

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/68

C12N 5/20

C07K 16/18



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03823116.6

[43] 公开日 2005 年 10 月 19 日

[11] 公开号 CN 1685236A

[22] 申请日 2003.9.9 [21] 申请号 03823116.6

[30] 优先权

[32] 2002.9.27 [33] EP [31] PCT/EP02/11062

[86] 国际申请 PCT/EP2003/010092 2003.9.9

[87] 国际公布 WO2004/029630 英 2004.4.8

[85] 进入国家阶段日期 2005.3.28

[71] 申请人 詹森药业有限公司

地址 比利时比尔斯

[72] 发明人 M·H·默肯

M·M·P·P·范德梅伦

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭广迅 刘 玥

权利要求书 2 页 说明书 24 页 序列表 13 页  
附图 3 页

[54] 发明名称 N-11 端截短的  $\beta$ -淀粉样蛋白的  
单克隆抗体、组合物、方法和用途

[57] 摘要

本发明涉及的抗体包括特定的部分或变体,其  
特异性针对至少是人  $\beta$ -淀粉样蛋白的 N-末端 11  
位点,例如 A $\beta$  11-x 多肽。还提供了制备和使用  
所述抗体的方法,包括治疗性药剂、给药和设备。

J&JPRD/hA $\beta$ 11/1 C1/G.1



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、特异性识别 A $\beta$  11-x 多肽的单克隆抗体。

2、权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特异性识别作为免疫原的  $\beta$ -分泌酶<sub>11</sub> 裂解位点的前 5-7 个人类氨基酸，即 Seq Id No.:1 和 Seq Id  
5 No.:2，或者  $\beta$ -分泌酶<sub>11</sub> 裂解位点的前 5-7 个小鼠氨基酸，即 Seq Id No.:3 和 Seq Id No.:4。

3、权利要求 1 或 2 所述抗体，其被可检测性地标记。

4、权利要求 3 所述抗体，其中可检测性标记为放射性标记、酶  
标记、发光标记或荧光标记。

10 5、权利要求 1 至 4 中任何一项所述的抗体，其被固定在载体上。

6、权利要求 1 至 5 中任何一项所述的单克隆抗体，其由杂交瘤  
细胞 J&JPRD/hA  $\beta$  11/1 和 J&JPRD/hA  $\beta$  11/2 表达，这些细胞于 2002  
年 8 月 19 日保藏在比利时微生物保藏协会，保藏号分别为  
LMBP5896CB 和 LMBP5897CB。

15 7、杂交瘤细胞 J&JPRD/hA  $\beta$  11/1 和 J&JPRD/hA  $\beta$  11/2，它们  
于 2002 年 8 月 19 日保藏在比利时微生物保藏协会，保藏号分别为  
LMBP5896CB 和 LMBP5897CB。

8、确定或检测样品中 A $\beta$  11-x 多肽的免疫检测方法，该方法包  
括将样品与权利要求 1 至 3 中任何一项所述的 A $\beta$  11-x 多肽的抗体  
20 接触，并确定抗体和 A $\beta$  11-x 多肽之间是否形成了免疫复合物。

9、检测组织样品中存在 A $\beta$  11-x 多肽的方法，该方法包括：

从受试者机体获得组织样品；

将组织样品与成像有效量的权利要求 3 或 4 所述的可检测性标记  
的抗体相接触；以及

25 检测标记以确定组织样品中 A $\beta$  11-x 多肽的存在。

10、权利要求 9 所述的方法，其中抗体被可检测性标记，由至少  
一种权利要求 7 所述的杂交瘤细胞表达。

11、检测体液样品中存在 A $\beta$  11-x 多肽的方法，该方法包括：

从受试者的机体获得体液样品；

30 将体液样品与成像有效量的权利要求 3 或 4 所述的可检测性标记  
的抗体相接触；以及

检测标记以确定体液样品中 A $\beta$  11-x 多肽的存在。

12、 权利要求 10 所述的方法，其中抗体被可检测性标记，由至少一种权利要求 7 所述的杂交瘤细胞表达。。

13、 权利要求 1 至 6 中任何一项所述的单克隆抗体在权利要求 9 或 10 所述的方法中的应用。

5 14、 权利要求 1 至 6 中任何一项所述的抗体在  $\beta$  淀粉样蛋白相关疾病的诊断中的用途。

15、 诊断组合物，其包含权利要求 1 至 6 中任何一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

10 16、 用于诊断  $\beta$  淀粉样蛋白相关疾病的免疫检测试剂盒，其包括权利要求 2 至 5 中任何一项所述的抗体和用于抗体的载体工具。

## N-11 端截短的 $\beta$ -淀粉样蛋白的单克隆抗体、 组合物、方法和用途

5 本发明涉及的抗体包括特定的部分或变体，其特异性针对至少是人  $\beta$ -淀粉样蛋白的 N-末端 11 位点，例如 A $\beta$  11-x 多肽。还提供了制备和使用所述抗体的方法，包括治疗性药剂、给药和设备。

### 发明背景

10 总体而言，本发明涉及控制  $\beta$ -淀粉样前体蛋白发展的方法和组合物。更特别的是，本发明涉及该方法和组合物在与阿耳茨海默症和其它  $\beta$ -淀粉样蛋白相关疾病的治疗相关的诊断、预后和监控中的应用，以及作为治疗阿耳茨海默症和其它  $\beta$ -淀粉样蛋白相关疾病的方法，所公开的抗体在被动免疫中的应用。

15 阿耳茨海默症（AD）是一种退化性大脑紊乱，其临床特征表现为记忆、认知、推理、判断和情感稳定性持续逐渐丧失，导致深度的智力衰退，最终死亡。AD 是造成老年人持续智力减退（痴呆）的最常见原因，在美国其被认为是四大最常见疾病死因的代表。AD 在全世界的人种和种族中都存在，是现今和未来的重要公众健康问题。仅在美国，据估计这种疾病目前就影响了约二到三百万人。目前 AD 是无法治愈的。已知现在没有有效的预防 AD 或消除其症状和病因的治疗手段。

20 患有 AD 的病人的大脑表现出称之为老年（或淀粉样）斑块、淀粉样血管病（在血管上的淀粉样沉积）和神经原纤维缠结的特征性损伤。在患有 AD 的病人的大脑中对于记忆和认知重要的几个区域中普遍存在大量的上述损伤，特别是淀粉样斑块和神经原纤维缠结。对未患有临床 AD 的绝大多数老年人的大脑经更严格的解剖检查发现了少量上述损伤。淀粉样斑块和淀粉样血管病也是患有 21 三体综合症（Down's 综合症）、弥漫性 Lewy 体病、伴有荷兰型淀粉样变性病（HCHWA-D）的遗传性脑出血的病人的大脑的特征。

25 淀粉样斑块的主要成分是一类  $\beta$ -淀粉样前体蛋白（APP）通过剪切产生的  $\beta$ -淀粉样蛋白（A $\beta$ ）多肽。过去存在着关于斑块和缠结是

诱因或仅仅是阿耳茨海默症的结果的激烈的科学争论，但最近的发现表明淀粉样斑块是成的前体和因素。特别是发现 A $\beta$  多肽的产生源自编码淀粉样前体蛋白的基因的突变，该蛋白正常加工时不会产生 A $\beta$  多肽。引起家族性、早发性的阿耳茨海默症淀粉样前体蛋白基因突变的鉴定最有力地证明了淀粉样代谢是这些疾病发病过程中重要的变化。目前已确信 APP 蛋白的加工（非致病）的正常过程是通过一种使蛋白的 A $\beta$  多肽区的 16 和 17 氨基酸之间裂解的  $\alpha$ -分泌酶的裂解而完成的。进一步确信致病过程是通过使前体蛋白的 A $\beta$  多肽区的氨基端裂解的  $\beta$ -分泌酶而部分完成的。

目前已证明 BACE-1 是 APP 在+1 位裂解所需的重要  $\beta$ -分泌酶。BACE-1 的过表达导致 A $\beta$  在+11 位的额外的裂解，产生较短的 A $\beta$  11-40 和 A $\beta$  11-42 片段，此后也称之为 A $\beta$  11-x 多肽。已经在原代大鼠神经元细胞培养物和小鼠 N2a 细胞的条件化培养基中检测到这些 A $\beta$  多肽，表明它们是神经元（3，4，5）中产生的正常的 APP 裂解产物。值得注意的是，这些较短的 A $\beta$  片段通过生化分析（6）已经被证明是 AD 大脑和正常老年大脑中的主要种类，通过免疫组织化学研究（7）也证明了在具有 AD 病理学特征的 Down's 综合症大脑中也是这样。这些事实促使对 A $\beta$  11-40/42 在阿耳茨海默症发病过程中的作用重新评价，特别是考虑到由 Glu11 开始的 A $\beta$  种类比由 1 位开始的 A $\beta$  种类表现为更不溶的事实。

除了了解有关 AD 和其它 A $\beta$  相关疾病的机理之外，还需要研究诊断和治疗这些疾病的方法和组合物。这样，监测淀粉样前体蛋白的细胞加工的能力对于诊断、预后、治疗性监管阿耳茨海默症具有很大意义。特别是希望能确定在容易获得的病人的样品，例如血清、脑脊髓液（CSF）等中筛选和评估可检测的诊断标记的具有最小侵害性的可重复性流程。多克隆抗体，例如 Said, T. C. et al., Neuroscience Letters 215(1996);173-176 中所述的那些，能用于检测生物样品中不同的 A $\beta$  多肽，但是考虑到每批多克隆抗体是不同的这一事实，这些抗体不能作为实施在容易获得的病人的样品中筛选和评估可检测的诊断标记的可重复性流程的工具。此外，使用多克隆抗体时非特异性结合特别高，在 Western 印迹中的准确性很低。

已经设想了许多可能的阿耳茨海默症的诊断性标记。本发明特别

感兴趣的是 APP 蛋白经  $\beta$ -分泌酶裂解后得到的 A $\beta$  前体蛋白的较短的羧基末端片段。这些标记可单独和/或与其它诊断标记和方法一起使用。诊断性标记优选在例如 CSF、血液、血浆、血清、尿的体液和组织等中可检测的，以便于使用最小侵害的诊断方法。

- 5        用于 A $\beta$  11-x 检测的特别检测方法应能够在非常低浓度的液体样品中以可重复的和分步骤的方式检测到 A $\beta$  11-x，还能够区分样品中可能存在的 A $\beta$  11-x 多肽和其它 APP 片段。

这里更详细描述本发明的各个方面。

10

### 发明概述

- 本发明提供特异性识别较短的 A $\beta$  多肽的单克隆抗体，该较短的 A $\beta$  多肽是 APP 蛋白通过 BACE-1 在 Glu-11 位剪切后得到的，例如 A $\beta$  多肽片段 A $\beta$  11-40 和 A $\beta$  11-42，此后称之为 A $\beta$  11-x 多肽。还提供  
15        产生单克隆抗体的杂交瘤细胞以及制备抗体和杂交瘤细胞的方法。以及通过竞争方法对 A $\beta$  多肽的免疫测定法或者使用抗体的夹心方法。

- 本发明特别提供单克隆抗体，其是使用  $\beta$ -分泌酶 11 剪切位点的前 5-7 个人类氨基酸，即 EVHHQ-C (人 A $\beta$  \_11(6 AA)-Seq Id No.:1) 和 EVHHQKI-C (人 A $\beta$  \_11(8 AA)-Seq Id No.:2) 或者使用  $\beta$ -分泌酶  
20        \_11 裂解位点的前 5-7 个小鼠氨基酸，即 EVRHQ-C (小鼠 A $\beta$  \_11(6 AA)-Seq Id No.:3) 和 EVRHQKL-C (小鼠 A $\beta$  \_11(8 AA)-Seq Id No.:4) 作为免疫原制备的。所述抗体与 A $\beta$  11-x 多肽特异性反应，与其它 APP 片段无交叉反应，其相应的被用于评价在阿耳茨海默症的  
25        发病过程中 A $\beta$  11-x 的作用的免疫检测中。

- 在一个更特别的实施方案中，单克隆抗体与人 A $\beta$  \_11(6 AA)免疫原反应并由杂交瘤细胞 J&JPRD/hA $\beta$  11/1 和 J&JPRD/hA $\beta$  11/2 表达，它们于 2002 年 8 月 19 日保藏在比利时微生物保藏协会，各自的保藏号为 LMBP5896CB 和 LMBP5897CB。在进一步的实施方案中，  
30        本发明提供表达本发明单克隆抗体的前述杂交瘤细胞。

在本发明的另一个方面，本发明的抗体应用于检测 A $\beta$  11-x 多肽的常规免疫学技术中，其中无论什么情况都包括用于监测  $\beta$ -淀粉样蛋

白相关疾病的生物样品和来自用于监测 APP 细胞内加工的细胞培养物的条件化培养基。适合的免疫学技术是所属领域技术人员熟知的，包括例如 ELISA、Western 印迹分析、竞争性或夹心免疫检测等。此外，被熟知的是它们都依赖于抗原-抗体免疫复合物的形成，其检测目的在于抗体被例如放射性、酶或荧光标记所标记，或者被固定在不溶性载体上而能被检测。

本发明也包括本发明的人源化抗体在药物制备中的应用，该药物用于治疗、预防或逆转阿耳茨海默症、Down's 综合症、HCHWA-D、大脑淀粉样血管病或其它  $\beta$ -淀粉样蛋白相关疾病；用于治疗、预防或逆转临床和潜伏期的阿耳茨海默症、Down's 综合症、HCHWA-D、大脑淀粉样血管病中的认知衰退；或者抑制淀粉样斑块的形成或可溶性毒性 A $\beta$  族在人体中作用。

#### 附图简述

图 1A: 注射了作为免疫原的  $\beta$ -分泌酶 11 裂解位点的前 5-7 个人类氨基酸，即 EVHHQ-C (人 A $\beta$  \_11(5 AA)-Seq Id No.:1) 和 EVHHQKI-C (人 A $\beta$  \_11(7 AA)-Seq Id No.:2) 或者  $\beta$ -分泌酶 11 裂解位点的前 5-7 个小鼠氨基酸，即 EVRHQ-C (小鼠 A $\beta$  \_11(5 AA)-Seq Id No.:3) 和 EVRHQKL-C (小鼠 A $\beta$  \_11(7 AA)-Seq Id No.:4) 的小鼠的血清滴度。使用的包被抗原为 2.0 $\mu$ g/ml 的 hA $\beta$ (11-40) (American Peptide Company)。

表 1 注射 EVHHQ-C (人 A $\beta$  \_11(5 AA)-Seq Id No.:1) 的小鼠的脾收集和融合的免疫过程和时间曲线。

表 3 显示对 AD 患者脑切片中 A $\beta$  11-x 多肽特异性检测的 Western 印迹结果。

图 2 使用纯化的单克隆抗体 JRF/A $\beta$  N/25、J&JPRD/hA $\beta$ 11/1 和 J&JPRD/hA $\beta$ 11/2 作为捕获抗体，JRF/cA $\beta$ 40/10-HRPO 作为检测抗体的夹心 ELISA。用与人 A $\beta$  1-40 和人 A $\beta$  11-40 (American Peptide Company) 的反应性来评价抗体组合。

A: JRF/A $\beta$  N/25 和 JRF/cA $\beta$ 40/10-HRPO 与人 A $\beta$  1-40 特异性反应，不与 hA $\beta$  11-40 交叉反应 (用于 A $\beta$  1-40 检测的阳性对照)。

B: J&JPRD/hA $\beta$ 11/1 和 JRF/cA $\beta$ 40/10-HRPO 与 hA $\beta$  11-40 特异

性反应，不与人 A $\beta$  1-40 交叉反应。

C: J&JPRD/hA $\beta$ 11/2 和 JRF/cA $\beta$ 40/10-HRPO 与 hA $\beta$  11-40 特异性反应，不与人 A $\beta$  1-40 交叉反应。

图 3 Western 印迹显示 J&JPRD/hA $\beta$ 11/1 与被人 APP<sub>swe</sub> 和人 BACE1 稳定转染的 HEK 细胞的膜提取物中的 APP 的  $\beta$ 11 裂解的 CTF 片段的特异性反应。C6/6.1 是针对 APP 的 C 末端并与 APP 的  $\beta$ 1 和  $\beta$ 11 裂解的 CTF 片段反应。

### 详细说明

10 本发明提供特异性识别较短的 A $\beta$  多肽的单克隆抗体，该较短的 A $\beta$  多肽是 APP 蛋白通过 BACE-1 在 Glu-11 位裂解后得到的。本发明的抗体具有与人 A $\beta$  的  $\beta$ -分泌酶<sub>11</sub> 裂解位点的前 5 至 7 个氨基酸或小鼠 A $\beta$  的  $\beta$ -分泌酶<sub>11</sub> 裂解位点的前 5 至 7 个氨基酸上存在的一个或多个抗原决定簇的特异性。

15 本发明特别提供单克隆抗体，其是使用包括  $\beta$ -分泌酶<sub>11</sub> 裂解位点的前 5-7 个人类氨基酸，即 EVHHQ-C (人 A $\beta$  <sub>11</sub>(6 AA)-Seq Id No.:1) 和 EVHHQKI-C (人 A $\beta$  <sub>11</sub>(8 AA)-Seq Id No.:2) 或者使用  $\beta$ -分泌酶<sub>11</sub> 裂解位点的前 5-7 个小鼠氨基酸，例如 EVRHQ-C (小鼠 A $\beta$  <sub>11</sub>(6 AA)-Seq Id No.:3) 和 EVRHQKL-C (小鼠 A $\beta$  <sub>11</sub>(8 AA)-Seq Id No.:4) 的多肽作为免疫原制备的。

20 前述的多肽可以通过本领域已知的方法制备，例如熟知的 Merrifield 固相合成技术，其中氨基酸依次增加形成长链 (Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2156)。氨基酸序列可以基于上述的 A $\beta$  片段的序列，或者可以使用自然产生或者基因工程突变的序列。

25 当作为免疫原使用时，由此获得的多肽可以单独使用或者可以连接到适合的免疫活化的天然或合成载体上，例如马来酰亚胺活化的例如如牛、兔和人的哺乳动物的血清白蛋白，如牛、兔、人和绵羊的哺乳动物的甲状腺球蛋白，以及匙孔螯血蓝蛋白 (KLH) 或者其它例如包括苯乙烯聚合物、丙烯酸聚合物、乙烯基聚合物和丙烯聚合物的合成聚

30 合物的适合的蛋白质载体。在实施例中进行进一步详细说明免疫化过程。

一旦获得了有效量的免疫原，就可以通过使用包括体外或体内技术的不同方法来制备对 A $\beta$  11-x 多肽特异性的多克隆抗体。体外技术



包括将淋巴细胞暴露于免疫原，而体内技术需要将免疫原注射到适合的脊椎动物宿主中。适合的脊椎动物宿主是非人的，包括小鼠、大鼠、兔、绵羊、山羊等。根据预先决定的方案，将免疫原注射到动物中，定期给动物抽血以得到连续的具有升高的滴度和特异性的血液。注射可以采用肌肉注射、腹膜内注射、皮下注射等。佐剂，例如 Freund's 完全佐剂或 Freund's 不完全佐剂，可用于加强抗体的产生能力。典型的筛选血清滴度水平的方法包括标准的 ELISA 或 RIA 检测法。例如在 ELISA 筛选过程中，将血清加入用 A $\beta$  11-x 多肽或者与载体（例如 BSA）耦联的 A $\beta$  11-x 多肽包被的固相（例如微孔板的底）上，然后加入抗免疫球蛋白抗体（例如当免疫发生在小鼠中时，使用抗小鼠免疫球蛋白抗体，例如绵羊抗小鼠免疫球蛋白（Ig）），该抗体与一个可检测的标记偶联，例如酶，优选辣根过氧化物酶或如 I<sup>125</sup> 的放射性同位素。

如果希望，使用本领域普通技术人员所熟知的技术，并通过上述的方法用目标免疫原超免疫例如小鼠的脊椎动物宿主，能够从中制备单克隆抗体。显示高滴度抗体的脊椎动物宿主很方便地被从目标免疫源免疫的动物中挑选出来。典型的是在最后免疫的 2-5 天，优选为 4 天，收集其脾脏和淋巴结，使其中包含的产生抗体的细胞永生化。使其永生化的方式不是关键的。目前，最常用的技术是与骨髓瘤细胞融合伴侣融合。融合过程根据本领域已知的方法进行，例如 Kohler 和 Milstein（Nature, 256, 495-497(1975)）的方法。其它技术包括 EBV 转化，用例如癌基因、逆转录病毒等的裸 DNA 转化，或者任何其它提供保持细胞系稳定和制备单克隆抗体的方法。可以使用包括聚乙二醇（PEG）和 Sendai 病毒的融合增强子。特别优选使用 PEG。骨髓瘤细胞的例子包括 NS-11、P3U1、SP2/0 和 AP-1，优选使用 SP2/0 细胞。

最有效制备产生具有与人 A $\beta$  的  $\beta$ -分泌酶<sub>11</sub> 裂解位点的前 5 至 7 个氨基酸或小鼠 A $\beta$  的  $\beta$ -分泌酶<sub>11</sub> 裂解位点的前 5 至 7 个氨基酸上存在的表位特异的单克隆抗体的方法：首先向产生杂交瘤的动物例如 Balb/c 小鼠腹腔注射存在于 Freund's 佐剂中的目标免疫原使其首先免疫化，随后每两周加强注射。然后使用本领域普通技术人员熟知的任何技术将分离的脾融合，优选根据 Kohler 和 Milstein 的改良方法(Eur.

J. Immunol., 6, 292-295(1976)) 使用 SP2/0 细胞。为确定用于生产与 A $\beta$  11-x 多肽具有特异性的抗体的杂交瘤细胞的筛选可以采用前述的标准 ELISA 或 RIA 法。生产目标单克隆抗体的杂交瘤细胞的挑选和培痛通常在动物培养基 (例如 Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基 (DMEM) 或 Eagle's 最小基本培养基 (MEM)) 中进行, 该培养基中补充了 10-20% 胎牛血清和其它成分, 例如 HAT (次黄嘌呤、氨基喋呤和胸腺嘧啶核苷) 或者 ESG 杂交瘤添加剂。相应的, 在本发明的一个实施方案中, 本发明提供杂交瘤细胞 J&JPRD/hA $\beta$  11/1 和 J&JPRD/hA $\beta$  11/2, 它们于 2002 年 8 月 19 日保藏在比利时微生物保藏协会, 各自的保藏号为 LMBP5896CB 和 LMBP5897CB。

抗 A $\beta$  11-x 单克隆抗体的分离和纯化与多克隆抗体的常规分离和纯化操作相似, 例如盐沉淀、乙醇沉淀、等电点沉淀、电泳、离子交换材料 (例如 DEAE) 的吸附和解吸附、超离心、凝胶过滤和包括抗原结合固相和蛋白质 A 或蛋白质 G 亲和层析的特异性免疫亲和分离技术。适合的蛋白质纯化技术在如 *Methods in Enzymology*, Vol. 182, Deutcher, ed., Academic Press. Inc., San Diego, 1990 中所述, 这里将其公开的内容作为参考。

因此本发明的目的是提供由前述的杂交瘤细胞表达的分离的单克隆抗体, 所述抗体能够特异性识别 A $\beta$  11-x 多肽。这些分离的单克隆抗体优选由杂交瘤细胞 J&JPRD/hA $\beta$  11/1 和 J&JPRD/hA $\beta$  11/2 表达, 它们于 2002 年 8 月 19 日保藏在比利时微生物保藏协会, 各自的保藏号为 LMBP5896CB 和 LMBP5897CB。

无论什么情况使用本发明的抗体, 以常规的免疫学技术检测 A $\beta$  11-x 多肽时, 都包括用于监测  $\beta$ -淀粉样蛋白相关疾病的生物样品和来自用于监测 APP 细胞内加工的细胞培养物的条件化培养基。适合的免疫学技术是本领域技术人员熟知的, 包括例如 ELISA、Western 印迹分析、竞争性或夹心免疫分析等。另外被熟知的是, 它们都依赖于抗原-抗体免疫复合物的形成, 其检测目的在于抗体被例如放射性、酶、发光或荧光标记等可检测性标记或者被固定在不溶性载体。因此本发明的目的是提供用于确定和检测样品中 A $\beta$  11-x 多肽的免疫检测方法, 包括将本发明的 A $\beta$  11-x 多肽的抗体与样品相接触, 并判断抗体和 A $\beta$  11-x 多肽之间是否形成免疫复合物的方法。这些方法或者在组

织样品上实施或者在体液样品上实施，通常包括从受试者的机体获取样品，将所述样品与成像有效量的可检测标记的本发明抗体相接触；检测标记以确定样品中存在 A $\beta$  11-x 多肽。

5 使用本发明的抗体的检测方法没有特别限制。只要与抗原的量相对应的抗体、抗原或者抗原-抗体复合物的量，特别是待测溶液中 A $\beta$  11-x 多肽的量可以通过化学或物理手段来检测，并根据使用含有已知量的抗原的标准溶液制定的标准曲线来计算，任何方法都可以使用。例如比浊法、竞争性法、免疫测量法和夹心法是适用的。考虑到灵敏性和特异性，特别优选使用下述的夹心法。

10 在使用标记物质的测量方法中，放射性同位素、酶、荧光物质、发光物质等作为标记试剂。放射性同位素的例子包括  $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$  和  $^{14}\text{C}$ 。酶通常是通过与其适合的底物连接，然后催化可检测的反应来实现检测的。其例子包括例如  $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶和苹果酸盐脱氢酶，优选辣根过氧化物酶。发光物质  
15 包括例如鲁光诺、鲁米诺衍生物、虫荧光素、发光蛋白质和荧光素酶。此外，抗生物素蛋白-生物素系统也能用来标记本发明的抗体和免疫原。

当免疫原或抗体作不溶处理时，可以采用通常用于蛋白质或酶不溶处理或固定化的物理吸附或化学结合。载体的例子包括例如琼脂糖、右旋糖苷和纤维素的不溶性多糖、例如聚苯乙烯、聚丙烯酰胺和  
20 硅氧烷聚合物的合成树脂以及玻璃。

在夹心方法中，受试溶液与不溶的抗 A $\beta$  11-x 多肽抗体反应（第一反应），标记的 A $\beta$  11-x 多肽抗体进一步反应（第二反应），然后测试不溶的载体上标记试剂的活性，由此能确定受试溶液中 A $\beta$  11-x 多肽的量。第一反应和第二反应可以同时进行或依次进行。  
25

在进一步的情况中，为了诊断  $\beta$ -淀粉样蛋白相关疾病，将得到的生物样品，包括组织、体液，例如 CSF、血液、血浆、血清、尿等，与适量的第一抗体接触形成免疫复合物。典型的接触包括将样品加入被第一抗体包被的固体基质中。将样品与第一抗体接触而形成的复合物通过洗脱从样品中分离。然而其它的恢复方法也可以使用。回收的  
30 复合物与至少一种对应于抗原上的抗原决定簇的第二抗体相接触，来结合复合物中的抗原。由于抗原实体的多表位性，第二抗体针对的抗

原决定簇可以与第一抗体针对的相同。应用上述任何标记可以使第一或第二抗体可以被检测。与由抗原与第一和第二抗体结合组成的复合物相结合的可检测抗体可以使用本领域已知技术容易的检测。通过将生物样品中获得的结果与对照样品中获得的结果相比较，可以确定 A  $\beta$  11-x 多肽的水平发生改变。

相应的本发明的目的是提供一种夹心检测法，其中第一抗体包被固体基质，此后称之为包被抗体，由识别 A  $\beta$  11-x 多肽和全长的 A  $\beta$  40 或 A  $\beta$  42 的抗体组成，第二抗体特异性识别 A  $\beta$  11-x 多肽其是可检测的。优选，包被抗体识别人 A  $\beta$  11-x 多肽和全长的 A  $\beta$  40 或 A  $\beta$  42。在更优选的实施方案中，包被抗体由特异性识别 A  $\beta$  11-40 和全长的 A  $\beta$  40 的单克隆抗体 JRF/cA  $\beta$  40/10 组成，所述单克隆抗体的特征在于包括至少一个具有氨基酸序列 SEQ ID No.5 的重链可变区和/或至少一个具有氨基酸序列 SEQ ID No.6 的轻链可变区（此后称之为单克隆抗体 JRF/cA  $\beta$  40/10），或者可选择的是，包被抗体由特异性识别 A  $\beta$  11-42 和全长的 A  $\beta$  42 的单克隆抗体 JRF/cA  $\beta$  42/12 组成，所述单克隆抗体的特征在于包括至少一个具有氨基酸序列 SEQ ID No.7 的重链可变区和/或至少一个具有氨基酸序列 SEQ ID No.8 的轻链可变区（此后称之为单克隆抗体 JRF/cA  $\beta$  42/12）。相应的在一个优选的实施方案中，第二抗体是由杂交瘤细胞 J&JPRD/hA  $\beta$  11/1 或 J&JPRD/hA  $\beta$  11/2 表达的单克隆抗体之一，这些细胞于 2002 年 8 月 19 日保藏在比利时微生物保藏协会，各自的保藏号为 LMBP5896CB 和 LMBP5897CB。本发明的目的是还提供一种确定 A  $\beta$  11-x 多肽与全长的 A  $\beta$  40 或 A  $\beta$  42 比例的夹心测定法。在这种实施方案中，还使用了识别全长的 A  $\beta$  40 和 A  $\beta$  42，但是与 A  $\beta$  11-x 多肽没有交叉反应性的另一种第二抗体。优选这种第二抗体，由 JRF/A  $\beta$  N25 组成，其特征在于包括至少一个具有氨基酸序列 SEQ ID No.9 的重链可变区和/或至少一个具有氨基酸序列 SEQ ID No.10 的轻链可变区。相应的本发明的目的是提供一种夹心检测法，其中包被抗体由特异性识别 A  $\beta$  11-x 多肽，但是不具有与全长的 A  $\beta$  40 和 A  $\beta$  42 多肽的交叉反应性的抗体组成，例如由杂交瘤细胞 J&JPRD/hA  $\beta$  11/1 或 J&JPRD/hA  $\beta$  11/2 表达的单克隆抗体，这些细胞于 2002 年 8 月 19 日保藏在比利时微生物保藏协会，各自的保藏号为 LMBP5896CB 和 LMBP5897CB，以及特

异性识别 A $\beta$  11-40 或 A $\beta$  11-42 的第二抗体，例如具有前述特征的 JRF/cA $\beta$  42/12 或 JRF/cA $\beta$  40/10。在一种特别的实施方案中，包被抗体由 J&JPRD/hA $\beta$  11/1 组成，第二抗体由特异性识别 A $\beta$  11-42 和全长的 A $\beta$  42 的 JRF/cA $\beta$  42/26 组成。所述单克隆抗体特征在于包括至少一个具有氨基酸序列 SEQ ID No.11 的重链可变区和/或至少一个具有氨基酸序列 SEQ ID No.12 的轻链可变区（此后称之为单克隆抗体 JRF/cA $\beta$  42/26）。

在确定 A $\beta$  11-x 多肽与全长的 A $\beta$  40 或 A $\beta$  42 的比例的备选的夹心测定法中，包被抗体由特异性识别 A $\beta$  11-x 多肽的抗体组成，优选人 A $\beta$  11-x 多肽，可检测的第二抗体特异性识别多肽 A $\beta$  11-40 或 A $\beta$  11-42，优选人 A $\beta$  11-40 或人 A $\beta$  11-42。在该备选夹心法中，包被抗体由杂交瘤细胞 J&JPRD/hA $\beta$  11/1 和 J&JPRD/hA $\beta$  11/2 表达的单克隆抗体之一组成，这些细胞于 2002 年 8 月 19 日保藏在比利时微生物保藏协会，各自的保藏号为 LMBP5896CB 和 LMBP5897CB。第二可检测的标记的抗体由具有前述特征的单克隆抗体 JRF/cA $\beta$  42/10 或单克隆抗体 JRF/cA $\beta$  40/12 组成。

本发明的单克隆抗体也可以用于夹心法以外的其它检测系统，例如，竞争性方法和比浊法。在竞争性方法中，测试溶液中的抗原和标记的免疫原竞争性与抗体反应。随后，将与抗体结合的标记的免疫原（B）与未反应的标记的免疫原（F）分离（B/F 分离）。然后测定 B 或 F 的标记量以决定测试溶液中免疫原的量。这些反应方法包括可溶性抗体被用做抗体，以及聚乙二醇和上述抗体的第二抗体被用于 B/F 分离的液相方法，以及固相化的抗体被用作第一抗体，或者可溶性抗体被用作第一抗体和固相化抗体被用作第二抗体的固相化方法。

在比浊法中，测定抗原-抗体在凝胶或溶液中反应得到的不溶性沉淀产物的量。即使当抗原的量很少，只获得少量的沉淀，也适合使用激光散射的比浊法。

在另外的方面，本发明涉及一种治疗和预防以在人体中形成含有  $\beta$ -淀粉样蛋白的斑块为特征的病症的方法，该方法包括给予，优选每周给予，需要这种治疗的人以治疗或预防有效量的本发明的人源化单克隆抗体或者其免疫学反应片段，其中抗体特异性结合人或小鼠 A $\beta$  多肽的  $\beta$  分泌酶<sub>11</sub> 裂解位点的前 5 到 7 个氨基酸上存在的一个或多

个表位。在另一个方面，本发明涉及抑制淀粉样斑块形成和清除人体中淀粉样斑块的方法，该方法包括给予需要这种抑制的人类对象以有效量的人源化抗体，该抗体将 A $\beta$  多肽在血液循环中隐藏起来，诱导大脑的流出物以及改变血浆和大脑中 A $\beta$  的清除。在其它方面，发明  
5 涉及这些人源化抗体，包括其免疫学有效的部分，以及它们的制备方法。

“人源化抗体”是指包括部分或全部衍生自人抗体种系的氨基酸序列的抗体，这种衍生是指改变具有非人互补决定区（CDR）的抗体的序列。“CDRs”被定义为作为免疫球蛋白重链和轻链的高度可变区域的抗体的互补决定区的氨基酸序列，参见例如 Kabat et al., Sequence  
10 of protein of immunological interest, 4<sup>th</sup>Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institute of Health(1987)。在免疫球蛋白的可变部分中有三个重链和三个轻链 CDRs（或 CDRs 区）。这里使用的“CDRs”是指所有三个重链 CDRs 或所有三个轻链 CDRs（或者  
15 如果需要的话，包括重链和轻链 CDRs）。

最简单的这种改变包括用鼠的恒定区替换人抗体的恒定区，从而形成具有有效地适于医药用途的低免疫原性的人/小鼠嵌合体。然而，优选将抗体的可变区和甚至是 CDR 也通过现在本领域熟知的技术进行人源化。用相应的人的框架区取代可变区的框架区，非人的 CDR  
20 不做任何处理或者甚至由人类基因组衍生的序列代替 CDR。全人抗体由免疫系统已经改变为相应的人的免疫系统的基因改造的小鼠来制备。正如上述方法所述，本发明的方法有效地用于制备抗体的免疫特异性片段，其中包括呈单链形式的片段。

人源化抗体也指包括人框架和至少一种来自非人抗体的 CDR 的  
25 抗体，其中存在的任何恒定区与人免疫球蛋白的恒定区基本相同，即至少约 85-90%，优选至少 95% 相同。因此，人源化抗体的所有部分，除可能的 CDRs 之外，与一个或多个天然人免疫球蛋白序列的相应部分基本上是相同的。例如，典型的人源化免疫球蛋白不包括嵌合的小鼠可变区/人恒定区抗体。

30 与非人和嵌合抗体相比，人源化抗体在用于人类治疗时具有至少三个潜在的优势：

1) 由于效应器部分是人的，它能够与人免疫系统的其它部分较

好的相互作用（例如通过补体依赖的细胞毒性（CDC）或者抗体依赖的细胞毒性（ACDC）更有效地破坏靶细胞）。

- 2) 人免疫系统不会将人源化抗体的框架或 C 区域认定为外源性的，因此对抗这种注射的抗体的抗体反应要比对抗完全的外源的非人抗体或者部分外源性的嵌合抗体的抗体反应小。
- 3) 已经有报道注射的非人抗体在人体循环中的半衰期要比人抗体的半衰期短得多。注射的人源化抗体具有与天然形成的人抗体基本相同的半衰期，可以较小和较低频率剂量给药。

在治疗和预防以形成包含  $\beta$ -淀粉样蛋白的斑块为特征的病症的方法中，使用常规的给药技术，优选通过静脉、腹膜、皮下、肺部、透皮、肌肉、鼻腔、口腔、舌下或者栓剂给药的外围给药方式（即不给药到中枢神经系统），向潜在的或表现为  $A\beta$  相关症状或病理学特征，例如临床或者潜在的阿耳茨海默症、Down's 综合症或临床或者潜在的淀粉样血管病的对象给予抗体（包括免疫学反应片段）。尽管抗体可以直接向心室、脊髓液或者脑实质给药，给这些部位定位的技术也是本领域所熟知的，但不一定要使用这些较为复杂的方法。当通过依靠外周循环系统的较为简单的技术给药时，本发明的抗体是有效的。本发明的优点包括即使抗体本身不直接进入中枢神经系统，抗体也能够表现出其有益效果。实质上，此处已经证明穿过血脑屏障的抗体的量为  $<0.1\%$  的血浆水平，本发明的抗体具有清除外周循环中  $A\beta$  的能力，并能够改变 CNS 和血浆可溶性  $A\beta$  的清除率。

根据选择的给药方式设计药物组合物，根据需要使用药学上可接受的赋形剂，例如分散剂、缓冲液、表面活性剂、防腐剂、溶剂、等渗剂、稳定剂等。最新版的 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton PA 在此引入作为参考，其中介绍了从业者公知的制剂技术的概况。

改变本发明抗体的溶解特性，使其更亲脂，例如将其包封在脂质体中或者封闭极性基团，尤其有用。

优选通过静脉、腹膜或皮下注射的外周系统给药。适合这些注射的器械为笔直的。此外，给药也可以通过鼻腔气溶胶或栓剂经粘膜起效。适合这种给药方式的制剂是公知的，其中典型的包括促进跨膜转运的表面活性剂。这些表面活性剂通常是由甾体衍生而来的或是阳离

子脂质，例如 N-[1-(2,3-二油酰)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA) 或者例如胆固醇半琥珀酸盐、磷脂酰甘油等不同的化合物。

5 制剂中人源化抗体的浓度按重量计算，从低至约 0.1% 到高达 15 或 20%，主要根据液体的体积、粘度等，特别是选用的特定的给药方式来选择。因此，典型的注射用药物组合物的组成包含 1mL 磷酸缓冲生理盐水配制的无菌缓冲水和 1-100mg 的本发明的人源化抗体。制剂制成后可以经无菌过滤，或者以其它方式达到可接受的微生物标准。典型的静脉输液组合物的液体体积为 250 mL，例如无菌 Ringer's 溶液，抗体浓度为每 mL 1-100mg 或更高。

10 本发明的治疗剂能够被冷冻或冻干储存，使用前用适合的无菌载体配制。冻干和配制能导致不同程度的抗体活性损失（例如在常规的免疫球蛋白中，IgM 抗体比 IgG 抗体将损失更多的活性）。必须调整剂量来弥补损失。选择制剂的 pH 值以平衡抗体的稳定性（化学的和物理的），使给药时病人感到舒适。

15 通常可耐受的 pH 在 4 至 8 之间。

尽管前述的方法对于例如人源化抗体的蛋白质给药而言是最方便、最适宜的，但是通过适当的改变，其它给药技术，例如透皮给药和口服给药也可以使用，只要制剂设计适当。

20 此外，也可以使用生物可降解膜和基质、或者微型渗透泵、或者基于葡聚糖珠、藻酸盐或胶原的传递系统的控释制剂达到效果。

总而言之，可用于本发明的抗体给药的制剂是本领域熟知的，可以有多种选择。利用常规的临床技术能够优化典型的剂量水平，典型的剂量水平还依赖于给药的方式和病人的身体条件。

25 本发明还提供在上述方法中使用的试剂盒，在一个实施方案中，试剂盒在一个或多个容器中包含本发明的抗体，优选纯化的抗体，更优选单克隆抗体，甚至更优选由杂交瘤细胞 J&LPRD/hA  $\beta$  11/1 和 J&LPRD/hA  $\beta$  11/2 表达的分离的单克隆抗体，这些细胞于 2002 年 8 月 19 日保藏在比利时微生物保藏协会，各自的保藏号为 LMBP5896CB 和 LMBP5897CB。在一个特别的实施方案中，本发明的试剂盒包含基本上分离的多肽，该多肽包含与包括在试剂盒中的抗体特异性反应的抗原决定簇。在进一步的实施方案中，该抗原决定簇选自作为免疫原的  $\beta$ -分泌酶 11 裂解位点的前 5-7 个人类氨基酸，即 EVHHQ-C（人

30



A $\beta$ \_11(6 AA)-Seq Id No.:1)和 EVHHQKI-C(人 A $\beta$ \_11(8 AA)-Seq Id No.:2)或者  $\beta$ -分泌酶\_11 裂解位点的前 5-7 个小鼠氨基酸,即 EVRHQ-C (小鼠 A $\beta$ \_11(6 AA)-Seq Id No.:3)和 EVRHQKL-C (小鼠 A $\beta$ \_11(8 AA)-Seq Id No.:4)。优选本发明的试剂盒用于夹心测定法中,其进一步包含不与目标多肽特异性反应的包被抗体。在一个特别的实施方案中,该包被抗体识别 A $\beta$  11-x 多肽和全长的 A $\beta$  40 或 A $\beta$  42,优选该包被抗体识别人 A $\beta$  11-x 多肽和全长的人 A $\beta$  40 或 A $\beta$  42,在更优选的情况下,包被抗体由特异性识别 A $\beta$  11-40 和全长的 A $\beta$  42 的单克隆抗体 JRF/cA $\beta$  42/10 (此前表征的)或由特异性识别 A $\beta$  11-42 和全长的 A $\beta$  42 的单克隆抗体 JRF/cA $\beta$  42/12 (此前表征的)组成的包被抗体。在本发明备选的夹心测定法中,试剂盒包括特异性识别 A $\beta$  11-x 多肽,优选人 A $\beta$  11-x 多肽的包被抗体,还包括特异性识别 A $\beta$  40 或 A $\beta$  42 的 C 末端,优选人 A $\beta$  40 或 A $\beta$  42 的 C 末端的抗体。在更优选的情况下,试剂盒包括由杂交瘤细胞 J&LPRD/hA $\beta$  11/1 和 J&LPRD/hA $\beta$  11/2 表达的分离的单克隆抗体作为包被抗体,这些细胞于 2002 年 8 月 19 日保藏在比利时微生物保藏协会,各自的保藏号为 LMBP5896CB 和 LMBP5897CB。单克隆抗体 JRF/cA $\beta$  42/10 (此前定义的)和单克隆抗体 JRF/cA $\beta$  42/12 (此前定义的)作为第二抗体,后者与可检测的标记、底物连接。

在另一个特殊实施方案中,本发明的试剂盒包括检测抗体与目标多肽结合(例如抗体可以与例如荧光化合物、酶的底物、放射性化合物或发光化合物的可检测底物结合,识别第一抗体的第二抗体可以与可被检测的底物结合)的工具。特别的是,试剂盒包括检测抗体与 A $\beta$  11-x 多肽结合的工具,该工具优选检测与选自  $\beta$ -分泌酶\_11 裂解位点的前 5-7 个人类氨基酸,即 EVHHQ-C (人 A $\beta$ \_11(6 AA)-Seq Id No.:1)和 EVHHQKI-C (人 A $\beta$ \_11(8 AA)-Seq Id No.:2)或者  $\beta$ -分泌酶\_11 裂解位点的前 5-7 个小鼠氨基酸,即 EVRHQ-C (小鼠 A $\beta$ \_11(6 AA)-Seq Id No.:3)和 EVRHQKL-C (小鼠 A $\beta$ \_11(8 AA)-Seq Id No.:4)的抗原决定簇结合。在前述的夹心法中,与可检测的底物偶联的抗体不是包被抗体。

在另外的情况下,本发明包括用于筛选包括组织、体液例如 CSF、血液、血浆、血清、尿等的生物样品的诊断试剂盒。所述生物样品包

含 A $\beta$  11-x 多肽。诊断试剂盒包含基本上分离的与 A $\beta$  11-x 多肽特异性免疫反应的抗体，特别是与具有选自  $\beta$ -分泌酶<sub>11</sub> 裂解位点的前 5-7 个人类氨基酸，即 EVHHQ-C (人 A $\beta$  <sub>11</sub>(6 AA)-Seq Id No.:1) 和 EVHHQKI-C (人 A $\beta$  <sub>11</sub>(8 AA)-Seq Id No.:2) 或者  $\beta$ -分泌酶<sub>11</sub> 裂解位点的前 5-7 个小鼠氨基酸，即 EVRHQ-C (小鼠 A $\beta$  <sub>11</sub>(6 AA)-Seq Id No.:3) 和 EVRHQKL-C (小鼠 A $\beta$  <sub>11</sub>(8 AA)-Seq Id No.:4) 组成的组中的抗原决定簇免疫反应，以及检测抗体与免疫原结合的手段。在一个实施方案中，抗体粘附于固体支持物上。在特别的实施方案中，抗体可以是单克隆抗体，特别是由杂交瘤细胞 J&LPRD/hA $\beta$  11/1 和 J&LPRD/hA $\beta$  11/2 表达的单克隆抗体，这些细胞于 2002 年 8 月 19 日保藏在比利时微生物保藏协会，各自的保藏号为 LMBP5896CB 和 LMBP5897CB。

试剂盒的检测手段可以包括标记的第二单克隆抗体，优选该标记的第二抗体包括 JRF/cA $\beta$  42/10 或 JRF/cA $\beta$  42/12，其中前述的固相化的单克隆抗体与特异性识别 A $\beta$  11-40 而与 A $\beta$  1-40 无交叉反应的 JRF/cA $\beta$  40/10 结合，前述的固定化的单克隆抗体与特异性识别 A $\beta$  11-42，而与 A $\beta$  1-42 无交叉反应的 JRF/cA $\beta$  42/12 结合。备选地，或者检测工具另外可以包括标记的竞争性抗原。

上述检测方法中用于将蛋白质材料粘附于固体支持物的固体表面剂是根据公知技术制备的，例如聚合物小珠、试纸条 (dip stick)、96 孔板或者过滤材料。这些粘附的方法通常包括蛋白质非特异性吸附于支持物上或者蛋白质，典型的通过游离的氨基，与固体支持物上的例如活化的羧基、羟基或醛基的化学反应基团共价结合。备选地，链霉亲和素包被的孔板能够被用于与生物素化的抗原连接。

这样本发明提供一种实施该诊断方法的检测系统或试剂盒。试剂盒通常包括表面结合了本发明的抗体的支持物，以及用于检测抗体与免疫原结合的报告分子标记的抗体。

参考下述的实施例的细节将更好的理解本发明。但是本领域技术人员很容易理解，这些实施例是对在后面的权利要求中有更充分阐述的本发明的示例性说明。此外，本申请中引用了多种出版物。这些出版物的内容在此作为本申请的参考，以充分说明本发明涉及的领域的状态。

## 实施例

### 原料和方法

#### 单克隆抗体的制备

5 将 Balb/c 小鼠用四种不同的存在于完全 Freund's 佐剂中的多肽免疫。前两种合成多肽包括  $\beta$ -分泌酶<sub>11</sub> 裂解位点的前 5-7 个人类氨基酸 (AA): EVHHQ(KI)-C (人 A $\beta$ <sub>11</sub>(6 或 8 AA))。其它两个用于免疫的多肽包含小鼠 A $\beta$ <sub>11</sub> 氨基酸序列 EVRHQ(KL)-C。使用例如 Pierce 的 Imject Maleimide mcKLH/BSA 试剂盒, 按照生产商的说明 (Pierce, Rockford, IL), 利用 COOH 末端的半胱氨酸将多肽与马来酰亚胺活化的 mc (*Megathura crenulata*) KLH, 或者马来酰亚胺活化的牛血清白蛋白偶联来制备所有的多肽。每两周小鼠加强注射 100 $\mu$ g 的 KLH 偶联的多肽, 第一次多肽存在于完全的 Freund's 佐剂中, 后面的存在于不完全 Freund's 佐剂中。

15 将所有的小鼠的脾脏分离, 除经人 A $\beta$ <sub>11</sub> (6AA) 多肽免疫的小鼠的脾脏外都在液氮中冷冻。选择显示最高血清滴度的小鼠, 并因此将其选择用来融合。在融合或脾脏提取前的第四天, 所有的小鼠腹腔注射 100 $\mu$ g 的与 mcKLH 偶联的 A $\beta$ <sub>11</sub> 多肽的生理盐水溶液进行加强。根据改良的 Kohler 和 Milstein (8) 方法, 将小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合。在 30 $\times$ 96 孔板中培养杂交瘤细胞, 10 天后通过使用 BSA 偶联的 6AA 的 hA $\beta$ <sub>11</sub> 多肽的直接 ELISA 进行筛选, 再通过非偶联的 A $\beta$ <sub>11-40</sub> 多肽来验证。针对游离 hA $\beta$ <sub>11</sub> 多肽的阳性细胞立即进行亚克隆, 在液氮中保存阳性克隆。

25 在 Dulbecco's 改良 Eagle's 培养基中培养所有的杂交瘤细胞, 该培养基中补充了 10% 的胎牛血清 (Hyclone, Europe), 2.5% 的 ESG 杂交瘤细胞添加剂 (Elscolab, Kruibeke, Belgium), 2% 的 HT (Sigma, USA), 1mM 的丙酮酸钠, 2mM 的 L-谷氨酸, 青霉素 (100U/ml) 和链霉素 (50mg/ml)。所有成分的都是商业上可获得的, 从 Life - Technologies (Payseley, U.K.) 购买。细胞在增湿的 8% CO<sub>2</sub> 空气培养箱中培养。

#### ELISA 抗体的选择

用于检测抗 A $\beta$ <sub>11</sub> 抗体的筛选 ELISA 是一种直接的 ELISA,, 其中将 1 $\mu$ g/ml 游离的人/小鼠 A $\beta$  11 - 40 或 BSA 偶联的人/小鼠 A $\beta$ <sub>11</sub> 在具有 50 $\mu$ l/孔包被缓冲液 (10mM Tris、10mM NaCl 和 10mM NaN<sub>3</sub>, pH8.5) 的 NUNC (Life Technologies) 的 U 形底高结合 96 孔微滴度孔板中在 4 $^{\circ}$ C 下包被过夜。第二天, 将孔板用具有 85 $\mu$ l/孔的 0.1% 的酪蛋白 PBS 溶液在 37 $^{\circ}$ C 下包被 60 分钟以减少非特异性结合。然后, 加入 50 $\mu$ l 杂交瘤细胞上清液, 在 37 $^{\circ}$ C 下培养 1 小时。清洗后, 结合的单克隆抗体用 50 $\mu$ l/孔的与辣根过氧化物酶在 37 $^{\circ}$ C 下培养偶联 1 小时的绵羊抗小鼠 Ig (Amersham - Pharmacia Biotech) 来检测。所有的试剂用 0.1% 的酪蛋白/PBS 稀释。清洗孔板, 加入 50 $\mu$ l 溶液作为底物, 该溶液中含有 0.42mM 的 3,5,3',5'-四甲基联苯胺, 0.003% (体积/体积) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 100mM 柠檬酸溶液, 100mM 的磷酸氢二钠溶液 (pH4.3)。反应在室温下在孔板摇床上进行, 最长时间为 15 分钟。随后用 50 $\mu$ l/孔的 2N 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止颜色变化, 将孔板放在微滴度孔板读数器 (Thermomax, Molecular Device) 上在 450nm 下读数。采用直接 ELISA 检测选择的单克隆抗体与全长的人游离的 A $\beta$  1 - 40 多肽的交叉反应, 其中除了使用全长人游离的 A $\beta$  1 - 40 多肽代替 BSA 偶联的 hA $\beta$ <sub>11</sub> (6AA) 多肽之外, 都与筛选检测方法相同。在第二个验证 ELISA 中, 选择的阳性培养物用游离的 A $\beta$  11 - 40 多肽再检测。

20

#### 用于检测 $\beta$ 淀粉样蛋白的夹心 ELISA

检测 hA $\beta$  (1-40)或 hA $\beta$  (11-40)的标准稀释液 (American Peptide Company) 的 ELISA 按下述方法进行: 简单的说, 将 5 $\mu$ g/ml 的单克隆抗体 JRF/A $\beta$  N/25、J&JPRD/hA $\beta$  11/1 和 J&JPRD/hA $\beta$  11/2 在具有 100 $\mu$ l/孔包被缓冲液的 NUNC 平底高结合 96 孔微滴度板中 4 $^{\circ}$ C 下包被过夜。第二天, 孔板用 125 $\mu$ l/孔的 0.1% 的酪蛋白 PBS 溶液在 37 $^{\circ}$ C 下过夜包被 30 分钟, 以减少非特异性结合, 再用 100 $\mu$ l/孔的 hA $\beta$  (1-40)或 hA $\beta$  (11-40)多肽稀释样品在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 90 分钟。清洗孔板, 随后用 100 $\mu$ l/孔的 HRP 标记的 JRF/cA $\beta$  40/10 - HRPO 孵育。清洗孔板, 加入 100 $\mu$ l 溶液作为底物, 溶液中含有 0.42mM 的 3,5,3',5'-四甲基联苯胺, 0.003% (体积/体积) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 100mM 柠檬酸溶液, 100mM 的磷酸氢二钠溶液 (pH4.3)。反应在孔板摇床上在室温下进行, 最长

30

时间为 15 分钟。随后用 50 $\mu$ l/孔的 2N 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止颜色变化，将孔板置于微滴度孔板读数器( Thermomax, Molecular Device )上在 450nm 下读数。

#### 5 APP CTF 的免疫检测

为了免疫检测 CTF (STUBS) 片段，将 HEK 细胞用人 APP<sub>swe</sub> 和人 BACE1 稳定转染，在 75cm<sup>2</sup> 培养瓶 ( Life, Technologies, Paisly, U.K. ) 中培养直到融合，然后将细胞消化，在 50mM 的 Tris: pH=7.0, 0.15MNaCl, 1 % 的 Triton X-100 和商用的蛋白酶抑制剂 Cocktail ( Roche, Boehringer Mannheim, Germany ) 中超声处理。粗消化产物在 4℃ 下以 10000g 离心 10min 以除去细胞核和碎片。提纯的细胞消化产物根据蛋白质含量而经标准化，样品在 95℃ 下在 2x Tricine Laemmli 缓冲液中变性 5 分钟，转入预先制备的 10 - 20 % 的 Tris Tricine SDS 梯度凝胶 ( NOVEX, Introvigen, Groningen, The Netherlands ), 在 1.5mA/cm<sup>2</sup> 的条件下，经过 45 分钟半干转入 0.22 $\mu$ m 的 Hybond - ECL 尼龙膜 ( APB ) 上。小分子量的蛋白质梯度被用作分子量标准 ( MagicMark Western 标准, Introvigen )。将膜用 10 % ( w/v ) 脱脂奶粉 ( BioRad ) 的 PBS 溶液封闭 1 小时。然后，将其与 5 $\mu$ g/ml 适当的单克隆抗体在 4℃ 下孵育过夜 ( 单克隆抗体 C1/6.1 针对 APP 的 C 末端抗原决定簇，来自 Dr. Mathews, Nathan, S. Kline Institute, Orangeburg 的慷慨赠送 )。然后将膜在 0.1% 的 Tween20 的 PBS 溶液中清洗 5 分钟，其中换 5 次缓冲液。与 HRP 偶联的山羊抗小鼠 ( Sigma ) 1: 2000 的稀释液在室温下 ( RT ) 孵育 1 小时。清洗后，根据生产商的说明 ( Roche, Boehringer Mannheim, Germany ), 通过化学发光将目标条带可视化。使用 Lumi-Imager ( Boehringer Mannheim, Germany ) 进行扫描。

#### AD 病人大脑切片中 APP 的免疫测定

将大脑切片用 10% ( w/v ) 的脱脂奶粉 ( BioRad ) 的 PBS 溶液封闭 1 小时。然后将其与 5 $\mu$ g/ml 适当的单克隆抗体在 4℃ 下孵育过夜。然后将膜在 0.1% 的 Tween20 的 PBS 溶液中清洗 5 分钟，其中换 5 次缓冲液。用 HRP 偶联的山羊抗小鼠 ( Sigma ) 1: 2000 的稀释液在室

温下 (RT) 孵育 1 小时。清洗后, 根据生产商的说明 (Roche, Boehringer Mannheim, Germany), 通过化学发光将目标条带可视化。使用 Lumi-Imager (Boehringer Mannheim, Germany) 进行扫描。

## 5 结果与讨论

### “融合小鼠”的挑选

向小鼠注射一组 4 种不同 mcKLH 偶联的多肽。对于每个多肽, 免疫 3 只不同的小鼠。在第一次加强免疫后, 给每只小鼠抽血, 分离血清, 用直接包被的 BSA 人 hA  $\beta$  (6AA) 的 ELISA 方法检测。用 hA  $\beta$  \_11 (6AA) 免疫小鼠的方法与所有被注射的小鼠一样, 如表 1 所示。在图 1a 中, 清楚的证明了用 KLH\_ hA  $\beta$  \_11 (6AA) (SEQ ID No.1) 免疫的小鼠 1 显示很高的对游离的人 A  $\beta$  11 - 40 多肽的血清滴度。因此, 用 hA  $\beta$  \_11 (6AA) 免疫的小鼠 1 被选择用来融合。

### 15 hA $\beta$ \_11 (6aa) 的融合, 脾脏 1

由于该超免疫的小鼠的脾细胞数量很大 (共计  $6.5 \times 10^8$  脾细胞), 使用半数脾细胞进行两次融合过程。所有的细胞在添加了 ESG 的培养基中增殖, 十天后用 30 $\times$ 96 杂交瘤孔板筛选。

在这些杂交瘤中, 最初 65 个培养孔在应用 BSA 偶联多肽的筛选 ELISA 检测法中显示明显的阳性信号。所有这些呈阳性的上清液用 IgG 特异性 ELISA 检测其游离的多肽。只有 5 个培养物被证实为阳性, 或者最初显示阳性的孔中不足 10% 为阳性。所有这些培养物对全长的人 A  $\beta$  1 - 40 为阴性, 表现出具有与 hA  $\beta$  11 - 40/42 末端存在 AA 的反应性。

25 立即将培养物克隆, 将母体培养物冷冻。这 5 个之中, 2 个被命名为 29B5 (J&JPRD/hA  $\beta$  11/1) 和 5C4 (J&JPRD/hA  $\beta$  11/2) 的杂交瘤细胞被成功克隆, 冷冻在液氮中。这两个杂交瘤每个有 4 个不同亚克隆被培养并冷冻。在表 2 中, 总结了阳性的亚克隆。

表 2

|                             |                           |
|-----------------------------|---------------------------|
| J&JPRD/hAβ11/1 (29B5cl1F3)  | J&JPRD/hAβ11/2 (5C4cl3D6) |
| J&JPRD/hAβ11/1 (29B5cl2F5)  | J&JPRD/hAβ11/2 (5C4cl3F5) |
| J&JPRD/hAβ11/1 (29B5cl4C1)  | J&JPRD/hAβ11/2 (5C4cl5B4) |
| J&JPRD/hAβ11/1 (29B5cl4D11) |                           |

在非 AD 的人对照、小猎犬和豚鼠的 CSF 样品中 A β 1 - 40/42 以及截短的 A β 11 - 40 的确定

用于测定 CSF 样品中的 A β 1 - 40/42 和截短的 A β 11 - 40 的 ELISA 如下操作: 简单的说, 将 5μg/ml 单克隆抗体 J&JPRD/hA β 11/1 或者特异性 A β x - 40 和 A β x - 42 单克隆抗体( Vandermeeren M. et al. 2001; Pype S., et al. 2003 ) JRF/cA β 40/10 和 JRF/cA β 43/26 在具有 100μl/孔包被缓冲液的 NUNC 平底高结合微滴度 96 孔板中包被过夜。第二天, 孔板用 150μl/孔的 0.1 % 的酪蛋白 PBS 溶液在 37℃下过夜包被 30 分钟, 以减少非特异性结合, 再与 100μl/孔的 PBS 缓冲液稀释的 CSF 样品在 37℃下孵育 90 分钟。清洗孔板, 随后用 100μl/孔的 HRP 标记的 JRF/cA β N/25 - HRPO 或 JRF/cA β 40/28 - HRPO 孵育。清洗孔板, 加入 100μl 溶液作为底物, 溶液中含有 0.42mM 的 3,5,3',5'-四甲基联苯胺, 0.003 % ( 体积/体积 ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 100mM 柠檬酸溶液, 100mM 的磷酸氢二钠溶液 ( pH4.3 )。反应在孔板摇床上在室温下进行, 最长时间为 15 分钟。随后用 50μl/孔的 2N 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止颜色变化, 将孔板放在微滴度孔板读数器 ( Thermomax, Molecular Dynamics ) 上在 450nm 下读数。

使用本发明的单克隆抗体, 可以定量检测 ( ng/ml ± stdev ) 非 AD 人对照、小猎犬和豚鼠的 CSF 样品 ( n = 6 ) 中截短的 11 - 40 β 淀粉样蛋白同型体。

|          | 人<br>ng/ml  | 犬<br>ng/ml  | 豚鼠<br>ng/ml |
|----------|-------------|-------------|-------------|
| Aβ 1-40  | 5.70 ± 0.63 | 5.61 ± 0.35 | 5.94 ± 0.42 |
| Aβ 11-40 | 0.20 ± 0.04 | 0.30 ± 0.34 | 0.36 ± 0.05 |
| Aβ 1-42  | 0.92 ± 0.31 | 1.25 ± 0.05 | 1.17 ± 0.16 |

## 结论

在总数超过 30,000 的杂交瘤中，我们选择了两个不同的特异性识别人 A $\beta$  11-40 多肽的游离 N 末端的杂交瘤细胞克隆。这些单克隆抗体对于全长的人 A $\beta$  1-40 呈阴性。为了评价抗体的特异性，将其用蛋白 G 亲和色谱纯化，用于特异性抗人 cA $\beta$  40 和 cA $\beta$  42mAbs 的夹心 ELISA 中。JRF/A $\beta$  N/25 作为 A $\beta$  1-40 的特异性单克隆抗体和 JRF/cA $\beta$  40/10-HRPO 一起作为检测抗体使用。后者特异性识别 A $\beta$  的 C 末端部分，相应的与特异性识别 A $\beta$  11-x 多肽的抗体 JRF/cA $\beta$  N/25、J&JPRD/hA $\beta$  11/1 和 J&JPRD/hA $\beta$  11/2 一起被用作检测抗体。图 2A 证实了 JRF/cA $\beta$  N/25 与 A $\beta$  1-40 特异性反应，不与 A $\beta$  11-40 交叉反应。从图 2B 和 2C 可以看出，抗体 J&JPRD/hA $\beta$  11/1 和 J&JPRD/hA $\beta$  11/2 特异性识别 hA $\beta$  11-40，不与人 A $\beta$  1-40 交叉反应。

本发明的抗体特异性标记生物样品中 A $\beta$  11-x 多肽的能力由应用人 APP 和人 BACE-1 稳定转染的 HEK 细胞的膜提取物（图 3）和 AD 病人淀粉样斑块的大脑切片的 Western 印迹来验证（表 3）。相应地，在夹心 ELISA 中使用这些抗体和特异性抗人 cA $\beta$  40 和抗人 cA $\beta$  42 的单克隆抗体，就形成了在包括生物体液和大脑匀浆的不同生物样品中特异性检测人 A $\beta$  11-x 多肽的灵敏的检测法。



## 参考文献

1. Jarrett, J.T., Berger, E.P., Lansbury, P.T., The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochem.* 32 (1993) 4693-4697.
2. Selkoe, D.J., Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81 (2001):741-766
3. Gouras, G.K., Xu, H., Jovanovic, J.N., Buxbaum, J.D., Wang, R., Relkin, N.R., Gandy, S., Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons, *J. Neurochem.*, 71 (1998) 1920-1925.
4. Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S.E., Sisodia, S.S., The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 31894-31902.
5. Vandermeeren, M., Geraerts, M., Pype, S., Dillen, L., Van Hove, C., Mercken, M., The functional inhibitor DAPT prevents production of amyloid  $\beta$  1-34 in human and murine cell lines. *Neurosci. Lett.* 315 (2001) 145-148.
6. Naslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses A.D., Tjernberg, L.O., Silberring, J., Gandy, S.E., Winblad, B., Greengard, P., Nordstedt, C., Terenius, L., Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91 (1994) 8378-8382.
7. Iwatsubo, T., Saido, T.C., Mann D.M., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q. Full-length amyloid-beta (1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid-beta 42(43) deposit in diffuse plaques. *Am. J. Pathol.* 149 (1996) 1823-1830.
8. Kohler, G., Howe, S.C., Milstein, C., Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur J Immunol* 6 (1976) 292-295.
9. Pype, S., Moechars, D., Dillen, L., Mercken, M., Characterization of amyloid beta peptides from brain extracts of transgenic mice overexpressing the London mutant of human amyloid precursor protein, *J. Neurochem.* 84(3) 602-609.

表 1

| 免疫/抽血                     | 日期         | 小鼠         | 注射          |                                 |
|---------------------------|------------|------------|-------------|---------------------------------|
| 初次免疫                      | 23/01/2002 | 1          | 100 $\mu$ g |                                 |
|                           | 23/01/2002 | 2          | 100 $\mu$ g |                                 |
|                           | 23/01/2002 | 3          | 100 $\mu$ g |                                 |
| 加强免疫1                     | 06/02/2002 | 1          | 100 $\mu$ g |                                 |
|                           | 06/02/2002 | 2          | 100 $\mu$ g |                                 |
|                           | 06/02/2002 | 3          | 100 $\mu$ g |                                 |
| 取血1                       | 20/02/2002 | 1          |             |                                 |
|                           | 20/02/2002 | 2          |             |                                 |
|                           | 20/02/2002 | 3          |             |                                 |
| 加强免疫2                     | 27/02/2002 | 1          | 100 $\mu$ g |                                 |
|                           | 27/02/2002 | 2          | 100 $\mu$ g |                                 |
|                           | 27/02/2002 | 3          | 100 $\mu$ g |                                 |
| 取血2                       | 08/03/2002 | 1          |             |                                 |
|                           | 08/03/2002 | 2          |             |                                 |
|                           | 08/03/2002 | 3          |             |                                 |
| 最后加强                      | 11/03/2002 | 1          | 100 $\mu$ g | 有腹水小鼠                           |
|                           | 11/03/2002 | 2          | 100 $\mu$ g | 有腹水小鼠                           |
|                           | 11/03/2002 | 3          | 100 $\mu$ g | 无腹水, 无滴度                        |
| 脾冷冻                       | 小鼠         | 日期         |             | 脾细胞                             |
| hAB_11(6aa).10exp6 cellen | 2          | 14/03/2002 |             | 105.10exp6/管(4管)                |
| 融合                        | 小鼠         | 日期         |             | 脾细胞                             |
| hAB_11(6aa) 30pl.         | 1          | 15/03/2002 |             | 655.10exp6                      |
|                           |            |            |             | 用 $325 \times 10^6$ 脾细胞融合<br>2次 |

表 3

|                        |           | 海马  |    |    |                            | 脉络膜丛 |
|------------------------|-----------|-----|----|----|----------------------------|------|
| Ab类型                   | 稀释        | 神经元 | 斑块 | 血管 | 其它                         |      |
| J&JPRD/hA $\beta$ 11/1 | 1 $\mu$ g | -   | +  | -  | -裂纹++<br>-白色物质++带有杂斑和弥散的染色 | +++  |
| J&JPRD/hA $\beta$ 11/1 | 5 $\mu$ g | +   | +  | -  | -裂纹++<br>-白色物质++带有杂斑和弥散的染色 | +++  |
| J&JPRD/hA $\beta$ 11/2 | 1 $\mu$ g | -   | -  | -  | -裂纹++<br>-白色物质++带有杂斑和弥散的染色 | +++  |
| J&JPRD/hA $\beta$ 11/2 | 5 $\mu$ g | -   | +  | -  | -裂纹++<br>+白色物质中带有杂斑        | +++  |

|                        |           | 皮质（内嗅或在梭状的脑回中） |     |    |         |
|------------------------|-----------|----------------|-----|----|---------|
| Ab类型                   | 稀释        | 神经元            | n斑块 | 强度 | 白色物质    |
| J&JPRD/hA $\beta$ 11/1 | 1 $\mu$ g | -              | ++  | +  | ++（杂斑）  |
| J&JPRD/hA $\beta$ 11/1 | 5 $\mu$ g | +              | +++ | ++ | ++（杂斑）  |
| J&JPRD/hA $\beta$ 11/2 | 1 $\mu$ g | -              | ++  | +  | +++（杂斑） |
| J&JPRD/hA $\beta$ 11/2 | 5 $\mu$ g | -              | +++ | ++ | +++（杂斑） |

<110> Janssen Pharmaceutica N.V.

<120>  $\beta$ -淀粉样蛋白单克隆抗体、组合物、方法和用途

<130> PRD 32

<150> PCT/EP02/11062

<151> 2002-09-27

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 由人 $\beta$ 淀粉样蛋白 BACE1 裂解位点的前 5 个氨基酸组成的免疫原

<400> 1

Glu Val His His Gln

1

5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 由人 $\beta$ 淀粉样蛋白 BACE1 裂解位点的前 7 个氨基酸组成的免疫原

<400> 2

Glu Val His His Gln Lys Ile

1

5

<210> 3  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 由小鼠 $\beta$ 淀粉样蛋白 BACE1 裂解位点的前 5 个氨基酸组成的免疫原

<400> 3

Glu Val Arg His Gln  
 1 5

<210> 4  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 由小鼠 $\beta$ 淀粉样蛋白 BACE1 裂解位点的前 7 个氨基酸组成的免疫原

<400> 4

Glu Val Arg His Gln Lys Leu  
 1 5

<210> 5  
 <211> 136  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

<220>  
 <221> CDR1  
 <222> (50).. (54)  
 <223>

<220>  
 <221> CDR2  
 <222> (69).. (85)  
 <223>

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDR3

&lt;222&gt; (118)..(125)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 5

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Lys | Cys | Ser | Trp | Val | Ile | Phe | Phe | Leu | Met | Ala | Val | Val | Ile | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Asn | Ser | Glu | Gly | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Arg |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Ala | Ser | Leu | Lys | Leu | Ser | Cys | Thr | Ala | Ser | Gly | Phe | Asn | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Asp | His | Tyr | Val | His | Trp | Val | Arg | Gln | Arg | Pro | Glu | Gln | Gly | Leu |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Trp | Ile | Gly | Trp | Ile | Ala | Pro | Lys | Asn | Gly | Tyr | Ser | Glu | Ser | Ala |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Lys | Phe | Gln | Gly | Lys | Ala | Ser | Met | Thr | Ala | Asp | Thr | Ser | Ser | Asn |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Val | Tyr | Leu | Gln | Leu | Ser | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Tyr | Cys | Phe | Ala | Gly | Phe | Tyr | Asp | Ser | Ser | Leu | Tyr | Trp | Gly | Gln |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Thr | Thr | Leu | Thr | Val | Ser | Ser |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |

<210> 6  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

<220>  
 <221> CDR1  
 <222> (44)..(59)  
 <223>

<220>  
 <221> CDR2  
 <222> (75)..(81)  
 <223>

<220>  
 <221> CDR3  
 <222> (114)..(122)  
 <223>

<400> 6

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg  
 1 5 10 15

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

Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Gly Gln Ser  
 35 40 45

Leu Leu Ala Arg Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Leu Gln Arg  
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp

---

|                                                                 |     |    |     |    |     |    |
|-----------------------------------------------------------------|-----|----|-----|----|-----|----|
| 65                                                              |     | 70 |     | 75 |     | 80 |
| Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe |     |    |     |    |     |    |
|                                                                 | 85  |    | 90  |    | 95  |    |
| Thr Leu Lys Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr |     |    |     |    |     |    |
|                                                                 | 100 |    | 105 |    | 110 |    |
| Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn |     |    |     |    |     |    |
|                                                                 | 115 |    | 120 |    | 125 |    |
| Leu Glu Ile Lys Arg                                             |     |    |     |    |     |    |
|                                                                 | 130 |    |     |    |     |    |

<210> 7  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

<220>  
 <221> CDR1  
 <222> (50)..(54)  
 <223>

<220>  
 <221> CDR2  
 <222> (69)..(85)  
 <223>

<220>  
 <221> CDR3  
 <222> (118)..(122)  
 <223>

<400> 7



Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys  
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Thr Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe  
35 40 45

Thr Glu Tyr Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu  
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ser Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Asn  
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
115 120 125

Leu Thr Val Ser Ser  
130

<210> 8  
<211> 133  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> CDR1  
<222> (44).. (59)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDR2

&lt;222&gt; (75)..(81)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDR3

&lt;222&gt; (114)..(122)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 8

Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro  
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro  
 20 25 30

Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Asn  
 35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg  
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Ser Arg Val Ser Asn Leu Ala  
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asn Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe  
 85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
 100 105 110

Cys Ala Gln Leu Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys  
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg  
 130

<210> 9  
 <211> 138  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

<220>  
 <221> CDR1  
 <222> (50).. (54)  
 <223>

<220>  
 <221> CDR2  
 <222> (69).. (85)  
 <223>

<220>  
 <221> CDR3  
 <222> (118).. (127)  
 <223>

<400> 9

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Ser Thr Ser Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Val Leu Pro Gly Ser Gly Lys Ser Asn His Asn  
 65 70 75 80

Ala Asn Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ala Ser Asn  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ser Asn Asn Asn Ala Leu Ala Tyr Trp  
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 130 135

<210> 10  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

<220>  
 <221> CDR1  
 <222> (46).. (55)  
 <223>

<220>  
 <221> CDR2  
 <222> (60).. (67)  
 <223>

<220>

<221> CDR3

<222> (110).. (117)

<223>

<400> 10

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ile Ile Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
50 55 60

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Ser Ser Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro  
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Pro Thr Ile  
85 90 95

Ser Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Asn Trp  
100 105 110

Arg Ser Ser Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
115 120 125

<210> 11

<211> 133

<212> PRT

<213> 小鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDR1

&lt;222&gt; (50).. (54)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDR2

&lt;222&gt; (69).. (85)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDR3

&lt;222&gt; (118).. (122)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 11

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
 1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Thr Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe  
 35 40 45

Thr Glu Tyr Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ser Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Asn  
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 115 120 125

Leu Thr Val Ser Ser  
 130

<210> 12  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<220>  
 <221> CDR1  
 <222> (44).. (59)  
 <223>

<220>  
 <221> CDR2  
 <222> (75).. (81)  
 <223>

<220>  
 <221> CDR3  
 <222> (114).. (122)  
 <223>

<400> 12

Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro  
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro  
 20 25 30

Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Asn  
35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg  
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Ser Arg Val Ser Asn Leu Ala  
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asn Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe  
85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
100 105 110

Cys Ala Gln Leu Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys  
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg  
130



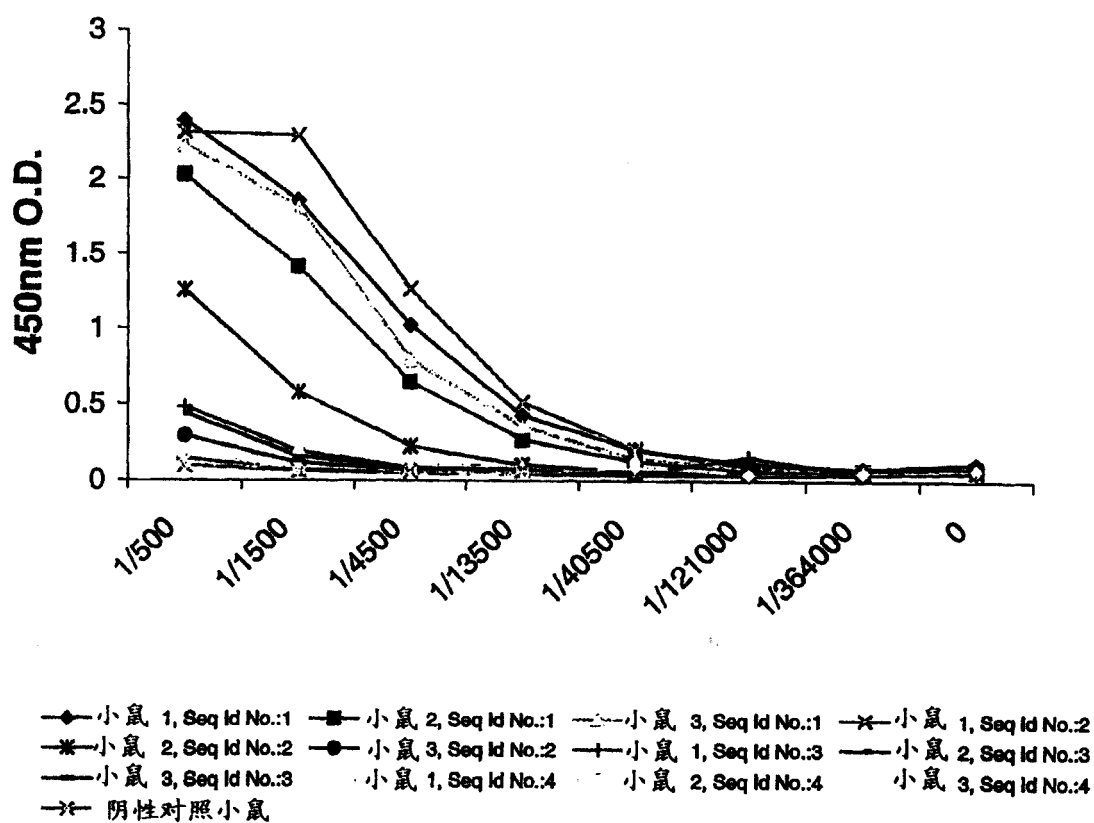


图 1A

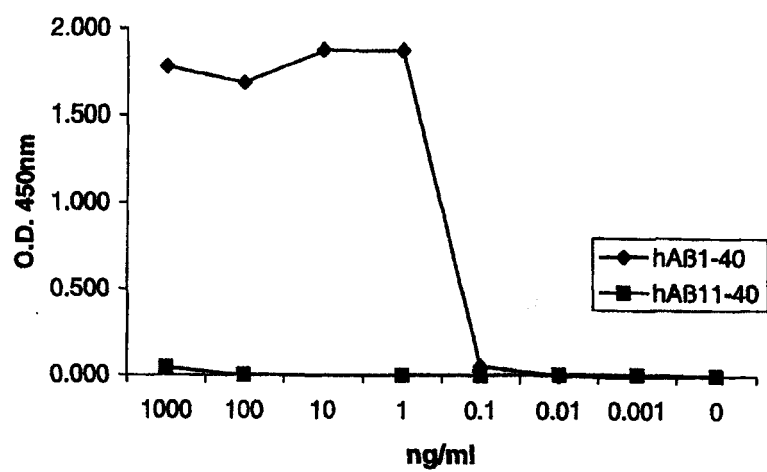
Fig2A

图 2A

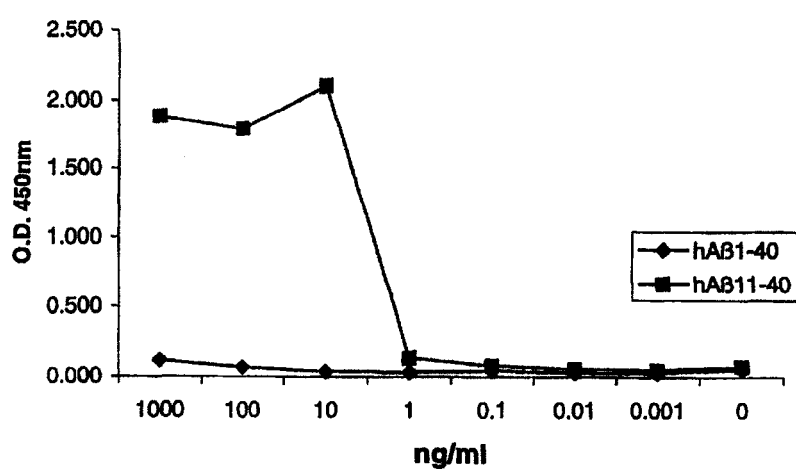
Fig2B

图 2B

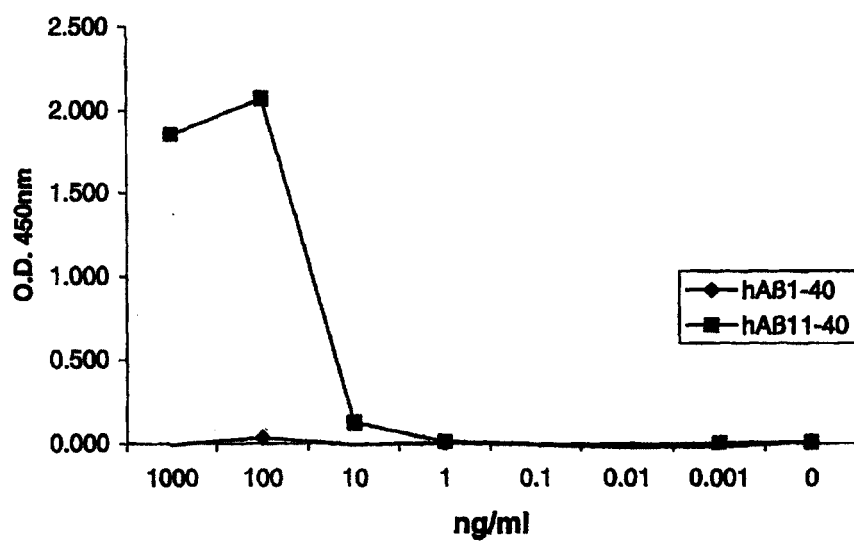


图 2C

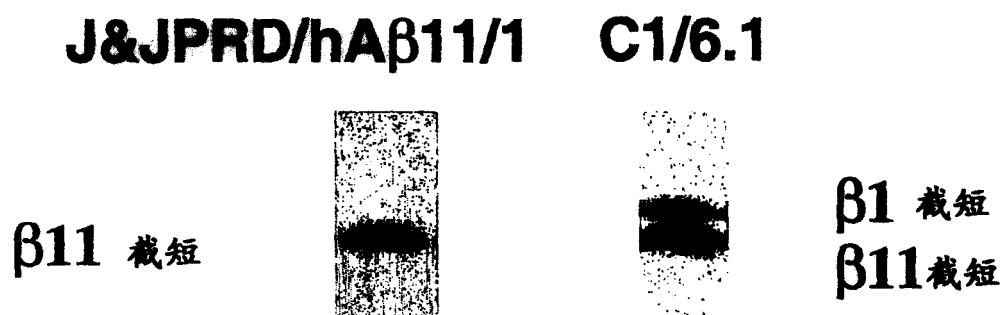


图 3

|                |                                                                                     |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | N - 11端截短的 $\beta$ - 淀粉样蛋白的单克隆抗体、组合物、方法和用途                                          |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN1685236A</a>                                                          | 公开(公告)日 | 2005-10-19 |
| 申请号            | CN03823116.6                                                                        | 申请日     | 2003-09-09 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 詹森药业有限公司                                                                            |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 詹森药业有限公司                                                                            |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 詹森药业有限公司                                                                            |         |            |
| [标]发明人         | MH默肯<br>MMPP范德梅伦                                                                    |         |            |
| 发明人            | M·H·默肯<br>M·M·P·P·范德梅伦                                                              |         |            |
| IPC分类号         | C07K16/18 C12N5/18 C12N5/20 G01N33/53 G01N33/68                                     |         |            |
| CPC分类号         | G01N2800/52 G01N2800/2821 G01N33/6896 G01N2333/4709 C07K16/18 A61P25/28 C07K2317/34 |         |            |
| 代理人(译)         | 刘玥                                                                                  |         |            |
| 优先权            | PCT/EP2002/011062 2002-09-27 WO                                                     |         |            |
| 其他公开文献         | CN100418984C                                                                        |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                      |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及的抗体包括特定的部分或变体，其特异性针对至少是人 $\beta$  - 淀粉样蛋白的N - 末端11位点，例如A $\beta$ 11 - x多肽。还提供了制备和使用所述抗体的方法，包括治疗性药剂、给药和设备。

