



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101137670 B

(45) 授权公告日 2012.08.08

(21) 申请号 200680007651.7

G01N 33/53(2006.01)

(22) 申请日 2006.03.09

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

P200500550 2005.03.09 ES

W0 2004029630 A, 2004.04.08,

W0 2004029630 A, 2004.04.08,

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.09.10

Adolfo Jimenez-Huete et al. antibodies directed to the carboxyl terminus of amyloid beta-peptide recognize sequence epitopes and distinct immunoreactive deposits in Alzheimer's disease brain. 《Alzheimer's reports》.1998, 第一卷

(86) PCT申请的申请数据

PCT/ES2006/070027 2006.03.09

Hampel H et al. Core biological marker candidates of alzheimer's disease: perspectives for diagnosis, prediction of outcome and reflection of biological activity. 《Journal of neural transmission》.2004, 第111卷(第3期),

(87) PCT申请的公布数据

W02006/095041 ES 2006.09.14

(73) 专利权人 科学研究高等机关

地址 西班牙马德里

(72) 发明人 恩里克·门德斯

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

审查员 刘睿

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006.01)

C07K 7/06(2006.01)

C12N 5/18(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 19 页

序列表 2 页 附图 7 页

(54) 发明名称

用单克隆抗体体外诊断阿尔茨海默病的方法

(57) 摘要

通过单克隆抗体的方式体外诊断阿尔茨海默病的方法。所述抗体能够结合于 β -淀粉状蛋白肽的至少氨基酸 12-16, 特异性检测作为阿尔茨海默病的特征神经炎性斑, 而不检测非所述疾病的指示物的扩散斑。在所述神经炎性斑中, 单克隆抗体使检测在沉积的各种 β -淀粉状蛋白肽的各种同种型的组成方面不同的亚型成为可能, 其与疾病的进展阶段相关。此外, 抗体能够结合在生物流体如尿中的 β -淀粉状蛋白肽的同种型。因此, 可以将本发明的单克隆抗体, 产生它的细胞系和包含它的组合物用于体外诊断阿尔茨海默病和确定疾病进展的阶段。

1. 一种杂交瘤细胞系,其由 ECACC 06030101 表示。
2. 由杂交瘤细胞系 ECACC 06030101 产生的单克隆抗体。
3. 权利要求 2 的单克隆抗体在制备用于在取自患有阿尔茨海默病的个体的脑组织的样品中体外诊断所述疾病的诊断剂中的应用。
4. 权利要求 3 所述的应用,其中所述疾病进展的阶段与样品中通过其与所述单克隆抗体结合所揭示的神经炎性斑的亚型的存在相关。
5. 一种组合物,其包含与一种物质偶联的权利要求 2 的单克隆抗体,所述物质容许所述抗体被检测到。
6. 权利要求 5 所述的组合物,其中所述单克隆抗体所偶联的物质是能够结合所述第一抗体的第二抗体,该第二抗体结合于能够催化具体物质向另一种可以被检测的物质的转化的酶。
7. 权利要求 6 所述的组合物,其中其转化由所述酶催化的物质是色素原。
8. 权利要求 6 或 7 所述的组合物,其中所述第二抗体结合于碱性磷酸酶并且所用的色素原是氮蓝四唑。
9. 权利要求 6 或 7 所述的组合物,其中所述第二抗体结合于辣根过氧化物酶并且所用的色素原是二氨基联苯胺。
10. 权利要求 6 或 7 所述的组合物,其包含至少一种其它的抗体,所述抗体特异于不同于 β -淀粉状蛋白肽的至少一个序列区域。
11. 权利要求 10 所述的组合物,其包含偶联于可以被检测的物质的权利要求 2 的单克隆抗体,和特异于 β -淀粉状蛋白肽的一种或多种不同序列区域的另一种抗体或其它抗体,所述另一种抗体或其它抗体偶联于也可以被检测的不同物质。
12. 权利要求 11 所述的组合物,其中权利要求 2 的单克隆抗体偶联于与辣根过氧化物酶结合的第二抗体,色素原二氨基联苯胺被用作用于转化的物质,该转化可以被检测。
13. 权利要求 11 所述的组合物,其中权利要求 2 的单克隆抗体偶联于与碱性磷酸酶结合的第二抗体,色素原氮蓝四唑被用作用于转化的物质,该转化可以被检测。
14. 权利要求 5-13 中任一项的组合物在制备用于诊断取自患有阿尔茨海默病的个体的脑组织的样品中所述疾病的诊断剂中的应用。
15. 权利要求 3 的应用,其中所述抗体通过与 β -淀粉状蛋白肽的至少一种同种型结合来检测神经炎性斑和血管淀粉状蛋白沉积物在所述样品中的存在,所述同种型至少包含序列 Val-His-His-Gln-Lys (SEQ ID NO :3),并且存在于神经炎性斑和 / 或血管淀粉状蛋白沉积物中。
16. 权利要求 15 所述的应用,其中所述单克隆抗体被包含在权利要求 5-13 中任一项的组合物中。
17. 权利要求 15 所述的应用,其中通过权利要求 2 的单克隆抗体检测的神经炎性斑的存在与所述疾病的进展阶段相关。
18. 权利要求 15-17 中任一项所述的应用,其中通过单克隆抗体检测的 β -淀粉状蛋白肽的 $A\beta_{1-40}$ 同种型在神经炎性斑中的存在通过特异于 β -淀粉状蛋白肽的 $A\beta_{1-40}$ 同种型的羧基端的抗体的结合证实。
19. 权利要求 15-17 中任一项所述的应用,其中通过特异于 β -淀粉状蛋白肽的 $A\beta_{1-42}$

同种型的羧基端的抗体的结合来检测另外的神经炎性斑和 / 或扩散斑的存在。

20. 一种包含权利要求 2 所述的单克隆抗体的组合物, 其中所述抗体偶联于有利于从它们存在的溶液中提取抗原 - 抗体片段复合物的物质或颗粒。

21. 权利要求 20 所述的组合物, 其中有利于从它们存在的溶液中提取抗原 - 抗体复合物的物质或颗粒是磁性颗粒。

22. 权利要求 21 所述的组合物, 其中在所述抗体和所述磁性颗粒之间的键是共价键。

23. 权利要求 2 所述的单克隆抗体在制备用于在生物流体的样品或来自其的溶液的样品中体外诊断阿尔茨海默病的诊断剂中的应用。

24. 权利要求 23 所述的应用, 其中所述单克隆抗体被包含在权利要求 20-22 中任一项的组合物中。

25. 权利要求 24 所述的应用, 其中将权利要求 20-22 任一项的组合物加入生物流体的样品或来自其的溶液中, 从而与存在于生物流体的样品或来自其的溶液中的 β -淀粉状蛋白肽的形式形成抗原 - 抗体。

26. 权利要求 25 所述的应用, 其中将形成的抗原 - 抗体复合物从它们存在的生物流体或溶液中提取出来是通过应用磁场进行的。

27. 权利要求 26 所述的应用, 其中在以抗原 - 抗体复合物形式将它们从它们存在的生物流体或来自其的溶液中提取出来后, 将从生物流体或来自其的溶液中提取出来的所述形式的 β -淀粉状蛋白肽与抗体分离, 之后进行它们的鉴定和 / 或量化。

28. 权利要求 27 的应用, 其中所述形式的 β -淀粉状蛋白肽通过 MALDI-TOF 质谱分析法进行鉴定和 / 或量化。

29. 权利要求 25-28 中任一项所述的应用, 其中所述生物流体的样品是尿样品。

30. 权利要求 23 的应用, 其中所述单克隆抗体从所述样品中检测至少包含所述序列 Val-His-His-Gln-Lys (SEQ ID NO:3) 的 β -淀粉状蛋白肽的至少一种同种型, 所述检测是通过下列阶段通过其与所述单克隆抗体的结合进行:

a) 将权利要求 21 或 22 所述的组合物加入生物流体的样品或来自其的溶液中;

b) 等待足够的时间使 β -淀粉状蛋白肽的至少一种同种型和包含在所述组合物中的抗体形成抗原 - 抗体复合物;

c) 应用磁场从所述溶液提取抗原 - 抗体复合物;

d) 去除所述溶液;

e) 将所述抗体与 β -淀粉状蛋白肽的分子分离;

f) 鉴定和量化提取自生物流体的样品或来自生物流体的溶液的 β -淀粉状蛋白肽的同种型。

31. 权利要求 30 所述的应用, 其中所述生物流体的样品是尿样品。

32. 权利要求 30 所述的应用, 其中加入阶段 a) 中的所述组合物包括通过修饰在所述抗体的 Fc 区域中存在的一个或多个残基而共价结合于相应的磁性颗粒的权利要求 2 所述的单克隆抗体。

33. 权利要求 32 所述的应用, 其中通过 MALDI-TOF 质谱分析法进行从尿样品中提取的 β -淀粉状蛋白肽的同种型的鉴定和量化。

34. 权利要求 33 所述的应用, 其中在包含三氟乙酸的乙腈水溶液中的 α -氰基-4-羟

基肉桂酸中进行阶段 e) 的所述抗体或抗体片段与 β -淀粉状蛋白肽分子的分离。

用单克隆抗体体外诊断阿尔茨海默病的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及通过抗体的方式来诊断神经疾病,尤其是诊断阿尔茨海默病,所述抗体能够和与所述疾病有关的特异性肽相互作用。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病 (AD) 是导致脑中神经元死亡的神经疾病。其通常进展缓慢,开始发生于 50 岁后并且其开始的症状可能会被归因于年老或普通的健忘。当疾病进展时,认知能力逐渐恶化,包括作出判断和进行日常生活的能力,个性可能发生变化,以及行为问题。在其晚期阶段,AD 导致痴呆并最终导致死亡。目前,该疾病是不可治愈的并且是死亡率的主要原因。

[0003] 目前,阿尔茨海默病通常通过临床现象进行诊断,因为确切的诊断仅能基于脑样品组织学检查(尸体解剖或活组织检查),揭示在脑组织中的其表征性特征的存在。鉴于在活着的患者中进行脑活组织检查存在风险,很少使用这种方法,因此估计该疾病的体内诊断的错误率是约 20-30%。

[0004] 患有阿尔茨海默病的个体的脑中显示两种主要的病理学标记:神经原纤维变性(其通过神经原纤维缠结,营养不良的神经突和神经纤维网线的存在进行鉴定)和淀粉状蛋白物质的沉积(即通常缩写为 A β 的所谓的 β -淀粉样蛋白肽的沉积),它们以斑块的形式(扩散的斑块和神经炎性斑,这些后面提及的形式是该疾病的特征,并且象这样命名,是因为它们出现在神经元之间和之内),和以血管沉积物(其存在于脑血管壁中)的形式存在。神经原纤维变性和淀粉状蛋白的沉积组成变性过程,这也与脑的正常老化相关。在没有遭受痴呆的年龄大的受试者中,A β 肽主要以扩散斑的形式沉积。这种类型的沉积尤其在一些具有正常认知能力的受试者中突出,并且对于一些学者而言,其组成“病理性老化”的过程,这被当作脑的正常老化和 AD 之间的过渡过程(halfway)[1]。特别深入研究的是,扩散斑在神经炎性斑之前数年的过早发展似乎也发生在唐氏综合征(DS)中,其是由导致淀粉样蛋白前体蛋白(β -APP)的过表达的染色体 21 的三体性所引起的。尽管在具有正常认知能力的受试者的脑中可能观察到少量的神经炎性斑,在年长者中受 AD 影响的脑和受 DS 影响的脑的特征是大量成熟神经炎性斑的发展[2,3]。与包含 A β 的非原纤维形式(称为“前淀粉状蛋白”)[4]的扩散斑相反,血管淀粉状蛋白沉积物和神经炎性斑包含原纤维形式的 A β 肽并且与淀粉状蛋白物质的染料如刚果红和硫黄素 T 反应。

[0005] 在 AD 中的认知下降与神经原纤维改变和皮质突触损失的进展线性相关[5]。没有观察到与扩散斑相关的局部突触损失[6]。相反,神经炎性斑与突触密度损失,神经原纤维改变和小胶质细胞的活化相关[7]。纯粹的神原纤维变化和 A β 的沉积按照 AD 进展的充分建立的连续模式进行[8,9]。然而,尽管认知下降的程度与基于神经原纤维改变的连续阶段更好地相关[5],在痴呆的临床显现中,AD 的确定的神经病理学诊断基于与按照患者的年龄组所预期的相比,在有联系的新皮质区中显著更高密度的神经炎性斑的组织学证实(CERAD 的共有标准:Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease)

[10]。神经炎性斑的形成组成 AD 中的中枢系统致病过程,因此,这些 β -淀粉状蛋白沉积物的分子组成和与所述组成相关的与扩散斑的不同是目前 AD 研究中的主要关注的领域之一。

[0006] 在最近数年里,关于在阿尔茨海默病患者的脑组织中的 β -淀粉状蛋白的沉积物的分子组成的知识已经发生了根本性的改变。使用生化或免疫组化方法来鉴定 A β 肽的不同形式的各种研究已经提供了相当一致的描述,这容许传统形态学发现的分子解释。这些研究提供了被称为淀粉状蛋白假说的该疾病的统一的致病理论的基础 [11],尽管最近已经重新阐述了最初的假说,从而包括作为主要致病剂的可溶性 A β 寡聚物的新出现的作用 [12]。目前,A β 肽在 AD 中的主要的和重要的致病作用的假说导致了涉及预防或去除这些沉积物的新的治疗策略。

[0007] 在受 AD 影响的脑中已知的 A β 肽的沉积物的地理分布和瞬时的序列已经通过针对 A β 分子的羧基末端,氨基末端或内部片段的抗体的方式以及通过生化方法分离和纯化 A β 的同种型进行阐释。由它们的羧基末端的特征表征的肽的组织分布显示出相当规则的充分定义的模式。尽管 A β_{x-40} 是血管沉积物中的主要形式,和在 CSF (脑脊液) 中遇到的主要形式。A β_{x-42} 是在脑组织沉积物 (扩散斑和神经炎性斑) 中检测到的主要形式 [13]。在 AD,唐氏综合征 (DS) [13,14] 和正常老化 [1] 中,A β_{x-42} 是扩散斑的唯一成分并且是神经炎性斑的主要成分。后者还可以主要在它们的中央核区包含 A β_{x-40} 。还可以确定 A β_{x-42} 是在起始阶段沉积的形式。

[0008] 尽管认为 A β_{x-40} 和 A β_{x-42} 开始几乎完全以氨基酸 Asp1 开始,已经通过免疫组织化学和生物化学充分确定了在氨基末端修饰和截短的 A β 肽的广泛种类的异源同种型参与扩散和神经炎性斑两者的组成 [15]。这些同种型还倾向于显示在扩散和神经炎性斑之间的常规的分布模式,从而使各种 A β 肽的地理分布的完整图像最终开始显现。但是在不同的研究之间出现了一些差异,特别是关于组成扩散斑的肽的氨基末端的特征,以及它们每种所具有的淀粉状蛋白沉积物的相对量。

[0009] 这些差异特别包括 p3 肽 (A β_{17-42})。尽管一些研究提示 A β_{17-42} 可能是扩散斑中的主要成分 [16],其它的研究已经发现这个水平上的相对更大量的较长形式 (以 Asp1 开始,或在氨基末端截短的或其它的修饰的同种型) [15]。因为 A β_{17-42} 通过用 α -分泌酶切割 β -APP 产生 (所谓的非促淀粉状蛋白生成途径) 并显示相当不同于 A β 的更长同种型的理化性质 (后者通过用 γ -分泌酶切割 β -APP 产生),其在扩散斑中的选择性存在可能是在斑块的发展中的关键致病原因。

[0010] Gowing [17] 等首先分离了作为主要形式的 A β_{17-42} 肽,其从富含扩散斑的受 AD 影响的脑中回收。在血管淀粉状蛋白沉积物或在神经炎性斑中没有发现这种沉积物。在一系列受 AD 和 DS 影响的脑中,识别 A β_{1-17} 的商业化的单克隆抗体 6E10 无论在脑皮质还是在小脑中都没有产生扩散斑的免疫染色 [18]。然而,在缺乏神经炎性斑情况下,扩散斑特别丰富的纹状体显示了对 6E10 抗体是阳性的一些斑块。使用 HPLC 和免疫组织化学测定,Lalowski 等 [19] 证实了 A β_{17-42} 在小脑的扩散斑中占总淀粉状蛋白含量的 70%,而 A β_{1-42} 占 12%,A β_{x-42} 的其它截短形式占 5% 或更少。在受 DS 影响的年长的人的脑中,Saido 等 [20] 发现与用抗 A β N(1) 抗体染色的扩散斑相比,用特异性抗 -A β N3 (pyroGlu) 抗体染色的扩散斑具有更强的染色。Iwatsubo 等 [15] 用一组涉及识别在氨基末端截短的和修饰的 A β 形式的抗

体研究了在来自受 AD 影响和受 DS 影响的年长个体中的一系列脑中的扩散斑。该研究是独特的,因为将用于免疫组织化学研究的脑组织固定在 70%乙醇中或在 4%甲醛中,从而能够测试常规的用甲醛进行的固定对人工产物外观的影响。在所有的固定在 70%乙醇中的组织样品中,当 A β N1 (L-Asp), A β N1 (L-isoAsp), A β N1 (D-Asp), A β N3 (pyroGlu) 和 A β X-42 存在的情况下扩散斑被强烈染色。使用 A β N11 (pyroGlu) 和 A β N17 获得弱的免疫染色。然而,在用甲醛固定的材料中,一些扩散斑被 A β N1 (L-Asp) 染色,未被 A β N1 (L-isoAsp) 或 A β N1 (D-Asp) 染色,而对于羧基末端的染色模式没有改变。尽管作者证实了氨基末端的修饰可以改变在固定于甲醛中的组织的免疫染色的结果,他们也在固定于乙醇中的材料中获得了对于 A β N17 的弱反应性。使用特异于 p3 (A β ₁₇₋₄₂) 的单克隆抗体 [16],他们发现该肽的沉积主要受限于杏仁核,海马和海马旁区中的扩散斑,营养不良的轴突和神经炎性斑的冠部。作者显示了 p3 在淀粉状蛋白物质的起始沉积和在神经炎性斑的起源中的特殊作用。Tekirian 等 [21] 证实,在一系列受 AD 影响的脑和对照中,在扩散斑中存在 A β N3 (肽) > A β N1 (D) > A β N17 (L) > A β N1 (rD)。

[0011] 关于在羧基末端的可变性,在使用针对 A β _{x-40}, A β _{x-42} 或 A β _{x-43} 抗体的研究中, Parvathy 等 [22] 发现仅与 A β C40 抗体反应的神经炎性斑的亚型,和与 A β C40 和 A β C42 都反应的斑块的更大的亚型。

[0012] 因此早期的研究已经确定扩散斑显示在羧基末端高度特异的 A β 的分布型和在氨基末端相当特异的 A β 的分布型,后者在不同的患者之间和在脑的不同区域之中具有某种异质性。A β ₁₇₋₄₂ 的存在似乎大大局限于扩散斑,尽管关于这种较短肽在它们中的相对含量在研究之间存在相当大的差异。在 Kida 等 [18] 进行的研究中,对于在皮质和皮质下区域的扩散斑中包括序列 12-16 的 A β 肽没有获得染色。

[0013] 总体上考虑,现有技术 (SA) 的结果显示,如由 Larner [23] 所推荐,根据氨基末端特异的 A β 肽的形式在扩散斑的发展中起着重要作用从而使它们被转化为神经炎性斑。因此,能够特异性检测具有截短的氨基末端的形式,并因此清楚地区分扩散斑和神经炎性斑的抗体是诊断阿尔茨海默病的非常有用的工具。在它们中,能够根据在终止羧基末端的氨基酸中具有差异的淀粉状蛋白肽的不同形式的比例,区分神经炎性斑的亚型的那些抗体是尤其有用的,尤其是如果它们能够用于确定组成具体的疾病标记的斑块的子群。直接针对组成 β -淀粉状蛋白肽的氨基酸 12-16 的序列,并且对于 A β ₄₂ 形式的亲和性大于对 A β ₄₀ 形式的亲和性的本发明的单克隆抗体满足这两个特征。

[0014] 其中能够检测 β -淀粉状蛋白肽的形式的抗体将是特别有用的另一个方面是通过分析该肽的不同形式在生物流体中的浓度来诊断阿尔茨海默病,被研究的一个方面是促进基于生物化学参数的诊断,和甚至能够预期鉴定潜伏期的病例或具有发展该疾病的特定风险的那些,并用于监测参与临床研究的患者。为此目的,许多研究集中于脑脊液 (CSF),目的是检测是否存在在该流体中出现的 β -淀粉状蛋白的可溶形式的浓度的变化,其使区分患者和健康对照成为可能。然而,分析 CSF 包括使用侵入性技术,腰椎穿刺,因此将其在临床实践中用于诊断和常规监测患有阿尔茨海默病的患者是相当不可能的。因此,其它种类的研究已经集中于研究生物标记物 (其包括 β -淀粉状蛋白肽的可溶形式) 在血液和尿液中的浓度的变化,所述标记物可能与疾病的出现和发展有关,但是到目前为止报道的研究很少。根据这些,A β _{x-42} 和 A β _{x-40} 的血浆水平似乎在有唐氏综合征的情况下增加,它们也随着

年龄的增长在正常个体中增加。 $A\beta_{x-42}$, 而不是 $A\beta_{x-40}$ 的血浆水平在患有阿尔茨海默病的患者中升高, 在疾病发展时降低 [28, 29], 但是这些种类在血浆中浓度的测量目前不能被用于诊断。还在尿中检测到 β -淀粉状蛋白肽的可溶性形式的存在 [30], 但是尚未进行在患者和对照之间的比较研究。尽管在血浆和尿中检测的 β -淀粉状蛋白肽的浓度的量级难以确定对应于健康个体和在疾病发展的不同阶段的患者的模式, 并且 β -淀粉状蛋白肽的可溶形式与存在于所述生物流体中的其它蛋白的可能联系是要克服的另一个难题, 但是这是被积极寻求的一种方法, 因此, 可以与存在于生物流体中的 β -淀粉状蛋白肽的形式相互作用从而可能检测它们的单克隆抗体可以是诊断阿尔茨海默病的一种非常有用的工具。能够与 β -淀粉状蛋白肽的可溶形式相互作用并且检测其在生物流体如尿中的存在的本发明的抗体是可用于实行这些诊断技术的抗体中的一种。此外, 其特异性针对接近于 β -淀粉状蛋白肽的氨基末端的区域的事实是区分在氨基末端保守的 β -淀粉状蛋白肽的形式和其中所述末端被截短的那些形式的令人感兴趣的特征。

[0015] 已经描述了其它特异性针对接近于 β -淀粉状蛋白肽的氨基末端的区域的其它单克隆抗体以及它们在与 AD 相关的诊断方法中的应用。例如, 美国专利 US-4, 666, 829 描述了单克隆抗体的产生, 针对最接近氨基末端的淀粉状蛋白肽的部分产生。具体地, 制备的合成肽包含 SEQ ID NO: 1 代表的所述肽的开始 10 个残基 (Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr)。由该抗体识别的表位被包括在这些氨基酸 1-10 中, 而本发明要求保护的抗体至少识别包含氨基酸 12-16 的表位。识别该单克隆抗体的具体序列关于本发明的单克隆抗体是不同的, 推荐的诊断技术的设计也是不同的, 因为所测定的只是所用的抗体与本发明考虑的由淀粉状蛋白肽的氨基酸 1-28 组成的作为阿尔茨海默病的特征的肽的结合, 而不考虑与具有不同长度的肽和 / 或在氨基和羧基末端具有变化的肽的其它形式的结合。此外, 没有实验证据证实其检测出现在生物流体中的淀粉状蛋白肽的形式的能力。

[0016] 此外, 专利申请 PCT WO 90/12871 描述了被称为 SV17-6E10 的单克隆抗体的制备。该抗体通过用由 SEQ ID NO: 2 代表的肽序列 Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Gln-Val-His-His-Gln-Lys-Leu 免疫产生, 其被认为等价于淀粉状蛋白肽的氨基酸 1-17 的肽序列。针对包含氨基酸 1-17 的区域的另一种单克隆抗体是前述商业单克隆抗体 6E10, 其如在对应于产品的数据单表中的描述, <http://www.alexiscorp.com/monoclonal-antibodies-SIG-9320/opfa.1.1.SIG-9320.386.4.1.html> 所指出, 具体而言在 β -淀粉状蛋白肽的氨基酸 1-17 中, 识别包含氨基酸 3-8 之间的表位。该表位对应于不同的区域, 与本发明的 EM5 单克隆抗体的表位相比, 其更接近于氨基末端。尽管其能够在没有对扩散斑进行染色的情况下, 产生神经炎性斑和血管沉积物的差异染色, 该抗体似乎没有显示在肽 $A\beta_{42}$ 和 $A\beta_{40}$ 之间的亲和性的差异。

[0017] 因此, 被称为 EM5 的本发明的单克隆抗体构成了新的工具, 因为其识别至少一个位于 β -淀粉状蛋白肽的序列中, 现有技术描述的抗体的任一种所不能识别的表位。因此, 本发明的抗体有效用于诊断阿尔茨海默病。其特异性地检测神经炎性斑, 而不检测与疾病没有特殊关联的扩散斑。在神经炎性斑中, 本发明的单克隆抗体使检测神经炎性斑的亚型成为可能, 所述神经炎性斑相对于 β -淀粉状蛋白肽的沉积物在它们的分子组成中不同。而且, 本发明的单克隆抗体能够结合于在溶液中存在的 β -淀粉状蛋白肽的形式, 容许随后检测和量化所述肽, 包括如果所述溶液是生物流体如尿的情况。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明涉及识别在 β -淀粉状蛋白肽中的表位的单克隆抗体,所述表位对应于下列序列:

[0020] Val-His-His-Gln-Lys (SEQ ID NO :3)

[0021] 所述单克隆抗体能够结合于包含所述序列的 β -淀粉状蛋白肽的同种型,不管所述肽是以可溶性形式,聚集形式存在或是被 SDS 所变性,可是其对于 A β 42 同种型显示比对 A β 40 同种型更大的亲和性。

[0022] 本发明还涉及前述抗体的片段,其也能够结合于包含所述 SEQ IDNO :3 的 β -淀粉状蛋白肽的同种型。

[0023] 本发明还涉及能够产生前述单克隆抗体的杂交瘤细胞系,和通过获得杂交瘤细胞系并将所述细胞系在容许产生单克隆抗体的条件下培养来产生所述抗体的方法。

[0024] 此外,本发明涉及这样的组合物,其包含本发明的抗体或其能够结合 SEQ ID NO :3 的至少一个片段。本发明的组组合物的一个可能的实施方案是其中该抗体或其片段偶联于能够使其被检测的物质,所述物质是能够结合于本发明的抗体或其片段的第二抗体,并且其偶联于可以使其被检测的物质,诸如能够催化具体物质转化为另一种可被检测的物质例如色素原的酶。本发明的组组合物的另一种可能的实施方案是其中将所述抗体或其片段偶联于有利于提取存在于溶液中的 β -淀粉状蛋白肽的同种型的一些物质或颗粒,如磁性颗粒,当应用磁场时,其可以自溶液分离形成的抗原-抗体或抗原-抗体片段复合物,因此其可能浓缩在所述溶液中存在的 β -淀粉状蛋白肽的同种型,并有利于它们随后的检测,鉴定和/或量化。

[0025] 本发明还涉及本发明的单克隆抗体或其能够结合 SEQ ID NO :3 的至少一个片段用于检测包含 SEQ ID NO :3 的 β -淀粉状蛋白肽的同种型的应用。待检测的 β -淀粉状蛋白肽的同种型可以存在于取自个体的脑组织样品中,存在于溶液如生物流体样品中或其衍生的溶液或甚至可以被包含在一些其它的非生物类型的样品中,在所述非生物类型的样品中类似地需要检测 β -淀粉状蛋白肽的同种型的可能存在。

[0026] 最终,本发明涉及基于通过使用本发明的抗体或其能够结合 SEQ IDNO :3 的至少一个片段检测 β -淀粉状蛋白肽的同种型来体外诊断阿尔茨海默病的方法。在本发明的优选实施方案中,在取自个体的脑组织样品中检测所述 β -淀粉状蛋白肽的同种型。在这种情况下,本发明的组合物可以是特别有用的,在所述本发明的组合物中,抗体或其片段偶联于能够允许检测它们的物质,所述物质可能是能够结合于本发明的抗体或其片段的第二抗体,并且其偶联于能够容许其被检测的另一种物质。

[0027] 在本发明的诊断技术的另一个优选实施方案中, β -淀粉状蛋白肽在溶液,优选地在生物流体的样品如脑脊液,尿或血液中或甚至在来自生物流体的溶液如血浆中进行检测。在本发明的这种第二实施方案中,优选的是使用本发明的组合物,其中将所述抗体或其片段偶联于有利于提取存在于溶液中的 β -淀粉状蛋白肽的同种型的一些物质或颗粒,如磁性颗粒,如果应用磁场的话,这可以从溶液中分离形成的抗原抗体或抗原-抗体片段复合物,因此其可能浓缩在所述溶液中存在的 β -淀粉状蛋白肽的同种型,并有利于它们随后的检测,鉴定和/或量化。因此,本发明的诊断方法包括下列阶段:

[0028] a) 将组合物加入生物流体的样品或源于其的溶液中,所述组合物包括偶联于磁性

颗粒的本发明的抗体或其能够结合 SEQ ID NO :3 的至少一个片段；

[0029] b) 等待足够的时间使 β -淀粉状蛋白肽的至少一种同种型和包含在所述组合物中的抗体或抗体片段形成抗原-抗体或抗原-抗体片段复合物；

[0030] c) 应用磁场来提取来自溶液的抗原-抗体或抗原-抗体片段复合物；

[0031] d) 去除所述溶液；

[0032] e) 将抗体或抗体的片段与 β -淀粉状蛋白肽的分子进行分离；

[0033] f) 鉴定和量化提取自生物流体或来自生物流体的溶液的样品的 β -淀粉状蛋白肽的同种型。

[0034] β -淀粉状蛋白肽的同种型提取自其中的溶液优选地是血液或尿样品，因为与获得脑脊液的样品比较，获得它们更为简单，或备选地是来自血液样品的血浆样品。在血液或血浆和尿之间，尤其优选的生物流体的样品是尿样品，其可以在不使用侵入性方法的情况下获得。然而，那么必要的是使用鉴定和量化 β -淀粉状蛋白肽的同种型的非常敏感的方法，如 MALDI-TOF 质谱分析法。

[0035] 也由本发明人开发的多克隆抗体 EM2 和 EM3，也可以在本发明的诊断方法中用作另外的工具。

[0036] 附图简述

[0037] 图 1 显示抗体 EM5 (顶部) 和 6E10 (底部) 与固定的 A β 肽结合的曲线。其显示在聚集 (Δ) 或未聚集 ($\square$) 的情况下对应于不同浓度 (横座标 ; 以浓度 nM 表示) 的抗体的结果，所述抗体针对 A β 40 肽 (实心符号) 和 A β 42 肽 (空心符号)。每个点表示来自一式三份进行的实验的平均值。在 450nm 下的光密度 (O. D.) 显示在纵座标中。

[0038] 图 2 显示相对于合成肽 A β 1-40 和 A β 1-42 的抗体 EM2, EM3 和 EM5 的免疫转移分析的结果。

[0039] 图 3 在顶部显示通过 ELISA 的方式，EM5 对一系列合成的 A β 肽的反应性的条形图，其吸光度 (在 450nm 下的 O. D.) 值对应于 20 μ g/ml 抗体。底部显示按照在该 ELISA 中获得的结果由 EM5 所识别的表位的定位。1-28R = 啮齿动物 A β 1-28。在圆括号中，各种突变。

[0040] 图 4 显示通过用说明书的表中给出的各种蛋白水解酶消化的免疫沉淀 β -淀粉状蛋白肽 (肽 1-5) 的质谱分析法所测定的由 EM5 单克隆抗体所识别的 A β 肽的表位的定位。序列 6 对应于没有被消化的 β -淀粉状蛋白肽。

[0041] 图 5 显示使用 EM2, EM3, EM5 和 EM5 与前述每种组合对受阿尔茨海默病影响的脑组织的免疫染色的照片。将染色的结构标记为 V (血管), DP (扩散斑) 和 NP (神经炎性斑)。所述照片对应于：

[0042] - (A) 和 (B) : 使用氮蓝四唑 (NBT) 作为色素原，用 EM5 (A) 和 EM3 (B) 作为一级抗体对枕叶皮质的相同区域的连续系列切片进行免疫染色。

[0043] - (C) : 来自使用 EM3 (色素原 : NBT) 和 EM5 (色素原 : DAB) 作为一级抗体进行的双重免疫染色技术的高倍放大的显微照片。

[0044] - (D) 和 (E) : 用 EM5 (D) 或用 EM2 (E) 对枕叶皮质的相同区域的连续系列切片进行免疫染色。

[0045] - (F) : 来自使用 EM2 (色素原 : 氮蓝四唑, NBT) 和 EM5 (色素原 : 二氨基联苯胺, DAB)

进行的双重免疫染色技术的高倍放大的显微照片。

[0046] 图 6 显示通过 MALDI-TOF 质谱分析不同长度的 β -淀粉状蛋白肽获得的图。在每种情形中,纵坐标显示通过质量 / 电荷比率 (m/z) 推导的对应于不同质量 (M_s) 的每个峰的百分比强度 (% Int)。用字母 A 指示,并且在右面标记“Ctrl”的上面的图获自这样的溶液,所述溶液包含包括 β -淀粉状蛋白肽的氨基酸 12-29 (Pep. A. β 12-29), 1-40 (Pep. A β 1-40) 和 1-42 (Pep. A β 1-42) 的肽。用字母 B 指示并且在右边标记“EM5+PM”的下面的图在通过使用共价结合磁性颗粒的 EM5 抗体并使用磁场来分离形成的复合物,从包含它们的溶液中浓缩所述肽后获得。在下面右面的图表示抗体与每种目标肽的结合区域。

[0047] 图 7 显示通过 MALDI-TOF 质谱分析来自健康个体的尿样品的获得的图,向所述尿样品中加入额外量的包含 β -淀粉状蛋白肽的氨基酸 12-28 (标记为 Pep. 12-28 的峰), 1-40 (标记为 Pep. 1-40 的峰) 和 1-42 (标记为 Pep. 1-42 的峰) 的肽,随后用共价结合磁性颗粒的 EM5 抗体处理样品,并通过应用磁场来分离形成的复合物。纵坐标显示由质量 / 电荷比率 (m/z) 推导的对应于不同质量 (M_s) 的每个峰的百分比强度 (% Int)。指示对应于被加入尿样品的 β -淀粉状蛋白肽的每种形式的峰。

[0048] 发明详述

[0049] 如已经提及的,本发明涉及识别在 β -淀粉状蛋白肽中的表位的单克隆抗体, EM5,所述表位对应于下列序列:

[0050] Val-His-His-Gln-Lys (SEQ ID NO :3)。

[0051] 该序列对应于人 β -淀粉状蛋白肽的残基 12-16 的序列。因此,希望前述抗体能够结合包含所述序列的 β -淀粉状蛋白肽的同种型,而不识别缺乏其的那些,例如所谓的 p3 肽 ($A\beta_{17-42}$) 和具有截短的氨基酸的其它形式 ($A\beta_{17-x}$)。在下面给出的实施例中详细描述的单克隆抗体的表征中,证实了 EM5 结合包含人 $A\beta$ 序列的残基 12-16 的任何肽,即使其在该区域的外面具有修饰,并且其不识别缺乏所述区域的肽。如果所述区域被修饰,如在位点 13 以及位点 5 和 10 上的氨基酸上发生变化的肽 $A\beta_{1-28}$ 的情形 (啮齿动物),所述肽不再被 EM5 所识别。

[0052] 此外,研究显示抗体能够结合包含残基 12-16 的 $A\beta$ 肽的同种型,不管其是以可溶性形式,以聚集形式还是以变性形式 (在 SDS 中) 存在。具体而言,在下面给出的实施例中描述的测试显示本发明的抗体能够结合聚集的 β -淀粉状蛋白肽的同种型,形成在脑组织中存在的一定比例的斑块,能够结合在溶液中的 β -淀粉状蛋白肽的同种型,包括当所述溶液是生物流体诸如尿样品时。因此,本发明的另一个方面涉及包含本发明的抗体或其能够结合 SEQ ID NO :3 的至少一个片段的组合物及其在诊断阿尔茨海默病中的应用,所述本发明的抗体或其能够结合 SEQ ID NO :3 的至少一个片段偶联于容许其检测和 / 或浓缩的物质。

[0053] 当本发明的抗体或其片段偶联于容许其被检测的物质时,通过检测和 / 或量化结合于 β -淀粉状蛋白肽的同种型的抗体或其片段来检测结合所述抗体或其片段的 β -淀粉状蛋白肽的同种型的存在和 / 或量化其是可能的,所述 β -淀粉状蛋白肽同种型包含由本发明的抗体所识别的特异性序列。在本发明的优选实施方案中,所述抗体或其能够结合 SEQ ID NO :3 的片段所偶联的物质是本发明的单克隆抗体能够结合的第二抗体,所述第二抗体能够结合于催化具体物质转化为另一种物质的酶,所述另一种物质具有有利于检测其

存在的特征。在本发明的最优选的实施方案中,结合于酶的第二抗体是来自 Dako 实验室的 Envision 系统的一部分,被酶催化转化的该物质是色素原,催化所述反应的酶是碱性磷酸酶(在使用氮蓝四唑作为色素原的情形中)或辣根过氧化物酶(其中使用二氨基联苯胺)。

[0054] 另一种可能性是本发明的抗体或其片段结合于有利于已经结合于所述抗体或其片段的 β -淀粉状蛋白肽同种型的浓缩的物质或颗粒。当将本发明的组合物用于检测和/或量化存在于溶液,尤其是其中它们的浓缩度较低的溶液如血液或血浆,尿或脑脊液中的 β -淀粉状蛋白肽同种型时,这种实施方案是优选的。所述物质或颗粒是这样的,如容许抗原-抗体复合物通过例如免疫沉淀从所述溶液中容易地分离出来。所述颗粒的优选实例是磁性颗粒,其当偶联于能够结合 β -淀粉状蛋白肽同种型的本发明的抗体或其片段时,如果应用适合的磁场,将容许结合于所述抗体或其片段的 β -淀粉状蛋白肽同种型从所述溶液中提取出来,所述 β -淀粉状蛋白肽同种型包含被本发明的抗体所识别的特异性序列。随后, β -淀粉状蛋白肽同种型可以与所述抗体或其片段分离并且接着可以进行检测,鉴定和/或量化。适合的方法是质谱分析法,尤其是已知为 MALDI-TOF 的质谱分析(matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight)。

[0055] 如已经提及,能够结合 β -淀粉状蛋白肽同种型的本发明的抗体或其片段以及包含至少其中之一的组合物可以用于体外诊断阿尔茨海默病,所述 β -淀粉状蛋白肽同种型包含被本发明的抗体所识别的特异性序列。使用能够结合 β -淀粉状蛋白肽同种型的本发明的抗体或其片段体外诊断阿尔茨海默病的方法,以及使用包含所述抗体或所述片段的组合物的方法在本发明的范围内,所述 β -淀粉状蛋白肽同种型包含被本发明的抗体所识别的特异性序列。所述诊断可以在脑组织上进行,其中主要包括包含被本发明的单克隆抗体所识别的序列的 β -淀粉状蛋白肽同种型的沉积物(神经炎性斑和血管沉积物,阿尔茨海默病发展的特征的沉积物)的存在被选择性地显示,检测本发明的单克隆抗体或其能够结合被所述抗体识别的特异序列的片段与所述沉积物的结合的存在,与其对其中主要包含缺乏被本发明的单克隆抗体所识别的序列的同种型,同种型 $A\beta_{17-x}$ 的沉积物(扩散斑)的结合进行对比,所述同种型 $A\beta_{17-x}$ 将不会显示与所述单克隆抗体或其片段的结合。通过组合物的方式来揭示抗体与神经炎性斑和血管沉积物的结合,所述组合物如除了本发明的抗体或其片段之外,还包含本发明的单克隆抗体能够结合的第二抗体的那些的其中之一,所述第二抗体与酶结合,所述酶催化确定的物质转化为另一种具有有利于检测其存在的特征的物质,诸如色素原。在本发明的对脑组织的诊断技术的最优选的实施方案中,诊断方法由另外应用多克隆抗体 EM2 和 EM3 来补充,所述 EM2 和 EM3 识别 $A\beta_{x-42}$ (EM3) 或 $A\beta_{x-40}$ (EM2),两种抗体在以前也由本发明的作者的小组开发 [24]。

[0056] 本发明的诊断方法的另一个实施方案在已知包含 β -淀粉状蛋白肽的同种型的生物流体上进行,所述生物流体如脑脊液,尿或血液或在后一种情况中,衍生自其中的血浆。由于需要穿刺才能获得脑脊液,优选使用血浆或尿并尤其优选后者,其可以在不使用侵入性技术的情况下获得。接着,优选的是本发明的诊断方法应该使用包含本发明的抗体或其片段的组合物,所述本发明的抗体或其片段结合于有利于浓缩结合于所述抗体或其片段的 β -淀粉状蛋白肽的同种型的某种物质或颗粒。如已经提及,有利于浓缩 β -淀粉状蛋白肽的同种型的颗粒优选的是与抗体或其片段偶联的磁性颗粒,从而当包含与 β -淀粉状蛋白肽的同种型形成的复合物的溶液经过磁场的作用时,后者可以从溶液中提取,其可

以使用如抽吸的方法容易地被丢弃。在使用完整的抗体的情形中,尤其优选抗体与磁性颗粒的偶联通过共价键来实现以增加稳定性,但是所述共价键的建立要以这样的方式进行,其尽可能地避免抗原结合位点,从而不会减弱抗体的结合能力,因此优选其中结合优先发生在抗体的 Fc 片段的富含组氨酸的区域中或在所述区域的糖苷链上的方法。在这种情形中,特别优选由 Fuentes 等人 [26] 描述的抗体与磁性颗粒的结合的方法。

[0057] 一旦 β -淀粉状蛋白肽的同种型的结合复合物从溶液中分离出来,抗体或其片段的所述同种型的分离优选在提取的 β -淀粉状蛋白肽同种型的检测和/或量化之前进行,对于所述提取可以使用乙腈和三氟乙酸。由于 β -淀粉状蛋白肽的同种型在尿中的浓度通常非常低,检测和/或量化优选地使用非常敏感的方法诸如 MALDI-TOF 质谱分析法来进行。

[0058] 本发明的另一个方面是能产生本发明的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。在本发明的优选实施方案中,所述细胞系通过用小鼠骨髓瘤细胞系 P3/X63-Ag. 653 与来自用偶联于 KLH(匙孔血蓝蛋白)的肽 $A\beta_{1-40}$ 免疫的 BALB/c 小鼠的脾细胞融合获得。

[0059] 最后,本发明的另一个方面是制备和纯化来自杂交瘤细胞的本发明的单克隆抗体的方法。在本发明的优选实施方案中,所述方法包括产生如前所述的杂交瘤细胞系,并将其在预先用降植烷处理的 BALB/c 小鼠中作为腹水培养。通过亲和层析法在 Protein A-Sepharose 柱 (Pharmacia) 上从这种腹水中纯化该单克隆抗体。在本发明的特别优选的实施方案中,所用的杂交瘤细胞来自被称为“EM5 克隆 A”的品系,其在 2006 年 3 月 1 日在 European Collection of Cell Cultures(ECACC), CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, United Kingdom 要求保藏,登记号为 06030101。

[0060] 现在使用下面的实施例来更详细地描述本发明及其优选实施方案。

实施例

[0061] 实施例 1 抗体的产生

[0062] 以以前报道的方式 [24] 产生在本研究中使用的多克隆抗体 EM2 和 EM5。

[0063] 进行下列步骤来产生 EM5 单克隆抗体:

[0064] 杂交瘤的产生

[0065] 用 40 μ g 的肽 $A\beta_{1-40}$ 皮下注射 BALB/c 小鼠,所述肽 $A\beta_{1-40}$ 偶联于 KLH(匙孔血蓝蛋白),溶解在磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,并用等体积的弗氏完全佐剂进行乳化。所述小鼠每隔一周重复接受三次注射,在弗氏不完全佐剂中。融合前三天,小鼠接受在 PBS 中的 25 μ g $A\beta_{1-40}$ -KLH 的腹膜内注射。在融合当天,按照已经确定的程序 [25],使用聚乙二醇 1400(Sigma)融合来自免疫的动物的脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞系 P3/X63-Ag. 653。将融合后的细胞以每孔 105 细胞的密度分布在无菌的 96 孔板中并在包含次黄嘌呤,胸苷和氨基蝶呤的培养基中进行选择。通过后面描述的 ELISA 来鉴定产生抗体的杂交瘤。

[0066] 杂交瘤的筛选

[0067] 在 4°C 用在碳酸盐缓冲液 50mM, pH 9.6(覆盖缓冲液)中的 5 μ g/ml 的 $A\beta_{1-40}$ 将聚苯乙烯微量滴定板 (Maxisorb, Nunc) 进行覆盖过夜。用在 PBS(PBS-T) 中的 0.05% 的吐温 20 洗涤所述板,并在 37°C 用在 PBS-T 中 2% 的牛血清白蛋白(BSA)(封闭溶液)封闭非特异性结合位点 1 小时。洗涤后,用在封闭溶液中稀释 2 次的组织培养上清液将所述板温育 1 小时。再次洗涤所述板,并用与辣根过氧化物酶缀合的山羊抗-小鼠 IgG(Sigma) 在 37°C

温育其达 1 小时。洗涤后,将底物(在柠檬酸盐缓冲液 100mM, pH5.0 中的 0.05% 邻苯二胺和 0.015% 的过氧化氢)加入溶液。10 分钟后用 2.5M 的硫酸终止反应,并在微量培养板阅读器中测定在 492nm 下的吸光度。选择这样的杂交瘤,其上清液产生的吸光度值是来自不相关的杂交瘤(抗-麦醇溶蛋白抗体)的上清液获得的吸光度的值的至少 2 倍。使用有限稀释来重复克隆产生的特异性抗体的杂交瘤,并且在使用特异性抗血清(Sigma)通过凝胶免疫沉淀浓缩的细胞培养物上清液中测定单克隆抗体的同种型。将选定的杂交瘤在预先用降植烷处理的 BALB/c 小鼠中作为腹水培养。

[0068] 单克隆抗体的纯化

[0069] 通过亲和层析法在 Protein A-Sepharose 柱(Pharmacia)上从腹水中纯化 EM5 单克隆抗体。将纯化的抗体在 PBS 中充分透析,并将其贮存在 -85°C 直到使用它们。

[0070] 实施例 2- 计算表观解离常数:对于肽 A β ₁₋₄₀ 和肽 A β ₁₋₄₂ 的亲合性

[0071] 使用新近溶解的,固定的肽 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂,使用 ELISA 来研究 EM5 和 6E10 单克隆抗体的亲合性,所述肽使用 N-叔-丁氧基羰基方法在耶鲁大学的 WM Keck 工厂合成。

[0072] 在 4°C,用在碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 pH9.6 中最近溶解的或聚集的 0.5 μ g 的肽 A β ₁₋₄₀ 或 A β ₁₋₄₂ 覆盖聚苯乙烯微量滴定板(Immulon 2 Dynex Technology Inc., Chantilly, VA) 达 16 小时。在用 Superblock(Pierce Chemical Co.)封闭后,将增加浓度的纯化的 EM5(在 TBS-T 中 0-0.5nM,每孔 100 微升)加入被 A β 覆盖的孔,在 37°C 温育 3 小时。用与辣根过氧化物酶缀合的山羊抗-小鼠 IgG 的 F(ab')₂ 片段(1 : 3000, Amersham)检测结合的 EM5。用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)(BioRad, Hercules, CA)使反应显影 15 分钟,用 2M 的硫酸终止反应并在 450nm 在微量培养板阅读器(Cambridge Technology, Watertown, MA)上量化它。使用纯化的 IgG 抗体的制剂按照相似的方法来研究商购抗体 6E10(Senetek, PLC)的亲合性。使用来自 GraphPad 的 Prism 软件(GraphPad, San Diego, CA)评估,通过计算 F 比率发现统计学显著性的非线性回归分析,表观解离常数的估计和蛋白质结合数据的比较。

[0073] 图 1 显示在 ELISA 中,对应于 EM5 和 6E10 单克隆抗体与最近溶解和聚集的 A β 肽的结合的饱和曲线。在所有的情况中都观察到高度亲合性,其中表观解离常数在皮摩尔范围内。这些抗体都没有显示对于 A β 的最近制备或聚集形式的差异亲合性。有趣的是,尽管 6E10 对于 A β ₁₋₄₀ 或 A β ₁₋₄₂ 显示相等的亲合性,EM5 对于 A β ₄₂ 显示比对于 A β ₄₀ 更大的亲合性($p < 0.01$)(对于最近制备和聚集的 A β ₄₂ 分别为 13.7pM 和 15.5pM;对于最近制备和聚集的 A β ₄₀ 分别为 37.5pM 和 37.0pM)。

[0074] 实施例 3- 免疫转移分析

[0075] 通过免疫转移分析的方式研究 EM5 对 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 的特异性识别并与 EM2 和 EM3 多克隆抗体比较。为此,将 A β 肽(0.5 μ g/泳道)在 16% 的丙烯酰胺, tris-tricine-SDS 中进行 PAGE 电泳分析。使用包含 10% 甲醇的 3-环己基氨基-1-丙烷磺酸, pH 11 在 400mA 和 4°C 将所述肽通过电泳 1 小时转移到聚(1,2-二氟乙烯)膜(Immobilon-P, Millipore)上。将所述膜在 4°C 用包含 5% 的粉末状脱脂牛奶的 TBS-T 封闭 16 小时,接着在室温与 2 μ g/ml 的 IgGs EM2, EM3 或 EM5 一起温育 1 小时。将偶联于辣根过氧化物酶(Amersham)并稀释 1 : 2000 的山羊抗兔 IgG(EM2 和 EM3)或山羊抗小鼠 IgG(EM5)用作第二抗体。按照生产商的说明书通过化学发光(Amersham)的方式观察免疫转移。

[0076] 结果显示在图 2 中,其中可以观察到在免疫转移实验中,EM5 显示对于 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 肽的免疫反应性(确证通过 ELISA 获得的结果),而抗体 EM2 和 EM3 仅能分别识别肽 A β ₁₋₄₀ 或 A β ₁₋₄₂,如前所述[24]。这些结果支持这样的观念,即 EM5 单克隆抗体结合这两种肽共有的特异性线性表位,其在用 SDS 处理的样品中是保守的。总而言之,我们的结果显示 EM5 能够识别可溶形式,聚集形式和变性形式(在 SDS 中)的 A β 肽,其稍稍优先结合于 A β ₄₂,可能是由于增加肽的疏水性的结果。

[0077] 实施例 4 表位的定位

[0078] 对于由 EM5 抗体识别的确定表位的精确定位,分析抗体与一系列合成的 A β 肽的结合。肽 A β ₁₋₁₆, A β ₁₋₂₈ 和 A β ₂₅₋₃₅ 获自 Sigma(San Luis, MO);肽 A β ₁₋₄₂, A β ₁₋₄₂(E22Q), A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₀(E22G), A β ₁₋₄₀(E22Q), A β ₁₋₂₈(啮齿动物), A β ₁₋₂₈(E22Q), A β ₁₇₋₄₀, A β ₁₆₋₄₂ 和 A β ₂₅₋₃₅ 使用 N-t-丁氧基羰基方法在耶鲁大学 WM Keck 工厂合成;A β ₂₁₋₂₈, A β ₂₁₋₂₈(E22Q), A β ₃₇₋₄₁ 和 A β ₃₇₋₄₀ 使用一般 Fmoc 方法在肽合成单位(National Biotechnology Center, Madrid)合成。肽 A β ₃₇₋₄₂ 和 A β ₃₇₋₄₉ 的设计包括在氨基末端具有半胱氨酸残基的尾巴以进行偶联,其具有序列 CSGGSGGG(SEQ ID NO:4)。所有的肽通过高效液相色谱以反相方式进行纯化并且通过 MALDI-TOF 质谱分析法评估它们的纯度。

[0079] a) 抗体-捕获 ELISA

[0080] 为了进行测试,用在碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液 0.1M, pH9.6 中的 1 μ g/孔的相应的 A β 肽在 4 $^{\circ}$ C 下覆盖平底聚苯乙烯微量滴定板(Immulon 2, Dynex Technology Inc., Chantilly, VA)16 小时。在用包含 2% BSA 的 NaCl150mM, Tris 20mM, 0.05% 的吐温-20, pH7.4(TBST)封闭后,在 37 $^{\circ}$ C 将系列稀释的 EM5 抗体(从 20 到 0.02mg/ml 的 IgG 级分)温育 1 小时。接着在 37 $^{\circ}$ C 应用偶联于过氧化物酶(Sigma, San Luis, MO)并稀释 1:2000 的抗小鼠 IgG 达 30 分钟。用 TMB(BioRad, CA)来使反应显影,用 2M 硫酸终止并在 450nm 进行的量化。测定非特异性结合,略去第一抗体。

[0081] 将结果显示在图 3 中,其上部显示对应于吸收值的条形图,所述吸收值对应于用每种肽温育 20 μ g/ml 的抗体获得。EM5 显示与包含人 A β 的序列的残基 12-16 的任何肽的结合,并且不能识别缺乏该区域的肽。此外,当与野生型肽相比时,在该区域(A β ₁₋₄₂(E22Q), A β ₁₋₄₀(A21G), A β ₁₋₄₀(E22G), A β ₁₋₄₀(E22Q))外具有修饰的突变变体显示类似的结合,而显示在位点 5, 10 和 13 的氨基酸上的三种变化的 A β ₁₋₂₈(啮齿动物)肽不被 EM5 所识别。

[0082] b) 消化的和免疫沉淀的 β -淀粉状蛋白肽的质谱分析

[0083] 为了证实所述结果,进行另外的研究,其中通过用胰蛋白酶或 α -胰凝乳蛋白酶消化产生的衍生自 A β ₁₋₄₂ 的一组肽与用 EM5 抗体包被的磁性颗粒接触,进行下列步骤:

[0084] 为了消化肽,将包含 0.025 μ g 的酶的 0.5 μ l 的胰蛋白酶或 α -胰凝乳蛋白酶加入 10 μ l 的在包含 1 μ g 肽的碳酸氢铵 50mM 中的 β -淀粉状蛋白肽的等分试样中。在 37 $^{\circ}$ C 进行温育 2 小时。进行的消化在表 1 中示意性地显示。

[0085] 为了将 EM5 单克隆抗体固定在磁性颗粒上,将 5 μ l 的 EM5 的等分试样(1.1mg/ml)与用山羊抗-小鼠 IgG 包被的 50 μ l 的 Dynabeads M450 一起在室温温育 2 小时。用 PBS 将所述复合物洗涤 4 次,伴随双向搅拌(在转子中)。

[0086] 为了进行免疫沉淀,将 10 μ l 的用胰蛋白酶(或 α -胰凝乳蛋白酶)消化的 β -淀

粉状蛋白肽的等分试样与 50 μ l 的固定在磁性颗粒上的 EM5 一起在转子中在 37°C 温育 1 小时。在相同的转子中,用 PBS 将所述磁性-免疫沉淀复合物洗涤 4 次,随后将上清液吸去并丢弃。

[0087] 为了对消化的免疫沉淀的 β -淀粉状蛋白肽进行质谱分析,用 20 μ l 的 50% 乙腈 / 0.3% 三氟乙酸释放包含在磁性复合物中的免疫沉淀的肽。将 5 μ l 的该溶液混合以在 0.1% 三氟乙酸 / 乙腈 (2 : 1) 中的 5 μ l 的饱和 α -氰基-4-羟基肉桂酸。接着将一体积的 0.5 μ l 的该溶液置于削尖的不锈钢的探针中并将其在室温进行干燥。将样品在来自 Bruker 的 MALDI-TOF 质谱分析仪 Reflex II 上进行测量,其装备有具有可见光和 N_2 激光 (337nm) 的离子源。将质谱以正向线性方式,以 28.5kV 和 1.5kV 的加速电压记录在线性检测器中,聚集低于辐照度阈值的 200 激光单脉冲光谱。只考虑从 3-5 个选择的入射点发射,高强度的具有良好的分辨率的质量信号。使用标准的肽的混合物 [血管紧张素 II (1047.2), 18-39 个片段的促肾上腺皮质激素 2466.7] 和胰岛素 (5734.6) ;Sigma] 在外部校准所有的 MALDI 光谱。

[0088] 将分析的肽的特征,以及获得的数据总结在下面的表 1 中:

[0089] 表 1 对于通过消化 β -淀粉状蛋白肽获得的片度的 MALDI-TOF 质谱分析数据

[0090]

片段 N ^o	包含的氨基酸	所用的酶	实验统计 (m/z)	预期值 (m/z)
1	1-16	胰蛋白酶	1956.57	1955.0
2	1-17	α -胰凝乳蛋白酶	2067.37	2068.2
3	5-17	α -胰凝乳蛋白酶	1606.62	1605.7
4	6-16	胰蛋白酶	1337.12	1336.4
5	11-17	α -胰凝乳蛋白酶	888.66	890.0

[0091] 将这些肽 (1-5) 的每种的序列和未经消化的肽 (6) 的序列显示在图 4 中,其中按照免疫沉淀的物质的 MALDI-TOF 质谱分析的结果似乎对应于由 EM5 抗体识别的表位的区域以阴影显示。

[0092] 如可以在图 4 中观察到的,通过 MALDI-TOF 质谱对免疫沉淀物质的分析显示 EM5 能够从消化混合物中提取包含残基 11-16 的肽的每个片段 (阴影区)。在该区域外部的肽的片段没有从溶液中回收。这些结果证实通过 ELISA 和免疫转移分析获得的数据。

[0093] 结论是,抗体与一系列 A β 肽的不同反应性显示 EM5 识别 A β 肽的残基 11-16。在它们之中,残基 12-16 的沉淀是基础,如通过在啮齿动物 A β ₁₋₂₈ 肽 (1-28R) 中的残基 12 的突变抑制抗体对其的识别的事实所证实的;对于此部分,不能排除残基 11(E) 在表位的构象中的参与,尽管获得的数据没有充分的证实它。

[0094] 实施例 5 免疫组织化学-抗体的组织反应性

[0095] 为了证实 EM5 抗体对于显示与扩散斑相对的作为阿尔茨海默病的特征的沉积物 (神经炎性斑和血管沉积物) 的有效性,使用抗体 EM2 (针对 A β 40 肽的羧基末端的多克隆

抗体), EM3(针对 A β 42 肽的羧基末端的多克隆抗体) 和 EM5(已经证实对于 A β 肽的残基 12-16 具有特异性的单克隆抗体) 进行对受阿尔茨海默病影响的脑组织的切片的免疫染色。EM2 和 EM3 都曾用在早期的研究中 [24]。

[0096] 处理脑组织并选择区域用于免疫组织化学

[0097] 脑组织由 Neurological Investigations, Madrid 的 Tissue Bank 供应。将患有充分确定的 AD 的 6 个受试者, 3 男和 3 女包括在该研究中。他们的年龄范围在 68-75 岁范围内。在所有的情形中, AD 的诊断基于 CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) 的临床-病理指导 [10]。没有一个患者曾经有其它相关的神经病理发现, 例如帕金森病或明显的血管改变。按照 Brain Bank 的切割, 固定和包埋说明书处理所有的脑用于组织学检查。死亡后的时间在 10 到 18 个小时之间。在解剖一半脑 (通过大脑半球, 小脑和脑干的中矢形切开术获得) 后, 立即将其固定在用磷酸盐缓冲的 4% 甲醛中。在固定 3-4 周后, 从明显涉及 AD 的所有的 皮质和皮质下区域获得组织块, 将其在乙醇中逐渐脱水后包埋在石蜡中并用二甲苯净化组织。在所有的情形中, 从最初的石蜡块获得 5 μ m 的对应于顶枕侧皮质, 颞侧皮质 (后两个区域由 CERAD 指导 [10] 推荐), 海马, 尾状核-豆状核 (有尾核的头部), 和大脑半球的皮质的组织切片用于免疫组织化学检查。作为非特异性的淀粉状蛋白染色的对照, 在对那些被处理的连续切片进行改进的六亚甲基四胺银染色以用于淀粉状蛋白免疫组织化学。

[0098] 抗体和免疫染色方法

[0099] 所用的一级抗体是 EM2, EM3 和 EM5。EM2 和 EM3 都曾用在早期的研究中 [24]。将切片与一级抗体一起在室温温育 30 分钟。使用氮蓝四唑 (NBT) 作为色素原, 用具有碱性磷酸酶 (APh) 的 Envision 系统 (Dako Laboratories) 检测所述多克隆抗体, 使用二氨基联苯胺 (DAB) 作为色素原, 用前述系统或具有辣根过氧化物酶 (HRP) 的 Envision 系统 (Dako Laboratories) 检测 EM5。在共区域化技术中, 总是用具有 APh 的 Envision 系统 (使用 NBT 作为色素原) 检测多克隆抗体, 而用具有 HRP 的 Envision 系统 (使用 DAB 作为色素原) 检测 EM5。

[0100] 双重和单一免疫染色

[0101] 为了确定每对抗体的共区域化程度以及它们每种的最佳工作稀释度的目的, 应用双重免疫染色技术, 使用 EM5 作为第一级抗体, 使用 EM2 或 EM3 作为第二级抗体作为开始的操作。在研究的这个阶段, 局限于来自两个病例的顶枕皮质的组织切片, 其证实了应用 EM5 作为第一级抗体排除了其它两种抗体的掩蔽作用, 当它们在双重免疫染色技术的过程中被用作第一抗体时。在来自两个选定的石蜡块的系列切片中, 增加稀释度的 (1 : 50, 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000 和 1 : 2000) 的 EM5 与减少稀释度的 (1 : 2000, 1 : 1000, 1 : 500, 1 : 100 和 1 : 50) 的 EM2 或 EM3 共同定位。因为发现 EM2 抗体在较高程度上与 EM5 共区域化, 研究的剩下部分的目标是证实由 EM5 和 EM3 展示的反应性的差异模式。为此目的, 随后将在所有的病例中, 将所有选定的区域的切片中的双重染色局限于使用 EM5 (在 1 : 1000 的稀释度) 作为第一级抗体和 EM3 (在 1 : 1000 的稀释度) 作为第二级抗体。此外, 为了更精确的观察在相同的组织中每种抗体显示的反应性的模式, 在来自使用 EM5, EM2 或 EM3 作为一级抗体的每个块的系列切片中进行单一免疫染色。因为本研究的该部分的主要目的是定性地比较免疫反应性的不同模式, 而不是在抗体之间的定量差异, 因

此染色的结果没有进行量化。

[0102] 结果

[0103] 可以在图 5 中观察来自所述病例其中之一的结果,以以前提及的分布提出,即:

[0104] -(A) 和 (B):来自使用 NBT 作为色素原,用 EM5 (A) 和 EM3 (B) 作为一级抗体对枕部皮质的相同区域进行免疫染色的连续系列切片。标记血管 (V) 以有利于斑块的定位,而 EM3 (B) 揭示了扩散斑 (DP) 和神经炎性斑 (NP),以及在血管 (V) 中的沉积物,EM5 (A) 对血管和一些神经炎性斑给出了更强烈的染色,但是扩散斑除外。

[0105] -(C) 使用 EM3 (使用 NBT- 蓝色 - 作为色素原) 和 EM5 (使用 DAB- 棕色 - 作为色素原) 作为一级抗体的双重免疫染色技术的高度放大的显微照片。观察到神经炎性斑和血管壁的双重免疫染色。

[0106] -(D) 和 (E) 用 EM5 (D) 或用 EM2 (E) 进行免疫染色的枕部皮质的相同区域的连续系列切片。再一次对血管 (V) 进行标记以辅助鉴定所述斑块。可以观察到血管和神经炎性斑与两种抗体都反应。与 EM5 比较,EM2 所染色的神经炎性斑更少,并且扩散斑不与它们之中的任一种反应。

[0107] -(F) 在来自枕部皮质的组织的相同切片中,使用 EM2 (使用 NBT- 蓝色 - 作为色素原) 和 EM5 (使用 DAB- 棕色 - 作为色素原) 作为一级抗体的双重免疫染色技术的高度放大的显微照片。在血管壁和神经炎性斑中观察到两种抗体的反应性的精确共区域化。

[0108] 除了一种以外,所有的情形都显示显著的柔脑膜和皮质内血管淀粉状蛋白沉积物与测试的所有抗体反应。在所有的阳性情形中,与 EM3 (图 (5B)) 相比,血管淀粉状蛋白沉积物与 EM2 (图 (5E)) 和 EM5 (图 (5A) 和图 (5D)) 的免疫反应性更显著 (范围更广和更强烈)。在该水平上,EM2 和 EM5 精确地共区域化 (图 (5F))。如预期,新皮质区域和海马显示高密度的扩散和神经炎性斑,而小脑皮质和纹状体仅显示扩散的淀粉状蛋白沉积物。用 EM3 抗体温育的切片显示与扩散和神经炎性斑的反应性 (图 (5B))。当它们与用改进的六亚甲基四胺银方法染色的连续切片进行比较时,显示在每个切片中存在 EM3 染色的所有的斑块。此外,EM3 抗体染色一些神经元体。EM2 和 EM5 对不成熟的神经炎性斑 (无核) 和成熟的神经炎性斑 (有核) 进行染色,又具有高度的共区域化 (图 (5F))。EM2 不与任何扩散斑反应,其既不在皮质区也不在皮质下区 (图 (3E))。用 EM5 和 EM3 进行的双重免疫染色揭示了在一些神经炎性斑,而不是在扩散斑中具有两种抗体的共区域化 (图 (5C)),但是当将 EM5 以非常低的稀释度 (1 : 50) 温育时,在该水平上发现一些共区域化。仅仅在一种情形中,其在纹状体的切片中显示丰富的 EM3- 阳性的扩散斑,它们中的一些被工作稀释度 (1 : 500) 的 EM5 非常轻微地染色。这种相同的情形没有显示扩散斑的任何反应性,如 EM5 在小脑皮质中。在所有其它的情形中,纹状体和小脑的切片显示不同量的扩散斑,它们都不与 EM5 抗体反应。无论 EM2 还是 EM5 似乎都不对所有存在的神经炎性斑进行染色 (见图 (5A, D))。然而,如已经在血管淀粉状蛋白沉积物的免疫反应性中观察到的,与 EM2 或 EM5 反应的神经炎性斑被 EM3 更为强烈地染色。除了在一种情形中血管对所有的抗体显示阴性和在这种相同的脑中的纹状体的一些扩散斑显示弱阳性外,可以认为所有的情形显示对于每种测试抗体的类似的染色模式。

[0109] 因此,与在扩散斑中观察到的染色的更均一的模式相反,该组抗体检测到在神经炎性斑中的异质性,这证实了对于在扩散斑的发展过程中对实际阶段的相关指示和它们向

神经炎性斑的转化。EM5 抗体对所有的结构（神经炎性斑和血管壁）给出了强烈的染色，其被 EM2 染色并且在不同程度上被 EM3 染色。发现神经炎性斑的亚型具有与血管淀粉状蛋白相同的染色模式，伴随对 EM2 和 EM5 的反应性的高度共区域化。本发明显示 EM5 应该与包含 $A\beta_{11-40}$ 或 $A\beta_{11-42}$ 的所有的结构反应。事实上，本文给出的 ELISA 结果显示 EM5 抗体识别最近溶解和聚集形式的 $A\beta$ 肽。然而，在组织切片中，我们发现与用多克隆抗体相比，EM5 使在神经炎性斑之间的染色出现更大的多样性，以及对 EM5 和 EM2 ($A\beta_{C40}$) 的强反应性的高度共区域化。在这些阳性斑块中的相对更强的染色可以揭示这样的神经炎性斑的亚型（subgroup），其具有特别高含量的长 $A\beta$ 肽，或选择性高含量的 $A\beta_{C40}$ ，或甚至更接近在显示 $A\beta_{11-40}$ 和 $A\beta_{11-42}$ 的共沉积的结构（血管或斑块）中由 EM5 识别的表位。本发明的抗体似乎检测以前由 Parvathy 等 [22] 检测的神经炎性斑 $A\beta_{C40}(+)$ 的相同亚型。具有特别高含量的长 $A\beta$ 肽的这种神经炎性斑的亚型可以代表在 AD 的淀粉状蛋白损伤进展中的重要转折点，其可以由本发明的单克隆抗体检测到。因此，使用 EM5 可容许确定组成疾病进展阶段的具体标记的斑块的亚型。

[0110] 实施例 6- 抗体与尿中 β -淀粉状蛋白肽形式反应的能力

[0111] 为了证实 EM5 抗体检测生物流体中的 β -淀粉状蛋白肽的形式存在的有效性，进行了测试，所述测试在来自健康患者的尿样品检测它们，在获得它们后，向其中加入对应于不同长度的 β -淀粉状蛋白肽的形式的合成肽的混合物。为此，将结合磁性颗粒的单克隆抗体加入尿样品中并使用 MALDI-TOF 质谱分析法来检测结合的肽。下面给出所用方法的细节。

[0112] 抗体与磁的结合

[0113] 按照 Fuentes 等 [26] 所述的方法制备与 EM5 抗体偶联的磁性颗粒。基于免疫球蛋白的糖苷残基的轻微氧化来产生醛基，其与磁性颗粒反应，在所述磁性颗粒的表面上通过用乙二胺的修饰产生氨基基团。简而言之，通过与高碘酸钠 10mM 温育 2 小时来诱导 EM5 抗体的氧化，其后在 4°C 在蒸馏水中透析氧化的抗体。通过在 10mg/ml 的浓度与 1M 乙二胺 pH 4.75 一起温育 90 分钟来修饰在其表面上具有羧基基团的 EM/100-30 磁性颗粒 (Merck Co, France)，其后将固体 EDCI (1-乙基-3-(3'-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐) 加入到最终浓度为 10mM，并反应 90 分钟，之后用蒸馏水大量洗涤。

[0114] 在 4°C 将溶解在磷酸钠缓冲液 150mM, pH7.5 中的 10mg 的氧化的 EM5 抗体加入 2ml 的在其表面上具有氨基基团的磁性颗粒 (10mg/ml) 并温育过夜后，将抗体固定在磁性颗粒表面上。通过在 pH8.5 和 4°C，加入硼氢化钠直到达到 1mg/ml 的浓度来还原席夫碱类形成的和未反应的醛基。用大量的蒸馏水来洗涤制剂。使用 Bradford's 方法 [27]，在固定之前和之后，量化蛋白质浓度中的不同来确定固定的抗体的量。

[0115] 检测溶液中的 β -淀粉状蛋白肽

[0116] 在证实其结合在生物流体如尿的样品中存在的 β -淀粉状蛋白肽的同种型的有效性之前，我们测试本发明的抗体结合溶液中的 β -淀粉状蛋白肽的形式的能力，和偶联于磁性颗粒的抗体是否可能从它们存在的溶液中提取 β -淀粉状蛋白肽的形式，从而进行它们随后的鉴定和 / 或量化。因此，将溶解在蒸馏水中对应于 β -淀粉状蛋白肽 $A\beta_{12-29}$ ， $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 的形式的合成肽在蒸馏水中混合在一起以得到终浓度为 0.44 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 $A\beta_{12-29}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 和 0.11 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 $A\beta_{1-40}$ 的混合物。将 4 μl 的肽的这种混合物加入

981 μ l 的水中。

[0117] 接下来,将存在于溶液中的 β -淀粉状蛋白肽在水中的形式使用偶联于磁性颗粒的本发明的抗体进行分离。在图 6 中显示从所述溶液中分离的肽的混合物的质谱分析,其中部分 A 对应于没有用抗体预先处理的溶液的分析 (Ctrl),部分 B 对应于使用结合于磁性颗粒的抗体 (EM5+PM)。如可以观察到的,抗体能够结合溶液中的 β -淀粉状蛋白肽的形式并能够与它们形成复合物,从而使得它们可以从所述溶液中分离出来。

[0118] 尿样品的制备

[0119] 在分离的时间,从健康个体收集 10ml 的尿样品,并在室温以 3500rpm 离心 5 分钟。以在 PBS 缓冲液中的 1M NaOH 将尿中和到 pH7.0。

[0120] 将对应于 β -淀粉状蛋白肽 $A\beta_{12-28}$, $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 的形式的合成肽在蒸馏水中混合在一起以得到终浓度为 0.44 μ g/ μ l 的 $A\beta_{12-28}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 和 0.11 μ g/ μ l 的 $A\beta_{1-40}$ 的混合物。将 4 μ l 的肽的这种混合物加入 981 μ l 的尿中。

[0121] 在 $A\beta_{12-18}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 的情形中, β -淀粉状蛋白肽的形式在尿中的最终浓度是 1.76 μ g/ml,在 $A\beta_{1-40}$ 的情形中,是 0.44 μ g/ml

[0122] 免疫沉淀

[0123] 将 15 μ l 的包被以 EM5 单克隆抗体的磁性颗粒 (在 PBS 缓冲液中以 1 : 4 稀释) 在 37 $^{\circ}$ C 与上述的 981 μ l 的尿样品温育 1 小时,所述尿样品包含三种 β -淀粉状蛋白肽 ($A\beta_{12-18}$, $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$)。

[0124] 在温育后,将试管置于磁性颗粒的磁化分离器中并使用移液管小心提取尿。

[0125] 用 H_2O 洗涤所述磁性颗粒三次,所述磁性颗粒具有结合于其上的肽,通过分离器的磁场的作用保留。

[0126] 用 12 μ l 的包含 0.1% (v/v) 三氟乙酸 (TFA) 的在 30% (v/v) 水性乙腈中的 α -氰基-4-羟基肉桂酸的基质的溶液从磁性颗粒中分离结合于它们的肽并通过 MALDI-TOF 质谱分析法进行分析。

[0127] 通过质谱分析法检测免疫沉淀的肽

[0128] 将 1.5 μ l 的从 α -氰基-4-羟基肉桂酸的基质中的免疫沉淀获得的样品混合物置于能容纳 100 个样品的不锈钢探针中,并在室温干燥 5 分钟。

[0129] 在来自 PE Biosystems 的 MALDI-TOF 质谱分析 Voyager DE-PRO 的工作站中,使用仪器的默认配置测量样品。将质谱记录在正向反应器模块中,加速电压 20kV,收集器电压 75%,0.002%的导线和 150 纳秒的延滞时间,聚集在辐照度阈值以下的 200 光谱的单个激光发射。只考虑具有良好分辨率,高强度的,来自 3-5 个选定的入射点的质量信号。使用标准混合物 2 在外部校准仪器,所述标准混合物 2 由 Applied Biosystems (Tres Cantos, Madrid, Spain) 供应,由血管紧张素 (1297Da), ACTH1-17 (2094Da), ACTH 18-39 (2466Da), ACTH7-38 (3660Da) 和牛胰岛素 (2867Da) 组成。

[0130] 图 7 显示用代表其它的一个样品获得的图。可以观察到对应于加入尿样品的肽的峰,其证实了本发明的抗体结合尿样品中的肽的能力。如已经用生物流体的样品进行的分析,还可观察对应于其它的分子的其它的峰,所述其它分子天然存在于样品中,并也结合于偶联于磁性颗粒的抗体。

[0131] 杂交瘤的保藏

[0132] 将产生 EM5 抗体的杂交瘤保藏在 European Collection of Cell Cultures (ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire, United Kingdom。保藏日期和登记号如下：

[0133]	<u>杂交瘤的名称</u>	<u>保藏日期</u>	<u>登记号</u>
[0134]	EM5 克隆 A	2006 年 1 月 3 日	06030101

[0135] 如以前记载的,通过下列两种类型的细胞的融合获得这些杂交瘤细胞:a)BALB/c 小鼠脾淋巴细胞,其在用作为免疫原并与 KLH(匙孔血蓝蛋白)偶联的 β -淀粉状蛋白肽形式免疫小鼠后获得,所述 β -淀粉状蛋白肽命名为 $A\beta_{1-40}$ 并包含所述肽的氨基酸 1-40;b) 小鼠骨髓瘤细胞系 P3/X63-Ag653 的细胞,其作为融合的永生部分起作用。获得了各种克隆,从其中我们选择了命名为“EM5 克隆 A”的克隆,其产生命名为“EM5”的单克隆抗体,一种能够特异性识别用于免疫的抗原的 IgG1 型抗体,所述抗原是肽 $A\beta_{1-40}$,如通过 ELISA 型的抗体捕获测试所证实的。将该克隆在 37℃和在 5% CO_2 气氛,在其中 95%的细胞生长在混悬液中和余下的 5%附着在培养容器上的条件下,培养在具有 10%胎牛血清,10% DMSO,谷氨酰胺 2mM 和丙酮酸钠 1mM 的 RPMI1640 培养基中。通过有限稀释的方式将细胞克隆 2 次,随后取 4×10^6 细胞的等分试样并将其置于小瓶中。在控制无细菌,无支原体和无真菌后,将这些小瓶中的一些送到 European Collection of Cell Cultures (ECACC),要求允许它们的保藏。

[0136] 1. Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen S. and Aronson MK. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* 13:1-11 (1992).

[0137] 2. Iwatsubo T, Mann DAM, Odaka A, Suzuki N and Ihara Y. Amyloid β protein ($A\beta$) deposition: $A\beta_{42}$ (43) precedes $A\beta_{40}$ in Down's syndrome. *Ann Neurol* 37:294-299 (1995).

[0138] 3. Fukumoto H, Asami-Okada A, Suzuki N, Shimada H, Ihara Y and Iwatsubo T. Amyloid β protein deposition in normal aging has the same characteristics as that in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 148:259-265 (1996).

[0139] 4. Giaccone G, Tagliavini F, Linoli G, Bouras C, Frigerio L, Frangione B and Bugiani O. Down syndrome patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci Lett* 97:232-238 (1989).

[0140] 5. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572-580 (1991).

[0141] 6. Masliah E, Terry RD, Mallory M, Alford M and Ganssen LA. Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer Disease. *Am J Pathol* 137:1293-97 (1990).

[0142] 7. Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:321-339 (1997).

[0143] 8. Braak H and Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related

changes. *Acta Neuropathologica* (Berl) 82 :239-259 (1991).

[0144] 9. Thal DR, Rüb U, Schultz Ch, Sassin I, Ghebremedhin S, Del Tredici K, Braak E and Braak H. Sequence of A β -protein deposition in the human medial temporal lobe. *J Neuropathol Exp Neurol* 59(8) :733-748 (2000).

[0145] 10. Mirra, SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G and Berg L. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41 :479-486 (1991).

[0146] 11. Selkoe DJ. Alzheimer's disease : genotypes, phenotype and treatments. *Science* 275(5300) :630-1 (1997).

[0147] 12. Hardy J, and Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease : progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297 :353-356 (2002).

[0148] 13. Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberberg I and Schenk DB. Characterization of β -amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J. Neurochem* 61 :1965-1968 (1993).

[0149] 14. Iwatsubo T, Mann DAM, Odaka A, Suzuki N and Ihara Y. Amyloid β protein (A β) deposition; A β 42(43) precedes A β 40 in Down's syndrome. *Ann. Neurol* 37 :294-299 (1995).

[0150] 15. Iwatsubo T, Saido TC, Mann DMA, Lee V M-Y and Trojanowski JQ. Full-length amyloid- β (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid- β 42(43) deposit in diffuse, aqueous. *Am J Pathol* 149 :1823-1830 (1996).

[0151] 16. Higgins L, Murphy Jr GM, Fomo LS, Catalano R and Cordell B. P3 β -amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* 149 :585-596 (1996).

[0152] 17. Gowing E, Rober AE, Woods AS, Cotter RJ, Chaney M, Little SP and Ball MJ. Chemical characterization of A β 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 269 :10987-10990 (1994).

[0153] 18. Kida E, Wisniewski KE and Wisniewski HM. Early amyloid- β deposits show different immunoreactivity to the amino- and carboxy-terminal regions of β -peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. *Neurosci Lett* 193 :105-108 (1995).

[0154] 19. Lalowski M, Golabek A, Lemere A, Selkoe DJ, Wisniewski HM, Beavis RC, Frangione B and Wisniewski T. The " non-amyloidogenic " p3 fragment (amyloid β 17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid. *J Biol Chem* 271 :33623-33631 (1994).

[0155] 20. Saido TC, Iwatsubo T, Mann DMA, Shimada H, Ihara Y and Kawashima S. Differential deposition of distinct β -amyloid peptide species, A β N3 (peptide) in senile plaques. *Neuron*, 14 :457-466 (1995).

- [0156] 21. Tekirian TL, Saido TC, Markesherry WR, Russell MJ, Wekstein DR, Patel E and Geddes JW. N-terminal heterogeneity of parenchymal and cerebrovascular A β deposits. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:76-94(1998).
- [0157] 22. Parvathy S, Davis P, Haroutunian V, Purohit DP, Davis KL, Mohs RC, Park H, Moran TM, Chan JY and Buxbaum JD. Correlation between A β x-40-, A β x-42-, and A β x-43-containing amyloid plaques and cognitive decline. *Arch Neurol* 58: 2025-2032(2001).
- [0158] 23. Lamer AJ. Hypothesis: amyloid β -peptides truncated at the N-terminus contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 20: 65-69(1999).
- [0159] 24. Jimenez-Huete A, Alfonso P, Soto C, Alvar JP, Rabano A, Ghiso J, Frangione B and Mendez E. Antibodies directed to the carboxyl terminus of amyloid β -peptide recognize sequence epitopes and distinct immunoreactive deposits in Alzheimer's disease brain. *Alzheimer's Reports* 1:41-48(1998).
- [0160] 25. Campbell A. Monoclonal antibody technology In: 'Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology' (Eds: Burdon RH, Knippenberg PH) Elsevier, Amsterdam, p. 120-134(1984).
- [0161] 26. Fuentes M, Mateo C, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies. *Biosensors and Bioelectronics* 20:1370-1387. (2005)
- [0162] 27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:278-254. (1976)
- [0163] 28. Mayeux R, Ong LS, Tang M-X, Manly J, Stem Y, Schupf N, Mehta PD. Plasma A β 40 and A β 42 and Alzheimer disease. Relation to age, mortality and risk. *Neurology* 61:1185-1190. (2003).
- [0164] 29. Vanderstichele H, van Kerschaver E, Hesse C, Davidsson P, . Buyse M, Andreasen N, Minthon L, Tallin A, Blennow K, Vanmechelen E. Standardization of measurement of beta-amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid* 7: 245-258. (2000).
- [0165] 30. Ghiso J, Calero M, Matsubara E, Govemale S, Chuba J, Beavis R, Wisniewski T, Frangione B. Alzheimer's soluble amyloid beta is a normal component of human urine. *FEBS Lett* 408:105-108(1997).

序列表

<110> 科学研究高等机关

<120> 用单克隆抗体体外诊断阿尔茨海默病的方法

<130>PCT-258

<160>4

<210>1

<211>10

<212> 肽

<213> 人工的

<310>US4666829

<311>15. 05. 85

<312>19. 05. 87

<400>

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr

<210>2

<211>17

<212> 肽

<213> 人工的

<220>

<222>1-17

<223> β -淀粉状蛋白肽

<223>6E10, SV17-6E10

<310>W0 90/12871

<311>13. 04. 90

<312>01. 11. 90

<400>

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

<210>3

<211>5

<212> 肽

<213> 人

<220>

<222>12-16

<223> 在 β -淀粉状蛋白肽中由 EM5 识别的序列

<400>

Val His His Gln Lys

<210>4

<211>8

<212> 肽

<213> 人工的

<220>

<223> 用于设计 A β 37-42yA β 37-49 的氨基末端的偶联尾部

<400>

Cys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly

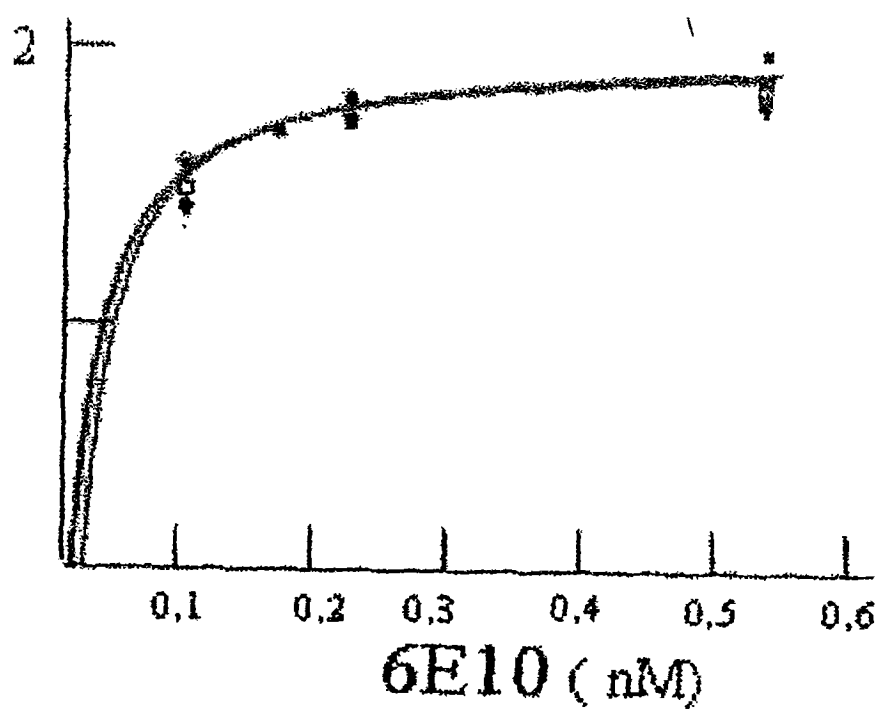
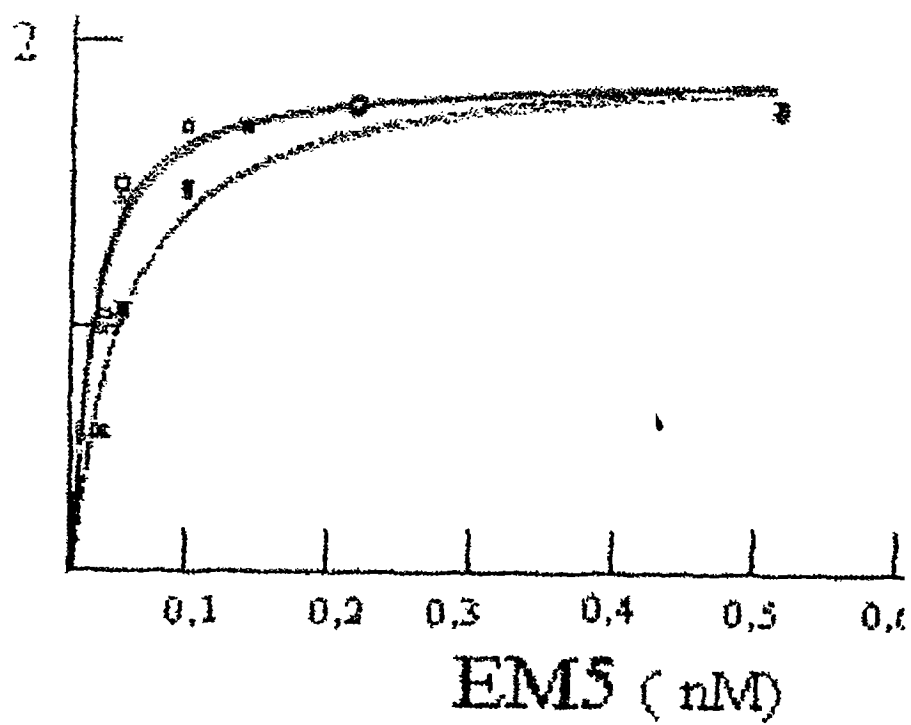


图 1

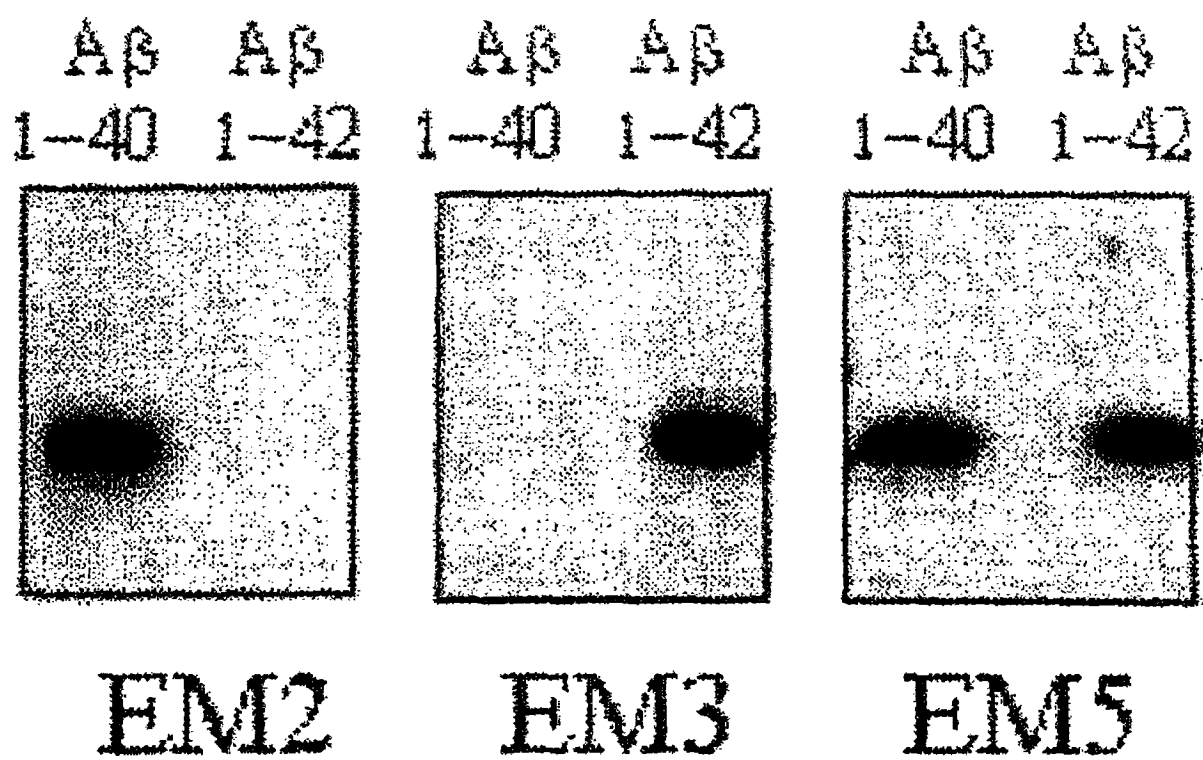


图 2

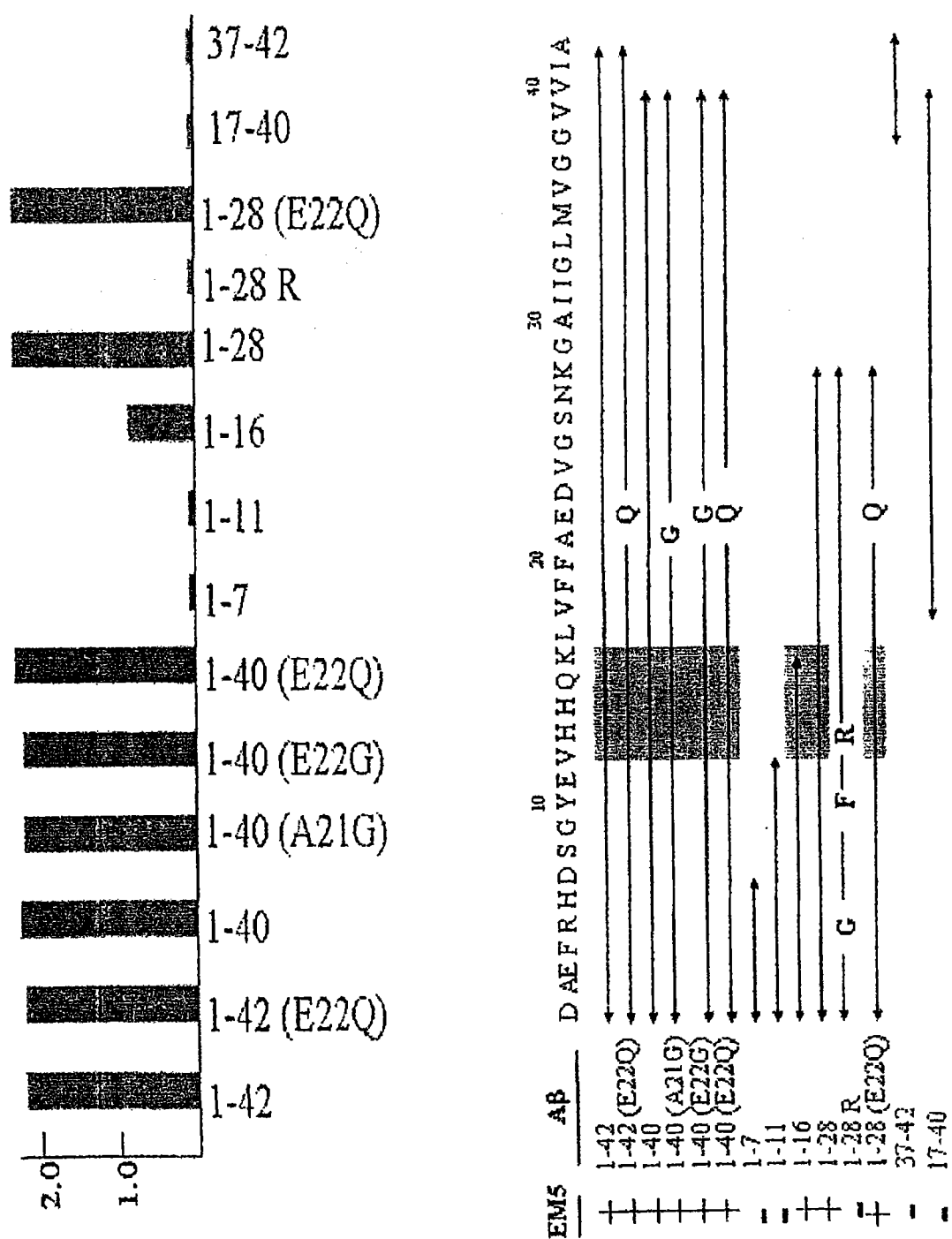


图 3

1	DAEFRHDSGY	EVHHOK	
2	DAEFRHDSGY	EVHHOK	L
3		RHDSGYEVHHOK	L
4		HDSGYEVHHOK	
5		EVHHOK	L
6	DAEFRHDSGY	EVHHOK	L

10 20 30 40

VFFAEDVGSNKGAIIGLMVGVVIA

图 4

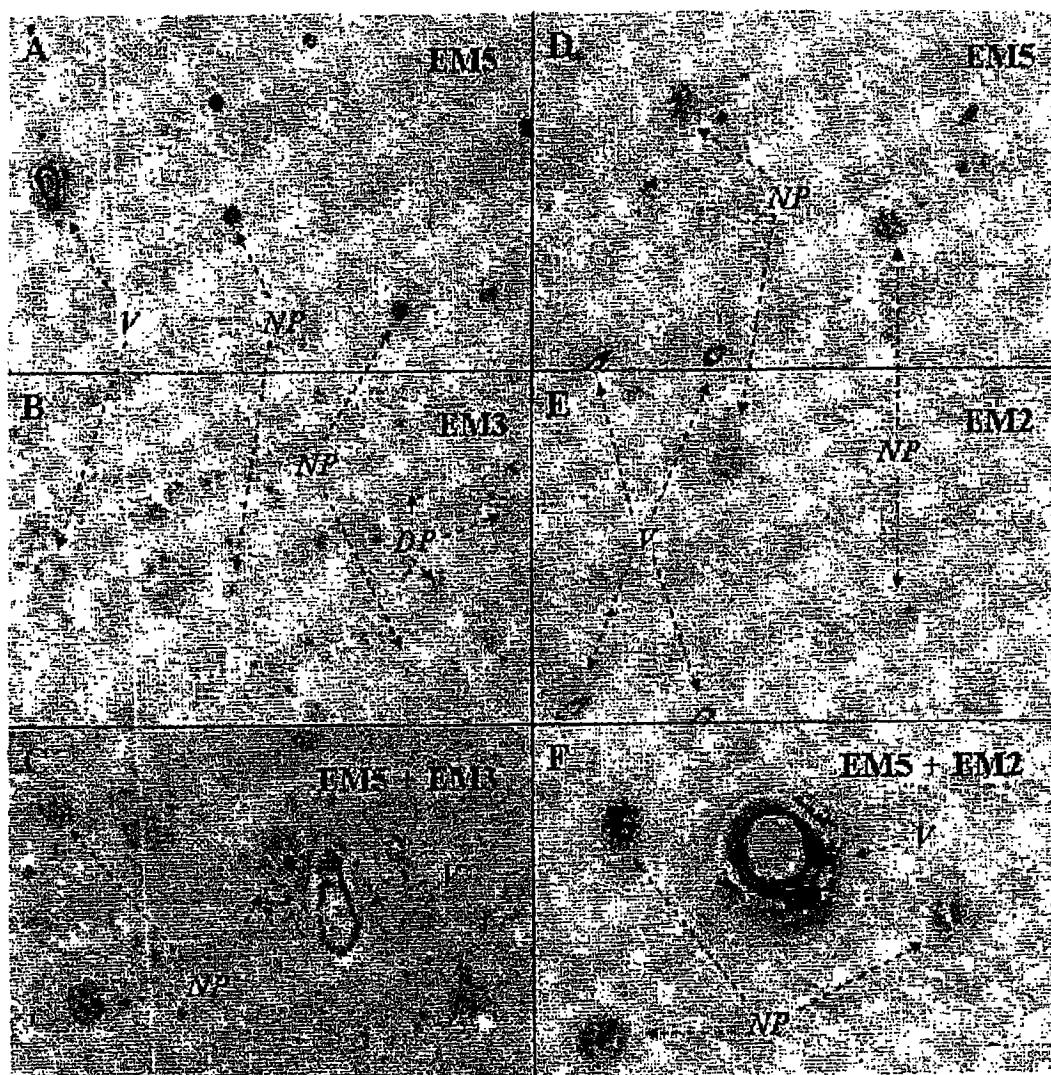


图 5

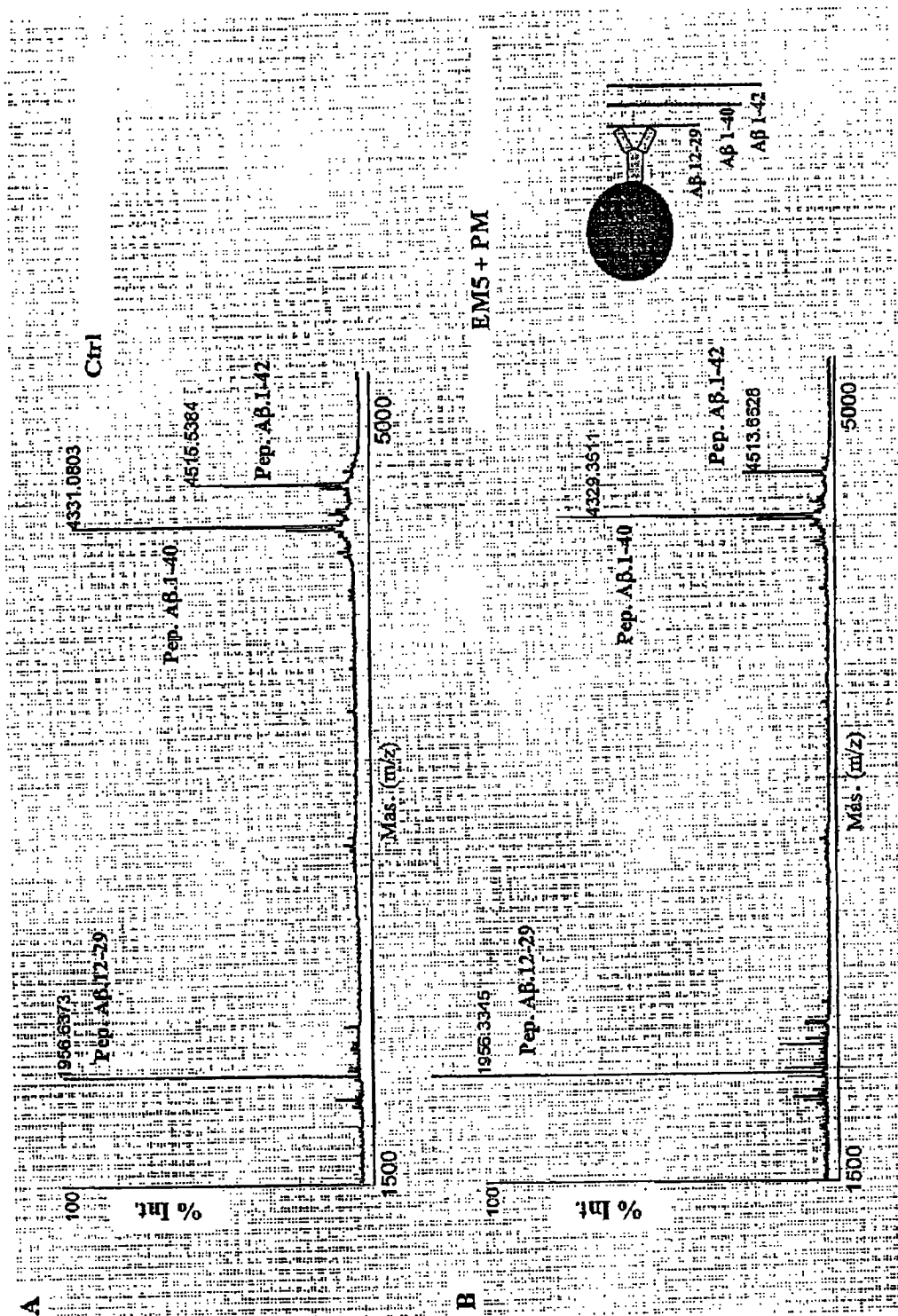


图 6

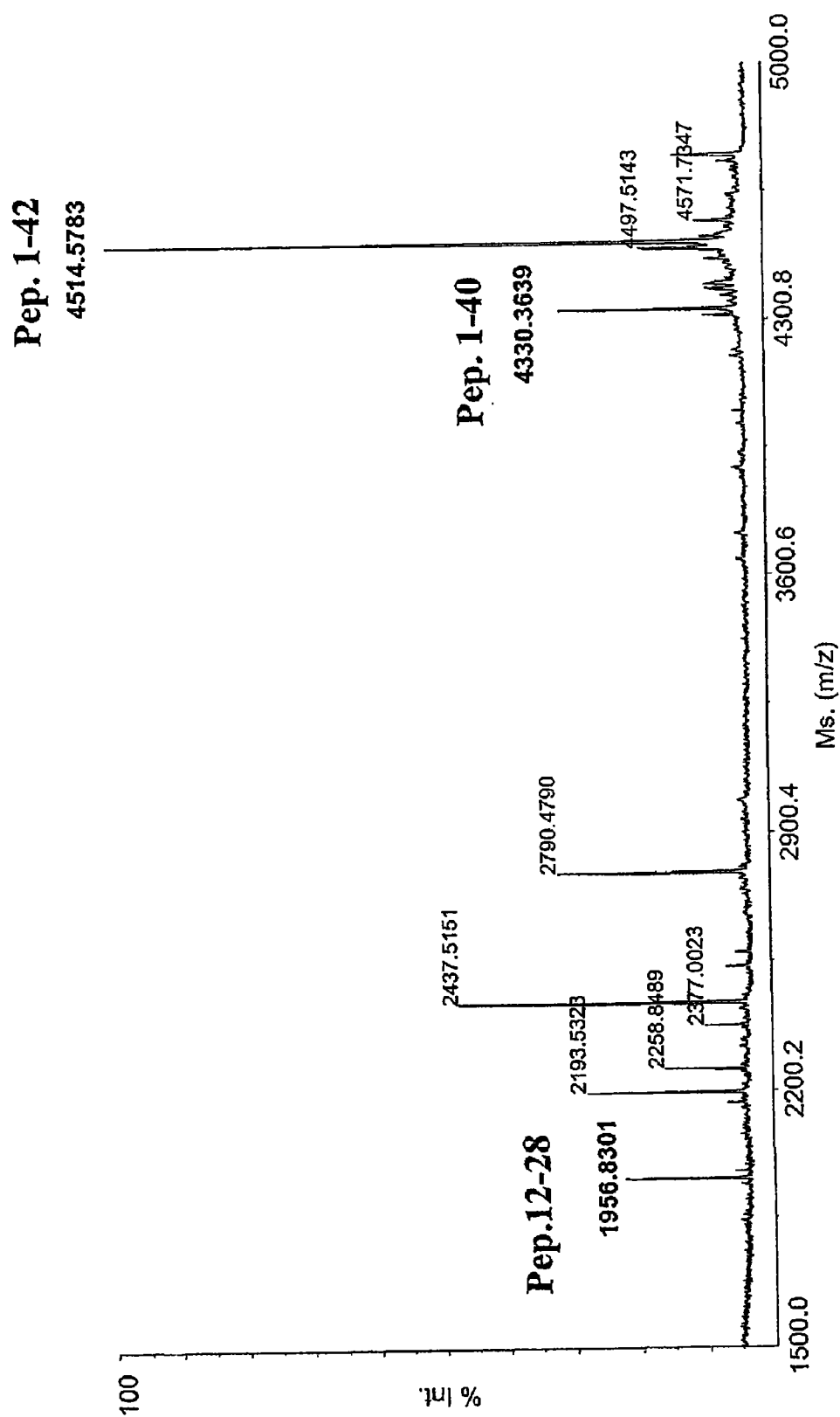


图 7

专利名称(译)	用单克隆抗体体外诊断阿尔茨海默病的方法		
公开(公告)号	CN101137670B	公开(公告)日	2012-08-08
申请号	CN200680007651.7	申请日	2006-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	科学研究高等机关		
申请(专利权)人(译)	科学研究高等机关		
当前申请(专利权)人(译)	科学研究高等机关		
[标]发明人	恩里克·门德斯		
发明人	恩里克·门德斯		
IPC分类号	C07K16/18 C07K7/06 C12N5/18 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/4711 C07K2317/34 G01N33/6896 C07K2317/92 C07K16/18 G01N2800/2821 A61P25/28 C07K7/06 G01N33/53		
代理人(译)	吴小明		
审查员(译)	刘睿		
优先权	2005000550 2005-03-09 ES		
其他公开文献	CN101137670A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

通过单克隆抗体的方式体外诊断阿尔茨海默病的方法。所述抗体能够结合于β-淀粉状蛋白肽的至少氨基酸12-16，特异性检测作为阿尔茨海默病的特征的神经炎性斑，而不检测非所述疾病的指示物的扩散斑。在所述神经炎性斑中，单克隆抗体使检测在沉积的各种β-淀粉状蛋白肽的各种同种型的组成方面不同的亚型成为可能，其与疾病的进展阶段相关。此外，抗体能够结合在生物流体如尿中的β-淀粉状蛋白肽的同种型。因此，可以将本发明的单克隆抗体，产生它的细胞系和包含它的组合物用于体外诊断阿尔茨海默病和确定疾病进展的阶段。

片段 N ⁰	包含的氨基酸	所用的酶	实验统计 (m/z)	预期值 (m/z)
1	1-16	胰蛋白酶	1956.57	1955.0
2	1-17	α-胰凝乳蛋白酶	2067.37	2068.2
3	5-17	α-胰凝乳蛋白酶	1606.62	1605.7
4	6-16	胰蛋白酶	1337.12	1336.4
5	11-17	α-胰凝乳蛋白酶	888.66	890.0