

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510126945.9

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 8 月 9 日

[11] 公开号 CN 1814287A

[22] 申请日 2000.5.26

[21] 申请号 200510126945.9

分案原申请号 00808117.4

[30] 优先权

[32] 1999.5.28 [33] US [31] 09/322,289

[71] 申请人 神经实验室有限公司

地址 百慕大群岛史密斯

[72] 发明人 戴尔·B·申克 弗雷德里克·巴德

尼克·J·瓦斯克斯

特德·耶德诺克

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 杨青 樊卫民

权利要求书 4 页 说明书 107 页 附图 18 页

[54] 发明名称

致淀粉样病的预防和治疗

[57] 摘要

本发明提供了治疗与患者脑部 A β 淀粉样沉积物相关之疾病的改进的治疗药物和方法。该方法包括给患者施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。优选的治疗药物包括 A β 的 N 末端片段及与其结合的抗体。

1. 一种多肽在制备预防或治疗患者脑中与 A β 淀粉样沉积物相关之疾病的药物中的应用，其中所述多肽带有 A β N 末端区域的至少 1-5
5 个残基的节段，A β 的第一个残基作为该多肽的 N 端残基，且该多肽不含有 A β 的 C 末端节段。

2. 权利要求 1 的应用，其中所述疾病的特征在于认知损伤。

10 3. 权利要求 1 的应用，其中所述疾病是阿尔茨海默氏病。

4. 权利要求 1 的应用，其中所述疾病是唐氏先天愚症。

5. 权利要求 1 的应用，其中所述疾病是轻度认知损伤。

15

6. 一种多肽在制备预防或治疗患者脑中与 A β 淀粉样沉积物相关之疾病的药物中的应用，其中所述多肽含有 A β 的 N 末端节段，该节段始于 A β 的 1-3 残基，止于 A β 的 7-11 残基处。

20 7. 权利要求 6 的应用，其中所述疾病的特征在于认知损伤。

8. 权利要求 6 的应用，其中所述疾病是阿尔茨海默氏病。

9. 权利要求 6 的应用，其中所述疾病是唐氏先天愚症。

25

10. 权利要求 6 的应用，其中所述疾病是轻度认知损伤。

11. 权利要求 1-10 中的任一权利要求所述的应用，其中所述 A β 的 N 末端节段的 C 端与一种异源多肽连接。

30

12. 权利要求 11 的应用，其中所述 N 末端节段由 DAEFRHD 这一氨基酸序列组成。

13. 权利要求 12 的应用，其中所述多肽含有
5 DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL 这一氨基酸序列。

14. 权利要求 6 的应用，其中所述 A β 的 N 末端节段的 N 端与一种异源多肽连接。

10 15. 权利要求 14 的应用，其中所述多肽含有 AKXVAAWTLKAAADAEFRHD 这一氨基酸序列。

16. 权利要求 6 的应用，其中所述 A β 的 N 末端节段在其 N 端和 C 端连有第一和第二异源多肽。

15

17. 权利要求 6 的应用，其中所述 A β 的 N 末端节段在其 N 端连有一个异源多肽，在其 C 端连有至少一个 N 末端节段的附加拷贝。

18. 权利要求 11-15 和 17 中的任一权利要求所述的应用，其中所述
20 异源多肽诱导针对该异源多肽的 T 细胞应答及抗 N 末端节段的 B 细胞应答。

19. 权利要求 1-15 和 18 中的任一权利要求所述的应用，其中所述多肽进一步含有至少一个 N 末端节段的附加拷贝。

25

20. 权利要求 6 的应用，其中所述多肽从 N 末端到 C 末端含有 A β 的 N 末端节段，该 N 末端节段的多个附加拷贝及异源的氨基酸节段。

21. 权利要求 1-20 中的任一权利要求所述的应用，其中所述 N
30 末端节段由 A β 1-7 组成。

22. 权利要求 1-11、14 和 16 中的任一权利要求所述的应用，其中所述 N 末端节段由 A β 3-7 组成。

5 23. 权利要求 1-10 中的任一权利要求所述的应用，其中所述多肽由 A β 1-7 组成。

24. 权利要求 1-10 中的任一权利要求所述的应用，其中所述多肽由 A β 3-7 组成。

10

25. 权利要求 1-20 中的任一权利要求所述的应用，其中所述多肽不含有 A β 43 C 端的至少 5 个氨基酸。

15 26. 权利要求 1-24 中的任一权利要求所述的应用，其中所述药物进一步包括增强对 N 末端节段的免疫应答的佐剂。

27. 权利要求 1-24 中的任一权利要求所述的应用，其中在施用所述药物前施用增强对 N 末端节段的免疫应答的佐剂。

20 28. 权利要求 1-24 中的任一权利要求所述的应用，其中在施用所述药物后施用增强对 N 末端节段的免疫应答的佐剂。

29. 权利要求 25 和 27-28 中的任一权利要求所述的应用，其中所述佐剂是明矾。

25

30. 权利要求 25 和 27-28 中的任一权利要求所述的应用，其中所述佐剂是 MPL。

30 31. 权利要求 25 和 27-28 中的任一权利要求所述的应用，其中所述佐剂是 QS-21。

32. 权利要求 25 和 27-28 中的任一权利要求所述的应用，其中所述佐剂是不完全弗氏佐剂。

5 33. 权利要求 1-25 和 27-32 中的任一权利要求所述的应用，其中所述药物剂量包括大于 10 微克量的多肽。

34. 一种药物组合物，含有权利要求 1-24 中的任一权利要求所定义的多肽和一种佐剂。

致淀粉样病的预防和治疗

5 相关申请的相互参考

本发明为申请于 1999 年 5 月 28 日的 USSN 09/322, 289 部分的延续, 在这里全文引用作为参考。

技术领域

10 本发明属于免疫学和医学领域。

发明背景

阿尔茨海默氏病(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, Nature, 373, 476-477 (1995); Games 等, Nature, 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的至少两种类型的损伤, 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。

25

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, Nature, 349, 704(1991)(缬氨酸⁷¹⁷变为异亮氨酸); Chartier Harlan 等, Nature, 353, 844(1991)(缬氨酸⁷¹⁷变为甘氨酸); Murrell

30

等, Sciences, 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, 是引起阿尔茨海默氏病的病因。

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, Nature, 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 的片段, 或 A β 内某些表位的抗体, 直接在体内治疗阿尔茨海默氏病或其它致淀粉样病。因此本发明满足了长期存在的对预防或改善阿尔茨海默氏病之神经病理学的治疗方案的需要。

本发明与申请于 1998 年 11 月 30 日的 WO99/27944, 申请于 1997 年 12 月 2 日的 USSN 60/067,740, 申请于 1998 年 4 月 7 日的 USSN 60/080,970 以及申请于 1998 年 11 月 30 日的 USSN 09/201,430 有关, 为各种目的在这里全文引用作为参考。

发明简述

一方面, 本发明提供了预防或治疗与患者脑部 A β 的淀粉样沉积物相关之疾病的方法。这类疾病包括阿尔茨海默氏病、唐氏先天愚症

及认知损伤。后者的产生可能有或没有致淀粉样疾病的其它特征。本发明的这些方法需要给患者施用有效剂量的可以特异性结合淀粉样沉积物成分的抗体。这些方法特别适用于人类患者阿尔茨海默氏病的预防与治疗。一些方法需要给药有效剂量的结合 A β 的抗体。一些方法需要给药有效剂量的特异性结合位于 A β 残基 1-10 内表位的抗体。在
5 一些方法中, 所述抗体特异性地结合位于 A β 残基 1-6 内的表位。在一些方法中, 所述抗体特异性地结合位于 A β 残基 1-5 内的表位。在一些方法中, 所述抗体特异性地结合位于 A β 残基 1-7 内的表位。在一些方法中, 所述抗体特异性地结合位于 A β 残基 3-7 内的表位。在
10 一些方法中, 所述抗体特异性地结合位于 A β 残基 1-3 内的表位。在一些方法中, 所述抗体特异性地结合位于 A β 残基 1-4 内的表位。在一些方法中, 所述抗体特异性地结合含有 A β 自由 N 末端的表位。在一些方法中, 所述抗体特异性地结合位于 A β 残基 1-10 的表位, 其中
15 这种 A β 的残基 1 和/或 7 是天冬氨酸。在一些方法中, 所述抗体特异性地结合 A β 肽而不结合全长的淀粉样前体蛋白质(APP)。在一些方法中, 所述抗体的同种型是人 IgG1。

20 在一些方法中, 所述抗体结合患者的淀粉样沉积物并诱导对淀粉样沉积物的清除应答。例如, 这种清除应答可以由 Fc 受体介导的吞噬实现。

25 这些方法可以用于无症状的患者和那些目前出现症状的患者。在这些方法中使用的抗体可以是人抗体、人源化、嵌合及非人抗体, 可以是单克隆或多克隆的抗体。一些方法中, 所述抗体从用 A β 肽免疫的人中制备, 该人可以是将由抗体治疗的患者。

30 一些方法中, 将所述抗体与一种药物载体以药物组合物的形式给药。一些方法中, 抗体以每千克体重 0.0001 到 100 毫克, 优选的至少 1 毫克的剂量给药。一些方法中, 抗体在一段长时期内以多剂量给药, 如至少六个月。一些方法中, 抗体以持续释放组合物给药。抗体可以

以例如腹膜内、口腔、皮下、颅内、肌内、局部、鼻内或静脉内给药。

5 一些方法中，抗体的给药通过给患者施用一种编码至少一个抗体链的多核苷酸完成。这种多核苷酸在患者体内表达产生抗体链。可选择的是，多核苷酸编码抗体的轻链和重链。这种多核苷酸在患者内表达产生轻链和重链。一些方法中，监控患者血液中被给药抗体的水平。

10 另一方面，本发明提供了预防或治疗与患者脑部 A β 的淀粉样沉积物相关之疾病的方法。例如，这些方法可用于治疗阿尔茨海默氏病、唐氏先天愚症或认知损伤。这些方法需要给药 A β 片段或其类似物以诱导对 A β 中某些表位的免疫应答。一些方法需要给患者施用有效剂量的包含至少含有 A β 第 1-5 残基的 N 末端节段的多肽，A β 的第一个残基作为多肽的 N 末端残基，且该多肽不含有 A β 的 C 末端节段。一些方法需要给患者施用有效剂量的含有 A β N 末端节段的多肽，这种节段起始于 A β 残基 1-3 且终止于 A β 残基 7-11。一些方法需要给患者施用有效剂量的可诱导对 A β N 末端节段之免疫应答的治疗药物，这种节段起始于 A β 残基 1-3 且终止于 A β 残基 7-11，对位于 A β 43 的 12-43 残基内的表位不产生免疫应答。

20 以上一些方法中，A β N 末端节段的 C 端连接有一个异源多肽。以上一些方法中，A β N 末端节段的 N 端连接有一个异源多肽。以上一些方法中，A β N 末端节段的 N 端和 C 端分别连接有第一和第二异源多肽。以上一些方法中，A β N 末端节段的 N 端连接有一个异源多肽，并且其 C 端连接有至少一个该 N 末端节段的附加拷贝。以上一些方法中，为异源多肽并因此产生 B 细胞对该 N 末端节段的应答。以上一些方法中，所述多肽进一步含有 N 末端节段的至少一个附加拷贝。以上一些方法中，所述多肽从 N 端到 C 端分别包括：A β N 末端节段、多个 A β N 末端节段的附加拷贝及异源氨基酸节段。以上一些方法中，A β N 末端节段含有 A β 1-7。以上一些方法中，A β N 末端节段含有 A β 3-7。

25

30

一些方法中，所述片段至少不含有 A β 43 内的 5 个 C 末端氨基酸。一些方法中，所述片段含有来自 A β 的多至 10 个连续的氨基酸。片段的典型的给药为每人每剂多于 10 微克。

5

一些方法中，所述片段与可以增强对 A β 肽免疫应答的佐剂共同给药。佐剂和片段可依次给药也可以组合物形式共同给药。佐剂可以是例如：氢氧化铝，磷酸铝，MPLTM，QS-21(StimulonTM)或不完全弗氏佐剂。

10

本发明进一步提供了药物组合物，其含有一种佐剂和 A β 片段，或如以上所述其它可诱导对 A β 相同表位产生免疫应答的治疗药物。本发明还提供了含有以上所述的任一种抗体与可药用载体的药物组合物。

15

另一方面，本发明提供了筛选在治疗与患者脑部 A β 沉积物相关疾病(如阿尔茨海默氏病)中有活性的抗体的方法。这些方法包括使抗体接触一种多肽，该多肽不含有 A β C 末端节段，但含有 A β N 末端节段的至少 5 个连续氨基酸，且这种连续的节段起始于 A β 1-3 之间的某个残基。籍此，可以确定是否这种抗体特异性地结合该多肽。特异性结合显示该抗体对于这类疾病的治疗有活性。

20

另一方面，本发明提供了筛选对清除与抗原相关的生物实体有活性的抗体的方法。这些方法包括将与抗原相关的生物实体、抗体及带有 Fc 受体的吞噬细胞混合于一培养介质中。然后监测培养介质中存留的与抗原相关的生物实体的含量。抗原相关的生物实体含量的减少暗示该抗体在清除抗原相关的生物实体中有活性。抗原可以是组织样品或以分离的形式存在。例如，抗原可以是来自阿尔茨海默氏病患者或表现阿尔茨海默氏病病理学现象的哺乳动物脑部的组织样品。在测试对清除抗原相关的生物实体有活性的抗体中，还可以使用其他组织

25

30

样品，包括：癌化组织样品、病毒感染的组织样品、含有炎症细胞、非恶性异常细胞增生的组织样品或含有异常胞外基质的组织样品。

5 另一方面，本发明提供了检测患者的淀粉样沉积物的方法。这些方法包括给患者施用可特异性结合位于 $A\beta$ 1-10 氨基酸内表位的抗体，并检测抗体在患者脑部的存在。一些方法中，抗体结合位于 $A\beta$ 4-10 残基内的表位。一些方法中，抗体标记有顺磁标记物，因此可以通过核磁共振 X 断层照像检测。

10 本发明进一步提供了适用于以上方法的诊断试剂盒。该试剂盒含有特异性结合含有 $A\beta$ 1-10 残基的表位的抗体。一些试剂盒带有体外诊断或监测阿尔茨海默氏病的抗体的使用说明标签。

附图说明

15 图 1：给转基因小鼠注射 $A\beta$ 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 $A\beta$ -特异性 m $A\beta$ 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。

20 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 $A\beta$ 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。

25 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。

30 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， $A\beta$ 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。

5 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。

10 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。

15

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。

20

图 15(A-E): 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。

图 16: A β 的多克隆抗体处理的小鼠的平均效价。

图 17: A β 的单克隆抗体 10D5 处理的小鼠的平均效价。

图 18: A β 的单克隆抗体 2F12 处理的小鼠的平均效价。

25

图 19: 表位成像: 限定于 N 末端应答。ELISA 测定 175 天的猕猴血清, 检测覆盖 AN1792 完整序列的一系列十聚体重叠肽。F10920M 号动物显示对覆盖作为免疫原的 AN1792 肽链 1-10 氨基酸的 DAEFRHDSGY 肽产生代表性的 N 末端限制性应答。

图 20: 表位成像: 非限定性 N 末端应答。ELISA 测定 175 天的猕猴血清, 检测覆盖 AN1792 完整序列的一系列十聚体重叠肽。

30

F10975M 号动物显示代表性的 N 末端非限制性应答，对覆盖 AN1792 肽的第 1-10 氨基酸的 DAEFRHDSGY 肽两个 N 末端和一个 C 末端产生了应答反应。

5 定义

术语“基本上相同”是指两个肽序列，当最优序列对比时，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(Adv. Appl. Math.2: 482(1981))的局部同源性运算法则；Needleman 和 Wunsch(J. Mol. Biol.,48: 443(1970))的同源性排列运算法则；Pearson 和 Lipman(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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，J. Mol. Biol., 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, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915(1989))。

为了将氨基酸替代分成保守或非保守替代，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，
5 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。保守替代涉及同类氨基酸之间的替代。非保守替代由一组中的一个成分改变成为
10 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，不含有所不期望的污染物。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
15 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”或“免疫球蛋白”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，包括独立的重链，轻链 Fab，Fab' F(ab')₂，Fab₂，以及 Fv。重组 DNA 技术或完整免疫球蛋白的酶法或化学法分离获得片段。术语“抗体”
25 也包括可以与其它蛋白质化学偶联，或者与其它蛋白质以融合蛋白质的形式表达的一个或多个免疫球蛋白链。术语“抗体”也包括双特异性抗体。双特异性抗体或双功能抗体是一种含有两个不同重、轻链对和两个不同结合位点的人工杂合抗体。双特异性抗体可以通过多种方法获得，包括杂交瘤融合或 Fab'片段的交联。参见，例如，Songsivilai
30 & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321(1990); Kostelny 等, J.

Immunol. 148, 1547-1553(1992)。

APP⁶⁹⁵、APP⁷⁵¹和 APP⁷⁷⁰分别指由人 APP 基因编码的 695、751、
5 和 770 个氨基酸残基长的多肽。参见 Kang 等, Nature, 325, 773(1987);
Ponte 等, Nature, 331, 525(1988); 和 Kitaguchi 等, Nature, 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。

10 “抗原”是与抗体特异性结合的实体。

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
15 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
20 biology)66 卷, Glenn E. Morris 编(1996)。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可以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 13-15 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-
依赖性增殖的体外分析来鉴定(如通过 ³H-胸苷掺入对表位应答的激活
25 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, J. Immunol., 156,
3901-1910)或者通过细胞因子分泌。

术语“免疫学”或“免疫”应答是在接受治疗的患者体内形成对
30 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。该应答可以是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抗体和 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”是在对哺乳动物给药(任选结合佐剂)后能够诱导对自己的免疫应答。

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，对抗原不产生免疫应答的化合物。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。

分析受测免疫球蛋白对参照抗体和普通抗原(如 A β)之间特异性结合的抑制, 以确定抗体间的竞争。业已知道多种竞争结合分析类型。例如, 直接或间接的固相放射性免疫分析(RIA)、直接或间接的固相酶免疫分析(EIA)、夹心竞争分析(参见 Stahli 等, *Methods In Enzymology*. 9:242-253(1983))、直接固相生物素-亲合素 EIA(参见 Kirkland 等, *J. Immunol.* 137:3614-3619(1986))、直接固相标记分析、直接固相标记夹心分析(参见 Harlow&Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual," 冷泉港出版社(1988))、I-125 标记的直接固相标记 RIA(参见 Morel 等, *Molec. Immunol.* 25(1):7-15(1988))、直接固相生物素-亲合素 EIA(参见 Cheung 等, *Virology* 176:546-552(1990))、直接标记 RIA(Moldenhauer 等, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82(1990))。典型地, 这些分析需要使用结合于固体表面的纯化抗原或带之的细胞、未标记的受测免疫球蛋白以及标记的参照免疫球蛋白。通过确定受测免疫球蛋白存在时结合于固体表面或细胞的标记可以量化竞争性抑制。通常受测免疫球蛋白过量存在。竞争分析法测定出的抗体(竞争性抗体)包括与参照抗体结合同一表位的抗体, 以及其结合的表位与参照抗体所结合的表位足够接近以至于产生空间上阻碍的抗体。通常, 当竞争性抗体过量存在, 至少可以抑制参照抗体与普通抗原间 50 或 75% 的特异性结合。

“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。

25

发明详述

I. 总则

一些致淀粉样疾病及症状的特征是患者脑部出现沉积的聚集成不溶团块的 A β 肽。该疾病包括阿尔茨海默氏病、唐氏先天愚症及认知损伤。后者是阿尔茨海默氏病和唐氏先天愚症的一个症状, 但也可以

30

没有这二者的其它症状。例如，轻度认知损伤或与衰老相关的记忆丧失出现于一些至今仍未患阿尔茨海默氏病或永远不会患该病的患者中。约定俗成地认为，轻度认知损伤可以通过微型智力状况测试的得分确认。这类疾病的特征是具有 β 折叠片层结构的 $A\beta$ 聚集及刚果红染色。预防或治疗阿尔茨海默氏病或其它致淀粉样疾病的基本方法是对患者的淀粉样沉积物成分产生免疫应答，这种方法在 WO99/27944 中作了描述(在此引入以作参考)。本发明重复并肯定了这种基本方法的有效性。然而，本发明主要在于改进的治疗药物和方法。这些改进部分基于这样的前提：本发明人定位了免疫应答所针对的 $A\beta$ 内的优选表位。 $A\beta$ 内优选表位的定位导致了效率增加、不良负效降低、和/或制备、配制和给药更加容易的治疗药物和方法。

II. 治疗药物

免疫应答可以是主动的，如给药免疫原以诱导与患者 $A\beta$ 反应的抗体，也可以是被动的，如给药与患者 $A\beta$ 直接结合的抗体。

1. 诱导主动免疫应答的药物

治疗药物诱导特异性针对 $A\beta$ 肽内某些表位的免疫应答。优选的药物是 $A\beta$ 肽本身和其节段。也可以使用诱导和/或与 $A\beta$ 肽优选表位的抗体有交叉反应的天然 $A\beta$ 肽的节段变体、类似物和嵌合体。

$A\beta$ ，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。 $A\beta$ 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 $A\beta$ 中。例如，在 APP 加工成 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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。

5 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 10000 倍。这种机制导致 A β 比其他抗原产生更强的免疫应答。

10 A β 肽有几种天然存在的形式。A β 的人中的形式为 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

15 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。

20 相对于目前方法使用的完整分子，A β 的免疫原性片段在几个方面有其优势。第一，由于 A β 内只有某些表位可以诱导对阿尔茨海默氏病的免疫应答，带有这些表位的片段比同样剂量完整 A β 在有用免疫原性表位上有更高的摩尔浓度。第二，A β 的某些免疫原片段在产生对淀粉样沉积物的免疫应答时，对 A β 来源的 APP 蛋白不产生显著的免疫应答。第三，由于其分子更小，A β 的片段比完整 A β 更容易操作。
25 第四，A β 的片段不象完整 A β 一样聚集，简化了药物组合物和其给药的准备。

30 一些 A β 的免疫原片段具有来源于天然肽的至少 2、3、5、6、10 或 20 个连续氨基酸的序列。一些免疫原片段具有来源于 A β 的不超过 10、9、8、7、5 或 3 个连续氨基酸的序列。来源于 A β N-端一半的片

段是优选的。优选的免疫原片段包括 A β 1-5、1-6、1-7、1-10、3-7、1-3 和 1-4。例如，A β 1-5 表示含有 A β 第 1-5 残基但缺乏 A β 其它残基的一个片段。特别优选起始于 A β 1-3 残基且终止于 A β 7-11 残基的片段。也可以使用 A β 1-12 残基，但优选性稍差。一些方法中，是除 A β 1-10 以外的 N-端片段。其它优选性稍差的片段包括 A β 13-28、17-28、1-28、25-35、35-40 和 35-42。这些片段在使用之前需要按照实施例的说明，筛选其清除或预防淀粉样沉积的活性。一些方法中使用的片段至少缺少一个，有时缺少 A β 天然形式中的至少 5 到 10 个 C 末端氨基酸。例如，缺少 A β 43 C 末端起的 5 个氨基酸的片段包括 A β N 末端最初的 38 个氨基酸。淀粉样斑的其它成分，如同型核蛋白及其表位片段也可以用于诱导免疫应答。

除非有另外的说明，A β 包括以上所述天然的人氨基酸序列及其类似物，包括等位基因的、种的和诱导的变异体。类似物通常与天然存在的肽在一个、两个或几个位置上不同，通常通过保守替代产生。类似物通常表现与天然肽至少有 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-末端氨基酸在一个、两个或几个位置上的修饰。例如，A β 的第 1 和/或 7 位的天然天冬氨酸残基可以被同型天冬氨酸所替代。非天然氨基酸的实例为 D-氨基酸、 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-甲基精氨酸及同型天冬氨酸。可以按照下面的描述，与未处理或安慰剂对照的对比，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 ，其片段和类似物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)。

5

治疗药物还包括更长的多肽, 其包括, 例如, 具有其它氨基酸的 A β 肽的活性片段。例如, 优选的药物包括含有 A β 的节段与异源氨基酸序列融合的融合蛋白, 可以诱导针对所述异源氨基酸序列的辅助 T 细胞应答, 及针对所述 A β 节段的 B 细胞应答。与如下所述的未处理或安慰剂对照对比, 可以在动物模型中筛选预防或治疗功效的所述多肽。A β 肽、类似物、活性片段或其它多肽可以以结合形式给药, 或者以多聚体形式给药, 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。

15 在进一步的改进中, 免疫原肽, 例如 A β 的片段可以以一种部分免疫组合物的病毒或细菌形式出现。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壳蛋白或细菌的跨膜蛋白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、委内瑞拉马脑炎病毒及其它甲病毒、水泡性口膜炎病毒、其它杆状病毒、痘苗病毒和鸡痘病毒。合适的细菌包括沙门氏菌属和志贺氏菌属。免疫原肽与 HBV 的 HBsAg 的融合尤其合适。治疗药物还包括不必具有与 A β 显著的氨基酸序列相似性, 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)。除了 A β 肽以外的药物可以诱导抗一个或多个以上

25 列出 A β 优选节段(如, 1-10, 1-7, 1-3 和 3-7)的免疫应答。优选地,

30

这些药物诱导的免疫应答特异性地针对这些节段之一，而不针对 A β 的其它节段。

5 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。

15 首先通过确定组合文库和其它化合物与已知的特异的 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 或其片段的多克隆血清或单克隆抗体进行最初的筛选。然后筛选结合 A β 内特定表位(如，1-10，1-7，1-3，1-4，1-5 和 3-7)的化合物。化合物的检测与抗体表位特异性成像的说明方法相同。然后进一步分析该筛选鉴定的化合物诱导 A β 或其中片段的抗体或反应性淋巴细胞的能力。例如，可以在用 A β 肽或其片段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 或其片段的反应性抗体。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，Games 等(同上)所述的带有 APP 717 突变的小鼠，和带有 APP 670/671 瑞典突变的小鼠，例如，McConlogue 等，US 25 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 类似物和包括 A β 片段的更长肽。

30

2. 诱导被动免疫应答的药物

本发明的治疗药物也包括特异性结合 A β 或淀粉样斑其它成分的抗体。该抗体可以是单克隆或多克隆的。这些抗体中的有些特异性结合聚集态的 A β 而不结合分离型的 A β 。有些特异性结合分离型而不结合聚集态。有些既结合聚集态又结合分离型。这些抗体中的一些结合 A β 的天然短型(即 A β 39、40 或 41), 而不结合 A β 的天然长型(即 A β 42 或 43)。一些抗体结合长型而不结合短型。一些抗体结合 A β 而不结合全长的淀粉样前体蛋白质。治疗中所用的抗体通常有完整的恒定区或至少足够的恒定区, 使其可与 Fc 受体相互作用。优选人同种型 IgG1, 因为其在人同种型中对吞噬细胞上的 FcRI 受体有最高的亲合力。也可以使用双特异性 Fab 片段, 其抗体的一个臂对 A β 有特异性, 另一个对 Fc 受体有特异性。一些抗体与 A β 的结合亲和力大于或等于 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10}M^{-1} 。

15

典型的, 多克隆抗血清含有结合 A β 全长上一些表位的抗体的混合物。然而, 多克隆抗血清可以特异性的针对 A β 的个别节段, 如 A β 1-10。单克隆抗体结合 A β 内的构象化或非构象化的特异性表位。利用实施例所述的转基因动物模型测试抗体的预防和治疗效果。优选的单克隆抗体结合位于 A β 1-10 残基内的表位(将天然 A β 第一个 N 末端残基设定为 1)。一些优选单克隆抗体结合 1-5 残基内的表位, 一些结合位于 5-10 残基内的表位。一些优选抗体结合氨基酸 1-3、1-4、1-5、1-6、1-7 或 3-7 内的表位。一些优选抗体结合起始于 A β 1-3 残基终止于 7-11 残基的表位。稍差的优选抗体包括那些结合 A β 10-15、15-20、25-30、10-20、20、30、或 10-25 残基内的表位。建议使用前在实施例所述的小鼠模型中对这些抗体进行活性筛选。例如, 已发现 10-18、16-24、18-21 和 33-42 残基内表位的抗体缺乏活性。一些方法中, 使用结合不同表位的多种单克隆抗体。抗体可以顺序或同时给药。除 A β 以外的淀粉样成分的抗体也可以应用。例如, 抗体可以是针对淀粉样相关蛋白同型核蛋白。

25

30

所述抗体结合特定残基(如 A β 1-5)内的表位,是指抗体特异性地结合具有特定残基(此例中是 A β 1-5)的多肽。这类抗体不一定与 A β 1-5 内的每个残基接触。也不是 A β 1-5 内的每个氨基酸替代或缺失一定会影响结合亲和力。抗体表位特异性的确定可以通过构成噬菌体展示文库,其不同的成员显示 A β 的不同序列。然后,筛选特异性地结合受测抗体的噬菌体展示文库成员。分离序列家族。典型的,这种家族含有一个普遍的核心序列,以及不同成员的不同长度侧翼序列。特异性结合抗体的最短核心序列表明该抗体结合的表位。用已知表位特异性的抗体进行竞争性分析,也可以测定抗体的表位特异性。例如,与结合 A β 的 3D6 抗体竞争的抗体与 3D6 有相同或相似的表位结合,即,位于 A β 1-5 残基内。同样的,与 10D5 抗体竞争的抗体与 10D5 有相同或相似的表位结合,即,位于 A β 3-6 残基内。对抗体表位特异性的筛选是治疗效果的有用预示。例如,确定为结合位于 A β 1-7 残基内表位的抗体可能有效预防和治疗阿尔茨海默氏病。

特异性结合 A β 优选节段,且不结合 A β 其它区域的单克隆或多克隆抗体,相对于结合 A β 其它区域的单克隆抗体或结合完整 A β 的多克隆抗血清而言,有许多优势。第一,同样剂量时,特异性结合 A β 优选节段的抗体含有更高的有效清除淀粉样斑的抗体量。第二,特异性结合优选节段的抗体可以诱导对淀粉样蛋白斑的清除应答,而不诱导对完整 APP 多肽的清除应答。因此降低了负作用的潜在可能。

i 免疫球蛋白的一般特征

已知基本的抗体结构单位包括亚单位的四聚体。每个四聚体包含两个相同的多肽链对,每对含有一个“轻”链(约 25kDa)和一个“重”链(约 50-70kDa)。每个链的氨基末端包括一个约 100-110 或更多氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。每个链的羧基末端包括一个主要负责效应物功能的恒定区。

轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，分别定义为抗体的同种型 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。轻链和重链中约 12 或更多氨基酸形成的“J”区连接可变区与恒定区，重链还包括 10 或更多氨基酸形成的“D”区。(一般参见 Fundamental Immunology (Paul, W.,编，第二版，Raven Press, N.Y., 1989 第七章)，为各种目的在此全文引入以作参考)。

每对轻链/重链的可变区形成抗体结合位点。因此，完整的抗体有两个结合位点。除了双功能或双特异性抗体，这两个结合位点是相同的。所有的链都显示同样的一般结构，三个高度可变区(也称为互补决定区或 CDRs)连接了相对保守的框架区。每对两个链的 CDRs 由框架区排列，使其可以结合特定表位。从 N 末端到 C 末端，轻链和重链的组成都包括 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 区。每区的氨基酸排列与以下文献一致：Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 和 1991)，或 Chothia&Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987); Chothia 等, Nature 342:878-883(1989)。

ii. 非人抗体的获得

非人单克隆抗体，如，鼠科动物、豚鼠、灵长类动物、兔或大鼠可以通过 A β 免疫动物制备。也可以使用含有 A β 、A β 的免疫原性片段或 A β 抗体的抗-独特型抗体的更长多肽链。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。选择的，如以下所述，免疫原可以融合载体蛋白或与其复合给药。选择的，免疫原可以结合佐剂给药。可以使用如以下所述的几种佐剂。免疫实验动物时，优选不完全弗氏佐剂和完全弗氏佐剂的依次使用。兔和豚鼠典型的用于获得多克隆抗体。小鼠典型的用于获得单克隆抗体。抗体结合 A β 的特异性筛选。选择的，进一步筛选结合 A β 特定区域的抗体。通过抗体与 A β 缺失突变群的结合，确定与抗体结合的缺

失突变体，完成后者的筛选。可以通过如 Western Blot 和 ELISA 的方法估计结合作用。显示特异性结合抗体的最小片段定位了该抗体的表位。另一方面，表位的特异性可以通过分析测试所用抗体的参照抗体对 A β 的竞争结合进行确定。如果受测抗体与参照抗体竞争，则它们结合相同表位，或其结合的表位足够接近，以至一个的结合干扰了另一个的结合。这些抗体的优选同种型是小鼠同种型 IgG2a 或其它种属的相当同种型。小鼠同种型 IgG2a 是人同种型 IgG1 的相当同种型。

iii. 嵌合和人源化抗体

嵌合和人源化抗体与提供构建该嵌合和人源化抗体的小鼠或其它非人抗体有同样或相似的结合特异性及亲和力。嵌合抗体典型地是通过基因工程，将属于不同种的免疫球蛋白基因片段构建成其轻链和重链。例如，小鼠单克隆抗体基因的可变区(V)可能结合人恒定区(C)节段，如 IgG1 和 IgG4。优选人同种型 IgG1。因此，典型的嵌合抗体为这样一个杂种蛋白，含有小鼠抗体 V 或抗原结合区和人抗体的 C 或效应区。

人源化抗体的可变区结构残基主要来自人抗体(称为受体抗体)，互补性确定区主要来自鼠抗体(称为供体免疫球蛋白)。参见 Queen 等，美国国家科学院科学进展 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)，86: 10029-10033(1989)和 WO 90/07861, US 5, 693, 762、US 5, 693, 761 和 US 5, 585, 089、US 5, 530, 101 及 Winter, US 5,225,539(为各种目的列入本文作为参考)。如果存在，恒定区主要或全部来自人免疫球蛋白。人可变区通常选自这种人抗体，其结构序列与该 CDRs 来源的小鼠可变区有高度的一致性。轻链和重链可变区结构残基可以来源于相同或不同的人抗体序列。人抗体序列可以是天然产生的人抗体序列，也可以是几种人抗体的一致序列。参见 Carter 等，WO92/22653。基于其对 CDR 构象和/或抗原结合的可能影响，选择某些可变区的结构氨基酸残基，进行替代。对这些可能影响的研究包括：建立模型，检验特定定位点氨基酸的特性，或对特定氨基酸的替代、突变结果进行经验性

观察。

5 例如，当某个氨基酸在鼠可变区结构残基和选择的人可变区结构残基之间不同，在以下情况，人结构氨基酸通常将被来自小鼠抗体中的相当的氨基酸替代。即，合理地预期该氨基酸：

- (1) 直接非共价地结合抗原，
- (2) 邻近一个 CDR 区，
- (3) 或者与一个 CDR 区相互作用(如位于 CDR 区约 6A)，或
- (4) 参与 VL-VH 界面。

10

其它被用来替代的，候选在人免疫球蛋白这一位点不寻常的人受体结构氨基酸。这些氨基酸可以被鼠供体抗体相应位置上的氨基酸，或更加典型的人免疫球蛋白相应位置上的氨基酸替代。其它被用来替代的，候选在人免疫球蛋白这一位点不寻常的人受体结构氨基酸。人源化免疫球蛋白可变区结构通常与人可变区结构序列或这些序列的一致序列至少有 85% 的序列一致性。

15

iv. 人抗体

人抗 A β 抗体由以下所述的多种技术提供。一些人抗体选自竞争性结合实验，或与特定的小鼠抗体(如实施例 XI 中说明的某个小鼠单克隆抗体)有同样的表位特异性。也可以通过仅用 A β 的一个片段作为免疫原，和/或通过筛选抗 A β 缺失突变体组的抗体，筛选具有特定表位特异性人抗体。优选的人抗体有同种型特异性人 IgG1。

20

25 (1)三杂交瘤 (trioma) 法

Oestberg 等描述了基本方法和本方法中作为范例的细胞融合组分，SPAZ-4, Hybridoma 2:361-367(1983); Oestberg, US 专利申请号 4,634,664; Engleman 等, US 专利申请号 4,634,666(为各种目的分别列入本文作为参考)。由于抗体产生细胞系来自三个细胞：两个人细胞和一个小鼠细胞，这种获得抗体表达细胞系的方法称为三杂交瘤法。最

30

初，一个小鼠骨髓瘤细胞与一个人 B 淋巴细胞融合，得到非抗体产生细胞的异种杂交细胞，如 Oestberg(同上)所述的 SPAZ-4 细胞系。接着，该异种细胞与免疫化的人 B 淋巴细胞融合，获得产生抗体的三杂交瘤细胞系。发现三杂交瘤比来自人细胞的普通杂交瘤细胞有更稳定的抗体表达。

免疫化的 B 淋巴细胞从人供体的血液、脾脏、淋巴结或骨髓中获得。如果期望抗体抗特定抗原或表位，优选使用该抗原或其表位免疫。免疫可以是体外或体内。体内免疫中，B 细胞典型的从免疫的人中获得，包括 A β 、其片段、带有 A β 或其片段的更大的多肽，或 A β 抗体的抗-独特型抗体。一些方法中，B 细胞来自最终被给药抗体治疗的同一患者。体外免疫中，典型的，B 淋巴细胞在添加有 10%人血浆的培养介质中(如 RPMI-1640，参见 Engleman，同上)，7-14 天的时期接触抗原。

利用众所周知的方法，免疫化的 B 淋巴细胞与异种杂交细胞(如 SPAZ-4)融合。例如，细胞用 40-50%聚乙二醇(分子量 1000-4000)在 37 度处理 5-10 分钟。从融合混合物中分离细胞，在选择性培养介质中扩增期望的杂交细胞(如 HAT 或 AH)。通过分析三杂交瘤培养介质中结合 A β 或其片段的能力，可以确定分泌具有所期望结合特异性的抗体的克隆。表达具有所期望特异性之人抗体的三杂交瘤细胞用限制稀释技术亚克隆，并在培养介质中体外培养。然后，测定获得的三杂交瘤细胞系结合 A β 或其片段的能力。

尽管三杂交瘤细胞遗传上稳定，但并不高量表达抗体。可以将来自三杂交瘤细胞的抗体基因克隆于一个或多个表达载体，载体转化标准哺乳动物、细菌或酵母细胞系，以增加表达水平。

(2)转基因的非人哺乳动物

人抗 A β 抗体也可以由转基因的非人哺乳动物表达，其具有编码

至少一个人免疫球蛋白基因座节段的转基因。通常，这种转基因哺乳动物的内源免疫球蛋白基因座功能上是无活性的。优选的，人免疫球蛋白基因座节段具有重链和轻链成分的未经重排的序列。内源免疫球蛋白基因的失活和外源免疫球蛋白基因的导入都可以通过定向同源重组，或 YAC 染色体的导入实现。由此获得的转基因哺乳动物能够功能性的重排免疫球蛋白成分的序列，大量表达人免疫球蛋白基因编码的各种同种型抗体，且不表达内源免疫球蛋白基因。具有这些性质的哺乳动物的获得与特性详细说明于：如 Lonberg 等，WO93/12227(1993);US5,877,397, US5,874,299, US5,814,318, US5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, Nature 148:1547-1553(1994), Nature Biotechnology 14,826(1996), Kucherlapati, WO 91/10741(1991)(为各种目的分别列入本文作为参考)。转基因小鼠特别合适。A β 或其片段免疫转基因的非人哺乳动物中可以获得抗 A β 抗体，如 Lonberg 或 Kucherlapati 所述(同上)。利用已知的 Kohler-Milstein 技术制备单克隆抗体，如，将来自这些哺乳动物的 B 细胞和合适杂交瘤细胞系融合。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。

(3)噬菌体展示法

更进一步获得人抗 A β 抗体的方法是筛选人 B 细胞 DNA 文库，一般的方案见 Huse 等，Sciences 246: 1275-1281(1989)。在三杂交瘤法中说明的，B 细胞可以从免疫的人中获得，包括 A β 、其片段、带有 A β 或片段的更大的多肽，或抗-独特型抗体。选择的，B 细胞可以从最终接受抗体治疗的患者中获得。选择结合 A β 或其片段的抗体。接着，克隆并扩增编码这些抗体(或结合片段)的序列。Huse 所述方案和噬菌体展示法一同使用将更加有效。参见，如，Dower 等,WO91/17271 和 McCafferty 等，WO92/01047, US 5,877,218, US 5,871,907, US 5,858,657, US 5,837,242, US 5,733,743, US 5,565,322(为各种目的分别

列入本文作为参考)。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。

5 在变化的噬菌体展示方法中,具有选择的鼠抗体结合特异性的人抗体被表达。参见 Winter WO 92/20791。这种方法中,选择的鼠抗体的轻链或重链的可变区被用作起始材料。例如,如果轻链的可变区被用作起始材料,构建的噬菌体文库其成员展示相同的轻链可变区(即,鼠起始材料)和不同的重链可变区。重链可变区来自重排的人重链可变区文库。选择对 A β 有强特异性结合(如,至少 10^8 , 优选的至少 $10^9 M^{-1}$)
10 的噬菌体。来自该噬菌体的人重链可变区接着作为构建另一个噬菌体文库的起始材料。该文库中,每个噬菌体展示相同的重链可变区(即,从第一个展示文库中鉴定的区域)和不同的轻链可变区。轻链可变区来自重排的人轻链可变区文库。又一次,选择对 A β 有强特异性结合的
15 噬菌体。这些噬菌体展示完全的人抗 A β 抗体的可变区。这些抗体与小鼠起始材料有同样或相似的表位特异性。

v 恒定区的选择

嵌合的、人源化的、或人抗体的轻链和重链可变区可以与至少部分的人恒定区相连。恒定区的选择部分依赖于是否期望的是抗体依赖性补体和/或细胞介导的毒性。例如,同种型 IgG1 和 IgG3 有补体活性,而同种型 IgG2 和 IgG4 没有补体活性。同种型的选择也影响抗体进入脑部的途径。优选人同种型 IgG1。轻链恒定区可以是 λ 或 κ 。抗体可以表达为含有两个轻链和重链的四聚体,可以是独立的轻链和重链,
20 Fab、Fab' F(ab)'₂ 和 Fv, 也可以作为轻链和重链通过间隔区域连接的单链抗体。
25

vi 重组抗体的表达

嵌合的、人源化的、或人抗体典型的可以通过重组表达获得。重组多核苷酸构建体典型的包括可操作的连接有表达调控序列的抗体链
30

编码序列，包括天然的或异源的启动子区。优选的，表达调控序列是能转化或转染真核宿主细胞的载体内的真核启动子系统。在该载体进入合适的宿主后，使宿主维持在适合该核苷酸序列高水平表达、以及适合交叉反应抗体的收集和纯化的环境中。

5

这些表达载体典型的可在宿主有机体中以附加体或宿主染色体 DNA 中的整合部分复制。一般的，表达载体带有选择标记(如青霉素抗性 or 潮霉素抗性)，使转化了所期望 DNA 的细胞得以检出。

10

E. coli 是一种特别适用于克隆本发明 DNA 序列的原核宿主。微生物，如酵母，也可用于表达。酿酒酵母是一种优选的酵母宿主，具有合适的带有表达调控序列的载体、复制起始位点、终止序列及其它希望的特点。典型的启动子包括 3 磷酸甘油酸激酶和其它糖酵解酶。可诱导的酵母启动子包括，来自乙醇脱氢酶，同型细胞色素 C 和其它参与麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

15

20

哺乳动物细胞是表达编码免疫球蛋白及其片段的核苷酸序列的优选宿主。参见，Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987)。本领域中发展了许多可以分泌完整异源蛋白的合适宿主细胞系，包括 CHO 细胞系、各种 COS 细胞系、HeLa 细胞、L 细胞和骨髓瘤细胞系。优选非人的细胞。这些细胞的表达载体包含表达调控序列，如复制起始位点、启动子和增强子 (Queen 等, Immunol. Rev.89:49(1986))，以及必须的加工信号位点，如核糖体结合位点、RNA 剪切位点、多聚腺苷酸位点和转录终止序列。优选的表达调控序列是来自内源基因、巨细胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒之类的启动子。参见 Co 等, J. Immunol. 148:1149(1992)。

25

30

替代的，抗体编码序列引入转基因中，导入转基因动物基因组并在转基因动物乳汁中的后续表达(参见，例如 US5, 741, 957, US5, 304, 489, US5, 849, 992)。合适的转基因包括可操作的连接哺乳

动物乳腺特异性基因(如酪蛋白或 β 乳球蛋白)的启动子和增强子的轻链和重链的编码序列。

5 根据宿主细胞类型, 含有目的 DNA 节段的载体可以众所周知的方式转入宿主细胞。例如, 氯化钙转染常用于原核细胞, 而磷酸钙处理、电穿孔、脂质转染、粒子轰击或病毒介导的转染可用于其它细胞宿主。转化哺乳动物细胞的其它方法包括使用 1, 5-二甲基-1, 5 二氮十一亚甲基聚甲溴化物(polybrene)、原生质融合, 脂质体, 电穿孔和显微注射(一般参见 Sambrook 等, 同上)。欲获得转基因动物, 转基因
10 可以注射入受精卵细胞, 或可以引入胚胎干细胞的基因组中, 以及转入去核卵细胞的核中。

表达后, 可以根据本领域标准的技术进行纯化, 技术包括: HPLC 纯化、柱层析, 及凝胶电泳之类(一般参见 Scopes, Protein
15 Purification(Springer-Verlag, NY, 1982))。

3. 载体蛋白质

一些诱导免疫应答的药物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
20 清白蛋白、钥孔蠔(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。其它载体包括结合多个 MHC 等位基因的 T 细胞表位, 如, 至少 75%的全部人 MHC 等位基因。这些载体有时在本领域被称为“通用 T 细胞表位”。通用 T 细胞表位的例子包括:

流感血凝素: HA₃₀₇₋₃₁₉ PKYVKQNTLKLAT

PADRE(常见残基由黑体表示): AKXVAAWTLKAAA

疟疾 CS: T3 表位 EKKIAKMEKASSVFNV

30 乙肝表面抗原: HbsAg₁₉₋₂₈FLLTRILTI

热激蛋白 65: hsp65₁₅₃₋₁₇₁DQSIGDLIAEAMDKVGNEG

卡介苗 QVHFQPLPPAVVKL

破伤风毒素: TT₈₃₀₋₈₄₄QYIKANSKFIGITEL

破伤风毒素: TT₉₄₇₋₉₆₇FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

5 HIV gp120T1: KQIINMWQEVGKAMYA

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。

10

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-硫基)-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)形成二硫键连接。这些试剂在其自身和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。

15

20

免疫原性的肽还可以与载体(即异源肽)以融合蛋白质的形式表达。可以将免疫原性的肽的氨基末端、羧基末端、或两端都连接载体。任选, 在融合蛋白质中可以多次重复出现免疫原性的肽。任选, 免疫原性的肽可以连接异源肽的多个拷贝, 例如, 在该肽的 N 和 C 末端。一些载体肽诱导对该载体肽的帮助 T 细胞应答。被诱导的帮助 T 细胞又诱导对该载体肽连接的免疫原性的肽的 B 细胞应答。

25

30

本发明的一些药物包括一种融合蛋白，其 A β N 末端片段的 C 端连有一载体肽。这些药物中，A β 片段的 N 末端残基构成融合蛋白的 N 末端残基。相应的，这种融合蛋白有效诱导那些结合需要 A β N 末端残基以自由形式存在的表位的抗体。本发明的一些药物包括多个其 C 端连接有一个或多个载体肽拷贝的 A β N 末端节段。并入融合蛋白的 A β N 末端片段有时开始于 A β 1-3，终止于 A β 7-11。A β 1-7、A β 1-3、1-4、1-5 和 3-7 是优选的 A β N 末端片段。一些融合蛋白含有不同 A β N 末端节段的串联重复。例如，融合蛋白可以包括 A β 1-7，跟随着 A β 1-3 和一个异源多肽。

10

一些融合蛋白中，A β N 末端节段在其 N 端融合了一个异源载体多肽。也可以使用与 A β N 末端节段的相同种类的 C 端融合物。一些融合蛋白含有异源多肽，其连接了 A β N 末端节段的 N 端，而该 A β 的 N 末端片段又连接以串联形式存在的一个或多个另外的 A β N 末端节段。

15

适用于本发明的融合蛋白的例子在以下有所表明。这些融合蛋白中的一些融合蛋白含有与破伤风毒素表位连接的 A β 节段，在 US 5, 196, 512, EP 378, 881 和 EP427, 347 中作了说明。一些融合蛋白含有与载体肽(说明于 US 5, 736, 142 中)连接的 A β 节段。一些异源肽是通用 T 细胞表位。一些方法中，给药的药物简单的是单一的融合蛋白，其中 A β 片段与一个异源多肽以线性构象连接。一些方法中，药物是代表结构为 2^X 的融合蛋白多聚体，其中 X 是 1-5 的整数形式。优选的，X 是 1、2 或 3，其中 2 是最优选的。当 X 为 2 时，这种多聚体具有以优选构象相连的四个融合蛋白，称为 MAP 4(参见 US 5, 229, 490)。A β 的表位是下画线的。

20

25

以下展示了 MAP 4 的构象，其中分支结构的产生是通过在 N 末端和赖氨酸的侧链氨基上起始肽链的合成。基于序列中和允许分支的赖氨酸的数量，产生的结构具有多个 N 末端。在此例中，带有赖氨酸

30

的核心上产生了四个相同的 N 末端。这种多重性极大的增强了关联 B 细胞的应答性。

5	肽	KGG	
	肽		KA
	肽		
		KGG	
10	肽		

AN90549(MAP4 构象中的 A β 1-7/破伤风毒素 830-844):
DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL

15 AN90550(MAP4 构象中的 A β 1-7/破伤风毒素 947-967):
DAEFRHDFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

AN90542(线性构象中的 A β 1-7/破伤风毒素 830-844 + 947-967):
DAEFRHDQYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

20 AN90576(MAP4 构象中的 A β 3-9/破伤风毒素 830-844):
EFRHDSGQYIKANSKFIGITEL

US 5,736,142 中所述肽 (均为线性构象):

25 AN90562(A β 1-7/ 肽) AKXVAAWTLKAAADAEFRHD
AN90543(A β 1-7x3/肽):DAEFRHDDAEFRHDDAEFRHDAKXVAAWTLKAAA

其它融合蛋白的例子(A β 的免疫原表位黑体)有:

AKXVAAWTLKAAA-**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD**
30 **DAEFRHD-** AKXVAAWTLKAAA
DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR
FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR
EFRHDSG-

ISQAVHAAHAEINEAGR

PKYVKQNTLKLAT-**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD**

DAEFRHD- PKYVKQNTLKLAT-**DAEFRHD**

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD- PKYVKQNTLKLAT

5 **DAEFRHD-DAEFRHD-** PKYVKQNTLKLAT

DAEFRHD- PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-

QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE- **DAEFRHD**

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD- QYIKANSKFIGITEL-

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

10 **DAEFRHD-** QYIKANSKFIGITEL-CFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

DAEFRHD- QYIKANSKFIGITEL- CFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-

DAEFRHD

位于具有两个分支的一个树脂上的 **DAEFRHD-** QYIKANSKFIGITEL
肽

15 Lys-Gly-Cys

肽

EQVTNVGGAISQAVHAAHAEINEAGR(MAP4 构象中的同型核
蛋白融合蛋白)

20 相同或相似的载体蛋白以及连接方法可用于获得被用来制备被动
免疫中抗 A β 抗体的免疫原。例如，连接载体的 A β 或片段可以给药实
验动物，以获得 A β 的单克隆抗体。

4. 编码治疗药物的核酸

25 对淀粉样沉积物的免疫应答也可以通过给药编码 A β 肽的节段、
或其片段，或其它肽免疫原、或用于被动免疫的抗体及其链组分的核
酸进行诱导。所述核酸可以是 DNA 或 RNA。编码免疫原的核酸节段
典型地与调控元件相连，例如启动子和增强子，这使 DNA 节段得以
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
30 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 主要中早期启动子和增强子适用于指导表达。相连的调控元

件和编码序列通常克隆到载体中。给药双链抗体时，其两条链可以克隆于同一个载体中，也可以分别克隆于不同载体中。

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
5 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
10 利基森林病毒的载体(参见例如，Dubensky 等，病毒学杂志，70，
508-519(1996)，委内瑞拉马脑炎病毒(参见 US5, 643, 576)和甲病毒
如水泡性口膜炎病毒(参见 WO96/34635)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-
15 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由 US 5208036, 5264618, 5279833 和 5283185
所描述。载体和编码免疫原的 DNA 还可以吸附或连接到颗粒性载体
20 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、
25 皮下、或头颅内灌输)或者局部给药(参见例如 US 5, 399, 346)。这种
载体进一步可以包含如丁哌卡因的辅助药物(US5, 593, 970)。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.
30 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)。

5 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. 筛选具有清除活性的抗体

10 本发明提供在淀粉样沉积物, 或其它抗原, 或相关生物实体的清除中具有活性的抗体的筛选方法, 这种清除活性是所期望的。筛选对淀粉样沉积物的清除活性, 来自阿尔茨海默氏病患者或具有阿尔茨海默氏病病理现象之动物的脑部组织样品与带有 Fc 受体的吞噬细胞(如小胶质细胞), 以及受测抗体在体外培养介质中接触。吞噬细胞可以是
15 初级培养物或如 BV-2、C8-B4、THP-1 之类的细胞系。一些方法中, 这些成分被集合于显微载玻片上以便显微监控。一些方法中, 多个反应在微量滴定板的孔中平行进行。这种方式中, 独立的微型显微载玻片可以放置在独立的小孔中, 或者, 在可以使用非显微检测的方式, 如 A β 的 ELISA 检测。优选的, 对体外反应混合物中淀粉样沉积物的
20 数量进行量化, 从反应前的基线水平开始, 反应进行中的一个或多个测试值。抗原可以通过染色检测, 如荧光标记的抗 A β 或其它淀粉样沉积物的抗体。用于染色的抗体可以与受测清除活性的抗体相同, 也可以不同。如果在淀粉样沉积的反应中出现相对于基线的降低, 则认为受测抗体具有清除活性。这些抗体可能可以用于预防或治疗阿尔茨
25 海默氏病和其它致淀粉样病。

类似的方法可以用于筛选在清除其它类型生物实体中具有活性的抗体。该分析可以用于对几乎任何类型生物实体的清除活性的检测。典型的, 生物实体在人和动物的疾病中有其作用。生物实体可以组织
30 样品或独立的形式提供。如果是组织样品, 优选非固定的组织样品,

使其成分易于接触，以及可以避免在固定状况时对成分构象的干扰。在本分析中可用于测试的组织样品包括癌组织、癌变前组织、良性生长的组织如瘤或痣、感染了病原微生物的组织、炎症细胞所浸润的组织、含有细胞间病理基质(如纤维蛋白性心包炎)的组织、带有异常抗原的组织，以及芽痕组织。可以使用的已分离的生物实体包括 $A\beta$ 、病毒抗原或病毒、蛋白聚糖、其它病原微生物的抗原、肿瘤抗原，以及粘连分子。这些抗原可以从天然来源、重组表达或化学合成方法，或其它方式获得。该组织样品或已分离的生物实体与带有 Fc 受体的吞噬细胞(如小胶质细胞和单核吞噬细胞)，以及受测抗体在培养介质中接触。该抗体可能针对受测生物实体或与之相关的抗原。在后一种情况，目的在于测试是否带有该抗原的生物实体间接地被吞噬。通常的，尽管并不一定，抗体与生物实体(有时是相关抗原)的接触发生在吞噬细胞加入之前。然后监测残存于培养介质中的生物实体和/或相关抗原(如果存在)的浓度。培养介质中的生物实体或相关抗原浓度或数量的减少显示，在吞噬细胞参与时，该抗体对于该生物实体和/或相关抗原具有清除活性。

IV. 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，而无需评估受试患者的危险。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 位的突变(分别被称为 Hardy 突变和瑞典突变(Swedish mutation)) (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 ADRDA 标准诊断患阿尔茨海默氏病的个体。

- 5 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。可以通过分析抗体、或激活的 T-细胞或 B-细胞对超时治疗药物(例如 A β 肽)的应答，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
10 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。

V. 治疗方案

- 15 在预防应用中，对易感阿尔茨海默氏病、或相反存在患阿尔茨海默氏病危险的患者给药足以消除或降低危险、减轻重症、或延缓疾病发作剂量的药物组合物或药物，症状包括疾病的生化、组织学和/或行为症状，疾病发展中出现的中间病理现象及其复杂性。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症状(生化、组织学和/或行为症状，包括疾病发展中出现的中间病理现象及其复杂性)剂量的组合物或药物。一些方法中，药物的给药减少或
20 消除了尚未表现典型阿尔茨海默氏病病理现象的患者的认知损伤。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。

- 25 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，但也可以治疗包括转基因哺乳动物在内的非人哺乳动物。需要测定
30 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 $10\text{、}20\text{、}50\text{、}100\mu\text{g}$ 。免疫原的量也依赖于免疫原内免疫原表位在整体免疫原总量中的比率。典型的，微克的免疫原使用 10^{-3} 到 10^{-5} 微摩尔的免疫原表位。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。例如，剂量可能为 1mg/kg 受体体重或 10 mg/kg 受体体重或在 $1\text{-}10\text{mg/kg}$ 受体体重范围之内。典型的治疗方案包括每两周、或每个月，或每 3-6 个月给药。一些方法中，同时给药两个或多个具有不同结合特异性的抗体，这种情况每种抗体的给药剂量降到说明的范围内。抗体通常多次给药。每次的间隔可以是以周、月、年记。间隔也可以是不定期的，如通过测试患者 $\text{A}\beta$ 的抗体血液水平所示。一些方法中，剂量被调整到使血浆中抗体浓度为 $1\text{-}1000\mu\text{g/ml}$ ，一些方法中为 $25\text{-}300\mu\text{g/ml}$ 。替代的，抗体可以持续释放剂量给药，这种情况下，不能频繁给药。根据患者的抗体半衰期改变剂量和频率。一般，人抗体有最长的半衰期，接下来依次为人源化抗体、嵌合抗体、和非人抗体。给药剂量和频率也依赖是否治疗性或预防性目的。在预防性应用中，在一段长的时期内，以相对不频繁的间隔，给药相对较低的剂量。一些患者在其余生中继续受到治疗。在治疗性应用中，要求以相对较短的间隔给药相对较高的剂量，直到疾病的发展得以减轻或终止，更优选的，直到该患者的疾病症状有部分或完全的改善。在此之后，可以给药患者一种预防性的方案。

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 μ g 到 10 mg, 或 30-300 μ gDNA 每位患者。注射感染性病毒载体的剂量为每剂量 10-100 个毒粒或更多毒粒。

5

诱导免疫应答的药物可以经非肠道、局部、静脉、口腔、皮下、关节内、颅内、腹膜内、鼻内或肌内方式给药, 用于预防和/或治疗处理。最典型的免疫原药物给药途径为皮下给药, 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。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, 例如颅内注射。抗体给药优选静脉输注的肌内注射。一些方法中, 特异性的治疗抗体直接注射于颅内。一些方法中, 抗体以一种缓释组合

10 物或装置(如 MedipadTM 装置)给药。

15

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。

20

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。优选的佐剂包括氢氧化铝和磷酸铝、3 脱-氧-酰化单磷酸脂类 A(MPLTM)(参见 GB 2220211RIBI ImmunoChem Reseach Inc., Hamilton, Montana, 现为 Corixa 的一部分)。StimulonTMQS21 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)(Aguila Bio Pharmaleaticals, Framingham, MA)。

25 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

30

(例如单磷酰脂类 A)组合(参见 Stoute 等, N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997))。另一种佐剂是 CpG(WO98/40100)。或者, 可以将 A β 与佐剂偶联。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, 单磷酰脂 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, Framingham, MA)或者由它们产生的颗粒例如 ISCOMs(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免疫原制剂的稳定性、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。

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、多糖如聚氨基葡糖、聚乳酸、聚羟基乙酸和共聚物(例如树胶功能化琼脂糖凝胶 TM、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)。

5 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。抗体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。一个范例的组合物包括 5mg/ml 的单克隆抗体存在于水相缓冲液(含有 10 50mM L-组氨酸, 150mM NaCl, 用 HCl 调整 pH 到 6.0)中。

15 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, 1527 (1990)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 20 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。

25 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% 30 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
5 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(transfersome)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-
10 15(1998))。

VI. 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
15 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。本发明可以用于监测主动免疫(例如，对给药免疫原应答表达的抗
体)和被动免疫(例如，检测给药抗体的水平)。

I. 主动免疫

20 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，
25 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。

30 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

5 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(例如高于平均值的一个标准差)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。

10 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。

15 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, 20 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。

30 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)。一些方法中，免疫应答的确定是通过上述第三部分中的清除分析。这些方法中，来自被测试患者的组织样品与淀粉样沉积物(例如，来自 PDAPP 鼠)及带有 Fc 受体的吞噬细胞接触。检测随之而来的淀粉样沉积物的清除。

5 清除应答的存在和程度显示了在被测患者组织样品中有效清除 A β 的抗体的存在和水平。

2. 被动免疫

一般的，监测被动免疫的方法与上述的监测主动免疫的方法相似。然而，被动免疫后的抗体浓度先是迅速上升到峰值，接着指数性降低。如果没有另外的给药，根据给药抗体半衰期的不同，将在几天到几月的时期内降低至处理前的水平。例如，人抗体半衰期为 20 天。

10

一些方法中，在给药前对患者的 A β 抗体进行基线量测，在此之后的第二次量测是为确定抗体的峰值，间隔进行一次或更多次的量测，以监测抗体的下降。抗体降低到基线或预先确定的峰值的更低基线(如 50%、25%、或 10%)，给药另一剂量的抗体。一些方法中，峰值或其后测定的更低背景与预先确定的参照相比较，以构成对其他患者产生有益的预防性或治疗性处理方案。如果测得的抗体水平明显小于参照水平(例如，小于治疗受益的患者群中参照值平均数减去一个标准差)，表明需要施用额外剂量的抗体。

15

20

3. 诊断试剂盒

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 抗体的试剂。试剂盒还包括一种标记物。

25

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，例如结合到微滴定平皿的孔中。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 抗体之间相关性的图或其他

30

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。

5 本发明还提供了进行体内成像的诊断试剂盒。该试剂盒典型地含有结合 $A\beta$ 表位的抗体，优选是 1-10 残基。优选的，试剂盒含有标记抗体或二级标记药物。优选的，试剂盒含有提供进行体内成像分析的说明的标签。

10 VII. 体内成像

 本发明提供了对患者淀粉样沉积物的体内成像方法。这种方法可用于诊断或确证阿尔茨海默氏病，或对其的怀疑。例如，该方法可用于出现痴呆症状的患者。如果患者有异常的淀粉样沉积物，则该患者可能患有阿尔茨海默氏病。该方法也可用于无症状的患者。异常淀粉
15 样沉积物的存在表明将来易发展为有症状疾病。该方法也可用于监测疾病的发展和/或早先被诊断为阿尔茨海默氏病患者对治疗的应答。

 该方法给药一种结合患者 $A\beta$ 的药物，如抗体，并在其结合后检测该药物。优选的抗体结合患者的 $A\beta$ 沉积物，但不结合全长的 APP
20 多肽。特别优选结合于 $A\beta$ 氨基酸 1-10 内表位的抗体。一些方法中，抗体结合于 $A\beta$ 氨基酸 7-10 内的表位。这类抗体典型地结合且不诱导显著的清除应答。其它方法中，抗体结合于 $A\beta$ 氨基酸 1-7 内的表位。这类抗体典型地结合并诱导对 $A\beta$ 的清除应答。然而，利用缺少一个全长恒定区的抗体片段，如 Fab，可以避免这种清除应答。一些方法
25 中，同样的抗体可以作为治疗和诊断药物。一般的，结合 $A\beta$ 10 的 C 末端表位的抗体没有与结合 1-10 内表位的抗体相似的强信号。可能因为淀粉样沉积物内的 C 末端表位是难于接触的。相应的，这种抗体较不被优选。

30 可以通过静脉注射患者身体，或颅内注射(或滴入头骨的小孔)脑

部，，给药诊断性药物。药物的剂量应处于治疗方法中剂量范围内。典型的，药物是标记的。尽管在一些方法中，与 $A\beta$ 亲和的一级药物未标记，而使用结合一级药物的标记二级药物，标记的选择基于检测方式。例如，荧光标记适用于光学检测。顺磁标记适用于无须手术参与的 X 射线断层检测。活性放射标记也可以用 PET 或 SPECT 检测。

比较标记位点与相应基线值的数目、大小和/或强度以进行诊断。基线值代表未感病群体的平均水平。基线值也代表同一患者先前确定的水平。例如，基线值可以在患者治疗开始前确定，而之后的数值可与基线值比较。相对于基线的数值的下降是治疗阳性的信号。

实施例

I. 抗 AD 的 $A\beta$ 的预防功效

这些实施例描述了对存在 717 位突变的 APP($APP_{717V\rightarrow F}$)过表达的转基因小鼠给药 $A\beta_{42}$ 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 $A\beta$ 。到十五个月，它们表现出的 $A\beta$ 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 $A\beta_{42}$ (聚集 $A\beta_{42}$)或磷酸盐缓冲盐水。选择聚集 $A\beta_{42}$ 是因为它能够诱导 $A\beta$ 多表位的抗体。

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 $A\beta_{42}$ (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 只小鼠注射来自血清淀粉样蛋白质(SAP)序列的肽。

2. 免疫原的制备

聚集态 $A\beta_{42}$ 的制备：将两毫克 $A\beta_{42}$ (美国肽公司，lot k-42-12)

溶解于 0.9 ml 水，加入 0.1 ml 10×PBS 至 1 ml。将其旋涡振荡，37℃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℃储藏，直到下次注射。

5 3.注射剂的制备

每次注射时，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。

15 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

20 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 1:100000。

30 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。

5 在聚集态 A β 1-42 组中九只小鼠中的七只脑中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 β 1-42 注射组的一只小鼠表现淀粉样侵害的明显降低，只限于海马。在另一只 A β 1-42 处理小鼠体内鉴定了隔离斑。

15 海马中淀粉样侵害的定量图像分析证明，A β 42 (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 β 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 β 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。

25 不含 A β 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。

30 A β 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 β 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 β 沉积物。SAP、PBS 和未处理对照中，GFAP-阳性星形胶质细胞与 A β 斑有关。在斑-阴性 A β 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 β 1-42 和 PBS 注射小鼠子集的证据表明 A β 1-42 注射小鼠中缺乏斑-相关性 MHC II 免疫反应性，与 A β -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 mAb 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 β 诱导的炎性反应的缺乏一致。

C. 结论

用 A β 1-42 注射的小鼠脑中，A β 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 β 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 β 1-42 对于预防人 A β 沉积或从脑组织中清除人 A β ，以及消除随后神经元和炎性变性性改变高度有效。因此，A β 肽的给药

在预防 AD 方面具有治疗优点。

II. 剂量反应研究

5 用在 CFA/IFA 中配制的 300、100、33、11、3.7、1.2、0.4、或 0.13 μ g A β 对几组五周龄、雌性瑞士 Webster 小鼠腹膜内给药免疫(每组 N=6)。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(第二次剂量之后开始)对动物取血,测定抗体效价。用 11、33、或 300 μ g 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月,以监测一
10 定免疫原制剂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 μ g 剂量应答逐步衰减,最低两个剂量没有应
15 答。11-300 μ g 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, GMTs 升高了 5-25 倍。甚至 0.4 μ g 抗原的受体也检测到较低的抗体应
20 答。1.2 μ g 和 3.7 μ g 组效价相近, GMTs 约为 1000,最高四个剂量集中, GMTs 约为 25000,除了 33 μ g 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 μ g 受体没有检测出抗体到 11 μ g 受体 GMT 为 36000 范围内的 0.14 μ g 到 11 μ g 较低抗原剂量组内表现出了清楚的剂量应答。此外,11 到 300 μ g 的四个最高剂量组
25 效价集中。因此,两次免疫之后,对于从 0.4 到 300 μ g 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 μ g 组中的效价比免疫之后 5 天取血
30 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 μ g 组中, 在该时间点, 观察到较为平缓的增加 (50%)。在 300 μ g 剂量组中, 最后一个剂量之后两个月, GMTs 锐减约 70%。再一个月后, 衰减不太剧烈为 45%(100 μ g), 对于 33 和 11 μ g 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。

10

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。

15

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(单克隆抗体 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。

30

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

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。

5 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。

15

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。

20

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。

25

B. 结果

30 1. AN1792 对于治疗淀粉样侵害的效果

通过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 A β -标记切片的共聚焦显微分析表明淀粉样斑物质存在于许多单核细胞中。

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、由细胞介导的清除。

3. AN1792 对 Aβ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 Aβ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 Aβ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 Aβ(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 Aβ(5200 ng/g)显著降低($p=0.0001$), 比应该出现的 Aβ水平降低了 72%。当比较 Aβ42 的皮质水平时得到类似的结果, 即 AN1792 处理组含有很少的 Aβ42, 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 Aβ水平的中值(ng/g)

月 龄	未处理			PBS			AN1792		
	Aβ	Aβ42	(n)	总 Aβ	Aβ42	(n)	Aβ	Aβ42	(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 Aβ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 Aβ, 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 Aβ42

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)。

5 表 3：海马中 Aβ的中值(ng/g)

月龄	未治疗			PBS			AN1792		
	总 Aβ	Aβ42	(n)	总 Aβ	Aβ42	(n)	Aβ	Aβ42	(n)
12	15,500	11,100	(10)	40,100	35,70	(9)	24,50	22,100	(10)
15	51,500	44,400	(10)						
18	80,800	64,200	(10)						

*p=0.0105

**p=0.0022

(c)小脑中的水平

10 在 12 个月未处理的 PDAPP 小鼠中，小脑中总 Aβ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 Aβ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 Aβ为 22 ng/g，18 个月的总 Aβ(25 ng/g)显著低于(p=0.002)相应的 PBS 组(表 4)。

15

表 4：小脑中 Aβ的中值(ng/g)

月龄	未治疗		PBS		AN1792	
	总 Aβ	(n)	总 Aβ	(n)	总 Aβ	(n)
12	15.6	(10)	20.8	(9)	21.7	(10)
15	27.7	(10)				
18	35.0	(10)				

*p=0.0018

4. AN1792 治疗对 APP 水平的影响

20 APP- α 和全长 APP 分子均含有全部或部分 Aβ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 μ g 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。

5 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变。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。

10 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

20 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)。

25

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

30

给药在治疗 AD 方面具有治疗优点。

IV. Aβ片段的筛选

5 用 9 种不同的 APP 区域和 Aβ免疫 100 只 9-11 月龄的 PDAPP 小鼠，以确定哪些表位传送有效应答。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 Aβ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 Aβ1-40、和聚集态人 Aβ25-35、以及聚集态啮齿动物 Aβ42。聚集态 Aβ42 和 PBS 分别用作正负对照。每个治疗组安排 10
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、Aβ水平、和毒理学。

A. 材料和方法

1. 免疫原的制备

15 偶联 Aβ肽的制备：通过利用交联试剂磺基-EMCS 加到 Aβ肽上的人工半胱氨酸偶联制备四种人 Aβ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 Aβ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。Aβ13-28 肽衍生物在指出的羧基端半胱氨酸之前还具有两个
20 个甘氨酸残基。

	Aβ1-12 肽	NH ₂ -DAEFRHDSGYEV <u>C</u> COOH
	Aβ1-5 肽	NH ₂ -DAEFR <u>C</u> COOH
	Aβ33-42 肽	NH ₂ - <u>C</u> -氨基-庚酸-GLMVGGVVIA COOH
25	Aβ13-28 肽	Ac-NH-HHQLVFFAEDVGSNKGG <u>C</u> -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
30

(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, 以缓冲交换缓冲液, 除去游离肽。使共轭物过 0.22 μ 孔尺寸的滤器, 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, 接受由不同区域的 A β 或 APP 结合弗氏佐剂的免疫。使动物组内性别、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膜内给药免疫, 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 $A\beta$ 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。

5

用 PBS 免疫的对照组中，海马中总 $A\beta$ 浓度的中值比皮层中总 $A\beta$ 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)。

10

对于皮层，处理组子集具有显著不同于对照组的总 $A\beta$ 和 $A\beta$ 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 $A\beta$ 1-42 或者 $A\beta$ 1-5 肽共轭物。与对照相比，这些处理组总 $A\beta$ 的中值分别降低 75%、79%和 61%。所有组脑皮层区 $A\beta$ 特异性抗体的效价和 $A\beta$ 水平之间没有可辨别的相关性。

15

在海马中，与 AN1792 处理相关的总 $A\beta$ 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 $A\beta$ 1-42 或 $A\beta$ 1-5 的动物组，总 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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。

20

25

也测定了小脑中的总 $A\beta$ ，该区在 AD 病理学中通常极少受影响。用各种 $A\beta$ 肽或 APP 衍生物免疫的所有组的 $A\beta$ 浓度的中值均与脑中该

30

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。

5 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。

10 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。

15 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%($p=0.02$)。

25 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

30

为该病的病理与 $A\beta$ 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 $A\beta$ 的治疗相关性 $A\beta$ 降低更大。

5

为了确定治疗动物中免疫诱导的 $A\beta$ 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 $A\beta$ 肽共轭物 $A\beta$ 1-5、 $A\beta$ 1-12、和 $A\beta$ 13-28 和全长 $A\beta$ 聚集物 AN1792 和 AN1528 免疫的动物含 $A\beta$ 的斑被内源 IgG 包围。用其它 $A\beta$ 肽或 APP 肽 pBx6 免疫的动物的脑没有用该方法分析。

10

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 $A\beta$ 1-42 包被的塑料多孔平板，测定作为 $A\beta$ 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免疫原制剂 AN1792，(峰 GMT: 94647)；AN1528，(峰 GMT: 88231)； $A\beta$ 1-12 共轭物，(峰 GMT: 47216)；和啮齿动物 $A\beta$ 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： $A\beta$ 1-5 共轭物(峰 GMT: 2356)、pBx6(峰 GMT: 1986)、 $A\beta$ 13-28 共轭物(峰 GMT: 1183)、 $A\beta$ 33-42 共轭物(峰 GMT: 658)、 $A\beta$ 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 $A\beta$ 1-5、 $A\beta$ 13-28、 $A\beta$ 25-35、 $A\beta$ 33-42 或啮齿动物 $A\beta$ 1-42 免疫)对同源肽的抗体效价，这些效价与对 $A\beta$ 1-42 测得的效价基本上相同，除了啮齿动物 $A\beta$ 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 $A\beta$ 降低测定的功效没有相关性。

15

20

25

30

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。

表 5			
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 和 AN1528 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

5 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。

10 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。

15

V. 用于被动保护的多克隆抗体的制备

125 只非转基因小鼠用 100 μ g A β 1-42, 添加佐剂 CFA 或 IFA 进行免疫, 到第 4-5 月无痛处死小鼠。对免疫小鼠采血。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。

20 每只小鼠得到平均约 0.5-1 mg 的免疫原特异性抗体, 总量 60-120 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

25 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，在注射的六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。其它被动免疫研究在以下实例 XI 和 XII 中作了说明。

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。

5

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。

10

15

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。

20

为了制备与完全弗氏佐剂(CFA)结合的制剂(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。

25

为了制备第 5 组和第 8 组的结合 MPL 的制剂, 将冻干粉末(Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT)加入到 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 $^{\circ}$ 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。

30

为了制备与低水包油型乳剂形成的制剂, 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。

10

为了制备结合明矾的制剂(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。

15

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。

20

4. 组织制备

约 14 周后,对所有豚鼠使用 CO₂ 无痛处死。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。

25

B. 结果

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

30

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 作为单独佐剂使制剂的效力降低近 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制剂(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 胍中制备海马趾、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, 尽管由这些制剂诱导的对 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。

5

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，通过 ELISA 分析抗体效价。各组的治疗方案如表 7 概述。

10

表 7

实验设计					
组	N ^a	佐剂 ^b	剂量	抗原	剂量(μ g)
1	10	MPL	12.5 μ g	AN1792	33
2	10	MPL	25 μ g	AN1792	33
3	10	MPL	50 μ g	AN1792	33
4	13	MPL	125 μ g	AN1792	33
5	13	MPL	50 μ g	AN1792	150
6	13	MPL	50 μ g	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 μ g/2 mg	AN1792	33
13	10	QS-21	5 μ g	AN1792	33
14	10	QS-21	10 μ g	AN1792	33
15	10	QS-21	25AN1792	AN1792	33
16	13	QS-21	25AN1792	AN1792	150
17	13	QS-21	25AN1792	AN1528	33
18	13	QS-21+ MPL	25 μ g/50 μ g	AN1792	33
19	13	QS-21+明矾	25 μ g/2 mg	AN1792	33

脚注：

^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。

5

各组中针对 A β 42 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，其中佐剂是 125 μ g MPL，50 μ g MPL 和 QS21 加 MPL。

5 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。

10 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。另外
15 一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 组单独用 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.,
20 Lot ME0439)肽的脱水储藏于-20 $^{\circ}$ C 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，
25 在 37 $^{\circ}$ C 保温过夜留待次日使用。

为了制备结合明矾的制剂(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
30 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。

5 为了制备结合 MPL 的制剂(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 50μl PBS 中 100μg 的肽、每剂量 50μg 的 MPL(50μl)和每剂量 100μl 的 PBS 在硼硅酸盐试管中混合后立即使用。

10

为了制备结合 QS21 的制剂(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℃储藏。用于每次注射时，将 50μl PBS 中每剂量 100μg 的肽、25μl PBS 中每剂量 25μg 的 QS21 和每剂量 125μl 的 PBS 在硼硅酸盐试管中混合后立即使用。

15

20 为了制备与弗氏佐剂(CFA)结合的制剂(组 4)，将 200μl PBS 中的 100μg 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 400μl，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 的制剂，将每剂量 100μg 的 AN1792 或 AN1528 与明矾(每剂量 1 mg)或 MPL(每剂量 50μg)或 QS21(每剂量 25μg)混合，在 PBS 中至终体积为 200μl，在后背肩胛骨之间皮下接种给药。对于接受 FA 的组，将 100μg 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 400μl，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 10μg AN1792 与 5μg 硫柳汞混合，在 PBS 中终体积为 50μl，皮下给药。第九组即对照组仅接受 200μl 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

25

30

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，以及通过脑切片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 -
5 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，之后到第六次免疫后，峰值衰减到 28%。
10 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，
15 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。

20

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)
QS-21/ AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1,511 (17/18)	1,188 (14/18)
CFA/ AN1792	10,076 (15/15)	61,279 (15/15)	75,386 (15/15)	41,628 (15/15)	30,574 (15/15)
明矾/ AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/20)	31 (2/20)
MPL/ AN1528	184 (15/21)	2,591 (20/21)	1,653 (21/21)	1,156 (20/20)	3,099 (20/20)
QS-21/ AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2,994 (21/22)
PBS + 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)

脚注：

5

^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结果如图 15 所示。在 PBS

对照 PDAPP 小鼠中，12 个月时，皮层中总 Aβ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 Aβ水平显著降低。仅 AN1792 加 CFA/IFA 的降低达到统计的显著度(P<0.05)。然而，如实施例 I 和 III 所示，在降低 Aβ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统计的显著度。相反，AN1792 加防腐剂硫柳汞显示，Aβ的中值与 PBS 治疗小鼠基本上相同。当比较皮层 Aβ42 的水平时，得到类似的结果。PBS 对照组中 Aβ42 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 处理组的降低获得统计的显著度(p=0.05)。AN1792 硫柳汞处理小鼠中 Aβ42 的中值为 1619 ng/g。

进一步的治疗佐剂或免疫原效率分析实施于 9-10.5 月龄的雄性和雌性异源 PADPP 转基因小鼠中。每个处理组 29-40 只动物，研究期为 25 周；所以在实验结束时动物为 15-16.5 月龄。处理组显示于下表 10 中。

	佐剂	免疫原	稀释缓冲液	给药方式
组 1	MPL-SE	AN1792-GCS(75μg)	PBS	SC(250μl)
组 2	ISA51	AN1792-GCS(75μg)	PBS	IP(400μl)
组 3	QS21	AN1792-GCS(75μg)	PBS	SC(250μl)
组 4	QS21(简)	AN1792-GCS(75μg)	PBS	SC(250μl)
组 5	PBS	-----	-----	SC(250μl)

表 10 缩写：MAP-多抗原性肽；TT-破伤风毒素 T 细胞表位(830-844)；SQ-皮下；IP-腹膜内；PBS-磷酸缓冲盐溶液；ISA-51 类似 IFA 的商业化佐剂；GCS-由甘氨酸/柠檬酸/蔗糖溶液构成；MPL-SE 是稳

定水油乳浊液中的 MPL。

5 免疫方案除了第三组(缩短的 QS21/AN1792)外, 各处理组都相同。在 0、2、4、8、12、16、20 和 24 周注射小鼠, 在 3、5、9、13、17、21 和 25 周取血。在本研究的 25 周内, 第一、二组注射 8 次而第三组 4 次。第四组, QS21/AN1792 的缩减方案, 仅在第 0、2、4、和 8 周接受注射。尽管以同样的取血方案对其取血以跟踪效价的下降, 在其它之后的周中, 该组不受注射。第三和第五组, 分别是 QS21/AN1792 和 PBS, 在本实验中作为阳性和阴性对照。

10

通过抗 A β 抗体效价分析确定各效价。

第一组, MPL-SE/AN1792 组。第九周几何平均效价(GMT)上升至峰值 17, 100, 25 周时 GMT 降至 10, 000。初始时, MPL-SE 效价上升至略高于 QS21/AN1792 对照组(第四组)。

15

第二组, ISA-51/AN1792 组。在整个实验中产生高效价, 后 9 周内 GMT 超过 100, 000。

20

第三组, QS21/AN1792 对照组。效价在 17 周达到峰值, GMT 16, 000。然后效价在以后的 8 周中下降, 最后以 GMT8, 700 结束。本组中一只动物在实验的全过程中未升高效价。

25

第四组, QS21/AN1792 缩减的注射方案组。效价在最后一次注射的 5 周后的第 13 周达到峰值 7, 300。最后取血时(25 周)效价降至 GMT 2, 100。在此对照组中, 一只动物无可检出的升高效价, 而另一只动物在下降期结束后丧失所有的效价。

第五组, PBS 独立处理的组, 无效价。

30

评价皮层 A β 的水平, 可用 ELISA 量化总 A β 和 A β_{1-42} 。简述如

下，脑半球分离为皮层、海马和小脑组织，5M 的胍缓冲液中匀浆并分析脑部 Aβ。皮层的总 Aβ 和 Aβ42 有相似结果。进行 Mann-Whitney 统计学分析以确定在 P 值为 0.05(表明 Aβ 显著变化)的组之间的显著度。

5

与 PBS 对照组相比，所有的处理组显著降低了总 Aβ 的水平(见表 11)。MPL-SE/AN1792 组的 Aβ 变化最大，并显著优于其它处理组。QS21/AN1792 缩减组在 Aβ 总体变化上与接受所有 8 次注射的 QS21 对照组相似。与 CFA/IFA-MAP(Aβ1-7)组相比，ISA51/AN1792 组的 Aβ 水平也有相似的降低。

10

表 11 皮层 Aβ 水平

	PBS	MPL-SE	ISA	QS-21	QS-21(4)
平均值 (纳克/克组织)	7,335	1,236	3,026	2,389	2,996
范围 (纳克/克组织)	550-18,358	70-3,977	23-9,777	210-11,167	24-16,834
P 值	---	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
N	38	29	36	34	40

总之，佐剂 MPL-SE、ISA-51 和 QS-21 与 AN1792 结合可以有效的诱导足量的免疫应答，显著减缓 Aβ 在皮层中的沉着。

15

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。AN1528 免疫动物与 PBS 处理或未处理动物相比

20

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. 抗 A β 抗体的治疗性处理

本实施例测试各种 A β 多克隆和单克隆抗体抑制异源转基因小鼠脑部 A β 聚集的能力。

1. 实验设计

60 只 8.5-10.5 月龄的雄性和雌性杂合 PADPP 转基因小鼠来自 Charles River 实验室。小鼠被分成 6 组, 分别用针对 A β 的各种抗体处理。分组使每组中动物性别、月龄、家系和来源尽可能保持一致。如表 10 所示, 抗体包括四种鼠 A β 特异性的单克隆抗体, 2H3(针对 A β 残基 1-12), 10D5(针对 A β 残基 1-16), 266(针对 A β 残基 13-28, 结合单体的 AN1792 而非聚集态 AN1792), 21F12(针对 A β 残基 33-42)。第五组用 A β 特异性的多克隆抗体组分(用聚集态 AN1792 免疫获得)处理。阴性对照组仅接受稀释剂 PBS, 没有抗体。

单克隆抗体每次注射剂量约每千克体重 10 毫克(假设小鼠重 50 克)。平均每七天进行腹膜内给药, 使抗 A β 效价维持在 1000 以上。尽管因 mAb 266 不与本实验中用作捕捉抗原的聚集态 AN1792 良好结合, 从而有效价较低, 但仍然使用同样的剂量方案。由于在体内抗体被快速清除, 接受单克隆抗体 2H3 的组在前三周内被终止。每次给药前对动物取血以测定抗体效价。治疗持续 6 个月, 总计约 196 天。在

最后一次给药一周后，无痛处死动物。

表 12:

实验设计				
处理组	N ^a	处理抗体	抗体特异性	抗体同种型
1	9	无，仅 PBS	NA ^b	NA
2	10	多克隆	Aβ 1-42	混合的
3	0	mAb ^c 2H3	Aβ 1-12	IgG1
4	8	MAb 10D5	Aβ 1-16	IgG1
5	6	MAb 266	Aβ 13-28	IgG1
6	8	MAb 21F12	Aβ 33-42	IgG2a

5

脚注:

a: 实验结束时组内的小鼠数目，所有的组以每组 10 只动物开始。

b: NA: 不适用

c: mAb 单克隆抗体

10

2. 材料和方法

a: 抗体制备

15

从两组动物采集的血液中制备抗 Aβ 多克隆抗体。第一组含有 6-8 周龄的 100 只雌性瑞典 Webster 小鼠。在 0、15 和 29 天用 100μg 与 CFA/IFA 组合的 AN1792 免疫。第三十六天进行第四次注射，给药一半剂量的 AN1792。第 42 天放血法处死动物，制备血清，共收集血清 64ml。第二组含有 24 只 6-9 周龄的雌性小鼠，与 PDAPP 小鼠等基因，但非转基因人 APP 基因的。在 0、14、28 和 56 天用 100μg 与 CFA 或 IFA 组合的 AN1792 免疫。第 63 天放血法处死动物，制备血清，

20

共收集血清 14ml。混合这两种血清。使用 50%饱和硫酸氨进行两次连续的沉淀作用，以纯化抗体组分。最终的沉淀物在 PBS 中透析并检测

内毒素。内毒素的水平小于 1 EU/mg。

5 抗 A β 单克隆抗体制备于腹水液。冰冷的腹水液中加入浓缩的硫酸葡聚糖钠盐进行脱水，在冰上搅动使终浓度为 0.238%。搅动加入浓缩的 CaCl₂，使其终浓度为 64 mM。10,000g 离心该溶液，丢弃沉淀。在冰上逐滴搅动加入等体积的饱和硫酸氨于上清液中。10,000g 离心该溶液，丢弃上清液。沉淀重悬并透析于 20 mM Tris-HCl, 0.4M NaCl 中 pH7.5。这一部分使用 Pharmacia FPLC Sepharose Q 柱，并以反向梯度从 0.4M 到 0.275M NaCl(溶于 20mM Tris-HCl pH7.5)洗脱。

10

抗体的峰值可以通过 280 纳米的吸收确定，从而收集合适的部分。通过 BCA 方式测定蛋白浓度，以及 SDS-PAGE 测定纯度，对纯化的抗体制备物进行定性。也检测抗体池的内毒素。内毒素水平低于 1 EU/mg。低于 100 的效价被任意地给一个 25 的效价值。

15

3. 脑部 A β 和 APP 的水平

20 各种抗 A β 抗体制备物处理 6 个月后，移去动物脑部，盐水灌注。大脑半球之一准备用于免疫组织化学分析，第二个用于测定 A β 和 APP 水平。为了测定各种形式 β 淀粉样沉积物和淀粉样前体蛋白(APP)浓度，解剖大脑半球，在 5 M 胍中匀浆海马、皮层和小脑三个区。进行一系列的稀释，与 ELISA 模式中已知浓度的 A β 肽或 APP 的一系列稀释标准比较，从而量化淀粉样肽或 APP 的水平。

25 ELISA 测定的皮层和海马匀浆液中总 A β 和 A β 1-42 的水平，小脑中总 A β 的水平分别在表 11、12 和 13 中作了说明。接种 PBS 的对照组总 A β 浓度的中值在海马中比皮层中高 3.6 倍(海马组织中值 63, 389 ng/g 比皮层组织中值 17, 818 ng/g)。对照组小脑的中值(30.6 ng/g 组织)比海马中低超过 2,000 倍。这些水平与从前报道的同龄杂合 PDAPP 转基因小鼠相似(Johnson-Wood 等, 1997)。

30

5 皮层中，一个处理组的 $A\beta$ 水平中值(以 $A\beta$ 1-42 测定的)与对照组 ($p<0.05$)的显著不同，那些动物接受了表 13 所示的多克隆抗 $A\beta$ 抗体。与本处理组的对照组相比， $A\beta$ 1-42 的中值降低了 65%。与另外一个处理组(动物被给药单克隆抗体 10D5， $p=0.0433$)相比， $A\beta$ 1-42 的中值降低了 55%。

表 13

皮层										
处理组	N ^a	中值						平均数		
		总 Aβ			Aβ42			总 Aβ	Aβ42	Aβ42
		ELISA 值 ^b	P 值 ^c	%变化	ELISA 值	P 值	%变化	ELISA 值	ELISA 值	ELISA 值
PBS	9	17818	NA ^d	NA	13802	NA	NA	16150+/-7456 ^e		12621+/-5738
多克隆抗 Aβ42 抗体	10	6160	0.0055	-65	4892	0.0071	-65	5912+/-4492		4454+/-3347
mAb 10D5	8	7915	0.1019	-56	6214	0.0433	-55	9695+/-6929		6943+/-3351
mAb 266	6	9144	0.1255	-49	8481	0.1255	-39	9204+/-9293		7489+/-6921
mAb 21F12	8	15158	0.2898	-15	13578	0.7003	-2	12481+/-7082		11005+/-6324

脚注:

a: 实验结束时每组动物的数目。

b: 纳克/克组织。

c Mann-Witney 分析。

d NA: 不适用。

e 标准偏差。

5 海马中，与多克隆抗 $A\beta$ 抗体处理相关的总 $A\beta$ 的中值降低的百分率(50%， $p=0.0055$)小于皮层中观察到的(65%)(表 14)。但海马中降低的绝对量几乎比皮层大三倍，海马中净降低为 31, 683 纳克/克组织而皮层中为 11, 685 纳克/克组织。如不以总 $A\beta$ ，而以 $A\beta_{1-42}$ 这种更加致淀粉病的 $A\beta$ 形式为测定基准，多克隆抗体导致的降低是显著的($p=0.0025$)。单克隆抗体 10D5 和 266 处理组的中值分别降低 33%和 21%。

表 14

海马										
处理组	N ^a	中值						平均数		
		总 A β			A β 42			总 A β		A β 42
		ELISA 值 ^b	P 值 ^c	%变化	ELISA 值	P 值	%变化	ELISA 值		ELISA 值
PBS	9	63389	NA ^d	NA	54429	NA	NA	58351+/-13308 ^e		52801+/-14701
多克隆抗 A β 42 抗体	10	31706	0.0055	-50	27127	0.0025	-50	30058+/-22454		24853+/-18262
MAb 10D5	8	46779	0.0675	-26	36290	0.0543	-33	44581+/-18632		36465+/-17146
MAb 266	6	48689	0.0990	-23	43034	0.0990	-21	36419+/-27304		32919+/-25372
MAb 21F12	8	51563	0.7728	-19	47961	0.8099	-12	57327+/-28927		50305+/-23927

脚注:

a: 实验结束时每组动物的数目。

b: 纳克/克组织。

c Mann-Witney 分析。

d NA: 不适用。

e 标准偏差。

也测定了小脑中的总 A β (表 15)。在多克隆抗 A β 抗体和 266 抗体处理组中，总 A β 水平显著降低(分别为 43%和 46%， $p=0.0033$ 和 $p=0.0184$)，而 10D5 处理组有几乎显著的降低(29%， $p=0.0675$)。

5 表 15

小脑					
处理组	N ^a	中值			平均数
		总 A β			总 A β
		ELISA 值	P 值	%变化	ELISA 值
PBS	9	30.64	NA ^d	NA	40.00+/-31.89 ^e
多克隆抗 A β 42 抗体	10	17.61	0.0033	-43	18.15+/-4.36
mAb 10D5	8	21.68	0.0675	-29	27.29+/-19.43
mAb 266	6	16.59	0.0184	-46	19.59+/-6.59
mAb 21F12	8	29.80	>0.9999	-3	32.88+/-9.90

脚注：

a：实验结束时每组动物的数目。

b：纳克/克组织。

10 c Mann-Witney 分析。

d NA：不适用。

e 标准偏差。

15 ELISA 测定了来自抗原处理的及对照，PBS 处理的小鼠皮层和小脑 APP 浓度。使用两种不同的 APP 分析。第一种，APP- α /FL，识别 APP- α (α ，剪切自 A β 序列的分泌型 APP)和 APP 的全长型(FL)。第二种分析只识别 APP- α 。与 A β 在一系列处理组中的处理相关性降低相反，与对照动物相比，在所有处理组中 APP 水平几乎不变。这些结

果表明 A β 抗体的免疫消耗 A β ，但不消耗 APP。

5 总之，抗 AN1792 的多克隆抗体处理的小鼠，其皮层、海马和小脑中 A β 的水平显著降低。A β 1-42 氨基末端，特别是 1-16 和 13-28 的氨基酸，的单克隆抗体也表现显著的治疗效果，尽管程度更小。

4. 组织化学分析

10 PBS、多克隆 A β 42、21F12、266 和 10D5 免疫的小鼠脑部亚群中，A β -免疫活性斑的形态与之前研究中的形态(使用 A β 42 的标准免疫程序)进行定性比较。

15 淀粉样斑的程度和外形的最大变化均产生在多克隆 A β 42 免疫的动物中。淀粉样侵害、侵蚀的斑形态以及细胞相关的 A β -免疫活性，这三者的降低非常类似标准免疫程序所产生的效果。这些观察支持 ELISA 的结果，即，给药多克隆 A β 42 抗体可以导致总 A β 和 A β 1-42 的显著降低。

20 同样的定性估计中，10D5 组的淀粉样斑在数量和形态上也有所减少，并存在细胞相关的 A β -免疫活性。相对于对照处理动物，抗 A β 的多克隆 Ig 组分和一个单克隆抗体 10D5 分别降低了 93%和 81%的斑侵害($p < 0.005$)。似乎 21F12 对斑侵害有相对较弱的效果。相对于对照处理的动物，对 pabA β ₁₋₄₂ 处理后的脑部显微照相显示出弥散的沉积物，以及 pab A β ₁₋₄₂ 处理组中许多更大紧密聚集斑的消失。

25 5. 抗体效价的测定

30 每次腹膜内接种之前，对三个来自每组的，随机选择的小鼠亚群进行采血，共 30 个血样。夹心 ELISA 的方法，使用包被 A β 1-42 的塑料多孔板进行抗体效价的测定，测定的抗体为 A β 1-42 结合抗体，在“一般材料和方法”中有详细的说明。每次采血的平均效价显示于图 16-18 中(分别为多克隆抗体和单克隆抗体 10D5 及 21F12)。在这段时

期，多克隆抗体制剂的效价平均高于 1000，而 10D5 及 21F12 处理的动物效价略高于这一水平。

6. 淋巴细胞增殖应答

5 最后一次抗体融入 8 天后收集脾细胞，测定依赖 $A\beta$ 的淋巴细胞增殖。新鲜收集的细胞，每孔 10^5 个，在 $A\beta$ 1-40(浓度为 $5\mu M$ ，以起刺激作用)存在下培养 5 天。作为阳性对照，另外的细胞与 T 细胞有丝分裂原 PHA 共同培养，作为阴性对照，细胞的培养无外加的肽。

10 各种抗 $A\beta$ 抗体被动免疫的衰老 PDAPP 小鼠的脾细胞在体外经 AN1792 刺激、增殖，测定细胞因子应答。这些分析的目的在于确定是否被动免疫促使抗原的呈递，并因此引发 AN1792 特异性的 T 细胞应答。在抗 $A\beta$ 抗体被动免疫的小鼠中未观察到 AN1792 特异性的增殖或细胞因子应答。

15

XII. 被动免疫的深入研究

在第二项研究中，重复 10D5 的处理并检测两种另外的抗 $A\beta$ 抗体，单克隆抗体 3D6($A\beta_{1-5}$)及 16C11($A\beta_{33-42}$)。对照组接受 PBS 或一种不相关的配合同种型抗体(TM2a)。小鼠较前述研究中大(11.5-12 月的杂合体)，其它实验设计都相同。再一次，在处理 6 个月后，与 PBS 或配合同种型抗体对照组($p=0.003$)相比，10D5 使斑侵害降低了超过 80%。另外一个抗 $A\beta$ 抗体 3D6 同样有效，产生 86%的降低($p=0.003$)。相反，第三个抗该肽的抗体，16C11，对斑侵害无效。 $A\beta_{42}$ ELISA 定量也获得相似的结果。这些结果表明在缺少 T 细胞免疫情况下，抗 $A\beta$ 肽的抗体应答足以降低 PDAPP 小鼠的淀粉样沉着，但并非所有的抗 $A\beta$ 抗体都有效。针对具有 $A\beta$ 氨基酸 1-5 或 3-7 的表位的抗体特别有效。

25

30 总之，我们表明了被动给药抗 $A\beta$ 抗体降低了患阿尔茨海默氏病模式小鼠的斑沉着的程度。较为平缓的血清浓度时($25-70\mu g/ml$)，抗体

以足以修饰 β -淀粉样斑的水平接触 CNS。抗体对 CNS 的进入并非因为血脑屏障的异常泄漏，因为 Evans 蓝检测 PDAPP 小鼠，未发现血管通透性的增加。衰老 PDAPP 小鼠脑主质中的抗体浓度和非转基因小鼠相似，即血清中抗体浓度 0.1%(不考虑同种型)。

5

XIII. 抗体结合的监测

检测是否抗 $A\beta$ 抗体可以在 CNS 内直接作用，取实施例 XII 结束时盐水灌注的小鼠脑部，确定外周给药的抗体是否存在。未固定的恒冷箱脑切片暴露于抗鼠免疫球蛋白(羊抗鼠 IgG-Cy3)的一种荧光药物中。10D5 和 3D6 处理组的脑部淀粉样斑被抗体强烈地着色，而 16C11 组无染色。为充分展示斑沉着的程度，先用抗 $A\beta$ 抗体与各个脑组织的系列切片免疫反应，然后用第二种试剂，外周给药后 10D5 和 3D6 接触 CNS 内的大多数淀粉样斑。与 16C11 组相比，这些组中的斑侵害被极大的降低。这些数据表明，外周给药的抗体可以进入 CNS 内，并在其中直接引发淀粉样沉积物的清除。可能 16C11 也能接触到淀粉样斑，但却不能结合。

15

XIV. 离体筛选分析抗淀粉样沉积物抗体的活性

为了检测抗体对斑清除的效果，我们用初级小胶质细胞与未固定的恒冷箱脑切片(来自 PDAPP 鼠或人 AD 脑)共同培养建立了一种离体分析。小胶质细胞来自新生 DBA/2N 小鼠(1-3 天)的脑皮层。在 HBSS (Hanks 平衡盐溶液, Sigma)和 50 μ g/ml DNA 酶 I 中机械化分散皮层。用 100 μ m 细胞滤器(Falcon)过滤分散化的细胞，1000rpm 离心 5 分钟。沉淀重悬于生长培养介质中(高葡萄糖 DMEM, 10%FBS, 25ng/ml rmGM-CSF)，以每个 T-75 培养瓶两个脑组织的密度铺板细胞。7-9 天后，培养瓶在定轨摇床以 200rpm 的速度 37 $^{\circ}$ C 培养 2 小时。细胞悬浮物在 1000rpm 离心，重悬于分析培养介质。

20

25

PDAPP 鼠或人 AD 脑(死亡时间小于 3 小时)的 10 μ m 恒冷箱脑切片融化后，置于多聚赖氨酸覆盖的园行玻璃盖片上，并放置在 24

30

孔组织培养平板孔中。分析培养介质冲洗盖片二次，分析培养介质含有 1%FBS 的 H-SFM(无杂交瘤细胞血清培养介质, Gibco, BRL)、谷氨酰氨、青霉素或链霉素, 以及 5ng/ml rmGM-CSF(R&D)。一小时内加入两倍浓度的对照或抗 A β 抗体(终浓度 5 μ g/ml)。以 0.8X10⁶ 细胞/ml 密度接种小胶质细胞于分析培养介质中。培养物在湿润培养箱内(37 度 5%CO₂)孵育 24 小时或更长时间。孵育结束后, 4%的甲醛固定培养物并浸透于 0.1%的 Triton-X100。切片用生物素酰化的 3D6 染色, 接着链霉素或 Cy3 共轭(Jackson ImmunoResearch)。外源的小胶质细胞通过核染色(DAPI)可见。倒置荧光显微镜(Nikon,TE300)观察培养物, SPOT 数码相机用 SPOT 软件(诊断装置)进行光学显微照相。Western 印记分析中, 培养物用 8M 尿素抽提, 在还原 tricine 样品缓冲液中以 1: 1 稀释, 并上样于 16% tricine 凝胶中(Novex)。转至转移膜上后, 印记暴露于 5 μ g/ml pabA β 42 和 HRP 偶联的抗鼠抗体, 在 ECL(Amersham)中显像。

16C11(一种抗 A β 抗体, 在体内无效)存在时, 对 PDAPP 脑切片进行分析, β 淀粉样斑保持其完整性, 并且未观察到吞噬现象。相反, 邻近的切片在 10D5 存在时, 淀粉样沉积物大多不存在, 并且小胶质细胞显示许多含有 A β 的吞噬泡。AD 脑切片也有同样的结果; 10D5 诱导对 AD 斑的吞噬, 而 16C11 无效。此外, 该分析提供了进行鼠或人小胶质细胞和鼠、兔或灵长类动物抗 A β 抗体的可比性结果。

表 16 表示几种不同结合特异性的抗体是否产生结合和/或吞噬作用。表中可见, 结合氨基酸 1-7 内表位的抗体结合并清除淀粉样沉积物, 而结合氨基酸 4-10 内表位的抗体结合但不清除淀粉样沉积物。结合 C 末端到残基 10 处表位的抗体既不结合也不清除淀粉样沉积物。

表 16: 表位特异性分析

	抗体		染色	吞噬
	表位	同种型		
N-末端 单克隆抗体				
3D6	1-5	IgG2b	+	+
10D5	3-6	IgG1	+	+
22C8	3-7	IgG2a	+	+
6E10	5-10	IgG1	+	-
14A8	4-10	大鼠 IgG1	+	-
13-28				
18G11	10-18	大鼠 IgG1	-	-
266	16-24	IgG1	-	-
22D12	18-21	IgG2b	-	-
C-末端				
2G3	-40	IgG1	-	-
16C11	-40/-42	IgG1	-	-
21F12	-42	IgG2a	-	-
免疫血清				
兔(CFA)	1-6		+	+
鼠(CFA)	3-7		+	+
鼠(QS-21)	3-7		+	+
猴(QS-21)	1-5		+	+
鼠(MAP1-7)			+	+

表 17 显示的结果获自几种抗 A β 抗体, 比较其离体分析中诱导吞噬的能力, 以及在体内被动转移研究中减少斑沉积的能力。尽管 16C11

和 21F12 可以高亲和地结合合成的聚集态 A β 肽，这些抗体不能与未固定的脑切片中的 β 淀粉样斑反应，因此不能引发离体分析中的吞噬，而且在体内并不有效。在三种测定中，10D5、3D6 和多克隆抗 A β 抗体都有活性。22C8 抗体对 A β 天然形式的类似物有更强的结合，其 1 和 7 处的天冬氨酸在类似物中被同型天冬氨酸所替换。这些结果显示体内效果是基于 CNS 中直接抗体介导的斑清除作用，并且离体分析可以预示体内效果。

同样的分析被用来检测抗一个同型核蛋白片段(称为 NAC)抗体的清除作用。已知同型核蛋白是一种淀粉样斑相关蛋白。NAC 的抗体与具有淀粉样斑、小胶质细胞的脑组织样品接触，同前。用兔血清作对照。接下来的监测显示斑的数目和尺度有显著的减少，显示了抗体的清除活性。

表 17 离体分析预示体内效果

抗体		同种型	对聚集态 A β 的亲合力(pM)	对 β 淀粉样 斑的结合	离体的效 率	体内效 率
单克隆	3D6	IgG2b	470	+	+	+
	10D5	IgG1	43	+	+	+
	16C11	IgG1	90	-	-	-
	21F12	IgG2a	500	-	-	-
	TM2a	IgG1	--	-	-	-
多克隆	1-42	混合	600	+	+	+

共聚焦显微镜被用来确定离体分析中抗体已内化。在对照抗体存在时，使外源的小胶质细胞维持在组织上方的一个共聚焦平面，在此区域没有含 A β 的吞噬细胞和完好的淀粉样斑。在 10D5 存在时，几乎所有的淀粉样斑物质都存在于外源小胶质细胞的小泡中。为了确定内

化肽的最终命运，在各个时间点对 10D5 处理的培养物进行 8M 尿素抽提，并进行 Western 印记分析检测。在第一小时时间点，还未产生吞噬作用，与多克隆抗 A β 抗体的反应显示一个强的 4kD 条带(相应于 A β 肽)。A β 的免疫活性在第一天降低，到第三天消失。因此，抗体介导 A β 的吞噬作用导致了其降解。

为了确定是否是 Fc 在离体分析中介导了吞噬，制备抗 A β 抗体 3D6 的 F(ab')₂ 片段。尽管 F(ab')₂ 片段保持了其与淀粉样斑反应的全部能力，它们不能引发小胶质细胞的吞噬作用。此外，整个抗体的吞噬可以被抗鼠 Fc 受体(抗 CD16/32)的药物阻断。这些数据显示 A β 的体内清除是通过 Fc 受体介导的吞噬进行的。

XV. 抗体通过血脑屏障的途径

本实施例通过静脉注射到正常或 PDAPP 小鼠周边组织后，确定进入脑部的抗体的浓度。0.9%NaCl 溶液灌注 PDAPP 或对照的正常小鼠。剖出脑区(海马和皮层)并快速冷冻。在 0.1% Triton+蛋白酶抑制剂中匀浆脑组织。ELISA 检测抽提物中的免疫球蛋白。Fab' 2 羊抗鼠 IgG 包被 RIA 板作为捕捉试剂。将脑抽提物或血清孵育 1 小时。用抗鼠 IgG1-HRP、IgG2a-HRP 或 IgG2b-HRP(Catlag)检测同种型。发现无论何种同种型，存在于 CNS 中的抗体与其在血液中的浓度比为 1: 1000。例如，当血液中 IgG1 浓度是血液中 IgG2a 浓度的三倍时，在脑部的浓度也是它的三倍，二者的浓度都是血液中浓度水平的 0.1%。在转基因或未转基因的小鼠中都观察到这一结果，因此 PDAPP 没有独特的血脑屏障泄漏。

XVI. MAP 构象中的 A β 肽的治疗效果

进行治疗性佐剂或免疫原效率的研究，选择 9-10.5 月龄的雄性和雌性 PDAPP 转基因小鼠，测试含有上述四聚体 MAP 构象中 A β 1-7 的融合蛋白的治疗效果。研究持续时间为 25 周，每个处理组 29-40 只动物；因此在结束时，动物月龄 15-16.5 月。本研究使用的方法与上面实施例 VIII 对不同佐剂的治疗研究中的相同。各处理组在下表 18 中表示。

表 18

	佐剂	免疫原	稀释缓冲液	给药方式
组 1	CFA/IFA	MAP(A β 1-7:TT)(100 μ g)	PBS	IP(400 μ l)
组 2	QS21	AN1792-GCS(75 μ g)	PBS	SC (250 μ l)
组 3	PBS	-----	---	SC(250 μ l)

表 18 缩写: MAP-多抗原性肽; TT-破伤风毒素 T 细胞表位(830-844); SQ-皮下; IP-腹膜内; PBS-磷酸缓冲盐溶液; GCS-是甘氨酸/柠檬酸/蔗糖制剂。

免疫方案各处理组都相同。在 0、2、4、8、12、16、20 和 24 周注射小鼠, 在 3、5、9、13、17、21 和 25 周取血。第 1, 2, 3, 4 和 6 组注射 8 次。第 2 和第 3 组, 即 QS21/AN1792 和 PBS, 在本实验中分别作为阳性和阴性对照。

通过抗 A β 抗体效价分析测定各组效价。

第一组, CFA/IFA: MAP(A β 1-7: TT)组, 效价水平低。13 周时 GMT 达到峰值, 仅为 1, 200, 且第 25 周降至 600。30 只小鼠中 3 只无任何效价升高, 而另外 7 只实验结束时效价低于 400。

第二组, QS21/AN1792 对照组。效价在 17 周达到峰值, GMT 16, 000。然后效价在以后的 8 周中下降, 最后以 GMT8, 700 结束。此组中一只动物在实验全过程中都没有效价产生。

第三组, PBS 独立处理组。没有效价产生。

与 PBS 对照组相比, 两个处理组皮层 A β 水平显著降低(见表 19)。尽管抗 A β 抗体的效价相对较低, CFA/IFA: MAP(A β 1-7)组与 PBS 对照组相比, 仍然显著地降低了皮层 A β 的水平。

表 19 皮层 A β 水平

	PBS	MAP	QS-21
平均值 (纳克/克组织)	7,335	3,692	2,389
范围(纳克/克组织)	550-18,358	240-10,782	210-11,167
P 值	---	0.0003	<0.0001
N	38	30	34

总之，Aβ1-7 MAP 免疫原可以有效的诱导充分的免疫应答，显著减缓 Aβ 在皮层中的沉着。

5 XVII. 猴中对 Aβ 的免疫应答表位成像

本例分析灵长类动物对 AN1792 免疫(即 Aβ1-42)的应答。结合了 QS-21 佐剂(50 或 100μg/剂)或 5%无菌右旋糖水溶液(D5W, 对照组)的 AN1792(75 或 300μg/剂)免疫 11 组猴子(4 只/性别/组)。所有的动物在表 20 所示的三个注射安排之一均接受 IM 注射，共计 4、5 或 8 次剂量。血清样品(来自 4 只/性别/组)在实验的第 175 天采集，CSF 样品(来自 3 只/性别/组)在实验的第 176 天采集(第六个月尸体剖检)，并测定其结合 Aβ1-40 肽和 APP 的能力。

表 20; 小组的分配及剂量水平

组	实验设计 ^a	猴(M/F)	AN1792 剂量(μg/剂)	QS21 剂量(μg/剂)	途径
1 ^b	1	4/4	0	0	IM
2	1	4/4	载体 ^c	50	IM
3	1	4/4	载体	100	IM
4	1	4/4	75	50	IM
5	1	4/4	300	50	IM
6	1	4/4	75	100	IM
7	1	4/4	300	100	IM
8	2	4/4	75	100	IM
9	2	4/4	300	100	IM
10	3	4/4	75	100	IM
11	3	4/4	300	100	IM

- a: 设计 1, 1、15、29、57、85、113、141、169 日给药; 设计 2, 1、29、57、113、169 日给药; 设计 3, 43、85、169 日给药。
- b: D5W 注射的对照组。
- c: 含有甘氨酸/柠檬酸/蔗糖缓冲溶液的载体, 是 AN1792 的赋形

剂。

通过 ELISA 测定与覆盖 A β 1-42 全序列之重叠肽结合的抗体，确定这些 AN1792 免疫动物的血清样品中的抗体所识别的线性肽的确切阵列。手性技术获得带有部分 AN1792 序列的生物素酰化的肽，即，10 个氨基酸肽每个有 9 个残基的重叠和一个残基突出(合成号 5366, 5331 和 5814)。前 32 个肽(从 AN1792 N 末端上游第八个氨基酸往下，直到 AN179 第 24 个氨基酸)的 C 端连接一个 GGK 接头使其生物素酰化。后 10 个肽(重复上一系列的 32 肽)的 N 端连接一个含有 EGEG 的接头使其生物素酰化。冻干的生物素酰化的肽溶解于 DMSO 中浓度为 5mM。这些肽的储存液在 TTBS(0.05% Tween20, 25mM Tris-HCl, 137mM NaCl, 5.1mM KCL, pH=7.5)中稀释至 5 μ M。5 μ M 的溶液中取 100 μ l 以二等份加入预先覆盖有链亲和素的 96 孔板(Pierce)。平板在室温下孵育 1 小时，然后用 TTBS 洗 4 次。血清样品在不含叠氮化物的样品稀释剂中稀释以归一化效价每孔加 100 μ l。这些平板在室温下孵育 1 小时，然后用 TTBS 洗 4 次。HRP 偶联的羊抗人抗体(Jackson ImmunoResearch)在不含叠氮化物的样品稀释剂中以 1: 10, 000 稀释，每孔加入 100 μ l。平板再孵育并冲洗。在加入用于终止反应的 30 μ l 2N 的 H₂SO₄ 之前，每孔加入 100 μ l TMB(Pierce)并孵育 15 分钟以产生颜色反应。在 Vmax 或 Spectramax 比色平板读取器上测定 450nm 的光密度。

AN1792 的免疫导致所有剂量组的 100%的动物在 175 天时表达抗体。各组的平均效价范围从 14596 到 56084。更高的效价倾向于那些有更高的抗原和/或佐剂浓度的免疫方案，但由于个体动物对免疫的应答有很高的波动，对此表现不出统计上的显著差异。

AN1792 抗体阳性的血清同样也是 A β 1-40 抗体阳性血清。各组的平均效价范围从 36867 到 165991，而抗 AN1792 的效价在 175 天各组没有表现出统计学上显著的差异。结合 AN1792 与结合 A β 1-40 有很

高的正相关性(Spearman $r=0.8671$)。

AN1792 免疫的各种设计安排的 48 只猴中, 33 只产生了体积和质量上足以用于分析的 CSF 样品。其中 32 只(97%)有对 AN1792 的阳性效价。效价范围从 2 到 246, 平均值为 49.44 ± 21.34 。抗 AN1792 的 CSF 水平是血清中的 $0.18 \pm 0.11\%$, 与血清效价表现出高的正相关(Spearman $r=0.7840$)。组间及性别之间的 CSF 抗体百分率没有差异。CSF 的抗体水平与通过血脑屏障进入中枢神经系统的外周产生抗体的被动转移一致。

10

对于抗 AN1792 阳性之 CSF 样品的一个亚群的检测表明, 和血清样品中的抗体相似, CSF 的抗体对 A β 1-40 有交叉反应。A β 1-40 效价和相应的 AN1792 效价有很高的相关性(Spearman $r=0.9634$)。检测 CSF 样品中最高 AN1792 效价的亚群, 显示对 APP 没有结合, 正如血清抗体一样。

15

检测第 175 天的血清对一系列 10 体重叠肽的抗性, 所有猴的抗体都结合其序列覆盖 AN1792 肽 1-10 氨基酸的肽(APP 的氨基酸 653-672)。一些动物中, 这是能被检测到结合的唯一肽链(见图 19)。

20

其它动物中还可以检测到其它反应活性, 但所有的情况下, 对肽链 N 末端的反应活性都是主导的。其它反应活性可以归结为两组。第一, 也最普遍, 是对以 AN1792 肽 N 末端 1-10 为中心的肽链的结合(图 20)。这种类型的结合针对那些覆盖 AN1792 肽氨基酸 1-8, 1-9 和 2-11 的肽。这些反应活性, 和 1-10 肽的反应活性一起, 代表了所有动物中的主要反应活性。个体动物在一段时间内的表位成像显示对 1-10 肽的抗体反应活性超过邻近的肽。这表明免疫应答强烈地倾向于具有自由天冬氨酸残基的 AN1792 肽 N 末端。在一些动物中, 第二种次要的可检出的活性是对位于主要区域 C 端, 以及覆盖 AN1792 肽氨基酸 7-16, 11-20 和 16-25 为中心的肽的结合。这些反应活性仅在 10%到 30%的

25

30

猴中可见。

不同动物的应答变化(如, 是否氨基酸 1-10 是专有的或主导性的活性表位)与抗原或佐剂剂量、给药安排, 或抗体效价不相关, 而且可能是各动物遗传组成的一个表现。

XVIII. 对人受试者的预防和治疗

进行单剂量 I 期试验确定人体安全性。以逐步增加的剂量对不同患者给药治疗药物, 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 II 期试验确定治疗功效。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 制定的标准确定的患早期到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 II 期试验, 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)或轻度认知损伤(MCI))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)。

10 XIX. 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 包被缓冲液(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)，用 100 μ l 溶液包被 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。稀释液在经包被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。

5 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。

10

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°C离心室(Dako A/S, Denmark), 在 1.5 ml PBS-FBS 中以 100 rpm 匀浆 10 秒, 15 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 NH₄Cl、1 M KHCO₃、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 10⁵ 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 20 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°C培养 96 小时。再加入 5 μ M 到 0.18 μ M 剂量范围内 4 个梯度的各种 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 μ g/ml)存在下不添加蛋白质培养。向细胞中加入 ³H- 25 胸苷(1 μ Ci/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))中计数。结果表示为插入不溶性大分子的放射性的 30 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 (Johnson-Wood 等，同上) 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 266，特异于 A β 的氨基酸 13-28(Seubert, 等)作为捕捉抗体，生物素酰化的单克隆抗体 3D6，特异于 A β 的氨基酸 1-5(Johnson-Wood 等)作为报道抗体。3D6 单克隆抗体不能识别分泌型 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 ng/ml(11 nM)，不与浓度高达 1 ng/ml 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 μ g/ml(28 μ 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)包被 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 m A 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 mAb 8E5, 对 APP695 型的氨基酸 444-592 升高(Games 等, 同上)。APP- α /FL 分析的报道 mAb 是 mAb 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 mAb 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), 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 mAb 266 所述，将 mAb 8E5 包被到 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-umbelliphenyl-磷酸酯，室温下保温 30 分钟，在 Cytofluor tm 2350 荧光读数仪 (Millipore) 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 240 μ m 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-A β (mAb, 3D6，特异于人 A β)在 PBS 和 1%马血清中稀释到浓度为 2 μ g/ml；或(2)特异于人 APP，8E5 的生物素酰化的 mAb，在 PBS 和 1.0%马血清中稀释到浓度为 3 μ g/ml；或(3)特异于神经胶质纤丝酸性蛋白质(GFAP；Sigma Chemical Co.)的 mAb，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 mAb，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 mAb (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 mAb (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 mAb (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 A β (Pharmingen), 用含 1%
5 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 A β (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 A β (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 mAb
(Serotec), 用含 1%兔血清的 PBS 液以 1:200 的比例稀释;或(12)含 1%
10 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℃下保温过夜。
15 然后使与 3D6 或 8E5 或 CD3e mAb 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
20 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。

25

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。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, 以封闭内源性过氧化物酶,
然后与一级抗体在 4℃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);
30

5 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-特异性单克隆抗体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。

10

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。

15

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。

20

8. 图像分析

25

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区中, 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 mAb 3D6 发生免疫反应的 A β 沉积物的海马趾面积的分数的) $\times 100$ 。同样, 神经炎侵害的百分率如下测定: (含与单克隆抗体 8E5 发生反应的营养不良性神经突的海马趾面积的分数的) $\times 100$ 。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

30

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区中，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) $\times$ 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 μ 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。

显然本发明提供了多种用途。例如，本发明提供了以上说明的任何 A β 抗体在致淀粉样病的治疗、预防或诊断中的应用，以及其使用的医学或诊断组合物的制备。同样的，本发明提供了以上说明的任何 A β 表位片段在致淀粉样病的治疗、预防或诊断中的应用，以及其使用的医学制备。

[illegible]

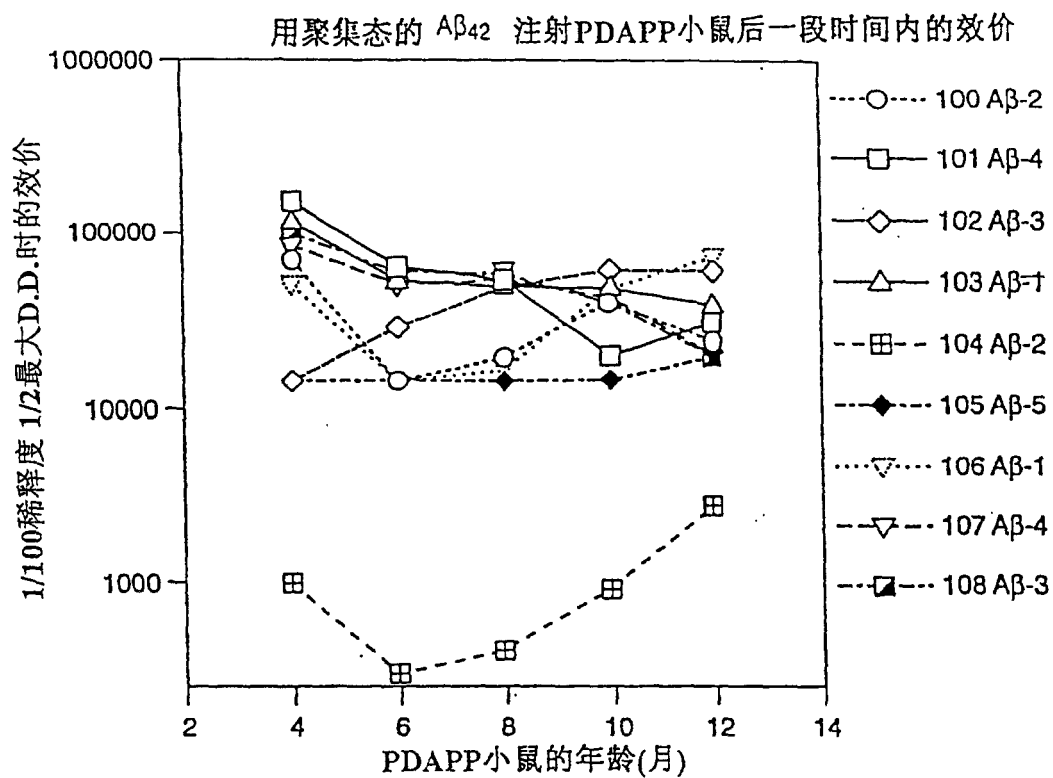


图1

研究001

海马淀粉样侵害

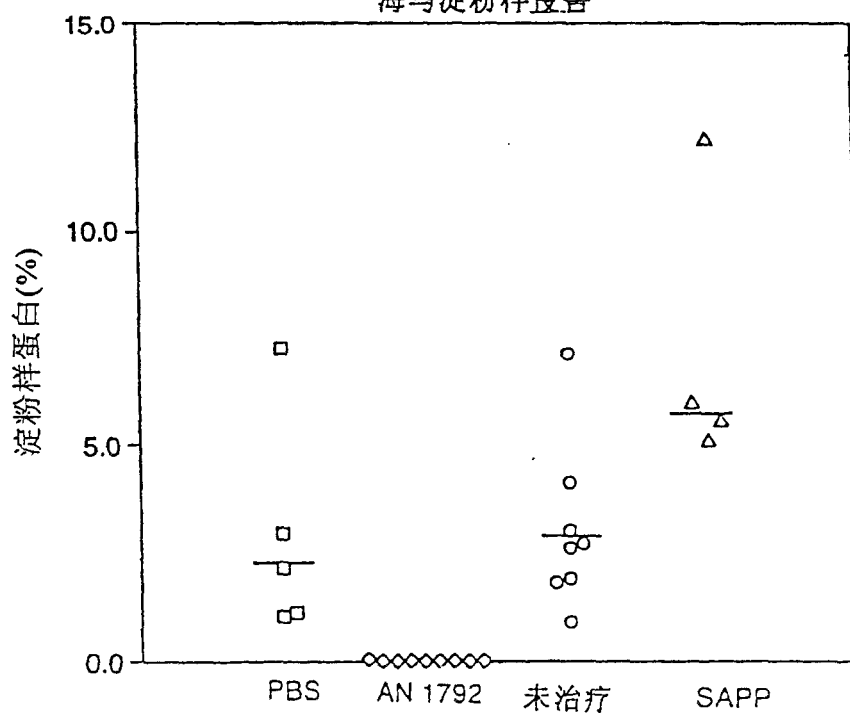


图2

研究001 海马神经炎斑侵害

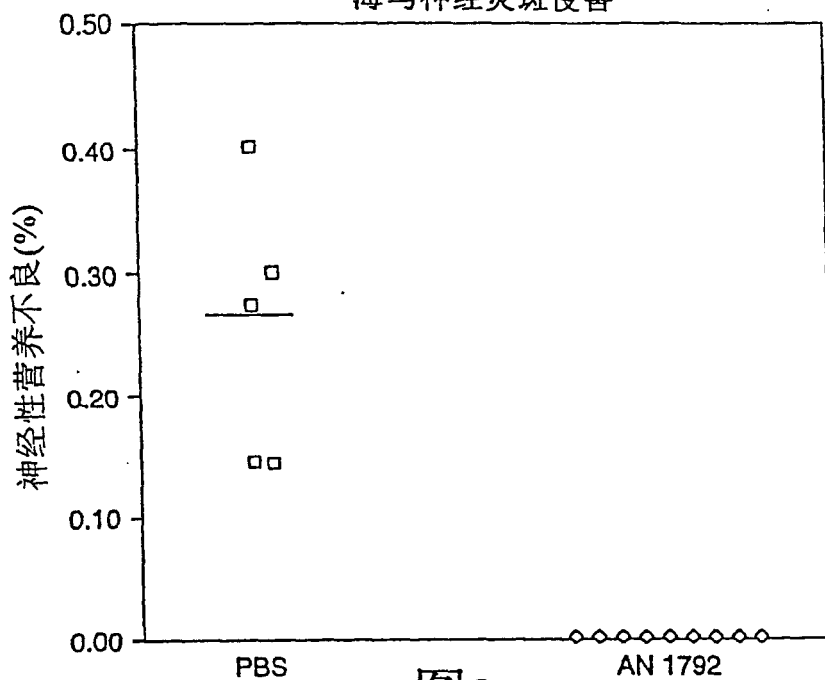


图3

研究001

夹肌后皮质的星形细胞增生

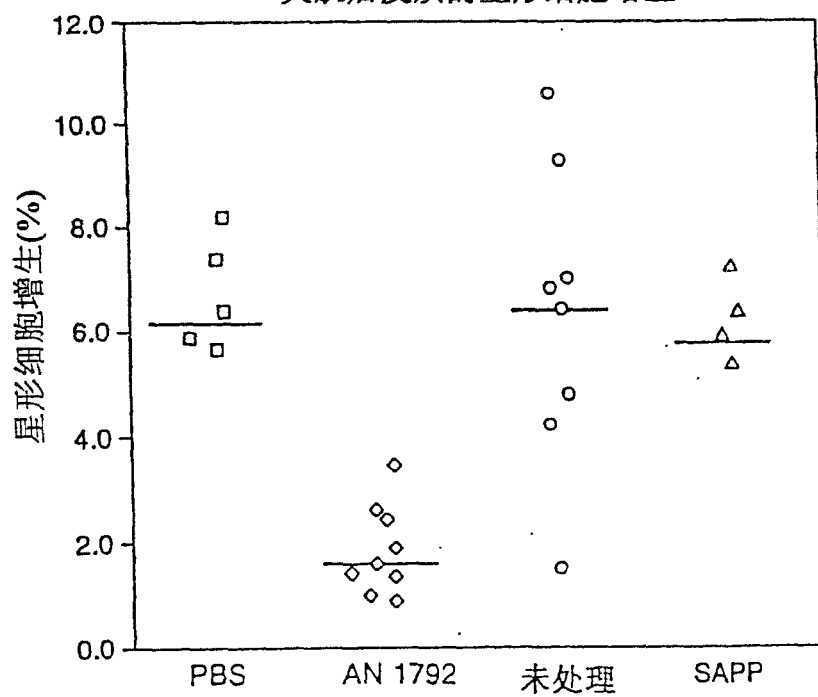


图4

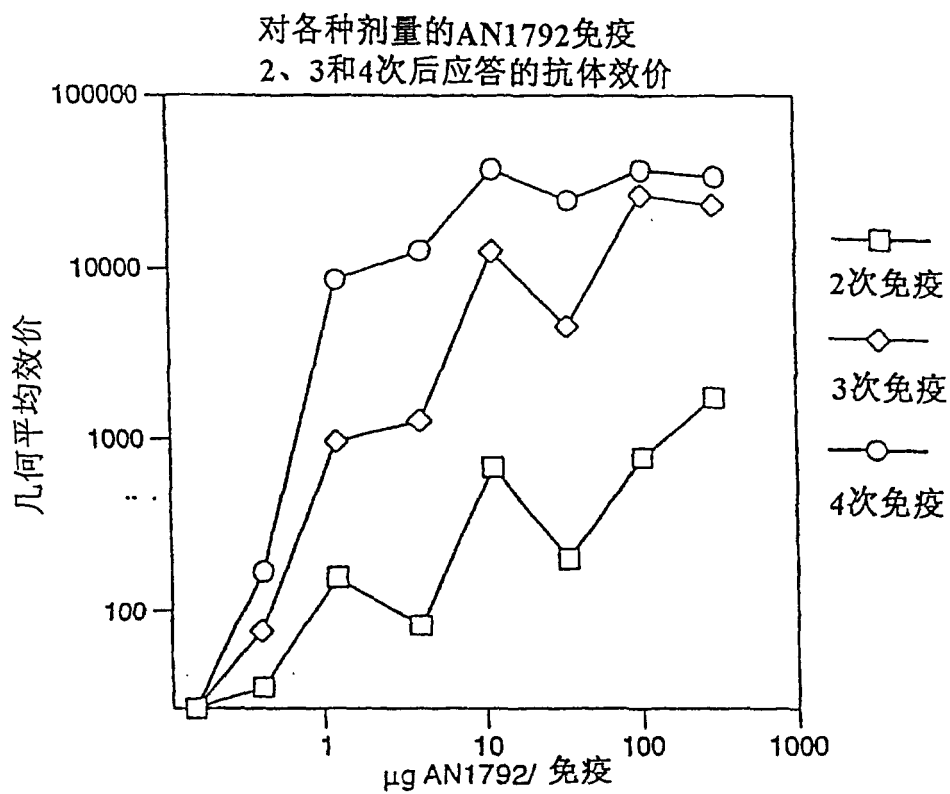


图5

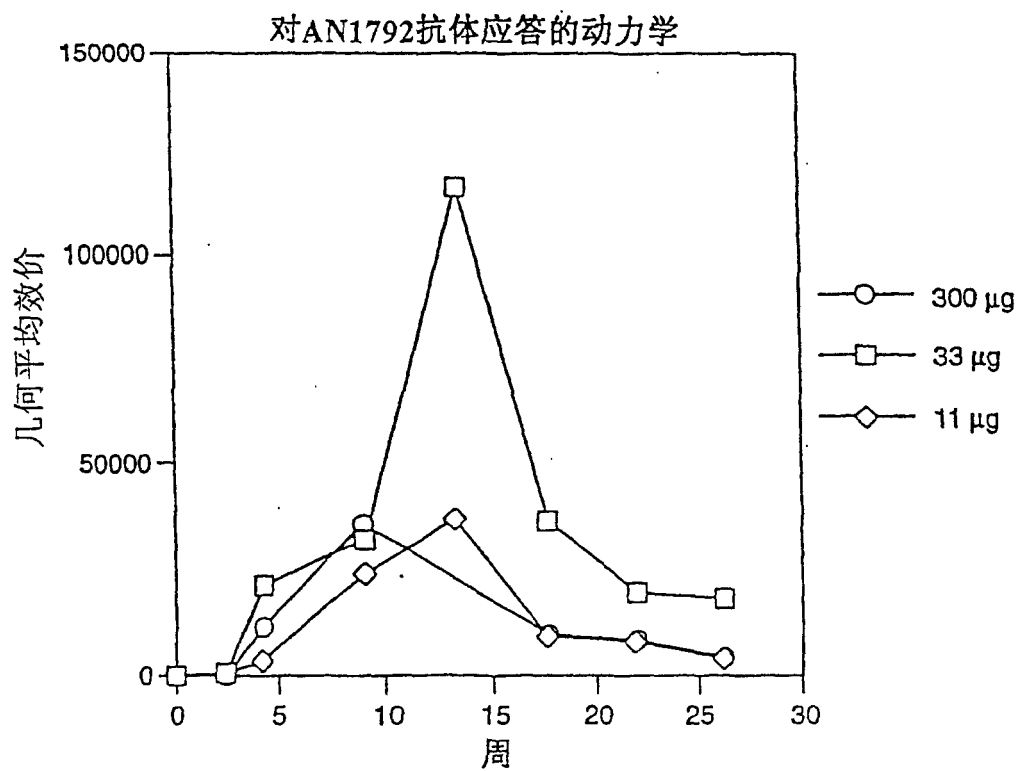


图6

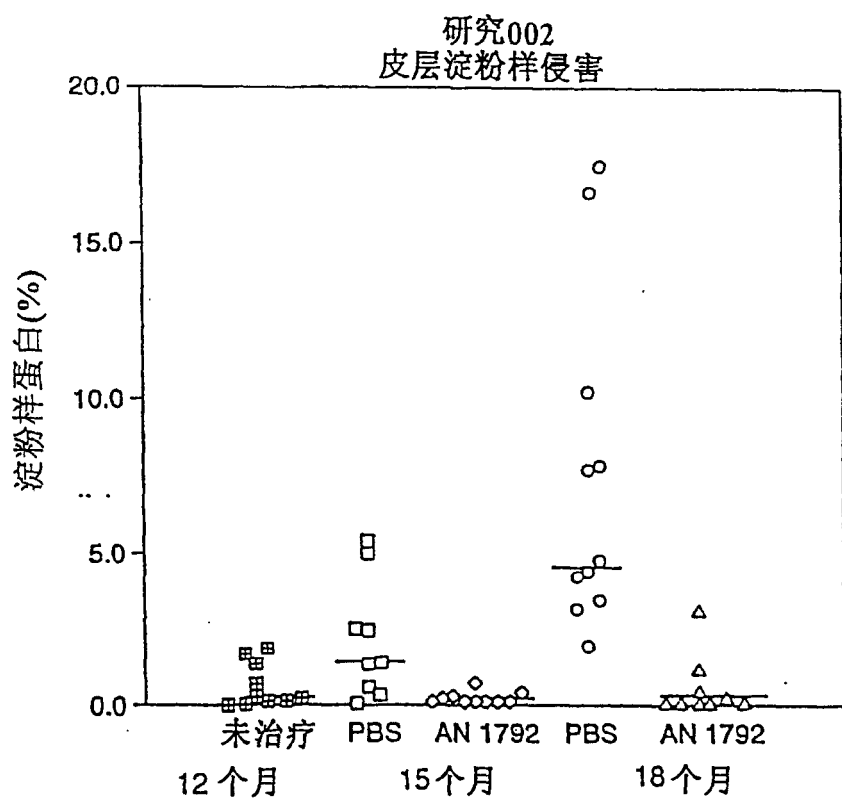


图7

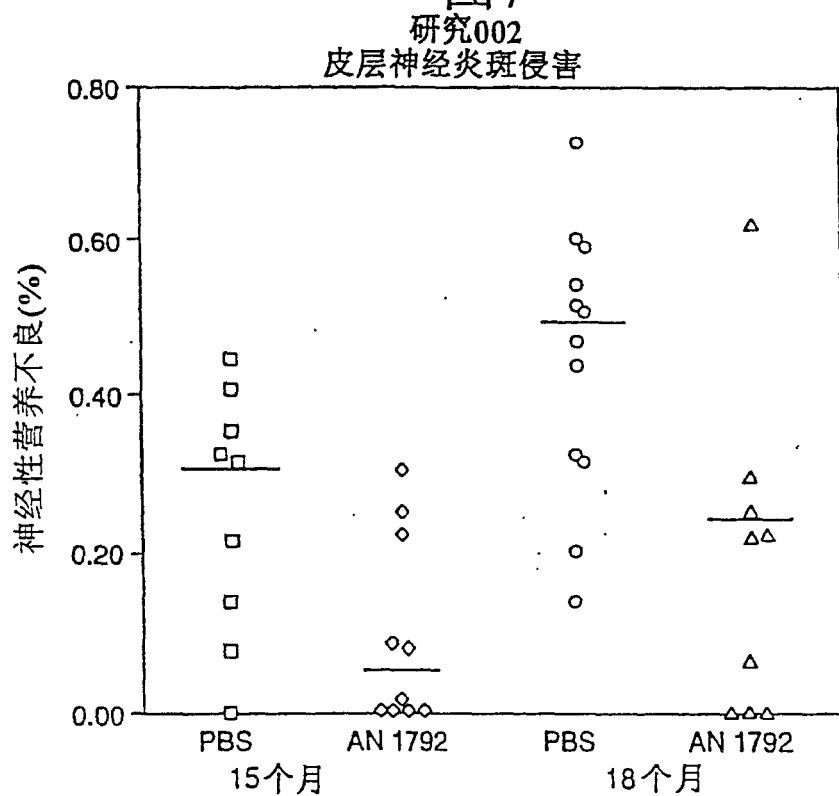


图8

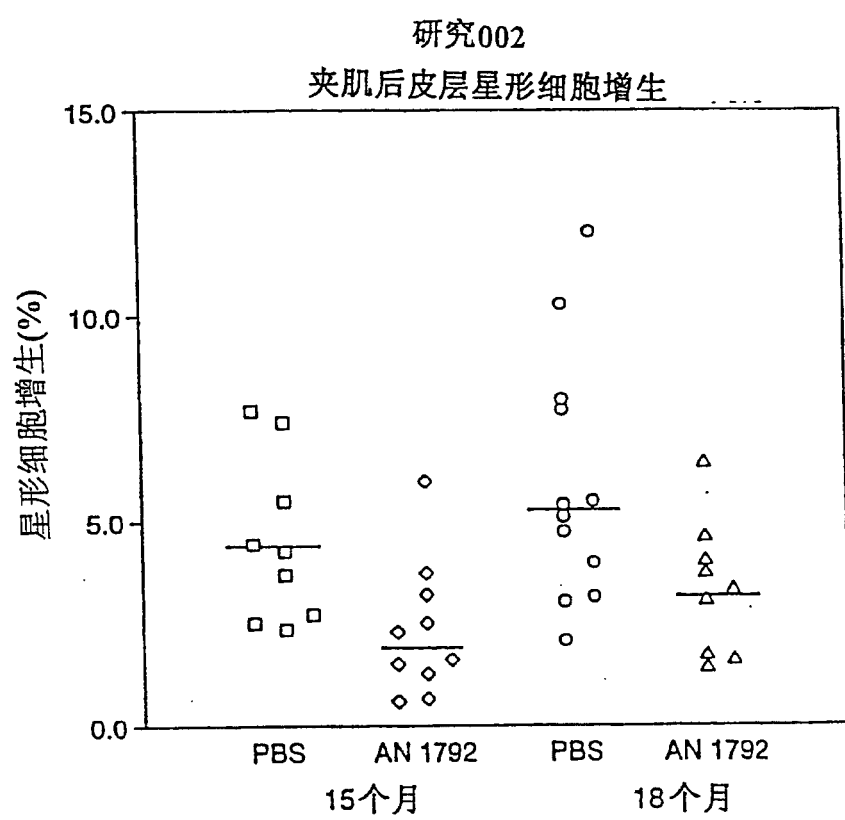


图9

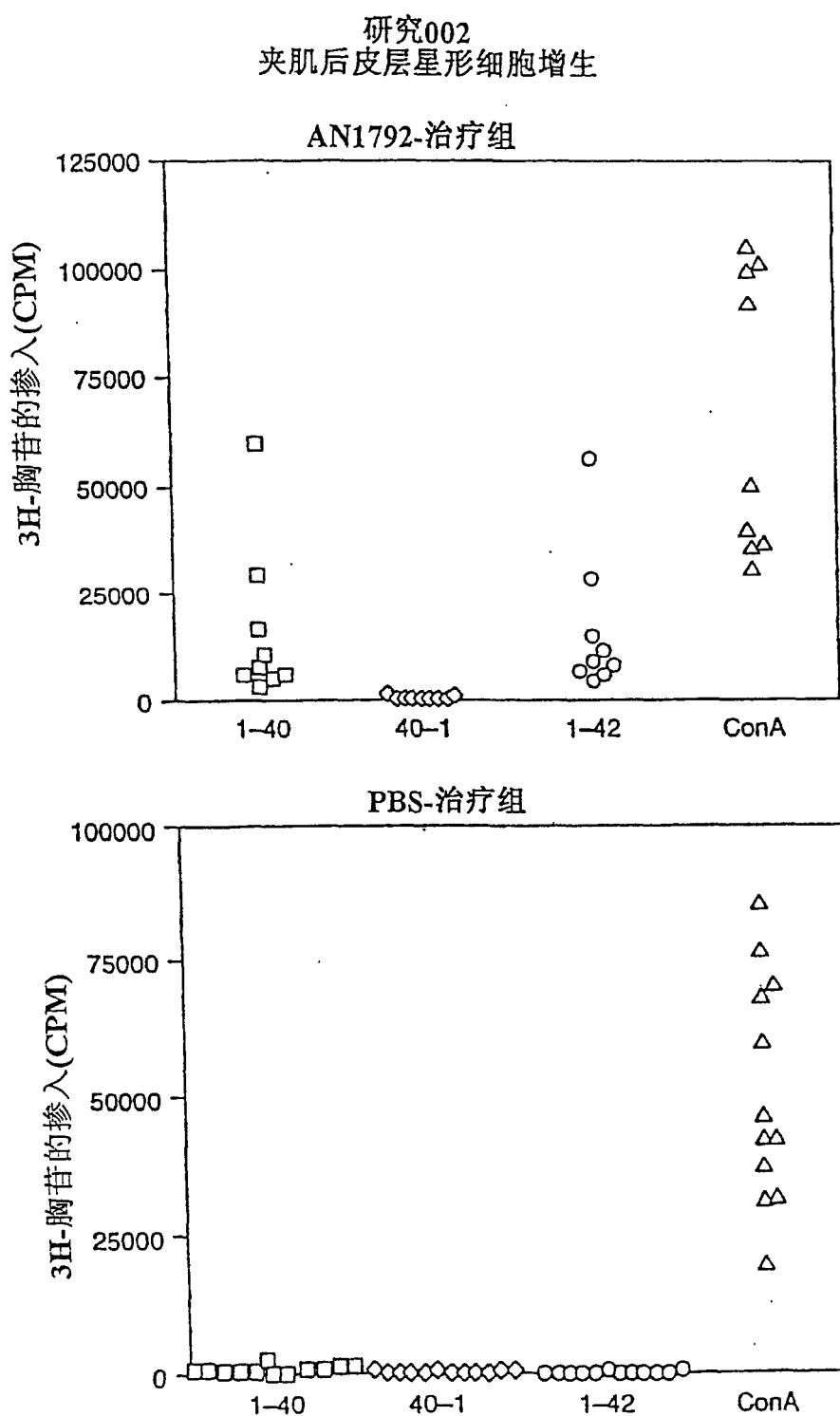


图10

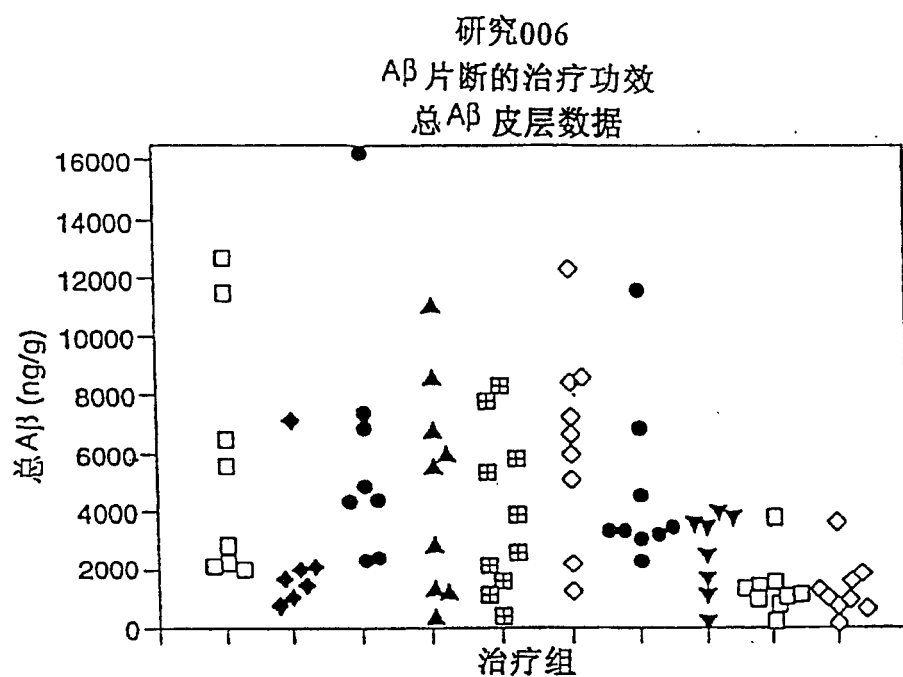


图11

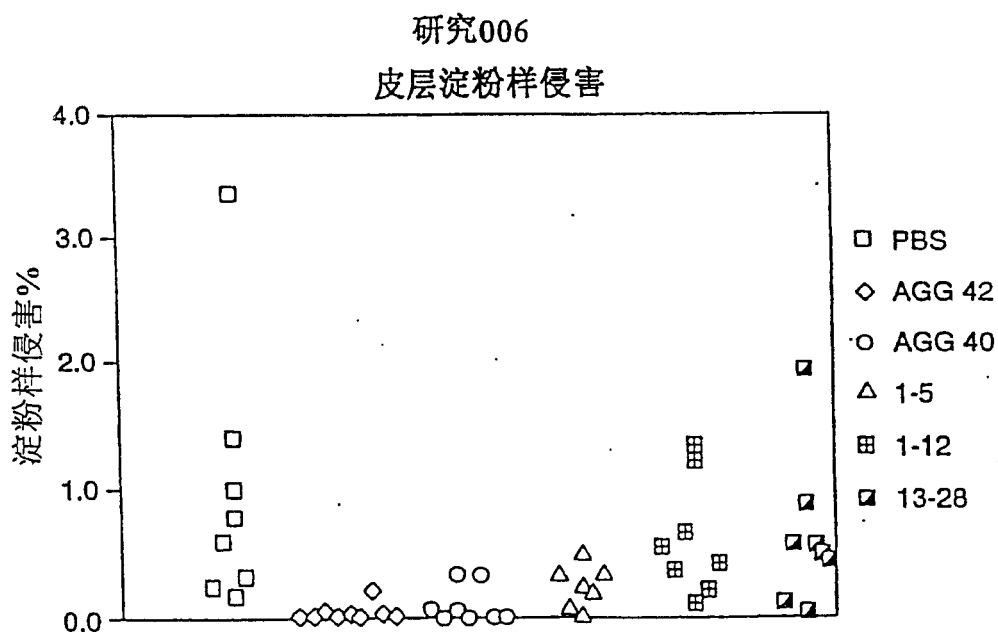
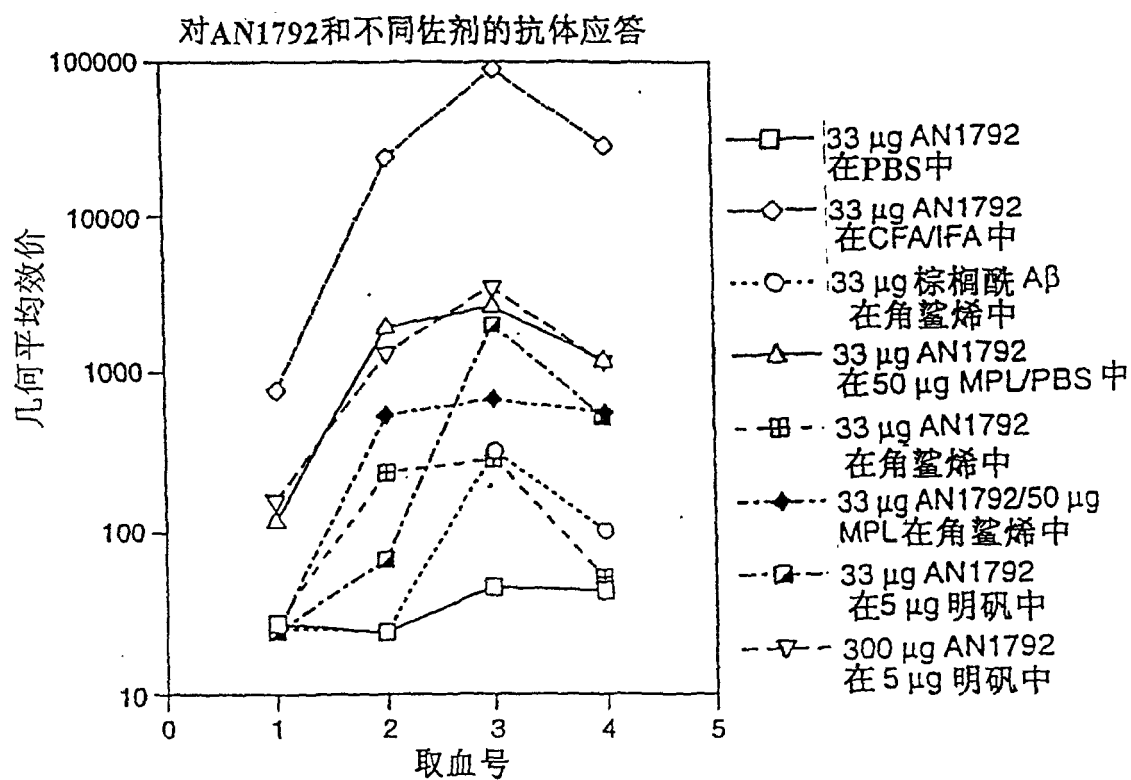
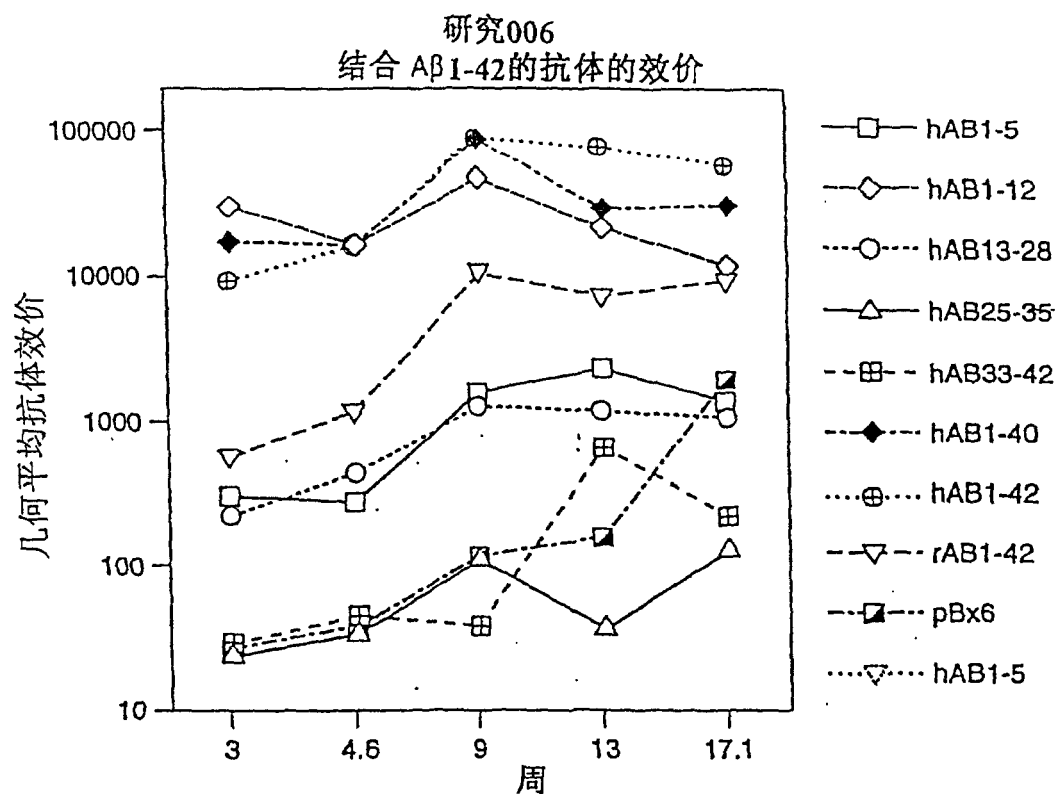


图12



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	2051	中值	1741
p 值(M-W)		p 值(M-W)	
平均值	2407	平均值	2140
标准偏差	1913	标准偏差	1659
% CV	79	% CV	78
p 值(t 检验)		p 值(t 检验)	
	n=20		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	1199	中值	475
p 值 (M-W)		p 值 (M-W)	0.0481
平均值	1552	平均值	637
标准偏差	1364	标准偏差	655
% CV	88	% CV	103
p 值 (t 检验)	n=21	p 值 (t 检验)	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)	n=15	p 值 (t 检验)	0.2650
			n=21

图15D

皮层

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

图15E

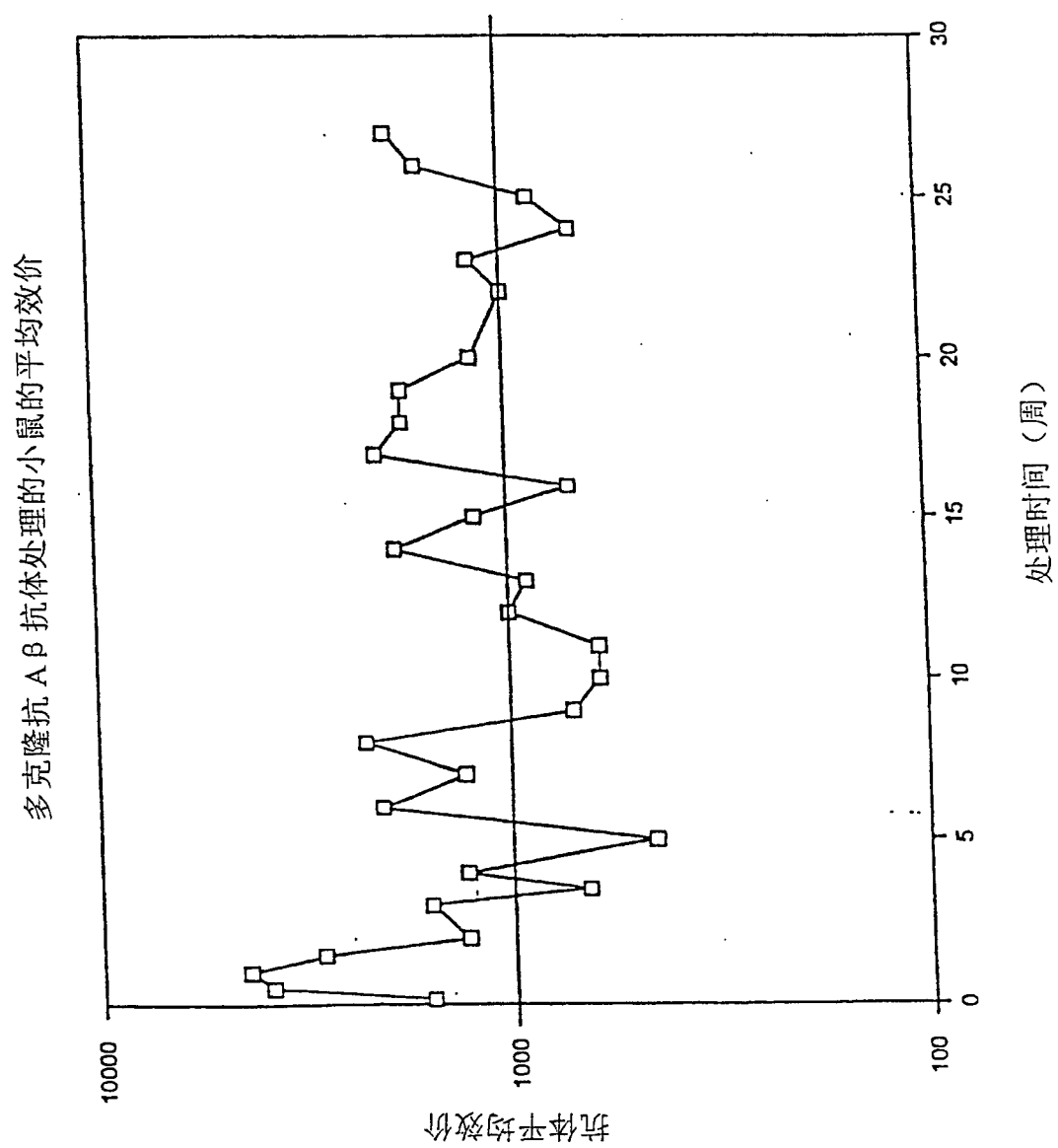


图 16

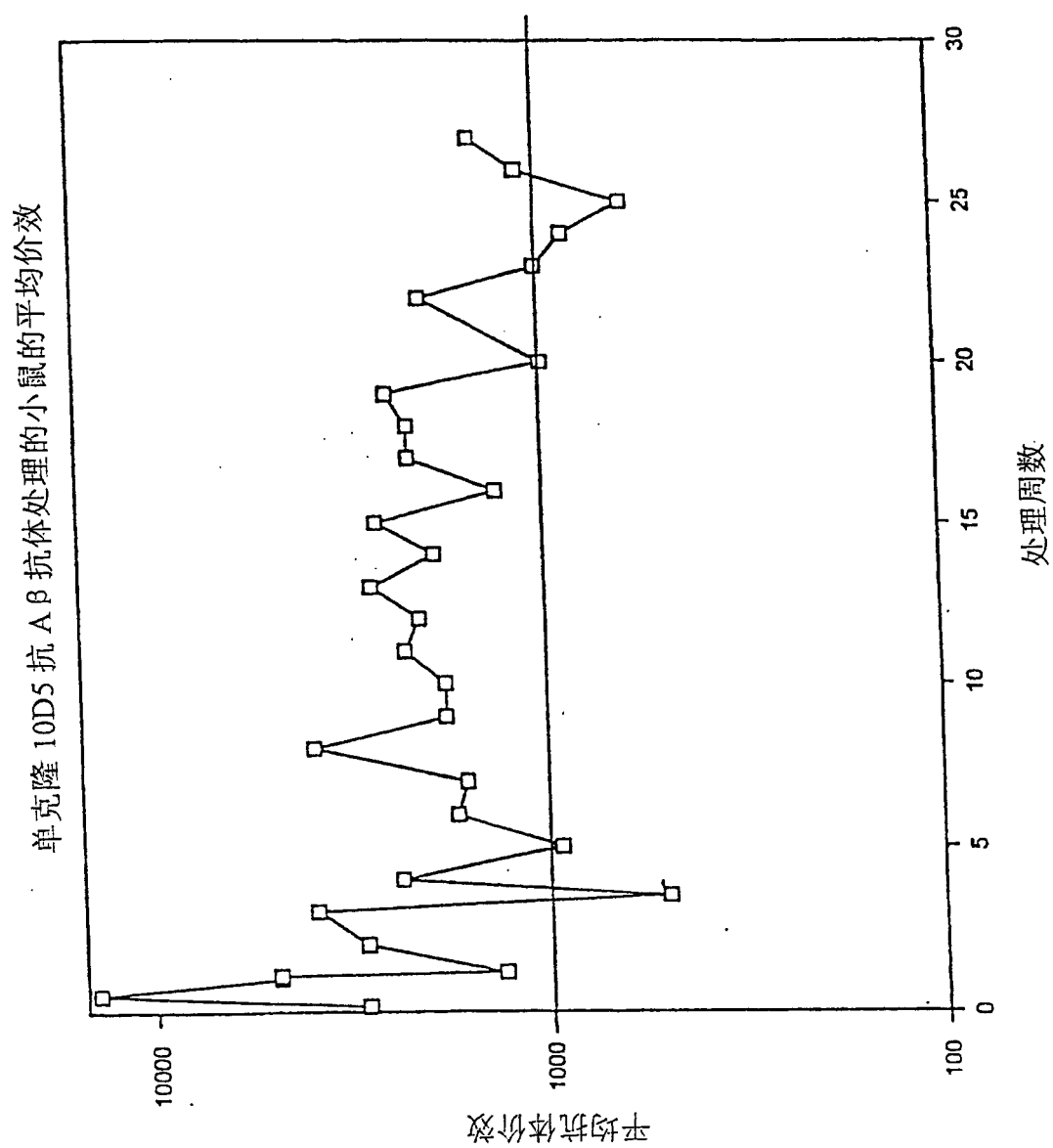


图 17

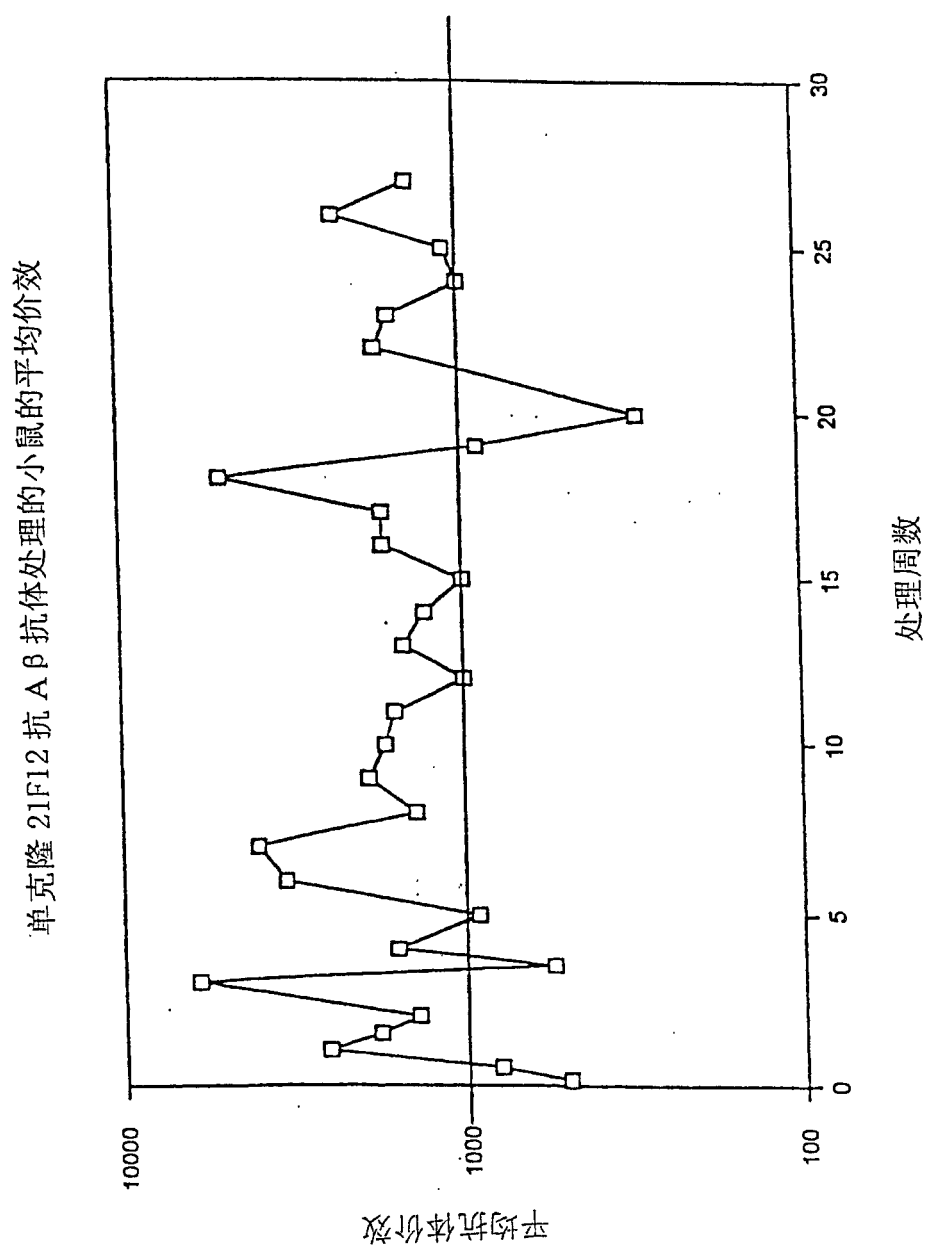


图 18

专利名称(译)	致淀粉样病的预防和治疗		
公开(公告)号	CN1814287A	公开(公告)日	2006-08-09
申请号	CN200510126945.9	申请日	2000-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	神经实验室有限公司		
申请(专利权)人(译)	神经实验室有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	神经实验室有限公司		
[标]发明人	戴尔B申克 弗雷德里克巴德 尼克J瓦斯克斯 特德耶德诺克		
发明人	戴尔·B·申克 弗雷德里克·巴德 尼克·J·瓦斯克斯 特德·耶德诺克		
IPC分类号	A61K39/395 A61K39/39 A61K38/17 A61P25/28 A61P25/00 G01N33/50 A61K38/00 A61K38/19 A61K39/00 A61K48/00 A61K49/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	C07K2317/34 A61K2039/55572 A61K2039/55555 C07K2319/00 A61K38/1709 A61K2039/605 A61K39/0005 C07K2317/77 A61K38/193 C07K16/18 G01N2800/2821 C07K14/4711 A61K2039/6037 A61K2039/55577 A61K39/0007 A61K2039/55505 A61K2039/53 A61K2039/505 A61K39/00 A61K2039/55566 A61P25/00 A61P25/28 C07K2317/70 Y02A50/412 A61K2300/00		
代理人(译)	杨青		
优先权	09/322289 1999-05-28 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了治疗与患者脑部A β 淀粉样沉积物相关之疾病的改进的治疗药物和方法。该方法包括给患者施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。优选的治疗药物包括A β 的N末端片段及与其结合的抗体。

