



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105481980 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 13

(21) 申请号	201510940307. 4	(51) Int. Cl.	
(22) 申请日	2009. 07. 10		<i>G07K 16/18</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据			<i>C12N 5/20</i> (2006. 01)
61/082, 309 2008. 07. 21 US			<i>A61K 39/395</i> (2006. 01)
(62) 分案原申请数据			<i>A61P 25/28</i> (2006. 01)
200980132674. 4 2009. 07. 10			<i>G01N 33/68</i> (2006. 01)
			<i>C12R 1/91</i> (2006. 01)
(83) 生物保藏信息			
DSM ACC2923 2008. 06. 17			
DSM ACC2924 2008. 06. 17			
DSM ACC2925 2008. 06. 17			
DSM ACC2926 2008. 06. 17			
(71) 申请人	前体生物药物股份公司		
地址	德国哈雷		
(72) 发明人	H-U · 德穆特 S · 席林		
	M · 克莱因施密特 K · 甘斯		
	A · 赖泽瑙尔 - 绍普 J-U · 拉费尔德		
	S · 肯普弗		
(74) 专利代理机构	永新专利商标代理有限公司		
	72002		
代理人	王健		
		权利要求书2页	说明书33页
		序列表16页	附图7页

(54) 发明名称
诊断抗体测定

(57) 摘要
本发明涉及新诊断测定,其用于诊断淀粉样变,特别是阿尔茨海默病及相关方面。特别地,本发明提供了单克隆抗体及抗体测定。

1. 抗体,特征在于其与A β 肽或其变体结合,优选以高亲和力结合。
2. 权利要求1的抗体,其中所述高亲和力是指解离常数(K_D)值为 10^{-7} M或更好。
3. 权利要求1或2的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。
4. 前述任一项权利要求的抗体,其中所述抗体的轻链的可变部分具有选自SEQ ID NO: 49、53、57和61的核苷酸序列或者选自SEQ ID NO:50、54、58和62的氨基酸序列。
5. 前述任一项权利要求的抗体,其中所述抗体的重链的可变部分具有选自SEQ ID NO: 51、55、59和63的核苷酸序列或者选自SEQ ID NO:52、56、60和64的氨基酸序列。
6. 前述任一项权利要求的抗体,其中所述抗体的轻链的可变部分具有SEQ ID NO:49的核苷酸序列或者SEQ ID NO:50的氨基酸序列,并且其中所述抗体的重链的可变部分具有SEQ ID NO:51的核苷酸序列或者SEQ ID NO:52的氨基酸序列。
7. 前述任一项权利要求的抗体,其中所述抗体的轻链的可变部分具有SEQ ID NO:53的核苷酸序列或者SEQ ID NO:54的氨基酸序列,并且其中所述抗体的重链的可变部分具有SEQ ID NO:55的核苷酸序列或者SEQ ID NO:56的氨基酸序列。
8. 前述任一项权利要求的抗体,其中所述抗体的轻链的可变部分具有SEQ ID NO:57的核苷酸序列或者SEQ ID NO:58的氨基酸序列,并且其中所述抗体的重链的可变部分具有SEQ ID NO:59的核苷酸序列或者SEQ ID NO:60的氨基酸序列。
9. 前述任一项权利要求的抗体,其中所述抗体的轻链的可变部分具有SEQ ID NO:61的核苷酸序列或者SEQ ID NO:62的氨基酸序列,并且其中所述抗体的重链的可变部分具有SEQ ID NO:63的核苷酸序列或者SEQ ID NO:64的氨基酸序列。
10. 前述任一项权利要求的抗体,其中所述抗体选自下组或其功能性变体:
A β 5-5-6(保藏号DSM ACC 2923)
A β 6-1-6(保藏号DSM ACC 2924)
A β 17-4-3(保藏号DSM ACC 2925)
A β 24-2-3(保藏号DSM ACC 2926)。
11. 前述任一项权利要求的抗体,其中所述抗体是A β 6-1-6(保藏号DSM ACC 2924)。
12. 前述任一项权利要求的抗体,其中所述抗体是A β 24-2-3(保藏号DSM ACC 2926)。
13. 前述任一项权利要求的抗体,其中所述抗体是保留高亲和力的人源化或嵌合抗体或者抗体片段。
14. 前述任一项权利要求的抗体,其用于检测A β 肽或其变体。
15. 权利要求14的抗体,其中所述变体选自下组:
pGlu-A β ₃₋₃₈
pGlu-A β ₃₋₄₀
pGlu-A β ₃₋₄₂,及
pGlu-A β _{3-x}变体,
其中x为10至42的整数,优选18至42、更优选30至42的整数。
16. 前述任一项权利要求的抗体,其是人的。
17. 前述任一项权利要求的抗体,其是保留高亲和力的双抗体或单链抗体。
18. 前述任一项权利要求的抗体,其与由权利要求15所定义的抗体结合的表位结合。
19. 前述任一项权利要求的抗体,其具有权利要求15所定义的抗体的互补决定区。

20. 前述任一项权利要求的抗体,其是标记的。
21. 前述任一项权利要求的抗体,其固定在固相上。
22. 抗体,其得自杂交瘤细胞系DSM ACC 2923、DSM ACC 2924、DSM ACC 2925、DSM ACC 2926的任意一种。
23. 组合物,其包含前述任一项权利要求所定义的抗体。
24. 权利要求23的组合物,其用于治疗、预防或者延缓淀粉样变。
25. 权利要求23或24的组合物,其中所述淀粉样变是选自轻度认知障碍、阿尔茨海默病和唐氏综合征中的神经变性的神经变性疾病。
26. 权利要求23或24的组合物,其中所述淀粉样变是散发性阿尔茨海默病或者家族性阿尔茨海默痴呆。
27. 权利要求26的组合物,其中所述家族性阿尔茨海默痴呆是家族性英国型痴呆或者家族性丹麦型痴呆。
28. 杂交瘤细胞系DSM ACC 2923。
29. 杂交瘤细胞系DSM ACC 2924。
30. 杂交瘤细胞系DSM ACC 2925。
31. 杂交瘤细胞系DSM ACC 2926。
32. 权利要求1-22中任一项所定义的抗体或者权利要求23-27中任一项所定义的组合物在诊断或者治疗方法中的用途。
33. 权利要求32的用途,其用于诊断淀粉样变相关疾病或疾病状况。
34. 权利要求33的用途,其中所述淀粉样变是选自轻度认知障碍、阿尔茨海默病和唐氏综合征中的神经变性的神经变性疾病。
35. 权利要求33的用途,其中所述淀粉样变是散发性阿尔茨海默病或者家族性阿尔茨海默痴呆。
36. 权利要求35的用途,其中所述家族性阿尔茨海默痴呆是家族性英国型痴呆或者家族性丹麦型痴呆。
37. 诊断淀粉样变相关疾病或疾病状况,特别是阿尔茨海默病的体外诊断方法,包括如下步骤:
使权利要求1-22中任一项的抗体与疑似患有所述疾病或疾病状况的个体的样品接触,以及
检测所述抗体与来自所述样品的pGlu-淀粉样蛋白、优选pGlu-AB肽的结合。
38. 诊断试剂盒,其包含权利要求1-22中任一项所定义的抗体和使用说明书,以及任选存在的其它生物学活性物质。
39. 权利要求32的诊断试剂盒,其中所述其它生物学物质是谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂。
40. 寡核苷酸,其选自SEQ ID No:23-48。

诊断抗体测定

[0001] 本申请是2009年7月10日提交的题为“诊断抗体测定”的中国专利申请200980132674.4的分案申请。

[0002] 本发明涉及新诊断测定,其用于诊断淀粉样变,这是与淀粉样蛋白相关的一组病症和异常,如阿尔茨海默病及相关方面。本发明特别提供了抗体测定。

[0003] 淀粉样变不是单一的疾病实体,而是一组不同的进行性疾病,特征在于称作淀粉样蛋白的蜡状淀粉样蛋白的细胞外组织沉积,其积聚在一种或多种器官或者机体系统中。随着淀粉样蛋白沉积物的积聚,它们开始干扰所述器官或者机体系统的正常功能。存在至少15种不同类型的淀粉样变。主要形式是无已知先例的原发淀粉样变,一些其它病症之后的继发性淀粉样变,以及遗传性淀粉样变。

[0004] 继发性淀粉样变在慢性感染或炎性疾病期间发生,如结核病、称作家族性地中海热的细菌感染、骨感染(骨髓炎)、类风湿性关节炎、小肠炎(肉芽肿性回肠炎)、霍奇金病和麻风病。

[0005] 淀粉样蛋白沉积物包括淀粉样蛋白P(五边形)组分(AP),其与正常血清淀粉样蛋白P(SAP)相关的糖蛋白;以及硫酸化糖胺聚糖(GAG),其是结缔组织的复合碳水化合物。淀粉样蛋白原纤维占淀粉样材料的大约90%,其包含若干种不同类型蛋白的一种。这些蛋白能折叠成所谓的“ β -折叠”原纤维,这是呈现出导致淀粉样蛋白独特的染色性质的刚果红结合位点的独特蛋白构型。

[0006] 许多衰老性疾病基于或与淀粉样蛋白相关,且部分地特征在于促使发病以及该疾病进展的淀粉样蛋白或淀粉样材料的细胞外积聚的形成。这些疾病包括但不限于神经性病症如轻度认知障碍(MCI),阿尔茨海默病(AD),如散发性阿尔茨海默病(SAD)或者家族性阿尔茨海默痴呆(FAD)如家族性英国型痴呆(FBD)和家族性丹麦型痴呆(FDD),唐氏综合征中的神经变性,卢伊体痴呆,具有淀粉样变的遗传性脑出血(Dutch型);关岛帕金森-痴呆综合征(Guam Parkinson-Dementia complex)。基于或者与淀粉样蛋白相关的其它疾病是进行性核上麻痹、多发性硬化症;克-雅病(Creutzfeldt Jacob disease),帕金森病,HIV-相关痴呆,ALS(肌萎缩侧索硬化症),成人发病型糖尿病;老年性心脏淀粉样变;内分泌性肿瘤及其它疾病,包括黄斑变性。

[0007] 尽管这些疾病的发病机制可能不同,但是它们的特征性沉积物通常含有许多共有的分子组分。这在很大程度上可以归因于促炎途径的局部活化,从而导致激活的补体组分、急性期反应物、免疫调节物及其它炎性介导物的同时沉积(McGeer et al., Tohoku J Exp Med. 174(3):269-277(1994))。

[0008] 最近,越来越多的证据表明阿尔茨海默病涉及N末端修饰的A β 肽变体。针对性活组织检查表明A β 1-40和A β 1-42不仅存在于阿尔茨海默病患者的脑中,也存在于未受影响个体的老年斑中。然而,N-末端截短的和焦谷氨酸修饰的A β N3pE-40/A β N3pE-42几乎只存在于阿尔茨海默病患者的斑中,使得这种A β 变体是适当的诊断标记物和潜在的药物开发靶标。

[0009] 目前一些商业生产厂家提供了ELISA试剂盒,其允许检测低皮克(pg)范围的A β 1-40/1-42和A β N3pE-40/A β N3pE-42。

[0010] 阿尔茨海默病(AD)患者脑的形态学特征是存在神经元纤维缠结以及新皮层脑结构中A β 肽的沉积(Selkoe, D.J. & Schenk, D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 545-584 (2003)). 在被 β -和 γ -分泌酶相继切割后, A β 肽从淀粉样前体蛋白(APP)中释放。 γ -分泌酶切割导致A β 1-40和A β 1-42肽的产生, 它们的C-末端不同且呈现出不同的聚集、原纤维形成及神经毒性效力(Shin, R.W. et al. Amyloid beta-protein(A β)1-40 but not A β 1-42 contributes to the experimental formation of Alzheimer disease amyloid fibrils in rat brain. *J. Neurosci.* 17, 8187-8193 (1997); Iwatsubo, T. et al. Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* 13, 45-53 (1994); Iwatsubo, T., Mann, D.M., Odaka, A., Suzuki, N. & Ihara, Y. Amyloid beta protein (A β) deposition: A β 42(43) precedes A β 40 in Down syndrome. *Ann. Neurol.* 37, 294-299 (1995); Hardy, J.A. & Higgins, G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185 (1992); Roßner, S., Ueberham, U., Schliebs, R., Perez-Polo, J.R. & Bigl, V. The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Prog. Neurobiol.* 56, 541-569 (1998)). 除了C末端可变性之外, N末端修饰的A β 肽是大量的(Saïdo, T.C. et al. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A β N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14, 457-466 (1995); Russo, C. et al. Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. *Nature* 405, 531-532 (2000); Saïdo, T.C., Yamao, H., Iwatsubo, T. & Kawashima, S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett.* 215, 173-176 (1996)). 看起来A β 肽的大部分经历了N末端截短两个氨基酸, 从而暴露谷氨酸残基, 其随后被环化为焦谷氨酸(pE), 这产生A β 3(pE)-42肽(Saïdo, T.C. et al. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A β N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14, 457-466 (1995); Saïdo, T.C., Yamao, H., Iwatsubo, T. & Kawashima, S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett.* 215, 173-176 (1996)). 或者, pE可以在BACE1的 β' -切割之后形成, 从而产生A β N11(pE)-42(Naslund, J. et al. Relative abundance of Alzheimer A β amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8378-8382 (1994); Liu, K. et al. Characterization of A β 11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated A β species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 112, 163-174 (2006)). 特别地, 已经证实A β N3(pE)-42在散发性和家族性阿尔茨海默病(FAD)中是A β 沉积物的主要组分(Saïdo, T.C. et al. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A β N3

(pE), in senile plaques. *Neuron* 14, 457-466 (1995); Miravalle, L. et al. Amino-terminally truncated Abeta peptide species are the main component of cotton wool plaques. *Biochemistry* 44, 10810-10821 (2005)).

[0011] Aβ N3pE-42肽与Aβ 1-40/1-42肽共存(Saido, T.C. et al. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, Abeta N3pE, in senile plaques. *Neuron* 14, 457-466 (1995); Saido, T.C., Yamao, H., Iwatsubo, T. & Kawashima, S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett.* 215, 173-176 (1996)), 并且基于许多观察结果可以在AD的发病机制中起重要作用。例如, 已经概述了Aβ N3pE-42肽的特殊神经毒性(Russo, C. et al. Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AbetaN3(pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J. Neurochem.* 82, 1480-1489 (2002), 以及N-截短的Aβ肽的pE-修饰赋予对大部分氨肽酶及Aβ-降解内肽酶的抗性(Russo, C. et al. Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AbetaN3(pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J. Neurochem.* 82, 1480-1489 (2002); Saido, T.C. Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of beta-amyloid. *Neurobiol. Aging* 19, S69-S75 (1998)). 谷氨酸环化为pE导致N末端电荷丧失, 从而引起与未修饰的Aβ肽相比Aβ N3pE的加速聚集(He, W. & Barrow, C.J. The Abeta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry* 38, 10871-10877 (1999); Schilling, S. et al. On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry* 45, 12393-12399 (2006)). 因此, Aβ N3pE-42形成的减少应使所述肽去稳定, 这通过使它们更易降解及随之防止较高分子量Aβ聚集的形成以及增强神经元存活率而进行的。

[0012] 然而, 长期以来还未知怎样发生Aβ肽的pE-修饰。近年来, 揭示了谷氨酰胺酰基环化酶(QC)在略酸性条件下能催化Aβ N3pE-42形成, 以及特异性QC抑制剂防止Aβ N3pE-42在体外产生(Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M. & Demuth, H.-U. Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett.* 563, 191-196 (2004); Cynis, H. et al. Inhibition of glutaminyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 1618-1625 (2006))。

[0013] 卢伊体痴呆(LBD)是神经变性病症, 其可以在65岁以上的人中发生, 并且通常导致认知(思考)障碍和异常行为改变的症状。症状可包括认知障碍, 神经病征, 睡眠障碍以及自主衰竭。认知障碍在大多数情况中是LBD的代表性特征。患者经常发生逐渐恶化的精神错乱的现象。认知能力的波动通常与注意力和警觉度的改变程度相关。认知障碍和思想波动可以在几分钟、几小时或几天内变化。卢伊体形成自磷酸化和未磷酸化的神经丝蛋白; 它们含有突触蛋白α-突触核蛋白以及泛素, 其参与损伤或异常蛋白的清除。除了卢伊体之外, 也可以存在卢伊神经突, 其是神经细胞的细胞过程中的包涵体。淀粉样斑可以在DLB患者脑中形成, 然而它们的数目比在阿尔茨海默病患者中所观察到的数目少。AD的另一微病理学特点

神经原纤维缠结不是LBD的主要特征,但是除了淀粉样斑之外经常存在。

[0014] 肌萎缩侧索硬化症(ALS)特征在于上和下运动神经元的变性。在一些ALS患者中,可以存在痴呆或失语(ALS-D)。痴呆是最常见的额颞痴呆(FTD),许多这些病例在齿状回和额叶及颞叶浅层神经元中具有泛素阳性、tau-阴性的包涵体。

[0015] 包涵体肌炎(IBM)是致残性疾病,通常在50岁以上的人中发现,其中肌纤维发生炎症并开始萎缩,但是脑不受影响,患者保留其全部智力。发现参与淀粉样 β 蛋白产生的两种酶在这种老年人最常见的晚期肌病患者的肌细胞中增加,其中淀粉样蛋白- β 也增加。

[0016] 基于或者与淀粉样蛋白的积聚和沉积相关的另一疾病是黄斑变性。黄斑变性是常见的眼病,其导致是视网膜(眼后面的极薄组织,其中光敏细胞输送视觉信号至脑)中心区域的黄斑退化。敏锐、清晰、“笔直”视力由黄斑处理形成。黄斑损伤导致产生盲点及模糊或失真的视力。年龄相关性黄斑变性(AMD)在美国是视力障碍的主要因素,并且对于65岁以上的白种人是导致法定盲的主要因素。大约180万年龄为40岁及更大的美国人患有晚期AMD,并且患有中期AMD的另外730万人处于视力丧失的危险中。政府估计到2020年将有290万人患有晚期AMD。通常令人惊奇及沮丧地发现对AMD患者的这种失明状况的原因的了解及治疗很少。

[0017] 存在两种形式黄斑变性:干性黄斑变性和湿性黄斑变性。其中黄斑的细胞缓慢开始破坏的干性形式占诊断的黄斑变性病例的85%。双眼通常均受干性AMD的影响,但是一只眼睛可以丧失视力,而另一只眼睛保持未受影响。玻璃疣是视网膜下的黄色沉积物,其通常是干性AMD的早期迹象。发生晚期干性AMD或湿性AMD的风险随着玻璃疣的数目或大小的增加而增加。干性AMD进展且导致视力丧失而不变成该疾病的湿性形式是可能的;然而,早期干性AMD迅速变成湿性形式也是可能的。

[0018] 湿性形式AMD尽管只占病例的15%,但导致90%的患者失明,并且被认为是晚期AMD(没有早期和中期阶段的湿性AMD)。干性形式的疾病总是先于湿性AMD。随着干性形式的恶化,一些人开始具有黄斑后的异常血管生长。这些血管非常脆弱,并会渗出液体和血液(因此“湿性”黄斑变性),从而导致黄斑的快速损伤。

[0019] 干性形式AMD最初通常导致轻微的视力模糊。特别是视力中心可变得模糊,且这个区域随着疾病的进展而渐渐扩大。如果仅一只眼睛受影响,则无可注意到的症状。在湿性AMD中,直线可出现波浪,且可迅速发生中心视力丧失。

[0020] 黄斑变性的诊断通常包括散瞳眼底检查,视力灵敏度测试及使用称作眼底检查的程序检查眼的背部以帮助诊断AMD,并且如果怀疑是湿性AMD,也可以进行荧光素血管造影术。如果干性AMD达到晚期阶段,目前还没有防止视力丧失的治疗方法。然而,特别的高剂量抗氧化剂和锌配方可延缓或防止中期AMD发展为晚期阶段。**Macugen®**(哌加他尼钠(pegaptanib sodium)注射剂)、激光凝固术和光动力学疗法可以控制黄斑的异常血管生长及出血,这有助于患有湿性AMD的一些人;然而,通过这些技术不能恢复已经丧失的视力。如果视力已经丧失,现有的低视力辅助器可有助于改善生存质量。

[0021] 年龄相关性黄斑变性(AMD)的最早征兆之一是视网膜色素上皮(RPE)的基底层与布鲁赫膜(BM)之间称作玻璃疣的胞外沉积物的积聚。最近Anderson等的研究证实玻璃疣含有淀粉样蛋白 β (Experimental Eye Research 78(2004)243-256)。

[0022] 本发明的目的是建立高灵敏性且同时强力的(robust)检测技术,其使得可以定量

确定诸如液体或血清样品、优选血清样品的生物样品中的A β 变体、特别是pGlu-A β 肽。考虑到A β 肽在血液中的低丰度,这是一个巨大挑战。然而,具有这种检测技术是在药物筛选程序研究中研究小分子抑制剂的效力的前提条件。

[0023] 本发明提供了新的方法和包含高特异性和高有效性抗体的组合物,所述抗体包括嵌合抗体及其片段,包括部分或完全人源化抗体及其片段,其具有特异性识别及结合一系列 β -淀粉样蛋白抗原、特别是pGlu-A β 肽的特异性表位的能力,所述抗原可以单体、二聚体、三聚体等形式或聚合物形式,集合物(aggregate)、纤维、丝的形式或者斑的浓缩形式呈递给抗体。本发明教导的抗体特别用于诊断淀粉样变,该淀粉样变是一组与淀粉样斑形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉样变和年龄相关性淀粉样变,包括但不限于神经性病症如阿尔茨海默病(AD),卢伊体痴呆,唐氏综合征,具有淀粉样变的遗传性脑出血(Dutch型);关岛帕金森-痴呆综合征;以及基于或者与淀粉样蛋白相关的其它疾病,如进行性核上麻痹,多发性硬化症;克-雅病,具有淀粉样变的遗传性脑出血(Dutch型),帕金森病,HIV-相关痴呆,ALS(肌萎缩侧索硬化症),成人发病型糖尿病;老年性心脏淀粉样变;内分泌性肿瘤及其它疾病,包括黄斑变性等等。

[0024] 为了满足上述所有需求,特别优选基于ELISA的技术。使用A β N3pE ELISA开始研究,因为对于这种A β 变体,已经可以商购ELISA系统(Human Amyloid β (N3pE)Assay Kit-IBL,Code No.27716),其用作参考和内部质量对照。A β N3pE-40肽的捕获使用TGC的hA β (x-40)ELISA(HS)进行(The Genetics Company,Inc.,Wagistrasse 23,8952 Schlieren,Zurich area Switzerland),其应当便于和加速开发过程。

[0025] 发明概述

[0026] 本发明特别涉及抗体或其变体,特征在于其以高亲和力与A β -肽结合。所述高亲和力在本发明中是指亲和力K_d值为10⁻⁷M或更好,优选K_d值为10⁻⁸M或更好,甚至更优选K_d值为10⁻⁹M-10⁻¹²M。

[0027] 特别地,所述抗体优选为单克隆抗体,并选自以下组:

[0028] A β 5-5-6

[0029] A β 6-1-6

[0030] A β 17-4-3

[0031] A β 24-2-3

[0032] 本发明的抗体可特别用于诊断方法以检测淀粉样变,特别是阿尔茨海默病。

[0033] 附图描述

[0034] 图1

[0035] A)通过增加pGlu-6166抗体(克隆12-1)的浓度检测10ng/ml淀粉样蛋白 β N3pE-40。

[0036] B)确定检测10ng/ml淀粉样蛋白 β N3pE-40所需的pGlu-6166抗体(克隆12-1)的最高浓度。

[0037] 图2

[0038] 各个IgG产生克隆的杂交瘤细胞培养上清的斑点印迹分析。

[0039] 图3

- [0040] pGlu-6166杂交瘤细胞克隆和IBL- $\text{A}\beta$ N3pE抗体的PepSpot分析。
- [0041] 图4
- [0042] 20 μg pGlu-6166抗体和杂交瘤细胞培养上清的12%SDS-PAGE。
- [0043] 图5
- [0044] 杂交瘤细胞培养上清的Biacore分析。图示了监测的结合过程的叠加。
- [0045] 图6
- [0046] 抗-ABN3pE抗体克隆6-1-6与 $\text{A}\beta\text{pE3-40}$ 相互作用的传感图。
- [0047] 图7
- [0048] 抗-ABN3pE抗体克隆24-2-3与 $\text{A}\beta\text{pE3-40}$ 相互作用的传感图。
- [0049] 图8
- [0050] 克隆6-1-6的N3pE-ELISA, $\text{A}\beta\text{pE3-40}$ 的标准曲线。
- [0051] 图9
- [0052] N3pE抗体克隆6-1-6的传感图。
- [0053] 图10
- [0054] 利用以下方法的 $\text{A}\beta\text{pE3-42}$ 定量:1:20稀释于EIA缓冲液,用860 μl 3.5M Tris进行pH滴定的中和。
- [0055] 图11
- [0056] 阿尔茨海默病(AD)患者的染色脑切片。
- [0057] (A)用识别总 $\text{A}\beta$ 的抗- $\text{A}\beta$ 抗体6E10染色的散发性AD(SAD)患者的脑,
- [0058] (B)用识别 $\text{A}\beta\text{pE3-x}$ 的N3pE抗体克隆24-2-3染色的散发性AD(SAD)患者的脑,
- [0059] (C)用识别 $\text{A}\beta\text{pE3-x}$ 的N3pE抗体克隆24-2-3染色的家族性AD(FAD)患者的脑。
- [0060] 发明详述
- [0061] 定义
- [0062] 术语“抗体”以其最广泛的含义使用,并且特别包括完整的单克隆抗体、多克隆抗体、从至少两个完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)以及抗体片段(只要它们呈现出期望的生物学活性)。抗体可以是IgM、IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgD、IgA或IgE。然而,优选所述抗体不是IgM抗体。
- [0063] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,通常是完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段:双抗体、单链抗体分子以及从抗体片段形成的多特异性抗体。
- [0064] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指得自一群基本均质的抗体的抗体,即该群包含的各个抗体除了可能少量天然存在的突变之外是相同的。单克隆抗体对于单一抗原性位点是高度特异性的。此外,与通常包含不同决定簇(表位)的不同抗体的“多克隆抗体”制备物相反,每个单克隆抗体只针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性之外,单克隆抗体通常的有利之处是它们通过杂交瘤培养合成,未被其它免疫球蛋白污染。“单克隆”是指抗体的特性,其得自基本均质的抗体群,不应理解为需要通过任何特殊方法来产生抗体。例如,本发明中使用的单克隆抗体可以通过首先由Köhler et al., Nature, 256:495(1975)所述的杂交瘤方法产生,或者可以通过通常已知的重组DNA方法产生。“单克隆抗体”也可以分离自噬菌体抗体文库,使用如Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991)和Marks et

al., J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)所述的技术。

[0065] 本文的单克隆抗体特别包括嵌合抗体(免疫球蛋白),其中一部分重链和/或轻链与衍生自特定物种的抗体或者属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或者同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种的抗体或者属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或者同源;以及这样的抗体的片段,只要它们呈现出期望的生物学活性。

[0066] “人源化”形式的非人(例如鼠)抗体是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或者抗体的其它抗原结合子序列),其含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体的大部分是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基由具有期望的特异性、亲和力和能力(capacity)的非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基代替。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv构架区(FR)残基由相应的非人残基代替。此外,人源化抗体可包含这样的残基,其在受体抗体及引入的CDR或构架序列中均未发现。

[0067] 进行这些修饰以进一步精制和优化抗体的性能。通常,人源化抗体包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些区域,并且所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白序列的那些区域。人源化抗体最优选还包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常为人免疫球蛋白的恒定区。进一步的细节参见Jones et al., Nature, 321:522-525(1986), Reichmann et al., Nature, 332:323-329(1988)及Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992)。人源化抗体包括PrimatizedTM抗体,其中所述抗体的抗原结合区源自通过用所关注的抗原免疫恒河猴而产生的抗体。

[0068] “单链Fv”或“sFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于单多肽链中。通常地,Fv多肽还包含V_H与V_L结构域之间的多肽连接物(linker),这使得sFv形成抗原结合所期望的结构。关于sFv的综述见Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994)。

[0069] 术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含在相同多肽链中与轻链可变结构域(V_D)连接的重链可变结构域(V_H)(V_H-V_D)。通过使用过短而不允许在相同链上两个结构域之间配对的连接物,迫使结构域与另一链的互补结构域配对,并产生两个抗原结合位点。双抗体在Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993)中得以更充分描述。

[0070] “分离的”抗体是已经鉴定并从其天然环境的组分中分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染组分是干扰抗体的诊断或治疗用途的材料,并且可以包括酶、激素及其它蛋白质或非蛋白质溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化为:(1)通过劳里(Lowry)方法确定为大于95重量%的抗体,最优选大于99重量%;(2)通过使用旋杯测序仪足以以获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或者(3)通过还原或非还原条件SDS-PAGE使用考马斯蓝或优选银染纯化的均一性。分离的抗体包括重组细胞内原位抗体,因为不存在抗体天然环境的至少一种成分。然而,通常分离的抗体通过至少一个纯化步骤来制备。

[0071] 如本文所用,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,并且所有这些名称均包括后代。因此,词语“转化体”和“转化的细胞”包括初始的对象细胞及从其衍生的培

养物而不论转移的数目。还应当理解,由于有意或无意的突变所致所有后代的DNA含量可以不完全相同。本发明包括经筛选与原始转化的细胞具有相同功能或生物学活性的突变体后代。在使用不同名称的情况下,从上下文可明了。

[0072] 如本文所用,术语“多肽”、“肽”和“蛋白”可互换使用,是指由通过肽键连接的氨基酸组成的生物分子。

[0073] 如本文所用,术语“一个(a)”、“一个(an)”及“这个(the)”是指“一个或多个”,并且包括复数形式,除非在上下文中是不适合的。

[0074] 表述“由淀粉样蛋白或淀粉状蛋白导致或者与其相关的疾病和病症”包括但不限于由单体、原纤维或多聚体状态或者这者的任意组合形式的淀粉样蛋白的存在或活性导致的疾病和病症。这样的疾病和病症包括但不限于淀粉样变、内分泌肿瘤以及黄斑变性。

[0075] 术语“淀粉样变”是指一组与淀粉样斑形成相关的疾病和病症,包括但不限于继发性淀粉样变和年龄相关性淀粉样变,例如这样的疾病,包括但不限于神经性病症如阿尔茨海默病(AD),包括特征在于认知记忆能力丧失的疾病或疾病状况(condition),如轻度认知障碍(MCI),散发性阿尔茨海默病,卢伊体痴呆,唐氏综合征,具有淀粉样变的遗传性脑出血(Dutch型);关岛帕金森-痴呆综合征,家族形式的阿尔茨海默病如家族性英国型痴呆(FBD)和家族性丹麦型痴呆(FDD);以及基于或者与淀粉样蛋白相关的其它疾病,如进行性核上麻痹,多发性硬化症;克-雅病,帕金森病,HIV-相关痴呆,ALS(肌萎缩侧索硬化症),包涵体肌炎(IBM),成人发病型糖尿病和老年性心脏淀粉样变;以及各种眼病,包括黄斑变性、玻璃疣相关的视神经病变及由于 β -淀粉样蛋白沉积所致的白内障。

[0076] “淀粉样蛋白 β 、A β 或 β -淀粉样蛋白”是本领域公认的术语,并且指淀粉样 β 蛋白和肽、淀粉样 β 前体蛋白(APP)及其修饰、片段和任何功能等同物。特别地,如本文所用,淀粉样蛋白 β 是指通过APP的蛋白酶剪切所产生的任何片段,但特别是涉及或者与淀粉样蛋白病理学相关的那些片段,包括但不限于A β ₁₋₃₈、A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂。这些A β 肽的氨基酸序列如下所示:

[0077] A β 1-42(SEQ ID NO.1):

[0078] 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

[0079] A β 1-40(SEQ ID NO.2):

[0080] 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

[0081] A β 1-38(SEQ ID NO.3):

[0082] 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

[0083] “pGlu-A β ”或“A β N3pE”是指N末端截短形式的A β ,其在A β 的氨基酸序列的第3位的谷氨酸残基开始,其中所述谷氨酸残基被环化形成焦谷氨酸残基。特别地,如本文所用,pGlu-A β 是指涉及或者与淀粉样蛋白病理学相关的那些片段,包括但不限于pGlu-A β ₃₋₃₈、pGlu-A β ₃₋₄₀、p-Glu-A β ₃₋₄₂。

[0084] N末端截短的形式AB、AB₃₋₃₈、AB₃₋₄₀、AB₃₋₄₂的序列如下所示：

[0085] AB 3-42(SEQ ID NO.4)：

[0086] 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

[0087] AB 3-40(SEQ ID NO.5)：

[0088] 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

[0089] AB 3-38(SEQ ID NO.6)：

[0090] 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

[0091] 特别地，本发明涉及如下项：

[0092] 1. 抗体，特征在于其与AB肽或其变体结合，优选以高亲和力和力结合。

[0093] 2. 项1的抗体，其中所述高亲和力是指解离常数(K_D)为10⁻⁷M或更好。

[0094] 3. 项1或2的抗体，其中所述抗体是单克隆抗体。

[0095] 4. 前述任一项的抗体，其中所述抗体的轻链的可变部分具有选自SEQ ID NO:49、53、57和61的核苷酸序列或者选自SEQ ID NO:50、54、58和62的氨基酸序列。

[0096] 5. 前述任一项的抗体，其中所述抗体的重链的可变部分具有选自SEQ ID NO:51、55、59和63的核苷酸序列或者选自SEQ ID NO:52、56、60和64的氨基酸序列。

[0097] 6. 前述任一项的抗体，其中所述抗体的轻链的可变部分具有SEQ ID NO:49的核苷酸序列或者SEQ ID NO:50的氨基酸序列，并且其中所述抗体的重链的可变部分具有SEQ ID NO:51的核苷酸序列或者SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

[0098] 7. 前述任一项的抗体，其中所述抗体的轻链的可变部分具有SEQ ID NO:53的核苷酸序列或者SEQ ID NO:54的氨基酸序列，并且其中所述抗体的重链的可变部分具有SEQ ID NO:55的核苷酸序列或者SEQ ID NO:56的氨基酸序列。

[0099] 8. 前述任一项的抗体，其中所述抗体的轻链的可变部分具有SEQ ID NO:57的核苷酸序列或者SEQ ID NO:58的氨基酸序列，并且其中所述抗体的重链的可变部分具有SEQ ID NO:59的核苷酸序列或者SEQ ID NO:60的氨基酸序列。

[0100] 9. 前述任一项的抗体，其中所述抗体的轻链的可变部分具有SEQ ID NO:61的核苷酸序列或者SEQ ID NO:62的氨基酸序列，并且其中所述抗体的重链的可变部分具有SEQ ID NO:63的核苷酸序列或者SEQ ID NO:64的氨基酸序列。

[0101] 10. 前述任一项的抗体，其中所述抗体选自以下组或其功能性变体：

[0102] AB 5-5-6(保藏号DSM ACC 2923)

[0103] AB 6-1-6(保藏号DSM ACC 2924)

[0104] AB 17-4-3(保藏号DSM ACC 2925)

[0105] AB 24-2-3(保藏号DSM ACC 2926)。

[0106] 11. 前述任一项的抗体，其中所述抗体是AB 6-1-6(保藏号DSM ACC 2924)。

[0107] 12. 前述任一项的抗体，其中所述抗体是AB 24-2-3(保藏号DSM ACC 2926)。

- [0108] 13. 前述任一项的抗体, 其中所述抗体是保留高亲和力的人源化或嵌合抗体或者抗体片段。
- [0109] 14. 前述任一项的抗体, 其用于检测A β 肽或其变体。
- [0110] 15. 项14的抗体, 其中所述变体选自下组:
- [0111] pGlu-A β ₃₋₃₈
- [0112] pGlu-A β ₃₋₄₀
- [0113] pGlu-A β ₃₋₄₂, 及
- [0114] pGlu-A β _{3-x}变体,
- [0115] 其中x为10至42的整数, 优选18至42、更优选30至42的整数。
- [0116] 16. 前述任一项的抗体, 其是人的。
- [0117] 17. 前述任一项的抗体, 其是保留高亲和力的双抗体或单链抗体。
- [0118] 18. 前述任一项的抗体, 其与由项15所定义的抗体结合的表位结合。
- [0119] 19. 前述任一项的抗体, 其具有项15所定义的抗体的互补决定区。
- [0120] 20. 前述任一项的抗体, 其是标记的。
- [0121] 21. 前述任一项的抗体, 其固定在固相上。
- [0122] 22. 抗体, 其可得自杂交瘤细胞系DSM ACC 2923、DSM ACC 2924、DSM ACC 2925、DSM ACC 2926的任意一种。
- [0123] 23. 组合物, 其包含前述任一项的抗体。
- [0124] 24. 项23的组合物, 其用于治疗、预防或延缓淀粉样变。
- [0125] 25. 项23或24的组合物, 其中所述淀粉样变是选自轻度认知障碍、阿尔茨海默病和唐氏综合征中神经变性的神经变性疾病。
- [0126] 26. 项23或24的组合物, 其中所述淀粉样变是散发性阿尔茨海默病或者家族性阿尔茨海默痴呆。
- [0127] 27. 项26的组合物, 其中所述家族性阿尔茨海默痴呆是家族性英国型痴呆或者家族性丹麦型痴呆。
- [0128] 28. 杂交瘤细胞系DSM ACC 2923。
- [0129] 29. 杂交瘤细胞系DSM ACC 2924。
- [0130] 30. 杂交瘤细胞系DSM ACC 2925。
- [0131] 31. 杂交瘤细胞系DSM ACC 2926。
- [0132] 32. 项1-22中任一项所定义的抗体或项23-27中任一项所定义的组合物在诊断或治疗方法中的用途。
- [0133] 33. 项32的用途, 其用于诊断淀粉样变相关(amyloid-associated)疾病或疾病状况。
- [0134] 34. 项33的用途, 其中所述淀粉样变是选自轻度认知障碍、阿尔茨海默病和唐氏综合征中的神经变性的神经变性疾病。
- [0135] 35. 项33的用途, 其中所述淀粉样变是散发性阿尔茨海默病或者家族性阿尔茨海默痴呆。
- [0136] 36. 项35的用途, 其中所述家族性阿尔茨海默痴呆是家族性英国型痴呆或者家族性丹麦型痴呆。

[0137] 37. 诊断淀粉样变相关疾病或疾病状况,特别是阿尔茨海默病的体外诊断方法,包括如下步骤:

[0138] 使项1至22中任一项的抗体与疑似患有所述疾病或疾病状况的个体的样品接触,以及

[0139] 检测所述抗体与来自所述样品的pGlu-淀粉样蛋白、优选pGlu-A β 肽的结合。

[0140] 38. 诊断试剂盒,其包含项1至22中任一项所定义的抗体和使用说明书,以及任选存在的其它生物学活性物质。

[0141] 39. 项32的诊断试剂盒,其中所述其它生物学物质是谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂。

[0142] 40. 寡核苷酸,其选自SEQ ID No:23-48。

[0143] 本发明的抗体可用于诊断淀粉样变。

[0144] 本发明的抗体可用作亲和力纯化剂。在这种方法中,使用本领域已知的方法将抗体固定在固相如Sephadex树脂或滤纸上。使固定的抗体与含有要纯化的A β -肽(或其片段)的样品接触,然后用合适的溶剂洗涤该支持物,这会基本上除去样品中除了与固定的抗体结合的A β -肽之外的所有材料。最后,用另一合适溶剂洗涤该支持物,所述另一合适溶剂如pH 5.0的甘氨酸缓冲液,其会从抗体中释放A β 肽。

[0145] 抗-A β -肽抗体也可用于A β -肽的诊断测定,例如检测其在特定细胞、组织或血清中的出现。因此,所述抗体可用于淀粉样变的诊断,特别是选自如下的神经变性疾病:轻度认知障碍(MCI),阿尔茨海默病(AD),如散发性阿尔茨海默病(SAD)或者家族性阿尔茨海默痴呆(FAD)如家族性英国型痴呆(FBD)和家族性丹麦型痴呆(FDD),以及唐氏综合征中的神经变性;优选阿尔茨海默病。

[0146] 对于诊断应用,所述抗体通常用可检测部分标记。可使用许多标记,其通常可分为如下几组:

[0147] (a)放射性同位素,如³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I。所述抗体可以利用如Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Gütigen et al., Ed., Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs., (1991)所述的技术,用放射性同位素进行标记,放射性可以利用闪烁计数测量。

[0148] (b)可以利用荧光标记,如稀土金属螯合物(钆螯合物)或荧光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、丹磺酰、丽丝胺(Lissamine)、藻红素和得克萨斯红(Texas Red)。可以利用例如Current Protocols in Immunology, 见上文所公开的技术将荧光标记与抗体偶联。荧光可以使用荧光计定量。

[0149] (c)可以利用各种酶-底物标记。酶通常催化生色底物的化学改变,这可以使用各种技术测量。例如,酶可催化底物颜色改变,这可以通过分光光度计测量。或者,酶可改变底物的荧光或化学发光。定量荧光改变的技术在上文描述。化学发光底物通过化学反应变成电子激发的,然后可以发出可测量的光(如使用化学发光计测量)或者将能量送给荧光接受体。酶标记的实例包括萤光素酶(例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶;美国专利4,737,456号)、萤光素、2,3-二氢2,3-二氮杂萘二酮(2,3-dihydrophthalazinedione)、苹果酸脱氢酶、尿素酶、过氧化物酶如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、0-半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(如尿酸氧化酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。将酶与抗体偶联的

技术在O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzymology (ed Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166(1981)中描述。

[0150] 酶-底物组合的实例包括例如:

[0151] (i)辣根过氧化物酶(HRP)与作为底物的过氧化氢酶,其中过氧化氢酶氧化染料前体(例如邻苯二胺(OPD)或3,3',5,5'-四甲基盐酸联苯胺(TMB));

[0152] (ii)碱性磷酸酶(AP)与作为生色底物的磷酸对硝基苯酯;和

[0153] (iii) β -D-半乳糖苷酶(β -D-Gal)与生色底物(例如p-硝基苯基- β -D-半乳糖苷酶)或荧光底物4-甲基伞形酮- β -D-半乳糖苷酶(4-methylumbelliferyl- β -D-galactosidase)。

[0154] 本领域技术人员可利用许多其它酶-底物组合。

[0155] 有时,将标记与抗体间接偶联。技术人员应当知道实现这个目的的各种技术。例如,可以将抗体与生物素偶联,以及可以将任何上述三大类标记与抗生物素蛋白偶联,或者反之亦然。生物素选择性地与抗生物素蛋白结合,因此可以将该标记以这种间接方式与抗体偶联。或者,为了实现标记与抗体的间接偶联,将抗体与小的半抗原(例如地高辛)偶联,并将上述不同类型标记之一与抗半抗原抗体(例如抗地高辛抗体)偶联。因此,可以实现标记与抗体的间接偶联。

[0156] AB-抗体不需要标记,并且其存在可以使用与AB-抗体结合的标记的抗体来检测。

[0157] 本发明的抗体可用于任何已知测定方法,如竞争性结合测定、直接和间接夹心测定以及免疫沉淀测定。Zola, Monoclonal Antibodies A Manual of Techniques, pp.147-158(CRC Press, Inc., 1987)。

[0158] 竞争性结合测定依赖于标记的标准物与测试样品分析物竞争结合有限量的抗体的能力。测试样品中AB-肽的量与变为与抗体结合的标准物的量成反比。为了便于确定变为结合的标准物的量,抗体在竞争之前或之后通常是不溶的,由此与抗体结合的标准物和分析物可以方便地与保持未结合的标准物和分析物分离。

[0159] 夹心测定涉及使用两种抗体,每种抗体能够与要检测的蛋白的不同免疫原性部分或表位结合。在夹心测定中,测试样品分析物由固定在固体支持物上的第一抗体结合,然后第二抗体与分析物结合,因此形成不溶的三部分复合物。第二抗体自身可以用可检测部分标记(直接夹心测定),或者可以使用可检测部分标记的抗免疫球蛋白抗体测量(间接夹心测定)。例如,一种优选类型的夹心测定是ELISA测定,其中可检测部分是酶。

[0160] 对于免疫组织化学,组织样品可以是新鲜或冷冻的,或者可以包埋在石蜡中及用防腐剂如福尔马林固定。

[0161] 诊断试剂盒

[0162] 便利地,本发明的抗体可以在试剂盒中提供,所述试剂盒即预定量的试剂与进行诊断测定的说明书的包装的组合。在抗体用酶标记的情况下,试剂盒包含酶所需的底物和辅因子(例如提供可检测生色团或荧光团的底物前体)。此外,可以包含其它添加剂,如稳定剂、缓冲液(例如封闭缓冲液或裂解缓冲液)等。各种试剂的相对量可以是广泛的,以提供充分优化测定灵敏性的试剂溶液的浓度。特别地,试剂可以干粉,通常是冻干粉的形式提

供,其包含溶解时提供具有合适浓度的试剂溶液的赋形剂。

[0163] 本发明的诊断试剂盒可以含有如下文所述的其它生物学活性物质。特别优选用于所述诊断试剂盒中的是谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂。

[0164] 本发明的诊断试剂盒可以特别用于检测和诊断淀粉样变相关疾病和疾病状况,特别是选自如下的神经变性疾病:轻度认知障碍(MCI),阿尔茨海默病(AD),如散发性阿尔茨海默病(SAD)或者家族性阿尔茨海默病(FAD)如家族性英国型痴呆(FBD)和家族性丹麦型痴呆(FDD),唐氏综合征中的神经变性;优选阿尔茨海默病。

[0165] 本发明特别涉及特征在于以高亲和力与A β -肽结合的抗体。本发明还涉及特征在于以高亲和力与A β -肽或其变体结合的抗体。本发明中所述高亲和力是指K_D值为10⁻⁷M或更好的亲和力,优选K_D值为10⁻⁸M或更好,甚至更优选K_D值为10⁻⁹M-10⁻¹²M。因此,本发明的抗体以高于先前已知的抗体的亲和力与A β -肽结合。

[0166] 特别地,所述抗体优选是单克隆抗体,并选自如下组:

A β 5-5-6 (DSM ACC 2923)

A β 6-1-6 (DSM ACC 2924)

[0167] A β 17-4-3 (DSM ACC 2925)

A β 24-2-3 (DSM ACC 2926)

[0168] 本发明的抗体可特别用于诊断方法中,以检测淀粉样变,特别是选自如下的神经变性疾病:轻度认知障碍(MCI),阿尔茨海默病(AD),如散发性阿尔茨海默病(SAD)或者家族性阿尔茨海默病(FAD)如家族性英国型痴呆(FBD)和家族性丹麦型痴呆(FDD),唐氏综合征中的神经变性;优选阿尔茨海默病。

[0169] 根据优选的实施方案,所述抗体可以是人源化抗体或者嵌合抗体或者人抗体。

[0170] 此外,选自上述组的抗体也可以是所述组的功能性变体。

[0171] 在本发明中,p-Glu-A β -肽的变体特别是:

[0172] pGlu-A β ₃₋₃₈,

[0173] pGlu-A β ₃₋₄₀,

[0174] pGlu-A β ₃₋₄₂

[0175] A β -肽的其它变体是所有pGlu-A β _{3-x}变体,已经证实其由于阿尔茨海默病或者在阿尔茨海默病之前在脑中积聚。x定义为10至42的整数,例如在上述pGlu-A β ₃₋₄₂中,“42”是x所表示的整数。

[0176] 在本发明中,本发明抗体的“功能性变体”是这样的抗体或其功能性变体,其保留结合能力,特别是与pGlu-A β _{3-x}肽以高亲和力结合的能力。本领域已知这种功能性变体的条件,并包含上述可能性,其在抗体及其片段的定义下表示。

[0177] 在优选的实施方案中,所述抗体是如上文所定义的抗体片段。

[0178] 在另一优选实施方案中,本发明的抗体是与由上文所定义的抗体结合的表位结合的抗体,特别是抗体5-5-6、抗体6-1-6、抗体17-4-3和抗体24-2-3。

[0179] 在另一优选实施方案中,本发明的抗体是具有上文所定义的抗体的互补决定区(CDR)的抗体。优选地,所述抗体可以是标记的;特别地,可能的标记是上述那些标记以及本领域技术人员已知的用于抗体的诊断用途的所有标记。

[0180] 优选地,所述抗体固定在固相上。

[0181] 本发明还涉及可得自杂交瘤细胞系6-1-6(DSM ACC 2924)的抗体。

[0182] 本发明还涉及包含上文所定义的抗体的组合物。特别地,所述组合物是用于诊断的组合物,特别是用于神经变性疾病的诊断,所述神经变性疾病选自轻度认知障碍(MCI),阿尔茨海默病(AD),如散发性阿尔茨海默病(SAD)或者家族性阿尔茨海默痴呆(FAD)如家族性英国型痴呆(FBD)和家族性丹麦型痴呆(FDD),唐氏综合征中的神经变性;优选阿尔茨海默病;特别是通过检测生物样品中的A β 肽或其变体来进行诊断。

[0183] 在另一实施方案中,本发明及本文前述的抗体或其片段呈现出的对A β 寡聚体、纤维、原纤维或丝的结合亲和力比对A β 单体的结合亲和力高至少2倍,特别是至少4倍、特别是至少10倍、特别是至少15倍,更特别是至少20倍,但是特别是至少25倍。

[0184] 仍然在一实施方案中,提供了本文前述的抗体或其片段,或者嵌合抗体或片段,或者人源化抗体或其片段,所述抗体充分与哺乳动物中,特别是人脑中包括A β 斑在内的聚集的A β 结合,但是优选不表现出与淀粉样前体蛋白(APP)的任何显著的交叉反应性。

[0185] 在本发明另一方面,提供了本文前述的抗体或其片段,或者嵌合抗体或其片段,或者人源化抗体或其片段,所述抗体充分与哺乳动物中,特别是人脑中可溶性聚合淀粉样蛋白,特别是淀粉样蛋白 β (A β),包括A β 单体结合,但是优选不表现出与淀粉样前体蛋白(APP)的任何显著的交叉反应性。

[0186] 本发明还涉及上文所定义的人源化形式的抗体,包含所述人源化抗体的组合物以及所述组合物在治疗淀粉样变,特别是治疗哺乳动物特别是人的神经变性疾病中的用途。所述神经变性疾病特别选自轻度认知障碍(MCI),阿尔茨海默病(AD),如散发性阿尔茨海默病(SAD)或者家族性阿尔茨海默痴呆(FAD)如家族性英国型痴呆(FBD)和家族性丹麦型痴呆(FDD),唐氏综合征中的神经变性。优选所述神经变性疾病是阿尔茨海默病。

[0187] 本发明还涉及如下杂交瘤细胞系5-5-6、6-1-6、17-4-3和24-2-3。

[0188] 本发明还涉及上文所定义的抗体或包含所述抗体的组合物在体外诊断方法中的用途。特别地,这种诊断方法用于诊断选自如下的神经变性疾病:轻度认知障碍(MCI),阿尔茨海默病(AD),如散发性阿尔茨海默病(SAD)或者家族性阿尔茨海默痴呆(FAD)如家族性英国型痴呆(FBD)和家族性丹麦型痴呆(FDD),唐氏综合征中的神经变性;优选阿尔茨海默病;特别是通过检测生物样品中的A β 肽或其变体来进行诊断。

[0189] 优选地,所述样品是血清样品。

[0190] 根据另一优选的实施方案,所述样品是液体或脑脊液(CSF)样品。

[0191] 在特别优选的实施方案中,本发明涉及诊断淀粉样变相关疾病或疾病状况,优选阿尔茨海默病的体外或原位诊断方法,所述方法包括如下步骤:

[0192] 使本发明的抗体与疑似患有所述疾病状况或疾病的个体的样品接触,所述样品优选自血清、液体或CSF样品,最优选血清样品;或者与特定身体部分或身体区域接触,以及

[0193] 检测所述抗体与样品的pGlu-淀粉样蛋白、优选pGlu-A β 肽的结合。

[0194] 更特别地,本发明涉及淀粉样变相关疾病或疾病状况,优选阿尔茨海默病的诊断方法,所述方法包括检测抗体或其活性片段与样品中的或原位pGlu-淀粉样蛋白,优选pGlu-A β 肽的免疫特异性结合,所述方法包括如下步骤:

[0195] (a)使疑似含有淀粉样蛋白的样品或者特定的身体部分或身体区域与本发明的抗

体,特别是单克隆抗体,或者本发明及本文前述的嵌合抗体或其片段,或者人源化抗体或其片段和/或它们的功能性部分接触,所述抗体与pGlu-A β 肽结合;

[0196] (b)使所述抗体和/或其功能性部分与pGlu-A β 肽结合以形成免疫复合物;

[0197] (c)检测所述免疫复合物的形成;以及

[0198] (d)使所述免疫复合物的存在或不存在与所述样品或者特定的身体部分或区域中的pGlu-A β 肽的存在或不存在相关连。

[0199] 本发明还包括确定组织和/或体液中促淀粉样斑负荷(amyloidogenic plaque burden)程度的方法,所述方法包括:

[0200] (a)获得研究的组织和/或体液的代表性样品;

[0201] (b)用本发明的抗体,特别是单克隆抗体,或者本发明及本文前述的嵌合抗体或其片段,或者人源化抗体或其片段和/或它们的功能部性分检测所述样品;

[0202] (c)确定与蛋白结合的抗体的量;以及

[0203] (d)计算所述组织和/或体液中的斑负荷。

[0204] 特别地,本发明涉及确定组织和/或体液中促淀粉样斑负荷的程度的方法,其中确定步骤c)中免疫复合物的形成,由此所述免疫复合物的存在或不存在与淀粉样蛋白,特别是pGlu-A β 肽的存在或不存在相关。

[0205] 仍然在另一实施方案中,本发明涉及这样的组合物,其包含治疗有效量的本发明的抗体,或者本发明及本文前述的嵌合抗体或其片段,或者人源化抗体或其片段,包括它们的任何功能等同的抗体或者任何衍生或功能性部分;特别是药物组合物,其任选还包含药可接受的载体。

[0206] 在本发明另一实施方案中,所述组合物包含治疗有效量的抗体。

[0207] 本发明还包括这样的混合物,其包含治疗有效量的本发明的抗体,特别是单克隆抗体,或者本发明及本文前述的嵌合抗体或其片段,或者人源化抗体或其片段,包括它们的任何功能等同的抗体或者任何衍生或功能性部分;以及任选的其它生物学活性物质和/或药可接受的载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0208] 特别地,本发明涉及这样的混合物,其中所述其它生物学活性物质是用于淀粉样变药物中的化合物,所述淀粉样变是与涉及神经变性疾病的淀粉样蛋白或淀粉状蛋白如A β 蛋白相关的一组疾病或病症,所述神经变性疾病选自轻度认知障碍(MCI),阿尔茨海默病(AD),如散发性阿尔茨海默病(SAD)或者家族性阿尔茨海默痴呆(FAD)如家族性英国型痴呆(FBD)和家族性丹麦型痴呆(FDD),唐氏综合征中的神经变性;优选阿尔茨海默病。

[0209] 在本发明另一实施方案中,其它生物学活性物质或化合物也可以是治疗剂,所述治疗剂可用于治疗由淀粉样蛋白 β 导致的淀粉样变,或者可用于其它神经性病症的药物中。

[0210] 所述其它生物学活性物质或化合物可以通过与本发明的抗体相同或相似机制,或者通过不相关的作用机制,或者通过多种相关和/或不相关的作用机制来发挥其生物作用。

[0211] 通常,所述其它生物学活性化合物可以包括神经元传递(neuron-transmission)增强剂,精神治疗药物,乙酰胆碱酯酶抑制剂,钙通道阻滞剂,生物胺,苯并二氮杂卓镇静剂,乙酰胆碱合成、贮存或释放增强剂,乙酰胆碱突触后受体激动剂,单胺氧化酶-A或-B抑制剂,N-甲基-D-天冬氨酸谷氨酸受体拮抗剂,非甾体类抗炎药物,抗氧化剂以及5-羟色胺能受体拮抗剂。

[0212] 更特别地,本发明涉及这样的混合物,其包含至少一种化合物与本发明的抗体以及任选的药学可接受的载体和/或稀释剂和/或赋形剂,所述化合物选自:有效抗氧化应激的化合物;抗凋亡化合物;金属螯合剂;DNA修复抑制剂如哌仑西平和代谢物;3-氨基-1-丙磺酸(3-APS);1,3-丙二磺酸盐(1,3PDS); α -分泌酶激活剂; β -和 γ -分泌酶抑制剂;Tau蛋白;神经递质; β -折叠破坏物(β -sheet breaker);淀粉样蛋白 β 清除/耗竭细胞组分引诱剂;包括焦谷氨酸化淀粉样蛋白 β 3-42在内的N末端截短淀粉样蛋白 β 的抑制剂,如谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂;抗炎分子;或者胆碱酯酶抑制剂(ChEI),如他克林、利凡斯的明、多奈哌齐和/或加兰他敏;M1激动剂;以及其它药物,包括任何淀粉样蛋白或tau修饰药物和营养补充剂及营养补充剂。

[0213] 本发明还涉及这样的混合物,其中所述化合物是胆碱酯酶抑制剂(ChEI),特别是这样的混合物,其中所述化合物选自他克林、利凡斯的明、多奈哌齐、加兰他敏、烟酸和美金刚。

[0214] 在另一实施方案中,本发明的混合物可以包含烟酸或美金刚与本发明的抗体,以及任选的药学可接受的载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0215] 在另一实施方案中,本发明的混合物可以包含谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂与本发明的抗体,以及任选的药学可接受的载体和/或稀释剂和/或赋形剂。

[0216] 优选的谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂描述于W0 2005/075436,特别是第31-40页所示的实施例1-141。实施例1-141的合成示于W0 2005/075436的第40-48页。W0 2005/075436关于实施例1-141、它们的合成及它们作为谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂的用途的公开通过引用并入本文。

[0217] 其它优选的谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂描述于W0 2008/055945,特别是第46-155页所示的实施例1-473。实施例1-473的合成示于W0 2008/055945的第156-192页。W0 2008/055945关于实施例1-473、它们的合成及它们作为谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂的用途的公开通过引用并入本文。

[0218] 其它优选的谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂描述于W0 2008/055947,特别是第53-118页所示的实施例1-345。实施例1-345的合成示于W0 2008/055947的第119-133页。W0 2008/055947关于实施例1-345、它们的合成及它们作为谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂的用途的公开通过引用并入本文。

[0219] 其它优选的谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂描述于W0 2008/055950,特别是第57-120页所示的实施例1-212。实施例1-212的合成示于W0 2008/055950的第121-128页。W0 2008/055950关于实施例1-212、它们的合成及它们作为谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂的用途的公开通过引用并入本文。

[0220] 其它优选的谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂描述于W0 2008/065141,特别是第56-59页所示的实施例1-25。实施例1-25的合成示于W0 2008/065141的第60-67页。W0 2008/065141关于实施例1-25、它们的合成及它们作为谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂的用途的公开通过引用并入本文。

[0221] 其它优选的谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂描述于W0 2008/110523,特别是第55-59页所示的实施例1-27。实施例1-27的合成示于W0 2008/110523的第59-71页。W0 2008/110523关于实施例1-27、它们的合成及它们作为谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂的用途的公开

通过引用并入本文。

[0222] 其它优选的谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂描述于W0 2008/128981,特别是第62-65页所示的实施例1-18。实施例1-18的合成示于W0 2008/128981的第65-74页。W0 2008/128981关于实施例1-18、它们的合成及它们作为谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂的用途的公开通过引用并入本文。

[0223] 其它优选的谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂描述于W0 2008/128982,特别是第61-67页所示的实施例1-44。实施例1-44的合成示于W0 2008/128982的第68-83页。W0 2008/128982关于实施例1-44、它们的合成及它们作为谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂的用途的公开通过引用并入本文。

[0224] 其它优选的谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂描述于W0 2008/128983,特别是第64-68页所示的实施例1-30。实施例1-30的合成示于W0 2008/128983的第68-80页。W0 2008/128983关于实施例1-30、它们的合成及它们作为谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂的用途的公开通过引用并入本文。

[0225] 其它优选的谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂描述于W0 2008/128984,特别是第63-69页所示的实施例1-36。实施例1-36的合成示于W0 2008/128984的第69-81页。W0 2008/128984关于实施例1-36、它们的合成及它们作为谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂的用途的公开通过引用并入本文。

[0226] 其它优选的谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂描述于W0 2008/128985,特别是第66-76页所示的实施例1-71。实施例1-71的合成示于W0 2008/128985的第76-98页。W0 2008/128985关于实施例1-71、它们的合成及它们作为谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂的用途的公开通过引用并入本文。

[0227] 其它优选的谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂描述于W0 2008/128986,特别是第65-66页所示的实施例1-7。实施例1-7的合成示于W0 2008/128986的第66-73页。W0 2008/128986关于实施例1-7、它们的合成及它们作为谷氨酰胺酰基环化酶抑制剂的用途的公开通过引用并入本文。

[0228] 仍然在本发明另一实施方案中,提供了这样的混合物,其包含“非典型抗精神病药”;和本发明的抗体、特别是单克隆抗体,但是特别是本发明及本文前述的嵌合抗体或其片段,或者人源化抗体或其片段;以及任选的药学可接受的载体和/或稀释剂和/或赋形剂,所述“非典型抗精神病药”例如氯氮平、齐拉西酮、利培酮、阿立哌唑或奥氮平,其用于治疗阳性和阴性精神病症状,包括幻觉、妄想、思维障碍(thought disorder)(表现为明显的不连贯、出轨(derailment)、言不及义)和怪诞或紊乱的行为,以及快感缺乏、情感障碍(flattened affect)、情感淡漠和社交退缩(social withdrawal)。

[0229] 在本发明的具体实施方案中,本发明及本文前述的组合物和混合物包含分别为治疗有效量的抗体和生物学活性物质。

[0230] 可以合适地用于与本发明的抗体组合的混合物中的其它化合物描述于W02008/065141(特别参见第37/38页),包括PEP抑制剂(第43/44页);LiCl;二肽基氨基肽酶的抑制剂,优选地DP-IV或DP-IV样酶的抑制剂(参见第48/49页);乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制剂(参见第47页);PIMT增强剂; β 分泌酶的抑制剂(参见第41页); γ 分泌酶的抑制剂(参见第41/42页);中性内肽酶的抑制剂;磷酸二酯酶-4(PDE-4)的抑制剂(参见第42/43页);TNF α 抑制剂;

毒蕈碱性M1受体拮抗剂(参见第46页);NMDA受体拮抗剂(参见第47/48页); σ -1受体抑制剂;组胺H3拮抗剂(参见第43页);免疫调节剂、免疫抑制剂或者选自antegren(那他珠单抗)、Neurelan(氨吡啶-SR)、campath(阿仑单抗)、IR 208、NBI 5788/MSP 771(替利莫肽)、紫杉醇、Anergix.MS(AG 284)、SH636、达芙文(CD 271,阿达帕林)、BAY 361677(白介素-4)、基质-金属蛋白酶抑制剂(例如BB 76163)、干扰素- τ (滋养层素(trophoblastin))和SAIK-MS的药剂; β -淀粉样蛋白抗体(参见第44页);半胱氨酸蛋白酶抑制剂(参见第44页);MCP-1拮抗剂(参见第44/45页);淀粉样蛋白沉积抑制剂(参见第42页)以及 β 淀粉样蛋白合成抑制剂(参见第42页),该文献通过引用并入本文。

[0231] 在另一实施方案中,本发明涉及这样的混合物,其包含治疗有效量的本发明的抗体,特别是单克隆抗体,或者本发明及本文前述的嵌合抗体或其片段,或者人源化抗体或其片段,和/或生物学活性物质。

[0232] 本发明还涉及本发明的抗体,特别是单克隆抗体,但是特别是本发明及本文前述的嵌合抗体或其片段,或者人源化抗体或其片段,和/或它们的功能性部分,和/或包含所述抗体的药物组合物或混合物在制备用于治疗或缓和淀粉样变的药物中的用途,所述淀粉样变是一组与淀粉样斑形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉样变和年龄相关性淀粉样变,例如这样的疾病,包括但不限于神经性病症如阿尔茨海默病(AD),卢伊体痴呆,唐氏综合征,具有淀粉样变的遗传性脑出血(Dutch型);关岛帕金森-痴呆综合征;以及基于或者与淀粉样蛋白相关的其它疾病,如进行性核上麻痹,多发性硬化症;克-雅病,帕金森病,HIV-相关痴呆,ALS(肌萎缩侧索硬化症),成人发病型糖尿病;老年性心脏淀粉样变;内分泌肿瘤及其它疾病,包括黄斑变性。

[0233] 本发明还包括这样的方法,其用于制备用在预防、治疗或缓和淀粉样变的作用的方法中的本发明的抗体,特别是单克隆抗体,但是特别是本发明及本文前述的嵌合抗体或其片段,或者人源化抗体或其片段,和/或它们的功能性部分,和/或包含特别是治疗有效量的所述抗体和/或其功能性部分的药物组合物或混合物,所述淀粉样变是一组与淀粉样斑形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉样变和年龄相关性淀粉样变,例如这样的疾病,包括但不限于神经性病症如轻度认知障碍(MCI),阿尔茨海默病(AD),例如散发性阿尔茨海默病(SAD)或者家族性阿尔茨海默痴呆(FAD)如家族性英国型痴呆(FBD)和家族性丹麦型痴呆(FDD),唐氏综合征中的神经变性;卢伊体痴呆,具有淀粉样变的遗传性脑出血(Dutch型);关岛帕金森-痴呆综合征;以及基于或者与淀粉样蛋白相关的其它疾病,如进行性核上麻痹,多发性硬化症;克-雅病,帕金森病,HIV-相关痴呆,ALS(肌萎缩侧索硬化症),成人发病型糖尿病;老年性心脏淀粉样变;内分泌肿瘤及其它疾病,包括黄斑变性,所述方法包括将本发明的抗体,特别是单克隆抗体,但是特别是本发明的嵌合抗体或其片段,或者人源化抗体或其片段配制成药学可接受形式。

[0234] 本发明还包括预防、治疗或缓和淀粉样变的作用的方法,所述淀粉样变是一组与淀粉样斑形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉样变和年龄相关性淀粉样变,例如这样的疾病,包括但不限于神经性病症如轻度认知障碍(MCI),阿尔茨海默病(AD)例如散发性阿尔茨海默病(SAD)或者家族性阿尔茨海默痴呆(FAD)如家族性英国型痴呆(FBD)和家族性丹麦型痴呆(FDD),唐氏综合征中的神经变性;卢伊体(Lewy body)痴呆,具有淀粉样变的遗传性脑出血(Dutch型);关岛帕金森-痴呆综合征;以及基于或者与淀粉样蛋白相关的其它疾

病,如进行性核上麻痹,多发性硬化症;克-雅病,帕金森病,HIV-相关痴呆,ALS(肌萎缩侧索硬化症),成人发病型糖尿病;老年性心脏淀粉样变;内分泌肿瘤及其它疾病,包括黄斑变性,所述方法通过将抗体和/或其功能性部分,但是特别是人源化抗体和/或其功能性部分,或者包含这种抗体和/或其功能性部分的组合物或混合物给予患有这种病症的动物或人来进行,所述方法包括给予治疗有效量的抗体。

[0235] 本发明的另一目的是提供通过将本发明及本文所述的抗体,特别是药物组合物给予动物,特别是哺乳动物或人来治疗淀粉样变的方法,所述淀粉样变是一组与淀粉样斑形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉样变和年龄相关性淀粉样变,包括但不限于神经变性疾病如轻度认知障碍(MCI)、阿尔茨海默病(AD)例如散发性阿尔茨海默病(SAD)或者家族性阿尔茨海默病(FAD)如家族性英国型痴呆(FBD)和家族性丹麦型痴呆(FDD)、唐氏综合征中的神经变性;特别是特征在于丧失认知记忆能力的疾病或疾病状况。

[0236] 在具体的实施方案中,本发明提供了保持或增加患有记忆障碍的动物,特别是哺乳动物或人的认知记忆能力,但是特别是恢复认知记忆能力的方法,所述方法通过将本发明及本文前述的抗体,特别是药物组合物给予动物,特别是哺乳动物或人来进行。

[0237] 本发明的另一目的是提供治疗组合物及生产这种组合物的方法,以及利用本发明及本文前述的抗体治疗淀粉样变的方法,所述淀粉样变是一组与淀粉样斑形成相关的疾病和病症,包括继发性淀粉样变和年龄相关性淀粉样变,包括但不限于神经变性疾病如轻度认知障碍(MCI)、阿尔茨海默病(AD)例如散发性阿尔茨海默病(SAD)或者家族性阿尔茨海默病(FAD)如家族性英国型痴呆(FBD)和家族性丹麦型痴呆(FDD)、唐氏综合征中的神经变性;特别是特征在于丧失认知记忆能力的疾病或疾病状况。

[0238] 特别地,本发明涉及治疗动物,特别是哺乳动物或人,其患有特征在于丧失认知记忆能力的淀粉样变相关疾病状况,所述治疗使得保留认知记忆能力。

实施例

[0239] 1.材料和方法

[0240] 1.1抗体的产生

[0241] 小鼠

[0242] 为生产杂交瘤,使用8周龄雌性BALB/C小鼠(Charles River)。

[0243] 骨髓瘤细胞系

[0244] 为产生杂交瘤,使用来自Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen的骨髓瘤细胞系SP2/0-Ag14。

[0245] 抗原

[0246] 使用肽pGlu-6166(序列pGlu-FRHDSGC,SEQ ID NO:65)。

[0247] 策略

[0248] 作为免疫原,将所述肽经由3种不同连接物的马来酰亚胺基团偶联至牛甲状腺球蛋白(thyroglobulin)(BTG,SIGMA)。所用的三种不同长度的连接物来自N-[ε-马来酰亚胺基己酰氧基]琥珀酰亚胺酯(EMCS)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯)(LCSMCC)和N-[ε-马来酰亚胺基丙氧基]琥珀酰亚胺酯(BMPS)。

[0249] 为检测产生的抗体,将相同的肽经由琥珀酰亚胺基-6-[(ε-马来酰亚胺基-丙酰氨

基)己酸酯](SMPH)的马来酰亚胺基团偶联至牛血清白蛋白(BSA, SIGMA)。

[0250] 方法

[0251] 用于免疫的肽的偶联

[0252] 偶联经由肽的半胱氨酸残基的SH-基团以两步进行。

[0253] 1. 载体蛋白的马来酰化(Maleoylation)

[0254] 将2至5mg相应连接物(50mg/ml于N-甲基吡咯烷酮(NMP)中)加入2ml载体蛋白溶液(10mg/ml于0.1mM NaHCO₃, pH 8.0中)中。将反应混合物在室温(RT)下孵育1h。然后将反应混合物用Sephadex G-50柱(1.5x 14cm)脱盐,该柱已用50mM磷酸钠,250mM NaCl, pH 6.8平衡。

[0255] 2. 马来酰化的BTG与肽的偶联

[0256] 将250μl肽溶液(10mg/ml于重蒸馏水(Aqua bidest)中)与2ml含有50mM磷酸钠,250mM NaCl, pH 6.8中的马来酰化的载体蛋白(2.5mg/ml)的溶液混合,在4℃下孵育2h,再在RT下孵育4h。未反应的马来酰亚胺基团通过加入2-巯基乙醇直至浓度为10mM并在4℃下过夜孵育而封闭。将所得偶联物对10mM磷酸钠,150mM NaCl, pH 7.5在4℃下渗析(更换缓冲液3次, MW截断值10.000)。

[0257] 用于ELISA的肽的偶联

[0258] 偶联经由肽的半胱氨酸残基的SH-基团以两步进行。

[0259] 1. 载体蛋白的马来酰化

[0260] 将2mg SMPH(50mg/ml于N-甲基吡咯烷酮, NMP中)加入2ml载体蛋白溶液(BSA, 10mg/ml于0.1mM NaHCO₃, pH 8.0中)中。将反应混合物在室温(RT)下孵育1h。然后将反应混合物用Sephadex G-50柱(1.5x 14cm)脱盐,该柱已用50mM磷酸钠,250mM NaCl, pH 6.8平衡。

[0261] 2. 马来酰化的BTG与肽的偶联

[0262] 将100μl肽溶液(10mg/ml于50mM磷酸钠,250mM NaCl, pH 6.8中)与1ml含有50mM磷酸钠,250mM NaCl, pH 6.8中的马来酰化的载体蛋白(2.5mg/ml)的溶液混合,在4℃下孵育2h,再在RT下孵育4h。未反应的马来酰亚胺基团通过加入2-巯基乙醇直至浓度为10mM并在4℃下过夜孵育而封闭。将所得偶联物对10mM磷酸钠,150mM NaCl, pH 7.5在4℃下渗析(更换缓冲液3次, MW截断值10.000)。

[0263] 免疫

[0264] 将5只小鼠腹膜内免疫39天。对于免疫,使用油包水乳液,该乳液由等份的抗原溶液(由等份的三种不同肽-BTG-偶联物组成)和完全或不完全弗氏佐剂组成。

[0265] 融合

[0266] 将3只免疫的小鼠通过CO₂培育(incubation)处死。取出脾并在无菌条件下匀浆。将脾细胞和骨髓瘤SP2/0细胞在达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(DMEM, SIGMA)中洗涤几次,并以2,3脾细胞:1SP2/0细胞的比率,用聚乙二醇3350(1ml 50%(w/v))融合。融合杂交瘤的进一步操作根据标准方法学进行。

[0267] ELISA

[0268] 将针对IgG的ELISA用于筛选细胞培养上清。测试在96孔聚苯乙烯(polystyrol)微量滴定板(Greiner, 编号655061)中进行。将板用BSA-pGlu-6166肽包被。将100μl未稀释的

细胞培养上清加入每孔中,并在RT下孵育1小时。将来自SP2/0细胞的上清用作阴性对照。将来自脾细胞的上清用作阳性对照。

[0269] 利用与碱性磷酸酶偶联的山羊抗小鼠IgG来检测阳性孔。在Dynex Opsys MR酶标仪(Dynex Opsys MR Microplate Reader)中于405nm处测量光密度(OD)。

[0270] 选择产生稳定抗体的杂交瘤细胞

[0271] 将来自阳性孔的细胞转移到24孔板中,并培养几天。将细胞再次转移,并在ELISA中测试BSA-pGlu-6199结合及交叉反应性。将阳性孔用于杂交瘤细胞系的低温保存。

[0272] 经有限稀释克隆

[0273] 进行两个连续克隆步骤以将产生抗体的细胞与不产生抗体的细胞分离,并且保证所选择的细胞是单克隆的。两个克隆步骤均根据有限稀释方法进行。

[0274] 低温保存

[0275] 所选择的杂交瘤使用DMSO和标准方法低温保存。

[0276] 1.2.ELISA测定

[0277] AB N3pE-40的捕获利用来自TGC(The GENETICS Company;Switzerland)的hAB(x-40)ELISA(HS)基本上根据厂商指导进行。

[0278] 产生了用于AB N3pE(pGlu-6166)的生物素化的检测抗体。当提到时,将IBL HRP偶联的AB N3pE抗体用作阳性对照(仅与IBL ELISA人淀粉样蛋白 β (N3pE)测定试剂盒组合时可用)。合成相应的AB N3pE-40肽(50 μ g等份于六氟异丙醇(HFIP)中,储存在-80 $^{\circ}$ C)。在即将使用之前,将HFIP蒸发,将肽用100mM Tris/HCl pH 10,4稀释至1 μ g/ μ l。将这个储存溶液进一步用TGC抗体稀释剂稀释。随后的捕获和检测根据厂商指导进行。

[0279] 1.3.PepSpotTM分析

[0280] AB N3pE抗体和细胞培养上清的特异性和生物学完整性用JPT Peptide Technologies GmbH,Volmerstrasse 5(UTZ),12489 Berlin,Germany的PepSpotTM技术确定。

[0281] 相应的PepSpotTM膜在JPT制备。该方法的原理由Kramer et al.1997 Cell 91, 799-809介绍和描述。

[0282] 对于分析,将膜用TBST-M(10mM Tris-Hcl,pH 7.5,150mM NaCl,0.005%吐温20+5%脱脂乳)在室温下温和振荡封闭2小时。在摇动平台上,于4 $^{\circ}$ C下,将膜用在等体积TBST-M中稀释的各个细胞培养上清孵育过夜。利用与碱性磷酸酶偶联的抗小鼠二抗根据标准程序进行信号检测。

[0283] 1.4.斑点印迹分析

[0284] 进行简单的斑点印迹方案以获得AB N3pE抗体和细胞培养上清对各自天然肽的敏感性的信息。为此,将递减浓度的AB N3pE-40肽(1000ng-8ng)点印在小块硝酸纤维素膜上,随后进行与PepSpotTM膜一样的实验程序。

[0285] 1.5.SDS PAGE

[0286] 将12%SDS聚丙烯酰胺凝胶根据标准方案成型。将15 μ l细胞培养上清和10 μ g生物素化的抗体在12%SDS聚丙烯酰胺凝胶上分离。电泳在100V恒压下进行2小时。

[0287] 1.6.BIACORE分析

[0288] 将AB N3pE-40肽(阳性对照)和AB N3E-40肽(阴性对照)偶联在Biacore CM5芯片

上。使用未修饰的芯片以确定空白值。监测在TGC稀释剂中从20 μ g/ml稀释至1 μ g/ml的生物素化的抗体的缔合与解离,以允许随后确定各个KD值。以此方式,还确定了各个细胞培养上清的结合特征。

[0289] 1.6.1 ABN3pE特异性抗体克隆6-1-6和24-2-3的亲合力

[0290] 将纯化的抗体克隆6-1-6在HBS-EP缓冲液(Biacore)中向下稀释至100、50、30、20、15、10、7、4、2、1nM。亲合力使用带有固定了A β pE3-40的CM5-芯片的Biacore 3000来确定。系统以30 μ l/min运行。测量的体效应和与芯片表面的非特异性结合通过减去固定了A β pE3-40的流动池4的信号和空白流动池3的信号而校正。缔合(10min)通过注射300 μ l每种浓度而获得。观察解离10min以上。剩余的抗体分子通过注射5 μ l 0.1M HCL而除去。对于每种抗体浓度,记录缔合和解离。利用“二价分析物”模型,通过全局同时拟合所有记录的抗体浓度的缔合和解离阶段来确定缔合和解离速率及解离常数。

[0291] 1.7. 测序抗体可变区

[0292] 杂交瘤细胞的培养:

[0293] 使杂交瘤细胞在添加了15%FBS、1%MEM-NEA(非必需氨基酸,Gibco)、50 μ g/ml庆大霉素(Gibco)和50 μ M β -巯基乙醇的D-MEM(+L-谷氨酰胺,+丙酮酸钠,4,5g/l葡萄糖,Gibco)中,于37 $^{\circ}$ C下和5%CO₂中生长。传代培养根据细胞密度在3-4天后进行。将细胞以0.5 x 10⁶细胞/ml接种,分瓶(splitting)在2-5 x 10⁶细胞/ml的细胞密度时进行。

[0294] cDNA合成和逆转录:

[0295] 根据NucleospinRNA分离试剂盒(Macherey-Nagel)的手册从2 x 10⁶个细胞分离总RNA。利用寡(dT)₁₅引物(Promega)和SuperScript III逆转录酶(Invitrogen),将100 ng RNA用于cDNA合成。

[0296] 重链和轻链可变区的PCR扩增:

[0297] 利用PhusionTM高保真DNA聚合酶(NEW ENGLAND BioLabs),使用与引物MHV1-12组合的引物MHCG1(在克隆5-5-6和6-1-6的情况下)和MHCG2b(克隆7-4-3和24-2-3)从模板cDNA中扩增重链可变区。为了扩增轻链可变区,使用与引物MKV1-MKV11组合的引物MKC。引物序列示于表1。

[0298] PCR产物克隆于pJET1.2中:

[0299] 将PCR扩增的重链和轻链可变区根据CloneJETTM PCR克隆试剂盒(Fermentas)的方案克隆入pJET1.2/平端(blunt)载体。使用pJET1.2测序引物进行测序。

[0300] 表1:用于重链和轻链可变区PCR扩增的引物序列

[0301]

. 名称	. 序列	SEQ ID NO.
MKV1	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG	23
MKV2	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG	24
MKV3	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGSGTTG	25
MKV4	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWCTTG	26
MKV5	ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC	27
MKV6	ATGAGGTKCYYTYGYSAGYTYCTGRGG	28
MKV7	ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACAKWYYCWGG	29

MKV8	ATGTGGGGAYCTKTTTYCMMTTTTTCAATTG	30
MKV9	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	31
MKV10	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT	32
MKV11	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC	33
MKC	ACTGGATGGTGGGAAGATGG	34
MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC	35
MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	36
MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT	37
MHV4	ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRTTT	38
MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTTCCTT	39
MHV6	ATGGCTTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTGC	40
MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT	41
MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG	42
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG	43
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCTG	44
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG	45
MHV12	ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCTG	46
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG	47
MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG	48

[0302] 1.8抗体克隆6-1-6用于N3pE ELISA

[0303] 通过在4℃下过夜孵育每孔100μl在D-PBS中稀释的2μg/ml抗-Aβ抗体4G8来用捕获抗体包被96孔maxisorb板(Nunc)。将板密封。除去包被溶液,将板表面用每孔200μl PIERCE无蛋白ELISA阻断剂(PIERCE Protein-free ELISA-Blocker)(无吐温-20)在室温下封闭2小时。然后将板用TBS+0.05%(v/v)吐温-20洗涤6次。通过轻敲板来除去剩余的洗涤溶液。将AβpE3-40标准肽在PIERCE无蛋白ELISA阻断剂(含吐温-20)中向下稀释至200、100、50、25、12.5、6.25、3.125pg/ml。将100μl每种浓度及100μl稀释缓冲液(空白)移液到板上。将板密封并在4℃下孵育2小时。然后将板用TBS+0.05%(v/v)吐温-20洗涤6次。通过轻敲板来除去剩余的洗涤溶液。将100μl检测抗体-酶偶联物溶液移液到每孔中,所述溶液含有溶于PIERCE无蛋白ELISA阻断剂(含吐温-20)中的1μg/ml AβN3pE特异性抗体克隆6-1-6和2μg/ml链霉抗生物素蛋白-HRP偶联物(Sigma)。将板密封并在4℃下孵育1小时。然后将板用TBS+0.05%(v/v)吐温-20洗涤6次。通过轻敲板来除去剩余的洗涤溶液。在每孔中移液加入100μl SureBlue底物溶液(KPL),将板在室温下避光孵育30min。通过每孔加入100μl 1M H₂SO₄来终止反应。用TECAN Sunrise在450nm处测量吸光度,并通过540nm处的吸光度校正。

[0304] 1.9经ELISA和表面等离子体共振(SPR)分析的交叉反应性研究

[0305] ELISA:

[0306] 通过在4℃下过夜孵育每孔100μl在D-PBS中稀释的2μg/ml抗-Aβ抗体4G8来用捕获抗体包被96孔maxisorb板(Nunc)。将板密封。除去包被溶液,将板表面用每孔200μl PIERCE无蛋白ELISA阻断剂(无吐温-20)在室温封闭2小时。然后将板用TBS+0.05%(v/v)吐温-20洗涤6次。通过轻敲板来除去剩余的洗涤溶液。将AβpE3-40标准肽和其它Aβ肽(2-40、3-40、

4-40、1-42、3-42和pE11-40)在PIERCE无蛋白ELISA阻断剂(含吐温-20)中向下稀释至800、400、200、100、50、25、12.5。将100 μ l每种浓度及100 μ l稀释缓冲液(空白)移液到板上。将板密封并在4 $^{\circ}$ C下孵育2小时。然后将板用TBS+0.05%(v/v)吐温-20洗涤6次。通过轻敲板来除去剩余的洗涤溶液。将100 μ l检测抗体-酶偶联物溶液移液到每孔中,所述溶液含有在PIERCE无蛋白ELISA阻断剂(含吐温-20)中稀释的1 μ g/ml A β N3pE特异性抗体克隆6-1-6和2 μ g/ml链霉抗生物素蛋白-HRP偶联物(Sigma)。将板密封并在4 $^{\circ}$ C下孵育1小时。然后将板用TBS+0.05%(v/v)吐温-20洗涤6次。通过轻敲板来除去剩余的洗涤溶液。在每孔中移液加入100 μ l SureBlue底物溶液(KPL),将板在室温下避光孵育30min。通过每孔加入100 μ l 1M H₂SO₄终止反应。用TECAN Sunrise在450nm处测量吸光度,并通过540nm处的吸光度校正。

[0307] SPR:

[0308] 除了不同A β 种类之外,还确定了对存在于人体中的其它pGlu-肽的交叉反应性。这通过表面等离子体共振进行。下述肽或它们N-末端区域固定在CM5-芯片的表面上:

[0309] MCP1、MCP2、大促胃液素(big gastrin)、促性腺激素释放激素、神经降压肽、食欲肽A、纤连蛋白、胶原蛋白1和TRH。作为阳性对照,还分析了与A β pE3-40的结合。将N3pE抗体克隆6-1-6和24-2-3在HBS-EP(Biacore)中向下稀释至25 μ g/ml。使用具有固定了各自的肽(在流动池2、3和4上)的几个CM5-芯片的Biacore 3000来观察结合。系统以20 μ l/min运行。测量的体效应和与芯片表面的非特异性结合通过减去固定了测试肽的流动池2、3和4的信号和空白流动池1的信号而校正。缔合(9min)通过分别注射180 μ l抗体克隆6-1-6和24-2-3而获得。观察解离9min以上。剩余的抗体分子通过注射5 μ l 0.1M HCL而除去。对于每种抗体与不同肽的相互作用,记录了缔合和解离。通过评价缔合阶段有关速率和结束时的信号来确定交叉反应性。将所有pGlu-肽的值与A β pE3-40的信号相比较。

[0310] 1.10用于脑分析的N3pE ELISA的优化和验证

[0311] 我们开发的N3pE ELISA应当用于分析转基因小鼠脑中的A β pE3-42浓度。通常分别分析半球和脑干的A β pE3-42含量。将小鼠脑在Precelly(Peqlab)匀浆器中,在500 μ l含蛋白酶抑制剂的2%SDS溶液中利用陶瓷珠匀浆。从珠吸取悬浮液,并转移到离心管中。将珠用250 μ l含蛋白酶抑制剂的2%SDS溶液再次洗涤,将溶液转移到离心管中。将750 μ l SDS脑悬浮液在碎冰上超声处理20sec。将样品在4 $^{\circ}$ C下以75000xg离心1小时。然后取上清,等分并储存在-80 $^{\circ}$ C下直至ELISA分析。将剩余SDS不溶团(pellet)与150 μ l 70%甲酸混合,并在碎冰上超声处理20sec。超声处理后,立即用2850 μ l 1M Tris将溶液中和(这是旧方法);或者用2850 μ l EIA缓冲液(PBS+10mg/ml BSA+0.05%吐温-20)+860 μ l 3.5M Tris将溶液中和,这代表新方法。将甲酸级分样品储存在-80 $^{\circ}$ C直至ELISA。

[0312] N3pE ELISA通过如下方案进行:

[0313] 通过在4 $^{\circ}$ C下过夜孵育每孔100 μ l在D-PBS中稀释的2 μ g/ml抗-A β 抗体4G8来用捕获抗体包被96孔maxisorb板(Nunc)。将板密封。除去包被溶液,将板表面用每孔200 μ l PIERCE无蛋白ELISA阻断剂(无吐温-20)在室温下封闭2小时。然后将板用TBS+0.05%(v/v)吐温-20洗涤6次。通过轻敲板来除去剩余的洗涤溶液。将A β pE3-42标准肽在PIERCE无蛋白ELISA阻断剂(含吐温-20)(旧方法)或EIA缓冲液(新方法)中向下稀释至1029.2、514.6、257.3、128.65、64.32、31.16、16.08pg/ml。将100 μ l每种浓度及100 μ l稀释缓冲液(空白)移液到板上。将SDS样品解冻,在PIERCE无蛋白ELISA阻断剂(含吐温-20)(旧方法)或EIA缓冲液(新方

法)中分别以1:25和1:100稀释,并且移液到ELISA板上。将甲酸样品(旧方法:甲酸/Tris;新方法:甲酸/EIA缓冲液/Tris)解冻,并未稀释移液到ELISA板上。将板密封并在4℃下孵育2小时。然后将板用TBS+0.05%(v/v)吐温-20洗涤6次。通过轻敲板来除去剩余的洗涤溶液。将100μl检测抗体-酶偶联物溶液移液到每孔中,所述溶液含有溶于PIERCE无蛋白ELISA阻断剂(含吐温-20)中的1μg/ml AβN3pE特异性抗体克隆6-1-6和2μg/ml链霉抗生物素蛋白-HRP偶联物(Sigma)。将板密封并在4℃下孵育1小时。然后将板用TBS+0.05%(v/v)吐温-20洗涤6次。通过轻敲板来除去剩余的洗涤溶液。在每孔中移液加入100μl SureBlue底物溶液(KPL),将板在室温下避光孵育30min。通过每孔加入100μl 1M H₂SO₄终止反应。用TECAN Sunrise在450nm处测量吸光度,并通过540nm处的吸光度校正。

[0314] 1.11 N3pE抗体克隆用于免疫组织化学

[0315] 将来自人脑(皮层)的福尔马林固定并石蜡包埋的切片如下处理:

[0316] 1.将切片(固定在玻片上)脱石蜡和再水化:

[0317] a.在Histoclear或二甲苯中将玻片孵育3分钟

[0318] b.除去清理溶液

[0319] c.再次在Histoclear或二甲苯中将玻片孵育3分钟

[0320] d.在1:1的Histoclear或二甲苯与100%乙醇中将玻片孵育3分钟

[0321] e.在100%乙醇中将玻片孵育3分钟,除去溶液

[0322] f.再次在100%乙醇中将玻片孵育3分钟

[0323] g.在95%乙醇中将玻片孵育3分钟

[0324] h.在70%乙醇中将玻片孵育3分钟

[0325] i.在50%乙醇中将玻片孵育3分钟

[0326] j.在蒸馏水中将玻片孵育3分钟

[0327] 2.中止内源过氧化物酶活性:

[0328] 将玻片用99ml甲醇+1ml 30%过氧化氢在室温下孵育10分钟。

[0329] 3.用水洗涤玻片:2x5分钟

[0330] 4.除去各个玻片中的水,并将玻片置于潮湿箱中的玻片架上以防止切片干燥。在通风橱中,于室温下用88%甲酸将切片覆盖10分钟。在水中淋洗几次,并在充满水的染色皿中摇动10分钟。

[0331] 5.于室温下在10%马血清中封闭20分钟。

[0332] 6.甩掉(或吸去)封闭溶液,并加入第一抗体(N3pE抗体克隆6或24),4℃下过夜。

[0333] 7.用TBS分别洗涤玻片10分钟以避免从一个玻片拖动另一个玻片。

[0334] 8.加入生物素化的第二抗体(来自Vector Laboratories的山羊抗小鼠):9ml TBS,1ml山羊血清,45μl第二抗体)。在室温下孵育30分钟。

[0335] 9.用TBS分别洗涤玻片10分钟以避免从一个玻片拖动另一个玻片。

[0336] 10.加入ABC溶液(10ml TBS,100μl马血清,90μl组分A,90μl组分B)。在室温下孵育30分钟。

[0337] 11.用50mM Tris洗涤玻片:2x 10分钟

[0338] 12.颜色反应:用DAB溶液(100ml 50mM Tris中的20mg来自Sigma的DAB,过滤,并加入33μl 33%过氧化氢)孵育切片。用显微镜观测颜色反应。反应产物是褐色的。通过将玻片

放入含水的染色皿来中终止反应。

[0339] 13.用水洗涤玻片10分钟

[0340] 14.用苏木精复染,用水洗涤

[0341] 15.脱水和澄清:次序颠倒地进行步骤1(例如水、乙醇至100%histoclean)

[0342] 16.用permount(Fisher Scientific)覆盖玻片。空气干燥玻片。用刀片和乙醇清理玻片。

[0343] 2.结果

[0344] 2.1抗体的产生

[0345] 分离了稳定产生抗pGlu-6166-BSA肽的抗体的6个克隆:克隆1-8-12、5-5-6、6-1-6、12-1-8、17-4-3和24-2-3。进一步鉴定这些克隆。

[0346] 2.2.确定所需抗体浓度:

[0347] ELISA测定中的信号强度不仅与分析物/AB变体浓度相关,而且还强烈依赖于采用的抗体的浓度。因为AB变体仅以低浓度存在于血清样品中,因此有必要确定能够检测低浓度的相应AB变体的抗体浓度。可商购的ABELISA试剂盒对AB的规定检测限度是低pg范围。在标准曲线中,最高浓度通常是500pg/ml。有关采用的抗体浓度的一般信息典型地在数据表/说明手册中是缺少的,然而,由于从一般文献推导出的进一步信息,使用1μg/ml抗体作为默认值。

[0348] 在第一系列实验中,用相应的pGlu-6166 12-1生物素偶联的抗体不能检测500pg/ml AB N3pE-40。事实上,需要相对较高AB N3pE浓度(10ng/ml)以用1μg/ml抗体来获得信号(参见图1A:中间条柱)。该信号的强度通过将抗体浓度增加至10μg/ml而大大增强(参见图1A:左手条柱)。直至20μg/ml抗体,信号强度可以进一步升高(参见图1B)。超过这个浓度,不能实现信号强度的进一步增加。因此,使用20μg/ml抗体来确定pGlu-6166抗体的检测限度。

[0349] 2.3.斑点印迹分析

[0350] 在筛选方法中选择AB N3pE-x抗体pGlu-6166,因为原始细胞克隆(命名为12-1-8)表现出对用于免疫的肽的强结合及非常低的交叉反应性(见表2)。

[0351] 表2:证实ELISA测定中用几种杂交瘤细胞克隆上清获得的信号的筛选结果

[0352]

克隆	N3pE-BSA	isoDAE-BSA	N3E-BSA	N11E-BSA	N11pE-BSA
1-8-12	1.787	0.012	0.142	0.011	0.005
5-5-6	1.649	0.015	0.126	0.004	0.006
6-1-6	1.377	0.013	0.125	0.007	0.014
12-1-8	2.123	0.005	0.009	0.001	0.005
17-4-3	1.915	0.007	0.320	0.003	0.004
24-2-3	1.768	0.014	0.218	0.003	0.002
阳性对照	1.824	1.227	1.596	1.243	1.346
阴性对照	0.045	0.005	0.008	0.001	0.003

[0353] 目前尚未包括针对全长天然AB N3pE-40肽的筛选步骤。因此,筛选可得的pGlu6166杂交瘤细胞克隆库以发现表达对天然AB N3pE-40肽可表现出较高亲和力的抗体的克隆。

[0354] 如图2所示,可以鉴定确实对天然全长AB N3pE-40肽表现出较高灵敏性的细胞克隆。尽管pGlu-6166抗体克隆12-1仅能检测1 μ g肽,但是克隆6-1-6和24-2-3对低至8ng肽也给出信号。因此,克隆6-1-6和24-2-3的灵敏性高125倍。用这些克隆可以获得相应ELISA中8pg/ml AB N3pE-40肽的检测限度。

[0355] 2.4.PepSpot分析

[0356] 然后通过PepSpot分析检查特异性以比较生物素化的AB N3pE-x抗体pGlu-6166与杂交瘤细胞克隆。在表3中,列出了对应于PepSpot膜上的斑点的所有肽。如图3所示,pGlu-6166克隆6-1-6和24-2-3不产生多于pGlu-6166抗体克隆12-1的交叉信号。所有研究的克隆主要识别6号斑点-特异性AB N3pE-x斑点(pEFRHD...,即SEQ ID No:12),随后是5号斑点(EFRHD...SEQ ID No:11)和7号斑点(FRHD...SEQ ID No:13)。用4号斑点也获得了微弱信号(AEFRHD...SEQ ID No:10)。

[0357] 表3:点印至PepSpot™膜(JPT Peptide Technologies GmbH)上的AB肽的序列及通过pGlu-6166杂交瘤细胞克隆的检测

[0358]

编号	肽序列 AB 1-40 (SEQ ID No:2) DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	IBL- AK	5- 5-6	6- 1-6	17- 4-3	24- 2-3	12- 4	SEQ ID No.
1	KMLAEFRHDSGYE	-	-	-	-	+/-	-	7
2	DAEFRHDSGYEVH	-	-	-	-	+/-	-	8
3	LDAEFRHDSGYEVH	-	-	-	-	+/-	-	9
4	AEFRHDSGYEVHH	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	10
5	EFRHDSGYEVHHQ	-	+	+	+	+	+	11
6	PEFRHDSGYEVHHQ	-	+++	+++	+++	+++	+++	12
7	FRHDSGYEVHHQK	+	+	+	+	+	+	13
8	GYEVHHQKLVFFA	-	-	-	-	-	-	14
9	EVHHQKLVFFAED	-	-	-	-	-	-	15
10	pEVHHQKLVFFAED	-	-	-	-	-	-	16
11	VHHQKLVFFAEDV	-	-	-	-	-	-	17
12	DAEVRHDSGYEVH	-	-	-	-	-	-	18
13	LDGGEVHHQKLVF	-	-	-	-	-	-	19
14	LVFFAEDVGSNKG	-	-	-	-	-	-	20
15	GSNKGAIIGLMVG	-	-	-	-	-	-	21
16	AIIGLMVGGVV	-	-	-	-	-	-	22

[0359] 表3中的pE是pGlu,焦谷氨酸

[0360] 表3中的iD是isoAsp,异天冬氨酸

[0361] 2.5.SDS-PAGE分析

[0362] AB-N3pE抗体及杂交瘤细胞培养上清的生物学完整性通过SDS-PAGE分析大体上确

定(细节见上述材料&方法)。

[0363] 如图4所示,所有上样到凝胶的样品揭示了无扩散的清晰条带,这表明了pGlu-6166 12-1抗体及杂交瘤细胞克隆上清的完整性。

[0364] 2.6.BIACORE分析

[0365] 用斑点印迹分析诊断了杂交瘤细胞克隆上清与生物素化的pGlu-6166抗体相比对AB N3pE-40肽的灵敏性的显著差异。然而,用这种方法仅监测了终点结果。在另一方面,Biacore分析允许实时分辨给定抗体的结合过程。为了检查pGlu-6166 12-1抗体的不良结合是否是AB N3pE-40肽的低缔合的结果,如上述材料和方法中所述进行Biacore分析。

[0366] 监测渐增浓度的pGlu-6166抗体的结合过程而计算的KD值为30nM。杂交瘤细胞克隆上清12-1与细胞克隆上清6-1-6的比较揭示出结合特征中的惊人差异。克隆6-1-6的缔合比用克隆12-1所观察到的缔合高约5倍。然而,最显著的是解离行为中的差异。尽管克隆6-1-6很难从AB N3pE-40肽解离,但是12-1在几分钟内很容易被洗掉。因此,克隆12-1的不良结合很可能是观察到的“解离速率(off-rate)”的结果。这个假设进一步由如下发现支持,即在斑点印迹分析中给出特别有利结果的克隆24-3-2表现出非常缓慢的与AB N3pE-40肽的缔合,但是与克隆12-1相反而没有可观察到的“解离速率”(还参见图5)。

[0367] 2.6.1 ABN3pE特异性抗体克隆6-1-6和24-2-3的亲和力

[0368] 对于N3pE抗体克隆6-1-6,通过全局拟合图6所示的所有传感图来计算缔合速率、解离速率和解离常数。

[0369] 缔合速率计算为 $1.67 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,解离速率为 $2.63 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$,解离常数为1.57nM。

[0370] 对于N3pE抗体克隆24-2-3,通过全局拟合图7所示所有传感图来计算缔合速率、解离速率和解离常数。

[0371] 缔合速率计算为 $3.25 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,解离速率为 $3.29 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$,解离常数为101nM。

[0372] 2.7测序抗体可变区

[0373] 鉴定了下述序列:

[0374] 2.7.1克隆5-5-6

[0375] 可变部分轻链,核苷酸序列(SEQ ID NO:49)

[0376]

ATGGTGTCTCAGCTCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTCAGGAAACCAACGGTGATGTTGTGATGACCCA
GACTCCACTCACTTTGTCGTTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATA
GTGATGGAAAAACCTATTTGAATTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAATGCGCCTAATCTATCTGGTGTCT
AAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACACTGAAAAATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTTTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGT
TGGAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCAT

[0377] 可变部分轻链,蛋白序列(SEQ ID NO:50)

[0378]

MVSSAQFLFLVLWIQETNGDVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWLLQRPQGSPMRLIYLV
KLDGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEADLGVYVCVQGTGTHFPFTFGSGTKLEIKRADAAPTIVSIFPP

[0379] 可变部分重链,核苷酸序列(SEQ ID NO:51)

[0380]

ATGGGATGGAGCGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGAAGTGCAGGTGTCCACTCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTC
TGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTATA
CCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAGTGGTGTACT
AGGTACAACCAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACATTAATTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCT
CAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTACAAGAGAGGCTAAACGGGAGTGGGACGAGACTTACTGGG
GCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTA

[0381] 可变部分重链, 蛋白序列(SEQ ID NO:52)

[0382]

MGWSGVFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYSGVT
RYNQKFKGKATLIVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCTREAKREWDETYWGQGLVTVSAAKTPPSV

[0383] 2.7.2克隆6-1-6

[0384] 可变部分轻链核苷酸序列(SEQ ID NO:53)

[0385]

ATGGTGTCCACAGCTCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTCAAGAAACCAACGGTGATGTTGTGATGACCCA
GACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATA
GTGACGGAACCTATTTGAATTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAATGCGCTAATCTATCTGGTGTCT
AAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTTTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGT
TGAAATAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAG

[0386] 可变部分轻链, 蛋白序列(SEQ ID NO:54)

[0387]

MVSTAQFLFLLVLWIQETNGDVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWLLQRPQGSPMRLIYLV
KLD SGVPDRFTGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCVQGT HFPFTFGSGTKLEIKRADAAPT VSI FPPS

[0388] 可变部分重链, 核苷酸序列(SEQ ID NO:55)

[0389]

ATGGGATGGAGCGGGTCTTTATCTTCCTCCTGTCAGGAAGTGCAGGTGTCCACTCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTC
TGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACA
CCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGTGTACT
AGGTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTAATTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCT
CAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTACAAGAGAGGCTAAACGGGAGTGGGACGAGACTTACTGGG
GCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTG

[0390] 可变部分重链, 蛋白序列(SEQ ID NO:56)

[0391]

MGWSGVFIFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGVT
RYNQKFKGKATLIVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCTREAKREWDETYWGQGLVTVSAAKTPPSVYPL

[0392] 2.7.3克隆17-4-3

[0393] 可变部分轻链, 核苷酸序列(SEQ ID NO:57)

[0394]

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGGTGTCTGGATTCTGTTTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACCCAGAC
TCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGTACACAGTG

ATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAC
CGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGA
GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTCCGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGG
AAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGT

[0395] 可变部分轻链蛋白序列(SEQ ID NO:58)

[0396]

MKLPVRLVLVFWIPVSSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDLGVIYFCSQSTHPPTFGGGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSS

[0397] 可变部分重链核苷酸序列(SEQ ID NO:59)

[0398]

ATGGACTTTGGGCTCAGCTTACTTATTTTTGTCCTTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGAAGCTGGTGGAGTC
TGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTTTCACTGACTACG
GAATGGCGTGGGTTCGACAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGAGTGGGTAGCATTATTAGTAATTTGGCATATAGTATC
TACTATGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCATTCTCTAGAGAGAATGCCAAGAACCCTGTACCTGGAAATGAG
CAGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCATGTACTACTGTGCAAGGTATGACTACGATAATATCTTGGACTATGTTATGG
ACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCCATCAGTCTATCCACTG

[0399] 可变部分重链,蛋白序列(SEQ ID NO:60)

[0400]

MDFGLSLLIFVLILKGVQCEVKLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSDYGMWVRQAPGKGPEWVAFISNLAYS
IYYADTVTGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDTAMYYCARYDYNILDYVMDYWGQTSVTVSSAKTTPPSVYPL

[0401] 2.7.4克隆24-2-3

[0402] 可变部分轻链核苷酸序列(SEQ ID NO:61)

[0403]

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTCTGGATTCAGGAAACCAAGGGTGATGTTGTGCTGACCCAGACTCCACT
CACTTTGTGCGTTACATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAA
AAACCTATTTGAATTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATGTGGTGTCTAACTGGAC
TCTGGAGTCCCTGACAGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGA
GGATTTGGGAGTTTATTATTGCGTGCAAGGTACACATTTTCCATTCACGTTCCGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATAA
AACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGT

[0404] 可变部分轻链蛋白序列(SEQ ID NO:62)

[0405]

MKLPVRLVLWIQETKGDVVLQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQRPQSPKRLIYVSKLD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCVQGTHFPFTFGSGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSS

[0406] 可变部分重链核苷酸序列(SEQ ID NO:63)

[0407]

ATGGGATGGAGCGGGTCTTTCTTCTCCTCTGTGTAAGTGAAGGTGTCCACTCCCAGGTTCACTGTCAGCAGTC
TGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATATATTCAATAACTACT
GGATAAAGTGGTGAAGCAGAGGCCTGGTCAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACT
AACTACAATGGGAAGTTCAAGGTAAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAG
CAGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGAGGGATATATTGTTTATTGGGGCCAAGGGACTC

TGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTG

[0408] 可变部分重链,蛋白序列(SEQ ID NO:64)

[0409]

MGWSGVFLFLLSVTEGVHSQVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYIFNNYWINWVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDT
NYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREGYIVYWGOGTLVTVSAAKTPPSVYPL

[0410] 2.8抗体克隆6-1-6用于N3pE ELISA

[0411] 针对定量限度((LOQ))和信噪比(S/N)测试了最终的N3pE ELISA方案。ELISA标准曲线示于图8。

[0412] 标准曲线形状对于低浓度范围看起来非常好,这显示出吸光度的近乎线性依赖。基于这个标准曲线,确定LOQ为3.125pg/ml, S/N=1.3。

[0413] 2.9经ELISA和SPR分析的交叉反应性的研究

[0414] ELISA:

[0415] 利用我们的N3pE-ELISA确定了对其它Aβ变体的交叉反应性。原始数据示于表4。

[0416] 表4:用克隆6-1-6进行N3pE-ELISA的原始数据:交叉反应性的测试

[0417]

浓度(pg/ml)	pE3-40(28.04.)	pE3-40(21.04.)	2-40	3-40	4-40	1-42	3-42	pE11-40
800	1.8280	1.806	0.048	0.090	0.055	0.053	0.052	0.047
400	0.8750	0.912	0.045	0.065	0.044	0.048	0.052	0.044
200	0.4350	0.484	0.044	0.057	0.046	0.048	0.049	0.048
100	0.2290	0.248	0.045	0.052	0.045	0.047	0.050	0.048
50	0.1330	0.143	0.044	0.048	0.044	0.050	0.045	0.045
25	0.0820	0.086	0.044	0.046	0.044	0.048	0.047	0.048
12.5	0.0570	0.063	0.039	0.042	0.040	0.043	0.042	0.046
0	0.0410	0.040	0.038	0.065	0.061	0.059	0.063	0.066

[0418] 仅对于AβpE3-40观测到了吸光度对浓度的依赖。除了Aβ3-40,所有测试的Aβ变体表现出的交叉反应性低于1%。800pg/ml的信号(由空白校正)是AβpE3-40信号的约2.7%。这是非常好的值,考虑到两种肽的N-末端具有相同氨基酸,除了第一个氨基酸以外,其在AβpE3-40的情况中是环化的。总体上,通常用于ELISA的Aβ N3pE抗体克隆6对于起始自位置3的pGlu的Aβ-肽的N末端具有非常高的特异性。

[0419] SPR:

[0420] 克隆6-1-6和24-2-3对其它非Aβ pGlu肽的交叉反应性通过表面等离子体共振进行分析。与表现出典型的结合传感图的AβpE3-40不同,所有其它测试的pGlu肽分别显示几乎不与克隆6-1-6和24-2-3相互作用,还参见图9(仅示出克隆6-1-6的数据)。将pGlu肽的传感图与AβpE3-40的传感图相比较。估计的交叉反应性均低于1%。所有分析的肽的总结于表5。

[0421] 表5:克隆6-1-6和24-2-3对其它pGlu肽的估计的交叉反应性

[0422]

pGlu肽	%交叉反应性
MCP-1	<1
MCP-2	<1
大促胃液素	<1

促性腺激素释放激素	<1
神经降压肽	<1
食欲肽A	<1
纤连蛋白	<1
胶原蛋白1	<1
TRH	<1

[0423] 所有实验均证实这一事实,即N3pE抗体克隆6-1-6和24-2-3对AβpE3-x的N末端表位是特异性的。未识别其它pGlu N末端,也未识别不携带N末端pE残基的其它Aβ肽变体。

[0424] 2.10用于脑分析的N3pE ELISA的优化和验证

[0425] 根据所用方法分析了小鼠脑干中的AβpE3-42浓度。样品源自在脑中过表达人AβQ3-42的转基因小鼠(tg),所述人AβQ3-42经QC环化为AβpE3-42。比较了来自杂合转基因小鼠(tg het)和纯合转基因小鼠(tg hom)以及来自野生型非转基因小鼠(wt)的样品。用于产生样品的小鼠如W02009034158所述产生。

[0426] 对于所有进一步实验,将样品和标准品在EIA缓冲液中稀释。在下一步骤中,将用于分析甲酸级分样品的中和方法优化,即中和是N3pE ELISA。所得的及本文开发的N3pE ELISA运行良好,其检测到tg hom小鼠脑中人AβpE3-42的显著水平、tg het小鼠脑中人AβpE3-42的显著较低水平以及wt小鼠脑中无人AβpE3-42(参见图10)。

[0427] 本发明的ELISA递送高信号及因此的非常可接受的LOQ,因此适合用于分析甲酸样品,特别是甲酸脑样品。

[0428] 2.11 N3pE抗体克隆用于免疫组织化学

[0429] 使用本发明的N3pE抗体,将患者脑切片中的AβpE3-x染色,所述患者处于散发性阿尔茨海默病(SAD)和家族形式的阿尔茨海默病(FAD)的晚期阶段,即携带衰老基因1(PS1)中的突变的患者。染色的脑切片示于图11。图11示出本发明的N3pE抗体适合于免疫组织化学。所述抗体特异性地检测SAD和FAD患者脑中的pGlu-Aβ。N3pE抗体在图像中无背景信号,这证实了由ELISA和SPR分析所示的特异性结合。

[0430] 3.保藏

[0431] 产生了特异性识别Aβ N3pE-x的单克隆抗体。目前所有表达相应单克隆抗体的杂交瘤细胞系5-5-6、6-1-6、17-4-3和24-2-3已根据布达佩斯条约保藏在Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen(DSMZ)in Braunschweig,DE,保藏日为2008年6月17日,各自的保藏号为

(克隆 5-5-6): DSM ACC2923

(克隆 6-1-6): DSM ACC2924

[0432] (克隆 17-4-3): DSM ACC2925

(克隆 24-2-3): DSM ACC2926

[0433] 可以证实这些抗体对它们各自的靶序列的特异性。对于Aβ N3pE-x,可以鉴定高亲和力和抗体克隆,它们在ELISA设定中应当给出强信号,并且具有低pg范围的预期检测限度。

[0434] 4.总结

[0435] 本发明的主要目的是建立高度灵性及强力的检测技术,其使得可以定量确定生物

学样品中的A β 变体。

[0436] 优选地,应当开发基于ELISA的技术。该任务以A β N3pE ELISA开始,因为对于该A β 变体,已经可以商购合适的ELISA系统(ABL)。该系统用作参考及内部质量控制。

[0437] 研究了pGlu-6166抗体在选择的ELISA测定设定中的实用性。为获得清晰的可测量信号,需要实施高抗体浓度(20 μ g/ml)。可以鉴定高亲和力A β N3pE-x抗体克隆。用这些克隆可以实现低pg范围(3-8pg/ml)的检测限度。

序列表

<110> 前体生物药物股份公司

<120> 诊断抗体测定

<130> PBD00070/WO

<150> US 61/082,309

<151> 2008-07-21

<160> 65

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

<210> 3

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly
35

<210> 4

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

[0001]

<400> 4

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val
 1 5 10 15

Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu
 20 25 30

Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

<210> 5

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val
 1 5 10 15

Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu
 20 25 30

Met Val Gly Gly Val Val
 35

<210> 6

<211> 36

<212> PRT

<213> Homo sapiens

[0002] <400> 6

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val
 1 5 10 15

Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu
 20 25 30

Met Val Gly Gly
 35

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu
 1 5 10

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His
 1 5 10

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Isoaspartate

<400> 9

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His
1 5 10

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His
1 5 10

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln
1 5 10

[0003]

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> pyroglutamate

<400> 12

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln
1 5 10

<210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10

<210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
1 5 10

<210> 15
<211> 13

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5 10

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> pyroglutamate

<400> 16
Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5 10

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5 10

[0004] <210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> isoaspartate

<400> 18
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His
1 5 10

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> isoaspartate

<400> 19
Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe
1 5 10

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly
1 5 10

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly
1 5 10

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
1 5 10

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 23
atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg

30

[0005]

<210> 24
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 24
atggagwcag acacactcct gytatgggtg

30

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 25
atgagtgtgc tcactcaggt cctggsgttg

30

<210> 26
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 26
atgaggrccc ctgctcagwt tyttggmwtc ttg

33

<210> 27
<211> 30

[0006]	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> PCR primer	
	<400> 27	
	atggatttgc aggtgcagat twtcagcttc	30
	<210> 28	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> PCR primer	
	<400> 28	
	atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrgg	27
	<210> 29	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> PCR primer	
	<400> 29	
	atgggcwtea agatggagtc acakwyycwg g	31
	<210> 30	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> PCR primer	
	<400> 30	
	atgtggggay ctkittyemm tttttcaatt g	31
	<210> 31	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> PCR primer	
	<400> 31	
	atggtrtccw casctcagtt ccttg	25
	<210> 32	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> PCR primer	
	<400> 32	
	atgtatatat gtttgtgtgc tatttct	27
	<210> 33	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> PCR primer	

	<400> 33 atggaagccc cagctcagct tctcttcc	28
	<210> 34 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial sequence	
	<220> <223> PCR primer	
	<400> 34 actggatggt gggaagatgg	20
	<210> 35 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial sequence	
	<220> <223> PCR primer	
	<400> 35 atgaaatgca gctggggcat sttcttc	27
	<210> 36 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial sequence	
	<220> <223> PCR primer	
[0007]	<400> 36 atgggatgga gctrtatcat sytctt	26
	<210> 37 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial sequence	
	<220> <223> PCR primer	
	<400> 37 atgaagwtgt ggttaaactg ggttttt	27
	<210> 38 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial sequence	
	<220> <223> PCR primer	
	<400> 38 atgractttg ggytcagctt grttt	25
	<210> 39 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial sequence	
	<220> <223> PCR primer	
	<400> 39 atggactcca ggctcaattt agttttcctt	30

	<210> 40	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> PCR primer	
	<400> 40	
	atggcttgtc ytrgsgctrc tctctgc	28
	<210> 41	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> PCR primer	
	<400> 41	
	atggratgga gckggrtctt tmtctt	26
	<210> 42	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> PCR primer	
	<400> 42	
	atgagagtgc tgattctttt gtg	23
[0008]	<210> 43	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> PCR primer	
	<400> 43	
	atggmttggg tgtggamcitt gctattcctg	30
	<210> 44	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> PCR primer	
	<400> 44	
	atgggcagac ttacattctc attcctg	27
	<210> 45	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
	<223> PCR primer	
	<400> 45	
	atggattttg ggetgatttt ttttattg	28
	<210> 46	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	

	<220>		
	<223>	PCR primer	
	<400>	46	
		atgatgggtgt taagtcttct gtacctg	27
	<210>	47	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial sequence	
	<220>		
	<223>	PCR primer	
	<400>	47	
		cagtggatag acagatgggg g	21
	<210>	48	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial sequence	
	<220>		
	<223>	PCR primer	
	<400>	48	
		cagtggatag actgatgggg g	21
	<210>	49	
	<211>	436	
	<212>	DNA	
	<213>	Mus musculus	
[0009]	<400>	49	
		atggtgtcct cagctcagtt cctgtttctg ttagtgctct ggattcagga aaccaacggt	60
		gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcggta ccattggaca accagcctct	120
		atctcttgca agtcaagtca gaggctctta tatagtgatg gaaaaaccta ttggaattgg	180
		ttattacaga ggccaggcca gtctccaatg cgcctaactc atctgggtgc taaactggac	240
		tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaaaatc	300
		agcagagtgg aggctgagga ttggggagtt tattactgcg tgcaaggta acattttcca	360
		ttcacgttcg gctcggggac aaagtggaa ataaaacggg ctgatgctgc accaactgta	420
		tccatcttcc caccat	436
	<210>	50	
	<211>	145	
	<212>	PRT	
	<213>	Mus musculus	
	<400>	50	
		Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Gln	
		1 5 10 15	
		Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser	
		20 25 30	
		Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser	
		35 40 45	
		Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg	
		50 55 60	

Pro Gly Gln Ser Pro Met Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Val Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
130 135 140

Pro
145

<210> 51
<211> 440
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 51
atgggatgga gcggggtcctt tctcttcttc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccactctgag 60
gtccagctgc aacagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gagcttcaat gaagatatcc 120
tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tataccatga actgggtgaa gcagagccat 180
ggaaagaacc ttgagtggat tggacttatt aatccttaca gtggtgttac taggtacaac 240
[0010] cagaaattca agggcaaggc cacattaatt gtagacaagt catccagcac agcctacatg 300
gagctcctca gtctgacatc tgaggactct gcagtctatt attgtacaag agaggctaaa 360
cgggagtgagg acgagactta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgcagccaaa 420
acgacacccc catctgtcta 440

<210> 52
<211> 146
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 52

Met Gly Trp Ser Gly Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Val Thr Arg Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ile Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Ala Lys Arg Glu Trp Asp Glu Thr Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro
130 135 140

Ser Val
145

<210> 53
<211> 440
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 53
atggtgtcca cagctcagtt cctgtttctg ttagtgcctt ggattcagga aaccaacggt 60
gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcctct 120
atctcttgca agtcaagtca gagectctta tatagtgaag gaaaaacctt ttgaattgg 180
ttattacaga ggccaggcca gtctccaatg cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 240
tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaaaatc 300
agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattactgcg tgcaaggta acattttcca 360
ttcacgttcg gctcggggac aaagtggaa ataaaacggg ctgatgctgc accaactgta 420
tccatcttcc caccatccag 440

[0011]

<210> 54
<211> 146
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 54

Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Gln
1 5 10 15

Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
20 25 30

Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Met Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Val Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser
145

<210> 55
<211> 447
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 55
atgggatgga ggggggtctt tatcttcctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccactctgag 60
gtccagctgc aacagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gagcttcaat gaagataacc 120
tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tacaccatga actgggtgaa gcagagccat 180
ggaaagaacc ttgagtggat tggacttatt aatccttaca atggtgttac taggtacaac 240
cagaagtcca agggcaagge cacattaatt gtagacaagt catccagcac agcctacatg 300
gagctcctca gtctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtacaag agaggctaaa 360
cgggagtggg acgagactta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgcagccaaa 420
acgacacccc catctgtcta tccactg 447

<210> 56
<211> 149
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 56

[0012]

Met Gly Trp Ser Gly Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Val Thr Arg Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ile Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Ala Lys Arg Glu Trp Asp Glu Thr Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro
130 135 140

Ser Val Tyr Pro Leu

145

<210> 57
 <211> 438
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 57
 atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg gtgttctgga ttctgtttc cagcagtgat 60
 gttgtgatga cccagactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttcagat ctagtcagag ccttgtacac agtgatggaa acacctattt acattggtae 180
 ctgcagaage caggccagtc tccaaagctc ctgatetaca aagtttccaa cegattttct 240
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtggg tcagggacag atttcacact caagatcage 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgtcttc aaagtacaca tgttcctcgc 360
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgggctg atgtgcacc aactgtatcc 420
 atcttcccac cctccagt 438

<210> 58
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 58

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Val Phe Trp Ile Pro Val
 1 5 10 15

[0013]

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

Ser Ser
 145

<210> 59
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 59
 atggactttg ggctcagctt acttattttt gtccttattt taaaagggtg ccagtgtgag 60
 gtgaagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gaggggcccg gaaactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac tttcagtac tacggaatgg cgtgggttcg acaggtccca 180
 gggaaggggc ctgagtgggt agcattcatt agtaatttgg catatagtat ctactatgca 240
 gacactgtga cgggccgatt caccatctct agagagaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 gaaatgagca gtctgaggtc tgaggacaca gccatgtact actgtgcaag gtatgactac 360
 gataatatct tggactatgt tatggactac tggggtcagg gaacctcagt caccgtctcc 420
 tcagccaaaa caacaccccc atcagtctat ccactg 456

<210> 60
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 60

Met Asp Phe Gly Leu Ser Leu Leu Ile Phe Val Leu Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

[0014] Ser Asp Tyr Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro
50 55 60

Glu Trp Val Ala Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Thr Val Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Asp Asn Ile Leu Asp Tyr Val Met
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
130 135 140

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
145 150

<210> 61
 <211> 432
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 61
 atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctc tggattcagg aaaccaaggg tgatgttgtg 60
 ctgaccaga ctccactcac ttgtcggtt accattggac aaccagctc tatctcttgc 120
 aagtcaagtc agagcctctt atatagtaat ggaaaaacct atttgaattg gttattacag 180

```

aggccaggcc agtctccaaa ggcctaatc tatgtggtgt ctaaactgga ctctggagtc      240
cctgacaggt tcactggcag tggatcagga acagatttta caetgaaaat cagcagagtg      300
gaggetgagg atttgggagt ttattattgc gtgcaaggta cacattttcc attcacgttc      360
ggctcgggga caaagtigga aataaaacgg getgatgctg caccaactgt atccatcttc      420
ccaccatcca gt                                                              432

```

<210> 62
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 62

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Trp Ile Gln Glu Thr Lys
 1 5 10 15

Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile
 20 25 30

Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr
 35 40 45

Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln
 50 55 60

Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Val Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val
 65 70 75 80

[0015]

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 85 90 95

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln
 100 105 110

Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
 130 135 140

<210> 63
 <211> 435
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 63

```

atgggatgga gcggggtctt tetcttcttc ctgtcagtaa ctgaagggtt ccactcccag      60
gttcagctgc agcagtcctg ggcctgagct gtgaggcctg ggtcctcagt gaagatttcc      120
tgcaaggctt ctggctatat attcaataac tactggataa actgggtgaa gcagaggcct      180
ggtcagggtc ttgagtggat tggacagatt tatectggag atggtgatac taactacaat      240
gggaagttca aggttaaage cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg      300
cagctcagca gcctaacatc tgaggactct gcggtctatt tctgtgcaag agagggatat      360
attgtttatt ggggccaaag gactctggtc actgtctctg cagccaaaac gacaccccac      420
tctgtctatc cactg                                                            435

```

<210> 64
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 64

Met Gly Trp Ser Gly Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Glu Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe
 35 40 45

Asn Asn Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

[0016]

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Ile Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
 130 135 140

Leu
 145

<210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> PYRROLIDONE CARBOXYLIC ACID

<400> 65

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Cys
 1 5

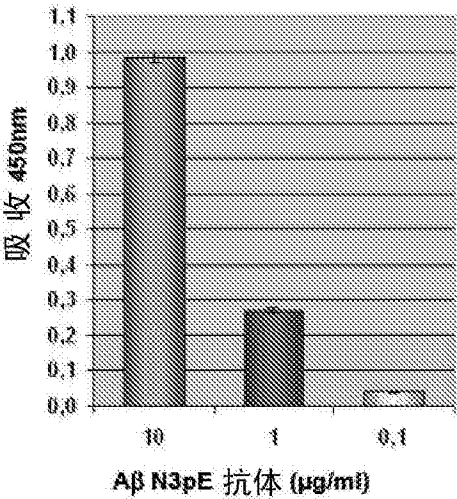


图1A

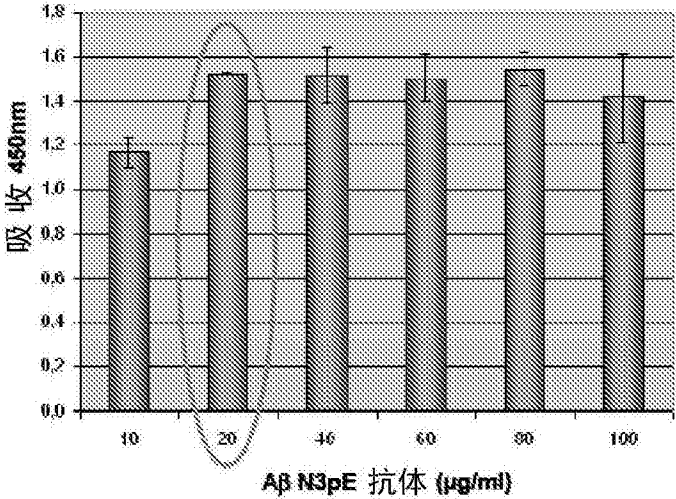


图1B

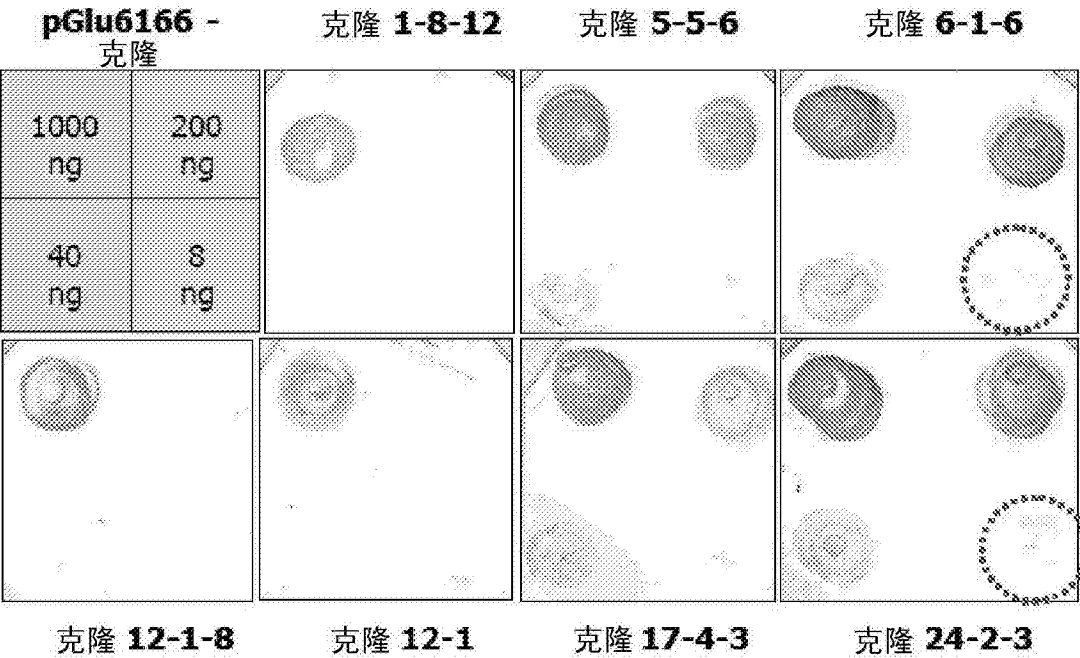


图2

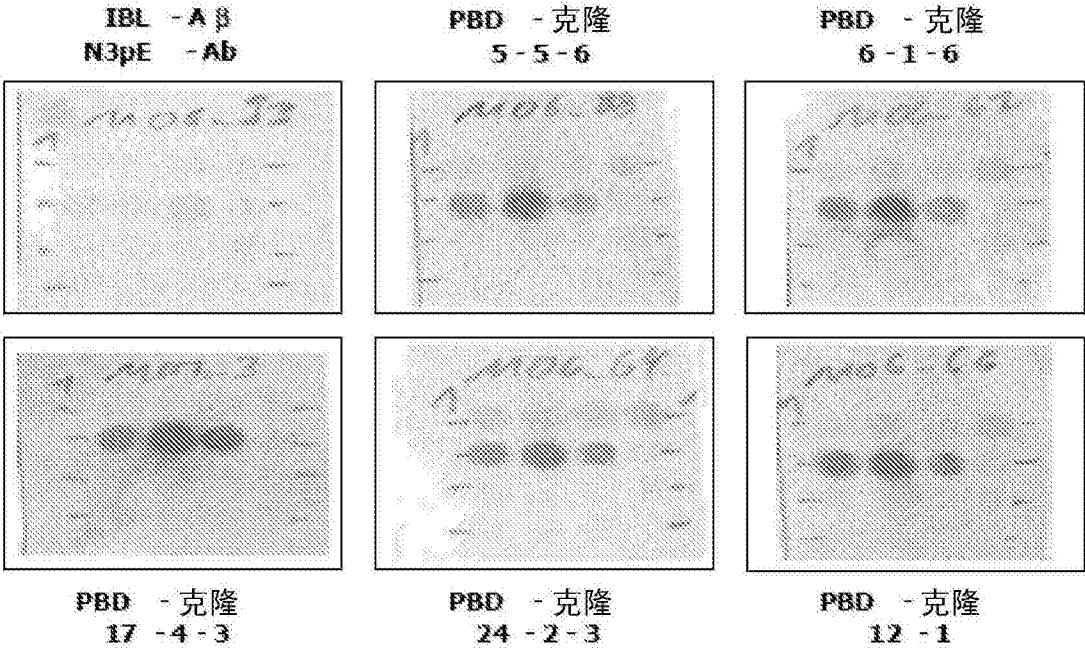


图3

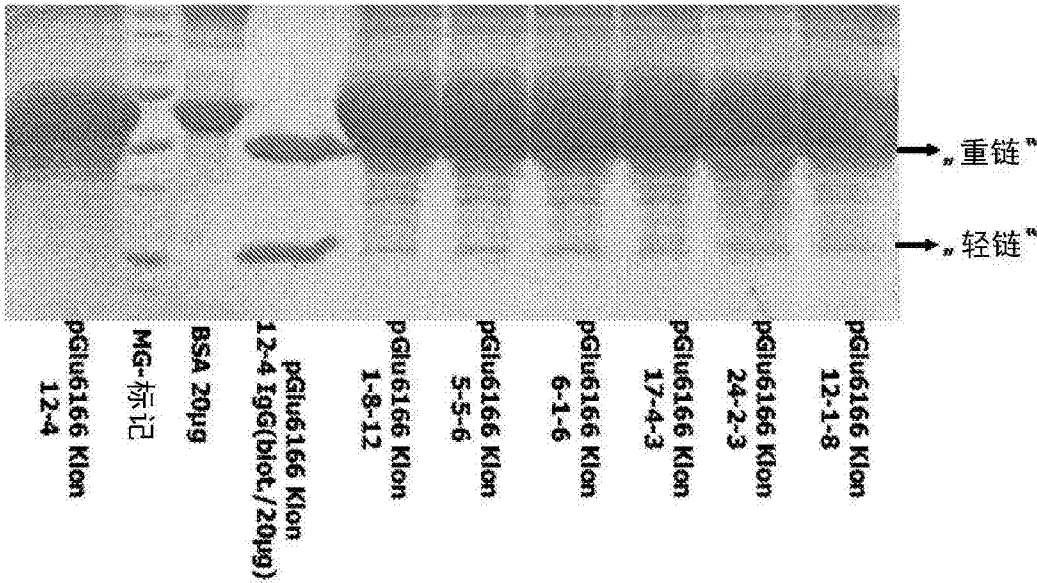


图4

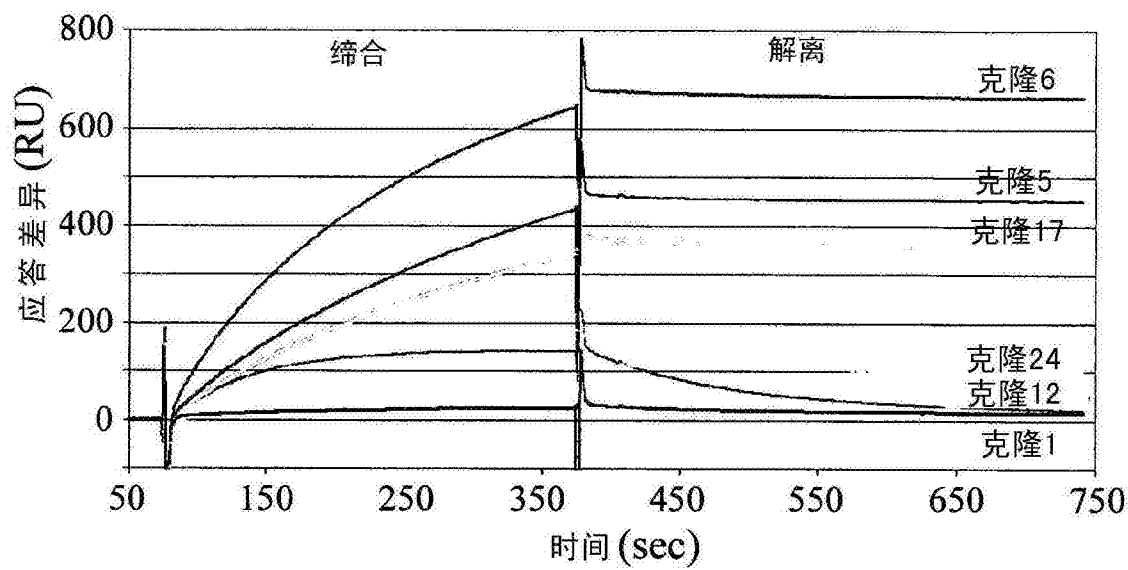


图5

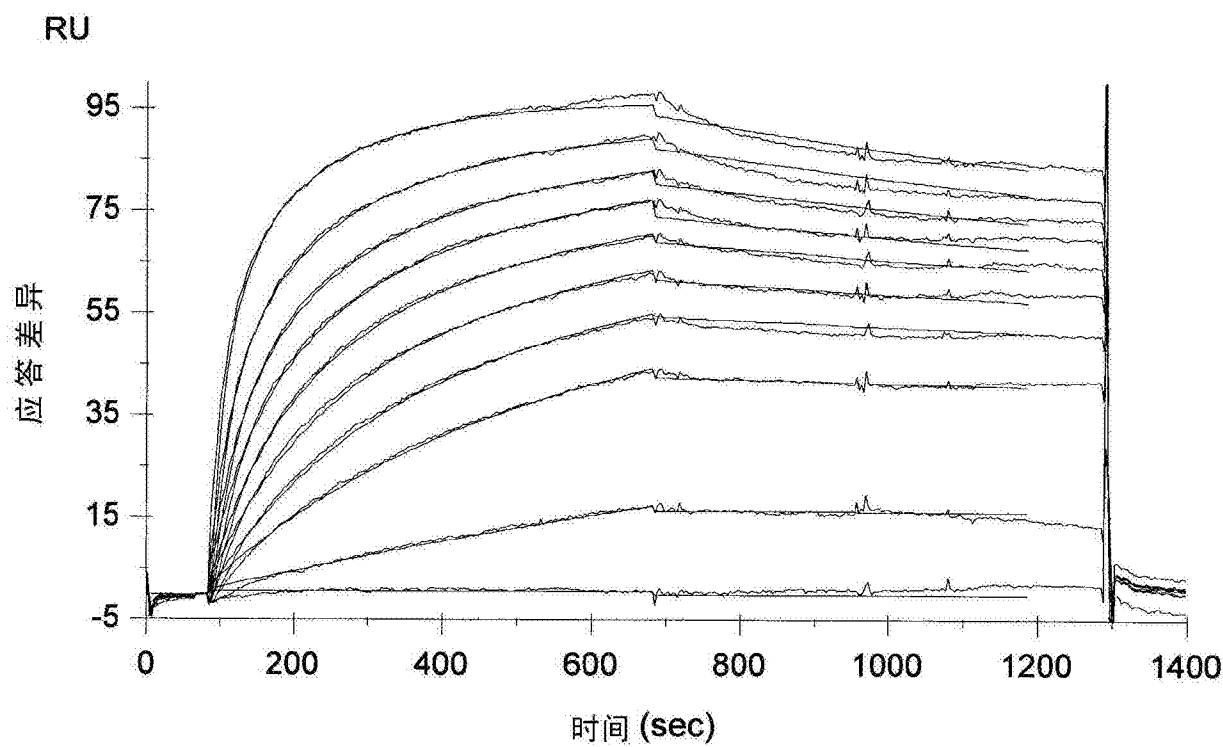


图6

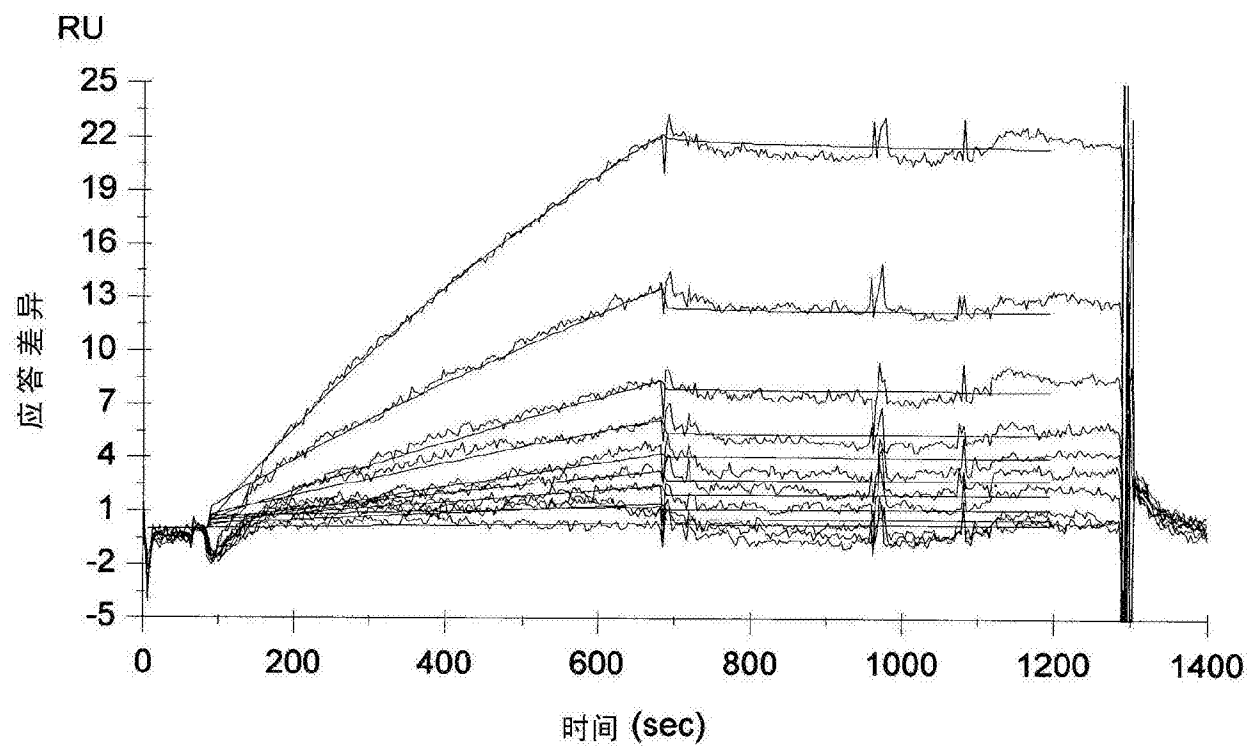


图7

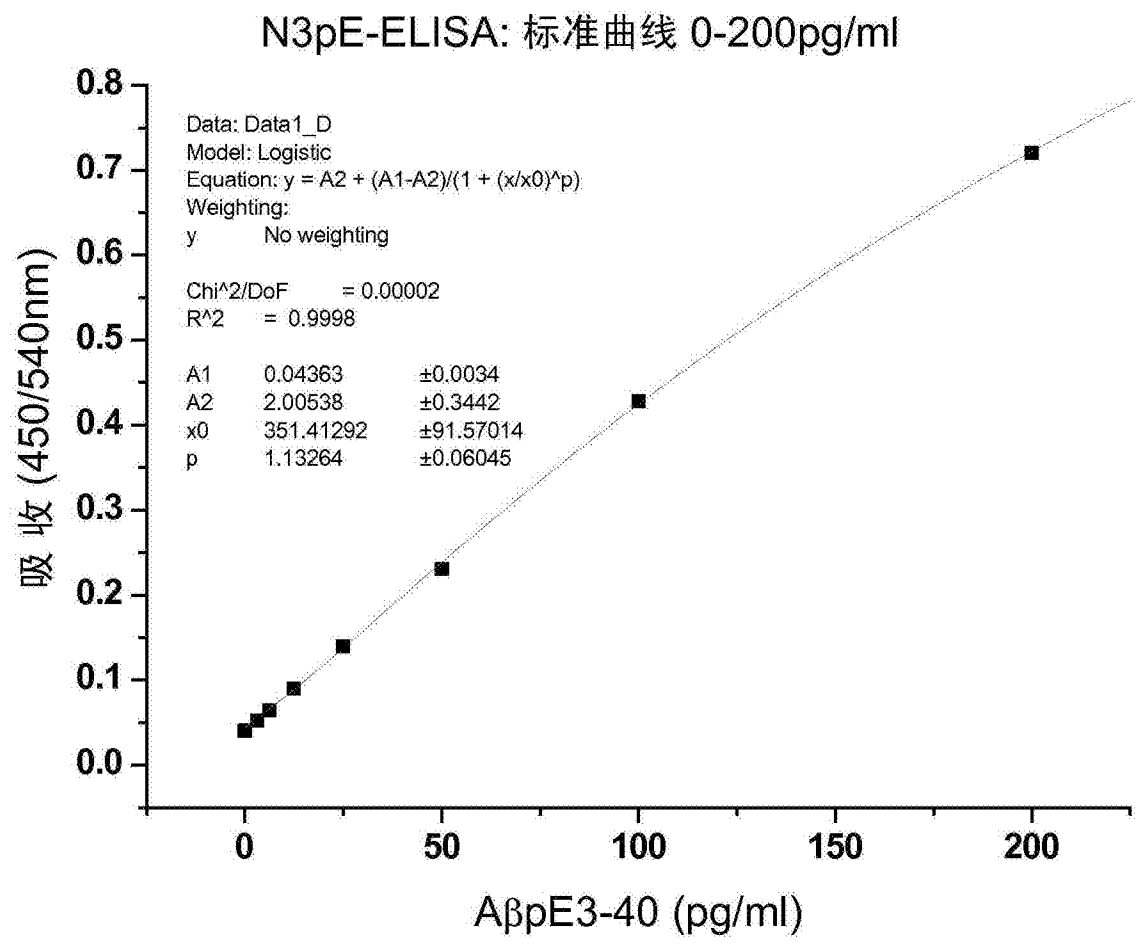


图8

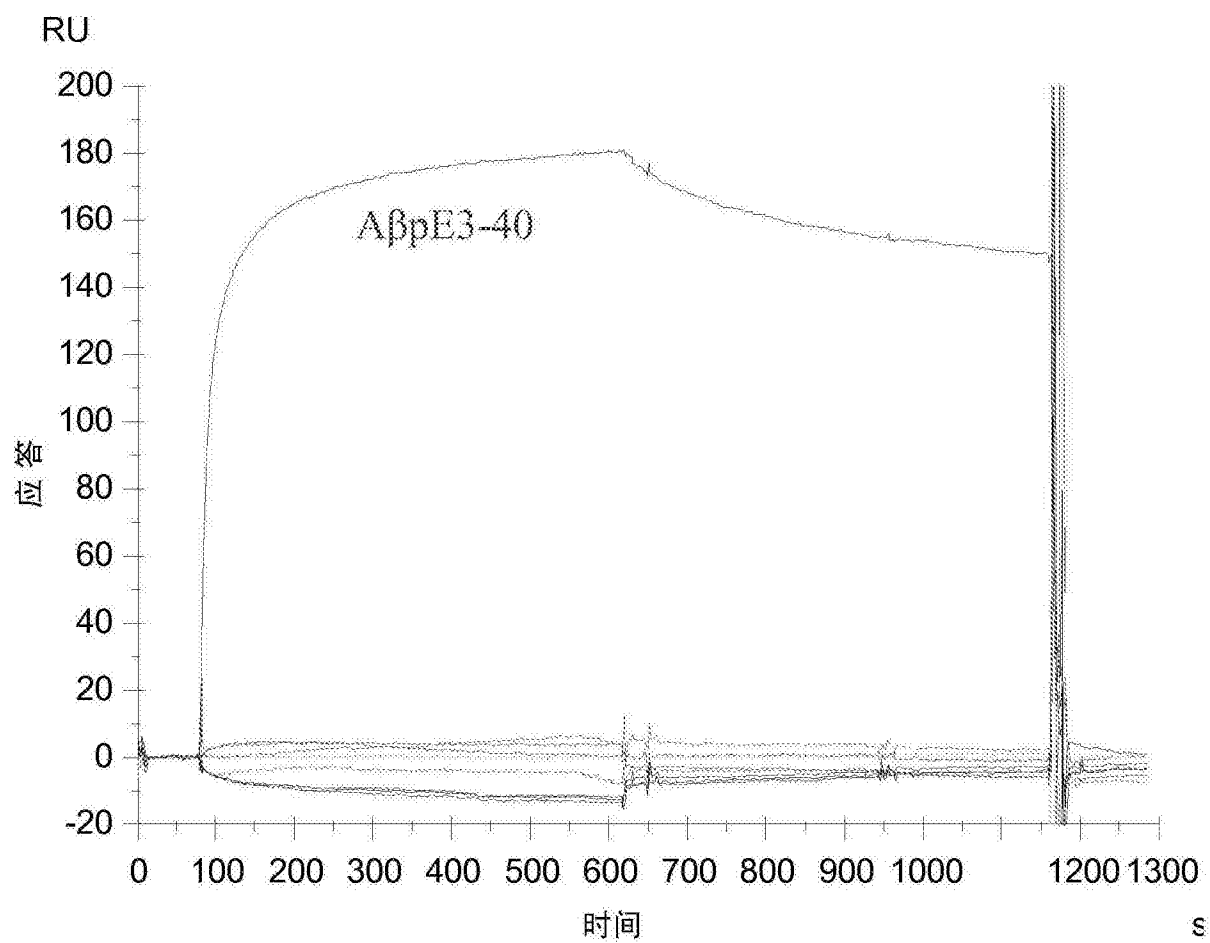


图9

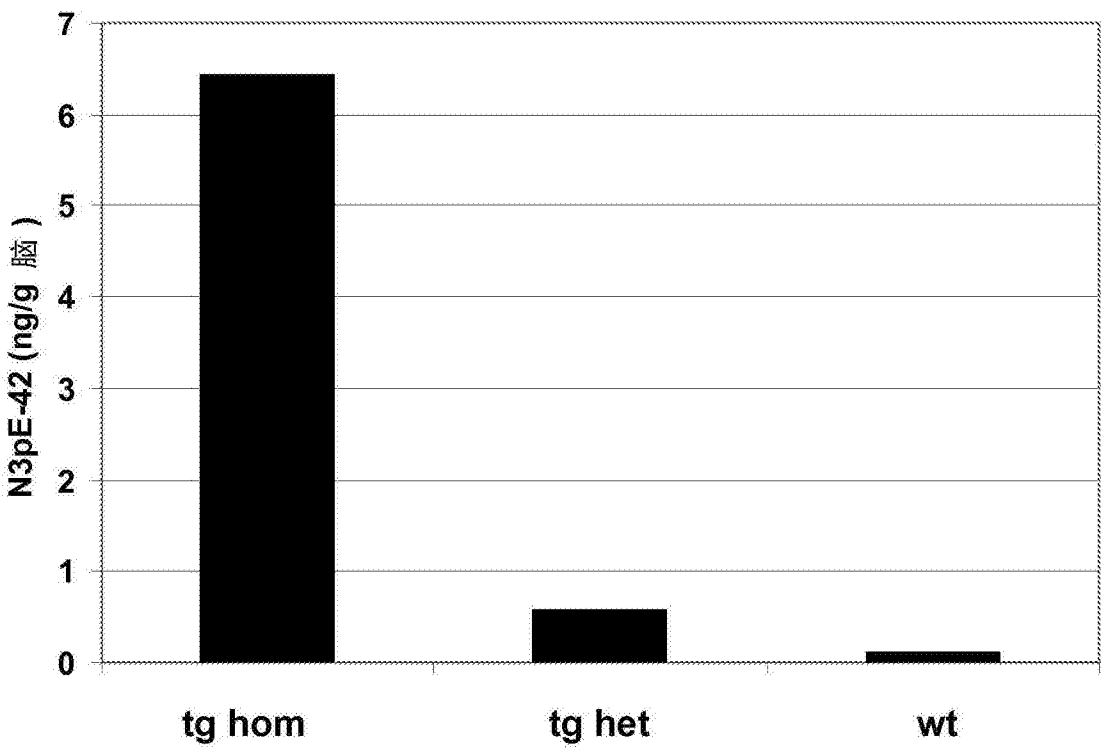


图10

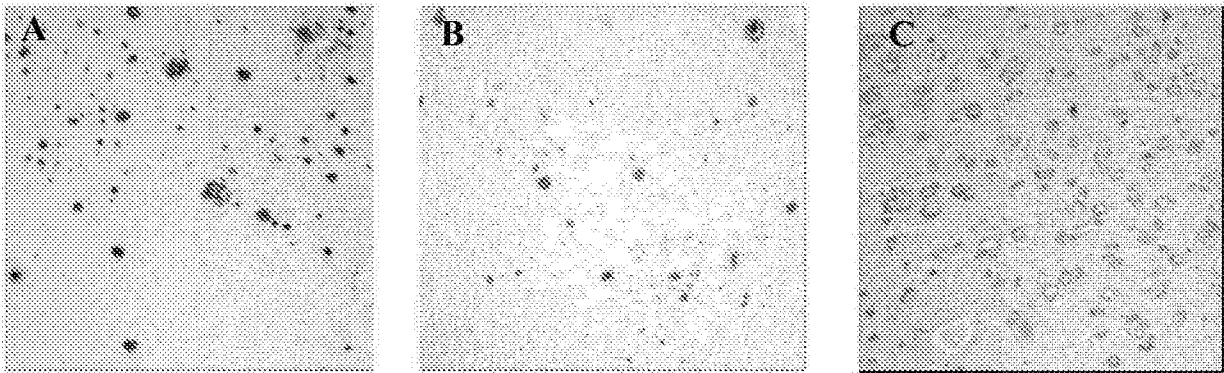


图11

Abstract

The present invention pertains to novel diagnostic assays for the diagnosis of amyloidosis, in particular Alzheimer's disease, and related aspects. In particular, monoclonal antibodies and an antibody assay are provided.