疗患有唐氏综合症并遭受记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是 AD 样记忆和 / 或认知损伤或异常的儿童或青年至中年对象,导致受治对象的记忆力增加或完全恢复认知记忆能力。

[0027] 使用根据本发明和本文所述的抗原肽治疗患有唐氏综合症的儿童和青年至中年对象的 AD 样认知损伤或异常显示出如本文公开的治疗效果而不诱导不想要的副作用如脑膜脑炎和少量出血。

[0028] 在本发明的某些实施方案中,对象是本文定义的儿童对象,特别是青年对象,特别是中年对象,其患有唐氏综合症,并遭受记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是遭受 AD 样记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质的损伤和异常。

[0029] 在本发明的其他实施方案中,用根据本发明和本文所述的抗原肽或组合物治疗预防了在唐氏综合症对象的脑内,特别是在脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质中,特别是在患有唐氏综合症的青年至中年的脑内,特别是在儿童的脑内,特别是在青年的脑内,特别是中年对象的脑内出现 A $\beta$  相关的斑块。

[0030] 在一个实施方案中,根据本发明和本文所述的抗原肽源自选自朊蛋白、 $\tau$  蛋白、 $\alpha$ -突触核蛋白,亨廷顿蛋白和淀粉样蛋白- $\beta$  或一种或多种上述肽的组合物或淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质。

[0031] 在本发明的一个实施方案中,所述 A $\beta$  抗原肽片段对应于 A $\beta$  肽的 N-末端部分,特别是包含 A $\beta$  1-15 片段的至少 5 个,特别是至少 6 个,特别是至少 7 个,特别是至少 8 个,特别是至少 9 个,特别是至少 10 个,特别是至少 11 个,特别是至少 12 个,特别是至少 13 个,特别是至少 14 个,特别是所有的氨基酸残基的 N-末端部分。

[0032] 在一个实施方案中,A $\beta$  抗原肽片段对应于包含来自 A $\beta$  1-16 片段、A $\beta$  1-17 片段、A $\beta$  1-18 片段、A $\beta$  1-19 片段、A $\beta$  1-20 片段、A $\beta$  1-22 片段、A $\beta$  1-23 片段、A $\beta$  1-24 片段、A $\beta$  1-25 片段或 A $\beta$  1-26 片段或 3-15A $\beta$  片段的至少 5 个,特别是至少 6 个,特别是至少 7 个,特别是至少 8 个,特别是至少 9 个,特别是至少 10 个,特别是至少 11 个,特别是至少 12 个,特别是至少 13 个,特别是至少 14 个,特别是至少 15 个,特别是所有的氨基酸残基的 A $\beta$

肽的 N- 末端部分。

[0033] 在一个实施方案中, A $\beta$  抗原肽片段对应于包含来自 A $\beta$  20-40 或 A $\beta$  20-42 片段、A $\beta$  21-40 或 A $\beta$  21-42 片段、A $\beta$  22-40 或 A $\beta$  22-42 片段、A $\beta$  23-40 或 A $\beta$  23-42 片段、A $\beta$  24-40 或 A $\beta$  24-42 片段、A $\beta$  25-40 或 A $\beta$  25-42 片段、A $\beta$  26-46 或 A $\beta$  27-42 片段或 A $\beta$  27-40 或 A $\beta$  27-42 片段或 A $\beta$  29-40 的至少 5 个, 特别是至少 6 个, 特别是至少 7 个, 特别是至少 8 个, 特别是至少 9 个, 特别是至少 10 个, 特别是至少 11 个, 特别是至少 12 个, 特别是至少 13 个, 特别是至少 14 个, 特别是至少 15 个, 特别是所有的氨基酸残基的 A $\beta$  肽的 C- 末端部分。

[0034] 在一个实施方案中, A $\beta$  抗原肽片段对应于包含来自 A $\beta$  15-35, 特别是 A $\beta$  20-35 片段的至少 5 个, 特别是至少 6 个, 特别是至少 7 个, 特别是至少 8 个, 特别是至少 9 个, 特别是至少 10 个, 特别是至少 11 个, 特别是至少 12 个, 特别是至少 13 个, 特别是至少 14 个, 特别是至少 15 个, 特别是所有的氨基酸残基的 A $\beta$  肽的中间部分。

[0035] 在本发明的另一个实施方案中, A $\beta$  抗原肽片段对应于 A $\beta$  肽, 特别是 A $\beta$  14-29 片段的中央部分。

[0036] 在特定的实施方案中, A $\beta$  抗原肽片段对应于 A $\beta$  肽的 C- 末端部分, 特别是 C- 末端 A $\beta$  22-35 片段。

[0037] 在本发明的另一个实施方案中, 可使用全长 A $\beta$  1-39、A $\beta$  1-40 或 A $\beta$  1-42 片段。

[0038] 在本发明的某些实施方案中, 如本文公开的 A $\beta$  抗原肽片段可包含一个或多个修饰的或非天然的氨基酸残基。

[0039] 在本发明的某些实施方案中, 考虑了 A $\beta$  抗原肽片段的用途, 所述片段不是由来自 A $\beta$  肽的 N- 末端部分的 13 至 15 个连续氨基酸残基的单一或重复序列段组成的片段, 特别不是这样的片段, 其中 13 至 15 个氨基酸残基的所述连续序列段是从 A $\beta$  肽的 N- 末端片段 1-16 或 1-17 获得的, 特别是从选自残基 1-15、1-14 和 1-13 的 A $\beta$  肽的 N- 末端部分获得的, 特别是由 WO2007/068411 中公开的 SEQ ID NO:1 给出的 A $\beta$ <sub>1-15</sub> 肽抗原和 SEQ ID NO:3 给出的 A $\beta$ <sub>1-16( $\Delta$ 14)</sub> 组成的。在一个实施方案中, 根据本发明和本文公开的抗原肽是在载体中重建存在的, 所述载体例如囊泡、颗粒体 (particulate body) 或分子, 但特别是在脂质体中重建的。

[0040] 在一个实施方案中, 根据本发明和本文公开的抗原肽是在载体或脂质体的表面上以单个或重复的阵列存在的。

[0041] 在一个实施方案中, 载体或脂质体表面上的所述高重复阵列包括至少 10 个重复的抗原单位 / 载体分子, 特别是至少 50 个重复的抗原单位 / 载体分子, 特别是至少 100 个重复的抗原单位 / 载体分子, 特别是至少 200 个重复的抗原单位 / 载体分子, 特别是至少 300 个重复的抗原单位 / 载体分子; 特别是至少 400 个重复的抗原单位 / 载体分子, 特别是至少 500 个重复的抗原单位 / 载体分子。

[0042] 本发明和本文所述的抗原组合物可包含构象抗原, 特别是本文所述的 A $\beta$  抗原, 其中大于 30%, 特别是大于 40%, 特别是大于 50%, 特别是大于 60%, 特别是大于 70%, 特别是大于 80%, 特别是大于 90%, 特别是大于 95% 和多达 100% 是处于  $\beta$ - 片层构象的。

[0043] 在本发明的一个实施方案中, 组合物在多个实施方案中包含治疗有效量的如本文所述的本发明的抗原肽, 和可药用的载体和 / 或赋形剂, 用于治疗 and / 或减轻和 / 或预防唐

氏综合症对象中的记忆损伤或异常。

[0044] 在本发明的另一个实施方案中,组合物在多个实施方案中包含治疗有效量的本文所述的本发明的抗原肽,和可药用的载体和/或赋形剂,用于治疗 and / 或减轻和 / 或预防唐氏综合症对象中的认知损伤或异常。

[0045] 特别的是,所述记忆和 / 或认知损伤源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质。

[0046] 在本发明的多个特定的实施方案中,组合物在多个实施方案中包含治疗有效量的本文所述的本发明的抗原肽,和可药用的载体和 / 或赋形剂,用于治疗 and / 或减轻和 / 或预防识别记忆损伤和 / 或情景联想记忆损伤和 / 或联想学习损伤和 / 或关于事实和事件的陈述性记忆损伤和 / 或情节记忆损伤和 / 或语言功能障碍,如失语症和 / 或视空间损伤,如物品乱放和对陌生和熟悉地区的探索困难和 / 或执行功能减少,如冷漠、去抑制、社会隔离、判断力低下、计划困难和 / 或抽象推理低下和 / 或人格改变和 / 或情绪改变,如冷漠、兴奋和精神病和 / 或失用症和 / 或实施学习运动任务损伤和 / 或其他神经学症状,包括锥体和锥体外系的发现,以及肌阵挛或抽搐。

[0047] 特别的是,所述损伤或异常涉及识别记忆。

[0048] 在特定的实施方案中,所述用于在唐氏综合症对象中增强或恢复识别记忆的抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N-末端部分,特别是所述抗原肽由 A $\beta$  1-15、A $\beta$  1-16、A $\beta$  1-17、A $\beta$  1-18、A $\beta$  1-19、A $\beta$  1-20、A $\beta$  1-22 或 A $\beta$  1-23 的全部或部分氨基酸残基组成。

[0049] 特别的是,所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15 组成。

[0050] 在另一个特定的实施方案中,所述用于在唐氏综合症对象中增强或恢复识别记忆的抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N-末端部分,特别是所述抗原肽由全部或部分氨基酸残基组成。

[0051] 特别的是,所述损伤或异常涉及情景联想记忆。

[0052] 在特定的实施方案中,所述用于在唐氏综合症对象中增强或恢复情景联想记忆的抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N 末端部分,特别是所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15、A $\beta$  1-16、A $\beta$  1-17、A $\beta$  1-18、A $\beta$  1-19、A $\beta$  1-20、A $\beta$  1-22 或 A $\beta$  1-23 的全部或部分组成。

[0053] 特别的是,所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15 组成。

[0054] 特别的是,所述损伤或异常涉及联想学习。

[0055] 在特定的实施方案中,所述用于在唐氏综合症对象中增强或恢复联想学习的抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N 末端部分,特别是所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15、A $\beta$  1-16、A $\beta$  1-17、A $\beta$  1-18、A $\beta$  1-19、A $\beta$  1-20、A $\beta$  1-22 或 A $\beta$  1-23 的全部或部分组成。

[0056] 特别的是,所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15 组成。

[0057] 在另一个特定的实施方案中,所述用于在唐氏综合症对象中增强或恢复联想学习的抗原肽源自 A $\beta$  肽的 C 末端部分,特别是所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  20-36、A $\beta$  20-40、A $\beta$  20-42、A $\beta$  21-36、A $\beta$  21-40、A $\beta$  21-42、A $\beta$  22-36、A $\beta$  22-40 或 A $\beta$  22-42 的全部或部分组成。

[0058] 特别的是,所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  22-35 组成。

[0059] 可以通过呈现部分或完全在载体中连接、整合或重建的抗原肽,实现抗原肽理想构象的形成和稳定,所述载体例如囊泡、颗粒体或分子、或任何其他适合作为抗原肽的载体 / 佐剂的工具。在本发明的特定的实施方案中,抗原肽通过弱相互作用,例如范德华氏力、疏

水性或静电的相互作用,或两种或多种所述相互作用的组合在载体中连接、整合或重建,使得所述肽以特定的构象呈现在载体表面,通过将所述抗原肽限制在其移动的三维自由度中从而阻止或严格限制构象变化,来维持和稳定所述构象。

[0060] 当使用囊泡、颗粒或颗粒体作为载体 / 佐剂时,例如脂质体,可以选择抗原肽的组合物使其整体的净电荷等于肽所连接的载体 / 佐剂表面的净电荷。在等电荷的载体 / 佐剂表面与抗原肽之间,但特别是在等电荷的载体表面与构成抗原肽的氨基酸残基之间,更特别是在等电荷的载体表面与包含在抗原肽中的等电荷的氨基酸残基之间有效的静电斥力,可导致抗原肽采用定义的、高特异性和稳定的构象,以确保高的生物学活性。结果是抗原肽被暴露并呈现为高生物学活性的构象,由于其允许靶生物体的免疫系统与包含在生物学活性构象的抗原性构建体中的抗原决定簇自由地相互作用,这导致强大和构象特异性的免疫应答,在靶生物体中导致例如高抗体滴度。

[0061] 可以通过使用脂质体作为载体,进一步增加免疫原性应答,所述脂质体可以在待用根据本发明的治疗性疫苗治疗的靶动物或人体内,作为佐剂发挥功能以增加或刺激的免疫应答。任选的,脂质体还可以含有其他佐剂,例如脂质 A、明矾、磷酸钙、白介素 1 和 / 或多糖和蛋白质的微胶囊,但特别是脱毒的脂质 A,如单磷酰或二磷酰脂质 A,或可适用于本发明范围内的任何其他佐剂,例如明矾、磷酸钙、白介素 1 和 / 或多糖和蛋白质的微胶囊、LPS、CpG ODN、Pam2CSK4、Pam3CSK4、dsRNA、ssRNA、胞壁酰二肽、Quil Q、QS-21。

[0062] 可用于本发明的组合物中的脂质体包括本领域技术人员已知的方法。可使用任何可用于制备脂质体的标准脂质。可使用标准的双层和多层脂质体制备本发明的组合物。虽然可使用本领域技术人员已知的任何制备脂质体的方法,但最优的脂质体是根据 Alving 等人, *Infect. Immun.* 60:2438-2444, 1992, (Lauer 等人, 1992) 的方法制备的,其通过引用整合到本文中。脂质体可具有双重功能,在于其可用作包含本文上述超分子构建体的载体,并且同时,在待用根据本发明的治疗性疫苗治疗的靶动物或人体内,作为佐剂发挥功能以增加或刺激的免疫应答。任选的,脂质体还可以含有另外佐剂或免疫调节剂或两者,例如脂质 A、明矾、磷酸钙、白介素 1 和 / 或多糖和蛋白质的微胶囊,但特别是脂质 A,更特别是脱毒的脂质 A,如单磷酰或二磷酰脂质 A 或明矾。

[0063] 脂质体可由选自二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (DMPEA)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油 (DMPG) 和胆固醇的组分构成。

[0064] 在一个实施方案中,本发明考虑使用阴离子型脂质作为脂质体膜中的阳离子型脂质的替代物,所述阴离子型脂质选自:

[0065] a. 具有头部基团磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、L- $\alpha$ -磷脂酰肌醇-4-磷酸或磷脂酸的二酰基-磷脂类;

[0066] b. 具有头部基团磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸或磷脂酸的溶血磷脂类,和

[0067] c. 心磷脂、二溶血-心磷脂、单溶血-心磷脂。

[0068] 在一个方面,本发明考虑使用阳离子型脂质作为脂质体膜中的阴离子型脂质的替代物,所述阳离子型脂质选自:

[0069] a. 具有头部基团 3-三甲基铵-丙烷、3-二甲基铵-丙烷、3-乙基磷酸胆碱或 3-磷脂酰乙醇胺的二酰基-磷脂类;和

[0070] b. D-赤藓氨醇、二甲基双十八烷基溴化铵、N-[1-(2,3-二肉豆蔻氧代)丙

基]-N,N-二甲基-N-(2-羟乙基)溴化铵、N,N,N-三甲基-2-双[(1-氧代-9-十八烯基)氧]-(Z,Z)-1-丙铵硫酸甲酯或 $3\beta$ -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰]胆固醇盐

[0071] 在本发明的一个实施方案中,与上述头部基团连接的脂链可以

[0072] a. 是饱和的或不饱和的,

[0073] b. 长度不同的 $(\text{CH}_2)_n$ ,其中n在3至24之间,且

[0074] 是对称或不对称取代的。

[0075] 在一个实施方案中,本发明和本文所述的抗原组合物包含脂质体制剂和佐剂,特别是脂质A、明矾、磷酸钙、白介素1和/或多糖和蛋白质的微胶囊,但特别是脂质A,更特别是脱毒的脂质A,如单磷酸或二磷酸脂质A或明矾。

[0076] 可以根据本文公开的方法,制备包含与包埋在本文所述的脂质体中的亲脂性部分偶联的 $\text{A}\beta$ 肽的本发明的脂质体组合物。

[0077] 当使用脂质体作为载体/佐剂时,还可以通过与促进插入到脂质体载体/佐剂的脂双层中的亲脂性或疏水性部分偶联,进一步修饰本文提供的抗原肽。所述疏水性部分可以是脂肪酸、甘油三酯、甘油二酯、类固醇、鞘磷脂、糖脂或磷脂。

[0078] 在特定的实施方案中,亲脂性或疏水性部分是具有至少1个碳原子,特别是至少2个碳原子,特别是至少3个碳原子,特别是至少4个碳原子,特别是至少6个碳原子,特别是至少8个碳原子,特别是至少12个碳原子,特别是至少16个碳原子的碳骨架的烷基或脂肪酸。

[0079] 亲脂性或疏水性部分可以是脂肪酸、甘油三酯和磷脂,其中脂肪酸碳骨架具有至少4个碳原子,特别地亲脂性部分具有碳骨架为至少约14个碳原子和多达约24个碳原子的脂肪酸,更特别地疏水性部分具有至少14个碳原子的碳骨架。疏水性部分的例子包括但不限于棕榈酸、硬脂酸、肉豆蔻酸、月桂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸和胆固醇或DSPE。在本发明的特定实施方案中,疏水性部分是棕榈酸。

[0080] 在本发明的特定的实施方案中,本发明和本文所述的抗原组合物包含肽抗原,所述肽抗原包含2个棕榈酸部分,特别是四个棕榈酸部分。

[0081] 棕榈酰化作用因为相对减少的 $\text{C}_{16:0}$ 脂肪酸部分长度为脂质体双层中的肽提供了锚定位点,导致肽暴露在脂质体表面或在紧邻脂质体表面处呈现。因此,加工抗原的细胞将不得不摄入含肽的完整脂质体。

[0082] 在一个实施方案中,本发明的抗原性构建体可包含通过聚乙二醇化(使用聚乙二醇(PEG)或修饰的聚乙二醇)修饰的肽,或通过上述所述的其他方法修饰的肽,如棕榈酸、多聚氨基酸(例如,聚甘氨酸、聚组氨酸)、多糖(例如,聚半乳糖醛酸、聚乳酸、聚乙交酯、几丁质、壳聚糖)、合成的多聚物(聚酰胺、聚氨酯、聚酯)或共聚物(例如,聚(甲基丙烯酸)和N-(2-羟基)丙基甲基丙烯酸酰胺)等。

[0083] 如果在制备抗原性构建体中使用PEG,则游离的PEG末端可以与磷脂酰乙醇胺的分子共价连接(其中脂肪酸可以是:肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸等,或其组合)。可以在由磷脂类和胆固醇(不同摩尔比例的磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、胆固醇)组成的脂质体中重建该超分子结构。可以使用其他磷脂类。可以使用浓度为约 $40\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ 磷脂的脂质A。

[0084] 在某些实施方案中,本发明的抗原性构建体包含在每个末端与至少一个聚乙二醇化的赖氨酸共价连接,特别地在每个末端与 1 或 2 个聚乙二醇化的赖氨酸共价连接的上文所述的抗原肽序列。PEG(聚乙二醇)链的长度可以在  $n = 8$  至  $n = 150.000$  之间变化,或更长,特别是从  $n = 10$  至  $n = 80.000$ ,更特别的是从  $n = 10$  至  $n = 10.000$  之间变化。在本发明的特定实施方案中,PEG 链的长度不大于  $n = 45$ ,特别是在  $n = 5$  和  $n = 40$  之间,更特别的是在  $n = 10$  至  $n = 30$  之间,甚至更特别  $n = 10$ 。

[0085] 在本发明的其他实施方案中,AB 肽抗原被结合在肽分子的 N- 和 / 或 C- 末端的 2 个棕榈酸修饰。

[0086] 在某些实施方案中,本发明考虑向预先形成的脂质体外层后插入不同浓度的不同的肽(例如,抗原)类型和 / 或佐剂类型,如 EP 申请号 10188832 所述,其公开内容全文整合到本文中。该后插入方法包括在溶液中预先形成脂质体,和通过疏水性部分修饰抗原肽,使得可获得胶束(micelle)形式的修饰的抗原肽。方法还包括通过诱导胶束降解,从胶束释放抗原肽,随后再整合到预形成的脂质体中。该整合过程由修饰的抗原和 / 或佐剂与脂质体的(磷)脂双层的疏水性相互作用驱动。特别的是,在没有任何化学反应或其他分子修饰的帮助下,通过将溶解的抗原肽或佐剂(最初以胶束形态呈现)稀释至低于表面活性剂的关键胶束浓度,实现将修饰的抗原肽和 / 或佐剂溶解到脂质体的外层中。然后将游离形式的抗原肽或佐剂整合到脂质体的外层中由于其疏水性结构域溶解在磷脂的酰基部分中。因此,方法提供了用于根据相应需求负载的一次性“空白脂质体”的储液。

[0087] 特别的是,用于制备包含通过在脂质体中重建的疏水性部分修饰的多种实施方案中本发明和本文所述的抗原肽的基于脂质体的抗原性构建体的此后插入方法包括步骤:i) 在溶液中制备脂质体;ii) 通过在肽分子的 N- 和 / 或 C- 末端添加至少一个疏水性部分,制备修饰的抗原肽;iii) 在存在表面活性剂的条件下,溶解修饰的抗原肽;iv) 将溶解的肽,和任选的,佐剂稀释至低于表面活性剂的关键胶束浓度(CMC);和 v) 通过向预先形成的脂质体制品中添加所述抗原肽,和任选的所述佐剂,并将添加的肽,和任选的添加的佐剂溶解到脂质体的外层中,特别地在没有任何化学反应或额外的分子修饰的帮助下,用稀释的,溶解的抗原肽,和任选的佐剂负载预先形成的脂质体。

[0088] 如本文中使用的,术语“关键胶束浓度”,也称为 CMC,被定义为表面活性剂的这样的浓度,在高于所述浓度时自发形成胶束。在向系统中加入表面活性剂(或任何表面活性材料)后,表面活性剂将最初分入界面中,因而通过 a) 降低界面能量(按面积 x 表面张力计算)和 b) 通过从与水的接触中去除表面活性剂的疏水性部分,来降低系统的自由能。之后,当表面活性剂覆盖的表面增加而表面自由能(表面张力)减少时,表面活性剂开始凝聚成胶束,因而通过减少表面活性剂的疏水性部分与水的接触面积,而再次减少系统的自由能。在达到 CMC 后,任何进一步添加表面活性剂将只增加胶束数量(IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford(1997))。

[0089] 有利的是,该方法导致高产量的肽和 / 或佐剂整合,在朝向脂质体双层的外层的脂质体上具有独特的分子展示。特别的是,至少 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 和多达 100% 的重建的抗原肽呈现在脂质体的表面,通过其疏水性部分插入脂双层中。

[0090] 方法还获得了表现出均质大小分布的脂质体制品,其具有在 0.4 至 0.6 之间,特别是 0.45 至 0.55,特别是 0.5 的多分散指数。此外,方法和构建体允许用于免疫系统的肽和 / 或佐剂的高生物利用度,其结果是改善的免疫应答。佐剂降解,例如 MPLA 降解是最小化的,或完全不存在,因此,提供了增加的批次重现性。通过上述方法制备的构建体是稳定的,能够无菌过滤,且不导致副免疫应答。

[0091] 因此,在本发明的某些实施方案中,提供了包含本发明的抗原肽的抗原性构建体,如本文所述在多个实施方案中所述抗原肽用于在脂质体中重建,其中至少 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 和多达 100% 的重建的抗原肽呈现在脂质体的表面,通过其疏水性部分插入脂双层中。

[0092] 在本发明的仍然其他实施方案中,提供了包含所述抗原性构建体的脂质体制品,所述制品显示了均质的大小分布,具有在 0.4 至 0.6 之间的范围,特别是 0.45 至 0.55,特别是 0.5 的多分散指数。

[0093] 在某些实施方案中,抗原肽以高重复阵列,特别是包含至少 10 个重复的抗原单位 / 载体分子,特别是至少 50 个重复的抗原单位 / 载体分子,特别是至少 100 个重复的抗原单位 / 载体分子,特别是至少 200 个重复的抗原单位 / 载体分子,特别是至少 300 个重复的抗原单位 / 载体分子;特别是至少 400 个重复的抗原单位 / 载体分子,特别是至少 500 个重复的抗原单位 / 载体分子的重复阵列呈现在载体分子的表面。

[0094] 在本发明的某些实施方案中,抗体可用于根据本发明和本文所述的方法中,用于在患唐氏综合症的儿童和青年至中年对象中,治疗和 / 或减轻和 / 或预防记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是 AD 样记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质的记忆和 / 或认知损伤,特别是识别记忆损伤和 / 或情景联想记忆损伤和 / 或联想学习损伤和 / 或关于事实和事件的陈述性记忆损伤和 / 或情节记忆损伤和 / 或语言功能障碍,如失语症和 / 或视空间损伤,如物品乱放和对陌生和熟悉地区的探索困难和 / 或执行功能减少,如冷漠、去抑制、社会隔离、判断力低下、计划困难和 / 或抽象推理低下和 / 或人格改变和 / 或情绪改变,如冷漠、兴奋和精神病和 / 或失用症和 / 或实施学习运动任务损伤和 / 或其他神经学症状,包括锥体和锥体外系的发现,以及肌阵挛或抽搐,所述抗体是响应本文公开的任一种抗原性构建体而生成的。该抗体可以是多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、完全的人抗体、双抗体、骆驼抗体或任何上述抗体的功能性片段,所述片段在治疗记忆和 / 或认知损伤或异常的方面具有与其来源的抗体基本相同的生物学活性。

[0095] 在本发明的某些实施方案中,抗体可用于根据本发明和本文所述的方法中,用于在患唐氏综合症的儿童中,治疗和 / 或减轻和 / 或预防记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是 AD 样记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质的记忆和 / 或认知损伤,特别是识别记忆损伤和 / 或情景联想记忆损伤和 / 或联想学习损伤和 / 或关于事实和事件的陈述性记忆损伤和 / 或情节记忆损伤和 / 或语言功能障碍,如失语症和 / 或视空间损伤,如物品乱放和对陌生和熟悉地区的探索困难和 / 或执行功能减少,如冷漠、去抑制、社会隔离、判断力低下、计划困难和 / 或抽象推理低下和 / 或人格改变和 / 或情绪改变,如冷漠、兴奋和精神病和 / 或失用症和 / 或实施学习运动任务损伤和 / 或其他

的神经学症状,包括锥体和锥体外系的发现,以及肌阵挛或抽搐,所述抗体是响应本文公开的任一种抗原性构建体而生成的。该抗体可以是多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、完全的人抗体、双抗体、骆驼抗体或任何上述抗体的功能性片段,所述片段在治疗记忆和 / 或认知损伤或异常的方面具有与其来源的抗体基本相同的生物学活性。

[0096] 在本发明的某些实施方案中,抗体可用于根据本发明和本文所述的方法中,用于在患唐氏综合症的儿童中,治疗和 / 或减轻和 / 或预防记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是AD样记忆和 / 或认知损伤或异常,特别是源自脑的海马的记忆和 / 或认知损伤,特别是识别记忆损伤和 / 或情景联想记忆损伤和 / 或联想学习损伤和 / 或关于事实和事件的陈述性记忆损伤和 / 或情节记忆损伤和 / 或语言功能障碍,如失语症和 / 或视空间损伤,如物品乱放和对陌生和熟悉地区的探索困难和 / 或执行功能减少,如冷漠、去抑制、社会隔离、判断力低下、计划困难和 / 或抽象推理低下和 / 或人格改变和 / 或情绪改变,如冷漠、兴奋和精神病和 / 或失用症和 / 或实施学习运动任务损伤和 / 或其他神经学症状,包括锥体和锥体外系的发现,以及肌阵挛或抽搐,所述抗体是响应本文公开的任一种抗原性构建体而生成的。该抗体可以是多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、完全的人抗体、双抗体、骆驼抗体或任何上述抗体的功能性片段,所述片段在治疗记忆和 / 或认知损伤或异常的方面具有与其来源的抗体基本相同的生物学活性。

[0097] 在本发明的另一个实施方案中,源自淀粉样蛋白或淀粉样蛋白样蛋白质的抗原肽片段在本文公开的方法中用于治疗 and / 或减轻和 / 或预防源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质的记忆和 / 或认知损伤。

[0098] 在一个实施方案中,本发明提供了用于在患有唐氏综合症的对象中,治疗和 / 或减轻和 / 或预防记忆损伤或异常的方法,所述方法包括向所述对象施用多种实施方案中本文所述的本发明的抗原肽或组合物。

[0099] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于在患有唐氏综合症的对象中,治疗和 / 或减轻和 / 或预防认知损伤或异常方法,所述方法包括向所述对象施用多种实施方案中本文所述的本发明的抗原肽或组合物。

[0100] 特别的是,所述损伤或异常涉及识别记忆。

[0101] 在特定的实施方案中,用于增强或恢复患有唐氏综合症的对象中的识别记忆的方法中的所述抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N 末端部分,特别是所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15、A $\beta$  1-16、A $\beta$  1-17、A $\beta$  1-18、A $\beta$  1-19、A $\beta$  1-20、A $\beta$  1-22 或 A $\beta$  1-23 的全部或部分组成。

[0102] 特别的是,所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15 组成。

[0103] 在另一个特定的实施方案中,用于增强或恢复患有唐氏综合症的对象中的识别记忆的方法中的所述抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N 末端部分,特别是所述抗原肽由全部或部分氨基酸残基组成。

[0104] 特别的是,所述损伤或异常涉及情景联想记忆。

[0105] 在特定的实施方案中,用于增强或恢复患有唐氏综合症的对象中的情景联想记忆的方法中的所述抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N 末端部分,特别是所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15、A $\beta$  1-16、A $\beta$  1-17、A $\beta$  1-18、A $\beta$  1-19、A $\beta$  1-20、A $\beta$  1-22 或 A $\beta$  1-23 的全部或部分组成。

[0106] 特别的是,所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15 组成。

[0107] 特别的是,所述损伤或异常涉及联想学习。

[0108] 在特定的实施方案中,用于增强或恢复患有唐氏综合症的对象中的联想学习的方法中的所述抗原肽源自 A $\beta$  肽的 N 末端部分,特别是所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15、A $\beta$  1-16、A $\beta$  1-17、A $\beta$  1-18、A $\beta$  1-19、A $\beta$  1-20、A $\beta$  1-22 或 A $\beta$  1-23 的全部或部分组成。

[0109] 在另一个示例性的实施方案中,活性剂是免疫治疗剂。免疫治疗剂的非限制性例子包括炎性剂、生物学因子、免疫调节蛋白、人和人源化抗体,和免疫治疗药物,如 AZT 和其他衍生的或修饰的核苷酸。本发明中还可以应用小分子作为活性剂。

[0110] 特别的是,所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  1-15 组成。

[0111] 在另一个特定的实施方案中,用于增强或恢复患有唐氏综合症的对象中的联想学习的方法中的所述抗原肽源自 A $\beta$  肽的 C 末端部分,特别是所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  20-36、A $\beta$  20-40、A $\beta$  20-42、A $\beta$  21-36、A $\beta$  21-40、A $\beta$  21-42、A $\beta$  22-36、A $\beta$  22-40 或 A $\beta$  22-42 的全部或部分组成。

[0112] 特别的是,所述抗原肽由氨基酸残基 A $\beta$  22-35 组成。

[0113] 对增强和 / 或恢复患有唐氏综合症的对象中的联想学习特别有效的抗原肽(例如由氨基酸残基 A $\beta$  22-35 组成的抗原肽)可以与一种或多种生物学活性化合物组合,所述化合物对识别记忆和 / 或情景联想记忆具有积极效果。

[0114] 在本发明的某些实施方案中,所述患有唐氏综合症的对象是青年至中年对象。

[0115] 在本发明的某些实施方案中,所述对象是青年对象。

[0116] 在本发明的仍然其他的某些实施方案中,所述对象是儿童对象。

[0117] 特别的是,所述对象小于 60 岁,特别是小于 55 岁,特别是小于 50 岁,特别是小于 45 岁,特别是小于 40 岁,特别是小于 35 岁,特别是小于 30 岁,特别是小于 25 岁,特别是小于 20 岁,特别是小于 15 岁,特别是小于 10 岁,特别是小于 5 岁,特别是小于 3 岁。

[0118] 术语“抗体”在本文中是本领域已知的术语,理解为指结合已知抗原,特别是结合免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分的分子或分子的活性片段,即,含有免疫特异性结合抗原的结合位点的分子。本发明的免疫球蛋白可以是免疫球蛋白分子的任何类型(IgG、IgM、IgD、IgE、IgA 和 IgY)或类别(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类。

[0119] 预期在本发明范围内的“抗体”包括单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、双特异性抗体、猿猴化(simianized)抗体、人抗体和人源化抗体,及其活性片段。结合抗原的分子的活性片段的例子包括 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段,包括 Fab 免疫球蛋白表达文库的产物和任何上述抗体和片段的表位结合片段。

[0120] 这些活性片段可通过多种技术从本发明的抗体得到。例如,可以用酶(如胃蛋白酶)切割纯化的单克隆抗体,并进行 HPLC 凝胶过滤。然后,可以收集含有 Fab 片段的恰当的级分,并通过膜过滤等浓缩。关于分离抗体活性片段的一般性技术的其他描述,参见例如 Khaw, B. A. 等人, J. Nucl. Med. 23:1011-1019(1982); Rousseaux 等人, Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986。

[0121] “人源化抗体”指一类改造的抗体,其 CDR 源自非人供体的免疫球蛋白,分子的其余的免疫球蛋白来源部分是源自一种(或多种)人免疫球蛋白。此外,可以改变框架支持残基以保留结合亲和力。获得“人源化抗体”的方法是本领域技术人员普遍已知的(参见

例如, Queen 等人, Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson 等人, Bio/Technology, 9:421 (1991)。

[0122] 还可以通过新的遗传改造方法获得“人源化抗体”, 所述方法能够在大型动物(例如, 兔)中生产亲和力成熟的类人多克隆抗体。

[0123] 术语“单克隆抗体”也是本领域普遍已知的, 指在实验室中从单个克隆大规模生产的抗体, 仅识别一种抗原。单克隆抗体通常是通过融合正常的短寿命、生产抗体的 B 细胞与快速生长的细胞, 如癌细胞(有时被称为“永生”细胞)来制备的。所获得的杂交细胞或杂交瘤快速加倍, 产生生产大量抗体的克隆。

[0124] 术语“记忆和 / 或认知损伤和异常”主要指与患唐氏综合症 (DS) 的对象中的淀粉样蛋白相关病理学相关联的临床症状, 特别指源自脑的海马、前额皮质和 / 或内嗅皮质的损伤和异常。这类记忆和 / 或认知损伤的例子是例如但不限于, 识别记忆损伤和 / 或情景联想记忆损伤和 / 或联想学习损伤和 / 或关于事实和事件的陈述性记忆损伤和 / 或情节记忆损伤和 / 或语言功能障碍, 如失语症和 / 或视空间损伤, 如物品乱放和对陌生和熟悉地区的探索困难和 / 或执行功能减少, 如冷漠、去抑制、社会隔离、判断力低下、计划困难和 / 或抽象推理低下和 / 或人格改变和 / 或情绪改变, 如冷漠、兴奋和精神病和 / 或失用症和 / 或实施学习运动任务损伤和 / 或其他神经学症状, 包括锥体和锥体外系的发现, 以及肌阵挛或抽搐。

[0125] 术语“记忆损伤”还指 DS 的基本特征, 通常是其最早的表现。即使不是主要的疾病, 但在报告时, 大部分 DS 患者都可发生记忆缺陷。DS 中的记忆损伤模式差异很大。在 DS 中, 依赖于内侧颞结构, 如内嗅皮质和海马的关于事实和事件的陈述性记忆受深刻的影响, 而支持程序性记忆的皮层下系统则相对保留, 直到病程的相当晚期。

[0126] 在青年 DS 患者中, 情节记忆受到比事实记忆(词汇和概念(语义记忆))更深刻的损伤, 事实记忆通常在晚些时候受到损伤。在情节记忆中, 在即时回忆(例如, 电话号码的内心演练)、近期事件的记忆(一旦必须回忆已经背离意识的物质时起作用)和更久远事件的记忆之间存在差异。由内侧颞叶的海马、内嗅皮质保留的近期事件的记忆主要在青年 DS 患者中受损。相反, 早期保留的即时记忆(由前额皮质记录)与长时间(数年)固化的记忆一样, 可以在缺少海马功能的条件下回忆。

[0127] 程序性记忆的损伤仅出现在中年 DS 患者中。语言、执行功能和其他认知领域的功能障碍在病程中以不同速率出现。DS 临床表现的异质性可能反映了脑病理学负荷的变化的地理分布。语言功能障碍, 即, 失语症, 是 DS 的常见症状, 首次表现的语言功能障碍通常包括选词困难、说话累赘和自发演讲中的词汇减少, 伴随在对抗性命名测试中的命名不能症。可以发展为包括误用错字、演讲内容贫乏和理解障碍。然而, 患者通常可以逐字重复短语, 直到疾病的相当晚期。DS 中的语言困难通常描述为 Wernicke 型和 Broca 型的失语症。当要求在一分钟时间内产生字词列表时, DS 患者在分类流畅性测试(例如, 列举动物)中的表现显著差于字母流畅性测试(例如, 列举以 F 开头的词)。这反映了语义记忆中的特定缺陷。

[0128] 丧失视空间技能是 DS 的另一个早期特征, 有时在出现时可以是非常明显的。视空间损伤表现为错误的放置物品和难以探索一开始陌生然后熟悉的地区。视觉失认症(不能识别目标)和人面失认症(不能识别人脸)是后期特征

[0129] DS患者中还可见执行功能的损伤。这些症状包括洞察力低下和降低的抽象推理能力。随着疾病发展,通常出现人格改变(如冷漠、社会隔离和去抑制)、判断力低下和计划,和不能完成任务。叠加型抑郁症也可以以该方式出现,其在痴呆的背景中是难以诊断的。

[0130] 对缺陷的洞察力降低(病感失认症)是DS的另一个独特特征。对患者而言,拒绝承认或低估自身缺陷,并在被指出时对其进行解释并不罕见。访问旁系家史(如配偶)对获得准确的病史而言是关键性的。事实上,通常是家庭成员使认知损伤的疾病获得医生关注。洞察力的丧失随时间和整体疾病严重程度而增加,可以与行为紊乱相关;具有相对保留的洞察力的患者更易于抑郁,而洞察力损伤较多的患者更易于焦虑、去抑制和表现出精神病特征。行为紊乱的出现,包括焦虑、进攻性、走神和精神病(幻觉、妄想、错误辨识综合症)可以导致患者与家庭成员的明显痛苦,通常可见于DS的晚期。

[0131] 青年DS患者一般具有正常的神经学检查,但认知检查除外。虽然DS患者中确实出现锥体和锥体外系运动症状、肌阵挛和抽搐,但这些通常是晚期现象。类似的,额叶释放信号(紧握、撅嘴反射、抗拒反射)和失禁是DS的晚期特征,而非早期特征。

[0132] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合物可以是治疗性疫苗,包含治疗或预防有效量的本发明和上文所述的抗原性构建体,并且在例如下文所述的利用本发明组合物的试剂盒的背景下,可以制备成液态溶液或可注射的悬浮液,或者是适合在注射前溶解的固体形态。

[0133] “治疗或预防有效量”指抗体、肽、化合物或药物组合物的量,当向人或动物施用所述量时,在所述人或动物中导致治疗的或预防的效果。本领域技术人员按照常规方法,可以方便的确定有效量。

[0134] 可以向人或动物,特别是向罹患AD样认知损伤或异常,特别是源自脑的海马和/或前额皮质和/或内嗅皮质的损伤或异常的患有唐氏综合症的人或动物施用本发明的免疫原性组合物,以在所述人或动物诱导免疫应答从而减轻与疾病相关的所述AD样症状,或恢复在不受疾病影响的健康个体中可见的状况。

[0135] 由于实际上所有的唐氏综合症人群最终都在生活史的某些时间点罹患AD样认知损伤,因此,在表现出AD样损伤之前向唐氏综合症人群施用所述疫苗也是有益的。此时,所述疫苗将作为预防性治疗发挥作用。

[0136] 可以通过任何恰当的标准施用途径,向人或动物施用本发明的免疫原性组合物。一般而言,可以通过局部、口腔、直肠、鼻或肠道外(例如,静脉内、皮下或肌肉内)途径施用组合物。此外,可以将组合物掺入到缓释基质(如可生物降解的聚合物)中,所述聚合物被植入到需要递送的位置附近,例如肿瘤位点。方法包括施用单次剂量,以预定的时间间隔施用重复剂量,和持续施用预定的时间段。

[0137] 在本发明的特定实施方案中,以重复的剂量,特别是以1至15次剂量,更特别的是2至10次剂量,更特别的是3至7次剂量,甚至更特别的是4至6次剂量,以1至10周的时间间隔,特别是1至6周的时间间隔,更特别的是1至4周的时间间隔,甚至更特别的是2至3周的时间间隔,施用本发明的抗原性构建体,特别是包含治疗有效量的所述抗原性构建体的免疫原性组合物。通过在强化后合适的时间,特别是强化后3至10天,更特别的是强化后4至8天,更特别的是强化后5至6天采集血清样品监控免疫应答,并使用已知的方法,特别是常用的免疫测定之一,例如ELISA测定法确定抗原性构建体的免疫原性。

[0138] 特别的是,通过肠道外,特别是通过腹膜内、静脉内、皮下和肌肉内注射施用本发明的抗原肽组合物。

[0139] 组合物的剂量取决于治疗的病况,使用的特定的组合物,和其他临床因素,如患者的体重、大小和条件、体表面积、待施用的特定化合物或组合物、同时施用的其他药物,和施用途径。

[0140] 本发明的免疫原性组合物可以和用于治疗与唐氏综合症相关联的症状的其他生物活性物质和程序组合施用。其他生物活性物质可以以混合物的形式,作为已包含本发明的免疫原性组合物的同一组合物的一部分,其中免疫原性组合物和其他生物活性物质在相同的可药用的溶剂和 / 或载体中相互混合或与相同的可药用的溶剂和 / 或载体相互混合,或者可以作为单独组合物的部分单独提供,所述单独组合物可以单独提供或以试剂盒的部分的形式一起提供。

[0141] 本发明的免疫原性组合物可以间歇地或顺序地和一种或多种其他生物活性物质同时施用。例如,本发明的免疫原性组合物可以与第一额外的生物活性物质同时施用,或在施用所述组合物之后或之前顺序施用。如果选择其中共同施用多于一种其他的生物活性物质与至少一种本发明的免疫原性组合物的应用方案,则化合物或物质可以部分同时施用,部分以多种组合顺序施用。

[0142] 因此,本发明的另一个目标是提供治疗或预防有效量的本发明的免疫原性组合物,和任选地一种或多种其他的生物活性物质的混合物,以及提供使用本发明的这类组合物或其混合物的方法,用于预防和 / 或治疗性治疗和 / 或减轻淀粉样蛋白相关病理学在患有唐氏综合症的儿童或青年至中年对象中的效应,特别是用于改善或恢复记忆损伤或异常,特别是源自脑的海马和 / 或前额皮质和 / 或内嗅皮质的损伤和异常,特别是用于改善或恢复识别记忆损伤和 / 或情景联想记忆损伤和 / 或联想学习损伤和 / 或关于事实和事件的陈述性记忆损伤和 / 或情节记忆损伤和 / 或语言功能障碍,如失语症和 / 或视空间损伤,如物品乱放和对陌生和熟悉地区的探索困难和 / 或执行功能减少,如冷漠、去抑制、社会隔离、判断力低下、计划困难和 / 或抽象推理低下和 / 或人格改变和 / 或情绪改变,如冷漠、兴奋和精神病和 / 或失用症和 / 或实施学习运动任务损伤和 / 或其他的神经学症状,包括锥体和锥体外系的发现,以及肌阵挛或抽搐。

[0143] 除本发明的免疫原性组合物以外,本发明的混合物可包含生物活性物质,例如用于对患有唐氏综合症的儿童或青年至中年对象中的 AD 样症状的用药中的已知化合物。

[0144] 其他的生物活性物质或化合物可以通过与本发明的免疫原性组合物相同或相似的机制,或通过不相关的作用机制,或通过多种相关的和 / 或不相关的作用机制产生其生物学效应。

[0145] 一般而言,其他的生物活性化合物可包括针对和结合本文公开的抗原肽的抗体,或用于神经病症的用药中的化合物,例如神经传递增强剂、精神治疗药物、乙酰胆碱酯酶抑制剂、钙通道阻断剂、生物胺、苯二氮卓 (benzodiazepine) 镇静剂、乙酰胆碱合成、储藏或释放的增强剂、乙酰胆碱突触后受体激动剂、单胺氧化酶 -A 或 -B 抑制剂、N- 甲基 -D- 天冬氨酸谷氨酸受体拮抗剂、非甾体类抗炎药物、抗氧化剂和血清素能受体拮抗剂。

[0146] 特别的是,本发明的混合物可包含至少一种其他的生物活性化合物与本发明的治疗性疫苗,和任选的,可药用的载体和 / 或稀释剂和 / 或赋形剂,所述生物活性化

合物选自抗氧胁迫的化合物、抗凋亡化合物、金属螯合剂、DNA 修复的抑制剂如哌仑西平 (pirenzepin) 和代谢物、3-氨基-1-丙烷磺酸 (3APS)、1,3-丙烷二磺酸酯 (1,3PDS)、分泌酶激活剂、 $\beta$ -和  $\gamma$ -分泌酶抑制剂、 $\beta$ -和  $\gamma$ -分泌酶调节剂、 $\tau$  蛋白、神经递质、 $\beta$ -片层中断剂、抗炎分子或胆碱酯酶抑制剂 (ChEI) 如他克林 (tacrine)、利伐斯的明、多奈哌齐和 / 或加兰他敏 (galatamine), 和其他药物和营养补充剂。

[0147] 本发明的混合物还可包括烟酸或美金刚胺与本发明的免疫原性组合物, 和任选的, 可药用的载体和 / 或稀释剂和 / 或赋形剂。

[0148] 在本发明的一个实施方案中, 提供的混合物包含用于治疗包括幻觉、妄想、思维障碍 (表现为明显的无条理性、出轨、讲话不切题)、怪诞或无序的行为, 以及快感缺乏、情感低沉、冷漠和社会退缩的阳性和阴性精神病症状的“非典型的抗精神病药物” (例如氯氮平 (clozapine)、齐拉西酮 (ziprasidone)、利培酮 (risperidone)、阿立哌唑 (aripiprazole) 或奥氮平 (olanzapine)) 与本发明的免疫原性组合物和 / 或治疗性疫苗, 和任选的, 可药用的载体和 / 或稀释剂和 / 或赋形剂

[0149] 适合与本发明的免疫原性组合物组合用于混合物中的其他化合物描述在例如 W02004/058258 (尤其参见第 16 和 17 页), 包括治疗药物靶 (第 36-39 页)、烷基磺酸和烷醇磺酸 (第 39-51 页)、胆碱酯酶抑制剂 (第 51-56 页)、NMDA 受体拮抗剂 (第 56-58 页)、雌激素 (第 58-59 页)、非甾体抗炎药物 (第 60-61 页)、抗氧化剂 (第 61-62 页)、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 激动剂 (第 63-67 页)、降胆固醇剂 (第 68-75 页); 淀粉样蛋白抑制剂 (第 75-77 页)、淀粉样蛋白形成抑制剂 (第 77-78 页)、金属螯合剂 (第 78-79 页)、抗精神病药物和抗抑郁药 (第 80-82 页)、营养补充剂 (第 83-89 页) 和增加生物活性物质在脑内的利用度的化合物 (参见第 89-93 页) 和前体药 (第 93 和 94 页), 所述文件通过引用整合到本文中, 尤其是上述页数中提及的化合物。

[0150] 在本发明的一个实施方案中, 提供了抗原性构建体, 其包含不含 T 细胞表位的 A $\beta$  肽, 因此没有潜在的副作用, 如由过度活化的补体系统导致的神经病并发症。在本发明的范围内, 这可以通过施用 A $\beta$  肽抗原, 特别是棕榈酰化的 A $\beta$  肽抗原, 更特别的是棕榈酰化的 A $\beta$ <sub>1-15</sub> 肽抗原, 尤其是棕榈酰化的 A $\beta$ <sub>1-15</sub> 肽抗原, A $\beta$ <sub>1-15</sub> 与补体抑制剂的组合来实现。

[0151] 补体抑制剂可以是选自可溶性人补体受体 1、抗人补体蛋白质 C5 例如人源化抗 C5 单克隆抗体或人源化单克隆抗体的单链片段、C1-酯酶抑制剂 -N 和天然的人 C1 抑制剂的化合物。

[0152] 可以按照 Nicolau 等人, 2002 中报道的方法, 合成修饰的淀粉样蛋白肽抗原 (例如淀粉样蛋白  $\beta$  1-15 肽抗原)。在 Nicolau 等人中报道的方法可如下修饰, 首先合成抗原肽, 然后进一步通过向预形成肽的末端氨基酸残基上树脂上 (on-resin) 移植亲脂性或疏水性部分修饰所述抗原肽。特别的是, 使用已知的偶联化学, 将受保护的氨基酸, 特别是受 Fmoc- 保护的氨基酸连接至树脂上。去除保护基, 偶联第二受保护的氨基酸残基。然后, 使用标准的自动化肽合成 (利用了已知的保护化学, 特别是 Fmoc/tBu 化学) 和标准的侧链保护基来合成 A $\beta$  抗原肽, 特别是 A $\beta$ <sub>1-15</sub> 抗原肽, 通过在淀粉样蛋白 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 的第 1 至 15 个氨基酸上偶联, 来生产具有给定序列的肽片段。在最后的步骤中, 在生长的肽片段上偶联另外 2 个受保护的氨基酸。然后, 选择性切割前两个和最后两个氨基酸的侧链上的 Mtt 基团, 并与棕榈酸偶联。在洗涤树脂后, 去除保护基, 同时切割树脂, 再使用标准的方法进行侧链去

保护。然后,可以获得高纯度的终产物,其身份由本领域已知的方法验证,例如电喷雾质谱。

[0153] 可以在由脂质体,特别是用二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (DMPEA)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油 (DMPG) 和胆固醇制备的,任选含有单磷脂酰脂质 A 的脂质体组成的构建体中重建修饰的淀粉样蛋白 A $\beta$  抗原肽,特别是修饰的 A $\beta$ <sub>1-15</sub> 抗原肽。

[0154] 在一个实施方案中,本发明考虑使用阴离子型脂质作为脂质体膜中的阳离子型脂质的替代物,所述阴离子型脂质选自:

[0155] a. 具有头部基团磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、L- $\alpha$ -磷脂酰肌醇-4-磷酸或磷脂酸的二酰基-磷脂类;

[0156] b. 具有头部基团磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸或磷脂酸的溶血磷脂类,和

[0157] c. 心磷脂、二溶血-心磷脂、单溶血-心磷脂。

[0158] 在一个方面,本发明考虑使用阳离子型脂质作为脂质体膜中的阴离子型脂质的替代物,所述阳离子型脂质选自:

[0159] a. 具有头部基团 3-三甲基铵-丙烷、3-二甲基铵-丙烷、3-乙基磷酸胆碱或 3-磷脂酰乙醇胺的二酰基-磷脂类;

[0160] b. D-赤鞘氨醇、二甲基双十八烷基溴化铵、N-[1-(2,3-二肉豆蔻氧代)丙基]-N,N-二甲基-N-(2-羟乙基)溴化铵、N,N,N-三甲基-2-双[(1-氧代-9-十八烯基)氧]-(Z,Z)-1-丙铵硫酸甲酯或 3 $\beta$ -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰]胆固醇盐酸。

[0161] 在本发明的一个实施方案中,与上述头部基团连接的脂链可以

[0162] a. 是饱和的或不饱和的,

[0163] b. 长度不同的 (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, 其中 n 在 3 至 24 之间,且

[0164] 是对称或不对称取代的。

[0165] 在本发明的特定实施方案中,使用含脂质 A 的脂质体作为佐剂制备抗淀粉样蛋白疫苗。混合二肉豆蔻酰磷脂酰-胆碱、-甘油和胆固醇,特别是以 0.9:1.0:0.7 的摩尔比混合。然后,添加合适浓度的强免疫调节剂(例如单磷脂酰脂质 A),特别是在 30 至 50mg/mmol 之间,更特别的是在 40mg/mmol 的磷脂浓度。然后,添加修饰的抗原性 A $\beta$  肽,肽与磷脂类的摩尔比在 1:30 至 1:200,特别是在 1:50 至 1:120 之间的摩尔比,更特别的是 1:100 的摩尔比。去除溶剂,通过例如蒸发,然后用无菌缓冲溶液(例如 PBS) 将获得的薄膜水合。

[0166] 还可以通过交叉流动注射技术,制备脂质体,如在例如 (Wagner 等人,2002) 中所描述的。在将脂质溶液注射到含水缓冲体系中的过程中,脂质倾向于形成“沉淀”,然后自我排列成囊泡。获得的囊泡大小取决于这样的因素,例如脂质浓度、搅拌速率、注射速率和脂质的选择。制备系统可以由交叉流动注射模块、用于极性相(例如 PBS 缓冲液)的容器、乙醇/脂质溶液容器和压力装置,特别是氮气压力装置组成。含水或极性溶液通过交叉流动注射模块泵出,同时乙醇/脂质溶液被注射到极性相中,伴随应用改变的压力。多种生产脂质体抗原性构建体的方法描述在 W02007/068411 中。

[0167] 在特定的实施方案中,制备用于本发明方法中的脂质体组合物,以包括棕榈酰化的 A $\beta$ <sub>1-15</sub>,特别是四棕榈酰化的 A $\beta$ <sub>1-15</sub> 以及作为佐剂的单磷脂酰脂质 A (MPLA)。

[0168] 可以每周或每两周向待免疫的对象皮下施用 4 至 10 次,特别是 5 至 6 次剂量的脂质体组合物。可以获得血浆探针,并周期性的分析 IgG 滴度。

[0169] 可以在唐氏综合症的相关动物模型中证实本发明的脂质体组合物作为在患有唐氏综合症的儿童和青年至中年对象中的免疫原的效果,以及用于在所述对象中治疗记忆缺陷的治疗潜力。特别的是,使用普遍接受作为 DS 动物模型的 Ts65Dn 小鼠。Ts65Dn 小鼠产生了鼠 16 号染色体三体,该染色体具有鼠 APP 基因 (Davisson 等人,1993 ;Netzer 等人,2010)。这些转基因小鼠表现出增加 1.5 倍的鼠 A $\beta$  (Hunter 等人,2004),并在若干种记忆任务中证实了行为缺陷 (Belichenko 等人,2009)。

[0170] 本发明可以证实本发明的脂质体组合物诱导升高的抗体滴度,并且所述抗体即使在末次免疫 40 天后也仍然是升高的。因此,本发明和本文所述的脂质体组合物能够诱导强免疫应答,并能够打破受治疗的唐氏综合症对象中的 A $\beta$  自身耐受。

[0171] 本发明和本文所述的脂质体组合物进一步表现出能够在患有唐氏综合症的青年至中年小鼠中诱导与无唐氏综合症的对照组对象中一样高的 IgG 滴度。本发明的脂质体组合物诱导与对照组相比增加的 IgG2a 同种型抗体滴度,而 IgG1 和 IgG2b 同种型的抗体滴度可与治疗组和对照组相比。治疗组中的 IgM 类抗体滴度低于对照组。该轻微较低的 IgM 水平可能是由患有唐氏综合症的小鼠中改变的免疫系统导致的。因此,脂质体组合物能够克服 DS 人群中描述的对于 A $\beta$  的受损的适应性免疫应答 (Monsonogo 等人,2001)。

[0172] 本发明和本文所述的脂质体组合物也是安全的,并且不诱导不想要的副作用。特别的是,用脂质体组合物治疗不导致脑的细胞激活,如星状胶质细胞或小胶质细胞的激活。

[0173] 本发明和本文所述的脂质体组合物表现出在动物模型中导致较高的判别比,提示治疗在受治动物中导致显著的记忆改善。

[0174] 在由训练、线索和情景环节组成的测试中,本发明和本文所述的脂质体组合物还表现出在达到了对照动物中观察到的水平的动物模型中导致增强的木僵 (freezing)。这提示免疫是有效的,并增强模型动物的记忆力。

[0175] 因此,本发明和本文所述的脂质体组合物能够挽救患有唐氏综合症的儿童和青年至中年对象,特别是在脑内尚未出现 A $\beta$  相关的斑块的患有唐氏综合症的儿童和青年至中年对象的记忆缺陷。患有唐氏综合症的患者表现出认知异常,如记忆损伤和异常行为。

[0176] 本发明和本文所述的脂质体组合物还能够挽救患有唐氏综合症的儿童和青年至中年对象,特别是在脑内已经出现 A $\beta$  相关的斑块的患有唐氏综合症的儿童和青年至中年对象的记忆缺陷。

[0177] 在一个实施方案中,用脂质体组合物治疗可以改善或恢复患有唐氏综合症的儿童或青年至中年的记忆缺陷,特别是识别记忆损伤和 / 或情景联想记忆损伤和 / 或联想学习损伤和 / 或关于事实和事件的陈述性记忆损伤和 / 或情节记忆损伤和 / 或语言功能障碍,如失语症和 / 或视空间损伤,如物品乱放和对陌生和熟悉地区的探索困难和 / 或执行功能减少,如冷漠、去抑制、社会隔离、判断力低下、计划困难和 / 或抽象推理低下和 / 或人格改变和 / 或情绪改变,如冷漠、兴奋和精神病和 / 或失用症和 / 或实施学习运动任务损伤和 / 或其他神经学症状,包括锥体和锥体外系的发现,以及肌阵挛或抽搐。

## 附图简介

[0178] 图 1 显示了 ACI-DS-01 疫苗的示意图,这是基于脂质体的疫苗,具有四棕榈酰化的小鼠 A $\beta$  1-15 抗原和作为佐剂的 MPLA。人和小鼠 A $\beta$  1-15 之间的 3 个氨基酸差异是下划线

的。

[0179] 图 2 显示了在用疫苗 ACI-DS-01 免疫的 Ts65Dn 小鼠中的抗小鼠 A $\beta$  抗体水平。A 和 B) 在用 ACI-DS-01 免疫的小鼠血浆中检测到了抗小鼠 A $\beta$  40 或 42IgG 滴度。在二次免疫后观察到了诱导的滴度,且即使在第 6 次注射 40 天后仍然比用空脂质体免疫的小鼠高。在 2N 和 Ts65Dn 小鼠的测量的滴度之间没有差异。C 至 F) 在第 4 次免疫后检测到了 IgG 同种型。G) Ts65Dn 小鼠中的 IgM 滴度几乎不较低。H) 在用 ACI-DS-01 免疫的所有小鼠中都检测到了相同的抗 MPLA IgG 滴度水平。图代表了平均值  $\pm$ SD (n = 202N-ACI-DS-01 ;n = 15Ts65Dn-ACI-DS-01 ;n = 182N-空白和 n = 11Ts65Dn-空白。图代表了平均值  $\pm$ SD)。

[0180] 图 3 显示了免疫对记忆表现的效果。2N 和 Ts65Dn 小鼠之间的自发活动差异在免疫后仍然是相似的。B) 在新目标识别中,用 ACI-DS-01 免疫的小鼠表现出比用空白疫苗治疗的组显著增强的识别指数 (RI)。C) 在条件恐惧中,免疫的小鼠在情景环节过程中表现出较高木僵水平的临界显著性。图代表了平均值  $\pm$ SD (n = 202N-ACI-DS-01 ;n = 13Ts65Dn-ACI-DS-01 ;n = 182N-空白和 n = 11Ts65Dn-空白)。

[0181] 图 4 显示了用 ACI-DS-01 疫苗治疗的小鼠中的 A $\beta$  40 水平。A) 在皮质中,Ts65Dn 中的 A $\beta$  40 水平几乎不高于 2N 小鼠。疫苗 ACI-DS-01 表现出减少皮质和海马中的 A $\beta$  42 和 A $\beta$  40 水平的倾向。在用 ACI-DS-01 治疗后,小脑中的 A $\beta$  42 和 A $\beta$  40 水平表现出统计学显著的减少。图代表了平均值  $\pm$ SD (n = 102N-ACI-DS-01 ;n = 10Ts65Dn-ACI-DS-01 ;n = 82N-空白和 n = 5Ts65Dn-空白)。B 和 C) 皮质或小脑中的 A $\beta$  -40/42 比例与 RI 之间的相关性。D) 抗 A $\beta$  IgG 滴度的水平与用 ACI-DS-01 治疗的 Ts65Dn 小鼠血浆中的 A $\beta$  40 水平弱相关。E) 抗 A $\beta$  IgG 水平和 RI 之间的显著相关性 (n = 192N-ACI-DS-01 ;n = 13Ts65Dn-ACI-DS-01 ;n = 182N-空白和 n = 11Ts65Dn-空白)。

[0182] 图 5 显示了炎症反应的研究。A) 体重和脑重。B) 受治疗的 2N 和 Ts65Dn 小鼠中的 GFAP 免疫反应性 (左) 和 CD45 (右) 的共聚焦图像。箭头指向单个的 CD45-阳性小胶质细胞。对 GFAP 免疫反应性的光密度进行定量,在组之间没有揭示出任何差异。每组为 n = 4。

[0183] 图 6 显示了用以 ACI-DS-02 免疫的小鼠的血清免疫染色的人 DS 脑样品的切片。阳性面积提示源自 ACI-DS-02 的抗体与 DS 人群的脑内的淀粉样蛋白斑块结合。染色与用 6E10 和用源自 ACI-24 的抗体获得的染色类似,所述 6E10 是可商购的抗淀粉样蛋白  $\beta$  抗体。ACI-24 疫苗对应于 ACI-DS-01 疫苗,差异在于 ACI-24 中使用的抗原是人 A $\beta$  1-15 序列,而 ACI-DS-01 疫苗含有小鼠 A $\beta$  1-15 序列作为抗原 (这两个抗原中的 3 个氨基酸差异参见图 1)。当用以 PBS 免疫的小鼠的血清孵育切片时,没有观察到任何染色。

[0184] 图 7 显示了在条件恐惧测试中,用 ACI-DS-02 疫苗免疫的 TS65Dn 小鼠的学习。在获得环节过程中,用 ACI-DS-02 免疫的 TS65Dn 小鼠显示了比用 PBS 免疫的 TS65Dn 小鼠更大的木僵,特别是在第三次条件刺激 (CS) 后。图代表了平均值  $\pm$ SD (n = 7Ts65Dn-ACI-DS-02 ;n = 72N-PBS 和 n = 4Ts65Dn-PBS。图代表了平均值  $\pm$ SD)。

[0185] 图 8 显示了用以 ACI-DS-03 免疫的小鼠的血清免疫染色的人 DS 脑样品的切片。阳性面积提示源自 ACI-DS-03 的抗体与 DS 人群的脑内的淀粉样蛋白斑块结合。染色与用 6E10 和用源自 ACI-24 的抗体获得的染色类似,所述 6E10 是可商购的抗淀粉样蛋白  $\beta$  抗体。ACI-24 疫苗对应于 ACI-DS-01 疫苗,差异在于 ACI-24 中使用的抗原是人 A $\beta$  1-15 序

列,而 ACI-DS-01 疫苗含有小鼠 A $\beta$  1-15 序列作为抗原(这两个抗原中的 3 个氨基酸差异参见图 1)。当用以 PBS 免疫的小鼠的血清孵育切片时,没有观察到任何染色。

[0186] 图 9 显示了用 ACI-DS-01 疫苗免疫的 Ts65Dn 小鼠的形态学分析。A) 内侧隔核中的 ChAT+ 细胞的数量, B) 所有组中的光密度是相似的。C) 在用 ACI-DS-01 免疫的 Ts65Dn 小鼠中, ChAT+ 细胞体面积比用空白疫苗治疗的 Ts65Dn 增加 ( $n = 42N$ - 空白 ;  $n = 4Ts65Dn$ - 空白 ;  $n = 42N$ -ACI-DS-01 和  $n = 4Ts65Dn$ -ACI-DS-01。图代表了平均值  $\pm$  SD)。

## 实施例

[0187] 实施例 1 一般方法

[0188] 1.1 动物

[0189] 使用被称为 DS 小鼠模型的 Ts65Dn 小鼠 (Davisson 等人, 1993) ( $N = 30$ ) 和年龄匹配的对照 2N ( $n = 40$ )。在开始日时, 使用的小鼠是 5 个月龄。在研究结束时 (免疫和行为测试), 小鼠是 9 个月龄。因此, 所有在处死时收集的样品都来自 9 个月龄的小鼠。

[0190] Ts65Dn 新生小鼠具有升高的死亡率 (约 6%), 主要是由于先天性心脏畸形 (Randall 2006, Moore 2006)。然而, 小鼠甚至可以存活至多 18 至 24 个月。在研究中, 观察到 15% 的死亡率。存活的小鼠的大小比正常的同窝幼崽小  $\sim 20\%$ 。在出生时死亡的受影响最重的小鼠, 没有活到用于分析, 导致低估了三体基因对一些表型的影响 (即, 心脏缺陷)。然而, 就我们的关注而言, 存活的小鼠代表了用于分析淀粉样蛋白和 AD 样病理学的适合的 DS 模型。

[0191] 在用于上述研究的 DS 小鼠模型中, 小鼠在 4 月龄时表现出增加的淀粉样蛋白水平 (Hunter 2004)。在 9 月龄时, 淀粉样蛋白  $\beta$  的水平达到根据 3 拷贝 APP 基因预测的正常水平的 3 倍。与 DS 人群类似, 衰老是 Ts65Dn 脑内沉积淀粉样蛋白的重要因素。尽管淀粉样蛋白与年龄相关的累积, Ts65Dn 小鼠不出现斑块。然而, 它们确实忠实地重复了在 AD 和患有唐氏综合症人群中可见的神经元群体的退化 (Salehi 等人, 2009)。

[0192] 综上所述, 所使用的小鼠模型中的 DS 特征包含存在病理学蛋白质和表型方面; 即, 淀粉样蛋白负载和认知损伤。因此, Ts65Dn 小鼠可以准确地概括 DS 的病理发生过程。由于这些小鼠在 6 月龄时开始以与人可比较的水平积累淀粉样蛋白, 将模型小鼠的年龄与年龄从青年至中年的人 DS 患者相比较。

[0193] 用于使用 ACI-DS-01 疫苗的免疫研究的小鼠是通过交配 B6EiC3Sn-Ts(1716)65Dn 雌性 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 和 B6EiC3Sn F1/J A/a 雄性 (Jackson Laboratory) 维持了大于 10 代的 Ts65Dn 鼠克隆。由于在同系繁殖时三染色体小鼠的育性极低或完全无育性, 因此使用该繁殖方案 ; B6C3 背景是最成功的。为了区分 2N 和 Ts65Dn 小鼠, 从尾部样品中提取基因组 DNA。使用定量聚合酶链式反应 (PCR) 规程 (由 Jackson Laboratory 提供) 测量 Mx1 基因表达, 该基因 Ts65Dnn 中存在 3 份拷贝。在所有研究中都使用雌性小鼠。在研究开始时它们是 4+/-0.3 个月大。

[0194] 1.2 疫苗制备 - 制备基于脂质体的抗原性构建体

[0195]

疫苗代码	抗原肽序列 <sup>a</sup>	A $\beta$ 序列	ATR-IR 测量的疫苗中的抗原肽构象 (%)
ACI-D S-01	H-Lys(Pal)-Lys(Pal)-Asp-Ala-Glu-Phe-Gly-His-Asp-Ser-Gly-Phe-Glu-Val-Arg-His-Gln-Lys(Pal)-Lys(Pal)-OH	小鼠 A $\beta$ 1-15 <sup>b</sup> (SEQ ID NO: 2)	73% $\beta$ 片层 19% 随机卷曲 0% $\alpha$ 螺旋或环 8% $\beta$ 转角
ACI-D S-02	H-Lys(Pal)-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Lys(Pal)-OH	人(SEQ ID NO: 4)和 小鼠(SEQ ID NO: 5) A $\beta$ 22-35	67% $\beta$ 片层 21% 随机卷曲 0% $\alpha$ 螺旋或环 12% $\beta$ 转角

[0196]

ACI-D S-03	H-Lys(Pal)-Lys(Pal)-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Lys(Pal)-Lys(Pal)-OH	人(SEQ ID NO: 6) 和 小鼠(SEQ ID NO: 7) A $\beta$ 14-29	57% $\beta$ 片层 19% 随机卷曲 12% $\alpha$ 螺旋或环 11% $\beta$ 转角
---------------	--	--	---

[0197] <sup>a</sup> 肽序列以三字母代码表示 ;Pal 代表棕榈酰残基 ;[0198] <sup>b</sup> 人和鼠 A $\beta$  1-15 序列之间的 3 个氨基酸差异显示在图 1 中, 是下划线的。

[0199] 根据 W02007/068411 所述方法生产脂质体抗原性构建体。由 Polypeptide Laboratories (Strasbourg, France) 生产棕榈酰化的肽。总而言之, 通过在 60°C, 将二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油 (DMPG)、胆固醇和单磷脂酰脂质 A (MPLA) (均为 Avanti Polar Lipids, AL, USA) 分别按摩尔比 9:1:7:0.05 溶解在乙醇中, 制备脂质体疫苗。在 PBS pH7.4 中稀释脂质 / 乙醇溶液, 允许形成多层囊泡。然后, 通过超滤浓缩所获得的制品 (Vivaflow200-100.000MWC0 聚醚砜), 流速为 200ml/min, 并用超滤步骤降低反应体积。浓缩的溶液在 Vivaflow200 装置中进一步经受透析, 其中用 PBS pH7.4 实施 10x 体积交换。然后, 将多室脂质体 (multilamellar liposome) 进行均质化 (在 15.000-20.000Psi 下 7 个循环), 再用孔径 0.2  $\mu$ m 直径 47mm 的聚碳酸酯滤膜 (Whatman) 进行顺序的 3 个挤出循环。均质化和挤出步骤都是在 EmulsiFlex-C5 (Avestin, Canada) 中进行的。在 PBS pH7.4 中稀释所获得的无抗原单室脂质体, 并在添加肽以前加热至 60°C。将棕榈酰化的肽溶解在含 5.0% ( $\beta$ -OG) 的 PBS pH11.4。为了制备疫苗 ACI-DS-01、ACI-DS-02 和 ACI-DS-03, 分别使用 1.33、0.67 和 1.06mg/mL 的相应的抗原肽。获得的溶液包含高于其 0.73% (wt/v) 的临界胶束浓度 (CMC) 的去垢剂浓度。然后在 60°C, 将该肽溶液注射到脂质体溶液中, 搅拌 30min, 获得具有最终  $\beta$ -OG 浓度远低于其临界胶束浓度的溶液。去垢剂胶束分解, 导致棕榈酰化的抗原掺入在之前形成的脂质体的表面上。然后, 通过超滤浓缩具有抗原的该脂质体溶液, 并通过渗滤用 PBS pH7.4 进行 10x 体积交换 (都在 100.000MWC0 聚醚砜中, 流速为 200ml/min)。然后, 通过 0.2  $\mu$ m 聚碳酸酯注射过滤器, 无菌过滤获得的脂质体 2 次, 并储藏在 5°C。疫苗中肽与脂质的摩尔比是 1:100。

[0200] 1.3 用 ACI-DS-01 疫苗免疫[0201] 所有的小鼠都接受使用 200  $\mu$ l 的 ACI-DS-01 (51.2  $\mu$ g/ 每剂 Pal1-15、四棕榈酰化

的 A $\beta$  肽 1-15) 或空白脂质体疫苗的皮下 (s. c.) 免疫。在第 1、14、28、42、56、70 和 110 天进行共计 6 次注射。在同一天, 在第 -1 天在首次疫苗注射之前 (采血前)、第 56 天 (在第 4 次注射后第 14 天) 和第 110 天处死时 (第 6 次注射后第 40 天) 实施尾部放血。在研究结束时处死 9 月龄的小鼠, 收集脑。

#### [0202] 1.4 在 ACI-DS-01 免疫后定量鼠 A $\beta$ - 特异性抗体

[0203] 通过 ELISA 确定 A $\beta$  1-42- 特异性 IgG 应答。简而言之, 用 10  $\mu$ g/mL 小鼠 A $\beta$  1-42 (Bachem H5966, 批号: 1013710、1028321 或 1033165) 或小鼠 A $\beta$  1-40 (Bachem H5638, 批号: 1013645) 包被平板 4 $^{\circ}$ C 过夜。在用 PBS-0.05% Tween20 洗涤和用 1% BSA 封闭后, 向平板添加血浆的系列稀释液, 并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。使用抗体抗 A $\beta$  4G8 (Covance SIG-39220, 批号: 08EC00905, 1mg/mL 稀释 4000) 和用相同 ACI-DS-01 批次的 3 次注射免疫的 C57BL/6JolaHsd (Harlan) 的血清作为阳性对照。洗涤后, 用碱性磷酸酶 (AP) 缀合的抗鼠 IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch West Grove, PA, USA, 货号 115-055-164, 批次 87821, 经过 1/4000 稀释) 在 37 $^{\circ}$ C 孵育平板 2 小时。在末次洗涤后, 用 AP 底物 (pNPP) 孵育平板 2 个半小时, 使用 ELISA 读板器在 405nm 读数。结果表示为光密度 (O. D)。

#### [0204] 1.5 ACI-DS-01 免疫后的行为测试

[0205] 所有的小鼠都在约 8 月龄时暴露于相同系列的行为测试。在测试前 7 天和测试之间中 3 天, 每只小鼠操作 10min, 每天 2 次。在所示天数实施测试 (根据末次免疫), 并按下列顺序: 自发活动 (第 11 天开始)、延迟 24h 的新目标识别任务 (第 18 天开始)、T 型迷宫 (第 25 天开始) 和情景条件恐惧测试 (第 34 天开始)。所有的行为测试都在 7:00A. M. 至 7:00P. M. 之间的日光循环的过程中进行, 并在室温实施 (22 $^{\circ}$ C)。在测试当天, 在相同实验箱中的日光期下, 将小鼠保持在其居住笼中 2h 使其习惯。作为每个测试过程中焦虑的指标, 还测量粪球和尿滴的数量。为了使前一试验的嗅觉线索最小化, 在每只动物占据后, 用 10% 乙醇彻底清洁每个装置。以盲测的方式实施操作和所有的行为测试, 对操作小鼠的研究人员也不揭示基因型和治疗。

#### [0206] 1.5.1 ACI-DS-01 免疫后的自发活动测试

[0207] 使用 Plexiglas 活动箱 (模型 MED-0FA-MS; Med Associates) (27.9x27.9x20cm) 和活动监控软件 (Activity Monitor, 4.3.6 版) 监控自发活动。如 Belichenko 等人所述 (Belichenko 等人, 2009; Belichenko 等人, 2007), 在明亮的环境光条件下, 将小鼠放在箱中心, 在 3 次独立的试验中监控活动 10min。确定总距离、速度、总活动时间、总活动计数和垂直活动的平均值。

#### [0208] 1.5.2 ACI-DS-01 免疫后的新目标识别任务

[0209] 使用 Bevins 和 Besheer 操作规程 (Bevins 和 Besheer, 2006; O' Doherty 等人, 2005): 一次试验非匹配取样 (one-trial non-matching-to-sample) 学习任务, 研究在一种环境下对 2 种样品目标的识别记忆, 来研究延迟 24h 的学习和记忆。在测试前, 在昏暗的环境光条件下, 使小鼠连续 2 天在黑色 Plexiglas 箱内 (31x24x20cm) 习惯 10min。用摄像机记录 8 月龄小鼠在目标识别任务过程中的活动。首先, 如前所述, 将 2 个相同的目标放在箱内 (Bevins 和 Besheer, 2006; O' Doherty 等人, 2005)。将小鼠放在与样品目标相对的墙的中点处。在探索目标 10min 后, 将鼠放回群体中 24h。为了测试目标识别, 将 1 个熟悉的目标和 1 个新目标放在箱内, 将鼠再次放在箱内 3min 探索目标。在一次试验中测量目标识别。

使用摄像机记录的直接观察结果确定数据。结果是：1) 新的和熟悉的样品目标的平均总探索时间，和 2) 区分比例（与新目标的相互作用 / 与两种目标的总相互作用）。

#### [0210] 1.5.3ACI-DS-01 免疫后的 T 型迷宫测试

[0211] 使用 8 月龄的小鼠。使用修改的 Deacon 和 Rawlins 操作规程 (Deacon 和 Rawlins, 2006) 和 T 型迷宫的连续变换任务 (continuous alternation task), 评估海马功能。迷宫用 (Deacon 和 Rawlins, 2006) 所述的不透明丙烯酸玻璃 (Plexiglas) 制成, 在起始臂的开端具有额外的滑门。在测试过程中, 将鼠放在起始臂的开端, 背对关闭的滑门。在打开所有的门后, 鼠沿起始臂奔跑, 选择右侧或左侧目标臂。在鼠的所有 4 条腿都进入一个目标臂后, 通向另一目标臂的滑门关闭 5s, 然后再次开启所有的滑门, 允许鼠回到起始臂。监控 T 型迷宫活动, 直到鼠完成 10 次变换。连续 3 天重复该程序, 共计 30 次试验。自发的变换分数定义为左 - 右和右 - 左变换的数量, 表示为在环节期间可能的变换的总数的百分比。结果是变换分数和花费时间的平均值。

#### [0212] 1.5.4ACI-DS-01 免疫后的情景条件恐惧测试

[0213] 进行情景和线索条件恐惧, 评估依赖恐惧的学习和检索。使用 Coulbourn Instruments (Whitehall, PA, USA) 的室实施测试。在第 1 天, 将动物放在室内 (情景 A) 3 分钟, 用于记录基线, 再进行 5 次声音惊吓配对。在每次条件 / 非条件刺激配对中, 在声音 (70dB, 2kHz, 20sec) 后施放惊吓 (0.5mA, 2sec)。在第 2 天, 用新室 (情景 B; 新房间、新嗅觉环境、新底板质地、用蓝色塑料插入物作墙、额外的蓝色光源和视觉线索) 进行线索测试。在 3 分钟的声音前时间后, 在 3 分钟的测试期内向动物展示 3 次没有惊吓的声音。在实验的最后一天, 将鼠放入情景 A 中 5 分钟, 没有任何条件或非条件刺激 (Saxe 等人, 2006)。木僵定义为通过 FreezeFrame 软件 (Actimetrics, Evanston, IL) 测量的最少 0.75 秒完全不运动。报告每个时期的木僵百分比。

#### [0214] 1.6 在 ACI-DS-01 免疫后, 测量体重和脑重

[0215] 在所有的行为测试猴, 用戊巴比妥钠 (200mg/kg i. p.) (Abbott Laboratories) 深度麻醉小鼠, 称重, 并用 0.9% 氯化钠 (10ml) 穿心灌注 1min, 然后用 0.1M PBS, pH7.4 中的 4% 多聚甲醛 (100ml) 灌注 10min。在灌注后, 立即移出脑。记录脑的重量 (包括嗅球、皮质、海马、小脑、脑干和至 C1-C2 的颈部脊髓)。然后将脑放在固定剂中至进一步使用。

#### [0216] 1.7ACI-DS-01 免疫后炎性反应的免疫荧光

[0217] 在含 0.3% Triton X-100 的 0.1M PBS 中, 用 5% 脱脂奶预孵育脑切片。然后用 1:500 稀释的兔抗牛胶质细胞纤维酸性蛋白 (GFAP) 抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark), 或用 1:5000 稀释的多克隆大鼠抗 CD45 (PharMingen) 在 4°C 孵育切片过夜。进行下列孵育 (室温下每个 1h); 用生物素化的驴抗兔二抗 (1:200; Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA, USA) 和用荧光素异硫氰酸 (FITC) 缀合 - 的链霉亲和素 (1:500; Jackson ImmunoResearch Labs)。在上述孵育之间进行 PBS 漂洗 (3 次, 每次 20min)。将切片固定在显微镜载玻片上, 用 0.1M 磷酸缓冲液 pH7.4 中的 90% 甘油封片。为了控制抗体染色的特异性, 对选定的切片进行相同的操作规程, 但不包括一抗。在对照切片中没有观察到免疫荧光。检查切片, 并在连接 Nikon Eclipse E800 荧光显微镜的 Radiance2000 (Bio-Rad, Hertfordshire, UK) 共聚焦显微镜中扫描。激光是氩 / 氦混合气体, FITC 的激发波长是 488nm ( $\lambda$ )。使用 LaserSharp 软件 (Bio-Rad) 建立图像收集的最佳条件。GFAP- 免疫反应性 (IR) 或

CD45-IR的共聚焦成像的最佳条件如下:透镜是20x物镜(Nikon;Plan Apo20x/0.75);激光能量是10%或20%;增益是34.7;补偿是0.0;缩放因子是3;扫描速度是500行/s;每个光学切片扫描3次,然后应用Kalman过滤降低噪音;图像大小是512x512像素,像素大小是0.48x0.48um。

#### [0218] 1.8ACI-DS-01 免疫后的统计学分析

[0219] 数据显示为平均值 ± 标准差(SD)或平均值的标准差(SEM)。通过双侧不配对t检验进行统计学分析。 $p < 0.05$ 的或然性被认为是显著的。

#### [0220] 实施例2用ACI-DS-01免疫生产抗小鼠A $\beta$ 抗体

[0221] 根据SupraAntigen™方法(WO2005/081872, WO2007/068411),用包埋在脂质体中的四棕榈酰化的小鼠A $\beta$ 1-15肽(Palm1-15)、H-Lys(Pal)-Lys(Pal)-Asp-Ala-Glu-Phe-Gly-His-Asp-Ser-Gly-Phe-Glu-Val-Arg-His-Gln-Lys(Pal)-Lys(Pal)-OH和单磷脂酰脂质A(MPLA),制备脂质体疫苗ACI-DS-01(图1)。向Ts65Dn雄性小鼠和年龄匹配的对照小鼠(2N)中,每2周皮下施用6次剂量的ACI-DS-01。第4次剂量后收集的血浆的分析显示在Ts65Dn和2N组的免疫的小鼠中的强的抗小鼠A $\beta$ 40或A $\beta$ 42的IgG滴度(图2A和2B)。即使在末次免疫后第40天,疫苗诱导的抗体仍然是升高的。在用不含抗原的空白脂质体免疫的小鼠中没有检测到任何滴度(图2A和2B)。因此,ACI-DS-01能够打破DS鼠模型中的A $\beta$ 自身耐受。

[0222] 在第4次免疫免疫后,在用ACI-DS-01免疫的小鼠的血浆中分析IgG亚类。使用A $\beta$ 40的ELISA显示,Ts65Dn组具有高于2N组的IgG2a滴度(图2D),而两组的IgG1和IgG2b滴度之间没有任何差异(图2C和2E)(单边ANOVA, Tukey posthoc;  $P = 0.05$ )。Ts65Dn组的IgG3滴度较低(图2F)(单边ANOVA, Tukey posthoc;  $P < 0.001$ )。Ts65Dn小鼠的IgM滴度略微,但显著低于2N小鼠(图2G)(单边One-way ANOVA, Tukey posthoc;  $P = 0.05$ )。用A $\beta$ 42实施的ELISA中也观察到相似的结果(数据未显示)。

[0223] Ts65Dn小鼠中上述一些滴度的较低水平的不太可能是由于Ts65Dn的免疫应答能力造成的,因为所有小鼠中的抗MPLA IgG水平都是可比较的(图2H)。

#### [0224] 实施例3用ACI-DS-01免疫恢复Ts65Dn小鼠的记忆缺陷

[0225] Ts65Dn小鼠表现出许多DS认知异常的特征,如记忆损伤和异常行为。为了探讨ACI-DS-01疫苗的效果,在末次免疫2周后,进行一组行为学测试。小鼠按下列顺序实施测试:开放场地、目标识别、T型迷宫和条件恐惧。

[0226] 开放场地测试分析显示,Ts65Dn小鼠具有比2N小鼠显著更高的自发活动(数据未显示)。在用ACI-DS-01免疫后,Ts65Dn小鼠继续比ACI-DS-01治疗的2N小鼠显著更活跃(图3A,不配对的单侧t测试;  $p = 0.0004$ )。在T型迷宫中,不论是在治疗前或治疗后,2N和Ts65Dn小鼠在变换比例或变换持续期中都没有表现出显著差异(数据未显示)。

[0227] 在目标识别(ORT)中测量空间记忆能力。Ts65Dn小鼠产生了弱的区分比例,因而识别新目标低下。ACI-DS-01治疗的Ts65Dn小鼠表现出更高的区分比例,表示治疗导致记忆显著改善(图3B,不配对的单侧t测试;  $p = 0.03$ 。单边ANOVA,基因型,  $P = 0.12$ ,疫苗,  $P = 0.002$ ,相互作用  $P = 0.54$ )。有趣的是,在2N组中也观察到相同的结果。

[0228] 条件恐惧测试由训练、线索和情景环节组成。在训练或线索环节中,所有的组都观察到相同水平的木僵(图3C)。在情景环节中,用空白疫苗(仅有脂质体,无抗原)治疗

的 Ts65Dn 小鼠表现出比对照 2N 小鼠更低的木僵百分比。相反,在免疫后, Ts65Dn 小鼠展示出增强的木僵,并达到与 2N 小鼠可比较的水平(不配对的单侧 t 测试;  $P = 0.04$ 。单边 ANOVA, 基因型,  $P = 0.01$ , 疫苗,  $P = 0.16$ , 相互作用  $P = 0.33$ )。这提示免疫是有效率的,并增强了 Ts65Dn 小鼠的记忆力。

[0229] 总而言之,这些结果表明 ACI-DS-01 治疗可以恢复 Ts65Dn 小鼠的记忆缺陷。

[0230] **实施例 4** ACI-DS-01 疫苗改善认知缺陷的机制

[0231] 为了解决 ACI-DS-01 诱导的抗体对 A $\beta$  水平的效果这一问题,使用海马、皮质和小脑的蛋白质提取物实施 ELISA。在用 ACI-DS-01 治疗后,上述区域无一表现出 A $\beta$  水平的显著差异;无论是 A $\beta$  40 还是 A $\beta$  42(图 4A)。值得注意的是皮质和小脑中的 A $\beta$  -40/42 比例与较高的识别指数(RI)相关(图 4B 和 4C。皮质;皮尔逊 r 相关性 =  $-0.3248$ ,  $P = 0.003$ 。小脑;皮尔逊 r 相关性 =  $-0.4127$ ,  $P = 0.009$ )。上述结果提示 A $\beta$  -40/42 可能对认知缺陷负责。其他分析显示,血浆中的 A $\beta$  42 是不可检测的。相反,血浆中增加的 A $\beta$  40 水平似乎与 ACI-DS-01 治疗的 Ts65Dn 小鼠组中测量的较高的抗 A $\beta$  IgG 值相关(图 4D;皮尔逊 r 相关性 =  $0.51$ ,  $P = 0.09$ )。此外,RI 与抗 A $\beta$  IgG 滴度相关(图 4E;皮尔逊 r 相关性 =  $0.3154$ ,  $P = 0.007$ )。

[0232] 上述结果提示,ACI-DS-01-诱导的抗体可以将 A $\beta$  从脑中清除到血浆中,然后这可导致记忆改善。

[0233] **实施例 5** 唐氏综合症的小鼠模型中的神经元形态学

[0234] 分析基底前脑(BFCN)中的胆碱能神经元的大小、数量和光密度。用 ChAT 抗体(Millipore,货号 #AB144P,批号 #2010060)对 2 个来自 BFCN 水平的切片进行染色。在共聚焦显微镜上扫描内侧隔核(MS)面积用于定量评估。计算下列参数:1)MS 中的 ChAT+ 细胞密度;2)ChAT+ 单个神经元的面积,和 3)单个神经元中的 ChAT 的平均光密度。将内侧隔核的胆碱能神经元成像,使用 ImageJ 软件计数神经元的数量、显示染色的光密度和描绘细胞体面积。

[0235] **结果**:在用空白疫苗治疗的 2N 和 Ts65Dn 小鼠中,内侧隔核中的 ChAT+ 细胞数量和光密度是相似的(图 9A 和 9B)。

[0236] 在 ACI-DS-01 治疗的 2N 和 Ts65Dn 小鼠中,内侧隔核中的 ChAT+ 细胞数量是相似的(图 9A)(2N-空白 =  $27.5 \pm 7.2/100$  微米切片;Ts65Dn-空白 =  $23.9 \pm 7.0$ ; 2N-ACI-DS-01 =  $36.6 \pm 4.6$ ;Ts65Dn-ACI-DS-01 =  $20.9 \pm 6.6$ )。在 ACI-DS-01 治疗的 2N 和 Ts65Dn 小鼠中,内侧隔核中的单个 ChAT+ 细胞中染色的光密度也是相似的(图 9B)(2N-空白 =  $79.9 \pm 3.5$  任意单位;Ts65Dn-空白 =  $74.7 \pm 2.6$ ;2N-ACI-DS-01 =  $71.9 \pm 2.6$ ; Ts65Dn-ACI-DS-01 =  $75.8 \pm 4.5$ )。Ts65Dn 小鼠的内侧隔核中的 ChAT+ 细胞体面积小于 2N 小鼠(图 9C)。Ts65Dn-ACI-DS-01 治疗的小鼠的内侧隔核中的 ChAT+ 细胞体面积与空白治疗的 Ts65Dn-veh 相比显著增加(Ts65Dn-空白 =  $179 \pm 6$  微米<sup>2</sup>;Ts65Dn-ACI-DS-01 =  $201 \pm 8$ ,  $P = 0.031$ )。2N 和 Ts65Dn-ACI-DS-01 治疗的小鼠具有相似的细胞体面积(2N-ACI-DS-01 =  $208 \pm 8$  微米<sup>2</sup>;Ts65Dn-ACI-DS-01 =  $201 \pm 8$ ,  $P = 0.55$ ) (图 9C)。这指出在 ACI-DS-01 治疗后,恢复了内侧隔核中的 ChAT+ 细胞体面积。同样的,这些结果是 ACI-DS-01 疫苗安全性的提示,因为在用疫苗免疫后,ChAT+ 细胞的数量没有改变。这些形态学的研究显示了 ACI-DS-01 免疫后较少的神经元萎缩,提示该疫苗可用于预防神经退化。

[0237] 实施例6 脂质体疫苗 ACI-DS-01 的安全性

[0238] 为了确定使用 ACI-DS-01 免疫是否可能导致安全性问题,记录小鼠的体重、综合观察结果和炎症标志物。在治疗前,Ts65Dn 小鼠具有显著低于 2N 小鼠的体重 (ANOVA, Tukey posthoc,  $P = 0.001$ )。免疫没有显著改变体重 (图 5A)。所有四组小鼠的脑重量相似 (图 5A)。免疫组化的结果显示,胶质细胞纤维酸性蛋白 (GFAP) 阳性的星状胶质细胞或 CD45- 阳性的小胶质细胞的数量没有差异。在皮质和海马中获得的结果都是相似的 (图 5)。上述结果表明,ACI-DS-01 接种不诱导炎性应答。

[0239] 为了验证 ACI-DS-01 诱导的抗体的特异性,进行交叉反应研究。用 ACI-DS-01- 治疗的 2N 小鼠的抗血清 dui2N 和 Ts65Dn 脑切片进行染色。

[0240] 总而言之,上述发现提示 ACI-DS-01 是安全的疫苗。

[0241] 实施例7:使用 ACI-DS-02 和 ACI-DS-03 疫苗的实验的一般方法

[0242] 7.1 用 ACI-DS-02 和 ACI-DS-03 疫苗免疫

[0243] 雄性 Ts65Dn 小鼠 (Jax laboratory B6EiC3Sn. BLiA-Ts (1716) 65Dn/DnJ), 研究开始时为  $4 \pm 0.3$  月龄,接受  $200 \mu\text{l}$  的 ACI-DS-02 ( $18.6 \mu\text{g}$ /剂二棕榈酰化的 A $\beta$  肽 22-39) ( $n = 6$  Ts65Dn 小鼠) 或 PBS ( $n = 4$  Ts65Dn 小鼠) 的皮下 (s. c.) 免疫。在第 1、14、28 和 42 天进行总计 4 次注射。在每个免疫 1 周后 (第 7、21、35 和 42 天),实施尾部放血。

[0244] 用相同的程序进行使用疫苗 ACI-DS-03 的免疫 ( $38.6 \mu\text{g}$ /剂 Pa114-29、四棕榈酰化的 A $\beta$  肽 14-29) ( $n = 7$  Ts65Dn 小鼠) 或 PBS ( $n = 4$  Ts65Dn 小鼠)。

[0245] 同窝对照小鼠 ( $n = 7$  只 2N- 小鼠) 接受 PBS 的类似注射。

[0246] 7.2 定量小鼠 A $\beta$ - 特异性抗体

[0247] 通过 ELISA 确定 A $\beta$  1-42- 特异性 IgG 应答。简而言之,用  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  人 A $\beta$  1-42 (Bachem H1368, 批号:1000255) 包被平板  $4^\circ\text{C}$  过夜。在用 PBS-0.05% Tween20 洗涤和用 1% BSA 封闭后,向平板添加血浆的系列稀释液,并在  $37^\circ\text{C}$  孵育 2 小时。使用抗体抗 A $\beta$  6E10 (6E10 来自 Covance SIG-39320, 批号:09GC01254 管 a, 经过  $1\text{mg}/\text{ml}$  稀释 1000x) 作为阳性对照。洗涤后,用碱性磷酸酶 (AP) 缀合的抗小鼠 IgG 抗体 (Jackson Immunoresearch West Grove, PA, USA, 货号 115-055-164, 批次 87821, 管 1/4000 稀释)  $37^\circ\text{C}$  孵育平板 2 小时。在末次洗涤后,用 AP 底物 (pNPP) 孵育平板 2 个半小时,使用 ELISA 读板器在 405nm 读数。结果表示为光密度 (O. D)。

[0248] 7.3 行为测试

[0249] 所有的小鼠都在约  $6 \pm 0.3$  月龄时开始暴露于相同系列的行为测试。所有的行为测试都在 7:00A. M. 至 7:00P. M. 之间的日光循环的过程中进行,并在室温实施 ( $22^\circ\text{C}$ )。

[0250] 7.3.1 空间目标识别任务

[0251] 在测试前,在昏暗的环境光条件下,使小鼠习惯没有任何目标的灰色聚丙烯室 (直径 40cm, 高度 32.4cm) 10min。在第二天和学习环节中,使 2 个相同的目标 (乐高方块或黑色玻璃瓶) 出现在迷宫的一侧 (10min)。在学习后 3 小时进行记忆力测试,将一个相同的目标移至迷宫的对侧,存在 10min。用摄像机追踪软件 Ethovision XT8.0 记录所有的环节。测量的参数包括新的和熟悉的样品目标的平均总探索时间,和区分比例 (与新目标的相互作用 / 与两种目标的总相互作用)。

[0252] 7.3.2 水迷宫记忆任务

[0253] 进行水迷宫以分析长程记忆。在习惯测试中,小鼠在第一天进入水迷宫(直径:165cm,高度:64cm),有1个可见的线索平台(直径:11cm,高度:37cm)。该测试基于5次试验,每次120秒,试验间间隔30分钟。最后的第6次试验在没有可见的线索平台的条件下进行。第二天,小鼠用隐藏的平台进行4天训练。小鼠每天实施6次试验,每次120秒,试验间间隔30分钟。在试验开始时,将小鼠放在面向槽边缘的水中的4个起点之一上(东北、东南、西南和西北)。每次试验都改变起点,但逃脱平台在整个实验过程中是固定的(西象限)。如果小鼠在120秒内发现了平台,则允许它在平台上停留15秒。如果没有在120秒内发现平台,则终止试验,将小鼠温和引导至平台,使其在那停留15秒。测量的参数包括在迷宫的不同部分花费的逃脱延迟时间(s),进入迷宫的每个象限的次数,行进到迷宫的每个象限中的距离(cm),距目的区域的距离(cm),每个象限的时间%,在探索试验期间在扩展的目标平台圆环中的时间%,在探索试验期间穿过扩展的目标平台圆环的次数和速度(cm/s)。

### [0254] 7.3.3 情景条件恐惧测试

[0255] 进行情景和线索条件恐惧用于评估依赖恐惧的学习和检索。使用 Med Associates Instruments 的室实施测试。在第1天,将小鼠放在室内(情景A)2分钟,用于记录基线,随后进行4次声音惊吓配对(条件刺激,CS)。在每次条件/非条件刺激配对中,惊吓30秒的声音刺激(5000Hz, 80dB)与2秒的足部惊吓(0.7mA)同时结束。在第2天,将小鼠放在没有任何条件或非条件刺激的情景A中5分钟。在实验的最后一天,用新室(情景B;新房间、新嗅觉环境、新地板质地、用蓝色塑料插入物作墙、额外的蓝色光源和视觉线索)进行线索测试。在2分钟的声音前时间后,在8分钟的测试期内向动物展示3次没有惊吓的声音。木僵定义为最少0.75秒完全不运动。报告每个时期的木僵百分比。

### [0256] 7.4 用 ACI-DS-02 和 ACI-DS-03 疫苗诱导的抗 A $\beta$ 抗体对人 DS 脑样品中的淀粉样蛋白斑块的免疫染色

[0257] 用血清中的疫苗来源的抗 A $\beta$  抗体对 DS 人群的脑切片染色,所述血清获得自用 ACI-DS-02 疫苗免疫的小鼠。免疫染色的程序中使用 1/100 稀释的来自用 ACI-DS-02 疫苗免疫的 5 只 c57BL/6 小鼠的血清混合池。简而言之,将 59 岁 DS 个体的 10  $\mu$ m 冷冻切片在 4% 多聚甲醛 (Sigma-Aldrich, 252549) 中孵育 20 分钟。在 70% 甲酸 (Merck, 1.00264.1000) 和 10% Triton X-100 (Sigma, 234729) 中各孵育 15 分钟后,在 PBST (PBS 加 0.5% Triton X-100) 中的 10% 普通山羊血清 (NGS, Invitrogen, 6210072) 中封闭切片 2 小时。在含 10% NGS 的 PBST 中,用一抗(免疫的小鼠的血清)孵育过夜。第 2 天,在 PBSA 中漂洗后,用 Alexa Fluor 488 缀合的 AffiniPur 山羊抗小鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-545-146) 孵育切片。将切片固定在 ProLong Gold (Invitrogen, P36931) 上。使用一抗抗 A $\beta$  6E10 (Covance, SIG-39320, 针对 A $\beta$  的 N-末端的抗 A $\beta$ , 使用 1:10000 稀释液) 作为阳性对照。使用以 PBS 免疫的 c57BL/6 小鼠的血清作为阴性对照。使用以 ACI-24 免疫的 c57BL/6 小鼠的血清作为对照。ACI-24 疫苗对应于 ACI-DS-01 疫苗,差异在于 ACI-24 中使用的抗原是人 A $\beta$  1-15 序列,而 ACI-DS-01 疫苗含有小鼠 A $\beta$  1-15 序列作为抗原(这两个抗原中的 3 个氨基酸差异参见图 1)。

### [0258] 7.5 统计学分析

[0259] 数据显示为平均值  $\pm$  标准差 (SD) 或平均值的标准差 (SEM)。通过双侧不配对 t

检验或 ANOVA 进行统计学分析,使用 prism pad graph 第 5 版。 $p < 0.05$  的或然性被认为是显著的。

[0260] 实施例 8 用 ACI-DS-02 免疫生产抗人 A $\beta$  抗体

[0261] 向 Ts65Dn 雄性小鼠和年龄匹配的对照小鼠 2N 中,每 2 周皮下施用 4 次剂量的 ACI-DS-02。对每次剂量后 7 天收集的血浆的分析显示了在 Ts65Dn 和 2N 组的免疫的小鼠中的针对人 A $\beta$  42 的 IgG 滴度(数据未显示)。在第 21 和 35 天时,用 ACI-DS-02 免疫的 Ts65Dn 小鼠的 IgG 滴度显著不同于用 PBS 免疫的小鼠(单边 ANOVA, Tukey posthoc, 分别为  $P = 0.01$  和  $0.05$ )。因此,ACI-DS-02 能够破坏 DS 小鼠模型中的 A $\beta$  自身耐受。

[0262] 分析用 ACI-DS-02 疫苗免疫的小鼠血浆中的 IgM 滴度。用 A $\beta$  42 完成的 ELISA 显示,在第 7、35 和 49 天时,免疫的 Ts65Dn 组具有高于用 PBS 免疫的组的 IgM 滴度(单边 ANOVA, Tukey posthoc, 分别为  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ , 数据未显示)。

[0263] 实施例 8 ACI-DS-02 来源的抗人 A $\beta$  抗体识别 DS 淀粉样蛋白斑块

[0264] 免疫染色实验显示,ACI-DS-02 来源的抗体结合 DS 人群的脑样品中的淀粉样蛋白斑块(图 6)。染色与用 6E10 和用 ACI-24 来源的抗体获得的染色相似,所述 6E10 是一种可商购的抗淀粉样蛋白  $\beta$  抗体。ACI-24 疫苗对应于 ACI-DS-01 疫苗,差异在于 ACI-24 中使用的抗原是人 A $\beta$  1-15 序列,而 ACI-DS-01 疫苗含有小鼠 A $\beta$  1-15 序列作为抗原(这两个抗原中的 3 个氨基酸差异参见图 1)。当用以 PBS 免疫的小鼠的血清孵育切片时,没有观察到染色。该结果提示,用 ACI-DS-02 疫苗免疫诱导识别 DS 人群的脑中的淀粉样蛋白斑块的抗体。

[0265] 实施例 9 ACI-DS-02 增强条件恐惧测试中的联想学习

[0266] 在条件测试中,用 ACI-DS-02 疫苗免疫的 Ts65Dn 小鼠在接受每次条件刺激后,表现出更高木僵水平的倾向(图 7A)。增强的木僵与 PBS 免疫的 Ts65Dn 组仅在第 3 次条件刺激(CS3)时显著不同(双边 ANOVA, 时间,  $P < 0.0001$ , 疫苗的倾向( $P = 0.09$ ), Bonferroni 后测试显示了 CS3 的  $P = 0.05$ )。

[0267] 已知学习环节受突触可塑性依赖机制的介导(Johansen2011)。然而,已知之前获得的恐惧记忆(情景、线索和消退环节)受不同的神经元机制介导。该结果提示,ACI-DS-02 免疫增强了在学习发生过程中的条件恐惧的获得/训练期。

[0268] 实施例 10 用 ACI-DS-03 免疫生产抗人 A $\beta$  抗体

[0269] 向 Ts65Dn 雄性小鼠和年龄匹配的对照小鼠 2N 中,每 2 周皮下施用 4 次剂量的 ACI-DS-03。对在每次剂量后 7 天收集的血浆的分析显示了在 Ts65Dn 和 2N 组的免疫的小鼠中的针对人 A $\beta$  42 的 IgG 滴度(数据未显示)。在第 21 天时,用 ACI-DS-03 免疫的 Ts65Dn 小鼠的 IgG 滴度显著不同于用 PBS 免疫的小鼠(单边 ANOVA, Tukey posthoc, 分别为  $P = 0.05$ )。因此,ACI-DS-03 能够破坏 DS 小鼠模型中的 A $\beta$  自身耐受。

[0270] 分析用 ACI-DS-03 疫苗免疫的小鼠血浆中的 IgM 滴度。使用 A $\beta$  42 完成的 ELISA 显示,在第 7 和 49 天时,免疫的 Ts65Dn 组具有高于用 PBS 免疫的组的 IgM 滴度(单边 ANOVA, Tukey posthoc, 分别为  $P < 0.001$  和  $P < 0.01$ , 数据未显示)。

[0271] 实施例 11 ACI-DS-03 来源的抗人 A $\beta$  抗体识别 DS 淀粉样蛋白斑块

[0272] 免疫染色实验显示,ACI-DS-03 来源的抗体结合 DS 人群的脑样品中的淀粉样蛋白斑块(图 8)。染色与用 6E10 和用 ACI-24 来源的抗体获得的染色相似,所述 6E10 是一种可

商购的抗淀粉样蛋白  $\beta$  抗体。ACI-24 疫苗对应于 ACI-DS-01 疫苗, 差异在于 ACI-24 中使用的抗原是人 A $\beta$  1-15 序列, 而 ACI-DS-01 疫苗含有小鼠 A $\beta$  1-15 序列作为抗原 (这两个抗原中的 3 个氨基酸差异参见图 1)。当用以 PBS 免疫的小鼠的血清孵育切片时, 没有观察到染色。该结果提示, 用 ACI-DS-03 疫苗免疫诱导识别 DS 人群的脑中的淀粉样蛋白斑块的抗体。

#### [0273] 实施例 12 衰减全反射远红外光谱

[0274] 分析作为在 ZnSe 晶体上干燥的 15  $\mu$  l D<sub>2</sub>O 水合薄膜的脂质体样品。用装备了液氮冷却的碲化汞镉检测器并偶联 BioATR-II 装置的 BRUKER TENSOR27FTIR 光谱仪获得光谱。每个光谱收集 2000 次扫描, 使用清洁的 ATR 晶体作为背景, 解析度为 2 $\text{cm}^{-1}$ , 取平均值并 FT 处理。频率折叠的上下限为 4000 $\text{cm}^{-1}$  和 900 $\text{cm}^{-1}$ 。用干燥空气连续清洁用品室, 在 25 $^{\circ}\text{C}$  实施所有的测量。然后, 在酰胺 I 区切割获得的光谱, 校正基线并标记。应用收缩技术 (第二衍生物和傅立叶自去卷积 (FSD)) 从而揭示宽的酰胺 I 带的重叠组分。从主要的检测带中完成主要次级构象的定性任务, 在 D<sub>2</sub>O 中使用下列频率范围: b- 片层 1613-1637 $\text{cm}^{-1}$ 、随机卷曲 1637-1646 $\text{cm}^{-1}$ 、 $\alpha$ - 螺旋 / 环 1646-1662 $\text{cm}^{-1}$ 、b- 转角 1662-1682 $\text{cm}^{-1}$ 、反平行 b- 片层 1682-1698 $\text{cm}^{-1}$ 。通过用 OPUS 软件中的相应应用进行曲线拟合, 来定量分析, 使用在次级衍生物和 FSD 光谱中鉴别的条带作为单个组分的初始值。假设组分峰值具有混合的 Gaussian-Lorentzian 形状。通过固定频率, 并允许改变峰宽度、强度和形状来进行迭代过程, 并且然后对于第二次迭代过程, 还允许改变频率。通过计算每个次级结构带的总酰胺 I 区的面积%, 进行次级结构估计, 假设不同组分为等摩尔吸收。

#### [0275] 参考文献列表

[0276] 1. Antonarakis, S. E., Lyle, R., Dermitzakis, E. T., Raymond, A., Deutsch, S., 2004. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat. Rev. Genet.* 5, 725-738.

[0277] 2. Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., Jones, E., 2011. Alzheimer's disease. *Lancet.* 377, 1019-1031.

[0278] 3. Belichenko, N. P., Belichenko, P. V., Kleschevnikov, A. M., Salehi, A., Reeves, R. H., Mobley, W. C., 2009. The "Down syndrome critical region" is sufficient in the mouse model to confer behavioral, neurophysiological, and synaptic phenotypes characteristic of Down syndrome. *J Neurosci.* 29, 5938-5948.

[0279] 4. Belichenko, P. V., Kleschevnikov, A. M., Salehi, A., Epstein, C. J., Mobley, W. C., 2007. Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype-phenotype relationships. *J Comp. Neurol.* 504, 329-345.

[0280] 5. Bevins, R. A., Besheer, J., 2006. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat. Protoc.* 1, 1306-1311.

[0281] 6. Davisson, M. T., Schmidt, C., Reeves, R. H., Irving, N. G., Akeson, E. C., Harris, B. S., Bronson, R. T., 1993. Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* 384, 117-133.

[0282] 7. Deacon, R. M., Rawlins, J. N., 2006. T-maze alternation in the rodent. *Nat.*

Protoc. 1, 7-12.

[0283] 8. Gilman, S. , Koller, M. , Black, R. S. , Jenkins, L. , Griffith, S. G. , Fox, N. C. , Eisner, L. , Kirby, L. , Boada, R. M. , Forette, F. , Orgogozo, J. M. , 2005. Clinical effects of A $\beta$  immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*.

[0284] 9. Hunter, C. L. , Bimonte-Nelson, H. A. , Nelson, M. , Eckman, C. B. , Granholm, A. C. , 2004. Behavioral and neurobiological markers of Alzheimer's disease in Ts65Dn mice: effects of estrogen. *Neurobiol. Aging*. 25, 873-884.

[0285] 10. Johansen I. P. , Cain C. K. , Ostroff L. E and LeDoux J. E. , 2011. Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory. *Cell*147

[0286] 11. Lee, M. , Bard, F. , Johnson-Wood, K. , Lee, C. , Hu, K. , Griffith, S. G. , Black, R. S. , Schenk, D. , Seubert, P. , 2005. A $\beta$ 42 immunization in Alzheimer's disease generates A $\beta$  N-terminal antibodies. *Ann. Neurol.* 58, 430-435.

[0287] 12. Lemere, C. A. , Blusztajn, J. K. , Yamaguchi, H. , Wisniewski, T. , Saido, T. C. , Selkoe, D. J. , 1996. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid  $\beta$ -peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis.* 3, 16-32.

[0288] 13. Liu, F. , Grundke-Iqbal, I. , Iqbal, K. , Oda, Y. , Tomizawa, K. , Gong, C. X. , 2005. Truncation and activation of calcineurin a by calpain I in Alzheimer disease brain. *J. Biol. Chem.* 280, 37755-37762.

[0289] 14. Liu, F. , Liang, Z. , Wegiel, J. , Hwang, Y. W. , Iqbal, K. , Grundke-Iqbal, I. , Ramakrishna, N. , Gong, C. X. , 2008. Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *FASEB J.* 22, 3224-3233.

[0290] 15. Moncaster, J. A. , Pineda, R. , Moir, R. D. , Lu, S. , Burton, M. A. , Ghosh, J. G. , Ericsson, M. , Soscia, S. J. , Mocofanescu, A. , Folkerth, R. D. , Robb, R. M. , Kuzak, J. R. , Clark, J. I. , Tanzi, R. E. , Hunter, D. G. , Goldstein, L. E. , 2010. Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  links lens and brain pathology in Down syndrome. *PLoS One*5, e10659.

[0291] 16. Monsonogo, A. , Maron, R. , Zota, V. , Selkoe, D. J. , Weiner, H. L. , 2001. Immune hyporesponsiveness to amyloid  $\beta$ -peptide in amyloid precursor protein transgenic mice: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*98, 10273-10278.

[0292] 17. Netzer, W. J. , Powell, C. , Nong, Y. , Blundell, J. , Wong, L. , Duff, K. , Flajolet, M. , Greengard, P. , 2010. Lowering  $\beta$ -amyloid levels rescues learning and memory in a Down syndrome mouse model. *PLoS One*5, e10943.

[0293] 18. Nicolau, C. , Greferath, R. , Balaban, T. S. , Lazarte, J. E. , Hopkins, R. J. , 2002. A liposome-based therapeutic vaccine against  $\beta$ -amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*99, 2332-2337.

[0294] 19. O' Doherty, A. , Ruf, S. , Mulligan, C. , Hildreth, V. , Errington, M. L. , Cooke, S. , Sesay, A. , Modino, S. , Vanes, L. , Hernandez, D. , Linehan, J. M. , Sharpe, P.

T. , Brandner, S. , Bliss, T. V. , Henderson, D. J. , Nizetic, D. , Tybulewicz, V. L. , Fisher, E. M. , 2005. An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science*. 309, 2033–2037.

[0295] 20. Prasher, V. P. , 1993. Down's syndrome, longevity, and Alzheimer's disease. *Br. J Psychiatry*. 162, 711.

[0296] 21. Prasher, V. P. , 2004. Review of donepezil, rivastigmine, galantamine and memantine for the treatment of dementia in Alzheimer's disease in adults with Down syndrome: implications for the intellectual disability population. *Int. J Geriatr. Psychiatry*. 19, 509–515.

[0297] 22. Raffi, M. S. , 2010. The pulse of drug development for Alzheimer's disease. *Rev. Recent. Clin. Trials*. 5, 57–62.

[0298] 23. Saxe, M. D. , Battaglia, F. , Wang, J. W. , Malleret, G. , David, D. J. , Monckton, J. E. , Garcia, A. D. , Sofroniew, M. V. , Kandel, E. R. , Santarelli, L. , Hen, R. , Drew, M. R. , 2006. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17501–17506.

[0299] 24. Stanton L. R, Coetzee R. H. Down's syndrome and dementia. 10, 50–58. 2004. *Advances in Psychiatric Treatment*.

[0300] Ref Type:Generic

[0301] 25. Stoltzner, S. E. , Grenfell, T. J. , Mori, C. , Wisniewski, K. E. , Wisniewski, T. M. , Selkoe, D. J. , Lemere, C. A. , 2000. Temporal accrual of complement proteins in amyloid plaques in Down's syndrome with Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 156, 489–499.

[0302] 26. Tapiola, T. , Soininen, H. , Pirttila, T. , 2001. CSF tau and Abeta42 levels in patients with Down's syndrome. *Neurology*. 56, 979–980.

[0303] 27. Weiner, H. L. , Frenkel, D. , 2006. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 404–416.

[0304] 28. Fernandez F, Morishita W, Zuniga E, Nguyen J, Blank M, Malenka RC and Garner CC (2007)

[0305] 29. Hanney M, Prasher V, Williams N, Jones EL, Aarsland D, Corbett A, Lawrence D, Yu LM, Tyrer S, Francis PT, Johnson T, Bullock R and Ballard C (2012) Memantine for Dementia in Adults Older Than 40 Years With Down's Syndrome (MEADOWS) : a Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Lancet* 379: 528–536.

[0306] 30. Salehi A, Delcroix J-D, Belichenko P. V. , Zhan K ; Wu C. , Valletta J C, Takimoto-Kimura R, Kleschevnikov A M, Sambamurti K, Chung PP, Xia W, Villar A, Campbell AW, Kulnane LS, Nixon RA, Lamb BT, Epstein CJ, Stokin GB, Goldstein L. S. B, Mobley W. C. (2006) Increased App Expression in a Mouse Model of Down's Syndrome Disrupts NGF Transport and Causes Cholinergic Neuron Degeneration, *Neuron*, 51, 29–42.

[0307] 31. Salehi A, Faizi M, Colas D, Valletta J, Laguna J, Takimoto-Kimura R., Kleschevnikov A., Wagner S. L., Aisen P., Shamloo M., Mobley W. C (2009) Restoration of Norepinephrine-Modulated Contextual Memory in a Mouse Model of Down Syndrome, *Sci Transl Med* 1, 7ra17.

[0001]

## 序列表

<110> AC免疫有限公司  
 A·普法伊费尔  
 A·穆斯  
 R·马达尼  
 P·B·瓦斯里威切  
 W·C·莫布里

<120> 疫苗疗法

<130> T2817 PCT BS

<150> PCT/US2011/052992

<151> 2011-09-23

<160> 7

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln  
 1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

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

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His Gln Lys  
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met  
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 5

Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met  
 1 5 10 15

[0002]

<210> 6  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 6

His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly  
1 5 10 15

<210> 7  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 7

His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly  
1 5 10 15



图 1

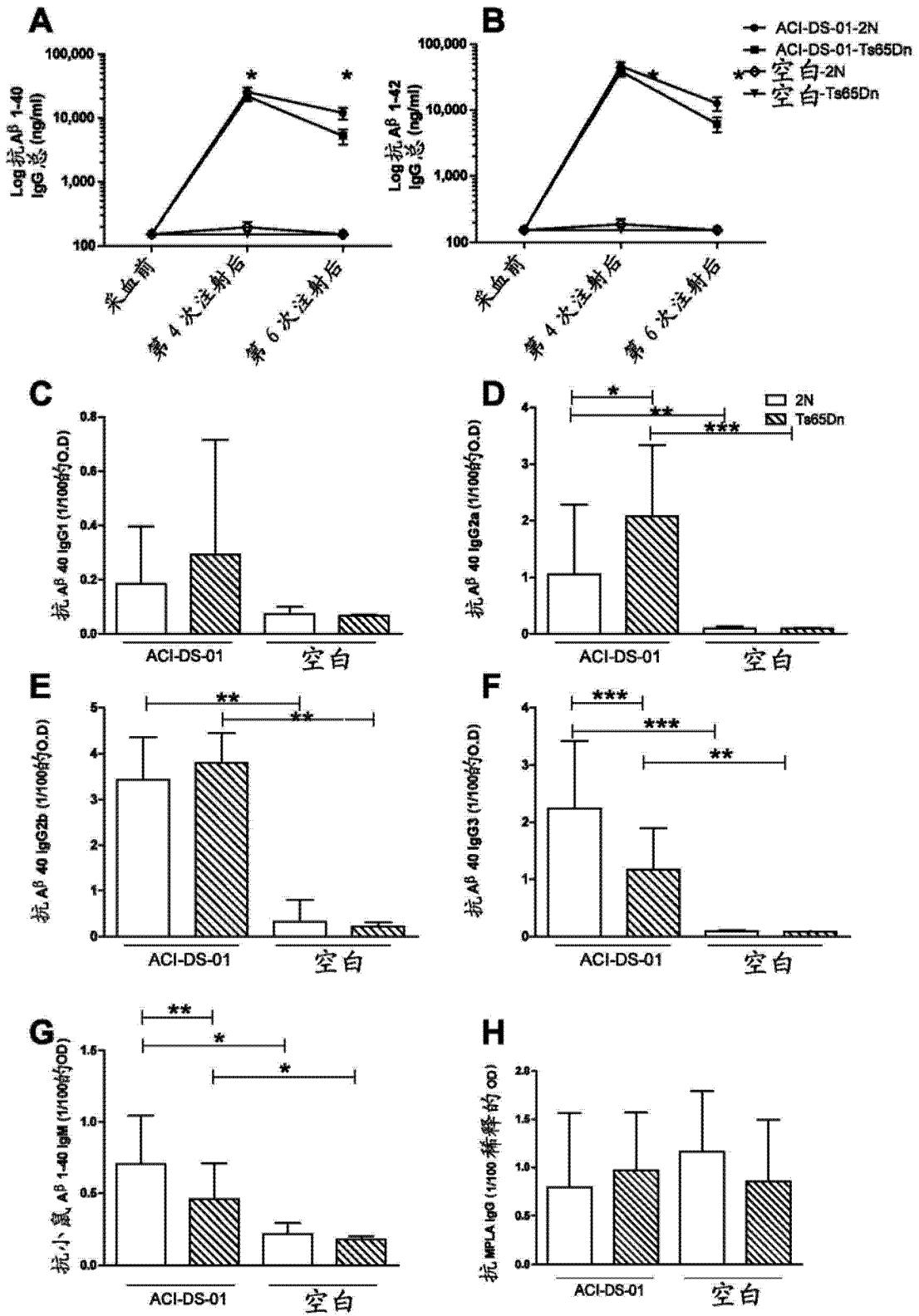


图 2

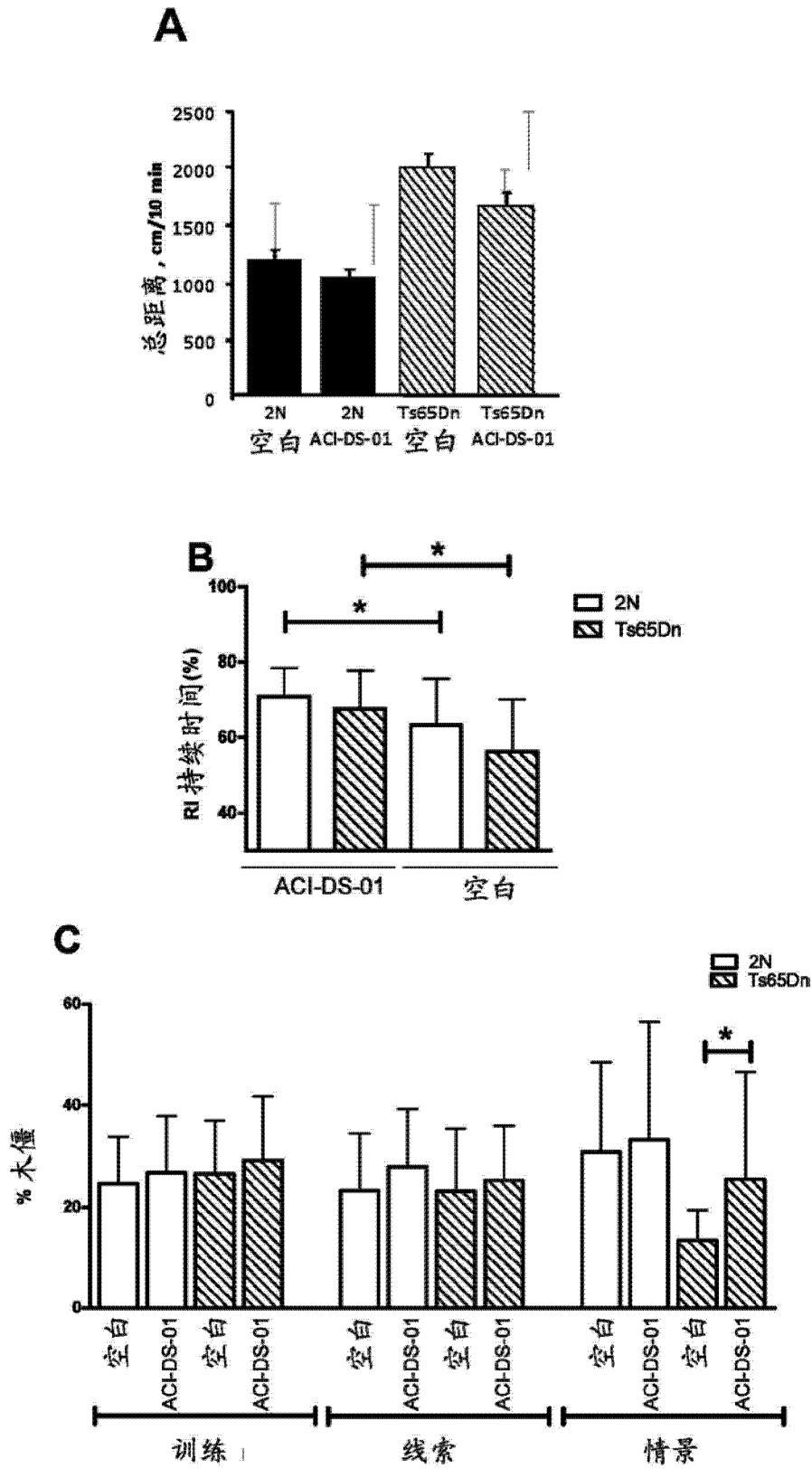


图 3

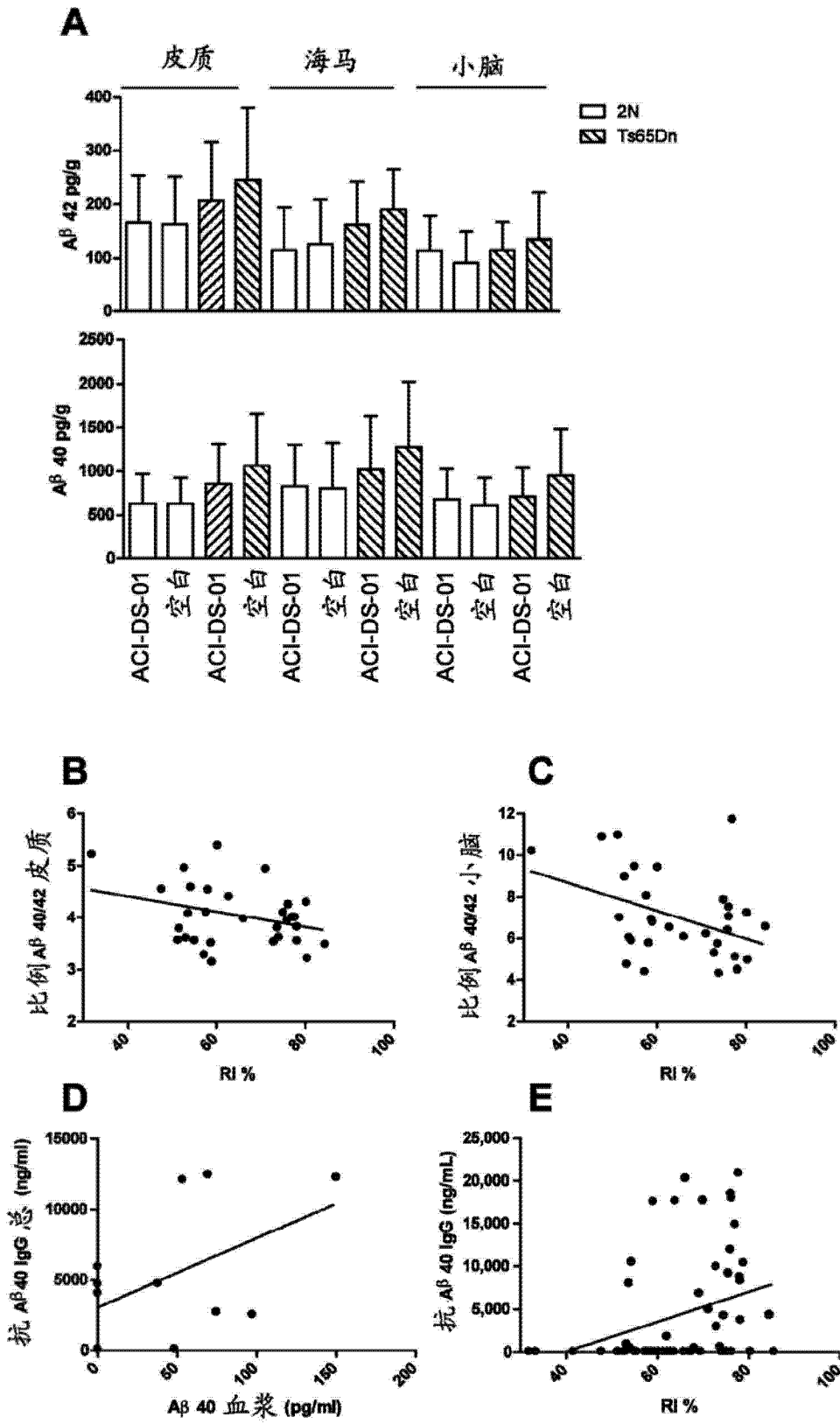


图 4

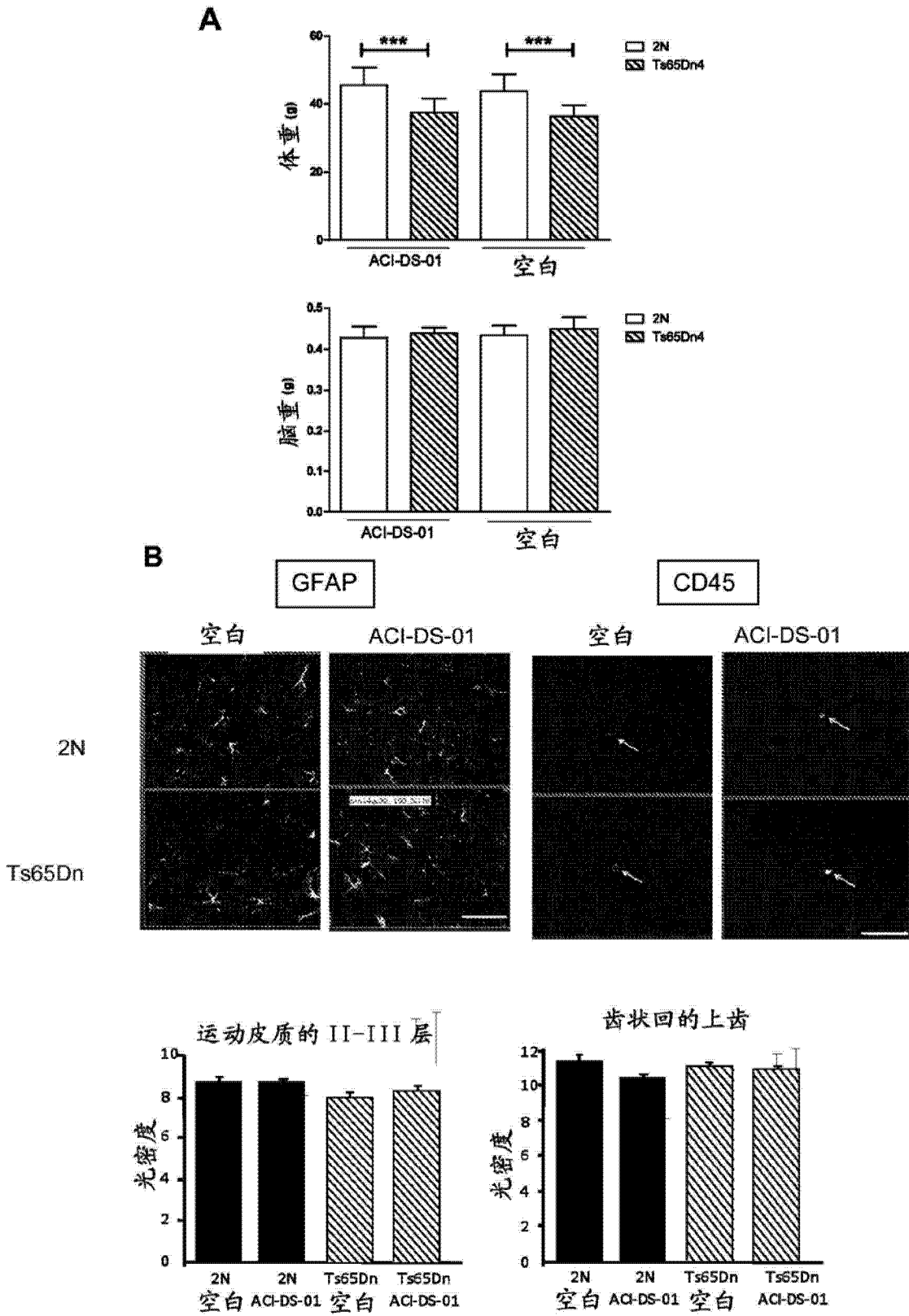


图 5

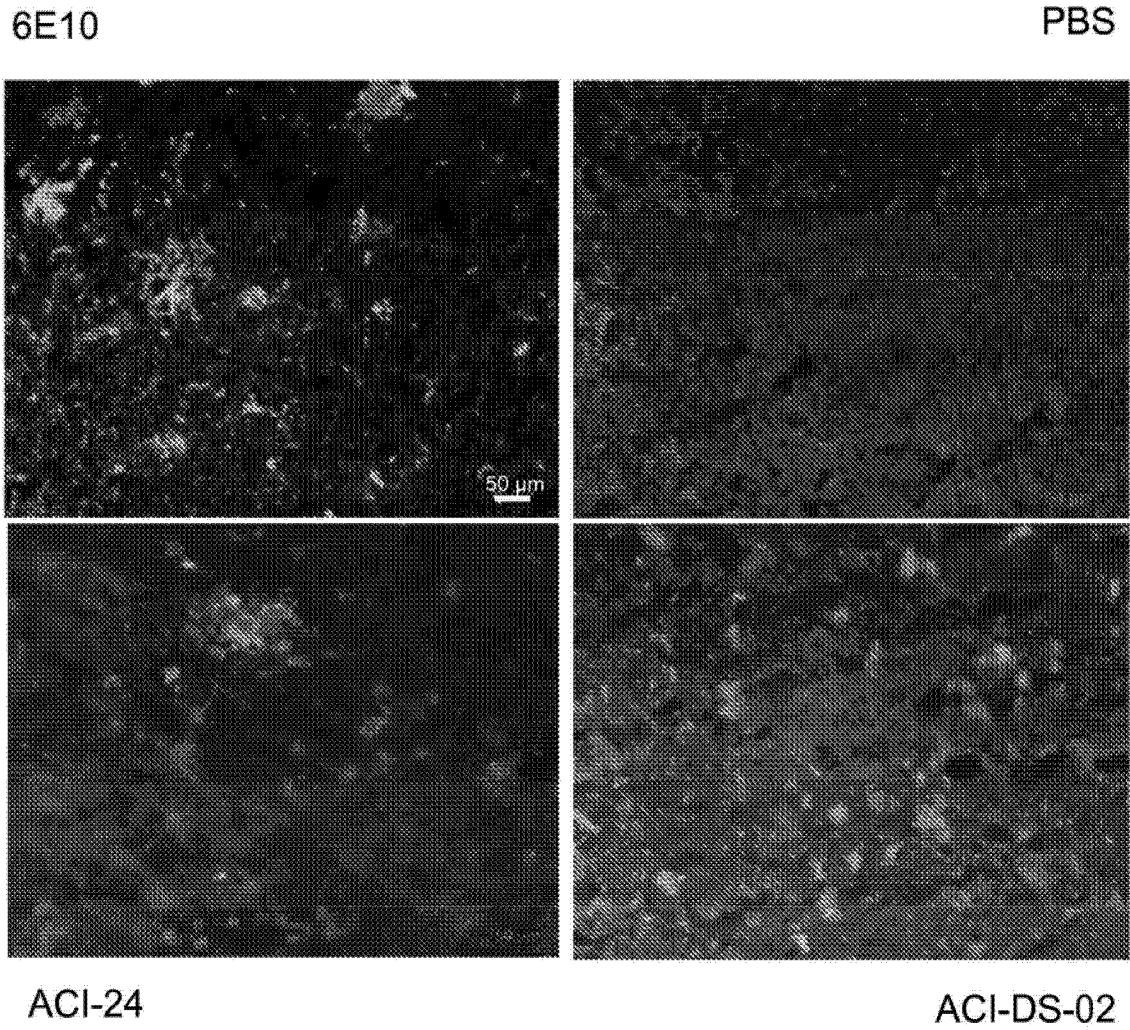


图 6

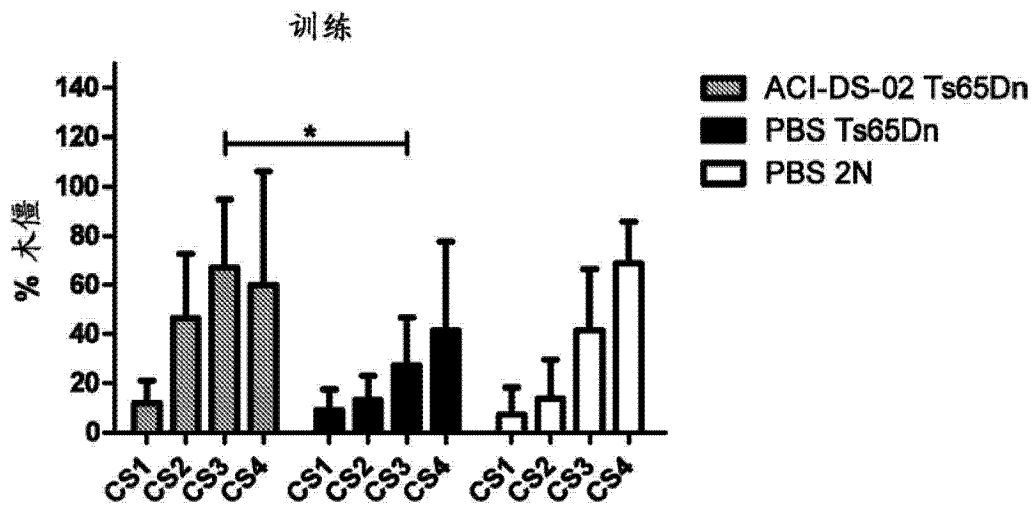


图 7

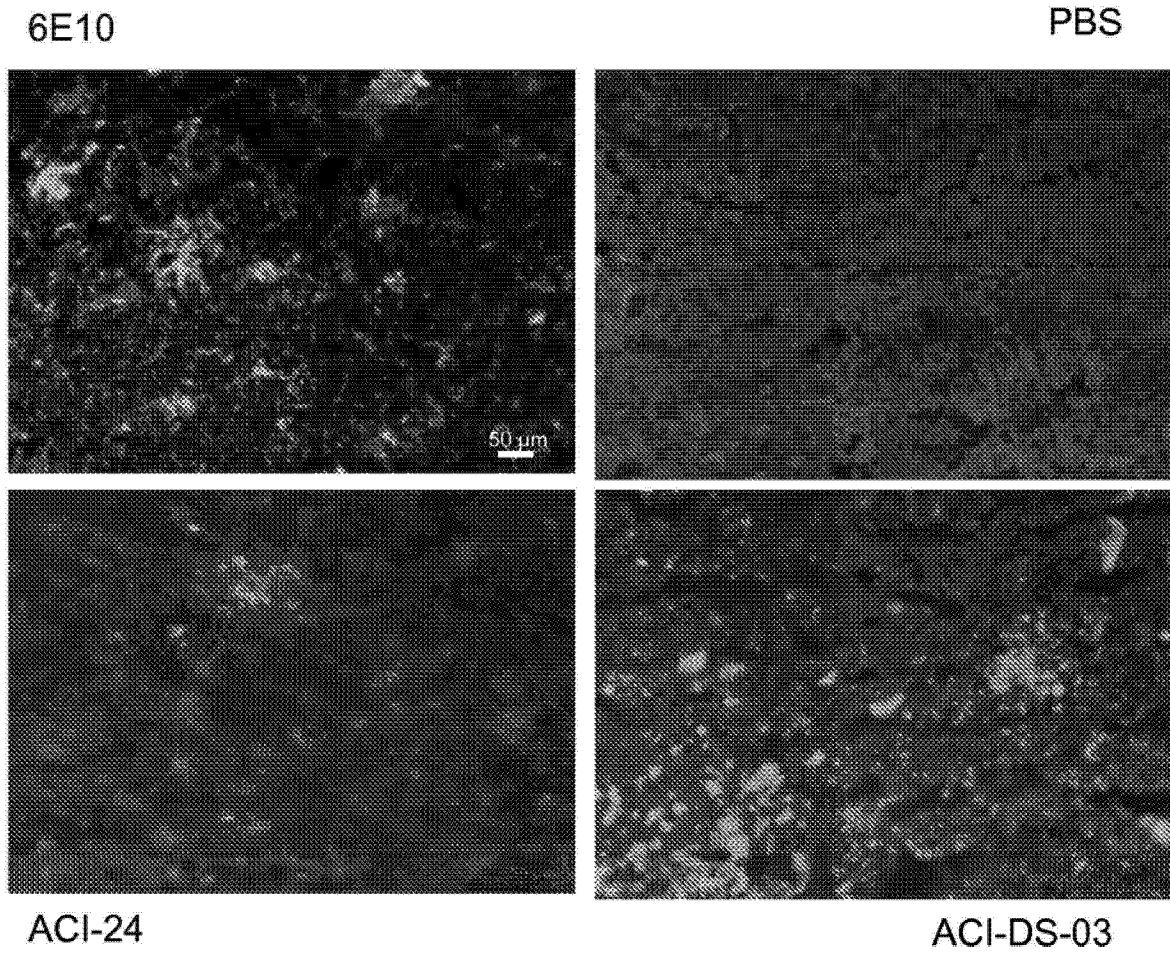


图 8

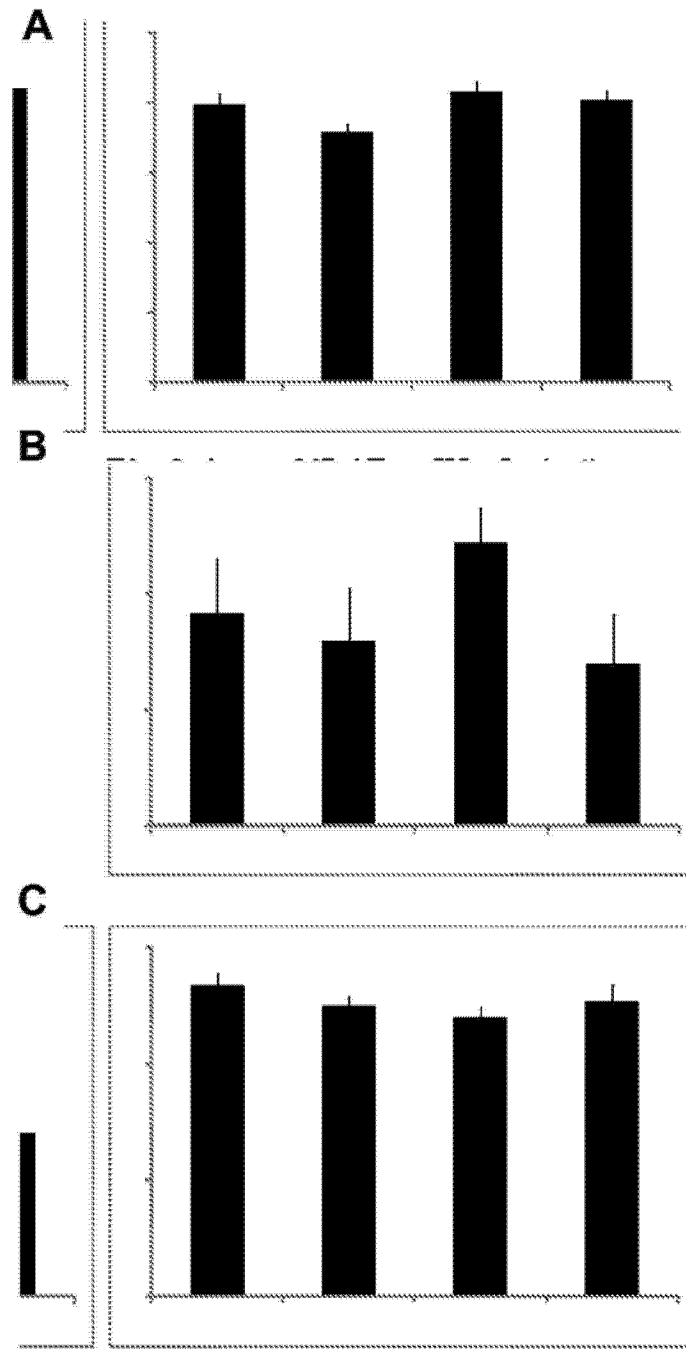


图 9