

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102898519 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 30

(21) 申请号 201210380708. 5

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2006. 11. 30

代理人 郭文洁 权陆军

(30) 优先权数据

60/740866 2005. 11. 30 US
60/778950 2006. 03. 03 US

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006. 01)
C12N 5/12(2006. 01)
A61K 39/395(2006. 01)
A61P 25/28(2006. 01)
G01N 33/53(2006. 01)
G01N 33/577(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

200680051985. 4 2006. 11. 30

(83) 生物保藏信息

PTA-7238 2005. 12. 01
PTA-7239 2005. 12. 01
PTA-7240 2005. 12. 01
PTA-7241 2005. 12. 01
PTA-7405 2006. 02. 28
PTA-7406 2006. 02. 28
PTA-7407 2006. 02. 28
PTA-7408 2006. 02. 28

(71) 申请人 雅培制药有限公司

地址 美国伊利诺伊州

申请人 艾博特股份有限两合公司

(72) 发明人 B. 拉布科夫斯基 S. 巴格霍恩

H. 希伦 U. 埃贝尔特

A. R. 斯特里宾格 P. 克勒

权利要求书 3 页 说明书 46 页
序列表 9 页 附图 13 页

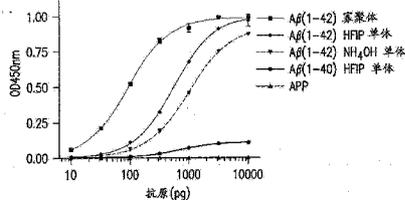
(54) 发明名称

抗淀粉样 β 蛋白的单克隆抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及可用于例如阿尔兹海默病或其它神经变性性疾病的预防、治疗和诊断的单克隆抗体(例如 8F5 和 8C5)。

用生物素酰化克隆 8F5 包被克隆 GGI 对
几种 AB 形式的夹心 ELISA
包被抗 AB 克隆 GGI \rightarrow AP 形式 \rightarrow 生物素酰化克隆 8F5
 \rightarrow 辣根过氧化物-POD \rightarrow 显色



	A β (1-42) 寡聚体	A β (1-42) HFIP 单体	A β (1-42) NH ₄ OH 单体	A β (1-40) HFIP 单体
BOTTOM	-0.001218	0.004304	0.006727	0.004288
TOP	0.9925	1.002	0.9292	0.1116
LOGSLOPE	1.958	2.745	3.033	2.825
HILLSLOPE	1.215	1.270	1.204	1.375
ECSO	90.74	555.8	1007	667.8

1. 一种分离抗体,所述分离抗体结合淀粉样 β (A β) 蛋白球聚体的特异性大于结合淀粉样 β 蛋白单体的特异性。
2. 权利要求 1 的分离抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。
3. 权利要求 2 的分离抗体,其中对所述球聚体的结合特异性与所述单体的结合特异性之比为至少 1.4。
4. 权利要求 3 的分离抗体,其中所述比例为 1.4-16.9。
5. 权利要求 4 的分离抗体,其中所述淀粉样 β 蛋白单体选自 A β (1-42) 单体和 A β (1-40) 单体。
6. 权利要求 5 的分离抗体,其中所述单克隆抗体由美国典型培养物保藏中心保藏号为 PTA-7238 或 PTA-7407 的杂交瘤产生。
7. 一种杂交瘤,所述杂交瘤的美国典型培养物保藏中心保藏号为 PTA-7238。
8. 一种单克隆抗体 (8F5),所述单克隆抗体由权利要求 7 所述的杂交瘤产生。
9. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体包含由 SEQ ID NO :1 编码的可变重链。
10. 权利要求 9 的单克隆抗体,其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。
11. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体包含由 SEQ ID NO :2 编码的可变轻链。
12. 权利要求 11 的单克隆抗体,其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。
13. 权利要求 11 的单克隆抗体,所述单克隆抗体还包含由 SEQ IDNO :1 编码的可变轻重链。
14. 权利要求 13 的单克隆抗体,其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。
15. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO :3。
16. 权利要求 15 的单克隆抗体,其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。
17. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO :4。
18. 权利要求 17 的单克隆抗体,其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。
19. 权利要求 17 的单克隆抗体,所述单克隆抗体还包含 SEQ IDNO :3。
20. 权利要求 19 的单克隆抗体,其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。
21. 一种分离抗体,所述分离抗体结合淀粉样 β 蛋白球聚体的特异性大于结合淀粉样 β 蛋白原纤维的特异性。
22. 权利要求 22 的分离抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。
23. 权利要求 23 的分离抗体,其中所述单克隆抗体由美国典型培养物保藏中心保藏号为 PTA-7238 或 PTA-7407 的杂交瘤产生。
24. 一种杂交瘤,所述杂交瘤的美国典型培养物保藏中心保藏号为 PTA-7407。
25. 一种单克隆抗体 (8C5),所述单克隆抗体由权利要求 24 所述的杂交瘤产生。
26. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体包含由 SEQ ID NO :11 编码的可变重链。
27. 权利要求 26 的单克隆抗体,其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。
28. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体包含由 SEQ ID NO :12 编码的可变轻链。
29. 权利要求 28 的单克隆抗体,其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。
30. 权利要求 28 的单克隆抗体,所述单克隆抗体还包含由 SEQ IDNO :11 编码的可变轻重链。
31. 权利要求 30 的单克隆抗体,其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。

32. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:19。
33. 权利要求 32 的单克隆抗体,其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。
34. 一种单克隆抗体,所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:20。
35. 权利要求 34 的单克隆抗体,其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。
36. 一种包含可变重链的单克隆抗体,其中所述可变重链包含至少一个选自 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15 的互补决定区(CDR)。
37. 一种包含可变轻链的单克隆抗体,其中所述可变轻链包含至少一个选自 SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18 的 CDR。
38. 权利要求 37 的单克隆抗体,所述单克隆抗体还包含可变重链,其中所述可变重链包含至少一个选自 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15 的 CDR。
39. 一种包含可变重链的单克隆抗体,其中所述可变重链包含至少一个选自 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 的互补决定区(CDR)。
40. 一种包含可变轻链的单克隆抗体,其中所述可变轻链包含至少一个选自 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 的 CDR。
41. 权利要求 40 的单克隆抗体,所述单克隆抗体还包含可变重链,其中所述可变重链包含至少一个选自 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 的 CDR。
42. 一种对阿尔兹海默病需要患者治疗或预防的方法,所述方法包括将权利要求 1 或权利要求 6 所述的分离抗体以足以实现所述治疗或预防的量给予所述患者。
43. 权利要求 42 的方法,其中所述分离抗体通过选自肌肉内给药、静脉内给药和皮下给药的途径给予。
44. 一种对怀疑患有阿尔兹海默病的患者进行诊断的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a. 从所述患者分离生物样品;
 - b. 使所述生物样品与权利要求 1 或权利要求 6 的所述分离抗体进行接触,接触的时间和条件足够使抗原/抗体复合物得以形成;和
 - c. 检测所述样品中所述抗原/抗体复合物的存在,所述复合物的存在表明所述患者患有阿尔兹海默病。
45. 权利要求 44 的方法,其中所述抗原是球聚体。
46. 一种对怀疑患有阿尔兹海默病的患者进行诊断的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a. 从所述患者分离生物样品;
 - b. 使所述生物样品与抗原进行接触,接触的时间和条件足够使抗原/抗体复合物得以形成;
 - c. 向所得的抗体/抗原复合物加入缀合物,加入的时间和条件足够使所述缀合物与结合抗体发生结合,其中所述缀合物包含权利要求 1 或权利要求 6 的所述分离抗体而且该抗体与能够产生可检测信号的信号产生化合物连接;和
 - d. 通过检测所述信号产生化合物所产生的信号检测在所述生物样品中可能存在的抗体的存在,所述信号表明所述患者患有阿尔兹海默病。
47. 权利要求 46 的方法,其中所述抗原是球聚体。
48. 一种对怀疑患有阿尔兹海默病的患者进行诊断的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a. 从所述患者分离生物样品;

b 使所述生物样品与抗抗体进行接触,其中所述抗抗体对权利要求 1 或权利要求 6 的所述抗体具有特异性,接触的时间和条件足够使抗抗体 / 抗体复合物得以形成,所述复合物含有所述生物样品中存在的抗体;

c. 向所得的抗抗体 / 抗体复合物加入缀合物,加入的时间和条件足够使所述缀合物与结合抗体发生结合,其中所述缀合物包含抗原,该抗原与能够产生可检测信号的信号产生化合物结合;和

d. 检测所述信号产生化合物所产生的信号,所述信号表明所述患者患有阿尔兹海默病。

49. 一种组合物,所述组合物包含权利要求 1 或权利要求 6 所述的分离抗体。

50. 一种对阿尔兹海默病需要患者预防或治疗的方法,所述方法包括将权利要求 49 所述的组合物以足以实现所述预防或治疗的量给予所述患者的步骤。

51. 一种疫苗,所述疫苗包含权利要求 1 或权利要求 6 的所述分离抗体及药学上可接受的佐剂。

52. 一种对阿尔兹海默病需要患者预防或治疗的方法,所述方法包括将权利要求 51 所述的疫苗以足以实现所述预防或治疗的量给予所述患者的步骤。

53. 一种鉴定对预测会发生阿尔兹海默病的患者适合的自动免疫接种的化合物的方法,所述方法包括:

a) 使一种或多种目的化合物暴露于权利要求 1 或权利要求 6 所述的分离抗体,暴露的时间和条件足以使所述一种或多种化合物与权利要求 1 或权利要求 6 所述的分离抗体发生结合;和

b) 鉴定与权利要求 1 或权利要求 6 所述的分离抗体发生结合的那些化合物,所鉴定出的化合物用于对预测会发生阿尔兹海默病的患者进行主动免疫接种。

54. 一种试剂盒,所述试剂盒包含:a) 权利要求 1 或权利要求 6 所述的分离抗体和 b) 包含与信号产生化合物连接的抗体的缀合物,其中所述缀合物的所述抗体不同于所述分离抗体。

55. 一种试剂盒,所述试剂盒包含:a) 抗权利要求 1 或权利要求 6 所述的分离抗体的抗抗体和 b) 包含与信号产生化合物连接的抗原的缀合物。

56. 权利要求 55 的试剂盒,其中所述抗原是球聚体。

抗淀粉样 β 蛋白的单克隆抗体及其用途

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 11 月 30 日,申请号为 200680051985.4 的、发明名称和本发明相同的发明专利申请的分案申请。

[0002] 发明背景

技术领域

[0003] 本发明涉及可例如用于阿尔兹海默病或其它神经变性疾病预防、治疗和诊断的单克隆抗体(例如 8F5 和 8C5)。

技术背景

[0004] 阿尔兹海默病(AD)是一种认知能力进行性丧失以及特有的神经病理学特征包括大脑若干区域的淀粉样蛋白沉积、神经原纤维缠结和神经元缺失为特征的神经变性的疾病,参见 Hardy 和 Selkoe (Science297, 353(2002);Mattson (Nature431, 7004(2004))。淀粉样蛋白沉积的主要成分是淀粉样蛋白 β 肽(A β),其中以长 42 个氨基酸的类型(A β 1-42)最为显著。

[0005] 具体的说,淀粉样 β (1-42) 蛋白质是具有 42 个氨基酸的多肽,其通过蛋白水解处理淀粉样前体蛋白(APP) 衍生得到。除了淀粉样 β (1-42) 蛋白质的人变体外,这还包括存在于人以外的生物体、尤其是其它哺乳动物、又特别是大鼠中的淀粉样 β (1-42) 蛋白质的亚型。在含水环境中趋向于发生聚合的这种蛋白质可以迥然不同的分子形式存在。

[0006] 不溶性蛋白的沉积与痴呆病症如阿尔兹海默病的发生或发展的简单相关被证实不可信(Terry et al., Ann. Neurol. 30, 572-580(1991);Dickson et al., Neurobiol. Aging16, 285-298(1995))。相反,突触和认知性感觉的丧失似乎与可溶性形式的 A β (1-42) 更有关联(Lue et al., Am. J. Pathol. 155, 853-862(1999);McLean et al., Ann. Neurol. 46, 860-866(1999))。

[0007] 虽然过去已经产生出抗 A β (1-42) 的多克隆和单克隆抗体,但无一被证实能在动物和/或人中产生所需的疗效而又不产生严重的副作用。例如,对高龄 APP23 小鼠接受的持续 5 个月每周一次的 N 末端定向性抗 A β (1-42) 抗体的临床前研究所得的被动免疫结果显示治疗相关性副作用。特别是这些小鼠比用盐水处理的小鼠显示出微出血量和严重程度加剧(Pfeifer et al., Science2002298:1379)。最近也有描述高龄(> 24 个月) Tg2576 和 PDAPP 小鼠有类似的出血增加情况(Wilcock et al., JNeuroscience2003, 23: 3745-51;Racke et al., J Neurosciences2005, 25:629-636)。在这两种小鼠品系中,注射抗 A β (1-42) 都导致微出血的显著增加。因此,存在开发预防或减慢疾病发展又不会诱发人体负面的和潜在的致命影响的生物制品的巨大的治疗需求。鉴于大众寿命的日益延长,由于这种延长,每年诊断出的阿尔兹海默病患者的数量增加,因此这种需求尤其明显。此外,这种抗体将允许对有阿尔兹海默病症状的患者进行正确的诊断,而目前的诊断只能在尸体解剖时才能得到确证。另外,所述抗体将允许对造成这种衰竭性疾病的蛋白质和其它生物因子的生物特性进行阐释。

[0008] 本文提到的所有专利和出版物通过引用整体结合到本文中。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明包括这样的分离抗体,其对淀粉样 β (A β) 蛋白球聚体 (globulomer) 的结合特异性大于对淀粉样 β 蛋白单体的结合特异性。因此,观察到优先结合现象。抗体可以是例如单克隆抗体如 8F5 或 8C5。对球聚体的结合特异性与对单体的结合特异性的比例为至少 1.4。具体的说,该比例优选为至少约 1.4 到至少约 16.9。(1.0-17.5 的比例,包括端点在内,及其小数部分,也被认为属于本发明的范围。例如,1.1、1.2、1.3、...、2.0、2.1、2.2...、17.1、17.2、17.3、17.4、17.5 以及其间的全部整数及其百分数被认为属于本发明的范围之内。) 淀粉样 β 蛋白单体可以是例如 A β (1-42) 单体或 A β (1-40) 单体。

[0011] 此外,本发明还涵括由美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) 保藏号为 PTA-7238 的杂交瘤产生的单克隆抗体 (本文称为“8F5”) 以及产生这种单克隆抗体 (即 8F5) 的杂交瘤。同样,本发明包括由美国典型培养物保藏中心保藏号为 PTA-7407 的杂交瘤产生的单克隆抗体 (本文称为“8C5”) 以及产生这种单克隆抗体 (即 8C5) 的杂交瘤。

[0012] 另外,本发明包括包含有由 SEQ ID NO :1 编码的可变重链的单克隆抗体。这个抗体可以是鼠抗体、人抗体或人源化抗体。

[0013] 此外,本发明包括包含有由 SEQ ID NO :2 编码的可变轻链的单克隆抗体。这个抗体同样可以是鼠抗体、人抗体或人源化抗体。该抗体还可包含有由 SEQ ID NO :1 编码的可变轻重链,且可以是人抗体或人源化抗体。

[0014] 而且,本发明包括包含有 SEQ ID NO :3 的单克隆抗体。该抗体可以是鼠抗体、人抗体或人源化抗体。

[0015] 此外,本发明涵括包含有 SEQ ID NO :4 的单克隆抗体。这个抗体可以是鼠抗体、人抗体或人源化抗体。这个抗体还可包含有 SEQ ID NO :3,且可以是鼠抗体、人抗体或人源化抗体。

[0016] 另外,本发明包括包含有由 SEQ ID NO :11 编码的可变重链的单克隆抗体。这个抗体可以是鼠抗体、人抗体或人源化抗体。

[0017] 此外,本发明包括包含有由 SEQ ID NO :12 编码的可变轻链的单克隆抗体。这个抗体同样可以是鼠抗体、人抗体或人源化抗体。该抗体还可包含有由 SEQ ID NO :11 编码的可变重链,且可以是人抗体或人源化抗体。

[0018] 而且,本发明包括包含有 SEQ ID NO :19 的单克隆抗体。该抗体可以是鼠抗体、人抗体或人源化抗体。

[0019] 此外,本发明涵括包含有 SEQ ID NO :20 的单克隆抗体。这个抗体可以是鼠抗体、人抗体或人源化抗体。这个抗体还可包含有 SEQ ID NO :19,且可以是鼠抗体、人抗体或人源化抗体。

[0020] 本发明还包括这样的分离抗体,其对淀粉样 β 蛋白球聚体 (globulomer) 的结合特异性大于对淀粉样 β 蛋白原纤维的结合特异性。这个抗体可以是例如单克隆的,可以由美国典型培养物保藏中心保藏号为 PTA-7243 的杂交瘤或保藏号为 PTA-7407 的杂交瘤产生的单克隆抗体。产生这些单克隆抗体的杂交瘤也属于本发明的范围之内。

[0021] 此外,本发明包括这样的抗体,其中可变重链的互补决定区 (CDR) 中至少有一个

选自 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :7。

[0022] 而且,本发明还包括这样的抗体,其中可变轻链的 CDR 中至少有一个选自 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10。这个抗体还可包含至少一个选自 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :7 的可变重链 CDR。

[0023] 本发明还包括这样的抗体,其中可变重链的 CDR 中至少有一个选自 SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14 和 SEQ ID NO :15。

[0024] 此外,本发明还涵括这样的抗体,其中可变轻链的 CDR 中至少有一个选自 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :18。这个抗体还可包含至少一个选自 SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14 和 SEQ IDNO :15 的可变重链 CDR。

[0025] 另外,本发明涵括对阿尔兹海默病需要患者治疗或预防的方法。这个方法包括将上述分离抗体中的任何一种或多种以足以实现治疗或预防的量给予该患者。

[0026] 本发明分离抗体可例如通过选自肌肉内给药、静脉内给药和皮下给药的途径来给予。

[0027] 本发明还包括对怀疑患有阿尔兹海默病的患者进行诊断的方法。这个方法包括以下步骤:1) 从该患者分离生物样品;2) 使该生物样品与至少一种上述抗体进行接触,接触的时间和条件足够使抗原/抗体复合物得以形成;和3) 检测所述样品中抗原/抗体复合物的存在,复合物的存在表明该患者患有阿尔兹海默病。该抗原可以是例如球聚体或者其部分或片段,该部分或片段具有与完全球聚体相同的功能特性(例如结合活性)。

[0028] 此外,本发明包括另一种对怀疑患有阿尔兹海默病的患者进行诊断的方法。这个方法包括以下步骤:1) 从该患者分离生物样品;2) 使该生物样品与抗原进行接触,接触的时间和条件足够使抗原/抗体复合物得以形成;3) 向所得的抗体/抗原复合物加入缀合物,加入的时间和条件足够使该缀合物与结合抗体发生结合,其中该缀合物包含上述抗体中的一种,这个抗体与能够产生可检测信号的信号产生化合物连接;和4) 通过检测信号产生化合物所产生的信号检测在该生物样品中可能存在的抗体的存在,该信号表明该患者患有阿尔兹海默病。该抗原可以是球聚体或者其部分或片段,该部分或片段具有与完全球聚体相同的功能特性(例如“结合活性”)。

[0029] 本发明包括又一种对怀疑患有阿尔兹海默病的患者进行诊断的方法。这个方法包括以下步骤:1) 从该患者分离生物样品;2) 使该生物样品与抗抗体进行接触,其中该抗抗体对上述抗体中的一种具有特异性,接触的时间和条件足够使抗抗体/抗体复合物得以形成,该复合物含有该生物样品中存在的抗体;3) 向所得的抗抗体/抗体复合物加入缀合物,加入的时间和条件足够使该缀合物与结合抗体发生结合,其中该缀合物包含抗原,这个抗原与能够产生可检测信号的信号产生化合物结合;和4) 检测信号产生化合物所产生的信号,该信号表明该患者患有阿尔兹海默病。

[0030] 此外,本发明包括包含有上述抗体中的任何一种或多种(例如 8F5 和 8C5)的组合物。

[0031] 本发明包括另一种对阿尔兹海默病需要患者预防或治疗的方法。这个方法包括将上述组合物以足以实现预防或治疗的量直接给予该患者的这个步骤。

[0032] 另外,本发明涵括包含有上述抗体中的至少一种和药学上可接受的佐剂的疫苗。

[0033] 而且,本发明包括又一种对阿尔兹海默病需要患者预防或治疗的方法。这个方法

包括将上述疫苗以足以实现预防或治疗的量给予该患者的这个步骤。

[0034] 此外,本发明涵括鉴定适用于对预测会发生阿尔兹海默病的患者进行自动免疫接种的化合物的方法。这个方法包括:1)使一种或多种目的化合物暴露于上述抗体中的一种或多种,暴露的时间和条件足以使该一种或多种化合物与该一种或多种抗体发生结合;2)鉴定与该一种或多种抗体发生结合的那些化合物,所鉴定出的化合物用于对预测会发展阿尔兹海默病的患者进行主动免疫。

[0035] 还有,本发明包括这样的试剂盒,其包括:a)上述分离抗体中的至少一种,和b)包含有与信号产生化合物连接的抗体的缀合物,其中该缀合物的该抗体不同于该分离抗体。该试剂盒还可包括包装插页,上有关于试剂盒的各成分如何进行使用的说明。

[0036] 本发明还涵括这样的试剂盒,其包括:a)抗上述抗体中的一种的抗体,和b)包含有与信号产生化合物连接的抗原的缀合物。该抗原可以是球聚体或者其片段或部分,该片段或部分具有与球聚体相同的功能特性(例如结合活性)。而且,该试剂盒还可包括包装插页,上有关于试剂盒的各成分如何进行使用的说明。

[0037] 附图简述

[0038] 图1图解比较了8F5对球聚体相对于A β (1-42)单体、A β (1-40)和sAPP的选择性。8F5的选择性系数可以计算为各EC₅₀值之间的比例(与HFIP中的A β (1-42)单体之比:555.8/90.74=6.1;与NH₄OH中的A β (1-42)单体之比:1007/90.74=11.1;与A β (1-40)单体之比:667.8/90.74=7.4;与sAPP之比>100)。

[0039] 图2图解说明结合原纤维的重链和轻链抗体(泳道4、6、8)和上清液中相应的非结合游离部分(泳道3、5、7)的SDS-PAGE分析。

[0040] 图3图解说明来自患轻度认知损害(MCI,左)或阿尔兹海默病(AD,右)患者的CSF样品中的A β 42和A β 40含量。在两组中,可以观察到与标准抗体6E10相比或者与用相同ELISA进行的直接样品分析相比,8F5结合较高比例的A β (1-42)和较少或相等数量的A β (1-40)。

[0041] 图4图解说明三组APP转基因小鼠(即6G1、8F5、PBS)和一组非转基因同胎仔鼠(野生型)中的新物体认知指数,该指数是对未知物体与对熟知物体所花的时间。各小鼠(数字在柱条下方给出)用单克隆抗体6G1或8F5进行免疫或者用介质(即磷酸缓冲盐水PBS和野生型)进行处理,做法是连续三周每周一次腹膜内注射。最后一次注射的当天,进行新物体认知试验。PBS组和野生型组之间的差异表明这个实验示例(paradigm)中的APP转基因小鼠有认知缺损。注射PBS的小鼠以机会水平认知(即不显著偏离50),而所有其它小鼠显示物体识别力(t-检验;星号)。当将抗体处理过的APP转基因小鼠的认知水平与对照组进行比较时发现,与PBS处理的小鼠有显著差异,但与野生型小鼠没有显著差异(ANOVA加post-hoc t-检验;圆圈),表明用抗体处理逆转了这些APP转基因小鼠的认知缺损。

[0042] 图5(A)图解说明编码本文称为“8F5”的单克隆抗体的可变重链的DNA序列(SEQ ID NO:1),图5(B)说明编码单克隆抗体8F5的可变轻链的DNA序列(SEQ ID NO:2)。(互补决定区(CDR)在每个序列中加下划线表示;另参见图6。)

[0043] 图6(A)图解说明单克隆抗体8F5的可变重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:3),图6(B)图解说明单克隆抗体8F5的可变轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。可变重链的一

个 CDR 由氨基酸序列 SYGMS (SEQ ID NO :5) 表示。可变重链的另一个 CDR 由氨基酸序列 ASINSNGGSTYYPD SVKG (SEQ ID NO :6) 表示,可变重链的又一个 CDR 由氨基酸序列 SGDY (SEQ ID NO :7) 表示。可变轻链的一个 CDR 由氨基酸序列 RSSQSLVYSNGD TYLH (SEQ ID NO :8) 表示。可变轻链的另一个 CDR 由氨基酸序列 KVS NRFS (SEQ ID NO :9) 表示,可变轻链的又一个 CDR 由氨基酸序列 SQSTHVPWT (SEQ ID NO :10) 表示。所有上述 CDR 在图 6 (A) 和 6 (B) 中以下划线表示。

[0044] 图 7 显示不同浓度的抗体与阿尔兹海默病 (AD) 患者或老龄 APP 转基因小鼠的新皮层的横切片的结合。具体的说,图 7 (A) 图解确认在 APP 转基因小鼠系 Tg2576 和在 AD 患者 (RZ55) 中用刚果红染色淀粉样沉积物为大脑组织中的斑块和脑血管中的大脑淀粉样血管病 (CAA)。图 7 (B) 图解说明对 AD 患者 (RZ16) 中的 A β (淀粉样斑块) 脑实质沉积物的染色只在 6G1 和市售可得抗体 6E10 出现,而 8F5 和 8C5 显示相当弱的染色。图 7 (C) 图解说明对 Tg2576 小鼠中的 A β (淀粉样斑块) 脑实质沉积物的强染色只在 6G1 和市售可得抗体 6E10 出现,而 8F5 和 8C5 显示相当弱的染色。图 7 (D)-(G) 图解说明用图像分析对组织学图像中的 A β 斑块染色进行的分析定量。光密度值 (0% = 无染色) 由斑块的灰度值减去背景组织的灰度值计算得出。(图 (D) = Tg2576 小鼠中结合 0.7 μ g/ml 抗体;图 (E) = APP/L 小鼠中结合 0.07-0.7 μ g/ml 抗体;图 (F) = AD 患者 (RZ55) 中结合 0.7 μ g/ml 抗体;图 (G) = AD 患者 (RZ16) 中结合 0.07-0.7 μ g/ml 抗体) 对市售可得抗体 6E10 (星号) 和 4G8 (圆圈) 与抗体 6G1、8C5 和 8F5 (一个星号/圆圈 :p < 0.05,两个星号/圆圈 :p < 0.01,三个星号/圆圈 :p < 0.001,均相对于于对照比较;在 ANOVA 后,post-hoc Bonferroni 的 t 检验 p < 0.001) 之间的染色差异进行了统计学上的评估(图 (D) 和图 (E))。在图 (E) 和 (G) 中,抗体 8C5 和 8F5 总是显示出比市售可得抗体 6E10 和 4G8 显著更低的染色 (ANOVA 检验 p < 0.001 后,post-hoc 的 t 检验中,p < 0.05)。图 (H) 图解说明对 A β 血管沉积物的强烈染色 (箭头) 只在 6G1 和市售可得抗体 6E10 出现,而 8F5 或 8C5 的染色要弱得多。在 Tg2576 小鼠中发现定性类似情况 (这里未显示)。

[0045] 图 8 图解比较了 8C5 对球聚体相对于 A β (1-42) 单体、A β (1-40) 和 sAPP 的选择性。8C5 的选择性系数可计算为各 EC50 值之间的比值 (对 HFIP 中的 A β (1-42) 单体 :2346/568.2 = 4.1 ;对 NH₄OH 中的 A β (1-42) 单体 :> 100 ;对 A β (1-40) 单体 :> 100 ;对 sAPP :> 100)

[0046] 图 9 (A) 图解说明了编码 8C5 的重链的核苷酸序列 (SEQ ID NO :11),图 9 (B) 图解说明了编码 8C5 的轻链的核苷酸序列 (SEQ ID NO :12)。编码图 10 (A) 和 10 (B) 中所述的相应 CDR 的核苷酸序列以下划线表示。

[0047] 图 10 (A) 说明单克隆抗体 8C5 的可变重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO :19),图 10 (B) 说明单克隆抗体 8F5 的可变轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO :20)。可变重链的一个 CDR 由氨基酸序列 SYGMS (SEQ ID NO :13) 表示。可变重链的另一个 CDR 由氨基酸序列 SIKNNGGSTYYPDSLKG (SEQ ID NO :14) 表示,可变重链的又一个 CDR 由氨基酸序列 SGDY (SEQ ID NO :15) 表示。可变轻链的一个 CDR 由氨基酸序列 RSSQSLVHSNGD TFLH (SEQ ID NO :16) 表示。可变轻链的另一个 CDR 由氨基酸序列 KVS NRFS (SEQ ID NO :17) 表示,可变轻链的又一个 CDR 由氨基酸序列 SQSIHVPWT (SEQ ID NO :18) 表示。所有上述 CDR 在图 10 (A) 和 10 (B) 中以下划线表示。

[0048] 发明详述

[0049] 本发明涉及本文称为“8F5”的单克隆抗体以及其它相关抗体（例如 8C5）。这些抗体可例如用于阿尔兹海默病和其它神经变性疾病诊断、预防和治疗。

[0050] 单克隆抗体 8F5 及单克隆抗体 8C5 具有许多值得关注的特性，这些特性使得它们成为极其值得关注的治疗用候选者及极其有用的诊断用候选者。例如，单克隆抗体 8F5 和 8C5 对 A β (1-42) 球聚体的结合优先于对单体或原纤维的结合。

[0051] 术语“A β (X-Y)”在本文中指人淀粉样 β 蛋白质中从氨基酸位置 X 到氨基酸位置 Y、包括 X 和 Y 在内的氨基酸序列，具体的说指氨基酸序列 DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGW IA 或其任何天然变体中从氨基酸位置 X 到氨基酸位置 Y、包括位置 X 和位置 Y 在内的氨基酸序列，或者具有最多三个另外的氨基酸置换、而这些置换没有一个会妨碍球聚体的形成的序列，所述变体具体的说是具有至少一个选自以下的突变的那些变体：A2T、H6R、D7N、A21G（“Flemish”）、E22G（“Arctic”）、E22Q（“Dutch”）、E22K（“Italian”）、D23N（“Iowa”）、A42T 和 A42V，其中数字是相对于 A β 肽的起始位置。“另外的”氨基酸置换在本文中定义为与自然界中所不存在的规范序列的任何偏差。

[0052] 更具体的说，术语“A β (1-42)”在本文中指人淀粉样 β 蛋白质中从氨基酸位置 1 到氨基酸位置 42、包括 1 和 42 在内的氨基酸序列，具体的说指从氨基酸位置 1 到氨基酸位置 42、包括 1 和 42 在内的氨基酸序列 DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGW IA（对应于氨基酸位置 1-42），或其任何天然变体，所述变体可以是例如具有至少一个选自以下的突变的那些变体：A2T、H6R、D7N、A21G（“Flemish”）、E22G（“Arctic”）、E22Q（“Dutch”）、E22K（“Italian”）、D23N（“Iowa”）、A42T 和 A42V，其中数字是相对于 A β 肽的起始位置，或者具有最多三个另外的氨基酸置换、而这些置换没有一个会妨碍球聚体的形成的序列。同样，术语“A β (1-40)”在本文中指人淀粉样 β 蛋白质中从氨基酸位置 1 到氨基酸位置 40、包括 1 和 40 在内的氨基酸序列，具体的说指从氨基酸位置 1 到氨基酸位置 40、包括 1 和 40 在内的氨基酸序列 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGW 或其任何天然变体，所述变体包括例如具有至少一个选自以下的突变的那些变体：A2T、H6R、D7N、A21G（“Flemish”）、E22G（“Arctic”）、E22Q（“Dutch”）、E22K（“Italian”）和 D23N（“Iowa”），其中数字是相对于 A β 肽的起始位置，或者具有最多三个另外的氨基酸置换、而这些置换没有一个会妨碍球聚体的形成的序列。

[0053] 术语“A β (X-Y) 球聚体”（也称“A β (X-Y) 球形寡聚体”）在本文中指以上所定义的 A β (X-Y) 肽的可溶性、球形、非共价的联合体 (association)，该联合体具有均匀性和独特的物理特性。A β (X-Y) 球聚体是 A β (X-Y) 肽的稳定、非纤维状、寡聚的集合体 (assembly)，可通过将该肽与阴离子去污剂一起温育来获得。与单体和原纤维相比，这些球聚体的特征是具有确定的亚单位集合体数（例如 PCT 国际申请公开说明书 W004/067561 中所描述，早期集合体形式，n = 3-6，“寡聚体 A”，和后期集合体形式，n = 12-14，“寡聚体 B”）。球聚体具有 3 维球形结构（“熔融小球 (molten globule)”，参见 Barghorn et al., 2005, J Neurochem, 95, 834-847）。它们还可通过一种或多种以下特征来表征：

[0054] - 能用混杂蛋白酶（如嗜热菌蛋白酶或内切蛋白酶 GluC）切割 N 末端氨基酸 X-23，产生截短形式的 A β (X-Y) 球聚体；

[0055] - 混杂蛋白酶和抗体不能接近 C 末端氨基酸 24-Y；

[0056] - 截短形式的这些 A β (X-Y) 球聚体保持了球聚体的 3 维核心结构,同时核心表位 A β (20-Y) 在其球聚体构象下具有更好的可接近性。

[0057] 根据本发明,具体的说出于评估本发明抗体的结合亲和力的目的,术语“A β (X-Y) 球聚体”在本文中指可通过国际申请公开说明书 W004/067561 (其通过引用整体结合到本文中) 描述的方法获得的产物。该方法包括使天然、重组或合成的 A β (X-Y) 肽或其衍生物解折叠;使至少部分上解折叠的 A β (X-Y) 肽或其衍生物暴露于去污剂;减少去污作用和继续进行温育。

[0058] 出于使肽解折叠的目的,可让氢键破坏剂如六氟异丙醇 (HFIP) 作用于蛋白质。当作用温度为约 20-50°C、具体的说约 35-40°C 时,几分钟、例如约 10-60 分钟的作用时间就足够了。随后将被蒸发至干的、优选为浓缩形式的残余物溶解于可与含水缓冲液混溶的合适有机溶剂如二甲亚砜 (DMSO),产生出至少部分上解折叠的肽或其衍生物的悬浮液,该悬浮液随后可以进行使用。如果需要,可将悬浮液原液在低温下、例如在约 -20°C 下储藏临时的一段时间。

[0059] 或者,可将肽或其衍生物吸收在轻微酸性的、优选含水的溶液中,例如约 10mM HCl 水溶液。在大约几分钟的温育时间后,将不溶性成分离心除去。以 10,000g 几分钟就适宜了。这些方法步骤优选在室温下、即 20-30°C 范围内进行。离心后获得的上清液含有 A β (X-Y) 肽或其衍生物,可在低温下、例如在约 -20°C 下储藏临时的一段时间。

[0060] 接下来暴露于去污剂涉及到肽或其衍生物发生寡聚化产生中间体型的寡聚体 (在国际申请公开说明书 W004/067561 中称为寡聚体 A)。出于这个目的,让去污剂作用于任选至少部分解折叠的肽或其衍生物,直到产生了足够的中间寡聚体。优选的是使用离子型去污剂,特别是阴离子去污剂。

[0061] 根据一个具体的实施方案,使用下式 (I) 的去污剂:

[0062] R-X,

[0063] 其中基团“R”是具有 6-20 个、优选 10-14 个碳原子的无支链或有支链烷基或者具有 6-20 个、优选 10-14 个碳原子的无支链或有支链烯基,基团“X”是酸性基团或其盐,该 X 优选选自 -COO^{M+}、-SO₃^{M+}, 最优选为 -OSO₃^{M+}, M⁺ 为氢阳离子或者优选选自碱金属阳离子、碱土金属阳离子和铵阳离子的无机或有机阳离子。最有利的是式 (I) 其中 R 为无支链烷基的去污剂,该烷基中特别值得一提的是烷-1-基基团。特别优选的是十二烷基硫酸钠 (SDS)。还可方便地使用月桂酸和油酸。十二烷酰肌氨酸这种去污剂的钠盐 (也称 sarkosyl NL-30 或 Gardol[®]) 也特别有利。

[0064] 去污剂作用的时间具体的说取决于寡聚化的肽或其衍生物是否已经解折叠,且如果已经解折叠,则取决于解折叠程度如何。如果根据解折叠步骤,肽或其衍生物已预先用氢键破坏剂 (即具体的说用六氟异丙醇) 进行了处理,则当作用温度为约 20-50°C、具体的说约 35-40°C 时,作用时间为若干小时、有利地约 1-20 小时、具体的说约 2-10 小时。如果是从解折叠较少或者几乎没有解折叠的肽或其衍生物出发,则宜相应增加作用时间。如果肽或其衍生物已例如根据上述程序进行了预处理作为 HFIP 处理的替代,或者所述肽或其衍生物直接经过寡聚化,则当作用温度为约 20-50°C、具体的说约 35-40°C 时,作用时间为约 5-30 小时、尤其是约 10-20 小时。温育后,不溶性成分通过离心法方便地除去。以 10,000g 几分钟就适宜了。

[0065] 去污剂浓度的选定取决于所用的去污剂。如果是使用 SDS, 则适宜浓度为 0.01-1% (重量)、优选 0.05-0.5% (重量)、例如约 0.2% (重量)。如果是使用月桂酸或油酸, 则适宜稍高的浓度, 例如 0.05-2% (重量)、优选 0.1-0.5% (重量)、例如约 0.5% (重量)。去污作用发生于近似生理学含盐浓度范围内。因此, 具体的说, NaCl 适宜浓度为 50-500mM、优选 100-200mM、更优选约 140mM。

[0066] 随后的去污剂作用的减少和温育的继续涉及到进一步寡聚化产生本发明的 A β (X-Y) 球聚体 (在国际申请公开说明书 W004/067561 中称为寡聚体 B)。由于从前面步骤获得的组合物常常含有去污剂和处于生理范围的盐浓度, 因此宜减少去污剂作用并优选还减少盐浓度。这可以这样来进行: 将去污剂和盐例如适宜地用水或较低盐浓度的缓冲液 (例如 Tris-HCl, pH7.3) 进行稀释, 从而减少去污剂和盐的浓度。稀释系数是约 2-10、有利地是约 3-8、特别合适的是约 4。去污剂作用的减少也可通过加入能中和这个去污剂作用的物质来实现。这些物质的实例包括能够将去污剂络合的物质, 如能够在纯化和提取措施中使细胞稳定化的物质, 例如特别是 E0/P0 嵌段共聚物, 具体的说商标为 Pluronic[®] F68 的嵌段共聚物。同样可以使用的是烷氧基化的、特别是乙氧基化的烷基酚, 如 Triton[®] X 系列的乙氧基化叔辛基酚, 具体的说是 Triton[®] X100、3-(3-胆酰胺丙基二甲氨基) 丙磺酸盐 (3-(3-c holamidopropyl dimethyl ammonio)-1-propanesulfonate, CHAPS[®]), 或者烷氧基化的、具体的说乙氧基化的脱水山梨糖醇脂肪酯, 如 Tween[®] 系列的乙氧基化脱水山梨糖醇脂肪酯, 具体的说是 Tween[®] 20, 所用浓度范围在特定临界胶束浓度附近或以上。

[0067] 随后将溶液温育至产生出足够的 A β (X-Y) 球聚体。当作用温度为约 20-50°C、具体的说约 35-40°C 时, 作用时间是若干小时、优选约 10-30 小时、具体的说约 15-25 小时。然后可将溶液浓缩, 可能出现的残余物可通过离心除去。同样, 以 10,000g 几分钟就适宜了。离心后获得的上清液含有本文所述的 A β (X-Y) 球聚体。

[0068] A β (X-Y) 球聚体可例如通过超滤、透析、沉淀或离心进行最终回收。进一步优选的是, A β (X-Y) 球聚体在变性条件下例如通过 SDS-PAGE 进行电泳分离能产生双条带 (例如对于 A β (1-42) 来说表观分子量为 38/48kDa), 特别优选的是, 在分离前对寡聚体进行戊二醛处理时, 这些双条带合并成一个条带。还优选的是, 对球聚体进行尺寸排阻色谱法产生单一峰 (例如对于 A β (1-42) 来说对应于大约 60kDa 的分子量)。这个方法特别适合于从 A β (1-42) 肽出发获得 A β (1-42) 球聚体。优选地, 球聚体显示出对神经元细胞的亲和力, 同时还显示神经调节作用。“神经调节作用”定义为神经元的长期抑制作用, 该抑制作用导致神经元在可塑性方面出现功能异常。

[0069] 根据本发明的另一个方面, 术语“A β (X-Y) 球聚体”在本文中指本质上由 A β (X-Y) 亚单位组成的球聚体, 其中优选的是平均来说 12 个亚单位中至少有 11 个是 A β (X-Y) 类型, 更优选的是, 小于 10% 的球聚体包含任何非 A β (X-Y) 肽, 最优选的是, 制品中的非 A β (X-Y) 肽的含量低于检测阈。更具体的说, 术语“A β (1-42) 球聚体”在本文中指包含如上定义的 A β (1-42) 单位的球聚体; 术语“A β (12-42) 球聚体”在本文中指包含如上定义的 A β (12-42) 单位的球聚体; 术语“A β (20-42) 球聚体”在本文中指包含如上定义的 A β (20-42) 单位的球聚体。

[0070] 术语“交联 A β (X-Y) 球聚体”在本文中指可通过对如上定义的 A β (X-Y) 球聚体

的组成单位进行交联、优选化学交联、更优选醛交联、最优选戊二醛交联而从该球聚体获得的分子。在本发明的另一个方面，交联球聚体基本上是这样的球聚体：其中的各单位至少部分上通过共价键连接，而不是只通过非共价相互作用保持在一起。

[0071] 术语“ $A\beta$ (X-Y) 球聚体衍生物”在本文中具体是指通过与有助于检测的基团发生共价连接而被标记的球聚体，所述基团优选为：荧光团，例如异硫氰酸荧光素、藻红蛋白、维多利亚水母 (*Aequorea victoria*) 荧光蛋白、线鱗科 (*Dictyosoma*) 荧光蛋白或者它们的任何组合或荧光活性污生物；发色团；化学发光团 (chemoluminophore)，例如萤光素酶，优选北美萤火虫 (*Photinus pyralis*) 萤光素酶、费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 萤光素酶或者它们的任何组合或化学发光活性衍生物；酶促活性基团，例如过氧化物酶如辣根过氧化物酶或者其酶促活性衍生物；电子致密基团 (electron-dense group)，例如含重金属基团如含金基团；半抗原，例如酚衍化半抗原；强抗原性结构，例如如通过 Kolaskar 和 Tongaonkar 的算法预测具有抗原性的肽序列；另一分子的适体 (aptamer)；螯合基团，例如六聚组氨酸基团；能介导进一步的特异性蛋白质-蛋白质相互作用的天然的或天然衍生的蛋白质结构，例如 fos/jun 对中的成员；磁性基团，例如铁磁性基团；或者放射性基团如包含 1H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I 或它们的任何组合的基团；或者是指这样的球聚体：其通过高亲和力和相互作用共价或非共价地、优选共价地与能促进失活、螯合、降解和 / 或沉淀的基团连接而附加标识，优选标识能促进体内降解的基团，更优选标识遍在蛋白，在这种情况下特别优选的是这一被标识寡聚体是在体内集合装配；或者是指通过上述基团的任何组合进行修饰的球聚体。这种标记的和附加标识的基团和将它们与蛋白质连接的方法是本领域公知的。标记和 / 或附加标识可在进行球聚体化 (globulomerization) 之前、过程中或之后进行。在本发明的另一个方面，球聚体衍生物是可通过标记和 / 或附加标识反应从球聚体获得的分子。相应地，术语“ $A\beta$ (X-Y) 单体衍生物”在本文中具体是指如对球聚体所述进行标记或附加标识的 $A\beta$ 单体。

[0072] 术语“较大亲和力”在本文中指这样的相互作用的程度，其中未结合抗体和未结合球聚体与抗体-球聚体复合物之间的平衡更有利于抗体-球聚体复合物。同样，术语“较小亲和力”在本文中指这样的相互作用的程度，其中未结合抗体和未结合球聚体与抗体-球聚体复合物之间的平衡更有利于未结合抗体和未结合球聚体。

[0073] 术语“ $A\beta$ (X-Y) 单体”在本文中指 $A\beta$ (X-Y) 肽的分离形式，优选没有参与到与其它 $A\beta$ 肽的实质上非共价相互作用的 $A\beta$ (X-Y) 肽形式。实际上， $A\beta$ (X-Y) 单体常常是以水溶液的形式提供。优选地，单体水溶液当用于例如测定本发明抗体的结合亲和力时，含有 0.05% -0.2%、更优选约 0.1% 的 NaOH。在另一个优选的情况中，单体水溶液含有 0.05% -0.2%、更优选约 0.1% 的 NaOH。当使用时，宜以适当的方式将溶液进行稀释。此外，溶液通常宜在其制备后 2 小时内、具体的说 1 小时内、特别是 30 分钟内使用。

[0074] 术语“原纤维”在本文中指由非共价缔合的单个 $A\beta$ (X-Y) 肽的集合体构成的分子结构，该集合体在电子显微镜下显示纤维状结构，能结合刚果红，在偏振光下显示双折射现象，其 X-射线衍射图样是交叉 β 折叠结构。原纤维还可定义为可通过这样的方法获得的分子结构，该方法包括使合适的 $A\beta$ 肽在例如 0.1M HCl 中，在去污剂不存在下，发生自身引发的聚合聚集 (polymeric aggregation)，导致形成超过 24 个单位、优选超过 100 个单位的聚集体 (aggregate)。这个方法是本领域公知的。 $A\beta$ (X-Y) 原纤维适宜以水溶液形式

使用。在本发明的一个特别优选的实施方案中,这样来制备原纤维水溶液:将 A β 肽溶于 0.1% NH₄OH 中,将它用 20mM NaH₂PO₄, 140mM NaCl, pH7.4 进行 1 : 4 稀释,然后重调 pH 至 7.4,所得溶液在 37°C 下温育 20 小时,然后以 10000g 离心 10 分钟,重悬浮于 20mM NaH₂PO₄, 140mM NaCl, pH7.4 中。

[0075] 术语“A β (X-Y) 原纤维”在本文中指包含 A β (X-Y) 亚单位的原纤维,其中优选的是平均来说至少 90% 的亚单位是 A β (X-Y) 类型,更优选的是至少 98% 的亚单位是 A β (X-Y) 类型,最优选的是非 A β (X-Y) 肽的含量低于检测阈。

[0076] 现回到 8F5(图 1 所示)及 8C5(图 8),相比于非特异性抗体 6G1 和 6E10, A β (1-42) 球聚体特异性抗体即单克隆抗体 8F5 和 8C5 主要识别 A β (1-42) 球聚体形式而不是 A β (1-40) 或 A β (1-42) 单体的标准制品,包括聚集的 A β (1-42)。具体的说,8F5 只通过无变性 PAGE-蛋白质印迹而不是通过 SDS-PAGEA 蛋白质印迹分析检测 A β (1-42) 球聚体,这表明是与核心 A β (1-42) 球聚体结构中的更为复杂的去污剂可解离亚基间表位发生结合。亚基间表位定义为位于至少两个亚单位上的复杂非线性型跨空间表位。更具体的说,对各种 A β (1-42) 和 A β (1-40) 标准制品的斑点印迹分析显示,特异性 8F5 和 8C5 在对 A β (1-42) 球聚体的识别与对非球聚体 A β 形式(标准的 A β (1-40)/(1-42) 单体制品、聚集的 A β (1-42)) 的识别上存在显著差异,而同种型非特异性抗体 6G1 和 6E10 却不是这样。通过在夹心 ELISA 中对 A β (1-42) 球聚体、A β (1-42) 单体、A β (1-40) 单体和可溶性淀粉样前体蛋白 α 结合进行定量,证实了 8F5 和 8C5 对球聚体有特异性,而 6G1 和 6E10 没有特异性。此外,由于这些抗体在无变性的蛋白质印迹后而不是在 SDS 蛋白质印迹后接近球聚体,很可能每个抗体识别的是在 A β (1-42) 的氨基酸 20-30 区域中亚单位之间的结构非线性型表位。对球聚体的这种特异性是重要的,因为用球聚体优先抗体如 8F5 或 8C5 特异性靶向球聚体形式的 A β ,将会:1) 避免靶向不溶性淀粉样沉积物(与不溶性淀粉样沉积物的结合可能是用不溶性 A β 进行免疫过程中所观察到的炎性副作用的原因);2) 避开据报道具有预识别 (precognitive) 生理功能 (Plan et al., J.ofNeuroscience23 :5531-5535(2003) 的 A β 单体和 APP;和 3) 提高抗体的生物利用度,因为它不会由于广泛结合不溶性沉积物而被遮挡或不可接近。

[0077] 本发明还包括编码单克隆抗体 8F5 和 8CD 的可变轻链和重链的分离核苷酸序列(或其片段),以及具有包含、对应于、相同于、可杂交于或可互补于与这些编码核苷酸序列的至少约 70% (例如 70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%或 79%)、优选至少约 80% (例如 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或 89%)、更优选至少约 90% (例如 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%) 同一性的序列的那些核苷酸序列(或其片段)。(关于百分比同一性,70% -100%之间(包括 70%和 100%)的所有整数(及其小数)均被认为都属于本发明的百分比同一性范围之内。)这种序列可源自任何来源(例如从天然来源分离,通过半合成途径产生,或者从头合成)。具体的说,这种序列可分离自或源自实施例所述的来源之外的来源(例如细菌、真菌、藻类、小鼠或人)。

[0078] 除了上述核苷酸序列外,本发明还包括单克隆抗体 8F5 和单克隆抗体 8C5 的可变轻链和重链的氨基酸序列(或者这些氨基酸序列的片段)。此外,本发明还包括包含、对应于、相同于或可互补于与本发明蛋白质的氨基酸序列的至少约 70%、优选至少约 80%、更优选至少约 90% 同一性的氨基酸序列(或其片段)。(同样,70% -100%之间(包括 70%

和 100%) 的所有整数 (及其小数) (如同以上有关核苷酸序列同一性所述) 也被认为属于本发明的核苷酸序列同一性范围之内。)

[0079] 出于本发明的目的,核苷酸序列的“片段”定义为对应于指定核苷酸序列的某个区域的、由大约至少 6 个、优选至少约 8 个、更优选至少约 10 个核苷酸、甚至更优选至少约 15 个核苷酸组成的连续序列。

[0080] 术语“同一性”指两个序列在特定的比较窗或区段范围内基于核苷酸对核苷酸比较的相关性。因此,同一性定义为两个 DNA 区段 (或者两个氨基酸序列) 的相同链 (正义链或反义链) 之间的相同性、对应性或等同性的程度。“序列同一性百分数”是这样计算的:将两个进行最佳比对的序列在特定区域范围内进行比较;确定两个序列中出现相同碱基或氨基酸的位置的数量,以得到相匹配位置的数量;将这种位置的数量除以被比较区段中的位置总数,所得的商再乘以 100。序列的最佳比对可以通过 Smith&Waterman, Appl. Math. 2 :482(1981) 的算法、Needleman&Wunsch, J. Mol. Biol. 48 :443(1970) 的算法、Pearson&Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85 :2444(1988) 的方法和执行相关算法的计算机程序 (例如 Clustal Macaw Pileup (<http://cmgm.Stanford.edu/biochem218/11Multiple.pdf>);Higgins et al., CABIOS. 5L151-153(1989))、FASTDB(Intelligenetics)、BLAST(National Center forBiomedical Information; Altschul et al., Nucleic Acids Research25 :3389-3402(1997))、PILEUP(Genetics Computer Group, Madison, WI) 或 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA(Wisconsin Genetics SoftwarePackage Release 7.0,Genetics Computer Group, Madison, WI) 来进行。(参见美国专利 5,912,120。)

[0081] 出于本发明目的,“互补性”定义为两个 DNA 区段之间的相关性程度。它是通过测量一个 DNA 区段的正义链在适当条件下与另一 DNA 区段的反义链发生杂交形成双螺旋的能力来确定的。“互补序列”定义为基于典范的碱基配对规则与给定序列配对的序列。例如,一个核苷酸链中的序列 A-G-T 与另一个核苷酸链中的序列 T-C-A 是“互补的”。

[0082] 在双螺旋中,腺嘌呤在一条链中出现,胸腺嘧啶则在另一条链中出现。同样,如鸟嘌呤存在于一条链中,则胞嘧啶会存在于另一条链中。两个 DNA 区段的核苷酸序列之间的相关性越大,该两个 DNA 区段的两条链之间形成杂合双链体的能力越大。

[0083] 两个氨基酸序列之间的“相似性”定义为在两个序列中有一系列的相同和保守的氨基酸残基存在。两个氨基酸序列之间的相似性程度越高,该两个序列的对应性、相同性或等同性越高。(两个氨基酸序列之间的“同一性”定义为在两个序列中有一系列的完全同样或不变的氨基酸残基存在。)”“互补性”、“同一性”和“相似性”的定义是本领域普通技术人员公知的。

[0084] “(由)..... 编码的”是指编码多肽序列的核酸序列,其中该多肽序列或其部分含有这样的氨基酸序列,其由该核酸序列编码的多肽的至少 3 个氨基酸、更优选至少 8 个氨基酸、甚至更优选至少 15 个氨基酸组成。

[0085] 另外,当单链形式的核酸分子在适当的温度和离子强度条件下能与另一核酸分子退火时,则该核酸分子与该另一核酸分子“可杂交”(参见 Sambrook et al., "Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Second Edition(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York))。温度和离子强度条件决定了杂交的“严格性”。

[0086] 本文所用的术语“杂交”一般用来指核酸在适当的严格性条件下的杂交,本领域技术人员根据探针序列和靶标序列的特性对严格性条件是容易明了的。杂交和洗涤的条件是本领域公知的,根据所需的严格性通过改变温育时间、温度和 / 或溶液的离子强度来对条件作出调整也是容易实现的。参见例如 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989, 这个文献在上文也提到过,它通过引用结合到本文中。(另参见 *Short Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel et al. 和 Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993), 这两个文献通过引用结合到本文中。)具体的说,条件的选择决定于被杂交序列的长度(特别是探针序列的长度)、核酸的相对 G-C 含量和允许的错配数量。如需要的是互补性程度较低的链之间的部分杂交,则优选低严格条件。当需要的是完美或近乎完美的互补性时,则优选高严格条件。对于典型的高严格条件,杂交溶液含有 6X S. C、0.01M EDTA、1x Denhardt 氏溶液和 0.5% SDS。杂交是在约 68 摄氏度下进行,对于克隆的 DNA 的片段进行约 3-4 小时,对于总真核 DNA 进行约 12- 约 16 小时。对于中等严格性,可以采取用 3X 氯化钠、柠檬酸钠 (SSC) 的溶液、50% 甲酰胺 (0.1M 的此缓冲剂, pH7.5) 和 5X Denhardt 氏溶液进行的滤膜预杂交和杂交。那么就可以在 37 摄氏度下预杂交 4 小时,接着在 37 摄氏度下与总量等于 3,000,000cpm 的标记探针杂交 16 小时,再接着在 2X SSC 和 0.1% SDS 溶液中进行洗涤,即在室温下洗涤 4 次,每次 1 分钟,然后在 60 摄氏度下洗涤 4 次,每次 30 分钟。干燥后,暴露于膜。对于低严格性,将杂交的温度降到低于双链体的解链温度 (T_m) 约 12 摄氏度。已知 T_m 是 G-C 含量和双链体长度以及溶液的离子强度的函数。

[0087] “杂交”要求两个核酸含有互补的序列。但是,视杂交的严格性而定,碱基之间可能会出现错配。如上所述,使核酸杂交的适当严格性取决于核酸的长度和互补的程度。这些变量是本领域公知的。更具体的说,两个核苷酸序列之间的相似性或同源性程度越大,具有这些序列的核酸的杂交体的 T_m 值越大。对于长度大于 100 个核苷酸的杂交体,已有计算 T_m 的方程式(参见 Sambrook et al., 出处同上)。对于与较短核酸的杂交,错配的位置变得更为重要,寡核苷酸的长度决定其特异性(参见 Sambrook et al., 出处同上)。

[0088] 本文所用的“分离核酸片段或序列”是单链或双链的 RNA 或 DNA 聚合物,任选含有合成的、非天然的或改变了的核苷酸碱基。DNA 聚合物形式的分离核酸片段可以由 cDNA、基因组 DNA 或合成 DNA 的一个或多个区段组成。(指定多核苷酸的“片段”指这样的多核苷酸序列:其包含由与指定核苷酸序列的某个区域有同一性或互补性的大约至少 6 个核苷酸、优选至少约 8 个核苷酸、更优选至少约 10 个核苷酸、甚至更优选至少约 15 个核苷酸、最优选至少约 25 个核苷酸组成的不间断序列。)核苷酸(通常以它们的 5' - 单磷酸形式存在)用以下单字母符号指代:“A”指代腺苷酸或脱氧腺苷酸(分别对 RNA 或 DNA),“C”指代胞苷酸或脱氧胞苷酸,“G”指代鸟苷酸或脱氧鸟苷酸,“U”指代尿苷酸,“UT”指代脱氧胸苷酸,“R”指代嘌呤(A 或 G),“Y”指代嘧啶(C 或 T),“K”指代 G 或 T,“H”指代 A 或 C 或 T,“I”指代肌苷,“N”指代任何核苷酸。

[0089] 术语“功能上等同的片段或亚片段”与“功能等同片段或亚片段”在本文中可互用。这些术语指分离核酸片段中的这样的部分或亚序列:其中无论该片段或亚片段是否编码活

性酶,其改变基因表达或产生某种表型的能力都得到保持。例如,该片段或亚片段可用于设计嵌合构建物以在被转化植物中产生所需的表型。可这样设计作共抑制或反义之用的嵌合构建物:将无论是否编码活性酶的核酸片段或其亚片段,以相对于植物启动子序列的适当方向进行连接。

[0090] 术语“同源性”、“同源的”、“基本上相似”、“基本上对应”在本文中可互用。它们指这样的核酸片段:其中一个或多个核苷酸碱基的变化不会影响核酸介导基因表达或产生某种表型的能力。这些术语还指对本发明核酸片段的修饰如缺失或插入,相对于初始的未修饰片段,该修饰基本上没有改变所产生的核苷酸片段的功能性特性。因此应认识到,本发明所涵括的不只是特定的示例性序列,这一点本领域技术人员会意识到。

[0091] “基因”指能表达特定蛋白质的核酸片段,包括该编码序列前面和后面的调节序列(分别为 5' 非编码序列和 3' 非编码序列)。

[0092] “天然基因”指自然界中所存在的带有其自身的调节序列的基因。相反,“嵌合序列”指在自然界中通常不一起存在的核酸片段的组合。因此,嵌合构建物可包含源自不同的来源的调节序列和编码序列,或者源自相同的来源、但排列方式不同于自然界中通常存在的方式的调节序列和编码序列。(术语“分离(的)”是指序列被脱离其自然环境。)

[0093] “外来”基因指在宿主生物中通常不存在、而是通过基因转移引入到该宿主生物中的基因。外来基因可包括插入到非天然生物中的天然基因或者嵌合构建物。“转基因”是通过转化程序被引入到基因组中的基因。

[0094] “编码序列”指编码特定氨基酸序列的 DNA 序列。“调节序列”指位于编码序列上游、当中或下游的核苷酸序列(位于上游或下游的分为叫 5' 非编码序列和 3' 非编码序列),它们能影响相关的编码序列的转录、RNA 加工或稳定性或者翻译。调节序列可包括但不限于启动子、翻译前导序列、内含子和聚腺苷酸化识别序列。

[0095] “启动子”或“调节基因序列”指能够控制编码序列或功能 RNA 的表达的 DNA 序列。该序列由近端的和较为远端的上游元件组成,后种元件往往被称为增强子。因此,“增强子”是能刺激启动子或调节基因序列活性的 DNA 序列,它可以是启动子的固有元件或者是被插入以增强启动子的水平或组织特异性的异源元件。启动子序列也可位于基因的被转录部分当中、和/或被转录序列的下游。启动子可以全部源自天然基因,或者可以由源自自然界中存在的不同启动子的不同元件组成,乃至可以包含合成的 DNA 区段。本领域技术人员认识到,不同的启动子可指导基因在不同组织或细胞类型中的表达,或者在不同发育阶段的表达,或者响应不同环境条件的表达。能引起基因在大多数宿主细胞类型中最多次数的表达的启动子,通常被称为“组成型启动子”。各种类型的可用于植物细胞的新启动子不断得到发现;在 Okamoto 和 Goldberg, *Biochemistry of Plants* 15:1-82 (1989) 的汇编资料中可以找到很多例子。还要认识到,由于在大多数情况下调节序列的确切界限未曾得到完全定义,稍有差异的 DNA 片段可能也有相同的启动子活性。

[0096] “内含子”是基因中的不编码蛋白质序列的一部分的间插序列。因此,这种序列被转录成 RNA 后就被切除而不被翻译。该术语还用于被切除的 RNA 序列。“外显子”是基因序列中的这样一个部分:它被转录和存在于源自该基因的成熟信使 RNA 中,但不一定是编码最终基因产物的序列的一部分。

[0097] “翻译前导序列”指位于基因的启动子序列和编码序列之间的 DNA 序列。翻译前

导序列在完全加工的 mRNA 中在翻译起始序列的上游存在。翻译前导序列可影响初级转录物向 mRNA 的加工、mRNA 稳定性或翻译效率。翻译前导序列的实例已有描述 (Turner, R. 和 Foster, G. D. (1995) *Molecular Biotechnology* 3 :225)。

[0098] “3' 非编码序列”指位于编码序列的下游的 DNA 序列,包括聚腺苷酸化识别序列和其它编码能够影响 mRNA 加工或基因表达的调节信号的序列。聚腺苷酸化信号通常以影响聚腺苷酸束 (tract) 向 mRNA 前体的 3' 末端的加入为特征。Ingelbrecht et al., *Plant Cell* 11 :671-680 (1989) 举例说明了不同的 3' 非编码序列的使用。

[0099] “RNA 转录物”指 RNA 聚合酶催化的 DNA 序列的转录所产生的产物。RNA 转录物如果是 DNA 序列的完美互补拷贝,则称它为初级转录物,或者它可以是源自初级转录物的转录后加工的 RNA 序列,称为成熟 RNA。“信使 RNA (mRNA)”指没有内含子的、能被细胞翻译成蛋白质的 RNA。“cDNA”指用反转录酶从 mRNA 模板合成的、与该模板互补的 DNA。cDNA 可以是单链的,或者可用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段转化成双链形式。“正义”RNA 指包括 mRNA 的、能在细胞当中或在体外被翻译成蛋白质的 RNA 转录物。“反义 RNA”指与靶标初级转录物或 mRNA 的全部或部分互补的、能阻断靶标基因的表达的 RNA 转录物 (美国专利 5, 107, 065)。反义 RNA 的互补性可以涉及特定基因转录物的任何部分,即在 5' 非编码序列、3' 非编码序列、内含子或编码序列。“功能 RNA”指可能不被翻译、但仍对细胞过程具有作用的反义 RNA、核酶 RNA 或其它 RNA。术语“互补序列 (complement)”和“反向互补序列 (reverse complement)”在本文中在 mRNA 转录物上可互用,意在定义信息链的反义 RNA。

[0100] 术语“内源 RNA”指在用本发明的重组构建物转化前在宿主的基因组中存在的任何核酸序列所编码的任何 RNA,既可以是天然的,也可以是非天然的,即通过重组手段、诱变等引入的。

[0101] 术语“非天然的”是指人工的,与自然界中通常存在的不一致。

[0102] 术语“有效连接”指将各核酸序列缔合在单一核酸片段上,使得一个序列的功能受到另一个序列的调节。例如,某启动子如果能够调节某编码序列的表达,则它就与该编码序列有效连接 (即该编码序列处于该启动子的转录控制下)。编码序列可以以正义或反义方向与调节序列有效连接。在另一个实例中,本发明的互补 RNA 区域能直接或间接地在靶标 mRNA 上游 (5') 有效连接,或者在靶标 mRNA 下游 (3') 有效连接,或者在靶标 mRNA 当中有效连接,或者第一互补区域在靶标 mRNA 上游 (5'),其互补序列在靶标 mRNA 下游 (3')。

[0103] 本文所用的术语“表达”指功能性最终产物的产生。基因的表达涉及到该基因的转录和 mRNA 翻译为前体或成熟蛋白质。“反义抑制”指能够抑制靶标蛋白质的表达的反义 RNA 转录物的产生。“共抑制”指能够抑制相同的或本质上类似的外来或内源基因的表达的正义 RNA 转录物的产生 (美国专利 5, 231, 020)。

[0104] “成熟”蛋白质指经过翻译后加工的多肽,即已除去了初级翻译产物中存在的任何前肽 (prepeptide 或 propeptide) 的多肽。“前体”蛋白质指 mRNA 翻译的初级产物,即其中仍存在有前肽。前肽可以是但不限于胞内定位信号。

[0105] “稳定转化”指核酸片段向宿主生物的基因组中转移并产生遗传上稳定的遗传特征。相反,“短暂转化”指核酸片段向宿主生物的细胞核或含 DNA 细胞器转移并导致基因表达,但不发生整合和稳定的遗传特征。含有转化核酸片段的宿主生物称为“转基因”生物。本文所用的术语“转化”既指稳定的转化也指短暂的转化。

[0106] 本发明所用的标准重组 DNA 和分子克隆技术是本领域公知的,在 Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (下文称“Sambrook”)中有更详细的描述。

[0107] 术语“重组(的)”指将序列的两个不同的分开区段进行人工组合,例如通过化学合成或者通过用遗传工程技术对核酸的分离区段进行操纵。

[0108] “PCR”或“聚合酶链式反应”是一种用以合成大量的特定 DNA 区段的技术,由一系列的重复循环组成 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT)。通常,将双链 DNA 热变性,使与靶标区段的 3' 边界互补的两个引物在低温下退火,然后在中温下延伸。这三个连续步骤构成一组称为一个循环。

[0109] 聚合酶链式反应 (“PCR”) 是一种通过模板的反复复制在短时间里将 DNA 扩增几百万倍的强大技术。(Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273 (1986); Erlich et al., 欧洲专利申请第 50,424 号;欧洲专利申请第 84,796 号;欧洲专利申请第 258,017 号;欧洲专利申请第 237,362 号;Mullis, 欧洲专利申请第 201,184 号;Mullis et al., 美国专利第 4,683,202 号;Erlich, 美国专利第 4,582,788 号;和 Saiki et al., 美国专利第 4,683,194 号)。该过程采用几组特异性的体外合成寡核苷酸来引发 DNA 合成。引物的设计取决于待分析的 DNA 的序列。该技术是通过许多个以下循环 (通常 20-50 个) 步骤来进行:高温使模板解链、让引物与模板当中的互补序列退火、然后用 DNA 聚合酶使模板复制。

[0110] PCR 反应的产物是这样进行分析:进行琼脂糖凝胶分离,然后进行溴化乙锭染色,再用紫外透照法进行显现。或者,可将放射性 dNTP 加到 PCR 中以向产物中掺入标记。在这种情况下,PCR 的产物通过将凝胶暴露于 X 射线片来显现。对 PCR 产物进行放射标记的额外好处是能对单个扩增产物的水平进行定量。

[0111] 术语“重组构建物”、“表达构建物”和“重组表达构建物”在本文中可互用。这些术语指可用本领域技术人员公知的标准方法插入到细胞基因组中的遗传材料功能单位。这种构建物可以单独使用,或者可以与载体一起使用。如果使用载体,则载体的选择取决于要用来转化宿主植物的方法,这是本领域技术人员公知的。例如,可以使用质粒。为了成功转化、选择和繁殖包含本发明的任何分离核酸片段的宿主细胞而必须在载体上存在的遗传元件,是技术人员所熟知的。技术人员还会认识到,不同的独立转化事件会导致不同的表达水平和模式 (Jones et al., (1985) EMBO J. 4:2411-2418; De Almeida et al., (1989) Mol. Gen. Genetics 218:78-86), 因此必须对多个事件进行筛选以获得显示所需的表达水平和模式的细胞系。这种筛选可通过 DNA 的 Southern 分析、mRNA 表达的 Northern 分析、蛋白质表达的 Western 分析或者表型分析来实现。

[0112] 本文所用的“单克隆抗体”意指含有共同的重链和共同的轻链氨基酸序列的抗体的一种抗体分子制品,与之相对的是来自含有不同抗体的混合物的“多克隆”抗体制品。单克隆抗体可通过几种新型技术如噬菌体、细菌、酵母或核糖体展示来产生,也可通过以杂交瘤衍生抗体为例证的经典方法来产生 (例如由通过杂交瘤技术如标准的 Kohler 和 Milstein 杂交瘤方法 ((1975) Nature 256:495-497) 制备的杂交瘤分泌的抗体)。因此,本发明的非杂交瘤衍生的激动性抗体尽管可能是通过非经典方法衍生得到,但仍称为单克隆

抗体。

[0113] 本文所用的“分离抗体”意指基本上与具有不同抗原特异性的其它抗体分开的抗体（例如，特异性结合球聚体的分离抗体基本上与特异性结合球聚体之外的抗原的抗体分开）。但是，特异性结合球聚体的分离抗体可能对其它抗原具有交叉反应性。此外，分离抗体可以大体上与其它细胞材料和 / 或化学药品分开。

[0114] 本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”（或简称“抗体部分”）指抗体的一个或多个保持特异性结合抗原的能力的片段。已证实抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的各片段来执行。这种抗体实施方案还可以是特异性结合两个或多个不同抗原的双特异性、二重特异性或多特异性形式。涵括在术语抗体的“抗原结合部分”当中的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段，为由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段，为包含两个通过铰链区中的二硫化物桥接的 Fab 片段的二价片段；(iii) Fd 片段，其由 VH 和 CH1 结构域组成；(iv) Fv 片段，其由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域组成；(v) dAb 片段 (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546)，其包含单一可变结构域；和 (vi) 分离的互补决定区 (CDR)。此外，虽然 Fv 片段的 VL 和 VH 两个结构域由分别的基因所编码，但可用重组方法通过合成的接头将它们连接起来，合成的接头使它们能够构成单一的蛋白质链，在该蛋白质链中 VL 区和 VH 区能配对形成单价分子（称为单链 Fv (scFv)；参见例如 Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426；和 Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。这种单链抗体也意在涵括在抗体的“抗原结合部分”这个术语当中。还涵括的有其它形式的单链抗体如双功能抗体。双功能抗体是二价双特异性抗体，其中 VH 和 VL 结构域表达在单一多肽链上，但所用的接头太短，而不能使同一条链上的两个结构域配对，从而迫使这两个结构域与另一条链的互补结构域配对，产生两个抗原结合位点（参见例如 Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448；Poljak, R. J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123）。这种抗体结合部分是本领域公知的 (Kontermann 和 Dubeleds., *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag, New York 790pp. (ISBN3-540-41354-5))。

[0115] 还有，抗体或其抗原结合部分还可以是较大的免疫黏附分子的一部分，该免疫黏附分子是由该抗体或抗体部分与一个或多个其它蛋白质或肽发生共价或非共价缔合而形成。这种免疫黏附分子的实例包括使用链霉亲和素核心区来制作四聚 scFv 分子 (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) 和使用半胱氨酸残基、标记肽和 C 末端聚组氨酸标签来制作二价和生物素酰化的 scFv 分子 (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31 = 1047-1058)。抗体部分如 Fab 和 $F(ab')_2$ 片段可用常规技术从完整抗体制备，如分别用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶对完整抗体进行消化来制备。此外，抗体、抗体部分和免疫黏附分子可用本文所述的标准重组 DNA 技术获得。

[0116] 本文所用的术语“重组人抗体”意在包括所有通过重组手段制备、表达、产生或分离的人抗体，如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体、从重组、组合人抗体库分离的抗体 (Hoogenboom H. R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70；Azzazy H., 和 Highsmith W. E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445；Gavilondo J. V., 和 Larrick J. W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145；Hoogenboom H., 和 Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378)、从人免疫球蛋白基因的转基因动物（例如小鼠）分离的抗体（参见例如

Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20 :6287-6295 ;Kellermann S-A., 和 Green L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13 :593-597 ;Little M. et al (2000) Immunology Today 21 :364-370) 或者通过任何其它涉及到将人免疫球蛋白基因序列剪接到其它 DNA 序列的手段制备、表达、产生或分离的抗体。这种重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。但是,在某些实施方案中,这种重组人抗体经历体外诱变(或者如果使用人 Ig 序列的转基因动物的话,经历体内体细胞诱变),因此重组抗体的 VH 区和 VL 区的氨基酸序列是这样的序列:它们虽然源自和关联于人种系 VH 序列和 VL 序列,但可能并不在体内人抗体种系库当中天然存在。(另参见 Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991)。但是,本发明的人抗体可包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或位点特异性诱变引入的或者通过体内体细胞突变引入的突变)。(另参见 Harlow 和 Lane, Antibodies : A Laboratory Manual, New York : Cold Spring Harbor Press, 1990)。

[0117] 术语“嵌合抗体”指包含来自一种物种的重链和轻链可变区序列和来自另一种物种的恒定区序列的抗体,如其中鼠重链和轻链可变区与人恒定区连接在一起的抗体。

[0118] 术语“CDR 移植抗体”指包含来自一种物种的重链和轻链可变区序列、但其中 VH 和 / 或 VL 的一个或多个 CDR 区的序列用另一种物种的 CDR 序列取代的抗体,如具有鼠重链和轻链可变区、其中一个或多个鼠 CDR(例如 CDR3) 已用人 CDR 序列取代的抗体。

[0119] 本发明的重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列可变区,且还可包括源自人种系免疫球蛋白序列的恒定区。(参见 Kabat et al. (1991), 出处同上。)但是,在某些实施方案中,这种重组人抗体经历体外诱变(或者如果使用人 Ig 序列的转基因动物的话,经历体内体细胞诱变),因此重组抗体的 VH 区和 VL 区的氨基酸序列是这样的序列:它们虽然源自和关联于人种系 VH 序列和 VL 序列,但可能并不在体内人抗体种系库当中天然存在。不过在某些实施方案中,这种重组抗体是选择性诱变或回复突变或这两种情况的结果。

[0120] 术语“回复突变”指这样的过程:其中人抗体的一些或全部的体细胞性突变的氨基酸被来自同源种系抗体序列的相应种系残基替代。将本发明人抗体的重链和轻链序列分别与 VBASE 数据库中的种系序列进行比对,以鉴定出具有最高同源性的序列。VBASE 是所有的人种系可变区序列的综合目录,是将包括 GenBank 和 EMBL 数据文库的最新发布序列在内的公布序列汇编而成。该数据库是在 MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK) 开发,作为已测序的人抗体基因的收藏库(网址 <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-intro.php?menu=901>)。本发明的人抗体中的差异,通过将编码这种差异性氨基酸的明确核苷酸位置进行突变来回传到种系序列。对于每种氨基酸这样被鉴定为回复突变的候选者的角色,都应研究其在抗原结合中的直接或间接角色,任何在突变后被发现会影响人抗体的任何合宜特性的氨基酸,都不应包括在最终人抗体中。为使要经历回复突变的氨基酸的数量减到最少,可保留那些被发现与最近的种系序列不同、但与第二种系序列中的相应氨基酸相同的氨基酸位置,条件是第二种系序列与本发明的人抗体的序列在所指涉氨基酸的两侧相同和共线性 (co-linear) 达至少 10 个、优选 12 个氨基酸。回复突变可在抗体最优化的任何阶段出现。

[0121] “标记结合蛋白”是其中本发明抗体或抗体部分衍生或连接到另一功能分子(例

如另一肽或蛋白质)的蛋白质。例如,本发明的标记结合蛋白可通过将本发明抗体或抗体部分(通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或其它方式)与一个或多个其它分子实体发生功能连接来衍生,所述分子实体如另一抗体(例如双特异性抗体或双功能抗体)、可检测物剂、细胞毒性剂、药剂和/或能介导该抗体或抗体部分与另一分子的缔合的蛋白质或肽(如链霉亲和素核心区或聚组氨酸标签)。

[0122] 出于本发明目的,“糖基化结合蛋白”是这样的蛋白质:其中抗体或其抗原结合部分包含一个或多个碳水化合物残基。体内新生的蛋白质可进行进一步的加工,此称翻译后修饰。具体的说,可酶促加入糖(糖基)残基,这个过程称为糖基化。所得的带有共价连接的寡糖侧链的蛋白质称为糖基化蛋白质或糖蛋白。抗体就是在Fc结构域以及可变结构域中有一个或多个碳水化合物残基的糖蛋白。Fc结构域中的碳水化合物残基对Fc结构域的效应子功能具有重要的影响,而对抗体的抗原结合或半衰期的影响最小(R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21(2005), pp. 11-16)。与此对比,可变结构域的糖基化可能对抗体的抗原结合活性有影响。可变结构域中的糖基化可能会对抗体结合亲和力有负面影响(这可能是因为位阻所致)(Co, M. S., et al., *Mol. Immunol.* (1993) 30 :1361-1367),或者可能会导致对抗原的亲和力增加(Wallick, S. C., et al., *Exp. Med.* (1988) 168 :1099-1109 ;Wright, A., et al., *EMBO J.* (1991) 10 :2717-2723)。此外,可以产生出其中结合蛋白的O-或N-连接糖基化位点已被突变的糖基化位点突变体。本领域技术人员可用标准的公知技术产生出这样的突变体。还设想到了保持有生物活性、但结合活性得到提高或降低的糖基化位点突变体。

[0123] 此外,可对本发明抗体或抗原结合部分的糖基化加以修饰。例如,可产生出无糖基化抗体(即缺乏糖基化的抗体)。可对糖基化加以改变,以例如提高抗体对抗原的亲和力。这种碳水化合物修饰可通过例如改变抗体序列其中的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可作出一个或多个会导致一个或多个可变区糖基化位点被消除的氨基酸置换,从而消除该位点处的糖基化。这种糖基化会提高抗体对抗原的亲和力。这种方法在国际申请公开说明书W003/016466A2及美国专利5,714,350和6,350,861中有更详细的描述,这三个专利每一个都通过引用整体结合到本文中。

[0124] 另外,可产生出糖基化类型发生改变的修饰抗体,如岩藻糖基残基数量减少的低岩藻糖基化抗体或分叉(bisecting)GlcNAc结构增加的抗体。这种改变了的糖基化模式已证实能提高抗体的ADCC能力。这种碳水化合物修饰可通过例如在糖基化体系(machinery)发生了改变的宿主细胞中表达抗体来实现。糖基化体系发生了改变的细胞在本领域中已有描述,可用作宿主细胞来表达本发明的重组抗体从而产生糖基化改变了的抗体。(参见例如 Shields, R. L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277 :26733-26740 ;Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17 :176-1,以及欧洲专利EP1,176,195 ;国际申请公开号W003/035835和W099/5434280,这些文献和专利的每一个通过引用整体结合到本文中。)

[0125] 蛋白质糖基化取决于目的蛋白质的氨基酸序列,以及表达该蛋白质的宿主细胞。不同的生物可产生不同的糖基化酶(例如糖基转移酶和糖苷酶),可有不同的底物(核苷酸糖)可供利用。由于这些因素,蛋白质糖基化模式和糖基残基的组成可随表达特定蛋白质的宿主系统而异。可用于本发明的糖基残基包括但不限于葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、N-乙酰葡糖胺和唾液酸。优选地,糖基化结合蛋白所包含的糖基残基使得糖基化模式是人

糖基化模式。

[0126] 本领域技术人员公知,不同的蛋白质糖基化会导致不同的蛋白质特性。例如,在微生物宿主如酵母中产生并用酵母内源途径糖基化的治疗性蛋白质,与在哺乳动物细胞如 CHO 细胞系中表达的相同蛋白质相比,其功效会降低。这种糖蛋白还可能在人体中具有免疫原性,并显示给药后体内半衰期减少。人和其它动物中的特异性受体可识别特定的糖基残基,促进蛋白质从血流中的快速清除。其它不良反应可包括蛋白质折叠、溶解度、对蛋白酶的易感性、运输、转运、区室化、分泌、被其它蛋白质或因子的识别、抗原性或变应原性方面的变化。因此,业内人士可能偏好具有特定的糖基化组成和模式的治疗性蛋白质,所述特定的糖基化组成和模式例如相同于或至少类似于在人细胞中或在预期动物对象的物种特异性细胞中产生的糖基化组成和模式。

[0127] 要表达不同于宿主细胞的糖基化蛋白质的糖基化蛋白质,这可通过将宿主细胞遗传修饰成能表达异源糖基化酶来实现。业内人士使用本领域公知的技术可产生出显示人蛋白质糖基化的抗体或其抗原结合部分。例如,已将酵母菌株遗传修饰成能表达非天然糖基化酶,使得在这些酵母菌株中产生的糖基化蛋白质(糖蛋白)显示的蛋白质糖基化与动物细胞特别是人细胞的相同(美国专利申请公开说明书 20040018590 和 20020137134 及国际申请公开说明书 W005/100584A2)。

[0128] 此外,本领域技术人员会认识到,可用文库的遗传设计的表达各种糖基化酶的宿主细胞表达目的蛋白质,使得该库中的成员宿主细胞产生出具有不同的糖基化模式的目的蛋白质。业内人士然后可选择和分离出具有特定的新型糖基化模式的目的蛋白质。优选地,具有特别选定的新型糖基化模式的蛋白质显示出改进的或改变的生物特性。

[0129] 本发明还提供通过对包含人免疫球蛋白基因座的非人转基因动物进行免疫,从非人、非小鼠动物产生本发明单克隆抗体的方法。这种动物可用本领域公知的方法来产生。在一个优选的实施方案中,非人动物可以是大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马。能产生抗体的无限增殖杂交瘤可从被免疫动物制备得到。免疫后,将动物处死,将脾 B 细胞与无限增殖骨髓瘤细胞融合,这是本领域公知的。参见例如 Harlow 和 Lane,出处同上。在一个优选的实施方案中,骨髓瘤细胞不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌性细胞系)。在融合和进行抗生素选择后,用抗原(例如球聚体)或其部分或者表达目的抗原的细胞筛选杂交瘤。在一个优选的实施方案中,用酶联免疫测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA)、优选 ELISA 进行初始筛选。国际申请公开说明书 W000/37504(其通过引用结合到本文中)提供了 ELISA 筛选的一个实例。

[0130] 对能产生抗体的杂交瘤进行选择、克隆并就合宜特性进行进一步筛选,所述合宜特性包括充沛的杂交瘤生长(robust hybridoma growth)、高抗体生产和适需的抗体特性,这在下文进一步论述。杂交瘤可在同种同基因(syngeneic)型动物中、在缺乏免疫系统的动物例如裸鼠中体内培养和扩展,或者在体外细胞培养物中培养和扩展。选择、克隆和扩展杂交瘤的方法是本领域技术人员公知的。优选地,被免疫动物是能表达人免疫球蛋白基因的非人动物,脾 B 细胞与源自该非人动物的相同物种的骨髓瘤融合。

[0131] 在一个方面,本发明提供能产生旨在用于阿尔兹海默病的治疗、诊断和预防的单克隆抗体的杂交瘤。在一个优选的实施方案中,杂交瘤是小鼠杂交瘤。在另一个优选的实施方案中,杂交瘤在非人、非小鼠物种如大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马中产生。在另一个实施

方案中,杂交瘤是人杂交瘤,其中人非分泌性骨髓瘤与表达抗球聚体的抗体的人细胞发生融合。

[0132] 如在美国专利 5,627,052、国际申请公开说明书 W092/02551 和 Babcock, J. S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 中所述,可用本领域称为选定淋巴细胞抗体方法(selected lymphocyte antibody method (SLAM) 的程序从单个分离的淋巴细胞产生重组抗体。在这个方法中,用抗原特异性溶血斑块测定法筛选能分泌目的抗体的单细胞(例如衍自被免疫动物的淋巴细胞),在该测定中抗原(例如球聚体)或其片段是用接头如生物素与绵羊红细胞偶联,并用来鉴定能分泌对该抗原有特异性的抗体的单细胞。鉴定出能分泌抗体的目的细胞后,通过反转录酶-PCR 从细胞拯救出重链和轻链可变区 cDNA,然后将这些可变区在哺乳动物宿主细胞如 COS 或 CHO 细胞中在适当的免疫球蛋白恒定区(例如人恒定区)情况下进行表达。用衍自体内选定淋巴细胞的扩增免疫球蛋白序列转染的宿主细胞,然后就可进行进一步的体外分析和选择,例如通过对被转染细胞进行淘选以分离出能表达抗 IL-18 抗体的细胞。扩增的免疫球蛋白序列还可例如通过体外亲和力成熟方法进行体外操作,所述方法例如国际申请公开说明书 W097/29131 和国际申请公开说明书 W000/56772 中所述的那些方法。

[0133] 术语“嵌合抗体”指包含来自一种物种的重链和轻链可变区序列和来自另一种物种的恒定区序列的抗体,如其中鼠重链和轻链可变区与人恒定区连接在一起的抗体。

[0134] 术语“CDR 移植抗体”指包含来自一种物种的重链和轻链可变区序列、但其中 VH 和 / 或 VL 的一个或多个 CDR 区的序列用另一种物种的 CDR 序列取代的抗体,如具有鼠重链和轻链可变区、其中一个或多个鼠 CDR(例如 CDR3) 已用人 CDR 序列取代的抗体。

[0135] 术语“人源化抗体”指包含来自非人物种(例如小鼠)的重链和轻链可变区序列、但其中 VH 和 / 或 VL 序列的至少一部分已被改变成更加“人样”即更类似于人种系可变序列的抗体。一种类型的人源化抗体是其中人 CDR 序列被引入到非人 VH 和 VL 序列中以替代相应的非人 CDR 序列的 CDR 移植抗体。具体的说,术语“人源化抗体”是这样的抗体或其变体、衍生物、类似物或片段:它们能免疫特异性地结合目的抗原,包含有基本上具有人抗体的氨基酸序列的构架(FR)区和基本上具有非人抗体的氨基酸序列的互补决定区(CDR)。本文在 CDR 情形中所用的术语“基本(本质)上”指其氨基酸序列与非人抗体 CDR 的氨基酸序列至少 80%、优选至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 相同的 CDR。人源化抗体包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv),其中所有或基本上所有的 CDR 区对应于非人免疫球蛋白(即供体抗体)的 CDR 区,所有或基本上所有的构架区是人免疫球蛋白共有序列的构架区。优选地,人源化抗体还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)、通常是人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体既含轻链也含至少可变结构域的重链。该抗体还可包括重链的 CH1、铰链、CH2、CH3 和 CH4 区。在一些实施方案中,人源化抗体只含人源化轻链。在其它实施方案中,人源化抗体只含人源化重链。在特定的实施方案中,人源化抗体只含人源化可变结构域的轻链和 / 或人源化重链。

[0136] 人源化抗体可选自免疫球蛋白的任何类别和任何同种型,前者包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE,后者包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。人源化抗体可包含来自超过一种类别或同种型的序列,且可用本领域公知的技术选择特定的恒定结构域以使所需的效应子

功能最优化。

[0137] 人源化抗体的构架区和 CDR 区不需要精确对应于亲本序列,例如供体抗体 CDR 或共有构架可通过置换、插入和 / 或缺失至少一个氨基酸残基进行诱变,使得在该位点处的 CDR 或构架残基不对应于供体抗体或共有构架。但是在一个优选的实施方案中,这种突变不会大量发生。通常,至少 80%、优选至少 85%、更优选至少 90%、最优选至少 95% 的人源化抗体残基会对应于亲本 FR 序列和 CDR 序列的残基。本文所用的术语“共有构架”指共有免疫球蛋白序列中的构架区。此外,本文所用的术语“共有免疫球蛋白序列”指由相关免疫球蛋白序列家族中的最常出现氨基酸(或核苷酸)形成的序列(参见例如 Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987)。在免疫球蛋白家族中,共有序列中的每个位置都被在该家族中该位置处最常出现的氨基酸所占据。如果两个氨基酸出现频率相等,则任一个都可包括在共有序列中。

[0138] 术语“活性”包括诸如抗体对抗原的结合特异性 / 亲和力的活性。

[0139] 术语“表位”包括任何能够特异性结合免疫球蛋白或 T 细胞受体的多肽决定簇。在某些实施方案中,表位决定簇包括分子的化学活性表面组 (chemically active surface grouping), 如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,而在某些实施方案中则可具有特定的三维结构特性和 / 或特定的电荷特性。表位是被抗体结合的抗原的区域。在某些实施方案中,抗体如果能在蛋白质和 / 或大分子的复杂混合物中优先识别其靶标抗原,则称之为能特异性结合抗原。

[0140] 本文所用的术语“表面等离子共振”指可以实时生物特异性相互作用进行分析的一种光学现象,该分析是通过例如用 BIAcore 系统 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ) 检测生物传感器矩阵中的蛋白质浓度变化来进行。更多的描述参见 Jönsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; 和 Johnson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277。

[0141] 本文所用的术语“ K_{on} ”意指抗体与抗原缔合形成抗体 / 抗原复合物的“缔合速率 (on rate)”常数,这是本领域公知的。

[0142] 本文所用的术语“ K_{off} ”意指抗体从抗体 / 抗原复合物解离的“解离速率 (off rate)”常数,这是本领域公知的。

[0143] 本文所用的术语“ K_d ”意指特定的抗体 - 抗原相互作用的“解离常数”,这是本领域公知的。

[0144] 本文所用的术语“标记结合蛋白”指掺入了标记的蛋白质,该标记使该结合蛋白可以被鉴定。优选地,该标记是可检测标志,例如放射标记氨基酸的掺入或与可被标记亲和素检测的生物素酰化部分的多肽的连接(例如含有能通过光学或比色方法检测的荧光标志或酶促活性的链霉亲和素)。多肽用标记的实例包括但不限于以下:放射性同位素或放射性核素(例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 或 ^{153}Sm); 荧光标记(例如 FITC、罗丹明或镧系磷(lanthanide phosphors)); 酶标记(例如辣根过氧化物酶、萤光素酶或碱性磷酸酶); 化学发光标志; 生物素酰基基团; 被第二报道分子识别的预定多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域或表位标签); 和磁性物质如钆螯合物。

[0145] 术语“抗体缀合物”指与第二化学部分如治疗性或细胞毒性剂发生化学连接的结合蛋白如抗体。这里使用的术语“(物)剂”表示化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子或者从生物材料制备的提取物。优选地,治疗性或细胞毒性剂包括但不限于百日咳毒素、紫杉醇、松胞菌素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷 (tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽素二酮 (dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素 D、1-去氢睾酮、糖皮质类固醇、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素以及这些物剂的类似物和同系物。

[0146] 本文所用的术语“晶体”和“结晶的”指以晶体形式存在的抗体或其抗原结合部分。晶体是物质固态的一种形式。

[0147] 术语“免疫”在本文中指将抗原呈递到免疫系统 (immune repertoire) 的过程,无论该免疫系统是在天然的遗传上未改变的生物中存在,还是在被修饰成能显示人工的人免疫系统的转基因生物中存在。类似地,“免疫原性制品”是含有会增强抗原的免疫原性的佐剂或其它添加剂的抗原制剂。这方面的一个实例是纯化形式的 GLP-1 受体与弗氏完全佐剂共注射于小鼠。本文所用的“超免疫(法)”是将免疫原性制剂中的抗原连续、多次呈递给宿主动物以旨在发展出强烈的免疫应答的做法。

[0148] 测量抗体的结合动力学的一种方式是通过表面等离子共振。本文所用的术语“表面等离子共振”指一种以实时生物特异性相互作用进行分析的光学现象,该分析是通过例如用 Biacore 系统 (Biacore International, Upsala, Sweden and Piscataway, NJ) 检测生物传感器矩阵中的蛋白质浓度变化来进行。更多的描述参见 Jönsson et al. (1993) *Annales de Biologie Clinique* (Paris) 51:19-26; Jönsson et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnson et al. (1995) *Journal of Molecular Recognition* 8:125-131; 和 Johnson et al. (1991) *Analytical Biochemistry* 198:268-277。

[0149] “药学上可接受的载体”包括任何和所有生理上相容的溶剂、分散介质、包衣料、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延缓剂等。药学上可接受的载体的实例包括水、盐水、磷酸缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等中的一个或多个以及它们的组合。在许多情况下,优选的是将等渗剂例如糖、多元醇如甘露糖醇、山梨糖醇或氯化钠包括在组合物中。药学上可接受的载体还可包含少量的能提高抗体或抗体部分的货架期或有效性的辅助物质,如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲液。

[0150] 本发明的药物组合物可包括“治疗有效量的”或“预防有效量的”本发明抗体或抗体部分。“治疗有效量”指在必要的剂量下和时间里能有效实现所需的治疗结果的量。抗体或抗体部分的治疗有效量可由本领域技术人员进行确定,它可根据以下各种因素而异:个体的疾病状态、年龄、性别和体重,抗体或抗体部分在个体中引起所需的应答的能力。治疗有效量还是这样的量:在该量下抗体或抗体部分的治疗有效作用超出任何毒性或有害作用。“预防有效量”指在必要的剂量下和时间里能有效实现所需的预防结果的量。通常,由于预防剂量是在疾病早期阶段之前或在疾病早期阶段用于受试者,因此预防有效量会低于治疗有效量。

[0151] 可将本发明的抗体和抗体部分掺入到适合于例如肠胃外给药的药物组合物中。优选地,可将抗体或抗体部分制备成含有 0.1-250mg/ml 抗体的可注射溶液。可注射溶液可以在无色玻璃 (flint) 或琥珀色玻璃 (amber) 小瓶、安瓿或预充注射器中的液体剂型或冻

干剂型。缓冲剂可以是 L-组氨酸 (1-50mM), 最好 5-10mM, pH5.0-7.0 (最好 pH6.0)。其它合适的缓冲剂包括但不限于琥珀酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠或磷酸钾。可使用浓度 0-300mM (对于液体剂型最好 150mM) 的氯化钠来缓和溶液的毒性。对于冻干剂型, 可包括抗冻剂, 主要是 0-10% 蔗糖 (最好 0.5-1.0%)。其它合适的抗冻剂包括海藻糖和乳糖。对于冻干剂型, 可包括增量剂 (bulking agent), 主要是 1-10% 甘露糖醇 (最好 2-4%)。在液体剂型和冻干剂型中都可使用稳定剂, 主要是 1-50mM L-甲硫氨酸 (最好 5-10mM)。其它合适的增量剂包括甘氨酸、精氨酸, 可作为 0-0.05% 聚山梨醇酯-80 (最好 0.005-0.01%) 加入。另外的表面活性剂包括但不限于聚山梨醇酯 20 和 BRIJ 表面活性剂。

[0152] 本发明的组合物可以为多种形式。这些形式包括例如液体、半固体和固体剂型, 如液体溶液剂 (例如可注射和可输注溶液剂)、分散剂或混悬剂、片剂、丸剂、散剂、脂质体和栓剂。优选的形式取决于预定的给药方式和治疗应用。典型的优选组合物为可注射或可输注溶液剂形式, 如与用于和其它抗体一起对人进行被动免疫的那些组合物相似的组合物。优选的给药方式是胃肠外 (例如静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内) 给药。在一个优选的实施方案中, 抗体通过静脉内输注或注射给予。在另一个优选的实施方案中, 抗体通过肌肉内或皮下注射给予。

[0153] 通常, 治疗用组合物在制造和储藏条件下必须是无菌的和稳定的。组合物可配制成溶液剂、微乳、分散剂、脂质体或者其它与高药物浓度相配的有序结构。无菌可注射溶液剂可这样制备: 将活性化合物 (即抗体或抗体部分) 以所需的量掺入到适当的溶剂中, 同时按需一起掺入以上列举的一种成分或其组合, 然后进行过滤除菌。分散剂通常是这样制备: 将活性化合物掺入到含有基本的分散介质和所需的选自以上列举成分的其它成分的无菌介质中。在用于制备无菌可注射溶液剂的无菌冻干散剂的情况中, 优选的制备方法是进行真空干燥和喷雾干燥, 从之前进行过无菌过滤的活性成分加上任何另外所需成分的溶液产生出这些成分的粉末。溶液的适当流动性可例如这样来保持: 使用包衣料如卵磷脂, 在分散剂的情况中维持所需的颗粒大小, 和使用表面活性剂。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包括能延迟吸收的物剂如单硬脂酸盐和明胶来实现。

[0154] 本发明的抗体和抗体部分可通过多种本领域公知的方法给予, 不过对于许多治疗应用, 优选的给药途径/方式是皮下注射、静脉内注射或输注。本领域技术人员会认识到, 给药途径/方式要依所需的结果而变。在某些实施方案中, 可将活性化合物与能保护该化合物免受快速释放的载体一起进行制备, 所述载体如为控释制剂, 包括植入物、透皮贴剂和微胶囊递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物, 如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。有许多制备这种制剂的方法已申请了专利或者为本领域技术人员所公知。参见例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0155] 在某些实施方案中, 本发明的抗体或抗体部分可进行口服给药, 例如与惰性稀释剂或可吸收可食用载体一起给予。化合物 (如果需要, 还有其它成分) 还可包封在硬壳或软壳明胶胶囊中, 压制成片剂, 或者直接掺入到受试者的膳食中。对于口服治疗给药, 可将化合物与赋形剂一起掺合并以可摄取片剂、口含片剂、药片剂 (troche)、胶囊剂、酞剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂 (wafer) 等的形式使用。为通过胃肠外给药之外的方式给予本发明化合物, 可能需要将该化合物用能防止其失活的材料包衣或者与该材料一起共给予。

[0156] 还可将辅助性活性化合物掺入到组合物中。在某些实施方案中,可将本发明的抗体或抗体部分与一种或多种可用于治疗阿尔兹海默病或相关疾病或病症的另外治疗药剂一起共配制和 / 或共给予。例如,可将一种本发明抗体或其抗体部分与一种或多种能结合其它靶标的另外抗体一起共配制和 / 或共给予。

[0157] 在某些实施方案中,可将本发明的单克隆抗体或其片段与本领域公知的半衰期延长介质连接。这种介质包括但不限于 Fc 结构域、聚乙二醇和葡聚糖。这种介质描述于例如美国申请系列号 09/428,082 和公布的 PCT 申请号 W099/25044, 出于任何目的这两个专利通过引用结合到本文中。

[0158] 除了以上论述到的各程序外,从业人员也熟知这样的标准资料:这些资料描述用于大分子(例如 DNA 分子、质粒等)的构建、操作和分离,用于重组生物的产生和用于克隆的筛选和分离的特定条件和程序(参见例如, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press(1989); Maliga et al., *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Press(1995); Birren et al., *Genome Analysis: Detecting Genes, 1*, Cold Spring Harbor, New York(1998); Birren et al., *Genome Analysis: Analyzing DNA, 2*, Cold Spring Harbor, New York(1998); *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, eds. Clark, Springer, New York(1997))。

[0159] 单克隆抗体的用途

[0160] 本发明的单克隆抗体(例如 8F5 和 8CF)具有许多值得关注的用途。例如,单克隆抗体可如上所述用于阿尔兹海默病的预防、治疗和诊断。此外,该抗体可用于抗抗体的开发。此外,产生相应抗体的杂交瘤使得能够稳定提供相同单克隆抗体(即试剂)的连续来源,从而保证各种实验以及治疗应用中各抗体之间的同一性。

[0161] 还有,本发明的方法使得可以制备适量的用于制备其它原料的起始原料,而其它原料又可用来产生单克隆抗体(或其它抗体)供用于治疗阿尔兹海默病。上文提到,所述抗体还可用来进行被动免疫,以预防阿尔兹海默病或者以阿尔兹海默病的相同症状如认知损伤为特征的其它相关神经病症。

[0162] 在本发明的一个诊断实施方案中,使本发明的抗体(例如 8F5)或其部分包被在固体相上(或者存在于液体相中)。然后使试验样品或者说生物样品(例如全血、脑脊髓液、血清等)与固体相进行接触。如果样品中存在抗原(例如球聚体),这种抗原会结合固体相上的抗体,然后通过直接或间接方法检测。直接方法涉及简单地检测到复合物本身的存在,从而检测到抗原的存在。在间接方法中,将缀合物加到被结合抗原。缀合物包含与信号产生化合物或标记相连接的、能与被结合抗原发生结合的第二抗体。要是该第二抗原与被结合抗原发生结合,信号产生化合物就会产生可测量的信号。于是这种信号表明了抗原在试验样品中的存在。

[0163] 用于诊断性免疫测定的固体相的实例有多孔材料和无孔材料、乳胶颗粒、磁性颗粒、微颗粒(参见例如美国专利 5,705,330)、珠粒、膜、微量滴定孔和塑料管。固体相材料的选择和对缀合物中存在的抗原或抗体进行标记的方法,如果需要的话根据所需的测定模式性能特性来确定。

[0164] 如上所述,缀合物(或指示试剂)会包含与信号产生化合物或标记连接的抗体(或者也许是抗抗体,视测定法而定)。这一信号产生化合物或“标记”本身是可检测的,或

者可与一种或多种另外的化合物反应产生可检测产物。信号产生化合物的实例包括发色团、放射性同位素（例如 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 和 ^{14}C ）、化学发光化合物（例如吖啶鎓(acridinium)）、颗粒（可见的或荧光的）、核酸、络合剂或者催化剂如酶（例如碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶和核糖核酸酶）。在使用酶的情况中（例如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶），发色、发荧光或发光的基因底物的加入会导致可检测信号的产生。也可使用其它检测系统如时间分辨荧光、内反射荧光、扩增（例如聚合酶链反应）和拉曼光谱。

[0165] 可用上述免疫测定法测试的生物流体的实例包括血浆、全血、干全血、血清、脑脊髓液或者组织和细胞的水提取物或有机金属的水提取物。

[0166] 本发明还涵括检测抗体在试验样品中的存在的方法。这个方法包括以下步骤：(a) 使怀疑含有抗体的试验样品与对患者样品中的该抗体有特异性的抗抗体接触，接触的时间和条件足够使抗抗体 / 抗体复合物得以形成，其中该抗抗体是能结合患者样品中的抗体的本发明抗体；(b) 向所得的抗抗体 / 抗体复合物加入缀合物，该缀合物包含与能够产生可检测信号的信号产生化合物连接的抗原（其能结合该抗抗体）；和 (d) 通过检测信号产生化合物所产生的信号，检测在试验样品中可能存在的抗体的存在。可使用包含抗该抗抗体的抗体的对照品或校准品。

[0167] 本发明还包括包含有一种或多种本文所述抗体或其部分及药学上可接受的佐剂（例如弗氏佐剂或磷酸缓冲盐水）的疫苗。

[0168] 试剂盒也包括在本发明的范围之内。更具体的说，本发明包括用以测定怀疑患有阿尔兹海默病或者别的以认识损害为特征的病症的患者中抗原（例如球聚体）的存在的试剂盒。具体的说，用以测定抗原在试验样品中的存在的试剂盒包含：a) 本文所定义的抗体或其片段；和 b) 包含与能够产生可检测信号的信号产生化合物连接的第二抗体（对该抗原具有特异性）的缀合物。该试剂盒还可含有对照品或校准品以及说明书，该对照品或校准品包含能结合该抗原的试剂，该说明书详述如何使用试剂盒和试剂盒各组分。

[0169] 本发明还包括用以检测试验样品中的抗体的试剂盒。该试剂盒可包含 a) 对目的抗体有特异性的抗抗体（例如本发明抗抗体之一）和 b) 前文所定义的抗原或其部分。也可包括包含有能结合该抗原的试剂的对照品或校准品。更具体的说，该试剂盒可包含 a) 对该抗体有特异性的抗抗体（如本发明抗抗体之一）和 b) 包含有与能够产生可检测信号的信号产生化合物连接的抗原（例如球聚体）的缀合物。此外，该试剂盒还可包含对照品或校准品以及说明书或包装插页，该对照品或校准品包含能结合该抗原的试剂，该说明书或包装插页描述应如何使用试剂盒和试剂盒各组分。

[0170] 该试剂盒还可包含一个容器如小瓶、瓶子 (bottle) 或条，所述每种容器具有预定 (pre-set) 固体相，以及含有相应缀合物的其它容器。这些试剂盒还可含有装着为进行测定所需的其它试剂（如洗涤、加工和指示试剂）的小瓶或容器。

[0171] 还应指出的是，本发明不仅包括上述全长抗体，还包括其部分或片段，例如其 Fab 部分。另外，本发明涵括任何具有与本发明抗体相同的特性的抗体，所述相同的特性是例如结合特异性、结构等方面的特性。

[0172] 保藏信息：

[0173] 能产生单克隆抗体 8F5 的杂交瘤 (ML5-8F5. 1F2. 2A2) 根据布达佩斯条约的

条款于 2005 年 12 月 1 日寄存在美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110), 分配的保藏号为 ATCC No. PTA-7238。

[0174] 能产生单克隆抗体 8C5 的杂交瘤 (ML5-8C5. 2C1. 8E6. 2D5) 根据布达佩斯条约的条款于 2006 年 2 月 28 日寄存在美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110), 分配的保藏号为 ATCC No. PTA-7407。

[0175] 本发明可用以下非限制性实施例进行说明：

[0176] 实施例 I(a)

[0177] 单克隆抗体 8F5 和 8C5 的产生

[0178] 将 Balb/c 小鼠用如 Barghorn et al., 2005, J Neurochem, 95, 834-847 中所述的 50 微克 A β (1-42) 球聚体 (于 CFA (Sigma) 中) 进行 sub-q 免疫, 并以一个月的时间间隔加强免疫两次。收集脾脏, 将脾细胞与小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞以 5 : 1 比例通过 PEG 程序进行融合。将融合细胞以 2×10^5 个细胞 /ml、200ml / 孔接种在 96 孔平皿中的重氮丝氨酸 / 次黄嘌呤选择培养基中。让细胞生长形成可见集落, 通过直接 ELISA 测定法测定上清液的 A β 寡聚体反应性。通过限制性稀释对分泌抗 A β 寡聚体抗体的杂交瘤进行亚克隆, 直到抗体表达呈现稳定。

[0179] 实施例 II

[0180] 8F5 和 8C5 结合 A β (1-40) 和 A β (1-42) 的球聚体优先于结合它们的单体制品

[0181] 为测试 8F5 的选择性, 使用两种进行了不同的溶解的 A β (1-42) 单体制品, 并使用刚制备的 A β (1-40) 作为单体的替代物。进行了两个类型的实验。在第一个实验中, 通过夹心 ELISA 法, 以球聚体衍化但是构象异构的 (globulomer derived but conformer) 非特异性的 MA6G1 (参见 S. Barghorn et al. J. Neurochemistry, 95 : 834 (2005)) 作为捕捉抗体, 测试 8F5 对 A β 球聚体的特异性。用生物素酰化 8F5 作为第二和构象异构 (conformer) 选择性抗体。这个实验在以下实施例 2.1 中描述。

[0182] 在第二个实验 (在以下实施例 2.2 中描述) 中, 通过斑点印迹免疫测定法分析寡聚体对 A β (1-42) 单体和对 A β (1-40) 单体的选择性。在这个实验中, 8F5 显示出对 A β (1-42) 球聚体 (对比已知抗体 4G8, 其映射到的区域与 8F5 类似, 但由用线型肽 A β (17-24) (Abcam Ltd., Cambridge, MA) 进行免疫衍生) 的结合优先于对 A β (1-42) 单体的结合和对 A β (1-40) 单体的结合。8C5 的试验方案同 8F5。

[0183] 实施例 2.1 : 单克隆抗体 8F5 和 8C5 的寡聚体选择性

[0184] a) A β (1-42) 球聚体的制备：

[0185] 将 9mg A β (1-42) Fa. Bachem 溶于 1.5ml HFIP (1.1.1.3.3.3 六氟 -2- 丙醇) 中, 在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1, 5h。将所得溶液在 SpeedVac 中蒸发, 悬浮于 396 μ l DMSO (5mM A β 储备溶液) 中。将样品在超声波水浴中超声处理 20 秒钟, 振摇 10 分钟, 在 -20 $^{\circ}$ C 下储藏过夜。

[0186] 将样品用 4.5ml PBS (20mM NaH $_2$ PO $_4$; 140mM NaCl; pH7.4) 稀释, 加入 0.5ml 2% SDS 水溶液 (0.2% SDS 含量)。将所得混合物在 37 $^{\circ}$ C 下温育 7 小时, 用 16ml H $_2$ O 稀释, 在 37 $^{\circ}$ C 下再温育 16 小时。然后, 将 A β (1-42) 球聚体溶液以 3000g 离心 20 分钟。上清液用 30KDa centriprep 浓缩到 0.5ml。将浓缩液在 6 $^{\circ}$ C 下对 5mM NaH $_2$ PO $_4$; 35mM NaCl; pH7.4 透析

过夜。随后,将 A β (1-42) 球聚体浓缩液以 10000g 离心 10 分钟。然后将上清液分成等分试样,在 -20 $^{\circ}$ C 下储藏。

[0187] b) HFIP 预处理的单体 A β (1-42) 的制备:

[0188] 将 3mg 人 A β (1-42) (Bachem Inc, 目录号 H-1368) 溶于 1.7ml Eppendorff 管中的 0.5ml HFIP (6mg/ml 悬浮液) 中,在 37 $^{\circ}$ C 下振摇 1.5h (Eppendorff Thermo 混合器, 1400rpm), 直到获得透明溶液。将样品在 speed vac 浓缩器中干燥 (1.5h), 重悬于 13.2 μ l DMSO 中, 振摇 10 秒钟, 然后进行超声浴超声处理 (20 秒钟), 振摇 (例如在 Eppendorff Thermo 混合器中, 1400rpm) 10 分钟。

[0189] 加入 6ml 20mM NaH₂PO₄; 140mM NaCl; 0.1% 嵌段式聚醚 (Pluronic) F68; pH7.4, 在室温下搅拌 1 小时。将样品在 3000g 下离心 20 分钟。弃去上清液, 将沉淀溶于 0.6ml 20mM NaH₂PO₄; 140mM NaCl; 1% 嵌段式聚醚 F68; pH7.4 中。加入 3.4ml 水, 在室温下搅拌 1 小时, 然后以 3000g 离心 20 分钟。将上清液以 8x0.5ml 等分试样在 -20 $^{\circ}$ C 下储藏。

[0190] c) 单体 A β (1-42) 的 NH₄OH 溶液的制备:

[0191] 将 1mg A β (1-42) 固体粉末 (Bachem Inc., 目录号 H-1368) 溶于 0.5ml 0.1% NH₄OH 水溶液 (刚制备) (2mg/ml) 中, 立即在室温下振摇 30 秒钟以获得透明溶液。将样品在 -20 $^{\circ}$ C 下储藏备用。

[0192] d) 单体 A β (1-40) 的制备:

[0193] 将 1mg 人 A β (1-40) (Bachem Inc, 目录号 H-1194) 悬浮于 Eppendorff 管中的 0.25ml HFIP (4mg/ml 悬浮液) 中。将该管在 37 $^{\circ}$ C 下振摇 1.5 小时 (例如在 Eppendorff Thermo 混合器中, 1400rpm) 以获得透明溶液, 然后在 speed vac 浓缩器中干燥 (1.5 小时)。将样品重新溶于 46 μ l DMSO (21.7mg/ml 溶液) 中, 振摇 10 秒钟, 然后在超声浴中超声处理 20 秒钟。振摇 (例如在 Eppendorff Thermo 混合器中, 1400rpm) 10 分钟后, 将样品在 -20 $^{\circ}$ C 下储藏备用。

[0194] e) 抗 A β 小鼠单克隆抗体 8F5 的生物素酰化:

[0195] 将 500 μ l 抗 A β 小鼠单克隆抗体 8F5 于 PBS 中的溶液 (0.64mg/ml) 加到刚溶于水的 2 μ l 20mg/ml Sulfo-NHS-生物素 (Pierce Inc., 目录号 21420), 振摇 (例如在 Eppendorff Thermo 混合器中, 1400rpm) 30 分钟, 在透析管中 6 $^{\circ}$ C 下对 500ml 20mM Na Pi; 140mM NaCl; pH7.4 透析 16 小时。将透析液在 -20 $^{\circ}$ C 下储藏备用。8C5 据此进行生物素酰化。

[0196] f) A β 样品的夹心 ELISA:

[0197] g) 试剂目录:

[0198] 1. F96 Cert. Maxisorp NUNC-Immuno Plate, 目录号 439454

[0199] 2. 结合抗体: 抗 A β 小鼠单克隆抗体 6G1, 溶于 PBS 中; 浓度: 0.4mg/ml; 在 -20 $^{\circ}$ C 下储藏

[0200] 3. 包被缓冲液: 100mM 碳酸氢钠; pH9.6

[0201] 4. ELISA 封闭剂; Roche Diagnostics GmbH, 目录号 1112589

[0202] 5. PBST 缓冲液:

[0203] 20mM NaH₂PO₄; 140mM NaCl; 0.05% Tween 20; pH7.4

[0204] 6. 牛清蛋白部分 V (albumin bovine fraction V), 无蛋白酶; Serva, 目录号

11926.03 ;4℃下储藏

[0205] 7. PBST+0.5% BSA 缓冲液 :

[0206] 20mM NaH_2PO_4 ;140mM NaCl ;0.05% Tween 20 ;pH7.4+0.5% BSA

[0207] 8. A β (1-42) 球聚体标准储备液 :5mM NaH_2PO_4 ;35mM NaCl 的溶液 ;pH7.4 ;浓度 :10.77mg/ml ;-20℃下储藏

[0208] 9. A β (1-42) 单体 HFIP 处理标准储备液 :3mM NaH_2PO_4 ;21mM NaCl ;0.15% 嵌段式聚醚 F68 的溶液 ;pH7.4 ;浓度 :0.45mg/ml ;-20℃下储藏

[0209] 10. A β (1-42) 单体于 NH_4OH 中的标准储备溶液 ;于 0.1% NH_4OH 中的溶液 ;浓度 :2mg/ml ;-20℃下储藏

[0210] 11. A β (1-40) 单体 HFIP 处理标准储备液 :于 DMSO 中的溶液 ;浓度 :21.7mg/ml ;-20℃下储藏

[0211] 12. 生物素酰化的抗 A β 小鼠单克隆抗体克隆 8F5 ;于 PBS 中的溶液 ;浓度 :0.24mg/ml ;-80℃下储藏

[0212] 13. 链霉亲和素 -POD 缀合物 ;Fa. Roche, 目录号 1089153

[0213] 14. 染色 :TMB ;Roche Diagnostics GmbH, 目录号 92817060 ;42mM DMSO 溶液 ;3% H_2O_2 水溶液 ;100mM 乙酸钠 pH4.9

[0214] 15. 通过加入 2M 磺酸溶液停止染色

[0215] 试剂的制备 :

[0216] 采用以下方案 :

[0217] 1. 结合抗体

[0218] 将单克隆 6G1 储备溶液解冻,在包被缓冲液中 1 : 400 稀释。

[0219] 2. 封闭剂 :将封闭剂溶于 100ml 水中制备封闭储备溶液,以 10ml 的等分试样在 -20℃下储藏。对于每个要封闭的板,将 3ml 封闭储备溶液用 27ml 水稀释。

[0220] 3. A β 标准溶液 :

[0221] a) A β (1-42) 球聚体

[0222] -将 1 μ l A β (1-42) 球聚体标准储备溶液加到 1076 μ l PBST+0.5% BSA = 10 μ g/ml

[0223] -将 50 μ l 10 μ g/ml A β (1-42) 球聚体标准溶液加到 4950 μ l PBST+0.5% BSA = 100ng/ml

[0224] b) A β (1-42) 单体, HFIP 处理

[0225] -将 10 μ l A β (1-42) 单体 HFIP 预处理标准储备溶液加到 440 μ l PBST+0.5% BSA = 10 μ g/ml

[0226] -将 50 μ l 10 μ g/ml A β (1-42) 单体 HFIP 预处理标准溶液加到 4950 μ l PBST+0.5% BSA = 100ng/ml

[0227] c) A β (1-42) 单体于 NH_4OH 中的溶液

[0228] -将 5 μ l A β (1-42) 单体于 NH_4OH 中的标准储备溶液加到 995 μ l PBST+0.5% BSA = 10 μ g/ml

[0229] -将 50 μ l 10 μ g/ml A β (1-42) 单体于 NH_4OH 中的标准溶液加到 4950 μ l PBST+0.5% BSA = 100ng/ml

[0230] d) A β (1-40) 单体, HFIP 预处理

[0231] - 将 1 μ l A β (1-40) 单体 HFIP 预处理标准储备溶液加到 49 μ l PBST+0.5% BSA = 430 μ g/ml

[0232] - 将 10 μ l 430 μ g/ml A β (1-40) 单体 HFIP 预处理标准储备溶液加到 420 μ l PBST+0.5% BSA = 10 μ g/ml

[0233] - 将 50 μ l 10 μ g/ml AB(1-40) 单体 HFIP 预处理标准溶液加到 4950 μ l PBST+0.5% BSA = 100ng/ml

[0234] 标准曲线:

[0235]

编号 最终浓度	储备溶液	PBST + 0.5% BSA
1 100ng/ml	2ml S	0 ml
2 31.6ng/ml	0.633ml (1)	1.367ml
3 10ng/ml	0.633ml (2)	1.367ml
4 3.16ng/ml	0.633ml (3)	1.367ml
5 1ng/ml	0.633ml (4)	1.367ml
6 0.32ng/ml	0.633ml (5)	1.367ml
7 0.1ng/ml	0.633ml (6)	1.367ml
8 0.0ng/ml	0ml	2ml

[0236] 1. 第一抗体:生物素酰化的单克隆抗体 8F5:

[0237] 将浓缩的生物素酰化抗 A β 单克隆抗体 8F5 在 PBST+0.5% BSA 缓冲液中稀释。稀释系数为 1/1200 = 0.2 μ g/ml。将抗体立即使用。

[0238] 2. 标记试剂:

[0239] 使链霉亲和素-POD 缀合物冻干品在 0.5ml 水中复原。加入 500 μ l 甘油,以 100 μ l 的等分试样在 -20 $^{\circ}$ C 下储藏备用。

[0240] 将浓缩的标记试剂在 PBST 缓冲液中稀释。

[0241] 稀释系数为 1/10000。立即使用。

[0242] 3. 染色溶液 TMB:

[0243] 将 20ml 100mM 乙酸钠 pH4.9 与 200 μ l TMB 溶液和 29.5 μ l 13% 过氧化物溶液进行混合。立即使用。

[0244] 样品板设置:(注意所有的标准品均重复进行两次)

[0245]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6
C	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
D	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16	3.16
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
G	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
H	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[0246] 所采用的程序：

[0247] 1. 每孔加入 100 μ l 抗 A β 小鼠单克隆抗体 6G1 溶液,在 4 $^{\circ}$ C 下温育过夜。[0248] 2. 弃去抗体溶液,用 250 μ l PBST 缓冲液洗涤各孔三次。[0249] 3. 每孔加入 260 μ l 封闭溶液,在室温下温育 2 小时。[0250] 4. 弃去封闭溶液,用 250 μ l PBST 缓冲液洗涤各孔三次。[0251] 5. 标准品制备后,将标准品以 100 μ l/孔加到板中。在室温下温育 2 小时,并在 4 $^{\circ}$ C 下温育过夜。[0252] 6. 弃去标准溶液,用 250 μ l PBST 缓冲液洗涤各孔三次。[0253] 7. 每孔加入 200 μ l 生物素酰化的第一抗体 8F5 溶液,在室温下温育 1.5 小时。[0254] 8. 弃去抗体溶液,用 250 μ l PBST 缓冲液洗涤各孔三次。[0255] 9. 每孔加入 200 μ l 标记溶液,在室温下温育 1 小时。[0256] 10. 弃去标记溶液,用 250 μ l PBST 缓冲液洗涤各孔三次。[0257] 11. 向每孔加入 100 μ l TMB 溶液,在室温下温育 (5-15 分钟)。[0258] 12. 观察染色情况,在背景染色开始后每孔加入 50 μ l 终止溶液。

[0259] 13. 在 450nm 下进行 UV 读数。

[0260] 14. 从标准曲线计算结果。

[0261] 15. 进行评估

[0262] 抗体 8F5 的结果在图 1 中显示,抗体 8C5 的结果在图 8 中显示。在 Log EC₅₀ 值方面,相比于两种不同制备的 A β (1-42) 单体 (分别为 2.745 和 3.003) 和 A β (1-40) 单体 (2.825) 的较低值,A β (1-42) 球聚体抗原 (1.958) 明显最低。这些数据表明,抗体 8F5 对 A β (1-42) 球聚体的选择性为对 A β (1-42) 单体的选择性的约 10 倍。

[0263] 在抗体 8C5 上也获得几乎相同的结果,在图 8 中显示。

[0264] 实施例 22:单克隆抗体 8F5 和 8C5 的寡聚体选择性

[0265] - 通过斑点印迹方法区别 A β 单体和 A β 球聚体 :8F5 和 8C5 与 4G8 的比较。

[0266] 用 PBS 对 A β (1-42) 球聚体、A β 1-42 单体和 A β 1-40 单体进行稀释, 浓度范围为 100pmol/ μ l-0.01pmol/ μ l。将每个样品取 1 μ l 点滴到硝酸纤维素膜上。将小鼠单克隆抗体 4G8 和 8F5 (0.2 μ g/ml) 以及与碱性磷酸酶偶联的抗小鼠 IgG 作为第二抗体和染色试剂 NBT/BCIP (RocheDiagnostics, Mannheim) 一起用于检测。通过显像密度计 (GS800, Biorad, Hercules, CA, USA) 在 10pmol 的抗原浓度下对检测信号分析其强度 (反射密度 = RD)。在此浓度下, 对于每种 A β 形式, 所测得的反射密度都在显像密度计检测的线性范围内。另一种抗体 8C5 也以类似的方案进行使用。结果在下表 1 中显示:

[0267]

	反射密度 (RD)[10pmol]			A β (1-42) 球聚体的 RD 与 A β (1-42) 单体的 RD 之比	A β (1-42) 球聚体的 RD 与 A β (1-40) 单体的 RD 之比
	A β (1-42) 球聚体	A β (1-42) 单体	A β (1-40) 单体		
8F5	1,6	1,1	0,1	1,4	16,9
8C5	1,3	0,2	0,3	5,1	4,1
4G8	3	3,1	0,7	1	4,2

[0268] 表 1 :A β 1-40 单体和 A β 1-42 单体的抗 A β 抗体的区别。该区别计算为 A β 1-42 球聚体和 A β 1-42 单体分别与 A β 1-40 单体的检测信号比。

[0269] 具体的说, 以上结果表明, 8F5 和 8C5 与市售可得的映射到 A β (17-24) (即线型序列) 的抗 A β (1-42) 抗体 4G8 相比显示出不同的结合谱 (binding profile)。更具体的说, 8F5 和 8C5 显示出对球聚体的结合优先于对 A β 42 单体的结合 (参见第 4 列; 比较 1.4 与 1) 和对球聚体的结合优先于对 A β 40 的结合 (第 5 列; 比较 16.9 与 4.2)。这两个相对于标准 4G8 的改进的结合选择性, 如上所述应导致在使用 8F5 和 / 或 8C5 时副作用的产生更少 (例如蚀斑结合)。

[0270] 实施例 III

[0271] 8F5 和 8C5 与 AB(1-42) 原纤维的结合

[0272] 由于 8F5 抗体是针对可溶性球聚体而产生的, 猜测认为 8F5 应该不会结合沉积的斑块或原纤维材料。因此, 如以下实施例所述对 8F5 与聚合的 A β 原纤维悬浮液的结合进行测试。

[0273] A β (1-42) 原纤维的制备:

[0274] 将 1mg A β (1-42) (Bachem Inc., 目录号:H-1368) 溶于 500 μ l 0.1% NH₄OH (Eppendorff 管) 水溶液中, 将样品在室温下搅拌 1 分钟, 然后以 10000g 离心 5 分钟。将上清液吸取到新的 Eppendorff 管中, 按照 Bradford 蛋白质浓度测定法 (BIO-RAD Inc. 测定程序) 测量 A β (1-42) 浓度。

[0275] 将 100 μ l 的这一刚制备的 A β (1-42) 溶液用 300 μ l 20mM NaH₂PO₄; 140mM NaCl;

pH7.4 中和,然后用 2% HCl 调 pH7.4。将样品在 37℃ 下再温育 20 小时,离心 (10min, 10000g)。弃去上清液,将原纤维沉淀用 400 μ l 20mM NaH_2PO_4 ;140mM NaCl ;pH7.4 在 Vortex 混合器上搅拌 1 分钟进行重悬,然后进行离心 (10min,10000g)。弃去上清液后,重复此重悬程序,对最终原纤维悬浮液再进行离心沉淀 (10min,10000g)。再次弃去上清液,将最终沉淀在 Vortex 混合器上搅拌 1 分钟重悬于 380 μ l 20mM NaH_2PO_4 ;140mM NaCl ;pH7.4 中。将所得样品的等分试样在冷藏器中 -20℃ 下储藏。

[0276] 将 80 μ l 原纤维悬浮液与 320 μ l 20mM NaH_2PO_4 ;140mM NaCl ;0.05% Tween20 ; pH7.4 缓冲液进行混合,在室温下搅拌 5 分钟,然后进行超声处理 (20 秒钟)。离心 (10min, 10000g) 后,将沉淀在 Vortex 混合器中搅拌重悬于 190 μ l 20mM NaH_2PO_4 ;140mM NaCl ; 0.05% Tween20 ;pH7.4 中。

[0277] - 抗体与 A β (1-42) 原纤维的结合

[0278] 将此原纤维悬浮液的 10 μ l 等分试样与以下物质一起进行温育:

[0279] a) 10 μ l 20mM Na Pi ;140mM NaCl ;pH7.4

[0280] b) 10 μ l 0.1 μ g/ μ l 单克隆抗体 6E10 Signet Inc. 目录号 9320,20mM

[0281] c) NaH_2PO_4 ;140mM NaCl ;pH7.4

[0282] d) 10 μ l 0.1 μ g/ μ l 单克隆抗体 4G8SignetInc. 目录号 9220,20mM NaPi ;140mM NaCl ;pH7.4 中

[0283] e) 10 μ l 0.1 μ g/ μ l 单克隆抗体 8F5(8C5),于 20mM Na Pi ;140mMNaCl ;pH7.4 中

[0284] 将样品在 37℃ 下温育 20 小时。最后将样品离心 (10min,10000g)。收集含有未结合抗体级分的上清液,与 20 μ l SDS-PAGE 样品缓冲液混合。将沉淀级分用 50 μ l 20mM NaH_2PO_4 ;140mM NaCl ;pH7.4 缓冲液在 Vortex 混合器中搅拌 1 分钟进行洗涤,然后离心 (10min,10000g)。将最终沉淀重悬于 20 μ l 20mM Na Pi ;140mM NaCl ;0.025% Tween20 ; pH7.4 缓冲液中,并溶于 20 μ l SDS-PAGE 缓冲液中。

[0285] -SDS-PAGE 分析

[0286] 将上清液和重悬沉淀样品在 98℃ 下加热 5 分钟,在以下条件下加样到 4-20% Tris/Glycin Gel 上。

[0287] SDS 样品缓冲液:0.3g SDS;0.77g DTT;4ml1M Tris/HCl pH6.8;8ml 甘油;1ml 1%溴酚蓝乙醇溶液;加水到 50ml4-20% Tris/Glycin Gel :Invitrogen Inc., No. : EC6025BOX 中。

[0288] 电泳缓冲液:7.5g Tris ;36g 甘氨酸 ;2.5g SDS ;加水到 2.5l。

[0289] 在 20mA 下进行 PAGE。凝胶进行考马斯蓝 R250 染色。

[0290] 结果

[0291] SDS-PAGE 的考马斯蓝染色表明,抗体的重链和轻链主要存在于原纤维悬浮液的上清液中 (泳道 7,图 2),原纤维悬浮液的剩余部分显示极少的抗体物质,同时还显示 4.5kDa 的部分解聚 A β 。与 8F5 和 8C5 不同的是,相比于原纤维结合级分 (泳道 6,图 2),其它抗 A β 抗体不在可溶性级分中出现 (6E10,泳道 3,图 2),或者部分地出现 (4G8,泳道 5,图 2)。

[0292] 通过测量原纤维结合级分和上清液级分中的抗体重链的反射密度值,从 SDS-PAGE 分析对与原纤维类型的 A β 的相对结合进行评估,并按照下式进行计算:

[0293] 原纤维结合抗体级分 = $\text{RD}_{\text{原纤维级分}} \times 100\% / (\text{RD}_{\text{原纤维级分}} + \text{RD}_{\text{上清液级分}})$

[0294] 获得了以下数值：

[0295]

抗体	原纤维抗体结合级分
6E10	98%
8F5	16%
8C5	21%

[0296] 这些数据表明结合的 8F5 和 8C5 与标准抗体 6E10 相比有显著下降。

[0297] 实施例 IV

[0298] 内源 A β (1-42) 球聚体相对于 A β (1-40) 的优先结合

[0299] 基于 A β 的寡聚体概念,重要的是抗 A β 寡聚体抗体也能显示在体内对 A β (1-42) 寡聚体的优先结合,特别是在轻度认知损害和 AD 患者中优先于 A β (1-40) 的结合。将 A β (1-42) 物质相对于 A β (1-40) 降低的这一想法,用于通过 NSAID 治疗 AD 的治疗方法中(Weggen et al., Nature414,212-216(2001))。据认为,与 A β (1-40),那些 NSAID 降低 A β (1-42),在阿尔茨海默病的治疗中显示最佳的功效。A β (1-42)/A β (1-40) 比对于选择性疗法以及对于诊断性目的都是重要的。

[0300] 用来自阿尔兹海默病患者和 MCI 患者的 CSF 样品进行分析。从图 3 所示和以下描述的结果可以得出结论,8F5 具有优于诸如 6E10 的 A β 抗体的重大优点,因为 8F5 检测出 A β (1-42) 的比例高于检测出聚集度较低的 A β (1-40) 的比例。这个优点使得可以更有选择性地诊断和中和 MCI 和 AD 患者中的 A β (1-42) 型寡聚体。

[0301] A) 用寡聚体选择性抗 A β 鼠单克隆抗体 8F5 进行免疫沉淀后 MCI 和 AD 患者的 CSF 中的内源 A β (1-42) 和 A β (1-40) 水平：

[0302] 将抗 A β 单克隆抗体固定化于 CNBr 活化的 Sepharose 4B：

[0303] a) 单克隆抗体 6E10 Signet Inc., 目录号 9320

[0304] b) 单克隆抗体 8F5

[0305] 将 0.4g CNBr 活化的 Sepharose4B(Amersham Pharmacia Bio-techAB, Uppsala, Sweden, Inc., 目录号 17-0430-01) 加到 10ml 1mM HCl 水溶液中,在室温下温育 30 分钟。将 CNBr 活化的 Sepharose4B 用 10ml1mM HCl 洗涤三次,用 10ml100mM NaHCO₃;500mM NaCl;pH8.3 洗涤两次。对于每种固定化抗体,将 100 μ l CNBr 活化的 Sephanose 4B 基质加到 950 μ l 0.5mg/ml 抗 A β 鼠单克隆抗体溶液(于 100mMNaHCO₃;500mM NaCl;pH8.3 中)。在室温下振摇 2 小时后,将样品以 10000g 离心 5 分钟。然后,将 500 μ l 100mM 乙醇胺;100mMNaHCO₃;500mM NaCl;pH8.3 缓冲液加到珠粒,将样品在室温下振摇 1 小时。将抗 A β 鼠单克隆抗体-Sepharose 样品以 10000g 离心 5 分钟,用 500 μ l 20mM NaH₂PO₄;140mM NaCl;pH7.4 洗涤 5 次。加入叠氮化钠至 0.02% 终浓度使样品稳定化,然后在 6°C 下进行储藏。

[0306] 免疫沉淀：

[0307] a) 小鼠单克隆抗体 (mMAb)6E10-Sepharose

[0308] b) 小鼠单克隆抗体 (mMAb)8F5-Sepharose

[0309] 将 200 μ l 的人脑脊液样品用 200 μ l 20mM NaH₂PO₄NaH₂PO₄;140mM NaCl;0.05%

Tween20 ;pH7.4 进行稀释。将这些样品加到 2 μ l 抗 A β 小鼠单克隆抗体 -Sephrose 基质,在室温下搅拌 2 小时。将样品以 10000g 离心 5 分钟。弃去上清液,将抗 A β 小鼠单克隆抗体 -Sephrose 用 50 μ l PBS 洗涤两次,搅拌 1 分钟后离心 (5 分钟,10000g)。弃去上清液,接着将 Sepharose 珠粒悬浮于 50 μ l 2mM NaH₂PO₄NaH₂PO₄;14mM NaCl, pH7.4 中,然后在室温下搅拌 1 分钟,以 10000g 离心 5 分钟。在下一个步骤中,将抗 A β 小鼠单克隆抗体 -Sephrose 珠粒用 50 μ l 50% CH₃CN ;0.2% TFA 水溶液进行处理。在室温下振摇 10 分钟后,将样品以 10000g 离心 5 分钟。收集上清液并转移到 1.5ml Eppendorf 管。将样品与 50 μ l 水混合,在 Speed Vac 浓缩器中蒸发。将沉淀重新溶解于 4 μ l 70% HCOOH,在室温下振摇 10 分钟,用 76 μ l 1M Tris-溶液和 720 μ l 20mM NaH₂PO₄NaH₂PO₄;140mM NaCl ;0.05% Tween 20 ;pH7.4 中和。

[0310] 用于测定 CSF 中的 A β (1-40)、(1-42) 单体形式的样品 :

[0311] a) 没有进行免疫沉淀时 CSF 样品中的 A β 含量 :

[0312] 将 158 μ l CSF 用 342 μ l 20mM NaH₂PO₄;140mM NaCl ;0.05% Tween 20 ;pH7.4 进行稀释。将此 1 : 3.16 稀释液进行夹心 ELISA,在评估过程中加以考虑。

[0313] b) 进行免疫沉淀后 CSF 样品中的 A β 含量 :

[0314] 将得自上述程序的样品进行分析。

[0315] 用于测定 CSF 中的 A β (1-40) 的夹心 FLISA 方案

[0316] 试剂目录 :

[0317] 1. F96Cert. Maxisorp NUNC-Immuno Plate, 目录号 439454

[0318] 2. 结合抗体

[0319] 抗 A β 单克隆抗体 克隆 6E10 ;Signet 目录号 9320 ; 浓度 :0.4mg/ml Bradford(BioRad) ; -20 $^{\circ}$ C 下储藏

[0320] 3. 偶联缓冲液

[0321] 100mM 碳酸氢钠 ;pH9.6

[0322] 4. ELISA 封闭试剂 ;Roche Diagnostics GmbH, 目录号 1112589

[0323] 5. PBST 缓冲液

[0324] 20mM NaH₂PO₄NaH₂PO₄ ;140mM NaCl ;0.05% Tween20 ;pH7.4

[0325] 6. A β (1-40) 标准品 :

[0326] A β (1-40) 固体粉末 ;Bachem 目录号 H-1194 ; -20 $^{\circ}$ C 下储藏

[0327] 7. 第一抗体 :

[0328] 抗 A β (1-40) 兔 pAb ;经亲和纯化 ;于 PBS 中的溶液 ;浓度 :0.039mg/ml ;

[0329] Signet 目录号 9130-005 ; -20 $^{\circ}$ C 下储藏

[0330] 8. 标记试剂 : 抗兔 -POD 缀合物 ;Fa. Jackson ImmunoResearch 目录号 111-036-045 ;

[0331] 9. 染色

[0332] TMB ;Roche Diagnostics GmbH 目录号 92817060 ;42mM 于 DMSO ;3% H₂O₂ 水溶液 ;100mM 乙酸钠 pH4.9

[0333] 10. 终止溶液 2M 磺酸

[0334] 用于制备试剂的方案 :

[0335] 1. 结合抗体：

[0336] 将抗 A β 单克隆抗体 6E10 (Signet Inc, 目录号 9320) 稀释至终浓度 0.7mg/ml。

[0337] 2. 封闭剂：

[0338] 为了制备封闭储备溶液, 将封闭试剂溶于 100ml H₂O 中, 以各为 10ml 的等分试样在 -20°C 下储藏。将 3ml 的封闭储备溶液用 27ml H₂O 进行稀释, 供封闭一个 ELISA 板。

[0339] 3. A β (1-40) 单体形式标准稀释液：

[0340] A) A β (1-40) 单体标准储备液：将 0.5mg A β (1-40) 溶于 250 μ l 10.1% NH₄OH 中, 浓度：2mg/ml；刚制备；立即使用。

[0341] B) 将 5 μ l A β (1-40) 单体标准储备溶液加到 995 μ l PBST = 10 μ g/ml

[0342] C) 将 5 μ l, 10 μ g/ml A β (1-40) 单体标准溶液加到 4995 μ l PBST = 10ng/ml

[0343] 标准曲线：

[0344]

编号	储备溶液	PBST
最终浓度		
1	2ml B	0ml
10000pg/ml		
2	0.633ml (1)	1.367ml
3160pg/ml		
3	0.633ml (2)	1.367ml
1000pg/ml		
4	0.633ml (3)	1.367ml
316pg/ml		
5	0.633ml (4)	1.367ml
100pg/ml		
6	0.633ml (5)	1.367ml
31.6pg/ml		
7	0.633ml (6)	1.367ml
10pg/ml		
8	0ml	2ml
0.0pg/ml		

[0345] 样品：

[0346] IP：免疫沉淀样品

[0347]

编号 稀释系数	样品	PBST
1 直接	0.4ml IP	0ml
2 1:5	0.1ml (1)	0.4ml
3 1:25	0.1ml (2)	0.4ml
4 1:125	0.1ml (3)	0.4ml

[0348] 4. 第一抗体：

[0349] 将浓缩的抗 A β (1-40)pAb 稀释在 PBST 缓冲液中稀释。稀释系数为 1/200 = 0.2 μ g/ml。立即使用。

[0350] 5. 第二抗体：

[0351] 将冻干的抗兔 -POD 缀合物溶于 0.5ml H₂O 中，与 500 μ l 甘油混合。然后将抗体浓缩物以 100 μ l 等分试样在 -20 $^{\circ}$ C 下储藏。将浓缩物在 PBST 缓冲液中进行 1 : 10' 000 稀释。将抗体溶液立即使用。

[0352] 6. TMB 溶液：将 20ml 的 100mM 乙酸钠 pH4.9 与 200 μ l TMB 溶液和 29.5 μ l 13% 过氧化氢混合在一起。将此溶液立即使用。

[0353] 样品板设置：(注意所有的标准品和样品均重复运行两次。)

[0354]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10000	10000	U1	U1								
B	3160	3160	U2	U2								
C	1000	1000	U3	U3								
D	316	316	U4	U4								
E	100	100	U5	U5								
F	31.6	31.6	U6	U6								
G	10	10	U7	U7								
H	0.0	0.0	U8	U8								

[0355]

[0356] U1-U# = 未知样品

[0357] 所用的程序：

[0358] 1. 每孔加入 100 μ l 结合抗体溶液，在 4 $^{\circ}$ C 下温育过夜。

- [0359] 2. 弃去抗体溶液,用 250 μ l PBST 缓冲液洗涤各孔三次。
- [0360] 3. 每孔加入 260 μ l 封闭溶液,在室温下温育 2 小时。
- [0361] 4. 弃去封闭溶液,用 250 μ l PBST 缓冲液洗涤各孔三次。
- [0362] 5. 标准品和样品制备后,将标准品和样品以 100 μ l/孔加到板中,在室温下温育 2 小时,并在 4 $^{\circ}$ C 下温育过夜。
- [0363] 6. 弃去标准品 / 样品溶液,用 250 μ l PBST 缓冲液洗涤各孔三次。
- [0364] 7. 每孔加入 200 μ l 第一抗体溶液,在室温下温育 1.5 小时。
- [0365] 8. 弃去抗体溶液,用 250 μ l PBST 缓冲液洗涤各孔三次。
- [0366] 9. 每孔加入 200 μ l 标记溶液,在室温下温育 1 小时。
- [0367] 10. 弃去标记溶液,用 250 μ l PBST 缓冲液洗涤各孔三次。
- [0368] 11. 向每孔加入 100 μ l TMB 溶液,在室温下温育 (5-15 分钟)。
- [0369] 12. 观察颜色发展情况,每孔加入 50 μ l 终止溶液。
- [0370] 13. 在 450nm 下读数。
- [0371] 14. 从标准曲线计算结果。
- [0372] 15. 进行评估 :
- [0373] 如果未知样品的消光不在校准曲线的线性范围,那么以适当的样品稀释度重复进行 ELISA。
- [0374] 用于测定 CSF 中的 A β (1-42) 单体形式的夹心 ELISA 方案
- [0375] 试剂目录 :
- [0376] 1. F96 Cert. Maxisorp NUNC-Immuno Plate 目录号 439454
- [0377] 2. 结合抗体
- [0378] 抗 A β 单克隆抗体克隆 6E10 ;Signet 目录号 9320 ; 浓度 :0.4mg/ml Bradford(BioRad) ; -20 $^{\circ}$ C 下储藏
- [0379] 3. 包被缓冲液
- [0380] 100mM 碳酸氢钠 ;pH9.6
- [0381] 4. ELISA 封闭剂 ;Roche Diagnostics GmbH, 目录号 1112589
- [0382] 5. PBST 缓冲液
- [0383] 20mM NaH₂PO₄/NaH₂PO₄ ;140mM NaCl ;0.05% Tween20 ;pH7.4
- [0384] 6. A β (1-42) 标准品 :A β (1-42) 固体粉末 ;Bachem 目录号 H-1368 ; -20 $^{\circ}$ C 下储藏
- [0385] 7. 第一抗体 :
- [0386] 抗 A β (1-42) 兔 pAb ;经亲和纯化 ;经生物素酰化 ;于 PBS 中的溶液,含 50% 甘油 ; 浓度 :0.25mg/ml ;Signet 目录号 9137-005 ; -20 $^{\circ}$ C 下储藏
- [0387] 8. 标记试剂 :
- [0388] 抗兔 -POD 缀合物 ;Fa. Jackson ImmunoResearch, 目录号 111-036-045
- [0389] 9. 染色 :
- [0390] TMB ;Roche Diagnostics GmbH, 目录号 92817060 ;42mM DMSO 溶液 3% H₂O₂ 水溶液 100mM 乙酸钠, pH4.9 终止液 :2M 磺酸
- [0391] 用于制备试剂的方法 :
- [0392] 1. 结合抗体 :

[0393] 将抗 A β 单克隆抗体克隆 6E10 以 1 : 400 稀释在包被缓冲液中。

[0394] 2. 封闭剂:将封闭试剂溶于 100ml 水中制备封闭储备溶液,将各 10ml 等分试样在 -20℃ 下储藏。对于每个要封闭的板,将 3ml 封闭储备溶液用 27ml 水进行稀释。

[0395] 3. A β (1-42) 单体形式,标准稀释液:

[0396] A β (1-42) 单体标准储备溶液:将 0.5mg A β (1-42) 溶于 250 μ l 10.1% NH₄OH;浓度:2mg/ml;刚制备;立即使用。

[0397] 将 5 μ l A β (1-42) 单体标准储备溶液加到 995 μ l PBST = 10 μ g/ml。

[0398] 将 5 μ l、10 μ g/ml A β (1-42) 单体标准溶液加到 4995 μ l PBST = 10ng/ml。

[0399] 标准曲线:

[0400]

编号 最终浓度	储备溶液	PBST
1 10000pg/ml	2ml B	0ml
2 3160pg/ml	0.633ml (1)	1.367ml
3 1000pg/ml	0.633ml (2)	1.367ml
4 316pg/ml	0.633ml (3)	1.367ml
5 100pg/ml	0.633ml (4)	1.367ml
6 31.6pg/ml	0.633ml (5)	1.367ml
7 10pg/ml	0.633ml (6)	1.367ml
8 0.0pg/ml	0ml	2ml

[0401] 样品:

[0402] IP:免疫沉淀样品

[0403]

编号 稀释系数	样品	PBST
1 直接	0.4ml IP	0ml
2 1:5	0.1ml (1)	0.4ml
3 1:25	0.1ml (2)	0.4ml
4 1:125	0.1ml (3)	0.4ml

[0404] 所用的程序:

[0405] 1. 第一抗体：

[0406] 将浓缩的抗 A β (1-42) pAb 稀释在 PBST 缓冲液中。稀释系数为 $1/1250 = 0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。立即使用。

[0407] 2. 标记试剂：

[0408] 使抗兔 -POD 缀合物冻干品在 0.5ml 水中复原。加入 $500 \mu\text{l}$ 甘油，将各 $100 \mu\text{l}$ 的等分试样在 -20°C 下储藏备用。

[0409] 将浓缩的标记试剂在 PBST 缓冲液中稀释。稀释系数为 $1/5000$ 。立即使用。

[0410] 3. TMB 溶液：

[0411] 将 20ml 100mM 乙酸钠 pH4.9 与 $200 \mu\text{l}$ TMB 溶液和 $29.5 \mu\text{l}$ 13% 过氧化物溶液进行混合。立即使用。

[0412] 样品板设置：(注意所有的标准品和样品均重复运行两次)

[0413]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10000	10000	U1	U1								
B	3160	3160	U2	U2								
C	1000	1000	U3	U3								
D	316	316	U4	U4								
E	100	100	U5	U5								
F	31.6	31.6	U6	U6								
G	10	10	U7	U7								
H	0.0	0.0	U8	U8								

[0414] U1-U# = 未知样品

[0415] 所用的程序：

[0416] 1. 每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 结合抗体溶液，在 4°C 下温育过夜。

[0417] 2. 弃去抗体溶液，用 $250 \mu\text{l}$ PBST 缓冲液洗涤各孔三次。

[0418] 3. 每孔加入 $260 \mu\text{l}$ 封闭溶液，在室温下温育 2 小时。

[0419] 4. 弃去封闭溶液，用 $250 \mu\text{l}$ PBST 缓冲液洗涤各孔三次。

[0420] 5. 标准品和样品制备后，将标准品和样品以 $100 \mu\text{l}$ /孔加到板中。在室温下温育 2 小时，并在 4°C 下温育过夜。

[0421] 6. 弃去标准品 / 样品溶液，用 $250 \mu\text{l}$ PBST 缓冲液洗涤各孔三次。

[0422] 7. 每孔加入 $200 \mu\text{l}$ 第一抗体溶液，在室温下温育 1.5 小时。

[0423] 8. 弃去抗体溶液，用 $250 \mu\text{l}$ PBST 缓冲液洗涤各孔三次。

[0424] 9. 每孔加入 $200 \mu\text{l}$ 标记溶液，在室温下温育 1 小时。

- [0425] 10. 弃去标记溶液,用 250 μ l PBST 缓冲液洗涤各孔三次。
- [0426] 11. 向每孔加入 100 μ l TMB 溶液,在室温下温育 (5-15 分钟)。
- [0427] 12. 观察染色情况,每孔加入 50 μ l 终止溶液。
- [0428] 13. 在 450nm 下读数。
- [0429] 14. 从标准曲线计算结果。
- [0430] 15. 进行评估:
- [0431] 如果未知样品的消光不在校准曲线的线性范围,那么以适当的样品稀释度重复进行 ELISA。
- [0432] 结果
- [0433]

	A β 40 ELISA (Signet)		A β 42 ELISA (Signet)		A β 42/40
	A β (1-40)	SEM	A β (1-42)	SEM	
MCI 样品 (n=4)					
没有 IP	11678,9	2679,4	1242,0	353,5	7,84%
6E10 IP	8282,4	2185,7	2035,1	280,9	17,35%
8F5 IP	8586,1	2396,8	2854,8	411,4	20,95%
AD 样品 (n=2)					
没有 IP	7297,5	1484,5	843,0	157,5	10,95%
6E10 IP	5610,2	26,3	1453,0	14,5	20,57%
8F5 IP	4133,9	86,8	1670,2	12,3	28,78%

- [0434] 以上结果表明了以下情况:
- [0435] a. 与非球聚体选择性抗体如 6E10 相比,球聚体优先抗体如 8F5 (或 8C5) 对 A β 42 的结合优先于对 A β 40 的结合,这不受疾病状态的限制。这个结果表明阿尔兹海默病得到成功治疗,因为将 A β 42 优先于 A β 40 进行消除被遵循为一种 AD 治疗的思想 (例如通过使用 R- 氟比洛芬 (Flurizan), R- 氟比洛芬在 Myriad Inc 所公布的临床试验中证明具有 AD 治疗功效)。这个思想是由 S. Weggen 等 (J Biol Chem. (2003) 278(34) :31831-7) 公布。结果在图 3 中显示。
- [0436] b. 患者与健康对照者相比,球聚体优先抗体如 8F5 (或 8C5) 结合 A β 42 更多过结合 A β 40。这个结果更加说明阿尔兹海默病得到成功治疗,如上所述,将 A β 42 优先于 A β 40 进行消除被遵循为一种 AD 治疗思想 (例如使用非类固醇的抗炎药物,如 R- 氟比洛芬)。(参见图 3)。
- [0437] B) 用球聚体选择性抗 A β 鼠单克隆抗体 8F5 或 8C5 进行免疫沉淀后相比于用球聚体非选择性抗体 6E10 进行免疫沉淀后,人 CSF 中的内源 A β (1-42) 和 A β (1-40) 水平:
- [0438] b1) 用 Dynabeads M-280 绵羊抗小鼠 IgG 进行免疫沉淀 (IP)
- [0439] A β 抗体溶液
- [0440] 以下纯抗体是根据标准纯化程序从杂交瘤获得。
- [0441] - 鼠单克隆抗体 6E10 ;Fa. Signet Nr. :9320 ;1mg/ml 于 PBS 缓冲液中
- [0442] - 鼠单克隆抗体 8F5 ;1. 65mg/ml 于 PBS 缓冲液中
- [0443] - 鼠单克隆抗体 8C5 ;1. 44mg/ml 于 PBS 缓冲液中
- [0444] Dynabeads M-280 绵羊抗小鼠 IgG :
- [0445] 将绵羊抗小鼠 IgG (Invitrogen Inc., 目录号 112. 02) 与磁珠 (Dynabeads) 共价结合。
- [0446] 用单克隆小鼠抗体激活 Dynabeads

[0447] -将 dynabeads (Dynabeads M-280 绵羊抗小鼠 IgG, Invitrogen ;Prod. No. 112. 02) 的储备悬浮液小心振摇,以防止发泡。

[0448] - 无菌移取 1mL, 转移到 1.5mL 反应小瓶中。

[0449] - 将 dynabeads 用 1mL 免疫沉淀 (IP) 洗涤缓冲液 (IP 洗涤缓冲液 :PBS (20mM NaH_2PO_4 , 140mM NaCl , pH7.4), 0.1% (w/v) BSA) 洗涤 3 次 5 分钟。在洗涤程序过程中, 小心除去上清液, 同时用磁性分选仪架 (magnetic separator stand, MSS) 将 dynabeads 固定化在反应小瓶的侧壁。

[0450] - 将洗涤过的 dynabeads 与 40 μg $\text{A}\beta$ 抗体在 1mL PBS, 0.1% (w/v) BSA 中一起温育。

[0451] - 该活化在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下振摇温育过夜来进行。

[0452] - 将活化的 dynabeads 用 1mL IP 洗涤缓冲液 (PBS (20mM NaH_2PO_4 , 140mM NaCl , pH7.4), 0.1% (w/v) BSA) 洗涤 4 次 30 分钟 (再次使用 MSS)。

[0453] - 将活化的 dynabeads 用 1mL PBS, 0.1% (w/v) BSA, 0.02 (w/v) % 叠氮化钠重悬; 旋涡混合并稍作离心。

[0454] - 将抗体活化的 dynabeads 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下储藏备用。

[0455] CSF 样品制备:

[0456] 将来自阿尔兹海默病患者的 400 μL CSF 加到 4 μL 完全蛋白酶抑制剂混合物 (Roche Inc. 目录号 1697498, 1 片剂溶于 1mL 水中), 将 0.8 μL 500mM PMSF 溶于甲醇中。10 分钟后, 加入 1.6mL 20mM NaH_2PO_4 , 140mM NaCl , 0.05% Tween20, pH7.4 (PBST)。

[0457] 人 AD-CSF 的 $\text{A}\beta$ 物质的免疫沉淀:

[0458] 将所制备的 CSF 样品的 250 μL 等分试样加到 25 μL 抗 $\text{A}\beta$ -Dynabeads 悬浮液。

[0459] 免疫沉淀是在 6 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌下进行 16 小时。随后的洗涤是用 1mL PBS/0.1% (w/v) BSA 洗涤三次 5 分钟、最后用 1mL 10mM Tris/HCl pH7.5 缓冲液洗涤一次 3 分钟。在洗涤程序过程中, 小心除去上清液, 同时用磁性分选仪架 (MSS) 将 dynabeads 固定化在反应小瓶的侧壁。

[0460] 在最后洗涤步骤后, 将残余上清液彻底除去。 $\text{A}\beta$ 肽和相应的抗体是这样从 Dynabeads 除去: 将 25 μL 无 β -巯基乙醇的样品缓冲液 (0.36M Bistris, 0.16M N-二甘氨酸, 1% SDS (w/v), 15% (w/v) 蔗糖, 0.004% (w/v) 溴酚蓝) 加到 Eppendorff 管, 在微量恒温仪中于 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 分钟。冷却到室温后, 用磁性分选仪架 (MSS) 将 dynabeads 固定化在反应小瓶的侧壁, 将上清液转移到另一 Eppendorff 管 (IP 洗脱液)。

[0461] 用尿素-PAGE 然后是蛋白质印迹程序对 $\text{A}\beta$ 免疫沉淀物进行分析:

[0462] $\text{A}\beta$ 1-40 和 $\text{A}\beta$ 1-42 物质的定量是按照 H.W. Klafki et al., Analytical Biochemistry 237, 24-29 (1996) 最早描述的、后来也被 J. Wiltfang et al., J. Neurochemistry 81, 481-496, 2002 使用的程序, 通过 8M 尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳系统和随后的蛋白质印迹分析来进行。在实验程序中只作了两个小改动:

[0463] 1) 将积层凝胶中的 SDS 浓度调至 0.25% (w/v) 而不是 0.1% (w/v)。

[0464] 2) 对于蛋白质印迹, 用抗人 $\text{A}\beta$ (N) (82E1) 小鼠 IgG 单克隆抗体 (IBL, 目录号 10323) 替代抗体 1E8 (Senetek Drug Delivery Technologies Inc. St. Louis, MO, USA)。

[0465] 将免疫沉淀样品的 15 μL IP 洗脱液等分试样加样到 8M 尿素 PAGE 上。在 100V 下进行电泳 (15 分钟), 并在 60V 下继续。当蓝色样品加样染料运动前缘离凝胶末端还有

0.5cm 时, 停止电泳。

[0466] 蛋白质印迹程序:

[0467] 蛋白质印迹分析是在半干燥印迹室 (BioRad Inc., 75mA 下 45 分钟) 中, 在 7.5cm x9cm 硝酸纤维素 0.45 μ m (BioRad Inc.) 上进行。

[0468] 印迹缓冲液: 6g Tris; 28.1g 甘氨酸; 500mL 甲醇; 用水调至 2.5L。

[0469] 将硝酸纤维素印迹在 PBS 中 100°C 煮沸 10 分钟。该印迹通过用 50mL 5% (w/v) BSA 于 PBST 中的溶液在室温下处理 1 小时进行饱和。除去流体相后, 进行如下的洗涤步骤两次: 50mL TTBS (25mM Tris/HCl; 150mM NaCl 缓冲液; 0.05% Tween20; pH7.5) 室温下 10 分钟, 然后 50mL TBS (25mM Tris/HCl; 150mM NaCl 缓冲液; pH7.5) 室温下 10 分钟。对于进一步的显影, 将最终洗涤缓冲液从印迹弃去, 加入 15mL 抗体 I 溶液 (0.2 μ g/mL 82E1 = 1 : 500 于 3% (w/v) 脱脂奶粉 (Lasana Inc.), 于 15mL TBS 中), 6°C 下保持 20 小时。除去缓冲液后, 如上所述进行三个洗涤步骤。将印迹与抗体溶液 II (抗小鼠 -POD1 : 10000 稀释于 15mL 3% (w/v) 脱脂奶粉 (于 15mL TBS 中)) 一起在室温下温育 1 小时。除去缓冲液后, 如上所述进行三个洗涤步骤。

[0470] 除去最后的洗涤缓冲液后, 将 2mL Super Signal West FemtoMaximum Sensitivity Substrate Enhancer 和 2mL 过氧化物溶液进行混合。将刚制备的溶液倒在已在暗处预温育 5 分钟的印迹上。用 VersaDoc 成像系统 (BioRad) 记录化学发光。

[0471] 成像参数:

[0472] - 曝光时间 180 秒。

[0473] 在 30 秒、60 秒、120 秒和 180 秒后记录照片。

[0474] 结果是从 180 秒暴露时间的照片获得。

[0475]

	A β 40 尿素-PAGE [pg/ml]	A β 42 尿素-PAGE [pg/ml]	比例 A β 42/A β 40+42 x100%
6E10 IP	4389	202	4.4%
8F5 IP	1260	112	8.1%
8C5 IP	1202	211	14.9%

[0476] 以上结果表明, 球聚体优先抗体如 8F5 或 8C5 与非球聚体选择性抗体如 6E10 相比, 结合人 CSF 中的 A β 42 比结合 A β 40 要多。这个结果说明阿尔兹海默病得到成功治疗, 如上所述, 将 A β 42 优先于 A β 40 进行消除被遵循为一种 AD 治疗思想 (例如通过使用 R- 氟比洛芬 (参见上文))。

[0477] 实施例 V

[0478] 8F5 在 APP 转基因小鼠中能改进新物体识别能力

[0479] 为验证抗体 8F5 的中和性内部 A β (1-42) 球聚体表位对认知的正向作用, 用 APP 转基因小鼠进行被动免疫实验, 在实验中测试该小鼠记住它们曾探究过的物体的能力。一定时间后, 延长第一次和第二次碰到物体之间的时间, APP 转基因小鼠不能够识别已经探究过的物体。这个实验是基于动物的天然好奇心, 对已经探究过的物体明显缺乏兴趣证明了

对该物体的识别。

[0480] 实施例 V.1:单克隆抗体 8F5 能提高识别指数:

[0481] 动物:

[0482] 使用 FVB x C57B1 背景 (APP/L, ReMYND, Leuven, Belgium) 的阿尔兹海默病单一转基因小鼠模型的雌性小鼠和 FVB x C57B1 背景的、作为野生型对照的 3 月龄阴性同胎仔鼠。所有小鼠在 3 周龄时通过聚合酶链式反应 (PCR) 进行基因型分型并得到唯一的身份登记号,一旦得知 PCR 结果,进行第二次 PCR 加以核实,然后再开始研究。将所有小鼠进行随机分配和年龄匹配,即通过计算机给予它们随机的号码,随机分配到某个治疗。在研究开始前 18 天通过处理组将各小鼠关入笼中,以让它们熟悉新的笼子环境。小鼠能自由获得预过滤的无菌水(紫外灯)和标准的鼠粮。该食物是在通风良好的储藏室中在干燥和凉爽的条件下储藏。每日检查水和食物的量,必要时加以供应,每周两次进行更新。将小鼠在颠倒的日夜节律下关养:在标准的 RVS T2 型金属笼(面积 540cm²)中,从下午 7 时起 14 小时光亮/10 小时黑暗。笼子装有结实的地板和一层垫草。每笼的小鼠数量按照动物福利立法受到限制。在行为试验开始前 5 天,将小鼠换到 macrolon Type2 笼中运到实验室,以适应实验室环境为行为试验做准备。

[0483] 处理(被动免疫):

[0484] 进行了三个单独的实验,其中小鼠(每组至少 9 只)在第 1、8 和 15 天接受腹腔内注射(500 μg, 240 μL/小鼠)。用单克隆抗体 6G1、8F5 和其它非公开的抗体,所有抗体均溶于磷酸缓冲盐水或者用 320 μL 磷酸缓冲盐水处理小鼠。

[0485] 新物体识别试验:

[0486] 在第三次处理的当天进行新物体识别试验。所用的方案遵循 Dewachter 等(Journal of Neuroscience, 2002, 22(9):3445-3453)所描述的方法。让小鼠熟悉 Plexiglas 开放空间箱(52x52x40cm)1 小时,该箱有黑色垂直壁和透明地板,由放置在箱子下方的灯暗淡照明。第二天,将各小鼠放在该箱中,进行 10 分钟识别试验。在这个试验过程中,将各小鼠分别放入有 2 个完全相同物体 A(橙色圆筒或绿色立方体,大小类似 ±4cm)的开放空间中,通过计算机化系统(Ethovision, Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands)记录小鼠探究物体 A(当小鼠口鼻朝向该物体距离小于 1cm 和小鼠朝该物体的方向灵敏地嗅闻时)的持续时间(time_{AA})和频率(Freq_{AA})。在进行 2.5 小时后的 10 分钟保持试验(第二试验)过程中,将新的物体(物体 B,绿色立方体或橙色圆筒)与熟悉的物体(物体 A)一起放入开放空间中(分别是 Freq_A 和 Freq_B 及 Time_A 和 Time_B)。用识别指数(RI)测量非空间记忆力,识别指数定义为探究新物体的持续时间与探究两个物体的持续时间之比[Time_B/(Time_A+Time_B)x100]。在识别试验过程中探究物体 A 的持续时间和频率(Time_{AA} 和 Freq_{AA})用来测量好奇心。

[0487] 将所有三个研究的接受单克隆抗体 6G1 或 8F5 或磷酸缓冲盐水的 APP 转基因小鼠和接受磷酸缓冲盐水的非转基因同胎仔鼠进行合并,以进行数据分析(图 4)。不能区别旧物体和新物体的小鼠其识别指数为 50。能识别旧物体的小鼠会优先探究新物体,因此识别指数变成大于 50。专门探究新物体的小鼠其识别指数为 100。将每组的平均识别指数通过 t 检验与机会水平(即 50)进行比较。将所有各组的平均识别指数也通过 ANOVA 然后是 post-hoc t 检验进行比较。PBS 组和野生型组之间的差异表明这个示例中的 APP 转基因小

鼠有认知缺损。注射 PBS 的小鼠以机会水平（即不显著偏离 50）发挥，而所有其它小鼠显示物体识别力（图 4：星号）。当将抗体处理过的 APP 转基因小鼠的性能与对照组进行比较时发现，与 PBS 处理的小鼠有显著差异，但与野生型小鼠比较没有显著差异（图 4：圆圈），表明用抗体 8F5 进行的处理逆转了这些 APP 转基因小鼠的认知缺损。

[0488] 实施例 VI

[0489] 抗体 8F5 和 8C5 与淀粉样斑块形式的原纤维淀粉样 β 肽和老龄 APP 转基因小鼠和阿尔兹海默病患者脑膜血管中的淀粉样蛋白的特异性反应的原位分析

[0490] 抗体 8F5 和 8C5 显示出对原纤维 A β 肽沉积物的染色减低，这提示它们的治疗作用是通过与可溶性球聚体形式的而不是原纤维沉积形式的 A β 肽结合来介导的。由于抗体与原纤维 A β 肽结合会导致聚集物的快速溶解和随后可溶性 A β 浓度的增加，而后者据认为具有神经毒性并可能导致微出血，因此优选的是能影响可溶性球聚体而不是单体的抗体疗法。

[0491] 方法：

[0492] 对于这些实验，使用了几种大脑材料样品：来自两个 AD 患者的皮层组织（RZ16 和 RZ55）和来自 19 月龄 Tg2576 小鼠（APPSWE#001349, Taconic, Hudson, NY, USA）或 12 月龄老的 APP/L 小鼠（ReMYND, Leuven, Belgium）的皮层组织。

[0493] 小鼠过量表达带家族性阿尔兹海默病突变的人 APP，在大约 11 月龄时在脑实质中形成 β 淀粉样沉积物，在大约 18 月龄时在较大的脑血管中形成 β 淀粉样沉积物。将小鼠深度麻醉，穿心灌注 0.1M 磷酸缓冲盐水（PBS）以冲洗血液。然后，从头盖移取大脑，纵向切开。将其中半个大脑急冻（shock-frozen），另半个大脑通过浸入 4% 多聚甲醛进行固定。将浸入固定的大脑半球通过在 30% 蔗糖的 PBS 溶液中浸泡进行低温保护，然后装在冰冻切片机上。将整个前脑切成 40 μ m 横切片，收集在 PBS 中，用于后面的染色程序。来自阿尔兹海默病患者的新皮层样品是获自德国慕尼黑 Brain-Net，为冷冻组织，在解冻过程中在 4% 多聚甲醛中浸入固定，随后同小鼠组织一样进行处理。

[0494] 用以下方案对各个切片进行刚果红染色：

[0495] 材料：

[0496] - 淀粉样蛋白染料刚果红试剂盒（Sigma-Aldrich ;HT-60），由 NaCl 酒精溶液、NaOH 溶液和刚果红溶液组成。

[0497] - 染色皿

[0498] - 显微镜载玻片 SuperfrostPlus 和盖玻片

[0499] - 乙醇、二甲苯，包埋介质

[0500] 试剂：

[0501] - NaOH 用 NaCl 溶液 1 : 100 稀释产生碱性盐水

[0502] - 碱性盐水用刚果红溶液 1 : 100 稀释产生碱性刚果红溶液（在使用前 15 分钟内制备，过滤）

[0503] - 将切片装在载玻片上，让它们干燥。

[0504] - 将载玻片在染色皿中温育，首先是在碱性盐水中温育 30-40 分钟，然后是在碱性刚果红溶液中温育 30-40 分钟。

[0505] - 用新鲜乙醇清洗三次，用二甲苯包埋。

[0506] 首先对染色用 Zeiss Axioplan 显微镜 (Zeiss, Jena, Germany) 进行照相, 定性评估。红颜色表明是斑块形式的和在较大脑膜血管中的淀粉样沉积物。之后对抗体染色的评估集中在这些结构。

[0507] 染色是按照以下方案通过将切片与含有 0.07-0.7 $\mu\text{g/ml}$ 的各个抗体的溶液一起温育来进行:

[0508] 材料:

[0509] -TBST 洗涤溶液 (Tris 缓冲盐水加 Tween20 ;10x 浓缩液 ;DakoCytomation S3306, DAKO, Hamburg, Germany) 1 : 10 于 Aquabidest 中)

[0510] -0.3% H_2O_2 的甲醇溶液

[0511] - 驴血清 (Serotec, Düsseldorf, Germany), 5% TBST 溶液, 作为封闭血清

[0512] - 单克隆小鼠抗球聚体抗体, 在 TBST 中以给定浓度稀释。

[0513] - 第二抗体: 生物素酰化的驴抗小鼠抗体 (Jackson Immuno/Dianova, Hamburg, Germany ;715-065-150 ;在 TBST 中 1 : 500 稀释)

[0514] -StreptABComplex (DakoCytomation K0377, DAKO, Hamburg, Germany)

[0515] - 过氧化物酶底物试剂盒二氨基联苯胺 (= DAB ;SK-4100 ;VectorLaboratories, Burlingame, CA, USA)

[0516] -Superfrost Plus 显微镜载玻片和盖玻片

[0517] - 无二甲苯包埋介质 (Mediate, Burgdorf, Germany ;X-tra Kitt)

[0518] 程序:

[0519] - 将漂浮的切片转移到用冰冷的 0.3% H_2O_2 中, 温育 30 分钟

[0520] - 在 TBST 缓冲液中洗涤 5 分钟

[0521] - 与驴血清 /TBST 一起温育 20 分钟

[0522] - 与第一抗体一起在室温下温育 24 小时。

[0523] - 在 TBST 缓冲液中洗涤 5 分钟

[0524] - 与封闭血清一起温育 20 分钟

[0525] - 在 TBST 缓冲液中洗涤 5 分钟

[0526] - 与第二抗体一起在周围环境温度下温育 60 分钟

[0527] - 在 TBST 缓冲液中洗涤 5 分钟

[0528] - 与 StreptABComplex 一起在周围环境温度下温育 60 分钟

[0529] - 在 TBST 缓冲液中洗涤 5 分钟

[0530] - 与 DAB 一起温育 20 分钟

[0531] - 将切片装在载玻片上, 将载玻片风干, 用酒精使载玻片脱水, 将载玻片包埋

[0532] 除了在显微镜下对切片进行目视检查外, 另外还对淀粉样染色进行定量, 做法是用 ImagePro 5.0 图像分析系统从组织学图像目视切取 10 个随机选择的斑块, 测定它们的平均灰度值。从灰度值计算出光密度值, 做法是将淀粉样斑块的密度减去染色材料的平均背景密度 (0% - 没有超过周围背景的斑块染色, 100% - 没有透射 / 最大染色)。用 ANOVA 检验抗体 6E10/4G8 分别与 6G1、8C5 和 8F5 的差值的统计学显著性。

[0533] 结果:

[0534] 所有所述的抗体染色材料证明是亲刚果红淀粉样沉积物 (图 7(A))。球聚体优先

抗体 8F5 和 8C5 对 A β 肽的脑实质和脑膜亲刚果红沉积物的染色显著少于对抗体 6G1 和 6E10 的染色 (图 7(B)-(C), (H))。对脑实质淀粉样斑块染色的定量分析揭示,所有抗体都结合斑块 (统计学上显著的超出对照的密度),但抗体 8F5 和 8C5 的结合显著低于参考抗体 6E10 (针对 A β 的 N 末端序列),等于或低于参考抗体 4G8 (针对 A β 的 N 末端序列) (图 7(D)-图 (G))。抗体 8F5 和 8C5 与淀粉样沉积物的结合小于能识别 A β 单体或一部分 A β 序列的抗体。用结合原纤维 A β 肽的抗体进行处理会导致大脑组织中的淀粉样斑块的快速溶解和随后可溶性 A β 浓度的增加,而后者据认为具有神经毒性并可能导致微出血,和 / 或血管淀粉样蛋白的快速溶解,这也会导致微出血。因此,优选能影响可溶性球聚体而不是单体的抗体疗法。

[0001]

<110> Abbott Laboratories

<120> 单克隆抗体及其用途

<130> 8127.WO.01

<140> PCT/US2006/046148

<141> 2006-11-26

<160> 20

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 336

<212> DNA

<213> 鼠

<400> 1

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact	120
ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat	180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tcagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtgggtgac	300
tactggggcc aaggetccac tctcacagtc tectca	336

<210> 2

<211> 339

<212> DNA

<213> 鼠

[0002]

<400> 2

```

gatgttgatga tgaccctaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gaggccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg      120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctt caaccgattt      180
tctggggctcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttctt      300
tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaacgg                                339
    
```

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 3

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20           25           30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
35           40           45
Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85           90           95
Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
100          105          110
    
```

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> 鼠

[0003]

<400> 4

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 5

Ser Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 鼠

[0004]

<400> 6

Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 7

Ser Gly Asp Tyr

1

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 8

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 鼠

[0005]

<400> 9

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 10

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 11

<211> 336

<212> DNA

<213> 智人

<400> 11

gaggtgcagt	tggtggagtc	tgggggaggc	ttagtgcagc	ctggagggtc	cctgaaactc	60
tectgtacag	cctctggatt	cactttcagt	agctatggca	tgtcttgggt	tcgccagact	120
ccagacaaga	ggctggagtt	ggtcgcaagt	attaaaaata	atggtggtag	cacctattat	180
ccagacagtt	tgaagggccg	attcaccate	tccagagaca	atgccaagaa	caccctgtac	240
ctgcaaatga	gcagtctgaa	gtctgaggac	acagccatgt	attattgtgc	aagtggggat	300
tactggggcc	aaggcaccac	tctcacagtc	tcctca			336

<210> 12

<211> 339

<212> DNA

<213> 鼠

[0006]

<400> 12

```

gatgttgga tgacccaaac tccactctcc ctgectgtca gtcttggaga tcaagcctcc    60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gagacacctt ttacattgg    120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt    180
tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc    240
agcagagtgg aggtgagga tctgggaatt tattctgct ctcagagtat acatgttccg    300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg    339

```

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 13

Ser Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Ser Ile Lys Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 4

<212> PRT

[0007]

<213> 鼠

<400> 15

Ser Gly Asp Tyr

1

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 16

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asp Thr Phe Leu His

1

5

10

15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 18

[0008]

Ser Gln Ser Ile His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val

35 40 45

Ala Ser Ile Lys Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Leu

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 20

<211> 113

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 20

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

[0009]

1		5		10		15									
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
		20						25					30		
Asn	Gly	Asp	Thr	Phe	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35						40					45		
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50						55						60		
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Ile	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser
					85									90	
Ile	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
					100				105					110	
Arg															

用生物素酰化克隆 8F5 包被克隆 6G1 对
 几种 A β 形式的夹心 ELISA
 包被抗 A β 克隆 6G1 \rightarrow A β 形式 \rightarrow 生物素酰化克隆 8F5
 \rightarrow 链霉亲和素-POD \rightarrow 显色

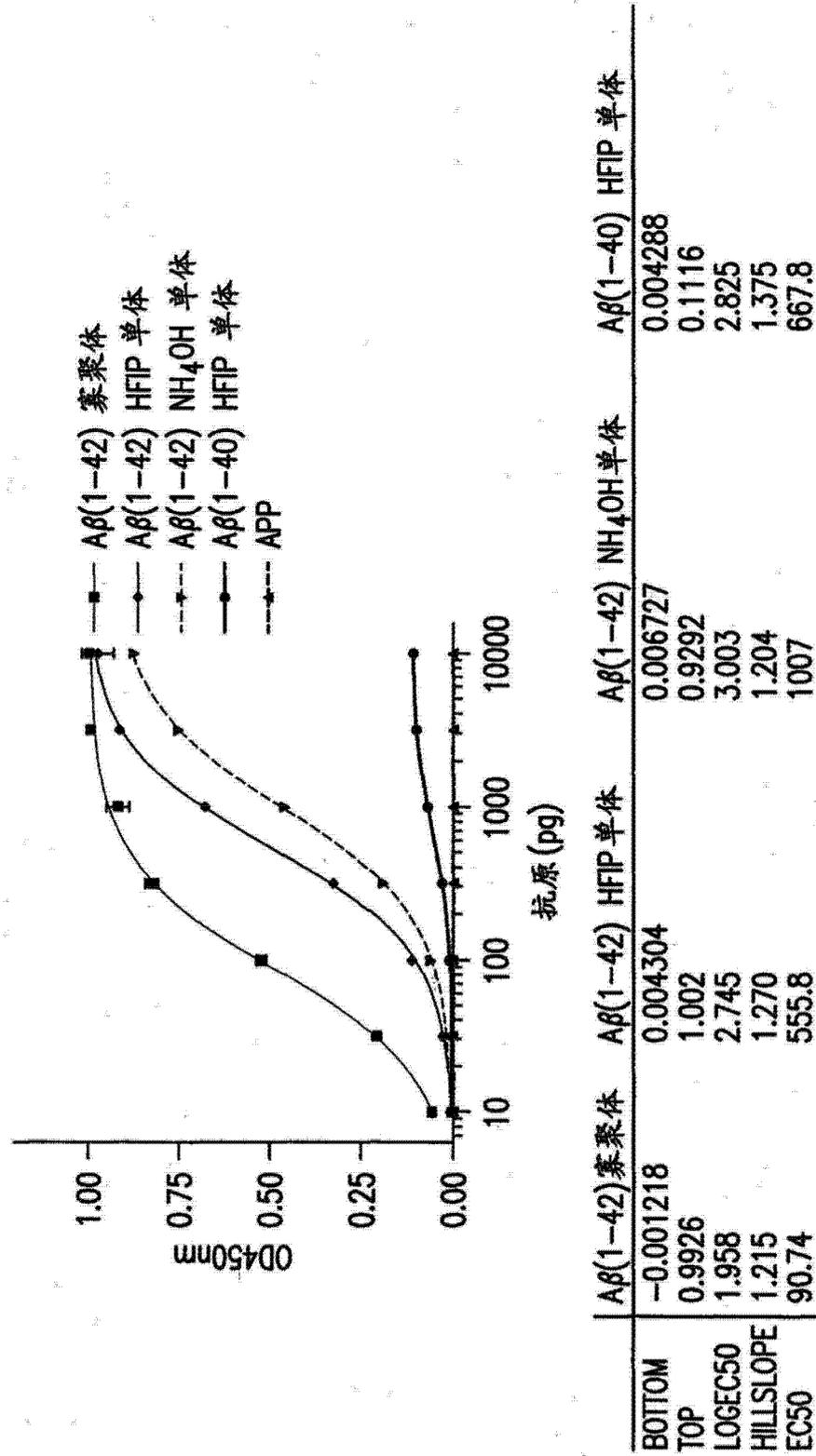
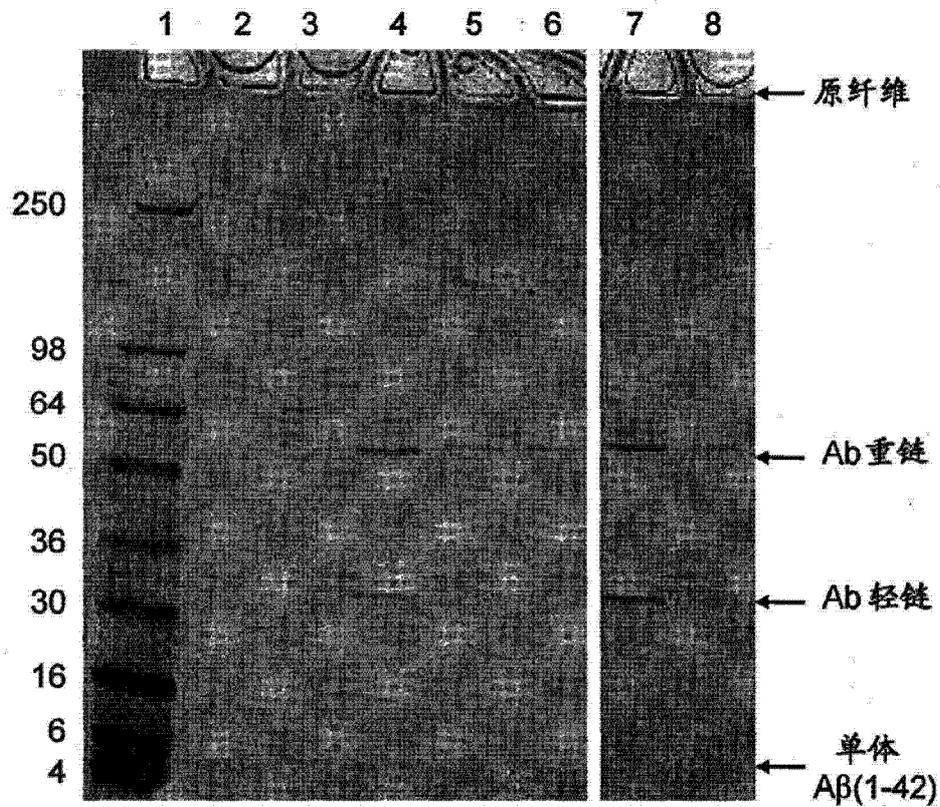


图 1



1. 标志
2. 原纤维制品对照
3. 原纤维制品; + mMAb 6E10 ; 20h 37°C ; 上清液
4. 原纤维制品; + mMAb 6E10 ; 20h 37°C ; 沉淀
5. 原纤维制品; + mMAb 4G8 ; 20h 37°C ; 上清液
6. 原纤维制品; + mMAb 4G8 ; 20h 37°C ; 沉淀
7. 原纤维制品; + mMAb 8F5 ; 20h 37°C ; 上清液
8. 原纤维制品; + mMAb 8F5 ; 20h 37°C ; 沉淀

图 2

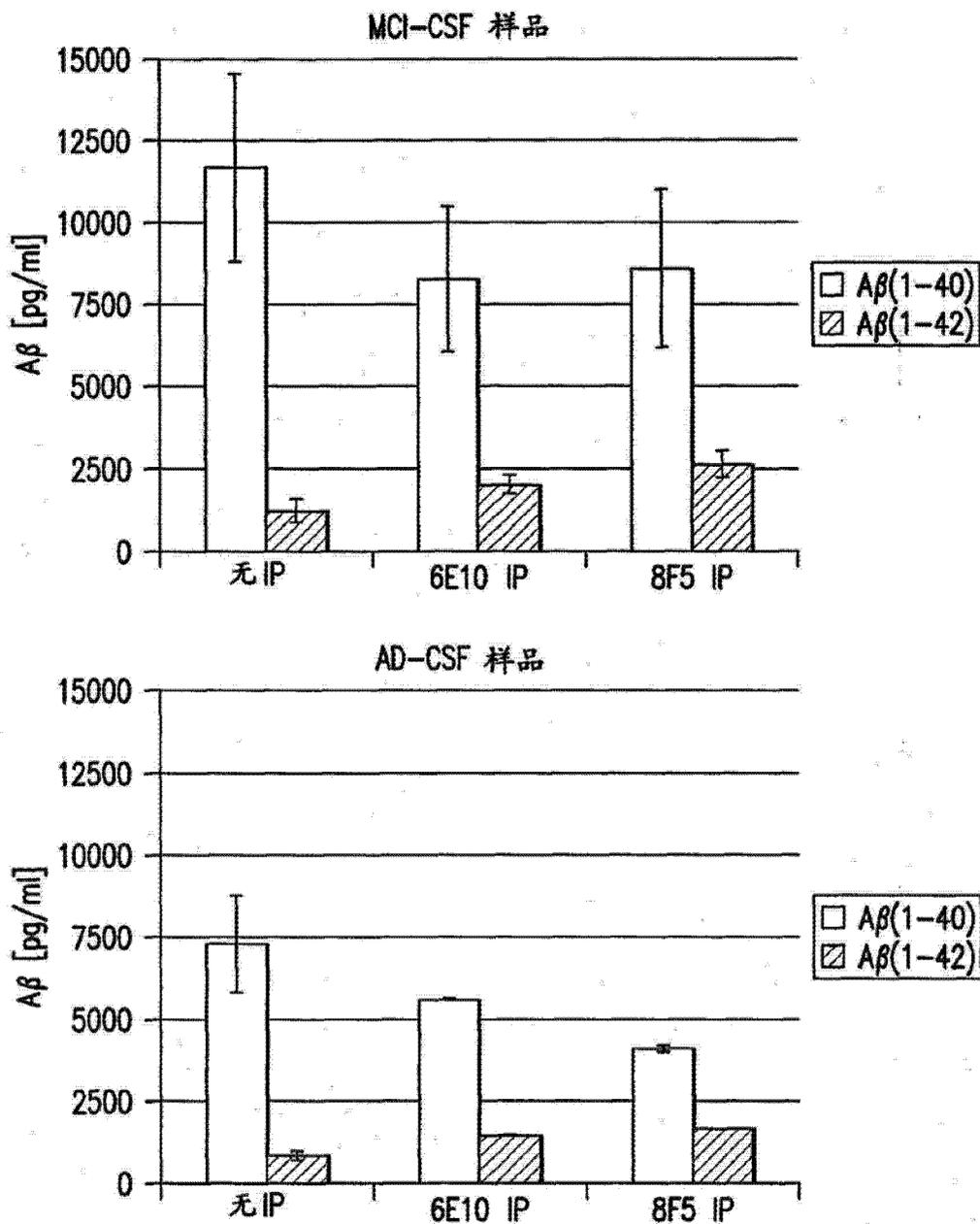
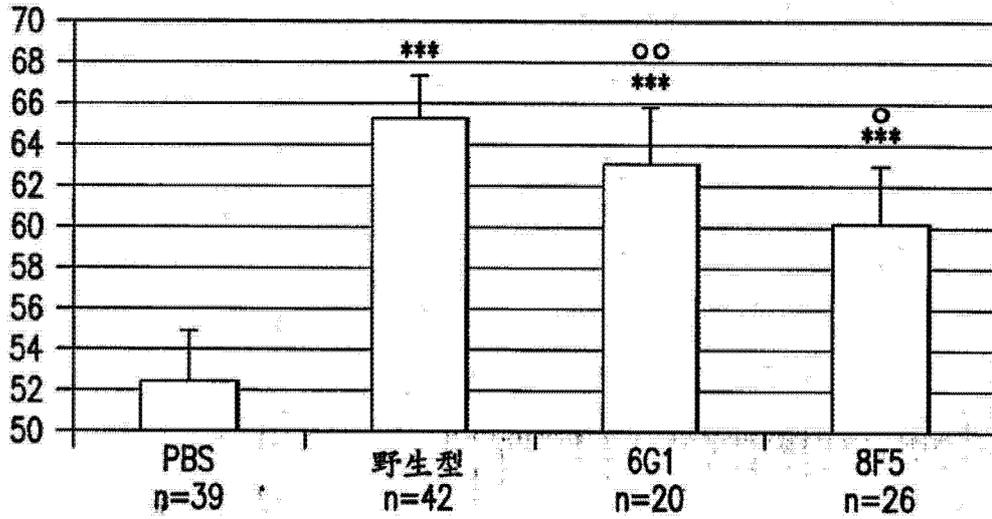


图 3



*** P<0.001, 相对于 50%
 ° P<0.05; °° P<0.01

在 ANOVA 检验 P<0.001 后进行 post hoc 的 t 检验, 相对于 PBS

图 4

VH 8F5

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGCCC
 TGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGGCATGTCT
 TGGGTTCCGACACTCCAGACAAGAGGCTGGAATTGGTCGCAAGCATCAATA
GTAATGGTGGTAGCACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCAT
 CTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAG
 TCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGTGGTGACTACTGGGGCCAAG
 GCTCCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:1)

图 5A

VL 8F5

GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTATATAGTAATGGAGACA
CCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATC
TACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTG
GATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCT
GGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTTGGACGTTCCGGTGGAG
GCACCAAGCTAGAAATCAAACGG (SEQ ID NO:2)

图 5B

VH 8F5

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLELVASINSN
GGSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCASGDYWGQGST
LTVSS (SEQ ID NO:3)

CDR1 (VH) = SYGMS (SEQ ID NO:5)

CDR2 (VH) = SINSNGGSTYYPDSVKG (SEQ ID NO:6)

CDR3 (VH) = SGDY (SEQ ID NO:7)

图 6A

VL 8F5

DVMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSLVYSNGDTYLHWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGKLE
IKR (SEQ ID NO:4)

CDR1(VL) = RSSQSLVYSNGDTYLH (SEQ ID NO:8)

CDR2(VL) = KVSNRFS (SEQ ID NO:9)

CDR3(VL) = SQSTHVPWT (SEQ ID NO:10)

图 6B

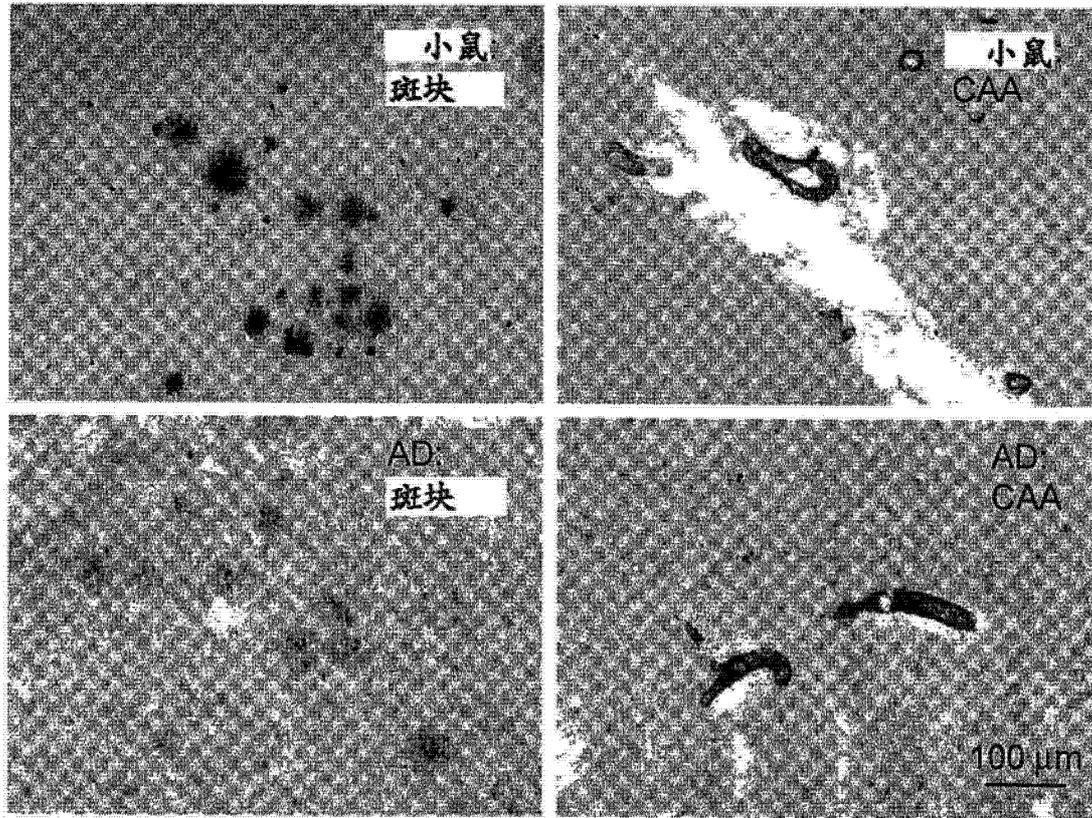


图 7A

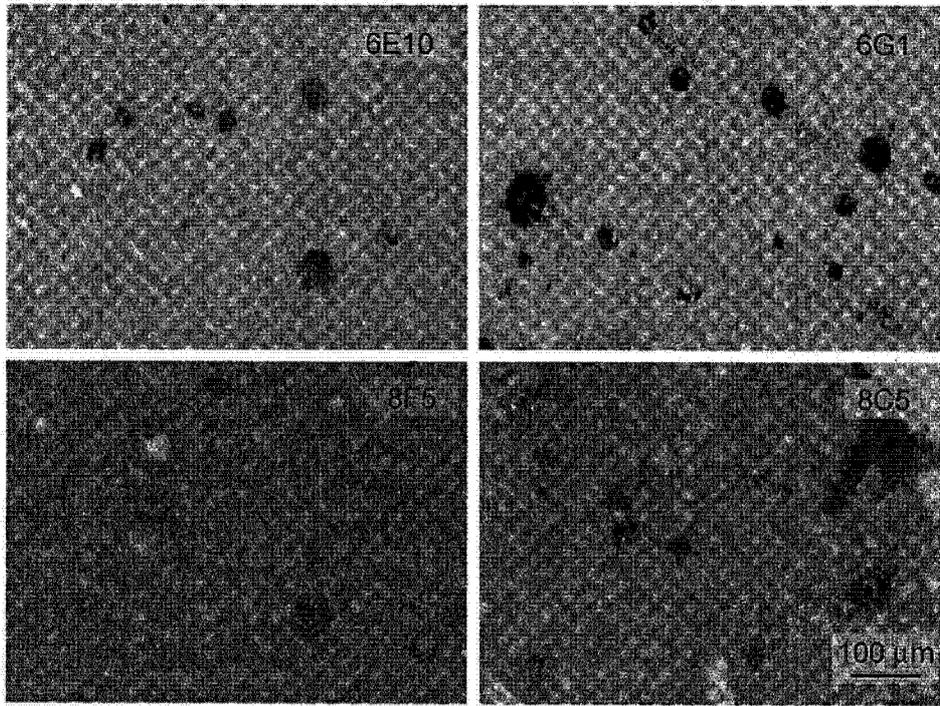


图 7B

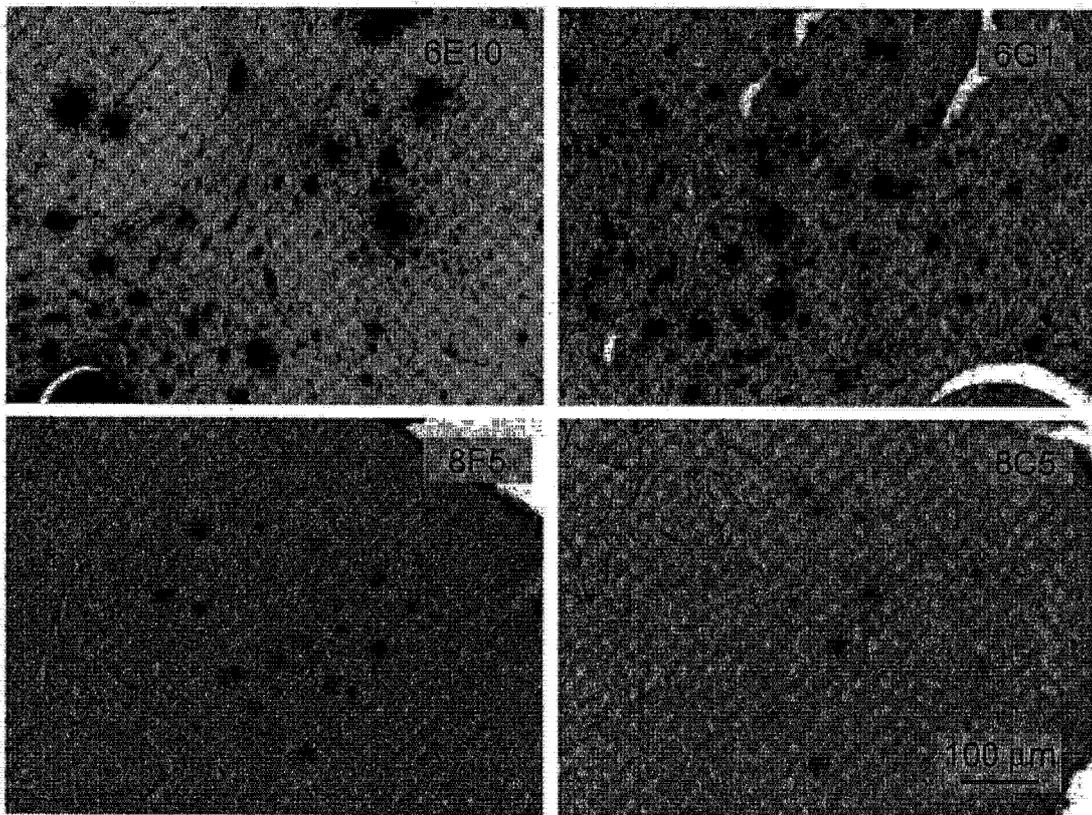


图 7C

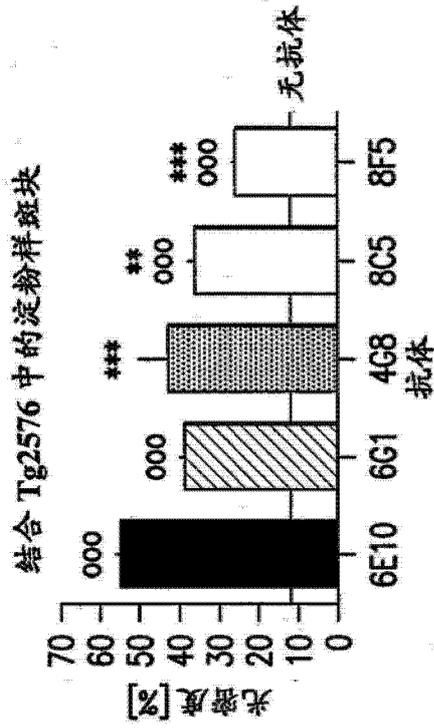


图 7D

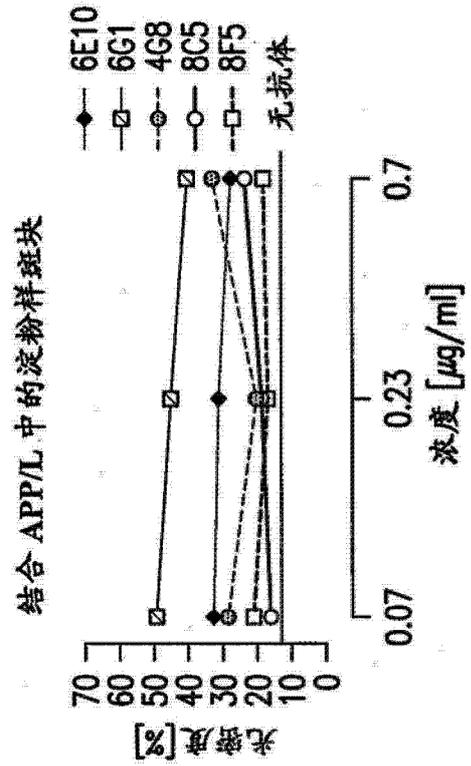


图 7E

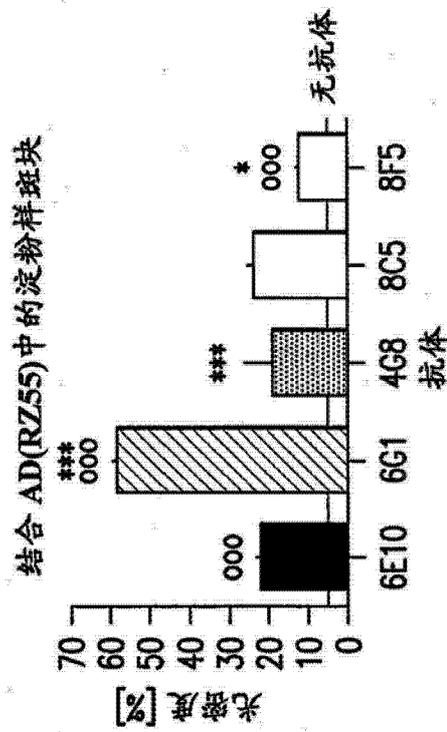


图 7F

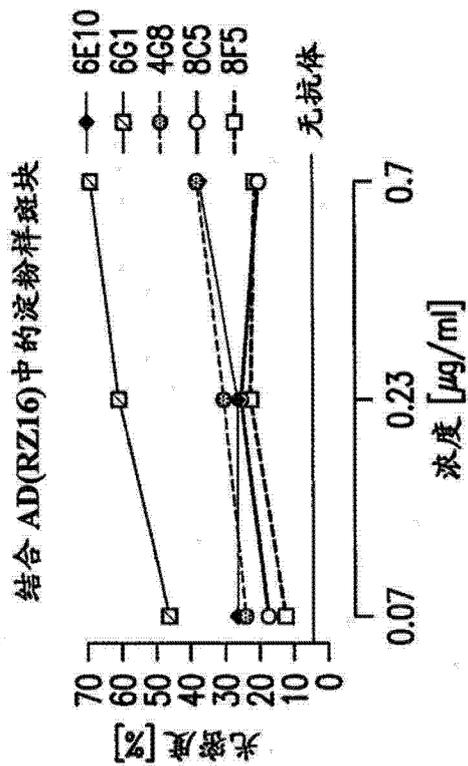


图 7G

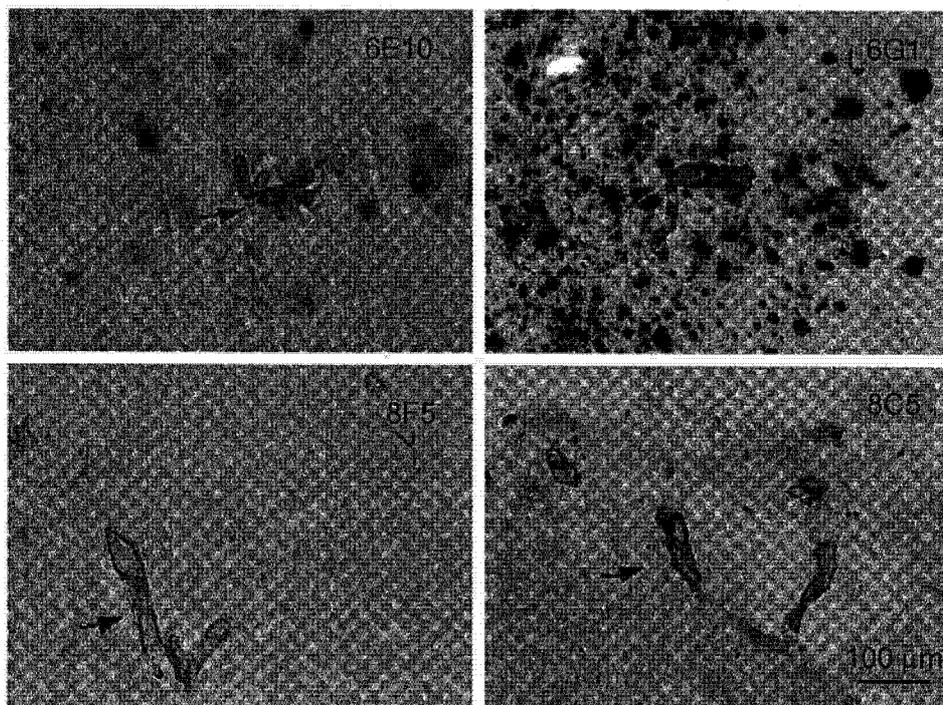


图 7H

用生物素酰化包被克隆对
 几种 A β 形式的夹心 ELISA
 包被抗 A β 克隆 6G1 \rightarrow A β 形式 \rightarrow 生物素酰化克隆 8F5
 \rightarrow 链霉亲和素-POD \rightarrow 显色

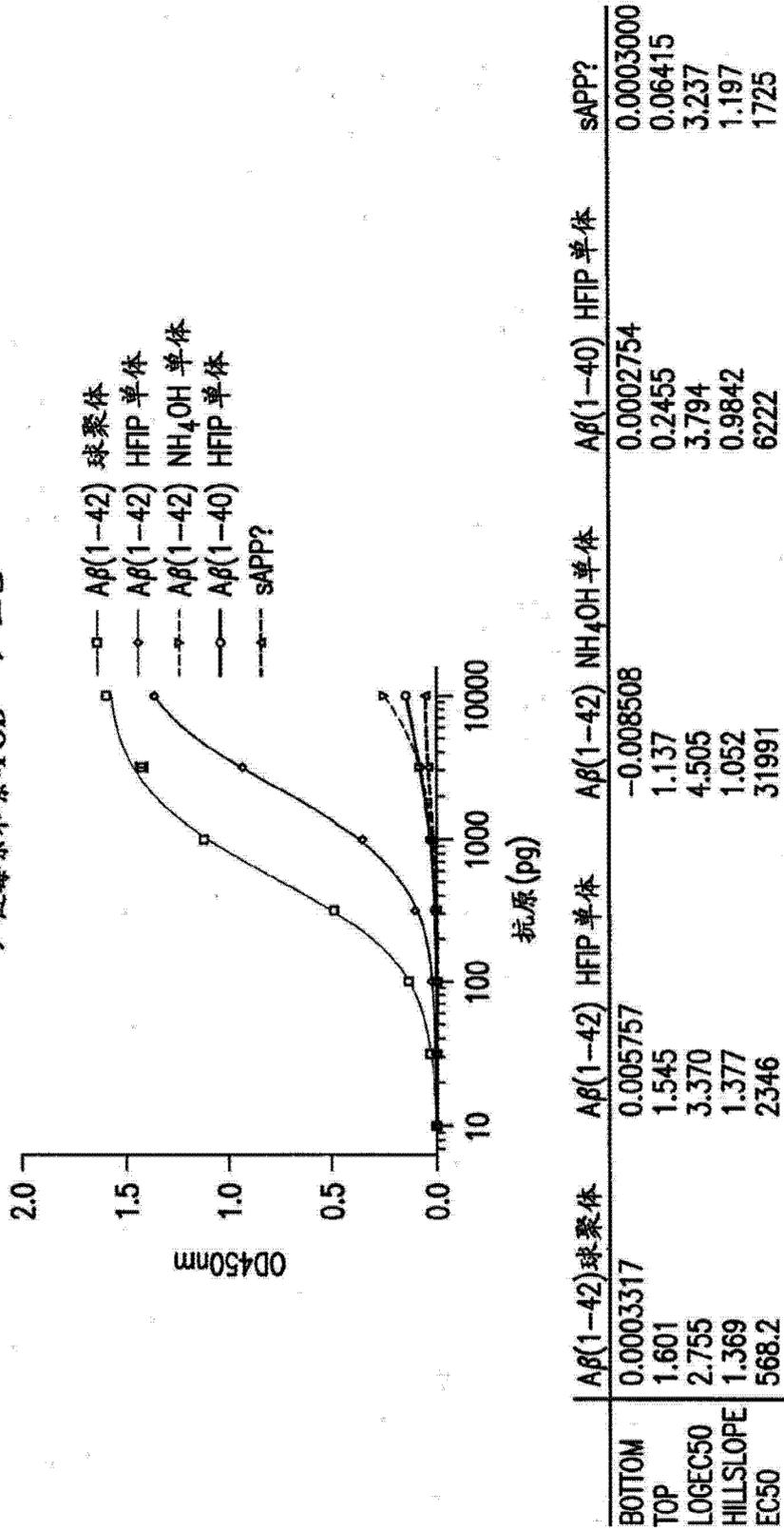


图 8

VH 8C5

GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCC
TGAAACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGGCATGTCT
TGGGTTCCGACACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAAGTATTA
ATAATGGTGGTAGCACCTATTATCCAGACAGTTTGAAGGGCCGATTACCAT
CTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAG
TCTGAGGACACAGCCATGTATTATTGTGCAAGTGGGGATTACTGGGGCCAAG
GCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:11)

图 9A

VL 8C5

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAGAC
ACCTTTTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGAT
CTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGTTTCAGTGGCAGTG
GATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCT
GGGAATTTATTTCTGCTCTCAGAGTATACATGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAG
GCACCAAGCTGGAAATCAAACGG (SEQ ID NO:12)

图 9B

VH 8C5

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLELVASIKNN
GGSTYYPDLSLKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCASGDYWGQGTT
LTVSS (SEQ ID NO:19)

CDR1 (VH) = SYGMS (SEQ ID NO:13)

CDR2 (VH) = SIKNNGGSTYYPDLSLKG (SEQ ID NO:14)

CDR3 (VH) = SGDY (SEQ ID NO:15)

图 10A

VL 8C5

DVVMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSLVHSNGDTEFLHWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSIHVPWTFGGGTKLEI
KR (SEQ ID NO:20)

CDR1 (VL) = RSSQSLVHSNGDTEFLH (SEQ ID NO:16)

CDR2 (VL) = KVSNRFS (SEQ ID NO:17)

CDR3 (VL) = SQSIHVPWT (SEQ ID NO:18)

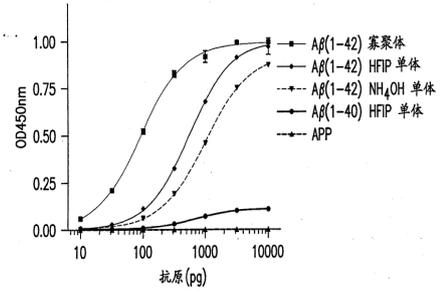
图 10B

专利名称(译)	抗淀粉样β蛋白的单克隆抗体及其用途		
公开(公告)号	CN102898519A	公开(公告)日	2013-01-30
申请号	CN201210380708.5	申请日	2006-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司 艾博特股份有限两合公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药有限公司 艾博特股份有限两合公司		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药有限公司 艾博特股份有限两合公司		
[标]发明人	B 拉布科夫斯基 S 巴格霍恩 H 希伦 U 埃贝尔特 A R 斯特里宾格 P 克勒		
发明人	B.拉布科夫斯基 S.巴格霍恩 H.希伦 U.埃贝尔特 A.R.斯特里宾格 P.克勒		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/12 A61K39/395 A61P25/28 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/565 C07K2317/92 A61K2039/505 C07K2317/56 A61P25/28 A61P37/04 C07K16/46 C07K2317/24 G01N33/53 G01N33/6893 G01N2800/2821 A61K39/3955 C07K2317/14 C07K2317/20 C07K2317/21 G01N33/577 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2500/20		
代理人(译)	郭文洁		
优先权	60/740866 2005-11-30 US 60/778950 2006-03-03 US		
其他公开文献	CN102898519B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及可用于例如阿尔兹海默病或其它神经变性疾病预防、治疗和诊断的单克隆抗体(例如8F5和8C5)。

用生物素酰化克隆 8F5 包被克隆 6G1 对
 几种 A β 形式的夹心 ELISA
 包被抗 A β 克隆 6G1 --> A β 形式 --> 生物素酰化克隆 8F5
 --> 链霉菌素-POD --> 显色



	A β (1-42)寡聚体	A β (1-42) HFIP 单体	A β (1-42) NH ₄ OH 单体	A β (1-40) HFIP 单体
BOTTOM	-0.001218	0.004304	0.006727	0.004288
TOP	0.9926	1.002	0.9292	0.1116
LOGEC50	1.958	2.745	3.003	2.825
HILLSLOPE	1.215	1.270	1.204	1.375
EC50	90.74	555.8	1007	667.8