

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/395

C12N 15/13 C12N 15/63

A61P 25/28



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410063651.1

[43] 公开日 2005 年 3 月 9 日

[11] 公开号 CN 1589903A

[22] 申请日 1999.5.21

[21] 申请号 200410063651.1

分案原申请号 99808844.7

[30] 优先权

[32] 1998.5.21 [33] US [31] 60/086,198

[71] 申请人 田纳西州立大学研究基金会

地址 美国田纳西州

[72] 发明人 A·所罗门 R·赫尼西

J·S·沃尔

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

权利要求书 5 页 说明书 14 页 附图 4 页

[54] 发明名称 用淀粉样蛋白抗体除去淀粉样蛋白的方法

[57] 摘要

本发明公开了增强患者对淀粉样原纤维沉积物的细胞介导的免疫应答的方法和有关的免疫球蛋白肽及其片段。 这些方法利用了针对淀粉样物质的抗体或其组成部分的调理作用。

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

1. 至少一种免疫球蛋白多肽或其片段在制备用来治疗淀粉样沉积疾病患者的药物中的用途，其中所述免疫球蛋白多肽或其片段与淀粉样原纤维或其组件或前体结合。
2. 根据权利要求1所述的用途，其中免疫球蛋白多肽或其片段针对的是免疫球蛋白轻链。
3. 根据权利要求1所述的用途，其中免疫球蛋白多肽或其片段的结合调理了淀粉样原纤维。
4. 根据权利要求1所述的用途，其中免疫球蛋白多肽或其片段是单克隆抗体。
5. 根据权利要求4所述的用途，其中单克隆抗体是人化抗体。
6. 根据权利要求4所述的用途，其中单克隆抗体是嵌合抗体。
7. 根据权利要求6所述的用途，其中嵌合抗体是人化抗体。
8. 根据权利要求4所述的用途，其中单克隆抗体是标记的抗体。
9. 根据权利要求4所述的用途，其中单克隆抗体选自 $\kappa 1(57-18H12)$ 、 $\kappa 4(11-1F4)$ 、 $\lambda 8(31-8C7)$ 及其组合。
10. 一种免疫球蛋白多肽或其片段，它与淀粉样原纤维或其组件或前体结合并有效地增强患者细胞免疫应答，以除去与疾病相关的淀粉样原纤维沉积物。
11. 根据权利要求10所述的免疫球蛋白多肽或其片段，其中免疫球蛋白多肽或其片段是单克隆抗体或其片段。
12. 根据权利要求11所述的免疫球蛋白多肽或其片段，其中单克隆抗体是人化抗体。
13. 根据权利要求11所述的免疫球蛋白多肽或其片段，其中单克隆抗体是嵌合抗体。
14. 根据权利要求13所述的免疫球蛋白多肽或其片段，其中嵌合抗体是人化抗体。
15. 根据权利要求11所述的免疫球蛋白多肽或其片段，其中单克隆抗体是标记的抗体。
16. 根据权利要求11所述的免疫球蛋白多肽或其片段，其中单克隆抗体选自 $\kappa 1(57-18H12)$ 、 $\kappa 4(11-1F4)$ 、 $\lambda 8(31-8C7)$ 及其组合。
17. 根据权利要求16所述的免疫球蛋白多肽或其片段，其中单克隆抗体是人化抗体。

18. 根据权利要求 10 所述的免疫球蛋白多肽或其片段, 其中免疫球蛋白多肽或其片段针对的是合成的淀粉样原纤维。

19. 一种药物组合物, 它包含权利要求 10-17 任一所述的免疫球蛋白多肽或其片段。

20. 一种核酸分子, 它编码的多肽至少包含权利要求 10-17 任一所述的免疫球蛋白多肽的超变区。

21. 一种宿主细胞, 它包含权利要求 20 所述的核酸分子。

22. 一种生产免疫球蛋白多肽的方法, 该方法包括培育权利要求 21 所述的宿主细胞的步骤。

23. 一种用于治疗淀粉样沉积疾病患者的方法的物质或组合物, 所述物质或组合物包含至少一种免疫球蛋白多肽或其片段, 其中所述免疫球蛋白多肽或其片段与淀粉样原纤维或其组件或前体结合, 且所述方法还包括将以下物质给予患者的步骤

a) 治疗有效剂量的所述物质或组合物, 和

b) 药学上可接受的载体。

24. 根据权利要求 23 所述的用于治疗方法的物质或组合物, 其中免疫球蛋白多肽或其片段针对的是免疫球蛋白轻链。

25. 根据权利要求 23 所述的用于治疗方法的物质或组合物, 其中免疫球蛋白多肽或其片段的结合调理了淀粉样原纤维。

26. 根据权利要求 23 所述的用于治疗方法的物质或组合物, 其中免疫球蛋白多肽或其片段是单克隆抗体。

27. 根据权利要求 26 所述的用于治疗方法的物质或组合物, 其中单克隆抗体是人化抗体。

28. 根据权利要求 26 所述的用于治疗方法的物质或组合物, 其中单克隆抗体是嵌合抗体。

29. 根据权利要求 28 所述的用于治疗方法的物质或组合物, 其中嵌合抗体是人化抗体。

30. 根据权利要求 26 所述的用于治疗方法的物质或组合物, 其中单克隆抗体是标记的抗体。

31. 根据权利要求 26 所述的用于治疗方法的物质或组合物, 其中单克隆抗体选自 $\kappa 1(57-18H12)$ 、 $\kappa 4(11-1F4)$ 、 $\lambda 8(31-8C7)$ 及其组合。

32. 免疫球蛋白多肽或其片段在制备制剂中的用途, 该制剂通过将抑制淀粉样沉积形成有效量的制剂给予对象来抑制对象的淀粉样沉积形成, 其中所述免疫球蛋白多肽或其片段与淀粉样原纤维或其组件或前体结合。

33. 免疫球蛋白多肽或其片段在制备制剂中的用途, 该制剂通过将除去淀粉样沉积物有效量的制剂给予对象来除去对象的淀粉样沉积物, 其中所述免疫球蛋白多肽或其片段与淀粉样原纤维或其组件或前体结合。

34. 免疫球蛋白多肽或其片段在制备制剂中的用途, 该制剂通过将调节淀粉样沉积形成有效量的制剂给予对象来调节对象的淀粉样沉积形成, 其中所述免疫球蛋白多肽或其片段与淀粉样原纤维或其组件或前体结合。

35. 根据权利要求 32 所述的用途, 其中免疫球蛋白多肽或其片段充分抑制淀粉样沉积的形成速度。

36. 根据权利要求 34 所述的用途, 其中免疫球蛋白多肽或其片段通过提高对象的淀粉样沉积除去来调节淀粉样沉积的形成。

37. 根据权利要求 32-34 任一项所述的用途, 其中免疫球蛋白多肽或其片段针对的是免疫球蛋白轻链。

38. 根据权利要求 32-34 任一项所述的用途, 其中免疫球蛋白多肽或其片段调理了淀粉样沉积物中的淀粉样原纤维。

39. 根据权利要求 32-34 任一项所述的用途, 其中免疫球蛋白多肽或其片段是单克隆抗体。

40. 根据权利要求 39 所述的用途, 其中单克隆抗体是完全的人抗体。

41. 根据权利要求 39 所述的用途, 其中单克隆抗体是人化抗体。

42. 根据权利要求 39 所述的用途, 其中单克隆抗体是嵌合抗体。

43. 根据权利要求 42 所述的用途, 其中嵌合抗体是人化抗体。

44. 根据权利要求 39 所述的用途, 其中抗体是标记的抗体。

45. 根据权利要求 39 所述的用途, 其中单克隆抗体选自 λ 8(31-8C7)(ATCC 保藏号 PTA-103)、 κ 1(57-18H12)(ATCC 保藏号 PTA-104)、 κ 4(11-1F4)(ATCC 保藏号 PTA-105)及其组合。

46. 根据权利要求 32-34 任一项所述的用途, 其中免疫球蛋白片段是 Fv 片段、Fab 片段、F(ab')₂ 片段或 SvFv 片段。

47. 根据权利要求 32-34 任一项所述的用途, 其中免疫球蛋白是单链抗体。

48. 根据权利要求 32-34 任一项所述的用途, 其中免疫球蛋白具有交叉同种型反应性。

49. 根据权利要求 32-34 任一项所述的用途, 其中免疫球蛋白与非轻链淀粉样蛋白反应。

50. 根据权利要求 49 所述的用途, 其中免疫球蛋白与阿尔茨海默疾病蛋白 A β

反应。

51. 根据权利要求 32-34 任一项所述的用途，其中对象是人。

52. 根据权利要求 32-34 任一项所述的用途，其中免疫球蛋白多肽或其片段与免疫球蛋白多肽或其片段所针对的淀粉样原纤维或其组件或前体之外的淀粉样原纤维
5 反应。

53. 根据权利要求 32-34 任一项所述的用途，其中一种以上的免疫球蛋白多肽或其片段被给予对象。

54. 根据权利要求 32-34 任一项所述的用途，其中免疫球蛋白多肽或其片段和载体一起给予。

10 55. 一种用于抑制对象淀粉样沉积形成的方法的物质或组合物，所述物质或组合物包含免疫球蛋白多肽或其片段，所述方法包括将所述物质或组合物以有效抑制淀粉样沉积形成的量给予对象，其中免疫球蛋白多肽或其片段与淀粉样原纤维或其组件或前体结合。

56. 一种用于除去对象淀粉样沉积物的方法的物质或组合物，所述物质或组合物
15 包含免疫球蛋白多肽或其片段，所述方法包括将所述物质或组合物以有效除去淀粉样沉积物的量给予对象，其中免疫球蛋白多肽或其片段与淀粉样原纤维或其组件或前体结合。

57. 一种用于调节对象的淀粉样沉积形成的方法的物质或组合物，所述物质或组合物包含免疫球蛋白多肽或其片段，所述方法包括将所述物质或组合物以有效调节淀粉样沉积形成的量给予对象，其中免疫球蛋白多肽或其片段与淀粉样原纤维或其组件或前体结合。
20

58. 根据权利要求 55 所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中免疫球蛋白多肽或其片段充分抑制淀粉样沉积的形成速度。

59. 根据权利要求 57 所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中免疫球蛋白多肽或其片段通过提高对象的淀粉样沉积除去来调节淀粉样沉积的形成。
25

60. 根据权利要求 55-57 任一项所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中免疫球蛋白多肽或其片段针对的是免疫球蛋白轻链。

61. 根据权利要求 55-57 任一项所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中免疫球蛋白多肽或其片段调理了淀粉样沉积物中的淀粉样原纤维。

30 62. 根据权利要求 55-57 任一项所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中免疫球蛋白多肽或其片段是单克隆抗体。

63. 根据权利要求 62 所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中单克隆抗体是

完全的人抗体。

64. 根据权利要求 62 所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中单克隆抗体是人化抗体。

5 65. 根据权利要求 62 所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中单克隆抗体是嵌合抗体。

66. 根据权利要求 65 所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中嵌合抗体是人化抗体。

67. 根据权利要求 62 所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中抗体是标记的抗体。

10 68. 根据权利要求 62 所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中单克隆抗体选自 λ 8(31-8C7)(ATCC 保藏号 PTA-103)、 κ 1(57-18H12)(ATCC 保藏号 PTA-104)、 κ 4(11-1F4)(ATCC 保藏号 PTA-105)及其组合。

69. 根据权利要求 55-57 任一项所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中免疫球蛋白片段是 Fv 片段、Fab 片段、F(ab')₂ 片段或 SvFv 片段。

15 70. 根据权利要求 55-57 任一项所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中免疫球蛋白是单链抗体。

71. 根据权利要求 55-57 任一项所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中免疫球蛋白具有交叉同种型反应性。

20 72. 根据权利要求 55-57 任一项所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中免疫球蛋白与非轻链淀粉样蛋白反应。

73. 根据权利要求 72 所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中免疫球蛋白与阿尔茨海默疾病蛋白 A β 反应。

74. 根据权利要求 55-57 任一项所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中对象是人。

25 75. 根据权利要求 55-57 任一项所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中免疫球蛋白多肽或其片段与免疫球蛋白多肽或其片段所针对的淀粉样原纤维或其组件或前体之外的淀粉样原纤维反应。

76. 根据权利要求 55-57 任一项所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中一种以上的免疫球蛋白多肽或其片段被给予对象。

30 77. 根据权利要求 55-57 任一项所述的用于治疗方法的物质或组合物，其中免疫球蛋白多肽或其片段和载体一起给予。

用淀粉样蛋白抗体除去淀粉样蛋白的方法

5

本申请是申请日为 1999 年 5 月 21 日、申请号为 CN 99808844.7、发明名称为“用淀粉样蛋白抗体除去淀粉样蛋白的方法”的中国专利申请的分案申请。

联邦政府资助

10

本发明是用国立卫生研究院授予的第 2R01 CA 20056 号政府资助金完成的。因此，政府在本发明中具有一定权利。

技术领域

15

本发明总地涉及治疗淀粉样蛋白相关疾病的方法。具体地说，本发明提供了依靠患者自身免疫吞噬系统来除去淀粉样原纤维的与治疗性抗体有关的方法。

发明背景

20

淀粉样变性指亲刚果、双折射呈绿色的原纤维形式的蛋白的病理性沉积，该原纤维被刚果红染色时呈分散的或局部化淀粉样瘤的形式。这种沉积是某些疾病的症状，例如有阿尔茨海默病、炎性相关淀粉样蛋白症、II 型糖尿病、牛海绵状脑病(BES)、Creutzfeld-Jakob 病(CJD)、羊痒病和原发性淀粉样变性。

25

淀粉样蛋白变性病(amyloidoses)通常分为三类：主要为全身性的淀粉样蛋白变性病、主要为局部性的淀粉样蛋白变性病，以及混杂性淀粉样蛋白变性病。主要为全身性的淀粉样蛋白变性病包括：慢性炎性病(如结核病、骨髓炎等)；非传染性病，如青少年类风湿性关节炎、强直性脊柱炎和 Crohn's 病等；家族性地中海热，浆细胞恶液质(原发性淀粉样变性)和各种家族性多发性神经病和心肌病。主要为局部性的淀粉样蛋白变性病包括：慢性透析(通常为 8 年以上)，阿尔茨海默病，Down 综合征，遗传性大脑出血(Dutch)，以及老年人的非创伤性大脑出血。混杂性淀粉样蛋白变性病包括：家族性多发性神经病(Iowa)、家族性淀粉样变性(Finnish)、遗传性大脑出血(Icelandic)、CJD、甲状腺髓样癌、动脉淀粉样蛋白病和糖尿病(胰岛瘤)。其它淀粉样蛋白变性病包括 Louis W. Heck, "淀粉样蛋白疾病"《Cecil's 医学课本》1504-6(W.B. Saunders & Co., Philadelphia, PA; 1996)中有所描述。

30

引起 CJD 和 Gerstmann-Strassler-Scheinker(GSS)病的可传染的海绵状脑病在 B. Chesebro 等人,"可传染的海绵状脑病: 简介"《田间病毒学》2845-49(第三版; Raven Publishers, Philadelphia, PA; 1996)以及 D.C. Gajdusek, "传染性淀粉样蛋白: 作为可传染的大脑淀粉样蛋白变性病的亚急性海绵状脑病"《田间病毒学》2851-2900(1996)中有所描述。这些疾病有许多可能由朊病毒(一种感染性蛋白质)介导。见 S.B. Prusiner, "朊病毒"《田间病毒学》2901-50(1996)及其所附参考文献。Online Mendelian Inheritance in Man(OMIM)"www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/omim/dispmin"上描述了淀粉样蛋白变性病的遗传形式。上述内容均纳入本文作为参考。

很少有经临床证实患淀粉样变性的患者能自发地完全恢复, 这可能是因为淀粉样蛋白变性病原纤维本身是非免疫原性的。已经研究了各种治疗淀粉样变性的方法, 例如高剂量化疗、类固醇、碘化阿霉素、以及干细胞替代治疗。然而, 药物治疗(用秋水仙碱)只在一种淀粉样蛋白疾病(即家族性地中海淀粉样变性)中有效。

用单克隆抗体(mAb, 单抗)诱导或调节免疫学除去未被识别的物质的方法是已知的。例如, 单抗已经成功用于治疗非霍奇金(Hodgkin's)淋巴瘤和乳房癌。

以前, 各种研究已经鉴定出与淀粉样原纤维或淀粉样蛋白结合的抗体。例如参见, 美国专利 No. 5,714,471; 5,693,478; 5,688,651; 5,652,092; 5,593,846; 5,536,640; 5,385,915; 5,348,963; 5,270,165; 5,262,332; 5,262,303; 5,164,295 和 4,782,014。另外, 几份出版物已经提出, 抗淀粉样蛋白抗体可用来研究 β -淀粉样变性的进展以及各种治疗选项。例如参见, Bellottii, 等人, Scand.J.Immunol.(1992) 36(4):607-615; Bellotti 等人, Ren. Fail. (1993) 15(3):365-371; Walker 等人, J. Neuropathol. Exp. Neurol. (1994)53(4):377-383;和 Bickel 等人, Bioconjug. Chem. (1994) 5(2):119-125。然而, 没有一种治疗性抗体显示出能停止或逆转患者体内的淀粉样原纤维沉积。因此, 需要有一种用含有能结合淀粉样原纤维的抗体的抗体制剂, 治疗淀粉样蛋白变性病的方法。

25 发明概述

本发明者已经发现了治疗淀粉样蛋白相关疾病和病情的新方法。这些方法利用了针对淀粉样蛋白的蛋白组分的单抗的调理作用。

本发明包括一种治疗淀粉样蛋白相关疾病患者的方法, 该方法包括下列步骤: 给予该患者治疗有效剂量的至少一种免疫球蛋白多肽或其片段, 以及药学上可接受的载体; 其中免疫球蛋白多肽或其片段可以是能与淀粉样原纤维结合的基本纯的免疫球蛋白多肽, 其中多肽的结合调理了淀粉样原纤维。

具体地说, 本发明涉及下文所述的三种单抗的任一种或其组合的用途。这些抗体

具有通常的抗淀粉样蛋白结合性能，并且提供了激活患者自身细胞免疫清除机制的非固有的调理试剂。

附图简述

5 图 1A 和 1B。图 1A 和 1B 是 Balb/c 小鼠在注射淀粉样蛋白后立即拍摄的(1A)以及注射 14 天后拍摄的(1B)重显照片。注射部位被刮过，以便更好地说明注射淀粉样蛋白物质所引起的“隆起”。

图 2A-2B。图 2A 和 2B 是人中性粒细胞粘附于体外受到调理的人淀粉样蛋白的重显照片。

10 图 3A-3D。图 3A-3D 是免疫组织化学染色的充满淀粉样蛋白的组织样品的重显照片(放大 20 倍)。图 3A 是用刚果红染色的 κ 1 淀粉样变性患者的组织样品；在偏振光下观察，淀粉样蛋白沉积物呈蓝绿色颗粒。图 3B 是用抗 κ I(57-18-H12)单抗标记后的碱性磷酸酶染色的组织样品。图 3C 是如图 3B 所述那样染色的组织样品，只是用抗 κ IV(11-1F4)单抗。图 3D 是如图 3B 所述那样染色的组织样品，只是采用抗 λ VIII(31-15 8c7)单抗。

图 4。图 4 是显示与植入 Balb/c 小鼠中的人淀粉样蛋白结合的荧光素化(FITC) κ 4 单抗(FITC)的重显照片。将该单抗注入小鼠大腿。注射后 72 小时，切下淀粉样瘤，用落射荧光显微镜(放大 20 倍)观察。

20 发明实施方式

综述

本发明利用免疫球蛋白多肽来调节和增强宿主或患者体内淀粉样原纤维不良沉积物的降解和清除。预计本发明例如可用来治疗患有以淀粉样原纤维不良沉积无为特征的疾病或病情的病人。不希望受任何特定的作用机理的约束，认为本发明的免疫球
25 蛋白多肽的给予调理了淀粉样变性患者体内沉积的淀粉样原纤维，从而有助于患者靠患者自身的免疫系统除去这些淀粉样原纤维。据认为，如果没有这种治疗性干预，单靠患者免疫系统不能除去淀粉样原纤维所调节的病情中的淀粉样原纤维，推测是因为淀粉样原纤维本身相对没有免疫原性。

为了治疗淀粉样变性患者，将治疗有效量的本发明免疫球蛋白多肽或其片段与药
30 学上可接受的载体或赋形剂一同给予。在这些免疫球蛋白多肽与淀粉样原纤维不良沉积物结合或粘附时，认为后者受到了调理。

本发明组合物的单次或多次给予可根据剂量进行，并可用本领域技术人员已知的

适用于给予其它治疗性抗体产品的给药程序进行。这些参数可由治疗具体患者的医师来选择和/或优选。

5 较佳的, 治疗有效量的本发明药物制剂应输送一定量的抗淀粉样蛋白的免疫球蛋白多肽, 该用量应足以基本上抑制淀粉样原纤维的不良沉积或基本上抑制淀粉样原纤维不良沉积产生的速度。更佳的, 该制剂应减少患者体内沉积的淀粉样原纤维的总负荷。另外, 这些制剂的给药应在诊断出淀粉样变性后立即开始, 并持续直至症状基本上消除再随后持续一段时间。在病情顽固的情况下, 加载量后可能需要维持剂量。

定义

10 本文中术语“肽”、“多肽”或“蛋白质”可以互换使用。术语“基本上相同”在指多肽时, 表示所述多肽或蛋白质与完整的天然存在的蛋白质或其部分有至少大约30%的相同性, 通常至少大约70%的相同性, 较佳的至少大约95%的相同性。

15 本文所用的术语“分离的”、“基本纯的”和“基本均一的”可互换使用, 这些术语描述了将蛋白质与其天然相伴组分分离。基本纯的蛋白质通常包含大约85%至90%的蛋白质样品, 更通常的大约95%, 较佳的为大约99%以上纯。蛋白纯度或均一性可用本领域熟知的多种方法来表明, 例如蛋白质样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后通过染色使聚丙烯酰胺凝胶上的一条多肽带显色。某些目的需要高的分辨率, 可采用HPLC或类似纯化方式。

20 蛋白质可用本领域熟知的标准技术纯化成基本均一, 这些方法包括用诸如硫酸铵等物质进行选择性的沉淀、柱层析、免疫纯化方法和其它方法。例如参见, Scopes, 《蛋白质纯化原理和实践》, Springer-Verlag: New York(1982), 其内容纳入本文作为参考。

25 抗体纯化技术是本领域中熟知的。Harlow 等人, 《抗体实验手册》, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor(1988), 288-318, 其内容纳入本文作为参考, 其中例如描述了用硫酸铵沉淀、辛酸(caprylic acid)、DEAE、羟基磷灰石层析、凝胶过滤层析、蛋白质A珠层析和免疫亲和层析进行纯化。

本文所用的核酸可以是DNA或RNA。当指核酸时, 术语“基本相同”表示两个核酸或其指定部分的序列在最佳排列对比时, 至少大约80%的核苷酸是相同的, 通常为至少大约90-95%, 更佳的有至少大约98%-99.5%的核苷酸是相同的, 并有适量的核苷酸插入或缺失。

30 或者, 当核酸片段在选择性杂交条件下与另一核酸链的互补链杂交时, 则核酸序列是基本相同的。

“基本互补”同样指一个核酸与另一核酸选择性杂交或相同。通常, 当至少14-

25 个核苷酸的链内有至少大约 55%的相同性, 较佳的有至少大约 65%的相同性, 更佳的有至少大约 75%的相同性, 最佳的有至少大约 90%的相同性时, 才会发生选择性杂交。见 M. Kanehisa Nucl. Acids Res. 12:203(1984), 其内容纳入本文作为参考。

5 严谨杂交条件通常包括盐浓度低于大约 1M, 更通常地低于大约 500mM, 较佳的低于大约 200mM。温度通常大于 22℃, 通常大于大约 30℃, 较佳的超过大约 37℃。由于其它因素(包括碱基组成和互补链的大小, 有机溶剂的存在以及碱基错配的程度)对杂交严谨性可能有显著影响, 因此这些参数的组合比任何单独一个绝对的数量度都更为重要。

10 术语“分离的”或“基本纯的”在指核酸时, 是指用标准技术(包括碱性/SDS 处理、CsCl 分带、柱层析以及本领域中熟知的其它技术)从其它细胞组分或其它污染物(例如其它细胞核酸或蛋白质)中纯化出的那些核酸。见 F.Ausubel, 等人编辑, 《当代分子生物学方法》, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New-York(1987), 该文纳入本文作为参考。

15 当一核酸被置于与另一核酸序列有功能上关系的位置时, 该核酸是“操作性连接的”。例如, 如果启动子或增强子影响编码序列的转录, 则它与编码序列操作性连接。通常, 操作性连接指被连接的核酸序列是毗邻的, 当需要连接两个蛋白质编码区时, 指被连接的核酸序列是毗邻的且在同一读框内。

核酸操作的技术, 例如将编码多肽的核酸序列亚克隆到表达载体中、标记探针、DNA 杂交等等, 例如在 Sambrook 等人,(1989)《分子克隆实验指南》(第二版)1-3 卷, 20 Cold Spring Harbor Laboratory, 或 Ausubel 等人编辑(1987) op.cit.中有大致的描述, 两者均纳入本文作为参考。

“表达载体”、“克隆载体”或“载体”通常是能在所选宿主细胞中复制的质粒或其它核酸分子。表达载体可以自主复制, 或可通过本领域熟知的方法插入宿主细胞的基因组中而进行复制。自主复制的载体具有在所选宿主细胞内起作用的复制起点或自主复制序列(“ARS”)。通常, 希望一个载体可用于多种宿主细胞内, 例如在大肠杆菌中用于克隆和构建, 在哺乳动物细胞用于表达。

30 哺乳动物细胞系通常被用作表达真核细胞衍生多肽的宿主细胞。哺乳动物细胞在培养物中的繁殖本来就是熟知的。见《组织培养》, Academic Press, Kruse and Patterson 编辑(1973), 该文纳入本文作为参考。宿主细胞系还可包括以下生物体, 如细菌(如大肠杆菌或枯草芽孢杆菌)、酵母、丝状真菌、植物细胞或昆虫细胞。

“转化”指用熟知的方法将含有感兴趣的核酸的载体直接导入宿主细胞内。转化方法因宿主细胞类型而异, 包括: 电穿孔; 采用氯化钙、氯化铷磷酸钙、DEAE-葡聚

糖或其它物质的转染；微粒轰击；脂转染；感染(载体是感染因子)；和其它方法。见 Sambrook 等人,(1989) 同上。在谈到已经导入了上述核酸的细胞时，还包括这些细胞的后代。

本文所用的术语“免疫球蛋白多肽”指衍生自天然免疫球蛋白(例如多肽)的、对
5 特定靶标(例如对淀粉样原纤维)有特异性免疫反应活性的分子。抗体通常是免疫球蛋白多肽的四聚体。本文所用的术语“抗体”还指基本上由免疫球蛋白基因编码的一种或多种多肽所组成的蛋白质。免疫球蛋白基因包括编码轻链(可以是 κ 型或 λ 型)的基因，以及编码重链的那些基因。重链的类型有 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 。免疫球蛋白重链和轻链的羧基端部分是恒定区，而氨基端部分由多个免疫球蛋白可变区基因编码。免疫球蛋白
10 可变区是提供抗原识别特异性的部分。具体地说，特异性在于免疫球蛋白的互补决定区(“CDR”)中，该互补决定区也称为超变区。

免疫球蛋白可以各种片段形式存在，例如包括 Fv, Fab, F(ab'), F(ab')₂, SvFv 和其它片段，以及单链(例如 Huston, 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883(1988)和 Bird, 等人, Science 242:423-426(1988), 纳入本文作为参考)。(通常见, Hood, 等人, "免疫学" Benjamin, N.Y., 第 2 版(1984), 和 Hunkapiller and Hood, Nature, 323:15-16(1986),
15 纳入本文作为参考)。还可采用单链抗体，其中重链基因和轻链基因被组合成单条编码序列。免疫球蛋白多肽还包括截短的免疫球蛋白链，例如链中含有的恒定区结构域少于天然多肽。这些截短的多肽可用标准方法制备，例如在待缺失结构域序列的 5'端基因序列中导入一终止密码子。然后，将截短的多肽装配到截短的抗体内。本文所用的
20 抗体还包括双特异性抗体，该抗体可用下列参考文献中描述的方法来制备：Glennie, 等人, J. Immunol., 139:2367-2375(1987); Segal 等人, Biologic Therapy of Cancer Therapy of Cancer Updateds 2(4):1-12(1992); 和 Shalaby 等人, J. Exp. Med. 175:217-225(1992)。

“单克隆抗体”可用本领域技术人员熟知的各种技术获得。简言之，使经所需抗原免疫的动物的脾细胞无限增殖，通常通过与骨髓瘤细胞融合来进行(见, Kohler 和
25 Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519(1976))。另一种无限增殖的方法包括用 EB 病毒、肿瘤基因或逆转录病毒来转化，或本领域熟知的其它方法。在从单个无限增殖的细胞产生的集落中筛选对抗原有所需特异性和亲和性的抗体的产生，且这些细胞产生单克隆抗体的产量可用各种技术来增强，这些技术包括将细胞注射入脊椎动物宿主的腹膜腔。

30 单特异性和双特异性免疫球蛋白还可用在原核或真核宿主细胞中的重组技术来制备。

“嵌合的”抗体由免疫球蛋白基因编码，该基因已经过基因工程改造，从而使得

轻链和重链基因由属于不同种类的免疫球蛋白基因片段组成。例如，可将小鼠单抗基因的可变区(V)片段与人恒定区(C)片段连接。这种嵌合抗体对人而言抗原性可能比用小鼠恒定区和小鼠可变区组成的抗体低。

本文所用的术语嵌合抗体还指这样一种抗体，它包括具有人样构架区的免疫球蛋白，其中任何恒定区与人免疫球蛋白恒定区有至少大约 85-90%的多肽序列相同性，较佳的有大约 95%的多肽序列相同性，它也称为“人化的”免疫球蛋白(例如参见，PCT 出版物 WO90/07861，该文纳入本文作为参考)。因此，这样的“人化”免疫球蛋白的所有部分，可能除了互补决定区(CDR)外，与一种或多种天然的人免疫球蛋白序列的对应部分基本上相同。需要的时候，构架残基也可用种内或种间的残基替代，尤其是若发现某些构架残基影响 CDR 的结构时。嵌合的抗体还可含有截短的可变区或恒定区。

本文所用的术语“构架区”指在单个种类的不同免疫球蛋白之间相对保守的免疫球蛋白轻链和重链可变区的那些部分(即 CDR 除外的那些)(如 Kabat,等人,(1987);《感兴趣的免疫学蛋白质序列》第 4 版，U.S. Dept. Health and Human Services 中定义的，纳入本文作为参考)。本文所用的术语“人样构架区”是这样一个构架区，每一存在的链中包含至少大约 70 或更多，通常为 75-85 或更多个与人免疫球蛋白中残基相同的残基。

人恒定区 DNA 序列可用熟知的程序从各种人细胞分离获得，但是较佳的是分离自无限增殖的 B 细胞。用于制备本发明嵌合免疫球蛋白的可变区或 CDR 可以类似方式衍生自能结合人型淀粉样蛋白的单克隆抗体，并在任何合适的哺乳动物系统中生产，包括小鼠、大鼠、家兔、野兔、人细胞系，或可用熟知的方法产生抗体的其它脊椎动物。可变区或 CDR 可用标准的重组方法合成制得，这些重组方法包括聚合酶链反应(“PCR”)或通过噬菌体展示文库制得。对于噬菌体展示方法，例如参见，McCafferty 等人，Nature 348:552-554(1990); Clackson 等人，Nature 352:624-628 和 Marks 等人，Biotechnology 11:1145-1149(1993)。可采用合适的原核系统如细菌、酵母和噬菌体。

DNA 序列的合适细胞来源以及用于表达和分泌免疫球蛋白的宿主细胞可从各种来源获得，例如从美国典型培养物保藏中心获得(“细胞系和杂交瘤分类”第 5 版(1985)Rochville, Maryland, U.S.A., 纳入本文作为参考)。

除了本文具体描述的嵌合的和“人化的”免疫球蛋白外，还可用本领域技术人员熟知的各种重组 DNA 技术来设计和生产有所改进但基本上相同的其它免疫球蛋白。通常，对基因的改进容易用各种熟知的技术来实现，这些技术例如有 PCR 和定点诱变(见，Gillman 和 Smith, Gene 8:81-97(1979)和 S. Roberts 等人，Nature 328:731-

734(1987), 两篇文献均纳入本文作为参考)。

或者, 可以制得只含免疫球蛋白一级结构之一部分的多肽片段。例如, 可能希望制备出具有除抗原识别活性以外的一种或多种免疫球蛋白活性(如补体固定)的免疫球蛋白多肽片段。

- 5 整个或部分免疫球蛋白基因还可与其它基因(如酶)的功能区或其它分子(如毒素、标记和寻靶部分)组合, 以产生具有新性质的融合蛋白(例如“免疫毒素”)。在这些基因融合的情况下, 相同多肽链中存在两个组分。或者, 可以用各种熟知的化学程序将免疫球蛋白或其片段与毒素或标记用化学方法连接起来。例如, 当标记或细胞毒性剂是蛋白质而第二个组分是完整的免疫球蛋白时, 此种连接可通过异双功能交联剂(如
- 10 SPDP、碳化二亚胺、戊二醛等)实现。

合适的标记例如包括放射性核素、酶、底物、辅因子、抑制剂、荧光剂、化学发光剂、磁性颗粒。例如参见说明这些标记的使用的专利、美国专利 No. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149;和 4,366,241, 所有这些均纳入本文作为参考。

- 15 免疫毒素, 包括单链分子, 也可用重组方法制得。各种免疫毒素的制备是本领域中熟知的, 其方法可在例如“单抗-毒素偶联物: 瞄准目标的有魔力的子弹”Thorpe 等人,《临床医学单克隆抗体》Academic Press, 168-190 页(1982); E. Vitetta, Science(1987) 238:1098-1104; 和 G. Winter 和 C. Milstein, Nature(1991) 349:293-299 中找到, 所有这些文献均纳入本文作为参考。

- 20 制备免疫球蛋白和免疫球蛋白片段的其它技术在 V.S. Malik 等人,《抗体技术》(Academic Press, 1994); C.A.K. Borrebaeck,《抗体工程: 分子生物学的突破》(Oxford Univ. Press, 1995); 和 P.J. Delves 等人,《抗体制备的基本技术》(John Wiley & Sons, 1997) 中有所描述, 这些文献均纳入本文作为参考。

- 25 本文所用的术语“调理”指免疫球蛋白多肽与特定的靶标, 尤其是淀粉样原纤维沉积物上发现的表位结合, 从而使抗体和靶标一同被宿主细胞免疫系统识别为“外来物质”。换句话说, 本发明免疫球蛋白的结合增强了对淀粉样原纤维的吞噬作用。

本文所用的术语“淀粉样变性”指特征为存在淀粉样蛋白物质的任何情况。这种物质可以是淀粉样瘤形式或是更为分散的淀粉样沉积物或原纤维形式。

30 药物组合物

本发明的用于治疗性处理的药物组合物可用于肠胃外给药、口服或局部给药。较佳的, 肠胃外给予该药物组合物, 例如静脉内、皮下、真皮内或肌内给予。由于 IgG

不能渗透通过血脑屏障(见 U.Bickel 等人,1994 *Bioconjug. Chem.* 5:119-25), 因此克服血脑屏障(BBB)的抗体输送可将抗体通过脂质体或分子团输送至所需部位来实现。另外, 本发明的制剂可以直接输送至脑脊液(例如参见 L.C. Walker 等人,1994 *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53:377-83)。对于其它输送机制, 参见 P.M. Friden, 1996, 美国专利 5,527,527 和 W.M. Pardridge,1991 美国专利 No. 5,004,697。所有上述文献均纳入本文作为参考。

因此, 本发明提供了适合肠胃外给药的组合物, 该组合物包含溶解或悬浮在药学上可接受的载体(较佳的是水性载体)中的抗淀粉样蛋白的免疫球蛋白多肽。可以使用各种水性载体, 例如水、缓冲水溶液、0.4%盐水、0.3%甘氨酸、透明质酸等。这些组合物可用常规的熟知的灭菌技术来除菌, 或可经过无菌过滤。得到的水溶液可包装使用或冻干, 冻干制剂在给药前与无菌溶液组合。该组合物可根据需要含有药学上可接受的辅助性物质以接近生理条件, 例如 pH 调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等(例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨糖醇月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等)。

药物制剂中本发明抗淀粉样蛋白的免疫球蛋白多肽的浓度可以有很大差异, 即从低于大约 1%起, 通常为至少大约 10-15%, 至高达 50%或更高(以重量计), 主要是根据所选的特定给药方式从液体体积、粘度等来选择。

本领域普通技术人员无需过多实验就能确定足以调理淀粉样瘤的免疫球蛋白多肽有效量。该用途的有效量将取决于, 例如, 抗淀粉样蛋白的免疫球蛋白多肽组合物的特性、给药方式、待治疗的疾病的阶段和严重程度、患者的体重以及总体健康状况、以及处方医师的判断。通常可采用 0.5 毫克/千克的典型单剂量。必须注意的是, 抗淀粉样免疫球蛋白多肽以及其衍生的肽组合物可用于严重的疾病状态, 即威胁生命或可能威胁生命的场合。在这些情况下, 可以、而且治疗医师可能感到需要给予过量的这些组合物。因此, 本发明的人抗淀粉样蛋白单克隆抗体或基本上人抗淀粉样蛋白受体单克隆抗体在这些情况下是最佳的。

本发明的治疗淀粉样变性病人的方法也适用于易患淀粉样变性的动物, 如奶牛或仔鸡。因此, 本文中涉及到人患者的也适用于非人患者。

本文所定义的免疫球蛋白多肽宜为针对淀粉样瘤或其组分或前体的抗淀粉样蛋白的单抗。该单抗可针对 IgLC 可变区结构域产生, 或较佳的针对 IgLC 亚组 $\kappa 1$ 、 $\kappa 4$ 、 $\lambda 8$ 或其组合产生。将基本上非人的免疫球蛋白多肽给予人可能会引起对该抗体的应答反应。因此, 希望制备基本上是人(源)的本发明抗 IgLC 免疫球蛋白多肽。“基本上是人(源)”指抗体或其结合片段由以下氨基酸序列组成, 该序列有至少大约 50%来源于

人, 更佳的有至少 70-80%, 最佳的有大约 95-99%或更多的来源于人, 尤其是对于在治疗已建立的淀粉样瘤所需的长时间内反复给药来说, 这更为需要。如本文所用的, 人抗体意味着包括完整人来源的抗体以及基本上来自于人的那些抗体, 除非内容另有描述。

5 还可产生针对合成的淀粉样原纤维的单克隆抗体。用标准技术分离重组的轻链、可变区肽, 并体外纯化。然后, 用诸如 Wall 等人,"体外免疫球蛋白轻链原纤维形成"《酶学方法》309 卷(在出版)中描述的技术从肽制得合成的原纤维。然后, 用标准的免疫技术产生针对该合成原纤维的抗体, 免疫通常在小鼠或家兔中进行。用标准的杂交瘤技术产生分泌抗原纤维抗体的单克隆细胞系。

10 本发明的抗淀粉样免疫球蛋白多肽可用任何一种熟知的技术制得。例如, 它们可以这样制得, 用纯化或部分纯化的人淀粉样蛋白免疫动物。该受免疫动物可以是免疫学上能识别人型淀粉样胞外结构域表位特征的任何一种动物, 例如鼠、兔、马等。

 本发明的单克隆抗体可通过使含有以下核酸序列的细胞无限增殖来制得, 该核酸序列编码的免疫球蛋白多肽或其部分能与人型淀粉样蛋白胞外结构域的特征性抗原
15 决定簇特异性结合。无限增殖过程可通过杂交瘤融合技术、用病毒转化产生抗体的淋巴细胞、重组 DNA 技术或细胞融合、病毒转化和/或重组 DNA 方法相联合的技术来实现。产生单克隆抗体的免疫原包括合成的淀粉样原纤维, 例如 A.Lomakin 等人,1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7924-7 中所述, 该文献纳入本文作为参考。

 由于人抗淀粉样蛋白单克隆抗体的产生很难采用常规的无限增殖技术, 因此希望
20 首先制得非人抗体, 然后通过重组 DNA 技术, 将非人抗体的抗原结合区(例如 Fab、互补决定区(CDR)或超变区)转移到合适的人恒定区(Fc)或构架区内, 产生基本上为人(源)的分子。这种方法是本领域中通常所知道的, 且在例如美国专利 4,816,397、PCT 出版物 WO 90/07861 和 EP 出版物 173494 和 239400 中有所描述, 其中每篇文献均纳入本文作为参考。然而, 转基因动物中可以产生完整的人抗体。例如, 通过 PCR, 可
25 从人 B 细胞分离所需的人免疫球蛋白基因或基因片段, 将该 DNA 克隆到适合在真核细胞表达的载体中, 将克隆的 DNA 导入动物体内, 以产生转基因。适合产生转基因来表达人免疫球蛋白的动物包括小鼠、大鼠、家兔和猪, 其中表达人免疫球蛋白的转基因啮齿类动物宜有一个或多个内源免疫球蛋白基因座已被灭活或“剔除”, 从而有利于鉴定和分离人抗体(例如参见, Lonberg, 等人,Nature 368:856-859(1994))。

30 得到的能与淀粉样蛋白结合的嵌合抗体或嵌合的免疫球蛋白多肽也在本发明范围内。典型的治疗性嵌合抗体是一种杂交蛋白, 它由对人淀粉样抗原性决定簇有特异性的小鼠免疫球蛋白的可变区(V)或抗原结合结构域, 以及人免疫球蛋白的恒定区

(C)或效应结构域组成,虽然可变和恒定结构域也可采用其它哺乳动物种类的结构域。本文所用的术语“嵌合抗体”还指由一免疫球蛋白基因编码的抗体,该基因中只有 CDR 是转移自特异性识别抗原决定簇的免疫球蛋白,而免疫球蛋白基因的其余部分衍生自人(或其它哺乳动物,根据需要)免疫球蛋白基因。如上所述,此类嵌合抗体称为
5 “人化”(在使用人免疫球蛋白基因的情况下)抗体。另外也考虑到的是不含其它动物序列的重组人抗体。

抗淀粉样蛋白的免疫球蛋白多肽可变结构域的超变区是本发明的一个相关方面。该超变区(或 CDR)与构架区(在一种动物中不同免疫球蛋白之间相对保守的免疫球蛋白轻链和重链可变区的构架部分)的偶联能使抗淀粉样蛋白的免疫球蛋白多肽识别并
10 从而结合人淀粉样蛋白。超变区可被克隆和测序。一旦确定,就可将赋予特异性识别人淀粉样蛋白能力的这些区域克隆到在宿主细胞中表达的载体中,作为另一免疫球蛋白分子的一部分或作为融合蛋白,例如作为起增强克隆的个体型免疫原性作用的载体分子。

本发明的抗淀粉样免疫球蛋白多肽通常以完整的形式使用,或以免疫原性片段
15 (如 Fv, Fab, F(ab')₂)形式使用。这些片段可用常规技术从抗体获得,这些常规技术是用诸如胃蛋白酶、木瓜蛋白酶或其它蛋白水解酶水解消化抗体,或用重组 DNA 技术,其中克隆或合成编码所需片段的基因或其部分,并在各种宿主中表达。

本领域技术人员将认识到,可用特异性免疫球蛋白作为免疫原根据标准技术制得“抗独特型”抗体。例如,用淀粉样原纤维或其片段进行感染或免疫,诱导出中和性
20 免疫球蛋白,该蛋白的 Fab 可变区组合部位上有淀粉样蛋白的图象,该图象对于特定的免疫球蛋白来说是独特的,即是独特型的。用这种抗淀粉样免疫球蛋白进行免疫诱导产生抗独特型抗体,该抗体的结合部位具有的构象模仿了原来的淀粉样抗原结构。因此,这些抗独特型抗体可用来代替淀粉样抗原。例如参见, Nisonoff(1991) J. Immunol. 147:2429-2438, 该文献纳入本文作为参考。

25 下列工作实施例具体指出了本发明的较佳实施方案,不应理解这些方案限制了其它公开内容。其它一般的构型对于本领域技术人员来说是显而易见的。

实施例 1 鼠宿主中人 IgLC 淀粉样蛋白的无辅助性分辨

从尸体解剖期间获得的感染器官抽提并纯化获得人 IgLC 淀粉样蛋白。第一个实
30 验涉及将 50-200 毫克该淀粉样物质移植到 Balb/c 小鼠体内。将淀粉样块或“淀粉样瘤”制备在无菌 PBS 中,进行连续超声处理和研磨步骤,以产生完全具有体内所见辅助性分子的淀粉样原纤维精细悬浮液。进行该程序的目的是使淀粉样蛋白能通过宽口

径皮下注射针注射入小鼠。

将相当于动物体重 10% 的淀粉样物质注射入小鼠肩胛骨之间(处于麻醉下), 产生可见的大团块(见图 1A)。小鼠需要 15-18 天完全消除淀粉样瘤(见图 1B), 此时动物看上去是健康的, 并活了正常的寿命。淀粉样瘤的消除由实验者主观决定; 通过简单地
5 触摸注射部位, 很容易感觉到皮肤下的硬豌豆状的淀粉样瘤。

实施例 2 抗体介导的免疫力和细胞免疫力均参与了淀粉样瘤的消除

通过筛选先前注射了淀粉样物质的小鼠的针对注射物质样品的血清, 显示出抗淀粉样抗体参与了淀粉样瘤的清除。这用 Western 印迹分析来进行, 采用合适稀释度的
10 小鼠血清作为第一抗体。结果显示对淀粉样基质的每个组分均有抗体, 即凝胶上的每条带均被小鼠血清染色, 即使是在 10000 倍的血清稀释度下(数据未显示)。

细胞组分的参与得到体外中性粒细胞结合试验(见图 2A 和 2B)以及利用剔除突变型小鼠株的证实(数据未显示)。图 2A 和 2B 表明, 在淀粉样蛋白经小鼠抗人 IgLC 单抗处理后, 人中性粒细胞与人淀粉样蛋白发生粘附。这表明该小鼠单抗能与淀粉样
15 蛋白结合并吸引入中性粒细胞。

剔除突变株小鼠的研究进一步证实了抗体参与淀粉样蛋白消除的这一发现。首先, 缺少 B 和 T 淋巴细胞的 scid/scid 小鼠即使在三个月后也不能消除注入的淀粉样瘤(数据未显示)。其次, CD18 基因剔除的动物不能象正常动物那样迅速地除去淀粉样瘤。CD18 剔除的动物有 97% 缺少 CD18(在粒细胞/巨噬细胞谱系上发现的细胞表面整联蛋
20 白)。尽管这些细胞不能离开循环, 但动物是 B 细胞和 T 细胞有活性的, 因此可产生抗体应答。第三, 没有白细胞的裸鼠不能除去淀粉样瘤。

而且, 用另一小鼠的淀粉样蛋白反应性血清培育过的淀粉样蛋白在植入第二个小鼠体内后 4 天内被除去。在该实验中, 将 50 毫克 HIG 淀粉样蛋白注射入 Balb/c 小鼠中, 放置 1 周, 然后剪开尾静脉取血。对血液进行 1500rpm 离心沉淀, 吸除细胞。血浆保藏于 4℃ 直至使用。HIG 淀粉样蛋白(100 毫克)的另一制备物是通过悬浮在无菌
25 PBS 中制得的, 在该 PBS 中加入 1 毫升前一小鼠的血浆。然后将该制备物注射入第二只小鼠(Balb/c), 淀粉样蛋白在 4 天内被除去。因此, 得出结论, 即该过程可通过注射前调理该物质来加速。

30 实施例 3 IgLC 亚系列的 ELISA 筛选

用 ELISA 技术进行系统性研究, 用针对 IgLC 亚系列(λ 1、 λ 2、 λ 3、 λ 4、 λ 5、 λ 6、 κ 1、 κ 2、 κ 3、 κ 4、没有 κ 和 λ 以及全部的 κ 和 λ) 的单抗筛选了大量抽提的人淀粉样蛋白

样品。令人感兴趣的是，时常发现，淀粉样蛋白用对其自身亚型有特异性的单抗、全部的 κ 或 λ 抗体以及 $\kappa 1(57-18H12)$ 、 $\kappa 4(11-1F4)$ 和 $\lambda 8(31-8C7)$ 单抗测试呈阳性。发现这三种制剂以非亚型特异性方式进行反应，即， $\kappa 1$ 单抗与包含除 $\kappa 1$ 外的 IgLC 的淀粉样蛋白反应；而另两种抗体表现出相同的性质。这表明这些抗体识别的表位可能是淀粉样原纤维的普遍性特征，表明可能靶向共同的淀粉样蛋白表位。

实施例 4 免疫化学染色

用标准免疫化学技术对淀粉样患者的组织样品染色，结果观察到相似的结合现象。图 3A-3D 显示抗 $\kappa 1$ 与 $\kappa 1$ 淀粉样蛋白结合，令人惊奇的是，抗 $\kappa 4$ 与 $\kappa 1$ 淀粉样蛋白反应，这提示这些抗体可能识别一个淀粉样蛋白表位。另外，抗 $\kappa 4$ 与含有 λ 的淀粉样蛋白反应(未说明)。这是交叉同种型反应性的一个例子。然而，ELISA 与免疫组织化学的结果并不总是相符。这可能是因为你所见现象的内在差别，即 ELISA 是采用抽提纯化的淀粉样蛋白进行的液相结合试验，而免疫组织化学在波片上固定的组织切片上进行。

根据布达佩斯条约，分泌抗 $\kappa 1$ 单抗的杂交瘤细胞样品(57-18-H12(ATCC 保藏号 PTA-104))、分泌抗 $\kappa 4$ 单抗的杂交瘤细胞样品(11-1F4(ATCC 保藏号 PTA-105))和分泌抗 $\lambda 8$ 单抗的杂交瘤细胞样品(31-8c7(ATCC 保藏号 PTA-103))于 1999 年 5 月 21 日保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

实施例 5 抗 IgLC 亚组的体内研究

将 0.1 毫克上述鉴定的三种抗体— $\kappa 1$ 、 $\kappa 4$ 或 $\lambda 8$ 中的一种注射入如上所述已经导入淀粉样瘤形式的淀粉样蛋白的小鼠大腿。 $\kappa 1$ 和 $\kappa 4$ 制剂导致宿主在 7 天内完全消除大多数种类的受测试的淀粉样原纤维(对于某些淀粉样蛋白来源短达 4 天)。图 4 显示了与人淀粉样蛋白结合的荧光素化的 $\kappa 4$ 单抗。

在上述两种体外研究中的某些情况下有反应性的 $\lambda 8$ 制剂在体内实验中使淀粉样瘤分辨率增加大约 10%。

实施例 6 抗 IgLC 亚组的体内研究

从炎症相关的 AA-淀粉样患者分离出人淀粉样蛋白，反复超声处理和研磨以允许其注入小鼠体内，制得用于注入 Balb/c 小鼠的制剂(见实施例 1)。在注射入 100 毫克人 AA-淀粉样蛋白抽提物后，立即用 100 微克 $\kappa 4$ 单抗、抗 AA-单抗、无单抗以及非特异性单抗对照(抗游离 κ)处理小鼠。在 48 小时内，在经 $\kappa 4$ 和抗 AA 单抗处理的动物中

观察到淀粉样物质完全消除。相反，对照动物有大块淀粉样蛋白物质留在注射部位。

实施例 7 特异性抗淀粉样原纤维单抗的制备

体外制得合成的淀粉样原纤维，并作为小鼠的免疫原来产生第一代抗淀粉样原纤维的单抗。简言之，用细菌表达系统和标准的蛋白质纯化技术产生、分离和纯化重组的 $\lambda 6$ -轻链、可变区肽。如 Wall 等人，"体外免疫球蛋白轻链原纤维形成"《酶学方法》39 卷(出版中)(该文纳入本文作为参考)中所描述的，通过在溶液中长期搅拌，从这些肽制得合成的原纤维。室温下 17000xg 离心 20 分钟，浓缩原纤维。

然后用浓缩的原纤维免疫 Balb/c 小鼠数周。用标准的杂交瘤技术产生分泌抗原纤维抗体的单克隆细胞系。所得抗体具有根据 ELISA 试验证实的抗原纤维活性(如实施例 3 所述)。当用 ELISA 测试时，这些抗体迄今与测试的所有人 IgLC 淀粉样抽提物中的 99%反应，而不论前体蛋白的同种型或亚组的性质如何。同样，抗体以 ELISA 形式与分离的鼠 AA-淀粉样蛋白以及衍生自阿尔茨海默病蛋白 A β [A β (25-35)]的肽组成的合成原纤维反应。

15

应理解，前述讨论和实施例仅仅详细地描述了本发明的某些较佳实施方案。因此，本领域普通技术人员显然能不背离本发明精神范围而作各种改动和等价变换。上文引用的所有文献、文章和专利均全部纳入本文作为参考。



第14天

图 1B



第1天

图 1A

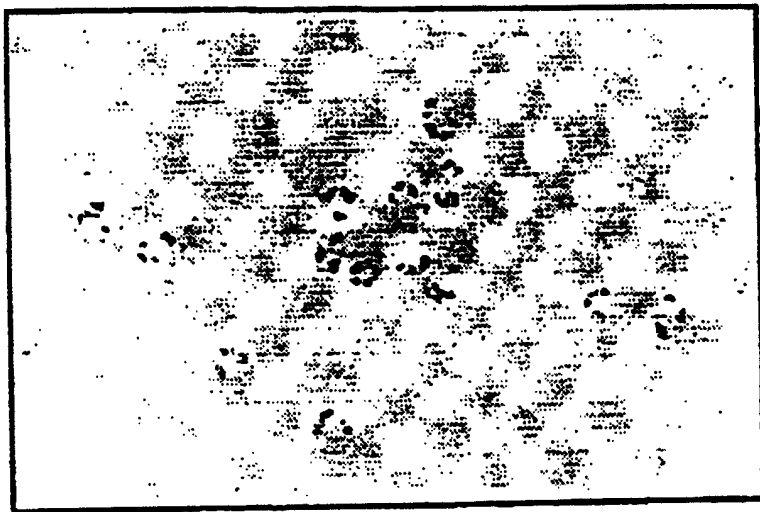


图 2A

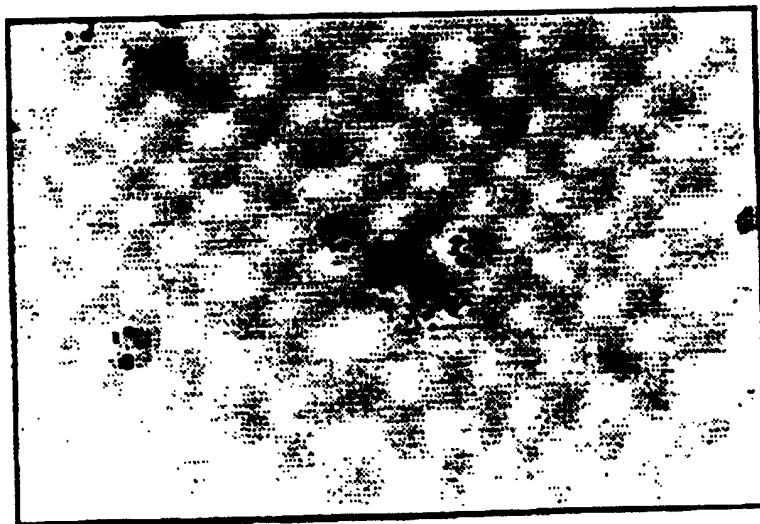


图 2B



Her

图 3A
CR



图 3C
抗-κIV (11-1F4)



图 3B
抗-κI (57-18-H12)



图 3D
抗-λVIII (31-8C7)

AMYI

