(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102006887 A
(43)申请公布日 2011.04.06

(21)申请号 200880116438.9
(22)申请日 2008.11.14
(30)优先权数据
60/988,481 2007.11.16 US
61/019,747 2008.01.08 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.05.14
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2008/083659 2008.11.14
(87)PCT申请的公布数据
WO2009/065054 EN 2009.05.22
(83)生物保藏信息
ATCC PTA-8830 2007.12.05
(71)申请人 洛克菲勒大学
地址 美国纽约州
(72)发明人 杰弗瑞·华弗治 福山英啓
(74)专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事务所 12201
代理人 陆艺
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/567(2006.01)

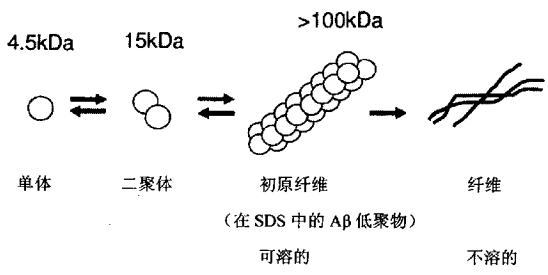
权利要求书 2 页 说明书 25 页 序列表 14 页
附图 12 页

(54)发明名称

初原纤维形式 β-淀粉样蛋白的特异性抗体

(57)摘要

本发明表征了一种分离抗体，其对初原纤维形式的 β-淀粉样肽的重复构象表位具有特异性亲和作用，而对低分子量 β-淀粉样肽不具有亲和作用。本发明的分离抗体和其相关药学有效的组合物，能有效阻断由初原纤维形式的 β-淀粉样肽形成与阿尔茨海默病并发症相关的原纤维形式的进程，可以用于阿尔茨海默病的预防和治疗。本发明的分离抗体还可用于多种诊断检测和相关试剂盒。



CN 102006887 A

1. 一种分离抗体，其能与初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位特异性相互作用并表现出可测量的亲和力，其中所述初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位由含有序列 SEQ ID NO：2 的氨基酸序列的初原纤维形式的 Aβ 肽暴露区表示，所述抗体对单体或二聚体形式的 Aβ 肽表现出极小亲和力或无亲和力。

2. 如权利要求 1 所述的分离抗体，其特征在于，所述抗体是单克隆抗体。

3. 如权利要求 2 所述的分离抗体，其特征在于，所述单克隆抗体是人源化单克隆抗体。

4. 如权利要求 2 所述的分离抗体，其特征在于，所述单克隆抗体是人源单克隆抗体。

5. 一种分离抗体，其能与初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位特异性相互作用并表现出可测量的亲和力，其中所述初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位由含有选自序列 SEQ ID NO：3 和 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列的初原纤维形式 Aβ 肽暴露区表示，所述分离抗体对单体或二聚体形式 Aβ 肽表现出极小亲和力或无亲和力。

6. 如权利要求 5 所述的分离抗体，其特征在于，所述抗体是单克隆抗体。

7. 如权利要求 6 所述的分离抗体，其特征在于，所述单克隆抗体是 13C3 单克隆抗体。

8. 如权利要求 6 所述的分离抗体，其特征在于，所述单克隆抗体是人源化单克隆抗体。

9. 如权利要求 6 所述的分离抗体，其特征在于，所述单克隆抗体是人源单克隆抗体。

10. 如权利要求 5 所述的分离抗体，其特征在于，所述抗体还进一步包括一个由序列 SEQ ID NO：5 组成的轻链可变区。

11. 如权利要求 5 所述的分离抗体，其特征在于，所述抗体还进一步包括一个由序列 SEQ ID NO：7 组成的重链可变区。

12. 如权利要求 5 所述的分离抗体，其特征在于，所述抗体还进一步包括一个含有如序列 SEQ ID NO：13 所示的 CDR1 区、如序列 SEQ ID NO：14 所示的 CDR2 区和如序列 SEQ ID NO：15 所示的 CDR3 区的轻链可变区。

13. 如权利要求 5 所述的分离抗体，其特征在于，所述抗体还进一步包括一个含有如序列 SEQ ID NO：20 所示的 CDR1 区、如序列 SEQ ID NO：21 所示的 CDR2 区和如序列 SEQ ID NO：22 所示的 CDR3 区的重链可变区。

14. 一种单克隆抗体的生产方法，所述抗体在体外能与初原纤维形式 Aβ 肽的重复构象表位特异性结合，而对低分子量形式 Aβ 肽表现出极小亲和力，其包括：

(a) 用初原纤维形式 Aβ 肽免疫哺乳动物；

(b) 收获所述哺乳动物的 B 细胞；

(c) 从所述收获的 B 细胞产生杂交瘤，其中所述的杂交瘤产生抗体；以及

(d) 选择能产生抗体的杂交瘤，所述抗体对初原纤维形式 Aβ 肽特异性结合，而对单体形式或二聚体形式 Aβ 肽表现出极小亲和力。

15. 一种测定组织或体液样品中初原纤维形式 Aβ 肽的量的方法，包括：

(a) 从受试者中获得所述的组织或体液样品；

(b) 将所述组织或体液样品与能与初原纤维形式 Aβ 肽特异性结合而对单体形式或二聚体形式 Aβ 肽表现出极小亲和力的抗体或其片段接触；以及

(c) 测定所述组织或体液样品中初原纤维形式 Aβ 肽的量。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，所述抗体是选自抗体 13C3、1D1 和 19A6 的单克隆抗体。

17. 一种检测初原纤维形式 Aβ 肽而对单体形式或二聚体形式 Aβ 肽表现极小亲和力的检测试剂盒，其包括：

(a) 能在体外与初原纤维形式 Aβ 肽的重复构象表位特异性结合而对低分子量形式 Aβ 肽表现出极小亲和力的抗体或其片段；以及

(b) 与所述抗体或其片段直接或间接结合的试剂。

18. 如权利要求 17 所述的试剂盒，其特征在于，所述抗体是选自抗体 13C3、1D1 和 19A6 的单克隆抗体。

19. 一种预防或治疗哺乳动物 β-淀粉样纤维斑块沉积的方法，其包括给予所述哺乳动物药学有效量的能以最小剂量与初原纤维形式 Aβ 肽特异性相互作用以抑制 β-淀粉样纤维斑块形成和沉积的可变区片段。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述抗体是单克隆抗体。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述单克隆抗体是选自抗体 13C3、1D1 和 19A6。

22. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述单克隆抗体是人源化单克隆抗体。

23. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述单克隆抗体是人源单克隆抗体。

24. 一种分泌选自抗体 13C3、1D1 和 19A6 的抗体的杂交瘤。

25. 一种分离的核酸分子，其编码单克隆抗体 13C3 的重链可变区片段，其特征在于，所述重链可变区片段含有如序列 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。

26. 一种分离的核酸分子，其编码单克隆抗体 13C3 的重链可变区片段，其特征在于，诉述重链可变区片段含有如序列 SEQ ID NO:8 所示的核苷酸序列。

27. 一种用于在重组宿主细胞中表达单克隆抗体 13C3 的重链可变区片段的表达载体，其特征在于，所述的表达载体含有权利要求 26 所述的核酸分子。

28. 一种表达单克隆抗体 13C3 的重链可变区片段的宿主细胞，其中所述宿主细胞含有权利要求 27 所述的表达载体。

29. 一种分离的核酸分子，其编码单克隆抗体 13C3 的轻链可变区片段，其特征在于，所述的轻链可变区片段含有序列 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列。

30. 一种分离的核酸分子，所述核酸分子编码单克隆抗体 13C3 的轻链可变区片段，其特征在于，所述的轻链可变区片段含有序列 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。

31. 一种用在重组宿主细胞中表达单克隆抗体 13C3 的轻链可变区片段的表达载体，其特征在于，所述的表达载体含有权利要求 30 所述的核酸分子。

32. 一种表达单克隆抗体 13C3 的轻链可变区片段的宿主细胞，其中所述的宿主细胞含有权利要求 31 所述的表达载体。

33. 一种分离的单克隆抗体 13C3 的重链可变区片段，其包括序列 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。

34. 一种分离的单克隆抗体 13C3 的轻链可变区片段，其包括序列 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列。

初原纤维形式 β-淀粉样蛋白的特异性抗体

[0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2007 年 11 月 16 日提交的临时专利申请 60/988,481 和 2008 年 1 月 8 日提交的临时专利申请 61/019,747 的优先权，其内容并入本文作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及能与初原纤维形式人 β-淀粉样肽的构象表位特异性相互作用的分离抗体。这些抗体对低分子量形式 β-淀粉样肽具有微小的或不能检测到的亲和作用。本发明公开的这些抗体可用于诊断、治疗和 / 或预防与 β-淀粉样斑块沉积相关的阿尔茨海默病的发生或发展。

背景技术

[0004] β 淀粉样 (Aβ) 肽被认为是阿尔茨海默病 (" AD") 的致病因子，它通过不溶性 Aβ 肽原纤维的形成和这些原纤维的沉积形成淀粉样斑块。在对于记忆和其他认知功能非常关键的大脑内形成这些斑块被认为会导致与该病相关联的痴呆 (见 Selkoe，1994，J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53 :438-447)。β 淀粉样肽是一组 39-43 个氨基酸长度的肽，是淀粉样肽前体蛋白 (APP) 经过 β-分泌酶和 γ-分泌酶分别在氨基和羧基末端蛋白水解加工而成。至少有五个不同亚型的 APP，长度分别是 563、695、714、751 和 770 个氨基酸 (见 Wirak 等，1991Science 253 :323)。这些 APP 亚型由 APP 基因初始转录产物选择性剪接而成。在常染色体显性遗传的早期发病的阿尔茨海默病家族的 APP 中，鉴定出大量错义突变。有些突变集中在分泌酶裂解位点附近，通过增加 Aβ 形式 (如 $Aβ_{42}$) 的产生或其比例而影响 APP 代谢，和其他形式相比，它产生的原纤维更多，聚集得更快。神经毒性可能在于大分子量的原纤维中，它通过可溶性 Aβ 肽聚集成不溶性原纤维而形成，随后，原纤维合并成淀粉样斑块。一种中间态的原纤维是初原纤维 (PF) 形式 Aβ 肽，一种大分子量的寡聚形式 Aβ 肽，它在体外是可溶性的，可以以大约 670kDa 的实体分离出来。因此，不溶性 Aβ 肽的体外形式是最初的寡聚 Aβ 肽形成结构不同、可溶解性的、高分子量的初原纤维形式的终产物。这些瞬时性的初原纤维结构是淀粉样纤维的前体，而淀粉样纤维则造成了阿尔茨海默病和其他蛋白积聚性疾病中的细胞障碍和神经元丢失。

[0005] 目前，已经提出多种治疗方法以防止 Aβ 肽形成，例如，防止 APP 蛋白水解作用的抑制剂。另外，免疫治疗策略也已引入到减少斑块体积和密度的尝试，诸如给予抗 -Aβ 抗体

[0006] (以诱导清除淀粉样沉积) 或是用 Aβ 肽抗原免疫 (以提高激素反应)。

[0007] Lannfelt 等发明的美国专利 7,179,463 公开了一种通过给予一种抗体治疗阿尔茨海默病的方法，该抗体是针对由 Aβ 肽编码区内北极型突变 (Arctic mutation) 组成的原纤维提出的。在说明书中没有例举所提出的抗体，也没有给出针对其对低分子量形式 Aβ 肽的亲和力的比较。

[0008] Schenk 等发明的美国专利 6,761,888 和 6,750,324，公开了一系列能识别 $Aβ_{42}$ 氨

基酸序列不同表位的抗体。对 $A\beta_{42}$ 肽 N 末端和中间区域具有特异性的抗体表现出减少体内和体外的斑块的效力。

[0009] 虽然目前对治疗和预防阿尔茨海默病领域已经具备一定知识，但仍需要改善治疗和 / 或预防该病的组合物和方法。本发明通过公开初原纤维形式的 Aβ 肽特异性抗体，其对 Aβ 肽低分子量纤维表现出的可检测亲和性极低，提供了能解决和满足上述需要的组合物和方法。包括一种或多种上述抗体的药学有效的组合物可用于治疗和 / 或预防与阿尔茨海默病的发病和发展相关的 β 淀粉样斑块沉积。

发明内容

[0010] 本发明涉及一种分离抗体，其显示与初原纤维形式 β- 淀粉样肽的构象表位特异性结合作用。野生型 β- 淀粉样 (Aβ) 肽单体是本领域已知的并在本文中显示为 SEQ ID NO :1。本发明的分离抗体对大分子量的初原纤维形式 β- 淀粉样肽的重复构象表位具有亲和力，而对 β- 淀粉样肽的其它形式 (如单体或二聚体形式 Aβ 肽) 只表现极小亲和力的或不能检测到亲和力。

[0011] 本发明还涉及一种分离抗体，其能与初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位特异性相互作用并表现出可测量的亲和力，初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位用初原纤维形式的 Aβ 肽暴露区表示，其包括 Aβ 肽暴露区的氨基末端部分。

[0012] 本发明还涉及一种分离抗体，其能与初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位特异性相互作用并表现出可测量的亲和力，初原纤维形式表位用初原纤维形式 Aβ 肽暴露区作表示，其包括 Aβ 肽暴露部分的氨基酸 1-20(SEQ ID NO :2)。

[0013] 本发明还涉及一种分离抗体，其能与初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位特异性相互作用并表现出可测量的亲和力，初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位用初原纤维形式 Aβ 肽暴露区表示，其包括 Aβ 肽暴露部分的氨基酸 4-12 和 9-20(分别是序列 SEQ ID NO :3 和 4)。

[0014] 本发明还部分涉及单克隆抗体 13C3、1D1 和 19A6，以及抗体 13C3、1D1 和 19A6 的任何亲和力成熟型。本发明还进一步涉及一种能模拟本发明所述的抗体 13C3、1D1 和 19A6 的功能特异性的抗体。为此，本发明还涉及 13C3、1D1、19A6 或 13C3 样 -、1D1 样 - 或 19A6 样抗体的生物学活性片段和 / 或其突变体，包括但不一定限于氨基酸取代 (如亲和力成熟的重链可变区或轻链可变区的定点突变)、缺失、增加、氨基末端截短和羧基末端截短，使这些突变提供抗体或抗体结合部分的基础，产生和抗体 13C3、1D1、19A6 类似或改进的结合蛋白。在本发明此部分的一个实施方式中，抗体 13C3 的重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 分别包括 SEQ ID NO :7(V_H) 和 / 或 SEQ ID NO :5(V_L) 所示的氨基酸序列。

[0015] 本发明还进一步涉及含有编码抗体 13C3、1D1 或 19A6 的 V_H 和 / 或 V_L 区核苷酸序列的分离核酸分子，尤其涉及编码抗体 13C3 或其亲和性成熟型或突变型的抗体 13C3、1D1 或 19A6 的生物学相关部分的分离核酸分子 (多聚核苷酸)，为此，本发明此部分的一个实施方式中涉及一种核苷酸序列，其含有编码抗体 13C3 的 V_H 和 V_L 区的核苷酸序列，分别如 SEQ ID NO :8(抗体 13C3 :V_H 区) 和 / 或 SEQ ID NO :6(抗体 13C3 :V_L 区) 所示。

[0016] 本发明还涉及本文所述的分离抗体 13C3、1D1 或 19A6，其与初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位特异性相互作用并表现出可测量的亲和力。

[0017] 本发明还涉及能产生本发明的单克隆抗体的杂交瘤。本发明的具体杂交瘤包括能

分别产生示例性的单克隆抗体 13C3、19A6 和 1D1 的杂交瘤。

[0018] 本发明还涉及药学有效的组合物，其包括所公开的并进一步在本文定义的分离抗体：一种与初原纤维形式 Aβ 肽的重复构象表位特异性相互作用并表现出可测量的亲和力，而与低分子量形式 Aβ 肽表现出极小亲和力或不能检测到的亲和力的分离抗体。这些组合物可以选择性地包括一种或多种载体，一种或多种赋形剂，和 / 或一种或多种化学衍生物。

[0019] 本发明还涉及治疗患有阿尔茨海默病的个体的治疗方法，包括给予该个体一种含有本发明所述抗体药学有效的组合物，即，与初原纤维形式 Aβ 肽的重复构象表位特异性相互作用并表现出可测量的亲和力，而对低分子量形式 Aβ 肽表现出极小亲和力或不能检测到亲和力的分离抗体。这些方法将提供一种治疗干预以减少患有阿尔茨海默病的个体大脑中淀粉样沉积的量。本发明此部分的具体实施方式还涉及治疗患有阿尔茨海默病的个体的治疗方法，包括给予该个体一种药学有效的组合物，该组合物由对初原纤维形式 Aβ 肽构象表位表现特异性亲和性（至少与低分子量形式 Aβ 肽相比）的抗体制成，特别是，初原纤维形式 Aβ 肽表位用含初原纤维形式 Aβ 肽暴露部分氨基酸 1-20(SEQ ID NO:2) 的初原纤维形式 Aβ 肽暴露区表示。与本发明公开的治疗和预防方法相关的具体实施方式可以使用示例性的小鼠单克隆抗体 13C3、1D1 和 19A6，以及任何这些抗体的亲和力成熟型、嵌合抗体、人源化抗体、人源单克隆抗体和 / 或现有技术中任何其他形式抗体，包括但不限于本文所述的抗体或特异性结合成员。任何这种抗体或特异性结合成员在本说明书中都可以称之为“13C3 样抗体”。因此，“13C3 样抗体”也意味着包括本发明中的 13C3 单克隆抗体。

[0020] 本发明还涉及筛选或选择可作为与阿尔茨海默病相关的原纤维和 / 或老年斑形成抑制剂的化合物的方法。该方法包括：在多种抗体 / 肽 / 待测化合物相互作用检测中，使用具有 13C3 样特性的抗体（如，相对于 Aβ 肽的初原纤维 (PF) 形式与低分子量 (LMW) 形式的特异性亲和力），以选择能调节原纤维和 / 或斑形成过程的化合物。

[0021] 本发明还进一步涉及在受试者或患者中特异性测定初原纤维水平的诊断检测方法。该检测方法可以通过本领域普通技术人员知晓并可用的任何现有技术来实施，包括但不限于免疫印迹 (Western 印迹）、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、放射免疫法、免疫组织化学法或其它本领域已知的免疫化学方法。因此，本发明此部分的一个实施方式涉及从受试者或患者取样并使用诊断试剂盒和相关检测方法测定组织样品中 PF 形式 Aβ 的水平。待分析的组织样本通常是受试者或患者的血液、血浆、血清、粘液或脑脊液。

[0022] 因此，本发明的抗体至少可以用于以下用途：(1) 单独使用或与任何现有疗法联合使用，作为预防或诊断试剂来防止或减少阿尔茨海默病相关的斑块沉积；(2) 用于设计肽免疫原，可用来在阿尔茨海默病治疗相关的预防性或治疗性疫苗策略中激发有效的抗体反应；(3) 用来产生预防性或治疗性抗独特型抗体 (Ab2)，模拟能与本发明的抗体结合的一个或多个隐蔽表位；以及 (4) 用于设计本发明的中和抗体的互补决定区 (CDR) 衍生的肽，用于筛选可用作预防和 / 或治疗方案的初原纤维形式 Aβ 抑制剂；以及 (4) 作为诊断试剂测定具有罹患阿尔茨海默病 (AD) 风险的患者血清中或脑脊液 (CSF) 中初原纤维形式 Aβ 的水平。

[0023] 本发明的一个目的是提供能一种分离抗体，其与 Aβ 肽的初原纤维形式暴露构象表位特异性相互作用并表现出可测得亲和力，其中 Aβ 肽初原纤维形式的暴露构象表位含

有 Aβ 肽暴露区的氨基酸 1-20(SEQ ID NO :2)。

[0024] 本发明的另一个目的是提供能与 Aβ 肽的初原纤维形式暴露构象表位特异性相互作用并表现出可测得亲和力的分离抗体,其中 Aβ 肽初原纤维形式的暴露构象表位含有 Aβ 肽暴露区氨基酸 4-12 和 9-20(SEQ ID NO :3 和 4)。

[0025] 本发明的另一个目的是提供 13C3 样抗体,其可预防或减少与阿尔茨海默病相关的斑沉积相关的初原纤维形式 Aβ 肽的形成。

[0026] 本发明的另一目的是提供检测方法,在抗体 / 肽 / 待测化合物相互作用检测中,使用具有 13C3 样抗体来选择能用于治疗阿尔茨海默病相关的斑块沉积的化合物。

[0027] 本发明中所用的“Ka”是指具体抗体抗原反应的结合常数,“Kd”是指具体抗体抗原反应的解离常数。

[0028] 本发明中所用的术语“表位”或“抗原决定簇”是指 B 细胞和 / 或 T 细胞对其应答的抗原上的位点,或抗体能针对其产生和 / 或抗体能与其结合的分子上的位点。例如,表位可被确定该表位的抗体识别。表位既可以是“线性表位”(其中一级氨基酸序列包含该表位 ;通常在单一序列中,至少 3 个连续的氨基酸残基,或者更通常,至少 5 个到大约 8 个或 10 个氨基酸),也可以是“构象表位”(表位中,其中一级相邻的氨基酸序列不是表位唯一决定组分)。相对于线性表位,构象表位可以包括更多数目的氨基酸,因为这种构象表位识别的是肽或蛋白的三级结构。例如,当蛋白分子折叠形成三维结构时,形成构象表位的某些氨基酸和 / 或肽骨架并排排列以使抗体能够识别该表位。确定表位构象的方法包括但不限于,例如 X 射线晶体学、二维核磁共振、定点自旋标记和电子顺磁共振。参见,例如,在分子生物学方法中表位定位技术 (Epiitope Mapping Protocols in Methods in MolecularBiology), Vol.66,Glenn E.Morris,Ed.(1996),其公开内容以其全文并入本文作为参考。

[0029] 本文所用两个实体间的“特异性结合”是指亲和力至少为 10^6M^{-1}、10^7M^{-1}、10^8M^{-1}、10^9M^{-1} 或 $10^{10}M^{-1}$。

[0030] 本文所用的“初原纤维”是初原纤维样聚集体,包括含有 Aβ 肽的球形结构,表现为形成曲线结构的球形结构串。

[0031] 本文所用术语“分离的”(或“分离”)和本领域所用的含义相同。即,抗体 / 特异性结合成员和核酸分子和这类分子被发现时的状态。抗体 / 特异性结合成员和核酸分子不含或基本不含在天然环境或制备(如细胞培养)环境(这种制备是通过重组 DNA 技术(在体外操作或体内操作))发现的与其天然结合的物质,诸如其他多肽或核酸。“分离”包括含有从初始环境分离后本发明所鉴定和表征的一种或多种组分的任何形式。具体实例包括但当然不限于药物制剂、含稀释剂的制剂、抗体 / 特异性结合成员、核酸分子及其在体内或体外修饰(如糖基化抗体)并从环境中分离的部分。

[0032] 本申请所用的术语“重组人源抗体”代表一类由本领域熟知的多种方式的重组 DNA 技术或非人类转基因技术产生的活的“抗体”亚群。采用这种方法从以下来源之一产生抗体 :(i) 从联合人源抗体库中分离出单链抗体 (scFv) 或其替代抗体 ;(ii) 从稳定转染或瞬时转染到宿主细胞,优选哺乳动物宿主细胞的各自表达载体中产生的部分抗体或完整抗体(如,将编码 VH 和 VL 链的核苷酸序列连同各自的 CH 和 CL 核苷酸序列亚克隆到表达载 体,以便提高表现 PF 形式 Aβ 特异性的某种预定抗体形式的表达 ;和 / 或 (iii) 从含有人类免疫球蛋白基因的非人类转基因动物中分离的抗体,或通过任何其他有赖于人类免疫球蛋白

基因序列和其他 DNA 序列的重组“混合和配对”的已知方法来产生目的重组人源抗体。

[0033] 术语“受试者”或“患者”是指包括任何脊索动物门成员，包括但不限于，人类和其他灵长类动物，包括非人类的灵长动物，诸如黑猩猩和其他猿类和猴类；家畜诸如牛、绵羊、猪、山羊和马；驯养动物如狗和猫；实验动物包括啮齿类动物，诸如小鼠、大鼠和豚鼠；鸟类包括驯养鸟、野生鸟和猎鸟，诸如鸡、火鸡和其它禽类、鸭、鹅等等。

[0034] 术语“处理”（“treating”）或疾病的“治疗”（“treatment”）是指实施一种方案，包括给予受试者（人类或其他）一种或多种药物，以减轻疾病的症状或病征。减轻症状或病征可以发生在疾病的症状或病征出现之后或之前。因此，术语“治疗”或疾病的“治疗”包括“预防”或疾病的“预防”。在阿尔茨海默病中，“预防”或疾病的“预防”还可以是在为了预防或阻止阿尔茨海默病相关症状出现的疗程。另外，“治疗”或疾病的“治疗”不需要完全消除症状或体征，不需要治愈，特别包括在受试者身上只有微小积极效果的方案。

[0035] 本文所用的术语“活性成分”是指对初原纤维形式 β 淀粉样蛋白氨基末端部分表现具有亲和力和特异性（如特异性结合）的 13C3 样抗体。

[0036] 本文所用的术语抗体的“有效量”或“药学有效量”，如本文所提供，是指活性成分的量无毒性，但足以产生预期的生物学效果。在个体案例中，适当的“有效”量可以由本领域普通技术人员采用常规的实验技术来确定。

[0037] 本文所用的术语“药学可接受的”或“药理学可接受的”是指一种物质，其可与配制的生物学试剂一起在给药装置中给个体给药，而不会造成任何不期望的生物学作用或以有害方式与组合物中所含任何组分相互作用（如“药学可接受的组合物”）。

[0038] 本文所用的短语“生理学可接受的载体”和“药学可接受的载体”（可互换使用）是指既不会严重刺激生物体也不会消除给药化合物的生物学活性和特征的载体、稀释剂和赋形剂。其中辅料包括在这些短语之内。

[0039] 本文所用的术语“赋形剂”是指一种惰性物质，其加入到药物组合物中可进一步方便活性成分的给药。

[0040] 在比较抗体对初原纤维形式 Aβ 肽和其他形式 Aβ 肽（诸如原纤维形式、折叠结构和低分子量形式寡聚体和单体）的亲和力时，术语“最小的亲和力”表示抗体对初原纤维形式 Aβ 肽的亲和力和对其他形式 Aβ 肽的亲和力之比约大于 2。优选地，该比例约大于 3，或 4，或 5。

附图说明

[0041] 图 1 显示 Aβ 原纤维生成过程，包括初原纤维寡聚体的形成过程。

[0042] 图 2A-B 显示 Aβ 原纤维生成过程和 Aβ 肽在 0 点 (A) 和 4 小时 (B) 的纯化，洗脱量用 mAU215(215nm 的吸光度）表示。4 小时 (B) 时，低分子量 (LMW) 形式洗脱液约为 15kDa 的二聚体，而初原纤维形式洗脱液的分子量约为 670kDa。

[0043] 图 3A-B 显示单克隆抗体 13C3(A) 和 4G8(B) 对初原纤维形式 (PF- ◆ -) 和低分子量形式 (LMW :- ■ -)Aβ 的特异性，增加的 PF 和 LMW 形式 Aβ 浓度用 450/650nm 的光密度 (OD) 表示。

[0044] 图 4A-C Biacore®结合检测数据，显示单克隆抗体 4G8(A)、13C3(B 和对照 IgG1(C) 对不同浓度的低分子量 (LMW) 形式 Aβ 的亲和力，其中 LMW Aβ 的浓度为 0.25μg/ml 到

4.0μg/ml。

[0045] 图 5A-B 是由上述抗 Aβ 抗体识别的表位抗原的鉴定数据。图 5A 阐明使用抗体 13C3(上图)、1D1(中图)和 4G8(下图)对实施例 5 所述的一系列重叠的 13 个氨基酸肽的 Western 点杂交分析。图 5B 显示 $A\beta_{1-42}$(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列以及单克隆抗体 13C3 和 1D1 的预测表位。

[0046] 图 6 显示单克隆抗体 13C3(-■-)和 4G8(-◆-)与分泌 Aβ 寡聚体的 7PA2 的上清液的 SEC 组分的作用。初原纤维形式 (PF) 和低分子量形式 (LMW) 组分用 450/650nm 下的光密度 (OD) 测定并在 X 轴表示。

[0047] 图 7A-C 是薄切片免疫电子显微镜显微照片显示单克隆抗体 13C3 对 Aβ 原纤维 (B,C) 上的重复结构的亲和力。对照免疫电子显微镜显微照片是 IgG_1(A) 的。

[0048] 图 8A-B 是电子显微照片数据,表明与单克隆抗体 13C3 给药 (B) 相比,在对照 IgG_1(A) 抗体给药后,代表性的 TgCRND8 转基因小鼠中斑块的数量减少。

[0049] 图 9A-B 显示使用单克隆抗体 13C3 每周一次 (A) 或每周两次 (B) 的方案治疗后,TgCRND8 转基因小鼠老年斑的形成减少。

[0050] 图 10 显示克隆的单克隆抗体 13C3 轻链可变区和重链可变区的核苷酸和氨基酸序列。

[0051] 图 11 显示在 APP 转基因小鼠快速外周给予单克隆抗体 13C3 后不会像给予对照的 3D6 抗体那样导致血浆 Aβ 增加。

[0052] 图 12 显示单克隆抗体 13C3 可识别 AD 大脑中的人淀粉样神经炎斑(聚集的)但不能如抗 Aβ 抗体 3D6 那样扩散 Aβ 的沉积。

具体实施方式

[0053] 淀粉样前体蛋白 (APP) 在阿尔茨海默病 (AD) 的发病机制中起着重要作用。APP 由 β- 分泌酶和 γ- 分泌酶蛋白水解过程产生 Aβ 肽 (Aβ),其长度通常为 39 到 43 个氨基酸。阿尔茨海默病的发生以 Aβ 寡聚体或聚集形式在大脑内的累积为特征。本发明的免疫组合物用于治疗或预防阿尔茨海默病,可作为诊断试剂使用,也可用来设计淀粉样沉积的小分子抑制剂。本发明的 13C3 样抗体可在哺乳动物群体特别是人类中,预防性给予预期的药学可接受的制剂,其用量和 / 或剂量应足以消除、减轻或延缓该病的发生。对已知具有遗传上或家族性阿尔茨海默病风险的个体,特别值得采用预防性治疗方法。目前已经鉴定出多种阿尔茨海默病风险的遗传标记,包括但不限于 APP 突变(如印第安型突变 (Val717Phe)、瑞典型突变 (Lys670Asn,Met671Leu)、亨德里克斯突变 (Ala692Gly)、荷兰型突变 (Glu693Gln)、伊朗型突变 (Thr714Ala)、德国型突变 (Val715Ala) 和佛罗里达型突变 (Ile716Val)),在此列出上述几个。其他可以提示阿尔茨海默病风险升高的突变包括早老基因 (PS1 和 PS2) 和 ApoE4 的突变。本发明还涉及通过给予经鉴定正在罹患阿尔茨海默病的个体(特征性痴呆,特别是上述危险因子的存在)或已经罹患该病的个体足够治愈或至少部分阻止阿尔茨海默病症状和体征的量的含 13C3 样抗体的药物可接受的组合物的治疗干预。本发明预期的基于预防性的或治疗性的治疗可用于阿尔茨海默病发病早期或晚期。鉴于寡聚形式 Aβ 肽在阿尔茨海默病的发病中起到重要作用,本发明涉及能与初原纤维形式 Aβ 肽的重复构象表位相互作用并表现出可测量的亲和力的分离抗体。野生型 Aβ 肽单

体（$A\beta_{42}$；42 个氨基酸型）是本领域已知的，如本发明中 SEQ ID NO：1 所示：

[0054] Asp Ala Glu Phe Arg Hls Asp Ser Gly Tyr Glu Val Hls Hls Gln

[0055] Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala

[0056] Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val VaL lle Ala(SEQ ID NO：1).

[0057] 本发明的分离抗体对大分子量寡聚初原纤维形式 Aβ 肽的重复构象表位表现出亲和力，而对其它形式（如低分子量单体或二聚体）Aβ 肽表现出极小的亲和力。

[0058] 本发明还涉及能与初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位相互作用并表现出可测得亲和力的分离抗体，初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位用包括 Aβ 肽暴露部分的氨基末端部分的初原纤维形式 Aβ 肽暴露区表示。

[0059] 本发明还进一步涉及一种分离抗体，其能与初原纤维形式 Aβ 肽构象表位相互作用并表现出可测量的亲和力，其中初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位用含有初原纤维形式 Aβ 肽暴露部分的氨基酸 1-20(SEQ ID NO：2) 的初原纤维形式 Aβ 肽暴露区表示，序列如下：Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe(SEQ IDNO：2)。

[0060] 如本发明的示例，鉴定小鼠单克隆抗体的结果特别显示：其对初原纤维形式 (PF) Aβ 肽具有特异性亲和力，而对其它低分子形式 Aβ 肽只表现极小的亲和力。二聚体形式 Aβ 肽（约 15kDa）随着时间推移会聚合形成可溶性 PF 形式 Aβ（分子量大约为 670kDa）。小鼠用这种较高分子量的 PF 形式 Aβ 肽免疫。筛选对高分子量 PF 形式 Aβ 肽具有特异性，而与低分子量 Aβ 肽结合能力很小或不能与低分子量 Aβ 肽结合的单克隆抗体。本发明的此部分以 13C3 系列单克隆抗体的筛选、分离和表征为例，13C3 系列单克隆抗体是抗 670

[0061] kDa 高分子量初原纤维形式 Aβ 肽的（即，抗体 13C3、1D1 和 19A6）。该系列单克隆抗体在体外表现出预想的特异性，也能减少阿尔茨海默病转基因小鼠模型中阿尔茨海默病相关斑的形成。因此，在本发明的一个具体实施方式中，分离的抗体能与初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位特异性相互作用并表现出可测量的亲和力，初原纤维形式 Aβ 的构象表位以含有 Aβ 肽暴露部分氨基酸 4-12(SEQ ID NO：3) 和氨基酸 9-20(SEQ ID NO：4) 的初原纤维形式 Aβ 暴露区表示：Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val(SEQ ID NO：3)；Gly Tyr GluVal His His Gln Lys Leu Val Phe Phe(SEX ID NO：4)。

[0062] 本发明的一个实施方式涉及含有如抗体 13C3 所公开的 V_H(SEQ ID NO：7) 区和 / 或 V_L(SEQ ID NO：5) 区的抗体，从而其相对于低分子量形式 Aβ 肽，对 PF 形式 Aβ 肽具备了 13C3 样抗体的特异性。另一个实施方式是 13C3 样抗体或其表现出 PF 形式 Aβ 肽的特异性（相对于低分子量形式 Aβ 肽）相关生物学片段。因此，本发明还涉及抗体 13C3、1D1、19A6 或 13C3 样抗体的生物学活性片段和 / 或突变体，包括但不局限于氨基酸取代（如具有成熟亲和性的 V_H 或 V_L 区的定点突变）、缺失、增加、氨基末端截短和羧基末端截短，这些突变为抗体或抗体结合部分提供了基础，产生了 13C3、1D1 或 19A6 样抗体结合蛋白相似或改良形式。本发明此部分的一个实施方式涉及这种抗体的 V_H 和 V_L 区，分别含有如 SEQ ID NO：7(V_H) 和 / 或 SEQ ID NO：5(V_L) 所示的氨基酸序列。本发明注意到编码冗余的存在可以导致不同 DNA 分子表达其相同的抗体或其部分（如：可替换的核酸分子编码相同的 IgG scFv 或 VH 和 / 或 VL 部分）。为了本发明的目的，将含有一个或多个取代密码子的序列定义成简并变异。序列变异的另一来源可能发生在 RNA 编辑过程。RNA 编辑可能会导致另一

种形式的密码子冗余，其中开放阅读框的变化不会导致表达蛋白中氨基酸残基的变化。本发明还包括能改善表达抗体最终物理性质的 DNA 序列或翻译抗体的突变。为此，本发明涉及：(i) 亲和力成熟形式的抗体 13C3、1D1、19A6 或任何其他 13C3 样抗体，和 / 或 (ii) 成熟型抗体 13C3、1D1、19A6 或任何其他 13C3 样抗体，包括但不限于 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 区发生一个或多个突变的抗体，该突变可通过引入位点特异性突变的现有亲和力成熟方法和重组 DNA 技术产生。因此，本发明的分离抗体是与初原纤维形式 Aβ 肽上的构象表位表现特异性亲和作用的抗体。本发明的分离抗体与大分子量初原纤维形式 Aβ 肽的构象表位表现亲和性，而对其它形式 Aβ 肽（诸如原纤维、折叠结构和低分子量形式寡聚体和单体）只表现极小亲和性。

[0063] 本发明还涉及分离的单克隆抗体 13C3。本发明此部分还涉及一种能产生本发明的单克隆抗体 13C3 的杂交瘤。产生单克隆抗体 13C3 的杂交瘤可从美国典型培养物保藏中心 (ATCC，美国弗吉尼亚州马纳萨斯市）根据 ATCC 登录号 PTA-8830 获得，其保藏日为 2007 年 12 月 5 号。

本发明还涉及分离的单克隆抗体 1D1。本发明此部分还涉及一种能产生上述单克隆抗体 1D1 的杂交瘤。

[0064] 本发明还涉及分离的单克隆抗体 19A6。本发明此部分还涉及一种能产生上述单克隆抗体 19A6 的杂交瘤。

[0065] 本发明还涉及筛选或选择可作为与阿尔茨海默病相关的原纤维和 / 或老年斑形成抑制剂的化合物的方法。该方法包括：在多种抗体 / 肽 / 待测化合物相互作用检测中，使用对 PF 形式 Aβ 肽具有 13C3 样亲和性的抗体来选择能调节原纤维和 / 或斑块形成的化合物。该化合物可以是非蛋白有机或无机分子、肽（如，作为潜在的预防性或治疗性肽疫苗）、蛋白、DNA（单链 DNA 或双链 DNA）或 RNA（如小干扰 RNA 或小发夹样 RNA）。回顾一下本说明书公开和教导的内容，显然，任何能与 13C3 样抗体有效竞争结合 PF 形式 Aβ 肽的肽或小分子都代表一种可能的预防和治疗阿尔茨海默病相关的先导化合物。为此，可以使用相互作用法进行高通量筛选鉴定识别占据抗体 13C3 或与其相互作用的 PF 形式 Aβ 肽表位以及置换该抗体的化合物。

[0066] 可以采用本领域已知的各种抗原 - 抗体检测来筛选用于阿尔茨海默病诊断和治疗的化合物（如无机小分子或备选肽疫苗），这种方法结合或依赖本发明的 13C3 样抗体作为核心试剂，这些方法包括但不限于酶联免疫吸附检测 (ELISA)、放射免疫法检测、免疫印迹 (Western 印迹）分析或任何不需要分离和清洗步骤依赖可测生物学反应的均相检测（如，可见 PerkinElmer 公司的 AlphaScreen 技术）和 / 或表面等离子共振 (SPR) 技术（如，见 BIACore 技术）。通过使用 13C3 样抗体鉴定的备选化合物和 / 或肽疫苗可以采用多种方法检测。该检测可以是简单的定性检测（确定其在形成已知抗体 / 抗原复合物的能力是否有变化）或是定量检测（通过使用诸如 ELISA 法检测、均相法检测或基于 SPR 法检测）。为此，本发明涉及任何测定待测化合物与 13C3 样抗体竞争结合 PF 形式 Aβ 肽 13C3 表位氨基末端部分适合的肽或蛋白模拟物的能力的检测方法，而不论是否使用了已知方法。

[0067] 本文所述的抗体在多种免疫检测中作为基本试剂测定组织样品中初原纤维形式 Aβ 的存在。通常，这些抗体可用于任何类型的免疫检测，无论是定性的，还是定量的。这既包 括传统的竞争结合法，也包括双位点夹心法以及非竞争型单位点免疫法。为了实现检

测简单并定量的目的的一个实施方式是夹心法或双抗体法检测，其中可存在多种变化，所有这些变化都包括在本发明的此部分。例如，在典型的正向夹心法中，未标记的抗体被固定在固体底物如微孔板上，将待测样品与结合分子接触。孵育适当时间，使有足够时间形成抗体－抗原二元复合物，然后添加标记报告分子能够诱导可检测信号的第二抗体并且继续温育以提供充分的时间使其与抗原在不同位点结合并形成抗体－抗原－标记的抗体的三元复合物。洗掉所有未反应物质，通过观测信号确定抗原的存在，该信号可通过与含有已知量的抗原对照样品比较来定量。正向夹心法的变化包括同步法，此时将样品和抗体同时加入到结合抗体中，或反向夹心法，此时标记抗体和待测样品首先结合、孵育并加入到非标记表面结合抗体汇总。这些技术是本领域普通技术人员熟知的，可能的细微变化是显而易见的。此处所用“夹心法”规定为包括基于双位点法的所有变化。

[0068] 对本发明的夹心法而言，唯一的限制因素是两种抗体对初原纤维形式 Aβ 具有不同的结合特异性。因此，可能有多种组合方式。更具体的一个例子是，在典型的正向夹心法中，第一抗体或是共价或是被动结合到固定支撑物上。该固体表面通常是玻璃或聚合物，常用的聚合物是纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯和聚丙烯。因此支撑物可以是试管、小珠、圆盘或微孔盘，或任何其它适合进行免疫反应的表面。结合过程是本领域众所周知的。结合后，冲洗固相－抗体复合物准备检测样品。然后将等量的含有初原纤维形式 Aβ 的待测体液加入到固相－抗体复合物中，在 25℃下孵育充足的时间，以使初原纤维形式 Aβ 与初原纤维形式 Aβ 特异性抗体结合。随后将第二抗体加入到固相－抗体复合物中，再次在 25℃下孵育充足时间，以使第二抗体结合到第一抗体－抗原固相复合物上。第二抗体连接有报告分子，其可视信号用来指示第二抗体与样品中任何抗原的结合。本说明书中所用“报告分子”是指一种分子，该分子可利用其化学性质提供一种可分析检测的信号，该信号能够检测抗原抗体的结合。检测必须至少是相对定量的，以便测定样品中的抗原量。这可用绝对值计算，或通过一种或一系列含有抗原已知正常水平的标准品对比而得。

[0069] 这种检测法中最常用的报告分子是酶或荧光基团。在酶免法中，酶通常通过戊二醛或高碘酸盐偶联到第二抗体上。然而，容易认识到的是，目前存在着本领域熟练技术人员熟知的多种不同的偶联技术。常用的酶包括辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、β－半乳糖苷酶和碱性磷酸酶等。具体酶所用的底物通常是根据被相应酶水解产生颜色变化来选择的。例如，对硝基苯磷酸盐适合与碱性磷酸酶偶联使用，而对于过氧化物酶的偶联，则常用 1，2- 苯二胺或苯胺。还可以使用荧光底物，其能产生荧光产物而不是像上述的生色底物。在所有方式中，酶标抗体都是加入到第一抗体－初原纤维形式 Aβ 复合物中，使其与复合物结合，然后冲洗掉多余的试剂。随后将适当的底物溶液加入到抗体－抗原－标记抗体三元复合物中。底物与酶联第二抗体反应，产生定量的可视信号，通常可采用分光光度计进一步定量，得到存在于血清样品中的抗原的量。

[0070] 另外，荧光化合物如荧光素或若丹明，也可以化学偶合到抗体上而不会改变抗体的结合能力。当用某一具体波长的光照射激活时，荧光标记抗体吸收光能，诱导分子处于激活状态，随之发射具有较长的特征波长的光线。该发射用光学显微镜可以检测到特征颜色。酶免法 (EIA) 中，荧光标记抗体可与抗初原纤维形式 Aβ 第一抗体结合形成蛋白复合物。冲洗掉未结合试剂后，留下的三元复合物便暴露在适当波长的光线下，所观察到的荧光表示抗原存在。免疫荧光和 EIA 技术都是本领域成熟的技术，在本方法中特别优选。然而，

也可使用其它报告分子，诸如放射性同位素、化学发光或生物发光分子等。对于本领域熟练的技术人员而言，如何改变操作以适合使用的要求是显而易见的。

[0071] 在另一个实施方式中，可以在单位点免疫法中使用待测样品（如含初原纤维形式 Aβ 的血液或脑脊液），其中，待测样品共价或非共价吸附到固体底物上。引入未标记初原纤维形式 Aβ 抗体与结合到固体底物上的样品接触，孵育适当时间，足以使抗体抗原二元复合物形成，然后加入可诱导可测信号的报告分子标记的第二抗体，继续孵育足够时间直至形成抗原 - 抗体 - 标记抗体三元复合物。在单位点免疫法中，第二抗体可以是能结合目的初原纤维形式 Aβ 蛋白的特异性抗体的通用抗体（即，免疫球蛋白的异种抗体，特别是连接到报告分子的抗 (IgM 和 IgG) 抗体）。

[0072] 13C3 样抗体可以呈现现有技术中的各种抗体形式。抗体可以采取相关抗体片段、抗体结合部分、特异性结合成员、合成的蛋白拟似物等任何形式，也可以采取本领域已知的指代至少能基本保留结合特性（中和）活性的实体的术语形式。因此，本说明书任何一处所用“抗体”包括，但不限于，任何特异性结合成员、免疫球蛋白家族和 / 或同型抗体（如 IgG1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgM、IgA、IgD、IgE 和 IgM）；以及其生物学相关片段或特异性结合成员，包括但不限于，Fab 抗体、F(ab′)2 抗体、Fv 抗体、scFv（单链抗体或相关实体）。因此，本领域众所周知，仅作为评述包括在内的是，“抗体”指包括至少两条重链 (H) 和两条轻链 (L) 的用二硫键相互连接的糖蛋白，或其抗原结合部分。重链由重链可变区 (VH) 和重链恒定区 (CH1、CH2 和 CH3) 组成，轻链由轻链可变区 (VL) 和轻链恒定区 (CL) 组成。重链和轻链两条链的可变区都含有框架区 (FWR) 和互补决定区 (CDR)。4 个 FWR 区是相对恒定的，而 CDR 区 (CDR1、CDR2 和 CDR3) 则是高度可变的，从氨基末端到羧基末端排列如下：FWR1、CDR1、FWR2、CDR2、FWR3、CDR3 和 FWR4。重链和轻链可变区含有一个与抗原结合的结合域，它取决于同种型，而恒定区可介导免疫球 蛋白与宿主组织或因子的结合。也就是说，“抗体”的功能定义也包括嵌合抗体、人源化抗体、重组抗体、由非人类转基因动物产生的作为人类抗体，以及采用本领域技术人员可用的富集技术从抗体库中选取的抗体。如下所述，本领域普通技术人员可通过熟知的且适合的技术获得抗体片段。因此，“抗体”是能特异性结合本发明所述的初原纤维形式 Aβ 构象表位的实体或具体结合成员。术语“抗体”描述一种免疫球蛋白，无论是天然的还是部分或全部人工合成的；任何具有与抗体结合区域同源或与其基本同源的结合区域的肽或蛋白。这些抗体可源自天然抗体，或者部分或全部合成产生。抗体的例子如免疫球蛋白同种型及其同种型亚类；包括抗原结合区域的抗体片段，如下所述，但不限制，如 Fab 抗体、单链抗体 (scFv)、Fv 抗体、dAb、Fd 和双价抗体 (diabodies)。本领域熟知可以操控单克隆抗体或其它抗体，并其可采用重组 DNA 技术生产其它抗体或嵌合抗体并保留了原抗体的特异性。这些技术可能发展为将编码免疫球蛋白可变区或抗体的互补决定区 (CDRs) 的 DNA 引入到不同免疫球蛋白的恒定区或恒定区加框架区。产生抗体的杂交瘤或其他细胞可遭遇基因突变或其他变化，其可以改变或可以不改变产生抗体的结合特异性。修饰抗体可采用多种方式，术语“抗体”可理解为涵盖任何具有所需特异性的结合区的任何特异性结合成员或物质。因此，本属于包括抗体的片段、衍生物、功能等效物和“抗体”同源物，包括任何含有免疫球蛋白结合区域的多肽，无论是天然的还是全部或部分合成的。这种实体可以是包括在术语抗体的“抗原结合部分”或抗体的“特异性结合成员”中的结合片段，包括但不限于 (i)Fab 抗体片段，系由 VL、VH、CL 和 CH 区组成的单价片段；(ii)F(ab′)2 抗体

片段，系含以二硫键在铰链区相连的两个 Fab 片段的二价片段；(iii)Fd 抗体片段，系由 VH 和 CH 区组成的片段；(iv)Fv 片段，系由抗体一条单链的 VL 和 VH 区组成的片段 (v)dAb 抗体片段，系含有 VH 区的片段；(vi) 分离的互补决定区 (CDR)；(vii)′ scAb′ 抗体片段，系含 VH 和 VL 区以及 CL 或 CH 区的片段；以及 (viii) 基于蛋白质支架的人工抗体，包括但不限于 III 型纤维多肽肽抗体 (如，见 2004 年 3 月 9 日授权 Koide 的 US6,703,199 和 PCT 国际申请公开号 WO 02/32925)。另外，虽然 Fv 片段的两个区域 VL 和 VH 由不同的基因编码，但是可以采用重组方法用合成的连接体将其连接在一起，使其成为单个蛋白链，其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子 (称之为单链 Fv(scFv))。

[0073] 在一个实施方式中，本发明的分离的 13C3 或 13C3 样抗体的轻链可变区 (VL) 可包含一个 113 个氨基酸的肽序列 (SEQ ID NO :5)，该序列由 339 个碱基对的核苷酸序列 (SEQID NO :6) 编码：

[0074] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser lieSer Cys Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu lie Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro AspArg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Lys lie Ser Arg Val Glu Ala GIu AspLeu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn Thr Phe Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys LeuGlu Ile Lys Arg(SEQ ID NO :5)

[0075] GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTGGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTATACAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCGGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAATACATTTGTTCCTTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG(SEQ ID NO :6)

[0076] 在另一个实施方式中，本发明的分离的 13C3 或 13C3 样抗体的重链可变区 (VH) 可包含一个 115 个氨基酸的肽序列 (SEQ ID NO :7)，该序列由一个 345 个碱基对的核苷酸序列 (SEQ ID NO :8) 编码：

[0077] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val Ser Val Lys lie SerCys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala LysSer Leu Glu Trp lie Gly Val lie Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe LysGly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu ThrSer Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Asp Gly Tyr Ser Trp Gly Gln Gly ThrSer Val Thr Val Ser Ser(SEQ ID NO : 7)；

[0078] CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGTCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGGGTTCCGGCTACACATTCACTGATTATGCTATGCACTGGGTGAAGCAGAGTCATGCAAAGAGTCTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACTAAGTATGGTAAGACAAACTACAACCAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTTGACAAATCCTCCAGCACAGCCTATATGGAGCTTGCCAGATTGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGGGGACGATGGTTATTCCTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID NO :8).

[0079] 在另一个实施方式中，VL 链框架区 FWR1、FWR2、FWR3 和 FWR4 可分别由 SEQ IDNO : 9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :12 所述的氨基酸序列组成，序列如下：

[0080] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser IleSer Cys Arg Ser Gly(SEQ ID NO:9)；

[0081] Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr(SEQ ID NO:10)；

[0082] Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser GIy Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr LeuLys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys(SEQ ID NO:11)；

[0083] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg(SEQ ID NO:12).

[0084] 在另一个实施方式中，VL 链互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3 可分别由 SEQ IDNO：13、SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15 所述的氨基酸序列组成，序列如下：

[0085] Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr(SEQ ID NO:13)；

[0086] Thr Val Ser(SEQ ID NO:14)；

[0087] Ser Gln Asn Thr Phe Val Pro Trp Thr(SEQ ID NO:15).

[0088] 在另一个实施方式中，VH 链框架区 FWR1、FWR2、FWR3 和 FWR4 可分别由 SEQ IDNO：16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列组成，序列如下：

[0089] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val Ser Val Lys lie SerCys Lys(SEQ ID NO:16)；

[0090] Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Val(SEQ ID NO:17)；

[0091] Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr SerGlu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg(SEQ ID NO:18)；

[0092] Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser(SEQ ID NO:19).

[0093] 在另一个实施方式中，VH 链互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3 可分别由 SEQ IDNO：20、SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列组成，序列如下：

[0094] Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala(SEQ ID NO:20)；

[0095] Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys(SEQ ID NO:21)；

[0096] Gly Asp Asp Gly Tyr Ser(SEQ ID NO:22).

[0097] 公开的治疗方法中所用的多克隆抗体或单克隆抗体可以按照已知的技术来制备。对靶构象表位表现特异性的单特异性鼠（小鼠）抗体可以从含有针对该区反应的抗体的哺乳动物抗血清中纯化，或是采用 Kohler 和 Milstein(1975,Nature 256:495-497) 技术制备单克隆抗体。如本文所用的单特异性抗体是指具有同源结合特征单一抗体种或多抗体种，诸如本发明中作为示例的 13C3 系列小鼠单克隆抗体。杂交瘤细胞通过将脾淋巴细胞和适当的融合伴侣，优选骨髓瘤细胞，在适合稳定生成杂交瘤的条件下混合来产生。融合、选择和筛选生成细胞和骨髓瘤细胞的脾抗体以用于抗体生产。抗体阳性孔中的杂交瘤细胞采用诸如 MacPherson 的软琼脂法克隆 (1973, Soft Agar Techniques, in Tissue Culture Methods andApplications, Kruse and Paterson, Eds, Academic Press)。单克隆抗体的体内生产是通过将各 自的杂交瘤细胞注射到初次接触抗原的小鼠体内、间断收集腹水用本领域熟知的技术来进行。

[0098] 除了上述物种特异性单克隆抗体，本发明的抗体还可以是“嵌合抗体”、由鼠源可变区和目的宿主源（如人，可见综述Morrison and Oi，1989，Advances in Immunology，44：65-92）恒定区构建的单克隆抗体型。例如，啮齿动物（如小鼠）来源的轻链可变区和重链可变区DNA序列（分别如SEQ ID NO：6和8）可以克隆到哺乳动物表达载体。这些轻链和重链“嵌合”表达载体用已知技术转染到接受细胞系，进行选择和扩增。该细胞系可以按照已知细胞培养技术培养，既可以产生嵌合抗体的重链也可以产生轻链。历史已经证明这样的嵌合抗体具有其来源的鼠单抗结合抗原的能力，同时大大减少给宿主用药的免疫原性问题。

[0099] 对嵌合抗体的合理改良是“人源化抗体”，与完全的鼠单克隆抗体和嵌合抗体相比，人源化抗体可以说是降低了病人对治疗性抗体的免疫反应的机会。“人源化”鼠单克隆抗体（Mab）的战略基于氨基酸残基取代，它通过个别氨基酸残基的定点突变或移植整个互补决定区区别于人序列（Jones等，1986，Nature 321：522-526）。该技术也是本领域众所周知的并有多种策略以改进，即实施策略，包括但不限于″改形（reshaping）″（见Verhoeyen等，1988，Science 239：1534-1536），″超嵌合″（见Queen等，1991，Proc. Natl. Acad. Sci. 88：2869-2873）或″胶合（veneering）″（Mark等，1994，Derivation of Therapeutically Active Humanized andVeneered anti-CD18 Antibodies Metcalf end Dalton，eds. Cellular Adhesion：MolecularDefinition to Therapeutic Potential. New York：Plenum Press，291-312）。这些方案在某种程度上都涉及到啮齿动物和人之间的序列比较，以确定从一个特定的氨基酸由啮齿动物一致序列替换成人类一致序列是否合适。无论如何变化，产生人源化抗体的中心主题在于CDR移植，在此，来自重链和轻链的三个抗原结合位点都从啮齿类表达抗体（该抗体被克隆或亚克隆（移植）到编码人类抗体的框架区）中有效去除。例如，采用上述技术，可以表达其轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别为序列SEQ ID NOS：13、14和15，而其重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别为序列SEQ ID NOS：20、21和22的人源化抗体。因此，“人源化抗体”可以只用鼠CDR区（去除一个或更多的上述策略产生的任何额外的改进）和来源于人类的其余可变区和全部恒定区来有效构建。

[0100] 本发明还涉及分离的与抗体13C3的V_H和/或V_L区相关的核酸分子以及相关的氨基酸序列，更具体地说，本发明涉及编码抗体13C3生物学相关部分或抗体13C3、1D1、19A6或其它抗体13C3样抗体的亲和力成熟型或突变型的核酸分子（寡核苷酸）。这些核酸分子基本上不含其它核酸。对于大多数克隆目的而言，核酸优选DNA。这些DNA分子可以亚克隆到表达载体，转染至所选择的能提供相当量抗体13C3生物学相关部分或 抗体13C3、1D1、19A6或其它抗体13C3样抗体的亲和力成熟版本或突变版本的宿主细胞。这些方法有多种用途，诸如长生单链抗体或在哺乳动物表达载体中共表达含编码人C_H和C_L区，也就是IgG抗体的V_H和V_L。遗传密码的简并是这样的，除了两个氨基酸以外，多于一个密码子编码特定的氨基酸。这可用于构建编码本发明的抗体的合成DNA，其中合成DNA的核苷酸序列与此处公开的核苷酸序列有很大差别，但仍编码这种抗体。这种合成DNA包括在本发明的范围。如果期望在具体宿主细胞或组织中表达这种合成DNA，可以调整这种合成DNA密码子的使用，以反映该具体宿主密码子使用，从而使本发明抗体较高水平表达。换句话说，特定氨基酸的多种密码子的冗余也包括在本发明的范围。因此，本发明还涉及那些编码包括可替换的密码子的RNA序列（这些序列编码最终翻译的同样的氨基酸）的DNA序列，如下所示：A

= Ala = Alanine :密码子 GCA, GCC, GCG, GCU ;C = Cys = Cysteine :密码子 UGC, UGU ;D = Asp = Aspartic acid :密码子 GAC, GAUE = Glu = Glutamic acid :密码子 GAA, GAG ;F = Phe = Phenylalanine :密码子 UUC, UUU ;G = Gly = Glycine :密码子 GGA, GGC, GGG, GGU ;H = His = Histidine :密码子 CAC, CAU ;I = IIe = Isoleucine :密码子 AUA, AUC ;AUU ;K = Lys-Lysine :密码子 AAA, AAG ;L = Leu = Leucine :密码子 UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU ;M = Met = Methionine :密码子 AUG ;N = Asp = Asparagine :密码子 GAU, GAC ;P = Pro = Proline :密码子 CCA, CCC, CCG, CCU ;Q = Gln = Glutamine :密码子 CAA, CAG ;R = Arg = Arginine :密码子 AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU ;S = Ser = Serine :密码子 AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU ;T = Thr = Threonine :密码子 ACA, ACC, ACG, ACU ;V = Val = Valine :密码子 GUA, GUC, GUG, GUU ;W = Trp = Tryptophan :密码子 UGG ;Y = Tyr = Tyrosine :密码子 UAC, UAU。这种重组表达载体届时可能稳定或瞬时转染到合适的细胞系来生产可替代抗体种类。

[0101] 本发明注意到密码子冗余的存在可能导致不同的 DNA 分子表达相同的抗体或其部分（如不同核酸分子编码相同的单链抗体或抗体的 VH 和 / 或 VL 部分）。为了本说明书的目的，携带有一个或多个取代密码子的序列定义为退化变异。序列变异的另一个来源可能通过 RNA 编辑。这种 RNA 编辑可能会导致另一种形式的密码子冗余，其中开放阅读框的改变并不导致所表达的蛋白质氨基酸残基的改变。本发明的范围还包括能改善表达抗体最终的物理性能的 DNA 序列或翻译抗体的突变。为此，本发明涉及 :(i) 13C3 样抗体的亲和力成熟型，包括但不限于抗体 13C3、19A6 和 1D1 和 / 或 (ii) 成熟型 13C3 样抗体，包括但不限于抗体 13C3、19A6 和 1D1，包括但不限于 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 区域发生一处或多处突变的抗体，该突变可通过已知的引入位点特异性突变的亲和力突变方法和重组 DNA 技术产生。这种分离或纯化核酸分子代表 13C3 样抗体的 VH 和 / 或 VL 部分。这些 核酸基本上不含其它核酸。对大多数克隆目的，核酸优选 DNA。这些 DNA 分子可能是亚克隆到表达载体，并随后转染到所选择的的宿主细胞，该宿主细胞能提供相当量抗体 13C3 样抗体生物学相关部分或其亲和力成熟型的宿主细胞。这种方法可用多种用途，诸如在能编码人 IgG 抗体的 CH 区和 CL 区的哺乳动物表达载体系统生产单链抗体或联合表达其 VH 和 VL 链。

[0102] 本发明还涉及含有编码 13C3 样抗体重链和 / 轻链区核酸分子的重组载体和重组宿主，既可以是原核的，也可以是真核的。这些核酸分子全部或部分可以与其他与其并非天然连接的 DNA 分子（即其中包含用于产生重组人抗体的免疫球蛋白基因的 DNA 分子）相连，形成编码各自的重组人抗体“重组 DNA 分子”。这些载体可能包括 DNA 或 RNA。大多数克隆优选 DNA 载体。典型的载体包括质粒、改造的病毒、噬菌体、粘粒、酵母人工染色体，其他游离态或其他型的 DNA 结合。本领域熟练技术人员可以确定用于特定的基因转移和产生重组人源抗体以及其他用途的载体。将目的核酸分子亚克隆到表达载体、转化或转染含有载体的宿主细胞的方法，以及得到大体纯化的蛋白质的方法，包括将各自表达载体引入宿主细胞以及在适当的条件下培养宿主细胞，都是众所周知的。可以用传统方式从宿主细胞收获所得到的抗体（如 IgG 重组人源抗体）。上述目的可使用任何已知的表达载体（包括含有启动子和其它适当的转录调控元件的任何载体）来实施。所得到的表达构建物转移到原核和真核宿主细胞生产重组蛋白。此处表达载体是指克隆 DNA 的转录以及其 mRNA 在合适的宿主中翻译所需的 DNA 序列。这种载体可以用来在多种宿

主中表达真核 DNA，诸如细菌、蓝藻、植物细胞、昆虫细胞和动物细胞。特别设计的载体允许 DNA 在宿主间如细菌 - 酵母或细菌 - 动物细胞之间穿梭。一个适当的基因表达载体中应包含：在用于宿主细胞中自主复制的复制起点、选择标记、有限数目的有用的限制性内切酶位点、产生高拷贝的能力和活跃的启动子。启动子是指引导 RNA 聚合酶与 DNA 结合并启动 RNA 的合成的 DNA 序列。强启动子是指能使 mRNAs 高频率启动的启动子。这些操作技术可见于 Sambrook 等著的书 (1989，Molecular Cloning.A Laboratory Manual；Cold SpringHarbor Laboratory，Cold Spring Harbor，New York)，该书是本领域的普通技术人员众所周知并且可以获得的。表达载体可包括但不限于克隆载体、经改造的克隆载体以及专门设计的质粒或病毒。商业可获得的哺乳动物表达载体可能是合适的，包括但不限于：pcDNA3.neo(Invitrogen 公司)、pcDNA3.1(Invitrogen)、pCI-neo(Promega)、pLITMUS28、pLITMUS29、pLITMUS38 和 pLITMUS39(New England Bioloabs)、pcDNAI、pcDNAIanp(Invitrogen)、pcDNA3(Invitrogen)、pMClneo(Stratagene)、pXT1(Stratagene)、pSG5(Stratagene)、EBOpSV2-neo(ATCC 37593)pBPV-1(8-2)(ATCC 37110)、pdBPV-MMTneo(342-12)(ATCC 37224)、pRSVgpt(ATCC 37199)、pRSVneo(ATCC 37198)、pSV2-dhfr(ATCC 37146)、pUCTag(ATCC 37460) 和 1ZD35(ATCC 37565)。同时，也可使用多种细菌表达载体，包括但不限于 pCR2.1(Invitrogen)、pET1 Ia(Novagen)、lambda gtl 1(Invitrogen) 和 pKK223-3(Pharmacia)。此外，还可使用多种真菌细胞表达载体，包括但不限于：pYES2(Invitrogen) 和毕赤酵母 Pichie 表达载体 (Invitrogen)。另外，昆虫细胞表达载体亦可使用，包括但不限于 pBlueBacIII 和 pBlueBacHis2(Invitrogen) 以及 pAcG2T(Pharmingen).

[0103] 重组宿主细胞可以是原核也可以是真核的，包括但不限于细菌诸如大肠杆菌，真菌诸如酵母，哺乳动物细胞，包括但不限于牛、猪、猴和啮齿动物来源的细胞系；和昆虫细胞。适合的哺乳动物细胞包括但不限于 L 细胞 L-M(TK-)(ATCCCCL1.3)、L 细胞 L-M(ATCCCCL 1.2)、Saos-2(ATCCHTB-85)、293(ATCCCRL1573)、Raji(ATCC CCL 86)、CV-I(ATCCCCL 70)、COS-I(ATCC CRL1650)、COS-7(ATCC CRL 1651)、CHO-K1(ATCC CCL 61)、3T3(ATCC CCL 92)、NIH/3T3(ATCC CRL 1658)、HeLa(ATCC CCL 2)、C127I(ATCC CRL1616)、BS-C-I(ATCC CCL 26)、MRC-5(ATCCCCL171) 和 CPAE(ATCC CCL 209)。

[0104] 然而，和上述重组抗体相比，另一个进步是完全的人源单克隆抗体的产生。首先涉及遗传工程小鼠品系的免疫系统能使鼠抗体基因失活，从而由功能性人类抗体基因取代，而保留小鼠免疫系统的其他部分不变。这种转基因小鼠允许天然体内免疫反应和亲和力成熟过程，从而产生高亲和性的完全人源单克隆抗体。这项技术也是目前本领域众所周知的，并在各种出版物中有详细描述，包括但不限于：美国专利号 5,939,598、6,075,181、6,114,598、6,150,584 及相关专利族 (Abgenix 发明并公开了其 XenoMouse 技术) 以及美国专利号 5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,789,650、5,877,397、5,661,016、5,814,318、5,874,299 和 5,770,429(在" UltraMab 人源抗体开发系统" 的保护下，由 Medarex 公司提供，转让给 GenPharm 国际公司，目前仍有效)；也可参见 Kellerman 和 Green 的综述 (2002，Curr.Opinion in Biotechnology 13：593-597)。

[0105] 最后，本领域熟练技术人员可获得的用富集技术从抗体库中选择抗体片段的技术，包括但不限于噬菌体展示技术，核糖体展示技术 (Hanes 和 Pluckthun，1997，Proc.Nat.

Acad. Sci. 94 :4937-4942)、细菌展示技术 (Georgiou 等,1997, Nature Biotechnology 15 : 29-34) 和 / 或酵母展示技术 (Kieke, 等人,1997, Protein Engineering 10 :1303-1310) 也可用于替代前述的能特异结合到靶细胞因子的选择单链抗体的可选择技术。单链抗体可从直接利用丝状噬菌体技术产生单链抗体库选择。噬菌体展示技术是本领域已知的 (如,见剑桥抗体技术公司 (CAT) 的技术),如公开于美国专利 5,565,332、5,733,743、5,871,907、5,872,215、5,885,793、5,962,255、6,140,471、6,225,447、6,291650、6,492,160、6,521,404、6,544,731、 6,555,313、6,582,915、6,593,081 以及有赖于在先申请的英国专利 EP920,6318(1992 年 5 月 24 日申请) 的其他同族的美国专利或申请 ;还可见于 Vaughn 等 (1996, NatureBiotechnology 14 :309-314)。单链抗体还可以利用现有的重组 DNA 技术,如 DNA 扩增的方法 (如 PCR) 技术,或可能通过使用各自的杂交瘤细胞作为模板 cDNA 来设计和构建。单链抗体可以是单功能或双功能的,可以使是二价的或四价的。编码的单链抗体的核苷酸序列可以使用手动或自动核苷酸合成来构建,使用标准的构建 DNA 重组方法克隆到一个表达构建物中并引入到细胞来表达的编码序列,如下所述。

[0106] 本发明还涉及到一个基于抗体的药物组合物,它包括有效量的 13C3 样抗体,或其亲和力成熟型,它提供了抑制与阿尔茨海默氏症有关纤维和 / 或老年斑的形成预防或治疗选择。本发明基于抗体的药物组合物可以根据本领域已知的方案制备 (如,可见于 McGoff 和 Scher,2000, Solution Formulation of Proteins/Peptides :In McNaIIy, E. J. , ed. ProteinFormulation and Delivery. New York, NY :Marcel Dekker ;pp. 139-158 ; Akers 和 Defilippis,2000, Peptides and Proteins as Parenteral Solutions. In : Pharmaceutical FormulationDevelopment of Peptides and Proteins. Philadelphia, PA :Talyor and Francis ;pp. 145-177 ;Akers 等,2002, Pharm. Biotechnol. 14 :41-121)。适合给病人用药的药学上可接受的组合物含有有效量的抗体,其处方既能使它保持生物活性,同时也能促进其在可接受的温度范围内存储时保持最大稳定性。根据处方需要,药物组合物还可以包括药学上可接受的稀释剂、载体和 / 或赋形剂,或任何上述制备给动物或人体用药的药物组合物常用的辅料。其中稀释剂选择不影响组合中生物活性的,例如蒸馏水、生理磷酸盐缓冲液,林格氏液、葡萄糖溶液和汉克氏液 (Hank′ s solution)。本发明的药物组合物或制剂中赋形剂的有效量,是能使抗体均匀分布在整个组合物中以便当其被递送需要它的主体时可以被均匀分散。这可能有助于稀释抗体的浓度,提供所需的有利的缓解或治疗结果,而同时尽量减少过高浓度的任何不利的副作用。它还可以具有防腐作用。因此,对于具有高生理活性抗体将使用较多的赋形剂。另一方面,对于任何表现较低生理活性一种或多种有效成份将使用较少的赋形剂。一般来说,辅料在总组合物中的量介于 50% 左右 (重量比) 和 99.9% (重量比)。如果抗体表现特别低的生理活性,辅料的量可以少至 1% (重量比)。另一方面,如果抗体表现特别高的生理活性,辅料的量可以是大约大约 98%～99% (重量比)。此外,一种或多种抗体可以以“化学衍生物形式”给药 (一种包含通常不属于基础分子一部分的更多的化学基团)。这样的基团,可能可以提高生物制剂的溶解度、半衰期、吸收性能等。此外,这些基团可以减轻抗体的不良副作用。药品组合物还可以包括大的、代谢缓慢的大分子诸如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸和共聚物 (如橡胶功能化琼脂糖凝胶 latex functionalized sepharose、琼脂糖、纤维素等)、聚合氨基酸、氨基酸共聚物、和聚合脂 (如油滴或脂质体)。此外,这些载体可以作为免疫刺激剂 (即佐剂)。对于

注射给药，本发明的药剂可以在一个生理可接受的稀释剂（该稀释剂可以是无菌液体，如水、油、盐、甘油或乙醇）与药物载体以可注射溶液或悬浮液制剂给药。此外，本发明的组合物中还可以存在辅助药物辅助物质，如湿润剂或乳化剂、表面活性剂、pH 值缓冲物质等。药物组合物的其他组成部分，是石油、动物、植物、或合成类的成分，例如，花生油、豆油和矿物油。一般来说，二醇如丙二醇或聚乙二醇是优选的液体载体，尤其对于注射液而言。

[0107] 该抗体制剂可以是液体或固体形式。固体制剂通常是冻干的，使用前制成单个或多个剂量的溶液。这种制剂不应暴露在极端温度或 pH 值，以避免热变性。因此，将本发明的抗体组合物制成生物相应的 pH 值范围非常重要。本发明给出一种在贮藏期间维持在适当的 pH 值范围的缓冲溶液中，特别是在制备和给药之间保存时间较长的液体制剂。迄今为止，液体和固体制剂都需要在较低温度下（通常是 2-8℃）贮存，以维持较长时期的稳定。配方抗体组合物，特别是液体制剂，可能包含一个抑菌剂，以防止或尽量减少贮藏期间蛋白水解，包括但不限于有效浓度（通常是＜ 1％ w/v）的苯甲醇、苯酚、间甲酚，三氯叔丁醇，尼泊金甲酯和 / 或尼泊金丙酯。抑菌剂可能是有些病人的禁忌。因此，冻干制剂可以在含有或不含有这种成分的溶液中再生。缓冲液态或固态抗体制剂中还可以加入其他成分，包括但不限于作为冻干保护剂的糖类（包括但不一定限于多羟基碳水化合物如山梨醇、甘露醇、甘油和半乳糖醇和 / 或双糖如蔗糖、乳糖、麦芽糖和海藻糖），在某些情况下，及其相应的盐（包括但不限于氯化钠、氯化钾或氯化锂）。这种抗体制剂，尤其是作长期储存的液体制剂，将依靠总渗透压在可用范围，既能提高 2-8℃或较高温度下长期稳定，又能保证制剂静脉注射可用。总渗透压的有效范围（在溶液中的分子总数）是从 200mOs/L 到大约 800mOs/L。很明显，冻干保护剂如蔗糖或山梨醇的量将取决于制剂的含盐量，以便总渗透压保持在适当范围。因此，无盐制剂可能包含约 5％至约 25％蔗糖，优选蔗糖的浓度为约 7％至 15％，无盐制剂中特别优选的蔗糖浓度是从大约 10％至 12％。或者，山梨醇为基础的无盐制剂可能包含约 3％至约 12％山梨醇，优选的山梨醇约 7％至 15％，无盐制剂中，特别优选的山梨醇是从大约 5％至 6％。无盐制剂当然需要增加各自的冻干保护剂的范围，以保持有效的渗透压水平。这些制剂还可以包含二价阳离子物质（包括但不限于氯化镁、氯化钙和氯化锰）和非离子表面活性剂（包括但不一定限于山梨醇酯 -80（吐温 80®）、聚山梨醇酯 -60（吐温 60®）、聚山梨醇酯 40（吐温 40®）和聚山梨醇酯 20（吐温 20®）、聚氧乙烯烷基醚，包括但不限于玻雷吉 58®(Brij 58®)，玻雷吉 35®(Brij 35®) 以及其他如曲通 -100®(Triton X-100 ®)、曲通 -114(Triton X 114®)、NP40 ®、Span85 和非离子表面活性剂普朗尼克系列（如聚醚 121））。任何这些组分的组合，包括可能的抑菌剂加入，都可能是本发明含抗体制剂的有益补充。本发明的抗体组合物还可以是“化学衍生物形式”，其描述了一种包含不是免疫球分子一部分的附加的化学基团（如聚乙二醇化抗体）的抗体。这样的基团可以提高基础分子的溶解度、半衰期、吸收性能等。此外，这些基团可以减轻抗体的不良副作用或降低基础分子的毒性。

[0108] 各种载体、稀释剂、赋形剂等的大量实例是本领域已知的并在本文通过引用而公开，以及 Remington’s Pharmaceutical Sciences(18th, edt:Mak Publish’s Company, Easton,Pa,1990)，其内容通过引用并入本文。简单来说，合适的载体、赋形剂和其他试剂都可并入本发明的组合物以提供更好的转移、递送、耐受等性能。并入生物试剂和 / 或其他一种或多种活性成分进入载体的方法是本领域普通技术人员众所周知的，并有赖于实施本发

明的人员所选择的生物制剂的性质和载体的性质。离子结合、凝胶包裹或载体内部物理捕获、将载体浸入生物制剂溶液中都是设想将药物组合物制备成用于实施上述的治疗方法合适的例子。另外，载体可以仅仅只是生物试剂的稀释剂。这些制剂可以包括，例如，粉末、膏、药膏、凝胶、蜡、油、油脂、无水吸收基、水包油或油包水乳液、聚乙二醇乳液（具有不同分子量聚乙二醇）、半固态凝胶、含聚乙二醇的半固体混合物。利用本发明的化合物的给药方案是多种因素选择的，包括类型、品种、年龄、体重、性别和病人的医疗状况、待处理病情的严重程度、给药途径、病人的肾，肝及心血管功能以及其采用特定生物制剂。具备普通技能的医生或兽医可以很容易地确定需要预防、对抗或阻碍疾病进展所需药量并给出处方。为了精确达到既能产生作用又不会产生毒性作用的药物浓度的范围，需要基于药物在靶位的药代动力学的处方。这涉及到药物的分布、平衡和消除的考虑。只要在制剂中的有效成份不被灭活并且该制剂生理相容，上述制剂都可作为适合的本发明的治疗和疗法。

[0109] 本发明的药物组合物可以以任何本领域现有的方式、策略和 / 或组合对宿主给药，其用量应足以提供对阿尔茨海默病的治疗。这些组合物可以按照现有技术已知的各种方式提供给个体，特别是肠道外方式，包括但不限于如静脉注射 (IV) 和肌肉注射 (IM) ；或皮下 (SC) 给药等肠道外方式，IV 注射是本领域治疗性抗体给药方式的常规方式。这些组合物可以以单一剂量或多个剂量给药（即在治疗方案中维持制剂的无菌状态）。利用本发明的化合物的给药方案是多种因素选择的，包括类型、品种、年龄、体重、性别和受试者（如患者）的医学状况、待处理病情的严重程度、给药途径、患者的肾，肝及心血管功能以及其所用的具体生物制剂。具备普通技能的医生或兽医可以很容易地确定需要预防、对抗或阻碍疾病进展所需药量并给出处方。为了精确达到既能产生作用又不会产生毒性作用的药 物浓度的范围，需要基于药物在靶位的药代动力学的处方。这涉及到药物的分布、平衡和消除的考虑。此处所述的抗体在适当的剂量可单独使用。另外，和其它制剂联合给药或顺序给药也是可取的。在本发明的抗体治疗方案的同时，给予其它预防或治疗方案也是可以的。有效的给药方案，将取决于多种因素，包括给药方式、靶位、患者的生理状态、患者是人或动物、其他用药，以及是否治疗预防或治疗性的等。对于 13C3 样抗体的给药，剂量范围约 0.0001 至 100 毫克 / 千克，更通常是 0.01 至 5 毫克 / 千克宿主体重。在阿尔茨海默病病例中，淀粉样蛋白沉积在大脑中出现，本发明的制剂也可以与其他能促进药物通过血脑屏障的制剂一起用药。

[0110] 另一个方面，关于本发明的 13C3 样抗体组合物的给药和剂量方案，涉及通过肠道外途径给药，包括但不限于非注射和注射装置。通常，注射用组合物制成液体溶液或悬浮液；也可制备成在注射前能溶解或悬浮于液态载体的固体形式。制剂也可乳化或在脂质体或微粒（如聚乳酸或聚羟基乙酸或如上所述的加强免疫佐剂作用的共聚物）包裹（见 Langer，1990，Science 249 :1527-1523 ;and Hanes，1997，Advanced Drug Delivery Reviews 28 :97-119）。本发明的试剂，可以长效注射剂形式或植入制剂形式给药，从而允许其活性成分持续或脉冲释放。

[0111] 具体实施例包括本文讨论的和本领域众所周知的乳酸 - 羟基乙酸共聚物 (PLGA) 微球，以及含聚（乙烯醋酸乙烯酯 ;PEVAc) 的聚合物为基础的非降解载体微球。此外，控释和抗体局部给药为基础的治疗产品见于综述 Grainger 等 .，2004，Expert Opin.Biol. Ther.4(7) :1029-1044)，在此以其全文并入本文作为参考。能包裹抗体的合适的微胶囊

还可以包括羟甲基纤维素或明胶微胶囊和由凝聚技术或界面聚合法制备的聚甲基丙烯酸甲酯微胶囊。见 PCT 公开文件 WO 99/24061，名称为" Method for Producing IGF-1 Sustained-ReleaseFormulations"，其中蛋白用 PLGA 微球包裹，在此以其全文并入本文作为参考。此外，也可以使用微乳液或胶体给药系统，如脂质体和白蛋白微球。其他的优选缓释组合物使用生物黏附剂将抗体保持在给药部位。如上所述，缓释制剂可以包括一个将抗体包埋其中的可生物降解的聚合物，它能提供非立即释放。此处描述的非注射的装置为"植入"、"药物贮库植入物"、"贮库植入物"、"非注射用贮库"之类的类似的术语。常用的贮库植入物可以包括，但不仅限于，固体生物降解和不可生物降解聚合物装置（如延长聚合物或同轴杆形装置），以及本领域已知的各种泵系统。注射装置分为 Bolus 氏注射器（注射药物后释放和分散）和仓库或贮库注射器，它们在注射部位提供储存库，允许生物剂能够随着时间的推移持续释放。贮库植入可以通过手术植入给药地点，以便提供一个充足的储存库，使抗体随着时间的推移长期释放。这种装置将能携带一定量的药物制剂，如在预选阶段治疗或 预防性治疗所需量的药物制剂。贮库植入还可以保护制剂在治疗期间不被机体活动降解（如蛋白酶）。正如本领域已知的，术语"缓释"，是指药物在一段长时间内逐步（连续或不连续）从聚合物基质中释放。无论使用何种具体装置，缓释 13C3 样抗体组合物将在局部产生生物有效的抗体浓度。一种或多种生物制剂的缓释，可以是一个、几天、一周或更长时间，但大多数一个月或以上，或最多 6 个月，因制剂不同而异。根据植入的特点，如多功能降解动力学，安全性和生物相容性，本领域已知的天然或合成聚合物可用于贮库植入。可以使用这些共聚物改变活性成分的药代动力学，屏蔽药物避免酶的攻击以及随着时间的推移在依附或注射部位的降解。本领域技术人员可以理解，本领域有大量教导掌握这些共聚物的性质，包括各自的生产工艺、催化剂使用以及缓释贮库植入物或贮库注射剂的最终分子量。天然聚合物包括但不限于蛋白质（如胶原蛋白、白蛋白或明胶）、多糖（纤维素、淀粉、海藻、甲壳素、壳聚糖、环糊精、葡聚糖和透明质酸）和脂类；可生物降解合成聚合物包括但不限于各种聚酯、L- 谷氨酸和 γ - 乙基 -L- 谷氨酸共聚物 (Sidman 等，1983，Biopolymers 22 :547-556)、聚乳酸 ([PLA]；美国专利 3,773,919 和欧洲专利 058,481)、乳酸 - 羟基乙酸共聚物 (PLGA) 如聚乳酸 - 乙醇酸共聚物（见，如美国专利 4,767,628 和 5,654,008)、聚羟基乙酸 (PG)、聚（α - 羟基酸）的聚乙二醇 (PEG) 配基、聚原酸酯、聚阿斯匹林、聚磷氮烯 (polyphosphagene)、吡咯烷酮、聚乙烯醇 (PVA)、接枝共聚物，聚乙二醇对苯二甲酸酯 - 聚对苯二甲酸丁二醇酯共聚物 (PEGT-PBT 共聚物（聚活性））、甲基丙烯酸酯、聚 (N- 异丙基丙烯酰胺）、聚氧乙烯 - 聚氧丙烯 - 聚氧乙烯嵌段共聚物 (PEO-PPO-PEO，pluronics)、聚氧乙烯 - 聚氧丙烯 - 聚丙烯酸共聚物 (PEO-PPO-PAA)、PLGA-PEO-PLGA、聚原酸酯 (POE) 或其任何组合，如上所述（见，例如美国专利 6,991,654 和美国专利申请 20050187631，每一项都并入本在整个参考）、水凝胶（见，例如，Langer 等，1981，J. Biomed. Mater. Res. 15 :167-277；Langer，1982，Chem. Tech. 12 :98-105，）、不可降解的乙烯醋酸乙烯酯（例如，乙烯醋酸乙烯酯磁盘和聚（乙烯乙酸乙烯酯））、可降解乳酸 - 羟基乙酸共聚物，如 Lupron Depot™、聚 D-(-)-3- 羟丁酸（欧洲专利 133,988)、透明质酸凝胶（见，如美国专利 4,636,524)、海藻酸悬浊液、聚原酸酯 (POE) 等等。自商业化的 Lupron Depot™ 于 1989 年作为第一个使用聚乳酸 (PLA) 的注射缓释制剂被批准以来，聚乳酸 (PLA) 及其与乙醇酸共聚物 (PLGA) 在本领域已是众所周知。使用 PLA 和 PLGA 作为赋形剂使得活性成分实现持续释放的产品的其

他例子包括 Atridox(PLA ;牙周疾病），Nutropin Depot(PLGA ;与生长激素）和 Trelstar Depot(PLGA ;前列腺癌）。其它合成聚合物，包括但不限于聚己内酯、聚 3- 羟基丁酸酯、聚（β - 苹果酸）和聚（二氧环己酮）、聚酐、聚氨酯（见 PCT 公开文件 WO 2005/013936)、聚酰胺、环状糊精、聚原酸酯、N- 乙烯基醇，聚环氧乙烷 / 聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚磷腈、多聚磷酸酯、聚膦酸、聚原酸酯、聚氰酯、聚乙二醇、聚二氢吡喃和聚甲醛。非生物降解设备包括但不限于各种纤维素衍生物（羧甲基纤维素，醋酸纤维素，醋酸纤维素酯，乙基纤维素，羟丙基甲基纤维素）基于硅的植入物（聚二甲基硅氧烷），丙烯酸聚合物（聚甲基丙烯酸酯，聚甲基丙烯酸甲酯、聚羟基（甲基丙烯酸乙酯）、乙酸乙烯酯与乙烯的共聚物、泊洛沙姆，聚乙烯吡咯烷酮，泊洛沙胺、聚丙烯、聚酰胺、聚甲醛、聚酯，聚乙烯三氟氯乙烯、聚四氟乙烯 (PTFE 或“特富龙™”)、丁苯橡胶、聚乙烯、聚丙烯、聚苯醚、聚苯乙烯、聚一氯对二甲苯、聚甲基戊烯、聚砜及其他相关生物稳定性的聚合物。适合缓释制剂贮库的载体包括但不限于微球、膜、胶囊、颗粒、凝胶剂、涂料、基质和薄片、丸剂或其他药物递送组合物。这种缓释制剂的例子如上所述，还可见于美国专利 6,953,593、6,946,146、6,656,508、6,541,033 和 6,451,346，上述专利各自内容在此并入本文作为参考。该剂型必须能够携带足够预选的治疗期间所需量和浓度的药物制剂，并且能保护制剂在治疗阶段不被降解。例如，剂型可以由在外部制造的材料包裹，该材料具有保护制剂不被代谢过程降解以及避免出现渗漏，开裂，破损，或扭曲等风险。这可以防止其在使用过程中以不可控制方式受到压力对剂型含物的压榨，上述压力可以是如施加到药物释放装置上导致患者正常的关节衔接或其他运动的物理力或在连接给药装置中与贮库内产生的压力相关的物理力。用于持有或承载该药物的药物贮库或其它装置还必须是能避免与活性剂配方发生意外作用的材料，优选生物相容性材料（例如，该剂型的植入，基本上不与主体的机体或体液发生反应）。一般来说，各有关一种或多种生物剂对个体的给药，至少 12 小时到至少一个星期，很有可能通过一个旨在提供至少 10 天、20 天、30 天或 100 天，或者根据需要至少 4 个月，或者至少 6 个月以上的植入物给药。13C3 样抗体可以在相当低体积速率下给药，例如，从大约 0.001 毫升 / 天至 1 毫升 / 天，以减少制剂释放部位或附件部位组织的干扰或创伤。本制剂可以以低速率释放，取决于具体的一种或多种生物制剂，例如，从大约 0.01 微克 / 小时或 0.1 微克 / 小时，0.25 微克 / 小时，1 微克 / 小时，通常可达 200 微克 / 小时，或制剂以低体积速率释放，例如，容积率从大约 0.001 毫升 / 天至约 1 毫升 / 天，例如，每天 0.01 微克至 20 毫克。剂量取决于许多因素，如效用，生物利用度和所用活性成分（例如，IgG 抗体）的毒性和主体的需求等。

[0112] 在阅读完下述的方法学和组合物的细节之后，本发明的这些和其它目的、优势和特征对于本领域的熟练技术人员来讲将是显而易见的。

[0113] 实施例

[0114] 实施例 1 ：初原纤维形式 β - 淀粉样蛋白 (Aβ 42) 的制备

[0115] Aβ 42 合成肽 (American Peptide Company, Inc., CA) 根据 Fezoui 等 (Fezoui 等人 . Amyloid 7(3) :166-178. (2000)) 描述的方法制备。简单地说，冻干 Aβ 42 用 2mM NaOH 溶解 (1mg/ml，pH ～ 10.5)、超声处理，然后冷冻干燥。NaOH 处理的 Aβ 用水溶解制成浓度为 1mg/ml 的溶液，用 0.22μm ULTRAFREE-MC 过滤装置 (Millipore，MA) 过滤。0.5mg/ml 肽溶液溶解在终浓度为 50mM 磷酸，100mM 氯化钠的缓冲液 (PBS) 中，室温孵育 4 小时。采用体积排阻色谱 (SEC) 分级上清液，将初原纤维形式从低分子量蛋白中分离出来。纯化的

SEC 组分在 4℃保存。

[0116] 各种形态的 Aβ42 蛋白表现为作为单体或二聚体关联在一起形成高分子量寡聚体（初原纤维）的能力（图 1）。可溶性初原纤维的进一步聚集产生不溶型蛋白，而初原纤维可以解离恢复成低分子量形式。

[0117] 为了从低分子量蛋白中纯化初原纤维形式 Aβ 蛋白，样品经采用 Superdex 75 体积排阻色谱柱的 AKTA 层析系统分级。图 2A 显示，未与 Aβ42 合成肽室温孵育的情况下，没有寡聚体聚集形成初原纤维。图 2B 表明，与 Aβ42 合成肽室温孵育 4 小时，随后 SEC 纯化显示确有初原纤维组分。

[0118] 实施例 2：具有初原纤维形式 Aβ 特异性的单克隆抗体的制备

[0119] 采用现有技术已知的方法，通过用初原纤维形式 Aβ 蛋白免疫 Balb/c 小鼠制备抗体 13C3、19A6 和 1D1(Harlow 等，Cold Spring Harbor Laboratory.(1988))。脾脏被切除并在几个 96 孔板中与 SP2 骨髓瘤细胞融合。监测融合培养的生长，用抗体捕获免疫法筛选上清液与初原纤维形式 Aβ 结合的能力。

[0120] 实施例 3：具有初原纤维形式 Aβ 特异性的单克隆抗体的表征

[0121] 采用抗体捕获法进一步表征杂交瘤产生的单克隆抗体 (13C3、19A6 和 1D1)。向微孔板的每个孔中加入 50μl 2μg/ml 的初原纤维形式 Aβ42 蛋白溶液，在 4℃下孵育微孔板过夜。孵育后，去除残余抗原溶液并用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗。将梯度稀释的杂交瘤上清液加入到含有结合抗原的微孔板中，室温孵育 1 小时。去除一级抗体溶液，再次用磷酸盐缓冲溶液冲洗。然后加入酶标二级抗体，室温孵育 1 小时。去除二级抗体溶液后，在反应中加入结合酶的特异性显色底物，检测捕获抗体，得到定量结果。

[0122] 另外，将二级试剂换成同种型特异性抗免疫球蛋白抗体，鉴定每种具体同种型单克隆抗体。在此实验中，采用了商业化抗 Aβ42 抗体用来对比抗体 13C3、19A6 和 1D1 结合特异性。

[0123] 图 3A 和 3B 显示了用于在抗体捕获免疫测定中检测 13C3 抗体特异性的初原纤维形式的 (PF) 和低分子量形式的 (LMW)Aβ42 肽。具体而言，图 3A 显示根据 ELISA 实验绘制的图，表明 13C3 抗体对初原纤维形式的 (PF)Aβ42 具有特异性，而不能识别低分子量形式的 (LMW)Aβ42 蛋白。图 3B 显示商业化抗体 4G8 的 ELISA 数据，表明它既能识别初原纤维形式 Aβ42，也能识别低分子量形式 Aβ42 蛋白。

[0124] 实施例 4：采用表面等离子共振 (BIACORE) 法证明单克隆抗体对初原纤维形式 (PF)Aβ42 蛋白的特异性

[0125] 按照公开的方法将纯化的单克隆抗体（如下见表 1 所列）固定在 BIACORE 传感器芯片上 (Nice 等 .BioEssays 21：339-352(1999))。BIAcore 光学反应的高度敏感性能定量反射量的变化，生成单独配基的基础反应。当分析物、初原纤维形式 (PF) 和低分子量形式 (LMW)Aβ42 肽注入到传感器芯片上的溶液中时进行反应分析，表面等离子共振的变化产生反应鉴定每种抗体结合 LMW 形式 Aβ42 和 PF 形式 Aβ42 的能力。抗体 13C3 和 19A6 都能与 PF 形式 Aβ42 高特异性结合，而不是 LMW 形式的 Aβ42。本实验所用的所有抗体中，PF 结合力 /LMW 结合力之比显示，对于 LMW Aβ42，商业化抗体对 PF 形式的 Aβ42 表现出较高的特异性。

[0126] 表 1

[0127]

抗体名称	表位	同种型	来源	BIACORE 结合分析		
				LMW	PF	比例 (PF/ LMW)
1D1	结构	IgG1	Ravetech	23.2	122.2	5.3
13C3	结构	IgG1	Ravetech	25	124.8	5.0
19A6	结构	IgG3	Ravetech			
3D6	Aβ1-5	IgG2b	Elan 药业	424.6	402.7	0.9
4G8	Aβ17-22	IgG2b	Senetek 公司	228.6	340.3	1.5
6E10	Aβ3-8	IgG2b	Senetek 公司	400.1	541.1	1.4
82E1	Aβ1-17	IgG1	IBL	69.9	68.4	1.0

[0128] 表面等离子共振分析感应图显示，抗体 13C3（图 4B）不与 LMW 形式的 Aβ42 蛋白结合。而抗体 4G8（图 4A）对 LMW Aβ42 表现出标准的结合 / 解离曲线。同种型抗体对照 IgG1（图 C）同样不和 LMW 形式的 Aβ42 结合。在这些实验中使用了采用表面等离子体共振原理的自动化 BIAcore 系统。抗体 19A6 的结合特异性数据显示，抗体 19A6 的结合率是 5.8，和抗体 13C3 的结合率 (5.3) 相似。

[0129] 实施例 5 ：抗体 13C3 的抗原表位分析

[0130] 按照公开的方法 (Korth 等 390 ：74(1997)) 采用 RepliTope Microarrays(JPT PeptideTechnologies GmbH) 系统定位抗体 13C3、1D1 和 19A6 的表位。微阵列上的每个点都含有一个 13 个氨基酸的 Aβ42 肽，其中微阵列的每个位移都代表氨基酸的位移（从氨基末端到羧基末端），即序列 SEQ ID NO ：23，SEQ ID NO ：24...SEQ ID NO ：51 和 SEQ ID NO ：52。以下是根据其在载片列阵上的位置列出的肽及其确切的氨基酸序列。一旦上述肽固定在 RepliTope Microarray 上，就用抗体 13C3 孵育样品，随后用结合了化学荧光标签的二级抗体标记。产生信号的点代表其结合位点被抗体结合的蛋白上的表位。

[0131] Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr GIu Val His(SEQ ID NO ：23)

[0132] Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His(SEQ ID NO ：24)

[0133] Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln(SEQ ID NO ：25)

[0134] Phe Arg His Asp Ser GIy Tyr Glu Val His His Gln Lys(SEQ ID NO ：26)

[0135] Arg His Asp Ser Gly Tyr GIu Val His His Gln Lys Leu(SEQ ID NO ：27)

[0136] His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val(SEQ ID NO ：28)

[0137] Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe(SEQ ID NO ：29)

[0138] Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe(SEQ ID NO ：30)

[0139] Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala(SEQ ID NO ：31)

[0140] Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu(SEQ ID NO ：32)

[0141] Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp(SEQ ID NO ：33)

[0142] Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala GIu Asp Val(SEQ ID NO ：34)

[0143] His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly(SEQ ID NO:35)

[0144] His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser(SEQ ID NO:36)

[0145] Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala GIu Asp Val Gly Ser Asn(SEQ ID NO:37)

[0146] Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys(SEQ ID NO:38)

[0147] Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly(SEQ ID NO:39)

[0148] Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala(SEQ ID NO:40)

[0149] Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala He(SEQ ID NO:41)

[0150] Phe Ala Glu Asp Val GIy Ser Asn Lys Gly Ala He He(SEQ ID NO:42)

[0151] Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala He He Gly(SEQ ID NO:43)

[0152] Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala He He Gly Leu(SEQ ID NO:44)

[0153] Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala He He Gly Leu Met(SEQ ID NO:45)

[0154] Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala He He Gly Leu Met Val(SEQ ID NO:46)

[0155] Gly Ser Asn Lys Gly Ala He He Gly Leu Met Val Gly(SEQ ID NO:47)

[0156] Ser Asn Lys Gly Ala He He Gly Leu Met Val Gly Gly(SEQ ID NO:48)

[0157] Asn Lys Gly Ala He He Gly Leu Met Val Gly Gly Val(SEQ ID NO:49)

[0158] Lys Gly Ala He He Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val(SEQ ID NO:50)

[0159] Gly Ala He He Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val He(SEQ ID NO:51)

[0160] Ala He He Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val He Ala(SEQ ID NO:52)

[0161] 图 5A 显示了鉴定抗体 13C3、1D1 和 4G8 在 Aβ1-42 肽上的表位的 RepliTopeMicroarray 实验的斑点印迹。结合抗体用化学荧光信号表示。图 5B 是 Aβ1-42 的氨基酸序列，显示了抗体 13C3 表位在序列中的肽片段。1D1 显示与 13C13 相同的表位，而商业化抗体 4G8 则识别不同的表位。

[0162] 实施例 6：抗体 13C3 特异性的表征

[0163] 图 6 显示 7PA2 细胞系、分泌型 Aβ 寡聚细胞系上清液的体积排阻层析组分。采用抗体捕获法进一步表征抗体 13C3 与 SEC 纯化 7PA2 初原纤维形式的组分和低分子量形式的组分的结合。将 100μl 1 ： 200 稀释的每种组分加入到微孔板的每个孔中，在 4℃孵育过夜。孵育后，去除残余抗原溶液，用 PBS 溶液冲洗。向含有结合抗原的微孔板中加入梯度稀释的抗体 13C3 上清液，室温孵育 1 小时。去除一级抗体溶液，再次用 PBS 溶液冲洗。然后加入酶标二级抗体，室温孵育 1 小时。去除二级抗体溶液后，反应中加入结合酶特异性发色底物，测定捕获抗体，得到定量结果。本方法鉴定了抗体 13C3 只能特异性识别初原纤维形式的组分，而抗体 4G8 能识别所有组分。7PA2 细胞系由哈佛医学院 Dennis J.Selkoe,M.D. 提供。

[0164] 实施例 7：用电子显微镜 EM 表征抗体 13C3 反应

[0165] 采用标准方法进行染色 (Brenner 等 .Biochim.Biophys.Ada 34, 103-110(1959))。将少量 (10μl)0.2mg/ml 初原纤维形式的 Aβ 溶液加入碳包聚乙烯醇缩甲醛网格 (400 目)，保持 2 分钟。然后用 1％ BSA 封闭网格，用抗体 13C3 孵育之后用结合了胶体金偶联二级抗体孵育。样品放在连续两滴 2％磷钨酸中负染，每次 30 秒。用滤纸吸干多余染料，空气干燥网格，在 JEOL 100CX 透射显微镜下观察 (80kV)。用柯达 4489 大幅面底片记录图片，用平床扫描仪进行数字化分析。

[0166] IEM(免疫电子显微镜)图片表明,抗Aβ抗体克隆13C3对Aβ42纤维具有结合特异性(图7B和7C),而同种型对照抗体IgG1则显示没有结合(图7A)。二级抗体用胶体金颗粒偶联。

[0167] 实施例8:用抗体13C3治疗人阿尔茨海默病的小鼠模型

[0168] 使用单克隆抗体13C3治疗阿尔茨海默病TgCRND8小鼠模型的Aβ斑块。小鼠含有人APP695 cDNA转基因(这会加速Aβ淀粉样斑块在小鼠大脑内的沉积),1月龄内显现。实验组(5只)TgCRND8小鼠(5周龄),每周给单克隆抗体13C3(浓度为10mg/kg),持续七周。第二组TgCRND8小鼠(5只)给同型IgG1抗体同样疗程。重复实验,不过治疗改为每周两次而不是一次。

[0169] 12周龄时处死实验组及对照组小鼠。大脑的组织学分析表明抗体13C3治疗组小鼠大脑内Aβ斑块减少。

[0170] 制备用单克隆抗体13C3和IgG1治疗的TgCRND8小鼠冷冻大脑组织连续切片。图8A和8B显示各组抗体中Aβ斑块的数目差异。

[0171] 统计学T-检验表明,每周一次单克隆抗体13C3治疗能减少阿尔茨海默病小鼠模型的Aβ斑块(图9A)。然而,每周两次治疗斑块减少水平相同(图9B)。

[0172] 上述TgCRND8小鼠均得自多伦多大学David Westaway博士。

[0173] 实施例9:单克隆抗体13C3可变区的分子表征

[0174] 从杂交瘤13C3克隆了IgG重链可变区和IgG Kappa轻链区。重链和轻链序列(图10)都用VBASE2(http://www.vbase2.org)分析,VBASE2是来自人和小鼠免疫球蛋白基因座种系可变区基因数据库,是从欧洲分子生物研究室数据库(EMBL-Bank)和Ensembl数据库中抽取出来的(Retter等.Nucleic Acids Res.33:D671-4(2005))。结果分析识别出了重链和轻链可变区来自一种新鉴定的免疫球蛋白,但和数据库中其他免疫球蛋白可变区分别具有73%和81%的一致性。另外通过对比数据库,还确定了序列中的框架区(FWR)和互补决定区(CDR)。这些序列用VBASE,KABAT和IMGT/LIGM数据库进行分析时结果只是略有变化。

[0175] 实施例10:急性外周给予APP转基因小鼠抗体13C3不会像给予对照抗体3D6那样引起血浆Aβ增加

[0176] APP转基因小鼠(Thy APPSL,10-14周龄)腹腔内注射10mg/kg(即,300μg每只鼠)抗体13C3,对照抗体IgG1(DM4,不能识别Aβ)以及参考抗Aβ抗体3D6(能识别所有Aβ构象异构体)。在注射前(0时)、注射后6小时,24小时和7天在同一只小鼠进行血浆Aβ的定量。采用不会干扰抗体13C3或抗体3D6与Aβ结合的抗Aβ抗体对进行血浆Aβ的定量。

[0177] 注射抗体3D6(能抗所有Aβ肽构象异构体)后,导致血浆中Aβ肽大大增加,可能是因为其可以保护Aβ分子不被降解。这种作用可用于解释作为抗Aβ免疫治疗机制的"外周下沉"假说(Dematteos等人,2001,PNAS 17:8850)。和抗体3D6不同,注射抗体13C3后,不会引起血浆Aβ水平的任何提高。这与抗体13C3的特性是一致的,抗体13C3对初原纤维形式的Aβ肽具有特异性,但不能识别可溶性单体或寡聚体形式的Aβ肽。而血浆里存在的很可能是这些形式的Aβ。

[0178] 实施例11:抗体13C3能识别阿尔茨海默病AD大脑中的人淀粉样神经炎斑(聚集

的）而不像参照抗 Aβ 抗体 3D6 那样识别弥散的 Aβ 沉积

[0179] 采用标准技术对诊断的阿尔茨海默病人大脑切片用抗体 13C3 和 3D6 进行研究。抗体免疫染色用 DAB 色原检测（图 12）。抗体 13C3 标记具有典型的成熟淀粉神经炎斑形态的淀粉样蛋白沉积（也称为高密度斑块），它是围绕有浅晕的非常密集的核或染色很强的更大斑块。在相邻的大脑部分，在低倍率下，抗体 3D6 比 13C3 染色更多对象（图 12，左图）。高倍率下的进一步鉴定（图 12，右图）显示抗体 3D6 除了和抗体 13C3 一样标记相同的成熟淀粉神经炎斑外，还标记大量弥散的淀粉样沉积（正如通常采用抗 Aβ 免疫标记所描述）。弥散斑块并不像文献描述的那样具有纤维性质，因为它们不能用硫代黄素 S 和其他纤维的组织学标志物检测 (Mann，1989，Ann. Med. 21 :133)。为了排除这两种抗体敏感性的差别，在 (20μg/ml) 高浓度下的抗体 13C3 进行了类似实验，依然没有检测到弥散性沉积。该数据与抗体 13C3 特异性是一致的，即抗体 13C3 特异性结合初原纤维形式的 Aβ 肽而不象抗体 3D6 那样识别可溶性单体形式或二聚体形式的 Aβ 肽。

[0180] 工业实用性

[0181] 本发明可用于治疗和诊断阿尔茨海默病。

[0182] 本文中引用的所有文献，包括专利和非专利的文献，其代表着本发明所属领域技术人员的技术水平。上述所有文献所引用的整个内容完全被并入本文供参考，其引用程度如同每个专利的和非专利的文献以参考其全文的方式并入本文。

[0183] 另外，尽管在此以参考具体实施例和实施方式来描述本发明，应理解为这些实施例和实施方式仅仅是本发明的原理和应用的例证。因此，应理解可以对于示例性的实施方式进行的大量变化，并且可以设计其他的措施而不偏离本文权利要求所限定的本发明的主旨和范围。

序列表

<110> 洛克菲勒大学

<120> 初原纤维形式 β-淀粉样蛋白的特异性抗体

<130>BYUS1003

<140>N/A
<141>2008-11-14

<150>60/988,481
<151>2007-11-16

<150>61/019,747
<151>2008-01-08

<160>52

<170>PatentIn version 3.5

<210>1
<211>42
<212>PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>1

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
1				5				10					15		
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
			20					25				30			
Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala						
		35					40								

<210>2
<211>20
<212>PRT
<213> 智人

<400>2
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15
Leu Val Phe Phe
20

<210>3
<211>9
<212>PRT
<213> 智人

<400>3
Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
1 5

<210>4
<211>12
<212>PRT
<213> 智人

<400>4
Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
1 5 10

<210>5
<211>113
<212>PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400>5
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 Gly Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser 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 Asn
85 90 95
Thr Phe Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210>6
<211>339
<212>DNA
<213> 小鼠

<400>6
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctggtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct atacagtttc caaccgattt 180
tctggggtcc cggacaggtt cagtggcagt ggatcagggt cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaaatac atttgttcct 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg 339

<210>7
<211>115
<212>PRT
<213> 小鼠

<400>7
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asp Asp Gly Tyr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser
115

<210>8
<211>345
<212>DNA
<213> 小鼠

<400>8
caggtccagc tgcagcagtc tgggcctgag ctggtgaggc ctggggtctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg gttccggcta cacattcact gattatgcta tgcactgggt gaagcagagt 120
catgcaaaga gtctagagtg gattggagtt attagtacta agtatggtaa gacaaactac 180
aaccagaagt ttaagggcaa ggccacaatg actgttgaca aatcctccag cacagcctat 240
atggagcttg ccagattgac atctgaggat tctgccatct attactgtgc aagaggggac 300
gatggttatt cctggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctca 345

<210>9
<211>26
<212>PRT
<213> 小鼠
<400>9
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 Gly
20 25

<210>10
<211>17
<212>PRT
<213> 小鼠

<400>10
Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10 15
Tyr

<210>11
<211>36

<212>PRT
<213> 小鼠

<400>11
Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
Ser Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
20 25 30
Val Tyr Phe Cys
35

<210>12
<211>11
<212>PRT
<213> 小鼠
<400>12
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210>13
<211>11
<212>PRT
<213> 小鼠

<400>13
Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210>14
<211>3
<212>PRT
<213> 小鼠

<400>14
Thr Val Ser
1

<210>15
<211>9

<212>PRT
<213> 小鼠

<400>15
Ser Gln Asn Thr Phe Val Pro Trp Thr
1 5

<210>16
<211>23
<212>PRT
<213> 小鼠

<400>16
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
20

<210>17
<211>17
<212>PRT
<213> 小鼠

<400>17
Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15
Val

<210>18
<211>31
<212>PRT
<213> 人工 (Artificial)

<220>
<223> 分离的 13C3 或 13C3 样抗体的重链可变区

<400>18
Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
1 5 10 15

Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210>19
<211>11
<212>PRT
<213> 小鼠

<400>19
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210>20
<211>10
<212>PRT
<213> 小鼠

<400>20
Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala
1 5 10

<210>21
<211>17
<212>PRT
<213> 小鼠

<400>21
Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
1 5 10 15
Lys

<210>22
<211>6
<212>PRT
<213> 小鼠

<400>22
Gly Asp Asp Gly Tyr Ser
1 5

<210>23
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>23
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His
1 5 10

<210>24
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>24
Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His
1 5 10

<210>25
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>25
Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln
1 5 10

<210>26
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>26
Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10

<210>27
<211>13

<212>PRT
<213> 智人）

<400>27
Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
<210>32
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>32
Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu
1 5 10

<210>33
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>33
Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5 10

<210>34
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>34
Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5 10

<210>35
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>35
His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly

1 5 10

1 5 10

<210>28

<211>13

<212>PRT

<213> 智人

<400>28

His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val

1 5 10

<210>29

<211>13

<212>PRT

<213> 智人

<400>29

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

1 5 10

<210>30

<211>13

<212>PRT

<213> 智人

<400>30

Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe

1 5 10

<210>31

<211>13

<212>PRT

<213> 智人

<400>31

Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala

1 5 10

<210>36

<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>36
His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
1 5 10

<210>37
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>37
Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn
1 5 10

<210>38
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>38
Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
1 5 10

<210>39
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>39
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly
1 5 10
<210>40
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>40
Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala
1 5 10

<210>41
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>41
Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile
1 5 10

<210>42
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>42
Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
1 5 10

<210>43
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>43
Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
1 5 10

<210>44
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>44
Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu
1 5 10

<210>45
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>45
Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met
1 5 10

<210>46
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>46
Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val
1 5 10

<210>47
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>47
Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly
1 5 10

<210>48
<211>13
<212>PRT
<213> 智人
<400>48
Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly
1 5 10

<210>49
<211>13
<212>PRT

<213> 智人

<400>49
Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val
1 5 10

<210>50
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>50
Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Gly Gly Gly Val Val
1 5 10

<210>51
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>51
Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile
1 5 10

<210>52
<211>13
<212>PRT
<213> 智人

<400>52
Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
1 5 10

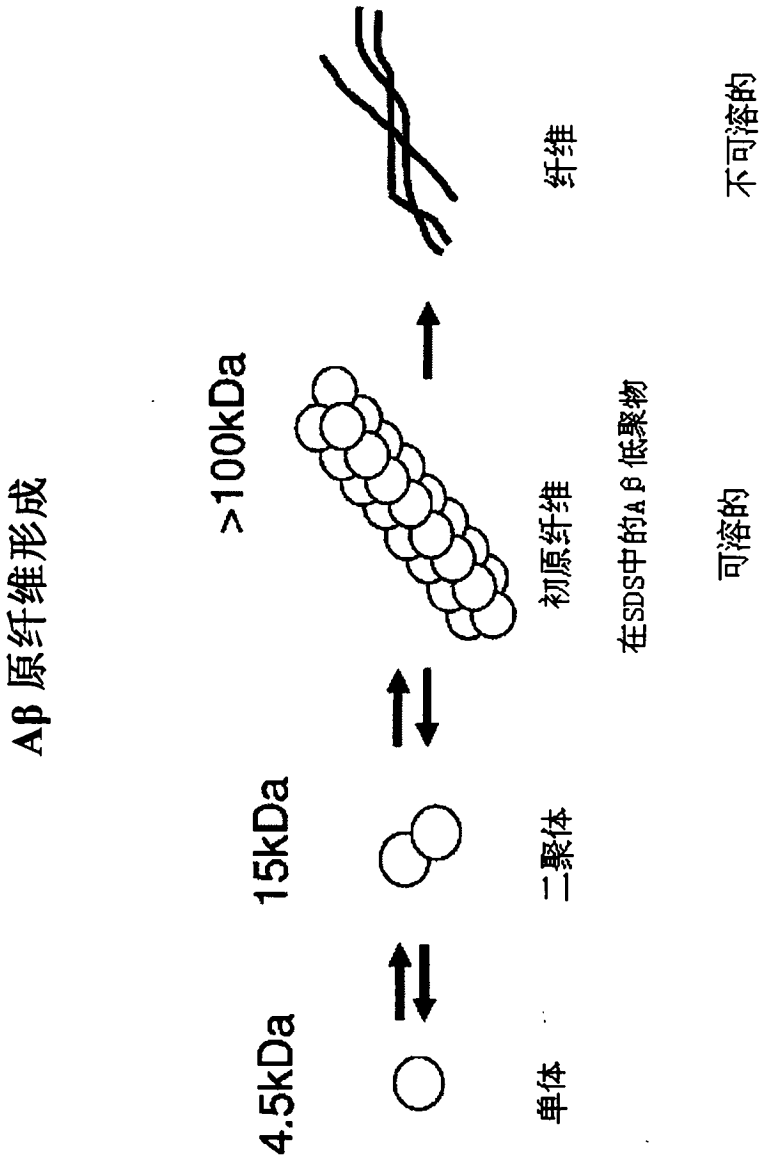

Aβ 原纤维形成
4.5kDa
15kDa
>100kDa
单体
二聚体
初原纤维
纤维
在SDS中的Aβ低聚物
可溶的
不可溶的

图 1

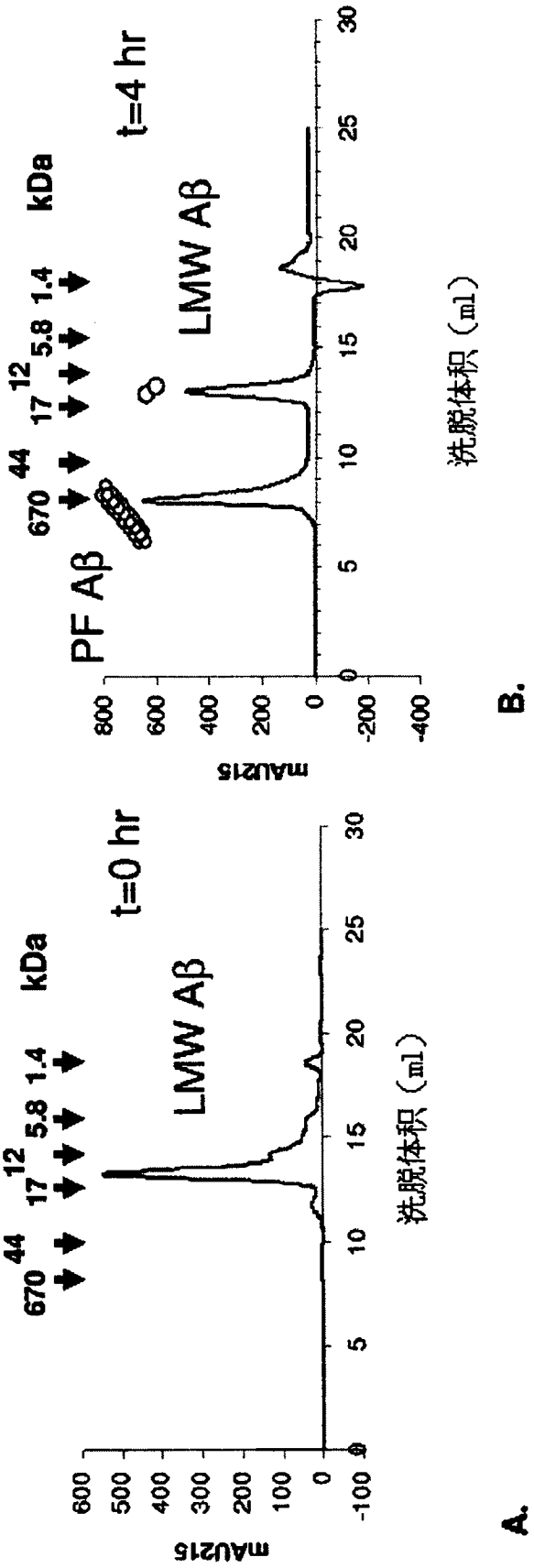

B.
t=4 hr
kDa
670 44 17 12 5.8 1.4
PF Aβ
LMW Aβ
mAU215
洗脱体积（ml）
A.
t=0 hr
kDa
670 44 17 12 5.8 1.4
LMW Aβ
mAU215
洗脱体积（ml）

图 2

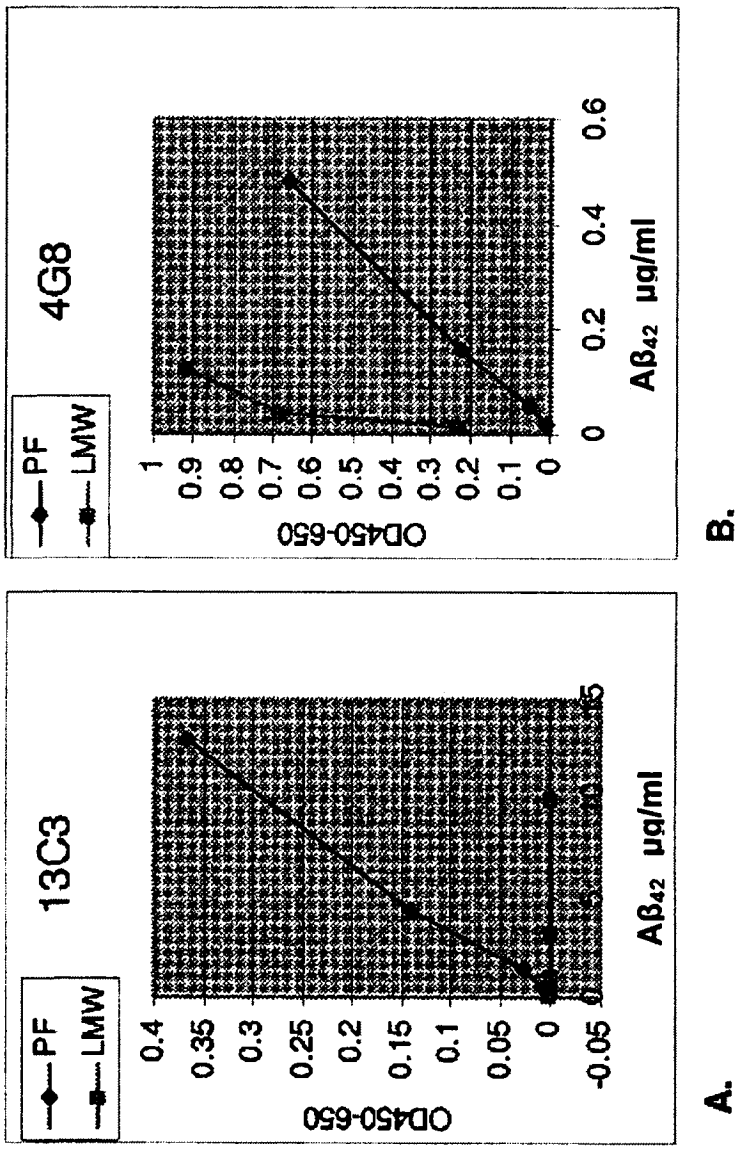

4G8
PF
LMW
OD450-650
Aβ42 µg/ml
B.
13C3
PF
LMW
OD450-650
Aβ42 µg/ml
A.

图 3

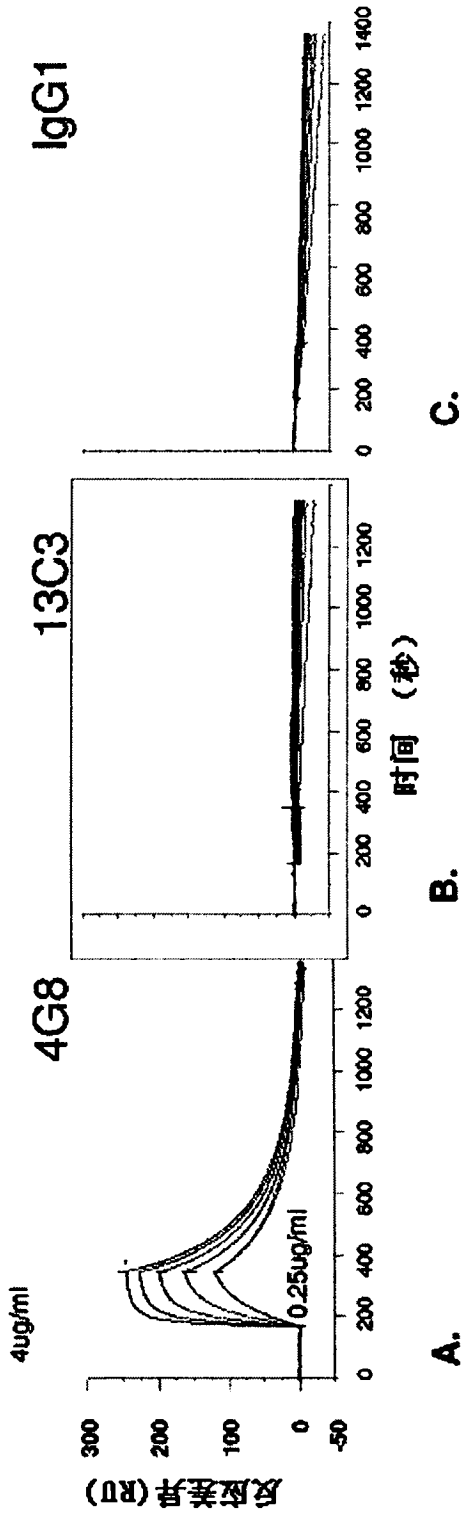

4G8
13C3
IgG1
A.
B.
C.
4ug/ml
0.25ug/ml
反应差异(RU)
时间（秒）
300
200
100
0
-50
0
200
400
600
800
1000
1200
1400

图 4

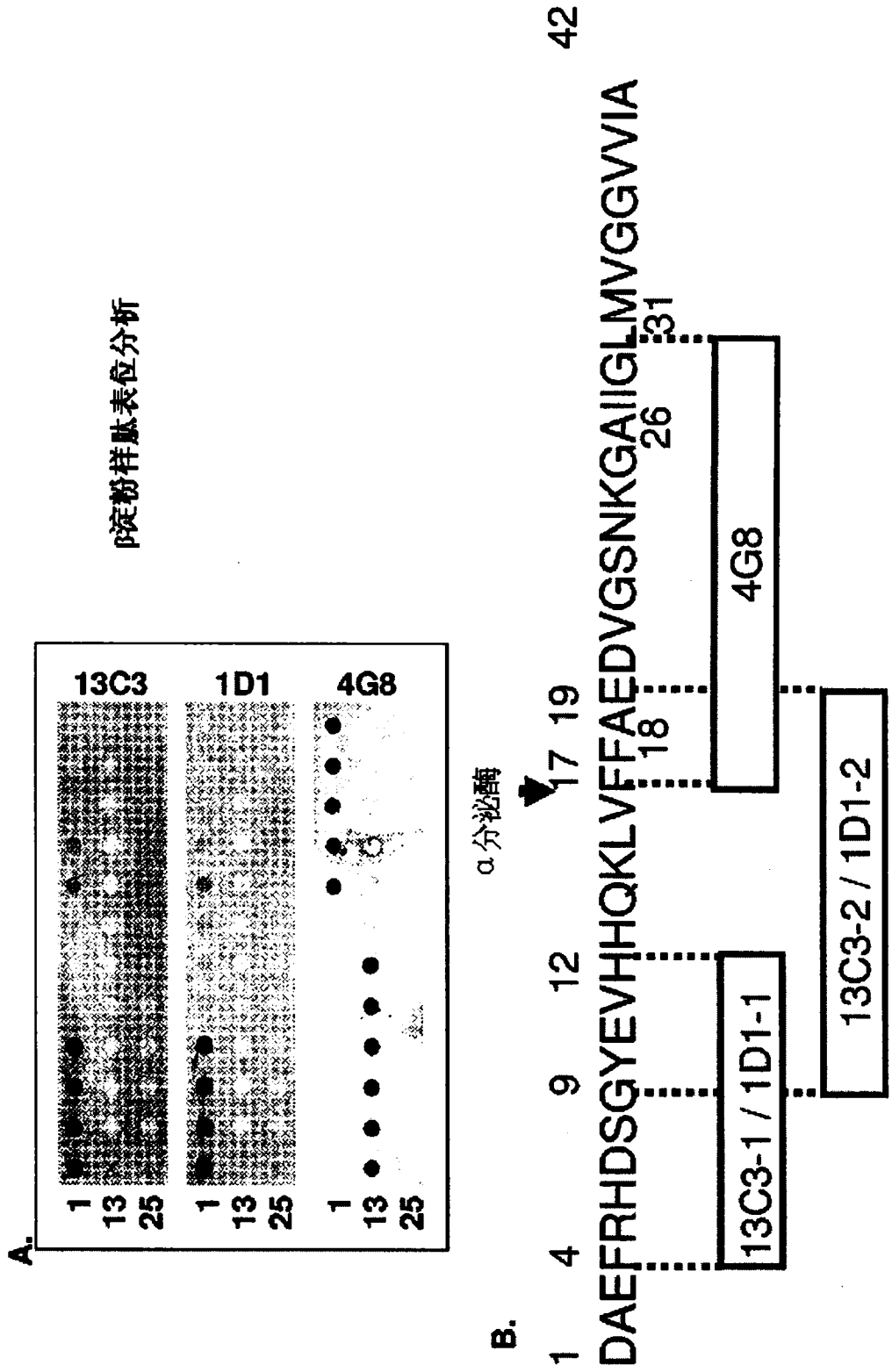

A.
β淀粉样肽表位分析
13C3
1D1
4G8
1
13
25
B.
α分泌酶
1 4 9 12 17 19 18 26 31 42
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
13C3-1 / 1D1-1
13C3-2 / 1D1-2
4G8

图 5

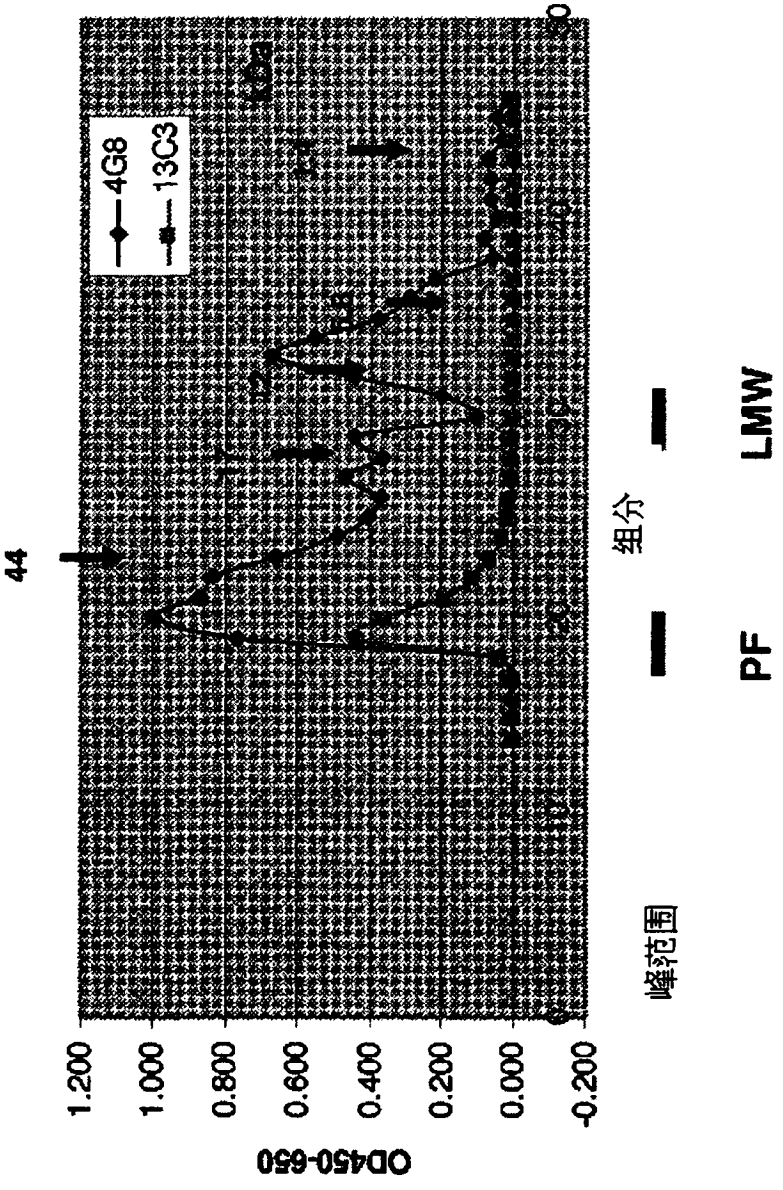

4G8
13C3
44
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
-0.200
OD450-650
峰范围
组分
PF
LMW

图 6

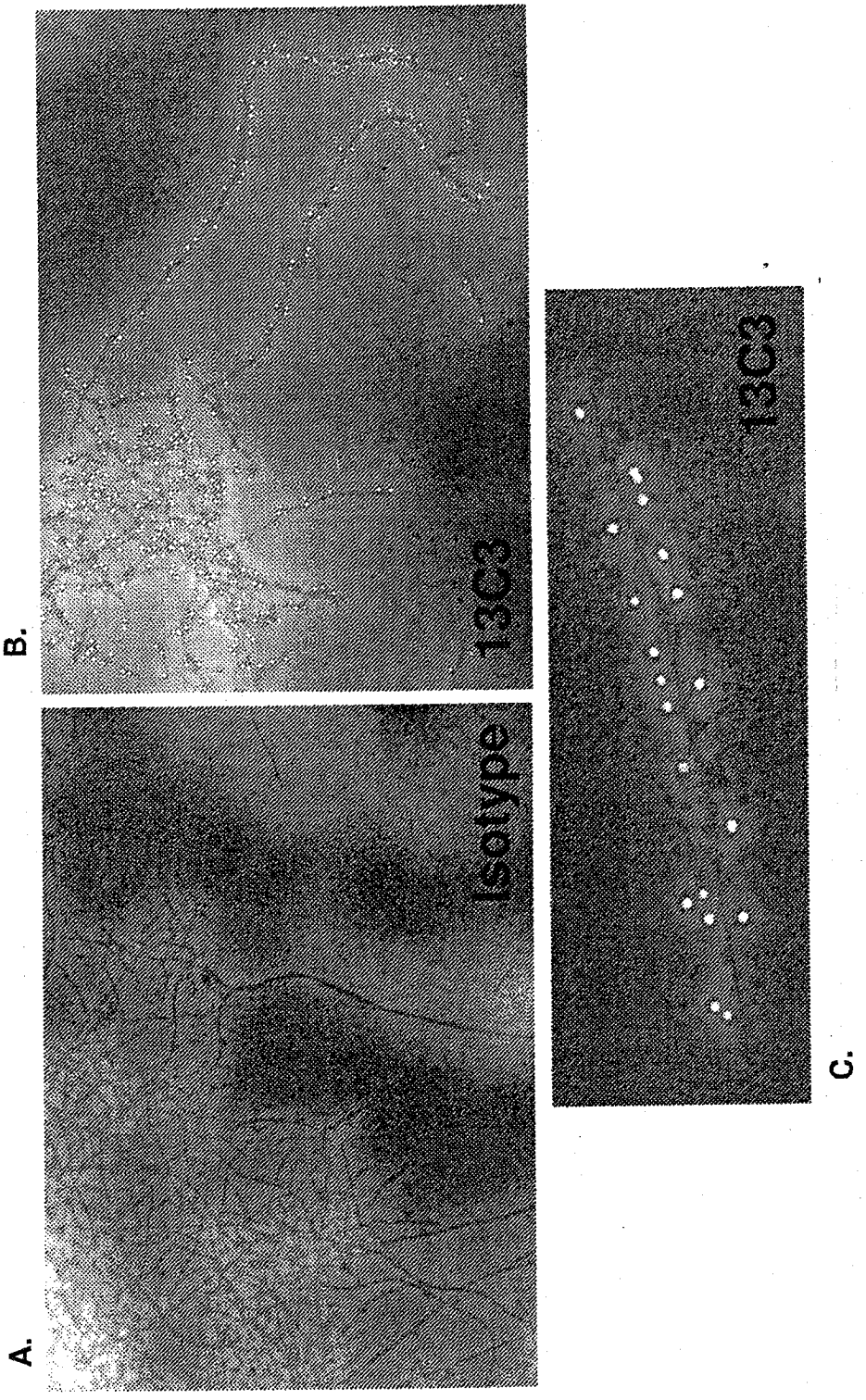


图 7

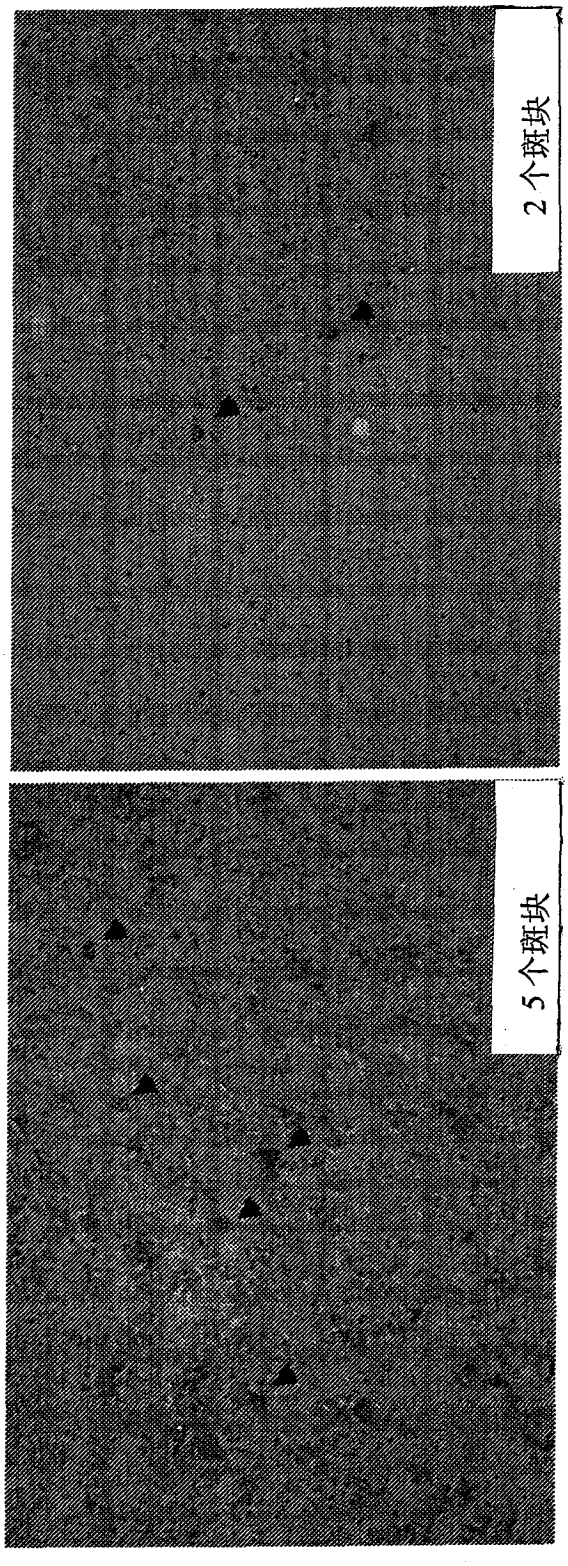
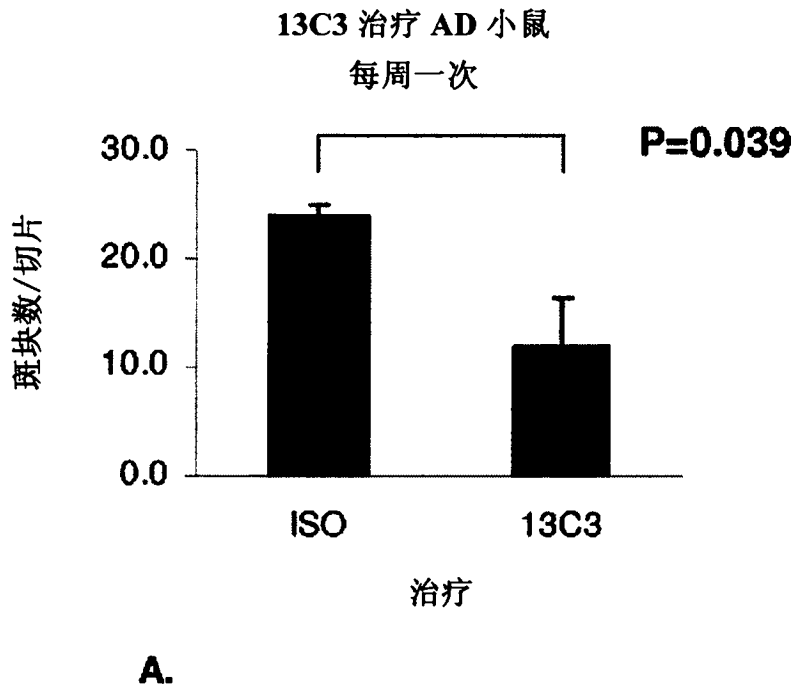
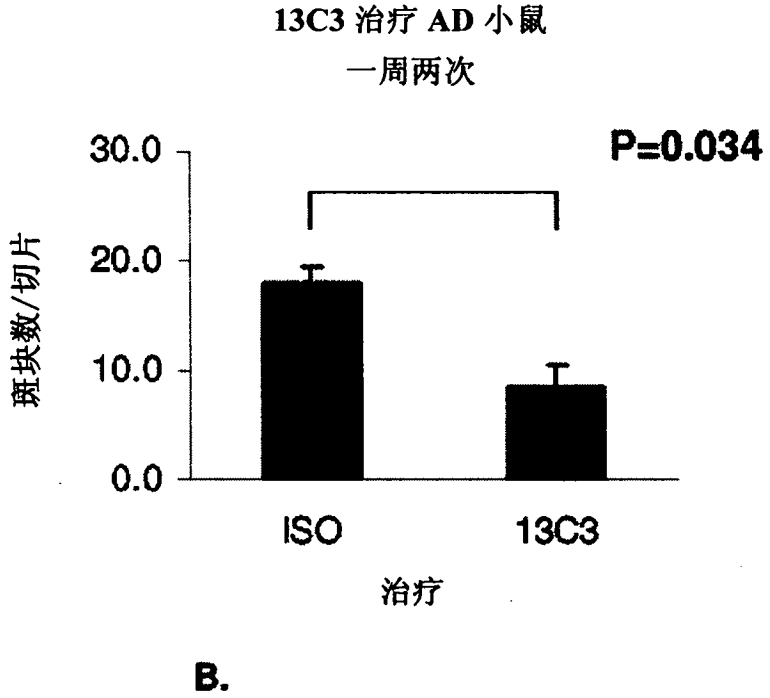


图 8


13C3 治疗 AD 小鼠
每周一次
P=0.039
30.0
20.0
10.0
0.0
斑块数/切片
ISO
13C3
治疗

A.


13C3 治疗 AD 小鼠
一周两次
P=0.034
30.0
20.0
10.0
0.0
斑块数/切片
ISO
13C3
治疗

B.

图 9

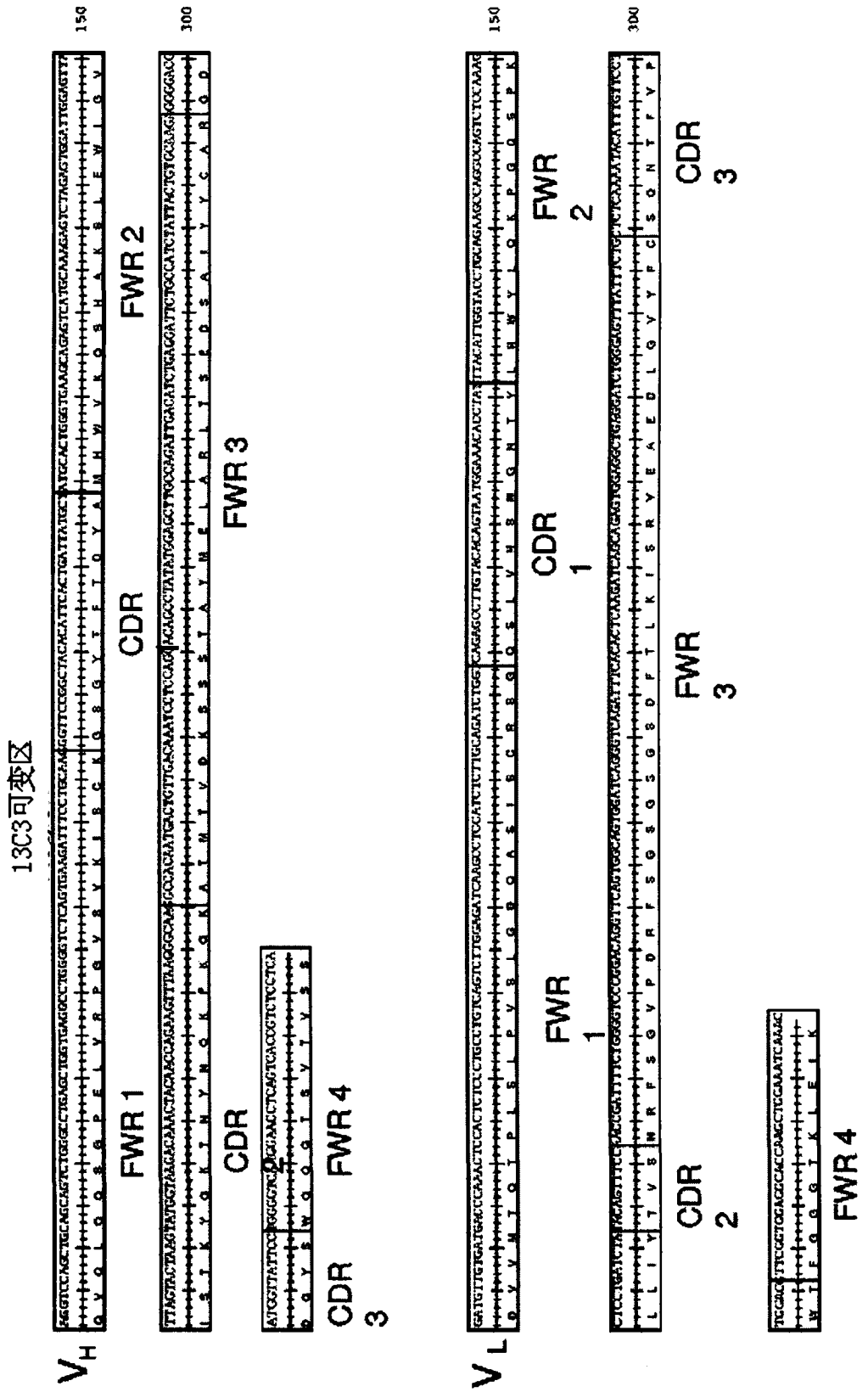

13C3可变区
VH
FWR 1
CDR
FWR 2
FWR 3
CDR
CDR 3
FWR 4
VL
FWR 1
CDR 1
FWR 2
CDR 2
FWR 3
CDR 3
FWR 4

图 10

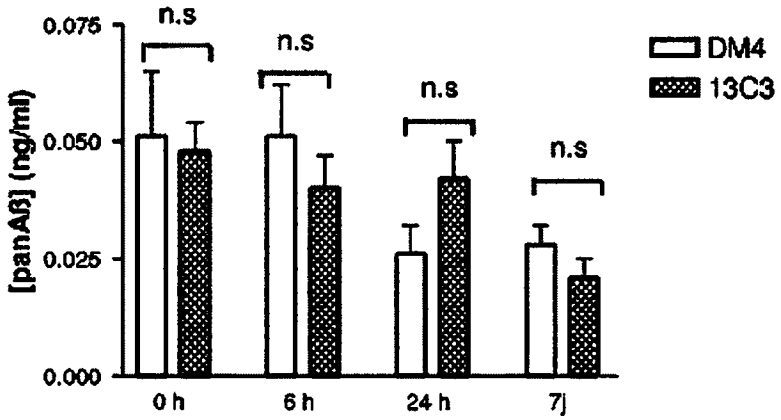

n.s
n.s
n.s
n.s
0.075
0.050
0.025
0.000
[panAβ] (ng/ml)
DM4
13C3
0 h
6 h
24 h
7j
时间

图 11A

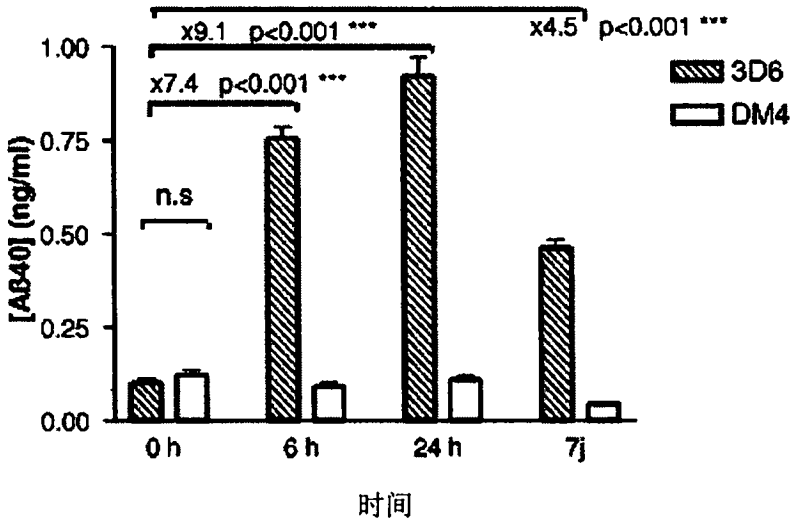

x9.1 p<0.001 ***
x4.5 p<0.001 ***
x7.4 p<0.001 ***
n.s
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
[Aβ40] (ng/ml)
3D6
DM4
0 h
6 h
24 h
7j
时间

图 11B

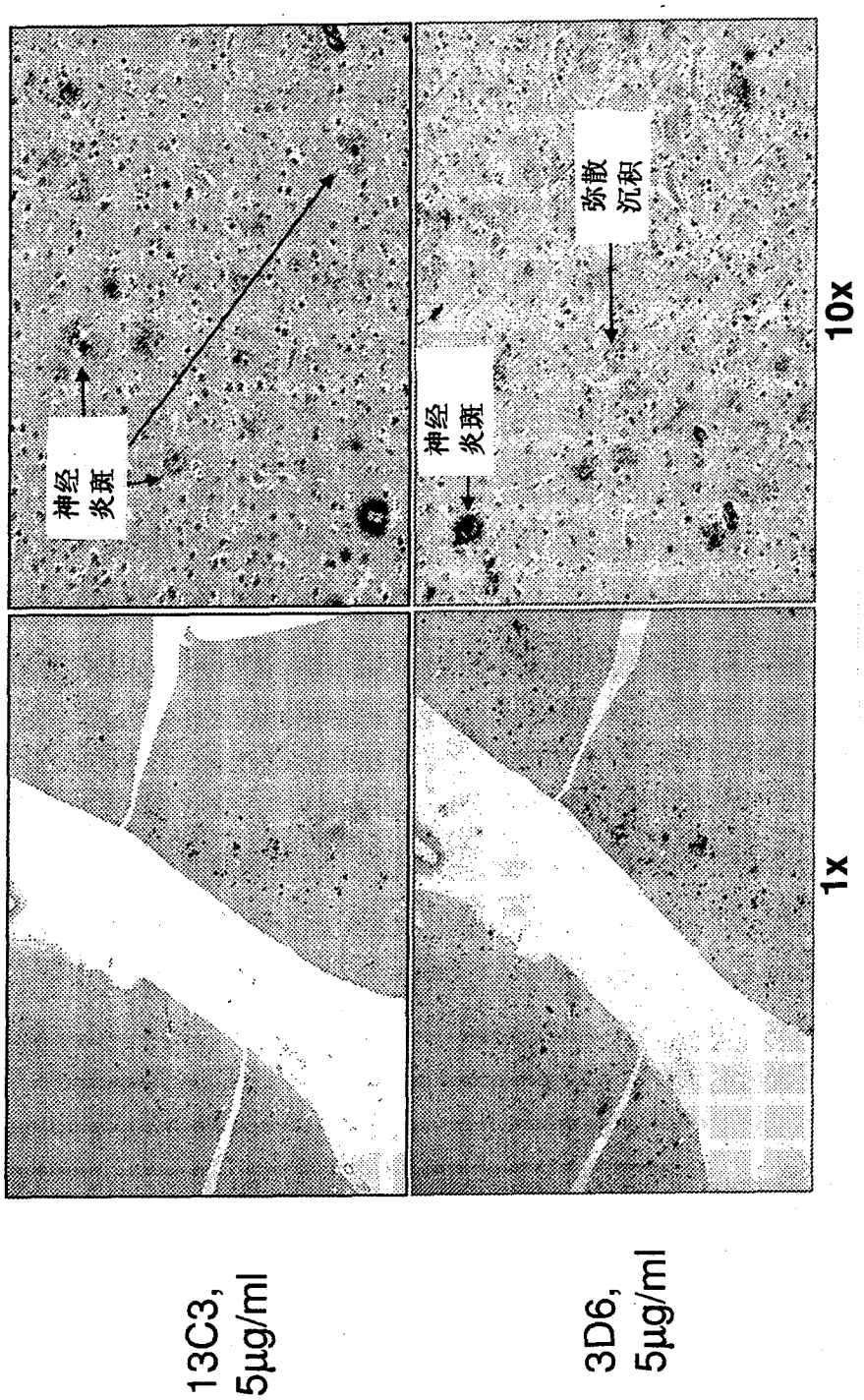
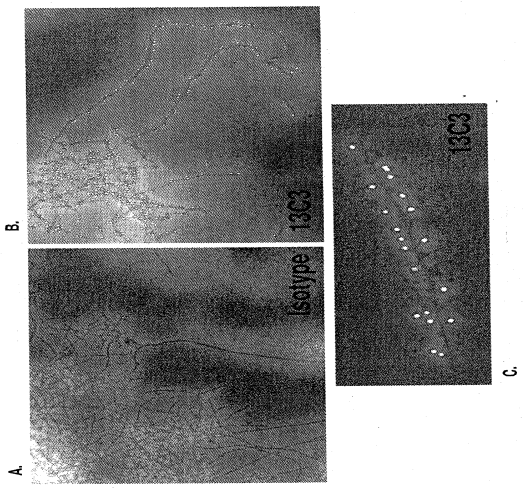


图 12

专利名称(译)	初原纤维形式β-淀粉样蛋白的特异性抗体		
公开(公告)号	CN102006887A	公开(公告)日	2011-04-06
申请号	CN200880116438.9	申请日	2008-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	洛克菲勒大学		
申请(专利权)人(译)	洛克菲勒大学		
当前申请(专利权)人(译)	洛克菲勒大学		
[标]发明人	杰弗瑞华弗治 福山英啓		
发明人	杰弗瑞·华弗治 福山英啓		
IPC分类号	A61K39/395 G01N33/53 G01N33/567		
CPC分类号	C07K2317/34 A61K2039/505 G01N2333/4709 G01N33/6896 C07K16/18 A61P25/00 A61P25/20 A61P25/28 C07K2317/14 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/56 C07K2317/565 G01N2800/2821		
代理人(译)	陆艺		
优先权	60/988481 2007-11-16 US 61/019747 2008-01-08 US		
其他公开文献	CN102006887B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明表征了一种分离抗体，其对初原纤维形式的β-淀粉样肽的重复构象表位具有特异性亲和作用，而对低分子量β-淀粉样肽不具有亲和作用。本发明的分离抗体和其相关药学有效的组合物，能有效阻断由初原纤维形式的β-淀粉样肽形成与阿尔茨海默病并发症相关的原纤维形式的进程，可以用于阿尔茨海默病的预防和治疗。本发明的分离抗体还可用于多种诊断检测和相关试剂盒。