[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
*A61K 38/17* (2006.01)
*A61K 39/00* (2006.01)
*C07K 14/435* (2006.01)
*C07K 19/00* (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01805360.2

[45] 授权公告日 2006 年 10 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1279971C

[22] 申请日 2001.2.19 [21] 申请号 01805360.2

[30] 优先权

[32] 2000.2.21 [33] DK [31] PA200000265

[86] 国际申请 PCT/DK2001/000113 2001.2.19

[87] 国际公布 WO2001/062284 英 2001.8.30

[85] 进入国家阶段日期 2002.8.21

[71] 专利权人 法麦克萨有限公司

地址 丹麦赫斯霍尔姆

[72] 发明人 彼得·比尔克 M·R·詹森

克劳斯·格里戈里厄斯·尼尔森

审查员 温庭江

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程 伟

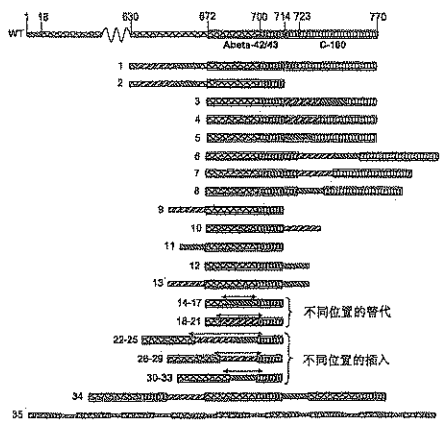
权利要求书 7 页 说明书 71 页 附图 1 页

[54] 发明名称

下调淀粉状蛋白的新方法

[57] 摘要

公开的是对抗以淀粉状蛋白沉积为特征的疾病的新方法。此方法通常以针对致淀粉状蛋白产生蛋白(可引起淀粉状蛋白形成的蛋白)例如 β 淀粉状蛋白(Aβ)的免疫作用为基础。免疫作用优选地通过使用自体致淀粉状蛋白产生多肽的类似物起效，所述类似物能够诱导抗自体致淀粉状蛋白产生多肽的抗体生成。特别优选的作为免疫原的是自体 Aβ，Aβ 已经通过导入一个单一或几个外源的、免疫显性的和混杂的 T 细胞抗原决定簇被修饰，同时实质上保存了大多数 Aβ 的 B 细胞抗原决定簇。也公开了对抗致淀粉状蛋白产生多肽的核酸免疫接种和用活疫苗的免疫接种以及用于免疫接种的方法和工具。这种方法和工具包括，鉴定致淀粉状蛋白产生蛋白的有用免疫原类似物的方法、制备类似物和药学制剂的方法、以及核酸片段、载体、转化的细胞、多肽和药学制剂。



1.选自以下的制剂：

a)人 Aβ或 APP 多肽的类似物，其中该类似物通过氨基酸插入、添加、删除、或替代被引入至少一个分离的外源混杂（promiscuous）T 辅助细胞抗原决定簇($T_H$抗原决定簇)，所述的类似物选自：

由 SEQ ID NO:2 的氨基酸 672-714 组成的三个同一 APP 片段被至少一个分离的外源 $T_H$抗原决定簇分开，

由 SEQ ID NO:2 的氨基酸 672-714 组成的九个同一 APP 片段被至少一个分离的外源 $T_H$抗原决定簇分开，

含有在其 N 端或 C 端融合有分离的外源 $T_H$抗原决定簇的 SEQ ID NO:2 的氨基酸 672-714，

SEQ ID NO:2 的氨基酸 672-714，其中通过替代而被引入分离的外源 $T_H$抗原决定簇，

SEQ ID NO:2 的氨基酸 672-714，其中通过插入而被引入分离的外源 $T_H$抗原决定簇，

SEQ ID NO:2 的氨基酸 672-770，其中通过替代而在氨基酸 714-770 引入至少一个分离的外源 $T_H$抗原决定簇，

SEQ ID NO:2 的氨基酸 672-770，其中通过插入而在氨基酸 714-770 引入至少一个分离的外源 $T_H$抗原决定簇，

SEQ ID NO:2 的氨基酸 630-770，其中通过替代而在氨基酸 630-672 引入至少一个分离的外源 $T_H$抗原决定簇，

SEQ ID NO:2 的氨基酸 630-714，其中通过插入而在氨基酸 630-672 引入至少一个分离的外源 $T_H$抗原决定簇，

b)至少一个多聚羟基聚合物载体骨架，它可分别偶联至少一个分离的外源 $T_H$抗原决定簇和至少一个来自动物的自体 Aβ或 APP 的肽，

c)编码至少一种 a)中定义的类似物的核酸序列，

d)一种携带 c)中定义的核酸片段的非致病微生物或病毒，

在制备含有用于下调 Aβ或 APP 的制剂的药物中的用途。

2.根据权利要求 1 的用途，其中所述的引入作用导致 Aβ或 APP 的 B 细胞抗原决定簇的基本部分被保留，以及

—至少引入一个第一部分，它实现类似物靶向抗原呈递细胞(APC)或B淋巴细胞，和/或

— 至少引入一个第二部分，它激发免疫系统，和/或

— 至少引入一个第三部分，它优化类似物向免疫系统的呈递。

3.根据权利要求 2 的用途，其中所述的类似物通过作为侧链基团引入第一部分和/或第二部分和/或第三部分进行修饰，其中是通过共价或非共价地结合于Aβ、APP 或其亚序列中。

4.根据前面所述权利要求中的任一项所述的用途，其中所述的类似物包括至少一个Aβ或APP的B细胞抗原决定簇的重复体和/或引入一个半抗原。

5.根据前面所述权利要求中的任一项所述的用途，其中所述的外源混杂 $T_H$ 抗原决定簇是具有免疫显性的。

6.根据前面所述权利要求中的任一项所述的用途，其中所述的外源混杂 $T_H$ 抗原决定簇选自天然混杂的 T 细胞抗原决定簇以及人造的 MHC-II 结合肽序列。

7.根据权利要求 6 的用途，其中所述的天然 T 细胞抗原决定簇选自破伤风毒素抗原决定簇如 P2 或 P30、白喉毒素抗原决定簇、流感病毒红血球凝集素抗原决定簇和镰状疟原虫 CS 抗原决定簇。

8.根据权利要求 2-7 中的任一项所述的用途，其中所述的第一部分实际上是 B 淋巴细胞特异表面抗原或抗原呈递细胞特异表面抗原的特异结合成分，如半抗原或碳水化合物，在 B 淋巴细胞或 APC 上有其受体。

9.根据权利要求 2-8 中的任一项所述的用途，其中所述的第二部分选自细胞因子，如 γ 干扰素(IFN-γ)或其有效部分、Flt3L 或其有效部分、白介素 1(IL-1)或其有效部分、白介素 2(IL-2)或其有效部分、白介素 4(IL-4)或其有效部分、白介素 6(IL-6)或其有效部分、白介素 12（IL-12）或其有效部分、白介素 13（IL-13）或其有效部分、白介

素 15(IL-15)或其有效部分、以及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)或其有效部分；激素；热休克蛋白如 HSP70 或其有效部分、HSP90 或其有效部分、HSC70 或其有效部分、GRP94 或其有效部分，以及钙网蛋白(CRT)或其有效部分。

10. 根据权利要求 2-9 中的任一项所述的用途，其中所述的第三部分是脂类性质的，如棕榈酰基、肉豆蔻酰基、法呢基，香叶基-香叶基、糖基磷脂酰肌醇固着物、和 N-酰基甘油二酯基，或其中所述的第三部分是一种多聚羟基聚合物，如多糖。

11. 根据权利要求 10 中所述的用途，其中所述的多糖可作为一个载体骨架，其中 Aβ 或 APP 衍生肽和外源混杂 $T_H$ 抗原决定簇可分别结合在其上面。

12. 根据权利要求 11 中所述的用途，其中所述的 Aβ 或 APP 衍生肽和外源混杂 $T_H$ 抗原决定簇是经酰胺键与多糖结合的。

13. 根据前面所述权利要求中的任一项所述的用途，其中所述的自体 Aβ 或 APP，当以自体 APP 的细胞结合形式存在时，已经被修饰以保留不暴露在细胞外相中的 B 细胞抗原决定簇。

14. 根据权利要求 13 中所述的用途，其中所述的 Aβ 或 APP，当以自体 APP 的细胞结合形式存在时，已经被修饰以便缺少至少一个暴露在细胞外相中的 B 细胞抗原决定簇。

15. 根据前面所述权利要求中的任一项所述的用途，其中包括在相同或不同长度的氨基酸序列的自体 Aβ 或 APP 中至少替代一个氨基酸序列，在类似物中产生一个外源混杂 $T_H$ 抗原决定簇。

16. 根据前面所述权利要求中的任一项所述的用途，其中所述的类似物包括一个对应于 SEQ ID NO:2 中氨基酸 672-714 的氨基酸序列，其中所述的多肽被插入了一个氨基酸序列，可在类似物中产生一个外源混杂 $T_H$ 抗原决定簇，或其中所述的类似物包括一个对应于 SEQ ID NO:2 中氨基酸 672-714 的氨基酸序列，其中至少一个氨基酸序列被相

同或不同长度的氨基酸序列替代，以便产生一个外源混杂 $T_H$ 抗原决定簇。

17. 根据前面所述权利要求中的任一项所述的用途，其中所述的类似物的至少两个拷贝共价或非共价键地与一个能够实现多个抗原决定簇拷贝的呈递作用的载体分子结合。

18. 根据前面所述权利要求中的任一项所述的用途，其中所述的类似物已经与一个能促进对自体抗原的自体耐受性进行破坏的佐剂配伍。

19. 根据前面所述权利要求中的任一项所述的用途，其中所述的有效量的类似物经以下的途径对动物施用，该途径选自胃肠外施用如皮内、皮下和肌肉内施用；腹膜施用；口服；口腔施用；舌下施用；硬膜外施用；脊柱施用；肛门施用；以及颅内施用。

20. 根据权利要求 19 中所述的用途，其中所述的类似物的有效量在 0.5μg 和 2,000μg 之间。

21. 根据权利要求 19 或 20 中任一项所述的用途，其中所述的类似物包含在虚拟淋巴结(VLN)装置中。

22. 根据权利要求 1-16 中的任一项所述的用途，其中所述的下调作用包括向动物细胞中引入编码类似物的核酸，并因此通过引入核酸的细胞获得体内的表达。

23. 根据权利要求 22 中所述的用途，其中所述的引入的核酸选自裸露 DNA，与有电荷或无电荷脂类配伍的 DNA，与一个脂质体配伍的 DNA，包含在一个病毒载体中的 DNA，与一个促转染蛋白或多肽配伍的 DNA，与一个靶向蛋白或多肽配伍的 DNA，与钙沉淀剂配伍的 DNA，与一个惰性载体分子偶联的 DNA，包绕在壳多糖或乙酰壳多糖中的 DNA，以及与一个佐剂配伍的 DNA。

24. 根据权利要求 23 中所述的用途，其中所述的核酸包含在一个 VLN 装置中。

25. 根据权利要求 20-24 中的任一项所述的用途，其包括至少每年一次的施用/引入，例如至少 2 次，至少 3 次，至少 4 次，至少 6 次，至少 12 次的施用/引入。

26. 根据权利要求 1-25 中的任一项所述用途用于治疗和/或预防和/或减轻阿尔兹海姆病或其它以 Aβ沉积为特征的疾病或状态。

27. 一种人 Aβ或 APP 的的类似物，所述类似物如权利要求 1-16 中的任一项所定义。

28. 根据权利要求 27 所述的类似物，其选自：

a）一个多肽，从 N 端到 C 端依次由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 672-714，SEQ ID NO:4，SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 672-714，SEQ ID NO:6，SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 672-714 所组成，

b）一个多肽，从 N 端到 C 端依次由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 630-634,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 671-714，

c）一个多肽，从 N 端到 C 端依次由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 672-713，SEQ ID NO:6，SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 729-734，SEQ ID NO:4，SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 750-770 所组成，其为说明书 85 页表中的结构 3。

29. 一种包括免疫原有效量的根据权利要求 27 或 28 中的任一项所述类似物的免疫原组合物，该组合物进一步包括一种药学和免疫学可接受的运载工具和/或载体，和任选的一种佐剂。

30. 一种编码权利要求 27，选项 a)或从属于权利要求 27，选项 a)中的权利要求 28 的类似物的核酸片段。

31. 一种携带根据权利要求 30 所述的核酸片段的载体，如一个能够自我复制的载体。

32. 根据权利要求 31 中所述的载体，其选自质粒、噬菌体、粘粒、微小染色体和病毒。

33. 根据权利要求 31 或 32 的任一项所述的载体，其中，在 5’→3’方向和可操作的连锁内，包括一个驱动根据权利要求 30 中所述的核酸片段表达的启动子，任选的一个编码能够促使分泌的引导肽或促进所述多肽片段整合进入膜内的核酸序列，根据权利要求 30 中所述的核酸片段，以及可任选的一个终止子。

34. 根据权利要求 31—33 中的任一项所述的载体，当引入一个宿主细胞内时，其能够或不能被整合进宿主细胞基因组中。

35. 根据权利要求 33 或 34 中的任一项所述的载体，其中所述的启动子可驱动在真核细胞和/或在原核细胞中的表达。

36. 携带权利要求 31-35 中的任一项所述载体的转化细胞，该转化细胞一个能够复制根据权利要求 30 中所述核酸片段的转化细胞。

37. 根据权利要求 36 中所述的转化细胞，其是一个选自细菌，酵母，原生动物的微生物，或一个来自选自真菌，昆虫细胞如 $S_2$ 或 SF 细胞，植物细胞和哺乳动物细胞的多细胞生物的细胞。

38. 根据权利要求 36 或 37 中的任一项所述的转化细胞，其表达根据权利要求 30 中所述的核酸片段，例如，一个分泌或在其表面携带根据权利要求 27 或 28 中的任一项所述的类似物的转化细胞。

39. 根据权利要求 1-16 中的任一项所述的用途，其中所述的下调作用包括给予一种携带编码和表达所述类似物的核酸片段的非病原性微生物或病毒。

40. 一种在一个动物中诱导抗 Aβ 或 APP 抗体产生的组合物，其中所述的这些蛋白是自体的，该组合物包括

— 一种权利要求 30 所述的核酸片段或根据权利要求 31—35 中的任一项所述的载体，和

— 一种药学和免疫学可接受的运载工具和/或载体和/或佐剂。

41. 一种稳定的细胞系，其携带权利要求 31—35 中的任一项所述的载体，并表达权利要求 30 所述的核酸片段，在其表面选择性的分

泌或携带权利要求 27 或 28 所述的类似物。

# 下调淀粉状蛋白的新方法

## 技术领域

本发明涉及在阿尔茨海默氏病（AD）和其它以淀粉状蛋白沉积为特征的疾病的治疗和预防上的改进措施，例如在以中枢神经系统（CNS）中发生淀粉状蛋白沉积为特征的疾病的治疗和预防上。更特别地，本发明提供了一个下调（不受欢迎的）淀粉状蛋白沉积的方法，该方法使患有涉及淀粉状蛋白沉积病状疾病或有患病危险的个体产生抗相应蛋白或其组件的抗体。本发明也提供了用于此方法的多肽的制备方法，以及所述多肽的修饰方法。本发明还包括编码修饰多肽的核酸片段，以及整合这些核酸片段的载体，和用它们转化的宿主细胞及细胞系。本发明也提供了鉴定可用在本发明方法中的沉积多肽类似物的方法，以及包含修饰多肽或包含编码修饰多肽的核酸的组合物。

## 发明背景

淀粉样变性是细胞外不溶性蛋白原纤维沉积，其导致组织损害和疾病（Pepys,1996；Tan 等人，1995；Kelly,1996）。当正常的可溶性蛋白和肽以不正常的方式进行自结合时，就形成了原纤维（Kelly,1997）。

淀粉状蛋白与严重疾病有关，包括系统性淀粉样变性、阿尔茨海默氏病、成熟期突发型糖尿病、帕金森氏病、亨廷顿病、额颞痴呆和朊病毒相关的传染型海绵状脑病（在人中是库鲁病（kuru）和克—雅病（Creutzfeldt-Jacob），在羊和牛中分别是瘙痒症和牛绵状脑病（BSE）），并且淀粉状蛋白斑形成看起来与人类疾病的发展密切相关，例如在阿尔茨海默氏病中。在动物模型中，在沉积物中发现的蛋白的过度表达或修饰形式的表达，例如 β－淀粉状蛋白，已经显示引起多种疾病症状，例如阿尔茨海默氏样症状。对于淀粉状蛋白沉积没有特效的治疗方法，这些疾病通常是致命的。

淀粉状蛋白原纤维的亚单位可以是野生型、变异体或截短的蛋白，

相似的原纤维可以在体外由寡肽和变性的蛋白形成（Bradbury 等人，1960；Filshie 等人，1964；Burke 和 Rougvie,1972）。原纤维的多肽成分的性质决定着淀粉样变性病的特点。尽管淀粉状蛋白在大小、天然结构和功能上存在很大的不同，但所有的淀粉状蛋白原纤维长度不确定，无分支，直径 70～120 ，并显示特征性刚果红染色(Pepys,1996)。它们呈特征性的交叉 β 结构（Pauling 和 Corey,1951），其中多肽链组成 β 一片层形式。尽管淀粉状蛋白具有非常不同的前体结构，但它们都可能沿相似的路径经过结构转换以形成错折叠的形式，它是 β 一片层螺旋状原丝的建筑模块。

此独特的纤维形式使得这种淀粉样变性病被称作 β 一原纤维病（Glenner,1980a,b），且阿尔茨海默氏病的原纤维蛋白在其二级结构被发现之前被称作 β 一蛋白（Glenner 和 Wong,1984）。特征性的交叉 一β 衍射图案以及原纤维状外观和染色特性是目前公认的淀粉状蛋白的诊断标志，并且提示尽管原纤维由相当不同的蛋白前体形成，但是不管其前体蛋白的性质如何，原纤维具有一定程度的结构相似性并组成一个结构上的超家族（Sunde M,Serpell LC,Bartlam M,Fraser PE,Pepys MB,Blake CCFJ Mol Biol 1997 Oct 31;273(3):729-739）。

其中在中枢神经系统中的淀粉状蛋白沉积物在疾病进展中有重要的作用的最普遍和最熟知的疾病之一是阿尔茨海默氏病。

阿尔茨海默氏病

阿尔茨海默氏病（AD）是一个不可逆的、进行性脑疾病，其逐渐发生并引起记忆丧失、行为和个性改变及智力下降。这些功能丧失与脑细胞死亡和细胞间连接的损坏有关。此疾病的病程因人而异，下降速度也如此。尽管此病可以持续至 20 年，但 AD 患者在其诊断后平均生存 8 到 10 年。

AD 分阶段地发展，从早期轻度的遗忘到智力功能的严重丧失。此丧失称为痴呆。在大多数 AD 人群中，症状首先在 60 岁之后出现，但较早发作也并不罕见。最早的症状经常包括近期记忆丧失、错误判断和个性改变。通常，初始阶段的 AD 患者思维欠清晰并忘记熟人和常见物体的名字。在疾病的后期，他们可忘记如何做甚至很简单的工作。最后，AD 患者丧失所有推理能力并变得依赖其他人照顾每日生活。最

终，疾病使患者变得如此虚弱，以致患者卧床不起并易于形成其它疾病和感染。最常见的是，AD 患者死于肺炎。

尽管发生 AD 的危险性随年龄增加而增加，但 AD 和痴呆症状并不是正常衰老的一部分。AD 和其它致人发狂的疾病是由影响大脑的疾病引起的。在正常衰老过程中，脑内的神经细胞并不大量丢失。相反，AD 破坏了三个关键的过程：神经细胞通讯、代谢和修复。此破坏最终导致许多神经细胞停止发挥功能、丧失与其它神经细胞的联系并死亡。

首先，AD 破坏脑内特别是位于海马区内的控制记忆部分中的神经元，以及相关的结构。当海马区的神经细胞完全停止发挥功能时，短期记忆衰退，通常，病人进行简单而熟悉的工作的能力开始下降。AD 也侵犯大脑皮层，特别是负责语言和推理的区域。最终，涉及大脑许多其它的区域，所有这些大脑区域萎缩（缩小），AD 患者变得卧床不起、大小便失禁、完全失能并对外界无反应（出处：国立研究所对阿尔茨海默氏病衰老过程的报告，1999）。

AD 的影响

AD 是 65 岁及其以上的人群发生痴呆的最常见原因。因其对个人、家庭、卫生保健系统和社会总体上的巨大影响而成为一个重要的健康问题。科学家估计高到 400 万人目前患有此病，且对于超过 65 岁的人，患病率每 5 年增加一倍。还估计每年将发生大约 360,000 新病例（发病率），尽管此数字会随着人口老化而增加（Brookmeyer 等人，1998）。

AD 给社会带来了沉重的经济负担。一个最近在美国进行的研究估计到，照顾一个轻度 AD 患者的年护理费用为$18,408，中度 AD 患者为$30,096，重度 AD 患者为$36,132。美国照顾 AD 患者的年全国费用估计略超过$500 亿（Leon 等人，1998）。

大约 400 万美国人为 85 岁或 85 岁以上，且在大多数工业化国家，此年龄组是人口中增长最快的人群之一。据估计，美国到 2030 年此组数目接近 850 万；一些研究人口趋势的专家认为此数目可能更大。由于越来越多的人生命延长，患老年疾病包括 AD 的人数将持续增长。例如，一些研究显示 85 岁及其以上的人群中接近半数有某种形式的痴呆。（国立研究所对阿尔茨海默氏病衰老过程的报告，1999）

AD 的主要特征

大脑中两个异常结构是AD的标志：淀粉状蛋白斑和神经原纤维缠结（NFT）。斑是致密的、很大程度上具有不溶性的蛋白和细胞物质的沉积物，位于大脑神经元外及其周围。缠结是不溶性的合股纤维，它们在神经元内逐步形成。

存在两种类型的AD：家族性AD(FAD)，其遵循某种遗传方式；和散发性AD，未见其表现出明显的遗传方式。因为发作年龄不同，AD进一步描述为早发型（发生在65岁以下的人群中）或晚发型（发生于65岁及其以上的人群中）。早发型AD是罕见的（大约占病例的10%），通常侵犯在30～60岁间的人群。一些类型的早发型AD是遗传的并在家族中蔓延。通常，早发型AD也较更常见的晚发型发展更快。

目前已知的所有FAD具有早期发作的特点，现在知道50%的病例是由位于三个不同的染色体上的三个基因发生缺陷引起的。它们是21号染色体上的淀粉状蛋白前体（APP）基因的突变；14号染色体上的基因突变，称为早老素-1（presenilin 1）;和1号染色体上的基因突变，称为早老素-2（presenilin 2）。然而，至今没有证据表明任何这些突变在晚发型AD中的更常见的、散发性的或非家族性疾病中起主要作用。（国立研究所对阿尔茨海默氏病衰老过程的报告,1999）

淀粉状蛋白斑

在AD中，淀粉状蛋白斑首先在用于记忆和其它认知功能的大脑区域中形成。它们主要包括β淀粉状蛋白（此后命名为Aβ）的不溶性沉积物，并混合有部分神经元和非神经细胞如小胶质细胞和星形胶质细胞，其中β淀粉状蛋白是被称作淀粉状蛋白前体（APP,其氨基酸序列表示在SEQ ID NO:2中）的较大蛋白的一个蛋白片段。尚不知道是否淀粉状蛋白斑本身构成AD的主要原因，或者是否它们是AD过程中的一个副产物。当然，正如在由APP基因突变引起的遗传型AD中所显示的那样，APP蛋白的改变可以引起AD，且看起来Aβ斑的形成与人类这种疾病的发展密切相关（Lippa C.F.等人，1998）。

APP

APP是与细胞膜联系在一起的许多蛋白之一。在它形成后，APP嵌入神经细胞膜内，一部分在细胞内，一部分在细胞外。近期应用转基因小鼠的研究表明，APP看起来在神经元生长和生存中起重要作用。例

如，某些类型和数量的 APP 可防止神经元受短期和长期的损害，并可使受损的神经元具有较好的自身修复能力，帮助脑损伤后的部分神经元的生长。

在 APP 嵌入细胞膜中时，蛋白酶作用在 APP 上的特定位点，将其分裂成蛋白片段。一种蛋白酶辅助 APP 分裂形成 Aβ，另一种蛋白酶在淀粉状蛋白片段的中部分裂 APP 而不能形成 Aβ。形成的 Aβ 具有两种不同的长度，一种是较短的具有 40（或 41）个氨基酸的 Aβ，其是相对可溶的且聚合较慢；一种是略长的具有 42 个氨基酸的“粘性” Aβ，其迅速地形成不溶性团块。虽然 Aβ 形成了，但还不确切地知道它如何经过神经细胞或在神经细胞周围移动。在此过程的最后阶段，“粘性” Aβ 与已死亡和正在死亡的神经元以及小胶质细胞和星形胶质细胞的碎片一起在细胞外聚合成长细丝，在脑组织中形成 AD 特征性的斑。

存在一些证据表明 APP 中的突变使 Aβ 更可能从 APP 前体中剪切出来，因此导致形成更多的总 Aβ 或相对更多的“粘性”形式。并且看起来好象早老素基因突变可至少以两种方式对神经元的退化起作用：通过调节 Aβ 的产生或更直接地通过引发细胞的死亡。其他研究者提出，突变的早老素-1 和早老素-2 可能涉及加快细胞凋亡的速度。

预期，随着疾病的发展，将形成越来越多的斑，占据越来越多的大脑空间。研究提示，可能的情况是 Aβ 可能按一种动力学平衡的方式同时聚合和解聚。这样产生了可能破坏斑的希望，甚至在它们形成之后。（国立研究所对阿尔茨海默氏病衰老过程的报告，1999）

据信，Aβ 对神经元是有毒性的。在组织培养研究中，研究者观察到，同过度表达正常人 APP 的神经元相比，经基因工程处理的过度表达突变形式人 APP 的海马神经元细胞的死亡增加（Luo 等人，1999）。

此外，在动物模型中显示，过度表达或表达修饰形式的 Aβ 蛋白引起阿尔茨海默氏样症状。（Hsiao K 等人，1998）

假设 Aβ 产生增加、其聚合成斑和所引起的神经毒性可导致 AD，探索可以减速或甚至阻止 Aβ 聚合成斑的条件是有治疗意义的。

**早老素**

早老素-1（S-180）突变几乎占所有早发型家族性 AD(FAD)病例的 50%。已鉴定了大约 30 个突变可造成 AD。AD 的发作依突变而不同。

早老素-2 突变占 FAD 病例中的非常小的一部分，但仍然是一个显著的因素。尚不知道是否早老素涉及散发性的非家族性 AD。不知道早老素的功能，但它们看起来涉及加工 APP 产生 Aβ－42（该肽的较长的较粘形式，SEQ ID NO:2，残基 673－714）的过程，因为具有早老素突变的 AD 患者此肽水平增加。不清楚早老素在引起神经原纤维缠结形成中是否也有作用。有人提出，早老素也可能在神经元退化和神经元死亡中有更直接的作用。早老素-1 位于染色体 14 上而早老素-2 与染色体 1 连锁。如果一个人具有这些基因之一的仅仅一个突变形式，他或她几乎肯定要形成早发型 AD。

还不能确定早老素-1 是否等同于涉及 APP 加工的假想的 γ-分泌酶（Naruse 等人，1998）。

**载脂蛋白 E**

载脂蛋白 E 通常与胆固醇结合在一起，但在 AD 患者大脑的斑和缠结中也有发现。虽然等位基因 1－3 看起来不涉及 AD，但 APOE-e4 等位基因的出现和晚发型 AD 的形成之间有显著的相关（Strittmatter 等人，1993）。然而，这对于早老素和 APP 突变情形而言，只是一个危险因素而非直接原因，且这不限于家族性 AD。

对于 APOE-e4 蛋白增加 AD 形成可能性的方式尚未确切知道，但一个可能的理论是，它加速了 Aβ 的聚集，这有助于降低 AD 的发作年龄，或者特定的 APOE 等位基因的存在或不存在可影响神经元对损伤的反应方式（Buttini 等人，1999）。

此外 Apo A1 已经被显示出具有形成淀粉状蛋白的性质。完整的 apo A1 本身可以在体外形成刚果红阳性的淀粉样原纤维（Am J Pathol 147 (2):238-244(1995 年 8 月),Wisniewski T, Golabek AA,Kida E,Wisniewski KE,Frangione B)。

看起来有一些矛盾的结果，表明同其它等位基因相比，APOE-e4 等位基因在减少智力丧失中有正效应（Stern,Brandt,1997,Annals of Neurology 41)。

**神经元纤维缠结**

AD 的第二个标志由神经细胞内发现的异常聚集的缠绕细丝构成。缠结的主要成分是称为 tau(t)蛋白的一种形式。在中枢神经系统中，

tau 蛋白因其结合并帮助微管稳定的能力而最著名，微管是细胞内支持结构或骨架的一个组成部分。然而，在 AD 患者中，tau 发生了化学变化，此改变的 tau 不再能够稳定微管，而使它们崩解。这种运送系统的崩溃可首先引起神经细胞间通讯障碍，随后可导致神经元死亡。

在 AD 患者中，化学改变的 tau 缠绕成配对的螺旋状纤维—两条互相缠绕在一起的 tau 细丝。这些纤维是在神经元纤维缠结中发现的主要物质。在一个最近的研究中，研究者发现，健康人大脑海马区的特定部位中发生神经元纤维改变的神经元不到 6%，在死于轻度 AD 的人群中这些神经元超过 43%，在死于严重 AD 的人群中为 71%。在研究神经元丧失时发现了相似的发展过程。这种类型的证据支持一种观点，即缠结的形成和神经元的丧失一起贯穿于 AD 的发展过程中。（国立研究所对阿尔茨海默氏病衰老过程的报告,1999）

**Tau 蛋白病（Tauopathies）和缠结**

除了 AD 以外，几种神经变性疾病以 tau 在神经元和神经胶质中聚集成不溶的细丝为特征，导致功能障碍和死亡。最近，对除 AD 外的具有各种遗传性痴呆的家族进行研究的几组研究者发现了位于 17 号染色体上的 tau 基因的第一个突变（Clark 等人，1998；Hutton 等人，1998；Poorkaj 等人，1998；Spillantini 等人，1998）。在这些家族中，tau 基因的突变引起神经元细胞死亡和痴呆。这些疾病与 AD 共有某些特征，但是在几个重要方面又与其不同，它们被集合起来称作“与 17 号染色体连锁的额颞痴呆及帕金森氏病”（FTDP-17）。它们包括，例如帕金森氏病，一些类型的肌萎缩性侧索硬化(ALS)，皮质基底变性、进行性核上型瘫痪和皮克病，所有这些疾病均以 tau 蛋白异常聚集为特征。

**其它 AD 样神经系统疾病**

AD 和其它神经系统疾病间具有重要的相似性，包括朊病毒病（例如库鲁病、克-雅病和牛海绵状脑炎）、帕金森氏病、亨廷顿病和额—颞痴呆。所有这些疾病均涉及异常蛋白在脑内的沉积物。AD 和朊病毒病导致痴呆和死亡，都与不溶性淀粉状蛋白原纤维的形成有关，但是来自互不相同的膜蛋白。

研究帕金森氏病，即仅次于 AD 的第二个最常见的神经变性疾病，科学家发现了与该疾病相关的第一个基因。此基因编码一个称作

synuclein 的蛋白，令人感兴趣的是，它也在 AD 患者脑内的淀粉状蛋白斑中发现（Lavedan C, 1998, Genome Res. 8(9):871-80）。研究人员也已发现另一种引起痴呆的进行性神经变性疾病，即亨廷顿病的基因缺陷导致亨廷顿蛋白形成不溶性原纤维，该原纤维与 AD 病的 Aβ 原纤维和朊病毒病的蛋白原纤维很相似（Scherzinger E 等人，1999，PNAS U.S.A. 96(8):4604-9）。

科学家还发现了一个新的基因，当它发生突变时，是家族性不列颠痴呆（FBD）的原因，FBD 是一种罕见的遗传性疾病，导致严重的运动障碍和进行性痴呆，与 AD 所见相似。对 FBD 斑中发现的淀粉状蛋白原纤维进行的生化分析，发现了一种称为 ABri 的独特的肽（Vidal 等人，1999）。在此基因上特定位点的突变导致产生一种比正常 Bri 蛋白较长的蛋白。从 Bri 蛋白的变异末端剪切而成的 ABri 肽沉积为淀粉状蛋白原纤维。认为这些斑引起 FBD 特征性的神经元功能障碍和痴呆。

用 Aβ 的免疫

免疫系统通常会参加机体内外源蛋白和蛋白样颗粒的清除，但是与上述疾病相关的沉积物通常主要地由自体蛋白组成，因而使免疫系统在控制这些疾病中的作用不明显。此外，沉积物位于通常与免疫系统隔离的区域中（中枢神经系统），这两个事实提示任何疫苗或免疫治疗方法将不会成功。

然而，最近科学家们试图用一种由异源人 Aβ 和一种已知刺激免疫系统的物质组成的疫苗免疫小鼠（Schenk 等人，1999 和 WO 99/27944）。在用人突变的 APP 基因插入小鼠 DNA 而形成的部分转基因小鼠 AD 模型中试验了此疫苗。随着小鼠变老，小鼠产生了修饰的 APP 蛋白并形成了淀粉状蛋白斑。这个小鼠模型被用来检测用抗修饰的转基因人 APP 的疫苗接种对斑的形成是否有效。在第一个实验中，一组转基因小鼠在 6 周龄时开始每月给予疫苗注射，至 11 个月时终止。第二组转基因小鼠不接受注射并作为对照组。在 13 月龄时，对照组小鼠有斑形成，占大脑的 2～6%。相反，被免疫的小鼠实际上没有斑形成。

在第二个实验中，在已经有一些斑形成的第 11 个月，研究者开始注射。经过 7 个月的时间，对照组转基因小鼠的大脑内斑的量增加了 17 倍，而接受疫苗者同 18 个月大的对照组转基因小鼠相比下降了 99

%。在一些小鼠中，一些已经存在的斑沉积物看起来通过治疗被去除了。还发现作为免疫作用的结果，其它与斑相关的损害如炎症和异常的神经细胞活动减少了。

上面所述因而是在小鼠中进行的一个初步研究，例如，科学家们需要弄清楚接种疫苗的小鼠是否在其它方面仍然健康，以及接种疫苗的小鼠的记忆是否保持正常。此外，由于小鼠模型不是 AD 的完全代表模型（该动物不形成神经元纤维缠结，也没有许多神经元的死亡），有必要进行另外的研究以确定人与小鼠是否有相似的或不同的反应。另一个要考虑的问题是，此方法可能“治疗”淀粉状蛋白的沉积，但不能阻止痴呆的形成。

技术问题也存在着较大的挑战。例如，即使有可能也不大可能用此技术产生一种能够使人形成抗其自身蛋白的抗体的疫苗。因此，在能够考虑任何人体试验之前，需要解决大量的安全性和有效性问题。

因此，Schenk 等人的工作显示，如果有可能对中枢神经系统中的蛋白样沉积物中的自体蛋白产生强免疫反应，就有可能防止沉积物的形成并且有可能清除已经形成的斑。

## 发明目的

本发明的目的是对以淀粉状蛋白沉积为特征的状态，如 AD，提供新的治疗方法。另外的目的是形成一个抗淀粉状蛋白的自体疫苗，以获得一种对 AD 和其它涉及淀粉状蛋白沉积的病理学异常的新治疗方法。

## 发明概述

这里所描述的是应用一种自体疫苗接种技术以便对在其它情况下无免疫原性的自体蛋白产生强免疫反应，该自体蛋白包括在与病理学相关的淀粉状蛋白沉积物中。因此，产生的强免疫反应或者针对淀粉状蛋白，或者针对包括在沉积物中的一种或多种成分，或者针对一种或多种造成淀粉状蛋白形成的蛋白。还描述了这种疫苗的制备，该疫苗预防、可能治疗或缓解与淀粉状蛋白沉积相关疾病的症状。

因此，在其最广泛和最普遍的范围内，本发明涉及一种对动物，

包括人类，进行体内下调淀粉状蛋白的方法，该方法包括实现将下述免疫学有效剂量的物质呈递给动物免疫系统：

——至少一种致淀粉状蛋白产生多肽或其子序列，其已经被配制而成，因此，用该致淀粉状蛋白产生多肽或其部分对动物的进行免疫诱导产生抗该致淀粉状蛋白产生多肽的抗体，和/或

——至少一种淀粉状蛋白类似物，其中在该致淀粉状蛋白产生多肽中引入修饰，其结果是用此类似物免疫动物导致产生抗致淀粉状蛋白产生多肽的抗体。

因此，本发明包括下述用途：1）天然存在抗原及其片段，予以配制以便触发免疫反应，以及 2）这种天然存在抗原的类似物，该类似物能够引起可交叉反应的免疫反应。

本发明还涉及致淀粉状蛋白产生多肽的类似物以及编码它们的子集的核酸片段。包括类似物或核酸片段的免疫原性组合物也是本发明的一部分。

本发明也涉及确定能产生免疫原性效果的致淀粉状蛋白产生多肽的类似物的方法，以及制备含该类似物的组合物的方法。

## 附图说明

图 1：为来自淀粉状蛋白前体蛋白的自体疫苗变异体的示意图，自体疫苗变异体的目的是产生针对 Aβ 蛋白，Aβ-43（或 C-100）的抗体响应。本图的上端为 APP 示意图，其余图示结构显示模式抗原决定簇 P2 和 P30 被取代或插入到各种截短的 APP 中的情况。在本图中，黑色图案表示 APP 信号序列，双向交叉阴影是 APP 的细胞外部分，深色垂直阴影是 APP 的跨膜结构域，浅色垂直影是 APP 的胞内结构域，粗的交叉阴影表示 P30 抗原决定簇，细的交叉阴影表示 P2 抗原决定簇。实线框表示 Aβ —42/43，实线框和虚线框一起表示 C-100。“Abeta”代表 Aβ 。

## 发明详述

定义

下面将用于本说明书和权利要求书的若干术语进行详细地定义和

解释，以阐明本发明公认的界限和范围。

在这里，可以互换使用的术语“淀粉状蛋白”和“淀粉样的蛋白”是表示一类长度不确定的蛋白样无分支原纤维。淀粉样原纤维显示特征性的刚果红染色并具有一个交叉 β 结构，其中多肽链组成 β－片层形式。淀粉状蛋白通常来自致淀粉状蛋白产生蛋白，后者具有许多不同的前体结构但都可能经过结构转换形成错折叠的形式，它是 β－片层螺旋状原丝的构建模块。一般地，淀粉样原纤维的直径在大约70～120Å间变化。

术语“致淀粉状蛋白产生蛋白” 规定为表示一种涉及淀粉状蛋白沉积物形成的多肽，或者是这种沉积物的一部分，或者是导致沉积物形成的生物合成途径的一部分。因此，致淀粉状蛋白产生蛋白的实例是 APP 和 Aβ，但牵扯在这些蛋白代谢中的蛋白也可能是致淀粉状蛋白产生蛋白。在这里将详细讨论几种致淀粉状蛋白产生多肽。

在这里，“淀粉状蛋白多肽” 规定为表示含有上面讨论的致淀粉状蛋白产生蛋白的氨基酸序列的多肽，其中致淀粉状蛋白产生蛋白来自人或其它哺乳动物（或其截短形式，其与完整的致淀粉状蛋白产生蛋白共同具有大量的 B 细胞抗原决定簇）——因此一个致淀粉状蛋白产生多肽可以包括，例如形成该致淀粉状蛋白产生多肽的前体的实质性部分（就 Aβ 而言，一种可能的淀粉状蛋白多肽可能是衍生的 APP）。在原核系统中制备的非糖基化形式的致淀粉状蛋白产生多肽，同由于应用例如酵母或其它非哺乳动物真核表达系统的各种糖基化形式者一样，也包括在本术语的范围内。然而，应当注意到，当应用术语“致淀粉状蛋白产生多肽”时，它是指要讨论的多肽在呈递给要治疗的动物时通常是无免疫原性的。换句话说，致淀粉状蛋白产生多肽是自体蛋白或这种自体蛋白的类似物，它们通常不会产生抗所述动物的致淀粉状蛋白产生物质的免疫反应。

一种“致淀粉状蛋白产生多肽的类似物”是一种已经在其一级结构上接受改变的致淀粉状蛋白产生多肽。这种改变可以是，例如，将一种致淀粉状蛋白产生多肽融合到一个适合的融合成分上（即，只涉及在 C-或 N-末端添加氨基酸残基的一级结构改变）的形式，和/或在致淀粉状蛋白产生多肽的氨基酸序列中插入和/或删除和/或取代的形

式。此术语还包括衍生化的致淀粉状蛋白产生分子，参看下面对致淀粉状蛋白产生多肽修饰的讨论。如果致淀粉状蛋白产生多肽是淀粉状蛋白或前体，于是必须构建类似物，如此以致不大能或甚至不能产生抗淀粉状蛋白的正常前体蛋白的抗体，因而避免作为淀粉状蛋白前体的多肽的（生理学正常的）非聚集形式的不受欢迎的干扰，。

应当注意到，可以设想在人体中应用人致淀粉状蛋白产生多肽的异源类似物（如狗或猪的类似物）作为疫苗，以产生需要的抗致淀粉状蛋白产生多肽的免疫性。这种应用异源类似物进行免疫接种的方法也被认为是本发明的一部分。

本文中的术语“多肽”意指包括2～10个氨基酸残基的短肽、11～100个氨基酸残基的寡肽和超过100个氨基酸残基的多肽。进一步而言，此术语还要包括蛋白群，即至少包括一种多肽的功能性生物分子；当至少包括两种多肽时，它们可形成共价连接或非共价连接的复合物。蛋白中的多肽可以是糖基化的和/或脂化的和/或含有辅基。

术语“T-淋巴细胞”和“T-细胞”将互换地用于胸腺来源的淋巴细胞，它们负责各种细胞介导的免疫反应以及在体液免疫反应中起辅助活性。相似地，术语“B-淋巴细胞”和“B-细胞” 将互换地用于产生抗体的淋巴细胞。

术语“子序列”指分别直接衍生自天然存在的淀粉状蛋白的氨基酸序列或核酸序列的任何一段连续含有至少3个氨基酸或相应地至少3个核苷酸的结构。

本文中的术语“动物”通常规定表示一个动物种类（优选哺乳动物），例如人类、家犬等，并不止一个动物。然而，此术语也表示这种动物种类的一个群体，因为考虑到用同样的免疫原免疫动物，重要的是按照本发明方法免疫的所有个体均具有实质上一样的致淀粉状蛋白产生多肽。例如，如果在不同的人群中存在致淀粉状蛋白产生多肽的基因变异体，就可能有必要在这些不同的群体中应用不同的免疫原以便能够以最佳的方式在每一个群体中打破对致淀粉状蛋白产生多肽的自体耐受性。专业技术人员会清楚，本文中的动物是有免疫系统的生物。优选的动物是脊椎动物，如哺乳动物。

至于术语“淀粉状蛋白的体内下调”在这里是指生物机体内沉积

的相关类型淀粉状蛋白的总量下降。下调可以用几种机制获得：其中，通过抗体结合简单的干扰淀粉状蛋白以防止错误聚集是最简单的方法。然而，抗体结合引起清除细胞（如巨噬细胞和其它吞噬细胞）移除淀粉状蛋白，以及抗体干扰其它导致淀粉状蛋白形成的致淀粉状蛋白产生多肽，也包括在本发明的范围内。

表述“有效呈递…到免疫系统”规定是指动物免疫系统以一种可控的方式接受一个免疫源性的刺激。如在下面公开内容中将要公开的那样，这种免疫系统的刺激能以几种方式起效，其中最重要的是用含“药物疫苗（pharmaccine）”的多肽进行接种（即，一种用于治疗或改善正在发生的疾病的疫苗），或核酸“药物疫苗（pharmaccine）”接种。欲获得的重要结果是使动物体内的免疫感受态细胞以免疫学有效的方式碰到抗原，而获得此结果的精确模式对于成为本发明基础的发明思想而言是不太重要。

术语“免疫学有效量”具有其本领域内通常的含义，即，免疫原的量能够引起明显与致病因子有关的免疫反应，该免疫反应能与具有免疫原免疫学特征的致病因子对抗。

当应用致淀粉状蛋白产生多肽已经被“修饰”的表述时，这里是指构成致淀粉状蛋白产生多肽主要成分的多肽的化学修饰。这种修饰可以是，例如，致淀粉状蛋白产生多肽序列中某些氨基酸残基的衍生作用（如烷基化），但是正如将从下面公开内容中所能理解到的那样，优选的修饰包括改变氨基酸序列的一级结构。

在讨论“对致淀粉状蛋白产生多肽的自体耐受性”时，由于致淀粉状蛋白产生多肽在要接种的群体中是自体蛋白，可以理解到群体中的正常者不发动针对抗致淀粉状蛋白产生多肽的免疫反应；可是不能排除动物群体中的偶发个体可能产生抗天然致淀粉状蛋白产生多肽的抗体，例如作为自身免疫病的一部分。无论如何，动物通常仅对其自身的致淀粉状蛋白产生多肽具有自体耐受性，但不能排除所述动物也会对从其它动物种类或具有不同表现型的群体衍生的类似物具有耐受性。

“外源T-细胞抗原决定簇”（或“外源T-淋巴细胞抗原决定簇”）是一个能够与主要组织相容性复合物（MHC）分子结合并在一个动物种

类中刺激 T-细胞的肽。本发明优选的外源 T-细胞抗原决定簇是“混杂的”抗原决定簇，即与一个动物种类或群体中的特定类 MHC 分子的实质部分结合的抗原决定簇。已知仅有数量非常有限的这种混杂 T-细胞抗原决定簇，将在下面对它们进行详细讨论。混杂的 T-细胞抗原决定簇也表示“通用”的 T-细胞抗原决定簇。应当注意到，为使根据本发明使用的免疫原在动物群体的尽可能大的部分中有效，可能有必要：1）在同一个类似物中插入数个外源 T-细胞抗原决定簇，或 2）制备几个类似物，其中每个类似物插入不同的混杂抗原决定簇。还应当注意到，外源 T-细胞抗原决定簇的概念也包括应用隐蔽的 T-细胞抗原决定簇，即从自身蛋白衍生的抗原决定簇，当其以不是所述自身蛋白的一部分的分离形式存在时，才表现免疫学行为。

“外源 T 辅助淋巴细胞抗原决定簇”（外源 $T_H$ 抗原决定簇）是一种与 II 型 MHC 分子结合的外源 T-细胞抗原决定簇，并能够被呈递到与 II 型 MHC 分子结合的抗原呈递细胞（APC）的表面。

本发明中(生物)分子的“功能部分”规定是指该分子中，负责至少一种该分子所发挥的生物化学或生理学作用的部分。本领域熟知的是，许多酶和其它效应分子具有一个负责所述分子发挥作用的活性位点。分子的其它部分可作为稳定或增加溶解性的目的而发挥作用，因此假如这些目的在本发明的某些实施例所述情况下是不相干的，它们就可以被省去。例如，可以应用某些细胞因子作为致淀粉状蛋白产生多肽的修饰部分（参看下面的详细讨论），在这种情况下，稳定性的问题是离题的问题，因为对致淀粉状蛋白产生多肽的偶合可提供所需要的稳定性。

术语“佐剂”具有其在疫苗技术领域中通常的含义，即一种物质或物质组合物：1）其本身不能发动抗疫苗免疫原的特异免疫反应，但 2）尽管如此，它能增强抗免疫原的免疫反应。或换句话说，用佐剂单独接种不提供抗免疫原的免疫反应，用免疫原接种可能产生或不产生抗免疫原的免疫反应，但免疫原和佐剂联合接种引起强于免疫原单独引起的抗免疫原免疫反应。

本文中，分子的“导向作用”规定是表示当一种分子一旦导入动物体时，将优先出现在某些组织中或将优先与某些细胞或细胞类型相

联系的情况。此效果可用几种方法实现，包括将分子配入促进导向的成分中，或通过在分子中导入促进导向的基团。这些问题将在下面详细讨论。

“免疫系统的刺激作用”是指一种物质或物质组合物可表现出一般的、非特异的免疫刺激作用。许多佐剂和推定的佐剂（如某些细胞因子）具有刺激免疫系统的能力。应用免疫刺激剂的结果是增强了免疫系统的“警觉状态”，意味着用免疫原同时或随后免疫时引起与单独使用免疫原相比更显著有效的免疫反应。

淀粉状蛋白下调的优选实施方案

优选的是，用作本发明方法中的免疫原的致淀粉状蛋白产生多肽为修饰的分子，其中在致淀粉状蛋白产生多肽的氨基酸序列中至少存在一个改变，因为那样大大增加了获得对致淀粉状蛋白产生多肽的自体耐受性进行全面阻断的机会，例如，这可以以此处实施例 2 中所示结果予以证明，其中用野生型 Aβ 的免疫与用 Aβ 变异体分子的免疫进行了比较。应当注意到，应用修饰的分子不排除在配方中应用这种修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的可能性，该配方进一步促进了对致淀粉状蛋白产生多肽的自体耐受性的阻断，如含佐剂的配方。

已经表明（在 Dalum I 等人，1996, J. Immunol. 157:4796-4808 中）在正常个体中生理性地存在潜在的自身免疫反应 B-淋巴细胞识别自体蛋白。然而，为了引起这些 B-淋巴细胞真正产生与相关自体蛋白发生反应的抗体，需要来自产生细胞因子的 T-辅助淋巴细胞（$T_H$-细胞或 $T_H$-淋巴细胞）的协助。正常情况下不提供这种辅助，因为当被抗原呈递细胞（APC）呈递时，T-淋巴细胞通常不识别来自自体蛋白的 T-细胞抗原决定簇。然而，通过在自体蛋白上提供一个“外源性”成分（即通过导入一个免疫学显著的修饰），识别外源成分的 T-细胞一旦识别 APC（如，开始时是单核细胞）上外源抗原决定簇时被激活。能够识别修饰的自体蛋白上的自身抗原决定簇的多克隆 B-淋巴细胞（它们也是 APC）也使抗原内化，并随后呈递其外源 T-细胞抗原决定簇，激活的 T-淋巴细胞随后提供辅助这些自反应多克隆 B-淋巴细胞的细胞因子。由于这些多克隆 B-淋巴细胞产生的抗体与修饰的多肽上的不同抗原决定簇反应，包括那些也存在于天然多肽中的抗原决定簇，因此诱导了

一个与未修饰的自体蛋白交叉反应的抗体。总之，T-淋巴细胞就好象多克隆 B-淋巴细胞群识别了一个完整的外源抗原一样而被诱导发挥作用，而事实上只有插入的抗原决定簇对宿主而言是异质的。按此方式，诱导了能够与未修饰的自身抗原交叉反应的抗体。

本领域已知几种修饰自身抗原肽以实现阻断自体耐受性的方法。因此，根据本发明，修饰可以包括：

——至少导入一个外源 T-细胞抗原决定簇，和/或

——至少导入一个第一部分，它作用于将修饰的分子导向到抗原呈递细胞（APC），和/或

——至少导入一个第二部分，它刺激免疫系统，和/或

——至少导入一个第三部分，它使修饰的致淀粉状蛋白产生多肽呈递给免疫系统的过程最适化。

然而，所有这些修饰的进行应当同时保持致淀粉状蛋白产生多肽中原始 B-淋巴细胞抗原决定簇的实质部分，因为如此增强了 B-淋巴细胞对天然分子的识别。

在一个优选的实施例中，侧基（以外源 T-细胞抗原决定簇形式或上面提到的第一、第二和第三部分）被共价地或非共价地导入。这意味着衍生来自致淀粉状蛋白产生多肽的一段氨基酸残基序列时，不改变一级结构的氨基酸序列，或至少不在链内单个氨基酸间的肽键中导入改变。

一个优选的可选择的实施例应用到氨基酸取代和/或缺失和/或插入和/或添加（其可通过重组的方法或肽合成的方法实现；涉及一段长的氨基酸序列的修饰能产生融合多肽）。本实施例一个特别优选的版本是 WO 95/05849 中描述的技术，它公开了一个通过用自体蛋白的类似物免疫而下调自体蛋白的方法，其中数个氨基酸序列被相应数量的氨基酸序列取代，每个氨基酸序列含有一个外源免疫优势的 T-细胞抗原决定簇，而同时保持了类似物中自体蛋白的总体四级结构。然而，对于本发明的目的，如果修饰（插入、添加、缺失或取代）产生了外源 T-细胞抗原决定簇同时保存了致淀粉状蛋白产生多肽中 B-细胞抗原决定簇的基本数量就足够了。但是，为了获得诱导的免疫反应的最大效果，优选在修饰的分子中保持致淀粉状蛋白产生多肽的总体四级结构。

下面的分子式描述了本发明一般涵盖的分子构建物：$(MOD_1)_{s1}(amyloid_{e1})_{n1}(MOD_2)_{s2}(amyloid_{e2})n_2\cdots\cdots(MOD_X)_{sx}(amyloid_{ex})_{nx}$(I)

其中 $amyloid_{e1}$－$amyloid_{ex}$ 是 x 个含致淀粉状蛋白产生多肽的子序列的 B-细胞抗原决定簇，它们独立地相同或不相同，可含有或不含有外源侧基，x 是一个≥3 的整数，n1-nx 是 x 整数≥0（至少一个≥1），$MOD_1$-$MOD_X$ 是保守的 B-细胞抗原决定簇间导入的 x 个修饰，s1-sx 是 x 整数≥0（如果在 $amyloid_{ex}$ 序列中没有导入侧基，则至少一个≥1）。因此，假定存在对本结构的免疫原性上的一般性功能约束，本发明允许所有对致淀粉状蛋白产生多肽原始序列的置换类型及其所有的修饰。于是，通过删除诸如在体内有副作用的致淀粉状蛋白产生多肽的部分序列淀粉状蛋白或删除通常在细胞内并因此产生不需要的免疫反应的部分所获得的修饰的致淀粉状蛋白产生多肽包括在本发明中。

上面概括的构建物的一个首选版本，当可应用时，是其中含淀粉状蛋白的子序列的 B-细胞抗原决定簇不以前体多肽的形式暴露于细胞外的构建物，其中淀粉状蛋白由该前体多肽产生。通过对这样的淀粉状蛋白抗原决定簇的选择，保证了不产生与制造淀粉状蛋白前体的细胞反应的抗体，因而产生的免疫反应被限制为抗不需要的淀粉状蛋白沉积物的免疫反应。当可应用时，可以选择其它致淀粉状蛋白产生多肽而非淀粉状蛋白。在这些情况下，例如，诱导针对致淀粉状蛋白产生多肽抗原决定簇的免疫性是可行的，其中当这些致淀粉状蛋白产生多肽从产生其的细胞中解除任何形式偶联时，仅暴露于胞外相。

如这里所描述的，保持 B-细胞抗原决定簇的实质部分或甚至保持受修饰的蛋白的总体四级结构，可以用几种方法获得。一种是简单地制备一种直接抗致淀粉状蛋白产生多肽的多克隆抗血清（如在兔中制备的抗血清），然后用此抗血清作为一种用于产生的修饰蛋白的检测试剂（如在竞争 ELASA 中）。具有与致淀粉状蛋白产生多肽和抗血清同样反应程度的修饰型（类似物）一定被认为同致淀粉状蛋白产生多肽具有同样的总体四级结构，而表现出与这种抗血清具有有限反应性（但仍然是显著的和特异的）的类似物被认为保持了原始 B-细胞抗原决定簇的实质部分。

可选择地，可以制备一个与致淀粉状蛋白产生多肽上独特抗原决

定簇反应的单克隆抗体筛选库，并用作一个检测组。此方法具有以下优势，实现了 1)致淀粉状蛋白产生多肽的抗原决定簇作图，和 2）保持在制备的类似物中的抗原决定簇作图。

当然，第三种方法将解析致淀粉状蛋白产生多肽或其生物活性截短形式(参看上面叙述)的三维结构，并将此与已制备的类似物的已解析三维结构比较。三维结构可以通过 X-线衍射研究和核磁共振（NMR）-光谱学的帮助来解决。有关四级结构的进一步信息在一定程度上可以从圆二色性研究中获得，其优势是仅需要纯化形式的多肽（而 X-线衍射需要准备晶体化的多肽，NMR 需要准备多肽的同位素变体）以提供给定分子四级结构的有用信息。然而，最终需要 X-线衍射和/或 NMR 以获得结论性数据，因为圆二色性只能通过二级结构成分的信息提供正确三维结构的非直接证据。

本发明一个优选的实施例应用了致淀粉状蛋白产生多肽的 B-淋巴细胞抗原决定簇的多显示形式（即分子式 I，其中至少有一个 B-细胞抗原决定簇出现在两个位置中）。此效果可以用各种方法获得，如通过简单地制备含(致淀粉状蛋白产生多肽)$_m$结构的融合多肽，其中 m 是一个≥2 的整数，然后在至少一个淀粉状蛋白序列中导入这里讨论的修饰。导入的修饰包括至少一个重复的 B-淋巴细胞抗原决定簇和/或导入一个半抗原是优选的。这些包括所选抗原决定簇多显示形式的实施例在仅有小部分致淀粉状蛋白产生多肽被用作疫苗制剂成分时是特别优选的。

如上面提到的，外源 T-细胞抗原决定簇的导入可以通过导入至少一个氨基酸的插入、添加、缺失或取代而完成。当然，一般情况下会导入在氨基酸序列中超过一个的改变（如由一个完整的 T-细胞抗原决定簇引起的插入或取代），但要达到的重要目的是，当类似物被抗原呈递细胞（APC）处理时将产生这种外源免疫优势的 T-细胞抗原决定簇，它出现在 APC 表面上的 II 型 MHC 分子中。因此，如果在致淀粉状蛋白产生多肽的氨基酸序列的适当位置含有几个也可在外源 $T_H$ 抗原决定簇中发现的氨基酸残基，那么外源 $T_H$ 抗原决定簇的导入可以通过氨基酸插入、添加、缺失和取代方法通过提供外源抗原决定簇的剩余氨基酸而实现。换句话说，不必通过插入或取代导入一个完整的 $T_H$ 抗原决定

簇来完成本发明的目的。

氨基酸插入、缺失、取代或添加的数目，优选的是至少 2 个，如 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 和 25 个氨基酸的插入、取代、添加或缺失。进一步优选的是，氨基酸插入、取代、添加或缺失的数目不超过 150 个，如最多 100、最多 90、最多 80 和最多 70。特别优选的是取代、插入、缺失或添加的数目不超过 60，特别是此数目不应超过 50 甚至 40。最优选的是数目不多于 30。关于氨基酸添加，应当注意到，当得到的构建物是融合多肽形式时，这些经常大大高于 150。

本发明的优选实施例包括通过导入至少一个外源免疫优势的 T-细胞抗原决定簇的修饰。可以理解，T-细胞抗原决定簇的免疫优势依赖于所讨论的动物种类。如这里所用的，术语“免疫优势”简单地指在免疫接种的个体/群体中产生一个显著的免疫反应，但众所周知的事实是，在一个个体/群体中是免疫优势的 T-细胞抗原决定簇不一定在同一种类的另一个个体中具有免疫优势，尽管它能够在后者中与 MHC-II 分子结合。因此，对于本发明的目的，一个免疫优势的 T-细胞抗原决定簇是当出现抗原时将有效地提供 T-细胞帮助的 T-细胞抗原决定簇。典型地，免疫优势 T-细胞抗原决定簇具有一个固有的特征，即不论其存在部位，它们将总是基本上表现出与一个 MHC II 型分子结合在一起。

另一个重要论点是 T-细胞抗原决定簇的 MHC 限制问题。一般地，天然存在的 T-细胞抗原决定簇是 MHC 限制的，即构成 T-细胞抗原决定簇的某个肽将仅与一个 II 型 MHC 分子亚型有效地结合。这反过来具有这样的作用，在大多数情况下，应用一个特异的 T-细胞抗原决定簇将得到仅在部分群体中有效的疫苗成分，根据该部分的大小，可能有必要在同一个分子中包括更多的 T-细胞抗原决定簇，或可选择地，制备一个多元件疫苗，其中的元件是致淀粉状蛋白产生多肽的变异体，它们因导入的 T-细胞抗原决定簇的性质不同而相互区别。

如果所用 T-细胞的 MHC 限制是完全未知的（例如在免疫接种的动物具有很不明确的 MHC 成分的情况下），那么特定疫苗成分覆盖的群体分数可以通过下面的公式确定：

$$n$$

$$f_{population}=1-\prod_{i=1}(1-p_i) \qquad (II)$$

其中 $p_i$ 是群体中对疫苗成分中存在的第 $i$ 个外源 T-细胞抗原决定簇发生反应者的频率，n 是疫苗成分中外源 T-细胞抗原决定簇的总数目。于是，含 3 个外源 T-细胞抗原决定簇的疫苗成分在群体中分别有 0.8、0.7 和 0.6 的反应频率，将产生

1－0.2×0.3×0.4＝0.976

即，群体中的 97.6%将在统计学上发动 MHC-II 介导的对疫苗的反应。

上面的公式不能用于已知所用肽的 MHC 限制方式不太精确的情况。如果，例如某个肽仅与 HLA-DR 等位基因 DR1、DR3、DR5 和 DR7 编码的人 MHC-II 分子结合，那么这个肽与另一种能与由人体白细胞 D 抗原相关抗原（HLA-DR）等位基因编码的其余 MHC-II 分子结合的肽将在所述群体完成 100%的覆盖。同样地，如果第二个肽仅结合 DR3 和 DR5，添加此肽将根本不能增加覆盖率。如果纯粹根据疫苗中 T-细胞抗原决定簇的 MHC 限制计算群体反应，一个特定疫苗成分覆盖的群体分数可以通过下面的公式确定：

$$f_{population}=1-\prod_{j=1}^{3}(1-\Phi_j)^2 \qquad (III)$$

——其中 $\Phi_j$ 是编码 MHC 分子的等位基因单倍体群体中发生频次的总和，MHC 分子与疫苗中的任何一个 T-细胞抗原决定簇结合并属于 3 个已知的人体白细胞抗原（HLA）位点（DP、DR 和 DQ）中的第 $j$ 个；实际上，首先确定哪个 MHC 分子将识别疫苗中的每个 T-细胞抗原决定簇，其后按类型（DP、DR 和 DQ）列表—然后，对每个类型总计列入表内的不同等位基因单倍体的单独频率，由此产生 $\Phi_1$、$\Phi_2$和 $\Phi_3$。

可能发生公式 II 中的 $p_i$ 值超过相应的理论 $p_i$ 值：

$$\pi_i=1-\prod_{j=1}^{3}(1-\nu_j)^2 \qquad (IV)$$

——其中 $v_j$是编码 MHC 分子的等位基因单倍体群体中发生频次的总和，MHC 分子与疫苗中的第 $i$ 个 T-细胞抗原决定簇结合并属于 3 个已知的 HLA 位点（DP、DR 和 DQ）中的第 $j$ 个。这意味着群体的 1－$p_i$是 $f_{residual_i}=(p_i-p_i)/(1-p_i)$ 的反应频率。因此，公式 III 可以调整以产生公式 V：

$$f_{population}=1-\prod_{j=1}^{3}(1-\phi_j)^2+\left(1-\prod_{i=1}^{n}(1-f_{residual_i})\right) \qquad (V)$$

——如果是阴性，其中术语 1－$\Phi_{residual-i}$被设为 0。应当注意到，公式 V 需要所有的抗原决定簇已经对照同批单倍体绘制了单倍体图谱。

因此，在选择要导入类似物中的 T-细胞抗原决定簇时，重要的是包括可获得的有关该抗原决定簇的所有知识：1）群体中对每个抗原决定簇的反应频率，2）MHC 限制数据，和 3）相关单倍体群体中的频率。

有许多天然存在的“混杂”T-细胞抗原决定簇，它们在一个动物种类或动物群体的大部分个体中有活性，这些被优选导入疫苗中，从而减少了在同一疫苗中需要有很多不同类似物。

根据本发明，混杂的抗原决定簇可以是天然存在的人 T-细胞抗原决定簇，如来自破伤风毒素（如 P2 和 P30 抗原决定簇）、白喉毒素、流感病毒血凝素（HA）和 *P. falciparum* CS 抗原的抗原决定簇。

在这些年，已经确定了许多其它混杂的 T-细胞抗原决定簇。特别是已经确定了能够与大部分由不同 HLA-DR 等位基因编码的 HLA-DR 分子结合的肽，这些都是有可能导入按本发明应用的类似物中的 T-细胞抗原决定簇。也参看下面文献中讨论的抗原决定簇，它们在此均汇编为参考文献：WO 98/23635(Frazer IH 等人，转让给昆士兰大学)；Southwood S 等人，1998，J.Immunol.160:3363-3373;Sinigaglia F 等人，1998，Nature 336:778-780;Chicz RM 等人，1993，J.Exp.Med 178:27-47;Hammer J 等人，1993，Cell 74:197-203;和 Falk K 等人，1994，Immunogenetics 39:230-242。最后面的文献也涉及 HLA-DQ 和 -DP 配体。所有列在这 5 篇文献中的抗原决定簇作为要用在本发明中的

天然抗原决定簇的候选者是相关的，与这些抗原决定簇具有共同模体（基序）的抗原决定簇也是如此。

可选择地，抗原决定簇可以是能够结合大部分 II 型 MHC 分子的任何人工 T-细胞抗原决定簇。在本文中，WO 95/07707 和相应论文 Alexander J 等人，1994，Immunity 1:751-761(将两个公开文献均以参考文献汇编于此)中描述的泛 DR 抗原决定簇肽（“PADRE”）是引人关注的能按本发明应用的抗原决定簇候选者。应当注意到，在这些文章中公开的大多数有效 PADRE 肽在 C-和 N-末端携带 D-氨基酸，以改善施用施用时的稳定性。然而，本发明的主要目的是掺入相关的抗原决定簇，作为修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的一部分，它们应当随后在 APC 的溶酶体腔中被酶性分解，接着使之呈递在 MHC-II 分子范围内，因此，在本发明中使用的抗原决定簇内掺入 D-氨基酸是不利的。

一个特别优选的 PADRE 肽是具有 AKFVAAWTLKAAA 氨基酸序列者或其免疫学有效的子序列。它和其它具有同样 MHC 限制缺陷的抗原决定簇是优选的 T-细胞抗原决定簇，应当存在于本发明方法使用的类似物中。这种超混杂的抗原决定簇将用于进行本发明最简单的实施例，该实施例中仅有一个单一修饰的致淀粉状蛋白产生多肽被呈递给免疫接种动物的免疫系统。

如上所述，对致淀粉状蛋白产生多肽的修饰也可以包括导入将修饰的致淀粉状蛋白产生多肽导向到 APC 或 B-淋巴细胞的第一部分。例如，该第一部分可以是 B-淋巴细胞特异的表面抗原或 APC 特异表面抗原的特异性结合成分。许多这种特异的表面抗原是本领域已知的。例如，该部分可以是在 B-淋巴细胞或 APC 上具有受体的碳水化合物（如甘露聚糖或甘露糖）。可选择地，第二部分可以是一个半抗原。特异地识别 APC 或淋巴细胞上的表面分子的抗体片段也可以被用作第一部分（表面分子可以是例如巨噬细胞和单核细胞的 FCγ 受体，如 Fcγ RI，或可选择的任何其它特异性表面标记如 CD40 或 CTLA-4)。应当注意到，所有这些举例说明的导向分子也可以被用作佐剂的一部分，参看下面。

作为将修饰的致淀粉状蛋白产生多肽导向到某个细胞类型以获得免疫反应增强的备选或补充物，有可能通过将上面提到的刺激免疫系统的第二部分包括在内来提高免疫系统的应答水平。这种第二部分的

典型实例是细胞因子和热休克蛋白或分子成分，及其有效部分。

本发明所使用的适合的细胞因子是那些也通常在疫苗组合物中作为佐剂者，即，例如干扰素 γ（IFN-γ）、白介素 1（IL-1）、白介素 2（IL-2）、白介素 4（IL-4）、白介素 6（IL-6）、白介素 12（IL-12）、白介素 13（IL-13）、白介素 15（IL-15）和粒细胞一巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）；可选择地，细胞因子分子的功能部分可能足以作为第二部分。关于应用这种细胞因子作为佐剂物质参看下面的讨论。

按照本发明，用作第二部分的适合的热休克蛋白或分子成分可以是 HSP70、HSP90、HSC70、GRP94（也通称 gp96，参看 Wearsch PA 等人，1998，Biochemistry 37:5709-19）和 CRT（钙网蛋白）。

可选择地，第二部分可以是一个毒素，如李斯特氏菌溶胞素(LLO)、脂质 A 和热不稳定肠毒素。许多分枝杆菌衍生物如 MDP(胞壁酰二肽)、CFA(完全弗氏佐剂)和海藻糖二酯 TDM 和 TDE 也有令人关注的可能性。

本发明的又一个重要实施例是导入一个增强修饰的致淀粉状蛋白产生多肽呈递到免疫系统的第三部分的可能性。本领域已有几个此原理的实例。例如，已知布氏疏螺旋体蛋白 OspA 中的棕榈酰脂化锚可以被用来提供自辅多肽（参看，如 WO 96/40718）——看起来脂化蛋白成为胶粒样结构，它具有由多肽脂化锚部分组成的核心和从该核心中突出的该分子的其它部分，产生了多抗原决定簇外观。因此，本发明优选的实施例是应用此方法和使用不同脂化锚（如肉豆寇基、肉豆寇基、法呢基、香叶基一香叶基、糖基磷脂酰肌醇固着物和 N-酰基甘油二酯基）的相关方法，特别是因为在重组产生的蛋白中这种脂化锚的供应相当直接，且仅需要应用如天然存在的信号序列作为修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的融合伙伴。另一个可能性是应用补体因子 C3 的 C3d 片段或 C3 本身（参看 Dempsey 等人，1996，Science 271,348-350 和 Lou & Kohler,1998,Nature Biotechnology 16,458-462）。

导致将致淀粉状蛋白产生多肽的重要抗原决定簇区的多个（如至少 2 个）拷贝呈递到免疫系统的本发明的一个可选择的实施例是致淀粉状蛋白产生多肽淀粉状蛋白、子序列或其变异体共价偶联到某分子上。例如，可以使用多聚物，如像葡聚糖的碳水化合物，参看例如 Lees A 等人，1994，Vaccine 12:1160-1166; Lees A 等人，1990,J

Immunol. 145:3594-3600，但甘露糖和甘露聚糖也是有用的替代者。来自例如大肠杆菌和其它杆菌的完整膜蛋白也是有用的偶联成分。传统的载体分子如钥孔血蓝蛋白（KLH）、破伤风类毒素、白喉类毒素和牛血清白蛋白（BSA）也是优选和有用的偶联成分。

将淀粉状蛋白产生多肽共价偶联到如碳水化合物的多羟基聚合物上的优选实施例，涉及应用至少一种致淀粉状蛋白产生多肽，和至少一种单独偶联到多羟基聚合物上的外源 T－辅助细胞抗原决定簇（即外源 T－辅助细胞抗原决定簇不与致淀粉状蛋白产生多肽相互融合，而结合到后来作为载体主干的多羟基聚合物上）。此外，当携带致淀粉状蛋白产生多肽区的适合 B-细胞抗原决定簇通过短肽段构建时，这种实施例是最优选的——因为此方法是一种在得到的免疫原制剂中获得所选抗原决定簇多个外观的非常方便的方法。

特别优选的是，外源 T－辅助细胞抗原决定簇与致淀粉状蛋白产生（多）肽的偶合是依靠酰胺键的，该键可以被肽酶裂解。此方法有这样的效果，即 APC 将能够摄取偶合物同时处理偶合物，随后将外源 T－细胞抗原决定簇呈递在 II 型 MHC 范围内。

实现肽的偶合（既有致淀粉状蛋白产生多肽又有外源抗原决定簇）的一个方法是用 tresyl 基团激活一个适合的多羟基聚合物；例如有可能如 WO 00/05316 和 US 5,874,469（均在此汇编为参考文献）所描述的制备 tresyl 化的多糖，并将其与致淀粉状蛋白产生多肽和采用传统固相或液相肽合成技术制备的 T－细胞抗原决定簇偶合。得到的产物含有多羟基聚合物主干（如葡聚糖主干），致淀粉状蛋白产生多肽和外源 T－细胞抗原决定簇以其 N-末端或其它可利用的氮部分附着在其上。如果需要，也可能合成致淀粉状蛋白产生多肽以保护除 N-末端一个氨基以外所有可利用的氨基，然后将得到的被保护肽与 tresyl 化葡聚糖部分偶合，并最终去除偶合物的保护。此方法的一个特殊实例描述于下面的实施例中。

代替应用如 WO 00/05316 和 US 5,874,469 中讲授的水溶性多糖分子，应用交联的多糖分子是同样可能的，由此在多糖和多肽间获得一个特别的偶合物——据信引起多糖呈递到免疫系统的改善，因为达到了两个目的，即当注射偶合物时获得局部沉积效果，并得以成为 APC

有吸引力的靶标颗粒。应用这种颗粒系统的方法也在实施例中详细描述。

在致淀粉状蛋白产生多肽中选择导入修饰的区域时要考虑的是：a)保存已知的和预计的 B-细胞抗原决定簇，b)保存四级结构，c)避免 B-细胞抗原决定簇出现在“发生细胞”上等。无论如何，如上所述，筛选一组已全部在不同部位插入了 T-细胞抗原决定簇的修饰致淀粉状蛋白产生分子是相当容易的。

由于本发明最优选的实施例涉及人 Aβ 的下调，因此优选地上面讨论的致淀粉状蛋白产生多肽是人 Aβ 多肽。在此实施例中，特别优选的是人致淀粉状蛋白产生多肽已经被至少一个相等或不同长度并含有外源 $T_H$ 抗原决定簇的氨基酸序列在 SEQ ID NO：2 中取代至少一个氨基酸序列而修饰。修饰的致淀粉状蛋白产生的 APP 和 Aβ 的优选实例图解地显示于图 1 中，以 P2 和 P30 抗原决定簇为例。这种结构所依据的基本原理将在实例中详细讨论。

更特别地，被导入 SEQ ID NO:2 中的含 $T_H$（或完整的）氨基酸序列可在 SEQ ID NO:2 中的任何氨基酸处导入。即，导入可能在 1—770 氨基酸的任何一个之后，但优选地在 SEQ ID NO:2 中的下面任何氨基酸之后：671，672，673，674，675，676，677，678，679，680，681，682，683，684，685，686，687，688，689，690，691，692，693，694，695，696，697，698，699，700，701，702，703，704，705，706，707，708，709，710，711，712，713 和 714。这可与删除 1—671 氨基酸的任一或全部或删除 715-770 氨基酸的任一或全部相结合。进一步，当应用取代技术时，SEQ ID NO:2 中的下列氨基酸的任何一个结合导入可被删除：671，672，673，674，675，676，677，678，679，680，681，682，683，684，685，686，687，688，689，690，691，692，693，694，695，696，697，698，699，700，701，702，703，704，705，706，707，708，709，710，711，712，713 和 714。

致淀粉状蛋白产生多肽和修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的配方

当致淀粉状蛋白产生多肽或修饰的致淀粉状蛋白产生多肽通过给动物注射有效地呈递到动物免疫系统时，多肽的配方遵循本领域一般公认的原理。

含有肽序列作为活性成分的疫苗的制备通常为本领域所熟知，如美国专利 4,608,251； 4,601,903； 4,599,231;4,599,230;4,596,792; 和 4,578,770 所举例说明的，在此全部汇编为参考文献。典型地，这种疫苗被制备成可注射的液体溶液或悬液；也可以制备成适合在注射前溶解或悬浮在液体中的固体形式。制剂也可以是乳化的。活性免疫原成分通常与药物学可接受的且可与活性成分配伍的赋形剂混和。适合的赋形剂是，例如，水、盐水、葡萄糖、甘油、乙醇或其类似物，以及它们的组合物。此外，如果需要，疫苗可含有较少量辅助物质如湿润剂或乳化剂、pH 缓冲剂或增加疫苗有效性的佐剂；参看下面佐剂的详细讨论。

疫苗常规地是胃肠外施用的，例如通过皮下、皮内、真皮下、真皮内或肌肉内注射。适合其它施用方式的另外配方包括栓剂，在某些情况下为口服、口腔、舌下、腹膜内、阴道内、肛门、硬膜外、脊髓和颅内配方。对于栓剂，传统的粘合剂和载体可包括例如，聚亚烷基二醇或甘油三酯；这种栓剂可由含 0.5%～10%，优选 1—2%活性成分的混合物制成。口服配方包括这种通用的赋形剂如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物表现为溶液、悬液、片、小丸、胶囊、持续释放制剂或粉剂形式，并含有 10—95%，优选 25—70%的活性成分。对于口服配方，霍乱毒素是令人关注的配方成分（也是一个可能的偶合成分）。

多肽可被制成中性或含盐疫苗。药物学可接受的盐包括酸加成盐（与肽的游离氨基形成），它是与无机酸如盐酸或磷酸形成的，或与有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成的。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱如钠、钾、铵、钙或铁的氢氧化物，以及这样的有机碱如异丙胺、三甲胺、2—乙胺基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等。

疫苗以符合剂量处方的方式施用，以将会有治疗效果并产生免疫性的剂量施用。要给予的量有赖于要治疗的对象，包括，例如个体免疫系统进行免疫反应的能力以及所需要的防护程度。适合的剂量范围达到每次接种数百微克活性成分的水平，优选的范围大约为 0.1μg～2,000μg（即使考虑在 1—10mg 范围的较高剂量），如大约 0.5μg～1,000μg 的范围，优选的范围从 1μg 到 500μg，特别是大约 10μg

到 100μg 的范围。适合的初始施用和加强注射方案也是可以变化的，但以开始施用接着后续接种或其它施用为代表。

应用的方式是可广泛变化的。任何常规的给予疫苗的方法均可应用。这些包括以生理学可接受的固体成分或生理学上可接受的分散体的形式口服施用，或通过注射或类似方式进行非肠道施用。疫苗的剂量将有赖于施用的途径，并根据受接种者的年龄和抗原的处方而变化。

疫苗的某些多肽是足以在一个疫苗中产生免疫性的，而对某些其它多肽，如果疫苗进一步包含一个佐剂物质将会增强免疫反应。

已知有多种获得疫苗佐剂作用的方法。一般的原理和方法细述于“The Theory and Practical Application of Adjuvants”（佐剂的理论和实际应用），1995，Duncan E. S. Stewart-Tull（编辑），John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-95170-6，也见于“Vaccines: New Generation Immunological Adjuvants”（疫苗：新一代免疫学佐剂），1995, Gregoriadis G 等人（编辑），Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9，两者均在此合并为参考文献。

特别优选地应用一个显示能够加速中止对自体抗原的自动耐受性的佐剂；事实上，在未修饰的致淀粉状蛋白产生多肽被用作自体疫苗中活性成分的情况下，这是必需的。适合佐剂的非限制性实例选自：免疫靶向佐剂；免疫调节佐剂如毒素、细胞因子、和分枝杆菌衍生物；油配方；聚合物；胶粒形成佐剂；皂甙；免疫激发复合基质（ISCOM基质）；颗粒；DDA；铝佐剂；DNA 佐剂；γ－菊糖；及佐剂。通常应当注意到，上面公布的涉及在类似物中用于第一、第二和第三部分的化合物和试剂，也涉及它们在用于本发明疫苗的佐剂时加以必要的变更。

佐剂的应用包括，使用如氢氧化铝或磷酸（铝）试剂，通常以 0.05～0.1％缓冲盐溶液使用，以 0.25％溶液使用的与糖的合成聚合物形成的掺和物（如 Carbopol ），通过温度范围为 70° 到 101℃、分别经过 30 秒到 2 分钟的热处理凝集疫苗中的蛋白，，通过交联剂凝集也是可能的。用作区段替代物，也可以使用通过与胃蛋白酶处理的抗体（Fab 片段）的反应凝集到白蛋白上，与细菌细胞如小棒杆菌或革兰氏阴性杆菌的内毒素或脂多糖成分混和，在生理学上可接受的油载体如二缩甘露醇单油酸酯（Aracel A）中乳化，或者用 20％的全氟化碳（Fluosol-DA）

溶液乳化。也优选与油如角鲨烯和 IFA 混合。

按照本发明，DDA（溴化二甲基双十八基铵）同 DNA 和 γ－菊糖一样是令人关注的佐剂候选者，而且，弗氏完全和不完全佐剂以及 *quillaja* 皂甙如 QuilA 和 QS21 同 RIBI 一样是令人关注的。进一步有可能性的是单磷酰脂质 A（MPL）、上面提到的 C3 和 C3d、和胞壁酰二肽（MDP）。

已知脂质体制剂也具有佐剂作用，因此按照本发明脂质体佐剂是优选的。

免疫激发复合基质型（ISCOM 基质）佐剂也是按照本发明的优选选择，特别是已经发现此型佐剂能够上调抗原呈递细胞的 II 型 MHC 表达。ISCOM 基质由来自 *Quillaja 肥皂草*的（可选择性分馏的）皂甙（三萜系化合物）、胆固醇、和磷脂组成。在与免疫原蛋白混和时，得到的颗粒状制剂即是已知的 ISOCM 颗粒，其中皂甙构成以重量比计占 60-70％，胆固醇和磷脂以重量比计占 10-15％，蛋白以重量比计占 10-15％。有关免疫激发复合物的组成和应用的细节可以在例如上面提到的研究佐剂的教科书中发现，而且，Morein B 等人，1995，Clin.Immunother.3:461-475 以及 Barr IG 和 Mitchell GF，1996，Immuno.and Cell Biol.74:8-25（均在此合并为参考文献）提供了制备完全免疫激发复合物的有用指导。

另一个高度关注的（因此，也是优选的）获得佐剂效果的可能性是应用 Gosselin 等人 1992 年描述的技术（在此合并为参考文献）。简单地说，如本发明抗原的相应抗原可以通过将该抗原与抗单核细胞/巨噬细胞上的 Fcγ 受体的抗体（或抗原结合抗体的片段）结合而增强呈递。抗原和抗 FcγRI 间的特殊偶合物已经显示出增强了以免疫接种为目的的免疫原性。

其它可能性涉及使用上面提到的靶向和免疫调节物质（即细胞因子）作为致淀粉状蛋白产生多肽的修饰形式的第一和第二部分的候选者。在这一点上，细胞因子的合成诱导剂如多聚 I:C 也是可能的。

适合的分枝杆菌衍生物选自：胞壁酰二肽、完全弗氏佐剂、RIBI、和海藻糖二酯如 TDM 和 TDE。

适合的免疫靶向佐剂选自：CD40 配体和 CD40 抗体或其特异性的结

合片段（参看上面讨论的）、甘露糖、Fab 片段、和 CTLA-4。

适合的聚合物佐剂选自：碳水化合物如葡聚糖、PEG、淀粉、甘露聚糖和甘露糖；塑料聚合物；和胶乳如胶乳珠。

还有另一个令人注目的调节免疫反应的方式是在一个“虚拟淋巴结”（VLN）（一种专利医用装置，由 ImmunoTherapy 公司开发，360 Lexington Avenue, New York, NY 10017-6501）中包含免疫原(可选择地与佐剂和药理学可接受的载体和运载工具结合在一起)。VLN（一个细管状装置）模拟淋巴结的结构和功能。在皮下插入 VLN 产生了一个伴有细胞因子和趋化因子急剧上升的无菌性炎症部位。T-和 B-细胞以及抗原呈递细胞迅速对危险信号反应，募集到炎症部位并聚集到 VLN 的多孔基质内。已经显示，当应用 VLN 时，诱发对抗原的免疫反应所需要的必需抗原的剂量减少了，且用 VLN 免疫接种具有的免疫防护作用超过传统的用 Ribi 作佐剂的免疫作用。此技术即简要地描述于 *Gelber C* 等人，1998 年，“Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of Immunogens Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node”（用一个命名为虚拟淋巴结的新医用装置激发对小量免疫原的强大细胞和体液免疫反应)中，见：“From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts”（从实验室到临床，摘要卷),1998 年 10 月 12—15 日，Seascape Resort, Aptos, California”。

疫苗的微粒制剂已经在很多情况下显示可增加蛋白抗原的免疫原性，因而成为本发明的另一个优选的实施例。微粒被制成抗原与聚合物、脂质、碳水化合物或其它适合制备颗粒的共同制剂，或者微粒可以是仅由抗原本身组成的均质颗粒。

以聚合物为基础的微粒实例是以 PLGA 和 PVP 为基础的颗粒(Gupta, R.K.等人，1998)，其中聚合物和抗原浓缩在一个固体颗粒中。脂质为基础的颗粒可被制成其中俘获了抗原的脂质胶粒（所谓的脂质体）（Pietrobon, P.J. 1995)。碳水化合物为基础的颗粒典型地由适合的可降解碳水化合物组成，例如淀粉或脱乙酰壳多糖。碳水化合物和抗原以与用于聚合物颗粒相似的步骤混和并浓缩在颗粒中（Kas, H.S.等人 1997)。

仅由抗原组成的颗粒可用各种喷雾和冻干技术制造。特别适合本发明用途的是超临界流体技术，它被用来产生非常一致的可控大小的颗粒（York, P. 1999 & Shekunov, B. 等人，1999）。

预计疫苗应当每年给予 1—6 次，例如给需要这种疫苗的个体一年给予 1、2、3、4、5、或 6 次。已经明显地显示，通过应用按本发明优选的自体疫苗而诱导的记忆免疫性是不持久的，因此免疫系统需要定期地用致淀粉状蛋白产生多肽或修饰的致淀粉状蛋白产生多肽激发。

由于遗传性变异，不同的个体可能对同一种多肽以不同强度发生免疫反应。因此，本发明所述的疫苗可包括几种不同的多肽以增加免疫反应，也参看上面有关外源 T-细胞抗原决定簇导入的选择的讨论。疫苗可包括两种或多种多肽，其中所有的多肽如上面所规定的。

因此疫苗可包括 3—20 种不同的、修饰的或未修饰的多肽，如 3—10 种不同的多肽。

核酸接种

作为经典的以肽为基础的疫苗施用的可替代方法，核酸接种技术（通常也被称为“核酸免疫作用”、“遗传免疫作用”和“基因免疫作用”）提供了许多有吸引力的特征。

首先，同传统的疫苗方法相比，核酸接种不需要大规模生产免疫原药剂所消耗的资源（如以工业规模发酵微生物的形式生产修饰的致淀粉状蛋白产生多肽）。进一步，不需要免疫原纯化和重折叠过程的装置。最后，由于核酸接种依靠被接种个体的生化器官以产生导入核酸的表达产物，预期要发生表达产物最佳的翻译后过程；这在自体接种的情况下是特别重要的，因为，如上所述，原始 B-细胞抗原决定簇的一个重要部分应当被保存在修饰的分子中，并且由于 B-细胞抗原决定簇原则上可由任何（生物）分子（如碳水化合物、脂质、蛋白等）部分组成。因此，免疫原的天然糖基化和脂质化方式对整体免疫原性可以是非常重要的，这一点通过使宿主产生免疫原可最好地予以保证。

因此，本发明的一个优选实施例包括，通过将编码修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的核酸导入动物细胞，并由此获得导入核酸的细胞的体内表达，而有效地将修饰的致淀粉状蛋白产生多肽呈递给免疫系统。

在此实施例中，导入的核酸优选的是 DNA，其形式可以是：裸露

DNA，与带电荷或无电荷脂质配伍的 DNA，在脂质体中配伍的 DNA，包括在病毒载体中的 DNA，与转染促进蛋白或多肽配伍的 DNA，与一个靶向蛋白或多肽配伍的 DNA，与钙沉淀试剂配伍的 DNA，与一个惰性载体分子耦合的 DNA，包封在聚合物中的 DNA，如在 PLGA（参看在 WO 98/31398 中描述的微囊包封技术）中或在甲壳质或脱乙酰壳多糖中，和与佐剂配伍的 DNA。在本文中注意到，几乎所有与在传统疫苗配方中应用佐剂有关的考虑均适用于 DNA 疫苗的配方。因此，这里公布的所有涉及以多肽为基础的疫苗中佐剂的应用，加以必要的变更，适用于其在核酸接种技术中的应用。

关于上面已经细述的施用途径和以多肽为基础的疫苗施用方案，也可应用于本发明的核酸疫苗，且上面所有关于多肽施用途径和施用方案的讨论加以必要的变更也适用于核酸。对此应当加上，核酸疫苗可以适合静脉内和动脉内施用。进一步，本领域熟知，核酸疫苗可以用所谓的基因枪施用，因此它和相当的施用模式也被认为是本发明的一部分。最后，在给予核酸时使用 VLN 也被报道产生了好的结果，因此这个特别的施用模式是特别优选的。

此外，用作免疫作用药剂的核酸可以含有编码第一、第二和/或第三部分的区域，例如以上面描述的免疫调节物质的形式，诸如讨论用作佐剂的细胞因子。本实施例的一个优选模式包括含有类似物的编码区和在不同的读取框内或至少在不同的启动子控制下，含有免疫调制剂的编码区。因此避免了类似物或抗原决定簇作为免疫调制剂的融合成分而产生。可选择地，可以使用两个不同的核苷酸片段，但这不太优选，因为当两个编码区包括在同一个分子中时有保证共同表达的优势。

据此，本发明也涉及诱导抗致淀粉状蛋白产生多肽的抗体产生的组合物，该组合物包括：

——本发明的核酸片段或载体（参看下面载体的讨论），和

——如上讨论的药理学和免疫学上可接受的运载工具和/或载体和/或佐剂。

在一般情况下，编码变异体的核酸以载体的形式被导入，其中的表达是在病毒启动子的控制之下。对于本发明所述载体的更详细的讨

论参看下面的讨论。关于核酸疫苗的配方和应用的详细公开资料也可获得，参看 Donnelly JJ 等人，1997，Annu. Rev. Immunol. 15:617-648 和 Donnelly JJ 等人，1997，Life Sciences 60:163-172。这两个文献均在此合并为参考文献。

活疫苗

第三个可选择的将修饰的致淀粉状蛋白产生多肽有效呈递到免疫系统的方法是应用活疫苗技术。在活体疫苗接种中，通过给予动物一个非致病微生物而有效地呈递到免疫系统，其中该微生物已经被用编码修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的核酸片段或掺入了这种核酸片段的载体转化。非致病微生物可以是任何适合的减毒细菌株（通过传代或通过采用重组 DNA 技术移除致病表达产物而减毒），如牛分枝杆菌结核菌苗、非致病链球菌亚种、大肠杆菌、沙门氏菌亚种、霍乱弧菌、志贺氏菌属等。关于最新的活疫苗制备的综述可见于，例如 Saliou P, 1995, Rev. Prat. 45: 1492-1496 和 Walker PD, 1992, Vaccine 10:977-990，两者在此合并为参考文献。关于这种活疫苗中所用的核酸片段和载体的细节参看下面的讨论。

作为细菌活疫苗的替代，下面讨论的本发明的核酸片段可以整合进一个无毒的病毒疫苗载体中，如牛痘株或任何其它适合的痘病毒。

通常，非致病微生物或病毒仅给予动物一次，但在某些情况下，可能有必要在一生中超过一次地给予微生物以维持保护性免疫性。甚至可以考虑，在应用活的或病毒疫苗时，如上面细述的多肽接种的免疫作用方案将是有用的。

可选择地，活的或病毒接种与其前或其后的多肽和/或核酸接种相结合。例如，有可能用活的或病毒疫苗引起初级免疫作用，随后用多肽或核酸方法继发增强的免疫作用。

微生物或病毒可以用核酸转化，该核酸含有编码第一、第二和/或第三部分的区域，如以上面描述的免疫调节物质的形式，如讨论的作为有用佐剂的细胞因子。本实施例的一个优选模式包括含有类似物的编码区和在不同的读取框内或至少在不同的启动子控制下，含有免疫调制剂的编码区。因此避免了类似物或抗原决定簇作为免疫调制剂的融合成分而产生。可选择地，可以使用两个不同的核苷酸片段作为转

化剂。当然，在同一个读取框内具有第一和/或第二和/或第三部分可以提供作为一个表达产物、一个本发明的类似物，且按照本发明，这种实施例是特别优选的。

在疾病治疗中使用本发明的方法

如从上面讨论中会理解到的，本发明的方法的提供可控制以淀粉状蛋白沉积物为特征的疾病。在这种情况下，AD 是本发明方法的关键靶位，而且其它以淀粉状蛋白沉积物为特征的疾病也是可能的靶位。因此，本发明方法下调淀粉状蛋白活性的一个重要实施例包括治疗和/或预防和/或缓解 AD 或其它以淀粉状蛋白沉积为特征的疾病，该方法包括根据本发明方法下调淀粉状蛋白以至使淀粉状蛋白明显地降低。

特别优选的是淀粉状蛋白的减少可引起淀粉状蛋白形成和淀粉状蛋白降解/清除之间平衡的逆转，即淀粉状蛋白降解/清除的速率超过淀粉状蛋白形成的速率。通过谨慎控制具有这种需求的个体的免疫作用的次数和免疫学影响，将可能随着时间的推移获得一种平衡，使淀粉状蛋白沉积物发生净减少而没有过多的副作用。

可以选择的是，如果在一个个体中本发明方法不能清除或减少已存在的淀粉状蛋白沉积物，本发明的方法可被用来在临床上明显地减少新淀粉状蛋白的形成，因此显著延长了疾病不发生恶化的时间。通过测定血清中淀粉状蛋白的浓度(据信与沉积物质是相平衡的)，或通过采用正电子发射体层摄影技术(PET)扫描，参看 Small GW 等，1996，Ann N Y Acad Sci 802:70-78，应该能监测淀粉状蛋白沉积的速率。

本手段和方法和途径可以以相似的方式治疗或缓解的其它疾病和状态已经在前面所述的“发明背景”中提及(系统性淀粉样变性、成熟期突发型糖尿病、帕金森病、亨廷顿病、额一颞痴呆和朊病毒相关传播性海绵状脑病)，或在下面 以“其它淀粉样疾病及其相关蛋白” 为标题的章节中列举。

肽类、多肽以及本发明的组合物

如从上面讨论中明显表明的，本发明是基于用致淀粉状蛋白产生抗原免疫机体的构想，以便减少病理学上相关的淀粉状蛋白沉积物的量。获得这种免疫作用的优选途径是采用致淀粉状蛋白产生多肽的修饰体，从而产生了本领域以前没有公开过的分子。

据信，在此所讨论的修饰分子就其本身而言是独创的，因此本发明的一个重要部分是关于一种来自一种动物致淀粉状蛋白产生多肽的类似物，其中被引入一种修饰作用，这种修饰作用的结果是用该类似物免疫该动物可产生特异地与未修饰的致淀粉状蛋白产生多肽反应的抗体。优选的是，当讨论本发明方法的多种实施例并采用修饰的致淀粉状蛋白产生多肽时，修饰作用的特性符合上面所述的修饰作用的类型。因此，任何关于修饰的致淀粉状蛋白产生分子的在此公开内容与描述的本发明所述致淀粉样产生蛋白类似物的目的是有关联的，任何这样的公开内容加以必要的更改适用于描述这些类似物。

应该注意的是，优选的修饰的致淀粉状蛋白产生分子包括一些修饰作用，可产生一种与致淀粉蛋白产生蛋白或其至少 10 个氨基酸长度的子序列有至少 70%序列同一性的多肽。优选更高的序列同一性，如至少 75%或甚至至少 80%、85%、90%或 95%。蛋白和核酸的序列同一性可以用 $(N_{ref}-N_{dif})\cdot 100/N_{ref}$ 来计算，其中 $N_{dif}$ 是当对齐时两个序列中非相同残基的总数目，其中 $N_{ref}$ 是序列之一的残基数目。因此，DNA 序列 AGTCAGTC 与序列 AATCAATC($N_{dif}$=2 和 $N_{ref}$=8)具有 75%的序列同一性。

本发明也关于实施本发明方法中所用的组合物。因此，本发明也涉及一种包括免疫学有效量的一种对致淀粉状蛋白产生多肽的免疫原性组合物淀粉状蛋白，所述的致淀粉状蛋白产生多肽是一种动物的自体蛋白，与免疫学可接受的佐剂配伍在一起，以便打破动物针对致淀粉状蛋白产生多肽的自体耐受性，该组合物进一步包括一种药学和免疫学上可接受的稀释剂和/或运载工具和/或载体和/或赋形剂。换句话说，本发明的这一部分是关于天然存在的致淀粉状蛋白产生多肽的配制，它与本发明方法的实施例一起进行了描述。

本发明也涉及一种免疫原的组合物，它包括免疫学上有效量的上面定义的类似物，所述的组合物进一步包括药学和免疫学上可接受的稀释剂和/或媒介和/或载体和/或赋形剂，以及可选的一种佐剂。换句话说，本发明的这一部分是关于修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的配制，基本上如上所述。因此当提到在本发明方法中用来下调淀粉状蛋白的修饰和未修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的配制时，佐剂、载体和媒介的选择相应的是与上面所讨论的保持一致。

多肽是根据本领域已知的方法来制备的。较长的多肽通常是通过重组基因技术来制备的，该技术包括将一个编码类似物的核酸序列引入一个合适的载体中，用载体转化一种合适的宿主细胞，通过宿主细胞来表达核酸序列，从宿主细胞或其培养物上清液中回收表达产物，然后进行纯化及进一步进行可选择的修饰作用，如重折叠或衍生化作用。

较短的肽类优选通过已知的固相或液相肽合成技术来制备。但是，最近这种技术的进展已经可能通过这种技术产生全长的多肽和蛋白，因此通过合成方法来制备长的构建物也是在本发明的范围之内的。

本发明的核酸片段和载体

从上面的公开内容中可以理解到的是：修饰的致淀粉状蛋白产生多肽可以通过多种重组基因技术来制备，也可以通过化学合成或半合成的方法来制备；当修饰作用包括将蛋白载体(如 KLH, 白喉类毒素，破伤风类毒素，以及牛血清白蛋白)和非蛋白分子如糖类聚合物偶联到致淀粉状蛋白产生多肽衍生的肽链上时，后面的两种选择是特别相关的，当然当修饰作用包括将一个侧链或侧链基团添加到致淀粉状蛋白产生多肽衍生的肽链上时也是一样。

对于重组基因技术而言，当然也对于核酸免疫作用而言，编码修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的核酸片段是重要的化学产物。因此，本发明的一个重要部分是关于一种核酸片段，它编码一种致淀粉状蛋白产生多肽的类似物，即一种致淀粉状蛋白产生多肽衍生的多肽，它包括已经加入或插入一个融合成分的天然序列，或优选包括一种致淀粉状蛋白产生多肽衍生的多肽，其中已经通过插入和/或加入，优选通过替代和 / 或缺失引入了一个外源 T 细胞抗原决定簇。本发明的核酸片段是 DNA 或 RNA 片段。

本发明的核酸片段正常情况下被插入到一个合适的载体中形成携带本发明核酸片段的克隆载体或表达载体；这样的新载体也是本发明的一部分。关于本发明的这些载体构建物的详细细节将在下面的转化细胞和微生物的章节中讨论。根据应用的目的和类型，载体可以是质粒、噬菌体、粘粒、微型染色体或病毒的形式，仅仅暂时在特定细胞中表达的裸露 DNA 也是一种重要的载体。本发明优选的克隆载体和表

达载体能够自主复制，因而为进行高水平的表达或为随后的克隆进行高水平复制获得很高的拷贝数目。

本发明的载体的基本构造以 5’-3’ 方向和可操作连锁方式包括下列特征：驱动本发明的核酸片段表达的一个启动子，可选择的一个编码一段引导肽的核酸序列，该引导肽促进多肽片段的分泌(进入细胞外相，或当适用时进入周质)或将该多肽片断整合入膜上，本发明的核酸片段，以及可以选择的一个编码终止子的核酸序列。当在生产菌株或细胞系中用表达载体进行操作时，为了保持转化细胞的遗传稳定性，优选载体在进入一个宿主细胞时被整合进宿主细胞基因组中。相反，当使用用来影响动物体内表达的载体进行操作时(即，当在 DNA 接种时使用载体)，出于安全性原因优选载体不能被整合进入宿主细胞基因组中；典型地，可使用裸露的 DNA 或非整合性的病毒载体，其选择是本领域技术人员所熟知的。

本发明的载体可用来转化宿主细胞以产生本发明的修饰的致淀粉状蛋白产生多肽。这样的转化细胞，也是本发明的一部分，可以是培养细胞或细胞系，用来增殖本发明的核酸片段和载体，或用来重组产生本发明的修饰的致淀粉状蛋白产生多肽。可以选择的是，转化细胞可以是合适的活疫苗菌株，其中已经插入了核酸片段(一个单一的或多个拷贝)以影响修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的分泌或对细菌膜或细胞壁的整合作用。

本发明优选的转化细胞是微生物，例如细菌(如埃希杆菌属[如大肠杆菌]，芽孢杆菌属[如枯草芽孢杆菌]，沙门菌属，或分支杆菌属[优选非病原性，如牛分支杆菌结核菌苗])，酵母(如酿酒酵母)，以及原生动物。可以选择的是，转化细胞可以来源于一种多细胞的生物体，如真菌、昆虫细胞、植物细胞或哺乳动物细胞。最优选的是来自于人类的细胞，参看下面对细胞系和载体的讨论。最近的结果显示使用市售果蝇细胞系(可从 Invitrogen 购到的 Schneider 2($S_2$)细胞系和载体系统)在申请者的实验室中具有很大的重组生产多肽的前景，因此特别优选这种表达系统。

为了克隆和/或优化表达，优选转化细胞能够复制本发明的核酸片段。表达核酸片段的细胞是本发明优选的有用的实施例；它们可于小

量或大量制备修饰的致淀粉状蛋白产生多肽，或者在使用非病原性细菌的情况下，可在活疫苗中作为疫苗的组分。

当采用转化细胞的方法产生本发明的修饰分子时，尽管不是必要的，但还是很便利的，表达产物可以被运输至培养基中或携带到转化细胞表面。

当已经鉴定了一种有效的生产细胞时，优选在其基础上建立一种稳定的细胞系，该细胞系携带本发明的载体并表达编码修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的核酸片段。优选地，这种稳定的细胞系分泌或携带本发明的类似物，因此便于其纯化。

一般来说，含有来源于宿主细胞相容物种的复制子和控制序列的质粒载体可用于该宿主。载体一般携带一个复制位点，以及能够在转化细胞中提供筛选显型的标记序列。例如，大肠杆菌一般采用 pBR322 来转化，后者是一个来自一种大肠杆菌种属的质粒(参见，如，Bolivar 等人，1977)。PBR322 质粒含有氨苄青霉素和四环素抗性基因，因此可以为鉴定转化细胞提供很容易的手段。pBR 质粒，或其它微生物质粒或噬菌体也必须含有，或被修饰后含有，可被原核微生物表达使用的启动子。

这些启动子大多数普遍用在重组 DNA 构建物中，包括β-内酰胺酶(青霉素酶)和乳糖启动子系统(Chang 等人，1978；Itakura 等人，1977；Goeddel 等人，1979)，色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel 等人，1979；EP-A-0 036 776)。除了这些被最普遍使用的以外，其它微生物启动子也已经被发现和使用，关于其核苷酸序列的详细情况也已经被发表，从而使专业技术人员能够用质粒载体将它们功能性的连接在一起(Siebwenlist 等人，1980)。来自原核生物的某些基因可能在大肠杆菌中通过其自体的启动子序列而被有效的表达，这就排除了通过人工的方法加入其它启动子的需求。

除了原核生物，可以使用真核微生物，如酵母培养物也可以使用，在此该启动子应该能够驱动表达。酿酒酵母，或普通的面包酵母是真核微生物中最普遍使用的，尽管许多其它的菌株也普遍可以获得。例如，为了在酵母属中进行表达，经常使用质粒 YRp7(Stinchcomb 等人，1979；Kingsman 等人，1979；Tschemper 等人，1980)。这种质粒已经

含有 trp1 基因，该基因可为不能在色氨酸中生长的酵母突变株提供一个选择性标记物，例如 ATCC 44076 或 PEP4-1(Jones，1977)。作为酵母宿主细胞基因组的特征，trp1 区受到破坏的存在使细胞在缺乏色氨酸的环境下的生长为检测转化提供了一个有效的环境。

在酵母载体中合适的启动序列包括 3-磷酸甘油酸激酶(Hitzman 等人，1980)或其它糖分解酶(Hess 等人，1968;Holland 等人，1978)，如烯醇化酶，甘油醛-3-磷酸脱氢酶，己糖激酶，丙酮酸脱羧酶，磷酸果糖激酶，葡萄糖-6-磷酸异构酶，3-磷酸甘油酸变位酶，丙酮酸激酶，磷酸丙糖异构酶，磷酸葡萄糖异构酶，以及糖激酶的启动子。在构建合适的表达载体过程中，与这些基因有关的终止序列也连接入表达载体中，在上述期望表达的序列的 3’端提供 mRNA 多腺苷化和终止作用。

具有生长条件控制转录的又一优点的其它启动子，是乙醇脱氢酶 2，异细胞色素 C，酸性磷酸酶，与氮代谢有关的降解酶，和前面提到的甘油醛-3-磷酸脱氢酶，以及利用麦芽糖和半乳糖的酶的启动区。任何含有酵母相容性启动子，复制起点和终止序列的质粒载体都是合适的。

除微生物以外，来自多细胞生物体的细胞培养物也可作为宿主。原则上，任何这样的细胞培养物均是可使用的，无论是来自脊椎动物或无脊椎动物培养物。但最大的兴趣在脊椎动物细胞，培养的脊椎动物(组织培养)的增殖近年来已经成为一个常规的方法(Tissue Culture(组织培养)，1973)。这种有用的宿主细胞系的实例是 VERO 和 HeLa 细胞，中国仓鼠卵巢细胞系(CHO)，和 W138，BHK，COS-7 293，Spodoptera frugiperda(SF)细胞(可作为完全表达系统从 i.a. Protein Sciences, 1000 Research Parkway, Meriden, CT 06450, 美国以及 Invitrogen 的商业渠道获得)，以及 MDCK 细胞系。在本发明中，一种特别优选的细胞系是可从 Invitrogen，PO Box 2312，9704 CH Groningen，荷兰，获得的 $S_2$。

这些细胞的表达载体通常包括(如果需要)一个复制起点，一个位于要表达的基因前面的启动子，连同任何必需的核糖体结合位点，RNA 剪接位点，多聚腺苷化位点，和转录终止子序列。

为了在哺乳动物中使用，表达载体上的控制功能经常是由病毒材

料来提供的。例如，通常使用的启动子来源于多瘤病毒，腺病毒 2，以及最常用的猴病毒 40(SV40)。SV40 病毒的早期和晚期启动子是特别有用的，因为两者都很容易从病毒中作为一个片段获得，该片段也含有 SV40 病毒复制起点(Fiers 等人，1978)。也可使用更小或更大的 SV40 片段，只要它包括位于病毒复制起点中的从 *Hind*III 位点延伸至 *Bgl*I 位点的大约 250bp 序列。进一步，也可能，经常希望，使用一般与所需基因序列相关的启动子或控制序列，只要这样的控制序列与宿主细胞系统相容。

一个复制起点可以通过构建包含一个外源起点的载体提供，例如可能来自 SV40 或其它病毒(如，多瘤病毒，腺病毒，VSV，BPV)，或通过宿主细胞染色体复制机制提供。如果载体被整合进入宿主细胞染色体中，后一机制经常是足够的。

有用类似物的鉴定

对于专业技术人员来说，很明显不是所有可能的突变体或天然发生的对致淀粉状蛋白产生多肽的修饰作用将有能力在动物中诱发产生可与天然形式交叉反应的抗体。但是，对修饰的致淀粉状蛋白产生多肽建立一个有效的标准筛选试验并不困难，该试验可满足对在此所述免疫学反应性的最小需求。因此，本发明的另一部分是关于一种鉴定一个修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的方法，该多肽能够在一个该种动物中诱导产生针对未修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的抗体，其中未修饰的致淀粉状蛋白产生多肽是一个(无免疫原性的)自体蛋白，该方法包括：

—通过肽合成或基因工程技术的方法来制备一组相互不同的修饰的致淀粉状蛋白产生多肽，其中已经将氨基酸添加、插入、删除或替代该种动物的致淀粉状蛋白产生多肽的氨基酸序列，因此引起该组中的氨基酸序列发生变化，其中包含对该种动物是外源的 T 细胞抗原决定簇，或制备一组编码该组相互不同的修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的核酸片段，

—检测该组修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的成员或核酸片段的成员是否具有在该种动物体内诱导出针对未修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的抗体产生的能力，和

—鉴定和选择性的分离该组修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的成员，该多肽可明显地诱导该种动物未修饰抗致淀粉状蛋白产生多肽的抗体的产生或鉴定和选择性的分离多肽表达产物，该表达产物是由能够明显诱导该种动物抗未修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的抗体产生的该组核酸片段的成员所编码的。

在本文中，“一组相互不同的修饰的致淀粉状蛋白产生多肽”是不相同的修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的集合，它们可以以上述讨论的标准为基础来筛选(如，结合圆二色法，核磁共振波谱，和/或 X 线衍射图形的研究)。该组可仅由几个成员组成，但也可以考虑该组包含几百个成员。

该组成员的检测最终可在体内进行，但也可应用许多体外检测来缩小将用于本发明目的的修饰分子数目。

因为引入外源 T 细胞抗原决定簇的目的是通过 T 细胞的辅助来支持 B 细胞反应，所以一个首要条件是通过修饰的致淀粉状蛋白产生多肽来诱导 T 细胞的增殖。T 细胞的增殖可通过标准的体外增殖试验来检测。简言之，一个富含 T 细胞的样品可从一个受试者中获得，然后以培养物保存。培养的 T 细胞与受试者的抗原呈递细胞接触，其中抗原呈递细胞此前已经摄取了修饰的分子，并处理该分子而且呈递其 T 细胞抗原决定簇。T 细胞的增殖被监测，并与合适的对照(如，与曾处理过完整的、天然的致淀粉状蛋白产生多肽的抗原呈递细胞接触过的培养的 T 细胞)相比较。可以选择的是，增殖可以通过确定 T 细胞在识别外源 T 细胞发生反应中释放的相关细胞因子的浓度来测量。

如果认为每个类型组中至少一种修饰的致淀粉状蛋白产生多肽具有诱导抗致淀粉状蛋白产生多肽的抗体产生的能力是高度可能的，那么就可能制备一种免疫原性组合物，其中包括至少一种能够在一种动物中诱导抗未修饰的致淀粉状蛋白产生多肽的抗体产生的修饰的致淀粉状蛋白产生多肽，其中未修饰的致淀粉状蛋白产生多肽是一种自体蛋白，该方法包括将该组的成员混合，这些成员可明显地在该种动物中诱导抗体的产生，这些抗体与淀粉状蛋白带有一个药学和免疫学上可以接受的运载工具和/或载体和/或稀释剂和/或赋形剂，也可任选与至少一个药学和免疫学可接受的佐剂联合使用的致淀粉状蛋白产生多

肽能够反应。

本发明上述关于多肽组检测的方面可以很便利地进行，其过程是先制备许多相互不同的本发明的核酸序列或载体，将它们插入至合适的表达载体中，用载体转化合适的宿主细胞(或宿主动物)，并实现本发明核酸序列的表达。这些步骤之后是分离表达产物。优选核酸序列和/或载体通过下面的方法制备，即包括使用一种分子扩增技术，如 PCR 或通过核酸合成的方法。

特异的致淀粉状蛋白产生的靶位

除了与阿尔兹海姆病，β-淀粉状蛋白前体蛋白（APP），载脂蛋白 E4（ApoE4）和 Tau 蛋白最常有关的蛋白以外，还有许多其它蛋白以某种方式与 AD 相联系，或是通过直接存在于 AD 脑中的斑或缠结中，或与 AD 发生的危险性增加有明显的遗传相关性。如果不是全部，这些抗原的大多数均与在本发明中假定的靶蛋白在一起，即上述讨论的 Aβ，APP，衰老蛋白和 ApoE4。

**α1-抗胰凝乳蛋白酶(ACT)**是丝氨酸蛋白酶超家族的一个主要部分，被认为在 AD 病变和脑血管淀粉状蛋白变性(CA)(Acta neuropathol, 1998, 96:628-36)所引起伤害的发病机制中具有重要作用。它与 Aβ在体外相互作用，并激发 Aβ-42 原纤维的形成和崩解(JBC，1998，273:28360-4)。

**α2-巨球蛋白**是通过免疫染色在 AD 脑的斑核心中发现的。在斑核心中发现β亚单位的跨膜片段，而可溶性的α片段则在斑中细胞外发现。Acta neuropathol, 1998, 96:628-36 和 Brain Res., 1997, 777: 223-227。

**ABAD(Aβ-肽结合乙醇脱氢酶)**与 Aβ在细胞内结合。它是一个存在于正常细胞中的神经元酶，但在 AD 累及的神经元中过度表达。Aβ对过度表达 ABAD 的细胞具有更大的毒性。ABAD 与 X 染色体连锁。Yan，1997，Nature 389。

**APLP1 和-2(淀粉状蛋白前体蛋白样蛋白 1 和-2)**：两种蛋白都属于**淀粉状蛋白前体蛋白同源性**超家族蛋白，但缺少 Aβ肽区。虽然如此，在神经炎性斑中仍具有明显的 APLP 染色。Acta Neuropathol，1997，94: 519-524。

AMY117 是一个在 AD 人群的脑中斑样病变中新近发现的蛋白，看上去似乎很丰富，很广泛，并对这种疾病是“高度特异的”。猜测该蛋白 AMY117 可能在 AD 的发生和发展过程中通过形成这些斑而具有重要的作用。有趣的是，含有 AMY117 的斑与那些含有 Aβ的斑不具有相同的定位，因此表明除了已知的含有 Aβ的斑和含有 Tau 的缠结之外，还有一个 AD 的新的特征性表现。AMY117 阳性斑被发现在 AD 散发性病例的脑中以及唐氏综合征病人的脑中很丰富，但在对照组以及其它神经变性疾病的脑中却“很少或缺如”(Am J Pathol 1997; 151:69,80)。

Bax：单克隆抗体已经检测到 Bax 是 AD 脑中老年斑（SP）的成分之一。在营养障碍性轴突中也过度表达。Acta Neuropathol. 1998,95:407-412。

Bcl-2 的作用不清楚。在斑周围的神经胶质细胞中过度表达。Acta Neuropathol. 1998, 95:407-412。

博莱霉素水解酶可能是一个β-分泌酶。在 AD 的 SP 中已经发现有抗博莱霉素水解酶的免疫反应性(Brain Res. 1999,830:200-202)。在某些病例中一种特定的博莱霉素水解酶基因型与 AD 发生的危险性增加有关，而在其它疾病中却已经发现没有关联(Ann Neurol, 1998, 44: 808-811 和 Ann Neurol, 1999,46:136-137)。

BRI/ABRI：ABRI 是一个被公认的跨膜蛋白的 4 kD 片段，由在第 13 号染色体上的 BRI 基因编码，发现于家族性性不列颠痴呆(FBD)患者的淀粉状蛋白斑中。这些患者在 BRI 基因的终止密码子上有一个突变，产生一个更长的开放阅读框。改变蛋白的 34 个羰基末端氨基酸的释放可产生 ABRI 淀粉状蛋白亚单位。ABRI 抗体可识别 FBD 患者脑中的实质和血管病变。ABri 沉积为淀粉状蛋白原纤维，产生的斑被认为可引起神经元功能障碍和痴呆，而这些均是 FBD 的特征(Vidal, R 等人，1999, Nature 399)。

嗜铬粒蛋白 A 已经在一些弥漫性淀粉状蛋白沉积物中和围绕沉积物的营养障碍性轴突中发现(Brain Res., 1991,539:143-50)。

簇连蛋白（Clusterin）/apoJ：它是一个经常可在不同的分子生物学领域的实验室中通过差示筛选分离的基因，因为它在多种变性疾病如 AD 和瘙痒症的病例中是过度表达的(Biochem J 1997 11 月 15 日；

328(1):45-50 Michel D, Chatelain G, North S, Brun G)。

CRF(促肾上腺皮质激素释放因子)结合蛋白可结合 41 aa CRF 肽，后者是脑中应激反应中的一个重要调节因子。因为大多数 CRF 是由 CRF 结合蛋白结合的，去除 CRF 结合蛋白(通过免疫治疗方法)可导致游离 CRF 水平升高，相信这样对 AD 具有积极的效应。Behan，1997，J.Neurochemistry，68：2053－2060。

EDTF(内皮细胞毒性因子)：一个由 AD 患者微血管产生的蛋白。它对神经元细胞具有特殊的毒性。WO 99/24468。

硫酸乙酰肝素蛋白聚糖已经显示在 SP 中与 Aβ具有共同的定位。大鼠的研究表明硫酸乙酰肝素粘聚糖对于淀粉状蛋白原纤维的形成是必须的(Neuron, 1994,12: 219-234 和 Acta neuropathol, 1998, 96:628-36)。

人老衰蛋白反应介导蛋白-2（Human collapsin response mediator protein-2 ）是一个在神经原纤维缠结中被一个单克隆抗体识别的 65kDa 蛋白。整合进缠结中可能去除了可溶性的蛋白，并引起异常的轴突生长，因此加速了神经元的变性。JBC，1998，273：9761-8。

Huntingtin(亨廷顿病蛋白)：在 HD 中，Huntingtin 蛋白的 N 末端是以聚谷氨酰胺延伸的。Huntingtin 的这种形式也在 AD 脑的 NFT 和皮克病中发现(Exp. Neurol, 1998,150:213-222)。

细胞间黏附分子 1 在 SP 中堆积。Acta neuropathol, 1998,96: 628-36 和 Am.J Pathol. 1994，144：104-16。

白介素 6 与神经原纤维的改变有关，发现位于斑的中央。它被认为是 AD 中的一个触发事件。在星形胶质细胞中可被 Aβ活性肽 25-35 强烈扩增。Brain Res.，1997，777：223-227 和 Behav Brain Res，1996，78：37-41。

溶酶体相关抗原 CD 68 可被 NFT 和 SP 中的 KP-1 抗体识别。因此，溶酶体在缠结和斑的形成中可能具有一定的作用。Dement Geriatr Cogn Disord, 1998, 9:13-19。

P21 ras 作为一个基本的步骤参与在 AD 发展早期可见到的生长因子和有丝分裂原水平的升高。Neuroscience，1999，91:1-5。

PLC-δ1(磷脂酶C同工酶δ1)在NFT和斑核心周围的轴突中是异常积

累的。它是位于细胞内的。Alzheimer Dis Assoc Disord，1995，9：15-22。

**血清淀粉状蛋白 P 组分(SAP)**是一个存在于所有淀粉淀粉状蛋白沉积物，包括 AD 的淀粉状蛋白中的正常血浆组分(JBC, 1995, 270:26041-4)。它在 SP 和 NFT 中都可观察到。在一些研究中显示它可以促进 Aβ的聚集，并阻止原纤维的蛋白水解(Biochem Biophys Res Commun, 1995,211:349v-53 和 PNAS, 1995,92:4299-4303)，而其它的研究表明 SAP 可抑制 Aβ原纤维的形成(JBC, 1995, 270: 26041-4)。

**突触小泡蛋白**已经在一些弥漫性淀粉状蛋白淀粉状蛋白沉积物和其周围的营养障碍性轴突中被检测到。(Brain Res,1991,539:143-50)。

**共核蛋白（Synuclein）(α-synuclein 或非 A β蛋白的成分的前体蛋白（NACP））**：AD 淀粉状蛋白的非 A β组分(NAC)作为从 AD 患者的脑组织中纯化的淀粉状蛋白的第二个主要成分被生化鉴定。NAC，来自其 140 个氨基酸长的前体 NACP，至少有 35 个氨基酸的长度(NAC35)，尽管其氨基末端并未明确确定。一个 NAC 单克隆抗体可免疫染色 AD 脑中的 SP，但不与 NACP 反应(Biochemistry 34(32): 10139 -10145(1995 年 8 月 15 日)Iwai A, Yoshimoto M, Masliah E, Saitoh T)。NAC 在 Aβ存在时是一个自体寡聚体。新的证据指出这个分子在淀粉状蛋白样原纤维形成和线粒体功能障碍引起的突触损害和神经毒性中具有潜在的作用。Brain Pathol 1999 10 月;9(4):707-20。FEBS Lett, 1998,421:73-76。一部分 NACP 与 APP 的 C 末端淀粉状蛋白片段和瘙痒症朊病毒蛋白(PrPSc)的一个区域具有高度的同源性。**共核蛋白**是帕金森病中的一个主要致病因素(Chem Biol,1995,2:163-9)。

**TGF-b1(转化生长因子 b1)**：在 TG 小鼠中 TGF-b1 与突变 APP 的过度表达可加速 Aβ的沉积。因此，人们相信 TGF-b1 涉及启动和促进淀粉状蛋白斑的形成(Wyss-Coray, 1997, Nature 389)。

**其它淀粉状蛋白疾病和与其相关的蛋白**

除了上述提及的潜在性参与 AD 和 AD 样疾病的蛋白(亨廷顿病，帕金森病，FBD 和其它形式的痴呆)，还存在除了 AD 以外的相对大量的疾病，其中淀粉状蛋白淀粉状蛋白的形成涉及触发疾病或引起疾病的症状。虽然涉及这些疾病的蛋白在性质上不同，但它们具有定义淀粉状

蛋白的同样的特征淀粉状蛋白，参看上文。下表列出了许多这样的淀粉状蛋白疾患和引起这些疾病的蛋白。

**淀粉状蛋白的原纤维蛋白的多样性**

| 临床症状 | 原纤维亚单位 | 前体结构 |
|---|---|---|
| 脑淀粉状蛋白血管病(CAA) | Aβ | 所有均是β |
| 单克隆蛋白系统性(AL)淀粉状蛋白变性 | Ig 轻链 V 结构域的全长或片段 | 所有均是β |
| 反应性系统性(AA)淀粉状蛋白变性 | 淀粉状蛋白 A 的 N 末端 76 残基片段 | α/β |
| 家族性淀粉状蛋白性多神经病 | 甲状腺运载蛋白变异体的全长或片段 | 所有均是β |
| 遗传性 ApoA1 淀粉状蛋白变性 | ApoA1 变异体的N末端片段(～90 个残基) | (α/β) |
| 遗传性溶菌酶淀粉状蛋白变性淀粉状蛋白 | 全长溶酶体变异体 | α+β |
| II 型糖尿病 | 胰岛-淀粉状蛋白多肽的 37 残基片段 | 未知 |
| 胰岛素相关的淀粉状蛋白 | 全长的野生型胰岛素 | α+β |
| 传播性海绵状脑病 | 朊病毒蛋白的全长或片段 | α+β |
| 甲状腺髓样癌 | 降钙素的片段 | 未知 |
| 老年性系统性淀粉状蛋白变性淀粉状蛋白 | 甲状腺运载蛋白的全长或片段 | 所有均是β |
| 血液透析相关的淀粉状蛋白变性淀粉状蛋白 | 全长，野生型β-2 微球蛋白 | 所有均是 β |
| 孤立性心房淀粉状蛋白变性淀粉状蛋白 | 心房利钠因子 | 未知 |
| 遗传性脑淀粉状蛋白血管病 | 胱蛋白酶变异体的 110 残基片段 | α+β |

| | | |
|---|---|---|
| 芬兰遗传性淀粉状蛋白变性淀粉状蛋白 | 胶溶素变异体的71残基片段 | α/β |
| 遗传性血纤蛋白原a-链淀粉状蛋白变性淀粉状蛋白 | 血纤蛋白原a-链变异体片段 | 未知 |

这些蛋白，类似在AD中涉及的蛋白，所有均是在此所建议的免疫方法的潜在靶位。

可以考虑的是对致淀粉状蛋白产生多肽进行免疫的大多数方法应该限制在产生与天然致淀粉状蛋白产生多肽具有交叉反应的抗体的免疫反应中。然而，在某些病例中，重要的是针对从致淀粉状蛋白产生多肽呈递了MHC I型抗原决定簇的细胞以CTL反应的形式诱导细胞免疫—这在那些病例中是有利的，其中产生致淀粉状蛋白产生多肽的细胞数目减少不会引起严重的反作用。在需要CTL反应的这些病例中，优选应用申请者的PCT/DK99/00525(对应于USSN 09/413,186)中的教导内容。这两个文件的公开内容在此引入作为参考。

在下列非限制性的实施例中，重点是开发一种针对AD的以Aβ为基础的自体疫苗。但是，在此所提出的原理可同样地应用于任何淀粉状蛋白。

**实施例1**

针对AD免疫的自体疫苗接种方法

敲除Aβ蛋白的小鼠不显示任何异常或不利的副作用的事实表明，删除Aβ或降低Aβ的量是安全的，Zheng H.(1996)。

已发表的转基因动物被转基因人Aβ蛋白免疫的试验表明，如果可能打破自体耐受，Aβ的下调可通过自体反应抗体来实现。这些试验进一步表明这样的Aβ下调将有潜力预防斑的形成，并清除脑中已经形成的Aβ斑，参看，Schenk等人，(1999)。但是，传统上，不可能出现抗自体蛋白的抗体。

已发表的数据没有提供打破针对真正的自体蛋白的真正的自体耐受的方法。数据也没有提供任何关于怎样保证免疫反应仅仅针对或主要针对Aβ沉积物的信息，而不是针对结合Aβ前体蛋白(APP)的细胞膜

的信息，如果这被认为是必要的话。采用已有的技术产生的免疫反应大概会以一种不可调节的方式产生针对自体蛋白的免疫反应，所以可能会产生针对 Aβ蛋白部分的不需要的、过度的自体反应。因此，采用已有的免疫方法最大的可能性是不能产生针对自体蛋白的强烈的免疫反应，并且进一步来说，由于对结合在细胞膜上的 APP 的潜在强烈交叉反应，因此是不安全的，其中 APP 存在于中枢神经系统中的大量细胞上。

本发明提供了可有效产生强烈的可调节的针对真正的自体蛋白的免疫反应的方法，该自体蛋白在中枢神经系统或机体的其它部分中可形成斑并引起严重的疾病。将采用这种技术来开发一种用于治疗 AD 的安全有效的人 Aβ蛋白治疗性疫苗。

就此而言，可能预计到 AD，即一种预计在下个世纪削弱卫生保健系统的疾病，可能被治愈，或者所描述的这种疫苗至少可建立一种治疗这种疾病的症状和发展的有效治疗方法。

这种技术代表了一种阻断淀粉状蛋白在 AD 以及其它神经性疾病中沉积的全新的免疫学方法。

在下表中，简要说明了 35 个考虑过的构建物。在表中给定的所有位置都是相对于 APP 的起始蛋氨酸，即甲硫氨酸(SEQ ID NO:2 中的第一个氨基酸)，包括起始和终止氨基酸，例如 672-714 片段包括氨基酸 672 和 714。P2 和 P30 的起始和终止位置表明，在指明的位置上抗原决定簇替代了一部分 APP 片段(两个位置也包括在替代物中)—在大多数构建物中，引入的抗原决定簇替代了抗原决定簇长度的片段。表中的星号具有以下含义：

*) P2 和 P30 仅有一个位置指示抗原决定簇已经在指示位置中(抗原决定簇在给定的位置附近的氨基酸 C 末端开始)被插入至 APP 衍生物。

**) 构建物 34 含有 3 个相同的、分别被 P30 和 P2 分隔的 APP 片段。

***) 构建物 35 含有 9 个相同的、交替被 P30 和 P2 抗原决定簇分隔的 APP 片段。

APP AutoVac 构建物

| 变异体编号 | 相对 APP aa1 的 APP 片段起始点 | 相对 APP aa1 的 APP 片段终止点 | 相对 APP aa1 的 P2 抗原决定簇位置 | 相对 APP aa1 的 P30 抗原决定簇位置 | 分子长度 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 630 | 770 | 656-670 | 635-655 | 141 |
| 2 | 630 | 714 | 656-670 | 635-655 | 85 |
| 3 | 672 | 770 | 735-749 | 714-728 | 99 |
| 4 | 672 | 770 | | 714-728 | 99 |
| 5 | 672 | 770 | 714-728 | | 99 |
| 6 | 672 | 770 | 723* | 723* | 135 |
| 7 | 672 | 770 | | 723* | 120 |
| 8 | 672 | 770 | 723* | | 114 |
| 9 | 672 | 714 | | 672* | 64 |
| 10 | 672 | 714 | | 714* | 64 |
| 11 | 672 | 714 | 672* | | 58 |
| 12 | 672 | 714 | 714* | | 58 |
| 13 | 672 | 714 | 714* | 672* | 79 |
| 14 | 672 | 714 | 680-694 | | 43 |
| 15 | 672 | 714 | 685-799 | | 43 |
| 16 | 672 | 714 | 690-704 | | 43 |
| 17 | 672 | 714 | 695-709 | | 43 |
| 18 | 672 | 714 | | 675-695 | 43 |
| 19 | 672 | 714 | | 680-700 | 43 |
| 20 | 672 | 714 | | 685-705 | 43 |
| 21 | 672 | 714 | | 690-710 | 43 |
| 22 | 672 | 714 | 680* | 680* | 79 |
| 23 | 672 | 714 | 690* | 690* | 79 |
| 24 | 672 | 714 | 700* | 700* | 79 |
| 25 | 672 | 714 | 710* | 710* | 79 |
| 26 | 672 | 714 | | 680* | 64 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 27 | 672 | 714 | | 690* | 64 |
| 28 | 672 | 714 | | 700* | 64 |
| 29 | 672 | 714 | | 710* | 64 |
| 30 | 672 | 714 | 680* | | 58 |
| 31 | 672 | 714 | 690* | | 58 |
| 32 | 672 | 714 | 700* | | 58 |
| 33 | 672 | 714 | 710* | | 58 |
| 34 | 672 | 714 | 在 rep. 1**后 | 在 rep. 2**后 | 165 |
| 35 | 672 | 714 | 34×3* | 34×3*** | 165 |

紧靠最可能产生反应的片段的APP部分是43个氨基酸的Aβ核心肽(Aβ-43，与SEQ ID NO:2对应，相当于残基672-714)，它是AD脑中淀粉状蛋白斑的主要成分。这个 APP 片段是上面所列的所有构建物的一部分。

变异体1和2包括一部分APP，在Aβ-43上游，其中已经放置了模式抗原决定簇P2和P30。变异体1和3-8均包括C-100片段，该片段显示是有神经毒性的—C-100片段对应于SEQ ID NO:2中的氨基酸残基714-770。在变异体3-5中，抗原决定簇替代了C-100的一部分，而在变异体6-8它则已经插入至C-100中。

变异体9-35仅含有核心Aβ-43蛋白。在变异体9-13中，P2和P30被融合至Aβ-43的任意一个末端中；在14-21中， P2和P30替代了Aβ-43部分；在22-23中， P2和P30被插入至Aβ-43中；34含有三个相同的、分别被P30和P2相隔的Aβ-43片段；35含有9个交替被P2和P30抗原决定簇分隔的Aβ-43重复片段。

详细情况见上面的图1和表。

特别优选构建物的另外类型。因为本发明的一个目标是需要删除Aβ而避免破坏产生APP的细胞，所以制备仅包括部分Aβ的自体疫苗构建物似乎是可行的，该构建物当存在于APP中时不暴露在细胞外相中。因此，这样的构建物需要含有至少一个 B 细胞抗原决定簇，该表位来自由在SEQ ID NO:2中的 700-714 氨基酸确定的氨基酸片段。

因为这样的一个短多肽片段预计仅有微弱的抗原性，因此优选这

样的一个自体疫苗构建物，其中该构建物含有 B 细胞抗原决定簇的几个拷贝，如以具有在本发明详细公开内容中的式 I 中所显示结构的构建物的形式存在，参看前文。在式 I 的这个版本中，术语 $amyloid_{e1}$—$amyloid_{ex}$ 淀粉状蛋白淀粉状蛋白是 x 个含有来自 SEQ ID NO:2 中的 700-714 氨基酸的氨基酸序列的 B 细胞抗原决定簇。一个优选的选择是上述所详细描述的将淀粉状蛋白产生(多) 肽和选择出的外源 T 辅助细胞抗原决定簇经酰胺键偶联至一个多糖载体分子上的可能性—用这种方法，使由 SEQ ID NO:2 中的 700-714 氨基酸构成的“微弱的”抗原决定簇的多种呈递作用成为可能，并且在 B 细胞和 T 细胞抗原决定簇之间选择一个最佳的比例也成为可能。

**实例 2**

根据本发明用 Aβ和修饰蛋白对转基因小鼠进行免疫

**构建编码 hAB43+—34 的 DNA。**用几个步骤来构建 hAB43+-34 基因。首先用引物 ME#800 (SEQ ID NO:9)作为模板，用引物 ME#801 (SEQ ID NO:10)和引物 ME#802 (SEQ ID NO:11)产生一个 PCR 片段。ME#800 编码具有大肠杆菌优化密码子的人 abeta-43 片段。ME#801 和 802 在片段中加入了适当的限制性位点。

纯化 PCR 片段，用 *Nco*I 和 *Hind*III 消化，再次纯化并克隆进 *Nco*I-*Hind*III 消化和纯化的 pET28b+大肠杆菌表达载体中。得到的编码野生型人 Aβ-43 的质粒称为 pAB1。

在下面的步骤中，T 辅助细胞抗原决定簇，P2，加入至该分子的 C 末端。引物 ME#806 (SEQ ID NO:12)含有编码 P2 抗原决定簇的序列，因此通过 PCR 反应产生了一个 P2 和 Abeta-43 的融合体。

采用 pAB1 作为模板，通过引物 ME#178(SEQ ID NO:8)和 ME#806 制备一个 PCR 片段进行克隆。纯化片断，用 *Nco*I 和 *Hind*III 消化，再次纯化并克隆进 *Nco*I-*Hind*III 消化和纯化的 pET28b+ 载体中。得到的质粒称为 pAB2。

以类似的方式，制备了另一个质粒，该质粒包含了 Aβ-43 编码序列以及加入至 N 末端的另一个 T 辅助细胞抗原决定簇，P30。这个过程可以通过采用 pAB1 为模板，以引物 ME#105 (SEQ ID NO:7)和 ME#807(SEQ

ID NO:13)制备一个 PCR 片段来完成。

纯化片段，用 *Nco*I 和 *Hind*III 消化，再次纯化，并克隆进 *Nco*I-*Hind*III 消化和纯化的 pET28b+ 载体中。得到的质粒称为 pAB3。

在第三步中，第二个 Aβ-43 重复序列通过引物 ME#809(SEQ ID NO:14)从 C 末端加入至质粒 pAB2 的 P2 抗原决定簇上。同时 ME＃809 在 Aβ-43 重复序列后立即产生一个 *Bam*HI 位点。采用 pAB2 作为模板，用引物 ME#178 和 ME#809 制备一个 PCR 片段。用 *Nco*I 和 *Hind*III 消化该片段，纯化并克隆进经 *Nco*I-*Hind*III 消化和纯化的 pET28b+ 载体中。该质粒称为 pAB4。

最后，来自 pAB3 的 P30 抗原决定簇— Aβ-43 重复序列被克隆进 pAB4 质粒中。这个过程可以采用 pAB3 为模板，用引物 ME＃811(SEQ ID NO:16)和 ME#105 制备一个 PCR 片段来完成。纯化该片段，在随后的采用 pAB3 作为模板的 PCR 中与 ME＃810(SEQ ID NO:15)一起用作引物。纯化得到的片段，用 *Bam*HI 和 *Hind*III 消化，并克隆进 *Bam*HI-*Hind*III 消化和纯化的 pAB4 质粒中。得到的质粒，pAB5，编码 hAB43+-34 分子。

所有的 PCR 和克隆步骤均主要参看 Sambrook，J.，Fritsch，E.F. & Maniatis，T.1989“Molecular cloning: a laboratory manual(分子克隆：实验室指南)”，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory，纽约。

对于所有的克隆步骤，使用的是大肠杆菌 K-12 细胞和 Top-10 F’菌株(Stratagene，美国)。pET28b+ 载体购自 Novagen，美国。所有引物由丹麦的 DNA Technology 合成。

**hAB43+-34 的表达和纯化。**如 pET28b+系统提供商(Novagen)所描述的，由 pAB5 编码的 hAB43+－34 蛋白在 BL21-Gold(Novagen)大肠杆菌细胞中表达。

洗涤包涵体，并在在 6M 尿素存在的条件下，使用 BioCad 纯化工作台(PerSeptive Biosystem，美国)进行阳离子交换色谱纯化表达的 hAB43+-34 蛋白，使纯度高于 85%。然后通过在一个尿素含量逐渐降低的溶液中进行逐步透析去除尿素。最终的缓冲液为 10mM Tris，pH 8.5。

**免疫作用研究。**在研究中使用人 APP(阿尔兹海姆前体蛋白)转基因小鼠。这些小鼠，称为 TgRND8+，表达 APP 的一种突变形式，可导致在

鼠脑中高浓度的 Aβ-40 和 Aβ-42(Janus, C.等人)。

小鼠(每组 8-10 只小鼠)用 Abeta-42(SEQ ID NO:2，残基 673-714，用一种标准的 Fmoc 方法合成)或 hAB43+-34 变异体(实施例 1 所含的表中的构建物 34，重组产生)免疫 4 次，时间间隔为两周。剂量为 Aβ 100mg 或 hAB43+-34 50mg。小鼠在第 43 天(3 次注射后)和第 52 天后(4 次注射后)被放血，采用一种针对 Aβ-42 的 ELISA 法来确定血清中抗 Aβ-42 的特异性效价。

下表显示了抗 Abeta-42 的平均相对滴度。

| 免疫原 | 第 43 天(3 次免疫后) | 第 52 天(4 次免疫后) |
|---|---|---|
| Aβ-42 | 4000 | 3000 |
| hAB43+-34 | 16000 | 23000 |

很清楚的是，当用 hAB43+-34 Aβ 变异体免疫时，获得的抗体效价在 3 和 4 次免疫后，较采用未改变的野生型 Aβ-42 作为免疫原获得的效价分别高大约 4 倍和 7.5 倍。当考虑用于免疫的变异体的量仅为用于免疫的野生型序列量的 50%这一实际情况时，这一事实可进一步认为是正确的。

实施例 3

采用激活的多聚-羟基聚合物作为交联剂合成一个 Aβ 肽共聚物疫苗

引言。一个传统的结合疫苗由共价偶联于一个载体蛋白上的肽(多肽)组成。该肽包含 B 细胞抗原决定簇(多个)和提供 T 辅助细胞抗原决定簇的载体蛋白。但是，大多数载体蛋白作为 T 细胞抗原决定簇的来源正常情况下是不相关的，因为总序列中仅一小部分含有相关的 T 辅助细胞抗原决定簇。这些抗原决定簇可被确定和合成为肽，例如 12-15 个氨基酸的肽。如果这些肽与含有 B 细胞抗原决定簇的肽共价结合，例如通过一个多价的激活的多聚-羟基聚合物，就可以获得一个仅含有相关部分的疫苗分子。进一步而言，就可能提供含有优化比例的 B 细胞和 T 细胞抗原决定簇的一个疫苗结合物。

**激活的多聚-羟基聚合物的合成。**多聚-羟基聚合物，例如葡聚糖、淀粉、琼脂糖等，可用 2,2,2-三氟乙磺酰氯(tresyl 氯化物)来激活，

或通过同质合成(葡聚糖)方法，溶解在N-甲基吡咯烷酮(NMP)中；或通过异质合成(淀粉，琼脂糖，交联葡聚糖)方法，例如溶解在丙酮中。

将 225 毫升干燥的 N-甲基吡咯烷酮(NMP)在干燥条件下加入至冻干的、水溶性的葡聚糖(4.5 克，83 毫摩尔，临床级，重均分子量(平均) 78000)中，置于一个500毫升的圆底烧瓶中并加入一个搅拌磁体。烧瓶置于60℃油浴中并进行磁力搅拌。温度升高至92℃，处理超过20分钟。当葡聚糖溶解时，将烧瓶立即从油浴中移出，油浴中的温度降至40℃。将烧瓶再次置于油浴中，仍然进行磁力搅拌，逐滴加入tresyl氯化物(2.764毫升，25毫摩尔)。15分钟后，逐滴加入干燥的吡啶(无水的，2.020毫升，25毫摩尔)。将烧瓶从油浴中移出，在室温中搅拌1小时。将产物(Tresyl激活的葡聚糖,TAD)在1200毫升冷乙醇(99.9%)中沉淀。倒出上清液，将沉淀收集在50毫升聚丙烯离心管中，2000rpm离心。沉淀溶解在50毫升0.5%乙酸中，在5000毫升0.5%乙酸中透析两次，并冻干。TAD作为冻干粉末可储存在-20℃。

不溶的多聚-羟基聚合物，如琼脂糖或交联葡聚糖可以是 tresyl 激活的，通过制备一种例如在丙酮中的多聚-羟基聚合物悬浮液，并作为一种固相合成法进行合成。激活的多聚-羟基聚合物可通过过滤来收集。合适的方法有报道，例如 Nilsson K 和 Mosbach K(1987)，Methods in Enzymology(酶学方法) 135，67 页和 Hermansson GT 等人(1992)，“Immobilized Affinity Ligand Techniques”，Academic Press，Inc.，87 页。

**A Beta 肽共聚物疫苗的合成。**TAD(10 毫克)溶解在 100 微升水和1000微升碳酸盐缓冲液中，后者pH 9.6并含有5毫克 Aβ-42(SEQ ID NO:2，残基673-714)，然后加入2.5毫克P2(SEQ ID NO:4)和2.5毫克P30(SEQ ID NO:6)。Aβ-42和P2和P30肽均含有保护的赖氨酸基团：它们的形式是 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧环己烷基-1-基 亚基)乙基(Dde)保护的赖氨酸基团。肽通过标准的 Fmoc 方法制备，其中常规的Fmoc-Lys(Boc)-OH被Fmoc-Lys(Dde)-OH(从Novabiochem获得，目录号04-12-1121)替代，即赖氨酸中的 ε-氨基基团被Dde而不是Boc保护。

测定pH值并用1M HCL调整至9.6。室温2.5小时后，加入80%的

肼溶液至肼终浓度为 8%，溶液继续在室温下孵育 30 分钟，此后立即冻干。冻干的产物溶解在水中，并在最后冻干前用水进行大量透析。

在终产物中，B 细胞抗原决定簇(Aβ)和 T 辅助细胞抗原决定簇 (P2 和 P30) 的比例可以通过在合成步骤中所使用的这些肽的不同浓度来改变。而且，终产物可以被标记，例如，方法是通过在合成步骤中的碳酸盐缓冲液中加入氨化甘露糖从而用甘露糖标记(为了将结合物靶向抗原呈递细胞)。

如果一种不溶的激活的多聚-羟基聚合物用来结合含有 B 细胞抗原决定簇和 T 辅助细胞抗原决定簇的肽，与该聚合物的偶联可以以固相合成来进行，收集终产物，通过洗涤和过滤来纯化。

## 参考文献列表

Brookmeyer, R.; Gray, S.; Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer's Disease in the United States and the Public Health Impact of Delaying Disease Onset. American Journal of Public Health, 88(9), 1337-1342.

Buttini, M.; Orth, M.; Bellosta, S.; Akeefe, H.; Pitas, R.E.; Wyss-Coray, T.; Mucke, L.; Mahley, R.W. (1999). Expression of Human Apolipoprotein E3 or E4 in the Brains of Apoe-/- Mice: Isoform-Specific Effects on Neurodegeneration. Journal of Neuroscience, 19, 4867-4880.

Clark, L.N.; Poorkaj, P.; Wszolek, Z.; Geschwind, D.H.; Nasreddine, Z.S.;Miller, B.; Li, D.; Payami, H.; Awert, F.; Markopoulou, K.; Andreadis, A.;D'Souza, I.; Lee, V.M.; Reed, L.; Trojanowski, J.Q.; Zhukareva, V.; Bird,T.; Schellenberg, G.; Wilhelmsen, K.C. (1998). Pathogenic Implications of Mutations in the Tau Gene in Pallido-Ponto-Nigral Degeneration and Related Neurodegenerative Disorders Linked to Chromosome 17. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 95(22), 13103-13107.

Gupta, R. K. et. al. (1998), Der Biol Stand. 92: 63-78.

Hsiao K. et al. (1998) Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins", Exp. Gerontol. 33 (7-8), 883-889

Hutton, M.; Lendon, C.L.; Rizzu, P.; Baker, M.; Froelich, S.; Houlden, H.;Pickering-Brown, S.; Chakraverty, S.; Isaacs, A.; Grover, A.; Hackett, J.;Adamson, J.; Lincoln, S.; Dickson, D.; Davies, P.; Petersen, R.C.; Stevens,M.; de Graaff, E.; Wauters, E.; van Baren, J.; Hillebrand,

M.; Joosse, M.;Kwon, J.M.; Nowotny, P.; Che, L.K.; Norton, J.; Morris, J.C.; Reed, L.E.;Trojanowski, J.; Basun, H.; Lannfelt, L.; Neystat, M.; Fahn, S.; Dark, F.;Tannenberg, T.; Dodd, P.; Hayward, N.; Kwok, J.B.J.; Schofield, P.R.;Andreadis, A.; Snowden, J.; Craufurd, D.; Neary, D.; Owen, F.; Oostra,B.A.; Hardy, J.; Goate, A.; van Swieten, J.; Mann, D.; Lynch, T.; Heutink, P. (1998). Association of Missense and 5'-Splice-Site Mutations in Tau with the Inherited Dementia FTDP-17. Nature, 393, 702-705.

Janus, C. et. al. (2000), Nature 408:979 - 982.

Kas, H.S. (1997) J Microencapsul 14:689-711

Leon, J.; Cheng, C.K.; Neumann, P.J. (1998). Alzheimer's Disease Care: Costs and Potential Savings. Health Affairs, 17(6), 206-216.

Lippa C. F. et al. (1998) Ab-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. Lancet 352, 1117-1118

Luo, J.-J.; Wallace, W.; Riccioni, T.; Ingram, D.K.; Roth, G.S.; Kusiak, J.W. (1999). Death of PC12 Cells and Hippocampal Neurons Induced by Adenoviral-Mediated FAD Human Amyloid Precursor Protein Gene Expression. Journal of Neuroscience Research, 55(5), 629-642.

Naruse, S.; Thinakaran, G.; Luo, J.-J.; Kusiak, J.W.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Qian, X.; Ginty, D.D.; Price, D.L.; Borchelt, D.R.; Wong, P.C.; Sisodia, S.S. (1998). Effects of PS1 Deficiency on Membrane Protein Trafficking in Neurons. Neuron, 21(5), 1213-1231.

National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999, NIH Publication No. 99-4664.

Pietrobon, P.J. (1995), Pharm Biotechnol. 6: 347-61Poorkaj, P.; Bird, T.D.;Wijsman, E.; Nemens, E.; Garruto, R.M.; Anderson, L.; Andreadis, A.;Wiederhold, W.C.; Raskind, M.; Schellenberg, G.D. (1998). Tau Is a Candidate Gene for Chromosome 17 Frontotemporal Dementia. Annals of Neurology, 43, 815-825.

Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu,K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao,Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.;Vasquez, N.; Vandevert, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games,D.; Seubert, P. (1999). Immunization with A-beta Attenuates Alzheimer's Disease-Like Pathology in the PDAPP Mouse. Nature,

400(6740), 173-177.

Shekunov, B. et. al. (1999), J. Crystal Growth 198/199:1345 - 1351.

Spillantini, M.G.; Murrell, J.R.; Goedert, M.; Farlow, M.R.; Klug, A.; Ghetti, B. (1998). Mutation in the Tau Gene in Familial Multiple System Tauopathy with Presenile Dementia. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 95(13), 7737-7741.

Strittmatter, W.J.; Saunders, A.M.; Schmechel, D.; Pericak-Vance, M.; Enghild, J.; Salvesen, G.S.; Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: High-Avidity Binding to A β and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late-Onset Familial Alzheimer Disease. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 90,1977-1981.

Vidal, R.; Frangione, B.; Rostagno, A.; Mead, S.; Revesz, T.; Plant, G.; Ghiso, J. (1999). A Stop-Codon Mutation in the BRI Gene Associated with Familial British Dementia. Nature, 399: 776-781.

Zheng H. (1996) "Mice deficient for the amyloid precursor protein gene. Ann. N Y Acad. Sci., 777, 421-426.

York, P. (1999), PSTT 11:430-440

# 序列列表

<110> 法麦克萨有限公司

<120> 下调淀粉状蛋白的新方法

<130> P1009PC1

<140>
<141>

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 3.0

<210> 1
<211> 2313
<212> DNA
<213> 人类

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2313)

<220>
<221> misc_feature
<222> (2098)..(2169)
<223> 编码跨膜区的核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (2014)..(2313)
<223> 编码 C-100 的核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (2016)..(2144)
<223> Abeta 42/43

<220>

<221> misc_feature
<222> (2014)..(2142)
<223> Abeta 42/43
<400> 1

```
atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg ctg gcc gcc tgg acg gct cgg   48
Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
  1               5                  10                  15

gcg ctg gag gta ccc act gat ggt aat gct ggc ctg ctg gct gaa ccc   96
Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
             20                  25                  30

cag att gcc atg ttc tgt ggc aga ctg aac atg cac atg aat gtc cag   144
Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
         35                  40                  45

aat ggg aag tgg gat tca gat cca tca ggg acc aaa acc tgc att gat   192
Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
     50                  55                  60

acc aag gaa ggc atc ctg cag tat tgc caa gaa gtc tac cct gaa ctg   240
Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65                  70                  75                  80

cag atc acc aat gtg gta gaa gcc aac caa cca gtg acc atc cag aac   288
Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
                 85                  90                  95

tgg tgc aag cgg ggc cgc aag cag tgc aag acc cat ccc cac ttt gtg   336
Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
            100                 105                 110

att ccc tac cgc tgc tta gtt ggt gag ttt gta agt gat gcc ctt ctc   384
Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
        115                 120                 125

gtt cct gac aag tgc aaa ttc tta cac cag gag agg atg gat gtt tgc   432
Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
    130                 135                 140
```

```
gaa act cat ctt cac tgg cac acc gtc gcc aaa gag aca tgc agt gag   480
Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
145                 150                 155                 160

aag agt acc aac ttg cat gac tac ggc atg ttg ctg ccc tgc gga att   528
Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
                165                 170                 175

gac aag ttc cga ggg gta gag ttt gtg tgt tgc cca ctg gct gaa gaa   576
Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
            180                 185                 190

agt gac aat gtg gat tct gct gat gcg gag gag gat gac tcg gat gtc   624
Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
        195                 200                 205

tgg tgg ggc gga gca gac aca gac tat gca gat ggg agt gaa gac aaa   672
Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
    210                 215                 220

gta gta gaa gta gca gag gag gaa gaa gtg gct gag gtg gaa gaa gaa   720
Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
225                 230                 235                 240

gaa gcc gat gat gac gag gac gat gag gat ggt gat gag gta gag gaa   768
Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
                245                 250                 255

gag gct gag gaa ccc tac gaa gaa gcc aca gag aga acc acc agc att   816
Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
            260                 265                 270

gcc acc acc acc acc acc acc aca gag tct gtg gaa gag gtg gtt cga   864
Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
        275                 280                 285

gag gtg tgc tct gaa caa gcc gag acg ggg ccg tgc cga gca atg atc   912
Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
    290                 295                 300
```

```
tcc cgc tgg tac ttt gat gtg act gaa ggg aag tgt gcc cca ttc ttt   960
Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
305                 310                 315                 320

tac ggc gga tgt ggc ggc aac cgg aac aac ttt gac aca gaa gag tac   1008
Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
                325                 330                 335

tgc atg gcc gtg tgt ggc agc gcc atg tcc caa agt tta ctc aag act   1056
Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
            340                 345                 350

acc cag gaa cct ctt gcc cga gat cct gtt aaa ctt cct aca aca gca   1104
Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
        355                 360                 365

gcc agt acc cct gat gcc gtt gac aag tat ctc gag aca cct ggg gat   1152
Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp
    370                 375                 380

gag aat gaa cat gcc cat ttc cag aaa gcc aaa gag agg ctt gag gcc   1200
Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
385                 390                 395                 400

aag cac cga gag aga atg tcc cag gtc atg aga gaa tgg gaa gag gca   1248
Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
                405                 410                 415

gaa cgt caa gca aag aac ttg cct aaa gct gat aag aag gca gtt atc   1296
Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
            420                 425                 430

cag cat ttc cag gag aaa gtg gaa tct ttg gaa cag gaa gca gcc aac   1344
Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
        435                 440                 445

gag aga cag cag ctg gtg gag aca cac atg gcc aga gtg gaa gcc atg   1392
Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
    450                 455                 460
```

```
ctc aat gac cgc cgc cgc ctg gcc ctg gag aac tac atc acc gct ctg   1440
Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
465                 470                 475                 480

cag gct gtt cct cct cgg cct cgt cac gtg ttc aat atg cta aag aag   1488
Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
                485                 490                 495

tat gtc cgc gca gaa cag aag gac aga cag cac acc cta aag cat ttc   1536
Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
            500                 505                 510

gag cat gtg cgc atg gtg gat ccc aag aaa gcc gct cag atc cgg tcc   1584
Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
        515                 520                 525

cag gtt atg aca cac ctc cgt gtg att tat gag cgc atg aat cag tct   1632
Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser
    530                 535                 540

ctc tcc ctg ctc tac aac gtg cct gca gtg gcc gag gag att cag gat   1680
Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
545                 550                 555                 560

gaa gtt gat gag ctg ctt cag aaa gag caa aac tat tca gat gac gtc   1728
Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
                565                 570                 575

ttg gcc aac atg att agt gaa cca agg atc agt tac gga aac gat gct   1776
Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
            580                 585                 590

ctc atg cca tct ttg acc gaa acg aaa acc acc gtg gag ctc ctt ccc   1824
Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
        595                 600                 605

gtg aat gga gag ttc agc ctg gac gat ctc cag ccg tgg cat tct ttt   1872
Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
    610                 615                 620
```

```
ggg gct gac tct gtg cca gcc aac aca gaa aac gaa gtt gag cct gtt   1920
Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
625                 630                 635                 640

gat gcc cgc cct gct gcc gac cga gga ctg acc act cga cca ggt tct   1968
Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
                645                 650                 655

ggg ttg aca aat atc aag acg gag gag atc tct gaa gtg aag atg gat   2016
Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
            660                 665                 670

gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa ttg   2064
Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
        675                 680                 685

gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa ggt gca atc att gga   2112
Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
    690                 695                 700

ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg aca gtg atc gtc atc acc ttg   2160
Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
705                 710                 715                 720

gtg atg ctg aag aag aaa cag tac aca tcc att cat cat ggt gtg gtg   2208
Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
                725                 730                 735

gag gtt gac gcc gct gtc acc cca gag gag cgc cac ctg tcc aag atg   2256
Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
            740                 745                 750

cag cag aac ggc tac gaa aat cca acc tac aag ttc ttt gag cag atg   2304
Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
        755                 760                 765

cag aac tag                                                      2313
Gln Asn
    770
```

<210> 2
<211> 770
<212> PRT
<213> 人类

<400> 2

```
Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
  1               5                  10                  15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
             20                  25                  30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
         35                  40                  45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
     50                  55                  60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65                  70                  75                  80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
                 85                  90                  95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
            100                 105                 110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
        115                 120                 125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
    130                 135                 140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
145                 150                 155                 160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
                165                 170                 175
```

```
Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
            180                 185                 190

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
        195                 200                 205

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
    210                 215                 220

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
225                 230                 235                 240

Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
                245                 250                 255

Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
            260                 265                 270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
        275                 280                 285

Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
    290                 295                 300

Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
305                 310                 315                 320

Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
                325                 330                 335

Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
            340                 345                 350

Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
        355                 360                 365

Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp
    370                 375                 380
```

```
Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
385                 390                 395                 400

Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
                405                 410                 415

Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
            420                 425                 430

Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
        435                 440                 445

Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
    450                 455                 460

Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
465                 470                 475                 480

Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
                485                 490                 495

Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
            500                 505                 510

Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
        515                 520                 525

Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser
    530                 535                 540

Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
545                 550                 555                 560

Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
                565                 570                 575

Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
            580                 585                 590
```

Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
595 600 605

Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
610 615 620

Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
625 630 635 640

Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
645 650 655

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
660 665 670

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
675 680 685

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
690 695 700

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
705 710 715 720

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
725 730 735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
740 745 750

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
755 760 765

Gln Asn
770

<210> 3
<211> 45
<212> DNA
<213> 破伤风杆菌

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(45)
<223> 编码 P2 抗原决定簇的 DNA

<400> 3
cag tac atc aaa gct aac tcc aaa ttc atc ggt atc acc gag ctg 45
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 破伤风杆菌

<400> 4
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

<210> 5
<211> 63
<212> DNA
<213> 破伤风杆菌

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(63)
<223> 编码 P30 抗原决定簇的 DNA

<400> 5
ttc aac aac ttc acc gta agc ttc tgg ctg cgt gtt ccg aaa gtt agc 48
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

gct agc cac ctg gaa 63
Ala Ser His Leu Glu
20

<210> 6
<211> 21
<212> PRT
<213> 破伤风杆菌

<400> 6
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
20

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 合成的

<400> 7
caactcagct tcctttcggg c 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 合成的

<400> 8
agatctcgat cccgcgaaat t 21

<210> 9
<211> 135
<212> DNA
<213> 合成的

<400> 9
atggatgcag aattccgtca cgactccggt tacgaagttc accaccagaa actggttttc 60

ttcgcagaag atgttggttc caacaaaggt gcaatcatcg gtctgatggt tggcggtgtt 120
gttatcgcga cctag 135

<210> 10
<211> 31
<212> DNA
<213> 合成的

<400> 10
gccggccatg gatgcagaat tccgtcacga c 31

<210> 11
<211> 39
<212> DNA
<213> 合成的

<400> 11
gccggaagct tctaggtcgc gataacaaca ccgccaacc 39

<210> 12
<211> 84
<212> DNA
<213> 合成的

<400> 12
ccggcaagct tctacagctc ggtgataccg atgaatttgg agttagcttt gatgtactgg 60
gtcgcgataa caacaccgcc aacc 84

<210> 13
<211> 101
<212> DNA
<213> 合成的

<400> 13
gccggccatg ggtttcaaca acttcaccgt tagcttctgg ctgcgtgttc cgaaagttag 60
cgcgagccac ctggaagatg cagaattccg tcacgactcc g 101

<210> 14
<211> 172

<212> DNA
<213> 合成的

<400> 14
gggccaagct tggatccggt cgcgataaca acaccgccaa ccatcagacc gatgattgca 60
cctttgttgg aaccaacatc ttctgcgaag aaaaccagtt tctggtggtg aacttcgtaa 120
ccggagtcgt gacggaactc tgcatccagc tcggtgatac cgatgaattt gg 172

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> 合成的

<400> 15
ctggaagatg cagagttccg tcacgactcc 30

<210> 16
<211> 35
<212> DNA
<213> 合成的

<400> 16
gcgccggatc cttcaacaac ttcaccgtta gcttc 35

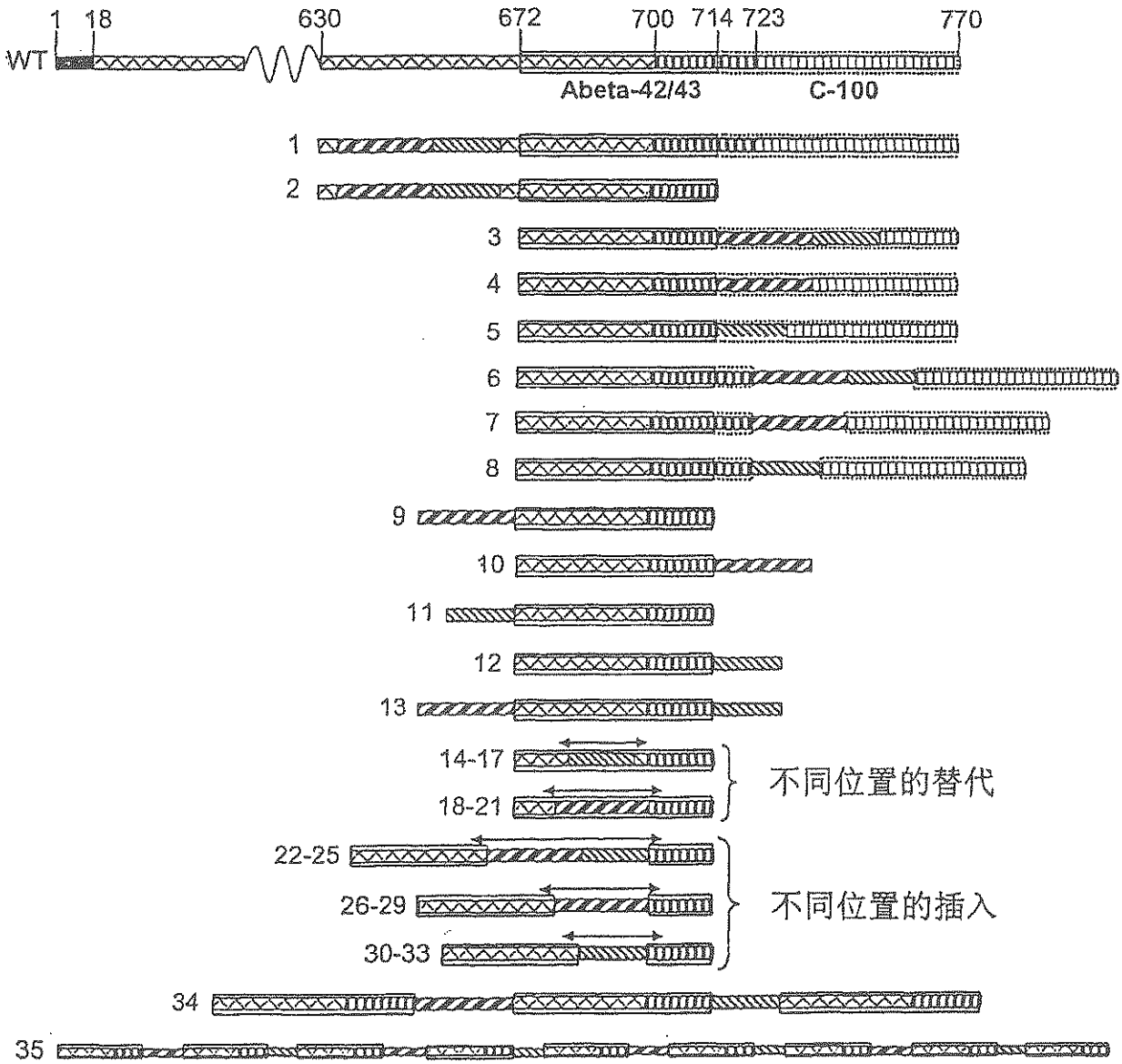

1
18
630
672
700
714
723
770
WT
Abeta-42/43
C-100
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14-17
18-21
不同位置的替代
22-25
26-29
30-33
不同位置的插入
34
35

Fig. 1