



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105579061 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201380035339. 9

(22) 申请日 2013. 06. 18

(30) 优先权数据

61/667, 891 2012. 07. 03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/046399 2013. 06. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/007982 EN 2014. 01. 09

(71) 申请人 杨森阿尔茨海默氏症免疫治疗公司

地址 爱尔兰都柏林

申请人 惠氏有限责任公司

(72) 发明人 曼纽尔·布蒂尼 陈明

希拉·加尔道伊

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 杨青 穆德骏

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

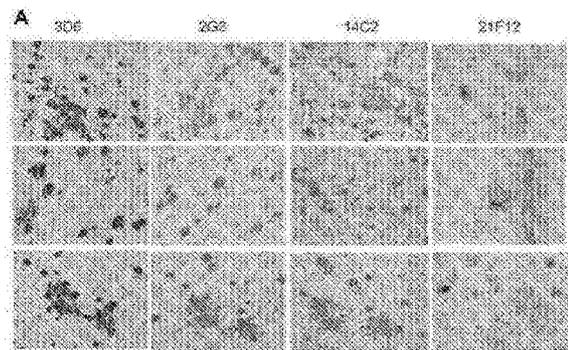
权利要求书8页 说明书35页 附图12页

(54) 发明名称

C端和中央表位的Aβ 抗体

(57) 摘要

本发明提供了相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的针对Aβ 的C端和中央表位的抗体。本发明还提供了治疗患者以减少或消除Aβ 的紧密斑的存在和相关症状的方法。一方面,本发明提供了一种治疗被诊断患有中期或晚期阿尔茨海默氏病的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用与Aβ 的第12-43位残基内的表位结合并且相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案。在某些情况下,所述患者已被诊断患有中期阿尔茨海默氏病。在某些情况下,所述患者已被诊断患有晚期阿尔茨海默氏病。



1. 一种治疗被诊断患有中期或晚期阿尔茨海默氏病的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用与A β 的第12-43位残基内的表位结合并相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案。

2. 权利要求1的方法,其中所述患者已被诊断患有中期阿尔茨海默氏病。

3. 权利要求1的方法,其中所述患者已被诊断患有晚期阿尔茨海默氏病。

4. 权利要求1的方法,其中所述抗体对A β 的中央表位具有特异性。

5. 权利要求4的方法,其中所述抗体是266抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,15C11抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者22D12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

6. 权利要求5的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区互补决定区(CDR),其中CDR L1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

7. 权利要求5的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:14的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:14的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:14的第94至101位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:15的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:15的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:15的第99至101位残基的氨基酸序列。

8. 权利要求5的方法,其中所述抗体包含:22D12的三个轻链可变区CDR和22D12的三个重链可变区CDR。

9. 权利要求1的方法,其中所述抗体对A β 的C端表位具有特异性。

10. 权利要求9的方法,其中所述抗体是2G3抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,14C2抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者21F12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

11. 权利要求10的方法,其中所述抗体包含:2G3的三个轻链可变区互补决定区(CDR)和2G3的三个重链可变区CDR。

12. 权利要求10的方法,其中所述抗体包含:14C2的三个轻链可变区CDR和14C2的三个重链可变区CDR。

13. 权利要求10的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:3的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:3的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:3的第94至102位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:2的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:2的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:2的第99至106位残基的氨基酸序列。

14. 权利要求1至13任一项的方法,其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

15. 权利要求14的方法,其中所述抗体是人源化抗体。

16. 权利要求14的抗体,其中所述抗体是IgG1亚型。

17. 一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病并且相对于总斑块来说紧密斑的比例比弥散斑的比例更高的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用与A β 的第12-43位残基内的表

位结合并且相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案。

18. 权利要求17的方法,其中紧密斑的比例为总斑块的至少40%。

19. 权利要求17的方法,其中紧密斑和弥散斑相对于总斑块的的比例通过正电子发射断层(PET)扫描来测定。

20. 权利要求19的方法,其中PET扫描包括检测选自 $[^{18}\text{F}]$ AV-14、 $[^{18}\text{F}]$ AV-144、 $[^{11}\text{C}]$ AZD2995、 $[^{18}\text{F}]$ -AZD4694和 $[^{18}\text{F}]$ -SMIBR-W372的PET配体。

21. 权利要求17的方法,其中所述抗体对AB的中央表位具有特异性。

22. 权利要求21的方法,其中所述抗体是266抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,15C11抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者22D12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

23. 权利要求22的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区互补决定区(CDR),其中CDR L1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

24. 权利要求22的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:14的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:14的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:14的第94至101位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:15的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:15的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:15的第99至101位残基的氨基酸序列。

25. 权利要求22的方法,其中所述抗体包含:22D12的三个轻链可变区CDR和22D12的三个重链可变区CDR。

26. 权利要求17的方法,其中所述抗体对AB的C端表位具有特异性。

27. 权利要求26的方法,其中所述抗体是2G3抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,14C2抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者21F12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

28. 权利要求27的方法,其中所述抗体包含:2G3的三个轻链可变区互补决定区(CDR)和2G3的三个重链可变区CDR。

29. 权利要求27的方法,其中所述抗体包含:14C2的三个轻链可变区CDR和14C2的三个重链可变区CDR。

30. 权利要求27的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:3的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:3的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:3的第94至102位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:2的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:2的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:2的第99至106位残基的氨基酸序列。

31. 权利要求17至30任一项的方法,其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

32. 权利要求31的方法,其中所述抗体是人源化抗体。

33. 权利要求31的方法,其中所述抗体是IgG1亚型。

34. 一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病并具有癫痫发作症状的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用与A β 的第12-43位残基内的表位结合并且相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案。

35. 权利要求34的方法,其中总淀粉样斑块负担降低并且癫痫发作症状减轻。

36. 权利要求34的方法,其中所述抗体对 β -淀粉样肽的中央表位具有特异性。

37. 权利要求36的方法,其中所述抗体是266抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,15C11抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者22D12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

38. 权利要求37的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区互补决定区(CDR),其中CDR L1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

39. 权利要求37的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:14的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:14的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:14的第94至101位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:15的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:15的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:15的第99至101位残基的氨基酸序列。

40. 权利要求37的方法,其中所述抗体包含:22D12的三个轻链可变区CDR和22D12的三个重链可变区CDR。

41. 权利要求34的方法,其中所述抗体对A β 的C端表位具有特异性。

42. 权利要求41的方法,其中所述抗体是2G3抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,14C2抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者21F12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

43. 权利要求42的方法,其中所述抗体包含:2G3的三个轻链可变区互补决定区(CDR)和2G3的三个重链可变区CDR。

44. 权利要求42的方法,其中所述抗体包含:14C2的三个轻链可变区CDR和14C2的三个重链可变区CDR。

45. 权利要求42的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:3的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:3的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:3的第94至102位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:2的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:2的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:2的第99至106位残基的氨基酸序列。

46. 权利要求34至45任一项的方法,其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

47. 权利要求46的方法,其中所述抗体是人源化抗体。

48. 权利要求46的方法,其中所述抗体是IgG1亚型。

49. 一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病的患者的方法,所述方法包括:

(a)向所述患者施用相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案,其中所述

抗体对AB的中央或C端表位具有特异性;以及

(b)使用PET扫描监测所述患者的脑中紧密斑的一种或多种特性。

50. 权利要求49的方法,其中使用放射性示踪剂PiB来鉴定所述紧密斑的一种或多种特性。

51. 权利要求49的方法,其中所述一种或多种特性包括相对于以前的PET扫描来说一个或多个紧密斑的尺寸减小。

52. 权利要求49的方法,其中所述抗体对AB的中央表位具有特异性。

53. 权利要求52的方法,其中所述抗体是266抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,15C11抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者22D12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

54. 权利要求53的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区互补决定区(CDR),其中CDR L1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

55. 权利要求53的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:14的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:14的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:14的第94至101位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:15的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:15的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:15的第99至101位残基的氨基酸序列。

56. 权利要求53的方法,其中所述抗体包含:22D12的三个轻链可变区CDR和22D12的三个重链可变区CDR。

57. 权利要求49的方法,其中所述抗体对AB的C端表位具有特异性。

58. 权利要求57的方法,其中所述抗体是2G3抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,14C2抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者21F12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

59. 权利要求58的方法,其中所述抗体包含:2G3的三个轻链可变区互补决定区(CDR)和2G3的三个重链可变区CDR。

60. 权利要求58的方法,其中所述抗体包含:14C2的三个轻链可变区CDR和14C2的三个重链可变区CDR。

61. 权利要求58的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:3的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:3的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:3的第94至102位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:2的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:2的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:2的第99至106位残基的氨基酸序列。

62. 权利要求49至61任一项的方法,其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

63. 权利要求62的方法,其中所述抗体是人源化抗体。

64. 权利要求62的方法,其中所述抗体是IgG1亚型。

65. 一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病并且以前已用对A β 的N端表位具有特异性的抗体治疗过的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用与A β 的第12-43位残基内的表位结合并且相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案。

66. 权利要求65的方法,其中在以前使用特异性针对A β 的N端表位的抗体治疗期间,所述患者的紧密斑相对于总斑块的比例增加。

67. 权利要求65的方法,其中所述抗体对A β 的中央表位具有特异性。

68. 权利要求67的方法,其中所述抗体是266抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,15C11抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者22D12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

69. 权利要求68的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区互补决定区(CDR),其中CDR L1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

70. 权利要求68的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:14的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:14的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:14的第94至101位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:15的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:15的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:15的第99至101位残基的氨基酸序列。

71. 权利要求68的方法,其中所述抗体包含:22D12的三个轻链可变区CDR和22D12的三个重链可变区CDR。

72. 权利要求65的方法,其中所述抗体对A β 的C端表位具有特异性。

73. 权利要求72的方法,其中所述抗体是2G3抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,14C2抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者21F12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

74. 权利要求73的方法,其中所述抗体包含:2G3的三个轻链可变区互补决定区(CDR)和2G3的三个重链可变区CDR。

75. 权利要求73的方法,其中所述抗体包含:14C2的三个轻链可变区CDR和14C2的三个重链可变区CDR。

76. 权利要求73的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:3的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:3的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:3的第94至102位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:2的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:2的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:2的第99至106位残基的氨基酸序列。

77. 权利要求65至76任一项的方法,其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

78. 权利要求77的方法,其中所述抗体是人源化抗体。

79. 权利要求77的方法,其中所述抗体是IgG1亚型。

80. 一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病并且以前已用与A β 的第12-43位残基内的表

位结合并且相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体治疗过的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用对AB的N端表位具有特异性的抗体的有效方案。

81. 权利要求80的方法,其中在以前使用特异性针对AB的中央或C端表位的抗体治疗期间,所述患者的弥散斑相对于总斑块的比例增加。

82. 权利要求80的方法,其中所述抗体对AB的中央表位具有特异性。

83. 权利要求82的方法,其中所述抗体是266抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,15C11抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者22D12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

84. 权利要求83的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区互补决定区(CDR),其中CDR L1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

85. 权利要求83的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:14的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:14的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:14的第94至101位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:15的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:15的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:15的第99至101位残基的氨基酸序列。

86. 权利要求83的方法,其中所述抗体包含:22D12的三个轻链可变区CDR和22D12的三个重链可变区CDR。

87. 权利要求80的方法,其中所述抗体对AB的C端表位具有特异性。

88. 权利要求87的方法,其中所述抗体是2G3抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,14C2抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者21F12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

89. 权利要求88的方法,其中所述抗体包含:2G3的三个轻链可变区互补决定区(CDR)和2G3的三个重链可变区CDR。

90. 权利要求88的方法,其中所述抗体包含:14C2的三个轻链可变区CDR和14C2的三个重链可变区CDR。

91. 权利要求88的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:3的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:3的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:3的第94至102位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:2的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:2的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:2的第99至106位残基的氨基酸序列。

92. 权利要求80至91任一项的方法,其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

93. 权利要求92的方法,其中所述抗体是人源化抗体。

94. 权利要求92的方法,其中所述抗体是IgG1亚型。

95. 一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病的患者的方法,所述方法包括:

(a)向所述患者施用与AB的第12-43位残基内的表位结合并且相对于弥散斑来说优先

结合紧密斑的第一抗体的有效方案;以及

(b)向所述患者施用对AB的N端表位具有特异性的第二抗体的有效方案。

96. 权利要求95的方法,其中所述第一抗体和第二抗体被同时施用。

97. 权利要求95的方法,其中所述第二抗体选自3D6抗体、12A11抗体、10D5抗体、12B4抗体、6C6抗体、2H3抗体或3A3抗体或者这些抗体中任一种的嵌合、人源化或镶嵌的形式。

98. 权利要求95的方法,其中所述抗体对AB的中央表位具有特异性。

99. 权利要求98的方法,其中所述抗体是266抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,15C11抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者22D12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

100. 权利要求99的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区互补决定区(CDR),其中CDR L1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

101. 权利要求99的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:14的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:14的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:14的第94至101位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:15的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:15的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:15的第99至101位残基的氨基酸序列。

102. 权利要求99的方法,其中所述抗体包含:22D12的三个轻链可变区CDR和22D12的三个重链可变区CDR。

103. 权利要求95的方法,其中所述抗体对AB的C端表位具有特异性。

104. 权利要求103的方法,其中所述抗体是2G3抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,14C2抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者21F12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。

105. 权利要求104的方法,其中所述抗体包含:2G3的三个轻链可变区互补决定区(CDR)和2G3的三个重链可变区CDR。

106. 权利要求104的方法,其中所述抗体包含:14C2的三个轻链可变区CDR和14C2的三个重链可变区CDR。

107. 权利要求104的方法,其中所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:3的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:3的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:3的第94至102位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:2的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:2的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:2的第99至106位残基的氨基酸序列。

108. 权利要求95至107任一项的方法,其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

109. 权利要求108的方法,其中所述抗体是人源化抗体。

110. 权利要求108的方法,其中所述抗体是IgG1亚型。

111. 被命名为2G3、14C2、21F12或22D12的抗体的人源化、嵌合或镶嵌的形式。

112. 权利要求111的抗体,其包含2G3、14C2、21F12或22D12抗体的6个Kabat CDR。

113. 一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病并且相对于总斑块来说紧密斑的比例比弥散斑的比例更高的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用与Aβ的第1-11位残基内的表位结合的抗体的有效方案。

114. 权利要求113的方法,其中紧密斑的比例为总斑块的至少40%。

115. 权利要求113的方法,其中紧密斑和弥散斑相对于总斑块的比例通过正电子发射断层(PET)扫描来测定。

116. 一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病并具有1-9的MMSE或6-7的Braak的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用与Aβ的第12-43位残基内的表位结合并且相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案。

C端和中央表位的A β 抗体

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年7月3日提交的美国临时专利申请号61/667,891在35USC 119(e)下的权益,所述临时申请以其全部内容通过参考并入本文。

背景技术

[0003] 阿尔茨海默氏病(AD)是一种引起老年痴呆症的渐进性疾病。总的来说参见 Selkoe, TINS 16:403(1993); Hardy等, WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53:438(1994); Duff等, Nature 373:476(1995); Games等, Nature 373:523(1995)。广义来说,该疾病分成两类:在老年(65+岁)发生的迟发型,以及在老年期之前即在35至60岁之间充分发展的早发型。在这两种疾病类型中,病理学是相同的,但是在较早年龄开始的病例中异常情况倾向于更加严重且广泛。该疾病的特征在于脑中的至少两种类型的病变,即神经原纤维缠结和老年斑块。神经原纤维缠结是由成对的彼此缠绕的两根细丝构成的微管结合性tau蛋白的细胞内沉积物。老年斑块(即淀粉样斑块)是跨度高达150 μ m的无序的神经纤维网区域,在其中心处具有可以通过脑组织切片的显微镜分析看到的细胞外淀粉样沉积物。淀粉样斑块在脑中的积累也与唐氏综合征和其他认知障碍相关。

[0004] 斑块的主要组成成分是被称为A β 或 β -淀粉样肽的肽。A β 是被称为淀粉样肽前体蛋白(APP)的较大跨膜糖蛋白的39-43个氨基酸的4-kDa内部片段。作为APP被不同分泌酶的蛋白水解加工的结果,A β 主要以长度为40个氨基酸的短形式和长度在42-43个氨基酸范围内的长形式这两种形式存在。APP的疏水跨膜结构域的一部分存在于A β 的羧基末端处,并且可以解释A β 聚集成斑块的能力,尤其是在长形式的情况下。淀粉样斑块在脑中的积累最终导致神经元细胞死亡。与这种类型的神经退化相关的身体症状是阿尔茨海默氏病的特征。

[0005] 使用利用A β 特异性抗体的免疫染色技术能够最可靠地揭示AD脑中斑块的存在(Hyman等, Proc Natl Acad Sci USA 92:3586-3590(1995))。两种最常用的抗体(3D6和10D5)识别N端A β 表位(分别在第1-5位和第3-7位残基内)(Hyman等,(1995),同上;Bard等, Proc Natl Acad Sci USA 100:2023-2028(2003))。

[0006] 已报道,针对A β 的C端部分的一些抗体结合于淀粉样沉积物。然而,这样的研究通常使用福尔马林或聚甲醛固定的石蜡包埋的组织,所述组织通常经受了甲酸或其他攻击性试剂的攻击性预处理,以暴露出A β 的C端表位(Murphy等, Am J Pathol 144:1082-1088(1994); Kida等, Neurosci Lett 193:105-108(1995); Fukumoto等, Am J Pathol 148:259-265(1996); Mann等, Am J Pathol 148:1257-1266(1996); Tekirian等, Neurobiol Aging 17:249-257(1996); Lippa等, Arch Neurol 56:1111-1118(1999); Schwab等, Exp Neurol 161:527-534(2000); Axelsen等, Mol Immunol 46:2267-2273(2009))。因此,这些研究不一定在生理上与斑块相关。Wilcock等, J. Neurosci 26:5340-5346(2006)和Wilcock等, J. Neurosci 24:6144-6151(2004)报道了在分别接受2H6抗体(抗A β ₃₃₋₄₀抗体;末端特异性的小鼠IgG2b同种型)或2286抗体(抗A β ₂₈₋₄₀抗体;末端特异性的小鼠IgG1同种型)注射的Tg2576

小鼠中斑块减少。已报道,数种其他C端抗体,包括16C11、2G3和21F12,在阿尔茨海默氏病的PDAPP动物模型中不能结合或清除斑块(参见US20060257396)。

[0007] 已报道,266抗体(抗A β ₁₆₋₂₃抗体)主要结合于可溶形式的A β ,并且显示出几乎不结合于斑块。关于该抗体从被治疗的小鼠的脑清除斑块的能力,这样的研究也已报道了冲突的结果。DeMattos等(Proc Natl Acad Sci USA 98:8850-8855(2001))报道了外周施用于PDAPP小鼠的266抗体清除斑块但不结合于斑块或进入脑中,而是通过捕获外周中的可溶性A β ,并通过产生使得A β 从脑迁移出去并进入血浆中的浓度梯度来降低脑的斑块载量(外周池假说(peripheral sink hypothesis))。然而,在用266抗体免疫的PDAPP小鼠中的较晚研究报道了斑块没有减少(Seubert等,Neurodegener Dis 5:65-71(2008))。第三项研究报道了使用266抗体短期治疗PDAPP小鼠逆转了它们的认知缺陷而不影响斑块,提出266抗体结合并中和来自于脑的可溶性神经毒性A β 物质(Dodart等,Nat Neurosci 5:452-457(2002))。US20060257396报道了266抗体和结合于A β 中的中间区表位的两种其他抗体(18G11和22D12)在PDAPP转基因动物模型中既不结合也不清除斑块。

发明内容

[0008] 本发明提供了针对A β 的C端和中央表位并且相对于弥散斑(diffuse plaque)来说优先结合紧密斑(compact plaque)的抗体。本发明还提供了治疗患者以减少或消除A β 的紧密斑的存在和相关症状的方法。

[0009] 一方面,本发明提供了一种治疗被诊断患有中期或晚期阿尔茨海默氏病的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用与A β 的第12-43位残基内的表位结合并且相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案。在某些情况下,所述患者已被诊断患有中期阿尔茨海默氏病。在某些情况下,所述患者已被诊断患有晚期阿尔茨海默氏病。

[0010] 另一方面,本发明提供了一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病并且紧密斑的比例相对于弥散斑的比例更高的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用与A β 的第12-43位残基内的表位结合并且相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案。在某些情况下,紧密斑的比例为总斑块的至少40%。在某些情况下,紧密斑相对于弥散斑的比例通过正电子发射断层(PET)扫描来测定。在某些情况下,所述PET扫描包括检测选自[¹⁸F]AV-14、[¹⁸F]AV-144、[¹¹C]AZD2995、[¹⁸F]-AZD4694和[¹⁸F]-SMIBR-W372的PET配体。

[0011] 另一方面,本发明提供了一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病并具有癫痫发作症状的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用与A β 的第12-43位残基内的表位结合并且相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案。在某些情况下,总淀粉样斑块负担降低并且癫痫发作症状减轻。

[0012] 另一方面,本发明提供了一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病的患者的方法,所述方法包括:(a)向所述患者施用相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案,其中所述抗体对A β 的中央或C端表位具有特异性;以及(b)使用PET扫描监测所述患者的脑中紧密斑的一种或多种特性。在某些情况下,使用放射性示踪剂PiB来鉴定所述紧密斑的一种或多种特性。在某些情况下,所述一种或多种特性包括相对于以前的PET扫描来说一个或多个紧密斑的尺寸减小。

[0013] 另一方面,本发明提供了一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病并且以前已用对A β

的N端表位具有特异性的抗体治疗过的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用与A β 的第12-43位残基内的表位结合并且相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案。在某些情况下,在以前使用特异性针对A β 的N端表位的抗体治疗期间,所述患者的紧密斑相对于总斑块的比例增加。

[0014] 另一方面,本发明提供了一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病并且以前已用与A β 的第12-43位残基内的表位结合并且相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体治疗过的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用对A β 的N端表位具有特异性的抗体的有效方案。在某些情况下,在以前使用特异性针对A β 的中央或C端表位的抗体治疗期间,所述患者的弥散斑相对于总斑块的比例增加。

[0015] 另一方面,本发明提供了一种治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病的患者的方法,所述方法包括:(a)向所述患者施用与A β 的第12-43位残基内的表位结合并且相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案;以及(b)向所述患者施用对A β 的N端表位具有特异性的第二抗体的有效方案。在某些情况下,所述第一抗体和第二抗体被同时施用。在某些情况下,所述第二抗体选自3D6抗体、12A11抗体、10D5抗体、12B4抗体、6C6抗体、2H3抗体或3A3抗体或者这些抗体中任一种的嵌合、人源化或镶嵌(veneered)的形式。

[0016] 在上面的段落中讨论的任一方法的各种不同实施方式中,所述抗体对A β 的中央表位具有特异性,或者所述抗体对A β 的C端表位具有特异性。

[0017] 在某些情况下,所述抗体对A β 的中央表位具有特异性,并且所述抗体是266抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,15C11抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者22D12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。在某些情况下,所述抗体包含:三个轻链可变区互补决定区(CDR),其中CDR L1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在某些情况下,所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:14的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:14的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:14的第94至101位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:15的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:15的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:15的第99至101位残基的氨基酸序列。在某些情况下,所述抗体包含:22D12的三个轻链可变区CDR和22D12的三个重链可变区CDR。

[0018] 在某些情况下,所述抗体对A β 的C端表位具有特异性,并且所述抗体是2G3抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,14C2抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式,或者21F12抗体或其嵌合、人源化或镶嵌的形式。在某些情况下,所述抗体包含:2G3的三个轻链可变区互补决定区(CDR)和2G3的三个重链可变区CDR。在某些情况下,所述抗体包含14C2的三个轻链可变区CDR和14C2的三个重链可变区CDR。在某些情况下,所述抗体包含:三个轻链可变区CDR,其中CDR L1包含SEQ ID NO:3的第24至39位残基的氨基酸序列,CDR L2包含SEQ ID NO:3的第55至61位残基的氨基酸序列,并且CDR L3包含SEQ ID NO:3的第94至102位残基的氨基酸序列,以及三个重链可变区CDR,其中CDR H1包含SEQ ID NO:2的第26至35位残基的氨基酸序列,CDR H2包含SEQ ID NO:2的第50至66位残基的氨基酸序列,并且CDR H3包含SEQ ID NO:

2的第99至106位残基的氨基酸序列。

[0019] 在某些情况下,上面讨论的任一抗体是嵌合抗体或人源化抗体。在优选实施方式中,所述抗体是人源化抗体。在某些情况下,所述抗体是IgG1亚型。

[0020] 另一方面,本发明提供了被命名为2G3、14C2、21F12或22D12的抗体的人源化、嵌合或镶嵌的形式。在某些情况下,所述抗体包含2G3、14C2、21F12或22D12抗体的6个Kabat CDR。

[0021] 本发明还提供了治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病并且相对于总斑块来说紧密斑的比例比弥散斑的比例更高的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用与Aβ的第1-11位残基内的表位结合的抗体的有效方案。在某些这样的方法中,紧密斑的比例为总斑块的至少40%。在某些这样的方法中,紧密斑和弥散斑相对于总斑块的比例通过正电子发射断层(PET)扫描来测定。

[0022] 本发明还提供了治疗被诊断患有阿尔茨海默氏病并具有1-9的MMSE或6-7的Braak的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用与Aβ的第12-43位残基内的表位结合并且相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的抗体的有效方案。

附图说明

[0023] 图1A和1B示出了C端表位特异性抗体2G3、14C2和21F12不依赖ApoE基因型而结合于未固定的AD脑切片(枕叶皮质)中的斑块。每一行示出了来自于具有apoE3/E3基因型(图1A)或apoE3/E4基因型(图1B)的不同患者的切片。3D6抗体是阳性对照。用作阴性对照的IgG显示出无染色(未示出)。

[0024] 图2A-2D分别示出了3D6抗体(阳性对照)以及C端表位特异性抗体2G3、14C2和21F12与PDAPP、PSAPP和41系小鼠的未固定和固定的脑切片中的斑块的相对结合。用作阴性对照的IgG显示出无染色(未示出)。

[0025] 图3A和3B示出了未固定的AD脑切片(图3A)和未固定的PSAPP小鼠脑切片(图3B)用3D6、21F12和2G3抗体以及3D6与21F12或2G3的组合进行的免疫染色,证实了2G3和21F12抗体主要结合于斑块的致密核心。

[0026] 图4A和4B示出了两个独立的离体实验的结果,所述实验评估了IgG(阴性对照)、3D6抗体(阳性对照)和C端表位特异性抗体2G3、14C2和21F12对来自于PSAPP和41系小鼠脑切片的斑块的清除的诱导。每张图中的白点表示来自于3D6染色的斑块的信号。

[0027] 图5示出了在离体测定法中,来自于PSAPP(左图)和41系(右图)小鼠脑切片的斑块的小神经胶质细胞吞噬的诱导。在下方6张图的每一张中均可以看到小神经胶质细胞内存在Aβ。

[0028] 图6A和6B示出了中央表位特异性抗体266、15C11和22D12不依赖ApoE基因型而结合于未固定的AD脑切片(枕叶皮质)中的斑块。每一行示出了来自于具有apoE3/E3基因型(图6A)或apoE3/E4基因型(图6B)的不同患者的切片。3D6抗体是阳性对照。用作阴性对照的IgG显示出无染色(未示出)。

[0029] 图7示出了3D6抗体(阳性对照)以及中央表位特异性抗体266、15C11和22D12与未固定的PDAPP和PSAPP小鼠脑切片中的斑块的相对结合。用作阴性对照的IgG显示出无染色(未示出)。还示出了非转基因对照小鼠(非-Tg)的背景图像。

[0030] 图8A和8B示出了未固定的AD脑切片(图8A)和未固定的PSAPP小鼠脑切片(图8B)用3D6和22D12抗体以及两种抗体的组合进行的免疫染色,证实了22D12抗体主要结合于斑块的致密核心。

[0031] 图9示出了离体实验的结果,所述实验评估了IgG(阴性对照)、3D6抗体(阳性对照)和中央表位特异性抗体266、15C11和22D12对来自于PDAPP和PSAPP小鼠脑切片的斑块的清除的诱导。每张图中的白点表示来自于3D6染色的斑块的信号。中央表位特异性抗体不显著清除PDAPP切片中的斑块,但清除41系小鼠的切片中的斑块。

[0032] 图10示出了在离体测定法中,来自于PDAPP(左图)和PSAPP(右图)小鼠脑切片的斑块的小神经胶质细胞吞噬的诱导。在3D6抗体(阳性对照)的两张图中以及在右下方对应于PSAPP小鼠切片中的266抗体的图中,可以看到小神经胶质细胞内存在A β 。

[0033] 序列简述

[0034] 表1. 序列描述

[0035]

SEQ ID NO	氨基酸序列的描述
1	A β 1-42
2	带有信号序列的m21F12 V _H
3	带有信号序列的m21F12 V _L
4	m266 CDR L1
5	m266 CDR L2
6	m266 CDR L3
7	m266 CDR H1
8	m266 CDR H2

[0036]

9	m266 CDR H3
10	h266 V _L
11	h266 V _H
12	h266 V _L
13	h266 V _H
14	m15C11 V _L
15	m15C11 V _H
16	巴匹珠单抗(bapineuzumab)V _L
17	巴匹珠单抗V _H
18	h10D5 V _L
19	h10D5 V _H
20	h12A11 V _L
21	h12A11 V _H

[0037] 定义

[0038] 基本抗体结构单元包含亚基的四聚体。每个四聚体由相同的两对多肽链构成,每对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基端部分包括主要

负责抗原识别的约100至110或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基端部分定义了主要负责效应子功能的恒定区。重链恒定区包括CH1、铰链、CH2和CH3结构域。

[0039] 轻链被分类为 κ 或 λ 。重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，并将抗体的同种型分别定义为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过约12或更多个氨基酸的“J”区相连，其中重链还包括约10或更多个氨基酸的“D”区。(总的来说参见《基础免疫学》(Fundamental Immunology)(Paul, W. 主编, 第二版, Raven Press, N.Y., 1989), 第7章(以其全部内容为所有目的通过参考引入)。在人类中, 存在四种IgG同种型IgG1、2、3和4。重链恒定区中的氨基酸按照EU编号惯例编号。

[0040] 每个轻链/重链对的可变区形成抗体结合位点。因此, 完整的抗体具有两个结合位点。除了在双功能或双特异性抗体中之外, 两个结合位点是相同的。所述链都表现出通过三个超变区(也称为互补决定区或CDR)相连的相对保守的构架区(FR)的相同的总体结构。来自于每个轻链/重链对的两条链的CDR通过构架区对齐, 使得能够结合到特定表位。从N端到C端, 轻链和重链两者都包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。每个结构域的氨基酸的指派优选地根据Kabat, 《免疫学重要的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest)(National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987和1991)或Chothia&Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)中的定义。然而, CDR也可以按照Chothia等, Nature 342:878-883(1989)或通过Kabat和Chothia定义的复合来定义, 在所述复合中, 存在于Kabat或Chothia所定义的CDR内的任何氨基酸被认为是CDR的一部分, 其他残基被认为是构架残基。

[0041] 对抗体或免疫球蛋白的指称包括完整抗体及其结合性片段。通常, 片段与它们所源自的完整抗体竞争与抗原的特异性结合。片段包括分离的重链和轻链、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc和Fv。分离的链包括NANOBODIES™(即来自于骆驼或美洲驼的抗体的重链的分离的VH片段, 任选地被人源化)。分离的VH片段也可以从其他来源例如人类抗体获得。片段通过重组DNA技术或通过完整免疫球蛋白的酶或化学分离来生产。术语“抗体”还包括化学偶联到其他蛋白或与其他蛋白表达成融合蛋白的一条或多条免疫球蛋白链。术语“抗体”还包括双特异性抗体。双特异性或双功能抗体是具有两个不同的重链/轻链对和两个不同结合位点的人造杂合抗体。双特异性抗体可以通过各种不同方法来生产, 包括杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。(参见例如Songsivilai&Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321(1990); Kostelny等, J. Immunol. 148, 1547-1553(1992))。

[0042] 单克隆抗体与其靶抗原的特异性结合意味着至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 $10^{10}M^{-1}$ 的亲合性。与发生于至少一种不相关靶的非特异性结合相比, 特异性结合具有可检测到的更高幅度, 并且可以与非特异性结合区分开。特异性结合可以是特定官能团之间形成键或特定空间配合(例如锁和钥匙类型)的结果, 而非特异性结合通常是范德华力的结果。然而, 特异性结合不必暗示单克隆抗体结合一个且仅仅一个靶。

[0043] 相对于弥散斑来说“优先结合”紧密斑的抗体是在免疫染色测定法(例如Hyman等, (1995)同上)中产生更强信号的抗体。这样的比较可以在相同组织切片(例如来自于人类)中的紧密斑和弥散斑之间进行。或者, 比较可以在含有不同的紧密斑呈现态(representation)的组织切片之间进行, 例如将来自于PSAPP小鼠的组织切片(Holcomb等, Nat Med 4:97-100(1998); Gordon等, Exp Neurol 173:183-195(2002))与来自于PDAPP小

鼠的具有较低的紧密斑呈现态的组织切片(Games等,Nature 373:523-527(1995))进行比较。由于在不论是紧密斑还是弥散斑的各个斑块的染色之间可能存在一定变差,因此比较优选地基于数个紧密斑和数个弥散斑的平均或均值染色,并且差异应该足以使紧密斑相对于弥散斑的染色增加超出弥散斑染色的合理的变差度量(例如均值加上标准偏差)。免疫染色可以通过肉眼来进行比较或通过将染色斑数字化成代表染色强度的数值来更加定量地进行比较。

[0044] 术语“表位”是指抗原上被免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)特异性结合的位点。表位可以由毗连的氨基酸形成或由通过蛋白质的三级折叠而并置的非毗连氨基酸形成。由毗连氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂后通常得以保留,而通过三级折叠形成的表位在变性溶剂处理后通常丧失。表位通常包括采取独特空间构象的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括例如x-射线晶体学和2维核磁共振。参见例如《分子生物学方法中的表位作图方案》(Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology),Vol.66,G.E.Morris主编(1996)。

[0045] 识别相同或交叠表位的抗体可以在显示一种抗体与另一种抗体竞争与靶抗原结合的能力的简单免疫测定法中得到鉴定。抗体的表位也可以通过与其抗原结合的抗体的X-射线晶体学来确定,以鉴定接触残基。或者,如果抗原中减少或消除一种抗体的结合的所有氨基酸突变都减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有相同的表位。如果减少或消除一种抗体的结合的某些氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有交叠的表位。

[0046] 抗体之间的竞争通过其中待试验抗体抑制参比抗体与共同抗原的特异性结合的测定法来测定(参见例如Junghans等,Cancer Res.50:1495,1990)。如果当在竞争结合测定法中测量时,过量的试验抗体(例如至少2x、5x、10x、20x或100x)将参比抗体的结合至少抑制至少50%,但优选为75%、90%或99%,则所述试验抗体与所述参比抗体竞争。通过竞争测定法鉴定的抗体(竞争抗体)包括与参比抗体结合相同表位的抗体,以及结合于与参比抗体所结合的表位足够接近以发生空间位阻的相邻表位的抗体。

[0047] APP存在多种同工型,例如APP⁶⁹⁵、APP⁷⁵¹和APP⁷⁷⁰。APP内的氨基酸按照APP⁷⁷⁰同工型的序列(参见例如GenBank登记号P05067)指派编号,除非从上下文明显看出不是如此。Aβ肽的序列及其与APP前体的关系由Hardy等,TINS 20,155-158(1997)的图1示出。例如,Aβ42具有下述序列:

[0048] H₂N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH(SEQ ID NO:1)。

[0049] 对Aβ的指称还包括上述序列的天然的等位基因变异,尤其是与遗传病相关的变异,例如Arctic突变、E693G、APP 770编号,除非从上下文明显看出不是如此。Aβ41、Aβ40和Aβ39与Aβ42的差异在于从C末端分别省略Ala、Ala-Ile和Ala-Ile-Val。Aβ43与Aβ42的差异在于在C端存在苏氨酸残基。

[0050] Aβ的N端表位是指在第1-11位残基内的表位。在C端区域内的表位是指在第29-43位残基内的表位,并且在中央或中间区域内的表位是指在第12-28位残基内的表位。当表位以范围出现时,它可以包括定义所述范围的氨基酸以及所述范围之间的氨基酸。当针对中

央和C端区域的抗体被合起来指称时,这样的抗体可以具有在中央或C端区域内的表位或跨越中央与C端区域之间的边界的表位。也就是说,表位在A β 的第12-43位残基内。

[0051] 单体A β 和有时被称为ADDL的约4-10个单体的小的低聚集体(Lambert等,PNAS May 26,1998vol.95no.116448-6453)可溶于水性溶液(包括体液,例如CSF)。通过体外聚集形成或以斑块形式在体内形成的A β 的较高级的集体基本上不溶于水性溶液。聚集的A β 据信至少部分通过在肽的C端(APP的跨膜结构域的一部分)处的疏水残基而保持在一起。较高级的不溶性沉积物有时被称为淀粉样纤维。原纤维的特征在于交叉的 β 结构,并且即使在去污剂和变性溶剂中也基本上不溶(参见Schmidt等,PNAS 106,19813-19818(2009);Cai等,Current Medicinal Chemistry 24,19-52(2007))。

[0052] 斑块通过Dickson&Vickers的三方计划(tripartite scheme)进行分类(Neuroscience.2001;105(1):99-107)。术语“紧密”或“纤维状”斑是指具有A β 的中央物质带有通往合生外缘的紧密的辐条状延伸的形态表型的斑块(Dickson,Neuroscience.2001;105(1):99-107)。

[0053] 术语“弥散斑”是指缺少在形态上可识别的亚结构并表现为基本上均质的A β 球的斑块。

[0054] 术语“致密核心斑(dense-cored plaque)”是指具有被基本上均质的A β 外部球包围的压实的A β 中央物质的形态表型的斑块。由于致密核心斑具有弥散斑和紧密斑两者的特征,因此可以将它们当作与紧密斑和弥散斑不同的类别对待,或根据致密核心斑内紧密区域和弥散区域的相对表面积或体积而分派在这些斑块类别之间。

[0055] 术语“Fc区”是指IgG重链的C端区域。尽管IgG重链的Fc区的边界可以轻微变化,但Fc区通常被定义为从IgG重链的氨基酸残基Cys226附近跨越到羧基端。

[0056] 术语“效应子功能”是指存在于抗体(例如IgG抗体)的Fc区中的活性,并且包括例如抗体结合效应分子例如补体和/或Fc受体的能力,其能够控制抗体的数种免疫功能例如效应细胞活性、裂解、补体介导的活性、抗体清除和抗体半衰期。效应子功能也可以受到铰链区中突变的影响。

[0057] 术语“Kabat编号”被定义为按照通过参考并入本文的Kabat等(《免疫学重要的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))中所述的对残基进行编号。

[0058] 术语“佐剂”是指当与抗原联合施用引发和/或增强对所述抗原的免疫应答,但是当单独施用不产生针对抗原的免疫应答的化合物。佐剂可以通过数种机制(包括募集淋巴细胞、刺激B和/或T细胞以及刺激巨噬细胞)来增强免疫应答。

[0059] 术语“ApoE4携带者”是指具有一个或两个ApoE4等位基因的患者,术语“非ApoE4携带者”是指具有0个ApoE4等位基因的患者。

[0060] 处于阿尔茨海默氏病或以脑中的A β 淀粉样沉积物为特征的其他疾病的高风险中的个体是具有将对象置于比普通人群显著更高的在确定时间段例如5年内发生所述疾病的风险中的一种或多种已知风险因素(例如年龄超过70岁、遗传、生物化学、家族史、前驱症状)的个体。

[0061] 中期阿尔茨海默氏病是指例如根据DMS IV TR进行的阿尔茨海默氏病诊断,并具

有10-20的小型精神试验(mini-mental test)分值或在其他量表上的等同分值(例如Braak量表上3-4)。

[0062] 晚期阿尔茨海默氏病是指例如根据DMS IV TR进行的阿尔茨海默氏病诊断,并具有9或更低的小型精神试验分值或在其他量表上的等同分值(例如Braak量表上5-6)。

[0063] 或者,中期和晚期阿尔茨海默氏病可以被定义为用于评估主要变性痴呆症(GDS)的全面衰退量表(Global Deterioration Scale for Assessment of Primary Degenerative Dementia)(也称为Reisberg量表)上阶段5-7中的任一阶段或所有阶段。

[0064] 统计学显著性是指 $p \leq 0.05$ 。如果相对于标志物的基线测量值而言标志物的变化在重复测量的典型误差幅度之外,则所述变化被认为是显著的。对于通过PET扫描测量淀粉样沉积物来说,典型的误差幅度(例如在同一患者上测量的可重复性)为约5%。

具体实施方式

[0065] I. 通述

[0066] 本发明提供了使用针对A β 的中间或C端区域的抗体治疗以A β 的淀粉样沉积物为特征的疾病的方法。尽管对于本发明的实践来说不需要理解机制,但据信所述抗体至少部分通过涉及紧密或纤维状淀粉样斑块的减少或清除的机制起作用。所述方法部分地以下述结果为前提,即识别A β 的中央和/或C端表位的抗体可以相对于弥散斑来说优先结合紧密斑,并因此促进从患者的脑去除这样的斑块。鉴于以前报道了中间和末端抗体缺少结合和清除斑块的能力以及至少一些这样的抗体主要结合可溶性A β ,这一结果是令人吃惊的。目前的数据可以与以前的数据相调和,因为许多以前的数据是使用来自于阿尔茨海默氏病的PDAPP小鼠模型的斑块产生的,所述模型与阿尔茨海默氏病患者或某些其他转基因模型相比,紧密斑的比例偏低。尽管中间和C端抗体与PDAPP小鼠中斑块的总体结合可以被认为是低或甚至不显著的,但中间和C端抗体强烈结合于阿尔茨海默氏病患者和某些其他转基因动物模型例如PSAPP小鼠中存在的斑块的一个亚类,即紧密斑。因此,中间和C端抗体可用于清除斑块,并且在具有相对高比例的致密斑的患者中,正如通常在中期到晚期阿尔茨海默氏病的情形中,是特别有用的。由于它们优先结合于紧密斑,因此中间和C端抗体也可用于与显示出更均匀地识别不同斑块类型的N端抗体相组合。

[0067] II. A β 抗体

[0068] 本发明利用中间或C端抗体,并任选地与N端抗体相组合。

[0069] A. C端抗体

[0070] 本发明的C端抗体与A β 的第29-43位残基内的表位结合。所述抗体可以是或不是末端特异性的。末端特异性抗体是其表位包括具有游离羧基的C端氨基酸(即不经肽键结合于另一个氨基酸)的抗体。相对于APP或跨越A β 的C端的APP的其他肽来说,末端特异性氨基酸优先结合于A β 。抗体可以对任何A β 形式(例如A β ₃₈、29、40、41、42、43)具有末端特异性。本发明的C端抗体相对于弥散斑来说结合紧密斑。某些示例性的C端抗体是2G3抗体(Johnson-Wood等,PNAS 94,1550-1555(1997),表位在A β ₃₃₋₄₀残基内)、14C2抗体(Elan Pharmaceuticals, Inc., Solomon等,Proc Natl Acad Sci U S A.1997April 15;94(8):4109-4112,表位在A β ₃₃₋₄₀残基内)、21F12抗体(表位在A β ₃₃₋₄₂残基内)。21F12对A β ₄₂具有末端特异性,2G3对A β ₄₀具有末端特异性,对更长形式的A β 具有低得多的反应性。14C2的精确

的表位特异性尚未确定。还包括上述抗体中任一种的嵌合、人源化或镶嵌的形式,以及共有与2G3、14C2或21F12任一者相同的6个Kabat CDR的任何抗体。

[0071] 21F12单克隆抗体(Bard等,Proc Natl Acad Sci U S A.2003年2月18日;100(4):2023-2028)的重链和轻链可变区的氨基酸序列在下面示出(信号序列为斜体并带下划线,CDR用粗体和下划线示出):重链可变区:

[0072] MGWNWIFLFLLSGTAGVLSEVQLQQSGPELLKPGASVKISCKAS**GFTFT DYTMH**
WMKQSHGKSLEWIG**GINPNSGGTIYNEKFKD**KATLTVDKSSRTAYMELRSLTSEDSAVYFCTR
GVYDGYFYWGQGLVTVSA(SEQ ID NO:2)

[0073] 轻链可变区:

[0074] MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISC**RSSQSLV YSNGNTFLH**
WYLQKPGQSPKLLIY**KVSTRES**GVPDRFSGSGSGSDFTLKISRVEAEDLGIYFC**SQTHAPFT**
FGSGTKLAIR(SEQ ID NO:3)

[0075] 对于CDR L1、CDR L2和CDR L3来说,轻链可变区的CDR分别对应于SEQ ID NO:3的第24至39位残基、第55至61位残基和第94至102位残基(其中信号序列被编号为-19至-1)。

[0076] 对于CDR H1、CDR H2和CDR H3来说,重链可变区的CDR分别对应于SEQ ID NO:2的第26至35位残基、第50至66位残基和第99至106位残基(其中信号序列被编号为-19至-1)。

[0077] 其他C端抗体包括2H6或9TL抗体(Wilcock等(2006),同上;US 7,807,165和US20060057701)和2286抗体(Wilcock等(2004),同上;WO2004032868)。编码9TL抗体的重链和轻链的DNA序列被保存为ATCC PTA 6124和6125。9TL抗体的人源化形式被称为庞珠单抗(ponezumab)。2286抗体被保存为ATCC PTA 5199。任选地,C端抗体是2H6、9TL、庞珠单抗或2286之外的抗体。任选地,C端抗体是不具有与2H6、9TL或2286抗体的相应CDR一致的任何或所有Kabat或Chothia CDR的抗体。任选地,C端抗体是不具有与2H6、9TL或2286抗体的CDR的序列同一性为至少90%的Kabat或Chothia CDR的抗体。本发明的某些C端抗体相对于弥散斑来说优先结合紧密斑的程度比2H6、9TL抗体和/或2286抗体更高。

[0078] 正如在实施例中证实的,C端抗体可用于从需要免疫治疗的个体(例如阿尔茨海默氏病患者)的脑清除斑块,尤其是紧密斑。

[0079] 本发明的某些抗体与被称为2G3、14C2或21F12的抗体结合到相同或交叠的表位。具有这样的结合特异性的其他抗体可以通过用AB或其包含所需表位的部分免疫小鼠并从得到的抗体筛选结合于CD122并任选地与2G3、14C2或21F12竞争的抗体来产生。也可以筛选针对AB的突变形式的抗体,以鉴定对突变变化的集合显示出与2G3、14C2或21F12相同或相似的结合情况的抗体。突变可以是在整个AB中或在其已知存在有表位的区段中,一次或以相隔更大的时间间隔系统性地用丙氨酸(或者如果已经存在丙氨酸,则用丝氨酸)替换一个残基。

[0080] 具有所选的鼠类抗体(例如2G3、14C2或21F12)的结合特异性的抗体也可以使用噬菌体展示方法的变化形式来生产。参见Winter,W092/20791。这种方法特别适合于生产人类抗体。在这种方法中,将所选鼠类抗体的重链或轻链可变区用作起始材料。如果例如选择轻链可变区作为起始材料,则构建其中成员展示出相同的轻链可变区(即鼠类起始材料)和不同的重链可变区的噬菌体文库。重链可变区可以例如从重排的人类重链可变区文库获得。

选择对A β 显示出强的特异性结合(例如至少 10^8 , 优选为至少 $10^9 M^{-1}$)的噬菌体。然后将来自于该噬菌体的重链可变区用作起始材料,以构建另一个噬菌体文库。在该文库中,每个噬菌体展示出相同的重链可变区(即从第一噬菌体文库鉴定到的区域)和不同的轻链可变区。轻链可变区可以例如从重排的人类轻链可变区文库获得。再一次选择对A β 显示出强的特异性结合的噬菌体。得到的抗体通常具有与鼠类起始材料相同或相似的表位特异性。

[0081] 其他抗体可以通过编码示例性抗体例如2G3、14C2或21F12的重链和轻链的cDNA的突变来获得。本发明还包括在成熟的重链和/或轻链可变区的氨基酸序列上与2G3、14C2或21F12的同一性为至少90%、95%或99%并维持其功能性质的单克隆抗体,和/或与相应抗体的区别在于少量功能上不重要的氨基酸置换(即保守置换)、缺失或插入的单克隆抗体。具有与2G3、14C2或21F12的相应CDR的同一性为90%、95%、99%或100%的至少一个并且优选所有6个由Kabat所定义的CDR的单克隆抗体也被包括在内。

[0082] B. 中央表位抗体

[0083] 本发明的中央或中间表位抗体识别在A β 的第12-29位残基内的表位,并相对于弥散斑来说优先结合紧密斑。一些示例性的中央表位抗体是266抗体(特异性针对在A β_{16-23} 内的表位)、15C11抗体(特异性针对在A β_{18-22} 内的表位)和22D12抗体(Bard等, Proc Natl Acad Sci U S A. 2003年2月18日; 100(4):2023-2028, 特异性针对在A β_{18-22} 内的表位),以及上述抗体中任一种的嵌合、人源化或镶嵌的形式。

[0084] 产生266单克隆抗体的细胞系在《布达佩斯公约》(Budapest Treaty)的条款下于2004年7月20日保藏在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC), 登记号为PTA-6123。任选地, 266抗体的同种型为人类IgG1、IgG2或IgG4, 优选为IgG1。

[0085] 266单克隆抗体CDR的氨基酸序列(US Pat.No.7,892,545)如下: CDR L1: Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His(SEQ ID NO:4);

[0086] CDR L2: Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser(SEQ ID NO:5);

[0087] CDR L3: Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr(SEQ ID NO:6);

[0088] CDR H1: Arg Tyr Ser Met Ser(SEQ ID NO:7);

[0089] CDR H2: Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys(SEQ ID NO:8); 和

[0090] CDR H3: Gly Asp Tyr(SEQ ID NO:9)。

[0091] 266抗体的人源化形式被描述在US 20040265308、US 20040241164、WO 03/016467和US 7,195,761中。

[0092] 示例性的人源化266抗体的轻链和重链可变区序列如下所示(不包括信号序列):

[0093] 轻链

[0094] Asp Xaa Val Met Thr Gln Xaa Pro Leu Ser Leu Pro Val Xaa Xaa Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Xaa Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Xaa Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Glu Ile Lys

Arg(SEQ ID NO:10);

[0095] 其中:第2位处的Xaa是Val或Ile;第7位处的Xaa是Ser或Thr;第14位处的Xaa是Thr或Ser;第15位处的Xaa是Leu或Pro;第30位处的Xaa是Ile或Val;第50位处的Xaa是Arg、Gln或Lys;第88位处的Xaa是Val或Leu;第105位处的Xaa是Gln或Gly;第108位处的Xaa是Lys或Arg;并且第109位处的Xaa是Val或Leu;以及

[0096] 重链

[0097] Xaa Val Gln Leu Val Glu Xaa Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Xaa Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Xaa Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Xaa Xaa Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Xaa Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:11)

[0098] 其中:第1位处的Xaa是Glu或Gln;第7位处的Xaa是Ser或Leu;第46位处的Xaa是Glu、Val、Asp或Ser;第63位处的Xaa是Thr或Ser;第75位处的Xaa是Ala、Ser、Val或Thr;第76位处的Xaa是Lys或Arg;第89位处的Xaa是Glu或Asp;并且第107位处的Xaa是Leu或Thr。

[0099] 示例性的人源化266抗体包含下列轻链和重链序列(不包括信号序列):

[0100] 轻链

[0101] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys(SEQ ID NO:12)

[0102] 重链

[0103] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Ser Met Ser Trp Val Ary Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Va Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Ary Glu
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys(SEQ ID NO:13)

[0104] 产生15C11单克隆抗体的细胞系在《布达佩斯公约》(Budapest Treaty)的条款下于2005年12月12日保藏在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC),登记号为PTA-7270。任选地,15C11抗体的同种型为人类IgG1、IgG2或IgG4,优选为IgG1。

[0105] 15C11单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列如下所示(不包括信号序列):

[0106] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp
Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr
Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys
Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
Ser Gln Ser Thr His Val Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys(SEQ
ID NO:14)

[0107] 对于CDR L1、CDR L2和CDR L3来说,CDR分别对应于SEQ ID NO:14的第24至39位残基、第55至61位残基和第94至101位残基。

[0108] 15C11单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列如下所示:

[0109] Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Ser Met Ser Trp
Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala Lys Ile Ser Asn Ser Gly
Asp Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Leu Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
Ala Gln Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
(SEQ ID NO:15)

[0110] 对于CDR H1、CDR H2和CDR H3来说,CDR分别对应于SEQ ID NO:15的第26至35位残

基、第50至66位残基和第99至101位残基。

[0111] 15C11的人源化形式的生产被描述在US 7,625,560中。

[0112] 本发明的某些抗体与被称为266、15C11或22D12的抗体结合到相同或交叠的表位。具有这样的结合特异性的其他抗体可以通过用A β 或其包含所需表位的部分免疫小鼠并从得到的抗体筛选结合于A β 并任选地与266、15C11或22D12竞争的抗体来产生。也可以筛选针对A β 的突变形式的抗体,以鉴定对突变变化的集合显示出与266、15C11或22D12相同或相似的结合情况的抗体。突变可以是在整个A β 中或在其已知存在有表位的区段中,一次或以相隔更大的时间间隔系统性地用丙氨酸(或者如果已经存在丙氨酸,则用丝氨酸)替换一个残基。

[0113] 具有所选的鼠类抗体(例如266、15C11或22D12)的结合特异性的抗体也可以使用噬菌体展示方法的变化形式来生产。参见Winter,WO 92/20791。这种方法特别适合于生产人类抗体。在这种方法中,将所选鼠类抗体的重链或轻链可变区用作起始材料。如果例如选择轻链可变区作为起始材料,则构建其中成员展示相同的轻链可变区(即鼠类起始材料)和不同的重链可变区的噬菌体文库。重链可变区可以例如从重排的人类重链可变区文库获得。选择对A β 显示出强的特异性结合(例如至少 10^8 ,优选为至少 $10^9 M^{-1}$)的噬菌体。然后将来自于该噬菌体的重链可变区用作起始材料,以构建另一个噬菌体文库。在该文库中,每个噬菌体展示相同的重链可变区(即从第一噬菌体文库鉴定到的区域)和不同的轻链可变区。轻链可变区可以例如从重排的人类轻链可变区文库获得。再一次选择对A β 显示出强的特异性结合的噬菌体。得到的抗体通常具有与鼠类起始材料相同或相似的表位特异性。

[0114] 其他抗体可以通过编码示例性抗体例如266、15C11或22D12的重链和轻链的cDNA的突变来获得。本发明还包括在成熟的重链和/或轻链可变区的氨基酸序列上与266、15C11或22D12的同一性为至少90%、95%或99%并维持其功能性质的单克隆抗体,和/或与相应抗体的区别在于少量功能上不重要的氨基酸置换(即保守置换)、缺失或插入的单克隆抗体。具有与266、15C11或22D12的相应CDR的同一性为90%、95%、99%或100%的至少一个并且优选所有6个由Kabat所定义的CDR的单克隆抗体也被包括在内。

[0115] 正如在实施例证实的,中央表位抗体可用于从需要免疫治疗的个体(例如阿尔茨海默氏病患者)的脑清除斑块,尤其是紧密斑。

[0116] C.N端抗体

[0117] 在某些方法中,中间或C端抗体与N端抗体(即与A β 的第1-11位残基内、优选为在A β 的第1-5位或第3-7位残基内的表位结合的抗体)组合使用。

[0118] 3D6抗体、10D5抗体及其变体(例如嵌合、人源化或镶嵌的形式)是可以使用的抗体的实例。两者都被描述在US 20030165496、US20040087777、WO 02/46237和WO 04/080419、WO 02/088306以及WO02/08830和US 7,318,923中。10D5抗体也被描述在US 20050142131中。其他的3D6抗体被描述在US 20060198851和PCT/US05/45614中。3D6是特异性结合到位于人类A β 中、具体为第1-5位残基中的N端表位的单克隆抗体(mAb)。10D5是特异性结合到位于人类A β 中、具体为第3-6位残基中的N端表位的mAb。产生3D6单克隆抗体的细胞系(RB96 3D6.32.2.4)在《布达佩斯公约》(Budapest Treaty)的条款下于2003年4月8日保藏在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC),登记号为PTA-5130。产生10D5单克隆抗体的细胞系(RB4410D5.19.21)在《布达佩斯公约》(Budapest Treaty)的

条款下于2003年4月8日保藏在ATCC,登记号为PTA-5129。

[0119] 巴匹珠单抗(由世界卫生组织(World Health Organization)指定的国际无产权名称)是指一种人源化3D6抗体,其包含成熟可变区具有SEQ ID NO:16指定的氨基酸序列的轻链,以及成熟可变区具有SEQ IDNO:17指定的氨基酸序列的重链。(被WHO指定为巴匹珠单抗的抗体的重链和轻链恒定区分别为人类IgG1和人类κ)。

[0120] 人源化3D6的轻链可变区

[0121] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys (SEQ ID NO:16)

[0122] 人源化3D6的重链可变区

[0123] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser(SEQ ID NO:17)

[0124] 包含成熟可变区具有SEQ ID NO:18指定的氨基酸序列的轻链以及成熟可变区具有SEQ ID NO:19指定的氨基酸序列的重链的人源化10D5抗体的版本如下所示。

[0125] 人源化10D5的轻链可变区

[0126] Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Ile His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Glu (SEQ ID NO:18)

[0127] 人源化10D5的重链可变区

[0128] Gln Ala Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Ser Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Lys Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser(SEQ ID NO:19)

[0129] 另一种示例性的N端特异性抗体是12A11或其嵌合、人源化、镶嵌或纳米抗体形式。12A11抗体或其变体被描述在US 20050118651、US 20060198851、WO 04/108895和WO 06/066089中,所有这些专利为所有目的以其全部内容通过参考并入本文。12A11是特异性结合到位于人类A β 、具体为第3-7位残基中的N端表位的mAb。生产12A11单克隆抗体的细胞系在《布达佩斯公约》(Budapest Treaty)的条款下于2005年12月12日保藏在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC),登记号为PTA-7271。

[0130] 示例性的人源化12A11抗体的轻链和重链可变区(不包括信号序列)的序列如下所述。

[0131] 人源化的12A11轻链可变区

[0132] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys (SEQ ID NO:20)

[0133] 人源化的12A11重链可变区(版本1)

[0134] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser(SEQ ID NO:21)

[0135] 其他示例性的N端抗体包括12B4抗体或其变体(例如嵌合和人源化的),其被描述在US 20040082762A1和WO 03/077858中。12B4是特异性结合到位于人类A β 、具体为第3-7位残基中的N端表位的mAb。

[0136] 其他示例性的N端抗体是6C6抗体或其变体(例如嵌合和人源化的),其被描述在US 20060165682和WO 06/06604中。6C6是特异性结合到位于人类A β 、具体为第3-7位残基中的N端表位的mAb。生产抗体6C6的细胞系在《布达佩斯公约》(Budapest Treaty)的条款下于2005年11月1日保藏在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC),登记号为PTA-7200。

[0137] 其他示例性的N端抗体是2H3抗体或其变体(例如嵌合或人源化的),其被描述在US 20060257396中。2H3是特异性结合到位于人类A β 、具体为第2-7位残基中的N端表位的mAb。生产抗体2H3的细胞系在《布达佩斯公约》(Budapest Treaty)的条款下于2005年12月13日保藏在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),登记号为PTA-7267。

[0138] 其他示例性的N端抗体包括3A3及其变体(例如嵌合或人源化的),其被描述在US 20060257396中。3A3是特异性结合到位于人类A β 、具体为第3-7位残基中的N端表位的mAb。

生产抗体3A3的细胞系在《布达佩斯公约》(Budapest Treaty)的条款下于2005年12月13日保藏在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC),登记号为PTA-7269。

[0139] D. 一般性特征

[0140] 下面的特征适用于刚才描述的任何C端、中间或N端抗体。抗体可以是多克隆或单克隆的。多克隆血清通常含有特异性结合于沿着APP的长度的数个表位的抗体的混合群体。然而,多克隆血清可以特异性针对AB的特定区段例如A β 1-11,而不特异性结合于AB的其他区段。优选的抗体是嵌合、人源化或镶嵌的(参见Queen等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989)和WO 90/07861、US 5,693,762、US5,693,761、US 5,585,089、US 5,530,101和Winter,US 5,225,539)或人类的(Lonberg等,WO 93/12227(1993);US 5,877,397,US 5,874,299,US 5,814,318,US 5,789,650,US 5,770,429,US 5,661,016,US 5,633,425,US 5,625,126,US 5,569,825,US 5,545,806,Nature 148,1547-1553(1994),Nature Biotechnology 14,826(1996),Kucherlapati,WO91/10741(1991),EP1481008,Bleck,Bioprocessing Journal 1(2005年9月/10月),US 2004132066,US 2005008625,WO 04/072266,W005/065348,W0 05/069970和W0 06/055778)。

[0141] 针对AB的其他非人类单克隆抗体例如鼠类、豚鼠、灵长类、兔或大鼠的单克隆抗体的生产可以通过例如用AB或其片段免疫动物来实现。参见Harlow&Lane,《抗体实验指南》(Antibodies,A Laboratory Manual)(CSHP NY,1988)(为所有目的通过参考并入)。任选地,免疫原可以与佐剂一起施用。如下所述,可以使用数种类型的佐剂。对于实验室动物的免疫来说,完全弗氏佐剂后接着用不完全佐剂是优选的。兔和豚鼠通常被用于制造多克隆抗体。小鼠通常被用于制造单克隆抗体。筛选特异性结合于AB内的所需表位的抗体。

[0142] 人源化抗体是遗传工程改造的抗体,其中将来自于非人类“供体”抗体的CDR嫁接到人类“受体”抗体序列中(参见例如Queen,US5,530,101和5,585,089;Winter,US 5,225,539;Carter,US 6,407,213;Adair,US 5,859,205、6,881,557;Foote,US 6,881,557)。受体抗体序列可以是例如成熟的人类抗体序列、人类抗体序列的共有序列或种系区序列。因此,人源化抗体是具有完全或基本上来自于供体抗体的一些或所有CDR以及完全或基本上来自于人类抗体序列的可变区构架序列和恒定区的抗体。同样地,人源化的重链具有完全或基本上来自于供体抗体重链的至少一个、两个和通常所有三个CDR,并且重链可变区构架序列和重链恒定区,如果存在的话,基本上来自于人类重链可变区构架和恒定区序列。同样地,人源化的轻链具有完全或基本上来自于供体抗体轻链的至少一个、两个和通常所有三个CDR,并且轻链可变区构架序列和轻链恒定区,如果存在的话,基本上来自于人类轻链可变区构架和恒定区序列。除了纳米抗体和dAb之外,人源化抗体包含人源化的重链和人源化的轻链。当在各CDR之间至少85%、90%、95%或100%的相应残基(如Kabat所定义)相同时,人源化抗体中的CDR基本上来自于非人类抗体中的相应CDR。当至少85%、90%、95%或100%的由Kabat所定义的相应残基相同时,抗体链的可变区构架序列或抗体链的恒定区基本上分别来自于人类可变区构架序列或人类恒定区。

[0143] 尽管人源化抗体通常并入来自于小鼠抗体的所有6个CDR(优选如Kabat所定义),但是它们也可以被制造成具有来自于小鼠抗体的少于所有CDR(例如至少3、4、5个)(例如Pascalis等,J.Immunol.169:3076,2002;Vajdos等,Journal of Molecular Biology,320:

415-428, 2002; Iwahashi等, *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura等, *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000)。

[0144] 在某些抗体中,为了保留人源化抗体中的结合,只需要一部分CDR,即结合所需要的CDR残基的子集,其被称为SDR。不接触抗原并且不在SDR中的CDR残基可以通过分子建模和/或凭经验或者如Gonzales等, *Mol. Immunol.* 41:863, 2004中所述,在以前研究的基础上从位于Chothia超变环(Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987)外部的Kabat CDR区域得到鉴定(例如CDR H2中的残基H60-H65通常是不需要的)。在这样的人源化抗体中,在其中不存在一个或多个供体CDR残基或其中整个供体CDR被删除的位置处,占据所述位置的氨基酸可以是在受体抗体序列中占据相应位置(Kabat编号)的氨基酸。CDR中所包括的这种受体对供体氨基酸的置换的数目反映出竞争性考虑因素的平衡。这样的置换对减少人源化抗体中小鼠氨基酸的数目以及因此降低潜在的免疫原性可能是有利的。然而,置换也可以引起亲和性的变化,并且优选避免亲和性的显著降低。CDR内用于置换的位置和待置换的氨基酸也可以凭经验进行选择。

[0145] 人类受体抗体序列可以任选地选自许多已知的人类抗体序列,以在人类受体序列可变区构架与供体抗体链的相应可变区构架之间提供高度序列同一性(例如65-85%的同一性)。

[0146] 来自于人类可变区构架残基的某些氨基酸可以根据它们对CDR构象和/或与抗原的结合的可能影响而被选择用于置换。这样的可能的影响的调查是通过建模、特定位置处氨基酸的特征的检查或特定氨基酸的置换或突变的影响的经验观察来进行的。

[0147] 例如,当在鼠类可变区构架残基与所选的人类可变区构架残基之间存在氨基酸差异时,可以将人类构架氨基酸用来自于小鼠抗体的等同的构架氨基酸置换,如果可以合理地预计所述氨基酸具有下述性质的话:

[0148] (1)直接非共价地结合抗原,

[0149] (2)与CDR区相邻,

[0150] (3)通过其他方式与CDR区相互作用(例如在CDR区的约6Å之内)。

[0151] 用于置换的其他候选物是在该位置处对于人类免疫球蛋白来说不常见的受体人类构架氨基酸。这些氨基酸可以用来自于小鼠供体抗体的等同位置或来自于更典型的人类免疫球蛋白的等同位置的氨基酸置换。用于置换的其他候选物是在该位置处对于人类免疫球蛋白来说不常见的受体人类构架氨基酸。

[0152] 嵌合抗体是其中将非人类抗体(例如小鼠)的轻链和重链的成熟可变区与人类轻链和重链恒定区相组合的抗体。这样的抗体基本上或完全保留小鼠抗体的结合特异性,并且约三分之二是人类序列。

[0153] 镶嵌抗体包括至少一条镶嵌的抗体链(即至少一条镶嵌的轻链或重链,通常包含两者)。镶嵌的抗体链是具有下述结构的抗体链(即分别对于轻链或重链来说):(i)可变区,其包括基本上来自于非人类抗体(例如鼠类,并且任选地小鼠)的互补决定区(CDR)(例如至少一个CDR,优选地两个CDR,更优选地三个CDR)和基本上来自于非人类抗体(例如小鼠)的可变区构架,但是可变区构架的表面暴露的残基(优选地所有这样的残基)基本上来自于人类抗体序列(例如有序列);以及(ii)完全或基本上来自于人类抗体恒定区的恒定区。CDR通常如Kabat所定义,但是也可以如Chothia所定义,或者是由Kabat和Chothia所定义的CDR

区的复合体。针对AB的人类抗体通过下面描述的各种不同技术来提供。某些人类抗体通过竞争性结合实验、通过上述Winter的噬菌体展示方法或其他方式来选择,以具有与特定小鼠抗体例如实施例中描述的小鼠单克隆抗体之一相同的表位特异性。也可以通过仅仅使用AB的片段作为免疫原,和/或通过筛选针对AB的缺失突变体集合的抗体,来筛选具有特定表位特异性的人类抗体。

[0154] 用于生产人类抗体的方法包括三源杂交瘤方法(Oestberg等,Hybridoma 2:361-367(1983);Oestberg,美国专利号4,634,664;和Engleman等,美国专利4,634,666),使用包含人类免疫球蛋白基因的转基因小鼠(参见例如Lonberg等,W093/12227(1993);US 5,877,397,US 5,874,299,US 5,814,318,US 5,789,650,US 5,770,429,US 5,661,016,US 5,633,425,US 5,625,126,US 5,569,825,US 5,545,806,Nature 148,1547-1553(1994),Nature Biotechnology 14,826(1996),Kucherlapati,W0 91/10741(1991))和噬菌体展示方法(参见例如Dower等,W091/17271和McCafferty等,W0 92/01047,US 5,877,218,US 5,871,907,US 5,858,657,US 5,837,242,US 5,733,743和US 5,565,332)。

[0155] 本文中描述的任何抗体或抗体片段可以使用标准方法来设计或制备,正如在例如US 20040038304、US 20070020685、US 200601660184、US 20060134098、US 20050255552、US 20050130266、US 2004025363、US 20040038317、US 20030157579和US 7,335,478中所公开的。

[0156] 可以对任何抗体或抗体片段进行添加或去除翻译后修饰例如磷酸化、羧基化或糖基化的处理。例如,糖基化可以通过用糖苷酶例如N-糖苷酶F处理或通过经历糖基化的残基的突变来去除。

[0157] 可以生产具有不同同种型或突变的同种型的上述任何抗体,以控制与不同Fc γ 受体结合的程度。缺少Fc区的抗体(例如Fab片段)缺少与Fc γ 受体的结合。同种型的选择影响与Fc γ 受体的结合。人类、嵌合或人源化抗体合并有基本上或完全人类的恒定区。最常见的同种型是人类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。因此,2G3、14C2、21F12、266、15C11和22D12中任一种的人源化、嵌合或镶嵌的形式均可以具有人类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4同种型中的任一种。各种不同人类IgG同种型对三种Fc γ 受体即Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII的相应的亲和性已被测定。(参见Ravetch&Kinet,Annu.Rev.Immunol.9,457(1991))。Fc γ RI是以单体形式结合于IgG的高亲和性受体,后两者是仅以多聚体形式结合IgG的低亲和性受体。总的来说,IgG1和IgG3两者对所有三种受体都具有显著结合活性,IgG4对Fc γ RI具有显著结合活性,并且IgG2对仅仅一种类型的被称为IIaLR的Fc γ RIII具有显著结合活性(参见Parren等,J.Immunol.148,695(1992))。人类IgG1和IgG3支持补体功能,而人类IgG2和IgG4不支持。当需要效应子功能时通常选择人类同种型IgG1,当不需要效应子功能时通常选择人类IgG2或IgG4。人类IgG1在本方法中是优选的。

[0158] 在所有同种型中,在铰链连接区中的位点上、邻近或附近的突变(例如将第234、235、236和/或237位残基用另一个残基替换)降低对Fc γ 受体、尤其是Fc γ RI受体的亲和性(参见例如US 6,624,821)。任选地,将第234、236和/或237位用丙氨酸替换,并将第235位用谷氨酰胺替换。(参见例如US 5,624,821)。在人类IgG2同种型中,第236位缺失。对于人类IgG2来说,第234、235和237位的示例性氨基酸区段是Ala Ala Gly、Val Ala Ala、Ala Ala Ala、Val Glu Ala和Ala Glu Ala。对于人类同种型IgG1来说,突变体的优选组合是L234A、

L235A和G237A。特别优选的N端抗体是具有人类同种型IgG和人类IgG1的Fc区的这三个突变的巴匹珠单抗。降低与Fc γ 受体的结合的其他置换是E233P突变(尤其是在小鼠IgG1中)和D265A(尤其是在小鼠IgG2a中)。降低Fc和/或C1q结合的突变和突变组合的其他实例包括(E318A/K320A/R322A(尤其是在小鼠IgG1中)和L235A/E318A/K320A/K322A(尤其是在小鼠IgG2a中)。同样地,人类IgG4中的第241位残基(Ser)可以例如用脯氨酸替换,以破坏Fc结合。

[0159] 可以对恒定区做出其他突变以调节效应子活性。例如,可以在A330S、P331S或两者处对IgG2a恒定区做出突变。对于IgG4来说,可以做出E233P、F234V和L235A突变,将G236缺失,或其任何组合。IgG4也可以具有下列突变S228P和L235E中的一个或两个。破坏的恒定区序列在调节效应子功能中的用途被进一步描述在例如W006/118,959和W006/036291中。

[0160] 可以对人类IgG的恒定区做出其他突变以调节效应子活性(参见例如W006/03291)。这些突变包括对人类IgG1做出的下列置换:(i)A327G、A330S、P331S;(ii)E233P、L234V、L235A、G236缺失;(iii)E233P、L234V、L235A;(iv)E233P、L234V、L235A、G236缺失、A327G、A330S、P331S;和(v)E233P、L234V、L235A、A327G、A330S、P331S。

[0161] 可以通过突变重链恒定区的某些残基来改变抗体对FcR的亲合性。例如,人类IgG1的糖基化位点的破坏可以降低抗体的FcR结合,并由此降低效应子功能(参见例如W006/036291)。其中X是脯氨酸之外的任何氨基酸的三肽序列NXS、NXT和NXC是用于使N残基糖基化的酶识别位点。任何所述三肽氨基酸(尤其是在IgG的CH2区域中)的破坏将阻止该位点处的糖基化。例如,人类IgG1的N297的突变阻止糖基化并减少FcR与抗体的结合。

[0162] 人类恒定区在不同个体之间显示出同种异型变异和异同种异型变异,即在不同个体中恒定区可以在一个或多个多态性位置处有差异。异同种异型与同种异型的区别在于识别异同种异型的血清结合于一种或多种其他同种型的非多态性区域。IgG1恒定区的优选的同种异型是G1mz,其在第356位处具有Glu并在第358位处具有Met。 κ 恒定区的优选的同种异型是Km3,其在第153位处具有Ala,并在第191位处具有Val。不同的同种异型Km(1)在第153位和第191位处分别具有Val和Leu。同种异型变体由J Immunogen 3:357-362(1976)和Loghem, Monogr Allergy 19:40-51(1986)进行综述。恒定区的其他同种异型和异同种异型变体也被包括在内。还包括具有占据天然同种异型中多态性位置的残基的任何排列的恒定区。其他重链IgG1同种异型的实例包括:G1m(f),G1m(a)和G1m(x)。G1m(f)与G1m(z)的区别在于它在第214位处具有Arg而不是Lys。G1m(a)在第355-358位处具有氨基酸Arg、Asp、Glu、Leu。

[0163] III. 主动免疫

[0164] 针对C端、中间或N端表位的抗体也可以通过用诱导这样的抗体的AB的免疫原性片段或其类似物主动免疫而在患者中原位产生。优选的片段具有AB的约5-12、5-10以及更优选6-9个毗连残基。为了产生针对中央表位的抗体,所述5-12、5-10或更优选地6-9个毗连残基在AB的第12至28位残基内。为了产生针对C端表位的抗体,所述5-12、5-10或更优选地6-9个毗连残基在AB的第29-43位残基内。为了产生针对N端表位的抗体,所述5-12或6-9个毗连残基在AB的第1-11位残基内。

[0165] 用于诱导针对AB的中央表位的抗体的优选片段包括AB15-21、AB16-22、AB17-23、AB18-24、AB19-25、AB15-22、AB16-23、AB17-24、AB18-25、AB15-23、AB16-24、AB17-25、AB18-

26、Aβ15-24、Aβ16-25和Aβ15-25。Aβ16-23是特别优选的,这是指包括Aβ的第16-23位残基并缺少Aβ的其他残基的片段。由这样的片段诱导的至少一些抗体相对于弥散斑来说优先结合于紧密斑,与示例性的中央区域单克隆抗体例如266的情况相同。

[0166] 用于诱导针对Aβ的C端表位的抗体的优选片段包括在Aβ的第29至43位残基之间的5-12以及优选地6-9个毗连氨基酸的Aβ39、40、41、42或43的C端片段。由这样的片段诱导的至少一些抗体相对于弥散斑来说优先结合于紧密斑,与示例性的C端抗体的情况相同。

[0167] 用于诱导N端抗体的优选片段包括始于在Aβ的第1-3位之间的残基并终止于在Aβ的第7-11位之间的残基的片段。示例性的N端片段包括Aβ1-5、1-6、1-7、1-10和3-7,其中1-7是特别优选的。

[0168] 片段优选地缺少会诱导针对Aβ的T-细胞的T-细胞表位。一般来说,T-细胞表位大于10个毗连氨基酸。因此,Aβ的优选片段的尺寸为5-10或优选地6-9个毗连氨基酸;即足以产生抗体应答而不产生T-细胞应答的长度。不存在T-细胞表位是优选的,因为这些表位对于片段的免疫原性活性来说是不需要的,并且可能在一部分患者中引起不想要的炎性应答。

[0169] 片段通常为天然Aβ的片段(例如SEQ ID NO:1中示出的Aβ1-42),但是可以在1、2、5、10个或甚至所有位置处包括非天然氨基酸或者N或C端氨基酸的修饰。例如,可以将Aβ的第1位和/或第7位处的天然的天冬氨酸残基用异天冬氨酸替换。非天然氨基酸的实例是D、α,α-双取代的氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸、4-羟基脯氨酸、γ-羧基谷氨酸、ε-N,N,N-三甲基赖氨酸、ε-N-乙酰基赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰基丝氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、ω-N-甲基精氨酸、β-丙氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、甲状腺素、γ-氨基丁酸、高丝氨酸、瓜氨酸和异天冬氨酸。某些片段是全D型肽例如全D型Aβ或全D型Aβ片段以及全D型肽类似物。可以与未治疗或安慰剂对照相比,针对片段在转基因动物模型中的预防或治疗功效来筛选片段。

[0170] 通常将片段偶联到载体分子,通常为载体多肽,其提供T-细胞表位,并因此有助于引发针对偶联到载体的片段的免疫应答。可以将单一药剂连接到单一载体;可以将多个拷贝的药剂连接到多个拷贝的载体,所述多个拷贝的载体又彼此连接;可以将多个拷贝的药剂连接到单一拷贝的载体;或者可以将单一拷贝的药剂连接到多个拷贝的载体或不同载体。适合的载体包括血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白、免疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵清蛋白、破伤风类毒素或来自于其他病原细菌例如白喉(例如CRM₁₉₇)、大肠杆菌、霍乱或幽门螺旋杆菌的类毒素或者减毒的毒素衍生物。T细胞表位也是适合的载体分子。一些偶联物可以通过将本发明的药剂连接到免疫刺激性聚合物分子(例如三棕榈酰基-S-甘油半胱氨酸(Pam₃Cys)、甘露聚糖(甘露糖聚合物)或葡聚糖(β1→2聚合物))、细胞因子(例如IL-1、IL-1α和β肽、IL-2、γ-INF、IL-10、GM-CSF)和趋化因子(例如MIP1-α和β以及RANTES)来形成。也可以将免疫原性药剂连接到增强跨组织运输的肽,如O'Mahony, W097/17613和W097/17614中所描述的。可以使用或不使用间隔氨基酸(例如gly-gly)将免疫原连接到载体。

[0171] 其他载体包括病毒样粒子。病毒样粒子(VLP)也称为假病毒粒子或病毒衍生粒子,表示由能够在体内自体组装成具有明确的球形对称结构的VLP的病毒衣壳和/或包膜蛋白的多个拷贝构成的亚单位结构。(Powilleit等,(2007)PLoS ONE 2(5):e415)。已发现,这些粒子可用作抗原递送系统。由于其颗粒性质和高分子量,VLP可以被大量生产并容易地纯

化。VLP无需另外使用佐剂即可诱导免疫应答。(Ulrich等,(1996)Intervirol. 39:126-132)。可用作VLP抗原递送系统的示例性嵌合粒子包括基于乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、酵母反转录转座子Ty、酵母全病毒L-A、细小病毒、流感病毒、诺瓦克病毒、轮状病毒、腺相关病毒、蓝舌病毒、甲型肝炎病毒、人乳头瘤病毒、麻疹病毒、多瘤病毒和RNA噬菌体病毒的嵌合粒子,以及基于各种不同的反转录病毒和慢病毒的嵌合粒子。对于综述,参见Lechner等(2002)Intervirol. 45:212-217。

[0172] 乙型肝炎病毒的核心蛋白(HBcAg)是用于携带外来抗原的常用VLP(参见Koletzki等(1997)J Gen Vir 78:2049-2053)。简单来说,HBcAg可以被用作核心来构建呈递延长的外来蛋白区段的VLP。所述方法利用在C端截短的HBcAg与含有终止密码子的外来蛋白序列之间具有连接物序列的构建物。在用于在大肠杆菌抑制基因菌株中表达的空白突变TGA-Trp的基础上,利用通读机制来表达截短的HBcAg/外来蛋白嵌合体。由Koletzki等描述的方法允许将长的外来蛋白序列并入到VLP中,允许用VLP携带更大量种类的抗原。

[0173] HIV病毒的Gag蛋白可用作抗原载体系统(参见Griffiths等,(1993)J Virol. 67(6):3191-3198)。Griffiths利用HIV的V3环,其是HIV包膜的重要的中和决定簇。Gag:V3融合蛋白在体内组装成杂合的Gag粒子,其被称为病毒衍生粒子(VDP)。VDP诱导体液应答和细胞应答两者。由于V3环含有CTL表位,因此用Gag:V3免疫诱导了针对VLP的V3蛋白部分的CTL应答。

[0174] 也可以使用杂合的HIV:Ty VLP(参见Adams等,(1987)Nature 329(3):68-70)。HIV:Ty VLP利用酵母转座子Ty的p1蛋白。p1的前381个氨基酸对于VLP形成来说是足够的。HIV:Ty融合蛋白能够在体内组装成VLP,并且诱导针对由VLP携带的HIV抗原的免疫应答。使用Typ1蛋白的VLP也可以含有融合到完整 $\alpha 2$ -干扰素、牛乳头瘤病毒E1和E2基因的产物以及流感病毒血凝素的一部分的p1。每个这些Ty融合体形成VLP,并能够诱导针对非Ty VLP组分的抗血清的产生。

[0175] 也可以从酵母全病毒L-A的变体来设计VLP(参见Powilleit等,(2007)PLOS One 2(5):e415)。可以将L-A病毒的Po1基因用适合的抗原替换以诱导特定的免疫应答,证实了酵母VLP是有效的抗原载体。

[0176] 重组的非复制型细小病毒样粒子也可以用作抗原载体。(Sedlik等,(1997)PNAS 94:7503-7508)。这些粒子允许所携带的抗原进入细胞溶质,使得它们进入I类限制性免疫途径,从而刺激细胞毒性T-淋巴细胞(CTL)介导的应答。Sedlik具体使用了PPV:VLP,其含有细小病毒的VP2衣壳蛋白,并且将来自于淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的第118-132位残基插入到VP2衣壳蛋白中。含有LCMV的PPV:VLP能够诱导针对LCMV的免疫应答,并在预先免疫的小鼠中引发针对致死病毒剂量的免疫保护。

[0177] VLP也可以包含不能复制的流感病毒,其缺少流感病毒NS2基因,这是病毒复制所必需的基因。(Watanabe等(1996)J Virol. 76(2):767-773)。这些VLP感染哺乳动物细胞并允许外来蛋白表达。

[0178] 基于诺瓦克病毒(NV)的VLP也可用于免疫原递送的介质。(Ball等(1999)Gastroenterology 117:40-48)。NV基因组具有三个开放阅读框(ORF 1-3)。ORF 2和3的重组杆状病毒表达允许重组诺瓦克病毒(rNV)VLP的高得率的自发组装。

[0179] 片段通常与药学可接受的佐剂一起施用。相对于肽被单独使用的情况,所述佐剂

提高诱导的抗体的滴度和/或诱导的抗体的结合亲和性。可以将各种不同佐剂与AB的免疫原性片段组合使用,以引发免疫应答。优选的佐剂增强对免疫原的固有应答,而不在免疫原中引起影响应答的定性形式的构象变化。优选的佐剂包括氢氧化铝和磷酸铝、3-脱氧-酰基化的单磷酰脂质A(MPLTM)(参见GB 2220211(RIBI ImmunoChem Research Inc.,Hamilton, Montana,现在为Corixa的一部分)。StimulonTMQS-21是从存在于南美的皂树(*Quillaja Saponaria Molina*)的树皮分离的一种三萜烯糖苷或皂角苷(参见Kensil等,《疫苗设计:亚单位和佐剂方法》(Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach)(Powell & Newman主编,Plenum Press,NY,1995);US 5,057,540)、(Aquila BioPharmaceuticals, Framingham,MA,现在的Antigenics,Inc.,New York,NY)。其他佐剂是水包油乳液(例如角鲨烯或花生油),任选地与免疫刺激剂例如单磷酰脂质A(参见Stoute等,N.Engl.J.Med.336,86-91(1997))、pluronic聚合物和杀死的分枝杆菌相组合。另一种佐剂是CpG(WO 98/40100)。佐剂可以作为含有活性剂的治疗性组合物的组分施用,或者可以在治疗剂施用之前、同时或之后分开地施用。

[0180] 优选的一类佐剂是铝盐例如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝。这样的佐剂可以与或不与其他特异性免疫刺激剂一起使用,所述免疫刺激剂例如MPL或3-DMP、QS-21、聚合或单体氨基酸例如聚谷氨酸或聚赖氨酸。另一类佐剂是水包油乳液制剂。这样的佐剂可以与或不与其他特异性免疫刺激剂一起使用,所述免疫刺激剂例如胞壁酰肽类(例如N-乙酰基胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰基-正胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(nor-MDP)、N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺-L-丙氨酸-2-(1'-2'二棕榈酰基-sn-甘油-3-羟基磷酰氧基)-乙胺(MTP-PE)、N-乙酰基葡萄糖氨基-N-乙酰基胞壁酰-L-Ala-D-异谷氨酰-L-Ala-二棕榈酰氧基丙酰胺(DTP-DPP)(theramideTM)或其他细菌细胞壁组分。水包油乳液包括(a)MF59(WO 90/14837),其含有5%角鲨烯、0.5%Tween 80和0.5%Span 85(任选地含有各种不同量的MTP-PE),使用微流化仪例如110Y型微流化仪(Microfluidics,Newton MA)配制成亚微米粒子,(b)SAF,其含有10%角鲨烯、0.4%Tween80、5%pluronic嵌段聚合物L121和thr-MDP,被微流化成亚微米乳液或涡旋振荡以产生较大粒径的乳液,以及(c)RibiTM佐剂系统(RAS)(Ribi ImmunoChem,Hamilton,MT),其含有2%角鲨烯、0.2%Tween 80和一种或多种选自单磷酰脂质A(MPL)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS)的细菌细胞壁组分,优选为MPL+CWS(DetoxTM)。

[0181] 另一类优选的佐剂是皂角苷佐剂,例如StimulonTM(QS-21,Aquila,Framingham,MA)或从其产生的粒子例如ISCOM(免疫刺激复合物)和ISCOMATRIX。其他佐剂包括RC-529、GM-CSF和弗氏完全佐剂(CFA)和弗氏不完全佐剂(IFA)。其他佐剂包括细胞因子例如白介素(例如IL-1 α 和 β 肽、IL-2、IL-4、IL-6、IL-12、IL13和IL-15)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)、趋化因子例如MIP1 α 和 β 以及RANTES。另一类佐剂是糖脂类似物,包括N-葡萄糖基酰胺、N-葡萄糖基脲和N-葡萄糖基氨基甲酸酯,它们每个在糖残基中被氨基酸取代,作为免疫调节剂或佐剂(参见US 4,855,283)。热休克蛋白例如HSP70和HSP90也可以用作佐剂。

[0182] 佐剂可以与免疫原一起作为单一组合物施用,或者可以在免疫原施用之前、同时或之后施用。免疫原和佐剂可以被包装和供应在同一小瓶中,或者可以被包装在分开的小瓶中并在使用前混合。免疫原和佐剂通常被包装有指示目标治疗应用的标签。如果免疫原

和佐剂被分开包装,则包装物通常包括关于使用前混合的说明书。佐剂和/或载体的选择取决于含有佐剂的免疫原性制剂的稳定性、施用途径、给药时间安排、佐剂对待疫苗接种的物种的功效,并且在人类中,药学可接受的佐剂是已被相关管理机构批准或可批准用于人类施用的佐剂。例如,弗氏完全佐剂不适用于人类施用。铝盐、MPL和QS-21是优选的。任选地,可以同时使用两种或更多种不同佐剂。优选的组合包括铝盐和MPL、铝盐和QS-21、MPL和QS-21、MPL或RC-529和GM-CSF,以及铝盐、QS-21和MPL一起。此外,也可以使用弗氏不完全佐剂(Chang等,Advanced Drug Delivery Reviews 32,173-186(1998)),其任选地与铝盐、QS-21和MPL中的任一种及其所有的组合相组合。

[0183] IV. 适合于治疗的患者

[0184] 诱导这样的抗体的AB的C端和中央表位抗体或片段可被用在用于治疗与AB紧密斑相关的疾病和/或病症(例如阿尔茨海默氏病、唐氏综合征和某些形式的帕金森氏症)的有效方案中。也被称为“纤维状斑块”的紧密斑与总斑块的比例,在临床前AD中为22%,但是在末期AD中升高到49%。Dickson和Vickers,Neuroscience 105:99-107(2001)。这些紧密斑中的大部分(82%)与营养不良性神经炎相关。同上。因此,AD痴呆症的发展与向诱导局部神经炎型营养不良的较高紧密斑比例转变相关。

[0185] 由于紧密斑的呈现态随着疾病进展而增加,因此患有中期至晚期阿尔茨海默氏病的患者倾向于具有相对高的紧密斑呈现态。因此,具有根据例如认知量表诊断的中期至晚期阿尔茨海默氏病的患者,可以用中央或C端抗体或诱导这样的抗体的AB片段进行治疗,并进行或不进行紧密斑呈现态的个体化评估。

[0186] 或者,可以从患者的紧密斑呈现态评估他们用中央或C端抗体或诱导这样的抗体的AB片段的治疗,而不必通过其他方式例如在认知量表上评估他们的疾病发展阶段。紧密斑的呈现态可以通过在下面更详细讨论的PET扫描来测定。为了计算比率,将紧密斑的数量与斑块总数(即紧密斑、弥散斑和致密核心斑)进行比较。致密核心斑被包括在总斑块中,但是不计为紧密斑。测量脑的确定横截面或体积或区域内的斑块(所有类型的斑块)。提供治疗开始信号的紧密斑比例可以为总斑块的至少25%。在某些方法中,在开始使用中央或C端抗体治疗之前,紧密斑与总斑块的比例为总斑块的至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%。在某些患者中,在开始使用中央或C端抗体治疗之前,紧密斑与总斑块的比例是或至少是25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%或50%。

[0187] 与N端抗体相比,C端和中央表位抗体对紧密斑和弥散斑具有不同的结合情况(即C端和中央表位抗体优先结合于紧密斑)。AD脑中的许多淀粉样斑块也是N端截短和修饰的,始于第3位处的焦谷氨酸。Harigaya等,Biochem Biophys Res Commun 276:422-427(2000);Guntert等,Neuroscience 143:461-475(2006)。因此,识别C端或中央表位的抗体识别不被N端表位抗体识别的截短的AB分子。由于不同的结合特异性,在某些方法中,可以将使用C端或中央表位抗体或诱导这样的抗体的AB片段的治疗与使用N端抗体或诱导这样的抗体的AB片段的治疗相组合。与单个抗体的使用相比,抗体的组合可以引起更多淀粉样沉积物的去除。不同的抗体可以被顺序或同时施用。

[0188] 在某些方法中,首先用N端表位抗体或诱导这样的抗体的片段对患者进行治疗。如果使用N端表位抗体的治疗导致紧密斑的清除缺乏、亚最佳或不完全清除,则随后用C端或

中央表位抗体对这样的患者进行治疗。清除缺乏、亚最佳或不完全清除可以通过下面讨论的PET成像来确定,或者可以从其他生物标志物或认知下降的不充分抑制来推衍确定。认知度量包括ADAS-CO11、ADAS-CO12、DAASD、CDR-SB、NTB、NPI、MMSE,并且生物标志物包括[18F]FDG、MRI标志物(BBSI和VBSI)和CSF标志物 $A\beta \geq 42$ 、tau和磷酸化tau。然而,通过PET成像检测到的变化通常先于生物标志物或认知试验的变化。

[0189] 在某些方法中,首先用C端或中央表位抗体或诱导这样的抗体的A β 片段对患者进行治疗。如果治疗导致弥散斑的清除缺乏、不完全或亚最佳清除,则可以施用N端表位抗体。弥散斑的清除缺乏、不完全或亚最佳清除可以通过PET成像来确定,或者可以从生物标志物或从认知下降的不充分抑制来推断。

[0190] 在其他方法中,N端抗体或诱导这样的抗体的A β 片段以及C端或中央表位抗体或诱导这样的抗体的A β 片段被同时施用。同时施用包括将抗体在同一时间(例如作为混合的制剂)施用,或者将抗体分开地但在交叠的治疗方案中施用,以使治疗性浓度的两种抗体长时间(例如至少1、3、6或12个月)存在于血清中。在这样的方法中,可以将抗体的不同特异性组合,以减少紧密斑和弥散斑两者或至少抑制紧密斑和弥散斑两者进一步增加。

[0191] 本发明的C端和中央表位抗体或诱导这样的抗体的A β 片段也可用于治疗具有阿尔茨海默氏病和并发的癫痫的患者。在动物模型中,紧密斑诱导异常的神经元活动过度,其可以造成AD特异性癫痫发作(Busche等,Science 321:1686-1689(2008))、轴突丧失、营养不良性神经轴突以及神经元损伤和死亡。Shah等,Am J Pathol 177:325-333(2010);Sheng等,J Neuropath Exp Neurol 57:714-717(1998)。因此,优先结合于紧密斑的抗体对于伴有并发的癫痫的阿尔茨海默氏病患者来说特别有用。使用本发明的中央和C端抗体去除紧密斑,可以在这样的患者中减轻癫痫发作的症状,并且减少或抑制阿尔茨海默氏病本身的症状的进一步发展。

[0192] 本发明的C端和中央表位抗体可有效地用于具有任何ApoE基因型的患者中。尤其是,本发明的抗体可用于具有E3/E3、E3/E4或E4/E4ApoE基因型的患者中。

[0193] V. 治疗和给药

[0194] “有效方案”是在患者中产生所需结果的剂量以及施用频率和途径。在预防性应用中,将药剂或药物组合物或含有它们的药物以有效降低疾病(例如阿尔茨海默氏病)的风险、减轻其严重性或延迟其至少一种征兆或症状的发作的方案(剂量、施用频率和途径)施用于对所述疾病易感或以其他方式具有所述疾病风险的患者。具体来说,所述方案优选有效地减少患者脑中淀粉样沉积物(尤其是紧密斑)的量,或至少抑制淀粉样沉积物(尤其是紧密斑)的量的增加。具有阿尔茨海默氏病风险的患者包括脑中淀粉样沉积物高于正常水平并且尚未被诊断患有阿尔茨海默氏病的患者,以及具有轻度认知缺损并且尚未被诊断患有阿尔茨海默氏病的患者。在治疗性应用中,将药剂组合物或药物以有效改善阿尔茨海默氏病的至少一种征兆或症状或至少抑制其进一步恶化的方案(剂量、施用频率和途径)施用于怀疑或已经患有所述疾病的患者。具体来说,所述方案优选有效地减少患者中的淀粉样沉积物(尤其是紧密斑)或至少抑制其进一步增加。

[0195] 用于治疗上述病症的本发明的组合物的有效剂量随着许多不同因素而变,所述因素包括施用手段、靶位点、患者的生理状态、患者是人类还是动物、施用的其他药物以及治疗是预防性还是治疗性的。

[0196] 任选地,施用抗体以在患者中获得0.1-60、0.4-20或1-15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的被施用抗体的平均血清浓度。血清浓度可以通过实际测量来确定,或者可以根据施用的抗体量、施用频率、施用途径和抗体的半衰期,从标准药物动力学来预测(例如WinNonline 4.0.1版(Pharsight Corporation,Cary,USA))。

[0197] 血清中的平均抗体浓度任选地在1-10、1-5或2-4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内。此外,为了相对于可能的副作用、尤其是血管性水肿的发生而使治疗益处最大化,还任选地将患者中抗体的最高血清浓度维持在低于约28 μg 抗体/ ml 血清。优选的最高血清浓度在约4-28 μg 抗体/ ml 血清的范围内。患者中抗体的最高血清浓度低于约28 μg 抗体/ ml 血清与平均血清浓度低于约7 μg 抗体/ ml 血清的组合是特别有益的。任选地,平均浓度在约2-7 μg 抗体/ ml 血清的范围内。

[0198] 在抗体施用后血浆中A β 的浓度随着抗体血清浓度的改变而粗略地平行改变。换句话说,在抗体给药后A β 的血浆浓度最高,随后随着抗体浓度在两次给药之间降低,A β 的血浆浓度也降低。可以改变抗体施用的剂量和方案,以在血浆中获得所需的A β 水平。在这样的方法中,抗体的平均血浆浓度可以为至少450 pg/ml ,或例如在600-3000 pg/ml 或700-2000 pg/ml 或800-1000 pg/ml 的范围内。

[0199] 抗体的示例性剂量范围为约0.01至10 mg/kg 、0.01至5 mg/kg ,并且在某些情况下为0.1至3 mg/kg 或0.15-2 mg/kg 或0.15-1.5 mg/kg 宿主体重。在某些情况下,剂量为0.01、0.05、0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9或10 mg/kg 。可以每天、每隔一天、每周、每两周、每月、每季度或根据通过经验分析确定的任何其他日程安排向对象施用这样的剂量。示例性的治疗需要在例如至少三个月、至少六个月、至少九个月或至少一年的长时段内分多次剂量施用。其他的示例性治疗方案需要每两周一次或每月一次或每3至6个月一次施用。例如可以静脉内或皮下施用剂量。

[0200] 对于静脉内施用来说,每季度静脉内施用0.1 mg/kg 至2 mg/kg 、优选地0.5 mg/kg 、1.0 mg/kg 或1.5 mg/kg 的剂量是适合的。对于每月静脉内施用来说,优选的抗体剂量在0.1-1.0 mg/kg 抗体或优选地0.5-1.0 mg/kg 抗体的范围内。

[0201] 对于更频繁的给药,例如每周至每月给药来说,皮下施用是优选的。相对于静脉内给药,皮下给药更容易实施并且可以降低最高血清浓度。用于皮下给药的示例性剂量通常在0.01至0.6 mg/kg 或0.01-0.35 mg/kg 、优选地0.05-0.25 mg/kg 的范围内。对于每周或每两周给药来说,剂量优选地在0.015-0.2 mg/kg 或0.05-0.15 mg/kg 的范围内。对于每周给药来说,剂量优选为0.05至0.07 mg/kg ,例如约0.06 mg/kg 。对于每两周给药来说,剂量优选为0.1至0.15 mg/kg 。对于每月给药来说,剂量优选为0.1至0.3 mg/kg 或约0.2 mg/kg 。每月给药包括按照公历月或农历月(即每四周)给药。在这里,正如本申请中别处所述,表示成 mg/kg 的剂量可以通过乘以通常四舍五入至整数的典型患者的质量(例如70或75 kg)而转变成绝对质量剂量。其他方案由例如PCT/US2007/009499描述。在这些指导原则内,剂量和频率可以根据上面所讨论的患者的ApoE状态而变化。

[0202] 用于主动施用的药剂的量在每位患者1-500 μg 之间变化,更通常在每次人类施用注射5-100 μg 之间变化。每次注射的示例性剂量为每次人类注射3、10、30或90 μg 。免疫原的质量还取决于免疫原内免疫原性表位与作为整体的免疫原的质量的质量比。通常,10⁻³至10⁻⁵微摩尔的免疫原性表位被用于免疫原的每次免疫接种。注射的时间安排可以从每日一

次到每年一次到每十年一次显著地变化。在给予免疫原剂量的任何给定日,如果也施用佐剂则剂量高于 $1\mu\text{g}/\text{患者}$ 并且通常高于 $10\mu\text{g}/\text{患者}$,如果不存在佐剂,则高于 $10\mu\text{g}/\text{患者}$ 并且通常高于 $100\mu\text{g}/\text{患者}$ 。典型的方案由免疫接种和随后以一定时间间隔例如6周时间间隔的加强注射构成。另一种方案由免疫接种和随后1、2和12个月后的加强注射构成。另一种方案需要在一生中每两个月进行注射。或者,按照免疫应答的监测所指示的,加强注射可以不规则地进行。剂量和频率可以变化,使得由活性剂诱导的抗体具有与被动施用中相同的在 $0.1-60$ 、 $0.4-20$ 或 $1-15$ 或 $2-7\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内的平均血清浓度。

[0203] VI. 药物组合物

[0204] 本发明的药剂(例如抗体)通常作为包含活性治疗剂和各种其他药学可接受的组分的药物组合物施用。参见《雷明顿制药学》(Remington's Pharmaceutical Science)(第15版, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania(1980))。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗应用。取决于所需制剂,组合物也可以包括药学可接受的无毒性载体或稀释剂,其被定义为常用于配制用于动物和人类施用的药物组合物的介质。稀释剂被选择成不影响组合的生物活性。这样的稀释剂的实例是蒸馏水、生理磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液和Hank's溶液。此外,药物组合物或制剂也可以包括其他载体、佐剂或无毒性、非治疗性、非免疫原性稳定剂等。

[0205] 药物组合物还可以包括大的、代谢缓慢的大分子,例如蛋白质、多糖如壳聚糖、聚乳酸、聚乙醇酸和共聚物(例如乳胶功能化的Sephacrose™、琼脂糖、纤维素等)、聚氨基酸、氨基酸共聚物和脂质聚集体(例如油滴或脂质体)。此外,这些载体可以起到免疫刺激剂(即佐剂)的作用。

[0206] 药剂通常被肠胃外施用。抗体通常被静脉内或皮下施用。用于诱导主动免疫应答的药剂通常被皮下或肌肉施用。对于肠胃外施用来说,本发明的药剂可以作为物质在生理上可接受的稀释剂与药物载体中的溶液或悬液的可注射剂型施用,所述药物载体可以是无菌液体例如水、油类、盐水、甘油或乙醇。此外,辅助物质例如润湿剂或乳化剂、表面活性剂、pH缓冲物质等也可以存在于组合物中。药物组合物的其他组分是石油、动物、植物或合成来源的组分,例如花生油、大豆油和矿物油。一般来说,二醇例如丙二醇或聚乙二醇是优选的液体载体,尤其是对于注射溶液来说。抗体可以以储库型注射剂或植入制剂的形式施用,其可以被配制成允许活性成分的持续释放。

[0207] 通常,组合物被制备成注射剂,也可以在注射前制备成在液体介质中的液体溶液或悬液。抗体也可以被提供成冻干形式,以在使用前重构。正如上面讨论的,抗体制剂也可以被乳化或囊封在脂质体或微粒例如聚丙交酯、聚乙交酯或用于增强佐剂效果的共聚物中(参见Langer, Science 249:1527(1990)和Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28:97(1997))。本发明的药剂可以以储库型注射剂或植入制剂的形式施用,其可以被配制成允许活性成分的持续或脉冲式释放。

[0208] 适合于其他施用模式的其他制剂包括口服、鼻内和肺部制剂、栓剂和透皮应用。对于栓剂来说,粘合剂和载体包括例如聚亚烷基二醇或甘油三酯;这样的栓剂可以由含有0.5%至10%、优选地1%-2%范围内的活性成分的混合物形成。口服制剂包括赋形剂,例如制药级的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。这些组合物采取溶液、悬液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放制剂或粉剂的形式,并含有10%-95%、优选地25%-70%

的活性成分。

[0209] VII. 监测

[0210] 正如在本文中讨论的,对患者中的淀粉样沉积物进行体内成像的方法可用于诊断阿尔茨海默氏病或证实阿尔茨海默氏病的诊断,鉴定紧密斑或弥散斑相对于总斑块的比例,或在接受免疫疗法方案的患者中监测疾病进展和/或对治疗的响应(例如紧密斑的清除)。在某些情况下,监测包括相对于同一患者的以前的扫描或相对于历史对照评估患者脑中紧密斑的尺寸或相对比例。优选的成像技术是PET扫描。

[0211] 放射成像的最新进展已经使得能够在AD患者中进行A β 斑块的体内成像。Klunk和Mathis, *Curr Opin Neurol* 21:683-687(2008)。正如在下面更详细讨论的,用于这种方法的示例性化合物是正电子发射断层(PET)放射性示踪剂“匹兹堡化合物-B”(PiB),其以高亲和性结合于聚集的A β (同上),尽管其他PET配体也是可用的。PiB在患有AD的人的脑中的体内滞留,显示出与尸检时在组织染色的AD脑组织上观察到的斑块的分布非常类似的区域性分布。Ikonomovic等, *Brain* 131:1630-1645(2008)。使用PiB的荧光衍生物,已显示PiB在AD尸检组织上优先结合于紧密斑,而弥散斑的标记不太显著。同上。因此,PET扫描可用于鉴定相对于弥散斑来说具有高比例的紧密斑的AD患者。

[0212] 可以使用例如常规的PET成像仪和辅助设备来进行PET扫描。扫描通常包括公知与阿尔茨海默氏病中的沉积物相关的一个或多个脑区域,以及作为对照的其中如果有的话通常也是存在很少沉积物的一个或多个区域。与阿尔茨海默氏病中存在的淀粉样沉积物相关的脑区域包括例如脑的前扣带回、后扣带回、额叶、颞叶、顶叶或枕叶皮层。与不存在沉积物相关的脑区域包括例如皮质下白质、脑桥和小脑。

[0213] 通常,在开始免疫治疗之前进行基线测量。然后在开始治疗后进行一次或多次后续扫描。开始治疗后第一次这样的扫描可以在开始治疗后约3-24个月进行。通常,这样的扫描在开始治疗的6-18或9-18个月内例如在约6、9、12、15或18个月时进行。在某些方法中,扫描在治疗后78周进行。任何后续的扫描(即第三次和随后的扫描)可以以例如每季度、每六个月、每年或每两年的时间间隔进行。

[0214] 在开始免疫治疗后,免疫治疗对淀粉样沉积物的影响可以在约3-24个月、更通常6-18个月的时期内首次被观察到。所述影响可以被评估为淀粉样沉积物的全面减少、一种类型的淀粉样沉积物(例如紧密斑)的减少、或者紧密斑与弥散斑的呈现态或者紧密斑或弥散斑与总斑块的比率的变化。这样的变化相对于开始免疫治疗前的基线测量来评估。这样的影响可以在已知形成沉积物的一个或多个脑区域中度量,或者可以从这些区域的平均值得度量。总淀粉样斑块或紧密斑或者紧密斑与弥散斑的比率或者紧密斑相对于总斑块的比例的降低总是可以归因于治疗效果,因为在没有治疗的情况下淀粉样沉积物和紧密斑与弥散斑的比率或者紧密斑相对于总斑块的比例通常不减少。

[0215] 总淀粉样沉积物或紧密斑或者紧密斑与弥散斑的比率或者紧密斑相对于总斑块的比例维持在近似恒定水平或甚至淀粉样沉积物的少量增加也可以指示对治疗的响应,尽管可能是亚最佳响应。可以将这样的响应与未接受治疗的阿尔茨海默氏病患者中淀粉样沉积物水平的时间过程进行比较,以确定免疫治疗在抑制淀粉样沉积物、紧密斑或紧密斑与弥散斑的比率的进一步增加中是否具有效果。

[0216] 检测到的信号可以被表示成多维图像。多维图像可以是表示穿过脑的横截面的2

个维度、表示三维脑的三个维度或表示三维脑随时间变化的四个维度。可以使用彩色标度,其中不同颜色指示不同量的标记物和推衍检测到的淀粉样沉积物。扫描结果也可以通过数字呈现,其中数字与检测到的标记物的量相关并因此与淀粉样沉积物的量相关。可以将已知与阿尔茨海默氏病中的沉积物相关的脑区域中存在的标记物,与已知与沉积物无关的区域中存在的标记物进行比较,以提供指示前者区域内沉积物的程度的比率。对于相同的放射性标记的配体来说,这样的比率提供了淀粉样沉积物或紧密斑或者紧密斑与弥散斑的比率以及它们在不同患者之间的变化的可比较的度量。

[0217] 在某些方法中,PET扫描与MRI或CAT扫描同时进行或在同一次患者就诊中进行。MRI或CAT扫描与PET扫描相比提供了脑的更多解剖细节。然而,可以将来自于PET扫描的图像叠加在MRI或CAT扫描图像上,更精确地指示PET配体和推断的淀粉样沉积物相对于脑中解剖结构的位置。

[0218] 通常通过外周途径将PET配体施用于患者的系统循环,其中静脉内施用是优选的。因此,PET配体可以被系统循环递送跨过血脑屏障而与淀粉样沉积物发生接触。结合到脑中的淀粉样沉积物的PET配体被固定,并且可以在随后的PET扫描中被检测到。未结合的PET配体或结合于可溶性A β 的PET配体比结合的PET配体更快地从脑中清除,并且不被检测到或者相对于同样量的结合的PET配体以较低程度被检测到。

[0219] 匹兹堡化合物-B(^{11}C PiB)(Klunk等,Ann Neurol 55(3):306-319(2004);Ikonovic等,Brain;131:1630-1645(2008))是一种示例性PET配体。PiB是硫代黄素类似物,其以低的纳摩尔亲和性结合于A β 的聚集的纤维状沉积物,以足以用于PET成像的量进入脑中,并从正常脑组织快速清除。(Price等,J.Cereb.Blood Flow Metab.25:1528-1547(2005))。在PET研究中通常使用的低的纳摩尔浓度下,已显示PiB与尸检人脑的结合对纤维状A β 沉积物具有选择性(Ikonovic等,同上;Fodero-Tavoletti等,J Neurosci;27:10365-10371(2007))。与对照相比,在病理学上已知被A β 沉积物所靶向的脑联合皮质区域中,AD患者显示出约两倍的 ^{11}C PiB滞留。在已知相对不受A β 沉积影响的区域(例如皮质下白质、脑桥和小脑)中,在AD患者和对照中 ^{11}C PiB滞留是相当的。施用的PET配体的剂量可以通过放射活性来测量。示例性剂量、特别是对于 ^{11}C PiB来说,为12-18 μCi 。

[0220] 可以使用的其他PET配体包括Th-T PET配体 ^{18}F -AH110690(来自于GE Healthcare的PIB的3'-氟代类似物,也称为flutemetamol),以及两种CR PET配体:芪衍生物 ^{18}F -BAY94-9172(Bayer Schering Pharma)(其在AD和对照中的初步研究中与 ^{11}C -PIB性能相当[Rowe, .Lancet Neurol.2008;7(2):129-3535]) and (E)-4-(2-(6-(2-(2-(2-(2-18F-氟乙氧基)乙氧基)乙氧基)吡啶-3-基)乙烯基)-N-甲基苯胺(来自于Avid Radiopharmaceuticals的 ^{18}F -AV-45)[Klunk,Curr Opin Neurol.2008;21(6):683-732;Rowe,同上;Nordberg, Neuropsychologia.2008;46(6):1636-41]。

[0221] 施用PET配体与进行扫描之间的时间间隔可以取决于PET配体,尤其是它在脑中的摄取和清除速率,及其放射性标记物的半衰期。所述时间间隔可以为例如约10-120分钟或30-90分钟。

[0222] 实施例

[0223] 实施例1-4:材料和方法

[0224] 抗体:所有抗体为IgG1同种型的。阳性对照是3D6(A β ₁₋₅)和12A11(A β ₃₋₇)。IgG1为阴

性对照。C端AB抗体为2G3和14C2(对于A β ₄₀来说)以及21F12(对于A β ₄₂来说)。

[0225] 组织:PDAPP小鼠(Games等,Nature 373:523-527(1995))从机构内部群体获得。PSAPP小鼠(双重突变的hAPP和早老蛋白1的属间杂种,Holcomb等,Nat Med 4:97-100(1998);Gordon等,Exp Neurol173:183-195(2002))从Dr.Steve Jacobson(Wyeth)获得,41系小鼠(Swedish和London的带有Thy1启动子的突变的hAPP,(Rockenstein等,J Neurosci Res 66:573-582(2001))是来自于Dr.Eliezer Masliah(University of CA, San Diego)的慷慨馈赠。将小鼠安乐死,将脑快速取出并在干冰上冷冻。来自于AD患者的新鲜冷冻的组织是来自于Dr.Elizabeth Head(Brain Bank at University of CA, Irvine)的慷慨馈赠。

[0226] 切片制作:使用Microm HM 550冷冻切片从新鲜冷冻的组织产生10微米的冷冻切片,并将其固定在Superfrost-Plus载片上用于免疫染色,或固定在小的涂覆有Vectabond并压热灭菌的盖玻片上用于离体测定。在任何处理之前,将所有切片在室温下干燥过夜。

[0227] 将用于免疫染色的切片进行不固定或在丙酮75%/乙醇25%混合物中或在磷酸盐缓冲的4%聚甲醛中固定5分钟的处理。

[0228] 免疫染色:对于免疫过氧化物酶染色来说,第一抗体是不修饰的或被偶联到生物素,并分别以2和3 μ g/ml的浓度使用。第二抗体如果使用的话,来自于Vector,被偶联到生物素,并以1:200的稀释度使用。作为最后一步,使用来自于Vector的ABC“Elite”过氧化物酶试剂盒,并使用二氨基联苯胺和H₂O₂作为过氧化物酶底物来将结合有抗原的抗体可视化。所有切片用苏木精复染。

[0229] 对于被固定在Superfrost载片或盖玻片上的切片的免疫荧光染色来说,第一抗体以1-2 μ g/ml使用,第二抗体以1:200稀释度使用。使用来自于Molecular Probes的试剂盒将抗AB抗体偶联到Alexa-594(红色荧光)。除了上述抗体之外,可商购的抗CD11b抗体(大鼠抗体, Serotec)被用于在离体测定法后检测小神经胶质细胞,并使用Alexa-488(绿色荧光)来揭示。也使用Hoechst核染色剂(蓝色荧光)来揭示细胞核。

[0230] 离体测定法(AB吞噬测定法):这种测定法按照以前在Bard等,Nat Med 6:916-919(2000)中的描述进行。简单来说,将盖玻片上的新鲜冷冻切片单个地置于24孔培养板的孔中,并与3 μ g/ml浓度下的对照抗体(3D6, IgG)或一种C端AB抗体(2G3、14C2或21F12)温浴。在向切片添加抗体后30分钟,添加一周前从小鼠P1幼仔制备的鼠类小神经胶质细胞,并且以5x10⁵个细胞/孔的密度进行添加。在添加小神经胶质细胞后,将切片在37℃和5%CO₂气氛中温浴8h-14h。在该时间段后,将抗体/小神经胶质细胞溶液从切片吸出,并将切片用磷酸盐缓冲的4%聚甲醛固定,然后用于如上所述的免疫染色。

[0231] 实施例1

[0232] C端抗体2G3、14C2和21F12识别未固定的AD脑切片上的斑块

[0233] 未固定的AD组织(枕叶皮质)上的染色实验的结果被示出在图1(图A和B)中,并且它们的半定量可视化评估(由两位调查人员独立进行;平均的结果)被示出在下面的表2(A和B)中。使用未固定的切片来模拟经历治疗的患者中对AB抗体的暴露,即抗体能够与未被固定程序修饰的抗原相互作用,所述固定程序通常诱导组织切片中的蛋白质发生交联(福尔马林或聚甲醛)或脱水和沉淀(乙醇、丙酮、甲醇)。3D6和12A11抗体起到阳性对照的作用。当在染色程序中使用不相关的IgG(阴性对照)时,完全不能检测到染色。每种被评估的C端

抗体结合于AD斑块,尽管不如3D6或12A11那样强。在来自于载脂蛋白E3/E3和载脂蛋白E3/E4两种基因型的AD患者的切片中,观察到C端抗体与AD斑块的结合。这些结果显示,C端抗体2G3、14C2和21F12结合Aβ斑块。

[0234] 表2. 使用C端表位Aβ抗体的AD组织染色的半定量可视化评估。

[0235] A(E3/E3基因型)

[0236]

患者号 Braak阶段	3D6	12A11	2G3	14C2	21F12
05-02 V	++++	+++(+)	+++	++(+)	++
8-00 V	++++	++++	+++	++(+)	++
11-03 V	++++	+++(+)	+++	++(+)	++
14-02 V	++++	+++(+)	++	++	-
24-01 VI	++++	++++	+++(+)	+++(+)	+(+)
中位数	++++	+++(+)	+++	++(+)	+(+)

[0237] B(E3/E4基因型)

[0238]

患者号 Braak阶段	3D6	12A11	2G3	14C2	21F12
05-02 V	++++	+++(+)	+++	++(+)	++
8-00 V	++++	++++	+++	++(+)	++
11-03 V	++++	+++(+)	+++	++(+)	++
14-02 V	++++	+++(+)	++	++	-
24-01 VI	++++	++++	+++(+)	+++(+)	+(+)
中位数	++++	+++(+)	+++	++(+)	+(+)

[0239] 实施例2

[0240] C端抗体2G3、14C2和21F12识别PSAPP和41系但不是PDAPP小鼠的未固定和固定切片上的斑块

[0241] 为了调查C端Aβ抗体2G3、14C2和21F12在hAPP转基因小鼠的切片上的结合,产生下

列模型的冷冻切片(3只小鼠/基因型,对于每种抗体和染色条件来说1-2个切片/小鼠):PDAPP(纯合小鼠,24月龄);PSAPP(杂合的;13月龄);和41系(杂合的,18月龄)。

[0242] 我们将两种不同的固定条件(丙酮75%/乙醇25%混合物,4%磷酸盐缓冲的聚甲醛)与未固定的切片进行比较。所有AB抗体都用生物素标记。抗体3D6用作对照,IgG用作阴性对照。使用IgG时没有观察到信号(未示出)。

[0243] 3种小鼠模型的额叶皮层的结果被示出在图2中(A:3DF6,B:2G3,C:14C2,D:21F12)。在所有模型中和所有条件下,3D6浓重地标记斑块。与3D6相比,C端抗体仅标记少部分斑块。A β (40)抗体2G3和14C2仅标记PSAPP和41系中的斑块,其中2G3在所有三种条件下以相似程度标记斑块,而14C2仅在丙酮/乙醇固定后标记。A β (42)抗体21F12在PDAPP小鼠中标记少量斑块,并且在PSAPP和41系小鼠中标记更大量的斑块。在丙酮/乙醇固定后使用这种抗体的染色略微更强。

[0244] 这些结果表明,A β (40)和A β (42)抗体识别某些小鼠模型例如PSAPP和41系小鼠中的斑块。

[0245] 实施例3

[0246] 在AD和PSAPP小鼠中C端抗体主要结合于具有紧密外观的斑块

[0247] 为了确定3D6的斑块结合与C端A β 抗体的斑块结合之间的重叠,对未固定的AD和PSAPP切片进行荧光双重标记染色。结果被示出在图3中。双重染色仅对于AD中的3D6+21F12的双重标记和PSAPP切片中的3D6和2G3或3D6和21F12给出了可解释的结果。

[0248] 结果显示,21F12强烈结合于AD切片中斑块的致密核心(图3A,上方和中间行),并以较低程度结合于具有更弥散外观的斑块(图3A,下方行)。在PSAPP小鼠切片中,2G3和21F12主要结合于斑块的致密核心(图3B)。

[0249] 实施例4

[0250] 在离体测定法中C端抗体促进来自于PSAPP和41系小鼠切片的A β 斑块的小神经胶质细胞吞噬

[0251] 为了确定C端A β 抗体是否能够清除斑块,我们将它们在离体测定法中使用在来自于PSAPP和41系小鼠的冷冻切片上。

[0252] 如上面在材料和方法中所述,将来自于半脑的切片与一种A β 抗体(3D6、2G3、14C2、21F12,都是IgG1同种型)或与同种型匹配的IgG阴性对照和原代鼠类小神经胶质细胞温育。然后将切片用3D6(红色通道)、小神经胶质细胞标志物CD11b(绿色通道)和核染色剂Hoechst(蓝色通道)三重染色。随后,为了确定A β 抗体是否引发斑块清除,使用与Olympus BX61显微镜偶联的Retiga相机(QImaging),使用10x物镜,将来自于整个切片的红色通道信号(3D6,用于斑块)进行数字化扫描。使用Metamorph[®]软件,用黑色和白色将整个切片的图像进行数字化重建,以显示由3D6染色所揭示的斑块信号。两个这样的实验的结果被示出在图4A和4B中。结果显示,所有A β 抗体都引起斑块信号降低,表明在离体测定法中它们都能清除斑块。

[0253] 为了证实小神经胶质细胞吞噬参与这些使用C端A β 抗体的离体实验,随后将切片在高倍率(40X物镜)下观察,并同时对所有三个通道(红、绿和蓝)进行成像。结果示出了对于3D6、2G3、14C2和21F12抗体来说A β 存在于小神经胶质细胞内,如图5中所示。

[0254] 实施例5-8:材料和方法

[0255] 抗体:所有抗体为IgG1同种型的。3D6(AB₁₋₅)为阳性对照。IgG1为阴性对照。中央表位AB抗体为266(AB₁₆₋₂₃)、15C11(AB₁₈₋₂₂)和22D12(AB₁₈₋₂₂)。

[0256] 组织:PDAPP小鼠(Games等,(1995),同上)从机构内部群体获得。PSAPP小鼠(双重突变的hAPP和早老蛋白1的属间杂种(Holcomb等,(1998),同上;Gordon等,(2002),同上)从Dr.Steve Jacobson(Wyeth)获得。将小鼠通过CO₂暴露安乐死,将脑快速取出并在干冰上冷冻。来自于AD患者的新鲜冷冻的组织是来自于Dr.Elizabeth Head(Brain Bank at University of CA,Irvine)的慷慨馈赠。

[0257] 切片制作:使用Microm HM 550冷冻切片机从新鲜冷冻的组织产生10微米的冷冻切片,并将其固定在Superfrost-Plus[®]载片上用于免疫染色,或固定在小的涂覆有Vectabond[®]并压热灭菌的盖玻片上用于离体测定。在任何处理之前,将所有切片在室温下干燥过夜。用于免疫染色的切片进行不固定处理。

[0258] 免疫染色:对于免疫过氧化物酶染色来说,第一抗体以3μg/ml的浓度使用。第二抗体来自于Vector,被偶联到生物素,并以1:200的稀释度使用。作为最后一步,使用来自于Vector的ABC“Elite”过氧化物酶试剂盒,并使用二氨基联苯胺和H₂O₂作为过氧化物酶底物来将结合有抗原的抗体可视化。AD切片用苏木精复染。

[0259] 对于被固定在Superfrost载片或盖玻片上的切片的免疫荧光染色来说,第一抗体以1-2μg/ml使用,第二抗体以1:200稀释度使用。使用来自于Molecular Probes的试剂盒将抗AB抗体偶联到Alexa-594(红色荧光)。除了上述抗体之外,可商购的抗CD11b抗体(大鼠抗体,Serotec)被用于在离体测定法后检测小神经胶质细胞,并使用Alexa-488(绿色荧光)来揭示。也使用Hoechst核染色剂(蓝色荧光)来揭示细胞核。

[0260] 离体测定法(AB吞噬测定法):这种测定法按照以前在Bard等,(2000),同上中的描述进行。简单来说,将盖玻片上的新鲜冷冻切片单个地置于24孔培养板的孔中,并与3μg/ml浓度下的对照抗体(3D6,IgG)或一种中央AB抗体(266、15C11或22D12)温浴。在向切片添加抗体后30分钟,添加一周前从小鼠P1幼仔制备的鼠类小神经胶质细胞,并且以5x10⁵个细胞/孔的密度进行添加。在添加小神经胶质细胞后,将切片在37℃和5%CO₂气氛中温浴8h-14h。在该时间段后,将抗体/小神经胶质细胞溶液从切片吸出,并将切片用磷酸盐缓冲的4%聚甲醛固定,然后用于如上所述的免疫染色。

[0261] 实施例5

[0262] 中央表位抗体266、15C11和22D12识别未固定的AD切片上的斑块

[0263] 未固定的AD组织(枕叶皮质)上的染色实验的结果被示出在图6A、B中,并且它们的半定量可视化评估(由两位调查人员独立进行;平均的结果)被示出在下面的表3(A和B)中。使用未固定的切片来模拟经历治疗的患者中对AB抗体的暴露,即抗体能够与未被固定程序修饰的抗原相互作用,所述固定程序通常诱导组织切片中的蛋白质发生交联(福尔马林或聚甲醛)或脱水和沉淀(乙醇、丙酮、甲醇)。3D6抗体起到阳性对照的作用。当在染色程序中使用不相关的IgG(阴性对照)时,完全不能检测到染色。每种被评估的中央表位AB抗体结合于AD斑块,尽管不如3D6那样强。在来自于载脂蛋白E3/E3和载脂蛋白E3/E4两种基因型的AD患者的切片中,观察到中央表位抗体与AD斑块的结合。这些结果显示,中央表位AB抗体266、15C11和22D12结合AB斑块。

[0264] 表3. 使用中央表位AB抗体的AD组织染色的半定量可视化评估。

[0265] A(E3/E3基因型)

患者号 Braak 阶段	3D6	266	15C11	22D12
01-02 VI	++++	+	+	++
04-02 VI	++++	+/-	+	+ (+)
10-02 VI	++++	+	++	++
16-02 V	++++	+	++	++
26-00 VI	++++	+/-	+/-	+/-
中位数	++++	+	++	++

[0267] B(E3/E4基因型)

患者号 Braak 阶段	3D6	266	15C11	22D12
05-02' V	++++	+	++	+ (+)
8-00' V	++++	++	++ (+)	++ (+)
11-03 V	++++	+	++	++
14-02 V	++++	+	++	++
24-01 VI	++++	+	++ (+)	+++
中位数	++++	+	++	++

[0269] 实施例6

[0270] 中央表位A β 抗体266、15C11和22D12识别PSAPP但不是PDAPP小鼠的未固定切片上的斑块[0271] 为了调查中央表位A β 抗体266、15C11和22D12在hAPP转基因小鼠的切片上的结合，产生下列两种模型的冷冻切片(3只小鼠/基因型，对于每种抗体和染色条件来说1-2个切片/小鼠):PDAPP(纯合小鼠，20月龄)和PSAPP(杂合的;13月龄)。

[0272] 如上面在材料和方法中所述，将切片进行未固定处理。使用IgG时没有观察到信号(未示出)。在非转基因对照小鼠的切片中观察到非特异性背景。

[0273] 2种小鼠模型的额叶皮层的结果被示出在图7中。在所有模型中，3D6浓重地标记斑块。中央表位A β 抗体标记一部分被3D6标记的斑块。这些结果表明，中央表位A β 抗体识别某些小鼠模型例如PSAPP中的斑块。

[0274] 实施例7

[0275] 在AD和PSAPP小鼠中中央表位抗体主要结合于紧密斑

[0276] 为了确定3D6的斑块结合与中央表位A β 抗体的斑块结合之间的重叠,使用3D6与22D12的组合对未固定的AD和PSAPP切片进行荧光双重标记染色。结果被示出在图8A和8B中。

[0277] 结果显示,22D12强烈结合于AD和PSAPP切片中斑块的致密核心。

[0278] 实施例8

[0279] 在离体测定法中中央表位A β 抗体促进来自于PSAPP小鼠而不是PDAPP的切片的A β 斑块的小神经胶质细胞吞噬

[0280] 为了确定中央表位A β 抗体是否能够清除斑块,我们将266、15C11和22D12抗体在离体测定法中使用在来自于PDAPP和PSAPP小鼠的冷冻切片上。

[0281] 如上面在材料和方法中所述,将来自于半脑的切片与A β 抗体(3D6(阳性对照)或266(A β ₁₆₋₂₃)、15C11(A β ₁₈₋₂₂)、22D12(A β ₁₈₋₂₂),都是IgG1同种型)抗体或与同种型匹配的IgG阴性对照和原代鼠类小神经胶质细胞温育。然后将切片用3D6(红色通道)、小神经胶质细胞标志物CD11b(绿色通道)和核染色剂Hoechst(蓝色通道)三重染色。随后,为了确定A β 抗体是否引发斑块清除,使用与Olympus BX61显微镜偶联的Retiga相机(QImaging),使用10x物镜,将来自于整个切片的红色通道信号(3D6,用于斑块)进行数字化扫描。使用Metamorph[®]软件,用黑色和白色将整个切片的图像进行数字化重建,以显示由3D6染色所揭示的斑块信号。这样的实验的结果被示出在图9中。结果显示,在PDAPP小鼠切片中只有阳性对照3D6降低斑块信号,但在PSAPP切片中所有A β 抗体都引起斑块信号的降低,表明中央表位A β 抗体可以在PSAPP但不能在PDAPP小鼠中清除斑块。

[0282] 为了证实小神经胶质细胞吞噬在这些使用中央表位A β 抗体的离体实验中参与清除斑块,随后将切片(使用阴性对照IgG、阳性对照3D6或266抗体)在高倍率(40X物镜)下观察,并同时对所有三个通道(红、绿和蓝)进行成像。结果被示出在图10中。在使用3D6的离体实验后在来自于两种小鼠模型(PDAPP和PSAPP)的切片中观察到A β 的小神经胶质细胞吞噬,但是在使用中央表位抗体266的离体实验后仅在PSAPP小鼠的切片中观察到这种现象。

[0283] 本文中引用的所有参考文献,包括专利、专利申请、杂志文章、网页、登记号等,为所有目的以其全部内容通过参考并入本文,其程度等同于对每个参考文献单独地做出如此指示。本发明的任何步骤、要素、特征、实施方式或方面,可以与任何其他步骤、要素、特征、实施方式或方面组合使用,除非从上下文明显看出不是如此。尽管本发明已结合特定实施方式进行了描述,但它可以进一步修改。本申请旨在覆盖总体上符合本发明原理并包括落于本发明所属领域内的已知或惯常作法之内的相对于本公开的背离的本发明的任何变化、用途或改编,这同样适用于上文中提出的基本特征。

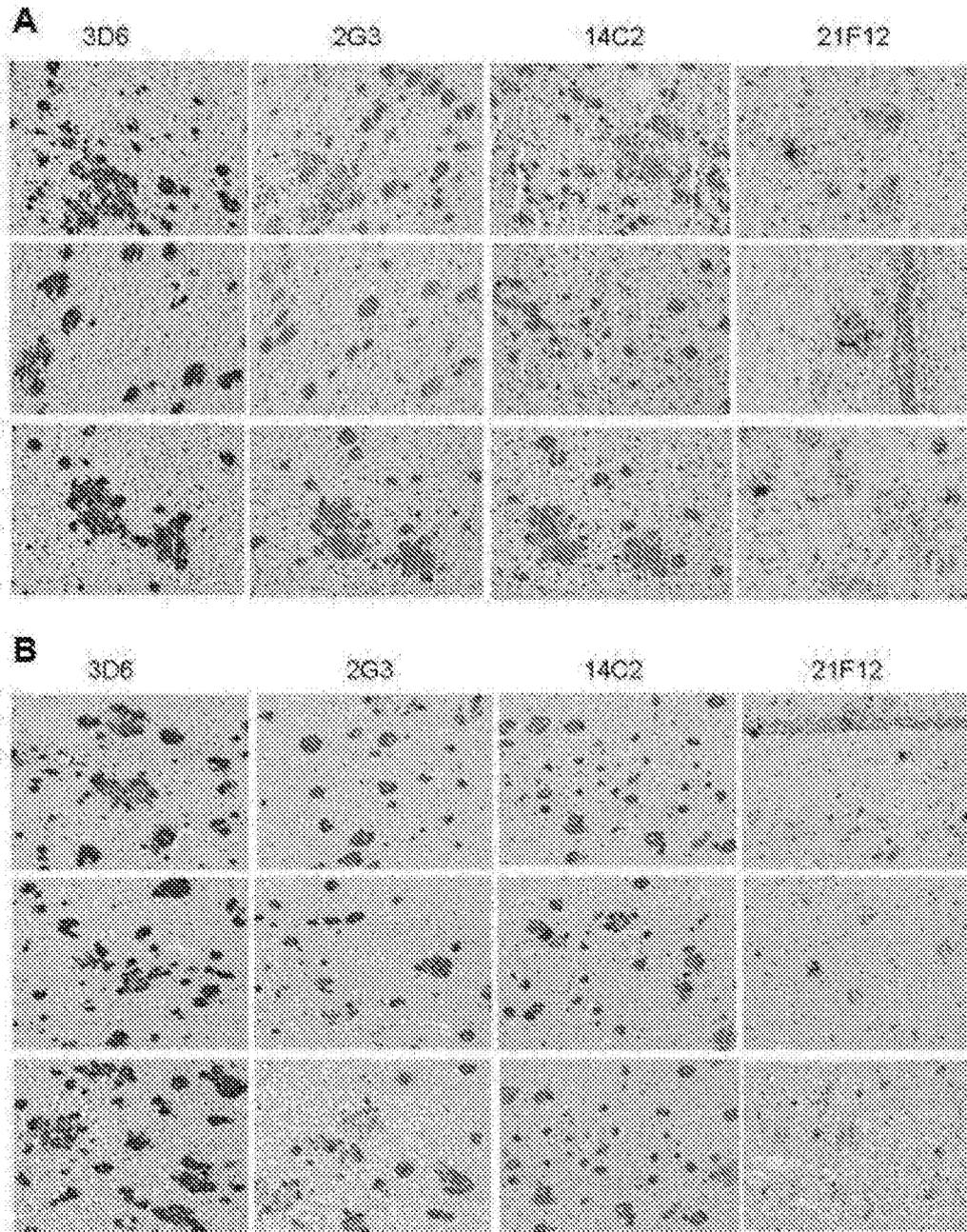


图1

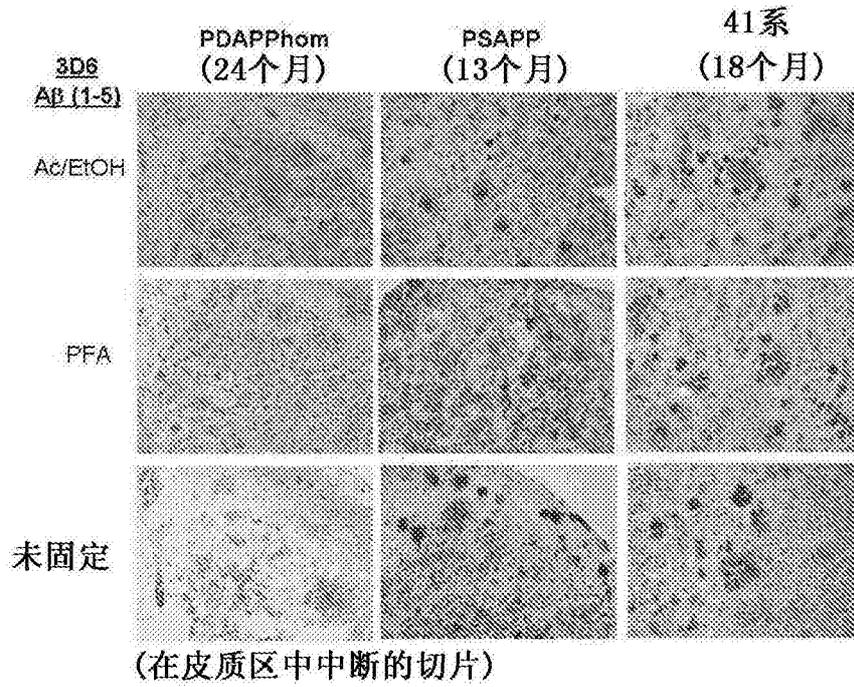


图2A

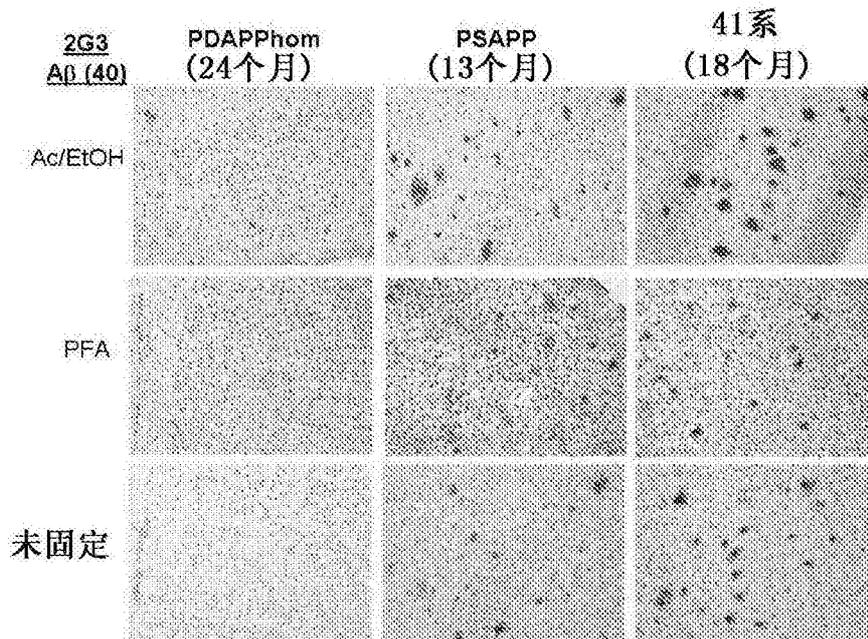


图2B

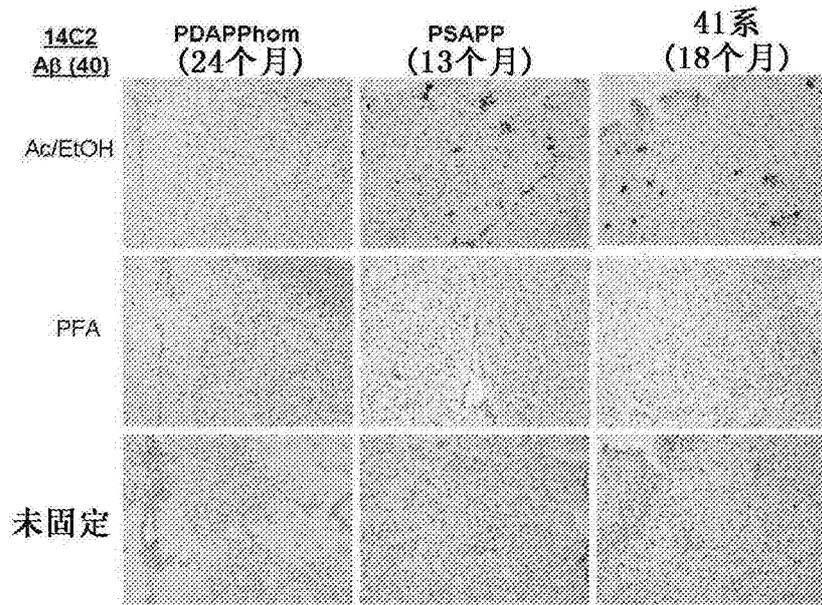


图2C

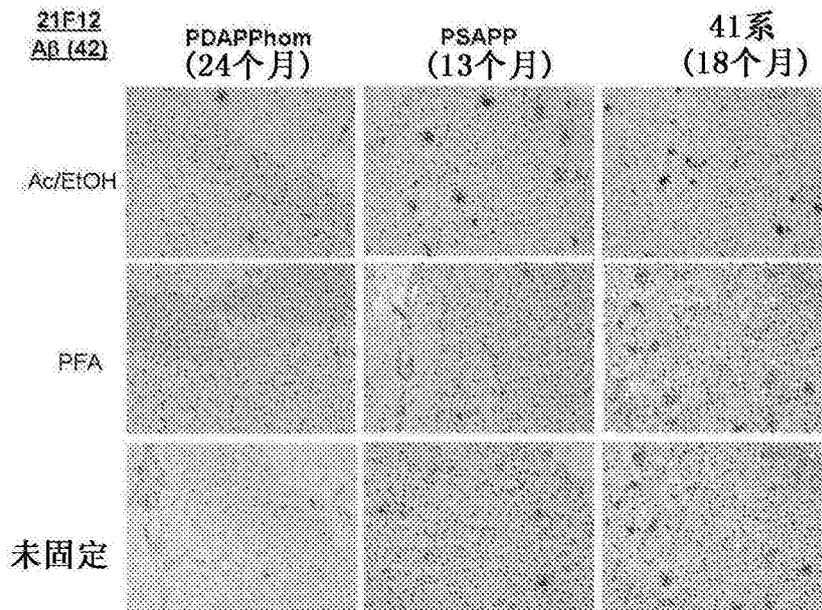


图2D

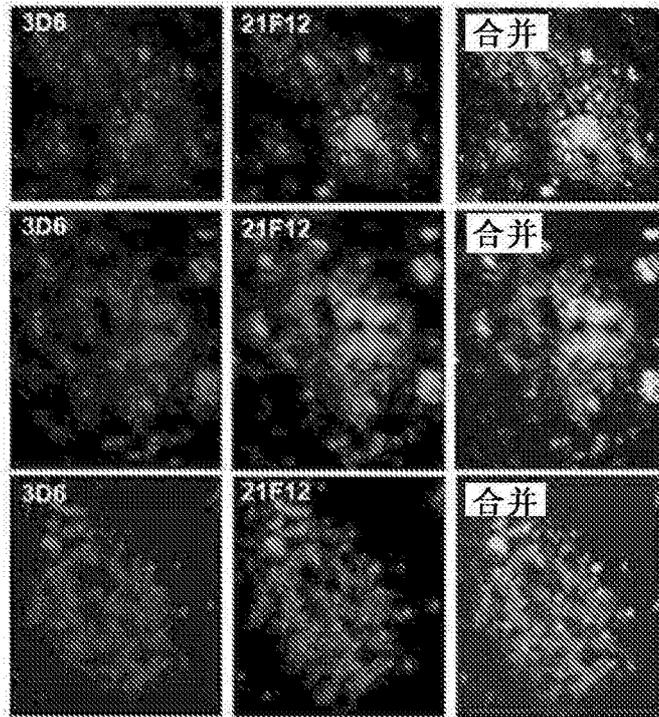


图3A

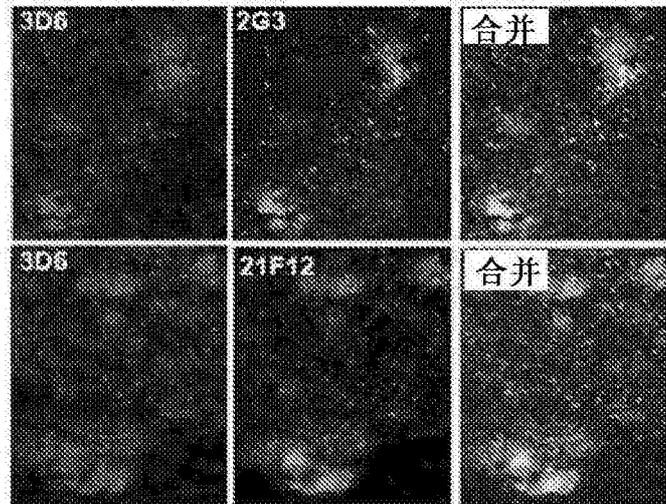


图3B

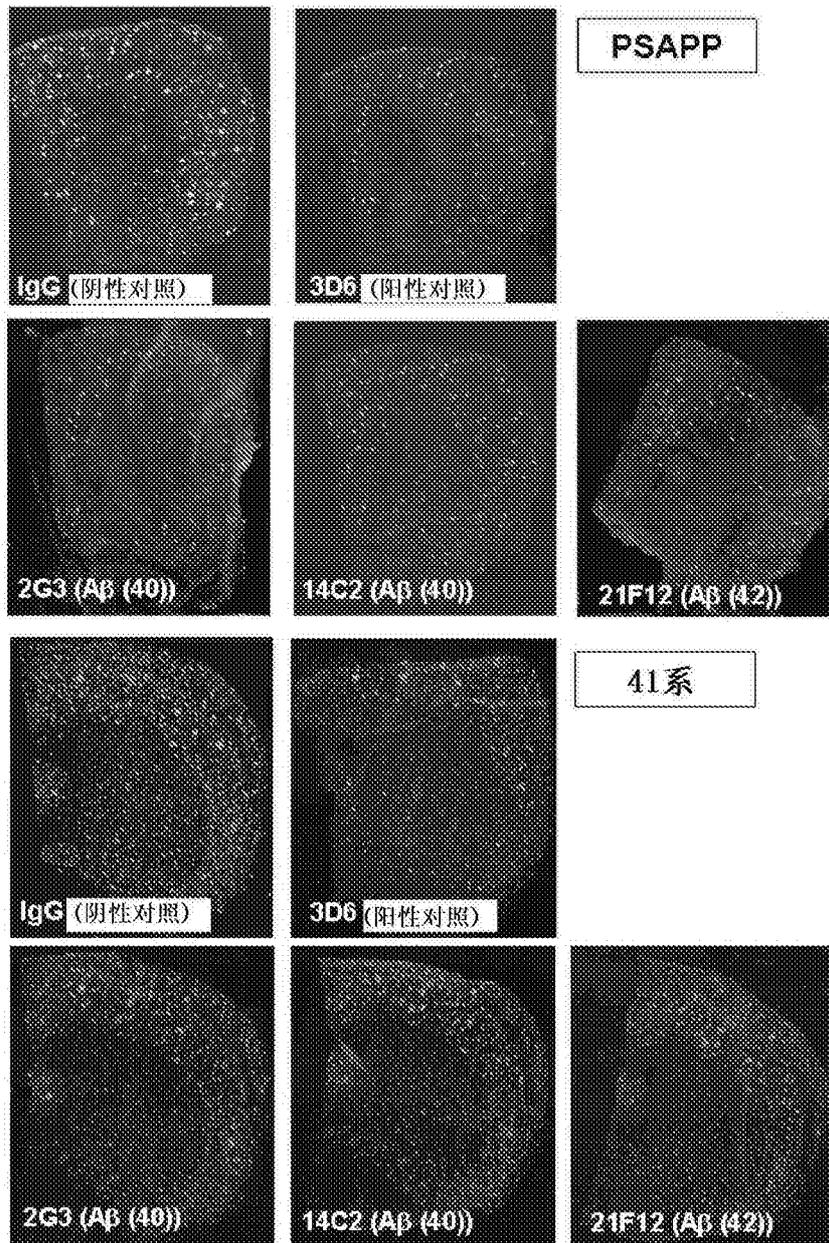


图4A

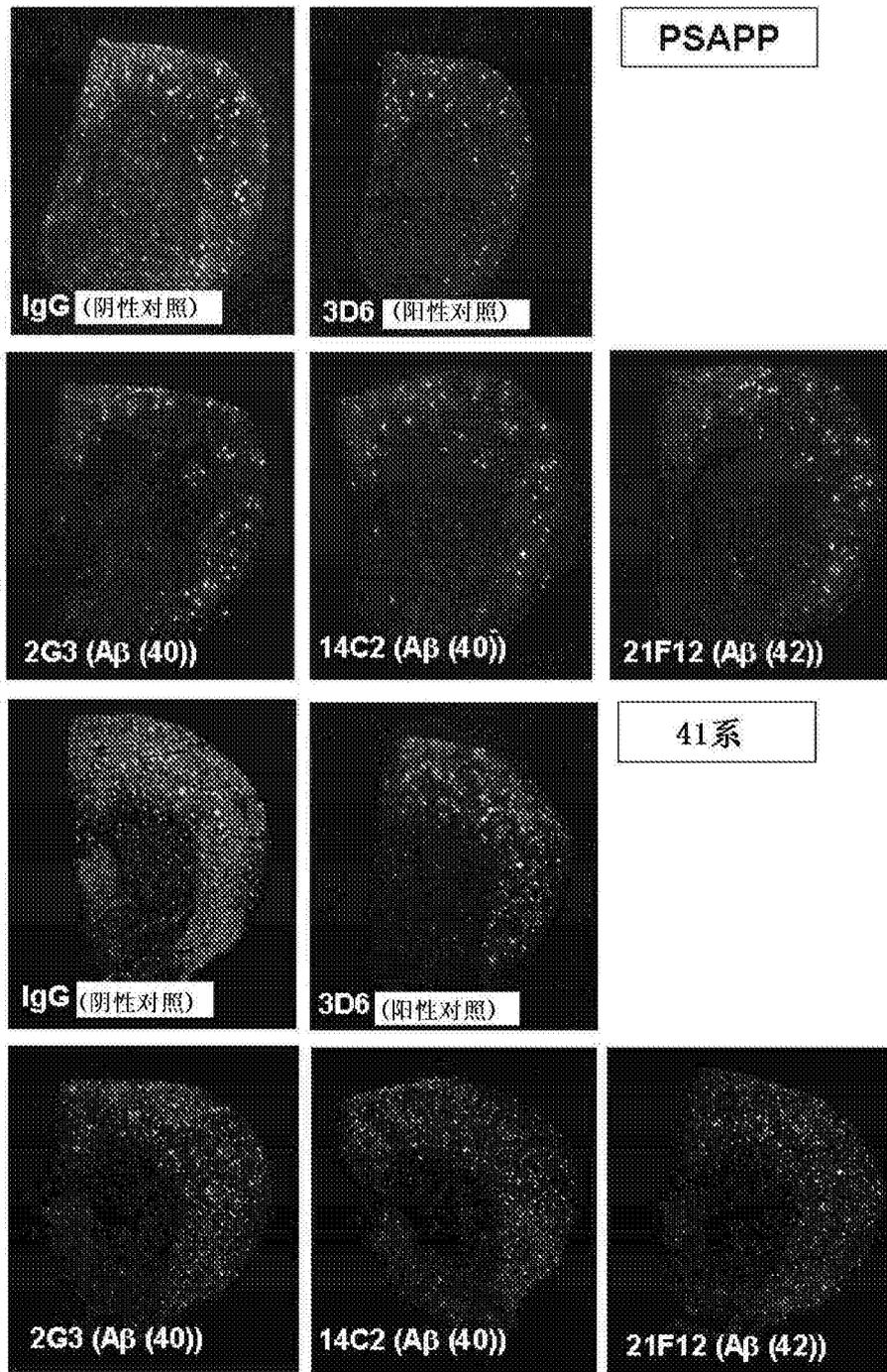


图4B

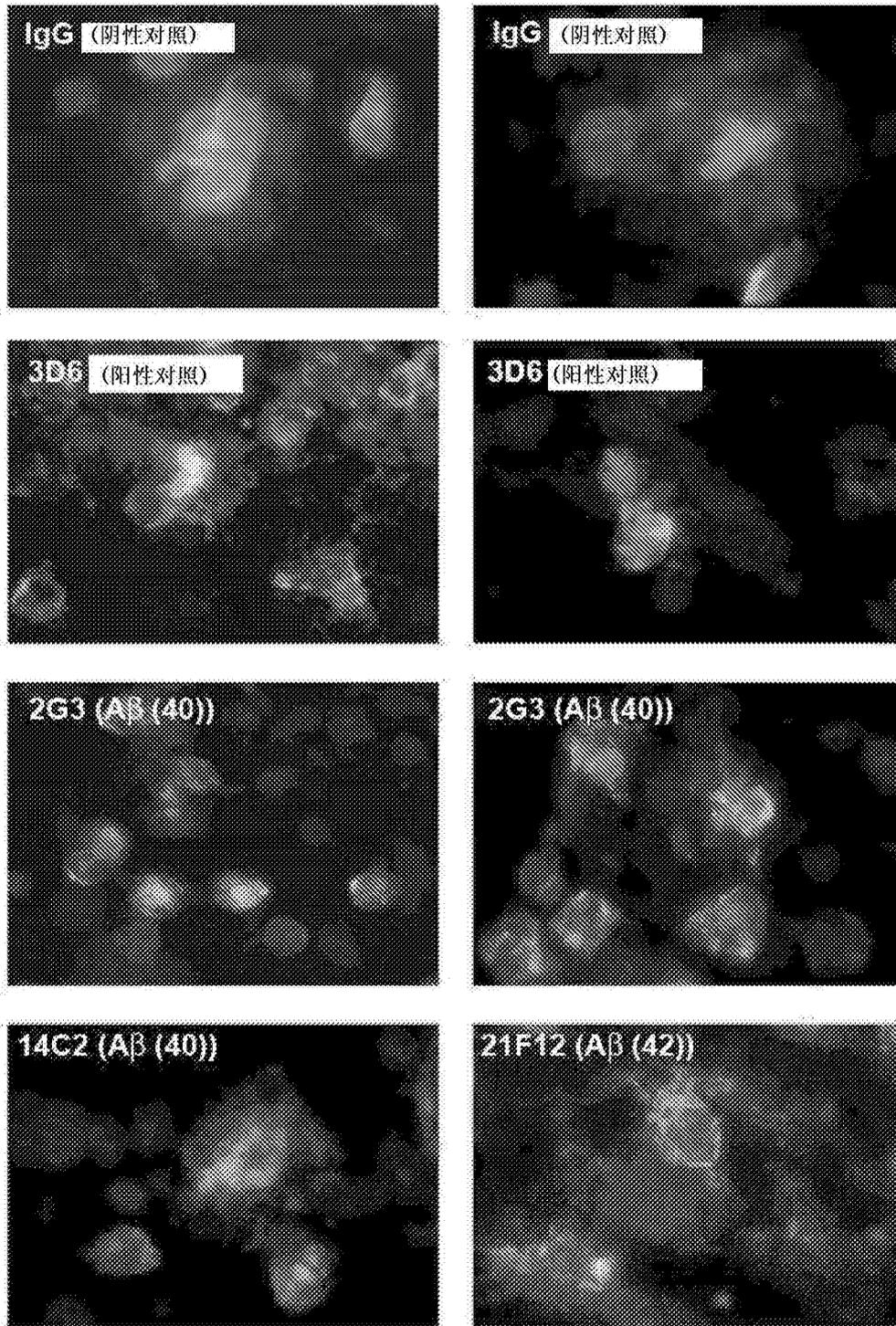


图5

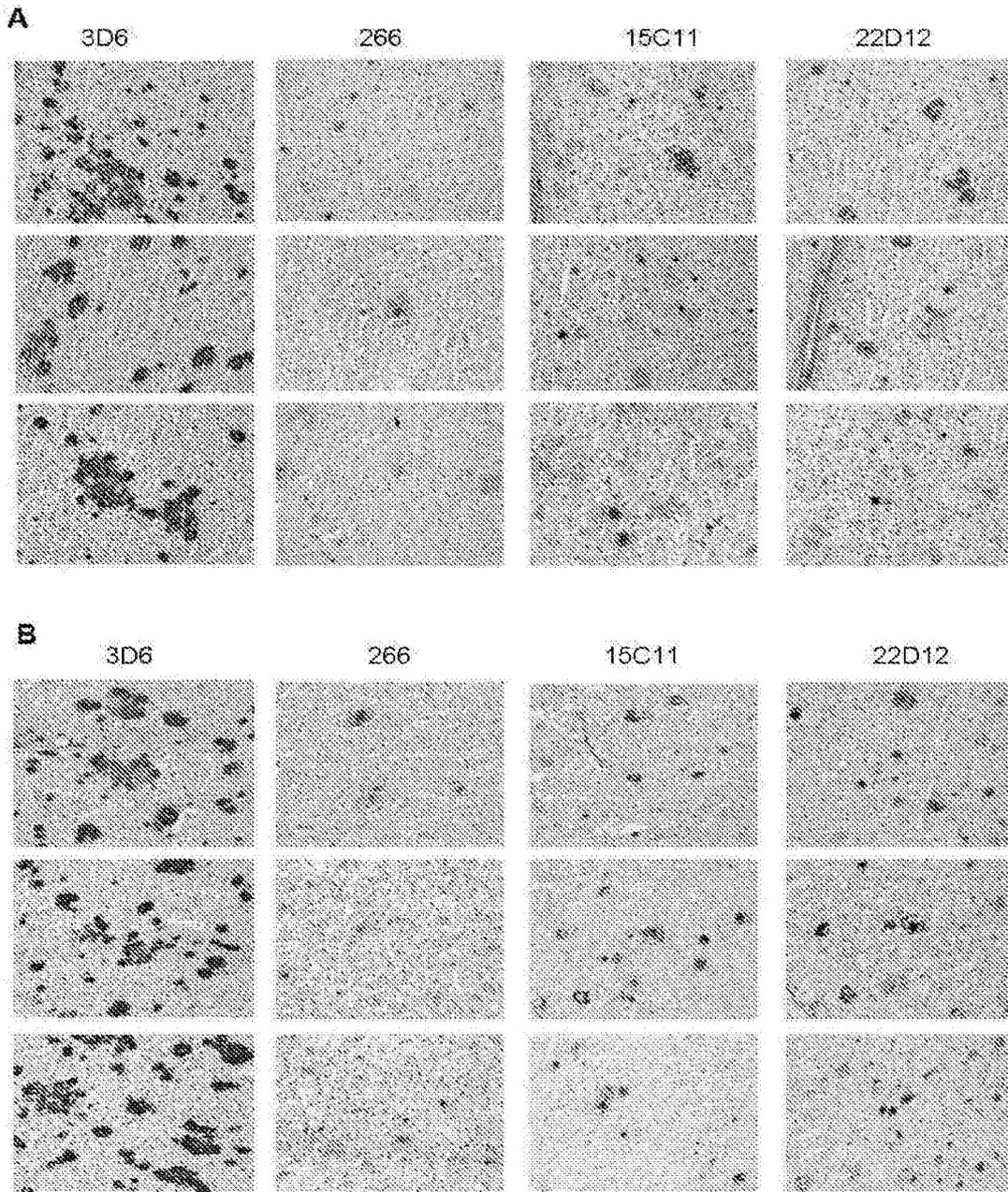


图6

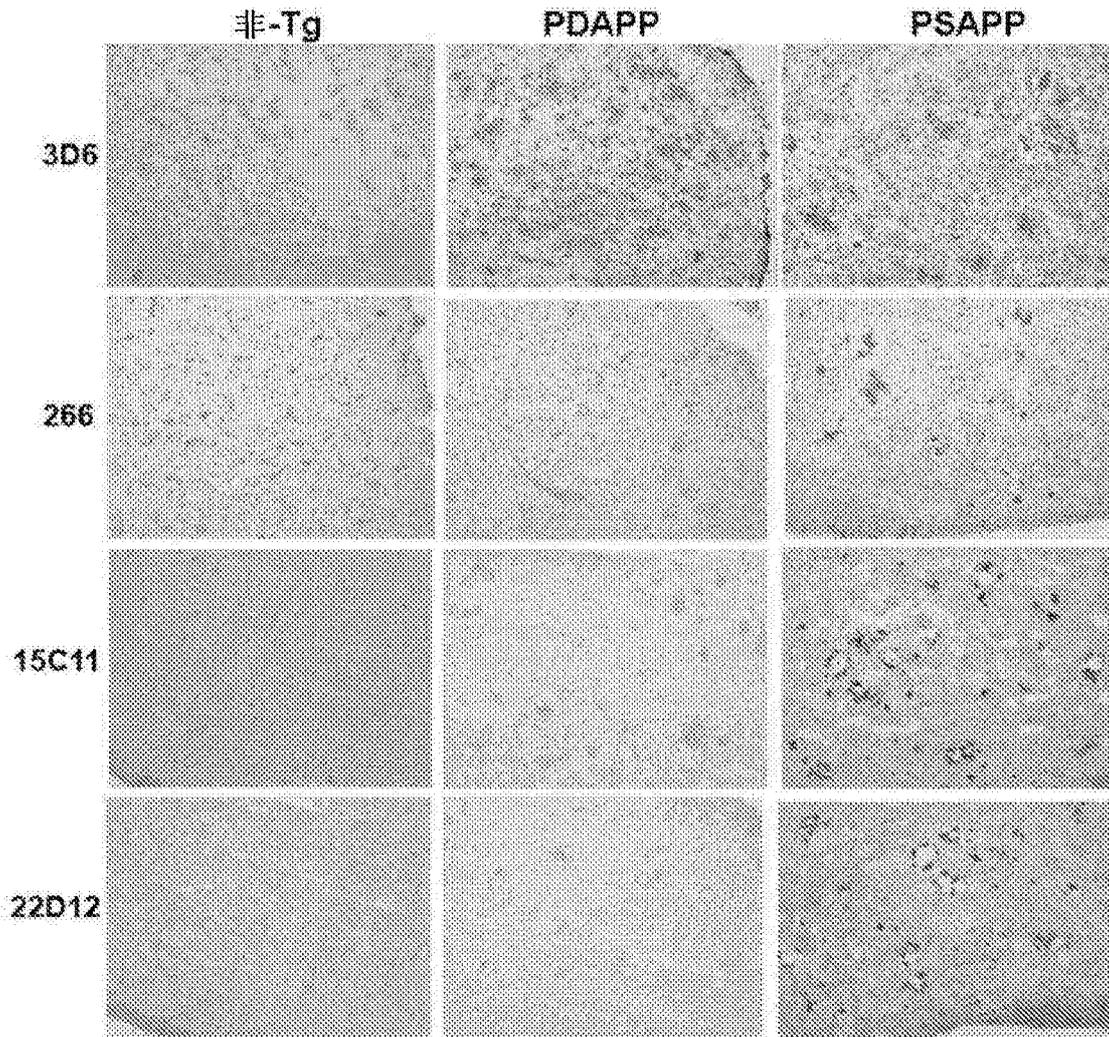


图7

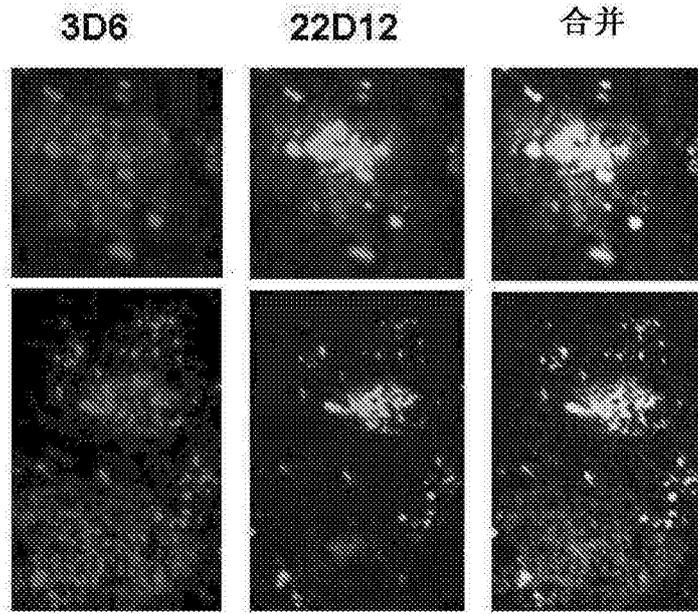


图8A

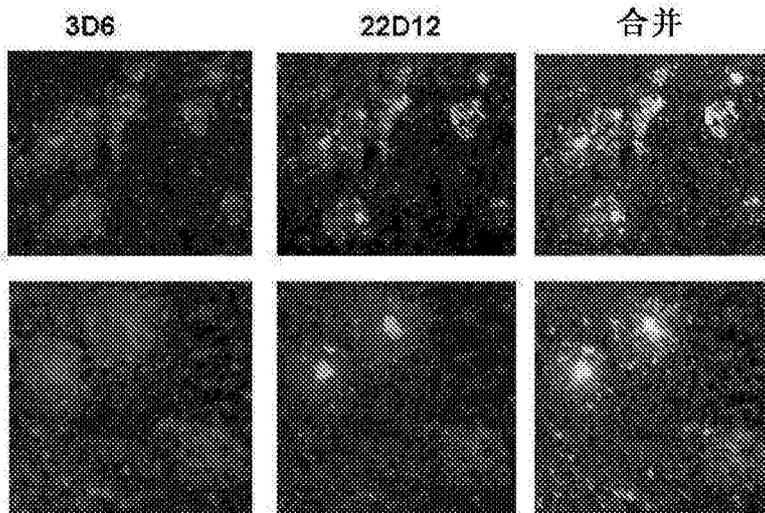


图8B

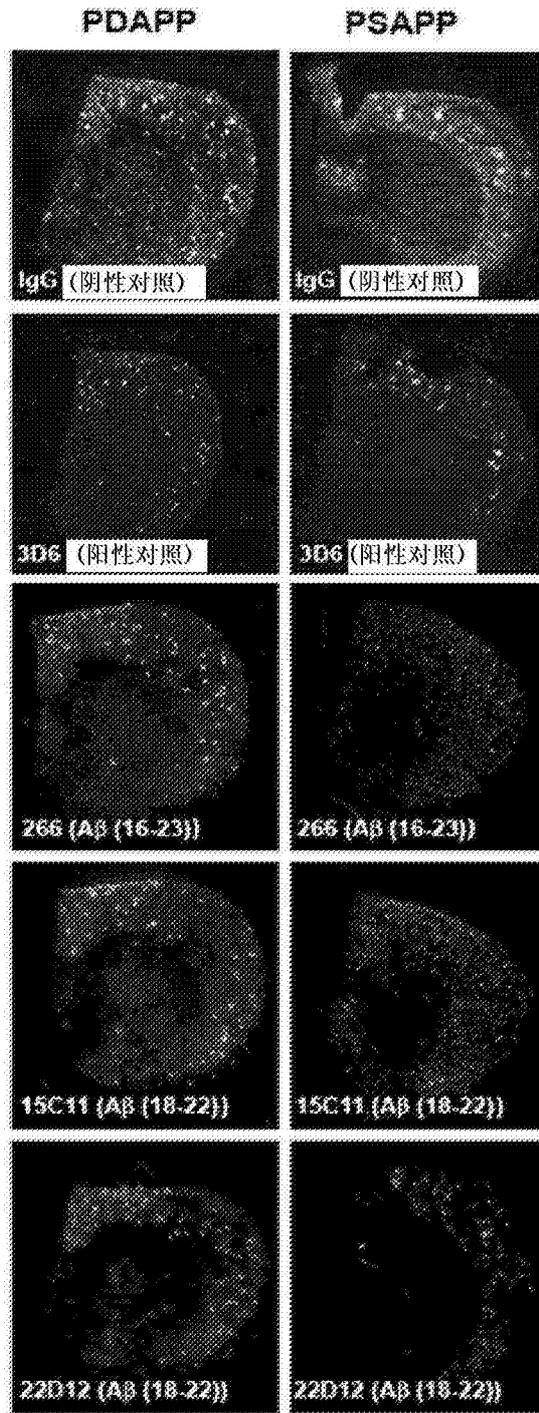


图9

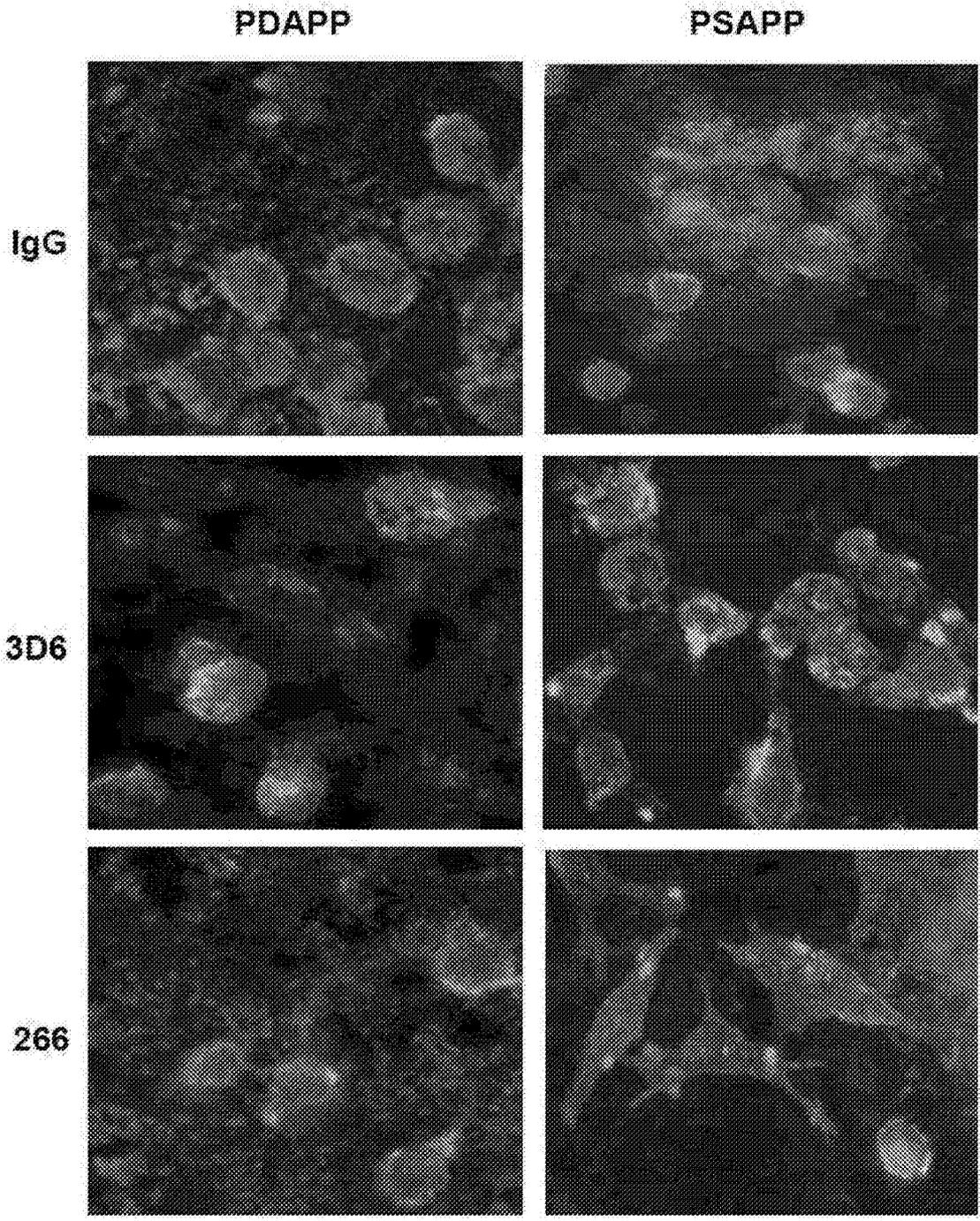


图10