

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98811731.2

[51] Int. Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 9/26 (2006.01)

A61K 33/06 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008年3月12日

[11] 授权公告号 CN 100374151C

[22] 申请日 1998.11.30 [21] 申请号 98811731.2

[30] 优先权

[32] 1997.12.2 [33] US [31] 60/067,740

[32] 1998.4.7 [33] US [31] 60/080,970

[86] 国际申请 PCT/US1998/025386 1998.11.30

[87] 国际公布 WO1999/027944 英 1999.6.10

[85] 进入国家阶段日期 2000.6.1

[73] 专利权人 神经实验室有限公司

地址 百慕大群岛史密斯

[72] 发明人 戴尔·B·申克

[56] 参考文献

WO9116819A1 1991.11.14

CN1086142A 1994.5.4

审查员 曲 燕

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 13 页 说明书 69 页 附图 13 页

[54] 发明名称

产生免疫的药物组合物及其在制备预防和治疗致淀粉样病的药物中的用途

[57] 摘要

本发明提供了治疗致淀粉样病的组合物和方法。该方法需要给患者使用一种诱导对淀粉样沉积物产生有益免疫应答的药物。该方法在预防和治疗阿耳茨海默氏病中尤其有用。在该方法中，合适的药物是 A β 肽或其抗体。

1. 药物组合物，包括（1）至少 10 μ g A β 肽或 A β 肽的免疫片段，所述 A β 肽或 A β 肽的免疫片段可在患者体内有效诱导产生免疫应答，所述免疫应答包括结合 A β 肽的抗体，和（2）可药用的佐剂，其中佐剂可增强对 A β 肽的免疫应答。
2. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述佐剂包括明矾。
3. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述佐剂包括 3 脱-氧-酰化单磷酰脂类 A。
4. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述佐剂包括 StimulonTM QS-21。
5. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述的佐剂包括巨噬细胞集落刺激因子。
6. 权利要求 1 的药物组合物，进一步包括 GM-CSF。
7. 权利要求 1 的药物组合物，其中 A β 肽或 A β 肽的免疫片段包胶于颗粒内。
8. 权利要求 7 的药物组合物，其中颗粒是聚丙交酯聚乙交酯共聚物颗粒。
9. 权利要求 1~8 任一项的药物组合物，包括 A β 肽。
10. 权利要求 9 的药物组合物，其中 A β 肽是 A β 43。

11. 权利要求 9 的药物组合物，其中 A β 肽是 A β 42。
12. 权利要求 9 的药物组合物，其中 A β 肽是 A β 41。
13. 权利要求 9 的药物组合物，其中 A β 肽是 A β 40。
14. 权利要求 9 的药物组合物，其中 A β 肽是 A β 39。
15. 权利要求 9 的药物组合物，包括至少 10 μ g 的 A β 肽。
16. 权利要求 9 的药物组合物，包括至少 20 μ g 的 A β 肽。
17. 权利要求 9 的药物组合物，包括至少 50 μ g 的 A β 肽。
18. 权利要求 9 的药物组合物，包括至少 100 μ g 的 A β 肽。
19. 权利要求 1~8 任一项的药物组合物，包括 A β 肽的免疫片段。
20. 权利要求 19 的药物组合物，其中 A β 肽的免疫片段来自 N-端一半的 A β 肽。
21. 权利要求 20 的药物组合物，其中 A β 肽的免疫片段为 A β 1-5。
22. 权利要求 21 的药物组合物，其中 A β 1-5 的氨基酸序列是 NH₂-DAEFR-COOH。
23. 权利要求 20 的药物组合物，其中 A β 肽的免疫片段为 A β 1-6。
24. 权利要求 23 的药物组合物，其中 A β 1-6 的氨基酸序列是 NH₂-DAEFRH-COOH。

25. 权利要求 20 的药物组合物,其中 A β 肽的免疫片段为 A β 1-12。

26. 权利要求 25 的药物组合物,其中 A β 1-12 的氨基酸序列是 NH₂-DAEFRHDSGYEV-COOH。

27. 权利要求 19 的药物组合物,其中 A β 肽的免疫片段选自 A β 1-5、A β 1-6、A β 1-12、A β 13-28、A β 17-28、A β 25-35、A β 33-42、A β 35-40 和 A β 35-42。

28. 权利要求 19 的药物组合物,包括至少 10 μ gA β 肽的免疫片段。

29. 权利要求 19 的药物组合物,包括至少 20 μ gA β 肽的免疫片段。

30. 权利要求 19 的药物组合物,包括至少 50 μ gA β 肽的免疫片段。

31. 权利要求 19 的药物组合物,包括至少 100 μ gA β 肽的免疫片段。

32. 有效诱导产生免疫应答的 A β 肽或 A β 肽的免疫片段和药学接受的可增强对 A β 肽或免疫原性 A β 肽片段的免疫应答的佐剂在制备用于治疗或预防患者体内有淀粉样沉积物之疾病的药物中的用途,其中所述免疫应答包括结合 A β 肽的抗体。

33. 权利要求 32 的用途,其中所述的佐剂包括明矾。

34. 权利要求 32 的用途,其中所述的佐剂包括 3 脱-氧-酰化单磷酸脂类 A。

35. 权利要求 32 的用途,其中所述佐剂包括 StimulonTM QS-21。

36. 权利要求 32 的用途，其中所述的佐剂包括巨噬细胞集落刺激因子。

37. 权利要求 32 的用途，其中所述的药物还包括 GM-CSF。

38. 权利要求 32 的用途，其中所述的药物包胶于颗粒内。

39. 权利要求 38 的用途，其中颗粒是聚丙交酯聚乙交酯共聚物颗粒。

40. 如权利要求 32~39 任一项的用途，其中在制备中使用了 A β 肽。

41. 权利要求 40 的用途，其中 A β 肽是 A β 43。

42. 权利要求 40 的用途，其中 A β 肽是 A β 42。

43. 权利要求 40 的用途，其中 A β 肽是 A β 41。

44. 权利要求 40 的用途，其中 A β 肽是 A β 40。

45. 权利要求 40 的用途，其中 A β 肽是 A β 39。

46. 权利要求 40 的用途，包括至少 10 μ g 的 A β 肽。

47. 权利要求 40 的用途，包括至少 20 μ g 的 A β 肽。

48. 权利要求 40 的用途，包括至少 50 μ g 的 A β 肽。

49. 权利要求 40 的用途，包括至少 100 μ g 的 A β 肽。

50. 如权利要求 32~39 任一项的用途，其中在制备中使用了 A β 肽的免疫片段。

51. 权利要求 50 的用途，其中 A β 肽的免疫片段来自 N-端一半的 A β 肽。

52. 权利要求 51 的用途，其中 A β 肽的免疫片段为 A β 1-5。

53. 权利要求 52 的用途，其中 A β 1-5 的氨基酸序列是 NH₂-DAEFR-COOH。

54. 权利要求 51 的用途，其中 A β 肽的免疫片段为 A β 1-6。

55. 权利要求 54 的用途，其中 A β 1-6 的氨基酸序列是 NH₂-DAEFRH-COOH。

56. 权利要求 51 的用途，其中 A β 肽的免疫片段为 A β 1-12。

57. 权利要求 56 的用途，其中 A β 1-12 的氨基酸序列是 NH₂-DAEFRHDSGYEV-COOH。

58. 权利要求 50 的用途，其中 A β 肽的免疫片段选自 A β 1-5、A β 1-6、A β 1-12、A β 13-28、A β 17-28、A β 25-35、A β 33-42、A β 35-40 和 A β 35-42。

59. 权利要求 50 的用途，包括至少 10 μ g A β 肽的免疫片段。

60. 权利要求 50 的用途，包括至少 20 μ g A β 肽的免疫片段。

61. 权利要求 50 的用途，包括至少 50 μg A β 肽的免疫片段。

62. 权利要求 50 的用途，包括至少 100 μg A β 肽的免疫片段。

63. 一种包含连接于载体蛋白形成共轭的有效量的 A β 肽或 A β 肽的免疫片段的药物组合物，其中载体蛋白有助于引起对 A β 的免疫应答。

64. 权利要求 63 的药物组合物，其中所述的载体蛋白是霍乱毒素。

65. 权利要求 63 的药物组合物，其中所述的载体蛋白是免疫球蛋白。

66. 权利要求 63 的药物组合物，其中所述的载体蛋白是白喉类毒素。

67. 权利要求 63 的药物组合物，其中所述的载体蛋白是减毒的白喉毒素 CRM 197。

68. 权利要求 63 的药物组合物，其中所述的载体蛋白是破伤风类毒素。

69. 权利要求 63 的药物组合物，进一步包括佐剂。

70. 权利要求 69 的药物组合物，其中所述佐剂包括明矾。

71. 权利要求 69 的药物组合物，其中所述佐剂包括 3 脱-氧-酰化单磷酰脂类 A。

72. 权利要求 69 的药物组合物，其中所述佐剂包括 StimulonTM

QS-21。

73. 权利要求 69 的药物组合物，其中所述的佐剂包括巨噬细胞集落刺激因子。

74. 权利要求 63 的药物组合物，进一步包括 GM-CSF。

75. 权利要求 63 的药物组合物，包括连接到载体蛋白上的 A β 肽。

76. 权利要求 75 的药物组合物，其中 A β 肽是 A β 43。

77. 权利要求 75 的药物组合物，其中 A β 肽是 A β 42。

78. 权利要求 75 的药物组合物，其中 A β 肽是 A β 41。

79. 权利要求 75 的药物组合物，其中 A β 肽是 A β 40。

80. 权利要求 75 的药物组合物，其中 A β 肽是 A β 39。

81. 权利要求 75 的药物组合物，包括至少 10 μ g 的 A β 肽。

82. 权利要求 75 的药物组合物，包括至少 20 μ g 的 A β 肽。

83. 权利要求 75 的药物组合物，包括至少 50 μ g 的 A β 肽。

84. 权利要求 75 的药物组合物，包括至少 100 μ g 的 A β 肽。

85. 权利要求 63~74 任一项的药物组合物，包括连接到载体蛋白 A β 肽的免疫片段。

86. 权利要求 85 的药物组合物, 其中 A β 肽的免疫片段来自 N-端一半的 A β 肽。

87. 权利要求 86 的药物组合物, 其中 A β 肽的免疫片段为 A β 1-5。

88. 权利要求 87 的药物组合物, 其中 A β 1-5 的氨基酸序列是 NH₂-DAEFR-COOH。

89. 权利要求 86 的药物组合物, 其中 A β 肽的免疫片段为 A β 1-6。

90. 权利要求 89 的药物组合物, 其中 A β 1-6 的氨基酸序列是 NH₂-DAEFRH-COOH。

91. 权利要求 86 的药物组合物, 其中 A β 肽的免疫片段为 A β 1-12。

92. 权利要求 91 的药物组合物, 其中 A β 1-12 的氨基酸序列是 NH₂-DAEFRHDSGYEV-COOH。

93. 权利要求 85 的药物组合物, 其中 A β 肽的免疫片段选自 A β 1-5、A β 1-6、A β 1-12、A β 13-28、A β 17-28、A β 25-35、A β 33-42、A β 35-40 和 A β 35-42。

94. 权利要求 85 的药物组合物, 包括至少 10 μ g A β 肽的免疫片段。

95. 权利要求 85 的药物组合物, 包括至少 20 μ g A β 肽的免疫片段。

96. 权利要求 85 的药物组合物, 包括至少 50 μ g A β 肽的免疫片段。

97. 权利要求 85 的药物组合物, 包括至少 100 μ g A β 肽的免疫片段。

98. 权利要求 63~84 和 86~97 的任一项药物组合物, 进一步包括药用载体。

99. 权利要求 85 的药物组合物, 进一步包括药用载体。

100. 权利要求 1~8 任一项的药物组合物, 其中所述的组合物不含完全弗氏佐剂。

101. 连接于载体蛋白形成共轭的有效量的 A β 肽或 A β 肽的免疫片段, 在制备用于治疗或预防患者体内有淀粉样沉积物之疾病的药物中的用途, 其中载体蛋白有助于对 A β 的免疫应答。

102. 权利要求 101 的用途, 其中所述的载体蛋白是霍乱毒素。

103. 权利要求 101 的用途, 其中所述的载体蛋白是免疫球蛋白。

104. 权利要求 101 的用途, 其中所述的载体蛋白是白喉类毒素。

105. 权利要求 101 的用途, 其中所述的载体蛋白是减毒的白喉毒素 CRM 197。

106. 权利要求 101 的用途, 其中所述的载体蛋白是破伤风类毒素。

107. 权利要求 101~106 任一项的用途, 其中所述的药物进一步包括佐剂。

108. 权利要求 107 的用途, 其中所述佐剂包括明矾。

109. 权利要求 107 的用途, 其中所述佐剂包括 3 脱-氧-酰化单磷

酰脂类 A。

110. 权利要求 107 的用途, 其中所述佐剂包括 StimulonTM QS-21。

111. 权利要求 107 的用途, 其中所述的佐剂包括巨噬细胞集落刺激因子。

112. 权利要求 107 的用途, 其中所述药物进一步包括 GM-CSF。

113. 如权利要求 101~112 任一项的用途, 其中在制备中使用了连接到载体蛋白上的 A β 肽。

114. 权利要求 113 的用途, 其中 A β 肽是 A β 43。

115. 权利要求 113 的用途, 其中 A β 肽是 A β 42。

116. 权利要求 113 的用途, 其中 A β 肽是 A β 41。

117. 权利要求 113 的用途, 其中 A β 肽是 A β 40。

118. 权利要求 113 的用途, 其中 A β 肽是 A β 39。

119. 权利要求 113 的用途, 包括至少 10 μ g 的 A β 肽。

120. 权利要求 113 的用途, 包括至少 20 μ g 的 A β 肽。

121. 权利要求 113 的用途, 包括至少 50 μ g 的 A β 肽。

122. 权利要求 113 的用途, 包括至少 100 μ g 的 A β 肽。

123. 如权利要求 101~106 和 108~112 任一项的用途，其中在制备中使用了连接到载体蛋白 A β 肽的免疫片段。

124. 如权利要求 107 的用途，其中在制备中使用了连接到载体蛋白 A β 肽的免疫片段。

125. 权利要求 123 的用途，其中 A β 肽的免疫片段来自 N-端一半的 A β 肽。

126. 权利要求 125 的用途，其中 A β 肽的免疫片段为 A β 1-5。

127. 权利要求 126 的用途，其中 A β 1-5 的氨基酸序列是 NH₂-DAEFR-COOH。

128. 权利要求 125 的用途，其中 A β 肽的免疫片段为 A β 1-6。

129. 权利要求 128 的用途，其中 A β 1-6 的氨基酸序列是 NH₂-DAEFRH-COOH。

130. 权利要求 125 的用途，其中 A β 肽的免疫片段为 A β 1-12。

131. 权利要求 130 的用途，其中 A β 1-12 的氨基酸序列是 NH₂-DAEFRHDSGYEV-COOH。

132. 权利要求 123 的用途，其中 A β 肽的免疫片段选自 A β 1-5、A β 1-6、A β 1-12、A β 13-28、A β 17-28、A β 25-35、A β 33-42、A β 35-40 和 A β 35-42。

133. 权利要求 123 的用途，包括至少 10 μ g A β 肽的免疫片段。

134. 权利要求 123 的用途，包括至少 20 $\mu\text{gA}\beta$ 肽的免疫片段。
135. 权利要求 123 的用途，包括至少 50 $\mu\text{gA}\beta$ 肽的免疫片段。
136. 权利要求 123 的用途，包括至少 100 $\mu\text{gA}\beta$ 肽的免疫片段。
137. 权利要求 101~106 任一项的用途，其中所述的药物进一步包括药用载体。
138. 权利要求 32~39、101~106 任一项的用途，其中所述淀粉样沉积物包括聚集态 $\text{A}\beta$ 肽。
139. 权利要求 32~39、101~106 任一项的用途，其中所述患者是人。
140. 权利要求 32~39、101~106 任一项的用途，其中所述疾病是阿耳茨海默氏病。
141. 权利要求 32~39、101~106 任一项的用途，其中所述患者是无症状的。
142. 权利要求 32~39、101~106 任一项的用途，其中所述患者年龄在 50 岁以下。
143. 权利要求 32~39、101~106 任一项的用途，其中所述患者具有显示对阿耳茨海默氏病有易感性的遗传危险因素。
144. 权利要求 32~39、101~106 任一项的用途，其中所述患者不具有已知的有关阿耳茨海默氏病的危险因素。

145. 权利要求 40 的用途，其中所述 A β 肽是聚集形式。

146. 权利要求 32~39 任一项所述的用途，其中所述免疫应答包括结合 A β 肽的作为 MHC I 或 MHC II 复合体之成分的 T-细胞。

147. 权利要求 32~39、101~106 任一项的用途，其中所述药物用于经口服、皮下、肌内、局部或静脉内给药。

148. 权利要求 32~39、101~106 任一项的用途，其中所述药物用于经肌内或皮下给药。

产生免疫的药物组合物及其在制备预防和 治疗致淀粉样病的药物中的用途

相关申请的相互参考

本发明的优先权为 1997 年 12 月 2 日申请的 USSN60/067,740 和 1998 年 4 月 7 日申请的 USSN60/080,970, 在这里全文引用作为参考。

技术领域

本发明属于免疫学和医学领域。

发明背景

阿尔茨海默病（早老性痴呆，AD）是一种导致老年性痴呆的进行性疾病。一般参见 Selkoe, TINS, 16, 403-409 (1993); Hardy 等, WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-447 (1994); Duff 等, 自然, 373, 476-477 (1995); Games 等, 自然, 373, 523 (1995)。广义上讲, 该疾病分为两类, 发生在晚年（65 岁以上）的晚期发作, 和老年期之前（即 35-60 岁）形成的早期发作。在该病的两种类型中, 病理学是相同的, 但是如果在早年开始, 异常可能更加严重且分布更广泛。该疾病特征在于大脑两种类型的损伤, 衰老斑和神经纤维缠结。通过脑组织切片的显微分析观察到, 衰老斑是直径达 150 μ m、中心穿插有胞外淀粉样沉积物的紊乱的神经纤维网区域。神经纤维缠结是含有两根细丝（互相成对地缠绕在一起）的 τ 蛋白质的细胞内沉积物。

衰老斑的主要成分是被称为 A β 或 β -淀粉样肽的肽。A β 肽是被称为淀粉样前体蛋白质（APP）的前体蛋白质的含 39-43 个氨基酸的内部片段。阿尔茨海默病的发生与 APP 蛋白质的几种突变有关。参见, 例如 Goate 等, 自然, 349, 704 (1991) (缬氨酸⁷¹⁷变为异亮氨酸); Chartier Harlan 等, 自然, 353, 844 (1991) (缬氨酸⁷¹⁷变为甘氨酸); Murrell 等, 科学, 254, 97 (1991) (缬氨酸⁷¹⁷变为苯丙氨酸); Mullan 等,

Nature Genet., 1, 345 (1992) (赖氨酸⁵⁹⁵-甲硫氨酸⁵⁹⁶变为天冬氨酸⁵⁹⁵-亮氨酸⁵⁹⁶的双突变)。认为该突变通过增加或改变 APP 到 A β 的加工,特别是使 APP 增量加工成为长型 A β (即, A β 1-42 和 A β 1-43),引起阿尔茨海默病。认为其它基因 (如早衰素 (presenilin) 基因, PS1 和 PS2) 的突变,间接影响 APP 加工,产生长型 A β 的增量 (参见 Hardy, TINS, 20, 154 (1997))。该观察表明 A β ,特别是它的长型,是引起阿尔茨海默病的病因。

McMichael 在 EP 526,511 中提出了对已确定为 AD 的患者以顺势疗法剂量给药 A β (小于或等于 10⁻²mg/天)。对于具有 5 升血浆的一般人,甚至该剂量的上限可以为产生不超过 2 pg/ml 浓度的剂量。在血浆中 A β 的正常浓度一般地在 50-200 pg/ml 范围内 (Seubert 等, 自然, 359, 325-327 (1992))。因为在 EP 526,511 中提出的剂量只是改变内源性循环 A β 的水平,并因为在 EP 526,511 中没有推荐使用佐剂,似乎产生的任何治疗性结果都是难以置信的。

相反,本发明通过在患者体内产生有益免疫应答的条件下,对患者给药 A β 或其它免疫原。因此本发明满足了长期存在的对预防或改善阿尔茨海默病之神经病理学的治疗方案的需要。

发明简述

一方面,本发明提供了预防或治疗特征在于患者体内淀粉样沉积物的疾病的方法。该方法需要诱导针对患者体内淀粉样沉积物之肽成分的免疫应答。该诱导可以是主动的 (通过给药免疫原),或是被动的 (通过给药抗体或抗体的活性片断或衍生物)。在一些患者中,A β 肽聚集成淀粉样沉积物,该疾病称为阿尔茨海默病。在一些方法中,有些患者是无症状的。在一些方法中,有些患者年龄小于 50 岁。在一些方法中,有些患者遗传获得对阿尔茨海默病表现易感性的危险因素。该危险因素包括早衰基因 PS1 或 PS2 中的变异等位基因,和 APP 的变异型。在其它的方法中,有些患者没有已知的有关阿尔茨海默病

的危险因素。

对于患有阿尔茨海默病患者的治疗，一个治疗方案需要对患者给药一定剂量的 A β 肽，以诱导免疫应答。在一些方法中，A β 肽和佐剂一起给药，以提高对 A β 肽的免疫应答。在一些方法中，佐剂为明矾。在一些方法中，佐剂为 MPL。如果和佐剂共同给药，对患者给药 A β 肽的剂量典型地至少为 1 或 10 μ g，如果不和佐剂共同给药，剂量至少为 50 μ g。在一些方法中，剂量至少 100 μ g。

在一些方法中，A β 肽为 A β 1-42。在一些方法中，A β 肽以聚集态给药。在另一些方法中，A β 肽以分离型给药。在一些方法中，治疗药物为有效量的编码 A β 或其活性片断或衍生物的核酸。编码 A β 或其活性片断或衍生物的核酸在患者体内表达，产生 A β 或它们的活性片断或衍生物，其可以诱导免疫应答。在一些方法中，核酸通过皮肤，任选经贴片（patch）给药。在一些方法中，通过筛选化合物文库，鉴定与 A β 抗体反应的化合物，然后给患者给药该化合物以诱导免疫应答，来鉴定治疗药物。

在一些方法中，免疫应答由聚集态 A β 肽引起，而不是由分离型 A β 肽引起。例如，免疫应答可以包括与聚集态 A β 肽结合而不与分离型 A β 肽结合的抗体。在一些方法中，免疫应答包括与 A β 结合的 T-细胞，所述 A β 与 CD8 或 CD4 细胞上的 MCH I 或 MHC II 复合。在其它方法中，免疫应答通过对患者给药 A β 的抗体进行诱导。在一些方法中，通过从患者体内分离出 T-细胞，在 T-细胞被激活的条件下使 A β 肽与 T-细胞接触，替换患者体内的 T-细胞，以诱导免疫应答。

典型地，治疗药物可以通过口服、鼻内、皮内、皮下、肌内、局部或静脉内给药。在一些方法中，给药后对患者进行监控，以评价免疫应答。如果监控表明在一段时间后免疫应答减少，可以给患者给药一个或更多剂量的药物。

另一方面,本发明提供了含有 A β 和适于口服或其它给药途径的赋形剂的药物组合物。本发明还提供了含有有效诱导患者对 A β 免疫应答的药物和可药用的佐剂的药物组合物。在一些该组合物中,药物为 A β 或其活性片断。在一些组合物中,佐剂含有明矾。在一些组合物中,佐剂含有水包油型乳剂。在一些组合物中,A β 或活性片断是聚丙交酯聚乙交酯共聚物(PLPG)或其它颗粒的成分。本发明进一步提供了含有连接有共轭分子的 A β 或活性片断的组合物,所述共轭物可以促进 A β 在患者血流中的传递和/或促进对 A β 的免疫应答。例如,共轭分子可以促进对 A β 的免疫应答。在一些组合物中,共轭分子为霍乱毒素。在一些组合物中,共轭分子为免疫球蛋白。在一些组合物中,共轭分子为减毒的白喉毒素 CRM197 (Gupta, 疫苗, 15, 1341-3 (1997))。

本发明还提供了药物组合物,其中含有在组合物不含完全弗氏佐剂的条件下有效诱导患者对 A β 免疫应答的药物。本发明还提供了含有病毒载体的组合物,所述病毒载体编码能够有效诱导对 A β 产生免疫应答的 A β 或其活性片断。合适的病毒载体包括疱疹病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、新培斯病毒、塞姆利基森林病毒、痘苗病毒或禽痘病毒。

本发明进一步提供了预防或治疗阿尔茨海默病的方法。在该方法中,给患者给药有效剂量的 A β 肽。本发明进一步提供了 A β 或其抗体在制备预防或治疗阿尔茨海默病的药物中的应用。

另一方面,本发明提供了对患者阿尔茨海默病治疗方法之疗效的评价方法。在该方法中,测定进行药物治疗前患者的组织样品中 A β 肽特异性抗体的基线量。将进行治疗后患者的组织样品中 A β 肽特异性抗体的量,和 A β 肽特异性抗体的基线量进行比较。如治疗后测得的 A β 肽特异性抗体的量明显高于 A β 肽特异性抗体的基线量,则表明治疗结果是积极的。

在对患者阿尔茨海默病治疗方法进行疗效评价的其它方法中，测定进行药物治疗前患者的组织样品中 A β 肽特异性抗体的基线量。将进行药物治疗后患者的组织样品中 A β 肽特异性抗体的量，和 A β 肽特异性抗体的基线量进行比较。如治疗后测得的 A β 肽特异性抗体的量和 A β 肽特异性抗体的基线量相比减少了或没有明显区别，则表明治疗结果是消极的。

在对患者阿尔茨海默病治疗方法进行疗效评价的其它方法中，测定对照群体的组织样品中 A β 肽特异性抗体的对照量。将进行药物治疗后患者的组织样品中 A β 肽特异性抗体的量，和 A β 肽特异性抗体的对照量进行比较。如治疗后测得的 A β 肽特异性抗体的量明显高于 A β 肽特异性抗体的对照量，则表明治疗结果是积极的。

在对患者阿尔茨海默病治疗方法进行疗效评价的其它方法中，测定对照群体的组织样品中 A β 肽特异性抗体的对照量。将进行药物治疗后患者的组织样品中 A β 肽特异性抗体的量，和 A β 肽特异性抗体的对照量进行比较。治疗后测得的 A β 肽特异性抗体的量和 A β 肽特异性抗体的对照量相比没有明显区别，这表明治疗结果是消极的。

监控患者阿尔茨海默病或其易感性的其它方法，包括检测患者样品中对于 A β 肽的免疫应答。在一些方法中，对患者给予有效治疗和预防阿尔茨海默病的药物，应答水平决定患者的进一步治疗方案。

在对患者阿尔茨海默病治疗方法进行疗效评价的其它方法中，测定已进行药物治疗的患者的组织样品中 A β 肽特异性抗体量的值。将该值与从由于药物治疗阿尔茨海默病症状改善或消失的患者群测得的对照值进行比较。如患者的值至少等于对照值，这表明治疗结果是积极的。

本发明还进一步提供了实施上述方法的诊断试剂盒。典型地，该试剂盒包括特异性结合 A β 抗体或刺激与 A β 反应的 T-细胞增殖的试剂。

附图说明

图 1: 给转基因小鼠注射 A β 1-42 后的抗体效价。

图 2: 海马中的淀粉样损伤。通过对免疫反应脑切片进行的计算机辅助定量图像分析，测定了淀粉样斑占据的海马区面积百分率（由与 A β -特异性 mA β 3D6 的反应性确定）。个体小鼠的该值表示成分类治疗组。每组的横线表示分布的中值。

图 3: 海马中的神经性营养不良。通过对免疫反应脑切片进行的计算机辅助定量图像分析，测定了营养不良神经占据的海马区面积百分率（由它们与人 APP-特异性 m A β 8E5 的反应性确定）。个体小鼠的该值表示为 AN1792 治疗组和 PBS 治疗对照组。每组的横线表示分布的中值。

图 4: 夹肌后皮质中的星形细胞增生。通过对免疫反应脑切片进行的计算机辅助定量图像分析，测定了神经胶质纤丝酸性蛋白质（GFAP）-阳性星形细胞占据的皮质区的面积百分率。个体小鼠的该值表示为分类治疗组，组中值用横线表示。

图 5: 用八种剂量的 AN1792（0.14、0.4、1.2、3.7、11、33、100 或 300 μ g）免疫后，A β 1-42 抗体效价的几何平均值。

图 6: 对 AN1792 免疫的抗体反应动力学。效价通过每组 6 个动物的几何平均值表示。

图 7: PBS-和 AN1792-治疗小鼠中皮质淀粉样损伤的定量图像分析。

图 8: PBS-和 AN1792-治疗小鼠中神经性斑损伤的定量图像分析。

图 9: PBS-和 AN1792-治疗小鼠中星形细胞占据夹肌后皮质的百分率的定量图像分析。

图 10: AN1792-处理（上图）或 PBS-处理（下图）的脾细胞的淋

巴细胞增殖分析。

图 11: 皮质中 A β 的总体水平。用 A β 或 APP 衍生物结合弗氏佐剂免疫的小鼠中个体 A β 的散点图。

图 12: 通过对用 A β 肽共轭物 A β 1-5、A β 1-12 和 A β 13-28; 全长 A β 聚集物 AN1792 (A β 1-42) 和 AN1528 (A β 1-40) 以及 PBS 治疗对照组免疫的小鼠的免疫反应脑切片进行的定量图像分析测定的皮质中淀粉样损伤。

图 13: 用 A β 或 APP 衍生物结合弗氏佐剂免疫的各组小鼠的 A β 特异性抗体的几何平均效价。

图 14: 用 AN1792 或其棕榈酸酯衍生物结合不同佐剂免疫的各组豚鼠的 A β 肽特异性抗体的几何平均效价。

图 15: 用 AN1792 或 AN1528 和不同的佐剂治疗的 12 个月龄的 PDAPP 小鼠皮质中的 A β 水平。

定义

术语“基本上相同”是指两个肽序列，当最优排列时，例如通过 GAP 或 BESTFIT 程序采用默认间隙重量，具有至少 65%的序列等同性，优选至少 80 或 90%的序列等同，更加优选至少 95%或更多的序列等同（例如，99%或更高的序列等同）。优选不同的残基位置通过保守氨基酸取代鉴别。

进行序列比较时，通常选定一个序列作为参照序列，将测试序列与其相比较。运行序列比较程序时，将测试序列和参照序列输入计算机，如果需要，指定序列等同物，并指定序列运算程序。然后序列比较运算程序根据指定的程序参数计算出测试序列相对于参照序列的序列等同百分率。

可以通过 Smith 和 Waterman(应用数学进展 2: 482 (1981))的局部同源性运算法则; Needleman 和 Wunsch(分子生物学杂志, 48: 443 (1970))的同源性排列运算法则; Pearson 和 Lipman (美国国家科学

院科学进展, 85: 2444(1988))的相似性检索方法; 运算法则(Wisconsin 遗传学软件包中的 GAP、BESTFIT、FASTA、和 TFASTA, 遗传学计算机组, 575 科学 Madison, WI 博士)的计算机化实施, 或者通过目检(一般性参见 Ausubel 等, 同上)进行序列的优化排列比较。适于确定序列等同性百分率和序列相似性百分率的运算法则的一个实例是 BLAST 运算法则, 它由 Altschul 等描述, 分子生物学, 215: 403-410 (1990)。进行 BLAST 分析的软件由国家生物技术信息中心向公众提供 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。通常, 可以用默认程序参数进行序列比较, 当然也可以使用用户化参数。对于氨基酸序列, BLASTP 程序默认单词长度(W)为 3, 预期值(E)为 10, BLOSUM62 记录矩阵(参见 Henikoff 和 Henikoff, 美国国家科学院科学进展 89, 10915 (1989))。

为了将氨基酸取代分成保守或非保守取代, 须将氨基酸如下分组: 组 I (疏水侧链): 正亮氨酸, 蛋氨酸, 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸; 组 II (中性亲水侧链): 半胱氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸; 组 III (酸性侧链): 天冬氨酸, 谷氨酸; 组 IV (碱性侧链): 天冬酰胺, 谷氨酰胺, 组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸; 组 V (影响链方向的残基): 甘氨酸, 脯氨酸; 和组 VI (芳香族侧链): 色氨酸, 酪氨酸, 苯丙氨酸。保守取代涉及同类氨基酸之间的取代。非保守取代由一组中的一个成分改变成为另一组中的一个成分。

本发明的治疗药物典型地是基本纯的。这意味着药物纯度典型地至少约为 50%w/w (重量/重量), 并且基本上没有干扰蛋白质和污染物。有时药物纯度至少约为 80% w/w, 更优选纯度至少 90%或约 95%w/w。然而, 利用常规蛋白质纯化技术, 可以得到至少 99% w/w 的均一多肽。

两个实体之间的特异性结合指亲和力至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9M^{-1} 或 10^{10}M^{-1} 。优选亲和力高于 10^8M^{-1} 。

使用的术语“抗体”包括完整抗体和其结合片段。通常，片段与其来源的完整抗体竞争性地与抗原特异性结合。任选，抗体或其结合片段可以与其它蛋白质化学结合，或者与其它蛋白质以融合蛋白质的形式表达。

APP⁶⁹⁵、APP⁷⁵¹和APP⁷⁷⁰分别指由人APP基因编码的695、751、和770个氨基酸残基长的多肽。参见Kang等，自然，325，773(1987)；Ponte等，自然，331，525(1988)；和Kitaguchi等，自然，331，530(1988)。人淀粉样前体蛋白(APP)中的氨基酸依照APP770同种型的序列指定编号。例如A β 39、A β 40、A β 41、A β 42、和A β 43指含氨基酸残基1-39、1-40、1-41、1-42、和1-43的A β 肽。

术语“表位”或“抗原决定簇”指使B和/或T细胞应答的抗原上的位点。B-细胞表位可以由相邻氨基酸形成，也可以由通过蛋白质三级折叠靠近的非相邻氨基酸形成。由相邻氨基酸形成的表位在接触变性溶剂时通常维持结构，而由三级折叠形成的表位在用变性溶剂处理时通常失去结构。在一个单一立体构型中表位通常包括至少3个，更经常至少5或8-10个氨基酸。确定表位的立体构型的方法包括，例如，X-射线晶体学和2维核磁共振。参见，例如，分子生物学方法中的表位成像方案(Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular biology)66卷，Glenn E. Morris编(1996)。可以通过显示一个抗体阻断另一个抗体与靶抗原结合能力的简单的免疫分析鉴定识别同样表位的抗体。CD8 T-细胞识别约9个氨基酸的连续表位，CD4 T-细胞识别约3-15个氨基酸的连续表位。识别表位的T细胞可以通过测定抗原-依赖性增殖(通过³H-胸苷掺入对表位应答的激活T-细胞确定)(Burke等，J. Inf. Dis. 170, 1110-19(1994))，通过抗原-依赖性杀伤(细胞毒性T淋巴细胞分析，Tigges等，免疫学杂志，156, 3901-1910)或者通过细胞因子分泌来鉴定。

术语“免疫学”或“免疫”应答是在接受治疗的患者体内形成对抗淀粉样肽的有益的体液（抗体介导的）和/或细胞（抗原特异性 T 细胞或其分泌产物）应答。该应答可以通过给药免疫原诱导的主动应答，也可以是通过给药抗体或激活的 T-细胞诱导的被动应答。在存在与 I 类或 II 类 MHC 分子有关的多肽表位，以激活抗原特异性 CD4⁺ T 辅助细胞和/或 CD8⁺细胞毒性 T 细胞的条件下诱导细胞免疫应答。应答还可以涉及单核细胞、巨噬细胞、NK 细胞、嗜碱细胞、树状细胞、星形细胞、小神经胶质细胞、嗜曙红细胞或其它具有天然免疫力成分的激活。可以通过增殖检测（CD4⁺ T 细胞）或 CTL（细胞毒性 T 淋巴细胞）检测确定细胞介导的免疫学应答的出现（参见，Burke，同上；Tigges，同上）。体液和细胞应答对免疫原产生的保护或治疗效果的相对贡献可以用下述方法区别，即从免疫的同系动物体内单独分离 IgG 和 T-细胞，然后在第二受试者体内测定保护或治疗效果。

“免疫原性的药物”或者“免疫原”是在对患者给药（任选结合佐剂）后能够诱导对它的免疫应答。

术语“裸多核苷酸”指没有与胶状材料复合的多核苷酸。裸多核苷酸有时被克隆到质粒载体中。

术语“佐剂”指当与抗原结合给药时增强对抗原的免疫应答，但当单独给药时，不产生对抗原免疫应答的化合物。佐剂可以通过几种机制增强免疫应答，包括征集淋巴细胞、激活 B 和/或 T 细胞、和激活巨噬细胞。

术语“患者”包括接受预防性或治疗性处理的人和其他哺乳动物受试者。

解聚或单体 A β 指 A β 的可溶解、单体肽单元。制备单体 A β 的一种方法是在洁净 DMSO 中超声溶解冻干肽。将得到的溶液离心除去所有

不溶颗粒。聚集 A β 是低聚体的混合物，其中单体单元通过非共价键结合到一起。

“包括”一种或多种所提及元素的组合物或方法可以包括没有具体提及的其他元素。例如，含有 A β 肽的组合物中包含分离的 A β 肽和作为一种较长多肽序列成分的 A β 肽。

发明详述

I. 总则

本发明提供了预防和治疗特征在于淀粉样沉淀物累积的疾病的药物组合物和方法。淀粉样沉淀物包括聚集成不溶团块的肽。该肽的性质随不同疾病有所变化，但在大多数情况下，聚集物具有 β -折叠的片层结构，可以用刚果红染料染色。特征在于淀粉样沉淀物的疾病包括阿尔茨海默氏病（AD），晚期发作和早期发作。在两种疾病中，淀粉样沉淀物包括被称为 A β 的肽，其在被侵袭个体的脑中累积。特征在于淀粉样沉淀物的疾病的其他一些例子是 SAA 淀粉样变、遗传性冰岛综合症、多发性骨髓瘤、和海绵状脑病（参见 Weissmann 等，神经生物学当前观点（Curr. Opin. Neurobiol.）7, 695-700 (1997); Smits 等，兽医季刊（Veterinary Quarterly）19,101-105(1997); Nathanson 等，美洲流行病学杂志（Am. J. Epidemiol.）145,959-969(1997)）。在这些疾病中形成聚集物肽的前三位分别是血清淀粉样蛋白 A, cystatin C、IgG κ 轻链，其次是感染性蛋白质。

II. 治疗药物

1. 阿尔茨海默氏病

本发明应用的治疗药物诱导对 A β 肽的免疫应答。这些药物包括 A β 自身和其变异型，诱导和/或与 A β 肽抗体交叉反应的 A β 类似物和模拟物，与 A β 肽反应的抗体或 T-细胞。免疫应答的诱导可以是主动的，即对患者给药免疫原，诱导对 A β 反应的抗体或 T-细胞，或者可以是被动的，即对患者给药与 A β 结合的抗体本身。

A β , 也被认为是 β -淀粉样肽, 或者 A4 肽 (参见 US4666829; Glenner 和 Wong, 生物化学和生物物理学研究通讯 (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 120,1131(1984)), 它是一种含 39-43 个氨基酸的肽, 是阿尔茨海默氏病特征斑的基本成分。A β 是通过两种酶 (被称为 β 和 γ 分泌酶) 加工较长蛋白质 APP 产生的 (参见 Hardy, Tins, 20, 154(1997))。已知的与阿尔茨海默氏病有关的 APP 中的突变发生在紧邻 β 或 γ 分泌酶的位点, 或者在 A β 中。例如, 在 APP 加工成 A β 时, 位置 717 紧邻 APP 的 γ 分泌酶酶切位点, 位置 670/671 紧邻 β 分泌酶酶切位点。据信突变通过与形成 A β 的酶切反应相互作用, 增加了产生的 42/43 个氨基酸形式的 A β 的量, 从而导致 AD。

A β 具有不寻常的特性, 即它能够固定和激活典型和替代补体级联。特别是, 它结合 C1q 并最终结合 C3bi。这种关系有利于结合导致 B-细胞激活的巨噬细胞。另外, C3bi 进一步分解, 然后与 B 细胞上的 CR2 以 T 细胞依赖性方式结合, 导致这些细胞的激活增加 10,000 倍。这种机制导致 A β 比其他抗原产生更强的免疫应答。

本申请要求保护的方法中用到的治疗药物可以是 A β 肽的任何自然存在形式, 特别是人中的形式 (即, A β 39、A β 40、A β 41、A β 42、或 A β 43)。这些肽的序列和它们与 APP 前体的关系如 Hardy 等 (TINS, 20,155-158(1997)) 图 1 所示。例如, A β 42 具有如下序列:

H₂N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH

A β 41、A β 40 和 A β 39 与 A β 42 的不同之处在于, 它们分别缺失 C-末端的 Ala、Ala-Ile、和 Ala-Ile-Val。A β 43 与 A β 42 的不同之处在于, 它在 C-末端还具有一个苏氨酸残基。治疗药物也可以是含有对人给药后诱导相似保护性或治疗性免疫应答的表位的天然 A β 肽的活性片段

或类似物。免疫原性片段典型地具有来源于天然肽的至少 3、5、6、10 或 20 个相邻氨基酸的序列。免疫原片段包括 A β 1-5、1-6、1-12、13-28、17-28、25-25、35-40、和 35-42。在一些方法中，来源于 A β N-端一半的片段是优选的。类似物包括等位基因的、种的和诱导的变异体。类似物通常与自然发生肽在一个或几个位置上不同，通常通过保守取代产生。类似物通常表现与天然肽至少 80%或 90%的序列等同性。一些类似物还包括非天然氨基酸或 N-或 C-末端氨基酸的修饰。非天然氨基酸的实例为 α , α -二取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸、4-羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酰胺、 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟赖氨酸、 ω -N-甲基精氨酸。可以按照下面的描述在转基因动物模型中筛选具有预防或治疗效果的片段和类似物。

A β ，其片段、类似物和其他致淀粉样肽可以通过固相肽合成或重组表达合成，或者从天然来源提取。很多供应商提供商品自动肽合成仪，例如应用生物系统（Applied Biosystems），Foster City, California。重组表达可以在细菌例如大肠杆菌、酵母菌、昆虫细胞或哺乳动物细胞中进行。重组表达的方法如 Sambrook 等描述（分子克隆：实验室手册（C. S. H. P.出版社，NY，第二版，1989））。也有一些商品提供的 A β 肽（例如，American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA 和 California Peptide Research, Inc. Napa, CA）。

治疗药物还包括较长的多肽，包括，例如，与其它氨基酸在一起的 A β 肽、活性片段或类似物。例如，A β 肽可以作为完整 APP 蛋白质或其片段出现，例如，从 A β N-末端开始并延续到 APP 末端的 C-100 片段。可以如下所述在动物模型中筛选所述多肽的预防或治疗功效。A β 肽、类似物、活性片段或其它多肽可以以结合形式给药（即作为一种淀粉样肽），或者以分离形式给药。治疗药物还包括单体免疫原药物的多聚体。

在进一步的改进中,免疫原肽,例如 A β 可以作为病毒或细菌疫苗的形式出现。将编码免疫原肽的核酸插入病毒或细菌的基因组或游离体。任选地,核酸以如下方式插入,即免疫原肽以分泌蛋白或与病毒的外表面蛋白质或细菌的跨膜蛋白质一起表达的融合蛋白的形式表达,以使该肽出现。该方法中使用的病毒或细菌应当是非病原性的或减毒的。合适的病毒包括腺病毒、HSV、痘苗病毒和鸡痘病毒。免疫原肽与 HBV 的 HBsAg 的融合体尤其合适。治疗药物还包括不必然具有与 A β 的显著氨基酸序列相似性,然而却作为 A β 的模拟物并诱导类似免疫应答的肽和其他化合物。例如,可以筛选所有形成 β -折叠片层的肽和蛋白质的适用性。也可以使用抗 A β 或其它致淀粉样肽单克隆抗体的抗-独特型抗体。该抗-Id 的抗体类似抗原,产生对它的免疫应答(参见基本免疫学 (Essential Immunology) (Roit 等, Blackwell 科学出版社, Palo Alto, 第 6 版), 181 页)。

还可以筛选肽或其它化合物随机文库的适用性。对于一些以按部就班方式合成的化合物类型可以创建组合文库,这类化合物包括多肽、 β -转角模拟物、多糖、磷脂、激素、前列腺素、类固醇、芳香族化合物、杂环化合物、苯并二氮、低聚 N-取代甘氨酸和低聚氨基甲酸。可以通过 Affymax, WO 95/12608, Affymax, WO93/06121, Columbia 大学, WO94/08051, 药典, WO 95/35503 和 Scripps, WO 95/30642 中描述的编码合成文库 (ESL) 法构建化合物的大组合文库(每一文献为各种目的列入本文作为参考)。也可以通过噬菌体展示法产生肽文库。参见,例如, Devlin, WO 91/18980。

首先通过确定组合文库和其它化合物与已知的特异于 A β 或其它致淀粉样肽的抗体或淋巴细胞 (B 或 T) 的结合能力,筛选它们的适用性。例如,可以用任何 A β 或其它致淀粉样肽的多克隆血清或单克隆抗体进行最初的筛选。然后进一步分析该筛选鉴定的化合物诱导 A β 或其它致淀粉样肽的抗体或反应性淋巴细胞的能力。例如,可以在用 A β 肽预涂的微量滴定平板上测试血清的多步稀释物,可以进行标准

ELISA, 以测试 A β 的反应性抗体。然后按照实施例中的描述, 在预先诱导致淀粉样病的转基因动物体内测试化合物的预防和治疗功效。所述动物包括, 例如, 如 Games 等 (同上) 所述的带有 APP 717 突变的小鼠, 和带有 APP 瑞典突变的小鼠, 例如, McConlogue 等, US 5,612,486 和 Hsiao 等, 科学, 274, 99 (1996); Staufenbiel 等, 美国国家科学院科学进展 94, 13287-13292 (1997); Sturchler-Pierrat 等, 美国国家科学院科学进展 94, 13287-13292 (1997); Borchelt 等, 神经 (Neuron) 19, 939-945 (1997)。可以将同样的筛选方法用于其它潜在药物, 例如前面所述的 A β 片段、A β 类似物和包括 A β 的更长肽。

本发明的治疗药物还包括特异性结合 A β 的抗体。该抗体可以是单克隆或多克隆的。这些抗体中的一些特异性结合聚集态的 A β 而不结合分离型的 A β 。一些特异性结合分离型而不结合聚集态。一些既结合聚集态又结合分离型。可以通过, 例如, 用 A β 免疫动物制备非人单克隆抗体, 例如, 鼠科动物或大鼠。参见 Harlow 和 Lane, 抗体, 实验室手册 (CSHP, NY, 1988) (为各种目的列入本文作为参考)。这样一种免疫原可以从天然来源获得、通过肽合成或者通过重组表达获得。

可以通过重组 DNA 技术将非人抗体的 CDR 区连接到人恒定区产生鼠抗体的人源化形式。参见 Queen 等, 美国国家科学院科学进展, 86, 10029-10033 (1989) 和 WO 90/07861 (为各种目的列入本文作为参考)。

可以利用噬菌体展示法获得人抗体。参见, 例如, Dower 等, WO 91/17271; McCafferty 等, WO 92/01047。在这些方法中, 产生噬菌体文库, 其中的成员在它们的外表面上展示不同的抗体。抗体通常展示为 Fv 或 Fab 片段。通过亲合浓缩选择对 A β 或其片段具有理想特异性的噬菌体展示抗体。也可以从具有编码至少一段人免疫球蛋白基因座和一种失活的内源性免疫球蛋白基因座的转基因的非人转基因哺乳动物制备抗 A β 的人抗体。参见, 例如, Lonberg 等, WO93/12227 (1993);

Kucherlapati, WO91/10741 (1991) (每篇文献为各种目的全文参考插入)。人抗体可以通过竞争性结合实验选择, 或相反, 则具有与特殊小鼠抗体相同的表位特异性。该抗体非常可能享有小鼠抗体的有用功能特性。还可以从用免疫原药物免疫的人血清中提供人多克隆抗体。任选, 该多克隆抗体可以利用 A β 或其它淀粉样肽作为亲合试剂, 通过亲合纯化浓缩。

人或人源化抗体可以被设计为具有 IgG、IgD、IgA 和 IGE 恒定区, 和所有同种型, 包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。抗体可以表达为含两个轻链和两个重链的四聚体, 表达为单独的重链、轻链, 表达为 Fab, Fab'F(ab')₂、和 Fv, 或者表达成单链抗体, 其中重链和轻链可变区通过间隔区连接起来。

本发明中使用的治疗药物还包括与 A β 肽结合的 T-细胞。例如, 可以通过在昆虫细胞系中表达人 MHC I 类基因和人 β -2-小球蛋白基因, 由此在细胞表面形成一种空复合物, 它可以结合 A β 肽, 来激活抗 A β 肽的 T-细胞。与细胞系接触的 T-细胞被肽特异性激活。参见, Peterson 等, US 5,314,813。表达 MHC II 类抗原的昆虫细胞系同样可以用于激活 CD4 T 细胞。

2. 其它疾病

同样或类似的原则决定治疗其它致淀粉样病的药物的生产。通常, 前面提到的用于治疗阿尔茨海默氏病的药物也可以用于治疗与伸舌样白痴有关的早期发作的阿尔茨海默氏病。在疯牛病中, 感染性蛋白质肽, 活性片段, 类似物, 和感染性蛋白质肽抗体被用于代替 A β 肽。在治疗多发性骨髓瘤中, 用到 IgG 轻链和类似物和其抗体, 其它疾病中也如此。

3. 载体蛋白质

一些诱导免疫应答的物质含有诱导对淀粉样沉积物免疫应答的合

适表位，但它们太小而不具有免疫原性。在这种情况下，可以将肽免疫原连接到适当的载体上，以帮助诱导免疫应答。合适的载体包括血清白蛋白、钥孔蚶（keyhole limpet）血蓝蛋白、免疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵清蛋白、破伤风类毒素、或其它病原菌的类毒素，例如白喉，大肠杆菌，霍乱、或 H. Pylori，或者减毒的毒素衍生物。刺激或增强免疫应答的其它载体包括细胞因子例如 IL-1、IL-1 α 和 β 肽，IL-2、 γ INF、IL-10、GM-CSF、和趋化因子，例如 MIP1 α 和 β 和 RANTES。免疫原性的药物还可以如 O'Mahony, WO 97/17613 和 WO 97/17614 所述与增强跨组织运输作用的肽相连。

免疫原性的药物可以通过化学交联连接到载体上。将免疫原连接到载体上的方法包括用 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基-巯基)-丙酸酯 (SPDP) 和琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯 (SMCC)(如果肽缺乏巯基，可以通过添加半胱氨酸残基提供)。这些试剂在其自身和一种蛋白质肽的半胱氨酸残基之间建立了二硫键，以及通过赖氨酸上的 ϵ -氨基或其它氨基酸中的其它游离氨基建立了酰胺键。免疫学研究(Immun. Rev.)62, 185(1982)中描述了大量这类二硫/酰胺-形成试剂。其它的双功能偶联剂形成硫醚键而不是二硫键。商业提供了一些硫醚形成剂，包括 6-马来酰亚胺基己酸、2-溴乙酸、和 2-碘乙酸、4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷-1-羧酸。羧基可以通过将其与琥珀酰亚胺或 1-羟基-2-硝基-4-磺酸钠盐结合而激活。

免疫原性的肽还可以与载体以融合蛋白质的形式表达。可以将免疫原性的肽连接到载体的氨基末端、羧基末端、或中间。任选，在融合蛋白质中可以多次重复出现免疫原性的肽。

4. 编码免疫原的核酸

对淀粉样沉积物的免疫应答也可以通过给药编码 A β 肽或其它肽免疫原的核酸诱导。所述核酸可以是 DNA 或 RNA。编码免疫原的核酸片段典型地与调控元件相连，例如启动子和增强子，这使 DNA 片段

得以在患者的预期靶细胞中表达。对于在血细胞中的表达，诱导免疫应答理想的是，来自免疫球蛋白轻链或重链基因的启动子和增强子元件或者 CMV 主要即早期启动子和增强子适用于引导表达。相连的调控元件和编码序列通常可克隆到载体中。

公开的一些病毒载体系统包括逆转录病毒系统（参见例如，Lawrie 和 Tumin，遗传学进展的目前观点（*Cur. Opin. Genet. Develop.*）3, 102-109 (1993)）；腺病毒载体（参见例如，Bett 等，病毒学杂志（*J. Virol.*）67, 5911 (1993)）；腺相关病毒载体（参见例如，Zhou 等，实验医学杂志（*J. Exp. Med.*）179, 1867 (1994)），来自痘病毒家族的病毒载体，包括痘苗病毒和禽痘病毒，来自 α 病毒属的病毒载体，例如来自新培斯病毒和塞姆利基森林病毒的载体（参见例如，Dubensky 等，病毒学杂志，70, 508-519 (1996)，以及乳头瘤病毒（Ohe 等，人类基因治疗（*human gene Therapy*）6, 325-333 (1995)；Woo 等，WO 94/12629 和 Xiao 和 Brandsma，核酸研究（*Nucleic Acids Res.*）24, 2630-2622 (1996)）。

编码免疫原的 DNA 或含该 DNA 的载体可以包装于脂质体中。合适的脂质和相关类似物如 US 5208036, US 5264618, US 5279833 和 US 5283185。载体和编码免疫原的 DNA 还可以吸附或连接到颗粒性载体上，载体的例子包括聚甲基丙烯酸甲酯聚合物和聚丙交酯类以及聚（丙交酯-共-乙交酯），参见例如，McGee 等，*J. Micro Encap.* (1996)。

可以通过对个体患者给药，向体内传递基因治疗载体或裸 DNA，典型地通过全身给药（例如，静脉内、腹膜内、鼻腔、胃、皮内、肌内、皮下、或头颅内灌输）或者局部给药（参见例如 US 5399346）。还可以利用基因枪给药 DNA。参见 Xiao 和 Brandsma，同上。编码免疫原的 DNA 可以沉淀到极微金属珠表面。用冲击波或扩散氦气加速微抛射体，使它透过组织到达几个细胞层的深度。例如，Agacetus, Inc. Middleton WI 生产的 Accel™ 基因传送装置是适用的。或者，仅需将

裸 DNA 点在皮肤上伴随化学或机械刺激即可使 DNA 穿过皮肤到达血流（参见 WO 95/05853）。

在进一步的改进中，可以将编码免疫原的载体输送给离体细胞，例如来自个体患者的移植细胞（例如，淋巴细胞、骨髓穿刺液、组织活检）或者一般供体的造血干细胞，通常在筛选插入了载体的细胞后，再次将细胞移植到患者体内。

III. 接受治疗的患者。

接受治疗的患者包括具有患病风险，但没有表现出症状的个体，以及目前表现出症状的患者。对于阿尔茨海默氏病，实际上任何人，只要他或她活得足够长，都存在患阿尔茨海默氏病的风险。因此，本发明可以对普遍群体预防性给药，而没有任何关于受试患者危险的评价。本发明尤其对已知具有阿尔茨海默氏病遗传危险的个体有效。所述个体包括有患该病经历的亲属，和通过遗传学和生化标记分析确定存在风险的人群。对于阿尔茨海默氏病的风险遗传学标记包括 APP 基因的突变，尤其是在 717 位，670 和 671 位（分别被称为 Hardy 突变和瑞典突变（Swedish mutation））的突变（参见 Hardy, TINS, 同上）。其他危险标记是早衰素基因（PS1 和 PS2）以及 ApoE4 中的突变、AD 家族史、血胆固醇过多或动脉粥样硬化。正患阿尔茨海默氏的个体可以通过特征性痴呆以及上述危险因子的存在识别。另外，可利用大量鉴定患 AD 的患者的诊断实验。这些实验包括测定 CSF τ 和 A β 42 的水平。升高的 τ 和 A β 42 水平下降表示患有 AD。也可以通过实施例部分论述的 MMSE 或 ADRDA 标准诊断患阿尔茨海默氏病的个体。

对于无症状患者，可以在任何年龄开始治疗（例如 10, 20, 30）。然而，通常在患者到 40, 50, 60 或 70 岁时，才需要开始治疗。治疗通常需要在一段时期内多剂量给药。可以通过分析一段时间内对治疗药物（例如 A β ）的抗体、或激活的 T-细胞或 B-细胞应答，来监测治疗。如果应答失败，表明需要升高剂量。对于潜在的唐氏综合症患者，

可以在产前对母亲给药治疗药物开始治疗，也可以在出生后不久对患者给药。

IV. 治疗方案

在预防应用中，对易感一种特殊疾病、或相反存在患一种特定疾病危险的患者给药足以消除或降低危险或延缓疾病发作剂量的药物组合物或药物。在治疗应用中，对易感或已经患所述疾病的患者给药足以治愈或至少部分抑制疾病和其并发症症状剂量的组合物或药物。足以实现上述效果的量被称为治疗-或预防-有效剂量。在预防和治疗方案中，通常均给药几个剂量，直到实现充分的免疫应答。通常监测免疫应答，如果免疫应答开始衰弱则重复给药。

对于治疗上述病症，本发明组合物的有效剂量随一些不同因素而改变，包括给药方法、靶部位、患者的生理状况、患者是人还是动物、给药的其他药物、以及处理是治疗性的还是预防性的。通常，患者为人，但对于某些疾病，例如疯牛病，患者可以是非人哺乳动物，例如牛。需要测定治疗剂量，以优化安全性和有效性。免疫原的量依赖于是否还给药佐剂，如果没有佐剂则需要较高剂量。用于给药的免疫原的量有时在每位患者 $1\mu\text{g}$ 到 $500\mu\text{g}$ 内变化，更经常每次对人注射 $5\text{--}500\mu\text{g}$ 。偶尔使用每次注射 $1\text{--}2\text{ mg}$ 的较高剂量。典型地每次对人注射约 $10\text{、}20\text{、}50\text{、}100\mu\text{g}$ 。值得注意的是注射时间可以从一天一次、到一年一次、到十年一次变化。在任何预定的给用一剂量的免疫原的那一天，如果还给药佐剂，则剂量高于 $1\mu\text{g}/\text{位患者}$ ，通常高于 $10\mu\text{g}/\text{位患者}$ ，如果没有佐剂则剂量高于 $10\mu\text{g}/\text{位患者}$ ，通常高于 $100\mu\text{g}/\text{位患者}$ 。典型疗法包括一次免疫，然后以 6 周间隔加强注射。另一种疗法包括一次免疫，随后 1、2 和 12 个月后加强注射。另一种疗法需要终生每两周注射一次。或者，可以如监测免疫应答所示，不定期加强注射。对于利用抗体的被动免疫，剂量范围为约 0.0001 到 100 mg/kg 受体体重，更经常为 0.01 到 5 mg/kg 受体体重。编码免疫原的核酸的剂量范围为 10 ng 到 1 g ， 100 ng 到 100 mg ， $1\mu\text{g}$ 到 10 mg ，或 $30\text{--}300\mu\text{gDNA}$

每位患者。注射感染性病毒载体的剂量从每剂量 10 个毒粒到 10^9 或更多毒粒。

诱导免疫应答的药物可以经非肠道、局部、静脉、口腔、皮下、腹膜内、鼻内或肌内方式给药，用于预防和/或治疗处理。最典型的给药途径的皮下给药，当然其它同样有效。其次最常用的是肌内注射。这种注射类型最典型地在胳膊或腿的肌肉内注射。静脉内注射以及腹膜内注射、动脉内注射、颅骨内注射、或皮内注射对于产生免疫应答也是有效的。在一些方法中，直接将药物注射到沉积物累积的特别组织中。

本发明的药物任选与其它治疗致淀粉样病至少部分有效的药物组合给药。对于脑中发生淀粉样沉积物的阿尔茨海默氏病和唐氏综合症，还可以将本发明的药物与其它促进本发明药物穿过血脑屏障的药物组合给药。

本发明的免疫原药物，例如肽，有时与佐剂联合给药。可以使用多种佐剂与肽（例如 A β ）联合使用，以诱导免疫应答。优选的佐剂增强对免疫原的固有应答，而不导致影响应答定性形式的免疫原的构象改变。优选的佐剂包括明矾、3 脱-氧-酰化单磷酸脂类 A（MPL）（参见 GB 2220211）。QS21 是从南美发现的 *Quillaja Saponaria Molina* 树的树皮中分离出的三萜糖甙或皂甙（参见 Kensil 等，疫苗设计：亚基和佐剂研究（*Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*）（Powell 和 Newman 编，Plenum 出版社，NY，1995）；美国专利号：5057540）。其它佐剂是水包油型乳剂（例如角鲨烯或花生油），任选与免疫刺激物（例如单磷酸脂类 A）组合（参见 Stoute 等，*N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)）。另一种佐剂是 CpG（今日生物世界，1998 年 11 月 15 日）。或者，可以将 A β 与佐剂偶联。例如，可以如制备乙型肝炎抗原疫苗中所述将棕榈酸或其它脂类直接与 A β 的 N-末端偶联，制备脂肽形式的 A β （Livingston，免疫学杂志，159，1383-1392

(1997))。然而,这种偶联应答基本上不改变 A β 的结构,以不影响其产生的免疫应答的性质。佐剂可以作为治疗组合物的一种成分与活性药物一起给药,也可以在给药治疗药物之前、同时、或之后单独给药。

佐剂的优选种类为铝盐(明矾),例如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝。这种佐剂可以与或不与其它特别的免疫刺激剂(例如 MPL 或 3-DMP、QS21、多聚或单体氨基酸例如多聚谷氨酸或多聚赖氨酸)一起使用。另一种佐剂是水包油型乳剂。这种佐剂可以与或不与其它特别的免疫刺激剂(例如胞壁酰肽(例如, N-乙酰胞壁酰-L-苏氨酸-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰-正胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(nor-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-丙三氧基-3-羟磷酰氧基)-乙胺(MTP-PE)、N-乙酰葡萄糖氨基-N-乙酰胞壁酰-L-铝-D-异谷氨酰胺酰-L-丙氨酸-二棕榈酰氧基丙酰胺(DTP-DPP) theramide™), 或者其它细菌细胞壁成分。水包油型乳剂包括(a) MF59 (WO 90/14837), 含 5%角鲨烯、0.5%吐温 80, 和 0.5% Span 85 (任选含有各种量的 MTP-PE), 用微型流化床器(例如 110Y 型微型流化床器, Microfluidics, Newton MA)配制成亚微细颗粒, (b) SAF, 含有 10%角鲨烯、0.4%吐温 80、5%普罗尼克-嵌段共聚物 L121、和 thr-MDP, 微流化成亚微细粒乳剂或者旋涡振荡产生较大颗粒的乳剂, 以及(c) Ribi™佐剂系统(RAS) (Ribi Immunochem. Hamilton, MT), 含有 2%角鲨烯、0.2%吐温 80、以及由下述成分组成的一种或多种细菌细胞壁成分, 单磷酸脂 A (MPL)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)、和细胞壁骨架(CWS), 优选 MPL+CWS (Detox™)。另一种优选佐剂是皂甙佐剂, 例如 Stimulon™(QS21, Aquila, Worcester, MA) 或者由它们产生的颗粒例如 ISCOM (免疫刺激复合物) 和 ISCOMATRIX。其它佐剂包括完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)。其它佐剂包括细胞因子, 例如白介素(IL-1、IL-2 和 IL-12), 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF), 肿瘤坏死因子(TNF)。

佐剂可以与免疫原一起作为单一组合物给药，或者可以在免疫原给药之前、同时或之后给药。免疫原和佐剂可以包装在同一个小药水瓶中使用，也可以各自包装于单独小药水瓶，使用前混合。通常将免疫原和佐剂包装于贴有标明预期治疗应用标记的容器内。如果免疫原和佐剂单独包装，包装通常包括使用前混合的指示。佐剂和/或载体的选择依赖于含佐剂的疫苗的稳定性和给药途径、剂量方案、佐剂对被接种的物种的效力，对于人类，可药用的佐剂是经有关管理机构认可或可接受用于对人给药的佐剂。例如，完全弗氏佐剂不适用于对人给药。明矾、MPL 和 QS21 是优选的。任选地，可以同时使用两种或多种不同佐剂。优选组合包括明矾与 MPL，明矾与 QS21，MPL 与 QS21，以及明矾、QS21 和 MPL。也可以使用不完全弗氏佐剂（Chang 等，先进药物传送综述（Advanced Drug Delivery Reviews）32,173-186(1998)），任选与明矾、QS21、和 MPL 中的一种和它们的组合一起给药。

本发明的药物通常作为包含活性治疗药物，和很多其它可药用成分的药物组合物给药。参见 Remington's 药理学（第 15 版，Mack 出版公司，Easton, Pennsylvania, 1980）。优选剂型根据预期给药和治疗应用方式决定。组合物还可以根据所需的剂型包括可药用的、非毒性载体或稀释剂，它们被认为是常规用于配制给动物或人给药的药物组合物的载体。稀释剂根据不影响组合物的生物活性来选择。这类稀释剂的例子是蒸馏水、生理磷酸盐缓冲液、林格液，葡萄糖溶液、和 Hank's 溶液。另外，药物组合物或制剂还可以包括其它载体，佐剂，或非毒性、非治疗性、非免疫原性稳定剂等。然而，一些试剂适合对动物给药，例如完全弗氏佐剂通常不用在对人应用的组合物中。

药物组合物还可以包括较大的、代谢缓慢的大分子，例如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚羟基乙酸和共聚物（例如树胶功能化琼脂糖凝胶、琼脂糖、纤维素等），多聚氨基酸，氨基酸共聚物，和脂类聚集物（例如油滴或脂质体）。另外，这些载体具备作为免疫刺激剂的功能（即佐剂）。

对于非肠道给药，本发明的药物可以作为溶液或物质在生理可接受稀释剂中的悬浮液的可注射剂型与药剂载体（可以是无菌液体，例如水油、盐水、甘油、或乙醇）一起给药。另外，组合物中还可以含有辅助物质，例如保湿剂或乳化剂、表面活性剂、pH 缓冲物质等。药物组合物的其它成分是石油，动物、植物、或合成来源的，例如，花生油、大豆油、和矿物油。液体载体通常优选二醇例如丙二醇或聚乙二醇，尤其是可注射溶液。

典型地，将组合物制备成液体溶液或悬浮液的可注射形式；也可以制备成注射前溶解于或悬浮于液体载体的固体剂型。如前面的论述，还可以将制剂乳化于或包埋于脂质体或微颗粒，例如聚丙交酯、聚乙交酯、或共聚物中，用于增强佐剂效果（参见 Langer, 科学, 249, 152791990）和 Hanes, 先进药物传送综述 28, 97-119（1997）。本发明的药物可以以储存注射的形式或移植制剂的形式给药，其中可以以使活性成分持续或脉动释放的方式配制它们。

适合其它给药方式的其它剂型包括口服、鼻内应用、和肺部应用的制剂，栓剂、和透皮应用制剂。

对于栓剂，粘合剂和载体包括，例如，聚亚烷基二醇或甘油三酸酯；该栓剂可以通过含活性成分在 0.5%到 10%，优选 1%-2%范围内的混合物制备。口服制剂包括赋形剂，例如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、和碳酸镁。这些组合物配制成溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、控释制剂或粉剂的形式，含有 10%-95%活性成分，优选 25%-70%活性成分。

局部应用可以制成透皮或皮内给药制剂。局部给药可以通过共同给药霍乱毒素或其脱毒衍生物或亚基，或者其它类似细菌毒素促进（参见 Glenn 等，自然 391, 851（1998））。通过应用经化学交联得到的

作为混合剂或连接分子的成分，或者表达为融合蛋白，实现共同给药。

或者，利用皮肤通道或利用转移体（transferosome）实现透皮给药。（Paul 等，欧洲免疫学杂志（*Eur. J. Immunol.*）25, 3521-24 (1995); Cevc 等，生物化学与生物物理学学报（*Biochem. Biophys. Acta*）1368, 201-15 (1998)）。

V. 诊断方法

本发明提供了检测患有或易感阿尔茨海默氏病的患者体内对 A β 的免疫应答。本方法对于监测接受给药患者的治疗过程尤其有用。本发明可以用于监测有症状患者的治疗处理以及无症状患者的预防处理。

一些方法需要确定一个剂量的药物给药之前患者体内的免疫应答基线水平，然后将该值与治疗后的免疫应答值相比较。免疫应答水平的显著增加（即同一样品重复测定中，高于试验误差的典型界限，表示为所述测定平均值基础上的标准差）表明治疗结果为阳性（即，药物的给药得到了或增强了免疫应答）。如果免疫应答的水平没有显著改变，或者有所降低，表明阴性治疗结果。通常，接受药物治疗的患者使用连续剂量时在初期表现为增加的免疫应答，其最终达到稳定期。药物的给药通常是连续的，而免疫应答是不断增加的。稳定期的获得表明治疗给药可以间断或者可以减少剂量或者次数。

在其它方法中，测定对照组免疫应答的对照值（即，平均值和标准差）。典型地，对照组中的个体没有接受预先治疗。然后将给药治疗剂后患者体内的免疫应答测量值与对照值比较。相对于对照值的显著增加（例如高于平均值的标准差）表明阳性治疗结果。缺乏明显的增加或降低表明阴性治疗结果。通常连续给药药物，免疫应答相对于对照值不断增加。和前面一样，相对于对照对照值出现稳定期，表明治疗给药可以间断，或者降低剂量或次数。

在其它方法中，测定接受治疗药物处理并且免疫应答对治疗的响应已经达到稳定期的个体对照组的免疫应答对照值（例如平均值和标准差）。患者体内免疫应答的测定值与对照值相比较。如果患者的测定值相对于对照值没有显著的不同（例如，高于一个标准差），则治疗可以间断。如果患者体内的水平显著低于对照值，则需要保证连续给药药物。如果患者体内的水平持续低于对照值，则改变治疗方案，例如，可能预示应用不同的佐剂。

在其它方法中，对目前没有接受治疗但以前曾接受一个疗程治疗的患者监测免疫应答，以确定是否需要再继续治疗。在早先一个疗程治疗之后，可以将患者体内免疫应答的测量值与患者以前获得的免疫应答值比较。相对于前期测量显著降低（即在相同样品的重复测量中，高于误差的典型界限）表明可以恢复治疗。或者，可以将患者的测量值与接受一个疗程治疗后的患者组测定的对照值相比较（平均值+标准差）。或者，可以将患者的测量值与接受预防处理、没有遗留疾病综合症的患者组或者接受治疗处理、表现疾病症状改善的患者组体内的对照值相比较。在所有这些情况下，相对于对照水平的显著降低（即，超过一个标准差）表明患者应当再继续治疗。

用于分析的组织样品典型的是来自患者的血液、血浆、血清、粘液或脑脊液。分析样品对任何形式的 A β 肽，典型地是 A β 42 的免疫应答标记。可以通过例如，特异性结合 A β 肽的抗体或 T-细胞的存在确定免疫应答。实施例部分描述了检测特异于 A β 的抗体的 ELISA 法。检测反应性 T-细胞的方法前面已经描述过（参见定义）。

本发明进一步提供了进行上述诊断方法的诊断试剂盒。通常，该试剂盒含有特异性结合 A β 抗体或与特异于 A β 的 T-细胞反应的试剂。试剂盒还包括一种标记物。对于检测 A β 抗体，标记物通常是被标记的抗独特型抗体的形式。对于检测抗体，可以预先将试剂结合到固相

上使用，例如结合到微滴定皿的孔中。对于反应性 T-细胞的检测，可以应用 ^3H -胸苷作为标记物测量增殖反应。试剂盒典型地还含有提供使用试剂盒指导的标签。该标签还可以包括显示测量的标记水平与 A β 抗体或与 A β 反应的 T-细胞之间相关性的图或其他相应方式。术语“标签”指在试剂盒的生产、运输、销售或使用的任何时间，贴附于或包在试剂盒中的任何书写或记录材料。例如，术语“标签”包括广告宣传页和手册、包装材料、说明书、音频或视听磁带、计算机磁盘、以及直接印刷在试剂盒上的书写印记。

实施例

I. 抗 AD 的 A β 的预防功效

这些实施例描述了对存在 717 突变的 APP (APP_{717V-F}) 过表达的转基因小鼠给药 A β ₄₂ 肽，预先使它们形成阿尔茨海默氏病样神经病理学。Games 等 (自然, 同上) 描述了这些小鼠 (PDAPP 小鼠) 的产生和特征。在这些动物的杂合型中，六个月后开始沉积 A β 。到十五个月，它们表现出的 A β 沉积水平与阿尔茨海默氏病中观察到的水平相同。给 PDAPP 小鼠注射聚集态 A β ₄₂ (聚集 A β ₄₂) 或磷酸盐缓冲盐水。选择聚集 A β ₄₂ 是因为它能够诱导多表位 A β 的抗体。

A. 方法

1. 小鼠来源

将三十只 PDAPP 杂合雌性小鼠随机分成下列组：10 只小鼠注射聚集 A β ₄₂ (转运中一只死亡)，5 只小鼠注射 PBS/佐剂或 PBS，10 只是没有注射的对照。5 只小鼠注射血清淀粉样蛋白质 (SAP)。

2. 免疫原的制备

聚集态 A β ₄₂ 的制备：将两毫克 A β ₄₂ (美国肽公司，lot k-42-12) 溶解于 0.9 ml 水，加入 0.1 ml 10 \times PBS 至 1 ml。将其旋涡振荡，37 $^{\circ}\text{C}$ 保温过夜，在该条件下，肽聚集。所有未利用的 A β 作为冻干粉末在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储藏，直到下次注射。

3.注射剂的制备

将对每只小鼠注射的 PBS 中的 100 μ g 聚集态 A β ₄₂ 用完全弗氏佐剂 (CFA) 按照 1:1 的比例乳化, 至终体积为 400 μ l 的乳化剂, 用于第一次免疫, 之后 2 周, 将不完全弗氏佐剂 (IFA) 中同样量的免疫原用作加强免疫。以月为间隔用 IFA 进行另外两次免疫。随后的免疫在 500 μ l PBS 中以月为间隔进行。腹膜内 (i.p.) 注射给药。

PBS 注射遵循同样的方案, 每只小鼠用 1:1 的 PBS/佐剂混合物 400 μ l, 或者用 500 μ l PBS 注射。SAP 注射剂遵循同样的方案, 每次注射剂量为 100 μ g。

4.小鼠出血的滴定、组织准备和免疫组织化学

上述方法在下面的一般材料和方法中描述。

B. 结果

用聚集态 A β ₄₂ (被聚集的 A β ₄₂)、SAP 肽、或磷酸盐缓冲盐水对一组 PDAPP 小鼠注射。另外留出一组 PDAPP 小鼠作为未注射的阳性对照。从第四次加强免疫开始每隔一个月监测小鼠对聚集态 A β ₄₂ 的效价, 直到小鼠长到 1 岁。在第 13 个月, 处死小鼠。在所有检查的时间点, 九只聚集态 A β ₄₂ 小鼠中的八只形成高抗体效价, 其在一系列注射过程中, 始终保持较高效价 (效价高于 1/10000)。第九只小鼠有点低, 但也可测得效价约为 1/1000 (图 1, 表 1)。SAPP 注射小鼠对该免疫原的效价为 1:1000 到 1:30000, 仅一只小鼠超过 1:10,000。

在 6、10 和 12 个月测定 PBS-处理小鼠对聚集 A β ₄₂ 的效价。当稀释度为 1/100 时, 对 PBS 小鼠测定的对聚集态 A β ₄₂ 的效价, 仅在一个数据点上比背景超过 4 倍, 而在其它所有时间点上比背景少于 4 倍 (表 1)。SAP 的特异性应答可以忽略, 在这些时间点上所有效价低于 300。

在聚集态 $A\beta_{1-42}$ 组中九只小鼠中的七只脑中并没有检测到淀粉样蛋白。相比较而言, 在 SAP 和 PBS 组中, 小鼠脑组织的海马、以及前皮质和色带环绕皮质中含有许多 3D6-阳性淀粉样沉积物。沉积模式类似于未处理对照的模式, 特征在于累及易损亚区, 例如海马锯齿状脑回的外分子层。 $A\beta_{1-42}$ 注射组的一只小鼠表现淀粉样侵害的明显降低, 仅限于海马。在另一只 $A\beta_{1-42}$ 处理小鼠体内鉴定了隔离斑。

海马中淀粉样侵害的定量图像分析证明, AN1792 处理动物中实现淀粉样侵害显著降低 (图 2)。PBS 组淀粉样侵害的中值 (2.22%) 和未处理的对照组的中值 (2.56%) 明显高于用 AN1792 免疫小鼠的中值 (0.00%, $p=0.0005$)。相比较而言, SAP 肽 (SAPP) 免疫组的中值为 5.74%。利用 $A\beta$ 特异性单克隆抗体 (mAb) 3D6 观察到未处理的对照小鼠脑组织 (海马和夹肌后皮质中) 含有大量 $A\beta$ 淀粉样沉积物。用 SAPP 或 PBS 免疫小鼠也观察到类似模式的淀粉样沉积物 (图 2)。另外, 在 AD 中典型地观察到, 这后三组具有这样的特征, 即累及脑中的易损亚区, 例如在后三组中, 均累及海马锯齿状脑回的外分子层。

不含 $A\beta$ 沉积物的脑中也缺乏在 PDAPP 小鼠中利用人 APP 抗体 8E5 通常可见的神经炎斑。剩余组 (SAP-注射、PBS 注射和未注射小鼠) 的所有脑中含有大量未处理 PDAPP 小鼠中典型存在的神经炎斑。在一个只 AN1792 处理小鼠中存在少量神经炎斑, 在 AN1792 处理的第二只小鼠中发现一簇营养不良性轴突。显示于图 3 的海马图像分析表明, 与 PBS 受体鼠 (中值 0.28%, $p=0.0005$) 相比, AN1792 处理小鼠 (中值 0.00%) 营养不良性轴突实质上消失。

$A\beta_{1-42}$ 注射组脑中也缺乏斑相关性发炎的星形细胞增生症状。其它组小鼠脑中富含, 且丛生 $A\beta$ 斑-相关性神经胶质过多症典型的 GFAP-阳性星形胶质细胞。用硫黄素 S 复染记数 GFAP-反应性玻片的一个子集, 以定位 $A\beta$ 沉积物。SAP、PBS 和未处理对照中, GFAP-阳性星形胶质细胞与 $A\beta$ 斑有关。在斑-阴性 $A\beta_{1-42}$ 处理小鼠中没有发现该相关

性，而在一只 AN1792 处理小鼠中鉴定了斑与神经胶质过多症之间的弱相关性。

图 4 显示的夹肌后皮质的图像分析证明，AN1792 处理小鼠星形细胞增生降低显著，中值为 1.56%，而用 SAP 肽处理、PBS 处理或未处理免疫组，中值高于 6% ($p=0.0017$)。

来自 $A\beta_{1-42}$ 和 PBS 注射小鼠子集的证据表明 $A\beta_{1-42}$ 注射小鼠中缺乏斑-相关性 MHC II 免疫反应性，与 $A\beta$ -相关性炎性反应的缺乏一致。

还将小鼠脑切片与特异于 MAC-1 (一种细胞表面蛋白质) 的 m $A\beta$ 反应。MAC-1 (CD11b) 是整联蛋白家族的成员，与 CD18 以异质二聚体存在。CD11b/CD18 复合物存在于单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和天然杀伤细胞上 (Mak 和 Simard)。基于在 MAC-1 免疫反应性切片中相似的表现型形态学，脑中固有的 MAC-1-反应性细胞类型可能是小胶质细胞。与 PBS 对照组相比，AN1792 处理小鼠脑中斑-相关性 MAC1 标记较低，该结果与 $A\beta$ 诱导的炎性反应的缺乏一致。

C. 结论

用 $A\beta_{1-42}$ 注射的小鼠脑中， $A\beta$ 斑和反应性神经元和胶质细胞改变的缺乏表明，在它们的脑中几乎没有或很少沉积淀粉样蛋白，并且没有出现病理结果，例如神经胶质细胞过多症和神经炎病理学。 $A\beta_{1-42}$ 处理的 PDAPP 小鼠基本上显示同样缺乏如对照非转基因小鼠的病理学。因此，注射 $A\beta_{1-42}$ 对于预防人 $A\beta$ 沉积或从脑组织中清除人 $A\beta$ ，以及消除随后神经元和炎性变性性改变高度有效。因此， $A\beta$ 肽的给药在预防 AD 方面具有治疗优点。

II. 剂量反应研究

用在 CFA/IFA 中配制的 300、100、33、11、3.7、1.2、0.4、或 $0.13\mu\text{g}$ $A\beta$ 对五周龄、雌性瑞士 Webster 小鼠组腹膜内给药免疫。以两

周间隔给药三个剂量，一个月后给药第 4 个剂量。第一个剂量用 CFA 乳化，其它的剂量用 IFA 乳化。每次免疫后 4-7 天（在下一个剂量之后开始）对动物取血，测定抗体效价。用 11、33、或 300 μg 抗原免疫的三组动物，在第四次免疫之后以月为间隔再取血四次，以监测一定疫苗剂量范围内抗体应答的衰落。这些动物在研究开始之后的第七个月接受最后一次即第五次免疫。一周后处死动物，测定对 AN1792 的抗体应答并进行毒理学分析。

观察到从 300 到 3.7 μg 剂量应答逐步衰减，最低两个剂量没有应答。11-300 μg 抗原的 3 个剂量后平均抗体效价约为 1:1000，4 个剂量后约为 1:10000（参见图 5）。

第三次免疫后，除了最低剂量组，其它组抗体效价均显著升高，GMT 升高了 5-25 倍。甚至 0.4 μg 抗原的受体也检测到较低的抗体应答。1.2 μg 和 3.7 μg 组效价相近，GMT 约为 1000，最高四个剂量集中，GMT 约为 25000，除了 33 μg 剂量组 GMT 较低，为 3000。大多数组在第四次免疫之后，效价增加不多。从 0.14 μg 受体没有检测出抗体到 11 μg 受体 GMT 为 36000 范围内的 0.14 μg 到 11 μg 较低抗原剂量组内表现出了清楚的剂量应答。此外，11 到 300 μg 的四个最高剂量组效价集中。因此，两次免疫之后，对于从 0.4 到 300 μg 的宽范围内，抗体效价依赖于抗原剂量。到第三次免疫，最高四个剂量的效价彼此接近，再次接受免疫后，它们保持在稳定期上。

第四次免疫之后一个月，300 μg 组中的效价比免疫之后 5 天取血测定的效价高 2 到 3 倍（图 6）。该观测数据表明峰记忆抗体应答发生在免疫后 5 天之后。33 μg 组中，在该时间点，观察到较为平缓的增加（50%）。在 300 μg 剂量组中，最后一个剂量之后两个月，GMT 锐减约 70%。再一个月后，衰减不太剧烈为 45%（100 μg ），对于 33 和 11 μg 剂量约为 14%。因此，终止免疫之后循环系统中抗体效价的衰减速率可能是双相的，峰应答之后的第一个月锐减，随后衰减速率较为平缓。

这些瑞士 Webster 小鼠的抗体效价和应答动力学类似于以平行方式免疫的幼年 PDAPP 转基因小鼠。对于诱导人类免疫应答的剂量有效性通常类似于小鼠的剂量有效性。

III. 对已确定 AD 的治疗功效的筛选

设计本实验用于检测免疫原性药物在抑制或逆转衰老动物体内 AD 的神经病理学症状方面的活性。当 PDAPP 小鼠脑中已经出现淀粉样斑时，开始用 42 个氨基酸长的 A β (AN1792) 免疫。

在该研究的过程中，未处理的 PDAPP 小鼠形成大量类似于 AD 中发现的神经变性改变 (Games 等，同上和 Johnson-wood 等，美国国家科学院科学进展 94, 1550-1555 (1997))。A β 沉积成为淀粉样斑与由异常轴突和树状元件 (被称为营养不良性神经突) 组成的变性神经元应答有关。被包围且含有营养不良性神经突的淀粉样沉积物被称为神经炎斑。在 AD 和 PDAPP 小鼠中，营养不良性神经突具有独特的球状结构，与识别 APP 和细胞骨架成分的抗体平板发生免疫反应，在亚显微结构水平上呈现复杂的亚细胞变性性改变。这些特征得以对 PDAPP 脑中神经炎斑进行疾病相关性、选择性和重现性地测量。PDAPP 神经炎斑的营养不良性神经元成分可以容易地用人 APP 特异性抗体观察 (mA β 8E5)，并可以通过计算机辅助的图像分析方便地测定。因此，除了测定 AN1792 对淀粉样斑形成的影响，我们还监测了该治疗对神经炎性营养不良的发展的影响。

星形胶质细胞和小胶质细胞是应答和反应神经元损伤程度的非神经元细胞。在 AD 中常可观察到 GFAP-阳性星形胶质细胞和 MHC II-阳性小胶质细胞，它们活性的增加伴随疾病的加重。因此，我们也监测 AN1792-处理小鼠体内反应性星形胶质细胞和小胶质细胞的发展。

A. 材料和方法

将从 Charles River 得到的四十八只杂合雌性 PDAPP 小鼠（11 到 11.5 月龄）随机分成两组：24 只小鼠用 100 μ g AN1792 免疫，24 只用 PBS 免疫，均与弗氏佐剂混合。当 AN1792 组和 PBS 组长到约 15 月龄时再次分组。15 月龄时对 AN1792-和 PBS-处理动物组分别无痛处死约一半（n 分别等于 10 和 9），其余的继续接受免疫，直到约 18 个月终止（n 分别等于 9 和 12）。研究过程中总共 8 只动物死亡（5 只 AN1792，3 只 PBS）。除了免疫动物，另外包括一岁龄（n=10）、15 月龄（n=10）和 18 月龄（n=10）未处理 PDAPP 小鼠，用于在 ELISA 中比较脑中的测量 A β 和 APP 水平；一岁龄的动物还用于免疫组织化学分析。

除非另有说明，方法如实施例 1 所述。在 15 个月的时间点之前，用 AN1792 的 US Peptides lot 12 和 California Peptides lot ME0339 制备六次免疫给药的抗原。在 15 到 18 个月之间用 California Peptides lot ME0339 和 ME0439 进行另外三次给药免疫。

用于免疫时，200 μ l PBS 中的 100 μ g AN1792 或者单独的 PBS，按照 1:1（体积：体积）的比例，用完全弗氏佐剂（CFA）或不完全弗氏佐剂（IFA）或 PBS 乳化，至终体积为 400 μ l。用 CFA 作为佐剂进行第一次免疫给药，接着的四个剂量与 IFA 一起给药，最后四个剂量与单独 PBS 不加佐剂给药。在七个月的时间段内总共进行九次免疫，前三个剂量应用两周方案，随后对于其他注射采用四周的间隔。在 15 月龄接受无痛处死的四个月治疗组，仅接受前六次免疫。

B. 结果

1. AN1792 对于治疗淀粉样侵害的效果

通过或定量图像分析确定的 AN1792 对皮质淀粉样侵害的治疗结果如图 7 所示。在未处理的 12 月龄 PDAPP 小鼠组中，皮质淀粉样侵害的中值为 0.28%，该值代表研究开始时小鼠体内斑负荷。在 18 个月，在 PBS-处理小鼠体内淀粉样侵害增长了 17 倍多，达到 4.87%，而 AN1792 处理小鼠淀粉样侵害显著降低，仅为 0.01%，明显低于 12 个

月的未处理组和 15 个月和 18 个月的 PBS 处理组。AN1792 受体体内，15 个月和 18 个月淀粉样侵害均显著降低，分别为降低 96% ($p=0.003$) 和降低 >99% ($p=0.0002$)。

典型地，PDAPP 小鼠体内皮质淀粉样沉积最早出现在前和夹肌后皮质 (RSC) 中，在腹侧方向上扩展，累及枕叶和顶叶以及 entorhinal 皮质 (EC)。12 月龄 (大约是首次 AN1792 给药的年龄) 的 EC 中很少或没有发现淀粉样蛋白。4 个月的 AN1792 治疗后，RSC 中淀粉样沉积物很大程度上消失了，AN1792 处理完全消除了 EC 的进行性累及。后一项观察结果表明 AN1792 完全终止了通常会侵入枕叶和顶叶以及腹侧皮质的淀粉样蛋白的扩展，同时抑制或可能逆转 RSC 中的沉积。

进一步通过已经接受七个月治疗的 18 个月组论证了 AN1792 治疗 PDAPP 小鼠体内发展性皮质淀粉样侵害的深远影响。在 AN1792 处理小鼠体内发现皮质淀粉样蛋白几乎完全消失，扩散斑总体减少，以及紧密沉积物减少。

2. 与 AN1792 处理有关的细胞和形态学改变

在典型含有淀粉样沉积物的脑区发现大群 A β 阳性细胞。引人注目的是，几个 AN1792 受体脑中，发现非常少或者没有发现胞外皮质淀粉样斑。大多数 A β 免疫反应性可能包含于具有大的小叶性和成群细胞体的细胞中。从表型上看，这些细胞类似激活的小胶质细胞或单核细胞。它们与识别通过激活的单核细胞和小胶质 (MHC II 和 CD11b) 表达的配体的抗体具有免疫反应性，偶尔与血管壁或内腔结合。用 A β 和 MHC II-特异性抗体标记的相邻切片的比较表明，这两种抗体均可以识别这些细胞的类似模式。对 AN1792 处理脑仔细检查发现，MHC II-阳性细胞被限制到残留在这些动物体内的有限淀粉样蛋白附近。在所用固定条件下，细胞与识别 T 细胞 (CD3、CD3e) 或 B 细胞 (CD45RA、CD45RB) 配体或白细胞共同抗原 (CD45) 的抗体不具有免疫反应性，

但与识别与单核细胞交叉反应的白涎素（CD43）的抗体发生反应。任何 PBS-处理小鼠体内均没有发现这种细胞。

PDAPP 小鼠毫无例外地在海马锯齿状脑回的外分子层形成严重的淀粉样沉积。沉积在穿孔通道（perforant pathway，在 AD 中典型地含有淀粉样斑的亚区）中形成明显的条纹。PBS-处理小鼠体内这些沉积物的特征性外观类似于前面描述的未处理 PDAPP 小鼠体内的特征。淀粉样沉积由连续带中的扩散斑和紧密斑组成。相比较而言，在一些 AN1792 处理小鼠的脑中，这种模式彻底改变。海马趾淀粉样沉积不再含有扩散淀粉样蛋白，带状模式完全打破。实际上，出现了一些不常见的与抗-A β 抗体反应的点状结构，其中几个出现在含淀粉样蛋白的细胞中。

MHC II-阳性细胞经常在 AN1792 处理动物的胞外淀粉样蛋白附近观察到。在几只 AN1792 处理小鼠的脑中，A β 阳性细胞与淀粉样蛋白的关系模式非常类似。这些单核细胞的分布被限制到沉积的淀粉样蛋白附近，在没有 A β 斑的其它脑区完全不存在。

MHC II 和 MAC I-标记切片的定量图像分析揭示了与 PBS 组相比 AN1792 处理小鼠的 RSC 和海马中免疫反应性增长趋势，其显示了在海马中测定 MAC 1 反应性的重要性。

这些结果表明，携斑脑区淀粉样蛋白的主动的、由细胞介导的去除。

3. AN1792 对 A β 水平的影响：ELISA 测定

（a）皮质水平

在未处理 PDAPP 小鼠中，在 12 个月时皮质中总 A β 的中值为 1600 ng/g，到第 15 个月，该值增加到 8700 ng/g（表 2）。到 18 个月，该值为 22000 ng/g，在实验期间中，增加了 10 倍多。PBS-处理动物在 15

个月总 A β 为 8600 ng/g, 到 18 个月增加到 19000 ng/g。相比较而言, AN1792 处理动物在 15 个月总 A β (1600 ng/g) 比 PBS 免疫组低 81%。在 18 个月将 AN1792 与 PBS 组比较时(表 2), 发现总 A β (5200 ng/g) 显著降低 ($p=0.0001$), 比应该出现的 A β 水平降低了 72%。当比较 A β 42 的皮质水平时得到类似的结果, 即 AN1792 处理组含有很少的 A β 42, 但在这种情况下 AN1792 和 PBS 组之间的差别在 15 个月 ($p=0.04$) 和 18 个月 ($p=0.0001$, 表 2) 显著。

表 2: 皮质中 A β 水平的中值 (ng/g)

月龄	未处理			PBS			AN1792		
	总 A β	A β 42	(n)	总 A β	A β 42	(n)	总 A β	A β 42	(n)
12	1,600	1300	(10)						
15	8,700	8,300	(10)	8,600	7,200	(9)	1,600	1,300*	(10)
18	22,200	18,500	(10)	19,000	15,900	(12)	5,200**	4,000**	(9)

* $p=0.0412$

** $p=0.0001$

(b) 海马中的水平

在未处理 PDAPP 小鼠中, 12 月龄海马中总 A β 的中值为 15000 ng/g, 到 15 个月增加到 51000 ng/g, 到 18 个月进一步增加到 81000 ng/g (表 3)。PBS 免疫小鼠表现相似的值, 15 个月和 18 个月分别为 40000 ng/g 和 65000 ng/g。AN1792 免疫动物表现较低的总 A β , 具体在 15 个月和 18 个月的时间点分别为 25000 ng/g 和 51000 ng/g。18 个月的 AN1792 处理组的值显著低于 PBS 处理组的值 ($p=0.0105$; 表 3)。对 A β 42 的测定得出同样的结果模式, 即在 18 个月评价时, AN1792 处理组中的水平明显低于 PBS 组 (分别为 39000 ng/g 对 57000 ng/g; $p=0.0022$) (表 3)。

表 3: 海马中 A β 的中值 (ng/g)

月龄	未治疗			PBS			AN1792		
	总 A β	A β 42	(n)	总 A β	A β 42	(n)	总 A β	A β 42	(n)
12	15,500	11,100	(10)						
15	51,500	44,400	(10)	40,100	35,700	(9)	24,500	22,100	(10)
18	80,800	64,200	(10)	65,400	57,100	(12)	50,900*	38,900**	(9)

*p=0.0105

**p=0.0022

(c) 小脑中的水平

在 12 个月未处理的 PDAPP 小鼠中, 小脑中总 A β 水平的中值为 15 ng/g (表 4)。在 15 个月, 该值增加到 28 ng/g, 到 18 个月增加到 35 ng/g。PBS 处理动物在 15 个月总 A β 的中值为 21 ng/g, 18 个月为 43 ng/g。发现 15 个月的 AN1792 处理动物总 A β 为 22 ng/g, 18 个月的总 A β (25 ng/g) 显著低于 (p=0.002) 相应的 PBS 组 (表 4)。

表 4: 小脑中 A β 的中值 (ng/g)

月龄	未治疗		PBS		AN1792	
	总 A β	(n)	总 A β	(n)	总 A β	(n)
12	15.6	(10)				
15	27.7	(10)	20.8	(9)	21.7	(10)
18	35.0	(10)	43.1	(12)	24.8*	(9)

*p=0.0018

4. AN1792 治疗对 APP 水平的影响

APP- α 和全长 APP 分子均含有全部或部分 A β 序列, 因此可能潜在地被 AN1792-介导的免疫应答影响。在对 PDAPP 小鼠的数据研究中, 注意到随着神经病理学的增加, APP 水平轻微上升。皮质中, APP- α /FL (全长) 或 APP- α 在治疗中基本上没有变化, 除了在 18 个月的

时间点上，AN1792 处理组比 PBS 处理组 APP- α 降低了 19%。18 个月的 AN1792 处理组 APP 值与 12 个月和 15 个月未处理组和 15 个月 PBS 组的值没有明显差异。在所有条件下，APP 值均维持在 PDAPP 小鼠中正常出现的范围内。

5. AN1792 治疗对神经变性和神经胶质病理学的影响

与 15 月龄和 18 月龄的 PBS 组相比，AN1792 处理小鼠前皮质中神经炎斑侵害显著降低（分别为 84%， $p=0.03$ ；和 55%， $p=0.01$ ）（图 8）。从 15 月龄到 18 个月龄 PBS 组神经炎斑侵害的中值从 0.32% 增加到 0.49%。与此相比，AN1792 组中神经炎斑的形成显著降低，15 个月和 18 个月组中神经炎斑侵害的中值分别为 0.05% 和 0.22%。

看来能够很好地耐受 AN1792 的免疫，当与 15 月龄和 18 月龄的 PBS 组相比时，AN1792 处理小鼠的 RSC 中反应性星形胶质细胞也明显降低，分别降低了 56%（ $p=0.011$ ）和 39%（ $p=0.028$ ）（图 9）。从 15 个月到 18 个月，PBS 组中星形胶质细胞增加百分率的中值从 4.26% 增加到 5.21%。AN1792 处理抑制了星形胶质细胞增多的进展，两个时间点上分别为 1.89% 和 3.2%。这表明神经纤维网没有因该清除过程而破坏。

6. 抗体应答

如上所述，十一月龄、杂合 PDAPP 小鼠（ $N=24$ ）接受用弗氏佐剂乳化的 100 μg AN1792 连续五次免疫，在第 0、2、4、8、和 12 周腹腔内给药，在第 16 周单独用 PBS（无弗氏佐剂）进行第六次免疫。作为阴性对照，一系列平行的 24 只年龄相当的转基因小鼠接受用同样佐剂乳化的 PBS 免疫，按照同样的方案给药。第二个剂量之后，每次免疫后三至七天内对动物取血。通过 ELISA 测定对 AN1792 的抗体应答。在第二、第三和最后（第六）一个剂量之后，AN1792 免疫动物的几何平均效价（GMT）分别约 1900、7600、和 45000。对照动物中，第六次免疫之后没有测到 A β 特异性抗体。

约一半的动物接受另外三个月的处理，约在 20、24 和 27 周接受免疫。每个剂量分别在单独的 PBS（无弗氏佐剂）中给药。在这段时间内，平均抗体效价保持不便。事实上，相应于涵盖从第五次到第九次注射时期的第四次到第 8 次取血的抗体效价保持稳定。

为了确定在 AN1792 处理小鼠的血清中检测到的、免疫诱导的 A β 特异性抗体是否也与沉积的脑淀粉样蛋白结合，将一系列来自 AN1792 和 PBS 处理小鼠的切片与小鼠 IgG 特异性抗体反应。与 PBS 组相比，AN1792 处理的脑中 A β 斑被内源 IgG 包围。15 月龄和 18 月龄的这两组中均发现这种差别。尤其震惊的是 PBS 组没有标记，尽管在这些小鼠中存在严重的淀粉样侵害。该结果表明，用合成的 A β 蛋白免疫产生识别和结合体内淀粉样斑中 A β 的抗体。

7. 细胞介导的免疫应答

9 只 AN1792 免疫和 12 只 PBS 免疫的 18 个月龄的 PDAPP 小鼠在第九次免疫之后取出脾脏。分离脾细胞，在 A β 40、A β 42、或 A β 40-1（倒序蛋白质）存在下培养。促分裂原伴刀豆球蛋白 A 作为阳性对照。用 >1.7 μ M 蛋白质得到最佳应答。来自所有九只 AN1792 处理动物的细胞均对 A β 1-40 或 A β 1-42 蛋白质应答而增殖，两种蛋白质的掺入水平相同（图 10，上图）。对 A β 40-1 反向蛋白质没有应答。来自对照动物的细胞对任何 A β 蛋白质均没有应答（图 10，下图）。

C. 结论

该研究结果表明对存在淀粉样沉积物的 PDAPP 小鼠进行的 AN1792 免疫减慢和防止进行性淀粉样沉积，并延缓随之发生的衰老 PDAPP 小鼠脑中神经病理学改变。用 AN1792 免疫基本上终止了在结构上的发展淀粉样蛋白，其通常会形成淀粉样变性病。因此，A β 肽的给药在治疗 AD 方面具有治疗优点。

IV. A β 片段的筛选

用 9 种不同的 APP 片段和 A β 免疫 100 只 9-11 月龄的 PDAPP 小鼠，以确定哪些表位传递应答。9 种不同的免疫原和一种对照如上述腹膜内注射。免疫原包括四种人 A β 肽共轭物 1-12、13-28、32-42、1-5（均经半胱氨酸键与绵羊抗-小鼠 IgG 偶联）；APP 多肽氨基酸 592-695、聚集态人 A β 1-40、和聚集态人 A β 25-35、以及聚集态啮齿动物 A β 42。聚集态 A β 42 和 PBS 用作对照。每个治疗组安排 10 只小鼠。如上述监测效价，在注射 4 个月末，对小鼠进行无痛致死。处死后测定组织化学、A β 水平、和毒理学。

A. 材料和方法

1. 免疫原的制备

偶联 A β 肽的制备：通过利用交联试剂磺基-EMCS 加到 A β 肽上的人工半胱氨酸偶联制备四种人 A β 肽共轭物（氨基酸残基 1-5、1-12、13-28、和 33-42，均共轭结合绵羊抗小鼠 IgG）。用下列终氨基酸序列合成 A β 肽衍生物。在每种情况下，插入的半胱氨酸残基的位置由下划线指出。A β 13-28 肽衍生物在指出的羧基端半胱氨酸之前还具有两个甘氨酸残基。

A β 1-12 肽 NH₂-DAEFRHDSGYEVCC COOH

A β 1-5 肽 NH₂-DAEFRC COOH

A β 33-42 肽 NH₂-C-氨基-庚酸-GLMVGGVVIA COOH

A β 13-28 肽 Ac-NH-HHQKLVFFAEDVGSNKGGC-COOH

为了进行偶联反应，将 10 mg 绵羊抗小鼠 IgG（Jackson Immuno Research Laboratories）对 10 mM 硼酸钠缓冲液（pH 8.5）透析过夜。然后利用 Amicon Centriprep 管将透析抗体浓缩到体积为 2 ml。将 10 mg 磺基 EMCS（N-（ ϵ 马来酰亚胺铜氧基）琥珀酰亚胺）（分子科学公司（Molecular Sciences Co.））溶解于 1 ml 去离子水。将 40 倍摩尔过量的磺基-EMCS 在搅拌下逐滴加入绵羊抗-小鼠 IgG，然后再次搅拌溶

液十分钟。纯化活性的绵羊抗-小鼠 IgG，通过经 0.1 M NaPO₄、5 mM EDTA、pH 6.5 的溶液平衡的 10ml 凝胶过滤柱（Pierce Presto 柱，从 Pierce Chemicals 获得），交换除去缓冲液。收集经 280 nm 吸收值鉴定的含抗体的组分，稀释到浓度约为 1 mg/mL，应用 1.4 mg/光密度作为消光系数。将 40 倍摩尔过量的 A β 肽溶解于 20 mL 10 mM 的 NaPO₄（pH 8.0），除了 A β 33-42 肽不同，将其 10 mg 首先溶解于 0.5 mL DMSO，然后用 10 mM NaPO₄ 缓冲液稀释到 20 mL。将肽溶液分别加到 10 mL 活化的绵羊抗-小鼠 IgG 中，室温下振摇 4 小时。将得到的共轭结合物用 Amicon Centriprep 管浓缩到体积小于 10 mL，然后对 PBS 透析，以缓冲液交换缓冲液，除去游离肽。使共轭物过 0.22 μ 孔尺寸的过滤器，用于除菌，然后等分成 1 mg 的组分，-20 $^{\circ}$ C 冷冻储藏。利用 BCA 蛋白质分析（Pierce Chemicals），用马 IgG 作标准曲线，测定共轭物的浓度。通过结合肽相对于活化绵羊抗-小鼠 IgG 分子量的增加证明共轭结合。A β 1-5 绵羊抗-小鼠共轭物是两次共轭偶联的集合制品，其余的为单一制品。

2. 聚集态 A β 肽的制备

用人 1-40（AN1528; California Peptides Inc., Lot ME0541）、人 1-42（AN1792; California Peptides Inc., Lot 0339 和 ME0439）、人 25-35、和啮齿动物 1-42（California Peptides Inc., Lot ME0218）的-20 $^{\circ}$ C 脱水储藏的冻干粉末新溶解配制一系列注射液。对于这种目的，将 2 mg 肽加入 0.9 ml 去离子水，旋涡搅拌，产生相对均一的溶液或悬浮液。所有这四种中，AN1528 是这一步唯一可溶的肽。当 AN1528 开始沉淀时，加入 100 μ l 10 \times PBS 溶液（1 \times PBS: 0.15 M NaCl、0.01 M 磷酸钠，pH 7.5）。悬浮液再次旋涡振荡，在 37 $^{\circ}$ C 保温过夜留待次日使用。

pBx6 蛋白质的制备：按照 Oltersdorf 等（生物化学杂志，265，4492-4497（1990））的描述，构建了编码 pBx6 的表达质粒，pBx6 是由 100 个氨基酸的噬菌体 MS-2 聚合酶 N-末端前导序列跟随 APP 的 592-695 氨基酸（ β APP）组成的融合蛋白质。将质粒转染到 E. coli

中，经启动子诱导后蛋白质得以表达。使细菌在 8 M 脲中胞溶，通过制备性 SDS PAGE 部分纯化 pBx6。通过 Western 印记，利用兔抗-pBx6 多克隆抗体，鉴定含 pBx6 的组分，合并组分，利用 Amicon Centriprep 管浓缩，对 PBS 透析。制品的纯度，经考马斯蓝染色的 SDS-PAGE 评价，约为 5-10%。

B. 结果和讨论

1. 研究设计

从 Charles River 实验室和 Taconic 实验室获得一百只雄性和雌性、九到十一月龄的杂合 PDAPP 转基因小鼠。将小鼠分成十组，接受由不同片段的 A β 或 APP 结合弗氏佐剂的免疫。使动物组间性别、年龄、家系和动物来源匹配，分布尽可能地接近。免疫原包括四种来源于人序列：1-5、1-12、13-28、和 33-42 的 A β 肽，分别共轭结合绵羊抗-小鼠 IgG；四种聚集态 A β 肽，人 1-40(AN1528)、人 1-42(AN1792)、人 25-35、和啮齿动物 1-42；以及含有 APP 氨基酸残基 592-695 的、被称为 pBx6 的融合多肽。第十组用 PBS 结合佐剂免疫，作为对照。

对于每一种免疫，将溶于 200 μ l PBS 的 100 μ g 各种 A β 肽或者将溶于同样体积 PBS 的 200 μ g APP 衍生的 pBx6 或者单独 PBS 用完全弗氏佐剂 (CFA) 按照 1:1 (体积: 体积) 的比例乳化，至终体积为 400 μ l，用于第一次免疫，随后用不完全弗氏佐剂 (IFA) 中的同样量的免疫原进行其后四个剂量的加强免疫，用 PBS 作为最后一个剂量。前三个剂量以间隔两周的方案腹腔内给药免疫，然后采用间隔一个月的方案。第二个剂量之后，每次免疫开始后四到七天对动物取血，用于测定抗体效价。最后一个剂量之后约一周无痛处死动物。

2. 脑中的 A β 和 APP 水平

用各种 A β 肽或 APP 衍生物免疫约四个月后，对盐水灌注动物取脑。一个半球准备用于免疫组织化学分析，另一个半球用于 A β 或 APP 水平的定量分析。为了测定各种形式的 β 淀粉样肽和淀粉样蛋白前体

蛋白质的浓度，解剖半球，在 5 M 胍中制备海马趾、皮层、和小脑区的匀浆。将它们稀释，通过与 ELISA 中安排的一系列已知浓度的 A β 肽或 APP 标准品的稀释度相比较，定量淀粉样蛋白或 APP 的水平。

用 PBS 免疫的对照组中，海马中总 A β 浓度的中值比皮层中总 A β 浓度的中值高 5.8 倍（海马组织的中值为 24318 ng/g，皮层中为 4221 ng/g）。对照组小脑中的中值（23.4 ng/g 组织）比海马中的中值约低 1000 倍。这些水平类似于我们以前报道的同年龄的杂合 PDAPP 转基因小鼠的该水平（Johnson-Woods 等，1997，同上）。

对于皮层，处理组子集具有显著不同于对照组的总 A β 和 A β 1-42 水平的中值（ $p < 0.05$ ），如图 11 所示，这些动物接受 AN1792、啮齿动物 A β 1-42 或者 A β 1-5 肽共轭物。与对照相比，这些处理组总 A β 的中值分别降低 75%、79% 和 61%。所有组脑皮层区 A β 特异性抗体的效价和 A β 水平之间没有可辨别的相关性。

在海马中，与 AN1792 处理相关的总 A β 中值的降低（46%， $p = 0.0543$ ）不象在皮层中观察到（75%， $p = 0.0021$ ）的那么显著。然而，在海马中降低的量却远远大于皮层，海马中净降低为 11186 ng/g 组织，而皮层中为 3171 ng/g 组织。对于接受啮齿动物 A β 1-42 或 A β 1-5 的动物组，总 A β 水平的中值分别降低 36% 和 26%。然而，假设组中个体较少，组内动物之间淀粉样肽水平高度可变，这些降低就不明显了。测定海马中 A β 1-42 的水平时，没有出现明显的治疗诱导的降低。因此，基于皮层中 A β 侵害较小，该区中的改变是治疗效果的更为灵敏的指标。经 ELISA 测定的皮层中 A β 水平的改变相似，但是免疫组织化学分析的结果（见下面）却不同。

也测定了小脑中的总 A β ，该区在 AD 病理学中通常不受影响。用各种 A β 肽或 APP 衍生物免疫的所有组的 A β 浓度的中值均与脑中该区的对照组没有差别。该结果表明处理没有影响 A β 的非病理水平。

还通过 ELISA 测定了治疗和对照小鼠皮层和小脑中的 APP 浓度。应用两种不同方法分析 APP。其一，指定的 APP- α /FL，识别两种 APP- α (α ，APP 的分泌型，其在 A β 序列中被酶切)，以及 APP 的全长型 (FL)，而第二种仅识别 APP- α 。在治疗组子集中，与治疗相关的 A β 的降低相比，所有治疗动物的 APP 水平没有相对于对照动物改变。这些结果表明 A β 肽的免疫没有耗尽 APP；治疗作用对 A β 更专属。

总之，通过 AN1792、啮齿动物 A β 1-42 或 A β 1-5 共轭物的治疗，皮层中总 A β 和 A β 1-42 的水平显著降低。海马中，仅 AN1792 治疗组总 A β 降低显著。在海马趾、皮层或小脑区中，A β 或 APP 水平没有其它显著的治疗相关性改变。

2. 组织化学分析

取来自六组动物的脑用于免疫组织化学分析，三组用 A β 肽共轭物 A β 1-5、A β 1-12、和 A β 13-28 免疫；两组用全长 A β 聚集物 AN1792 和 AN1528 免疫，另一组用 PBS 处理作为对照组。来自这些组脑切片的淀粉样侵害图像分析结果如图 12 所示。三组治疗组比对照动物皮层区中淀粉样侵害显著减少。在接受 AN1792 的组中观察到淀粉样侵害最大程度的降低，平均值降低了 97% ($p=0.001$)。用 AN1528 和 A β 1-5 肽共轭物治疗的动物也观察到显著降低，分别降低 95% ($p=0.005$) 和 67% ($p=0.02$)。

通过 ELISA 定量测定总 A β 或 A β 1-42 得到的结果和通过图像分析得到的淀粉样侵害某种程度上不同。当定量图像分析测定时，AN1528 处理对皮层淀粉样侵害水平影响显著，而当 ELISA 测定时，该区种总 A β 的浓度却没有被显著影响。这两种结果的差异可能因为分析的特异性导致。图像分析仅测定聚集成斑的不溶性 A β 。相比较而言，ELISA 测定所有形式的 A β ，包括可溶的和不可溶的，单体和聚集体。既然认为

该病的病理与 A β 的不溶斑相关型有关，图像分析技术显示治疗效果可能更灵敏。然而，因为 ELISA 更快速和容易分析，作为筛选目的它非常有效。而且，它可以显示结合斑型比总 A β 的治疗相关性 A β 降低更大。

为了确定治疗动物中免疫诱导的 A β 特异性抗体是否与沉积的脑淀粉样蛋白反应，将来自治疗动物和对照小鼠的一系列切片与小鼠 IgG 特异性抗体反应。与 PBS 组相比，用 A β 肽共轭物 A β 1-5、A β 1-12、和 A β 13-28 和全长 A β 聚集物 AN1792 和 AN1528 免疫的动物含 A β 的斑被内源 IgG 包围。用其它 A β 肽或 APP 肽 pBx6 免疫的动物的脑没有用该方法分析。

3. 抗体效价的测定

第二次免疫之后，每次免疫开始后四到七天对小鼠取血，共取血五次。利用夹心 ELISA，用 A β 1-42 涂布的塑料多孔平板，测定作为 A β 1-42 结合抗体的抗体效价。如图 13 所示，对于诱导 AN1792 特异性抗体最高效价的四种疫苗 AN1792，（峰 GMT：94647）；AN1528，（峰 GMT：88231）；A β 1-12 共轭物，（峰 GMT：47216）；和啮齿动物 A β 1-42，（峰 GMT：10766），第四个剂量之后诱导抗体的效价达到峰位。这些组的效价在第五和第六个剂量之后有点衰减。对于其它五种免疫原，第五或第六个剂量之后达到峰效价，但它们的量比四种最高效价组低很多：A β 1-5 共轭物（峰 GMT：2356）、pBx6（峰 GMT：1986）、A β 13-28 共轭物（峰 GMT：1183）、A β 33-42 共轭物（峰 GMT：658）、A β 25-35（峰 GMT：125）。还利用同样的 ELISA 夹心模式测定了一系列免疫原（那些组用 A β 1-5、A β 13-28、A β 25-35、A β 33-42 或啮齿动物 A β 1-42 免疫）对同源肽的抗体效价，这些效价与对 A β 1-42 测得的效价基本上相同，除了啮齿动物 A β 1-42 为免疫原的情况下的抗体效价对同源免疫原约高两倍。个体动物的 AN1792 特异性抗体效价的量或治疗组的平均值与由皮层中 A β 降低测定的功效没有相关性。

4. 淋巴细胞增殖反应

利用最后一次即第六次免疫之后约一周取到的脾细胞测定了 A β 依赖性淋巴细胞增殖。在存在用于刺激的、浓度为 5 μ M 的 A β 1-40 的条件下,以每孔 10⁵ 的量培养新鲜收获的细胞。还在存在反向肽 A β 40-1 的条件下培养来自十组中七组的细胞。作为阳性对照,另外的细胞与 T 细胞促分裂原, PHA 一起培养;作为阴性对照,细胞在不加肽下培养。

来自大多数动物的淋巴细胞对 PHA 反应而增殖。对 A β 40-1 反向肽没有明显的反应。当用 AN1792 受试者体内最高 cpm 的 A β 1-40 刺激时,来自较大的聚集态 A β 肽、AN1792、啮齿动物 A β 1-42 和 AN1528 免疫动物的细胞增殖剧烈。用 A β 1-12 共轭物、A β 13-28 共轭物和 A β 25-35 免疫的各组中有一只动物对 A β 1-40 应答增殖。接受 A β 1-5 共轭物、A β 33-42 共轭物、pBx6 或 PBS 的其余组没有动物对 A β 刺激应答。结果如下表 5 概述。

免疫原	共轭物	A β 氨基酸	应答数
A β 1-5	是	5-聚体	0/7
A β 1-12	是	12-聚体	1/8
A β 13-28	是	16-聚体	1/9
A β 25-35		11-聚体	1/9
A β 33-42	是	10-聚体	0/10
A β 1-40		40-聚体	5/8
A β 1-42		42-聚体	9/9
r A β 1-42		42-聚体	8/8
pBx6			0/8
PBS		0-聚体	0/8

这些结果表明, AN1792 强烈刺激 T 细胞 (更可能是 CD4⁺表型) 应答。用 A β 1-5 免疫动物的体内缺乏 A β 特异性 T 细胞应答并不奇怪,

因为 CD4⁺ T 细胞识别的肽表位通常约 15 个氨基酸长度，当然较短的肽有时也具有较低效果的功能。因此，四种结合肽的大量辅助 T-细胞表位可能出现在 IgG 结合模式中，但不在 A β 区。上述每种治疗组中动物的增殖性应答的几率非常低，支持了该假设。既然 A β 1-5 共轭物对于显著降低明显缺乏 A β 特异性 T 细胞的脑中的 A β 水平非常有效，通过这种肽免疫而诱导的免疫应答的关键效应物可能是抗体。

对于包括所有 A β 残基、含 APP 氨基酸 592-695 的融合肽 pBx6，缺乏 T 细胞应答，且抗体应答较低，可能因为这种特殊制品免疫原性较低。A β 25-35 聚集物的低免疫原性可能因为该肽太小而可能不含辅助诱导抗体应答的良好的 T 细胞表位。如果将该肽与载体蛋白质结合，它将可能有更好的免疫原性。

V. 用于被动保护的多克隆抗体的制备

20 只非转基因小鼠用 A β 或其它免疫原免疫，任选添加佐剂，到第 4-5 月无痛处死小鼠。对免疫小鼠采血。任选将 IgG 与其它血液成分分离。可以通过亲和层析部分纯化特异于该免疫原的抗体。每只小鼠得到平均约 0.5-1 mg 的免疫原特异性抗体，总量 5-10 mg。

VI. 用 A β 抗体进行被动免疫

如下所示，对 7-9 月龄 PDAPP 小鼠组中的每一只注射 0.5 mg 多克隆抗-A β 抗体或特异性抗-A β 单克隆抗体的 PBS 液。纯化所有抗体制剂，使其具有较低的内毒素水平。可以通过将 A β 片段或长型注射到小鼠体内，制备杂交瘤、筛选特异性结合 A β 目的片段而不结合其它 A β 非重叠片段的抗体的杂交瘤，制备针对该片段的单克隆抗体。

表 6

抗体	表位
2H3	A β 1-12
10D5	A β 1-12
266	A β 13-28
21F12	A β 33-42
小鼠多克隆抗人 A β 42	抗聚集态 A β 42

在 4 个月的时间内，按照需要对小鼠腹膜内注射，以维持通过 ELISA 效价测定的高于 1/1000（通过 ELISA 对 A β 42 或其它免疫原确定）的循环抗体浓度。如上述监测效价，在注射的四个月末无痛处死小鼠。处死后，研究组织化学、A β 水平和毒理学。每组安排十只小鼠。

VII. 不同佐剂的比较

该实施例比较了 CFA、明矾、水包油型乳剂和 MPL 刺激免疫应答的能力。

A. 材料和方法

1. 研究方案设计

将从 Elm Hill 得到的 100 只雌性 Hartley 系六周龄豚鼠分成 10 组，用 AN1792 或其棕榈酰化衍生物结合各种佐剂免疫。七组接受 AN1792（33 μ g，除非另有说明）结合 a) PBS, b) 弗氏佐剂, c) MPL, d) 角鲨烯, e) MPL/角鲨烯, f) 低剂量的明矾, 或 g) 高剂量的明矾（300 μ g AN1792）的注射。两组接受 AN1792 棕榈酰化衍生物（33 μ g）结合 a) PBS 或 b) 角鲨烯的注射。最后一组，即第十组接受单独 PBS（无抗原或其它佐剂）的注射。对于接受弗氏佐剂的组，第一个剂量用 CFA 乳化，其余四个剂量用 IFA 乳化。除了高剂量明矾组接受 300 μ g AN1792，其它各组以 33 μ g 的剂量给药抗原。对于 CFA/IFA，腹膜内注射给药，对于其它各组，在后肢四头肌左侧和右侧交替肌肉内注射

给药。前三个剂量以两周间隔方案给药，随后两个剂量以每月间隔给药。从第二个剂量之后开始，每次免疫后六到七天取血，用于测定抗体效价。

2. 免疫原的制备

将 2 mg A β 42 (California Peptide, Lot ME0339) 加入 0.9 ml 去离子水，旋涡振荡混合物，产生相对均一的混悬液。加入 100 μ l 10 \times PBS (1 \times PBS, 0.15 M NaCl, 0.01 M 磷酸钠, pH 7.5)。混悬液再次旋涡振荡，37 $^{\circ}$ C 保温过夜留待次日使用。将不用的 A β 1-42 脱水成为冻干粉末，于 -20 $^{\circ}$ C 储存。

通过在二甲基甲酰胺液中，将棕榈酸酐偶联到 AN1792 的氨基末端残基上，然后从氢氟酸处理的树脂上提取新生肽，制备 AN1792 的棕榈酰化衍生物。

为了制备与完全弗氏佐剂 (CFA) 结合的疫苗制剂 (组 2)，将 200 μ l 中的 33 μ g AN1792 用 CFA 按照 1:1 (体积: 体积) 的比例乳化至终体积为 400 μ l，用于第一次免疫。对于随后几次免疫，用不完全弗氏佐剂 (IFA) 进行类似乳化。

为了制备第 5 组和第 8 组的结合 MPL 的疫苗制剂，将冻干粉末 (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT) 加入 0.2% 的三乙胺水溶液，至终浓度为 1 mg/ml，然后旋涡振荡。加热到将混合物加热到 65-70 $^{\circ}$ C 保温 30 秒，以制备轻微浑浊的均匀的胶束悬浮液。新鲜配制用于一系列注射的溶液。对于第 5 组的各次注射，将 16.5 μ l PBS、50 μ g MPL (50 μ l) 和 162 μ l PBS 中的 33 μ g AN1792 在硼硅酸盐试管中混合后立即使用。

为了制备与低水包油型乳剂形成的疫苗制剂，将 AN1792 的 PBS 液加入含 5% 角鲨烯、0.5% 吐温 80、0.5% Span 85 的 PBS 液，至终单

剂量浓度为 250 μ l 液体中 33 μ g AN1792 (第 6 组)。将混合物过两仓手动装置乳化 15 到 20 次,直到显微镜下观察可见乳滴直径基本上等于 1.0 μ m 直径的标准乳珠。得到的混悬液为牛奶状乳白色。新鲜配制用于一系列注射的乳剂。对于第 8 组,将 0.2%三甲胺中的 MPL 以每剂量 50 μ g 的浓度加入角鲨烯和去污剂混合物,用于进行如上述的乳化。对于棕榈酰衍生物(第 7 组),将每剂量 33 μ g 棕榈酰-NH-A β 1-42 加入角鲨烯,然后旋涡振荡。然后在旋涡振荡下,加入吐温 80 和 Span 85。将该混合物加入 PBS,至终浓度为 5%角鲨烯、0.5%吐温 80、0.5% Span 85,将混合物如上述乳化。

为了制备结合明矾的疫苗制剂(第 9 组和第 10 组),将 AN1792 的 PBS 液加入含铝水凝胶(氢氧化铝凝胶, Accurate, Westbury, NY),达到 250 μ l 终制剂体积中每 5 mg 明矾 33 μ g(低剂量,第 9 组)或 300 μ g(高剂量,第 10 组) AN1792 的浓度。混悬液在室温下温和混合 4 小时。

3. 抗体效价的测定

从第二次免疫开始后,每次免疫后六到七天对豚鼠取血,总共取血四次。通过一般材料和方法中描述的 ELISA 测定抗 A β 42 的抗体效价。

4. 组织制备

约 14 周后,对所有豚鼠使用 CO₂。收集脑脊液,取出脑,解剖三个脑区(海马、皮层和小脑),用于利用 ELISA 测定总 A β 蛋白质的浓度。

B. 结论

1. 抗体应答

当测定免疫后对 AN1792 的抗体应答时,各种佐剂产生效力范围变化较大。如图 14 所示,当在 PBS 中给药 AN1792 时,二或三次免疫

后没有检测到抗体，第四和第五个剂量后检测到的应答可忽略不计，几何平均效价（GMT）仅约为 45。水包油型（o/w）乳剂第三个剂量后诱导中度效价（GMT 255），第四个剂量后该值维持（GMT 301），最后一个剂量后衰减（GMT 54）。对于结合明矾的 AN1792 存在明显的抗原剂量应答，在所有时间点上 300 μ g 的抗原比 33 μ g 的抗原具有更好的免疫原性。在抗体应答的峰位，即第四次免疫后，两个剂量之间 GMT 的差异为 43%，为 1940(33 μ g)和 3400(300 μ g)。对 33 μ g AN1792 加 MPL 产生的抗体应答非常类似于剂量几乎高出十倍的抗原（300 μ g）结合明矾产生的抗体应答。将 MPL 加入 o/w 乳剂相对于 MPL 作为单独佐剂使疫苗的效力降低近 75%。AN1792 的棕榈酰衍生物在 PBS 中给药时，完全没有免疫原性，当在 o/w 型乳剂中给药时，在第三次和第四次取血时得到中度效价，GMT 分别为 340 和 105。用弗氏佐剂产生最高抗体效价，峰 GMT 约为 87000，该值比其次两个最有效疫苗（MPL 和高剂量 AN1792/明矾）的 GMT 高出近 30 倍。

经该研究鉴定的最值得推荐的佐剂是 MPL 和明矾。对于这两种，MPL 看起来更为优选，因为它只需要低 10 倍的抗原剂量即可产生用明矾得到的相同的抗体应答。可以通过增加抗原和/或佐剂剂量，和通过优化免疫方案促进应答。对于 AN1792，o/w 型乳剂是一种非常差的佐剂，将 o/w 型乳剂加入 MPL 佐剂削弱了单独 MPL 的固有佐剂活性。

2. 脑中的 A β 水平

在大约 14 周时，使豚鼠深度麻醉，提取脑脊液（CSF），切下以下各组动物的脑，它们是用弗氏佐剂（第 2 组）、MPL（第 5 组）、明矾与高剂量（300 μ g）AN1792（第 10 组）免疫的组和 PBS 免疫的对照组（第 3 组）。为了测定 A β 肽的水平，解剖一个大脑半球，在 5 M 胼中制备海马趾、皮层、和小脑区的匀浆。将它们稀释，然后通过 ELISA 模式中已知浓度的 A β 标准蛋白质的一系列稀释度相比较对它们定量。所有四组的海马、皮层和小脑中 A β 蛋白质的水平都非常接近，尽管由这些疫苗诱导的对 A β 的抗体应答的范围非常宽。海马中测

定的平均 A β 水平约为 25 ng/g 组织，皮层中为 21 ng/g，小脑中为 12 ng/g。因此，在某些动物中出现的近三个月对 A β 的高循环抗体效价没有改变它们脑中的总 A β 水平。各组之间，CSF 中的 A β 水平也非常接近。AN1792 免疫对内源性 A β 缺乏巨大影响表明免疫应答集中在 A β 的病理学形成上。

VIII. 小鼠体内对不同佐剂的免疫应答

用六周龄雌性瑞士 Webster 小鼠进行该研究，每组 10-13 只动物。在第 0、14、28、60、90 和 20 天皮下给药进行免疫，制剂体积为 200 μ l。用 PBS 作为所有制剂的缓冲液。从第二个剂量开始后，每次免疫后 7 天对动物取血，用于通过 ELISA 分析抗体效价。各组的治疗方案如表 7 概述。

表 7

丁氢萘心定研究 010 的实验设计					
组	N ^a	佐剂 ^b	剂量	抗原	剂量(μg)
1	10	MPL	12.5 μg	AN1792	33
2	10	MPL	25 μg	AN1792	33
3	10	MPL	50 μg	AN1792	33
4	13	MPL	125 μg	AN1792	33
5	13	MPL	50 μg	AN1792	150
6	13	MPL	50 μg	AN1528	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		无	
9	10	角鲨烯乳化	5%	AN1792	33
10	10	角鲨烯混合	5%	AN1792	33
11	10	明矾	2 mg	AN1792	33
12	13	MPL+明矾	50 μg /2 mg	AN1792	33
13	10	QS21	5 μg	AN1792	33
14	10	QS21	10 μg	AN1792	33
15	10	QS21	25 μg	AN1792	33
16	13	QS21	25 μg	AN1792	150
17	13	QS21	25 μg	AN1528	33
18	13	QS21+ MPL	25 μg /50 μg	AN1792	33
19	13	QS21+明矾	25 μg /2 mg	AN1792	33

角标:

^a 实验开始时各组中小鼠的个数

^b 表明佐剂。所有这些制剂的缓冲液均为 PBS。对于第 8 组, 没有佐剂也没有抗原。

各组中针对 A β 的抗体 ELISA 效价显示于下表 8 中。

表 8

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

该表显示第 4、5 和 18 组得到最高效价，其中佐剂分别是 125 μ g MPL，50 μ g MPL 和 QS21 加 MPL。

IX. 不同佐剂的治疗效果

在 PDAPP 转基因小鼠中，研究了一系列适合人类应用的佐剂的治疗效果，以确定它们增强对 A β 免疫应答的能力和诱导免疫介导的淀

粉样沉积物在脑中清除的能力。

从 Charles River 实验室得到 180 只雄性和雌性 7.5 到 8.5 月龄的杂合 PDAPP 转基因小鼠。将小鼠分成 9 组，每组含动物 15-23 只，用 AN1792 或 AN1528 结合各种佐剂免疫。分配动物时，使各组之间动物的性别、年龄、和动物家系尽可能匹配。佐剂包括明矾、MPL、和 QS21，分别与两种抗原混合，弗氏佐剂（FA）仅与 AN1792 组合。其它组用加有防腐剂硫柳汞的 PBS 缓冲液配制的 AN1792 不加佐剂免疫。第 9 组用单独 PBS 免疫，作为阴性对照。

聚集态 A β 肽的制备：用人 A β 1-40（AN1528；California Peptides Inc., Napa, CA; Lot ME0541）和人 A β 1-42（AN1792；California Peptides Inc., Lot ME0439）肽的脱水储藏于 -20℃ 的冻干粉末新溶解配制一系列注射制剂。对于这种目的，将 2 mg 肽加入 0.9 ml 去离子水，旋涡振荡，产生相对均一的溶液或悬浮液。与 AN1792 相比，AN1528 在该步骤中是可溶的。当 AN1528 开始沉淀时，加入 100 μ l 10 \times PBS 溶液（1 \times PBS：0.15 M NaCl、0.01 M 磷酸钠，pH 7.5）。悬浮液再次旋涡振荡，在 37℃ 保温过夜留待次日使用。

为了制备结合明矾的疫苗制剂（第 1 组和第 5 组），将 PBS 中的 A β 肽加入含铝水凝胶中（Alhydrogel, 2% 氢氧化铝凝胶水溶液, Sargeant, Inc., Clifton, NJ），至每 1 mg 明矾 100 μ g A β 肽的浓度。加入 10 \times PBS 溶液至终制剂体积为 1 \times PBS 液 200 μ l。然后将混悬液在室温下温和混合约 4 小时，以便注射。

为了制备结合 MPL 的疫苗制剂（第 2 组和第 6 组），将冻干粉末（Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT; Lot 67039-E0896B）加入 0.2% 的三乙胺水溶液，至终浓度为 1 mg/ml，然后旋涡振荡。将混合物加热到 65-70℃ 保温 30 秒，以制备轻微浑浊的均匀的胶束悬浮液。该溶液在 4℃ 储藏。用于每组注射，将每剂量 50 μ l PBS 中 100 μ g

的肽、每剂量 50 μ g 的 MPL (50 μ l) 和每剂量 100 μ l 的 PBS 在硼硅酸盐试管中混合后立即使用。

为了制备结合 QS21 的疫苗制剂 (第 3 组和第 7 组), 将冻干粉末 (Aquila, Framingham, MA; Lot A7018R) 加入 PBS (pH 6.6-6.7), 至终浓度为 1 mg/ml, 然后旋涡振荡。将溶液在 -20 $^{\circ}$ C 储藏。用于每次注射时, 将 50 μ l PBS 中每剂量 100 μ g 的肽、25 μ l PBS 中每剂量 25 μ g 的 QS21 和每剂量 125 μ l 的 PBS 在硼硅酸盐试管中混合后立即使用。

为了制备与弗氏佐剂 (CFA) 结合的疫苗制剂 (组 4), 将 200 μ l 中的 100 μ g AN1792 用完全弗氏佐剂 (CFA) 按照 1:1 (体积: 体积) 的比例乳化, 终体积为 400 μ l, 用于第一次免疫。对于随后几次免疫, 用不完全弗氏佐剂 (IFA) 对抗原进行类似乳化。对于含有佐剂明矾、MPL 或 QS21 的疫苗, 将每剂量 100 μ g 的 AN1792 或 AN1528 与明矾 (每剂量 1 mg) 或 MPL (每剂量 50 μ g) 或 QS21 (每剂量 25 μ g) 混合, 在 PBS 中至终体积为 200 μ l, 在后背肩胛骨之间皮下接种给药。对于接受 FA 的组, 将 100 μ g 的 AN1792 用完全弗氏佐剂 (CFA) 按照 1:1 (体积: 体积) 的比例乳化, 终体积为 400 μ l, 腹膜内给药, 作为第一次免疫, 随后用同样量的免疫原在不完全弗氏佐剂 (IFA) 中进行其后五个剂量的加强免疫。对于接受不含佐剂的 AN1792 治疗的组来说, 将 10 μ g AN1792 与 5 μ g 硫柳汞混合, 在 PBS 中终体积为 50 μ l, 皮下给药。第九组即对照组仅接受 200 μ l PBS 皮下给药。在第 0、16、28、56、85 和 112 天上, 对前三个剂量采用两周间隔方案进行免疫, 之后以一月间隔方案免疫。第二个剂量开始后, 每次免疫后六到七天对动物取血, 用于测定抗体效价。最后一个剂量后约一周, 无痛处死小鼠。通过脑中 A β 和 APP 水平的 ELISA 分析, 以及通过脑区中存在的淀粉样斑的免疫组织化学评价, 测定结果。另外, 确定 A β 特异性抗体效价、和 A β -依赖性增殖应答和细胞因子应答。

表 9 表明, FA 和 AN1792 诱导出对 A β 1-42 的最高抗体效价, 第

四次免疫之后达到峰效价（峰 GMT：75386），最后一次免疫，即第六次免疫后，衰减了 59%。由 MPL 和 AN1792 诱导的峰平均效价（峰 GMT：28867）比与 FA 产生的峰平均效价低 62%，并且也在免疫方案中很早（3 个剂量之后）达到峰效价，之后到第六次免疫后，峰值衰减了 28%。由 QS21 和 AN1792 产生的峰平均效价（GMT：1511）比用 MPL 得到的效价约低 5 倍。另外，应答动力学较慢，因此需要再一次免疫以达到峰应答。由明矾-结合 AN1792 产生的效价略高于用 QS21 得到的效价，应答动力学也较 QS21 的迅速。对于在加有硫柳汞的 PBS 中给药的 AN1792，效价的频率和大小仅高于 PBS 单独处理组。MPL 和 AN1528 产生的峰效价（峰 GMT3099）比用 AN1792 产生的约低 9 倍。结合明矾的 AN1528 免疫原性非常低，仅在一些动物体内产生较低效价。用单独 PBS 免疫的对照动物体内没有观察到抗体应答。

表 9

抗体的几何平均效价 ^a					
取血周数					
治疗	3.3	5.0	9.0	13.0	17.0
明矾/ AN1792	102 (12/21) ^b	1,081 (17/20)	2,366 (21/21)	1,083 (19/21)	572 (18/21)
MPL/ AN1792	6241 (21/21)	28,867 (21/21)	1,1242 (21/21)	5,665 (20/20)	8,204 (20/20)
QS21/ AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1,511 (17/18)	1,188 (14/18)
CFA/ AN1792	10,076 (15/15)	61,279 (15/15)	75,386 (15/15)	41,628 (15/15)	30,574 (15/15)
明矾/ AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/21)	31 (2/20)
MPL/ AN1528	184 (15/21)	2,591 (20/21)	1,653 (21/21)	1,156 (20/20)	3,099 (20/20)
QS21/ AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2,994 (21/22)
PBS + 硫柳汞	25 (0/16)	33 (2/16)	39 (4/16)	37 (3/16)	47 (4/16)
PBS	25 (0/16)	25 (0/16)	25 (0/15)	25 (0/12)	25 (0/16)

角标：

^a 测定对 A β 1-42 的几何平均抗体效价

^b 每组应答者的数目

通过 ELISA 测定的，AN1792 或 AN1528 结合各种佐剂、或者硫柳汞治疗 12 月龄小鼠皮层淀粉样侵害的治疗结果如图 15 所示。在 PBS 对照 PDAPP 小鼠中，12 个月时，皮层中总 A β 的水平中值为 1817 ng/g。

在用 AN1792 加 CFA/IFA、AN1792 加明矾、AN1792 加 MPL、和 QS21 加 AN1792 处理的小鼠中观察到 A β 水平显著降低。仅 AN1792 加 CFA/IFA 的降低达到满意的显著度 ($P < 0.05$)。然而, 如实施例 I 和 III 所示, 在降低 A β 水平方面的免疫效果在 15 月龄和 18 月龄小鼠中基本上较大。因此, 期望 AN1792 加明矾、AN1792 加 MPL、AN1792 加 QS21 组合物至少在治疗年龄较大小鼠时将获得满意的显著度。相反, AN1792 加防腐剂硫柳汞显示, A β 的中值与 PBS 治疗小鼠基本上相同。当比较皮层 A β 42 的水平时, 得到类似的结果。PBS 对照组中 A β 42 的中值为 1624 ng/g。用 AN1792 加 CFA/IFA、AN1792 加明矾、AN1792 加 MPL、AN1792 加 QS1 处理小鼠中观察到显著降低的中值, 分别为 403、1149、620 和 714, AN1792 CFA/IFA 处理组的降低获得满意的显著度 ($p = 0.05$)。AN1792 硫柳汞处理小鼠中 A β 42 的中值为 1619 ng/g。

X. 毒性分析

在实施例 2、3 和 7 描述的研究的末期, 收集组织, 用于组织病理学检查。另外, 对来自实施例 3 和 7 的末期血样进行血液学和临床化学检查。评价大多数主要器官, 包括脑、肺、淋巴、胃肠道、肝、肾、肾上腺和性腺。虽然在研究动物中观察到偶发性损伤, 但是在 AN1792 处理和未处理动物之间, 无论是受影响组织还是损伤严重性上均没有明显差异。AN1782 免疫动物与 PBS 处理或未处理动物相比没有特别的值得注意的组织病理学损伤。在实施例 7 中, 佐剂组和 PBS 处理动物之间临床化学表现也没有差异。虽然, 实施例 7 中 AN1792 和弗氏佐剂处理动物相对于 PBS 处理动物, 几种血液学参数存在显著增加, 但是这些类型的影响是弗氏佐剂治疗和伴生的腹膜炎带来的能够意料到的影响, 它们不能说明 AN1792 治疗带来任何不利作用。虽然不是部分毒理学评价, 但广泛地检查了 PDAPP 小鼠的脑部病理作为部分功效端点。在所有研究中没有发现与治疗有关的脑病理学不良影响的迹象。这些结果表明 AN1792 治疗可以很好地耐受, 至少基本上没有副作用。

XI. 对受试者的预防和治疗

进行单剂量相 I 试验确定安全性。以逐步增加的剂量对不同患者给予治疗药物，从约 0.01（推测功效的水平）开始，以 3 为系数增长，直到达到 10 倍有效小鼠剂量的水平。

进行相 II 试验确定治疗功效。挑选利用阿尔茨海默氏病和相关病症协会（ADRDA）为可能发生的 AD 制定的标准确定的早期患中度阿尔茨海默氏病的患者。按照微小精神状态检查（Mini-Mental State Exam, MMSE），合适的患者积分在 12-26 范围内。其它选择标准是，患者在研究期间容易存活，以及不会出现复杂问题，例如可能带来干扰的伴随药物的使用。利用典型心理测量法（例如 MMSE、ADAS，它们对于评价阿尔茨海默氏病的状况和功能是一种内容详尽的标尺）对患者功能作基线评价。这些心理测量标准能够测量阿尔茨海默氏病的发展。合适的定性生命标准也可以用来监测治疗。还可以通过 MRI 监测疾病发展。也可以监测患者的血液数据，包括分析免疫原特异性抗体和 T 细胞应答。

测定基线后，患者开始接受治疗。将它们完全打乱，以双盲方式用治疗药物或安慰剂治疗。至少每六个月监测患者一次。通过进展中治疗组相对于安慰剂组有效降低确定效果。

进行第二次相 II 试验，评价患者从非阿尔茨海默氏病的早期记忆丢失（有时被称为年龄有关的记忆损伤（AAMI））到经 ADRDA 标准确定为可能的阿尔茨海默氏病的改变。通过筛选参照群体的记忆丢失早期迹象或其它与前阿尔茨海默氏病症候学、阿尔茨海默氏病的家族史、遗传危险因素、年龄、性别和已发现的其它预示阿尔茨海默氏病高危特征有关的不利，从非临床群体选择具有转化成阿尔茨海默氏病高风险的患者。收集基于包括 MMSE 和 ADAS 的合适法则和其它设计用来评价较为正常群体法则的基线积分。将这些患者群体分成合适的安慰剂对交替剂量药物组。间隔六个月后，对这些患者群体进行跟踪，

每个患者的端点是到观察结束时他或她是否转化成可能的阿尔茨海默氏病（按照 ADRDA 标准判断）。

XII. 一般材料和方法

1. 抗体效价的测定

在小鼠尾静脉切开小口取血，采集约 200 μ l 血置于微量离心管（microfuge tube）。豚鼠如下取血，首先剃去后腿背面的毛，然后用 18 号针头划破跖骨静脉，采血于微量离心管。室温下（RT）静置 1 小时使血液凝结成块，旋涡振荡，然后在 14000 \times g 离心 10 分钟，将血块从血清中分离出来。然后将血清转移到干净的微量离心管中，4 $^{\circ}$ C 储存直到测定效价。

用 ELISA 测定抗体效价。在 Well 涂层缓冲液（Well Coating Buffer）（0.1 M 磷酸钠，pH 8.5，0.1%叠氮化钠）中含有 10 μ g/ml A β 42 或 SAPP 或其它抗原（如各单独报道记录）的 100 μ l 溶液涂布 96 孔微滴定平板（Costar EIA 平板），室温过夜。吸干各孔，从 1/100 稀释度的样品稀释液（0.014 M 磷酸钠、pH7.4、0.15 M NaCl、0.6%牛血清白蛋白、0.05%硫柳汞）开始向孔中加入血清。以三倍的跨度制备七个连续稀释度的样品，置于平板中，终稀释度为 1/218700。稀释液在经涂布的平板的孔中室温保温 1 小时。然后用含 0.05%吐温 20 的 PBS 冲洗四次。将第二种抗体，结合辣根过氧化物酶的绵羊抗小鼠 Ig（从 Boehringer Mannheim 得到），作为 100 μ l 1/3000 稀释度的样品稀释液加到孔中，室温保温 1 小时。再次用 PBS、吐温 20 冲洗平板四次。为了形成色原体，将 100 μ l 慢 TMB（Slow TMB, 3,3',5,5'-四甲基对二氨基联苯，从 Pierce Chemicals 得到）加入各孔，室温保温 15 分钟。加入 25 μ l 2 M 硫酸终止反应。然后在分子装置 Vmax（Molecular Devices Vmax）上记录 450 nm-650 nm 处的光密度。

效价表示为得到最大光密度一半时血清稀释度的倒数。最大 OD 通常取自起始的 1/100 稀释液，除非该条件下具有非常高的效价，在

这种情况下，需要建立较高起始稀释度的最大 OD。如果两种稀释液之间下降了 50% 点位，则利用线性外推法计算最终效价。为了计算几何平均抗体效价，低于 100 的效价被任意地指定效价值为 25。

2. 淋巴细胞增殖分析

用异氟烷麻醉小鼠。取出脾，用 5 ml 含 10% 热灭活胎牛血清的 PBS (PBS-FBS) 漂洗两次，然后置于 Medimachine (Dako) 的 50 μ Centricon 室 (Dako A/S, Denmark)，在 1.5 ml PBS-FBS 中以 100 rpm 匀浆 10 秒，然后经 100 μ 孔径的尼龙筛过滤。用 15 ml PBS-FBS 冲洗脾细胞一次，然后在 200 \times g 离心 5 分钟沉淀。将沉淀重悬浮于 5 ml 含 0.15 M NH_4Cl 、1 M KHCO_3 、0.1 M NaEDTA 、pH 7.4 的缓冲液中室温保持 5 分钟，使红细胞溶解。然后同上述冲洗白细胞。将新鲜分离的脾细胞（每孔 10^5 个细胞，每个样品重复三次）置于 96 孔 U-型底处理培养物微滴定平板 (Corning, Cambridge, MA) 中，在添加 2.05 mM L-谷氨酰胺、1% 青霉素/链霉素、和 10% 热灭活 FBS 的 RPMI 1640 培养基中 (JRH Biosciences, Lenexa, KS) 于 37 $^\circ\text{C}$ 培养 96 小时。再加入 5 μM 到 0.18 μM 剂量范围内的各种 A β 肽，A β 1-16、A β 1-40、A β 1-42 或 A β 40-1 反向序列蛋白质。对照孔中的细胞在伴刀豆球蛋白 A (Con A) (Sigma, cat. # C-5275, 浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下不添加蛋白质培养。向细胞中加入 ^3H -胸苷 (1 $\mu\text{Ci}/\text{孔}$ ，从 Amersham Corp., Arlington Heights IL 得到) 培养最后 24 小时。然后收获细胞置于 UniFilter 平板，在 Top Count 微平板发光计数仪 (Top Count Microplate Scintillation Counter (Packard Instruments, Downers Grove, IL)) 上计数。结果表示为插入不溶性大分子的放射性的每分钟计数 (cpm)。

4. 脑组织制备

无痛处死后，取脑，一个大脑半球准备进行免疫组织化学分析，解剖另一个大脑半球的三个脑区（海马、皮层和小脑），用于利用特异性 ELISA 测定各种 A β 蛋白质和 APP 型的浓度。

将用于 ELISA 的组织在 10 体积的冰冷胍缓冲液（5.0 M 胍-盐酸，50 mM Tris-HCl, pH 8.0）中匀浆。匀浆液利用 Adams 振荡器(Fisher)温和振摇，室温下混合三到四小时，然后于-20℃储藏，留待定量 A β 和 APP 时使用。前面的试验已经表明，在该储藏条件下，分析物是稳定的，当合成的 A β 蛋白（Bachem）混入同窝生小鼠的对照脑组织匀浆中时，可以定量提取（Johnson-Wood 等，同上）。

5. A β 水平的测定

用冰冷却的酪蛋白稀释液（0.25%酪蛋白、PBS、0.05%叠氮化钠、20 μ g/ml 抑肽酶、5 mM EDTA pH 8.0, 10 μ g/ml 亮肽素）以 1:10 稀释脑匀浆，然后在 4℃，16000 \times g 离心 20 分钟。制备合成的 A β 蛋白质标准品（1-42 氨基酸）和 APP 标准品，使终组合物中包括 0.5 M 胍和 0.1%牛血清白蛋白（BSA）。“总” A β 夹心 ELISA 利用单克隆抗体（mA β ）266，特异于 A β 的氨基酸 13-28（Seubert, 等）作为捕捉抗体，生物素酰化的 mA β 3D6，特异于 A β 的氨基酸 1-5（Johnson-Wood 等）作为报道抗体。3D6 mA β 不能识别分泌型 APP 或全长 APP，仅可检测氨基末端为天冬氨酸的 A β 类型。该分析法灵敏度下限约为 50 ρ g/ml（11 ρ m），当浓度高达 1 ng/ml 时也不与内源性鼠 A β 蛋白质表现交叉反应性（Johnson-Wood 等，同上）。

A β 1-42 特异性夹心 ELISA 应用 mA β 21F12，特异于 A β 的氨基酸 33-42（Johnson-Wood 等）作为捕捉抗体。该分析同样用生物素酰化的 mA β 3D6 作为报道抗体，其灵敏度下限约为 125 ρ g/ml（28 ρ m，Johnson-Wood 等）。当进行 A β ELISA 时，用 100 μ l mA β 266（10 μ g/ml）或 mA β 21F12（5 μ g/ml）涂布 96 孔的免疫测试平板（Costar），室温下保温过夜。通过吸气除去溶液，向各孔中加入 200 μ l 0.25%的人血清蛋白 PBS 溶液，于室温将各孔封闭至少 1 小时。除去封闭液，在 4℃下储藏干燥的平板直到使用。用冲洗缓冲液（Tris-缓冲盐水（0.15 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5）加 0.05%吐温 20）在使用前使平板再水化。将样品和标准品加入每孔 100 μ l 的三等份，然后于 4℃保温过夜。

分析的每个步骤之间用冲洗缓冲液至少冲洗平板三次。加入生物素酰化的 mA β 3D6（用酪蛋白分析缓冲液（0.25%酪蛋白，PBS，0.05%吐温 20，pH 7.4）稀释到 0.5 μ g/ml），室温下保温 1 小时。将亲合素-辣根过氧化物酶结合物（亲合素-HRP 得自 Vector, Burlingame, CA）用酪蛋白分析缓冲液以 1:4000 的比例稀释，）加到孔中，室温保持 1 小时。加入比色物质，慢 TMB-ELISA（Pierce），使反应在室温下进行 15 分钟，之后，加入 25 μ l 2 N H₂SO₄ 终止反应。利用分子装置 Vmax，测定 450 nm 和 650 nm 的吸收度差值，定量反应产物。

6. APP 水平的测定

应用了两种不同 APP 测定法。其一，特指的 APP- α /FL，识别 APP- α 和 APP 的全长型（FL）。第二种分析特异于 APP- α 。APP- α /FL 分析法识别包括 A β 的前 12 个氨基酸的分泌型 APP。因为报道抗体（2H3）与 α -发夹-位点（存在于 APP695 的氨基酸 612-613 之间，Esch 等，科学，248，1122-1124（1990））不具有特异性；因此该分析也可以识别全长 APP（APP-FL）。利用固定于 APP-FL 细胞质末端的 APP 抗体消耗脑匀浆的 APP-FL 的初步试验表明，约 30-40% 的 APP- α /FL APP 是 FL（数据未显示）。APP- α /FL 和 APP- α 分析的捕捉抗体均为 mA β 8E5，对 APP695 型的氨基酸 444-592 升高（Games 等，同上）。APP- α /FL 分析的报道 mA β 是 mA β 2H3，其特异于 APP695 的氨基酸 597-608（Johnson-Wood 等，同上），APP- α 分析的报道抗体是 mA β 16H9 的生物素酰化衍生物，对 APP 的氨基酸 605-611 升高。APP- α /FL 分析的灵敏度下限约为 11 ng/ml（150 pM）（Johnson-Wood 等，同上），APP- α 特异性分析的灵敏度下限约为 22 ng/ml（0.3 nM）。对于这两种 APP 检测，如前面 mA β 266 所述，将 mA β 8E5 涂布到 96 孔 EIA 平板上。纯化的重组分泌型 APP- α 用作 APP- α 分析和 APP- α /FL 分析的参照标准品（Esch 等，同上）。5 M 胍中的脑匀浆样品用 ELISA 样品稀释液（0.014 M 磷酸盐缓冲液，pH 7.4，0.6%牛血清白蛋白，0.05% 硫柳汞，0.5 M NaCl，0.1% NP40）以 1:10 的比例稀释。然后用含 0.5 M 胍的样品稀释液以 1:4 的比例稀释它们。然后在室温下，16000 \times g

离心稀释的匀浆 15 秒。将 APP 标准品和样品以两等份加入平板，室温下保温 1.5 小时。将生物素酰化的报道抗体 2H3 或 16H9 与样品一起在室温下保温 1 小时。链霉亲和素碱性磷酸酶 (Boehringer Mannheim)，在样品稀释液中稀释 1000 倍，加入孔中室温下保温 1 小时。加入荧光物质 4-甲基-umbelliperyl-磷酸酯，室温下保温 30 分钟，在 Cytofluor tm 2350 荧光读数仪上在激发光 365 nm 和发射光 450 nm 下对平板读数。

7. 免疫组织化学

在 4%多聚甲醛的 PBS 液中于 4℃固定脑三天，然后在 1%多聚甲醛 PBS 液中于 4℃储存 1 到 7 天，直到被切片。在 vibratome 上室温下将其切成 40 微米厚的冠状切片，在防冻剂（30%甘油，30%乙二醇，在磷酸缓冲液中）中于 -20℃储存直到进行免疫组织化学处理。对于每个脑，在海马背水平上的六个切片，连续间隔 240μm 使彼此分离，在下列之一的抗体中保温过夜：（1）生物素酰化的抗-Aβ (m Aβ, 3D6, 特异于人 Aβ) 在 PBS 和 1%马血清中稀释到浓度为 2μg/ml；或（2）特异于人 APP, 8E5 的生物素酰化的 m Aβ, 在 PBS 和 1.0%马血清中稀释到浓度为 3μg/ml；或（3）特异于神经胶质纤丝酸性蛋白质 (GFAP; Sigma Chemical Co.) 的 m Aβ, 用含 0.25% Triton X-100 和 1%马血清的 Tris-缓冲盐水 (pH 7.4) (TBS) 以 1:500 的比例稀释；或（4）特异于 CD11b (MHC-1 抗原) (Chemicon International) 的 m Aβ, 用 0.25% Triton X-100 和 1%兔血清的 TBS 液以 1:100 的比例稀释；或（5）特异于 MHC II 抗原的 m Aβ (Pharmingen), 用含 0.25% Triton X-100 和 1%兔血清的 TBS 液以 1:100 的比例稀释；或（6）特异于 CD 43 的大鼠 m Aβ (Pharmingen), 用含 1%兔血清的 PBS 液以 1:100 的比例稀释；或（7）特异于 CD 45RA 的大鼠 m Aβ (Pharmingen), 用含 1%兔血清的 PBS 液以 1:100 的比例稀释；或（8）特异于 CD 45RB 的大鼠单克隆 Aβ (Pharmingen), 用含 1%兔血清的 PBS 液以 1:100 的比例稀释；或（9）特异于 CD 45 的大鼠单克隆 Aβ (Pharmingen), 用含 1%兔血清的 PBS 液以 1:100 的比例稀释；或（10）特异于 CD3e 的生物素酰化多克隆仓鼠 Aβ (Pharmingen), 用含 1%兔血清的 PBS

液以 1:100 的比例稀释；或 (11) 特异于 CD3 的大鼠 m A β (Serotec)，用含 1%兔血清的 PBS 液以 1:200 的比例稀释；或 (12) 含 1%正常马血清的无一级抗体的 PBS 溶液。

与上面所列的 1、2 和 6-12 号抗体溶液反应的切片首先用含 1.0% Triton X-100, 0.4% 过氧化氢的 PBS 液在室温下预处理 20 分钟，以封闭内源性过氧化物酶。接着将它们与一级抗体在 4 $^{\circ}$ C 下保温过夜。然后使与 3D6 或 8E5 或 CD3e m A β 反应的切片在室温下与辣根过氧化物酶-亲和素-生物素-复合物与用 PBS 稀释 75 倍的试剂盒成分 “A” 和 “B” (载体精英标准试剂盒 (Vector Elite Standard Kit), Vector Labs, Burlingame, CA) 一起反应 1 小时。与特异于 CD 45RA、CD 45RB、CD 45、CD3 的抗体和无一级抗体的 PBS 溶液反应的切片分别与生物素酰化的抗-大鼠 IgG (Vector) (用 PBS 稀释 75 倍) 或者生物素酰化的抗-小鼠 IgG (Vector) (用 PBS 稀释 75 倍) 一起在室温下保温 1 小时。然后将切片与辣根过氧化物酶-亲和素-生物素-复合物与试剂盒成分 “A” 和 “B” (用 PBS 稀释 75 倍) (载体精英标准试剂盒, Vector Labs, Burlingame, CA) 在室温下反应一小时。

将切片置于 0.01%过氧化氢、0.05% 3,3'-对二氨基联苯 (DAB) 中室温下显影。用于与 GFAP-、MAC-1-、和 MHC II-特异性抗体一起保温的切片首先用 0.6%过氧化氢在室温下预处理，一封闭内源性过氧化物酶，然后与一级抗体在 4 $^{\circ}$ C 下保温过夜。与 GFAP 抗体反应的切片与生物素酰化的马体内制备的抗-小鼠 IgG (载体实验室 (Vector Laboratories); Vectastain Elite ABC 试剂盒) (用 TBS 稀释 200 倍) 在室温下保温 1 小时。接着将切片与亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (载体实验室; Vectastain Elite ABC 试剂盒) (用 TBS 稀释 1000 倍) 反应 1 小时。接着将与 MAC-1-或 MHC II-特异性 m A β 作为一级抗体一同保温的切片与生物素酰化的来自兔的抗-大鼠 IgG (用 TBS 稀释 200 倍) 在室温下反应 1 小时, 随后与亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (用 TBS 稀释 1000 倍) 保温 1 小时。然后将与 GFAP-、MAC-1-和 MHC II-

特异性抗体一同保温的切片用 0.05%DAB、0.01%过氧化氢、0.04%氯化镍、TBS 液分别处理 4 和 11 分钟，使它们显色。

将免疫标记的切片在载玻片（VMR, Superfrost 玻片）上制作成标本，空气干燥过夜，在 Propar（Anatech）中浸渍，然后用 PermOUNT（Fisher）作为标本介质用盖玻片覆盖。

为了复染色 A β 斑，将一系列 GFAP-阳性切片在免疫组织化学处理后置于 Superfrost 载玻片上制作成标本，在 1%硫黄素 S（Sigma）水溶液中保持 7 分钟。然后使切片脱水，在 Propar 中使其清晰，然后用 PermOUNT 制作标本加盖玻片覆盖。

8. 图像分析

通过 CCD 摄像机和 Sony Trinitron 监测仪连接于 Nikon Microphot-FX 显微镜的图像计 150 型图像分析系统（Oncor, Inc., Gaithersburg, MD）被用来定量免疫反应切片。切片的图像储存于影象缓冲液中，确定基于颜色和饱和度的阈值以选择和计算免疫标记结构物所占据的总像素面积。对于每个切片，人工描绘出海马轮廓，计算海马占据的总像素面积。如下测定淀粉样侵害百分率：（含与 mA β 3D6 发生免疫反应的 A β 沉积物的海马趾面积的分数的分数） $\times 100$ 。同样，神经炎侵害的百分率如下测定：（含与 mA β 8E5 发生反应的营养不良性神经突的海马趾面积的分数的分数） $\times 100$ 。运行简单 32 软件应用程序的 C-成像系统（Compix, Inc., Cranberry Township, PA）通过光电子学照相机连接于 Nikon Microphot-FX 显微镜，用于定量 GFAP-阳性星形胶质细胞和 MAC-1-和 MHC II-阳性小胶质细胞占据的夹肌后皮层的百分率。免疫反应切片的图像储存于显影缓冲液中，确定单色阈值，以选择和计算免疫标记细胞占据的总像素面积。对于每个切片，手工绘制除夹肌后皮层（RSC）的轮廓，然后计算 RSC 占据的总像素面积。星形胶质细胞增多百分率如下确定：（GFAP-反应性星形胶质细胞占据的 RSC 的分数的分数） $\times 100$ 。同样，小胶质细胞增多百分率如下确定：（MAC-1-

或 MHC II-反应性小胶质细胞占据的 RSC 的分数) $\times 100$ 。对于所有的图像分析, 定量每个动物的海马背水平上的六个切片(彼此以连续 $240\mu\text{m}$ 的间隔分隔)。在所有条件下, 动物的治疗状况对于观察者都是未知的。

虽然为了便于清楚理解, 如上述详细描述了本发明, 但显然可以在附加权利要求范围内进行某些改动。本文为各种目的引证的所有出版物和专利文献以其全文内容引入, 好象各自单独全文列入本文那样。

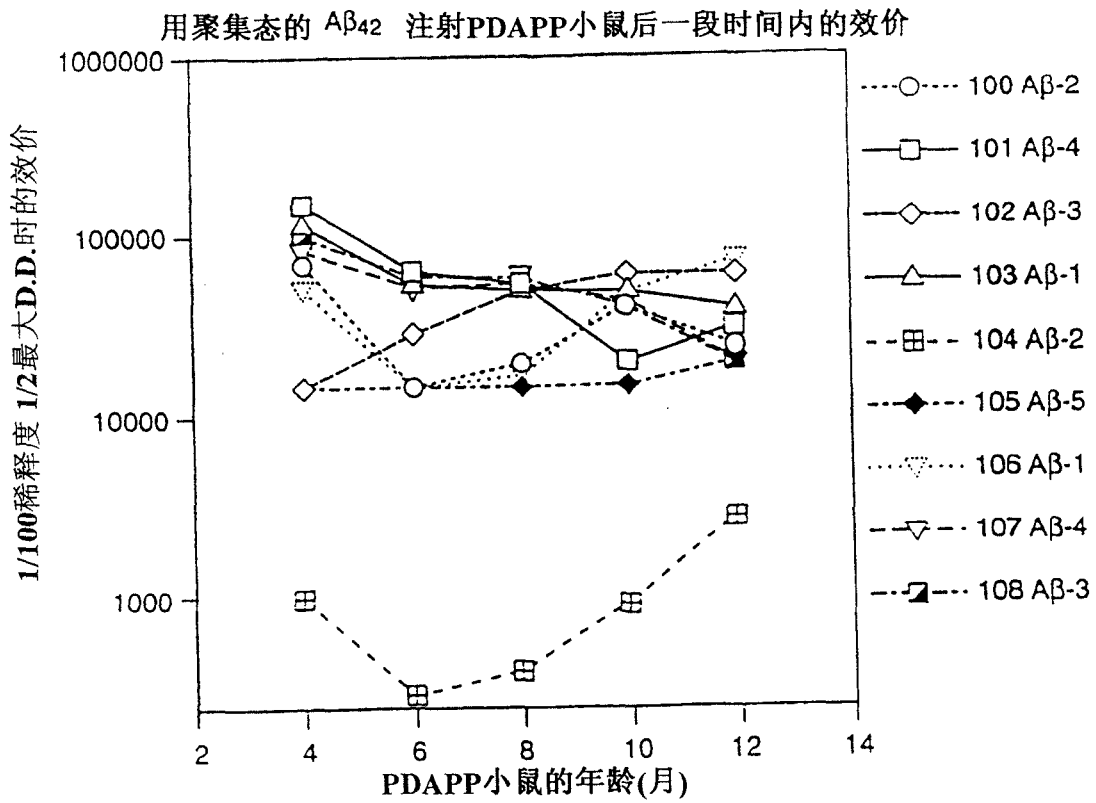


图1

研究001
海马淀粉样侵害

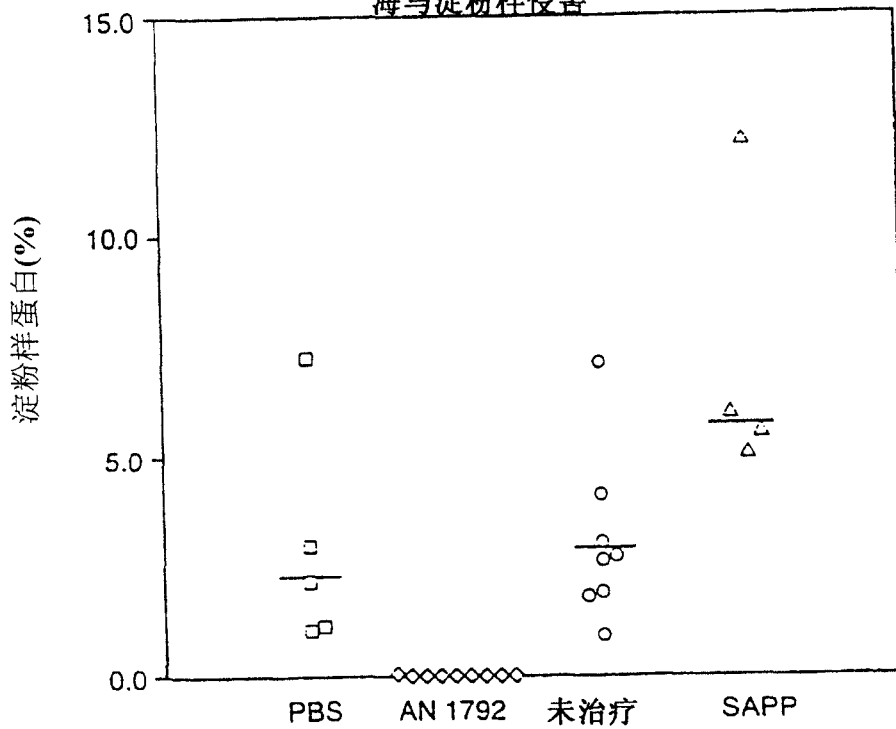


图2

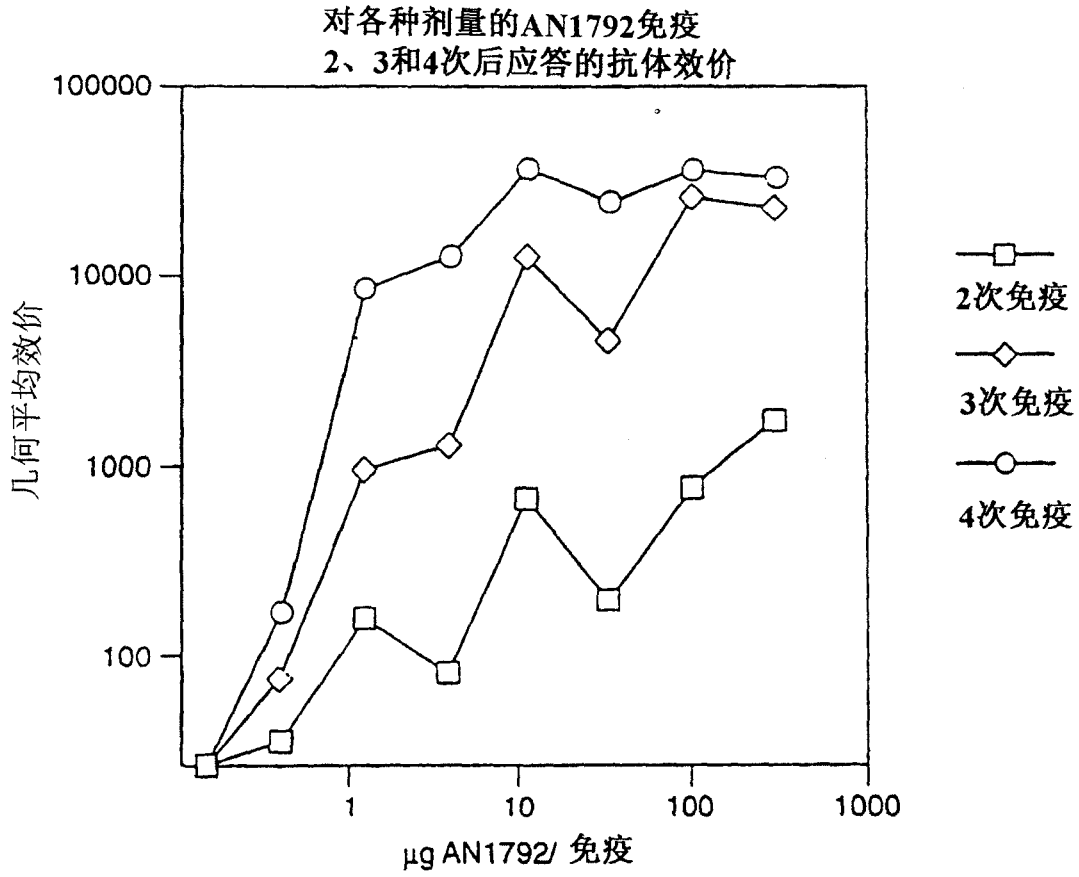


图5

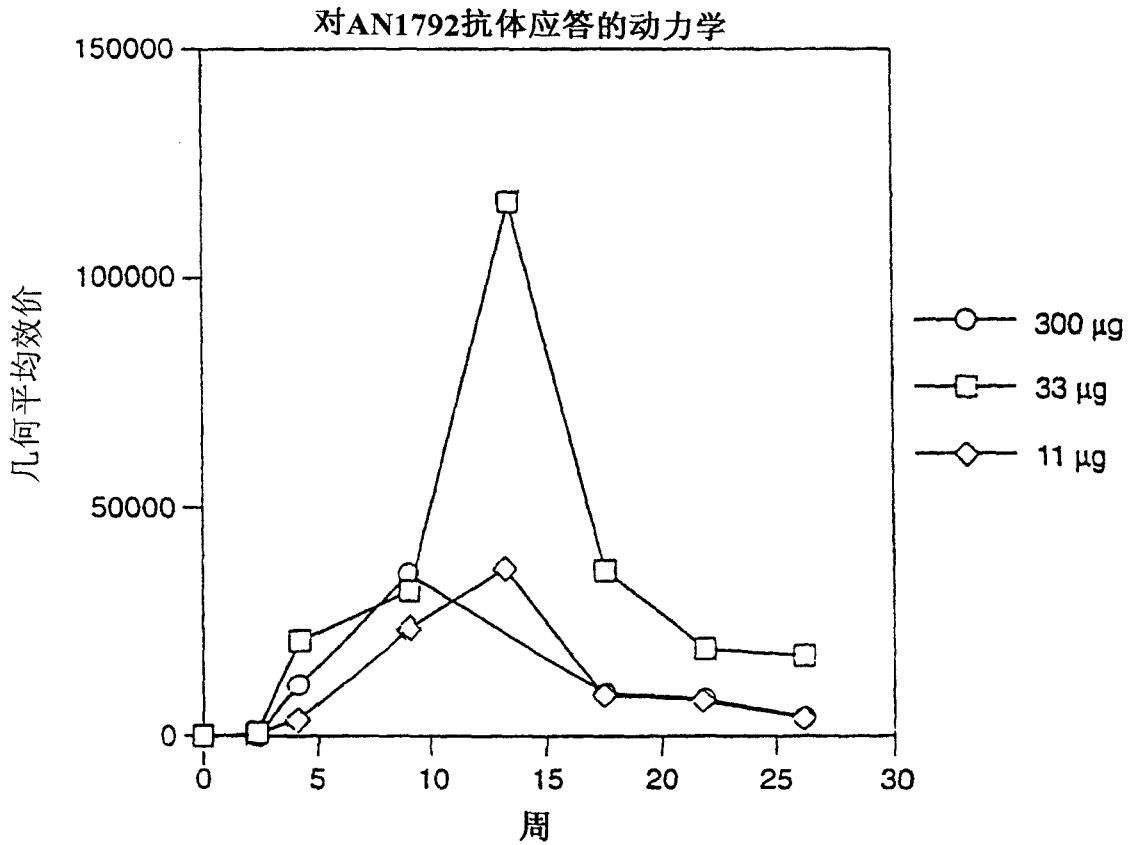


图6

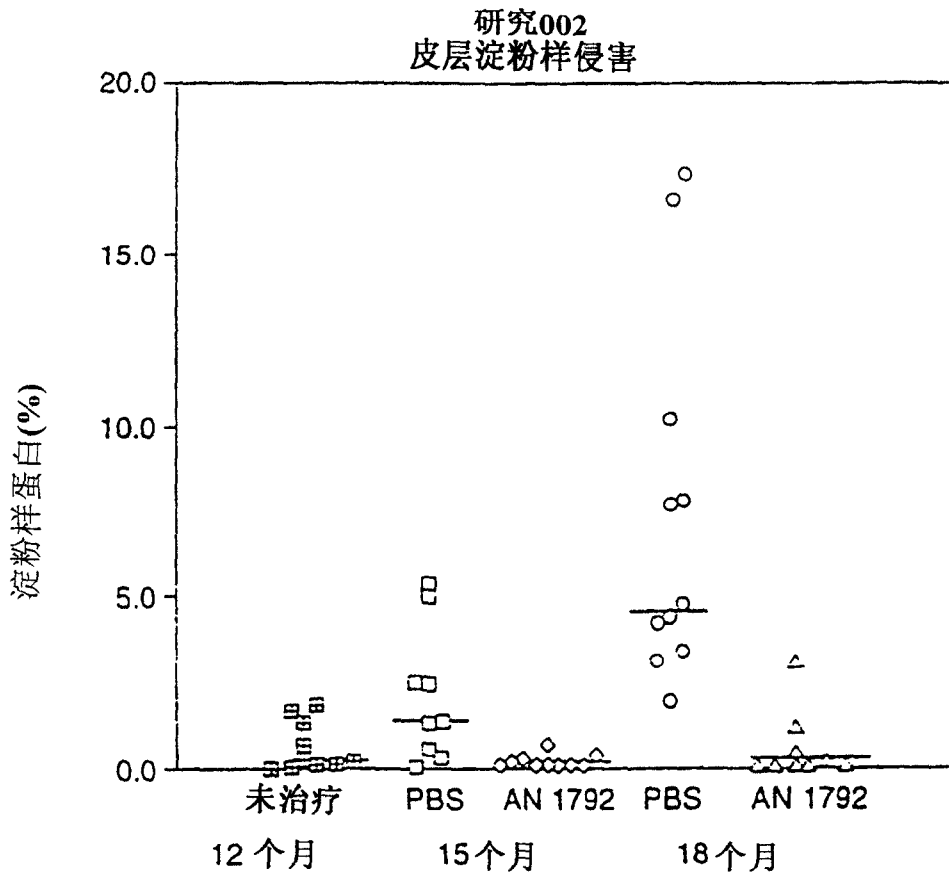


图7

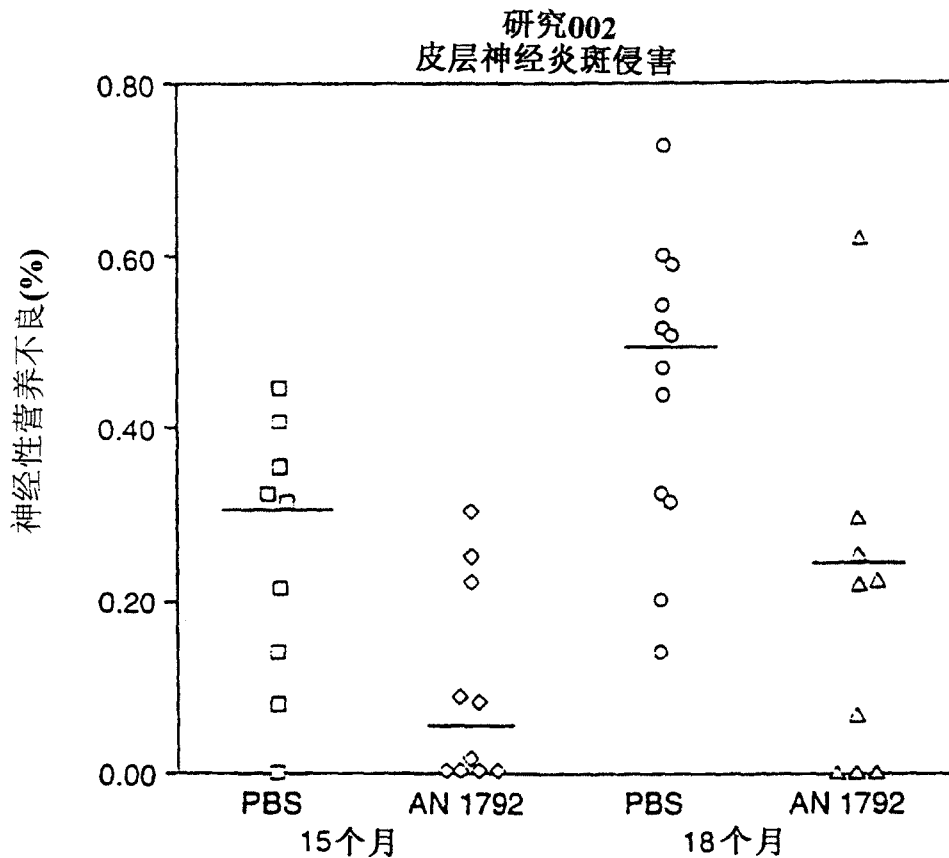


图8

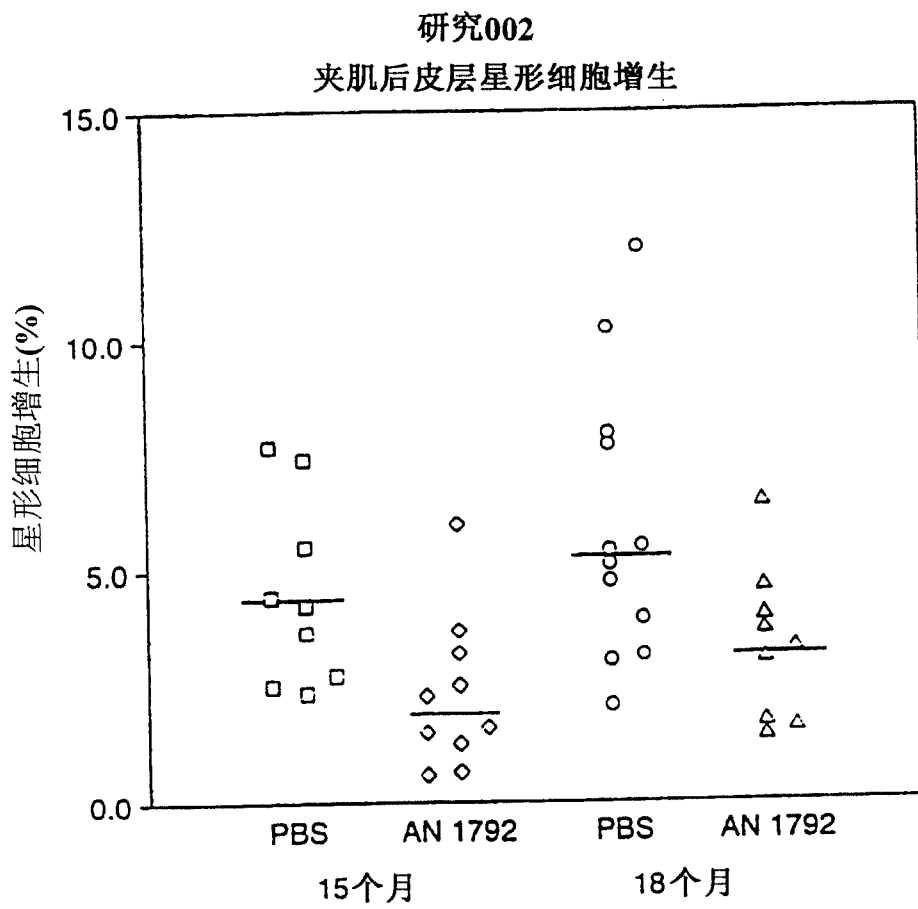


图9

研究002
夹肌后皮层星形细胞增生

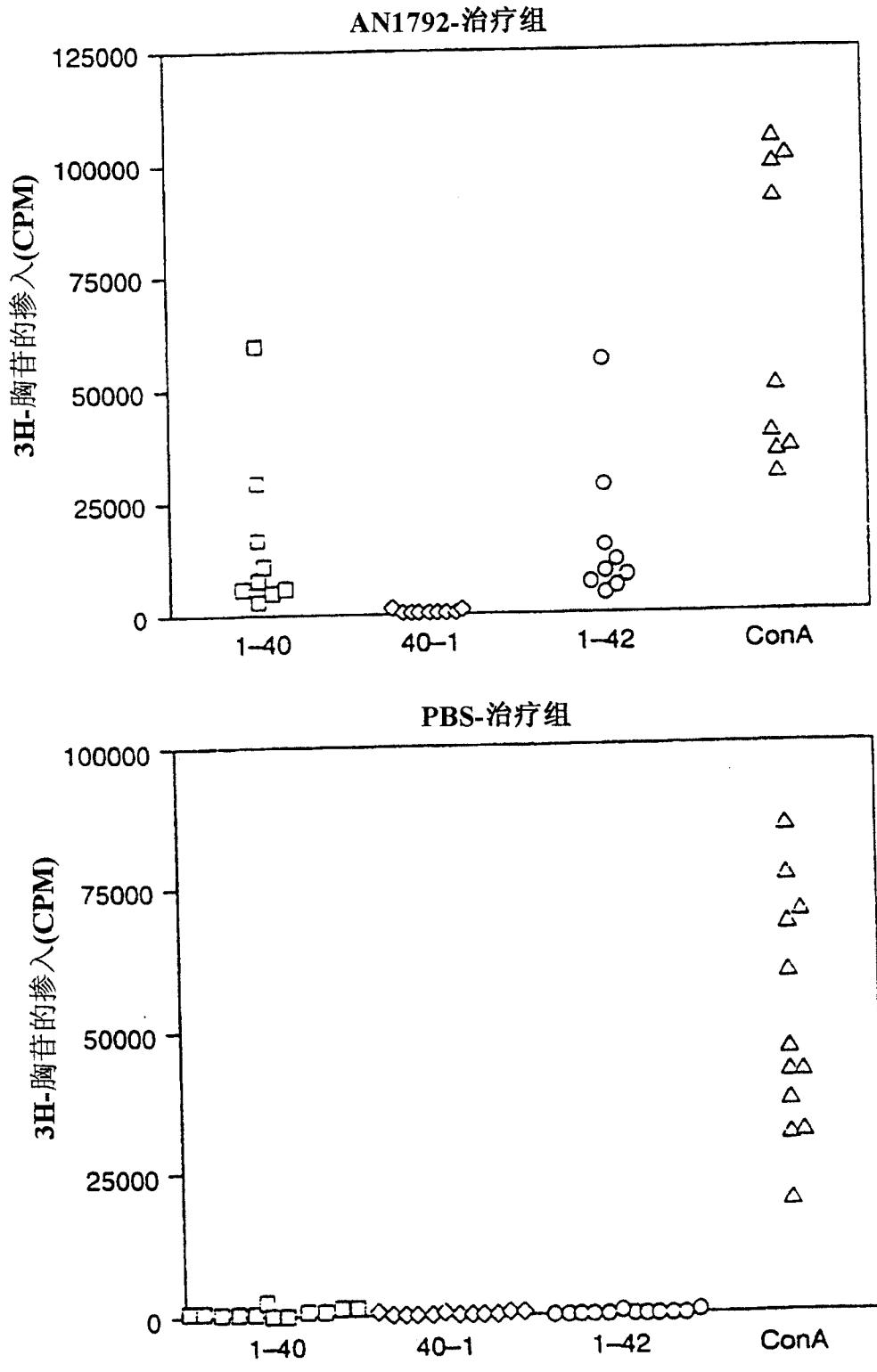


图10

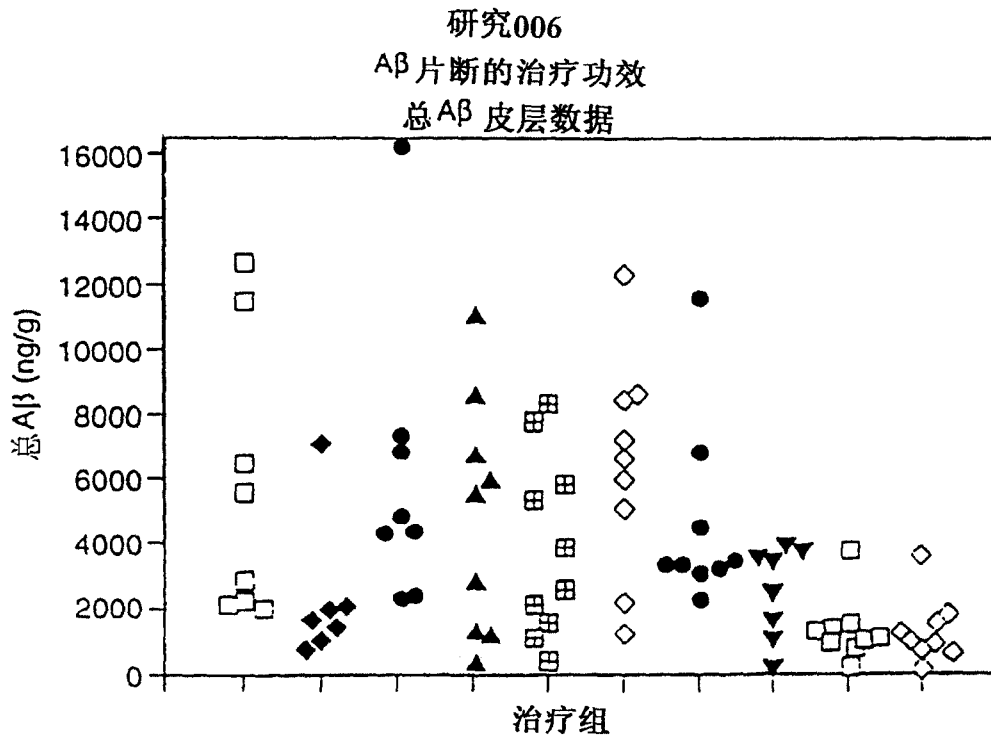


图11

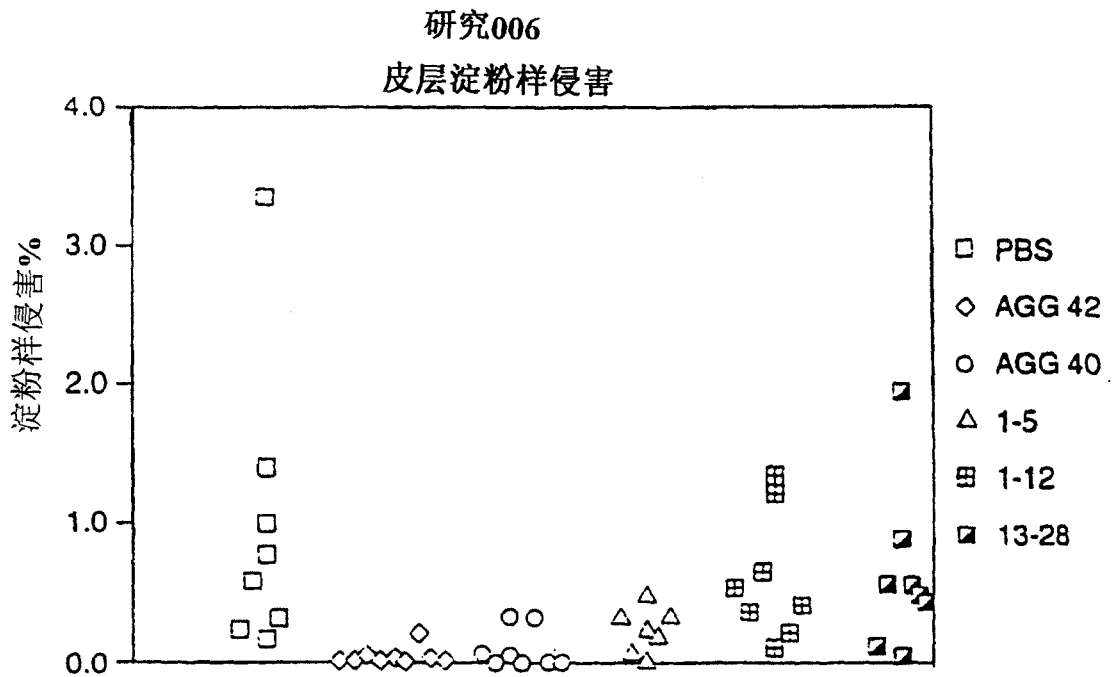


图12

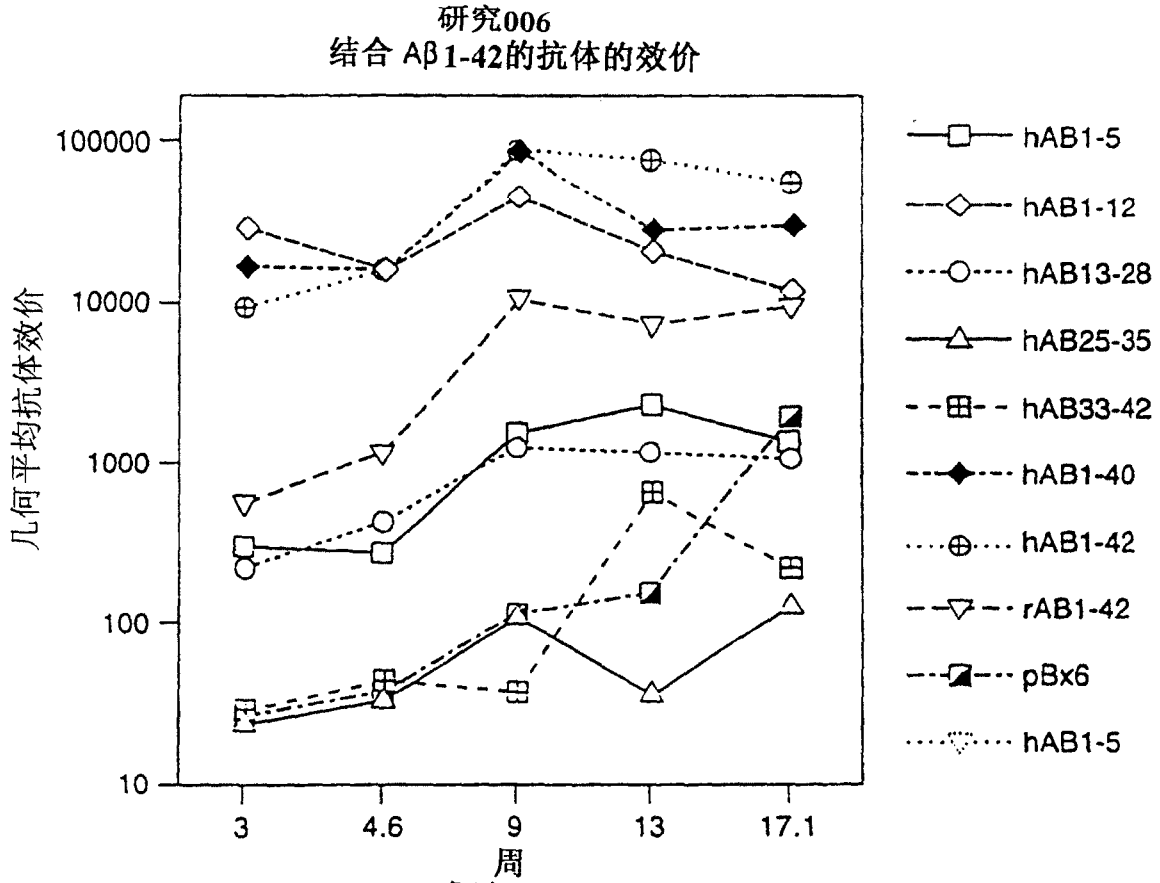


图13

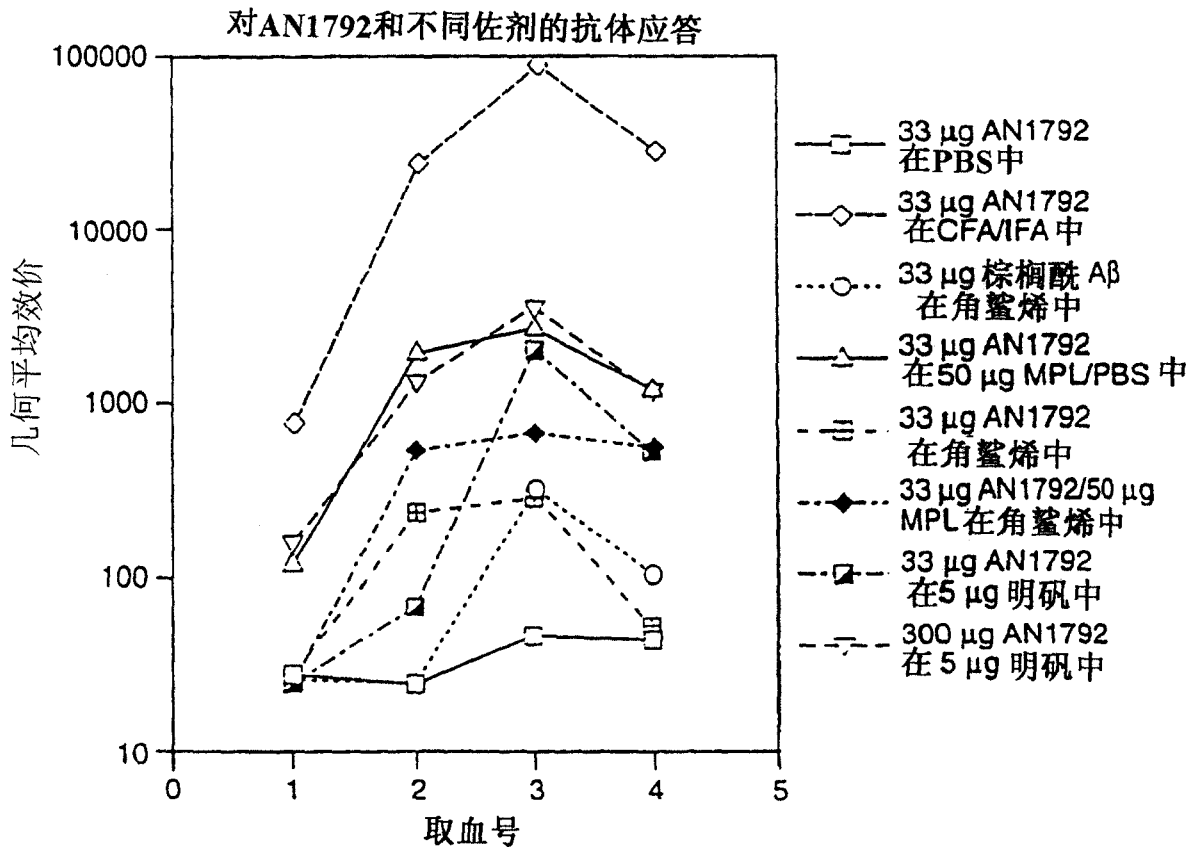


图14

皮层

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

图15A

皮层

2 mg 明矾 100 µg AN1528		50 µg MPL 100 µg AN1528	
660-083	295	643-105	385
661-084	3180	644-106	2640
662-085	2480	645-107	2403
663-086	3014	654-108	1741
664-087	5870	655-109	3053
665-088	5978	656-110	5990
693-089	1620	678-111	3360
694-090	35	679-112	1230
695-091	3400	704-114	2680
697-092	2630	705-115	78
698-093	983	706-116	1290
699-094	5327	729-117	3180
701-095	1862	730-118	1833
702-096	1849	731-119	4590
703-097	2239	736-120	1112
739-098	806	737-121	1653
740-099	5303	757-122	992
741-100	459	758-123	4692
800-103	154	808-124	785
801-104	852	809-125	244
		810-126	32
中值 p 值(M-W)	2051	中值 p 值(M-W)	1741
平均值 标准偏差 % CV p 值 (t 检验)	2407 1913 79 n=20	平均值 标准偏差 % CV p 值 (t 检验)	2140 1659 78 n=21

图15B

皮层

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

图15C

皮层

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

图15D

皮层

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

图15E