



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119770645 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 08

(21) 申请号 202411684173.X

G01N 33/74 (2006.01)

(22) 申请日 2019.02.07

A61P 25/28 (2006.01)

(30) 优先权数据

18155682.0 2018.02.08 EP

(62) 分案原申请数据

201980012542.1 2019.02.07

(71) 申请人 斯弗因高泰克有限公司

地址 德国亨尼希斯多夫

(72) 发明人 奥利·梅兰德

(74) 专利代理机构 北京睿阳联合知识产权代理

有限公司 11758

专利代理师 王莹

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书1页 说明书35页

序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

用于诊断和/或预测痴呆症的肾上腺髓质素和抗肾上腺髓质素结合物在治疗或预防痴呆症中的应用

(57) 摘要

本发明涉及用于诊断和/或预测痴呆症的肾上腺髓质素和抗肾上腺髓质素结合物在治疗或预防痴呆症中的应用,还涉及一种方法,其用于诊断痴呆症,或确定没有痴呆症的对象患痴呆症的风险,或监测患有痴呆症的对象的治疗或监测或指导患有痴呆症的对象干预,或监测有患痴呆症风险的对象的干预或监测或指导有患痴呆症风险的对象的预防性干预。

1. 抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在制备预防和治疗对象的痴呆症的药物中的应用,其中所述抗ADM抗体或抗ADM片段或抗ADM非Ig骨架结合到肾上腺髓质素的N-末端部分(aa 1-21):

YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC (SEQ ID No.:21)。

2. 根据权利要求1所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在制备预防和治疗对象的痴呆症的药物中的应用,其中在所述对象的体液样品中确定的所述对象所具有的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平低于阈值水平,和/或所述对象具有标志物水平比值,所述标志物水平比值是在所述对象的体液样品中确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平与在所述对象的体液样品中确定的肾上腺髓质素前体或其片段的水平的比值,并且其中所述标志物水平比值低于比值阈值。

3. 根据权利要求2所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在制备预防和治疗对象的痴呆症的药物中的应用,其中所述肾上腺髓质素前体的片段选自PAMP (SEQ ID No.:2)、MR-proADM (SEQ ID No.:3)、ADM-Gly (SEQ ID No.:5) 和CT-proADM (SEQ ID No.:6)。

4. 根据权利要求2或3所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在制备预防和治疗对象的痴呆症的药物中的应用,其中SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的阈值水平等于或低于15pg/mL。

5. 根据权利要求4所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在制备预防和治疗对象的痴呆症的药物中的应用,其中SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的阈值水平等于或低于10pg/mL。

6. 根据权利要求5所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在制备预防和治疗对象的痴呆症的药物中的应用,其中SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的阈值水平等于或低于5pg/mL。

7. 根据权利要求2或3所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在制备预防和治疗对象的痴呆症的药物中的应用,其中所述标志物水平比值在0.2至0.75的范围内。

8. 根据权利要求7所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在制备预防和治疗对象的痴呆症的药物中的应用,其中所述标志物水平比值在0.3至0.6的范围内。

9. 根据权利要求8所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在制备预防和治疗对象的痴呆症的药物中的应用,其中所述标志物水平比值在0.4至0.5的范围内。

## 用于诊断和/或预测痴呆症的肾上腺髓质素和抗肾上腺髓质素结合物在治疗或预防痴呆症中的应用

[0001] 本申请是申请号为201980012542.1、发明名称为“用于诊断和/或预测痴呆症的肾上腺髓质素和抗肾上腺髓质素结合物在治疗或预防痴呆症中的应用”、申请日为2019年2月7日的中国专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本申请涉及疾病诊断领域,尤其涉及痴呆症的诊断、预测、治疗或预防。

### 背景技术

[0003] 痴呆症是一种以表现为记忆困难、语言障碍、心理和精神病学变化以及日常生活活动障碍的一系列症状和体征为特征的临床综合征。痴呆症综合征的不同病因(有时被称为亚型)是:阿兹海默氏病(约占病例的50%),血管性痴呆(约占25%),混合性阿兹海默氏病和血管性痴呆(包括在上述之内,占25%),路易体痴呆(15%),以及包括额颞叶痴呆、局灶性痴呆(例如进行性失语)、皮层下痴呆(例如帕金森氏病痴呆)和痴呆综合征的继发病因(例如颅内病变)在内的其他病因(合计约5%)。

[0004] 阿兹海默氏病(AD)是最普遍的痴呆症形式。随着世界人口的老龄化,AD的发病频率迅速增加,并且越来越多的人进入这种年龄相关疾病的主要危险期。从目前受影响的530万美国公民,到2050年,受害者人数将增加到1300万或更多;全世界受影响的个体总数将增加到惊人的1亿(Alzheimer's Association, 2015 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimers Dement* 2015; 11: 332-84)。AD患者脑中的关键分子机制和组织病理学标志包括多个生物化学事件的动态级联,所述事件包括淀粉样肽前体蛋白(APP)的病理性产淀粉样肽裂解,包括淀粉样肽- $\beta$ 肽( $A\beta_{1-42}$ )、二聚体、三聚体、寡聚体在内的各种不同 $\beta$ -淀粉样肽物质的产生以及随后淀粉样肽在斑块中聚集和沉积,tau蛋白的异常过磷酸化和聚集,进行性细胞内神经原纤维变性,先天免疫系统内的变化和炎症。

[0005] 约5%的患者在65岁之前出现症状,并被定性为患有“早发性阿兹海默氏病”(EOAD)的患者。这些患者大多数具有散发形式的所述疾病,但10-15%的患者具有遗传形式,其通常以常染色体显性方式遗传。已提出了三个基因参与EOAD的发生:早老蛋白1和2和淀粉样肽前体蛋白(APP)基因。其他候选基因也在研究中。遗传形式倾向于在30或40岁开始并具有侵袭性过程,而散发EOAD倾向于在50岁之后开始,并且通常具有类似于“迟发性阿兹海默氏病”(LOAD)的时间特征。

[0006] 心理状态测试评估记忆力、解决简单问题的能力和其他思考技能。这样的测试可以总体了解一个人是否意识到症状,知道日期、时间以及他/她在哪里,可以记住一小组单词,遵从指示和进行简单的计算。小型精神状态检查(MMSE)和小型认知测试是两种常用的测试。MMSE或Folstein测试是一种30个点的调查问卷,被广泛用于临床和研究环境中以衡量认知障碍(Pangman等, 2000. *Applied Nursing Research* 13(4): 209-213; Folstein等, 1975. *Journal of Psychiatric Research*. 12(3): 189-98)。在MMSE期间,卫生健康专业

人员询问患者一系列旨在测试多种日常心理技能的问题。MMSE最高评分为30点。20至24的评分表明轻度痴呆,13至20的评分表明中度痴呆,小于12的评分指示严重痴呆。平均而言,患有阿兹海默氏病的人的MMSE评分每年下降约2至4点。MMSE的优点包括对于实施来说不需要专门的设备或培训,并且对阿兹海默氏病的诊断和纵向评估而言具有有效性和可靠性两者。在小型认知测试过程中,要求一个人完成两项任务,记住并在几分钟后重复三个普通物体的名称,和画一个钟面,在正确的位置显示所有12个数字并显示检查者指定的时间。这个简短测试的结果可以帮助医生确定是否需要进一步评估。其他测试也被使用,例如Hodkinson简略心理测试评分(Hodkinson1972. *Age and ageing*. 1(4): 233-8)或全科医生认知功能评估、计算机化测试例如CoPs和心理属性剖析系统以及用于特定缺陷的更深入分析的更长时间的正式测试。

[0007] 轻度认知障碍(MCI)是一种具有几种潜在原因的异质性临床病症。然而,大部分的MCI代表了健康的衰老与非常轻度的AD之间的过渡状态(DeCarli 2003. *Lancet Neurol*. 2:15-21)。因此,研究表明,MCI对象倾向于以每年大约10%-15%的比值发展成临床上可能的AD(Markesbery2010. *JAlzheimers Dis*. 19:221-228)。

[0008] 阿兹海默氏病通常基于患者病史、亲属病史和行为观察来诊断。特征性神经学和神经心理学特点的存在以及可选病症的不存在是支持性的。使用计算机断层扫描(CT)或磁共振成像(MRI)以及单光子发射计算机断层扫描(SPECT)或正电子发射断层扫描(PET)的高级医学成像可用于帮助排除其他脑部病理或痴呆症亚型。此外,它可以预测从前驱期(轻度认知障碍)向阿兹海默氏病的转化。包括记忆力测试在内的智力功能评估可以进一步表征所述疾病的状态。医疗组织已经创建了诊断标准,以简化和规范执业医师的诊断过程。在死后,当脑材料可获得并且可以进行组织学检查时,可以以非常高的准确性确认诊断。

[0009] 迄今为止,对这种疾病仅存在对症治疗,所有这些对症治疗都试图抵消神经递质的紊乱。目前有三种胆碱酯酶抑制剂可用,它们已被批准用于治疗轻度至中度AD。可用于中度至重度AD的另一种治疗选项是美金刚胺,它是一种N-甲基-D-天冬氨酸受体非竞争性拮抗剂。能够阻止或至少有效改变AD病程的治疗,也被称为“疾病改善”药物,仍在广泛研究之中。

[0010] 迫切需要新的疗法来治疗受影响的患者并预防、延迟、减缓恶化或改善AD症状。据估计,如果疾病的发作可以推迟5年,则所述疾病的总发生率将降低近50%。对症治疗是旨在增强认知或控制神经心理学症状的药物,且通常通过神经递质机制起作用;疾病改善疗法或治疗(DMT)是预防、延迟或减缓进展并靶向AD的隐含病理生理机制的药剂。目前,有100多种药剂正在AD治疗的开发流程中(Cummings等,2017. *Alzheimer's&Dementia: Translational Research&Clinical Interventions* 3:367-384)。

[0011] 路易体痴呆(DLB)是一种随时间而恶化的痴呆症。其他症状可能包括警觉波动、幻视、运动缓慢、行走困难和僵硬。DLB是继阿兹海默氏病和血管性痴呆之后最常见的痴呆病因。它通常在50岁以后开始。65岁以上的人中约有0.1%受到影响。男性似乎比女性更容易受到影响。潜在的机制涉及神经元中由 $\alpha$ -突触核蛋白构成的路易体的形成。可以根据症状做出疑似诊断,并进行血液测试和医学成像以排除其他可能的病因。目前尚无DLB的治愈方法。治疗是支持性的,并试图缓解与所述疾病有关的某些运动和神经心理学症状。乙酰胆碱酯酶抑制剂例如多奈哌齐可能会提供一些益处。使用左旋多巴可以改善一些运动问题。对于综

述,参见McKeith等,2017. *Neurology* 89: 88-100。

[0012] 血管性痴呆 (VaD),也被称为多发性梗塞性痴呆 (MID) 和血管性认知障碍 (VCI),是由脑部血液供应问题引起的痴呆症,所述血液供应问题通常是一系列轻度中风,导致逐步发生的恶化的认知下降。所述术语是指由脑血管疾病和风险因素的复杂相互作用构成的综合征,导致由于中风和病变引起的大脑结构变化和由此造成的认知变化。做出所述诊断需要中风与认知缺损之间的时间关系。由于经常重叠的临床特征和相关的基础病理学,区分不同的痴呆综合征可能具有挑战性。特别是阿兹海默氏病痴呆经常与血管性痴呆同时发生。患有血管性痴呆的人在多次脑血管事件 (中风) 后,通常逐步地如轻度认知障碍中那样急性或亚急性地表现出进行性认知障碍。对于综述,参见Venkat等,2015. *ExpNeurol*272: 97-108。

[0013] 额颞叶痴呆 (FTD) 是额颞叶变性的临床表现,其特征是主要涉及额叶或颞叶的进行性神经元丧失,通常丧失超过70%的纺锤体神经元,而其他神经元类型则保持完整。FTD 占年轻发作型痴呆症病例的20%。体征和症状通常在成年后期、更通常在55岁至65岁之间显现,对男性和女性的影响大致相同。常见的症状和体征包括社交和个人行为的显著改变、冷漠、情绪低落以及表达和接受性语言两者的缺陷。目前,尚无治愈FTD的方法,但有一些治疗有助于缓解症状。对于综述,参见Bott等,2014. *Neurodegener Dis Manag*4 (6) :439-454。

[0014] 肾上腺髓质素 (ADM) 这种肽首次在Kitamura等的文章 (Kitamura等, 1993. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 192 (2) :553-560) 中被描述为一种从人嗜铬细胞瘤分离的包含52个氨基酸的新的降血压肽。同一年,编码包含185个氨基酸的前体肽的cDNA以及该前体肽的完整氨基酸序列被报道。尤其是包含N-末端处21个氨基酸信号序列的所述前体肽被称为“肾上腺髓质素前体肽原” (pre-proADM)。pre-proADM 包含185个氨基酸 (SEQ ID No.:1)。成熟的ADM-NH<sub>2</sub>显示在SEQ ID No.:4中,ADM-Gly显示在SEQ No.5中。

[0015] 所述成熟肾上腺髓质素肽是一种酰胺化肽 (ADM-NH<sub>2</sub>),其包含52个氨基酸 (SEQ ID No.:4) 并包含通过蛋白水解切割形成的pre-proADM的第95至146位氨基酸。迄今为止,在所述pre-proADM的切割中形成的肽片段中只有几个片段已被更精确地表征,特别是生理活性肽肾上腺髓质素 (ADM) 和包含紧随pre-proADM的信号肽的21个氨基酸之后的20个氨基酸 (22-41) (SEQ ID No.:2) 的肽“PAMP”。此外,对于ADM和PAMP两者来说,均发现并更详细研究了具有生理活性的子片段。1993年对ADM的发现和表征引发了深入的研究活动和大量的出版物,其结果最近已被概述在各个综述文章中,在本描述的情形中,特别地参考了文章Takahashi 2001. *Peptides* 22:1691;Eto等,2001. *Peptides* 22:1693-1711和Hinson等, 2000 *Endocrine Reviews*21 (2) :138-167。

[0016] 在迄今为止的科学研究中,尤其发现ADM可以被视为一种多功能调节肽。它部分地被甘氨酸延长的无活性形式释放到循环中 (Kitamura等,1998. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244 (2) :551-555)。还存在特异性针对ADM并可能同样调节ADM的作用的结合蛋白 (Pio等,2001. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (15) : 12292-12300)。

[0017] 那些在迄今为止的研究中最重要的ADM以及PAMP的生理效应是影响血压的效应。因此,ADM是有效的血管扩张剂。

[0018] 此外,已发现上面提到的从pre-proADM形成的另一种生理活性肽PAMP同样表现出降血压效果,尽管它似乎具有不同于ADM的作用机制(Eto等,2001.Peptides22:1693-1711;Hinson等,2000EndocrineReviews21(2):138-167;Kuwasako等,1997.FEBS Lett 414(1):105-110;Kuwasaki等,1999. Ann. Clin. Biochem. 36: 622-628;Tsuruda等,2001.Life Sci.69(2):239-245;Kangawa等,EP0 622458)。

[0019] 此外,已发现在大量病理状态下,可以在循环和其他生物流体中测量的ADM浓度显著高于在健康对照者中发现的浓度。因此,在具有充血性心力衰竭、心肌梗塞、肾脏疾病、高血压疾病、糖尿病的患者中,在休克的急性期以及在脓毒症和脓毒性休克中,ADM水平显著提高,尽管提高程度不同。在某些所述病理状态下PAMP的浓度也提高,但血浆水平相对于ADM降低(Eto等,2001.Peptides 22:1693-1711)。

[0020] 此外,已知在脓毒症或脓毒性休克中将观察到异常高浓度的ADM(Eto等,2001.Peptides22: 1693-1711;Hirata等,1996.Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism81(4):1449-1453;Ehlenz等,1997.ExpClinEndocrinolDiabetes105:156-162;Tomoda等,2001. Peptides 22: 1783-1794;Ueda等,1999 Am. J. Respir. Crit. Care Med.160:132-136;Wang等,2001.Peptides22:1835-1840)。所述发现与已知是具有脓毒症和其他严重综合征例如SIRS的患者中作为疾病过程的常见现象的典型的血液动力学变化相关。肾上腺髓质素在脓毒症发展期间(Wang, Shock1998,10(5):383-384;Wang等,1998. Archives of surgery 133(12): 1298-1304)和大量急性和慢性疾病中(Parlapiano等,1999.European Review forMedical and Pharmacological Sciences 3: 53-61;Hinson等,2000 Endocrine Reviews 21(2):138-167)发挥关键作用。

[0021] 已描述了测量循环ADM水平的几种方法:通过确定同源前体肽的更稳定的片段来直接或间接地测量ADM。最近发表了一种方法,描述了测量循环成熟ADM的测定法(Weber等,2017.Journalof applied LaboratoryMedicine,2(2):222-233)。

[0022] 定量源自于ADM前体的片段的其他方法已被描述,例如MR-proADM(Morgenthaler等,2005.Clin Chem51(10):1823-9)、PAMP(Washimine等,1994.BiochemBiophysRes Commun 202(2):1081-7)和CT-proADM(EP 2 111 552)的测量。用于在全自动系统上测量血浆中的MR-proADM的商品化均相时间分辨荧光免疫测定法是可用的(BRAHMS MR-proADM KRYPTOR;BRAHMS GmbH,Hennigsdorf,Germany)(Caruhel等,2009.Clin Biochem 42(7-8):725-8)。由于这些肽以一定的化学定量比率从相同前体产生,因此它们的血浆水平在一定程度上相关。

[0023] 在几项研究中探索了MR-proADM在痴呆症和AD中的作用。在具有可能的AD的患者中测量到的MR-proADM的血浆水平与认知正常的老年健康对照相比提高(Buerger等,2009. Biological Psychiatry 2009; 65:979-984)。单独的MR-proADM血液浓度显示出在81%的特异性下灵敏度为47%的分类准确度,并且MR-proADM与另一种生物标志物CT-proET-1的比率对于AD的检测来说在81%的特异性下显示出66%的灵敏度。此外,MR-proADM的血浆浓度在从痴呆前MCI到临床AD的进展中具有预测价值(Buerger等,2010.J ClinPsychiatry72(4):556-563)。也在超过5000位没有普遍痴呆症的个体的基于人群的组群中测量了MR-proADM,并显示出其在发生痴呆症的参与者中升高,但在对传统风险因子进行调整后没有表明风险提高(Holm等,2017.Journal ofInternal Medicine 282: 94-101)。在参与动脉

粥样硬化的纵向研究的患者中,MR-proADM水平随着脑深部白质病变(DWML)等级的发展而显著提高(Kuriyama等,2017. *Journal of Alzheimer's Disease* 56: 1253-1262)。此外,在MR-proADM水平与认知测试评分之间观察到显著的反相关。

[0024] 已显示,与年龄匹配的对照相比,在来自于AD患者的额叶皮层中肾上腺髓质素增加(Ferrero等,2017. *Mol Neurobiol*.doi:10.1007/s12035-017-0700-6,印刷版之前的电子版)。然而,关于具有痴呆症、特别是阿兹海默氏病的患者中的血浆ADM,尚无了解。

[0025] 通过将微线圈双侧放置在颈总动脉上,在小鼠中复制出皮层下血管性痴呆模型。使用过表达循环ADM的小鼠,评估了ADM对脑灌注、脑血管结构、氧化应激、白质变化、认知功能以及cAMP、血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的脑水平的影响。这些数据表明,在慢性脑灌注不足后,ADM促进动脉生成和血管生成,抑制氧化应激,保留白质完整性并防止认知下降。因此,ADM可以充当解决皮层下血管性痴呆的一种策略。(Maki等,2011. *Stroke* 42:1122-1128)。

### 发明内容

[0026] 本发明的主题内容是一种方法,其用于:

[0027] a) 诊断痴呆症,或

[0028] b) 确定没有痴呆症的对象患痴呆症的风险,或

[0029] c) 监测患有痴呆症的治疗或监测或指导患有痴呆症的干预,或

[0030] d) 监测有患痴呆症风险的对象的治疗或监测或指导有患痴呆症风险的对象预防性干预,

[0031] 其中确定对象的体液样品中SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平,并且其中将所述成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平与阈值水平进行比较,

[0032] 并且其中

[0033] a) 如果所述SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平低于所述阈值水平,则所述对象被诊断为患有痴呆症,或者其中

[0034] b) 如果所述SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平低于所述阈值水平,则所述对象患痴呆症的风险增加,或者其中

[0035] c) 如果在治疗或干预过程中所述SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平提高,则在治疗或干预下患有痴呆症或有患痴呆症风险的对象状况正在改善,和/或其中如果所述SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平提高到高于所述水平阈值,则干预可以继续。

[0036] 本发明的另一个主题内容是一种方法,其用于:

[0037] a) 诊断痴呆症,或

[0038] b) 确定没有痴呆症的对象患痴呆症的风险,或

[0039] c) 监测患有痴呆症的对象的治疗或监测或指导患有痴呆症的对象干预,或

[0040] d) 监测有患痴呆症风险的对象预防性治疗或监测或指导有患痴呆症风险的对象预防性干预,

[0041] 其中确定标志物比值,所述标志物比值可以是确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平与确定的肾上腺髓质素前体或其片段(其不是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 在所述对象的体液样品中的水平的比值,并且其中将所述标

志物比值与比值阈值进行比较,

[0042] 并且其中

[0043] a) 如果所述成熟ADM-NH<sub>2</sub>/肾上腺髓质素前体或其片段的标志物比值低于所述比值阈值,则所述对象被诊断为患有痴呆症,或者其中

[0044] b) 如果所述成熟ADM-NH<sub>2</sub>/肾上腺髓质素前体或其片段的标志物比值低于所述比值阈值,则所述对象患痴呆症的风险增加,或者其中

[0045] c) 如果在治疗或干预过程中所述标志物比值提高,则在治疗或干预下患有痴呆症或有患痴呆症风险的对象的状态正在改善,并且其中如果所述标志物比值的水平提高到高于所述比值阈值,则干预可以继续。

[0046] 或者,将确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平和确定的肾上腺髓质素前体或其片段(其不是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 在所述对象的体液样品中的水平通过数学算法合并,其中所述算法的结果被用于诊断痴呆症,或确定没有痴呆症的对象患痴呆症的风险,或监测患有痴呆症的对象的治疗或监测或指导患有痴呆症的对象的干预,或监测有患痴呆症风险的对象的预防性治疗或监测或指导有患痴呆症风险的对象的预防性干预。

## 附图说明

[0047] 图1:图1示出了典型的bio-ADM剂量/信号曲线和在100μg/mL的抗体NT-H存在下的bio-ADM剂量信号曲线。

[0048] 图2:图2示出了在MPP组群和独立的阿兹海默氏病组群中的bio-ADM浓度。

[0049] 图3:图3示出了在用于预测阿兹海默氏病的MPP组群中bio-ADM浓度的Kaplan-Meier图。

[0050] 图4:图4示出了在用于预测阿兹海默氏病的MPP (病例对照) 组群的子组群和独立的AD组群中bio-ADM浓度的盒须图。

[0051] 图5:图5示出了在用于预测阿兹海默氏病的MPP (病例对照) 组群的子组群中MR-proADM浓度的盒须图。

[0052] 图6:图6示出了在用于预测阿兹海默氏病的MPP (病例对照) 组群的子组群中bio-ADM/MR-proADM比值的盒须图。

[0053] 图7:图7示出了在用于预测阿兹海默氏病的MPP (病例对照) 组群的子组群中bio-ADM (A) 和bio-ADM与MR-proADM的比值 (B) 的ROC图。

[0054] 图8:图8示出了在给药NT-H抗体后健康人类个体中的bio-ADM值。

## 具体实施方式

[0055] 本发明的一个惊人发现是,在晚些时候发展出痴呆症、特别是AD的健康患者中,成熟ADM的水平显著降低。此外,令人吃惊地发现,如果对象患有痴呆症、特别是阿兹海默氏病痴呆,则成熟ADM水平显著降低。从实施例可以看到,肾上腺髓质素、特别是SEQ ID No.:4所示的ADM-NH<sub>2</sub>的基线水平预测了痴呆症、特别是阿兹海默氏病痴呆的存在。

[0056] 此外,已令人吃惊地发现,如果ADM-NH<sub>2</sub>/肾上腺髓质素前体或其片段的标志物比值低于一定的标志物水平比值,则对象被诊断为患有痴呆症,特别是AD。此外,已令人吃惊

地发现,如果ADM-NH<sub>2</sub>/肾上腺髓质素前体或其片段的标志物水平比值低于一定的标志物水平比值阈值,则对象患痴呆症的风险增加。此外,已令人吃惊地发现,如果在治疗或干预过程中所述标志物水平比值提高,则在治疗或干预下患有痴呆症、特别是AD或有患痴呆症、特别是AD的对象的对象的状态正在改善,并且其中如果所述标志物比值的水平提高到高于所述比值阈值,则干预可以继续。

[0057] 或者,将确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平和确定的肾上腺髓质素前体或其片段(其不是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 在所述对象的体液样品中的水平通过数学公式或算法合并,其中所述公式或算法的结果被用于诊断痴呆症,或确定没有痴呆症的对象的患痴呆症的风险,或监测患有痴呆症的对象的治疗或监测或指导患有痴呆症的对象的干预,或监测有患痴呆症风险的对象的预防性治疗或监测或指导有患痴呆症风险的对象的预防性干预。

[0058] 因此,本发明的惊人发现是,循环中的成熟ADM (SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 在患有痴呆症或有患痴呆症风险的对象中的水平降低。此外,循环中的肾上腺髓质素前体或其片段(其不是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 在患有痴呆症或有患痴呆症风险的对象中的水平提高。已知成熟ADM (SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 是一种负责血管完整性和血管内皮功能的激素。还已知,血管内皮功能障碍与大量最可怕的人类疾病例如外周血管疾病、中风、心脏病、糖尿病、慢性肾功能衰竭以及转移和痴呆症有关。(Rajendran等,2013. *Int. J. Biol. Sci.* 9(19): 1057-1069)。

[0059] 循环中高水平的肾上腺髓质素前体或其片段(其不是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 似乎表明身体需要修复血管内皮的功能并需要支持血管完整性。然而,低水平的成熟ADM (SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 表明尽管pro-ADM的水平高,但从ADM-Gly向成熟ADM (SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 的转化似乎被扰乱。

[0060] 已知在患有阿兹海默氏病的患者、患有MCI的患者或将发生AD的对象的循环中MR-proADM浓度升高(Buerger等,2009. *Biological Psychiatry* 2009;65:979-984; Buerger等,2010. *J Clin Psychiatry* 72(4):556-563;Holm等,2017. *Journal of Internal Medicine* 282:94-101)。这显示出ADM合成途径被激活。然而,没有提及生物活性ADM的浓度。本发明显示,在患有AD的患者和将发生AD的患者中,循环中活性ADM (bio-ADM) 的浓度令人吃惊地较低(实施例6)。此外,越来越多的证据表明,脑微血管系统的损伤是阿兹海默氏病的病理生理的促成因素(Iadecola 2013. *The pathobiology of vascular dementia. Neuron* 2013;80(4):844-866)。组织学评估和白蛋白取样研究的结果显示,血脑屏障(BBB) 的通透性提高可能是关键机制(Benarroch 2007, *Neurovascular unit dysfunction: a vascular component of Alzheimer disease?*, *Neurology* 68(20):1730-1732)。在最近的研究中证实,患有早期AD的患者中的全面BBB泄漏与认知下降相关(Nation等,2019. *Nature Medicine* <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0297-y>;vandeHaar等,2016 *Radiology* 281(2):527-535)。N-末端抗ADM抗体显示出使肾上腺髓质素稳定并引起循环活性ADM增加(Geven等,2018, *Effects of humanized anti-adrenomedullin antibody Adrecizumab (HAM8101) on vascular barrier function and survival in rodent model of adrenomedullin and the anti-adrenomedullin antibody Adrecizumab in sepsis*, *Shock* 50(2):132-140)。在实施例7和图8中示出了引起健康患者血液中bio-ADM的快速增加的效果。

循环中ADM的增加对内皮细胞造成有益效果,例如毛细血管泄漏的减少。例如,已显示在系统性炎症和脓毒症的实验模型中N-末端抗ADM抗体(HAM8101, Adrecizumab)增强内皮屏障功能(Geven等,2018, Effects of humanized anti-adrenomedullin antibody Adrecizumab (HAM8101) on vascular barrier function and survival in rodent models of systemic inflammation and sepsis, *Shock* 50(6):648-654)。因此,可以使用N-末端ADM结合物、更具体来说是N-末端抗ADM抗体来提高患有痴呆症或具有发生痴呆症风险的患者、特别是患有阿兹海默氏病痴呆的患者的血液中的bio-ADM浓度。

[0061] 因此,概括来说,在身体需要修复血管内皮功能并需要支持血管完整性的患者中,循环中低水平的ADM、特别是生物活性ADM,可能指示了在所述患者中ADM的加工被扰乱。身体需要修复血管内皮功能并需要支持血管完整性的患者,可以如在本发明的方法中概述的通过确定SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在对象的体液样品中的水平并将所述成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平与阈值水平进行比较,或者如在本发明的方法中概述的通过确定标志物比值,其可以是确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平与确定的肾上腺髓质素前体或其片段(其不是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 在所述对象的体液样品中的水平的比值,并将所述标志物比值与阈值比值进行比较,来表征和鉴定。

[0062] 此外或可选地,身体需要修复血管内皮功能并需要支持血管完整性的患者可能是具有全面BBB泄漏或BBB崩溃的患者。全面BBB泄漏或BBB崩溃可以如下所述来确定:测量白蛋白或免疫球蛋白G(IgG)的脑脊液(CSF)/血清比值(Akaishi等,2015. Neurology and Clinical Neuroscience 3:94-100),或成像技术例如动态敏感性对比增强磁共振成像(DSC-MRI)或动态对比增强MRI(DCE-MRI)(Raja等,2018. Neuropharmacology 134:259-271)。

[0063] 因此,为了预防人类认知障碍或阻止人类认知障碍的发展或者为了预防或治疗痴呆症而需要提高bio-ADM水平的患者的分层和鉴定,通过如上所述的方法中的任一者来进行。

[0064] 在实施例和图8中已显示,在N-末端抗ADM抗体给药后,健康患者血液中的bio-ADM快速增加,这可能有助于修复泄漏或损坏的血脑屏障。因此,在如上所述鉴定和/或分层的对象中N-末端抗ADM抗体的给药有助于痴呆症的预防和治疗,似乎是有道理的。

[0065] 因此,另一个目的是在成熟ADM(SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>)水平降低和/或确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平与肾上腺髓质素前体或其片段(其不是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 在体液样品中确定的水平的比值降低的对象中提供治疗。所述患者组可以用抗肾上腺髓质素(ADM)抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架治疗,用于在对象中预防或治疗痴呆症,其中所述抗ADM抗体或抗ADM片段或抗ADM非Ig骨架结合到肾上腺髓质素的N-末端部分(aa 1-21):

[0066] YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC(SEQ ID No.:21)。

[0067] 在本发明的另一个实施方式中,所述待治疗的对象除了上面提到的判据之外还显示出轻度认知障碍的体征或痴呆症的体征。

[0068] 已知向对象给药抗肾上腺髓质素(ADM)抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架提高了对象的循环中成熟ADM(SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>)的浓度,并因此改善了患有痴呆症或具有痴呆症风险的对象的状态。

[0069] 本发明的主题内容是一种方法,其用于:

[0070] a) 诊断痴呆症,或

[0071] b) 确定没有痴呆症的对象患痴呆症的风险,或

[0072] c) 监测患有痴呆症的对象的治疗或监测或指导患有痴呆症的对象干预,或

[0073] d) 监测有患痴呆症风险的对象的治疗或监测或指导有患痴呆症风险的对象预防性干预,

[0074] 其中确定对象的体液样品中SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平,并且其中将所述成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平与阈值水平进行比较,

[0075] 并且其中

[0076] a) 如果所述SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平低于所述阈值水平,则所述对象被诊断为患有痴呆症,或者其中

[0077] b) 如果所述SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平低于所述阈值水平,则所述对象患痴呆症的风险增加,或者其中

[0078] c) 如果在治疗或干预过程中SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平提高,则在治疗或干预下患有痴呆症或有患痴呆症风险的对象状况正在改善,和/或其中如果SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平提高到高于所述水平阈值,则干预可以继续。

[0079] 在一个实施方式中,本发明的主题内容是一种方法,其用于:

[0080] a) 诊断痴呆症,或

[0081] b) 确定没有痴呆症的对象患痴呆症的风险,或

[0082] c) 监测患有痴呆症的对象的治疗或监测或指导患有痴呆症的对象干预,或

[0083] d) 监测有患痴呆症风险的对象预防性治疗或监测或指导有患痴呆症风险的对象预防性干预,

[0084] 其中确定标志物比值,所述标志物比值可以是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中确定的水平与确定的肾上腺髓质素前体或其片段(其不是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 在所述对象的体液样品中的水平的比值,并且其中将所述标志物比值与比值阈值进行比较,

[0085] 并且其中

[0086] a) 如果所述成熟ADM-NH<sub>2</sub>/肾上腺髓质素前体或其片段的标志物比值低于所述比值阈值,则所述对象被诊断为患有痴呆症,或者其中

[0087] b) 如果所述成熟ADM-NH<sub>2</sub>/肾上腺髓质素前体或其片段的标志物比值低于所述比值阈值,则所述对象患痴呆症的风险增加,或者其中

[0088] c) 如果在治疗或干预过程中所述标志物比值提高,则在治疗或干预下患有痴呆症或有患痴呆症风险的对象的状态正在改善,并且其中如果所述标志物比值的水平提高到高于所述比值阈值,则干预可以继续。

[0089] 或者,将确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平和确定的肾上腺髓质素前体或其片段(其不是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 在所述对象的体液样品中的水平合并数学公式或算法中,其中所述公式或算法的结果被用于诊断痴呆症,或确定没有痴呆症的对象患痴呆症的风险,或监测患有痴呆症的对象的治疗或监测或指导患有痴呆症的对象干预,或监测有患痴呆症风险的对象预防性治疗或监测

或指导有患痴呆症风险的对象的预防性干预。

[0090] 在本发明的一个实施方式中,在任意情况下确定两种标志物的水平:确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平,和确定的肾上腺髓质素前体或其片段(其不是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>)在所述对象的体液样品中的水平。将两种标志物水平用于进行计算,其可以是两种标志物的比值(例如成熟ADM-NH<sub>2</sub>与pro-ADM或其片段之间的比值或proADM或其片段与成熟ADM-NH<sub>2</sub>之间的比值),或其中引入了两种标志物的数学公式或其中引入了两种标志物的数学算法。这种比值或数学公式或数学算法的结果可以是一个值,然后将其与预定的阈值进行比较,然后将这种比较用于诊断痴呆症,或确定没有痴呆症的对象患痴呆症的风险,或监测患有痴呆症的对象的治疗或监测或指导患有痴呆症的对象干预,或监测有患痴呆症风险的对象的预防性治疗或监测或指导有患痴呆症风险的对象的预防性干预。

[0091] 在本发明的主题内容的一个实施方式中,所述肾上腺髓质素前体的片段选自PAMP (SEQ ID No.:2)、MR-proADM (SEQ ID No.:3)、ADM-Gly (SEQ ID No.:5) 和CT-proADM (SEQ ID No.:6)。

[0092] 在本发明的主题内容的一个实施方式中,SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的阈值水平等于或低于15pg/mL,优选地等于或低于10pg/mL,优选地等于或低于5pg/mL。

[0093] 在本发明的主题内容的一个实施方式中,所述标志物水平比值阈值在0.2至0.75、优选地0.3至0.6、优选地0.4至0.5的范围内。

[0094] 为了计算所述比值,所述两种标志物的浓度必须优选地用相同单位(例如pmol/L)表示。

[0095] 在本发明的主题内容的一个实施方式中,所述体液样品选自具有轻度认知障碍(MCI)、阿兹海默氏病、血管性痴呆、混合性阿兹海默氏病和血管性痴呆、路易体痴呆、额颞叶痴呆、局灶性痴呆(例如进行性失语)、皮层下痴呆(例如帕金森氏病痴呆)和痴呆综合征的继发病因(例如颅内病变)的患者。

[0096] 在本发明的主题内容的一个实施方式中,所述体液样品获取自在取样时从未有痴呆症或MCI诊断的对象。

[0097] 在本发明的主题内容的一个实施方式中,确定至少一种另外的临床参数,其选自年龄、种族、精神状态测试(例如小型精神状态检查(MMSE))、神经成像(CT、MRT、PET、SPECT)、家族史、ApoE4基因型、淀粉样肽 $\beta$ 1-42 ( $A\beta_{1-42}$ )、淀粉样肽 $\beta$ 1-40 ( $A\beta_{1-40}$ )、总Tau蛋白、磷酸化Tau蛋白(p-Tau 181、p-Tau 199、p-Tau 231)。

[0098] 在本发明的主题内容的一个实施方式中,所述标志物的水平通过免疫测定法来确定。

[0099] 在本发明的主题内容的一个实施方式中,所述方法被用于患者分层,以选择使用抗肾上腺髓质素(ADM)抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架治疗的患者,用于在对象中预防或治疗痴呆症,其中所述抗ADM抗体或抗ADM片段或抗ADM非Ig骨架结合到肾上腺髓质素的N-末端部分(aa 1-21):

[0100] YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC (SEQ ID No.:21)。

[0101] 本发明的主题内容是一种抗肾上腺髓质素(ADM)抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述抗ADM抗体或抗ADM片段

或抗ADM非Ig骨架结合到肾上腺髓质素的N-末端部分(aa 1-21):

[0102] YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTC (SEQ ID No.:21)。

[0103] 本发明的主题内容是一种抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述对象的确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平低于阈值水平,和/或所述对象具有一定的标志物比值,其是确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平与确定的肾上腺髓质素前体或其片段在所述对象的体液样品中的水平的比值,并且其中所述标志物水平比值低于比值阈值。

[0104] 本发明的主题内容是一种抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述肾上腺髓质素前体的片段选自PAMP (SEQ ID No.:2)、MR-proADM (SEQ ID No.:3)、ADM-Gly (SEQ ID No.:5) 和CT-proADM (SEQ ID No.:6)。

[0105] 本发明的主题内容是一种抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述对象通过如上所解释的方法来选择。

[0106] 本发明的主题内容是一种抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的阈值水平等于或低于15pg/mL,优选地等于或低于10pg/mL,优选地等于或低于5pg/mL。

[0107] 本发明的主题内容是一种抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述标志物水平比值在0.2至0.75、优选地0.3至0.6、优选地0.4至0.5的范围内。

[0108] 本发明的主题内容是一种抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述对象按照如上所解释的方法来选择,其中所述体液样品选自血液、血清、血浆、尿液、脑脊液 (CSF) 和唾液。

[0109] 本发明的主题内容是一种抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中还确定至少一种另外的临床参数,其选自年龄、种族、精神状态测试 (例如小型精神状态检查 (MMSE))、神经成像 (CT、MRT、PET、SPECT)、家族史、ApoE4基因型、淀粉样肽 $\beta$ 1-42 ( $A\beta_{1-42}$ )、淀粉样肽 $\beta$ 1-40 ( $A\beta_{1-40}$ )、总Tau蛋白、磷酸化Tau蛋白 (p-Tau 181、p-Tau 199、p-Tau231)。

[0110] 本发明的主题内容是一种抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述标志物的水平通过免疫测定法来确定。

[0111] 成熟ADM、bio-ADM和ADM-NH<sub>2</sub>在整个本申请中同义使用,并且是SEQ ID No.:4所示的分子。

[0112] 当在本文中使用时,术语“PAMP”包括循环形式的PAMP、即无生物活性的C-末端甘氨酸盐延长的PAMP (PAMP-Gly) 和有生物活性的C-末端酰胺化的PAMP (PAMP-酰胺) 两者。

[0113] 在本发明的特定实施方式中,所述proADM和/或其具有至少5个氨基酸的片段和成熟ADM选自:

- [0114] SEQ ID No.:1(肾上腺髓质素前体肽原(pre-proADM)):第1-185位氨基酸
- [0115] MKLVSVALMYLGLSLAFLGADTARLDVASEFRKKWKNWALS R G KREL R M S S S Y P T G L A D V K A G P A Q T L I R P Q D M K G A S R S P E D S S P D A A R I R V K R Y R Q S M N N F Q G L R S F G C R F G T C T V Q K L A H Q I Y Q F T D K D K D N V A P R S K I S P Q G Y G R R R R R S L P E A G P G R T L V S S K P Q A H G A P A P P S G S A P H F L
- [0116] SEQ ID No.:2(肾上腺髓质素前体N-20端肽,PAMP):preproADM的第22-41位氨基酸
- [0117] ARLDVASEFRKKWKNWALS R
- [0118] SEQ ID No.:3(肾上腺髓质素前体中段肽,MR-proADM):preproADM的第45-92位氨基酸
- [0119] ELR M S S S Y P T G L A D V K A G P A Q T L I R P Q D M K G A S R S P E D S S P D A A R I R V
- [0120] SEQ ID No.:4(成熟肾上腺髓质素(成熟ADM);酰胺化ADM;bio-ADM;hADM):第95-146位氨基酸-CONH<sub>2</sub>
- [0121] Y R Q S M N N F Q G L R S F G C R F G T C T V Q K L A H Q I Y Q F T D K D K D N V A P R S K I S P Q G Y - C O N H <sub>2</sub>
- [0122] SEQ ID No.:5(肾上腺髓质素1-52-Gly(ADM 1-52-Gly)):preproADM的第95-147位氨基酸
- [0123] Y R Q S M N N F Q G L R S F G C R F G T C T V Q K L A H Q I Y Q F T D K D K D N V A P R S K I S P Q G Y G
- [0124] SEQ ID No.:6(C-末端肾上腺髓质素前体,CT-proADM):preproADM的第148-185位氨基酸
- [0125] R R R R R S L P E A G P G R T L V S S K P Q A H G A P A P P S G S A P H F L
- [0126] 在本发明的特定实施方式中,在所述对象的体液中成熟ADM-NH<sub>2</sub>(SEQ ID No.:4)的免疫反应性水平低于阈值。
- [0127] 在本发明的特定实施方式中,在所述对象的体液中PAMP(SEQ ID No.:2)的免疫反应性水平或MR-proADM(SEQ ID No.:3)的免疫反应性水平或CT-proADM(SEQ ID No.:6)的免疫反应性水平或ADM 1-52-Gly(SEQ ID No.:5)的免疫反应性水平高于阈值。
- [0128] 在本发明的特定实施方式中,在所述对象的体液中成熟ADM-NH<sub>2</sub>(SEQ ID No.:4)的免疫反应性水平与MR-proADM(SEQ ID No.:3)的免疫反应性水平的比值低于阈值。
- [0129] 在本发明的特定实施方式中,成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平使用选自下述的至少一种结合物来确定:与包含在下述成熟ADM-NH<sub>2</sub>序列(SEQ ID No.:4)内的区域结合的结合物,和与包含在成熟ADM-NH<sub>2</sub>序列(SEQ ID NO.:4)内的区域结合的第二结合物。
- [0130] 在本发明的特定实施方式中,proADM和/或其片段的水平使用选自下述的至少一种结合物来确定:与包含在MR-proADM序列(SEQ ID No.:3)内的区域结合的结合物,和与包含在MR-proADM序列(SEQ ID No.:3)内的区域结合的第二结合物。
- [0131] 在本发明的特定实施方式中,pro-ADM和/或其片段的水平使用选自下述的至少一种结合物来确定:与包含在CT-proADM序列(SEQ ID No.:6)内的区域结合的结合物,和与包含在CT-proADM序列(SEQ ID No.:6)内的区域结合的第二结合物。
- [0132] 在本发明的特定实施方式中,pro-ADM和/或其片段的水平使用选自下述的至少一种结合物来确定:与包含在PAMP序列(SEQ ID No.:2)内的区域结合的结合物,和与包含在PAMP序列(SEQ ID No.:2)内的区域结合的第二结合物。
- [0133] 在本发明的特定实施方式中,pro-ADM和/或其片段的水平使用选自下述的至少一

种结合物来确定:与包含在ADM 1-52-Gly序列(SEQ ID No.:5)内的区域结合的结合物,和与包含在ADM 1-52-Gly序列(SEQ ID No.:5)内的区域结合的第二结合物。

[0134] 本发明的主题内容是一种根据本发明所述的方法,其中所述结合物选自与肾上腺髓质素前体或其具有至少5个氨基酸的片段结合的抗体、抗体片段或非Ig骨架。

[0135] 本发明的另一个实施方式涉及一种根据前述实施方式所述的方法,其中所述体液可以选自血液、血清、血浆、尿液、脑脊液(CSF)和唾液。在本发明的更特定实施方式中,所述体液是血液样品。血液样品可以选自全血、血清和血浆。在本发明的特定实施方式中,所述样品选自人类柠檬酸盐血浆、肝素血浆和EDTA血浆。

[0136] 本发明的主题内容是一种根据本发明所述的方法,其中所述肾上腺髓质素前体或其具有至少5个氨基酸的片段的确定在一位患者中进行超过一次。

[0137] 本发明的主题内容是一种根据本发明所述的方法,其中进行所述监测以便评估所述对象对采取的预防性和/或治疗性措施的反应。

[0138] 本发明的主题内容是一种根据本发明所述的方法,其中所述方法被用于将所述对象分层为多个风险组。

[0139] 当在本文中使用时,术语“风险”是指遭受不想要的事件或影响(例如疾病)的可能性。

[0140] 本申请的另一个实施方式涉及一种根据前述实施方式所述的方法,其中成熟ADM-NH<sub>2</sub>水平的降低预测了患痴呆症风险的提高。

[0141] 本申请的另一个实施方式涉及一种根据前述实施方式所述的方法,其中成熟ADM-NH<sub>2</sub>与proADM或其选自MR-proADM、CT-proADM、ADM-Gly和/或PAMP的片段之间的比值的降低预测了患痴呆症风险的提高。

[0142] 本发明的主题内容也是一种如前述段落中的任一者中所定义的确患痴呆症风险的方法,其中进行所述方法以便将所述对象分层为下文中进一步定义的风险组。在本发明的特定实施方式中,所述方法被用于将所述对象分层为风险组,例如具有患痴呆症的低风险、中风险或高风险的组。患痴呆症的低风险意味着成熟ADM-NH<sub>2</sub>的值与未患痴呆症的健康对象中的预定值相比基本上不降低。当成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平与未患痴呆症的健康对象中的预定值相比降低时,存在中风险,并且当成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平在基线测量时显著降低并且在后续分析时继续降低时,存在高风险。

[0143] 痴呆症的风险意味着在一定时间段内患痴呆症的风险。在特定实施方式中,所述时间段是在10年内或在7年内或在5年内或在2.5年内。

[0144] 术语“提高的水平”意味着高于某个阈值水平的水平。

[0145] 术语“降低的水平”意味着低于某个阈值水平的水平。

[0146] 在本发明的特定实施方式中,一种测定法被用于确定成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平,其中所述测定法的测定灵敏度为<15pg/mL,优选为<10pg/mL,更优选为<5pg/mL。

[0147] 在本发明的特定实施方式中,一种测定法被用于确定MR-proADM的水平,其中所述测定法的测定灵敏度能够定量健康对象的MR-proADM,并且为<0.5nmol/L,优选为<0.4nmol/L,更优选为<0.2nmol/L。

[0148] 在本发明的特定实施方式中,一种测定法被用于确定CT-proADM的水平,其中所述测定法的测定灵敏度能够定量健康对象的CT-proADM,并且为<100pmol/L,优选为<

75pmol/,更优选为<50pmol/L。

[0149] 本申请的另一个实施方式涉及一种根据前述实施方式所述的方法,其中一种测定法被用于确定PAMP-酰胺的水平,其中所述测定法的测定灵敏度能够定量健康对象的PAMP-酰胺,并且为<0.3pmol/L,优选为<0.2pmol/L,更优选为<0.1pmol/L。

[0150] 本申请的另一个实施方式涉及一种根据前述实施方式所述的方法,其中一种测定法被用于确定PAMP-甘氨酸的水平,其中所述测定法的测定灵敏度能够定量健康对象的PAMP-甘氨酸,并且为<0.5pmol/L,优选为<0.25pmol/L,更优选为<0.1pmol/L。

[0151] 本申请的另一个实施方式涉及一种根据前述实施方式所述的方法,其中一种测定法被用于确定ADM-Gly的水平,其中所述测定法的测定灵敏度能够定量健康对象的ADM-Gly,并且为60pmol/L,优选为10pmol/L,更优选为2pmol/L。

[0152] 在本发明的特定实施方式中,所述结合物对成熟ADM-NH<sub>2</sub>或proADM和/或其片段表现出至少10<sup>7</sup>M<sup>-1</sup>、优选地10<sup>8</sup>M<sup>-1</sup>的结合亲和性,优选的亲和性高于10<sup>9</sup>M<sup>-1</sup>,最优选地高于10<sup>10</sup>M<sup>-1</sup>。本领域技术人员了解,可以考虑通过施加较高剂量的化合物来补偿较低的亲和性,并且这种措施不会导致脱离本发明的范围。

[0153] 为了确定抗体对肾上腺髓质素的亲和性,使用Biacore 2000系统(GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany),利用无标记物表面等离子体共振来确定肾上腺髓质素与固定化抗体结合的动力学。抗体的可逆固定化使用以高密度共价偶联到CM5传感器表面的抗小鼠Fc抗体,按照制造商的说明书(小鼠抗体捕获试剂盒;GE Healthcare)

[0154] 来进行(Lorenz等,2011.*Antimicrob Agents Chemother.*55(1):165-173)。

[0155] 在本发明的特定实施方式中,所述结合物选自与成熟ADM-NH<sub>2</sub>或proADM和/或其片段结合的抗体或抗体片段或非Ig骨架。

[0156] 在本发明的特定实施方式中,一种测定法被用于确定成熟ADM-NH<sub>2</sub>和/或proADM或其具有至少5个氨基酸的片段的水平,其中这种测定法是夹心测定法,优选为全自动测定法。

[0157] 在本发明的一个实施方式中,测试技术可能是所谓的POC测试(即时测试),其允许在患者附近在不到1小时内进行测试,而不需要全自动测定系统。这种技术的一个实例是免疫层析测试技术。

[0158] 在本发明的一个实施方式中,这种测定法是使用任何类型的检测技术包括但不限于酶标记物、化学发光标记物、电化学发光标记物的夹心免疫测定法,优选为全自动测定法。在本发明的一个实施方式中,这种测定法是酶标记夹心测定法。自动或全自动测定法的实例包括可用于下述系统之一的测定法:Roche Elecsys®, Abbott Architect®, Siemens Centaur®, Brahms Kryptor®, Biomerieux Vidas®, Alere Triage®, Ortho Clinical Diagnostics Vitros®。

[0159] 各种不同的免疫测定法是已知的,并且可用于本发明的测定法和方法,它们包括:放射免疫测定法(“RIA”),均相酶倍增免疫测定法(“EMIT”),酶联免疫吸附测定法(“ELISA”),酶蛋白重新激活免疫测定法(“ARIS”),试纸条免疫测定法和免疫层析测定法。

[0160] 在本发明的特定实施方式中,所述两种结合物中的至少一者被标记,以便被检测。

[0161] 优选检测方法包括采取各种不同形式的免疫测定法,例如放射免疫测定法(RIA)、化学发光和荧光免疫测定法、酶联免疫测定法(ELISA)、基于Luminex的珠子阵列、蛋白质微

阵列测定法,以及快速测试形式例如免疫层析条测试。

[0162] 在优选实施方式中,所述标记物选自化学发光标记物、酶标记物、荧光标记物、放射性碘标记物。

[0163] 所述测定法可以是均相或非均相测定法、竞争性和非竞争性测定法。在一个实施方式中,所述测定法采取夹心测定法的形式,这是一种非竞争性免疫测定法,其中待检测和/或定量的分子被结合到第一抗体和第二抗体。所述第一抗体可以被结合到固相例如珠子、孔或其他容器的表面、片或条,并且所述第二抗体是用例如染料、放射性同位素或反应性或催化活性组成部分标记的抗体。然后通过适合的方法测量与分析物结合的标记抗体的量。与“夹心测定法”相关的一般性组成和程序确立已久,并且为专业技术人员知晓(《免疫测定法手册》(The Immunoassay Handbook),David Wild主编,Elsevier LTD,Oxford;第三版(May2005);Hultschig等,2006.Curr Opin Chem Biol.10(1):4-10)。

[0164] 在另一个实施方式中,所述测定法包含两种捕获分子、优选为抗体,两者均作为分散系存在于液体反应混合物中,其中第一标记组分被附连到所述第一捕获分子,其中所述第一标记组分是基于荧光或化学发光-淬灭或放大的标记系统的一部分,并且所述标记系统的第二标记组分被附连到所述第二捕获分子,使得在两种捕获分子与分析物结合后产生可测量的信号,允许检测在包含所述样品的溶液中形成的夹心复合物。

[0165] 在另一个实施方式中,所述标记系统包含稀土金属穴状化合物或稀土金属螯合物与荧光染料或化学发光染料、特别是花菁类型的染料的组合。

[0166] 在本发明的情形中,基于荧光的测定法包括染料的使用,所述染料可以例如选自FAM(5-或6-羧基荧光素)、VIC、NED、荧光素、荧光素异硫氰酸酯(FITC)、IRD-700/800、花菁染料例如CY3、CY5、CY3.5、CY5.5、Cy7、咕吨、6-羧基-2',4',7',4,7-六氯荧光素(HEX)、TET、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素(JOE)、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、5-羧基罗丹明-6G(R6G5)、6-羧基罗丹明-6G(RG6)、罗丹明、罗丹明绿、罗丹明红、罗丹明110、BODIPY染料例如BODIPY TMR、俄勒冈绿、香豆素类例如伞形酮、苯甲酰亚胺类例如Hoechst 33258、菲啉类例如德克萨斯红、雅吉瓦黄、Alexa Fluor、PET、溴化乙锭、吡啶染料、咪唑染料、吩噻嗪染料、卟啉染料、聚甲川染料等。

[0167] 在本发明的情形中,基于化学发光的测定法包括使用基于在下述文献中为化学发光材料描述的物理原理的染料(Kirk-Othmer,《化学技术百科全书》(Encyclopedia of chemical technology),第四版,1993.John Wiley&Sons,Vol.15:518-562,通过引用并入本文,包括在第551-562页上的引文)。优选的化学发光染料是吡啶酯。

[0168] 当在本文中提到时,“测定法”或“诊断测定法”可以是在诊断学领域中应用的任何类型的测定法。这种测定法可以基于待检测的分析物与一种或多种捕获探针以一定亲和性的结合。关于捕获分子与靶分子或感兴趣的分子之间的相互作用,亲和常数优选大于 $10^8 \text{M}^{-1}$ 。

[0169] 在本发明的情形中,“结合物分子”是可用于结合来自于样品的靶分子或感兴趣的分子、即分析物(在本发明的情形中即ADM-NH<sub>2</sub>和/或proADM及其片段)的分子。因此,结合物分子必须在空间和表面特点例如表面电荷、疏水性、亲水性、路易斯供体和/或受体的存在或不存在两个方面充分塑造,以特异性结合所述靶分子或感兴趣的分子。因此,所述结合可以例如通过捕获分子与靶分子或感兴趣的分子之间的离子、范德华力、 $\pi$ - $\pi$ 、 $\sigma$ - $\pi$ 、疏水键或

氢键相互作用或上述相互作用中的两者或更多者的组合来介导。在本发明的情形中,结合物分子可以例如选自核酸分子、糖类分子、PNA分子、蛋白质、抗体、肽或糖蛋白。优选地,所述结合物分子是抗体,包括其与靶分子或感兴趣的分子具有足够亲和性的片段,并且包括重组抗体或重组抗体片段,以及所述抗体的化学和/或生物化学修饰的衍生物或其源自于变异链的长度为至少12个氨基酸的片段。

[0170] 化学发光标记物可以是吡啶酯标记物、甾类标记物包括异鲁米诺标记物等。

[0171] 酶标记物可以是乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CPK),碱性磷酸酶、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、酸性磷酸酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶等。

[0172] 在本发明的一个实施方式中,将所述两种结合物中的至少一者结合到如磁性粒子的固相,和聚苯乙烯表面。

[0173] 在本发明的特定实施方式中,将所述两种结合物中的至少一者结合到固相。

[0174] 在本发明的特定实施方式中,确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平与肾上腺髓质素前体或其片段(其不是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>)的水平的比值的阈值在一定范围内,所述范围是0.2至0.75、优选地0.3至0.6之间,优选地使用0.4至0.5之间。

[0175] 本发明的ADM-NH<sub>2</sub>水平或相应的proADM或其片段的水平,使用如实施例中概述的已描述的ADM-NH<sub>2</sub>测定法(或相应的proADM或其片段的测定法)来确定。上文提到的阈值在其他测定法中可能是不同的,如果它们以与本发明中使用的测定体系不同的方式校准的话。因此,考虑到校准的差异,上面提到的临界值将相应地适用于这些不同校准的测定法。量化校准差异的一种可能性是通过使用两种方法测量样品中的相应生物标记物(例如bio-ADM),对所讨论的测定法与本发明中使用的相应生物标记物测定法进行方法比较分析(相关性)。另一种可能性是倘若所讨论的测定法具有足够的分析灵敏度,使用这种测试来确定代表性的正常人群的生物标志物水平中位数,将结果与文献中描述的所述生物标志物水平中位数进行比较,并基于通过这种比较获得的差异重新计算校准。通过本发明中使用的校准测量了来自于正常(健康)对象的样品:血浆bio-ADM(成熟ADM-NH<sub>2</sub>)中位数为13.7pg/mL(四分位数间距[IQR]9.6-18.7pg/mL)(Weber等,2017.JALM,2(2):222-233)。

[0176] 使用在Caruhel等(Caruhel等,2009.Clin Biochem42:725-8)中所描述的用于检测MR-proADM的自动夹心荧光测定法,正常(健康)对象中的血浆MR-proADM浓度中位数为0.41(四分位数间距0.23-0.64)nmol/L(Smith等,2009.Clin Chem 55:1593-1595)。

[0177] 正常健康对象(n=200)中的血浆CT-proADM浓度中位数为77.6pmol/L(min 46.6pmol/L,max 136.2pmol/L),并且95%百分位数为113.8pmol/L(EP 2 111 552 B1)。

[0178] 正常健康对象(n=51)中的PAMP-酰胺血浆浓度为0.51±0.19pmol/L(平均值±SD)(Hashida等,2004.Clin Biochem37:14-21)。

[0179] 正常健康对象(n=51)中的PAMP-甘氨酸血浆浓度为1.15±0.38pmol/L(平均值±SD)(Hashida等,2004.Clin Biochem 37:14-21)。

[0180] 在一个实施方式中,所述阈值可以如下所述预先确定:

[0181] • 将从所述对象获得的体液中所述标志物的浓度,与从与所述对象具有可比基线状况的随机选择的对象群体中的一组预先确定的样品获得的体液中所述标志物的中位数进行比较,

[0182] • 将从所述对象获得的体液中所述标志物的浓度,与从与所述对象具有可比基线状况的对象群体中的一组预先确定的样品获得的体液中所述标志物和/或其片段的水平的分位数进行比较,

[0183] • 在Cox比例风险分析的基础上或通过使用风险指数计算例如NRI (净重新分类指数) 或IDI (综合鉴别指数) 进行计算。

[0184] 此外,可以确定选自下述的至少一种临床参数或生物标志物:年龄,种族,精神状态测试(例如小型精神状态检查(MMSE)),神经成像(CT、MRT、PET、SPECT),家族史,ApoE4基因型,淀粉样肽 $\beta$ 1-42 ( $A\beta_{1-42}$ ),淀粉样肽 $\beta$ 1-40 ( $A\beta_{1-40}$ ),总Tau蛋白,磷酸化Tau蛋白(p-Tau 181、p-Tau 199、p-Tau 231)。

[0185] 在本发明的情形中,术语“痴呆症”包括阿兹海默氏病、血管性痴呆、混合性阿兹海默氏病和血管性痴呆、路易体痴呆、额颞叶痴呆、局灶性痴呆(例如进行性失语)、皮层下痴呆(例如帕金森氏病痴呆)和痴呆综合征的继发病因(例如颅内病变)。

[0186] 在本发明的更特定实施方式中,所述痴呆症选自阿兹海默氏病、血管性痴呆和混合性阿兹海默氏病和血管性痴呆。

[0187] 最优选地,所述痴呆症是阿兹海默氏病。

[0188] 本发明的另一个主题是一种药物组合物,其包含本文中公开的本发明的结合物,特别是包含用于预防或治疗痴呆症的抗ADM抗体或抗ADM抗体片段或抗ADM非Ig骨架。

[0189] 在本发明的另一个实施方式中,所述药物组合物是溶液,优选为即用型溶液。

[0190] 在本发明的另一个实施方式中,所述药物组合物是溶液,优选为pH为7.4的包含PBS的即用型溶液。

[0191] 在本发明的另一个实施方式中,所述药物组合物处于干燥状态,其在使用前被复溶。

[0192] 在本发明的另一个实施方式中,所述药物组合物处于冷冻干燥状态,其在使用前被复溶。

[0193] 在本发明的另一个实施方式中,所述用于痴呆症的预防和/或治疗的药物组合物通过口服、表皮、皮下、真皮内、舌下、肌肉内、动脉内、脑内、脑室内、鞘内、静脉内或腹膜内给药来给药。在本发明的优选实施方式中,所述药物组合物静脉内给药。在本发明的另一个优选实施方式中,所述药物组合物通过中枢神经系统(CNS)给药,例如脑内、脑室内和鞘内给药。

[0194] 根据本发明所述的抗体是一种特异性结合抗原的蛋白质,其包括基本上由免疫球蛋白基因编码的一个或多个多肽。公认的免疫球蛋白基因包括 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$  (IgA)、 $\gamma$  (IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>)、 $\delta$  (IgD)、 $\epsilon$  (IgE) 和 $\mu$  (IgM) 恒定区基因以及无数的免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白轻链长度通常为约25Kd或214个氨基酸。全长免疫球蛋白重链长度通常为约50Kd或446个氨基酸。轻链在NH<sub>2</sub>-端(长度约为110个氨基酸)处由可变区基因编码,并且在COOH-端处由 $\kappa$ 或 $\lambda$ 恒定区基因编码。类似地,重链由可变区基因(长度约为116个氨基酸)和其他恒定区基因之一编码。

[0195] 抗体的基本结构单元通常为四聚体,其由两对一致的免疫球蛋白链构成,每对具有一条轻链和一条重链。在每一对中,轻链和重链可变区结合到抗原,并且恒定区介导效应物功能。免疫球蛋白也以各种不同的其他形式存在,例如Fv、Fab和(Fab')<sub>2</sub>以及双功能杂合

抗体和单链(例如Lanzavecchia等,1987. *Eur. J. Immunol.* 17:105;Huston等,1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:5879-5883;Bird等,1988, *Science*242:423-426; Hood等, *Immunology*, Benjamin, N.Y., 第二版, 1984; Hunkapiller and Hood 1986. *Nature*323:15-16)。免疫球蛋白轻链或重链可变区包括被三个高变区、也被称为互补决定区(CDR)打断的构架区(参见Sequences of Proteins of Immunological Interest, E.Kabat等, U.S. Department of Health and Human Services, 1983)。正如上文提到的, CDR主要负责与抗原表位的结合。免疫复合物是特异性结合到抗原的抗体例如单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人类抗体或有功能的抗体片段。

[0196] 嵌合抗体是其轻链和重链基因从属于不同物种的免疫球蛋白可变和恒定区基因通常通过基因工程构建而成的抗体。例如,可以将来自于小鼠单克隆抗体的基因的可变区段联结到人类恒定区段例如 $\kappa$ 和 $\gamma$  1或 $\gamma$  3。因此在一个实例中,治疗性嵌合抗体是由来自于小鼠抗体的可变或抗原结合结构域和来自于人类抗体的恒定或效应物结构域构成的杂合蛋白,尽管也可以使用其他哺乳动物物种,或者所述可变区可以通过分子技术产生。制造嵌合抗体的方法在本领域中是公知的(例如参见美国专利No.5,807,715)。“人源化”免疫球蛋白是包括人类构架区和来自于非人类(例如小鼠、大鼠或合成的)免疫球蛋白的一个或多个CDR的免疫球蛋白。所述提供CDR的非人类免疫球蛋白被称为“供体”,并且所述提供构架的人类免疫球蛋白被称为“受体”。在一个实施方式中,人源化免疫球蛋白中的所有CDR来自于供体免疫球蛋白。恒定区不必存在,但是如果它们存在的话,它们必须基本上与人类免疫球蛋白恒定区一致,即至少约85-90%、例如约95%或更高地一致。因此,人源化免疫球蛋白的可能除了CDR之外的所有部分,与天然人类免疫球蛋白序列的相应部分基本上一致。“人源化抗体”是包含人源化轻链和人源化重链免疫球蛋白的抗体。人源化抗体与提供CDR的供体抗体结合相同的抗原。人源化免疫球蛋白或抗体的受体构架可能具有被取自供体构架的氨基酸的有限数目的替换。人源化或其他单克隆抗体可以具有另外的保守氨基酸替换,其对抗原结合或其他免疫球蛋白功能基本上没有影响。示例性的保守替换是例如gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; 和phe, tyr。人源化免疫球蛋白可以利用基因工程来构建(例如参见美国专利第5,585,089号)。人类抗体是其中轻链和重链基因均为人类来源的抗体。人类抗体可以使用本领域中已知的方法来产生。人类抗体可以通过将分泌感兴趣的抗体的人类B细胞永生来生产。永生可以例如通过EBV感染或通过人类B细胞与骨髓瘤或杂交瘤细胞融合以产生三源瘤细胞来实现。人类抗体也可以通过噬菌体展示法来产生(参见例如Dower等, PCT公布号W091/17271; McCafferty等, PCT公布号W092/001047; 和Winter, PCT公布号W092/20791)或从人类组合单克隆抗体文库选择(参见Morphosys网站)。人类抗体也可以使用带有免疫球蛋白基因的转基因动物来制备(例如参见Lonberg等, PCT公布号W093/12227; 和Kucherlapati, PCT公布号W091/10741)。

[0197] 因此,所述抗体可以具有本领域中已知的形式。实例是人类抗体、单克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、CDR嫁接抗体。在优选实施方式中,根据本发明所述的抗体是重组生产的抗体例如IgG,通常为全长免疫球蛋白,或至少含有重链和/或轻链的F-可变结构域的抗体片段例如化学偶联的抗体(抗原结合片段),包括但不限于Fab-片段包括Fab微抗体,单链Fab抗体,具有表位标签的单价Fab抗体例如Fab-V5Sx2,与CH3结构域二聚化的二价Fab(微抗体),通过例如在异源结构域的帮助下多聚化例如通过dHLX结构域的二聚化而形成的二

价Fab或多价Fab例如Fab-dHLX-FSx2, F(ab')<sub>2</sub>-片段, scFv-片段, 多聚化的多价或/和多特异性scFv-片段, 二价和/或双特异性双体抗体, BITE<sup>®</sup> (双特异性T-细胞接合体), 三功能抗体, 多价抗体例如来自于不同于G的类别的多价抗体, 单域抗体例如源自于骆驼或鱼类免疫球蛋白的纳米抗体, 以及大量其他抗体或片段。

[0198] 除了抗体之外, 复合靶分子的其他生物聚合物骨架在本领域中是公知的, 并且已被用于产生高度靶特异性生物聚合物。实例是适体、spiegelmer、anticalin和芋螺毒素。

[0199] 在优选实施方式中, 所述抗体形式选自Fv片段、scFv片段、Fab片段、scFab片段、(Fab)<sub>2</sub>片段和scFv-Fc融合蛋白。在另一个优选实施方式中, 所述抗体形式选自scFab片段、Fab片段、scFv片段及其生物可利用性优化的偶联物例如PEG化的片段。最优选的形式之一是scFab形式。

[0200] 非Ig骨架可以是蛋白质骨架并且可以用作抗体模拟物, 因为它们能够与配体或抗原结合。非Ig骨架可以选自基于四连蛋白的非Ig骨架 (例如在US2010/0028995中描述的)、纤连蛋白骨架 (例如在EP 1 266 025中描述的)、基于脂钙蛋白的骨架 (例如在WO 2011/154420中描述的)、泛素骨架 (例如在WO 2011/073214中描述的)、转移骨架 (例如在US 2004/0023334中描述的)、蛋白A骨架 (例如在EP 2 231 860中描述的)、基于锚蛋白重复序列的骨架 (例如在WO 2010/060748中描述的)、微蛋白骨架 (优选为形成胱氨酸结的微蛋白) (例如在EP 2 314 308中描述的)、基于Fyn SH3结构域的骨架 (例如在WO 2011/023685中描述的)、基于EGFR-A结构域的骨架 (例如在WO 2005/040229中描述的) 和基于Kunitz结构域的骨架 (例如在EP 1941867中描述的)。

[0201] 此外, 在本发明的一个实施方式中, 抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架是单特异性的。

[0202] 单特异性抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或单特异性抗肾上腺髓质素抗体片段或单特异性抗ADM非Ig骨架意味着所述抗体或抗体片段或非Ig骨架结合到所述靶标ADM内涵盖至少5个氨基酸的一个特定区域。单特异性抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或单特异性抗肾上腺髓质素抗体片段或单特异性抗ADM非Ig骨架是全都对同一抗原具有亲和性的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架。

[0203] 在另一个特定且优选的实施方式中, 所述结合到ADM的抗ADM抗体或抗ADM抗体片段或抗ADM非Ig骨架分别是单特异性抗体、抗体片段或非Ig骨架, 其中单特异性意味着所述抗体或抗体片段或非Ig骨架结合到所述靶标ADM内涵盖至少4个氨基酸的一个特定区域。根据本发明所述的单特异性抗体或片段或非Ig骨架是全都对同一抗原具有亲和性的抗体或片段或非Ig骨架。单克隆抗体是单特异性的, 但单特异性抗体也可以通过从共同的生殖细胞生产之外的其他方式来生产。

[0204] 所述结合到ADM的抗ADM抗体或抗体片段或结合到ADM的非Ig骨架可以是结合到ADM的非中和抗ADM抗体或抗体片段或结合到ADM的非Ig骨架。

[0205] 在特定实施方式中, 所述抗ADM抗体、抗ADM抗体片段或抗ADM非Ig骨架是非中和抗体、片段或非Ig骨架。中和抗ADM抗体、抗ADM抗体片段或抗ADM非Ig骨架将ADM的生物活性阻断几乎100%、至少超过90%、优选地至少超过95%。

[0206] 相反, 非中和抗ADM抗体或抗ADM抗体片段或抗ADM非Ig骨架将ADM的生物活性阻断低于100%, 优选地低于95%, 优选地低于90%, 更优选地低于80%, 甚至更优选地低于

50%。这意味着ADM的生物活性被降低少于100%，少于95%或更少而不是更多，少于90%或更少而不是更多，少于80%或更少而不是更多，少于50%或更少而不是更多。这意味着结合到所述非中和抗ADM抗体或抗ADM抗体片段或抗ADM非Ig骨架的ADM的残留生物活性将超过0%，优选地超过5%，优选地超过10%，更优选地超过20%，更优选地超过50%。

[0207] 在这种情形中，为简化起见在这里被统称为“非中和”抗ADM抗体的抗体片段或非Ig骨架的作为例如将ADM的生物活性阻断低于80%的具有“非中和抗ADM活性”的抗体或抗体片段或非Ig骨架的分子，被定义为：

[0208] 与ADM结合的一种或多种分子，其在添加到表达由CRLR（降钙素受体样受体）和RAMP3（受体活性修饰蛋白3）构成的有功能的人类重组ADM受体的真核细胞系的培养物后，降低通过平行添加的人类合成ADM肽的作用而由所述细胞系产生的cAMP的量，其中所述添加的人类合成ADM以在不存在所述待分析的非中和抗体的情况下引起cAMP合成的半数最大刺激的量添加，其中cAMP被所述结合到ADM的分子的降低以不超过80%的程度发生，即使在所述待分析的结合到ADM的非中和分子以比获得使用所述待分析的非中和抗体可获得的cAMP合成的最大降低所需的量高10倍的量添加时。

[0209] 同样的定义适用于其他范围：95%，90%，50%等。

[0210] 在本发明的优选实施方式中，所述抗ADM抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架结合到ADM的位于肾上腺髓质素的N-末端部分（aa 1-21）中的区域或表位。

[0211] 在另一个优选实施方式中，所述抗ADM抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架识别并结合到肾上腺髓质素的第1-14位氨基酸（SEQ ID No. :27）内的区域或表位；这意味着肾上腺髓质素的N-末端部分（aa 1-14）。在另一个优选实施方式中，所述抗ADM抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架识别并结合到肾上腺髓质素的第1-10位氨基酸（SEQ ID No. :28）内的区域或表位；这意味着肾上腺髓质素的N-末端部分（aa 1-10）。

[0212] ADM的aa 1-14

[0213] YRQSMNNFQGLRSF (SEQ ID No. :27)

[0214] ADM的aa 1-10

[0215] YRQSMNNFQG (SEQ ID No. :28)

[0216] 在另一个优选实施方式中，所述抗ADM抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架识别并结合到肾上腺髓质素的第1-6位氨基酸（SEQ ID No. :29）内的区域或表位；这意味着肾上腺髓质素的N-末端部分（aa 1-6）。如上所述，所述区域或表位优选包含至少4个或至少5个氨基酸的长度。

[0217] ADM的aa 1-6

[0218] YRQSMN (SEQ ID No. :29)

[0219] 在另一个优选实施方式中，所述抗ADM抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架识别并结合到肾上腺髓质素的N-末端（aa1）。N-末端意味着第1位氨基酸，其是SEQ ID No. :4、5、21、27、28或29的“Y”；对于抗体结合来说是强制性的。所述抗体或片段或骨架既不结合N-末端延伸或N-末端修饰的肾上腺髓质素，也不结合N-末端降解的肾上腺髓质素。这意味着在另一个优选实施方式中，如果ADM的N-末端不存在，则所述抗ADM抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架只结合到成熟ADM序列内的区域。在所述实施方式中，如果所述序列被包含在例如pro-ADM内，则所述抗ADM抗体或抗肾上腺髓质素抗体片

段或非Ig骨架将不结合到成熟ADM序列内的区域。

[0220] 为清楚起见,对于ADM的特定区域来说括号内的数字如“N-末端部分(aa 1-21)”被本领域技术人员理解为ADM的N-末端部分由成熟ADM序列的第1-21位氨基酸构成。

[0221] 在本发明的一个实施方式中,根据本发明所述的抗体可以如下生产:

[0222] 将Ba1b/c小鼠在第0和14天用ADM-100 $\mu$ g肽-BSA-偶联物(乳化在100 $\mu$ l弗氏完全佐剂中)并在第21和28天用50 $\mu$ g(在100 $\mu$ l弗氏不完全佐剂中)免疫。在进行融合实验之前3天,所述动物接受溶解在100 $\mu$ l盐水中的50 $\mu$ g所述偶联物,其以一剂腹膜内和一剂静脉内注射来提供。

[0223] 将来自于所述被免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞系SP2/0的细胞用1ml 50%聚乙二醇在37 $^{\circ}$ C下融合30s。在清洗后,将细胞接种在96孔细胞培养板中。通过在HAT培养基[增补有20%胎牛血清和HAT增补物的RPMI 1640培养基]中生长来选择杂交克隆。两周后,将所述HAT培养基用HT培养基替换进行三次传代,然后返回到正常细胞培养基。

[0224] 在融合后三周,对细胞培养上清液进行筛选,以选出抗原特异性IgG抗体。将测试结果阳性的微量培养物转移到24孔板中进行增殖培养。在重新测试后,将所选的培养物使用有限稀释技术克隆以及重新克隆,并确定同种型(也参见Lane1985.*J. Immunol. Meth.* 81: 223-228; Ziegler, B.等,1996 *Horm. Metab. Res.* 28:11-15)。

[0225] 抗体可以按照下述程序利用噬菌体展示技术来生产:

[0226] 人类幼稚抗体基因文库HAL7/8被用于分离针对肾上腺髓质素肽的重组单链F-可变结构域(scFv)。将所述抗体基因文库用淘选策略进行筛选,所述策略包括使用含有通过两个不同间隔物连接到肾上腺髓质素肽序列的生物素标签的肽。将使用非特异性结合的抗原和链亲和素结合的抗原的淘选轮的混合物用于最小化非特异性结合物的背景。将从第三轮淘选洗脱的噬菌体用于产生表达单克隆scFv的大肠杆菌菌株。将来自于这些克隆株的培养的上清液直接用于抗原ELISA测试(参见Hust等,2011.*Journal of Biotechnology* 152: 159-170; Schütte等,2009.*PLoS One* 4, e6625)。

[0227] 鼠类抗体的人源化可以按照下述程序进行:

[0228] 为了将鼠类起源的抗体人源化,分析所述抗体序列的带有互补决定区(CDR)的构架区与抗原的结构相互作用。在结构建模的基础上选择适合的人类起源的FR,并将鼠类CDR序列移植到所述人类FR中。可以在CDR或FR的氨基酸序列中引入变异,以重新获得被FR序列的物种切换废除的结构相互作用。这种结构相互作用的恢复可以通过使用噬菌体展示文库的随机方法或通过由分子建模指导的定向方法来实现(Almagro等,2008.*Front Biosci.* 2008;13:1619-33)。

[0229] 本申请的另一个实施方式涉及一种根据前述实施方式所述的方法,其中所述用于治疗对象的结合到肾上腺髓质素的N-末端部分aa 1-21的抗ADM抗体是结合到ADM的人类CDR嫁接抗体或其抗体片段,其中所述人类CDR嫁接抗体或其抗体片段包含抗体重链(H链),其包含:

[0230] SEQ ID NO. 7:

[0231] GYTFSTRYW

[0232] SEQ ID NO.:8:

[0233] ILPGSGST

- [0234] 和/或
- [0235] SEQ ID NO.:9:
- [0236] TEGYEYDGFYD
- [0237] 和/或还包含抗体轻链(L链),其包含:
- [0238] SEQ ID NO.:10:
- [0239] QSIVYSNGNTY
- [0240] SEQ ID NO.:11:(由于长度为3个氨基酸而没有在序列表中提到)
- [0241] RVS
- [0242] 和/或
- [0243] SEQ ID NO.:12:
- [0244] FQGSHIPYT。
- [0245] 在本申请的另一个特定实施方式中,所述用于治疗对象的抗ADM抗体是结合到ADM的人类单克隆抗体或其抗体片段,其中重链包含选自下述的至少一个CDR:
- [0246] SEQ ID NO.:7:
- [0247] GYTFSRYW
- [0248] SEQ ID NO.:8:
- [0249] ILPGSGST
- [0250] SEQ ID NO.:9:
- [0251] TEGYEYDGFYD
- [0252] 并且其中轻链包含选自下述的至少一个CDR:
- [0253] SEQ ID NO.:10:
- [0254] QSIVYSNGNTY
- [0255] SEQ ID NO.:11:(由于长度为3个氨基酸而没有在序列表中提到)
- [0256] RVS
- [0257] SEQ ID NO.:12:
- [0258] FQGSHIPYT。
- [0259] 在本申请的另一个实施方式中,所述用于治疗对象的抗ADM抗体是结合到ADM的人类单克隆抗体或其抗体片段,其中重链包含序列:
- [0260] SEQ ID NO.:7:
- [0261] GYTFSRYW
- [0262] SEQ ID NO.:8:
- [0263] ILPGSGST
- [0264] SEQ ID NO.:9:
- [0265] TEGYEYDGFYD
- [0266] 并且其中轻链包含序列:
- [0267] SEQ ID NO.:10:
- [0268] QSIVYSNGNTY
- [0269] SEQ ID NO.:11:(由于长度为3个氨基酸而没有在序列表中提到)
- [0270] RVS

[0271] SEQ ID NO.:12:

[0272] FQGSHIPYT。

[0273] 本申请的另一个实施方式涉及前述实施方式的方法,其中所述用于治疗抗体或片段是结合到ADM的人类单克隆抗体或其抗体片段,其中重链包含序列:

[0274] CDR1:SEQ ID No.:7:

[0275] GYTFSRYW

[0276] CDR2:SEQ ID No.:8:

[0277] ILPGSGST

[0278] CDR3:SEQ ID No.:9:

[0279] TEGYEYDGFYD

[0280] 并且其中轻链包含序列:

[0281] CDR1:SEQ ID No.:10:

[0282] QSIVYSNGNTY

[0283] CDR2:SEQ ID No.:11:(由于长度为3个氨基酸而没有在序列表中提到)

[0284] RVS

[0285] CDR3:SEQ ID No.:12:

[0286] FQGSHIPYT。

[0287] 本申请的另一个实施方式涉及前述实施方式的方法,其中所述用于治疗抗体或片段包含下述序列作为VH区:

[0288] SEQ ID NO.:13(AM-VH-C):

[0289] QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSRYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGS  
GSTNYNEKFKGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTEGYEYDGFYDYGQGT  
TLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTF  
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

[0290] SEQ ID NO.:14(AM-VH1):

[0291] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGRILPG  
SGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCTEGYEYDGFYDYGQGT  
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT  
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

[0292] SEQ ID NO.:15(AM-VH2-E40):

[0293] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGRILP  
GSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCTEGYEYDGFYDYGQ  
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSV  
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH

[0295] SEQ ID NO.:16(AM-VH3-T26-E55):

[0296] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKATGYTFSRYWISWVRQAPGQGLEWMGEILPG  
SGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCTEGYEYDGFYDYGQGT  
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT  
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKHHHHHH; 或

- [0297] SEQ ID NO.:17 (AM-VH4-T26-E40-E55) :  
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCATGYTFSRYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILP  
GSGSTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTEGYEYDGFYWGQ
- [0298] GTT V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V  
H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K H H H H H H ;
- [0299] 并包含下述序列作为VL区:
- [0300] SEQ ID NO.:18 (AM-VL-C) :  
D V L L S Q T P L S L P V S L G D Q A T I S C R S S Q S I V Y S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y R V  
S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H I P Y T F G G G T K L E I K R T V
- [0301] A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S  
K D S T Y L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
- [0302] SEQ ID NO.:19 (AM-VL1) :  
D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S I V Y S N G N T Y L N W F Q Q R P G Q S P R R L I Y R V  
S N R D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H I P Y T F G Q G T K L E I K R T V
- [0303] A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S  
K D S T Y L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
- [0304] SEQ ID NO.:20 (AM-VL2-E40) :  
D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S I V Y S N G N T Y L E W F Q Q R P G Q S P R R L I Y R V  
S N R D S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H I P Y T F G Q G T K L E I K R T V
- [0305] A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S  
K D S T Y L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C .
- [0306] 下述实施方式是本发明的主题:
- [0307] 1) 一种方法,其用于:
- [0308] a) 诊断痴呆症,或
- [0309] b) 确定没有痴呆症的对象患痴呆症的风险,或
- [0310] c) 监测患有痴呆症的对象的治疗或监测或指导患有痴呆症的对象干预,或
- [0311] d) 监测有患痴呆症风险的对象的治疗或监测或指导有患痴呆症风险的对象预防性干预,
- [0312] 其中确定对象的体液样品中SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平,并且其中将所述成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平与阈值水平进行比较,
- [0313] 并且其中
- [0314] a) 如果所述SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平低于所述阈值水平,则所述对象被诊断为患有痴呆症,或者其中
- [0315] b) 如果所述SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平低于所述阈值水平,则所述对象患痴呆症的风险增加,或者其中
- [0316] c) 如果在治疗或干预过程中所述SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平提高,则在治疗或干预下患有痴呆症或有患痴呆症风险的对象状况正在改善,和/或其中如果所述SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的水平提高到高于所述阈值,则干预可以继续。
- [0317] 2) 一种方法,其用于:
- [0318] a) 诊断痴呆症,或

- [0319] b) 确定没有痴呆症的对象患痴呆症的风险,或
- [0320] c) 监测患有痴呆症的对象的治疗或监测或指导患有痴呆症的对象干预,或
- [0321] d) 监测有患痴呆症风险的对象预防性治疗或监测或指导有患痴呆症风险的对象预防性干预,
- [0322] 其中确定标志物比值,所述标志物比值可以是确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平与确定的肾上腺髓质素前体或其片段(其不是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 在所述对象的体液样品中的水平的比值,并且其中将所述标志物比值与比值阈值进行比较,
- [0323] 并且其中
- [0324] a) 如果所述成熟ADM-NH<sub>2</sub>/肾上腺髓质素前体或其片段的标志物比值低于所述比值阈值,则所述对象被诊断为患有痴呆症,或者其中
- [0325] b) 如果所述成熟ADM-NH<sub>2</sub>/肾上腺髓质素前体或其片段的标志物比值低于所述比值阈值,则所述对象患痴呆症的风险增加,或者其中
- [0326] c) 如果在治疗或干预过程中所述标志物比值提高,则在治疗或干预下患有痴呆症或有患痴呆症风险的对象的状态正在改善,
- [0327] 或者代替上述标志物比值,确定SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平并确定肾上腺髓质素前体或其片段(其不是SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>) 在所述对象的体液样品中的水平,并将两个确定的水平合并数学算法中,其中所述数学算法的结果被用于诊断痴呆症,或确定没有痴呆症的对象患痴呆症的风险,或监测患有痴呆症的对象的治疗或监测或指导患有痴呆症的对象干预,或监测有患痴呆症风险的对象预防性治疗或监测或指导有患痴呆症风险的对象预防性干预。
- [0328] 3. 根据项目2所述的方法,其中所述肾上腺髓质素前体的片段选自PAMP (SEQ ID No.:2)、MR-proADM (SEQ ID No.:3)、ADM-Gly (SEQ ID No.:5) 和ICT-proADM (SEQ ID No.:6)。
- [0329] 4. 根据项目1所述的方法,其中SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的阈值水平等于或低于15pg/mL,优选地等于或低于10pg/mL,优选地等于或低于5pg/mL。
- [0330] 5. 根据项目2或3所述的方法,其中所述比值阈值在0.2至0.75、优选地0.3至0.6、优选地0.4至0.5的范围内。
- [0331] 6. 根据前述项目中的任一项所述的方法,其中所述样品选自血液、血清、血浆、尿液、脑脊液 (CSF) 和唾液。
- [0332] 7. 根据项目1至6所述的方法,其中所述体液样品获取自在取样时从未有痴呆症或MCI诊断的对象。
- [0333] 8. 根据前述项目中的任一项所述的方法,其中确定选自下述的至少一种另外的临床参数:年龄,种族,精神状态测试(例如小型精神状态检查 (MMSE)),神经成像 (CT、MRT、PET、SPECT),家族史,ApoE4基因型,淀粉样肽β1-42 (Aβ<sub>1-42</sub>),淀粉样肽β1-40 (Aβ<sub>1-40</sub>),总Tau蛋白,磷酸化Tau蛋白 (p-Tau 181、p-Tau 199、p-Tau 231)。
- [0334] 9. 根据前述项目中的任一项所述的方法,其中所述标志物的水平通过免疫测定法来确定。
- [0335] 10. 根据前述项目中的任一项所述的方法,其中所述方法被用于患者分层,以选择

患者进行使用抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架的治疗,用于在对象中预防或治疗痴呆症,其中所述抗ADM抗体或抗ADM片段或抗ADM非Ig骨架结合到肾上腺髓质素的N-末端部分(aa 1-21):

[0336] YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC (SEQ ID No.:21)。

[0337] 11.一种抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述抗ADM抗体或抗ADM片段或抗ADM非Ig骨架结合到肾上腺髓质素的N-末端部分(aa 1-21):

[0338] YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTC (SEQ ID No.:21)。

[0339] 12.根据项目11所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述对象的确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平低于阈值水平,和/或所述对象具有标志物比值,所述标志物比值是确定的SEQ ID No.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>在所述对象的体液样品中的水平与确定的肾上腺髓质素前体或其片段在所述对象的体液样品中的水平的比值,并且其中所述标志物水平比值低于比值阈值。

[0340] 13.根据项目12所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述肾上腺髓质素前体的片段选自PAMP (SEQ ID No.:2)、MR-proADM (SEQ ID No.:3)、ADM-Gly (SEQ ID No.:5) 和CT-proADM (SEQ ID No.:6)。

[0341] 14.根据项目11至13所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述对象通过根据项目10所述的方法来选择。

[0342] 15.根据项目12至14中的任一项所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中SEQ IDNo.:4所示的成熟ADM-NH<sub>2</sub>的阈值水平等于或低于15pg/mL,优选地等于或低于10pg/mL,优选地等于或低于5pg/mL。

[0343] 16.根据项目12至14所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述标志物水平比值在0.2至0.75、优选地0.3至0.6、优选地0.4至0.5的范围内。

[0344] 17.根据项目11至16所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述对象根据项目10所述的方法来选择,并且其中所述体液样品选自血液、血清、血浆、尿液、脑脊液 (CSF) 和唾液。

[0345] 18.根据项目11至16所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中确定选自下述的至少一种另外的临床参数:年龄,种族,精神状态测试(例如小型精神状态检查(MMSE)),神经成像(CT、MRT、PET、SPECT),家族史,ApoE4基因型,淀粉样肽 $\beta$ 1-42 ( $A\beta_{1-42}$ ),淀粉样肽 $\beta$ 1-40 ( $A\beta_{1-40}$ ),总Tau蛋白,磷酸化Tau蛋白(p-Tau 181、p-Tau 199、p-Tau231)。

[0346] 19.根据项目12至18所述的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述标志物的水平通过免疫测定法来确定。

[0347] 20. 根据项目12至19所述的结合到肾上腺髓质素的抗肾上腺髓质素 (ADM) 抗体或抗ADM抗体片段或结合到肾上腺髓质素的抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述抗体或片段或骨架对ADM表现出至少 $10^{-7}$ M的结合亲和性。

[0348] 21. 根据项目12至20所述的抗ADM抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述抗体或片段或骨架识别并结合到肾上腺髓质素的N-末端(aa 1)。

[0349] 22. 根据项目12至21所述的抗ADM抗体或抗肾上腺髓质素抗体片段或抗ADM非Ig骨架在预防和治疗对象的痴呆症中的应用,其中所述抗体或片段或骨架将ADM的生物活性阻断不超过80%,优选地不超过50%。

[0350] 实施例

[0351] 实施例1

[0352] 抗体的产生和它们的亲和常数的确定

[0353] 产生了几种人类和鼠类抗体,并确定了它们的亲和常数(参见表1)。

[0354] 用于免疫接种的肽/偶联物:

[0355] 参见表1,合成了用于免疫接种的肽(JPT Technologies,Berlin,Germany),其带有另外的N-末端半胱氨酸(如果在所选的ADM序列内不存在半胱氨酸的话)残基用于将所述肽偶联到牛血清白蛋白(BSA)。使用Sulfolink-偶联凝胶(Perbio Science,Bonn,Germany)将所述肽共价连接到BSA。偶联程序按照Perbio的手册来进行。

[0356] 鼠类抗体按照下述方法来产生:

[0357] 将Balb/c小鼠在第0和14天用100 $\mu$ g肽-BSA-偶联物(乳化在100 $\mu$ l弗氏完全佐剂中)并在第21和28天用50 $\mu$ g(在100 $\mu$ l弗氏不完全佐剂中)免疫。在进行融合实验之前3天,所述动物接受溶解在100 $\mu$ l盐水中的50 $\mu$ g所述偶联物,其以一剂腹膜内和一剂静脉内注射来提供。

[0358] 将来自于所述被免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞系SP2/0的细胞用1ml 50%聚乙二醇在37 $^{\circ}$ C下融合30s。在清洗后,将细胞接种在96孔细胞培养板中。通过在HAT培养基[增补有20%胎牛血清和HAT增补物的RPMI 1640培养基]中生长来选择杂交克隆。两周后,将所述HAT培养基用HT培养基替换进行三次传代,然后返回到正常细胞培养基。

[0359] 在融合后三周,首先对细胞培养上清液进行筛选,以选出抗原特异性IgG抗体。将测试结果阳性的微量培养物转移到24孔板中进行增殖培养。在重新测试后,将所选的培养物使用有限稀释技术克隆以及重新克隆,并确定同种型(也参见Lane,R.D.1985.J.Immunol.Meth.81:223-228;Ziegler等,1996.Horm.Metab.Res.28:11-15)。

[0360] 小鼠单克隆抗体生产:

[0361] 抗体通过标准的抗体生产方法来生产(Marx等,1997, Monoclonal Antibody Production,ATLA 25, 121)并通过蛋白A来纯化。基于SDS凝胶电泳分析,所述抗体纯度为>95%。

[0362] 人类抗体:

[0363] 人类抗体按照下述程序利用噬菌体展示技术来生产:

[0364] 人类幼稚抗体基因文库HAL7/8被用于分离针对ADM肽的重组单链F-可变结构域(scFv)。将所述抗体基因文库用淘选策略进行筛选,所述策略包括使用含有通过两个不同

间隔物连接到ADM肽序列的生物素标签的肽。将使用非特异性结合的抗原和链亲和素结合的抗原的淘选轮的混合物用于最小化非特异性结合物的背景。将从第三轮淘选洗脱的噬菌体用于产生表达单克隆scFv的大肠杆菌菌株。将来自于这些克隆株的培养的上清液直接用于抗原ELISA测试(参见Hust等,2011.JournalofBiotechnology152:159-170;Schütte等,2009.PLoS One4,e6625)。

[0365] 阳性克隆在针对抗原的ELISA信号为阳性和针对链亲和素包被的微量滴定板为阴性的基础上选择。为了进一步表征,将所述scFv开放阅读框克隆到表达质粒pOPE107中(Hust等,2011.JournalofBiotechnology152,159-170),通过固定化金属离子亲和层析从培养上清液捕获,并通过孔径排阻层析进行纯化。

[0366] 亲和常数:

[0367] 为了确定抗体对ADM的亲合性,使用Biacore 2000系统(GE Healthcare Europe GmbH,Freiburg,Germany),利用无标记物表面等离子体共振来确定ADM与固定化抗体结合的动力学。抗体的可逆固定化使用以高密度共价偶联到CM5传感器表面的抗小鼠Fc抗体,按照制造商的说明书(小鼠抗体捕获试剂盒;GE Healthcare)来进行(Lorenz等,2011.Antimicrob Agents Chemother. 55(1): 165-173)。

[0368] 分别针对下述人类和鼠类ADM的ADM区产生单克隆抗体。下表代表了在进一步实验中使用的所选的一组得到的抗体。选择是基于靶区域:

[0369] 表1:

序列号	抗原/免疫原	ADM 区	名称	亲和常数 Kd (M)
SEQ ID NO.: 21	YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTC	1-21	NT-H	$5.9 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO.: 22	CTVQKLAHQIYQ	21-32	MR-H	$2 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO.: 23	CAPRSKISPQGY-NH <sub>2</sub>	C-42-52	CT-H	$1.1 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO.: 24	YRQSMNQGSRSNGCRFGTC	1-19	NT-M	$3.9 \times 10^{-9}$
SEQ ID NO.: 25	CTFQKLAHQIYQ	19-31	MR-M	$4.5 \times 10^{-10}$
SEQ ID NO.: 26	CAPRNKISPQGY-NH <sub>2</sub>	C-40-50	CT-M	$9 \times 10^{-9}$

[0370] 通过酶消化产生抗体片段:

[0371] Fab和F(ab)2片段的产生通过鼠类全长抗体NT-M的酶消化来进行。将抗体NT-M用a)基于胃蛋白酶的F(ab)2制备试剂盒(Pierce 44988)和b)基于木瓜蛋白酶的Fab制备试剂盒(Pierce 44985)消化。片段化程序按照供应商提供的说明书来进行。在F(ab)2片段化的情况下消化在37°C进行8h。Fab片段化消化相应地进行16h。

[0372] 用于Fab产生和纯化的程序:

[0373] 将固定化的木瓜蛋白酶通过用0.5ml消化缓冲液清洗树脂并将柱以5000x g离心1分钟来平衡。随后舍弃缓冲液。脱盐柱通过除去储存溶液并将它用消化缓冲液清洗,随后每次将它以1000x g离心2分钟来准备。将0.5ml制备的IgG样品添加到含有平衡的固定化木瓜蛋白酶的离心柱管中。消化反应的温育时间是在桌面摇床上在37°C进行16h。将柱以5000×g离心1分钟以将消化物与固定化木瓜蛋白酶分离。随后将所述树脂用0.5ml PBS清洗并以5000×g离心1分钟。将清洗级分添加到消化的抗体,总样品体积为1.0ml。将NAb蛋白A柱用PBS和IgG洗脱缓冲液在室温下平衡。将所述柱离心1分钟以除去储存溶液(含有0.02%叠氮化钠)并通过添加2ml PBS进行平衡,再次离心1分钟并舍弃穿流液。将所述样品施加到柱

并通过颠倒重新悬浮。温育在颠倒混合下在室温进行10分钟。将所述柱离心1分钟,保留带有Fab片段的穿流液。(参考文献:Coulter和Harris1983.J. Immunol. Meth. 59, 199-203.; Lindner等,2010.Cancer Res. 70, 277-87; Kaufmann等,2010.PNAS. 107, 18950-5.; Chen等,2010.PNAS. 107, 14727-32; Uysal等,2009J. Exp. Med. 206, 449-62; Thomas等,2009.J. Exp. Med. 206, 1913-27; Kong等,2009J. Cell Biol. 185, 1275-840)。

[0375] 用于F(ab')<sub>2</sub>片段产生和纯化的方法:

[0376] 将固定化的胃蛋白酶通过用0.5ml消化缓冲液清洗树脂并将柱以5000x g离心1分钟来平衡。随后舍弃缓冲液。脱盐柱通过除去储存溶液并将它用消化缓冲液清洗,随后每次将它以1000x g离心2分钟来准备。将0.5ml制备的IgG样品添加到含有平衡的固定化胃蛋白酶的离心柱管中。消化反应的温育时间是在桌面摇床上在37°C进行16h。将柱以5000×g离心1分钟以将消化物与固定化胃蛋白酶分离。随后将所述树脂用0.5mL PBS清洗并以5000×g离心1分钟。将清洗级分添加到消化的抗体,总样品体积为1.0ml。将NAb蛋白A柱用PBS和IgG洗脱缓冲液在室温下平衡。将所述柱离心1分钟以除去储存溶液(含有0.02%叠氮化钠)并通过添加2ml PBS进行平衡,再次离心1分钟并舍弃穿流液。将所述样品施加到柱并通过颠倒重新悬浮。温育在颠倒混合下在室温进行10分钟。将所述柱离心1分钟,保留带有Fab片段的穿流液。(参考文献:Mariani等,1991.Mol. Immunol. 28:69-77; Beale1987. Exp Comp Immunol 11:287-96; Ellerson等,1972. FEBS Letters 24(3):318-22; Kerbel和Elliot1983. Meth Enzymol 93:113-147; Kulkarni等,1985. Cancer Immunol Immunotherapy 19:211-4; Lamoyi 1986. Meth Enzymol 121:652-663; Parham等,1982. J Immunol Meth 53:133-73; Raychaudhuri等,1985. Mol Immunol 22(9):1009-19; Rousseaux等,1980. Mol Immunol 17:469-82; Rousseaux等,1983. J Immunol Meth 64:141-6; Wilson等,1991. J Immunol Meth 138:111-9)。

[0377] NT-H抗体片段人源化:

[0378] 抗体片段通过CDR嫁接方法进行人源化(Jones等,1986.Nature 321, 522-525)。

[0379] 为了获得人源化序列执行了下述步骤:

[0380] -总RNA提取:使用Qiagen试剂盒从NT-H杂交瘤提取总RNA。

[0381] -第一轮RT-PCR:使用QIAGEN®一步RT-PCR试剂盒(目录号210210)。RT-PCR使用特异性针对重链和轻链的引物组进行。对于每个RNA样品,使用覆盖可变区的前导序列的简并正向引物混合物设立了12个单独的重链和11个轻链RT-PCR反应。反向引物位于重链和轻链的恒定区中。没有在引物中工程化限制性位点。

[0382] -反应设置:5xQIAGEN®一步RT-PCR缓冲液5.0μl, dNTP混合物(含有10mM的每种dNTP)0.8μl,引物组0.5μl, QIAGEN®一步RT-PCR酶混合物0.8μl,模板RNA 2.0μl,无RNase水至20.0μl。总体积20.0μl。PCR条件:反转录:50°C,30min;初始PCR激活:95°C,15min;循环:94°C,25sec;54°C,30sec;72°C,30sec共20个循环;最终延伸:72°C,10min。

[0383] -第二轮半巢式PCR:将来自于第一轮反应的RT-PCR产物进一步在第二轮PCR中扩增。使用特异性针对抗体可变区的半巢式引物组设立了12个单独的重链和11个轻链RT-PCR反应。

[0384] -反应设置:2x PCR混合物10μl;引物组2μl;第一轮PCR产物8μl;总体积20μl;杂交瘤抗体克隆报告PCR条件:初始变性在95°C下5min;95°C25sec、57°C30sec、68°C30sec共25

个循环;最终延伸是10min 68°C。

[0385] -在PCR完成后,将PCR反应样品在琼脂糖凝胶上迁移,以可视化扩增的DNA片段。在对通过巢式RT-PCR扩增的超过15个克隆的DNA片段进行测序后,几个小鼠抗体重链和轻链已被克隆并且正确。蛋白质序列比对和CDR分析鉴定了一条重链和一条轻链。由于在可变重链的第26、40和55位上的氨基酸和在可变轻链的第40位上的氨基酸对结合性能来说是关键的,因此可以将它们还原到鼠源。得到的候选物在下文描绘。

(Padlan1991.Mol.Immunol.28,489-498;Harris和Bajorath.1995.ProteinSci.4,306-310)。

[0386] 抗体片段序列 (SEQ ID No.:13-22) 的注释:粗体和下划线是按时间顺序排列的CDR 1、2、3;斜体是恒定区;铰链区用粗体字母突出显示,并且组氨酸标签用粗体和斜体字母突出显示。

[0387] SEQ ID No.:13 (AM-VH-C)

QVQLVQSGAELMKPGASVKISCKAT**GYTFSRYW**IEWVKQRPGHGLEWIGE**ILPG**  
 [0388] **SGST**NYNEKFKGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYC**TEGYEYDGF**YWGQGTTL  
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
 SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR**VEPKHHHHHH**

[0389] SEQ ID No.:14 (AM-VH1)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFSRYW**ISWVRQAPGQGLEWMGR**ILP**  
 [0390] **GSGST**NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC**TEGYEYDGF**YWGQGT  
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
 SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR**VEPKHHHHHH**

[0391] SEQ ID No.:15 (AM-VH2-E40)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFSRYW**IEWVRQAPGQGLEWMGR**ILP**  
 [0392] **GSGST**NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC**TEGYEYDGF**YWGQGT  
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
 SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR**VEPKHHHHHH**

[0393] SEQ ID No.:16 (AM-VH3-T26-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAT**GYTFSRYW**ISWVRQAPGQGLEWMGE**ILP**  
 [0394] **GSGST**NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC**TEGYEYDGF**YWGQGT  
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
 SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR**VEPKHHHHHH**

[0395] SEQ ID No.:17 (AM-VH4-T26-E40-E55)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAT**GYTFSRYW**IEWVRQAPGQGLEWMGE**ILP**  
 [0396] **GSGST**NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC**TEGYEYDGF**YWGQGT  
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
 SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR**VEPKHHHHHH**

[0397] SEQ ID No.:18 (AM-VL-C)

DVLLSQTPLSLPVSLGDQATISCRSS**QSIVYSNGNT**YLEWYLQKPGQSPKLLI**RY**  
 [0398] **SNR**FGVPPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDLGVYYC**FQGS**SHIPYTFGGGTKLEIKRTV  
 AAPSVEFIPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0399] SEQ ID No.:19(AM-VL1)  
 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSIVYSNGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYRV**  
**SNRDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGQGTKLEIKRTV**  
 [0400] AAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
 KDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0401] SEQ ID No.:20(AM-VL2-E40)  
 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS**QSIVYSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYRV**  
**SNRDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHIPYTFGQGTKLEIKRTV**  
 [0402] AAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
 KDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0403] 实施例2

[0404] 免疫测定法的开发

[0405] 使用针对人类ADM肽 (NT-H、MR-H和CT-H; 参见表1) 产生的抗体开发了免疫测定法。

[0406] 标记程序(示踪物): 将100 $\mu$ g (100 $\mu$ l) 抗体 (1mg/ml, 在pH 7.4的PBS中) 与10 $\mu$ l 吡啶 NHS酯 (1mg/mL, 在乙腈中, InVent GmbH, Germany) (EP0353971) 混合并在室温温育20min。将标记的CT-H在Bio-Sil®SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) 上通过凝胶过滤 HPLC进行纯化。将纯化的标记抗体在 (300mmol/L磷酸钾, 100mmol/L NaCl, 10mmol/L Na-EDTA, 5g/L牛血清白蛋白, pH 7.0) 中稀释。终浓度为每200 $\mu$ L标记的化合物 (大约20ng标记的抗体) 大约800.000相对光单位 (RLU)。吡啶酯化学发光使用AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH&Co.KG) 来测量。

[0407] 固相: 将聚苯乙烯管 (Greiner Bio-One International AG, Austria) 用抗体 (1.5  $\mu$ g抗体/0.3mL 100mmol/L NaCl, 50mmol/L TRIS/HCl, pH 7.8) 包被 (室温下18h)。在用5% 牛血清白蛋白阻断后, 将管用pH 7.4的PBS清洗并真空干燥。

[0408] 校准品: 将合成的人类ADM (hADM) (Bachem, Switzerland) 用50mM Tris/HCl, 250mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 0.5% BSA, 20片/L的完全蛋白酶抑制剂混合物片剂 (Roche AG), pH 7.8, 线性稀释。校准品在使用前储存在-20 $^{\circ}$ C。

[0409] ADM免疫测定法: 将50 $\mu$ l样品 (或校准品) 吸取到包被的管中, 在添加标记的第二抗体 (200 $\mu$ l) 后, 将所述管在室温温育2h。通过用清洗溶液 (20mM PBS, pH 7.4, 0.1% Triton X-100) 清洗5次 (每次1ml), 除去未结合的示踪物。管结合的化学发光使用LB 953 (Berthold Technologies GmbH&Co.KG) 来测量。抗体在夹心免疫测定法中用作包被管和标记的抗体, 并以下述变化形式组合 (参见表2)。温育按照hADM免疫测定法下所描述的来进行。结果以特异性信号 (在10ng/mL ADM下) /背景 (无ADM的样品) 信号的比值给出。

[0410] 表2:

信噪比	NT-ADM示踪物	MR-ADM示踪物	CT-ADM示踪物
NT-ADM	/	195	241
MR-ADM	204	/	904
CT-ADM	260	871	/

[0412] 令人吃惊的是, 我们发现MR-ADM与CT-ADM的组合是具有最高信噪比的组合。随后, 我们将这种抗体组合用于进一步研究以测量bio-ADM。我们使用抗MR-ADM抗体作为固相抗

体并使用抗CT-ADM抗体作为标记抗体。典型的剂量/信号曲线示出在图1中。

[0413] 实施例3

[0414] 人类肾上腺髓质素的稳定性

[0415] 将人类ADM在人类柠檬酸盐血浆中稀释 ( $n=5$ , 终浓度为 $10\text{ng ADM/mL}$ ) 并在 $24^\circ\text{C}$ 下温育。在选择的时间点, 将等分试样冷冻在 $-20^\circ\text{C}$ 。在融化样品后, 立即使用上述hADM免疫测定法来定量hADM。

[0416] 表3示出了在 $24^\circ\text{C}$ 下hADM在人类血浆中的稳定性。

[0417] 表3:

[0418]

时间 (h)	平均ADM回收 (N=5)	免疫反应性的相对损失	免疫反应性损失的%/h
0	100	/	/
2	99.2	0.8	0.4
4	96.4	3.6	0.8
8	88.2	11.8	1.5
			平均值:0.9%/h

[0419] 令人吃惊的是, 在夹心免疫测定法中使用抗体组合MR-ADM和CT-ADM, 分析物的分析前稳定性高(免疫反应性损失的平均值仅为 $0.9\%/h$ )。相反, 使用其他测定方法, 报告的血浆半衰期仅为 $22\text{min}$  (Hinson等, 2000 *Endocrine Reviews* 21 (2):138-167)。由于在医院日常中从取样到分析的时间少于 $2\text{h}$ , 因此所述使用的ADM检测方法适合于日常诊断。引人注目的是, 为了达到可接受的ADM免疫反应性稳定性, 不需向样品添加任何非常规添加剂(如抑肽酶 (Ohta等, 1999. *ClinChem* 45 (2):244-251))。

[0420] 实施例4

[0421] 校准品制备物的可重复性和校准品的制备间变差

[0422] 我们发现了制备用于ADM测定法的校准品的结果的高变差(平均CV  $8.5\%$ , 参见表4)。这可能是由hADM对塑料和玻璃表面的高吸附性造成的 (Lewis等, 1998. *Clinical Chemistry* 44(3): 571-577)。通过添加去污剂(最高 $1\%$  Triton X 100或 $1\%$  Tween 20)、蛋白质(最高 $5\%$  BSA)和高离子强度(最高 $1\text{M NaCl}$ )或其组合, 这种效应仅略微降低。令人吃惊的是, 如果向校准品稀释缓冲液添加过量的抗NT-ADM抗体 ( $10\mu\text{g/mL}$ ), ADM测定法校准品制备物的回收和可重复性显著改善, 达到 $<1\%$ 的制备间CV(表4)。变差系数从5次独立的制备运行给出。所述校准品使用上述ADM测定法测量 ( $s/n-r$ =信噪比)。对于所有后面的研究, 我们使用基于在示踪剂缓冲液中存在作为增补剂的 $10\mu\text{g/mL}$  NT-ADM抗体和 $10\mu\text{g/mL}$  NT-ADM抗体的情况下制备的校准品的ADM测定法。

[0423] 幸运的是, N-末端抗体的存在不影响由MR-和C-末端抗体的组合产生的bio-ADM信号(图1)。

[0424] 表4:

	在 NT-ADM 抗体 (10 $\mu$ g/mL) 存在下	制备间 CV (%)	无抗体	制备间 CV (%)
[0425] 校准品				
100ng/mL	3453 s/n-r	0.9	2842 s/n-r	2.8
10ng/mL	1946 s/n-r	0.8	1050 s/n-r	7.9
1ng/mL	179 s/n-r	1.1	77 s/n-r	14.8
		平均值: 0.93		平均值: 8.5

[0426] 实施例5

[0427] 灵敏度

[0428] 测定法灵敏度的目标是完全覆盖健康对象的ADM浓度和明显更低的浓度。

[0429] 健康对象中的Bio-ADM浓度

[0430] 使用bio-ADM测定法测量了健康对象 (n=88, 57位女性, 31位男性, 平均年龄: 42.2岁) (Weber等, 2017. JALM, 2(2): 222-233)。四分位差 (IQR) 中位数为13.7 (9.6-18.7) pg/mL, 平均值 (SD) 为15.6 (9.2) pg/mL。由于所述测定法灵敏度 (检测极限) 为3pg/mL, 因此使用所述bio-ADM测定法可检测100%的健康对象。

[0431] 实施例6

[0432] MPP的研究设计和群体

[0433] 马尔默预防项目 (Malmö Preventive Project) (MPP) 于1970年代中期获得资助, 旨在探索普通人群中的CV风险因子, 并招募了33346位居住在马尔默的个体 (Fedorowski等, 2010. Eur Heart J 31:85-91)。在2002年至2006年之间, 共有18,240位原始参与者响应了邀请 (参与率70.5%), 并进行了包括全面身体检查和血液样本采集在内的筛查 (Fava等, 2013. Hypertension 2013; 61:319-26)。在本研究中, MPP中的复检被视为基线。在基线时已患CVD的对象被排除。在4,364患者中, 从在基线评估期间收集的的血浆测量了Bio-ADM。在血液采样时, 已有34位患者被诊断为患有阿兹海默氏病。在随后的7年中, 有187位患者发展出AD (发生AD)。从所有参与者获得了知情同意书, 隆德大学伦理委员会 (Ethical Committee of Lund University, Lund, Sweden) 批准了所述研究方案。

[0434] 从瑞典国立患者登记中心 (Swedish National Patient Register) (SNPR) 索求关于痴呆症诊断的信息。登记中心中的诊断是根据《国际疾病分类》(ICD) 编码290, 293 (ICD-8)、290, 331 (ICD-9) 或F00, F01, F03, G30 (ICD-10) 的不同修订版收集的。自1987年以来, SNPR包括瑞典的所有住院护理, 并且此外还含有门诊数据, 包括在2000年后来自于私人 and 公共护理人员两者的日间手术和精神病护理。所有病因的痴呆症根据《精神障碍诊断和统计手册》(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) (DSM) -III修订版的标准来诊断, 而将DSM-IV标准用于阿兹海默氏病和血管性痴呆诊断。诊断通过对医疗记录以及可用的神经成像数据进行全面审查来验证。研究医师为每位患者指派最终诊断结果, 并在未解决的病例中咨询了专长于认知障碍的老年病学专家。我们选择了用于病例对照研究的数据集, 并在MPP的一个子组群中对MR-proADM进行了测量 (n=250位对照, 和n=150位发生AD的对象)。此外, 在血液采样时已被诊断为患有阿兹海默氏病的患者的独立组群 (= 现患AD; n=150) 中测量了bio-ADM。

[0435] 使用商业化全自动均相时间分辨荧光免疫测定法来测量血浆中的MR-proADM (BRAHMS MR-proADM KRYPTOR; BRAHMS GmbH, Hennigsdorf, Germany) (Caruhel等, 2009.

Clin Biochem. 42(7-8):725-8)。

[0436] **统计分析:** 值被表示为平均值和标准偏差、中位数和四分位差 (IQR) 或适当的计数和百分率。连续变量的组的比较使用Kruskal-Wallis检验进行。对生物标志物数据进行对数转换。在单变量和多变量分析中,使用Cox比例风险回归来分析风险因子对生存率的影响。针对所有变量测试了比例风险的假设。对于连续变量来说,将风险比 (HR) 标准化以描述一个IQR的生物标记物变化的HR。给出了风险因子的95%置信区间 (CI) 和卡方 (Wald检验) 的显著性水平。通过模型似然比卡方统计量评估每种模型的预测价值。给出一致性指数 (C指数) 作为效果的度量。它等同于为二元结果采用的AUC的概念。对于多变量模型,给出了C指数的自举校正版本。通过Kaplan-Meier方法绘制的生存曲线被用于说明目的。为了测试bio-ADM与临床变量之间的独立性,我们对嵌套模型使用了似然比卡方检验。

[0437] 所有统计检验均为双尾检验,并且0.05的双侧p-值被认为是显著的。使用2.5.1版本的R (<http://www.r-project.org>, library Design, Hmisc, ROCR) 和社会科学统计软件包 (Statistical Package for the Social Sciences) (SPSS) 22.0版 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) 进行统计分析。

[0438] **结果:**

[0439] 组群的基线特征示出在表5中。

[0440] 表5:

	变量	n=4364
[0441]	年龄	69.4 (6.2)
	男性	3008 (68.9%)
	当前吸烟	835 (19.1%)
	AHT	1476 (33.8%)
	HDL	1.4 (0.4)
	LDL	3.7 (1.0)
[0442]	BMI	27.1 (6.2)
	SBP	146.6 (20.3)
	现患糖尿病	466 (10.7%)
	发生AD	187 (4.3%)
	现患AD	34 (0.8%)

[0443] MPP组群和独立的阿兹海默氏病组群中的bio-ADM浓度示出在图2中。在随时间发展出AD的患者 (发生AD) 和独立组群中在血液采样时患有AD的患者 (现患AD) 中的bio-ADM浓度与无AD组相比明显更低 (分别为 $p=0.01$ 和 $<0.0001$ )。来自于MPP组群的现患AD的组 ( $n=34$ ) 与无AD组相比也表现出更低的bio-ADM浓度,但不是统计学显著的,这是由于样本量小。

[0444] 低的bio-ADM血浆浓度强烈预测阿兹海默氏病,风险比 (HR) 为0.73 (CI 0.6-0.87;  $p<0.001$ )。图3示出了使用bio-ADM浓度预测阿兹海默氏病的Kaplan-Meier图 (现患AD病例从所述分析中排除)。最低的四分位数与患AD的最高风险相关。

[0445] 我们选择来自于MPP组群的400位患者(没有在前面的CVD和AD)为病例对照产生了数据集,其中n=250位未发展出AD的对象和n=150位在7年的跟踪时间内发展出AD的对象。同样地,与无AD组相比,在发生AD的患者和现患AD的患者(独立组群)中bio-ADM浓度明显更低(对于所有比较来说 $p < 0.0001$ ) (图4)。此外,在MPP病例对照对象中测量了MR-proADM,与无AD组相比,其在发生AD组中略微更高但不显著(图5)。

[0446] 下一步,我们将两种生物标志物Ibio-ADM和MR-proADM组合。为了计算比值,所述两种标志物的浓度必须优选地以相同的单位(例如pmol/L)表示。因此,从计算比值的角度来说,bio-ADM的浓度以pmol/L为单位计算。当与无AD对象相比时,在具有发生AD的对象中bio-ADM与MR-proADM的比值显著降低( $p < 0.0001$ ;图6)。单独的Bio-ADM强烈预测阿兹海默氏病,比值比(OR)为0.44(CI 0.33-0.58)。然而,bio-ADM与MR-proADM的比值比单独的bio-ADM更好( $p < 0.001$ ),OR为0.32(CI 0.23-0.44)。bio-ADM和bio-ADM与MR-proADM的比值的相应的受试者工作曲线(ROC图)分别示出在图7A和图7B中,并揭示出bio-ADM的AUC为0.67(95%CI 0.61-0.72),bio-ADM与MR-proADM之间的比值的AUC为0.73(95% CI 0.68-0.78)。此外,bio-ADM和bio-ADM与MR-proADM的比值两者均独立于年龄和性别。

[0447] 实施例7-NT-H在健康人类中的给药

[0448] 所述研究在健康男性对象中作为随机双盲安慰剂对照研究来进行,在各自包含8位健康男性对象的3个连续组中使用作为静脉内(i.v.)输注给药的单次递增剂量的NT-H抗体(第一组,0.5mg/kg;第二组,2mg/kg;第三组8mg/kg)(每组活性药剂n=6,安慰剂n=2)。

[0449] 主要纳入标准为书面知情同意书,年龄在18-35岁之间,同意使用可靠的避孕方式以及BMI在18至30kg/m<sup>2</sup>之间。

[0450] 在研究单位中的对象,在1小时时间段内通过缓慢输注接受单次i.v.给药的NT-H抗体(0.5mg/kg;2mg/kg;8mg/kg)或安慰剂。

[0451] 所述4个组中的基线bio-ADM值没有差异。bio-ADM中位数值在安慰剂组中为7.1pg/mL,在第一治疗组(0.5mg/kg)中为6.8pg/mL,在第二治疗组(2mg/kg)中为5.5pg/mL,并且在第三治疗组(8mg/mL)中为7.1pg/mL。

[0452] 结果显示,在健康人类个体中,在NT-H抗体给药后的前1.5小时内bio-ADM值快速增加,然后达到平台并缓慢下降(图8)。

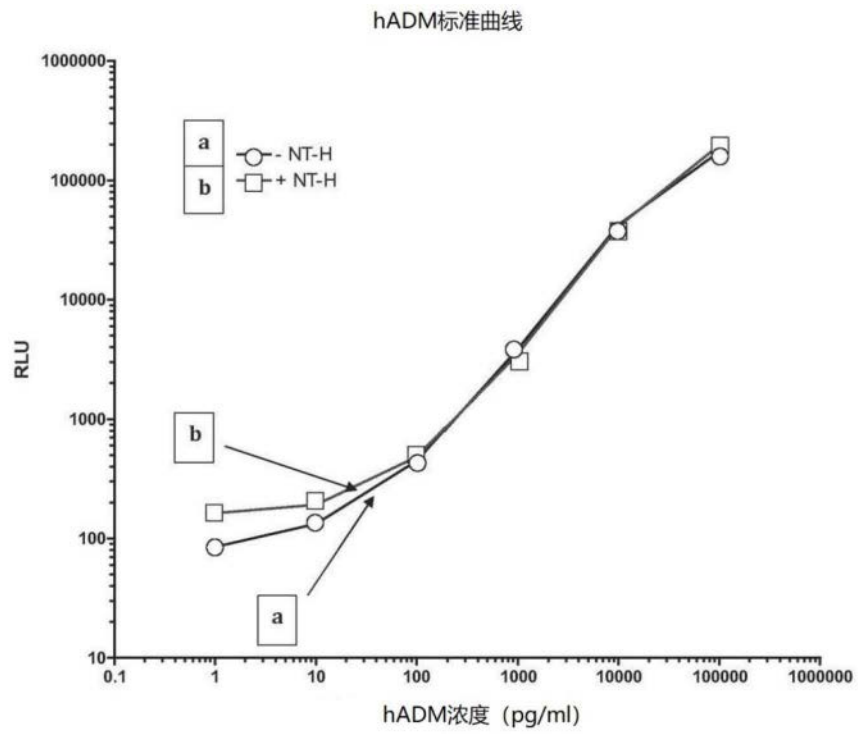


图1

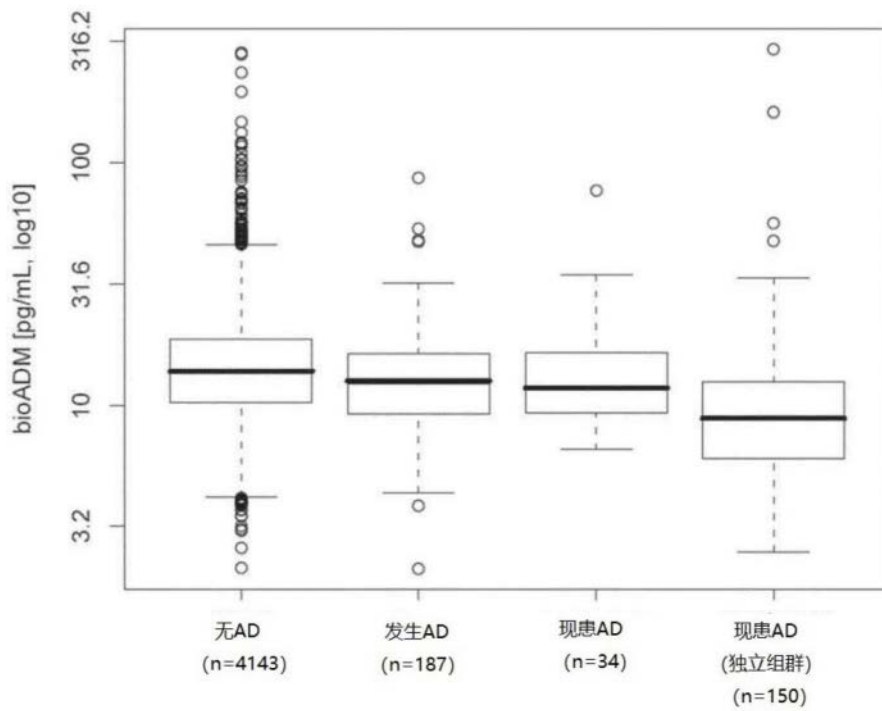


图2

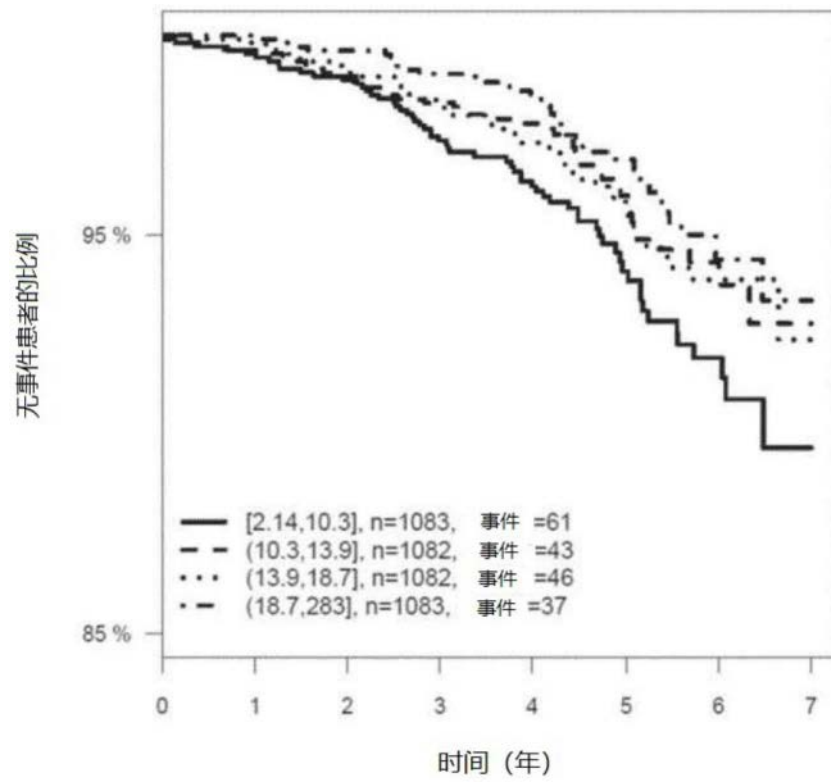


图3

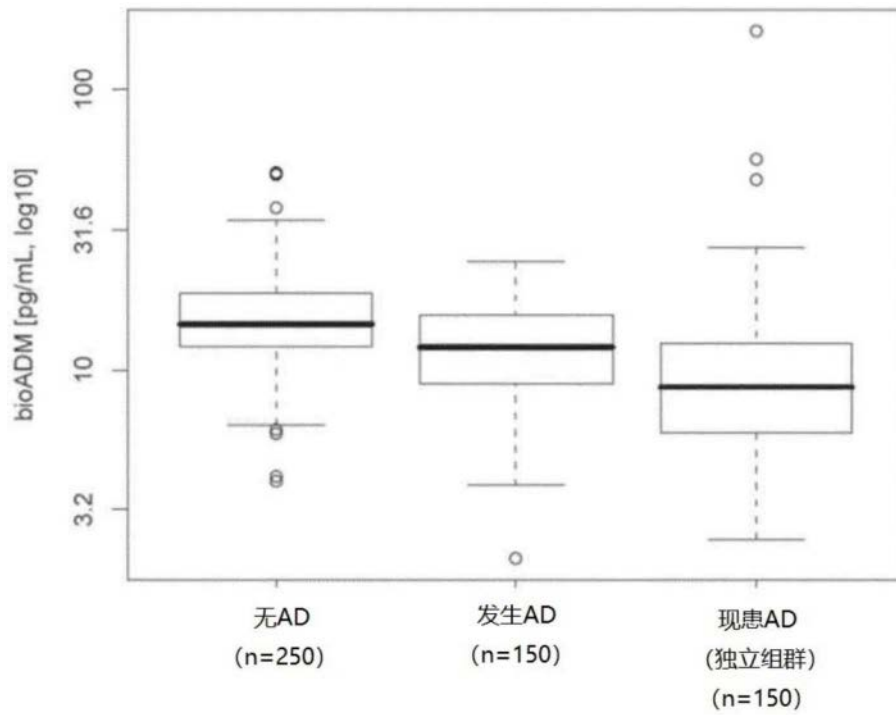


图4

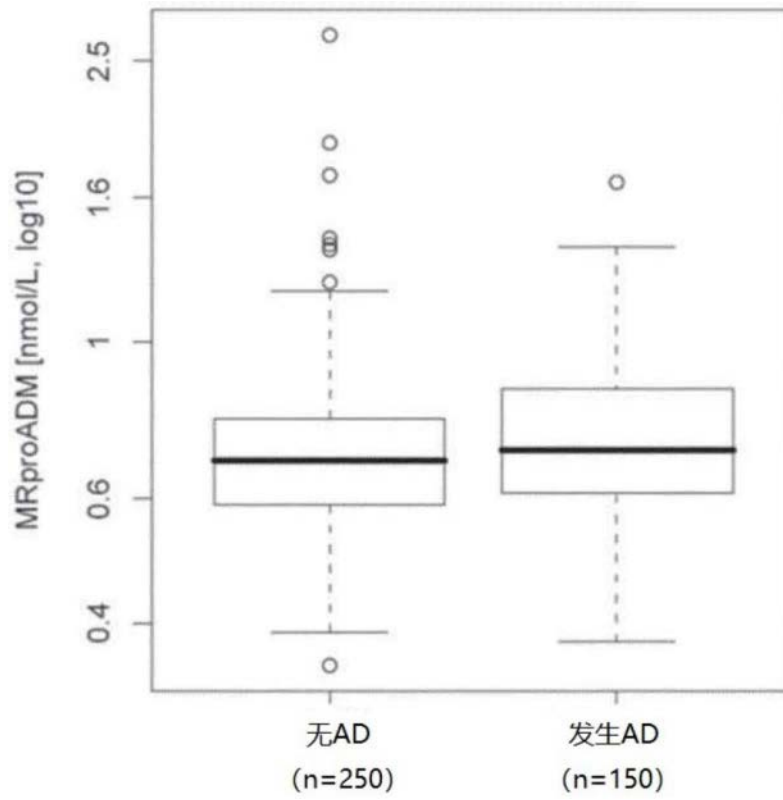


图5

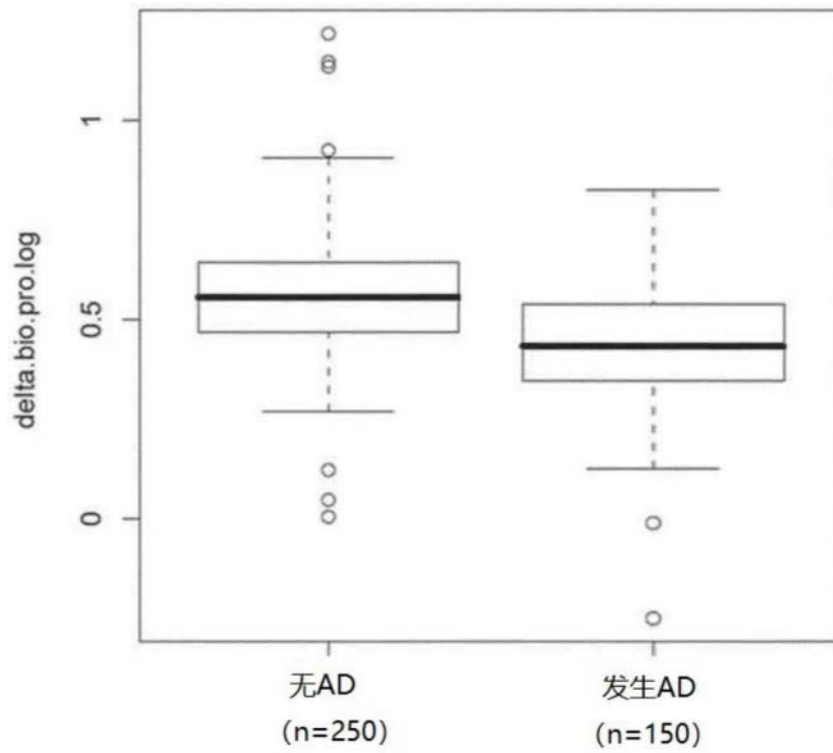


图6

A) bio-ADM

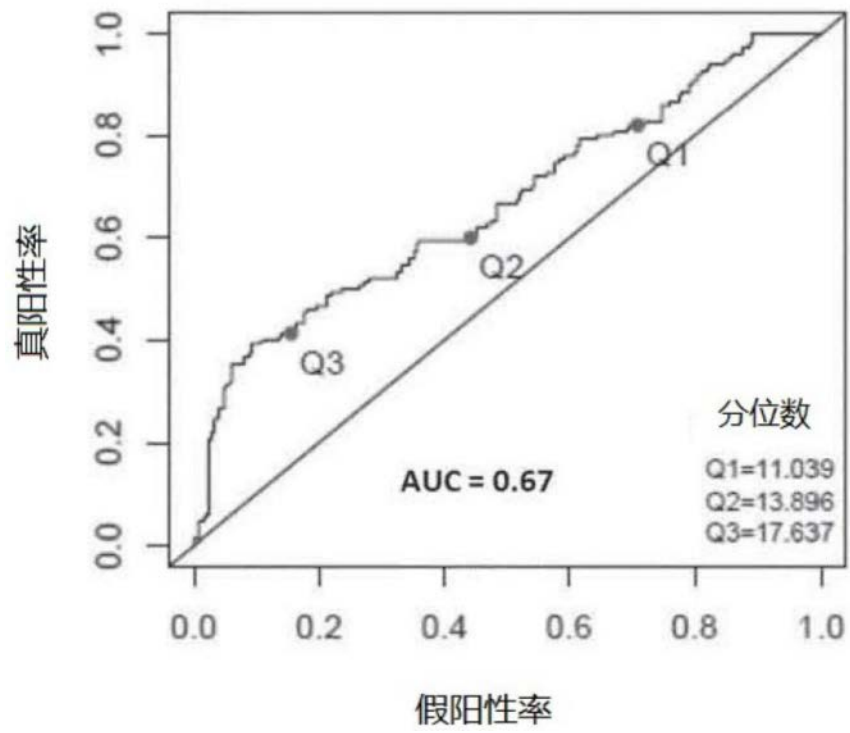


图7A

B) MR-proADM

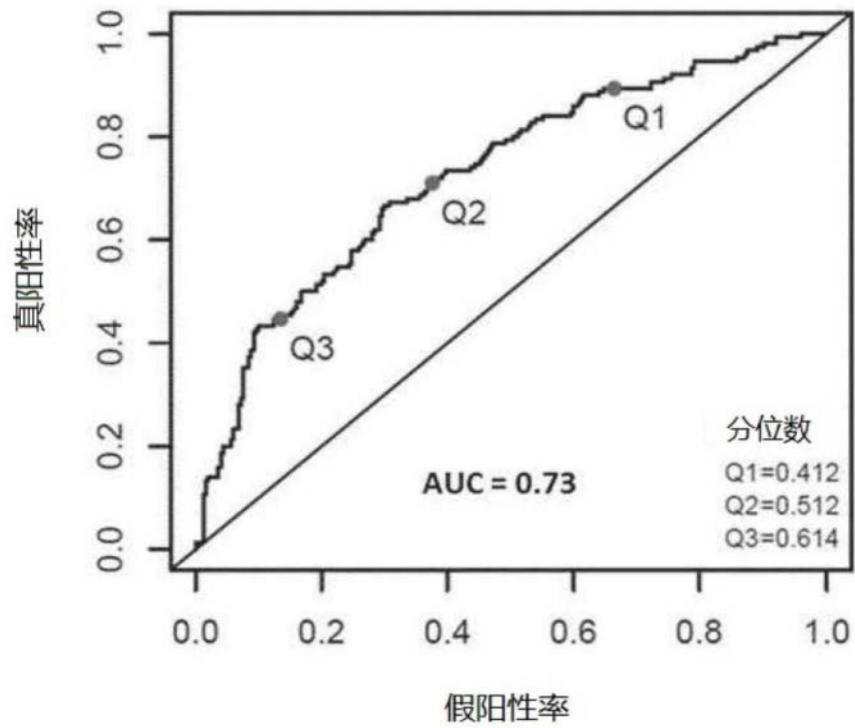


图7B

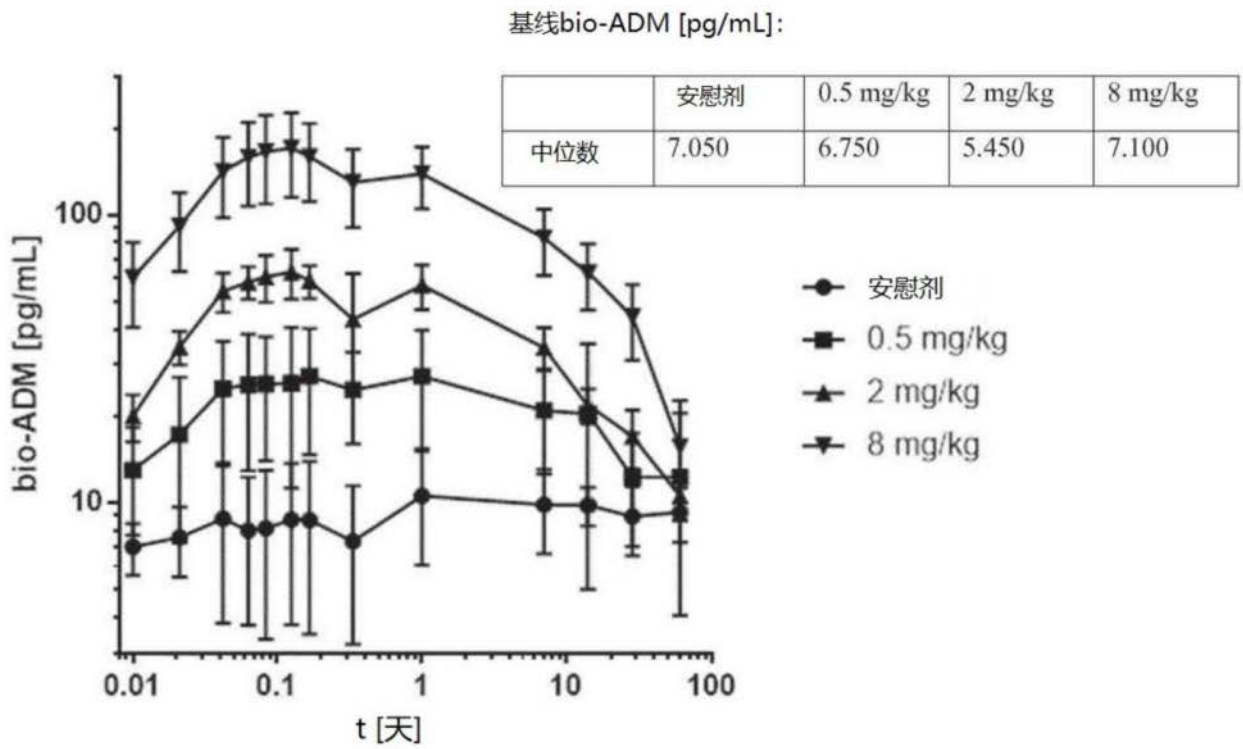


图8