

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利, 申請日期: 案號: , 有 無主張優先權

美國	1997年12月2日	60/067,740	<input checked="" type="checkbox"/> 有主張優先權
美國	1998年4月7日	60/080,970	<input checked="" type="checkbox"/> 有主張優先權

有關微生物已寄存於: , 寄存日期: , 寄存號碼:

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

相關申請案之前後參照

本申請案優先權出自 U S S N 6 0 / 0 6 7 , 7 4 0 (1 9 9 7 年 1 2 月 2 日 申 請) 以 及 U S S N 6 0 / 0 8 0 , 9 7 0 (1 9 9 8 年 4 月 7 日 申 請) , 兩 案 全 部 內 容 併 為 本 案 之 參 考 資 料 。

技術領域

本發明係在於免疫及藥物之技術領域內。

背景

阿茲海默氏疾病 (A D) 係為造成老年性痴呆症之進行性疾病。一般見於: Selkoe, TINS 1 6 , 4 0 3 - 4 0 9 (1 9 9 3) ; Hardy et al., WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 5 3 , 4 3 8 - 4 4 7 (1 9 9 4) ; Duff et al., Nature 3 7 3 , 4 7 6 - 4 7 7 (1 9 9 5) ; Games et al., Nature 3 7 3 , 5 2 3 (1 9 9 5) . 廣義而言, 此疾病分為兩二類: 晚期發生-其發作於晚年 (6 5 歲以上) 以及早期發生-其在年老前 (亦即, 3 5 - 6 0 歲) 早已發作。此二類疾病之病理學均相同, 但早期發作之情況下, 異常情形較為嚴重且較普及。此疾病之特徵在於腦內之二種損害——老年斑及神經纖維糾結。老年斑係為腦組織切片之顯微鏡分析中可見及的與中央胞外致澱粉樣沉積交錯之多達 $150\ \mu\text{m}$ 的瓦解神經氈區域。神經纖維糾結係為由一對彼此交錯纖維

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(2)

所組成之 t a u 蛋白質的胞內沉積。

斑之主成分係為以 A β 或 β - 致澱粉樣肽為名之肽。A β 肽係以致澱粉樣先驅蛋白質 (A P P) 為名之先驅蛋白質的 3 9 - 4 3 胺基酸內在片段。A P P 蛋白質內之幾個突變已和阿茲海默氏疾病之存在有所關聯。見於，例如，Goate et al., Nature 3 4 9 , 7 0 4) (1 9 9 1) (Valine⁷¹⁷ to isoleucine) ; Chartier Harlan et al., Nature 3 5 3 , 8 4 4 (1 9 9 1)) (valine717 to glycine) ; Murrell et al., Science 254, 97 (1991) (valine 717 to phenylalanine) ; Mullan et al., Nature Genet. 1 , 3 4 5 (1 9 9 2) (改變賴胺酸 595-甲硫胺酸 596 成為門冬醯胺 5 9 5 - 白胺酸 5 9 6 之雙重突變) 。前述突變被認為是由於提高或改變 APP 之處理成 A β ，尤其是，A P P 之處理成較高量長形態 A β (亦即，A β 1 - 4 2 及 A β 1 - 4 3) 而引起阿茲海默氏疾病。在其他基因中之突變 (諸如，早老基因，P S 1 及 P S 2) 被認為是間接影響 A P P 之處理而產生較高量長形態 A β (見於 Hardy, TINS 2 0 , 1 5 4 (1 9 9 7)) 。這些觀察指出 A β (尤其是長形態) 是阿茲海默氏疾病之起因。

McMichael (E P 5 2 6 , 5 1 1) 提議投服類似劑量 (小於或等於 1 / 1 0 0 m g / d a y) A β 至預先發作阿茲海默氏疾病 A D 之病人。在具有 5 升血漿之一般人中，甚至此一劑量之上限亦預期產生不大於 2 p g / m l 之濃度。人體血漿中之 A β 正常濃度通常係在 5 0 -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(3)

2 0 0 p g / m l 範圍內 (Seubert et al., Nature 3 5 9 , 3 2 5 - 3 2 7 (1 9 9 2)) 。 因為 E P 5 2 6 , 5 1 1 所提出之劑量幾乎不能改變 A β 之內在循環值且 E P 5 2 6 , 5 1 1 不推薦使用佐助劑，所以，似乎不可能獲致任何治療效益。

相反地，本發明係關於藉由在使病人產生有利免疫反應之情況下，投服 A β 或其他免疫原至病人以治療阿茲海默氏疾病及其他致澱粉樣變性病。本發明因而達到了有關預防或消除阿茲海默氏疾病之神經病理學治療法的長久以來需求。

本發明總論

一方面，本發明係提供預防或治療病人之以致澱粉樣沉積為特徵之疾病。此等方法使能減少病人對致澱粉樣沉積之肽成分的免疫反應。前述降低可藉由投服免疫原而予以活化或投服抗體或抗體之活性片段或衍生物而予以鈍化。在某些病人中，致澱粉樣沉積係為凝集之 A β 肽而疾病係為阿茲海默氏疾病。在某些方法中，病人是無症狀的。在某些方法中，病人年齡小於 5 0 歲。在某些方法中，病人具有易罹患阿茲海默氏疾病之遺傳性危險因子。前述危險因子包括在早老基因 P S 1 或 P S 2 中的各種對偶值以及各種形態之 A P P 。在其他方法中，病人並沒有任何阿茲海默氏疾病之已知危險因子。

有關罹患阿茲海默氏疾病之病人的治療，一種治療法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(4)

是為投服一劑量之 A β 肽至病人以誘起免疫反應。在某些方法中，A β 肽係與用以增強對 A β 肽之免疫反應的佐助劑一起投服。在某些方法中，佐助劑係為明礬。在某些方法中，佐助劑係為 M P L。投服至病人之 A β 肽劑量通常為至少 1 或 10 μ g (若與佐助劑一起投服的話) 及為至少 50 μ g (若未與佐助劑一起投服的話)。在某些方法中，此劑量為至少 100 μ g。

在某些方法中，A β 肽是為 A β 1 - 42。在某些方法中，A β 肽係以凝集形態投服。在其他方法中，A β 肽係以解離形態投服。在某些方法中，治療劑是有效劑量之編碼 A β 的核酸或其活性片段或衍生物。編碼 A β 之核酸或其片段係表現於病人體內以產生 A β 或其活性片段 (其誘起免疫反應)。在某些前述方法中，核酸係經皮膚投服，隨意地經由貼片。在某些方法中，治療劑係藉由篩選同系化合物以辨識出可與 A β 抗體產生反應之化合物，再投服此化合物至病人以誘起免疫反應。

在某些方法中，免疫反應係針對凝集之 A β 而不針對解離之 A β 。例如，免疫反應包括 T - 細胞，該 T - 細胞係結合至與 C D 8 或 C D 4 細胞上之 M C H 1 或 M H C I I 錯合的 A β 上。在其他方法中，免疫反應係由投服 A β 之抗體至病人而誘起。在某些方法中免疫反應係藉由移除病人之 T - 細胞，在 T - 細胞已接觸抗原之情況下，令 T - 細胞與 A β 肽接觸，再取代病人之 T - 細胞。

治療劑通常是經口，經鼻內，經皮內，經皮下，經肌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(5)

肉，局部或靜脈內投服。在某些方法中，在投藥後監視病人以評估免疫反應。若監視中顯示出免疫反應在此時間內降低的話，則投服額外之一或更多劑量的藥劑予病人。

另一方面，本發明係提供包含 A β 以及適供經口或其他投藥途徑之佐助劑的藥學組成物。本發明亦提供包含可有效降低病人對 A β 之免疫反應的藥劑以及藥學上可接受佐助劑的藥學組成物。在某些前述組成物中，藥劑是 A β 或其活性片段。在某些組成物中，佐助劑包含明礬。在某些組成物中，佐助劑包含油在水中型乳液。在某些組成物中，A β 或活性片段是聚交酯聚乙交酯共聚物或其他分子之一成分。本發明還提供包含連接至可促進 A β 輸送至病人血流中和／或促進對 A β 之免疫反應的共軛分子上的 A β 或其活性片段之組成物。例如，共軛體可供促進對 A β 之免疫反應。在某些組成物中，佐助劑係為霍亂毒素。在某些組成物中，共軛體係為免疫球蛋白。在某些組成物中，共軛體係為減弱之白喉毒素 C R M 1 9 7 (Gupta, Vaccine 1 5, 1 3 4 1 - 3 (1 9 9 7)) 。

本發明亦提供包含可有效降低病人對 A β 之免疫反應的藥劑之組成物，唯其先決條件為此組成物不含 Complete Freund's 佐助劑。本發明亦提供包含編碼 A β 或其活性片段之病毒載體的有效降低對 A β 之免疫反應的組成物。適當之病毒載體包括疱疹，腺病毒，腺伴隨病毒，逆病毒，辛德畢斯病毒 (sindbis)，西門利克森林 α 病毒 (semiliki forest virus)，牛痘或禽痘 (avian pox) 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(6)

本發明還提供預防或治療阿茲海默氏疾病的方法。在此等方法中，投服有效劑量之 A β 肽給病人。本發明還提供 A β 或其抗體在製造預防或治療阿茲海默氏疾病用藥物方面的用途。

在另一方面，本發明提供一種評估阿茲海默氏疾病治療法對病人之效力大小的方法。在這些方法中，基底數量之對 A β 且專一性的抗體係在病人用藥劑治療前取得之組織樣本中測定。再以病人使用藥劑治療後取得之組織樣本中的對 A β 具專一性之抗體數量與 A β 肽-專一性抗體之基底數量相比較。治療後測得之 A β 肽-專一性抗體數量遠大於其基底數量代表正面治療結果。

在其他評估阿茲海默氏疾病治療法對病人之效力大小的方法中，測定在病人用藥劑治療前取得之組織樣本中的 A β 肽-專一性抗體的基底數量。再以病人使用藥劑治療後取得之組織樣本中的對 A β 具專一性之抗體數量與 A β 肽-專一性抗體之基底數量相比較。治療後測得之 A β 肽-專一性抗體數量與其基底數量相較下，若其數量降低或無顯著差異，則代表負面治療結果。

在其他評估阿茲海默氏疾病治療法對病人之效力大小的方法中，測定由對照組取得之組織樣本中，A β 肽-專一性抗體的對照數量。再以病人使用藥劑治療後取得之組織樣本中的對 A β 具專一性之抗體數量與 A β 肽-專一性抗體之對照數量相比較。治療後測得之 A β 肽-專一性抗體數量遠大於其對照數量代表正面治療結果。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(7)

在其他評估阿茲海默氏疾病治療法對病人之效力大小的方法中，測定由對照組取得之組織樣本中，A β 肽-專一性抗體的對照數量。再以病人使用藥劑治療後取得之組織樣本中的對A β 具專一性之抗體數量與A β 肽-專一性抗體之對照數量相比較。治療後測得之A β 肽-專一性抗體數量與其對照數量間缺乏顯著差異代表負面治療結果。

其他監視病人之阿茲海默氏疾病或其易感性的方法包括偵測由病人取得之樣本對A β 肽的免疫反應。在某些前述方法中，病人經投服有效治療或預防阿茲海默氏疾病之藥劑，再由反應大小決定病人之進一步治療法。

在其他評估阿茲海默氏疾病治療法對病人之效力大小的方法中，測定病人使用藥劑治療後取得之組織樣本中的對A β 具專一性之抗體數量值。此數量值再與由使用藥劑治療而歷經改善或消除阿茲海默氏疾病徵狀之病人組取得的對照值相比較。病人之此數量值至少等於對照值代表正面治療反應。

附圖之簡要說明

附圖 1：用 A β 1 - 4 2 注射突變鼯鼠後之抗體滴定度。

附圖 2：海馬內之致澱粉樣負荷。致澱粉樣斑佔據之海馬區的面積百分比（藉由與 A β - 專一性 m A β 3 D 6 之反應性定義）係由免疫反應之腦部的電腦協助定量影像分析測得。每一鼯鼠之值係以治療組分類示出。每一群組

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(8)

之水平線代表分布之中間值。

附圖 3：海馬內之神經突失養症。神經突失養症占有之海馬區的面積百分比（藉由與人類 A P P - 專一性 m A β 8 E 5 之反應性定義）係由免疫反應之腦部的電腦協助定量影像分析測得。每一鼯鼠之值係以 A N 1 7 9 2 治療組及 P B S 治療對照組示出。每一群組之水平線代表分布之中間值。

附圖 4：逆脾皮質（retrosplenic cortex）內之星形細胞增多症。神經膠質之纖維酸性蛋白質（G F A P）- 陽性星形細胞增多症佔據之海馬區的面積百分比係由免疫反應之腦部的電腦協助定量影像分析測得。每一鼯鼠之值係以治療組分類示出且每一群組之水平線代表分布之中間值。

附圖 5：在使用 0 . 1 4 , 0 . 4 , 1 . 2 , 3 . 7 , 1 1 , 3 3 , 1 0 0 , 或 3 0 0 μ g 八種劑量範圍內之 A N 1 7 9 2 免疫後，對 A β 1 - 4 2 的幾何平均抗體滴定度。

附圖 6：抗體對 A N 1 7 9 2 免疫作用之反應動力學。滴定度係以每一組中，6 隻動物之幾何平均值表示。

附圖 7：在經 P B S - 及 A N 1 7 9 2 - 治療之鼯鼠中，皮質致澱粉樣負荷之定量影像分析。

附圖 8：在經 P B S - 及 A N 1 7 9 2 - 治療之鼯鼠中，神經突斑負荷之定量影像分析。

附圖 9：在經 P B S - 及 A N 1 7 9 2 - 治療之鼯鼠

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (10)

線時 (諸如 , 藉由染色體斷裂程式或使用短少染色體斷裂重量之 BESTFIT) , 至少 65 % 序列相同 , 宜為至少 80 或 90 % 序列相同 , 更宜為至少 95 % 或以上 (例如 , 99 % 或以上) 之序列相同。更理想的是 , 不相同之殘基位置僅為保留性胺基酸取代所造成之差異而已。

對序列比較而言 , 通常係以一序列作為參考序列而以其與測試序列相比較。當使用序列比較計數法時 , 測試與參考序列被輸入電腦中 , 再命名序列位置。序列比較計數法再計算測試序列與參考序列之序列相同百分比 (根據設定之程式參數) 。

序列在比較時之較理想排列成線可藉由 , 例如 , Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2 : 482 (1981) 之局部同源染色體計數法 , Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48 : 443 (1970) 之同源染色體排列成線計數法 , Pearson & Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85 : 2444 (1988) 之類比方法研究 , 這些計數法之電腦運算 (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA, in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) , 或肉眼檢視 (一般見於 Ausubel et al., 同上) 進行。一般而言 , 縱使亦可使用訂製之參數 , 但可使用短少程式參數法進行序列比較。

為了區分胺基酸取代係為保留性或非保留性 , 將胺基酸分組如下 : 第 I 組 (疏水性側鏈) : 正亮胺酸 , 甲硫胺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(11)

酸，丙胺酸，纈胺酸，亮胺酸，異亮胺酸；第 I I 組（中性親水性側鏈）：半胱胺酸，絲胺酸，蘇胺酸，第 I I I 組（酸性側鏈）：天冬胺酸，麩胺酸；第 I V 組（鹼性側鏈）：a s n，葡胺酸，組胺酸，賴胺酸，精胺酸；第 V 組（殘基影響側鏈方位）：甘胺酸，脯胺酸；及第 V I 組（芳族側鏈）：色胺酸，酪胺酸，苯丙胺酸。保留性取代涉及在同組胺基酸間之取代。非保留性取代則係不同組胺基酸間之取代。

本發明之治療劑通常是實際上純一的。此意指該藥劑通常至少約 50% w/w（重量/重量）純度，以及實際上不含干擾蛋白質及雜質。有時，此藥劑為至少約 80% w/w，且更宜為至少約 90% w/w 或約 95% w/w。但是，使用傳統之蛋白質純化技術可得到至少 99% w/w 之同源肽。

二實體間之專一性結合意指至少 10^6 ， 10^7 ， 10^8 ， 10^9 ，或 $10^{10} M^{-1}$ 之親和力。大於 $10^8 M^{-1}$ 之親和力是較理想的。

“抗體”一詞係用以包括完整抗體及其結合片段。通常，片段與其所衍生的完整抗體相競爭以結合至抗原。任意地，抗體或其結合片段可與其他蛋白質化學共軛至，或表現為融合蛋白質。

A P P 6 9 5，A P P 7 5 1，及 A P P 7 7 0 各別代表人類 A P P 基因編碼之 6 9 5，7 5 1 及 7 7 0 胺基酸殘基長多肽。見於 Kang, et al., Nature 3 2 5, 7 7 3 (

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (12)

1 9 8 7) ; Ponte et al., Nature 331,525 (1988) ; 及 Kitaguchi et al., Nature 331, 530 (1988) 。在人類致澱粉樣先驅蛋白質 (A P P) 間之胺基酸係根據 A P P 7 7 0 異構形態之序列指定號碼。諸如, A β 3 9 , A β 4 0 , A β 4 1 , A β 4 2 及 A β 4 3 之用語係指包含胺基酸殘基 1 - 3 9 , 1 - 4 0 , 1 - 4 1 , 1 - 4 2 及 1 - 4 3 的 A β 肽。

” 抗原決定基 ” 或 ” 抗原決定子 ” 係指 B 和 / 或 T - 細胞反應之抗原位置。B - 細胞抗原決定基可由蛋白質之第三褶並列的連續胺基酸或非連續胺基酸形成。由連續胺基酸形成之抗原決定基通常在曝露於變性溶劑下時仍保持不變而由第三褶形成之抗原決定基通常在變性溶劑處理下喪失。抗原決定基通常包含至少 3 , 且通常更多, 至少 5 或 8 - 1 0 個胺基酸於獨一空間構形中。決定抗原決定基之空間構形的方法包括, 例如, X - 射線結晶法及 2 - 維核磁共振。見於, 例如, Epitope, Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 Glenn E. Morris, Ed. (1 9 9 6) 。識別相同抗原決定基之抗體可於示出一抗體阻止另一抗體結合至標的抗原之能力的簡單免疫分析法中辨識出來。T - 細胞識別 C D 8 之 9 個胺基酸或第 C D 4 細胞之約 1 3 - 1 5 個胺基酸的連續抗原決定基。識別抗原決定基之 T - 細胞可藉由測定抗原 - 相依性增殖作用之體外分析法辨識出, 如同藉由與抗原決定基反應之已和抗原接觸的 T - 細胞的 3 H - 胸腺核苷併入法 (Burke

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (13)

et al., J. Inf. Dis. 170, 1110-19 (1994)) , 藉由抗原 - 相依性殺死 (cytotoxic T lymphocyte assay, Tigges et al., J. Immunol. 156, 3901-3910) 或胞質分泌法測定。

” 免疫的 ” 或 ” 免疫 ” 反應用語是針對接受病人之致澱粉樣肽的有利體液 (抗體媒介) 和 / 或細胞 (由抗原專一性 T - 細胞或其分泌產物所媒介) 反應的發展。此一反應可為藉由投服免疫原而引起之主動反應或為藉由投服抗體或已接觸抗原之 T - 細胞而引起之被動反應。細胞免疫反應係由多肽抗原決定基以及第 I 類或第 II 類 MHC 分子之存在以活化抗原 - 專一性 CD4 + 協助者細胞和 / 或 CD8 + 胞毒性 T - 細胞而証實。反應亦涉及單核細胞, 巨噬體, NK 細胞, 嗜鹼細胞, 樹突細胞, 星形膠質細胞, 小神經膠細胞, 嗜曙紅細胞或其他遺傳免疫成分的活化。細胞 - 媒介之免疫反應可藉由增殖性分析 (CD4 + T - 細胞) 或 CTL (胞毒性 T 淋巴球) 分析 (見於 Burke, 同前; Tigges, 同前) 測得。體液及細胞對免疫原之保護或治療作用的相對反應貢獻可藉由分別從經免疫之同基因動物分離出 IgG 及 T - 細胞並測定第二個體中之保護或治療作用。

” 免疫之藥劑 ” 或 ” 免疫原 ” 在投服 (任意地綜合佐助劑) 至病人時, 可引起對其本身的免疫反應。

” 裸露之聚核苷酸 ” 一詞係指未錯合膠質物質之聚核苷酸。裸露之聚核苷酸有時在質粒載體中無性繁殖。

五、發明說明（14）

“佐助劑”一詞係指在與抗原綜合投服時，可增強對抗原之免疫反應，但在單獨投服時，不產生對抗原之免疫反應的化合物。佐助劑可藉由幾種機轉來增強免疫反應，其機轉包括淋巴球反射增進，B及T—細胞之刺激，以及巨噬體之刺激。

“病人”一詞包括接受預防及治療之人類及其他哺乳類。

不凝集或單體的A β 意指A β 之可溶性單體肽。製備單體A β 之一方法是為利用超音波溶解低壓凍乾肽於純的DMSO中。離心所得溶液以移除任何不可溶之顆粒。凝集之A β 是為寡聚體混合物，其中，單體單元係藉由非共價鍵結維繫在一起。

“包括”一或更多所述及元素之組成物或方法可能包括其他未述及之元素。例如，包含A β 肽之組成物涵括分離出之A β 肽及較大多肽序列之一成分的A β 肽。

詳細說明

I. 通論

本發明提供用以預防及治療以致澱粉樣沉積聚集為特徵之疾病的藥學組成物及方法。致澱粉樣沉積包括凝集成不可溶塊體之肽。肽之性質因不同疾病而異，但在大多數情況下，凝集物具有 β -褶薄層構造且可用剛果紅染料染色。以致澱粉樣沉積為特徵之疾病包括阿茲海默氏疾病（AD），涵括晚期及早期發生兩者。在二種疾病中，致澱

五、發明說明 (15)

粉樣沉積包括以 A β 為名之肽，其積聚於罹病個體之腦部內。某些以致澱粉樣沉積為特徵之其他疾病實例為 S A A 澱粉樣變性病，遺傳性冰島徵候群，多發性骨髓瘤，及海棉狀腦病 ---其包括狂牛症，Creutzfeldt Jakob 疾病，羊搔癢症，及貂海棉狀腦病（見於 Weissmann et al., Curr. Opin. Neurobiol. 7, 695 - 700 (1997) ; Smith et al., Veterinary Quarterly 19, 101 - 105 (1997) ; Nathanson et al., Am. J. Epidemiol. 145, 959 - 969 (1997))。在這些疾病中形成凝集體之肽係為血清致澱粉樣 A, cysantin C, IgG kappa 輕鏈，其分別為他者之前三個 prion 蛋白質。

I I . 治療

1 . 阿茲海默氏疾病

用於本發明之治療劑包括對抗 A β 之免疫反應。這些藥劑包括 A β 肽本身) 及其變體，同系物及擬態物 (mimetics) ---其誘起和 / 或與抗體交叉反應而成 A β 肽。當投服免疫原以誘起抗體或 T-細胞與病人體內之 A β 反應時是為主動的免疫反應而當投服本身結合至病人體內之 A β 的抗體時是為被動的免疫反應。

A β ，亦稱為 β - 致澱粉樣肽，或 A 4 肽（見於 US46666829; Glenner & Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 1131 (1984)) 是 39 - 43 之肽，其係為阿茲海默氏疾病之特性斑的主成分。A β 係

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (19)

白質或融合蛋白質以展現肽。在此等方法中所用之病毒或細菌必須是非致病原的或被減弱的。適當病毒包括腺病毒，H S V，牛痘及禽痘。融合至H B V之H b s A g的免疫原肽是最適當的。治療劑亦包括不需具有類似A β 之重要胺基酸序列，但可充作A β 之模仿體而誘起類似免疫反應的肽類及其他化合物。例如，任何形成 β -褶薄層之肽類及蛋白質可依適用性篩選。亦可使用對抗A β 或其他致澱粉樣肽以單株抗體為對比的非遺傳性型抗體。此等非遺傳性型抗體模仿抗原而產生對抗原之免疫反應（見於Essential Immunology (Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 6th ed.) P. 181)。

肽類或其他化合物之自由基因庫亦可依適用性篩選。 β 組合基因庫可供多種可以一步一步方式合成之化合物。前述化合物包括多肽， β -轉折模仿體，多糖類，磷脂，荷爾蒙，前列腺素，膽固醇，芳族化合物，雜環化合物，苯並二氮雜草，N-經取代甘胺酸齊聚物及寡胺基甲酸鹽。化合物之大組合物基因庫可由Affymax, W O 9 5 / 1 2 6 0 8, Affymax, W O 9 3 / 0 6 1 2 1, Columbia University, W O 9 5 / 3 0 6 4 2 (每一者均併為本發明之參考資料)中所述之編碼合成基因庫(E S L)方法構造出。肽類基因庫亦可由噬菌體顯示方法產生。見於，例如，Devlin, W O 9 1 / 1 8 9 8 0。

組合物基因庫及其他化合物先藉由測定它們結合已知對A β 或其他致澱粉樣肽具專一性之抗體動淋巴細胞(B

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(20)

或 T) 的能力進行適用性篩選。例如，初始篩選可用 A β 之任何多株血清或多株抗體或其他致澱粉樣肽進行。由此篩選辨識出之化合物再進一步分析其誘使抗體或反應性淋巴細胞變成 A β 或其他致澱粉樣肽的能力。例如，血清之多重稀釋液可於預先塗布 A β 肽之微量滴定板上測試並可進行標準 E L I S A 以測定抗體對 A β 之反應性。再如實例中所述地測定化合物在預先罹患致澱粉樣變性病之導入外來基因的動物中之預防或治療效力。前述動物包括，例如，Games et al., (同上) 所述之具有 A P P 之 7 1 7 突變的鼯鼠，以及 McConlogue et al., U S 5 6 1 2 4 8 6 及 Hsiao et al., Science 274, 99 (1996); Staufenbiel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9 4, 1 3 2 8 7 - 1 3 2 9 2 (1997); Borchelt et al., Neuron 1 9, 9 3 9 - 9 4 6 (1997)) 中所述之具有 Swedish 突變的鼯鼠。

本發明之治療劑亦包括與 A β 專一性結合之抗體。前述抗體可為單株或多株抗體。某些前述抗體專一性結合至凝集形態之 A β 而不與解離形態結合。某些則專一性結合解離形態而不結合凝集形態。某些則與解離形態及凝集形態均可結合。非人類(例如，鼠科動物或家鼠)單株抗體之產製可由，例如，用 A β 使動物免疫而完成。見於 Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988) (併為本發明之參考資料)。此一免疫原可由天然來源或由肽類合成方法或重組物表現法取得。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (21)

人類化形態之鼯鼠抗體可藉由重組 D N A 技術連接非人類抗體之 C D R 部分至人類固定部分而產生。見於 Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 86, 10029-10033 (1989) 及 W O 90 / 07861 (併為本發明之參考資料)。

人類抗體可使用巨噬體 - 顯示方法取得。見於，例如，Dower et al., w o 91 / 17271 ; McCafferty et al., W O 92 / 01047。在這些方法中，巨噬體之基因庫係以各成分顯示不同抗體於其外表面上製成。抗體經常顯示為 F v 或 F a b 片段。具有所需專一性之巨噬體顯示抗體係藉由富含 A β 或其片段的親和力作選擇。對抗 A β 之人類抗體亦可由具有編碼至少一段人類免疫球蛋白區及去活化內源粘免疫球蛋白區之導入外來基因的非人類導入外來基因之哺乳類。見於，例如，Lonberg et al., W O 93 / 12227 (1993) ; Kucherlapati, W O 91 / 10741 (1991) (其均併為本發明之參考資料)。人類抗體可藉由競爭性結合實驗或其他方法選擇以具有如同特定鼯鼠抗體之相同抗原決定基專一性。此等抗體最易於分享鼯鼠之有用功能性質。人類多株抗體亦可以使用免疫原試劑免疫之人類血清形態提供。任意地，前述多株抗體可藉由使用 A β 或其他致澱粉樣肽作為親和劑之親和力純化方法予以濃縮。

人類或人類化抗體可被設計成具有 I g G , I g D , I g A 及 I g E 固有區，以及任何抗原決定基，其包括

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (22)

I g G 1 , I g G 2 , I g G 3 及 I g G 4 。 抗體可被表現為包含二輕鏈及二重鏈之四聚物，分開之重鏈，輕鏈，F a b , F a b ' F (a b ') 2 及 F v , 或為單鏈抗體，其中，重及輕鏈可變區係經由間隔基連接。

本方法中所用之治療劑亦包含結合至 A β 之 T - 細胞。例如，T - 細胞可藉由從昆蟲細胞系表現人類 M H C 第 I 類基因與人類 β - 2 - 小球蛋白基因而使空的複合物形成於細胞表面上而可結合至 A β 肽上，因此對 A β 肽具有活性。與細胞系接觸之 T - 細胞變成對肽具有專一活性。見於 Peterson et al., U S 5 3 1 4 8 1 3 。表現 M H C 第 I I 類抗原之昆蟲細胞系可類似地用以活化 C D 4 T 細胞。

2 . 其他疾疾

相同或類似的原理決定治療其他致澱粉樣變性病之治療劑的製備。一般而言，以上所示用以治療阿茲海默氏疾病之藥劑亦可用以治療伴隨 Down's 氏症候群之早期發作阿茲海默氏疾病。在狂牛病中，使用 Prion 肽，活性片段及同系物以及 prion 肽之抗體取代阿茲海默氏疾病治療中之 A β 肽，活性片段及同系物以及 A β 肽之抗體。在多發性骨髓瘤之治療中、使用 I g G 輕鏈及其同系物與抗體，其他疾病亦然。

3 . 載體蛋白質

五、發明說明 (23)

某些誘起免疫反應之藥劑包含誘起對抗致澱粉樣沉積之免疫反應，但太小而不為免疫原的適當抗原決定基。在此情況下，肽免疫原可被連接至適當載體上以協助產生免疫原。適當載體包括血清白蛋白，keyhole limpet血藍質，免疫球蛋白分子，甲狀腺球蛋白，卵白蛋白，破傷風毒素或來自其他致病細菌（諸如，白喉毒素，大腸桿菌，霍亂弧菌或H. pylori）之毒素或減弱之毒素衍生物。其他刺激或增強免疫反應之載體包括細胞質（諸如，IL-1，IL-1 α 及 β 肽類，IL-2， γ INF，IL-10，GM-CSF）及化學激素（諸如，M1P1 α 及 β 與RANTES）。

免疫劑可藉由化學交聯連接至載體上。連接免疫原至載體上之技術包括使用N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基-硫代)丙酸鹽(SPD P)及琥珀醯亞胺基酸4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸鹽(SMCC)（若肽缺乏硫氫基，則此可由加入半胱胺酸提供）形成二硫化物鏈結。這些試劑產生在其本身與一蛋白質上之半胱胺酸間的二硫化物鏈結以及多經由賴胺酸上之 ϵ -胺基或其他胺基酸中之解離胺基的醯胺鏈結。多種前述二硫化物/醯胺-形成劑揭示於Immun. Rev. 62, 185 (1982)。其他二官能基偶合劑形成硫醚而非二硫化物鏈結。許多這些硫醚形成劑係為市面上買得到的且其包括6-馬來醯亞胺基己酸，2-溴基乙酸及2-碘基乙酸，4-(N-馬來醯亞胺基-甲基)環己烷-1-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (24)

甲酸之反應性酯類。羧基可由結合琥珀醯亞胺或 1 - 羥基 - 2 - 硝基 - 4 - 磺酸，鈉鹽而予活化。

免疫原肽亦可用載體表現為融合蛋白質。免疫原肽亦可連接至載體之胺基終端，羧基終端或內部。任意地，免疫原肽之多次重複可存在於融合蛋白質內。

4 . 核酸編碼免疫原

對抗致澱粉樣沉積之免疫反應亦可藉由投服核酸編碼 A β 肽或其他肽免疫原而誘起。前述核酸可為 D N A 或 R N A 。編碼免疫原之核酸段通常連接至調節元素（諸如，促進子及增強子）上而令 D N A 段表現於病人之標的細胞內。爲了表現於血液細胞內，如同誘起免疫反應所需地，促進子及增強子元素（來自輕或重鏈免疫球蛋白基因）或 C M V 主要中間體早期促進子及增強子適供直接表現。連接之調節元素及編碼序列經常被植入載體內。

多種病毒載體系統可供使用，其包括逆病毒系統（見於，例如，Lawrie and Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102 - 109 (1993)）；腺病毒載體（見於，例如，Bett et al., J. Virol. 67, 5911 (1993)）；腺結合病毒載體（見於，例如，Zhou et al., J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)），來自包括疫苗病毒及禽痘病毒之痘族的病毒載體，來自 α 病毒屬（諸如，源自 Sindbis 及 Semliki 森林病毒（見於，例如，Ohe et al., J. Virol. 70, 508 - 519 (1996)），及乳頭

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(25)

狀瘤病毒 (Ohe et al., Human Gene Therapy 6, 325-333 (1995); Woo et al., WO 94/12629 及 Xiao& Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622 (1996)) 之病毒載體。

編碼免疫原之 DNA 或含彼之載體可被併入微脂粒中。適當之微脂粒及相關同系物揭示於 US 5208036, 5264618, 5279833 及 5283185 中。編碼免疫原之載體及 DNA 亦可被特定載體吸收或相結合。其實例包括聚異丁烯酸甲酯聚合物及聚內交酯及聚(內交酯-共同-乙交酯), 見於, 例如, McGee et al, m J. Micro Encap. (1996)。

基因治療載體或裸露 DNA 可以藉由投服至個別病人而在體內輸送, 其通常藉由全身性投服(例如, 靜脈內, 腹膜內, 鼻內, 胃內, 真皮內, 肌內, 皮下、或顱內輸液)或局部投服(見於, 例如, US 5399346)。DNA 亦可使用基因槍投服。見於 Xiao&Brandsma, 同上。編碼免疫原之 DNA 係沈澱至極小的金屬珠表面上。微投射物再以震動波或擴散氦氣加速, 再穿透組織至幾個細胞層深。例如, Agacetus, Inc. Middleton WI 製造之 Accel™ Gene DeliverDevice 是適用的。或者, 裸露 DNA 可簡單地藉由使用化學或機械刺激以將 DNA 放置於皮膚上而通過皮膚進入血流中(見於 WO 95/05853)。

在其他變化中, 編碼免疫原之載體可被傳送至體外細

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (26)

胞，諸如，由個別病人外在植入之細胞（例如，淋巴球，骨髓抽取液，活體組織檢查）或全適供血者造血幹細胞，隨之再移植此細胞至病人體內，經常在選擇已併入載體之細胞以後。

I I I . 可治療之病人

可治療之病人包括具有罹病危險性，然未出現病徵之個體以及已出現病徵之病人。在阿茲海默氏疾病情況下，若活得夠久的話，則實際上任何人均有罹病的危險性。因此，本方法可用以避免一般人罹患該疾病之危險性而得預防之效果。本方法基本上係對已具有阿茲海默氏疾病已知遺傳危險性的病人有用。前述個體包括已罹患該疾病之病人親屬以及具有已由遺傳或生化標記之分析測出危險性的人。罹患阿茲海默氏疾病危險性之遺傳性標記包括在 A P P 基因內之突變，尤其是在分別被稱為 Hardy 及 Swedish 突變之位置 7 1 7 與位置 6 7 0 及 6 7 1 上之突變（見於 Hardy, TINS, 同上）。危險性之其他標記係為在 A D，高膽固醇血症或粥狀動脈硬化症之早老基因（P S 1 及 P S 2）皮 A p o E 4 家族歷史中之突變。已罹患阿茲海默氏疾病之個體可從特性痴呆及上述之危險因子的存在辨識出。此外，許多診斷測試可供辨識罹患阿茲海默氏疾病之個體。這些包括 C S F t a u 及 A β 4 2 值之測定。高 t a u 及低 A β 值證明阿茲海默氏疾病之存在。罹患阿茲海默氏疾病之個體亦可由實例部分中論及之 M M S E 及

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (27)

A D R D A 評估準則診斷出。

在無徵狀病人中，治療可開始於任何年齡（例如，10，20，30）。但通常直到病人達到40，50，60或70歲時才開始治療。治療通常是在一段時間內予以多重投藥。治療可藉由評估在投藥期間內之抗體，或經活化T-細胞或B-細胞對治療劑（例如，Aβ肽）之反應。若反應降低則需追加劑量。在潛在唐氏（Down's）症候群病人中，治療可於出生前投服至母體或一出生即予投藥。

I V . 治療用藥法

在預防性用途中，藥學組成物或藥物係以足以消除或減低危險性或延緩疾病發作之數量投服至易於罹患特定疾病或具有危險性之病人。在治療用途中，組成物或藥物係以足以治療或至少部分地遏止疾病及其併發症之症狀的數量投服至疑似罹患或已罹患此一疾病之病人。適供投服之數量定義為治療-或藥學-有效劑量。在預防及治療兩種用藥法中，藥劑經常以多劑量投服直到獲致足夠免疫反應為止。通常，監視免疫反應而若免疫反應開始減低時給予重複劑量。

本發明組成物治療上述症狀之有效劑量係隨多種不同因素而變化，前述因素包括投藥途徑，標的位置，病人之生理狀況，病人是為人類或動物，其他投服藥物及治療係用以預防或治病。通常，病人是為人類，但在某些疾病（

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (29)

途徑亦同樣有效。其次最常用的是肌內注射。此類注射最常在手臂或腿部肌肉施行。靜脈內注射以及腹膜內注射，動脈內，顱內或真皮內注射亦有效產生免疫反應。在某些方法中，藥劑係直接注射於沉積已積聚之特定組織內。

本發明之藥劑可任意與其他至少部分有效治療致澱粉樣變性病之藥劑綜合投服。在阿茲海默氏疾病及唐氏症候群（致澱粉樣沉積發生於腦內）之情況下，本發明之藥劑亦可與其他可促進本發明之藥劑通過血液－腦部障壁之藥劑一起投服。

本發明之免疫劑（諸如，肽）有時與佐助劑一起投服。多種佐助劑可與肽（諸如， $A\beta$ ）綜合使用以產生免疫反應。較理想之佐助劑增強對免疫原之固有反應而反致引起免疫原之構型變化（其影響反應之定量形態）。較佳之佐助劑包括明礬，3 D e - O - 醯化單磷脂 A (M P L)（見於 G B 2 2 2 0 2 1 1）。Q S 2 1 是從南美發現之 Quillaja Saponaria Molina 樹之樹幹分離出之配糖或植物皂素三聚體（見於 Kensil et al., Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1 9 9 5)；US Patent No. 5 0 5 7 5 4 0）。其他佐助劑係為油在水中型乳液（諸如，角鯊烯或花生油），任意地綜合免疫刺激物，諸如，單磷脂 A（見於 Stoute et al., N. Engl. J. Med. 3 3 6, 8 6 - 9 1 (1 9 9 7)）。另外之佐助劑是 C p G (Bioworld Today, Nov. 1 5, 1 9 9 8)。或者， $A\beta$ 可偶合至佐助劑。例

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (30)

如，A β 之脂肽型可以藉由直接偶合棕櫚酸或其他脂質至A β 之N-端而製得，其係如B型肝炎疫苗（Livingston, J. Immunol. 159, 1383-1392 (1997)）所述。但是，前述偶合必需實際上不改變A β 之構型以免影響其免疫反應之性質。佐助劑可以治療組成物之一分子與活性試劑一起投服或者可以在投服治療劑之前，同時或之後，各別分開投服。

較佳之佐助劑種類是鋁鹽（明礬），諸如，氫氧化鋁，磷酸鋁，硫酸鋁。前述佐助劑可以和或不和其他免疫刺激劑（諸如，MPL或3-DMP，QS21，聚合或單體胺基酸，諸如，聚麩胺酸或聚賴胺酸）一起使用。其他種類之佐助劑是油在水中型乳化組成物。前述佐助劑可以和或不和其他免疫刺激劑（諸如，胞壁醯基肽（例如，N-乙醯基胞壁醯基-L-蘇胺醯-D-異麩胺醯胺（thr-MDP），N-乙醯基-正胞壁醯基-L-丙胺醯-D-異麩胺醯胺（nor-MDP），N-乙醯基胞壁醯基-L-丙胺醯-D-異麩胺醯胺基-L-丙胺酸-2-(1'-2'二棕櫚醯-sn-甘油-3-羥基磷醯氧基)-乙胺（MTP-PE），N-乙醯基葡胺基-N-乙醯基胞壁醯基-L-Al-D-異麩胺基-L-Ala-二棕櫚醯氧基丙醯胺（DTP-DPP）theramideTM），或其他細菌胞壁成分。油在水中型乳液包括（a）MF59（WO 90/14837），其包含5%角鯊烯，0.5% Tween80，及0.5% Span 85

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (31)

Microfluidics, Newton MA) 調製成 (任意包含不同數量之 M T P - P E) , 使用微流化劑 (諸如, 1 1 0 Y 型微流化劑 (次微米顆粒, (b) S A F , 其包含 1 0 % 角鯊烯, 0 . 4 % Tween 80, 5 % pluronic-阻斷之聚合物 L 1 2 1 , 及 t h r - M D P , 微流化成次微米乳液或反轉而產生較大顆粒大小乳液, 以及 (c) R i b i ^{T M} 佐助劑系統 (R A S) , (RIBI Immunochem, Hamilton,MT) , 其包含 2 % 角鯊烯, 0 . 2 % Tween 80, 及一或多種細菌胞壁成分, 該等成分來自單磷脂 A (M P L) , 二黴菌酸海藻糖酯 (T D M) , 以及胞壁骨架 (C W S) , 宜為 M P L + C W S (Detox^{T M}) 。另一類較佳佐助劑是植物皂素佐助劑, 諸如, Stimulon^{T M} (QS21, Aquila, Worcester, MA) 或由其產生之顆粒, 諸如, ISCOMs (免疫刺激複合物) 及 ISCOMATRIX。其他佐助劑包括完全弗瑞得佐助劑 (Complete Freund's Adjuvant (CFA)) 及不完全弗瑞得佐助劑 (I F A) 。其他佐助劑包括細胞激素, 諸如, 干擾素 (I L - 1 , I L - 2 , 及 I L - 1 2) , 巨噬體菌落刺激因子 (M - C S F) , 腫瘤壞死因子 (T N F) 。

佐助劑可與免疫原一起以單一組成物形態投服或者可以在投服免疫原之前, 同時或之後各別分開投服。免疫原與佐助劑可以一起包裝於同一小玻璃瓶內或者分開包裝於各別小玻璃瓶內而在使用前再予混合供應。免疫原及佐助劑通常用指示治療用途之標箋紙包裝。若免疫原及佐助劑分開包裝, 則其包裝通常包括使用前混合之指示。佐助劑及 /

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (32)

或載體之選擇依以下因素而定：包含佐助劑之疫苗安定性，投藥途徑，佐助劑對施打疫苗對象的效力，以及，在人體時，藥學上可接受佐助劑是為藉由人體投服之合宜調節體所允許或可允許者。例如，完全弗瑞得佐助劑並不適供人體投服。明礬，M P L 及 Q S 2 1 是較理想的。任意地，一或多種不同佐助劑可同時使用。較理想的組合包括明礬與 M P L，明礬與 Q S 2 1，M P L 與 Q S 2 1，以及明礬，Q S 2 1 與 M P L。而且，亦可使用不完全弗瑞得佐助劑 (Chang et al., Advanced Drug Delivery Reviews 32, 173-186 (1998))，任意地綜合明礬，Q S 2 1 或 M P L 中任一種以及其所有組合。

本發明之藥劑經常以包含活性治療劑以及各種其他藥學上可接受成分之藥學組成物形態投服。見於 Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980)。較理想的形態依所期望之投服模式及治療用途而定。組成物依所需組成物而定地亦可包括藥學上可接受之無毒性載體或稀釋劑，其被定義為一般用以調配動物或人類投服用組成物的賦形藥。稀釋劑係選擇不致影響組成物的生化活性者。前述稀釋劑之實例為蒸餾水，磷酸鹽緩衝之生理食鹽水，Ringer's 溶液，葡萄糖溶液，以及漢氏溶液 (Hank's solution)。此外，藥學組成物或調合物亦可包含其他載體，佐助劑或無毒性，無治療性之非免疫原安定劑等。但是，某些適供投服至動物之藥劑 (諸如，完全弗瑞得佐助劑) 通常不包含在人

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (33)

類使用之組成物內。

藥學組成物亦可包含緩慢代謝之巨大分子，諸如，蛋白質，多糖類，聚乳酸，聚葡康酸及共聚物（諸如，乳汁官能化瓊脂糖，瓊脂糖，纖維素，等），胺基酸聚合物，胺基酸共聚物，以及脂質附聚物（諸如，油滴或脂質體）。此外，這些載體可充作免疫刺激劑（亦即，佐助劑）。

為供非經腸道投服，本發明之藥劑可以物質在含藥學載體（其可為惰性液體，諸如，水油類，食鹽水，甘醇或乙醇）之藥學上可接受稀釋劑中的可注射溶液或懸浮液。此外，輔助物質（諸如，潤濕劑，界面活性劑，PH緩衝物質等）可存在於組成物中。藥學組成物之其他成分係為石油，動物的，植物的或合成來源，例如，花生油，黃豆油及礦物油。通常，諸如，丙二醇或聚乙二醇之二醇類是為較理想的液態載體，尤其是供可注射溶液使用。

一般而言，組成物係製成可注射之液態溶液或懸浮液；亦可製成注射前適供溶於或懸浮於液態賦形藥中之固體形態。製劑亦可乳化於或納入微脂粒或巨顆粒（諸如，聚丙交酯，聚乙交酯或共聚物）中以增強佐助劑效力，其係如以上所討論的（見於 Langer, Science 249, 1527 (1990) 及 Hanes, Advanced Drug Delivery review 28, 97-119 (1997)）。本發明之藥劑可以儲存注射（depot injection）或植入物製劑（其可經調配成使能持續或脈動的釋放出活性成分）形態投服心適供其他投

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (34)

藥途徑之其他組成物包括經口，經鼻及經肺的調合物，栓劑及經皮塗佈。

為供栓劑之用，結合劑及載體包括，例如，聚烷二醇類或甘油三酸酯；前述栓劑可由包含 0.5% - 10%，宜為 1% - 2% 範圍內之活性成分的混合物形成。口服組成物包括輔藥，諸如，藥品級甘露醇，乳糖，澱粉，硬脂酸鎂，糖精鈉，纖維素及碳酸鎂。這些組成物係為溶液，懸浮液，片劑，藥丸，膠囊，緩釋調合物或藥粉且包含 10% - 95%，宜為 25% - 70% 活性成分。

局部塗佈可導致經皮或皮內傳送。局部投服可利用共同投服藥劑與霍亂弧菌毒素或其去毒衍生物或其次單元或其他類似細菌毒素以利進行（見於 Glenn et al., Nature 391, 851 (1998)）。共同投服可藉由使用各成分之混合物或化學交聯反應所得連接分子或表現為融合蛋白質而達成。

或者是，經皮傳送可由使用皮膚貼片或使用 transferosomes 達成（Paul et al., Eur. J. Immunol. 25, 3521 - 24 (1995)）； Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368, 201 - 15 (1998)）。

V. 診斷方法

本發明係提供一種偵測罹患或易於罹患阿茲海默氏疾病之病人對 A β 肽之免疫反應的方法。此方法尤有用於監

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (35)

視病人之治療過程。此方法不但可監視症狀病人之治療過程，亦可監視無症狀病人之預防過程。

某些方法能夠測定病人在投服藥物劑量前之免疫反應基本值，再以此值與治療後之免疫反應值相比較。免疫反應值顯著提高（亦即，大於相同值重複測試中之實驗誤差標準邊緣，以平均值之一個標準偏差表示）代表正面沿治療結果（亦即，投服藥劑已獲致或增強免疫反應）。若此值未顯著改變或降低則代表負面治療結果。一般而言，剛使用藥劑治療之病人預期在連續投藥下，免疫反應會提高直到最後達到高原值為止。藥劑之投服是持續的而免疫反應同時提高。達到高原期代表治療可中斷或可減少劑量或用藥次數。

在其他方法中，免疫反應之對照值（亦即，平均值與標準偏差）係由對照組測得。通常，對照組之個人未接受先行治療。投服治療劑之後，病人免疫反應三測定值再與對照值相比較。相對於對照值之顯著提高（例如，大於平均值一個標準偏差）代表正面治療結果。無明顯提高或降低代表負面治療結果。通常持續投服藥劑之同時，相對於對照值之免疫反應隨之提高。如同前面一般地，達到相對終對照值之高原期代表治療可中斷或可減少劑量或用藥次數。在另一方法中，免疫反應之對照值（例如，平均值加上一個標準偏差）係由業已使用治療劑進行治療且其免疫反應已達高原期之對照組個體測得。再比較病人之免疫反應測定值與對照組。若病人之測定值與對照值並無顯著差

五、發明說明 (36)

異（例如，大於一個標準偏差），則可中斷治療。若病人之測定值低於對照值則需持續投服藥劑。若病人之測定值一直低於對照值，則可能表示治療用藥法（例如，使用不同的佐助劑）需改變。在另一方法中，監視目前未接受治療但已進行初始治療過程之病人的免疫反應以決定是否需要恢復治療。病人免疫反應之測定值可與進行初始治療過程之病人先前獲致之免疫反應值相比較。相對於先前測量值之明顯提高（亦即，大於相同值重複測量中之典型誤差邊緣）代表可恢復治療。或者，病人之測定值可與進行一段治療過程後之病人所測得之對照值相比較。或者，病人之測定值與無病徵之預防性治療病人或疾病特徵已消除之治癒病人的對照值相比較。在所有這些情況下，相對於對照值之明顯提高（亦即，大於一個標準偏差）代表病人必需恢復治療。

分析用之組織樣品通常是為病人之血液，血漿，血清，粘膜或腦脊髓液。分析樣品對任何形態 A β 肽，通常是 A β 42 之免疫反應。免疫反應可由，例如，專一性結合至 A β 肽之抗體或 T - 細胞的存在而測得。偵測 A B 專一性之抗體的 E L I S A 方法揭示於實例部分。偵測反應性 T - 細胞之方法已說明於上文中（見於定義中）。

實例

I . A β 對阿茲海默氏疾病的預防效力

這些實例說明投服 A β 肽至已導入外來基因之鼯鼠（

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (37)

其在位置 7 1 7 上突變而過度表現 A P P (A P P 7 1 7 V → F) 以致於使其易於罹患類似阿茲海默氏疾病之神經病理學) 。這些鼯鼠 (P D A P P) 之產製及特性揭示於 Games et al., 同上。這些異合子形態之動物在長大 6 個月後開始沉積 A β 。 1 5 個月大後，它們的 A β 沉積量等於阿茲海默氏疾病中所見及之量。 P D A P P 鼯鼠注射以凝集之 A β 4 2 或磷酸鹽緩衝食鹽水。選擇 A β 之理由是基於它誘起對 A β 多重抗原決定基之抗體的能力。

A . 方法

1 . 鼯鼠來源

將 3 0 隻 P D A P P 雌性鼯鼠任意分成以下幾組：

1 0 隻鼯鼠用凝集之 A β 4 2 注射 (1 隻鼯鼠在過渡中死亡) ， 5 隻鼯鼠用 P B S / 佐助劑或 P B S 注射，而 1 0 隻鼯鼠為未注射之對照組。 5 隻鼯鼠用血清致澱粉樣蛋白質 (S A P) 注射。

2 . 免疫原之製備

凝集 A β 4 2 之製備：將 2 m g A β (US Peptides Inc, lot k - 4 2 - 1 2) 溶入 0 . 9 m l 水中並加入 0 . 1 m l 1 0 x P B S 而成 1 m l 。將其反轉以於 3 7 ° C 下孵養過夜 (肽在此情況下凝集) 。任何未使用之 A β 以乾燥低壓凍乾粉末貯於 - 2 0 ° C 下直到下次注射為止。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (38)

3 . 注射液之製備

每隻鼯鼠 1 0 0 μ g P B S 中之凝集 A β 用完全弗瑞得佐助劑 (C F A) 以 1 : 1 比例乳化而得最後體積為 4 0 0 μ l 之乳液以供首次免疫用，隨之在第二週追加相同數量之不完全弗瑞得佐助劑 (I F A) 中的免疫原。每隔 1 個月再給予二劑量 (I F A 中)。隨後之免疫作用係每隔一個月在 5 0 0 μ l P B S 中進行。注射係由腹膜內進行 (i . p .)。

P B S 注射遵照相同程序且鼯鼠係用 P B S / 佐助劑之 1 : 1 混合物注射 (每隻鼯鼠 4 0 0 μ l 或 5 0 0 μ l P B S)。S A P 注射同樣遵照相同程序而使用每次注射 1 0 0 μ g 之劑量。

4 . 鼯鼠血液之滴定，組織製備及免疫組織化學

以上方法說明於以下一般物質與方法中。

B . 結果

P D A P P 鼯鼠注射以凝集 A β 4 2，S A P 肽，或磷酸鹽緩衝食鹽水。一組 P D A P P 鼯鼠亦未予以注射而充作正對照組。從第 4 次追加劑量開始，每隔一個月監視鼯鼠對凝集 A β 4 2 之滴定度直到鼯鼠一歲為止。在 1 3 個月大時殺死鼯鼠。在所有檢測點，9 隻鼯鼠中有 8 隻鼯鼠產生高抗體滴定度，其在一系列注射期間內均保持高值 (滴定度大於 1 / 1 0 0 0 0)。第 9 隻鼯鼠具有約 1 /

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(40)

多 A β 致澱粉樣沉積 (用 A β - 專一性單株抗體 (m A b) 3 D 6 形像化於海馬區以及逆脾皮質內。類似形態之致澱粉樣沉積亦見於用 S A P P 或 P B S 免疫之鼯鼠中 (附圖 2)。此外, 在這後三組中具有阿茲海默氏疾病中通常見及之腦部易受傷副區, 諸如, 海馬齒狀腦回之外分子層。

不含任何 A β 沉積之腦部亦無通常在具有人類 A P P 抗體 8 E 5 之 P D A P P 鼯鼠中所見及的神經斑。其餘各組 (S A P - 注射, P B S 及未注射鼯鼠) 之所有腦部具有未治療之 P D A P P 鼯鼠的許多典型神經斑。少數神經斑存在於用 A N 1 7 9 2 治療之一隻鼯鼠中, 且單叢營養障礙神經突見於第二隻用 A N 1 7 9 2 沿治療之鼯鼠中。如附圖 3 中所示地, 海馬區之影像分析証實了與 P B S 受體 (中間值 0 . 2 8 % , P = 0 . 0 0 0 5) 相較之下, 實際上消除了 A N 1 7 9 2 治療之鼯鼠中的營養障礙神經突 (中間值 0 . 0 0 %)。

斑結合發炎之星形細胞增多症亦不存在於 A β 1 - 4 2 注射組中。其他各組鼯鼠之腦部包含許多叢集之 A β 斑結合神經膠樣變性的典型 G F A P - 陽性星形細胞。G F A P - 反應之載玻片副組用 Thioflavin S 對比染色以固定 A β 沉積。在 S A P , P B S 及未治療對照組中, G F A P - 陽性星形細胞結合 A β 斑一起。在斑 - 陰性 A β 1 - 4 2 治療之鼯鼠中並未見及前述結合, 然而, 最少量之斑結合神經膠樣變性見於用 A N 1 7 9 2 治療之一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (41)

隻鼯鼠中。

附圖 4 中所示之逆脾皮質的影像分析証實了星形細胞增多症之減少是顯著的，因為用 A N 1 7 9 2 治療之組的中間值為 1 . 5 6 % 而用 S A P 肽，P B S 治療或未治療 (P = 0 . 0 0 1 7) 之組的中間值則大於 6 % 。

由 A β 1 - 4 2 - 及 P B S - - 結合之 M H C I I 免疫反應性不存在於 A β 1 - 4 2 注射之鼯鼠中，此與缺乏 A β - 相關之發炎反應相符合。

鼯鼠之腦切片亦與 M A C - 1 專一性之 m A β 反應。M A C - 1 (C D 1 1 b) 是完整合家族元素且以含 C D 1 8 之異二單體存在。C D 1 1 b / C D 1 8 複合物係存在於單細胞，巨噬體，嗜中性細胞及天然殺手細胞 (Mak and Simard) 上。腦內之固有 M A C - 1 - 反應性細胞種類根據 M A C - 1 免疫反應部分中之類似酚類形態可能是為小神經膠質。斑 - 結合之 M A C - 1 標記與 P B S 對照組比較之下，低於用 A N 1 7 9 2 治療之鼯鼠，此發現與缺乏 A β - 誘起之發炎反應相符合。

C . 結論

A β 1 - 4 2 注射之鼯鼠腦內缺乏 A β 斑及反應性神經元及神經膠變化代表沒有或極少致澱粉樣沉積於其腦內而不存在致病結果 (諸如，神經膠樣變性及神經炎病理學) 。用 A β 1 - 4 2 治療之 P D A P P 鼯鼠顯示出基本上和未和外來基因接觸之對照組同樣缺乏病理學。因此，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (42)

A β 1 - 4 2 注射係高度有效於預防腦組織之人類 A β 的沉積或清除以及消除隨後之神經元與發炎退行性變化。因此之故，投服 A β 肽在預防阿茲海默氏疾病中具有治療效果。

II. 劑量反應研究

幾組 5 週大之 Swiss Webster 雌性鼯鼠 (N = 6 / 組) 用 3 0 0 , 1 0 0 , 3 3 , 1 1 , 3 . 7 , 1 . 2 , 0 . 4 或 0 : 1 3 μ g C F A / I F A 中 A β 腹膜內注射使其免疫。前三劑量係每隔二週投服而在一個月之後投服第四劑量。第一劑量係用 C F A 乳化而其餘劑量係用 I F A 乳化。在第二次免疫後 4 - 7 天，對動物抽血以供測定抗體滴定度。用 1 1 , 3 3 或 3 0 0 μ g 抗體免疫之三組動物在第四次免疫後之四個月內，大約每隔一個月抽血一次以監視疫苗劑量範圍內之抗體反應衰變。這些動物在研究開始後第七個月接受最後第五次免疫。一週後殺死動物以測定對 A N 1 7 9 2 之抗體反應及進行毒性分析。

從 3 0 0 至 3 . 7 μ g 劑量範圍內可見及遞減之劑量反應而最低二劑量則無任何反應。在三劑量 1 1 - 3 0 0 μ g 抗原後之平均抗體滴定度為約 1 : 1 0 0 0 而在四劑量之 1 1 - 3 0 0 μ g 抗原後之平均抗體滴定度為約 1 : 1 0 0 0 0 (見於附圖 5) 。

在第三次免疫後，除了最低劑量之外，所有抗體滴定度顯著地升高而 G M T s 提高 5 - 至 2 5 - 倍。甚至

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (44)

幼鼯鼠。有效誘起人類免疫反應之劑量通常類似於鼯鼠之有效劑量。

I I I . 對已罹患阿茲海默氏疾病之治療效力的篩選

此一分析係設計用以測試免疫劑消除或逆轉年老動物之阿茲海默氏疾病的神經病理特性。用 4 2 胺基酸長 A β (A N 1 7 9 2) 免疫係在致澱粉樣斑已存在於 P D A P P 鼯鼠腦內時開始進行。

在此一研究所用之期間內，未治療之 P D A P P 鼯鼠產生類似阿茲海默氏疾病中見及之神經退行性變化 (Games et al., 同上及 Johnson-Wood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9 4 , 1 5 5 0 - 1 5 5 5 (1 9 9 7)) . A β 之沉積至致澱粉樣斑內伴隨包括失常軸索及樹枝狀元素在內之退行性神經元反應，稱之為營養障礙突。營養障礙神經突包圍且含彼之致澱粉樣沉積稱為神經炎斑。在阿茲海默氏疾病及 P D A P P 鼯鼠中，營養障礙神經突具有獨特的球狀構造，可與一組辨識 A P P 及細胞骨架成分之抗體行免疫反應且在超結構下展現複雜的次細胞退行性變化。這些特性使得 P D A P P 腦之神經炎斑形成的疾病－相關性，選擇性及再現性測量可行。P D A P P 神經炎斑之營養障礙神經元成分易由使用人類 A P P 專一性抗體 (m A β 8 E 5) 而見到且易由電腦協助之影像分析測得。因此之故，除了測定 A N 1 7 9 2 對致澱粉樣斑形成之作用以外，我們還監視此一治療對神經炎營養不良的作用。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (45)

星形細胞及小神經膠質是反映神經元受傷程度之非神經元細胞。G F A P - 陽性星形細胞及 M H C I I - 陽性小神經膠質通常見於阿茲海默氏疾病中，且其活性隨疾病嚴重性增高。因此，我們亦監視 A N 1 7 9 2 - 治療鼯鼠中之反應性星形細胞增多症及小神經質細胞增生症的發展。

A . 材料及方法

4 8 隻來自查里士河 (Charles River) 之雜種 P D A P P 雌性鼯鼠 (1 1 至 1 1 . 5 個月大) 任意地分成二組： 2 4 隻鼯鼠用 1 0 0 μ g A N 1 7 9 2 免疫而另 2 4 隻用 P B S 免疫，各別綜合弗瑞得佐助劑。當其達到約 1 5 個月大時再將 A N 1 7 9 2 及 P B S 組分組。在 1 5 個月大時，每一 A N 1 7 9 2 - 及 P B S - 治療動物組之半數安逸死 (n 分別等於 1 0 及 9)，其他動物持續接受免疫直到約 1 8 個月大時為止 (n 分別等於 9 及 1 2)。研究期間內共有 8 隻動物死亡 (5 隻 A N 1 9 7 2，3 隻 P B S)。除了免疫動物外，在 E L I S A s 中亦包括比較用之一歲大 (n = 1 0)，1 5 個月大 (n = 1 0) 及 1 8 個月大 (n = 1 0) 未治 P D A P P 鼯鼠以測定腦內之 α β 及 A P P 值；一歲大動物亦包括在免疫組織分析中。

方法除非另外指明否則如實例 1 所示。使用

A N 1 7 9 2 之 US Peptides lot 12 及 California Peptides

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (46)

lot M E 0 3 3 9 製備在 1 5 個月前投服之六次免疫作用的抗原。使用 California Peptides lot M E 0 3 3 9 及 M E 0 4 3 9 於 1 5 至 1 8 個月間投服之另外三次免疫中。

為供免疫之用，在 2 0 0 μ l P B S 中之 1 0 0 μ g A N 1 7 9 2 或 P B S 用完全弗瑞得佐助劑 (C F A) 或不完全弗瑞得佐助劑 (I F A) 或 P B S 以 1 : 1 乳化至最後體積為 4 0 0 μ l 。第一次免疫係用 C F A 為佐助劑，其後四次免疫則用 I F A 為佐助劑而最後四次免疫則僅使用 P B S 而未加入佐助劑。在 7 個月期間內共進行 9 次免疫，前三次免疫係每隔二週投服而後每隔 4 週投服。4 個月治療組（在 1 5 個月大時安逸死）僅接受前 6 次免疫。

B . 結果

1 . A N 1 7 9 2 治療對致澱粉樣負荷的作用

利用定量影像分析所得之 A N 1 7 9 2 治療對皮質致澱粉樣負荷的結果示於附圖 7 中。在未治療之 1 2 個月大 P D A P P 鼯鼠中之皮質致澱粉樣負荷中間值為 0 . 2 8 % ，此值代表鼯鼠在研究初期之斑負荷。1 8 個月大時，P B S - 治療之鼯鼠的致澱粉樣負荷提高 1 7 倍而達 4 . 8 7 % ，但 A N 1 7 9 2 - 治療之鼯鼠的致澱粉樣負荷則大大減少至僅為 0 . 0 1 % - - - 明顯小於 1 2 個月大未治療組及 1 5 - 與 1 8 - 個月大 P B S - 治療組。致

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (47)

澱粉樣負荷在 1 5 個月大 (9 6 % 降低 ; $p = 0 . 0 0 3$) 及 1 8 個月大 ($> 9 9 %$ 降低 ; $p = 0 . 0 0 0 2$) 之 A N 1 7 9 2 接受者中顯著降低。

通常，在 P D A P P 鼯鼠中之皮質致澱粉樣沉積始於額面及逆夾肌皮質 (R S C) 中且以腹外側方向進行而涉及顳及 entorhinal 皮質 (E C) 。在 1 2 個月大 (首次投服 A N 1 7 9 2 之適當年齡) 鼯鼠之 E C 中見及極少或者無任何致澱粉樣。在 A N 1 7 9 2 治療 4 個月後，致澱粉樣沉積在 R S C 中大大地減少而 E C 之進行性涉及亦由 A N 1 7 9 2 治療完全消除。後一觀察結果證明 A N 1 7 9 2 完全遏止致澱粉樣之進行性侵襲顳及腹面皮質以及阻止或者可能逆轉在 R S C 中之沉積。

A N 1 7 9 2 治療對 P D A P P 鼯鼠中之皮質致澱粉樣負荷的重大影響又進一步藉由 1 8 個月大組鼯鼠 (已治療 7 個月) 證明。近乎完全缺乏皮質致澱粉樣見於 A N 1 7 9 2 - 治療之鼯鼠，完全缺乏擴散斑以及密度大沉積減少。

2 . A N 1 7 9 2 治療 - 伴隨之細胞及形態變化

A β - 陽性細胞群見於通常包含致澱粉樣沉積之腦部內。很明顯的，在來自 A N 1 7 9 2 接受者之幾個腦中，極少或者甚至沒有發現任何細胞外皮質致澱粉樣斑。大多數之 A β 免疫活性似乎包含在具有小葉或凝集軀體之細胞內。遺傳表型地，這些細胞類似活化小神經膠質或單細胞

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (48)

。它們與辨識藉由活化單細胞及小神經膠質 (M H C I I 及 C D 1 1 b) 表現之配位基進行免疫反應且偶而與血管之壁或腔結合。用 A β 與 M H C I I - 專一性抗體標記之鄰近部分的比較顯示類似型態之這些細胞係由此兩類抗體辨識。A N 1 7 9 2 - 治療之腦部的詳細檢視顯示出 M H C I I - 陽性細胞局限於殘留在這些動物內之有限致澱粉樣周遭。在所用固定情況下，細胞並不與辨識 T - 細胞 (C D 3 , C D 3 e) 或 B - 細胞 (C D 4 5 R A , C D 4 5 R B) 配位基或白血球普通抗原 (C D 4 5) 之抗體進行免疫反應，但可與辨識 leukosialin (C D 4 3) - 其與單細胞交聯反應 - 之抗體反應。在任何 P B S - 治療之鼯鼠中未發現此等細胞。

P D A P P 鼯鼠一定產生嚴重之致澱粉樣沉積於海馬齒回之外分子層內。此沉積在穿通神經途徑內形成獨特之痕線，在阿茲海默氏疾病中之通常包含致澱粉樣斑的一副區。在 P B S - 治療之鼯鼠中，這些特性沉積之出現類似於先前在未治療 P D A P P 鼯鼠中之特徵。致澱粉樣沉積包括擴散及擁擠之斑於連續帶內。相反地，在很多來自 A N 1 7 9 2 - 治療之鼯鼠腦內，此一形態顯著地改變。海馬致澱粉樣沉積不再包含擴散致澱粉樣且帶狀形態完全中斷。取而代之地，存在很多與抗 - A β 抗體反應之不尋常點狀結構，其中幾個似乎是含致澱粉樣之細胞。

M H C I I - 陽性細胞經常在 A N 1 7 9 2 - 治療之動物內之細胞外致澱粉樣周遭發現。A β - 陽性細胞與致

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (49)

澱粉樣之結合形態在來自 A N 1 7 9 2 - 治療之鼯鼠的幾個腦內極其類似。這些單細胞之分布限於沉積致澱粉樣附近且完全不存在於無 A β 斑之其他腦部分內。M H C I I 及 M A C I - 標記部份之定量影像分析顯示出在 A N 1 7 9 2 - 治療之鼯鼠的 R S C 及海馬內之免疫活性升高趨勢，其和 P B S 組相較之下，其在海馬中之 M A C 1 測量具有意義。

這些結果指示出在帶有斑之腦部份內之致澱粉樣的活性細胞媒介移除。

3 . A N 1 7 9 2 對 A β 值之作用：E L I S A 測定(a) 皮質值

在未治療 P D A P P 鼯鼠中，在 1 2 個月時之皮質內的全部 A β 中間值是為 1 6 0 0 n g / g ，其在 1 5 個月時升高至 8 7 0 0 n g / g (表 2) 。在 1 8 個月時之此中間值為 2 2 0 0 0 n g / g ，在此實驗期間內升高 1 0 倍以上。P B S - 治療之動物在 1 5 個月時具有 8 6 0 0 n g / g 之全部 A β ，其在 1 8 個月時升高至 1 9 0 0 0 n g / g 。相反地，A M 1 7 9 2 - 治療之動物在 1 5 個月時具有小於 P B S - 免疫組 8 1 % 之全部 A β (1 6 0 0 n g / g) 。當比較 A N 1 7 9 2 及 P B S 組時發現在 1 8 個月時之全部 A β (5 2 0 0 n g / g) 明顯較少 (p = 0 . 0 0 0 1) ，其代表 A β 之存在減少 7 2 % 。在比較 A β 之皮質值時獲致類似結果，亦即，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (50)

A N 1 7 9 2 - 治療組包含更少之 A β 4 2 , 但在此情況下, A N 1 7 9 2 與 P B S 組之間的差異在 1 5 個月 ($p = 0 . 0 4$) 及 1 8 個月 ($p = 0 . 0 0 0 1$, 表 2) 時均具有意義。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (51)

表 2：皮質內之 A β 中間值 (n g / g)

年 齡	未 治 療		P B S		A N 1 7 9 2	
	全 部 A β	A β 4 2 (n)	全 部 A β	A β 4 2 (n)	全 部 A β	A β 4 2 (n)
1 2	1 6 0 0	1 3 0 0 (1 0)				
1 5	8 7 0 0	8 3 0 0 (1 0)	8 6 0 0	7 2 0 0 (9)	1 6 0 0	1 3 0 0 (1 0)
1 8	2 2 2 0 0	1 8 5 0 0 (1 0)	1 9 0 0 0	1 5 9 0 0 (1 2)	5 2 0 0 **	4 0 0 0 ** (9)

* P=0.0412

* * P=0.0001

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (52)

(b) 海馬值

在未治療 P D A P P 颯鼠中，1 2 個月大時全部 A β 之海馬中間值為 1 5 0 0 0 n g / g ，其在 1 5 個月大時升高至 5 1 0 0 0 n g / g 而在 1 8 個月大時再升高至 8 1 0 0 0 n g / g (表 3) 。類似地，P B S 免疫之颯鼠在 1 5 及 1 8 個月大時其值分別為 4 0 0 0 0 n g / g 及 6 5 0 0 0 n g / g 。A N 1 7 9 2 免疫動物之全部 A β 值較低，其在 1 5 及 1 8 個月大時分別為 2 5 0 0 0 n g / g 及 5 1 0 0 0 n g / g 。1 8 個月大之 A N 1 7 9 2 - 治療組之值顯著低於 P B S 治療組 (p = 0 . 0 1 0 5 ; 表 3) 。A β 4 2 之測定產生類似形態結果，亦即，A N 1 7 9 2 - 治療組之值在 1 8 個月大評估時顯著低於 P B S 組 (分別為 3 9 0 0 0 n g / g 比 5 7 0 0 0 n g / g ; p = 0 . 0 0 2 2) (表 3) 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (53)

表 3：海馬內之 A β 中間值 (n g / g)

年 齡	未 治 療			PBS			AN1792		
	全 部 A β	A β 42	(n)	全 部 A β	A β 42	(n)	全 部 A β	A β 42	(n)
12	15500	11100	(10)						
15	51500	44400	(10)	40100	35700	(9)	24500	22100	(10)
18	80800	64200	(10)	65400	57100	(12)	50900*	38900**	(9)

* P=0.0105

* * P=0.0022

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(54)

(c) 小腦值

在12個月大未治療之PDAPP 鼯鼠中，全部A β 升高至35 ng/g。PBS治療之動物在15個月大時之全部A β 中間值為21 ng/g而在18個月大時為43 ng/g。AN1792-治療之動物據發現在15個月大時之全部A β 中間值為22 ng/g而在18個月大時之全部A β (25 ng/g) 顯著較低 (p = 0.002) 於對應之PBS組 (表4)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (55)

表 4：小腦內之 A β 中間值 (n g / g)

	未治療	PBS	AN1792
年齡 (月)	全部 A β (n)	全部 A β (n)	全部 A β (n)
12	15.6 (10)		
15	27.7 (10)	20.8 (9)	21.7 (10)
18	35.0 (10)	43.1 (12)	24.8 * (9)

* P=0.0018

4 . A N 1 7 9 2 治療對 A P P 值之作用

A P P - α 與全部長度 A P P 分子均包含所有或部份之 A β 序列而由於 A N 1 7 9 2 - 指引之免疫反應而內在受衝擊。在迄今之研究中，在 A P P 值之輕微升高已知是 P D A P P 鼯鼠中之神經病理學提高。在皮質內，A P P - α / F L (全長) 或 A P P - α 之值基本上均未因治療而改變，但唯一例外的是 A P P - α 在 1 8 個月大時，在 A N 1 7 9 2 - 治療組對 P B S - 治療組中減少 1 9 %。1 8 個月大 A N 1 7 9 2 - 治療之 A P P 值與 1 2 - 及 1 5 - 個月大之未治療組與 1 5 - 個月大之 P B S 組之值並無顯著差別。在所有情況下，A P P 值保持在 P D A P P 鼯鼠中通常見及之範圍內。

五、發明說明 (56)

5. AN 1792 治療對神經退行性及神經膠樣變性病狀的作用

在 15 個月大 (84% ; $p = 0.03$) 及 18 個月大 (55% ; $p = 0.01$) 時之 AN 1792 - 治療之鼯鼠額面皮質內的神經炎斑負荷均顯著低於 P B S 組。在 15 至 18 個月大之 P B S 組中的神經炎斑負荷中間值由 0.32% 提高至 0.49%。此與 AN 1792 組之神經炎斑大大減少相反，因其在 15 及 18 個月大時之神經炎斑負荷中間值分別為 0.05% 及 0.22%。

用 AN 1792 免疫似乎耐受性佳且在 AN 1792 - 治療鼯鼠之 R S C 中的反應性星形細胞增多症顯著低於 P B S 組——在 15 個月大時，56% ; $P = 0.11$ 而在 18 個月大時，39% ; $P = 0.028$ (附圖 9)。在 P B S 組中的星形細胞增多症之中間值百分比在 15 至 18 個月大期間，由 4.26% 升高至 5.21%。AN 1792 - 治療在此二時間點分別抑制星形細胞增多症之發生至 1.89% 及 3.2%。由此可見神經氈並未被清除過程損害。

6. 抗體反應

如上所述地，11 個月大之雜種 P D A P P 鼯鼠 (N = 24) 接受一系列之五次用 100 μ g 完全弗瑞得佐助劑乳化的 AN 1792 在第 0, 2, 4, 8 及 12 週腹膜內注射免疫及在第 16 週僅單獨用 P B S (無完全弗瑞得

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (57)

佐助劑) 免疫。負面對照組係用年齡相當之導入外來基因的 24 隻鼯鼠組接受用相同佐助劑乳化之 P B S 在相同時刻免疫。在第二次投服後開始於每次免疫後之 3 - 7 天內從動物抽血。利用 E L I S A 測定抗體對 A N 1 7 9 2 的反應。用 A N 1 7 9 2 免疫之動物在第二, 三次及最後一次 (第六次) 投服後之幾何平均滴度分別為 1 9 0 0 , 7 6 0 0 及 4 5 0 0 0 。在第六次投服後之對照組動物中並未測得任何 A β - 專一性抗體。

約半數之動物再予以治療 3 個月 - - - 在約第 2 0 , 2 4 及 2 7 週時接受免疫治療。每一劑量均於 P B S 中投藥而不用弗瑞得佐助劑。在此期間內平均抗體滴定度均保持不變。事實上, 抗體滴定度在第 5 - 9 次注射第 4 - 8 次抽血時均保持穩定不變。

爲了決定 A β - 專一性抗體 (其由 A N 1 7 9 2 - 治療之鼯鼠血清中偵測之免疫誘出) 是否亦伴生腦部致澱粉樣沉積, 令一小部分之 A N 1 7 9 2 - 及 P B S - 治療之鼯鼠與對鼯鼠 I g G 專一性之抗體反應。與 P B S 組相反地, 在 A N 1 7 9 2 - 治療之腦內 A β 斑包覆內源的 I g G 。此二組間之差異見於 1 5 - 及 1 8 - 一個月大組。特別是縱使嚴重之致澱粉樣負荷存在於這些鼯鼠中, 但在 P B S 組中缺乏條紋標記。這些結果證明用合成 A β 蛋白質免疫產生辨識及體內結合至致澱粉樣斑中之 A β 上的抗體。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (58)

7 . 細胞媒介之免疫反應

在第 9 次免疫後第 7 天，從 9 隻 A N 1 7 9 2 - 免疫及 1 2 隻 P B S - 免疫之 1 8 個月大 P D A P P 鼯鼠中移除脾臟。分離脾細胞並在 A β 4 0，A β 4 2 或 A β 4 0 - 1 (逆順序蛋白質) 存在下培養 7 2 小時。有絲分裂原 C o n A 充作正對照組。最適當反應係用 > 1 . 7 蛋白質獲致。來自所有 9 隻 A N 1 7 9 2 - 治療動物之細胞在 A β - 4 0 或 A β 1 - 4 2 蛋白質均增殖 --- 以同量併入二蛋白質內 (附圖 1 0，上組)。A β 4 0 - 1 逆蛋白質則無反應。對照組動物之細胞對任何 A β 蛋白質均無反應 (附圖 1 0，下組)

C . 結論

本研究之結果顯示出已有致澱粉樣沉積之 P D A P P 鼯鼠用 A N 1 7 9 2 免疫可減緩及避免進行性致澱粉樣沉積並阻止老年 P D A P P 鼯鼠腦內之隨後神經病理變化。用 A N 1 7 9 2 免疫基本上阻止致澱粉樣在通常易罹患致澱粉樣變性病之構造中的發展。因此，投服 A β 肽可治療阿茲海默氏疾病。

I V . A β 片段之篩選

1 0 0 隻 9 - 1 1 個月大之 P D A P P 鼯鼠用 A P P 與 A β 之 9 個不同區段免疫以決定那一個抗原決定基傳達反應。9 個不同免疫原及 1 個對照組如上所述地由腹膜內

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (59)

注射。免疫原包括 4 個人類 A β 肽共軛體 1 - 1 2 , 1 3 - 2 8 , 3 2 - 4 2 , 1 - 5 (均經由胱胺酸連接而偶合至羊之抗 - 鼯鼠 I g G) ; 1 個 A P P 多肽 a a 5 9 2 - 6 9 5 , 凝集之人類 A β 1 - 4 0 及凝集之人類 A β 2 5 - 3 5 及凝集之齧齒動物 A β 。使用凝集 A β 及 P B S 作為對照組。每一治療組使用 1 0 隻鼯鼠。如上監視滴定度並令鼯鼠在注射之 4 個月後安逸死。死後檢驗組織化學, A β 值及毒性。

A . 材料與方法1 . 免疫原之製備

偶合 A β 肽之製備：四個人類 A β 肽共軛體 (胺基酸殘基 1 - 5 , 1 - 1 2 , 1 3 - 2 8 及 3 3 - 4 2 , 其各共軛至羊之抗 - 鼯鼠 I g G) 係藉由使用交聯劑磺基 - E M C S , 經由人造半胱胺酸偶合加至 A β 上而製得。A β 肽衍生物係用下列最後胺基酸序列合成。在每一情況下, 插入半胱胺酸殘基之位置由底線指出。A β 1 3 - 2 8 肽衍生物亦具有在所示羧基終端半胱胺酸前加入之 2 個甘胺酸殘基。

A β 1-12 肽 NH₂-DAEFRHDSGYEVC COOH

A β 1-5 肽 NH₂-DAEFRC COOH

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

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(60)

1. 爲了準備偶合反應，10 mg 羊之抗-鼯鼠 I g G (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 對 10 M m 硼酸鈉緩衝液 (P h 8 . 5) 滲析過夜。滲析過之抗體再使用 Amicon 濃縮管濃縮至體積爲 2 M l 。 10 mg 磺基 - E M C S (N (ξ - 馬來醯亞胺基己醯氧基) 琥珀醯亞胺) (分子科學公司) 溶入 1 M l 去離子水中。在攪拌同時將 40 倍莫耳濃度過量之磺基 - E M C S 逐滴加至羊之抗 - 鼯鼠 I g G 中，再攪拌溶液 10 分鐘。經活化羊之抗 - 鼯鼠 I g G 利用通過 10 m L 凝膠過濾管柱 (Pierce Presto Column, 得自 Pierce Chemicals) 純化及緩衝交換，用 0 . 1 M N a P O ₄ , 5 M m E D T A , P H 6 . 5 平衡。包含在 280 n m 吸收之部份的抗體經混合及稀釋至濃度爲約 1 m g / M l (使用 1 . 4 m g / O D 作爲消光係數) 。將 40 倍莫耳濃度過量 A β 肽溶入 20 m L 之 10 m M N a P O ₄ (P H 8 . 0) 中，但 A β 33 - 42 例外，其係先將 10 m g 溶入 0 . 5 M l D M S O 中，再用 10 m M N a P O ₄ 緩衝液稀釋至 20 m L 。將肽溶液分別加至 10 M l 經活化羊之抗 - 鼯鼠 I g G 中並於室溫下搖動 4 小時。所得共軛體再使用 Amicon Centriprer 管濃縮至最後體積小於 10 M l 後，再對 P B S 滲析以緩衝交換緩衝液並移除解離肽。令共軛體通過 0 . 22 - μ 孔徑過濾器以行消毒後，分成 1 m g 小部份並冷凍貯於 - 20 ° C 下。共軛體之濃度使用 BCA 蛋白質分析 (Pierce Chemicals) ，以馬之 I g G 作爲標準曲線而測得。共軛作

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(61)

用係由共軛肽之分子量大於經活化羊之抗-鼯鼠 I g G 分子量而獲諸證明。A β 1 - 5 羊之抗-鼯鼠共軛體系為二共軛作用之混合，其餘則來自單一製備。

2. 凝集 A β 肽之製備

人類 1 - 4 0 (A N 1 5 2 8 ; California Peptides Inc., Lot M E 0 5 4 1) , 人類 2 5 - 3 5 及齧齒動物 1 - 4 2 (California Peptides Inc., Lot M E 0 2 1 8) 肽剛從乾燥貯於 -20°C 下之低壓凍乾粉末溶解以供製備每一組注射劑。爲了此一目的，將 2 m g 肽加至 0 . 9 m l 去離子水中並翻轉混合物以產生相當均勻之溶液或懸浮液。在四者當中，A N 1 5 2 8 係爲此一步驟唯一溶解之肽。1 0 0 μ l 之 1 0 X P B S (1 X P B S : 0 . 1 5 M N a C l , 0 . 0 1 M 磷酸鈉 , p H 7 . 5) 再於 A N 1 5 2 8 開始沉澱時加入。再度翻轉懸浮液並於 37°C 下孵養過夜以供次日使用。

p B x 6 蛋白質之製備：編碼 p B x 6 之表現質體，包含 1 0 0 個胺基酸噬菌體 M S - 2 聚合酶 N - 終端引導序列，隨後接首 A P P 之胺基酸 5 9 2 - 6 9 5 (β A P P) 之融合蛋白質如 Oltersdorf et al., J. Biol. Chem. 2 6 5 , 4 4 9 2 - 4 4 9 7 (1 9 9 0) 所述構築。將此質體轉染至大腸桿菌 (E . c o l i) 而蛋白質在促進子誘導後表現。細菌在 8 M 尿素中溶解而 p B x 6 利用製備級 S D S P A G E 部份純化。含 p B x 6 之部份

五、發明說明 (62)

利用西方吸漬法，使用兔子之抗 - p B x 6 多株抗體辨識，混合，用 Amicon Centriprep 管濃縮並對 P B S 滲析。製劑之純度（利用 Coomassie Blue stained SDS PAGE 預估）為約 5 - 1 0 %。

B . 結果及討論1 . 研究設計

1 0 0 隻 9 - 1 1 個月大之導入外來基因的雜種 P D A P P 雌性及雄性鼯鼠係得自查理士河實驗及科技實驗室。將鼯鼠分成十組而用綜合弗瑞得佐助劑之 A β 或 A P P 不同區段免疫。分配動物以使同組中動物之性別，年齡，血統及來源儘可能相近。免疫原包括四個源自人類序列（1 - 5，1 - 1 2，1 3 - 2 8 及 3 3 - 4 2，其均共軛至羊之抗 - 鼯鼠 I g G 上）之 A β 肽；四個凝集之 A β 肽，人類 1 - 4 0（A N 1 5 2 8），人類 1 - 4 2（A N 1 7 9 2），人類 2 5 - 3 5 及齧齒動物 1 - 4 2；以及融合多肽（命名為 p B x 6，包含 A P P 胺基酸殘基 5 9 2 - 6 9 5）。第 1 0 組用綜合佐助劑之 P B S 免疫以充作對照組。

每次免疫中，在 2 0 0 μ l P B S 中之 1 0 0 μ g A β 肽或在相同體積 P B S 中之 2 0 0 μ g A P P 衍生物 p B x 6 或僅 P B S 用完全弗瑞得佐助劑（C F A）以 1 : 1（體積：體積）乳化而得最後體積為 4 0 0 μ l 以供首度免疫之用，隨後追加相同數量在不完全弗瑞得佐助劑

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (63)

(I F A) 中之免疫原於其後四次投服中而最後一次投服 P B S 。在前三次投服係每二週由腹膜內注射一次，其後則每個月投服一次。在第二次投服後開始，在每次免疫後 4 - 7 天對動物抽血以供測定抗體滴定度。動物在最後投服後約 1 週安逸死。

2 . 腦內之 A β 及 A P P 值

在用不同 A β 肽或 A P P 衍生物免疫約 4 個月後，從灌注食鹽水之動物移除腦部。製得一半球以供免疫組織分析而另一半球則用以定量 A β 及 A P P 之值。爲了測定不同形態 β 致澱粉樣肽及致澱粉樣先驅蛋白質之濃度，切除半球並於 5 M 胍中製備海馬，皮質及小腦部份之勻漿。這些經稀釋並藉由與 E L I S A 程式中之 A β 肽或 A P P 一系列已知標準濃度相比較而定出致澱粉樣或 A P P 之數量。

用 P B S 免疫之對照組的全部 A β 在海馬區內之中間濃度值係 5 . 8 倍高於皮質中（海馬組織之中間值爲 2 4 3 1 8 n g / g 而皮質中之中間值爲 4 2 2 1 n g / g ）。對照組之小腦內中間值（ 2 3 . 4 n g / g 組織）約 1 0 0 0 倍低於海馬區內之值。這些數值類似於先前述及之同齡導入外來基因的雜種 P D A P P 鼯鼠之值（ Johnson-Woods et al., 1 9 9 7 , 同上）。

對皮質而言，一部分治療組之全部 A β 及 A β 1 - 4 2 中間值顯顯著與對照組不同（ p , 0 . 0 5 ），該等

五、發明說明 (64)

動物係接受 A N 1 7 9 2，齧齒動物 A β 或 A β 1 - 5 肽共軛體（如附圖 1 1 中所示）。與對照組比較之下，這些治療組之全部 A β 中間值分別減低 7 5 %，7 9 % 及 6 1 %。對任何組而言，腦皮質區內之 A β - 專一性抗體滴定度及 A β 值之間並無任何可識別的關聯性存在。

在海馬區內，全部 A β 之中間值減低伴隨著 A N 1 7 9 2 治療（4 6 %， $P = 0.0543$ ）並未如皮質內見及之值一般大（7 5 %， $P = 0.0021$ ）。然而，海馬區內之減低程度遠大於皮質區內，海馬區內減低淨值為 1 1 1 8 6 n g / g 組織而皮質區內為 3 1 7 1 n g / g 組織。接受齧齒動物 A β 1 - 4 2 或 A β 1 - 5 之動物組的全部 A β 中間值分別減低 3 6 % 及 2 6 %。但是，在二組之間給予不同動物較小尺寸及高度變化致澱粉樣肽值時，這些減低並不明顯。當在海馬區內三測定 A β 1 - 4 2 值時，治療誘起之減低均極微小可予忽略。因此，由於皮質內之 A β 負荷較小，所以，在此區內之變化是治療作用之較敏感指示器。由 E L I S A 測得之皮質內 A β 值變化類似，但不同於免疫組織化學分析結果。

全部 A β 亦在小腦（在阿茲海默氏疾病理學中通常不受影響之區域）內測定。用不同 A β 肽或 A P P 衍生物免疫之任何組的 A β 濃度中間值在此一腦部區域內均與對照組相同。此一結果喻示 A β 之非 - 病理值並不受治療影響。

治療及對照組鼯鼠之皮質及小腦內的 A P P 濃度亦利

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (65)

用 E L I S A 測定。使用二種不同的 A P P 分析。第一種分析 (命名為 A P P - α / F L) 辨識 A P P - α (α , 已在 A β 序列內裂解之分泌形態 A P P) 及全長形態 (F L) 之 A P P , 而第二種分析則僅辨識 A P P - α 。與一部份治療組中之 A β 的治療伴生減低相反地, 在所有治療組動物中之 A P P 值均與對照組相同。這些結果顯示用 A P P 肽免疫並未用盡 A P P ; 而是治療作用對 A β 具專一性。

總而言之, 在使用 A N 1 7 9 2 , 齧齒動物 A β 1 - 4 2 或 A β 1 - 5 共軛體治療之皮質中的全部 A β 及 A β 1 - 4 2 值顯著降低。在海馬區中, 全部 A β 值僅因利用 A N 1 7 9 2 治療而降低。在海馬區, 皮質區或小腦區中之 A β 或 A P P 值並無任何治療伴生之變化是顯著的。

2 . 組織化學分析

製備 6 組鼯鼠之腦以供免疫組織化學分析, 其中 3 組用 A β 肽共軛體 A β 1 - 5 , A β 1 - 1 2 及 A β 1 3 - 2 8 免疫; 二組用全長 A β 凝集物 A N 1 7 9 2 及 A N 1 5 2 8 免疫以及 P B S - 治療之對照組。來自這些組之腦部份中的致澱粉樣負荷之影像分析結果示於附圖 1 2 中。三治療組之皮質區內的致澱粉樣負荷降低顯著大於對照組。致澱粉樣負荷之最大降低見於接受 A N 1 7 9 2 之組 (其平均值降低 9 7 % , P =

五、發明說明 (66)

0 . 0 0 1) 。顯著降低亦見於用 A N 1 5 2 8 (9 5 % , P = 0 . 0 0 5) 及 A β 1 - 5 肽共軛體 (6 7 % , P = 0 . 0 2) 治療之動物。

全部 A β 或 A β 1 - 4 2 利用 E L I S A 定量結果及利用影像分析之致澱粉樣負荷有某種程度的差異。用 A N 1 5 2 8 治療對利用定量影像分析測得之皮質致澱粉樣負荷值有顯著衝擊，但對利用 E L I S A 測得之相同區域內的全部 A β 濃度則否。這二種結果間之差異可能係出於分析之特性。影像分析僅測定凝集於斑內之不可溶 A β 。相反地，E L I S A 則測定所有形態之 A β (可溶與不可溶，單體及凝集的) 。因為疾病病因據認為是 A β 之不可溶斑 - 伴生形態，所以，影像分析技術可能對顯示治療效果較為敏感。但是，因為 E L I S A 是較迅速及容易的分析，所以對篩選極其有用。而且，它可能顯示 A β 之治療 - 伴生降低在斑 - 伴生情況下大於全部 A β 。

為了測定治療動物中，由免疫誘出之 A β - 專一性抗體是否與沉積之腦部致澱粉樣反應，令來自治療動物及對照鼯鼠之切片與鼯鼠 I g G 專一性之抗體反應。與 P B S 組相反地，用 A β 肽共軛體 A β 1 - 5 , A β 1 - 1 2 及 A β 1 3 - 2 8 ; 及全長 A β 凝集物 A N 1 7 9 2 及 A N 1 5 2 8 之動物中，含 A β 之斑包覆著內源性 I g G 。用其他 A β 肽或 A P P 肽 p B x 6 免疫之動物腦部並未利用此一分析法分析。

五、發明說明 (67)

抗體滴定度之測定

在第二次免疫後開始在每次免疫後之第 4 - 7 天對動物抽血，共計抽血五次。抗體係使用三明治 E L I S A (使用塗佈 A β 1 - 4 2 之多分格塑膠培養皿) 如同 A β 1 - 4 2 - 結合抗體般測試。如附圖 1 3 中所示地，尖峰抗體滴定度係在第四次投服誘起 A N 1 7 9 2 - 專一性抗體最高滴定度的四種疫苗後出現：A N 1 7 9 2 (尖峰 G M T : 9 4 6 4 7) ， A N 1 5 2 8 (尖峰 G M T : 8 8 2 3 1) ， A β 1 - 1 2 共軛體 (尖峰 G M T : 4 7 2 1 6) 及齧齒動物 A β 1 - 4 2 (尖峰 G M T : 1 0 7 6 6) 。這些組之滴定度在第五及六次投服後少許降低。其餘五種免疫原之尖峰滴定度則在第五或六次投服後達到且且值遠低於最高滴定度之四組：A β 1 - 5 共軛體 (尖峰滴定度：2 3 5 6) ， p B x 6 (尖峰滴定度：1 9 8 6) ， A β 1 3 - 2 8 共軛體 (尖峰滴定度：1 1 8 3) ， A β 3 3 - 4 2 共軛體 (尖峰滴定度：6 5 8) ， A β 2 5 - 3 5 (尖峰滴定度：1 2 5) 。同系肽之抗體滴定度亦使用相同 E L I S A 三明治程式對免疫原副組 (用 A β 1 - 5 ， A β 1 3 - 2 8 ， A β 2 5 - 3 5 ， A β 3 3 - 4 2 或齧齒動物 A β 1 - 4 2 免疫之組) 測定。這些滴定度大約與針對 A β 1 - 4 2 所測得之值相同，但齧齒動物 A β 1 - 4 2 免疫原例外 (在此情況下，對同系免疫原之抗體滴定度約為二倍高) 。各動物之 A N 1 7 9 2 - 專一性抗體滴定度或治療組之平均值與皮

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (68)

質內之 A β 誘起效率並無關聯。

3 . 淋巴增殖反應

A β - 依賴性淋巴增殖作用係使用第六次最後免疫後約一週收集之逆脾細胞測定。剛收集細胞 (1 0 0 0 0 0 / 分格) 在 A β 1 - 4 0 存在下，在 5 μ M 濃度培養 5 天以行刺激。來自 1 0 組中之 7 組的細胞亦在逆肽 (A β 4 0 - 1) 存在下培養。至於陽性對照組，細胞係用 T - 細胞促細胞分裂劑，P H A，培養，至於陰性對照組，細胞在未加入肽之下培養。大多數動物之淋巴細胞在 P H A 促進下增殖。對 A β 4 0 - 1 逆肽則無顯著回應。用較大凝集 A β 肽，A N 1 7 9 2，齧齒動物 A β 1 - 4 2 及 A N 1 5 2 8 免疫之動物的細胞在 A β 1 - 4 2 刺激下健全的增殖，在 A N 1 7 9 2 接受體中獲致最高 c p m。用 A β 1 - 1 2 共軛體，A β 1 3 - 2 8 共軛體及 A β 2 5 - 3 5 免疫之每一組動物中之 1 隻動物在 A β 1 - 4 0 刺激下增殖。其餘接受 A β 1 - 5 共軛體，A β 3 3 - 4 2 共軛體 p B x 6 或 P B S 之各組對 A β 刺激無回應。這些結果總列於以下表 5 中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (69)

表 5

免疫原	共軛體	A β 胺基酸	反應個數
A β 1-5	是	5-單體	0/7
A β 1-12	是	12-單體	1/8
A β 13-28	是	16-單體	1/9
A β 25-35		11-單體	1/9
A β 33-42	是	10-單體	0/10
A β 1-40		40-單體	5/8
A β 1-42		42-單體	9/9
γ A β 1-42		42-單體	8/8
pBx6			0/8
PBS		0-單體	0/8

由這些結果證明 A N 1 7 9 2 及 A N 1 5 2 8 刺激強烈 T - 細胞反應，最類似 C D 4 ⁺ 表現型。用 A β 1 - 5 免疫之動物中無 A β - 專一性 T 細胞反應並不必感到驚訝，因為 C D 4 ⁺ T 細胞辨識之肽抗原決定基通常約為 1 5 個胺基酸長度，雖然有時較短之肽可能作用效率較小。因此，四種肽共軛體之大多數協助子 T - 細胞抗原決定基可能存在於 I g G 共軛體配對中而不在 A β 區域內。此一假說係以這些治療組中之動物很少出現增殖性反應而支持。因為 A β 1 - 5 共軛體顯著減低腦內之 A β 值，所以在表面缺乏 A β - 專一性 T - 細胞中，由此肽之免疫誘起之主

五、發明說明 (70)

要有效免疫反應似乎是抗體。

缺少 T - 細胞以及來自融合肽 p B x 6 (包括所有 A β 殘基之 A P P 胺基酸 5 9 2 - 6 9 5) 之低抗體反應可能是由於此一特定製劑之不良免疫原性。A β 2 5 - 3 5 凝集物之不良免疫原性可能是因為肽太小而不可能包含一優良之 T - 細胞抗原決定基以協助誘起抗體反應。若此肽共軛至載體蛋白質上則其可能免疫原性較大。

V . 製備被動保護之多株抗體

2 0 隻未導入外來基因的鼯鼠用 A β 或其他免疫原 (任意的加上佐助劑) 免疫且於 4 - 5 個月安逸死。由經免疫之鼯鼠收集血液。任意的，從其他血液成分分離出 I g G 。對免疫原具專一性之抗體可利用親和力層析法部份純化。每隻鼯鼠製得平均約 1 0 . 5 - 1 m g 免疫原 - 專一性抗體，共計得到 5 - 1 0 m g 。

V I . 使用 A β 抗體的被動免疫

7 - 9 個月大 P D A P P 鼯鼠組各注射以 0 . 5 m g 在 P B S 中之如下所示多株 A β - 抗體或專一性單株 A β - 抗體。純化所有抗體製劑以具有低內毒性。單株抗體可藉由注射 A β 之片段或較長形態至鼯鼠體內，製備雜種瘤且篩選專一性結合至 A β 所要片段而不結合至 A β 之其他非重疊片段之抗體的雜種瘤而製成。

五、發明說明(71)

表 6

抗體	抗原決定基
2H3	A β 1-12
10D5	A β 1-12
266	A β 13-28
21F12	A β 33-42
鼯鼠多株人類 A β 抗體	抗-凝集 A β

鼯鼠在 4 個月期間內視需要由腹膜內注射以維持對 A β 42 或其他免疫原之循環抗體濃度(利用 E L I S A 測定)大於 1 / 1 0 0 0 (由 E L I S A 定義)。如上監視滴定度且讓鼯鼠在注射之 4 個月後安逸死。組織化學，死後進行 A β 值及毒性檢驗。

V I I . 不同佐助劑之比較

此一實例比較 C F A ，明礬，油在水中型乳液及 M P L 刺激免疫反應的能力。

A . 材料及方法1 . 研究設計

1 0 0 隻得自 Elm Hill 之 6 週大 Hartley 屬天竺鼠分成 1 0 組且用綜合不同佐助劑之 A N 1 7 9 2 或其棕櫚醯化衍生物免疫。7 組接受綜合 a) P B S ， b) 弗瑞得佐助

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (72)

劑， c) M P L ， d) 角鯊烯 ， e) M P L / 角鯊烯 ， f) 低劑量明礬 ， 或 g) 高劑量明礬 (3 0 0 μ g A N 1 7 9 2) 之 A N 1 7 9 2 (3 3 μ g ， 除非另外指明) 注射。二組接受綜合 a) P B S 或 b) 角鯊烯 之 A N 1 7 9 2 (3 3 μ g) 棕櫚醯化衍生物注射。最後第十組接受不含抗原或其他佐助劑之單獨 P B S 。接受弗瑞得佐助劑之組的第一次劑量用 C F A 乳化而其餘四次劑量用 I F A 乳化。所有組之抗原投服劑量均為 3 3 μ g (但高劑量明礬組除外，其接受 3 0 0 μ g A N 1 7 9 2) 。 C F A / I F A 係由腹膜內注射而所有其他各組肌內注射於後肢四頭肌內 (左側及右側交替注射) 。前三次劑量係每二週投服一次而隨後二劑量每個月投服一次。

2 . 製備免疫原

將 2 m g A β 4 2 (California PEPTIDE, Lot M E 0 3 3 9) 加至 0 . 9 m l 去離子水中並翻轉混合物以產生相當均勻之懸浮液。加入 1 0 0 μ l 之 1 0 X P B S (1 X P B S , 0 . 1 5 M N a C l , 0 . 0 1 M 磷酸鈉 , p H 7 . 5) 。再度翻轉懸浮液並於 3 7 。 C 下孵養過夜以供次日使用。未使用之 A β 1 - 4 2 以低壓凍乾粉末形態用乾燥劑貯於 - 2 0 。 C 下。A N 1 7 9 2 之棕櫚醯化衍生物係利用偶合棕櫚酸酐 (溶於二甲基甲醯胺中) 至 A N 1 7 9 2 之胺基終端，再用氫氟酸處理以從樹脂移除初生肽而製得。

五、發明說明 (73)

爲了製備含完全弗瑞得佐助劑 (C F A) (第 2 組) 之疫苗藥劑，在 2 0 0 μ l P B S 中之 3 3 μ g A N 1 7 9 2 用 C F A 乳化 (1 : 1 ， 體積比) 至最後體積爲 4 0 0 μ l 以供初次免疫之用。爲供其後之免疫使用，抗原係類似地用不完全弗瑞得佐助劑 (I F A) 乳化。

爲了製備第 5 及 6 組使用之含 M P L 的疫苗藥劑，將低壓凍乾粉末 (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT) 加至 0 . 2 % 三乙胺水溶液中至最後濃度爲 1 m g / m l 且加以翻轉。加熱混合物至 6 5 - 7 0 。 C 經 3 0 秒鐘以產生微胞之輕微不透明懸浮液。每次注射前才配製溶液。在第 5 組之每次注射中，在 1 6 . 5 μ l P B S 中之 3 3 μ g A N 1 7 9 2 ， 5 0 μ g M P L (5 0 M l) 及 1 6 2 μ l P B S 在使用前才混合於硼基矽酸鹽試管中。

爲了製備含低油在水中型乳液之疫苗藥劑，將 P B S 中之 A N 1 7 9 2 加至 5 % 角鯊烯， 0 . 5 % Tween 80, 0 . 5 % P B S 中之 Span 85 直到獲致 3 3 μ g / 2 5 0 μ l A N 1 7 9 2 之最後單一劑量濃度 (第 6 組) 。令混合物通過二小室手固定裝置 1 5 - 2 0 次直到乳化顆粒直徑似乎等於 1 . 0 μ m (在顯微鏡下觀察) 爲止。所得懸浮液是爲發出蛋白光的乳白色。乳液係在每一系列注射前才配製。對第 8 組而言，在 0 . 2 % 三乙胺中之 M P L 以 5 0 μ g / 劑之濃度加至角鯊烯中且如上所示地乳化潔淨的混合物。對棕櫚醯衍生物 (第 7 組) 而言， 3 3 μ g /

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (74)

劑之棕櫚醯基 - N H - A β 1 - 4 2 加至角鯊烯中並加以翻轉。再於翻轉同時加入 Tween 80 及 Span 85。將此一混合物加至 P B S 中而達 5 % 角鯊烯，0.5 % Tween 80，0.5 % Span 85 之最後濃度並如上所示地乳化該混合物。

爲了製備含明礬之疫苗藥劑（第 9 及 10 組），將 P B S 中之 A N 1 7 9 2 加至 Alhydrogel（氫氧化鋁凝膠，Accurate, Westbury < NY）而達到最後 250 μ l 劑量體積中 33 μ g / 5 m g 明礬（低劑量，第 9 組）或 300 μ g / 5 m g 明礬（高劑量，第 10 組）之 A N 1 7 9 2。

3 . 測定抗體滴定度

天竺鼠在第二次免疫開始後之第 6 - 7 天抽血共四次。對 A β 4 2 之抗體滴定度利用如一般材料及方法中所述之 E L I S A 測定。

4 . 組織製備

約 1 4 週後，所有天竺鼠投服 C O 2。收集腦脊髓液並移除腦子且切除三個腦區（海馬，皮質及小腦）而利用 E L I S A 測定全部 A β 蛋白質濃度。

B . 結果

1 . 抗體反應

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (75)

在測定為免疫後對 A N 1 7 9 2 之抗體反應時，不同佐助劑之潛效範圍廣泛。如附圖 1 4 中所示地，當 A N 1 7 9 2 在 P B S 中投服時，在二或三次免疫後未偵得任何抗體且在第四及五次投藥後偵得幾何平均滴定度 (G M T s) 僅約 4 5 之可忽略反應。o / w 乳液在第三次投藥 (G M T 2 5 5) 後誘起適度滴定度，其維持至第四次投藥 (G M T 3 0 1) 後而在最後投藥 (G M T 5 4) 後降低。結合至明礬之 A N 1 7 9 2 有明顯的抗原劑量反應，因為 3 0 0 μ g 在所有時間點之免疫活性均大於 3 3 μ g。在尖峰抗體反應下，第四次免疫後，二劑量間之差異為 4 3 % (3 3 μ g 及 3 0 0 μ g 之 G M T s 分別為 1 9 4 0 及 3 4 0 0)。對 3 3 μ g A N 1 7 9 2 及 M P L 之抗體反應極類似於幾乎高十倍以上劑量之結合至明礬的抗原 (3 0 0 μ g) 所產生之抗體反應。將 M P L 加至 o / w 乳液中會使疫苗效力提高至高達僅用 M P L 作為單獨佐助劑時之 7 5 %。A N 1 7 9 2 之棕櫚醯化衍生物在 P B S 中投服時是完全無抗原活性的而當在 o / w 乳液中投服時則產生適度滴定度 (第三及四次抽血云 G M T s 分別為 3 4 0 及 1 0 5)。最高抗體滴定度係用弗瑞得佐助劑時產生 (G M T 為約 8 7 0 0 0)，該 G M T 值幾乎 3 0 倍大於次二最高潛效疫苗 (M P L 及高劑量 A N 1 7 9 2 / 明礬) 之 G M T。

在此一研究中辨識出之最有希望佐助劑是 M P L 及明礬。此二者當中，M P L 因為需要 1 0 倍高之抗原劑量以

五、發明說明 (76)

產生與明礬所獲致之相同抗體反應，所以較為理想。反應可藉由提高抗原和／或佐助劑劑量及令免疫療程最適宜而得提高。o/w乳液是AN1792之極弱佐助劑且將o/w乳液加至MPL佐助劑中降低單獨MPL之固有佐助劑活性。

2. 腦內之A β

約14週大之天竺鼠深度麻醉，抽出腦脊髓液（CSF）並將用弗瑞得佐助劑（第2組）1MPL（第5組），含高劑量（300 μ g AN1792）之明礬（第10組）免疫之各組以及PBS免疫對照組動物之腦部切除。為了測定A β 肽之值，切除腦半球且於5M腦中製備海馬，皮質與小腦區之均化物。將其稀釋並藉由與ELISA程式中之一系列已知濃度A β 標準蛋白質稀釋液比較以定量之。在海馬，皮質及小腦內之A β 蛋白質值在所有四組中均極類似，縱使由這些疫苗誘起之對A β 的抗體反應範圍廣泛。在海馬內測得平均A β 值為約25 ng/g，皮質內之值為21 ng/g，而小腦內之值為12 ng/g。因此，在某些動物中幾乎3個月內存在之對A β 之高循環抗體滴定度並不改變其腦內之全部A β 值。在CSF中之A值在各組之間亦極類似。AN1792免疫對內源性A缺乏大作用顯示免疫反應著眼於A之致病原形成。

五、發明說明 (77)

V I I I . 鼯鼠中對不同佐助劑之免疫反應

此一研究中使用 6 週大 Swiss Webster 雌性鼯鼠，每組 10 - 13 隻鼯鼠。免疫係在第 0，14，28，60，90 及 20 天進行皮下注射 200 μ l 劑量。在所有調劑中使用 P B S 作為緩衝液。在第二次投藥後開始，在每次免疫後第 7 天對動物抽血以供利用 E L I S A 分析抗體滴定度。每一組之治療過程總列於表 7 中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (78)

表 7

Betabloc 研究 010之實驗設計					
組	N ^a	佐助劑 ^b	劑量	抗原	劑量 (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	AN1792	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		無	
9	10	乳化角鯊烯	5%	AN1792	33
10	10	混合角鯊烯	5%	AN1792	33
11	10	明礬	2mg	AN1792	33
12	13	MPL+明礬	50 μ g/2 μ g	AN1792	33
13	10	QS21	5 μ g	AN1792	33
14	10	QS21	10 μ g	AN1792	33
15	10	QS21	25 μ g	AN1792	33
16	13	QS21	25 μ g	AN1792	150
17	13	QS21	25 μ g	AN1792	33
18	13	QS21+MPL	25 μ g / 50 μ g	AN1792	33
19	13	QS21+明礬	25 μ g/2mg	AN1792	33

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(79)

附註：

- a 實驗開始時每組之鼯鼠數目
- b 指明佐助劑。所有這些調合物之緩衝液是 P B S。第 8 組無佐助劑與抗原。

每一組中抗體對 A β 之 E L I S A 滴定度示於以下表 8 中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(80)

表 8

幾何平均抗體滴定度					
抽血週數					
治療組	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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (81)

此表顯示出最高滴定度係在第 4 , 5 及 1 8 組獲致 , 其中 , 佐助劑係為 1 2 5 μ g M P L , 5 0 μ g M P L 及 Q S 2 1 + M P L 。

I X . 不同佐助劑之治療效力

治療效力研究係於導入外來基因之 P D A P P 颯鼠中 , 用適供人類使用之佐助劑進行以決定它們對 A β 之潛在免疫反應以及誘起腦內致澱粉樣沉積之免疫媒介清除的能力大小。1 8 0 隻 7 . 2 - 8 . 5 月大之導入外來基因的雜種 P D A P P 雄性及雌性颯鼠係得自查理士河實驗室。將其分成 9 組 , 每組 1 5 - 2 3 隻動物以使用綜合不同佐助劑之 A N 1 7 9 2 或 A N 1 5 2 8 免疫。動物依性別 , 年齡及血統分組而使各組儘可能相近。佐助劑包括明礬 , M P L 及 Q S 2 1 , 共各綜合二種抗原 , 而弗瑞得佐助劑 (F A) 僅綜合 A N 1 7 9 2 。另一組係用調製於 P B S 緩衝液及防腐性局部抗菌劑 (thimerosal) 中且不含佐助劑之 A N 1 7 9 2 免疫。第 9 組僅用 P B S 免疫而充作負面對照組。

製備凝集之 A β 肽 : 人類 A β 1 - 4 0 (AN1528 ; California Peptides Inc., Lot M E 0 5 4 1) 及人類 A β 1 - 4 2 (A N 1 7 9 2 ; California Peptides Inc., Lot M E 0 4 3 9) 從乾燥貯於 - 2 0 . C 下之低壓凍乾粉末當即溶解以供製備每一組注射液。爲了此一目的 , 將 2 m g 肽加至 0 . 9 m l 去離子水中並翻轉混合物而產生

五、發明說明(82)

相當均勻之溶液或懸浮液。A N 1 5 2 8 在此一步驟是可溶的而 A N 1 7 9 2 則否。在 A N 1 5 2 8 開始沉澱時再加入 1 0 0 μ l 之 1 0 X P B S (1 X P B S : 0 . 1 5 M N a C l , 0 . 0 1 M 磷酸鈉 , P h 7 . 5) 。再度翻轉懸浮液並於 3 7 . C 下孵養過夜以供次日使用。

爲了製備含明礬之疫苗藥劑(第1及5組),將 P B S 中之 A β 肽加至 Alhydrogel (2 % 氫氧化鋁凝膠水溶液, Sargeant, Inc., Clifton, NJ) 中使達到 1 0 0 μ g A β 肽 / 1 m g 明礬之最後濃度。懸浮液再於注射前,在室溫下溫和地混合約 4 小時。

爲了製備含 M P L 之疫苗藥劑(第2及6組),將低壓凍乾粉末(Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT; Lot 6 7 0 3 9 - E 0 8 9 6 B) 加至 0 . 2 % 三乙胺水溶液中使達到 1 m g / m l 之最後濃度並予以翻轉。加熱混合物至 6 5 - 7 0 . C 經 3 0 秒以產生微團之輕微不透明均勻懸浮液。溶液貯於 4 . C 下。對每一組注射液而言,在 5 0 μ l P B S 中之 1 0 0 μ g 肽 / 劑量, 5 0 μ g M P L / 5 0 μ l / 劑量及 1 0 0 μ l P B S / 劑量在使用前當即混合於硼矽酸鹽試管內。

爲了製備含 Q S 2 1 之疫苗藥劑(第3及7組),將低壓凍乾粉末(Aquila, Framingham, MA; Lot A 7 0 1 8 R) 加至 P B S (p H 6 . 6 - 6 . 7) 中使達到 1 m g / m l 之最後濃度並予以翻轉。溶液貯於 - 2 0 . C 下。對

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (83)

每一組注射液而言，在 $50 \mu l$ P B S 中之 $100 \mu g$ 肽 / 劑量， $25 \mu g$ Q S 2 1 / $25 \mu l$ P B S / 劑量及 $125 \mu l$ P B S / 劑量在使用前當即混合於硼矽酸鹽試管內。

爲了製備含弗瑞得佐助劑之疫苗藥劑（第 4 組），在 $200 \mu l$ P B S 中之 $100 \mu g$ A N 1 7 9 2 用完全弗瑞得佐助劑（C F A）以 1 : 1（體積 / 體積）乳化而得最後體積爲 $400 \mu l$ 以供初次免疫之用。其後之免疫中，抗原用不完全弗瑞得佐助劑（I F A）以類似方式乳化。爲了含佐助劑（明礬，M P L 或 Q S 2 1）之疫苗，每劑量 $100 \mu g$ A N 1 7 9 2 或 A N 1 5 2 8 綜合明礬（ $1 m g$ / 劑量）或 M P L（ $50 \mu g$ / 劑量）或 Q S 2 1（ $25 \mu g$ / 劑量）至最後體積爲 $200 \mu l$ P B S 並由皮下接種於兩肩胛之間的背部。爲了接受 F A 之組， $100 \mu g$ A N 1 7 9 2 用完全弗瑞得佐助劑（C F A）以 1 : 1（體積 / 體積）乳化而得最後體積爲 $400 \mu l$ 並由腹膜內注射以行首次免疫，隨後追加相同數量之不完全弗瑞得佐助劑中的免疫原於其餘五次免疫。爲了接受不含佐助劑之 A N 1 7 9 2 組， $10 \mu g$ A N 1 7 9 2 綜合 $5 \mu g$ thimerosal 至 $50 \mu l$ P B S 最後體積並由皮下注射。第 9 組（對照組）僅由皮下注射以 $200 \mu l$ P B S。免疫療程係爲前三次投服均每二週進行一次，其後每月進行一次而在第 0，16，28，56，85 及 112 天投服。在第二次投藥後開始，於每

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (84)

次免疫後 6 - 7 天對動物抽血以測定抗體滴定度。動物在最後投服後約 1 週安逸死。結果係利用腦內之 A β 及 A P P 值的 E L I S A 分析以及腦部份存在之致澱粉樣斑的免疫組織化學評估而得。此外，還測得 A β - 專一性抗體滴定度，以及 A β - 依賴性增殖與細胞分裂反應。

表 3 顯示對 A β 1 - 4 2 之最高抗體滴定度係由 F A 及 A N 1 7 9 2 誘起，尖峰滴定度出現在第四次免疫後（尖峰 G M T : 7 5 3 8 6）而在最後第六次免疫後降低 5 9 %。由含 A N 1 7 9 2 之 M P L 誘起之尖峰平均滴定度係 6 2 % 低於由 F A 誘起之值且亦在免疫療程早期，在第三次投服後達到，隨後在第六次免疫後降低至尖峰值之 2 8 %。由綜合 A N 1 7 9 2 之 Q S 2 1 產生的尖峰平均滴定度（G M T : 1 5 1 1）約五倍低於由 M P L 所得值。此外，因為需要額外免疫以達到尖峰反應，所以反應之動力學減緩。由明礬 - 結合 A N 1 7 9 2 所產生之滴定度稍大於 Q S 2 1 所產生之值且反應動力學較快速。對含 thimerosal 之 P B S 中輸送的 A N 1 7 9 2 而言，滴定度之頻率及大小勉強大於單獨 P B S 所致值。由 M P L 及 A N 1 7 9 2 產生之尖峰滴定度（尖峰 G M T 3 0 9 9）約 9 倍低於由 A N 1 7 9 2 所產生之值。明礬 - 結合之 A N 1 7 9 2 因僅在少許動物中產生低滴定度，故其免疫活性極差。在僅用 P B S 免疫之對照組動物中未見及任何抗體反應。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (85)

表 9

幾何平均抗體滴定度 ^a					
抽血週數					
治療	3.3	5.0	9.0	13.0	17.0
明礬 / AN1792	102 (12/21) ^b	1081 (17/20)	2366 (21/21)	1083 (19/21)	572 (18/21)
MPL / AN1792	6241 (21/21)	28867 (21/21)	11242 (21/21)	5665 (20/20)	8204 (20/20)
QS21 / AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1511 (17/18)	1188 (14/18)
CFA / AN1792	10076 (15/15)	61279 (15/15)	75386 (15/15)	41628 (15/15)	30574 (15/15)
明礬 / AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/20)	31 (2/20)
MPL / AN1528	184 (15/21)	2591 (20/21)	1653 (21/21)	1156 (20/22)	3099 (20/20)
QS21 / AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2994 (21/22)
PBS+ Thimerosal	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)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (87)

之鼯鼠，A N 1 7 9 2 + C F A / I F A 治療組之減低達到統計意義（P，0.05）。A N 1 7 9 2 + thimerosal 治療之鼯鼠的中間值是為 1 6 1 9 n g / g A β 4 2。

X. 毒性分析

收集組織以供實例 2，3 及 7 中所述之研究結束處之組織致病學檢視之用。此外，血液學及臨床化學亦對實例 3 及 7 之末梢血液樣品進行。評估大部份之主要器官，其包括腦，肺，淋巴樣，胃腸，肝，腎，腎上腺及內芽胞。雖然在研究動物中見及散發病灶，但經或未經

A N 1 7 9 2 治療之動物，無論是罹患組織或病灶嚴重程度方面均無任何明顯差別。與 P B S - 治療或未治療動物比較之下，A N - 1 7 8 2 免疫之動物中並未見及任何獨特之組織致病病灶。在實例 7 中，佐助劑組與 P B S 治療動物間亦無任何臨床化學模式差異。雖然相對於 P B S 治療動物而言，在實例 7 中之用 A N 1 7 9 2 及弗瑞得佐助劑治療之動物，幾個血液學參數顯著提高，但這些作用形態係為弗瑞得佐助劑治療及伴生之腹膜炎所預期的並不代表來自 A N 1 7 9 2 治療之任何負作用。即使並非毒性評估之一部份，進一步檢視 P D A P P 鼯鼠腦部病理學作為效力結點之一部份。在任何研究中均未見及治療相關之對腦部形態學的負作用。由這些結果顯示出 A N 1 7 9 2 治療是耐受性極佳且至少實際上無副作用。

五、發明說明 (88)

X I . 個體之預防及治療

進行單一劑量第 I 期試驗以測定安全性。治療劑以預期效力值之約 0 . 0 1 漸增劑量投服至不同病人，再以 3 之因子提高至達到約 1 0 倍於有效鼯鼠劑量之值為止。

進行第 I I 期試驗以測定治療效力。選擇罹患使用阿茲海默氏疾病及相關疾病結合 (A D R D A) 準則定義之早 - 中期阿茲海默氏疾病的病人。適當病人在 Mini-Mental State Exam (M M S E) 中在 1 2 - 2 6 範圍內評分。其他選擇標準是為病人在研究期間可能存活下來並無複雜影響因素，諸如，使用會產生干擾之併服藥物。病人功能之基準評估係用典型精神測驗法進行，諸如，M M S E 及 A D A S ，其係為評估阿茲海默氏疾病病人之疾病狀態與功能的範圍廣泛準繩。適當之定性生命準繩亦可用以監控治療。疾病進展亦可用 M R I 監控，病人的血液型態亦可監控，其包括免疫原 - 專一性抗體及 T - 細胞反應分析。

基準測定之後病人開始接受治療。他們以盲目方式任意用治療劑或安慰劑治療。至少每 6 個月監控病人。效力係藉由治療劑相對於安慰劑之進展顯著降低而測得。

進行第 I I 期試驗以評估病人由非阿茲海默氏疾病早年記憶喪失 (有時稱之為年齡 - 伴生之記憶受損，A A M I) 轉化成如 A D R D A 準則定義之可能阿茲海默氏疾病。具有轉化成阿茲海默氏疾病高危險性之病人係藉由篩選伴生預 - 阿茲海默氏疾病症候之記憶喪失或其他困難之參考人口，阿茲海默氏疾病家族史，遺傳性危險因子

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (90)

NaCl, 0.6% 胎牛血清白蛋白, 0.05% thimersal) 中的 1 / 100 稀釋液開始。樣品之 7 個系列稀釋液以 3 倍步驟直接在板內製備而達到 1 / 218700 之最後稀釋液。各稀釋液在室溫下在經塗布一板分格內孵養 1 小時。該板再用含 0.05% Tween 20 之 PBS 洗滌 4 次。將共軛至辣根過氧化酶 (得自 Boehringer Mannheim) 之第二抗體 (羊之抗-鼯鼠 Ig) 以在 Specimen Diluent 中之 1 / 3000 稀釋液 (100 μ l) 加至分格內並在室溫下孵養 1 小時。該板再用 PBS, Tween 20 洗滌 4 次。爲了發展色原, 將 100 μ l 之 Slow TMB (3, 3', 5, 5' - 四甲基聯苯胺, 得自 Pierce Chemicals) 加至每一分格內且於室溫下孵養 15 分鐘。反應由加入 25 μ l 之 2M H₂SO₄ 而中止。再於 Molecular Devices Vmax (450 nm - 650 nm) 讀取顏色強度。

滴定度定義爲產生 1 / 2 最大 OD 之血清稀釋濃度。最大 OD 通常由初始之 1 / 100 稀釋濃度取得, 但在極高滴定度之情況下例外, 在該情況下, 需要較高初始稀釋濃度以得最大 OD。若 50% 之點落在二稀釋濃度之間, 則採線性外堆法計算最後滴定度。爲了計算幾何平均抗體滴定度, 小於 100 之滴定度則任意定爲 25。

2. 淋巴細胞增殖分析

用 isoflurane 麻醉鼯鼠。移除脾臟且用 5 ml 含 10%

五、發明說明(91)

熱 - 去活化胎牛血清之 P B S (P B S - F B S) 清洗 2 次，再於 1 . 5 m l P B S - F B S 中之 5 0 μ Centricon 單元 (Dako A/S, Denmark) 內，在 Medimachine (Dako) 中在 1 0 0 r p m 下均化 1 0 秒，隨後，經由 1 0 0 μ 孔徑尼龍篩網過濾。脾細胞用 1 . 5 m l P B S - F B S 洗滌 1 次，再於 2 0 0 x g 下離心 5 分鐘以成粒狀。紅色血液細胞係藉由在室溫下，再度懸浮丸粒於 5 m l 含 0 . 1 5 M N H ₄ C l , 1 M K H C O ₃ , 0 . 1 M N a E D T A 之緩衝液，p H 7 . 4 中 5 分鐘布溶解。白血球再如上洗滌。剛分離出之脾細胞 (1 0 0 0 0 0 細胞 / 分格) 以三份方式，在 9 6 - 分格之 U 形底組織培養 - 處理的微滴定板 (Corning, Cambridge, MA) 中，在補充 2 . 0 5 m M L - 麩胺酸，1 % 盤尼西林 / 鏈霉素及 1 0 % 熱 - 去活化 F B S 之 R P M I 1 6 4 0 介質 (JRH BIOSCIENCES, Lenexa, KS) 內，在 3 7 . C 下培養 9 6 小時。各種 A β 肽類，A β 1 - 1 6 , A β 1 - 4 0 , A β 1 - 4 2 或 A β 4 0 - 1 逆序列蛋白質亦在四步驟內，在 5 μ M - 0 . 1 8 μ M 劑量範圍內加入。對照組分格內之細胞用未加入蛋白質之 Concanavalin A (Con A) (Sigma, cat. # C - 5 2 7 5 , 1 μ g / m l) 培養。細胞在最後 2 4 小時用 3 H - 胸腺核苷 (1 μ C i / 分格，得自 Amersham Corp., Arlington Heights IL) 脈衝。細胞再收集至 UniFilter 板上並在 Top Count Microplate 閃爍計數器 (Packard Instruments, Downers Grove, IL) 中計數。結果

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (92)

以併入不可溶巨分子內之放射活性的次數 / 分鐘 (c p m) 表示。

4 . 腦組織製備

安逸死後，移除腦並製備一半球以供免疫組織化學分析之用而從另一半球切除三個腦區（海馬，皮質及小腦）且用以使用專一性 E L I S A s (Johnson-Wood et al., 同上) 測定各種形態 A 蛋白質及 A P P 的濃度。

供 E L I S A s 用之組織在 1 0 體積冰冷胍緩衝液 (5 . 0 M 胍 - H C l , 5 0 m M T r i s - H C l , p H 8 . 0) 中均化。均化物使用 Adams Nutator (fisher) , 在室溫下溫和攪拌 3 - 4 小時，再於定量 A β 及 A P P 前貯於 - 2 0 . C 下。先前實驗已證明分析物在此一貯存條件下是安定的，而合成之 A β 蛋白質 (Bachem) 在釘入來自鼯鼠 littermates (Johnson-Wood et al., 同上) 之對照組腦組織均化物時可定量回收。

5 . 測定 A β 值

腦均化物用冰冷酪蛋白稀釋劑 (0 . 2 5 % 酪蛋白 , P B S , 0 . 0 5 % 疊氮化鈉 , 2 0 g / m l aprotinin , 5 m M E D T A p H 8 . 0 , 1 0 g / m l leupeptin) , 以 1 : 1 0 之比例稀釋並在 4 . C , 1 6 0 0 0 x g 下離心 2 0 分鐘。製備合成之 A β 蛋白質標準物及 A P P 標準物以包含 0 . 5 M 胍與 0 . 1 % 胎牛血清白蛋白 (

五、發明說明(93)

B S A) 於最後組成物中。"全部" A β 三明治
 E L I S A 使用單株抗體 (m A) 2 6 6 (對 A β 之胺基
 酸 1 3 - 2 8 (Seubert, et al.,) 具專一性) 作為捕捉抗體
 , 而生物化 m A 3 D 6 (對 A β 之胺基酸 1 - 5 (Johnson
 -Wood, et al) 具專一性) 作為接受抗體。3 D 6 m A 並不
 辨識分泌之 A P P 或全長 A P P 而僅偵測含天冬胺酸胺基
 終端之 A β 。此一分析具有 $\sim 50 \rho g / m l$ ($11 \rho M$)
) 之敏感性下限且在高達 $1 n g / m l$ 之濃度下, 對內源
 性之鼯鼠 A 蛋白質無交叉反應力 (Johnson-Wood et al., 同
 上) 。

A β 1 - 4 2 專一性三明治 E L I S A 採用 m A β
 2 1 F 1 2 (對 A β 之胺基酸 3 3 - 4 2 (Johnson-Wood
 et al.) 具專一性) 作為捕捉抗體。生物化之 m A β
 3 D 6 亦充作本分析中之接受抗體, 此分析之敏感性下限
 為約 $125 \rho g / m l$ ($28 \rho m$, Johnson-Wood et al.)
 。對 A E L I S A s 而言, $100 \mu l$ 之 m A 2 6 6 ($10 \mu g / m l$)
) 或 m A β 2 1 F 1 2 ($5 \mu g / m l$)
 刊利用在室溫下培養過夜而塗布至 9 6 - 分格免疫分析板
 (Costar) 之分格內。抽吸移除溶液且在室溫下, 在至少 1
 小時內, 將 $200 \mu l$ 之 0 . 2 5 % P B S 緩衝液中之人
 類血清白蛋白加至分格內而封阻之。移除封阻溶液並將該
 板乾燥貯存在 4 . C 下直到使用為止。各板在使用前再用
 洗滌緩衝液 (T r i s - 緩衝之食鹽水, 0 . 1 5 M
 N a C l , 0 . 0 1 M T r i s - H C l , p H 7 . 5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(94)

加上 0.05% Tween 20) 水合。樣品及標準物各以 100 μ l / 分格加入 (3 份) 後再於 4. C 下孵養過夜。各板在分析之每一步驟間用洗滌緩衝液至少洗滌 3 次。加入生物化之 m A β 3 D 6 (在酪蛋白分析緩衝液 (0.25% 酪蛋白, P B S, 0.05% Tween 20, p H 7.4) 中稀釋至 0.5 μ g / ml) 並於室溫下, 在分格中培養 1 小時。在室溫下, 1 小時內, 在分格中加入抗生物素蛋白-辣根過氧化酶共軛體 (Avidin-HRP, 得自 Vector, Burlingame, CA, 在酪蛋白分析緩衝液中以 1 : 4000 比例稀釋)。加入比色基質 (Slow TMB-ELISA (Pierce)) 並使其在室溫下反應 15 分鐘, 其後, 由加入 25 μ l 之 2 N H₂SO₄ 而中止酶化反應。反應產物利用 Molecular Devices Vmax 定量, 測定在 450 nm 及 650 nm 之吸收性差異。

6. 測定 A P P 值

採用兩種不同的 A P P 分析。第一種分析 (定名為 A P P - α / F L) 辨識 A P P 之 A P P - α (α) 及全長 (F L) 兩種形態。第二種分析對 A P P - 具專一性。A P P - α / F L 分析辨識含 A β 之前 12 個胺基酸的分泌胺基酸。因為接受抗體 (2 H 3) 對出現於 A P P 6 9 5 (Esch et al., Science 248, 1122 - 1124 (1990)) 之胺基酸 612 - 613 間的一夾一位置無專一性; 所以, 此分析亦辨識全長 A P P (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(95)

A P P - F L) 。使用 A P P - F L 之細胞質尾部的固定不動 A P P 抗體以耗竭 A P P - F L 之腦均化物喻示約 30 - 40 % A P P - α / F L A P P 是 F L (數據未示出) , A P P - α / F L 及 A P P - α 分析之捕捉抗體均為 m A β 8 E 5 , 其針對 A P P 6 9 5 形態之胺基酸 4 4 4 - 5 9 2 培植 (Games et al., 同上) 。 A P P - α / F L 分析之接受抗體 m A β 是 m A β 2 H 3 , 其對 A P P 6 9 5 之胺基酸 5 9 7 - 6 0 8 具專一性 (Johnson-Wood et al., 同上) 而 A P P - α 分析之接受抗體是 m A β 1 6 H 9 , 其針對 A P P 之胺基酸 6 0 5 - 6 1 1 培植。 A P P - α / F L 分析之敏感性下限為約 1 1 n g / m l (1 5 0 ρ M) (Johnson-Wood et al.) 而 A P P - α 專一性分析之敏感性下限為 2 2 n g / m l (0 . 3 ρ M) 。對二種 A P P 分析而言, m A 8 E 5 係如上 m A β 2 6 6 中所述地塗布至 E I A 板之 9 6 - 分格內。使用純化之重組分泌 A P P - α 作為 A P P - α 分析與 A P P - α / F L 分析之參考標準 (Esch et al., 同上) 。在 5 M 胍中之腦均化物用 E L I S A 樣品稀釋劑 (0 . 0 1 4 M 磷酸鹽緩衝液, p H 7 . 4 , 0 . 6 % 胎牛血清白蛋白, 0 . 0 5 % thimerosal, 0 . 5 M N a C l , 0 . 1 % N P 4 0) 以 1 : 1 0 之比例稀釋。它們再用含 0 . 5 M 胍之樣品稀釋劑以 1 : 4 之比例稀釋。稀釋均化物再於室溫及 1 6 0 0 0 x g 下離心 1 5 秒鐘。 A P P 標準物及樣品以雙份方式加至板內並於室溫下孵養 1 小時。

五、發明說明(96)

生物化接受抗體 2 H 3 或 1 6 H 9 用樣品在室溫下孵養 1 小時。以 1 : 1 0 0 0 比例稀釋於樣品稀釋劑中之鏈抗生物素蛋白 - 鹼性磷酸酶 (Boehringer Mannheim) 在分格內，室溫下孵養 1 小時。加入螢光基質 4 - 甲基 - 繖形酮基 - 磷酸鹽作 3 0 分鐘室溫孵養且在 Cytofluor tm 2 3 5 0 螢光計數器 (Millipore) 上，在 3 6 5 n m 激發及 4 5 0 n m 發射波長處讀值。

7. 免疫組織化學

腦子固定在 4 . C 下之 4 % P B S 內的伸甲醛中 3 天後，再貯於 4 . C 下之 1 % 伸甲醛，P B S 中 1 - 7 天直到切斷為止。4 0 微米厚之冠狀部份在室溫下，在 vibratome 上切割並在兌免疫組織化學處理前貯於 - 2 0 °C 下之低溫人保護劑 (在磷酸鹽緩衝液中之 3 0 % 甘醇，3 0 % 乙二醇) 內。每一腦內在背側海馬處之 6 個各由連續 2 4 0 μ m 間隔分開之部份用下列抗體之一孵養過夜：
 (1) 在 P B S 及 1 % 馬血清中稀釋至濃度為 2 μ g / m l 之生物素化抗 - A β (m A β , 3 D 6 , 對人類 A β 具專一性) ; 或 (2) 在 P B S 及 1 % 馬血清中稀釋至濃度為 3 μ g / m l 之對人類 A P P , 8 E 5 具專一性的生物素化 m A β ; 或 (3) 在 T r i s - 緩衝食鹽水，p H 7 . 4 (T B S) 中之對神經膠纖維酸性蛋白質 (GFAP; Sigma Chemical Co.) 具專一性之 m A β , 其用 0 . 2 5 % Triton X - 1 0 0 與 1 % 馬血清以 1 : 5 0 0

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(97)

之比例稀釋；或(4)在TBS中之對CD11b，
Mac-1抗原(Chemicon International)具專一性的
mAb，其用0.25% Triton X-100與1%兔子血清
以1:100之比例稀釋；或(5)在TBS中之對
MHCI1抗原(Pharmingen)具專一性的mAb，其用
0.25% Triton X-100與1%兔子血清以1:
100之比例稀釋；或(6)在PBS中之對CD43(
Pharmingen)具專一性的兔子mAb，其用1%兔子血清以
1:100之比例稀釋；或(7)在PBS中之對CD
45RA(Pharmingen)具專一性的兔子mAb，其用1%
兔子血清以1:100之比例稀釋；或(8)在PBS中
之對CD45RB(Pharmingen)具專一性的兔子單株
mAb，其用1%兔子血清以1:100之比例稀釋；或
(9)在PBS中之對CD45(Pharmingen)具專一性
的兔子單株mAb，其用1%兔子血清以1:100之比
例稀釋；或(10)在PBS中之對CD3e(
Pharmingen)具專一性的生物素化多株大鼠抗體兔子
mAb，其用1%兔子血清以1:100之比例稀釋；或
(11)在PBS中之對CD3(Serotec)具專一性的兔
子mAb，其用1%兔子血清以1:200之比例稀釋或
(12)PBS溶液，其缺乏主要抗體而包含1%正常馬
血清。

與以上1, 2及6-12中所列抗體溶液反應之部份
用PBS中之1% Triton X-100, 0.4% 過氧化氫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(98)

，在室溫下預處理 20 分鐘以封阻內源性過氧化酶。它們隨後在 4 °C 下，用主要抗體孵養過夜。與 3D6 或 8E5 或 CD3ε mAb 反應之部份再於室溫下，與 PBS 中以 1 : 75 比例稀釋之含組成分 "A" 及 "B" 的辣根過氧化酶 - 抗生物素蛋白 - 生物素 - 複合物 (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA) 反應。與對 CD45Ra, CD45RB, CD45, CD 及缺乏主要抗體之 PBS 溶液反應之各部份在室溫下，分別用 PBS 中之以 1 : 75 比例稀釋的生物素化抗 - 兔子 IgG (vector) 或 PBS 中之以 1 : 75 比例稀釋的生物素化抗 - 小鼠 IgG (vector) 孵養 1 小時。各部份再與 PBS 中以 1 : 75 比例稀釋之含組成分 "A" 及 "B" 的辣根過氧化酶 - 抗生物素蛋白 - 生物素 - 複合物 (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA) 反應。

各部份在室溫下，0.01% 過氧化氫，0.05% 3,3'-二胺基聯苯胺 (DAB) 內發展。預定用 GFAP-, MAC-1- 及 MHCI- 專一性抗體孵養之部份用 0.6% 過氧化氫於室溫下預先處理以封阻內源性過氧化酶，再用主要抗體於 4 °C 下孵養過夜。與 GFAP- 抗體反應之部份在室溫下，用馬內製成之用 TBS 以 1 : 200 比例稀釋的生物素化抗 - 小鼠 IgG (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) 孵養 1 小時。其次，各部份再與用 TBS 稀釋 (1 : 1000)

五、發明說明(99)

之抗生物素蛋白 - 生物素 - 過氧化酶複合物 (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) 反應 1 小時。用充作主要抗體之 MAC - 1 - 或 MHC I I - 專一性 m A 孵養之各部份隨後在室溫下，與用 T B S 稀釋 (1 : 2 0 0) 之兔子中製成的生物素化抗 - 兔子 I g G 反應，隨後用抗生物素蛋白 - 生物素 - 過氧化酶複合物 (用 T B S 稀釋， 1 : 1 0 0 0) 。用 G F A P - ， M A C - 1 - 及 M H C I I - 專一性抗體孵養之各部份再於室溫下，分別用 0 . 0 5 % D A B ， 0 . 0 1 % 過氧化氫， 0 . 0 4 % 氯化鎳， T B S 處理 4 及 1 1 分鐘而使其看得見。

將免疫標記部份置於玻璃片 (VWR, Superfrost slide) 上，空氣乾燥過夜，浸入 Propar (Anatech) 中並使用 Permount (Fisher) 作為裝載介質而與覆蓋片重疊。

為了逆染 A 斑，將幾組 G F A P - 陽性部份裝載於 Superfrost 片上並於含水之 1 % Thioflavin S (Sigma) 中孵養 7 分鐘，隨後免疫組織化學處理。各部份再予脫水並於 Propar 內清洗，然後與安裝載 Permount 之覆蓋片重疊。

8 . 影像分析

Videometric 150 Image Analysis System (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) 經由 C C D 錄影機及 Sony Trinitron 螢幕連接至 Nikon Microphot-FX 顯微鏡而用以定量免疫反應性玻片。貯存切片影像於影像緩衝液中並測定色彩 - 及飽

五、發明說明(100)

和度—為主之臨界點以選擇及計算免疫標記結構所占有之全部影像面積。對每一切片而言，海馬係用手動方式繪圖而算出海馬占有之全部影像面積。致澱粉樣負荷百分比干係如下測得：（包含與 m A β 3 D 6 免疫反應之海馬區分率）X 1 0 0。類似地，神經元負荷百分比係如下測得：（包含與 m A β 8 E 5 免疫反應之營養障礙神經突的海馬區分率）X 1 0 0。操作 Simple 32 軟體應用程式之 C-Imaging System (Compix Inc., Cranberry Township, PA) 經由 Optronics 照相機連接至 Nikon Microphot-FX 顯微鏡並用以定量 G F A P — 陽性星形細胞增多症與 M A C — 1 — 及 M H C I I — 陽性小神經膠質所占有之逆脾皮質百分比。免疫反應切片之影像貯於影像緩衝液中並測定單色—為主之臨界點以選擇及計算免疫標記細胞所占有之全部影像面積。對每一切片而言，逆脾皮質 (R S C) 係用手動方式繪圖而算出 R S C 占有之全部影像面積。星形細胞增多症百分比干係如下測得：（G F A P — 反應性星形細胞所占有之 R S C 分率）X 1 0 0。類似地，小神經膠質百分比係如下測得：（M A C — 1 — 或 M H C I I — 反應性小神經膠質所占有之 R S C 分率）X 1 0 0。對所有影像分析而言，定量每一動物在背側海馬區之各以連續 2 4 0 μ m 間隔分開之 6 部份。在所有情況下，動物之治療情形是觀察者未知的。

雖然前面發明已詳加說明以清楚了解其內容，很明顯的某些改良亨在所附申請專利範圍內實行。所有本文中引

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(101)

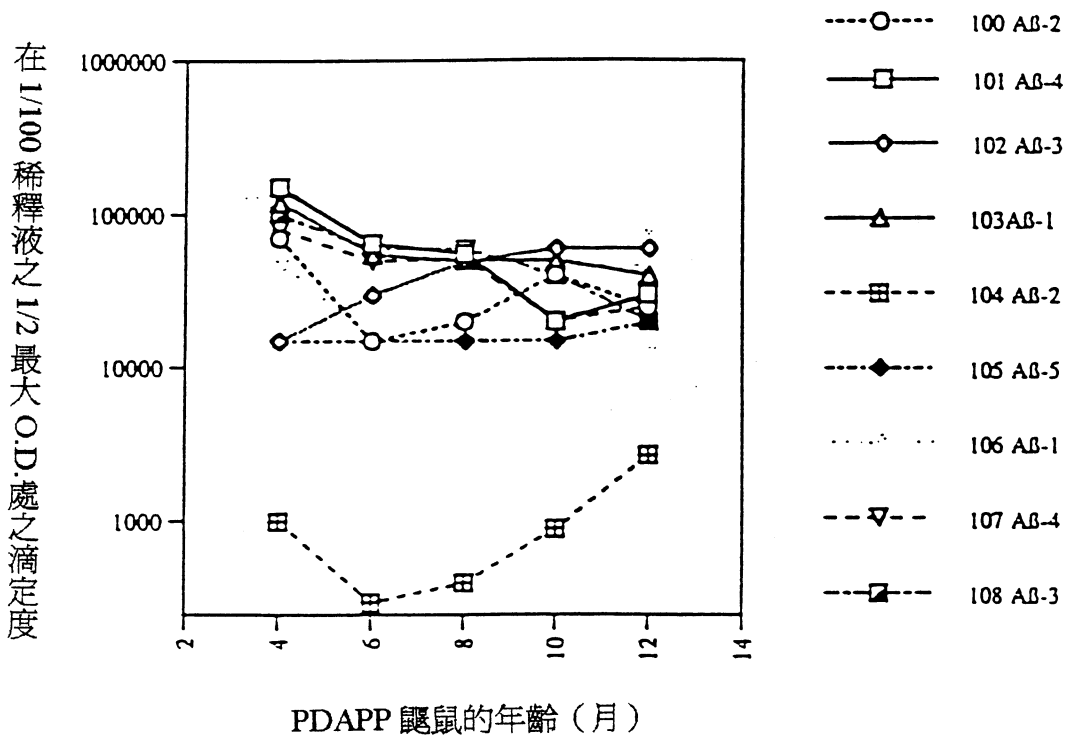
証之公告與專利文件全部內容均以其個別所示目的併為本文參考資料。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

附圖 1

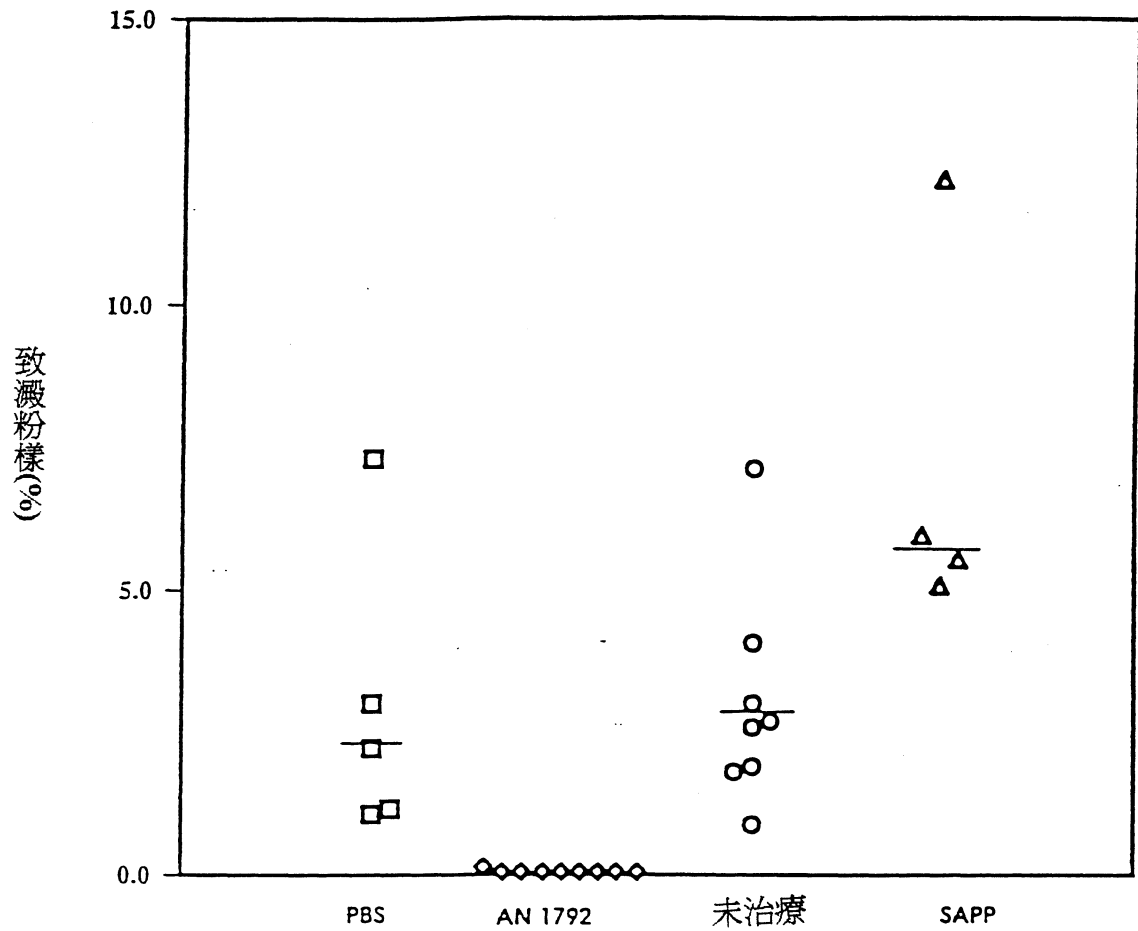
凝集 A β_{42} 注射之 PDAPP 鼯鼠對時間的滴定度



附圖 2

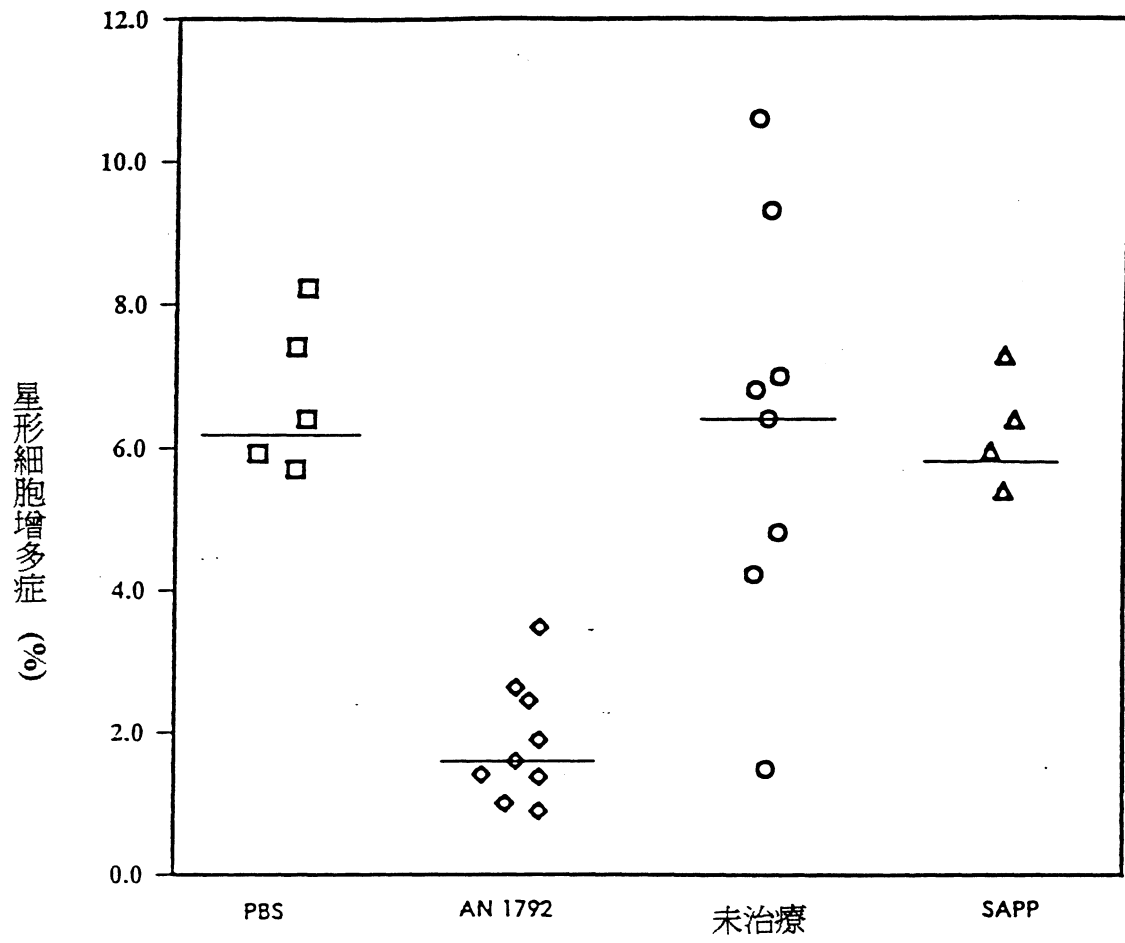
研究 001

海馬內之致澱粉樣負荷



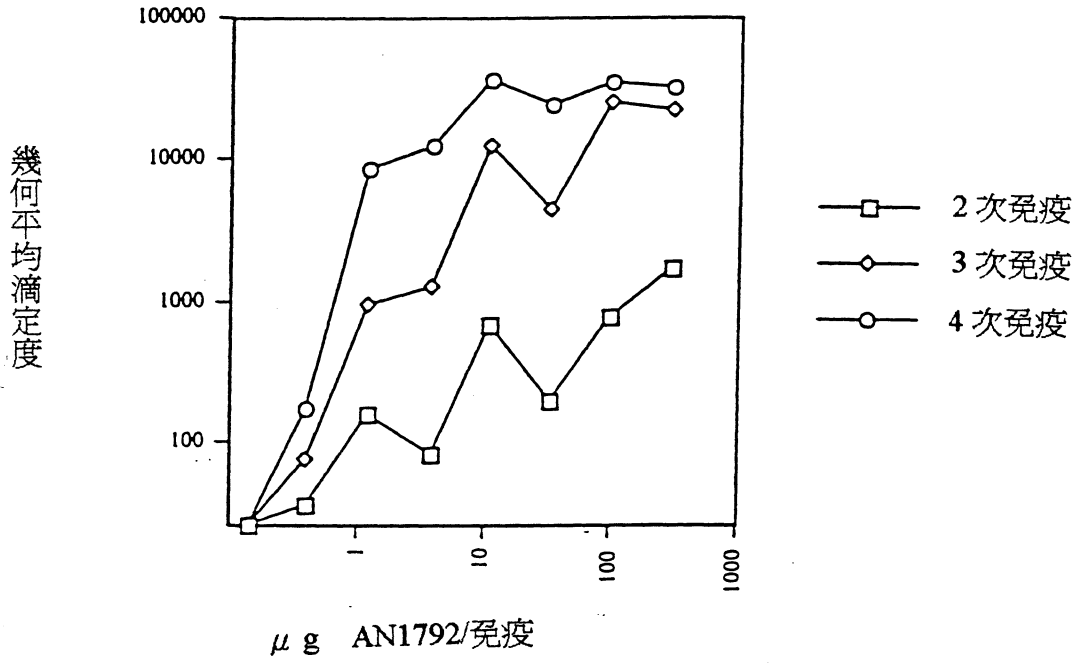
附圖 4

研究 001
逆脾皮負內之星形細胞增多症

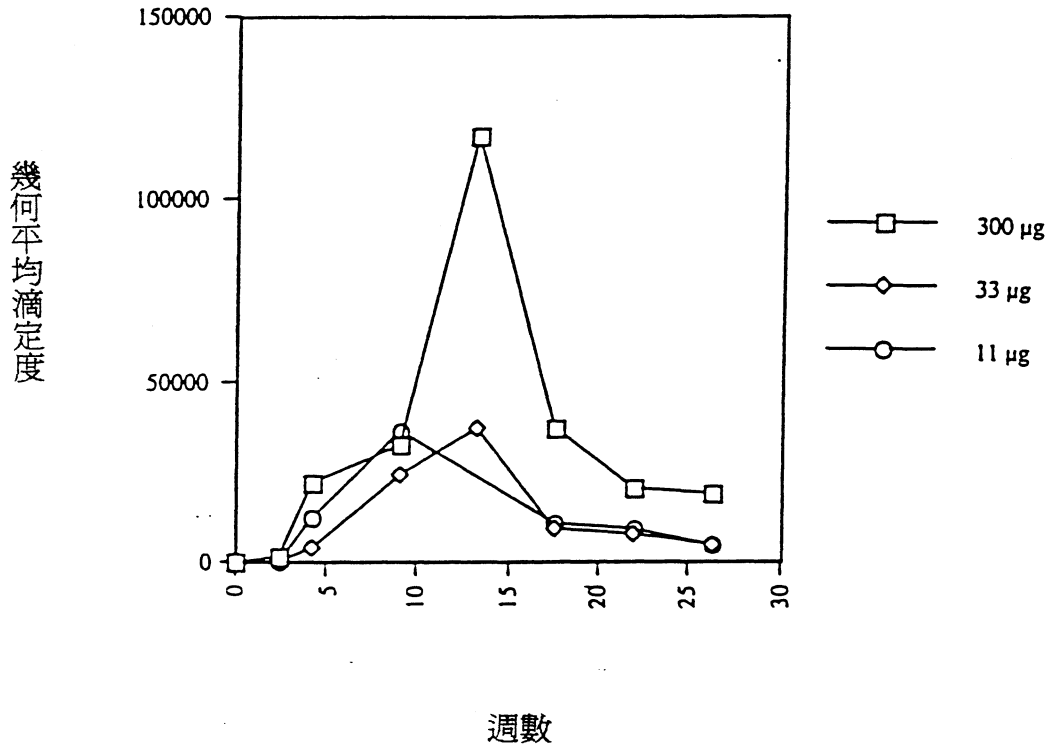


附圖 5

在 2,3 及 4 次免疫後,對不同劑量 AN1792 之抗體滴定度反應

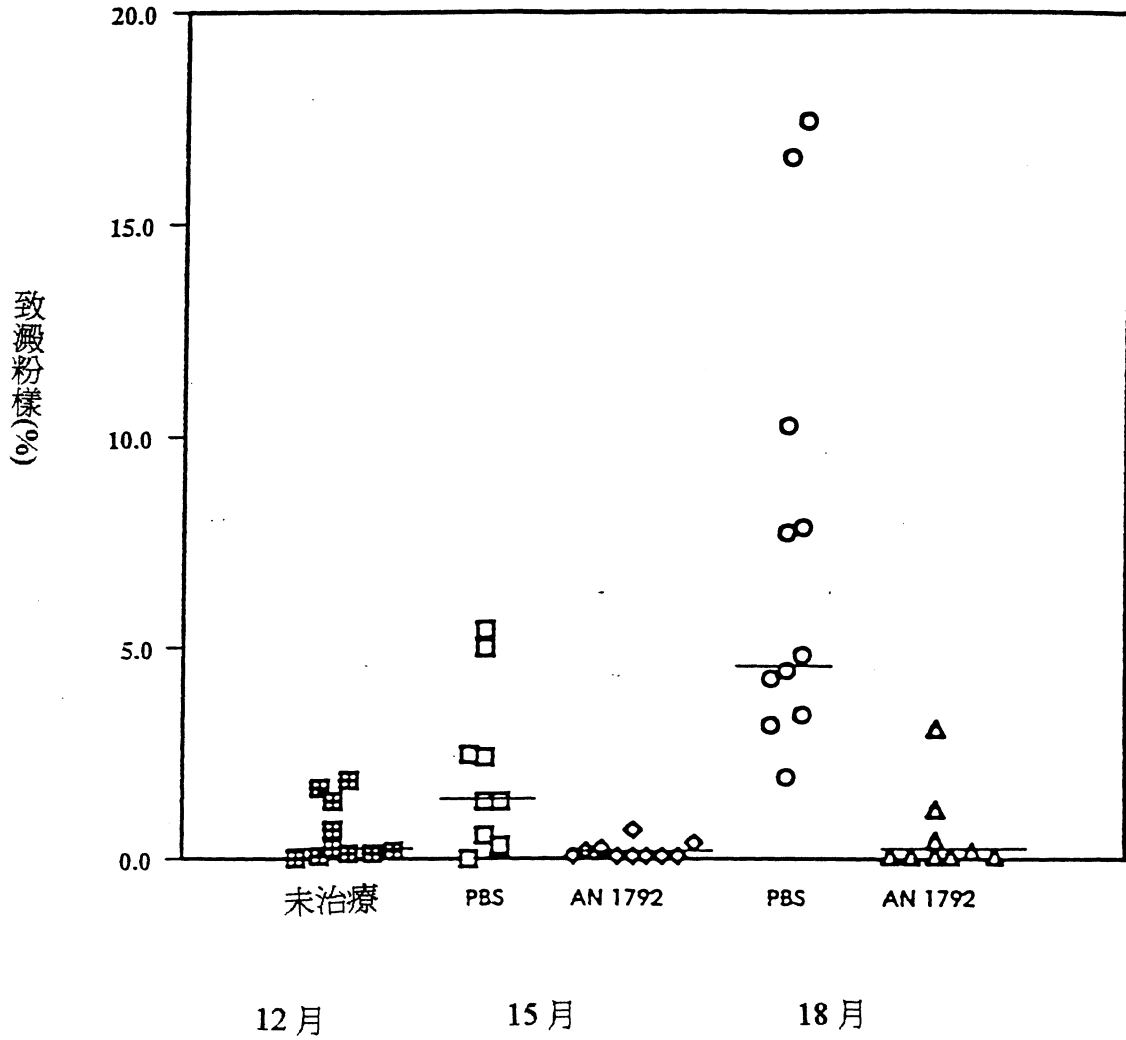


對 AN1792 之抗體反應動力學



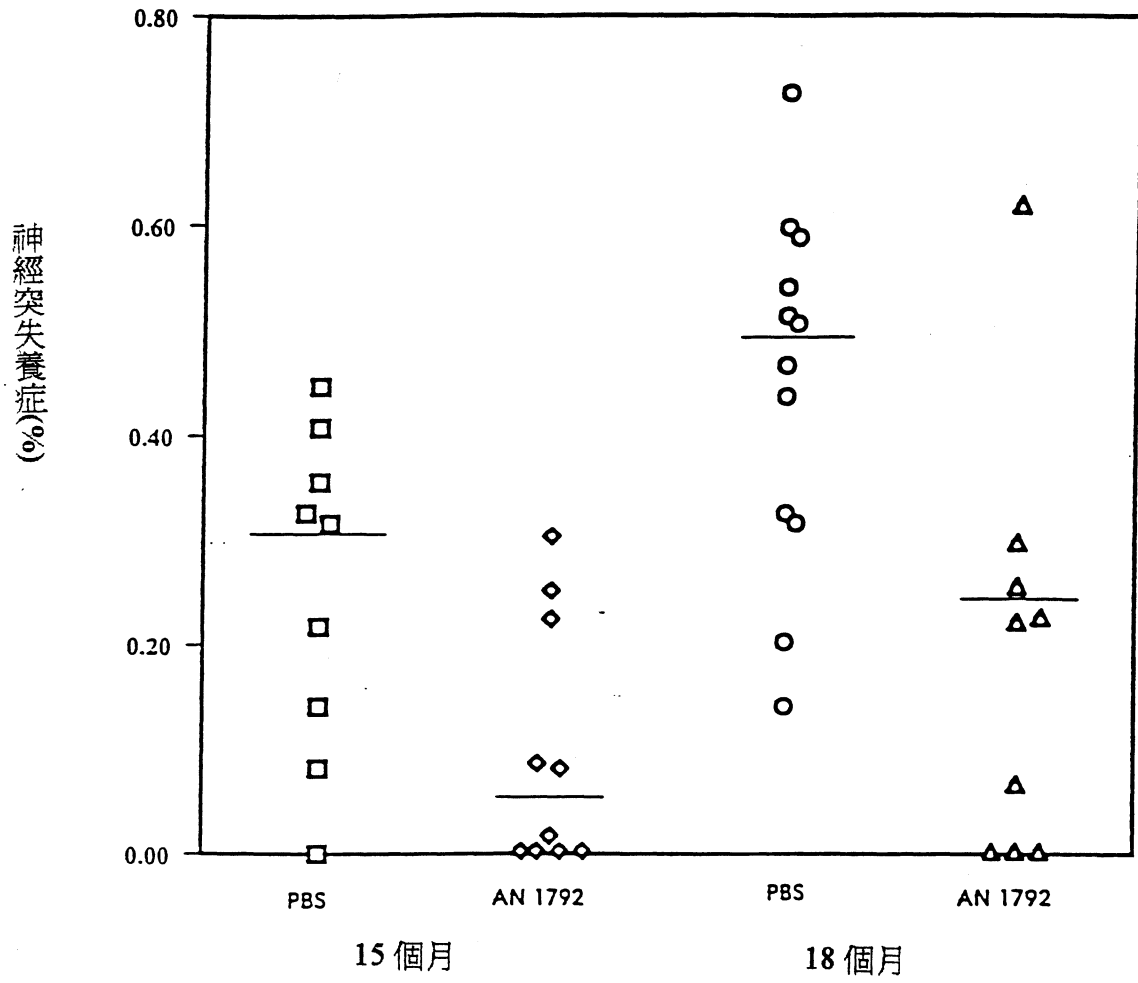
附圖 7

研究 002
皮質內之致澱粉樣負荷



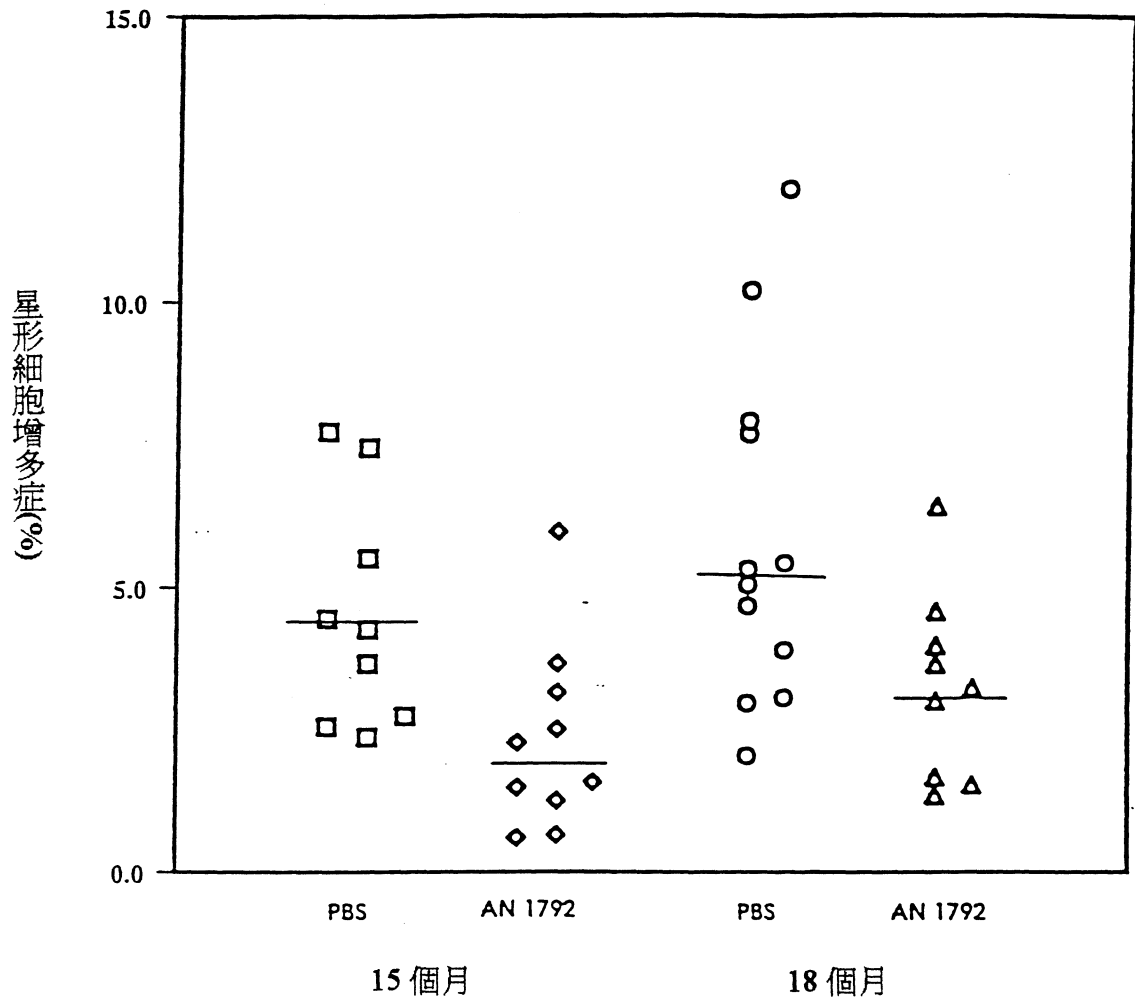
附圖 8

研究 002
皮質內之神經突斑負荷



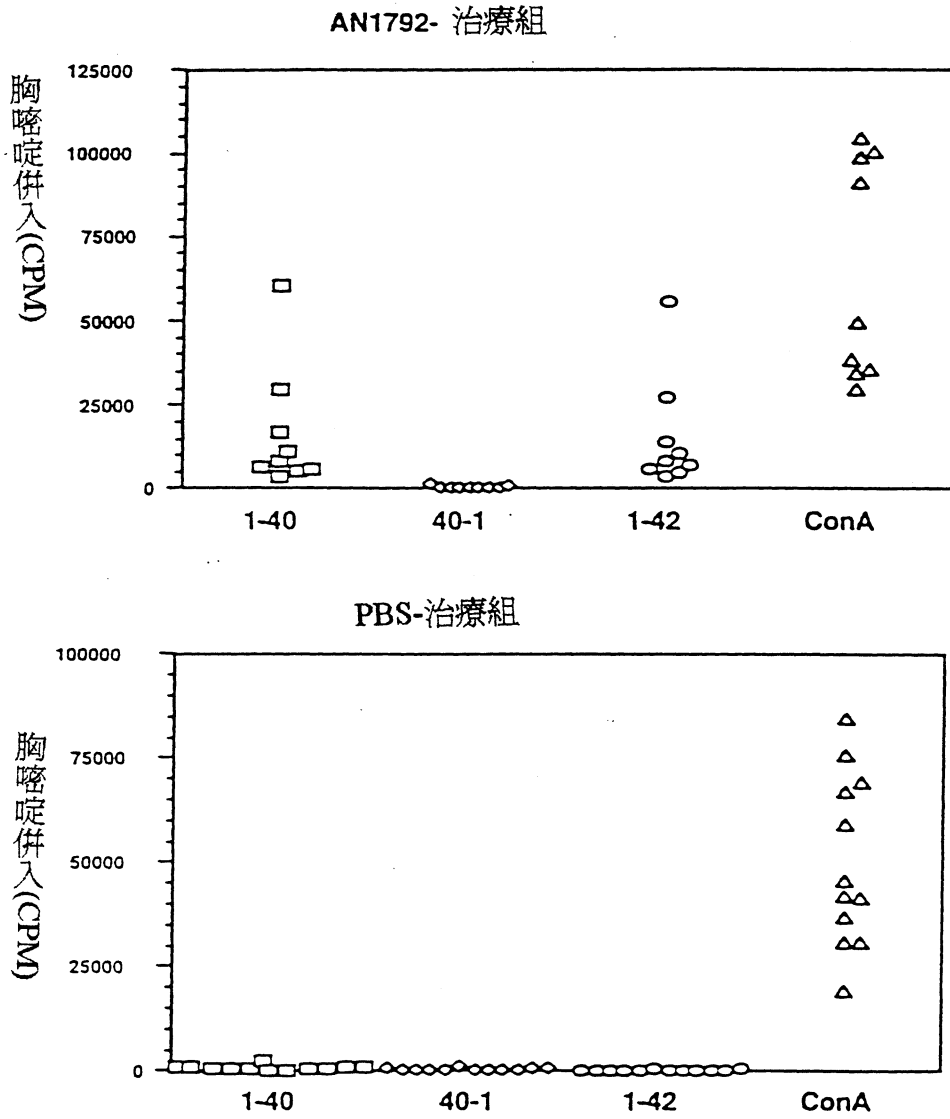
附圖 9

研究 002
逆脾皮質的星形細胞增多症



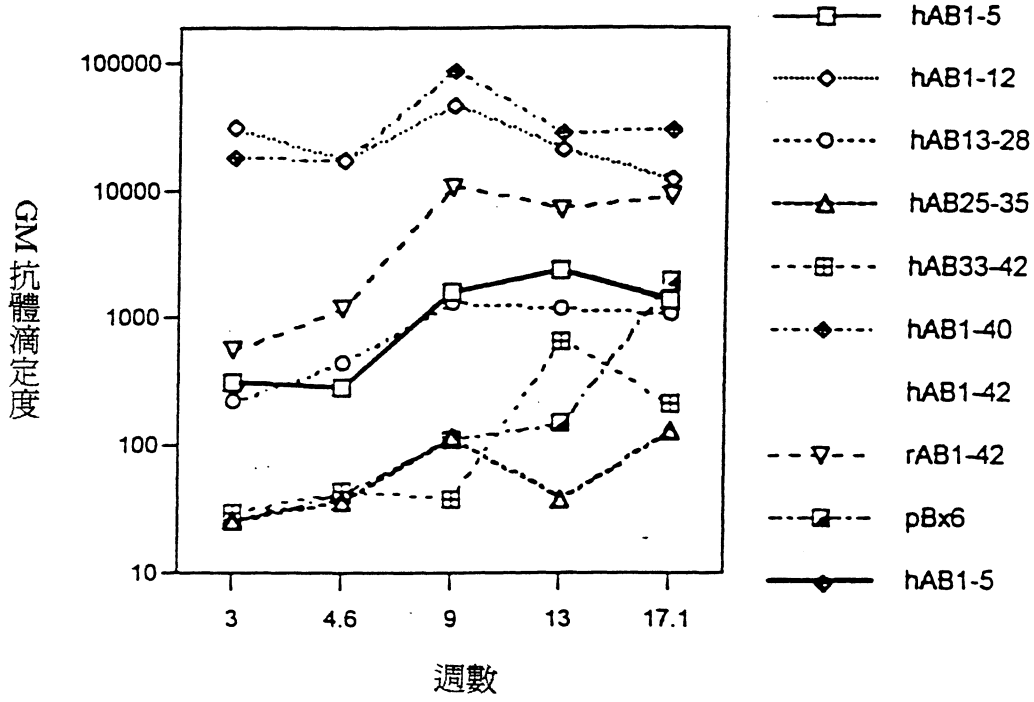
附圖 10

研究 002:脾細胞增殖分析

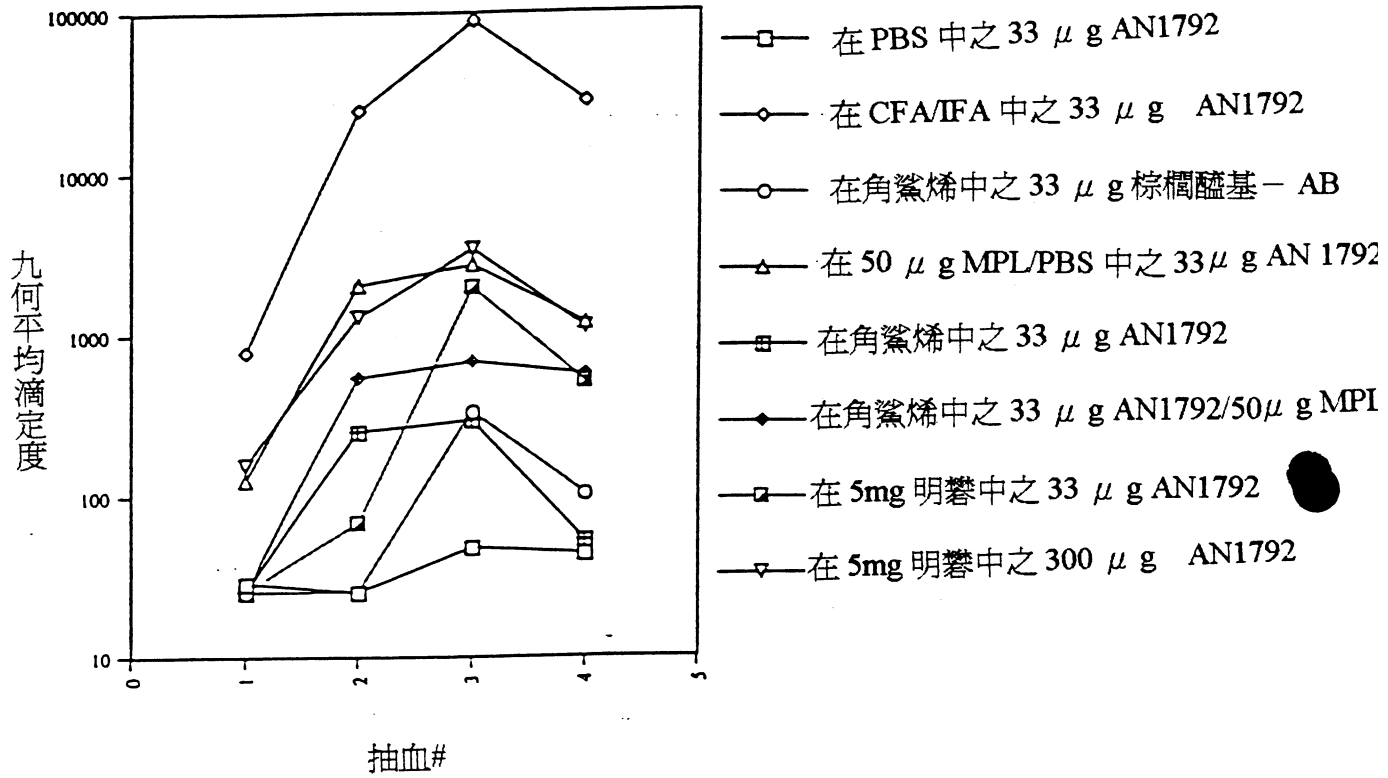


附圖 13

研究 006
AB1-42 結合抗體滴定度



抗體對含不同佐助劑之 AN 1792 的反應.





I239847

附件 4: 第 87119660 號專利申請案

中文說明書替換頁

民國 93 年 5 月 3 日呈

A4

C4

申請日期	87 年 11 月 26 日
案 號	87119660
類 別	ABIK 38/w. 38/28. 9/26

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	供預防和治療致澱粉樣變性病用之 Aβ 肽的 N 端片段和佐劑
	英 文	N-terminal fragment of Aβ peptide and an adjuvant for preventing and treating amyloidogenic disease
二、發明 創作人	姓 名	(1) 戴爾 沙恩克 Schenk, Dale B.
	國 籍	(1) 美國加州伯林加姆洛艾托大道一五四二號 1542 Los Altos Drive, Burlingame, CA 94010-5941, U.S.A.
	住、居所	
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 伊蓮製藥公司 Elan Pharmaceuticals, Inc.
	國 籍	(1) 美國
	住、居所 (事務所)	(1) 美國加州南舊金山城門路八〇〇號 800 Gateway Blvd., South San Francisco, CA 94080, U. S. A.
	代 表 人 姓 名	(1) 尚 都佛 Duvall, Jean M.

裝 訂 線

五、發明說明(9)

中，星形細胞增多症占有之逆脾皮質百分比的定量影像分析。

附圖 10：對來自經 A N 1 7 9 2 - 治療（較高組）及 P B S - 治療（較低組）之脾細胞的淋巴球增殖分析。

附圖 11：皮質內之 A β 總量。使用 A β 或 A P P 衍生物以及 Freund's 佐助劑免疫過之鼯鼠中的各別 A β 外形分布圖。

附圖 12：皮質內之致澱粉樣負荷係由使用 A β 肽共軛體 A β 1 - 5，A β 1 - 12，及 A β 13 - 28 免疫過鼯鼠之免疫反應腦部的定量影像分析測得：A β 之全長集合了包括 A N 1 7 9 2 (A β 1 - 42) 及 A N 1 5 2 8 (A β 1 - 40) 以及經 P B S 治療之對照組。

附圖 13：經 A β 或 A P P 衍生物與 Freund's 佐助劑免疫之鼯鼠組的 A β - 專一性抗體之幾何平均滴定度。

附圖 14：使用 A N 1 7 9 2，或其棕櫚醯化衍生物以及各種佐助劑免疫之天竺鼠組的 A β - 專一性抗體之幾何平均滴定度。

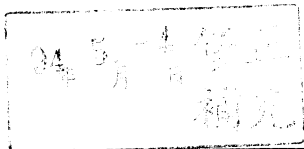
定義

“實際上相同”一詞意指二肽序列在最適當排列成直

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂



五、發明說明 (16)

利用兩種酶 (稱爲 β 及 γ 分泌酶) 處理較大蛋白質 A P P 而產生 (見於 Hardy, TINS 20, 154 (1997)) 。在伴隨阿茲海默氏疾病之 A P P 中的已知突變發生於接近 β 或 γ 分泌酶之位置或 A β 內。例如，位置 717 接近 A P P 經處理成 A β 時之 γ - 分泌酶裂解位置，而位置 670 / 671 則接近 β - 分泌酶裂解位置。一般咸信此突變由於與形成 A β 之裂解反應交互作用而提高所產生 A β 之 42 / 43 胺基酸形態而導致 A D 疾病。

A β 具有不尋常之性質而可固定及活化典型與交替補體鏈鎖。尤其是，它結合至 C 1 q 且最後結合至 C 3 b i 。此一結合促使結合至巨噬體而活化 B 細胞。此外，C 3 b i 再進一步破壞而再以 T - 細胞依賴性方或結合至 B 細胞上之 C R 2 而提高 10000 倍這些細胞的活化作用。此一機轉導致 A β 產生超過其他抗原之免疫反應。

本申請專利方法中所用之治療劑可爲任何天然產生形態之 A β 肽，尤其是人類形態 (亦即，A β 39，A β 40，A β 41，A β 42 或 A β 43) 。這些肽之序列及其與 A P P 前驅物之關係藉由 Hardy et al., TINS 20 155 - 158 (1997) 之附圖 1 說明。例如，A β 42 之序列如下：

五、發明說明 (17)

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

A β 41, A β 40 及 A β 39 與 A β 42 之差異在於分別少了 Ala, Ala-Ile 及 Ala-Ile-Val (從 C-端開始算起)。治療劑亦可為包含投服至人類可誘起類似預防或治療免疫反應之抗原決定基的天然 A β

肽之活性片段或同系物。免疫片段通常具有來自天然肽之至少 3, 5, 6, 10 或 20 連續胺基酸序列。免疫片段包括 A β 1-5, 1-6, 1-12, 13-28, 17-28, 25-25, 35-40 及 35-42。在某些方法中, 來自 A β 之 N-半端的片段是較理想的。同系物包括過敏性物種及誘起變體。同系物與天然產生肽之差異通常在於 1 或少許幾個位置上, 經常藉由保守性取代。同系物通常至少 80 或 90% 序列與天然肽相同。某些同系物亦包括非天然胺基酸或 N 或 C 端經改良之胺基酸。非天然胺基酸之實例為 α , α -二取代胺基酸, N-烷基胺基酸, 乳酸, 4-羥基脯胺酸, γ -羧基麩胺酸鹽, ξ -N, N, N-三甲基賴胺酸, ξ -N-乙醯基賴胺酸, O-磷酸絲胺酸, N-乙醯基絲胺酸, N-甲醯基甲硫胺酸, 3-甲基組胺酸, 5-羥基賴胺酸, ω -N-甲基精

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明（18）

胺酸。可如下所述地，篩選片段及同系物在導入外來基因之動物中的預防或治療效力。

A β ，其片段，同系物及其他致澱粉樣肽可由固態肽合成方法或重組體表現合成或者可由天然來源取得。自動肽合成器可自許多供應商買到，諸如，Applied Biosystems, Foster City, California. 重組體表現可於細菌，諸如，大腸桿菌（E. coli），酵母菌，昆蟲細胞或哺乳類細胞中進行。重組體表現之過程揭示於 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H.P. Press, NY 2d ed., 1989)。某些形態之 A β 亦可由市面上買到（例如，American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA and California Peptide research, Inc. Napa, CA）。

治療劑亦包括較長之多肽--其包括，例如，含其他胺基酸之 A β 肽，活性片段或同系物。例如，A β 可以完整 A P P 蛋白質或其部分（諸如，C - 1 0 0 片段，其開始於 A β 之 N 端且持續至 A P P 末端）。此等多肽在動物模系中之預防或治療效力可如下所述地篩選。A β 肽，同系物，活性片段或其他多肽可以結合形態（亦即，致澱粉樣肽）或解離形態投服。治療劑亦包括單體免疫原試劑之複體。

在進一步變化中，免疫原肽（諸如，A β ）可以病毒性或細菌性疫苗存在。編碼免疫原肽之核酸被併入病毒或細菌之基因或抗原決定基中。任意地，核酸係與病毒之外表面蛋白質或細菌之穿透膜蛋白質一起被表現為經分泌蛋

五、發明說明⁽²⁸⁾

諸如，狂牛症）中，病人可為非人類之哺乳類（諸如，牛）。治療劑量必須經滴定以獲致最大安全性及效果。免疫原之數量依是否亦投服佐助劑而定，若無佐助劑則需較高劑量。免疫原之投服數量有時在 $1 - 500 \mu g$ / 病人間變化且對人類而言經常為 $5 - 500 \mu g$ / 注射。偶而使用 $1 - 2 mg$ / 注射之較高劑量。 μ 通常，每人注射劑量為約 $10, 20, 50$ 或 $100 \mu g$ 。注射時機從每天一次，每年一次至每十年一次而顯著差異。在任何給予免疫原劑量日子，劑量係大於 $1 \mu g$ / 病人且經常大於 $10 \mu g$ （若亦投服佐助劑），而若未投服佐助劑，則為大於 $10 \mu g$ / 病人且經常大於 $100 \mu g$ / 病人。典型用藥法包括免疫後，每隔 6 週追加注射。另一用藥法包括免疫後，在第 1, 2 及 12 個月追加注射。另一用藥法係為在存活期間內，每隔 2 個月注射一次。或者，可藉由監視免疫反應而不定期地予以追加注射。為了使用抗體之被動免疫之用，劑量係在約 $0.0001 - 100 mg / kg$ ，且更常在 $0.01 - 5 mg / kg$ 宿主體重。編碼免疫原之核酸劑量在約 $10 ng$ 至 $1 g$ ， $100 ng$ 至 $100 mg$ ， $1 \mu g$ 至 $10 mg$ ，或 $30 - 300 \mu g$ DNA / 病人範圍內。傳染病毒載體之劑量為 $10 - 10^9$ 或更大病毒粒子 / 劑量。

誘起免疫反應之藥劑可藉由非經腸道，局部，靜脈內，經口，皮下，腹膜內，鼻內或肌內途徑投藥以供預防和 / 或治療之用。最典型之投藥途徑是皮下注射，雖然其他

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (39)

1 0 0 0 之低而可測得之滴定度 (附圖 1 , 表 1) 。

S A P P - 注射之鼯鼠對此一免疫原之滴定度為 1 :

1 0 0 0 至 1 : 3 0 0 0 0 且僅有一隻鼯鼠超過 1 :

1 0 0 0 0 0 。

P B S - 治療之鼯鼠在 6 , 1 0 及 1 2 個月大時 , 對凝集之 A β 滴定。在 1 / 1 0 0 稀釋下 , P B S 鼯鼠在對凝集之 A β 滴定時 , 僅一數據點超過 4 倍背景 , 然而在所有時間點均小於 4 倍背景 (表 1) 。 S A P - 專一性反應在這些時間點因所有滴定度均小於 3 0 0 而均可忽略。

在凝集之 A β 1 - 4 2 組之 9 隻鼯鼠中有 7 隻鼯鼠腦內並無可偵測出之致澱粉樣。相反地 , S A P 及 P B S 組鼯鼠之腦部組織包含許多 3 D 6 - 陽性致澱粉樣沉積於海馬區以及額面與 cingulate 皮質內。沉積形態類似於未治療之對照組 , 具有易受傷副區 (諸如 , 海馬齒狀腦回之外分子層) 之特徵困難。A β 1 - 4 2 注射組中之一隻鼯鼠具有大大降低之致澱粉樣負荷 (局限於海馬區) 。分離出之斑在另一 A β 1 - 4 2 - 治療之鼯鼠中辨識出。

在海馬區內之致澱粉樣負荷的定量影像分析証實了在 A N 1 7 9 2 - 治療之動物中所獲致之急劇降低 (附圖 2) 。 P B S 組之致澱粉樣負荷中間值 (2 . 2 2 %) 及未治療對照組之致澱粉樣負荷中間值 (2 . 6 5 %) 顯著大於用 A N 1 7 9 2 免疫者 (0 . 0 0 % , P = 0 . 0 0 0 5) 。相反地 , 用 S A P 肽 (S A P P) 免疫之組的中間值是 5 . 7 4 % 。來自未治療對照組鼯鼠之腦部組織包含許

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明⁽⁴³⁾

0.4 μ g 接受者仍可偵測出低抗體反應。1.2 及 3.7 μ g 組具有相當滴定度 (GMTs 約為 1000) 而最高四劑量之 GMTs 均近於 25000, 唯有 33 μ g 劑量組具有 3000 之較低 GMT 值。在第四次免疫後, 大多數組之滴定度更為適當提高。較低劑量組 (從 0.14 - 1.1 μ g) 之劑量反應明顯, 0.14 μ g 組無任何可偵測出之抗體而 1.1 μ g 組之 GMT 為 36000。再度地, 1.1 - 300 μ g 之最高劑量組的滴定度相近。因此, 在二次免疫後, 抗體滴定度係與 0.4 - 300 μ g 廣闊範圍內之抗原劑量相關。在第三次免疫後, 最高四劑量之滴定度均相近且在其後額外免疫後均保持在高原期。

第四次免疫後一個月, 300 μ g 組之滴定度 2 - 至 3 - 倍高於由免疫後第五天抽出之血液所測得之值 (附圖 6)。此一結果暗示尖峰抗體反應發生於免疫第五天以後。更適當 (50%) 提高見於 33 μ g 組。在 300 μ g 劑量組中, 在最後投服後的第二個月時, GMTs 突然降低約 70%。在另一個月以後, 降低趨於平緩 - - 45% (100 μ g) 及約 14% (33 及 1.1 μ g)。因此, 免疫停止後, 循環抗體滴定度之降低速率似乎是雙相的, 在尖峰反應後第一個月急遽降低後, 隨之較適當之降低速率。

這些 Swiss Webster 鼯鼠之抗體滴定度及反應動力學類似於以相近方式免疫之導入外來基因的雜種 PDAPP 年

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (86)

附註：

a 幾何平均抗體滴定度係針對 A β 1 - 4 2 測定

b 每組之反應數目

由 E L I S A 測得之含不同佐助劑或 thimerosal 之 A N 1 7 9 2 或 A N 1 5 9 2 對 1 2 個月大鼯鼠之皮質內致澱粉樣負荷的治療效果示於表 1 0 。在 P B S 對照組 P D A P P 鼯鼠中，在 1 2 個月之皮質內的全部 A β 中間值為 1 8 1 7 n g / g 。顯著減低之 A β 值見於用 A N 1 7 9 2 + C F A / I F A ， A N 1 7 9 2 + 明礬， A N 1 7 9 2 + M P L 以及 Q S 2 1 + A N 1 7 9 2 治療之鼯鼠中。減低達到統計意義 (P < 0 . 0 5) 者僅有 A N 1 7 9 2 + C F A / I F A 。但是，如實例 I 及 I I I 所示地，在減低之 A β 值內之免疫效力變成實際上大於 1 5 及 1 8 個月大之鼯鼠中所得效力。因此，吾人預期至少 A N 1 7 9 2 + 明礬， A N 1 7 9 2 + M P L 以及 A N 1 7 9 2 + Q S 2 1 組成物將在年老鼯鼠之治療中獲致統計意義。相反地， A N 1 7 9 2 + 防腐性 thimerosal 具有與 P B S 治療之鼯鼠中大約相等的 A β 中間值。類似結果在比較 A β 之皮質內之值時獲致。在 P B S 對照組中之 A β 中間值為 1 6 2 4 n g / g 。顯著減低之中間值 (4 0 3 ， 1 1 4 9 ， 6 2 0 及 7 1 4) 見於分別用 A N 1 7 9 2 + C F A / I F A ， A N 1 7 9 2 + 明礬， A N 1 7 9 2 + M P L 以及 A N 1 7 9 2 + Q S 2 1 治療

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (89)

，年齡，性別及其他在預測阿茲海默氏疾病高危險性中發現之特徵而從非臨床人口選定。累計按適當計數法（其包括 M M S E 及 A D A S）與其他設計用以評估更正常人口之計數法所得之基準分數。這些病人人數分成幾組而分別投服安慰劑及藥劑。追蹤這些病人約 6 個月，每一病人之終點為他或她是否在觀察結束時轉化成如 A D R D A 準則所定義之可能阿茲海默氏疾病。

X I I . 一般材料及方法

1 . 抗體滴定度之測定

鼯鼠由尾靜脈作一切口抽血並收集約 200 μ l 血液至微量管內。天竺鼠抽血係藉由刮除後足踝關節部位之毛後，再使用 18 刻度之針在中蹠骨靜脈作一切口並收集血液至微量管而完成。讓血液在室溫下凝結 1 小時，翻轉，再於 14000 x g 下離心 10 分鐘以從凝塊中分離出血清。再將血清轉置於乾淨微量管內並貯於 4 . C 下直到滴定為止。

利用 E L I S A 測定抗體滴定度。96 - 分格微滴定板（Costar EIA Plates）塗布以含 10 μ g / m l A β 4 2 或 S A P P 或其他個別報導中所述及抗原之 Well Coating Buffer（0 . 1 M 磷酸鈉，p H 8 . 5，0 . 1 % 疊氮化鈉）中的 100 l 溶液並保持在室溫下過夜。分格用吸器抽吸並將血清加至分格內，由在 Specimen Diluent（0 . 014 M 磷酸鈉，p H 7 . 4，0 . 15 M

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

表10

皮馬									
對照組		2 mg Alum 100 µg AN1528		50 µg MPL 100 µg AN1528		25 µg QS21 100 µg AN1528			
624-165	272	764-181	3470	660-083	295	643-105	385	615-128	1257
625-166	1802	765-182	171	661-084	3180	644-106	3640	616-129	361
626-167	62	766-183	91	662-085	2480	645-107	2403	617-130	1008
633-168	4696	767-184	5692	663-086	3014	654-108	1741	636-131	3290
634-169	3090	768-185	1353	664-087	5670	655-109	3053	637-132	2520
671-170	2417	771-186	1153	665-088	5978	656-110	5990	638-133	3880
672-171	2840	772-187	3800	693-089	1620	678-111	3360	744-134	627
829-172	3320	780-188	3740	694-090	35	679-112	1230	745-135	58
830-173	1833	843-189	163	695-091	3400	704-114	2580	746-136	2610
831-174	416	844-190	122	697-092	2530	705-115	78	747-137	1509
792-175	126	845-191	427	698-093	983	706-116	1290	769-138	1788
793-176	2559	846-192	2674	699-094	5327	729-117	3180	770-139	8
794-177	289	887-193	453	701-095	1862	730-118	1833	773-140	99
732-178	179	888-194	2956	702-096	1849	731-119	4590	774-141	339
733-179	1329	889-195	1075	703-097	2239	736-120	1112	775-142	402
734-180	5655			739-098	806	737-121	1653	776-143	537
				740-099	5303	757-122	992	840-144	1119
				741-100	459	758-123	4692	841-145	194
				800-103	154	808-124	785	821-146	1259
				801-104	852	809-125	244	822-147	5413
						810-126	32	823-148	2233
中間 p 值(M-W)	1817	中間 p 值(M-W)	1153	中間 p 值(M-W)	2051	中間 p 值(M-W)	1741	中間 p 值(M-W)	1199
平均值	1931	平均值	1825	平均值	2407	平均值	2140	平均值	1552
標準偏差	1718	標準偏差	1769	標準偏差	1913	標準偏差	1659	標準偏差	1364
% CV	89	% CV	97	% CV	79	% CV	78	% CV	88
p 值(t 測試)		p 值(t 測試)		p 值(t 測試)		p 值(t 測試)		p 值(t 測試)	
	n=16		n=15		n=20		n=21		n=21

皮馬									
CEA/IFA 100 µg AN1792		25 µg Thimerosal/IBS 10 µg AN1792		2 mg Alum 100 µg AN1792		50 µg MPL 100 µg AN1792		25 µg QS21 100 µg AN1792	
639-068	693	635-149	1337	610-001	432	646-023	2002	627-045	91
640-069	508	669-150	4644	611-002	1012	647-024	147	628-046	3397
641-070	440	670-151	6335	612-003	3607	648-025	1304	631-049	3702
642-071	467	673-152	3700	613-004	508	649-026	34	632-050	1776
690-072	42	674-153	2750	620-005	465	650-027	980	667-052	1832
691-073	2491	676-154	1687	621-006	16	724-028	1282	668-053	3023
692-074	121	681-156	185	622-007	28	726-030	1966	686-054	189
795-075	137	682-157	8031	623-008	217	727-031	733	687-055	61
796-076	822	683-158	3450	708-009	2738	720-032	2563	688-056	0
797-077	475	754-159	157	709-010	927	721-033	5563	689-057	0
748-078	600	755-160	6857	710-011	1609	802-034	113	712-059	3311
749-079	78	756-161	482	716-012	1608	803-035	671	825-061	1009
750-080	1287	805-162	524	784-014	3890	804-036	51	826-062	18165
751-081	1351	806-163	397	785-015	1814	811-037	613	827-063	73
761-082	69	807-164	234	786-016	285	812-038	332	828-064	78
				787-017	3102	813-039	1454	837-065	1051
				788-018	1617	814-040	2441	838-066	270
				789-019	1474	833-041	742	839-067	371
				815-020	424	834-042	40		
				816-021	1375	836-044	807		
				817-022	2323				
中間值 p 值(M-W)	475 0.0481	中間值 p 值(M-W)	1687	中間值 p 值(M-W)	1375 0.5000	中間值 p 值(M-W)	774 0.1710	中間值 p 值(M-W)	950 0.4076
平均值	637	平均值	2718	平均值	1394	平均值	1192	平均值	2199
標準偏差	655	標準偏差	2685	標準偏差	1166	標準偏差	1299	標準偏差	4187
% CV	103	% CV	99	% CV	84	% CV	109	% CV	190
p 值(t 測試)	0.0106	p 值(t 測試)		p 值(t 測試)	0.2650	p 值(t 測試)	0.1506	p 值(t 測試)	0.8131
	n=15		n=15		n=21		n=21		n=18

四、中文發明摘要 (發明之名稱： 供預防和治療致澱粉樣變性病用之)
A β 肽的 N 端片段和佐劑

本發明係提供治療致澱粉樣變性病的組成物及方法。前述方法需要投服一種誘發病人對抗致澱粉樣沉積之有利免疫反應的藥劑。此方法尤有用於預防及治療阿茲海默氏疾病。在此方法中，適宜之藥劑是 A β 肽或其抗體。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要 (發明之名稱：)

N-TERMINAL FRAGMENT OF A β PEPTIDE AND AN ADJUVANT FOR PREVENTING AND TREATING AMYLOIDOGENIC DISEASE

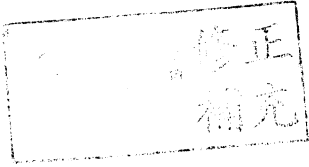
The invention provides compositions and methods for treatment of amyloidogenic diseases. Such methods entail administering an agent that induces a beneficial immune response against an amyloid deposit in the patient. The methods are particularly useful for prophylactic and therapeutic treatment of Alzheimer's disease. In such methods, a suitable agent is A β peptide or an antibody thereto.

訂

六、申請專利範圍 1

附件 3A :第 87119660 號專利申請案

中文申請專利範圍 替換本



民國 94 年 6 月 3 日修正

1 . 一種用於預防和治療阿茲海默氏疾病之藥學組成物，其包含 A β 肽或其選自 A β 40、A β 42、A β 1-5、A β 1-6、A β 1-12 或 A β 13-28 之免疫原性片段及選自明礬、單磷脂或 QS21 之藥學上可接受之佐助劑，且有效誘起免疫反應(包含產生對 A β 肽或其免疫原性片段之抗體)，其中該佐助劑增強對 A β 肽或其免疫原性片段的免疫反應。

2 . 如申請專利範圍第 1 項之藥學組成物，其中該 A β 肽或其免疫原性片段是包覆在顆粒內部。

3 . 如申請專利範圍第 2 項之藥學組成物，其中該顆粒是聚內交酯聚乙交酯共聚物 (P L P G) 顆粒。

4 . 如申請專利範圍第 1 或 2 項之藥學組成物，其包含至少 1 0 μ g 之 A β 肽。

5 . 如申請專利範圍第 1 或 2 項之藥學組成物，其包含至少 1 0 μ g 之 A β 片段。

6 . 如申請專利範圍第 1 或 2 項之藥學組成物，其包含至少 2 0 μ g 之 A β 肽。

7 . 如申請專利範圍第 1 或 2 項之藥學組成物，其包含至少 2 0 μ g 之 A β 片段。

8 . 如申請專利範圍第 1 或 2 項之藥學組成物，其包

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍 2

含至少 50 μg 之 A β 肽。

9 . 如申請專利範圍第 1 或 2 項之藥學組成物，其包含至少 50 μg 之 A β 片段。

10 . 如申請專利範圍第 1 或 2 項之藥學組成物，其包含至少 100 μg 之 A β 肽。

11 . 如申請專利範圍第 1 或 2 項之藥學組成物，其包含至少 100 μg 之 A β 片段。

12 . 如申請專利範圍第 1 或 2 項之藥學組成物，其中該 A β 肽或其免疫原性片段於投遞時呈聚集形式。

13 . 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之藥學組成物，其中該佐助劑適於投服人體。

14 . 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之藥學組成物，其中該藥學組成物為非經腸投服的藥學組成物。

15 . 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之藥學組成物，其中該藥學組成物適於經肌肉內或經皮下投服。

16 . 一種用於預防和治療阿茲海默氏疾病之藥學組成物，其包含選自 A β 1-5、A β 1-6、A β 1-12 或 A β 13-28 之免疫原性 A β 片段，該片段連接載體分子以形成共軛分子，其中該載體分子係免疫球蛋白或白喉類毒素。

17 . 如申請專利範圍第 16 項之藥學組成物，其中該載體分子係促進對抗 A β 片段之免疫反應。

18 . 如申請專利範圍第 16 項之藥學組成物，其中該白喉類毒素為 CRM 197。

19 . 如申請專利範圍第 17 項之藥學組成物，其中

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍 3

該白喉類毒素為 CRM 197。

20. 如申請專利範圍第 16 至 19 項中任一項之藥學組成物，其中該 A β 片段係以融合蛋白質之形式連接至該載體。

21. 如申請專利範圍第 16 至 19 項中任一項之藥學組成物，其中該藥學組成物係非經腸投服之藥學組成物。

22. 如申請專利範圍第 16 至 19 項中任一項之藥學組成物，其中該藥學組成物適於經肌肉或經皮下投服。

23. 一種用於預防或治療特徵為在病人體內具有包含 A β 肽之澱粉樣沈積的疾病之藥學組成物，其包含專一結合 A β 肽或其免疫原性片段的拮抗 A β 之抗體，其中該抗體專一結合 A β 1-12、A β 13-28、A β 40 或 A β 42，且該抗體量係有效預防或治療該疾病，其中投服該抗體係降低病人腦中 A β 量。

24. 如申請專利範圍第 23 項之藥學組成物，其中該抗體為單株抗體。

25. 如申請專利範圍第 23 項之藥學組成物，其中該為人類化抗體。

26. 如申請專利範圍第 25 項之藥學組成物，其中該抗體為 IgG1。

27. 如申請專利範圍第 25 項之藥學組成物，其中該抗體與載體以藥學組成物之型式投服。

28. 如申請專利範圍第 23 至 27 項中任一項之藥

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍 4

學組成物，其中該藥學組成物另包含佐助劑，其適於投服人體。

29. 如申請專利範圍第23至27項中任一項之藥學組成物，其中該藥學組成物係非經腸投服之藥學組成物。

30. 如申請專利範圍第23至27項中任一項之藥學組成物，其中該藥學組成物適於經肌肉內或經皮下投服。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂