



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104662423 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

---

(21) 申请号 201380021783. 5 (51) Int. Cl.  
(22) 申请日 2013. 03. 13 *G01N 33/53*(2006. 01)  
(30) 优先权数据 *C12P 21/04*(2006. 01)  
61/610, 390 2012. 03. 13 US  
(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2014. 10. 24  
(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2013/031018 2013. 03. 13  
(87) PCT国际申请的公布数据  
W02013/138512 EN 2013. 09. 19  
(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  
(72) 发明人 丹尼尔·基德  
约翰尼斯·鲁尔夫·施特雷费尔  
(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

权利要求书6页 说明书22页

---

(54) 发明名称

阿兹海默氏病的诊断、预后和监测中的寡聚体 A $\beta$

(57) 摘要

本发明提供了用于阿兹海默氏病的诊断、预后和监测的方法。所述方法包括测量从受试者获得的样品中合并的单体和寡聚体 A $\beta$  的量和单体 A $\beta$  的量,并确定比率。所述比率可用于诊断、预后和 / 或监测阿兹海默氏病。

1. 一种辅助阿兹海默氏病或其易感性的诊断、预后或监测的方法,所述方法包括
  - a. 测量来自于受试者的体液样品中单体 A $\beta$  的量;
  - b. 测量来自于所述受试者的第二体液样品中单体和寡聚体 A $\beta$  的量;
  - c. 将所述单体 A $\beta$  的量与单体和寡聚体 A $\beta$  的量进行比较;以及
  - d. 将所述比较用于所述受试者中阿兹海默氏病或其易感性的诊断、预后或监测。
2. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (c) 确定单体 A $\beta$  与单体和寡聚体 A $\beta$  之间的比率,单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的较小的商数,指示了所述受试者的发生所述疾病的更高的易感性、所述疾病存在的更高的可能性或病情的恶化。
3. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (c) 确定单体 A $\beta$  与寡聚体 A $\beta$  之间的比率,单体 A $\beta$  比寡聚体 A $\beta$  的较小的商数,指示了所述受试者的发生所述疾病的更高的易感性、所述疾病存在的更高的可能性或病情的恶化。
4. 权利要求 1 任一项的方法,其中步骤 (c) 确定寡聚体 A $\beta$  的量,寡聚体 A $\beta$  的较高的量,指示了所述受试者的发生所述疾病的更高的易感性、所述疾病存在的更高的可能性或病情的恶化。
5. 权利要求 1-4 任一项的方法,其中步骤 (a) 和 (b) 测量 A $\beta$ <sub>x-37</sub>、A $\beta$ <sub>x-38</sub>、A $\beta$ <sub>x-39</sub>、A $\beta$ <sub>x-40</sub>、A $\beta$ <sub>x-41</sub> 和 A $\beta$ <sub>x-42</sub> 中的至少一个。
6. 权利要求 5 的方法,其中步骤 (a) 和 (b) 至少测量 A $\beta$ <sub>x-40</sub>。
7. 权利要求 5 的方法,其中步骤 (a) 和 (b) 至少测量 A $\beta$ <sub>x-42</sub>。
8. 权利要求 5 的方法,其中步骤 (a) 和 (b) 至少测量 A $\beta$ <sub>x-40</sub> 和 A $\beta$ <sub>x-42</sub>。
9. 权利要求 1-8 任一项的方法,其中单体 A $\beta$  的量使用一种或多种抗体来测量,所述抗体结合一个或多个 C-端表位,所述 C-端表位在单体 A $\beta$  中存在并且在寡聚体 A $\beta$  中不存在或在空间上被阻断。
10. 权利要求 9 的方法,其中所述一种或多种 C-端抗体是一种或多种针对 A $\beta$ <sub>37</sub>、A $\beta$ <sub>38</sub>、A $\beta$ <sub>39</sub>、A $\beta$ <sub>40</sub>、A $\beta$ <sub>41</sub> 或 A $\beta$ <sub>42</sub> 的末端特异性抗体。
11. 权利要求 9 的方法,其中所述一种或多种 C-端抗体包括末端特异性针对 A $\beta$ <sub>40</sub> 的抗体,任选地为抗体 2G3。
12. 权利要求 9 的方法,其中所述一种或多种 C-端抗体包括末端特异性针对 A $\beta$ <sub>42</sub> 的抗体,任选地为抗体 21F12。
13. 权利要求 9 的方法,其中所述一种或多种 C-端抗体包括末端特异性针对 A $\beta$ <sub>40</sub> 的抗体和末端特异性针对 A $\beta$ <sub>42</sub> 的抗体。
14. 权利要求 8-11 任一项的方法,其中所述单体 A $\beta$  通过免疫亲和夹心测定法来测量,所述测定法包括所述一种或多种 C-端抗体和结合 N-端和 / 或中央表位的另一种抗体。
15. 权利要求 14 的方法,其中所述另一种抗体结合 N-端表位,任选地其中所述抗体是 3D6。
16. 权利要求 14 的方法,其中所述另一种抗体结合中央表位,任选地其中所述抗体是 266。
17. 权利要求 14 的方法,其中所述一种或多种 C-端抗体是报告抗体,所述另一种抗体是捕获抗体。
18. 权利要求 14 的方法,其中所述一种或多种 C-端抗体是捕获抗体,所述另一种抗体

是报告抗体。

19. 权利要求 17 或 18 的方法,其中所述一种或多种报告抗体用钆标记,并且所述捕获抗体用生物素标记。

20. 权利要求 1-19 任一项的方法,其中在步骤 (b) 中测量单体和寡聚体 A $\beta$  的量,包括用将寡聚体 A $\beta$  转变成单体 A $\beta$  的解聚试剂处理所述样品,并测定所述解聚试剂处理过的样品中单体 A $\beta$  的量。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述解聚试剂包含盐酸胍、异硫氰酸胍、脲、硫脲、高氯酸锂和 / 或碘化钾。

22. 权利要求 20 的方法,其中所述解聚试剂包含非离子型去污剂。

23. 权利要求 20 的方法,其中所述解聚试剂包含聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、多酚和 / 或六氟异丙醇。

24. 权利要求 20 的方法,其中所述解聚试剂处理过的样品中单体 A $\beta$  的量,通过与步骤 (a) 中用于测量单体 A $\beta$  的量相同的测定法来测量。

25. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (a) 和 (b) 通过定量质谱术来进行。

26. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (a) 和 (b) 通过毛细管或凝胶电泳,然后通过定量蛋白质印迹法来进行。

27. 权利要求 1-26 任一项的方法,其中所述体液样品是 CSF 样品。

28. 权利要求 1-26 任一项的方法,其中所述体液样品是血液样品。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述血液样品是血浆样品。

30. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (a) 和 (b) 同时进行。

31. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (a) 的样品和步骤 (b) 的第二样品是来自于单一样品的不同等份试样。

32. 权利要求 1-30 任一项的方法,其中所述受试者没有认知缺损,并且步骤 (d) 评估所述受试者发生阿兹海默氏病的易感性。

33. 权利要求 1-30 任一项的方法,其中所述受试者具有轻度认知缺损,并且步骤 (d) 评估所述受试者发生阿兹海默氏病的易感性。

34. 权利要求 1-30 任一项的方法,其中所述受试者具有认知缺损,并且步骤 (d) 包括使用步骤 (c) 的比较与所述受试者病症的其他症状和 / 或征兆的组合来提供阿兹海默氏病的诊断。

35. 权利要求 1-30 任一项的方法,其中所述受试者在进行所述方法之前已被诊断为患有阿兹海默氏病,并且步骤 (d) 提供所述疾病阶段的指示。

36. 权利要求 1-30 任一项的方法,其中所述受试者正接受阿兹海默氏病的治疗或预防,并且步骤 (d) 提供所述受试者对治疗的响应的指示。

37. 权利要求 36 的方法,其中所述方法每隔一段时间进行,并且步骤 (c) 的比较随时间的变化提供了对治疗的响应的指示。

38. 权利要求 36 的方法,其中所述受试者正用针对 A $\beta$  的免疫疗法治疗。

39. 权利要求 36 的方法,其中所述受试者正用百平珠单抗治疗。

40. 权利要求 39 的方法,其还包括在进行步骤 (a) 和 (b) 之前,用针对百平珠单抗的抗独特型抗体、任选地用 JH11. 22G2 处理所述样品。

41. 权利要求 1-40 任一项的方法, 其还包括测定所述样品中 Tau 或 P-Tau 的量, 其中 Tau 或 P-Tau 相对于对照值的增加, 提供了所述受试者的发生阿兹海默氏病的易感性、阿兹海默氏病的存在或病情恶化的进一步指示。

42. 权利要求 2 的方法, 其中所述受试者是进入临床试验以测试用于阿兹海默氏病的治疗或预防的药物的候选者, 其中如果所述单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的商数低于阈值, 则所述受试者被包含在所述临床试验中, 如果所述受试者高于所述阈值, 则所述受试者被排除出所述临床试验。

43. 权利要求 1-42 任一项的方法, 其还包括将所述诊断、预后或监测告知所述受试者或所述受试者的护理提供者。

44. 前述权利要求任一项的方法, 其中至少所述方法的步骤 (c) 在计算机中执行。

45. 权利要求 44 的方法, 其中所述计算机接收与单体 A $\beta$  的量以及单体和寡聚体 A $\beta$  的量有关的信号, 将所述信号转变成定量的量, 比较所述定量的量, 并提供与所述量、所述量的比较、所述受试者的情况或所述受试者的推荐治疗有关的输出。

46. 一种确定向群体中的哪些受试者给药药物以进行阿兹海默氏病的预防或治疗的方法, 所述方法包括对所述群体中的每个受试者:

- a. 测量体液样品中单体 A $\beta$  的量;
- b. 测量体液的第二样品中单体和寡聚体 A $\beta$  的量; 以及
- c. 将单体 A $\beta$  的量与单体和寡聚体 A $\beta$  的量进行比较,

其中在所述比较的基础上, 所述群体中的受试者接受或不接受药物来治疗阿兹海默氏病或进行阿兹海默氏病的预防。

47. 权利要求 46 的方法, 其中所述比较确定单体 A $\beta$  与单体和寡聚体 A $\beta$  之间的比率, 并且其中单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的商数低于阈值的受试者接受所述药物。

48. 权利要求 46 的方法, 其按照权利要求 1-44 任一项来进行。

49. 一种确定给予群体中的受试者何种治疗方案的方法, 所述方法包括对所述群体中的每个受试者:

- a. 测量体液样品中单体 A $\beta$  的量;
- b. 测量体液的第二样品中单体和寡聚体 A $\beta$  的量; 以及
- c. 将单体 A $\beta$  的量与单体和寡聚体 A $\beta$  的量进行比较,

其中所述受试者的第一子群体用第一治疗方案治疗, 所述受试者的第二子群体用第二治疗方案治疗, 其中在所述第一子群体的受试者和第二子群体的受试者之间, 单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的比率显著不同。

50. 权利要求 49 的方法, 其中所述第一治疗方案包括用于阿兹海默氏病的预防或治疗的药物, 所述第二治疗方案不包括所述药物, 并且所述第一子群体的受试者与所述第二子群体的受试者相比具有较低的单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的比率。

51. 权利要求 49 或 50 的方法, 其中单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的商数在所述第一子群体的受试者中低于阈值, 并且在所述第二子群体的受试者中低于阈值。

52. 权利要求 49-51 任一项的方法, 其按照权利要求 1-44 任一项来进行。

53. 一种对群体中的受试者进行差异治疗的方法, 所述方法包括用第一治疗方案治疗所述受试者的第一子群体, 并用第二治疗方案治疗所述受试者的第二子群体, 其中所述第

一子群体中的受试者和所述第二子群体中的受试者具有显著不同的单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的平均比率。

54. 权利要求 53 的方法,其中所述第一子群体的受试者用预防或治疗阿兹海默氏病的药物治疗,所述第二子群体的受试者不用所述药物治疗,并且与所述第二子群体中的受试者相比,单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的比率,在所述第一子群体的受试者中明显更低。

55. 权利要求 53 或 54 的方法,其中单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的量按照权利要求 1-44 任一项进行测量和比较。

56. 一种确定将群体中的哪些受试者征召到临床试验中的方法,所述方法包括对所述群体中的每个受试者:

- a. 测量体液样品中单体 A $\beta$  的量;
- b. 测量体液的第二样品中单体和寡聚体 A $\beta$  的量;以及
- c. 将单体 A $\beta$  的量与单体和寡聚体 A $\beta$  的量进行比较,

其中在所述比较的基础上,将所述群体中的受试者征召或不征召到所述临床试验中。

57. 权利要求 56 的方法,其中所述比较确定单体 A $\beta$  与单体和寡聚体 A $\beta$  之间的比率,并且其中单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的商数落于阈值之下的受试者被征召到所述临床试验中。

58. 一种诊断试剂盒,其包含:

至少一种末端特异性针对 A $\beta$  37、A $\beta$  38、A $\beta$  39、A $\beta$  40、A $\beta$  41 或 A $\beta$  42 的 C-端抗体;结合 A $\beta$  的 N-端和 / 或中央表位的抗体;以及将寡聚体 A $\beta$  转变成单体 A $\beta$  的解聚试剂。

59. 权利要求 58 的诊断试剂盒,其中所述 C-端抗体末端特异性针对 A $\beta$  40 或 A $\beta$  42。

60. 权利要求 58 的诊断试剂盒,其包含末端特异性针对 A $\beta$  40 的 C-端抗体和末端特异性针对 A $\beta$  42 的 C-端抗体。

61. 一种筛选具有对抗阿兹海默氏病的活性的药剂的方法,所述方法包括:

将阿兹海默氏病的转基因啮齿动物模型与所述药剂相接触;

比较与所述药剂相接触的转基因啮齿动物的体液中单体 A $\beta$  的量与单体和寡聚体 A $\beta$  的量;以及

使用所述比较来确定所述药剂是否具有可用于治疗阿兹海默氏病的活性。

62. 一种分析 A $\beta$  的方法,所述方法包括:

- a. 测量来自于受试者的体液样品中 A $\beta$  的量,其中所述样品没有用解聚试剂处理;
- b. 测量来自于所述受试者的体液样品中 A $\beta$  的量,其中所述样品用解聚试剂处理;并且
- c. 比较在步骤 (a) 和 (b) 中测量的量。

63. 权利要求 62 的方法,其中所述步骤 (a) 和 (b) 中的测量使用末端特异性针对 A $\beta$  的 C-端抗体来进行。

64. 权利要求 62 的方法,其中所述比较确定了步骤 (a) 中的量与步骤 (b) 中的量的比率或步骤 (a) 和步骤 (b) 中的量之间的差。

65. 权利要求 62 的方法,其还包括:

- d. 将所述比率或差用于所述受试者中阿兹海默氏病或其易感性的诊断、预后或监测,

步骤 (a) 中的量比步骤 (b) 中的量的较低商数或步骤 (b) 与步骤 (a) 中的量之间的较高差值, 指示了所述受试者的发生所述疾病的更高的易感性、所述疾病存在的更高的可能性或病情的恶化。

66. 权利要求 62-65 任一项的方法, 其中步骤 (a) 和 (b) 测量  $A\beta_{x-37}$ 、 $A\beta_{x-38}$ 、 $A\beta_{x-39}$ 、 $A\beta_{x-40}$ 、 $A\beta_{x-41}$  和  $A\beta_{x-42}$  中的至少一个。

67. 权利要求 62-65 任一项的方法, 其中步骤 (a) 和 (b) 至少测量  $A\beta_{x-40}$ 。

68. 权利要求 62-65 任一项的方法, 其中步骤 (a) 和 (b) 至少测量  $A\beta_{x-42}$ 。

69. 权利要求 62-65 任一项的方法, 其中步骤 (a) 和 (b) 至少测量  $A\beta_{x-40}$  和  $A\beta_{x-42}$ 。

70. 权利要求 62-65 任一项的方法, 其中  $A\beta$  的量使用一种或多种末端特异性针对  $A\beta_{37}$ 、 $A\beta_{38}$ 、 $A\beta_{39}$ 、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{41}$  或  $A\beta_{42}$  的 C- 端抗体来进行。

71. 权利要求 70 的方法, 其中所述一种或多种 C- 端抗体包括末端特异性针对  $A\beta_{40}$  的抗体和末端特异性针对  $A\beta_{42}$  的抗体。

72. 权利要求 70 或 71 的方法, 其中  $A\beta$  通过免疫亲和夹心测定法来测量, 所述测定法包括所述一种或多种 C- 端抗体和结合 N- 端和 / 或中央表位的另一种抗体。

73. 权利要求 62-72 任一项的方法, 其中所述解聚试剂包含盐酸胍、异硫氰酸胍、脲、硫脲、高氯酸锂和 / 或碘化钾、非离子型去污剂、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、多酚和 / 或六氟异丙醇。

74. 权利要求 62-73 任一项的方法, 其中步骤 (a) 和 (b) 使用相同的测定法来测量  $A\beta$  的量。

75. 权利要求 62-74 任一项的方法, 其中所述体液样品是 CSF 样品或血液样品。

76. 权利要求 62-75 任一项的方法, 其中所述受试者没有认知缺损, 并且步骤 (d) 评估所述受试者发生阿兹海默氏病的易感性。

77. 权利要求 65-75 任一项的方法, 其中所述受试者具有轻度认知缺损, 并且步骤 (d) 评估所述受试者发生阿兹海默氏病的易感性。

78. 权利要求 65-75 任一项的方法, 其中所述受试者具有认知缺损, 并且步骤 (d) 包括使用步骤 (c) 的比较与所述受试者病症的其他症状和 / 或征兆的组合来提供阿兹海默氏病的诊断。

79. 权利要求 65-75 任一项的方法, 其中所述受试者在进行所述方法之前已被诊断为患有阿兹海默氏病, 并且步骤 (d) 提供所述疾病阶段的指示。

80. 权利要求 65-75 任一项的方法, 其中所述受试者正接受阿兹海默氏病的治疗或预防, 并且步骤 (d) 提供所述受试者对治疗的响应的指示。

81. 权利要求 80 的方法, 其中所述方法每隔一段时间进行, 并且步骤 (c) 中的比较随着时间的变化提供了对治疗的响应的指示。

82. 权利要求 80 或 81 的方法, 其中所述受试者正用针对  $A\beta$  的免疫疗法治疗。

83. 权利要求 82 的方法, 其中所述受试者正用百平珠单抗治疗。

84. 权利要求 83 的方法, 其还包括在进行步骤 (a) 和 (b) 之前, 用针对百平珠单抗的抗独特型抗体、任选地用 JH11. 22G2 处理所述样品。

85. 权利要求 62-84 任一项的方法, 其还包括测定所述样品中 Tau 或 P-Tau 的量, 其中 Tau 或 P-Tau 相对于对照值的增加, 提供了所述受试者的发生阿兹海默氏病的易感性、阿兹

海默氏病的存在或病情恶化的进一步指示。

86. 权利要求 62-85 任一项的方法, 其还包括将所述诊断、预后或监测告知所述受试者或所述受试者的护理提供者。

87. 权利要求 62 的方法, 其在群体中的受试者上进行, 其中所述受试者的第一子群体用第一治疗方案治疗, 所述受试者的第二子群体用第二治疗方案治疗, 并且与所述第二子群体的受试者相比, 在步骤 (a) 中测量的 A $\beta$  的量比在步骤 (b) 中测量的 A $\beta$  的量的比率, 在所述第一子群体的受试者中明显更低。

88. 权利要求 87 的方法, 其中所述第一治疗方案包括用于阿兹海默氏病的预防或治疗的药物, 所述第二治疗方案不包括所述药物。

89. 权利要求 87 或 88 的方法, 其中在步骤 (a) 中测量的 A $\beta$  的量比在步骤 (b) 中测量的 A $\beta$  的量的比率, 在所述第一子群体的受试者中低于阈值, 并且在所述第二子群体的受试者中高于所述阈值。

## 阿兹海默氏病的诊断、预后和监测中的寡聚体 A $\beta$

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是非临时性的,并要求 2012 年 3 月 13 日提交的 61/610,390 的利益,在此为所有目的以其整体通过参考并入本文。

### 背景技术

[0003] 阿兹海默氏病 (AD) 是引起老年痴呆症的渐进性疾病 (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,该疾病分为两类:在老年 (65+ 岁) 发生的迟发型,以及在老年期之前、即 35 至 60 岁之间充分显露的早发型。在这两种类型的疾病中,病理学相同,但是在较早年龄开始的病例中异常情况趋于更严重且广泛。AD 以淀粉样斑块、神经元纤维缠结和脑神经元丧失为特征。神经元纤维缠结是微管结合性 Tau 蛋白的细胞内沉积物,其由相互缠绕成对的两条细丝构成。淀粉样斑块是跨度高达 150  $\mu\text{m}$  的无序神经纤维网区域,在中心处具有细胞外淀粉样沉积物,其可以通过大脑组织切片的显微镜分析看到。早发型阿兹海默氏病与尤其是 APP 或早衰蛋白基因中的遗传突变以及唐氏综合征中 21 号染色体的三倍体性相关。

[0004] 淀粉样斑块的首要组成成分是被称为 A $\beta$  的肽。A $\beta$  由大的跨膜糖蛋白、即淀粉样前体蛋白 (APP) 的蛋白水解加工产生。A $\beta$  的长度为 39 至 43 个氨基酸不等。优势形式 A $\beta$  40 长为 40 个氨基酸,并被认为是短形式。第二常见的形式 A $\beta$  42 长为 42 个氨基酸,并被认为是长形式。A $\beta$  42 与致病力相关,并且是神经炎斑块 (90%) 和实质血管沉积物 (75%) 中的主要组成成分。Roher 等, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 90:10836 (1993)。A $\beta$  的羧基端包括 APP 的疏水跨膜结构域的一部分,这可以解释它聚集成形成斑块的纤丝的倾向性。

[0005] A $\beta$  的渐进性脑沉积可以发生在认知症状之前数年或甚至数十年 (Selkoe, J. Neuropath. and Exp. Neurol. 53:438 (1994) 和 Selkoe, Neuron 6:487 (1991))。通过在认知症状出现之前检测淀粉样斑块的形成和 / 或与疾病相关的其他生理异常的测定法,可以便于 AD 的治疗和预防。大脑活组织检查是高度侵入性的并因此是不想要的,尤其是在未表现出认知症状的受试者中。已报道,淀粉样沉积物的体内成像是大脑活组织检查的可替代方案 (WO11/106732),但是成像技术需要复杂且昂贵的设备,并需要专业人员来解释图像。

[0006] 另一种方法是检测组织样品、尤其是体液中的生物标志物。已报道与健康对照相比,在患有 AD 的受试者的脑脊液 (CSF) 中可溶性 A $\beta$  42 的水平较低。已报道由神经元细胞损伤所释放的另一种生物标志物 Tau, 在 AD 患者的 CSF 中升高 (Vandermeeren 等, J. Neurochem. 61:1828 (1993))。已提出将可溶性 A $\beta$  和 / 或可溶性 Tau 的测量用于诊断和监测 AD (参见例如美国专利号 7,700,309)。然而,在非 AD 和 AD 受试者中,这些生物标志物的范围重叠,引起假阴性和假阳性。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了辅助阿兹海默氏病或其易感性的诊断、预后或监测的方法。这样的

方法包括：(a) 测量来自于受试者的体液样品中单体 A $\beta$  的量；(b) 测量来自于所述受试者的第二体液样品中单体和寡聚体 A $\beta$  的量；(c) 将所述单体 A $\beta$  的量与单体和寡聚体 A $\beta$  的量进行比较；以及 (d) 将所述比较用于所述受试者中阿兹海默氏病或其易感性的诊断、预后或监测。某些方法确定单体 A $\beta$  与单体和寡聚体 A $\beta$  之间的比率，单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的较小的商数，指示了所述受试者的发生所述疾病的更高的易感性、所述疾病存在的更高的可能性或病情的恶化。某些方法确定单体 A $\beta$  与寡聚体 A $\beta$  之间的比率，单体 A $\beta$  比寡聚体 A $\beta$  的较小的商数，指示了所述受试者的发生所述疾病的更高的易感性、所述疾病存在的更高的可能性或病情的恶化。某些方法确定寡聚体 A $\beta$  的量，寡聚体 A $\beta$  的较高的量，指示了所述受试者的发生所述疾病的更高的易感性、所述疾病存在的更高的可能性或病情的恶化。

[0009] 某些方法测量 A $\beta$  x-37、A $\beta$  x-38、A $\beta$  x-39、A $\beta$  x-40、A $\beta$  x-41 和 A $\beta$  x-42 中的至少一个。某些方法至少测量 A $\beta$  x-40。某些方法至少测量 A $\beta$  x-42。某些方法至少测量 A $\beta$  x-40 和 A $\beta$  x-42。

[0010] 在某些方法中，单体 A $\beta$  的量使用一种或多种抗体来测量，所述抗体结合一个或多个 C-端表位，所述 C-端表位在单体 A $\beta$  中存在并且在寡聚体 A $\beta$  中不存在。在某些方法中，所述一种或多种 C-端抗体是一种或多种针对 A $\beta$  37、A $\beta$  38、A $\beta$  39、A $\beta$  40、A $\beta$  41 或 A $\beta$  42 的末端特异性抗体。在某些方法中，所述一种或多种 C-端抗体包括末端特异性针对 A $\beta$  40 的抗体，任选地为抗体 2G3。在某些方法中，所述一种或多种 C-端抗体包括末端特异性针对 A $\beta$  42 的抗体，任选地为抗体 21F12。在某些方法中，所述一种或多种 C-端抗体包括末端特异性针对 A $\beta$  40 的抗体和末端特异性针对 A $\beta$  42 的抗体。在某些方法中，所述单体 A $\beta$  通过免疫亲和夹心测定法来测量，所述测定法包括所述一种或多种 C-端抗体和结合 N-端和 / 或中央表位的另一种抗体。在某些方法中，所述另一种抗体结合 N-端表位，任选地是抗体 3D6。在某些方法中，所述另一种抗体结合中央表位，任选地是抗体 266。在某些方法中，所述一种或多种 C-端抗体是报告抗体，所述另一种抗体是捕获抗体。在某些方法中，所述一种或多种 C-端抗体是捕获抗体，所述另一种抗体是报告抗体。在某些方法中，所述一种或多种报告抗体用钆标记，并且所述捕获抗体用生物素标记。

[0011] 在某些方法中，在步骤 (b) 中测量单体和寡聚体 A $\beta$  的量，包括用将寡聚体 A $\beta$  转变成单体 A $\beta$  的解聚试剂处理所述样品，并测定所述解聚试剂处理过的样品中单体 A $\beta$  的量。在某些方法中，所述解聚试剂包含离液剂以将寡聚体溶解成单体。离液剂包括盐酸胍、异硫氰酸胍、脲、硫脲、高氯酸锂和 / 或碘化钾。在某些方法中，所述解聚试剂包含非离子型去污剂。在某些方法中，所述解聚试剂包含聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、多酚和 / 或某些小分子例如六氟异丙醇。在某些方法中，所述解聚试剂处理过的样品中单体 A $\beta$  的量，通过与步骤 (a) 中用于测量单体 A $\beta$  的量相同的测定法来测量。在某些方法中，所述测量步骤通过定量质谱术来进行。在某些方法中，所述测量步骤通过毛细管或凝胶电泳，然后通过定量蛋白质印迹法来进行。

[0012] 在某些方法中，所述体液样品是 CSF 样品。在某些方法中，所述体液样品是血液样品。在某些方法中，所述血液样品是血浆样品。在某些方法中，步骤 (a) 和 (b) 同时进行。在某些方法中，所述步骤 (a) 的样品和所述步骤 (b) 的第二样品是来自于单一样品的不同等份试样。

[0013] 在某些方法中,所述受试者没有认知缺损,并且步骤(d)评估所述受试者发生阿兹海默氏病的易感性。在某些方法中,所述受试者具有轻度认知缺损,并且步骤(d)评估所述受试者发生阿兹海默氏病的易感性。在某些方法中,所述受试者具有认知缺损,并且步骤(d)包括使用步骤(c)的比较与所述受试者病症的其他症状和/或征兆的组合来提供阿兹海默氏病的诊断。在某些方法中,所述受试者在进行所述方法之前已被诊断为患有阿兹海默氏病,并且步骤(d)提供所述疾病阶段的指示。在某些方法中,所述受试者正接受阿兹海默氏病的治疗或预防,并且步骤(d)提供所述受试者对治疗的响应的指示。在某些方法中,所述方法在同一受试者上每隔一段时间进行,并且步骤(c)的比较随时间的变化提供了所述受试者对治疗的响应的指示。

[0014] 在某些方法中,所述受试者正用针对A $\beta$ 的免疫疗法治疗。在某些方法中,所述受试者正用百平珠单抗(bapineuzumab)治疗。某些方法还包括在进行步骤(a)和(b)之前,用针对百平珠单抗的抗独特型抗体、任选地用JH11.22G2处理所述样品。某些方法还包括测定所述样品中Tau或P-Tau的量,其中Tau或P-Tau相对于对照值的增加,提供了所述受试者的发生阿兹海默氏病的易感性、阿兹海默氏病的存在或病情恶化的进一步指示。

[0015] 在某些方法中,所述受试者是进入临床试验以测试用于阿兹海默氏病的治疗或预防的药物的候选者,其中如果所述单体A $\beta$ 比单体和寡聚体A $\beta$ 的商数低于阈值,则所述受试者被包含在所述临床试验中,如果所述受试者高于所述阈值,则所述受试者被排除出所述临床试验。某些方法还包括将所述诊断、预后或监测告知所述受试者或所述受试者的护理提供者。

[0016] 在某些方法中,至少所述比较单体A $\beta$ 和单体和寡聚体A $\beta$ 的量的步骤在计算机中执行。在某些方法中,所述计算机接收与单体A $\beta$ 的量以及单体和寡聚体A $\beta$ 的量有关的信号,将所述信号转变成定量的量,比较所述定量的量,并提供与所述量、所述量的比较、所述受试者的情况或所述受试者的推荐治疗有关的输出。

[0017] 本发明还提供了确定向群体中的哪些受试者给药药物以进行阿兹海默氏病的预防或治疗的方法。这样的方法包括对所述群体中的每个受试者:(a)测量体液样品中单体A $\beta$ 的量;(b)测量体液的第二样品中单体和寡聚体A $\beta$ 的量;以及(c)将单体A $\beta$ 的量与单体和寡聚体A $\beta$ 的量进行比较,其中在所述比较的基础上,所述群体中的受试者接受或不接受药物来治疗阿兹海默氏病或进行阿兹海默氏病的预防。在某些方法中,所述比较确定单体A $\beta$ 与单体和寡聚体A $\beta$ 之间的比率,并且其中单体A $\beta$ 比单体和寡聚体A $\beta$ 的商数低于阈值的受试者接受所述药物。

[0018] 本发明还提供了确定给予群体中的受试者何种治疗方案的方法。这样的方法需要测量体液样品中单体A $\beta$ 的量;测量体液的第二样品中单体和寡聚体A $\beta$ 的量;以及将单体A $\beta$ 的量与单体和寡聚体A $\beta$ 的量进行比较。所述受试者的第一子群体用第一治疗方案治疗,所述受试者的第二子群体用第二治疗方案治疗,其中在所述第一子群体的受试者和第二子群体的受试者之间,单体A $\beta$ 比单体和寡聚体A $\beta$ 的比率显著不同。在某些这样的方法中,所述第一治疗方案包括用于阿兹海默氏病的预防或治疗的药物,所述第二治疗方案不包括所述药物,并且所述第一子群体的受试者与所述第二子群体的受试者相比具有较低的单体A $\beta$ 比单体和寡聚体A $\beta$ 的比率。在某些这样的方法中,所述单体A $\beta$ 比单体和寡聚体A $\beta$ 的商数在所述第一子群体的受试者中低于阈值,并且在所述第二子群体的受试

者中低于阈值。A $\beta$  形式的测量和与寡聚体 A $\beta$  相关的参数的计算可以按照本文中描述的任何方法来进行。

[0019] 本发明还提供了对群体中的受试者进行差异治疗的方法,所述方法包括用第一治疗方案治疗所述受试者的第一子群体,并用第二治疗方案治疗所述受试者的第二子群体,其中所述第一子群体中的受试者和所述第二子群体中的受试者具有显著不同的单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的平均比率。在某些方法中,所述第一子群体的受试者用预防或治疗阿兹海默氏病的药物治疗,所述第二子群体的受试者不用所述药物治疗,并且与所述第二子群体中的受试者相比,单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的比率,在所述第一子群体的受试者中明显更低。

[0020] 本发明还提供了确定将群体中的哪些受试者征召到临床试验中的方法,所述方法包括对所述群体中的每个受试者:测量体液样品中单体 A $\beta$  的量;测量体液的第二样品中单体和寡聚体 A $\beta$  的量;以及将单体 A $\beta$  的量与单体和寡聚体 A $\beta$  的量进行比较,其中在所述比较的基础上,将所述群体中的受试者征召或不征召到所述临床试验中。在某些方法中,所述比较确定单体 A $\beta$  与单体和寡聚体 A $\beta$  之间的比率,并且其中单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的商数落于阈值之下的受试者被征召到所述临床试验中。

[0021] 本发明还提供了一种诊断试剂盒,其包含:至少一种末端特异性针对 A $\beta$  37、A $\beta$  38、A $\beta$  39、A $\beta$  40、A $\beta$  41 或 A $\beta$  42 的 C-端抗体;结合 A $\beta$  的 N-端和/或中央表位的抗体;以及将可溶性寡聚体 A $\beta$  转变成单体 A $\beta$  的解聚试剂。在某些试剂盒中,所述 C-端抗体末端特异性针对 A $\beta$  40 或 A $\beta$  42。某些试剂盒包含末端特异性针对 A $\beta$  40 的 C-端抗体和末端特异性针对 A $\beta$  42 的 C-端抗体,提供了多种用于疾病评估的比率,以提高方法结果的准确性或灵敏度。

[0022] 本发明还提供了筛选具有对抗阿兹海默氏病的活性的药剂的方法,所述方法包括:将阿兹海默氏病的转基因啮齿动物模型与所述药剂相接触;比较与所述药剂相接触的转基因啮齿动物的体液中单体 A $\beta$  的量与单体和寡聚体 A $\beta$  的量;以及使用所述比较来确定所述药剂是否具有可用于治疗阿兹海默氏病的活性。

[0023] 本发明还提供了分析 A $\beta$  的方法,所述方法包括:(a) 测量来自于受试者的体液样品中 A $\beta$  的量,其中所述样品没有用解聚试剂处理;(b) 测量来自于所述受试者的体液样品中 A $\beta$  的量,其中所述样品用解聚试剂处理;并且(c) 比较在步骤(a)和(b)中测量的量。在某些方法中,步骤(a)和(b)中的所述测量使用末端特异性针对 A $\beta$  的 C-端的抗体来进行。在某些方法中,步骤(c)中的比较确定了步骤(a)中的量与步骤(b)中的量的比率,或步骤(a)和步骤(b)中的量之间的差。某些方法还包括将所述比率或差用于所述受试者中阿兹海默氏病或其易感性的诊断、预后或监测,步骤(a)中的量比步骤(b)中的量的较低商数或步骤(b)中的量与步骤(a)中的量之间的较高差值,指示了所述受试者的发生所述疾病的更高的易感性、所述疾病存在的更高的可能性或病情的恶化。

[0024] 在某些方法中,步骤(a)和(b)测量 A $\beta$  x-37、A $\beta$  x-38、A $\beta$  x-39、A $\beta$  x-40、A $\beta$  x-41 和 A $\beta$  x-42 中的至少一个。在某些方法中,步骤(a)和(b)至少测量 A $\beta$  x-40。在某些方法中,步骤(a)和(b)至少测量 A $\beta$  x-42。在某些方法中,步骤(a)和(b)至少测量 A $\beta$  x-40 和 A $\beta$  x-42。在某些方法中,A $\beta$  的量使用一种或多种末端特异性针对 A $\beta$  37、A $\beta$  38、A $\beta$  39、A $\beta$  40、A $\beta$  41 或 A $\beta$  42 的 C-端抗体来进行。在某些方法中,一种或多种 C-端抗体包括末

端特异性针对 A $\beta$  40 的抗体和末端特异性针对 A $\beta$  42 的抗体。在某些方法中, A $\beta$  通过免疫亲和和夹心测定法来测量, 所述测定法包括所述一种或多种 C- 端抗体和结合 N- 端和 / 或中央表位的另一种抗体。在某些方法中, 所述解聚试剂包含盐酸胍、异硫氰酸胍、脲、硫脲、高氯酸锂和 / 或碘化钾、非离子型去污剂、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、多酚和 / 或六氟异丙醇。在某些方法中, 步骤 (a) 和 (b) 使用相同的测定法来测量 A $\beta$  的量。在某些方法中, 所述体液样品是 CSF 样品或血液样品。

[0025] 某些方法还包括步骤 (d) 将所述比率或差用于所述受试者中阿兹海默氏病或其易感性的诊断、预后或监测中, 步骤 (a) 中的量比步骤 (b) 中的量的较低商数或步骤 (b) 中的量与步骤 (a) 中的量之间的较高差值, 指示了所述受试者的发生所述疾病的更高的易感性、所述疾病存在的更高的可能性或病情的恶化。在某些方法中, 受试者没有认知缺损, 并且步骤 (d) 评估所述受试者发生阿兹海默氏病的易感性。在某些方法中, 所述受试者具有轻度认知缺损, 并且 (d) 评估所述受试者发生阿兹海默氏病的易感性。在某些方法中, 所述受试者具有认知缺损, 并且步骤 (d) 包括使用步骤 (c) 的比较与所述受试者病症的其他症状和 / 或征兆的组合来提供阿兹海默氏病的诊断。在某些方法中, 所述受试者在进行所述方法之前已被诊断为患有阿兹海默氏病, 并且步骤 (d) 提供所述疾病阶段的指示。在某些方法中, 所述受试者正接受阿兹海默氏病的治疗或预防, 并且步骤 (d) 提供所述受试者对治疗的响应的指示。在某些方法中, 所述方法每隔一段时间进行, 并且步骤 (c) 中的比较随时间的变化提供了对治疗的响应的指示。在某些方法中, 所述受试者正用针对 A $\beta$  的免疫疗法例如百平珠单抗治疗。

[0026] 某些方法还包括在进行步骤 (a) 和 (b) 之前, 用针对百平珠单抗的抗独特型抗体、任选地用 JH11. 22G2 处理所述样品。某些方法还包括测定所述样品中 Tau 或 P-Tau 的量, 其中 Tau 或 P-Tau 相对于对照值的增加, 提供了所述受试者的发生阿兹海默氏病的易感性、阿兹海默氏病的存在或病情恶化的进一步指示。某些方法还包括将所述诊断、预后或监测告知所述受试者或所述受试者的护理提供者。某些这样的方法在群体中的受试者上进行, 其中所述受试者的第一子群体用第一治疗方案治疗, 所述受试者的第二子群体用第二治疗方案治疗, 并且与所述第二子群体的受试者相比, 在步骤 (a) 中测量的 A $\beta$  的量比在步骤 (b) 中测量的 A $\beta$  的量的比率, 在所述第一子群体的受试者中明显更低。在某些方法中, 所述第一治疗方案包括用于阿兹海默氏病的预防或治疗的药物, 所述第二治疗方案不包括所述药物。在某些方法中, 在步骤 (a) 中测量的 A $\beta$  的量比在步骤 (b) 中测量的 A $\beta$  的量的比率, 在所述第一子群体的受试者中低于阈值, 并且在所述第二子群体的受试者中高于所述阈值。

[0027] 定义

[0028] 术语“抗体”包括完整抗体及其结合片段。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、轻链、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、双体抗体、Dab 和纳米抗体。片段通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶或化学分离来生产。

[0029] 特异性结合是指抗体 (或其他试剂) 与靶 (例如样品的组分) 的可检测到的幅度较高并且可以与发生在至少一种无关靶上的非特异性结合区分开的结合。特异性结合可以是特定官能团或特定空间契合 (例如锁匙类型) 之间的键形成的结果, 而非特异性结合通常是范德华力的结果。然而, 特异性结合并不暗示试剂结合一种并仅仅一种靶。因此, 试剂

可以并通常确实显示出与几种不同靶的不同强度的特异性结合,并且与其他靶仅显示出非特异性结合。特异性结合通常包括  $10^7$ 、 $10^8$  或  $10^9 M^{-1}$  或更高的结合常数。

[0030] 术语“表位”是指抗原上免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)特异性结合的位点。表位通常从连续氨基酸、或通过蛋白质的二级和/或三级折叠而被并置在一起的非连续氨基酸两者形成。从连续氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂后通常保留,而由二级和/或三级折叠形成的表位在用变性溶剂处理后通常丧失。表位通常在独特的空间构象中包含至少 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-射线晶体学和二维核磁共振。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)。

[0031] 当抗体被称为结合特定残基例如 A $\beta$  1-11 内的表位时,其意义是抗体特异性结合含有所述特定残基(即在这一实例中 A $\beta$  1-11)的多肽。这样的抗体不必定接触 A $\beta$  1-11 内的每个残基。A $\beta$  1-11 内的每个单个氨基酸的置换或缺失也不必定影响结合亲和性。

[0032] 末端特异性抗体特异性结合 A $\beta$  肽的最 N-或 C-端处的表位(即所述表位包括所述肽的 N-端或 C-端氨基酸),但是强度较低地结合或不特异性结合较长形式的 A $\beta$  中或 APP 中构成表位的残基。因此,末端特异性针对 A $\beta$  40 的抗体意味着相对于在 37、38、39、41、42 或 43 位残基结束的 A $\beta$  肽,优先(即以至少高 10 倍的结合常数)结合 A $\beta$  40 的抗体。同样地,末端特异性针对 A $\beta$  42 的抗体意味着相对于在 37、38、39、40、41 或 43 位残基结束的 A $\beta$  肽,优先结合在 42 位残基处结束的 A $\beta$  肽的抗体。

[0033] 术语“受试者”包括人类和其他哺乳动物受试者。该术语可以是指从没有疾病征兆或症状至具有全部疾病症状的范围之内的任何个体。该范围内的个体可以从无症状发展到具有疾病的一种或多种征兆再到具有典型(full blown)疾病的一种或多种症状。疾病的征兆和症状可以顺序或同时发生。处于任何这些阶段的个体可以具有或不具有遗传或其他已知的发生所述疾病的风险。

[0034] 阿兹海默氏病可以根据 DSM-IV-TR 判据诊断。

[0035] 轻度认知缺损可以根据美国神经病学学会 2001 指南(2001 guidelines of the American Academy of Neurology)来诊断。简单来说,这些指南需要个体对其自身记忆问题的报告,优选得到其他人的证实;使用标准的记忆评估试验检测到的可测量的高于正常的记忆缺损;以及进行正常的日常活动的正常的一般性思维和推理技巧和能力。

[0036] 如果个体尚未患有常规定义(例如通过 DSM IV TR)的阿兹海默氏病,但是具有将所述受试者置于以比总体人群明显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子(例如 >70 岁,遗传、生物化学、家族史、前驱症状和/或本文中所公开的寡聚体 A $\beta$  参数),则所述个体具有阿兹海默氏病的较高风险。

[0037] 易感性是指发生疾病和/或即将发生所述疾病的可能性或风险。较高的可能性或风险意味着较高易感性。测量与疾病发作之间较短的时间同样指示了较高的易感性。

[0038] 术语“症状”是指由受试者所感觉到的疾病的主观证据,例如改变的步态。“征兆”是指由医生观察到的疾病的客观证据。

[0039] 统计学显著性暗示  $p$  值  $\leq 0.05$ 。

[0040] 诊断、预后或监测测定法通常在确定受试者中的当前和未来状况或其中的变化中

低于 100% 准确, 但是如果从所述测定法获得的信息指示了与所述测定法没有提供所述信息的情况相比明显更高或更低的存在或将来发生所述状况的可能性, 则仍然是有用的。

[0041] 详细描述

[0042] I. 概述

[0043] 本发明提供了辅助阿兹海默氏病 (AD) 包括其发展到发作的诊断、预后和 / 或监测的方法。尽管本发明的实践不依赖于机制的理解, 但据信寡聚体 A $\beta$  占 AD 患者的体液中存在可溶性 A $\beta$  的显著部分, 并且大部分没有被当前的免疫测定方法检测到。据信寡聚体 A $\beta$  是 AD 中认知症状的致病因子或者是淀粉样斑块形成的中间体, 所述淀粉样斑块本身是 AD 中认知症状的表象的致病因子。在以前的报告中不能检测体液中的寡聚体 A $\beta$ , 可以解释在患有和未患阿兹海默氏病的受试者的体液中 A $\beta$  的值之间的显著重叠。本发明的方法可以评估体液中 A $\beta$  的寡聚体含量, 并将这一评估用于诊断 AD、为 AD 患者提供预后和 / 或在 AD 患者中监测疾病进展。这样的评估对于在可以在通过常规判据做出阿兹海默氏病诊断之前的疾病早期阶段进行诊断和监测来说, 是特别有用的。

[0044] II. A $\beta$

[0045] A $\beta$  是阿兹海默氏病特征性的淀粉样斑块的首要组分。A $\beta$  具有几种天然存在的全长形式 (直接得自于淀粉样前体蛋白 (APP) 被  $\beta$  和  $\gamma$  分泌酶的切割而没有进一步降解)。A $\beta$  的最常见的天然全长形式被称为 A $\beta$  39、A $\beta$  40、A $\beta$  41、A $\beta$  42 和 A $\beta$  43。这些肽的示例性序列以及它们与它们所源自的大的跨膜糖蛋白 APP 的关系, 示出在 Hardy 等, TINS20:155-158(1997) 中的图 1 中。

[0046] A $\beta$  42 具有下列序列: NH<sub>2</sub> - 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 - COOH (SEQ ID NO :1)。

[0047] 天然形式 A $\beta$  41、A $\beta$  40、A $\beta$  39、A $\beta$  38 和 A $\beta$  37 与 A $\beta$  42 的差异在于它们分别缺少 C- 端的 Ala、Ile-Ala 和 Val-Ile-Ala、Val-Val-Ile-Ala、Gly-Val-Val-Ile-Ala 氨基酸残基; A $\beta$  43 与 A $\beta$  42 的差异在于它在其 C- 端包括附加的 Thr 氨基酸残基。任何这些形式可以包括上述序列的天然存在的多态性变体, 例如 Arctic 突变。A $\beta$  的截短形式在体内通过 A $\beta$  的进一步降解 (即通过  $\beta$  和  $\gamma$  分泌酶之外的降解) 或通过在获得体液样品后的体外降解来产生。某些天然存在的 A $\beta$  片段在 N- 端被截短。到目前为止鉴定到的 N- 端截短的 A $\beta$  肽的实例包括具有 6-42、11-40、11-43、12-43 或 17-40 位氨基酸残基的 A $\beta$  肽。到目前为止鉴定到的其他天然存在的 A $\beta$  片段以从 N- 端和 C- 端两端截短为特征。这样的肽的实例包括具有 3-34、6-27、6-34、6-35 或 11-34 位氨基酸残基的 A $\beta$  肽。A $\beta$  的其他片段可以从分离的样品中的降解获得, 尽管任何这样的降解优选最小化。

[0048] 用于测量 A $\beta$  的某些技术不一定能区分体液样品中存在的全长形式的 A $\beta$  及其片段。例如, 使用末端特异性针对 A $\beta$  40 的 C- 端的一种抗体和特异性针对 20-25 位残基的中央表位的另一种抗体的免疫测定法, 可以检测 A $\beta$  40 和 A $\beta$  x-40 片段, 其中 x 约为 1-20。因此, 当通过这样的测定法测量 A $\beta$  时, 所述测定法事实上测量 A $\beta$  40 及其具有 A $\beta$  x-40 形式的任何片段, 其中 x 约为 1-20。其他测定法基本上仅测量全长形式的 A $\beta$ 。例如, 使用末端特异性针对 A $\beta$  40 的 C- 端的一种抗体和末端特异性针对 N- 端 (例如结合 1-5 位残基的表位或在其内结合) 的另一种抗体的免疫测定法, 检测 A $\beta$  40 而不检测亚片段 (超过背景或

阴性对照水平)。其他测定法例如定量质谱术,可以各个地测量全长形式的A $\beta$ 以及各个地测量片段。由于某些测定法不在全长A $\beta$ 与其某些片段之间作出区分,因此对A $\beta$ 的指称包括所检测的体液样品中存在的全长A $\beta$ 及其片段,除非上下文、即测定法的本质另有要求。简单来说,符号A $\beta$ <sub>x-y</sub>可用于指示A $\beta$ 肽及其在y位残基结束的任何片段,其中y可以是37、38、39、40、41、42或43。例如,A $\beta$ <sub>x-42</sub>被用于指示全长A $\beta$ 42或在上提供的氨基酸序列的42位残基处结束的任何片段。同样地,A $\beta$ <sub>x-40</sub>指示全长A $\beta$ 40或其在40位残基处结束的任何片段。

[0049] A $\beta$ 肽及其片段以代表不同聚集程度的单体、寡聚体、原纤丝和纤丝形式存在。单体A $\beta$ 意味着不论是否存在解聚溶剂和试剂都具有预期的单体分子量的A $\beta$ 。取决于长度,全长形式的单体A $\beta$ 的预期分子量为约3900至4700Da(例如A $\beta$ 42和A $\beta$ 40分别具有4514和4330Da的分子量)。截短形式取决于长度具有成比例减小的分子量。除了其他方法之外,分子量可以在凝胶、柱(例如通过HPLC)或质谱仪上测量。单体A $\beta$ 也可以通过在用解聚试剂处理后测量到的分子量缺少变化来识别。单体A $\beta$ 也可以在功能上被定义为被与寡聚体A $\beta$ 的对照制备物相比对单体A $\beta$ 的对照制备物表现出高至少10倍的偏好性的抗体,例如末端特异性针对A $\beta$ 的全长形式例如A $\beta$ 40或A $\beta$ 42的C-端的抗体识别的A $\beta$ 。A $\beta$ 在DMSO中的新鲜溶解的制备物主要以单体形式存在,并为评估试验制备物的分子量提供了有用的对照。A $\beta$ 在水中的已静置几天并且从中已通过将单体与寡聚体分离的凝胶电泳或柱层析例如孔径排阻层析或免疫亲和层析分离出寡聚体A $\beta$ 的制备物,可以用作用于寡聚体A $\beta$ 的对照。

[0050] 寡聚体A $\beta$ 是指彼此非共价聚集的至少两个A $\beta$ 分子。据信,寡聚体A $\beta$ 至少部分地通过肽的C-端(APP的跨膜结构域部分)处的疏水性残基保持在一起。类似于单体A $\beta$ ,寡聚体A $\beta$ 在生理条件下可溶。大多数寡聚体A $\beta$ 具有约2-20或5-20个A $\beta$ 分子。寡聚体A $\beta$ 可以通过至少二聚体分子的分子量来识别。例如,全长A $\beta$ 的寡聚体具有至少约7500Da的分子量。A $\beta$ 片段的寡聚体可能具有低于7500Da的分子量,但是大多数具有高于4600Da的分子量。寡聚体A $\beta$ 还可以通过在用解聚试剂处理后分子量的降低来识别。通过解聚试剂,可以将体液中的所有或大多数寡聚体A $\beta$ 转变成具有不超过约4600Da的分子量的单体。在确定的解聚条件下,体液中的大多数或所有寡聚体A $\beta$ 被转变成单体形式,此时使用解聚试剂继续处理不会使分子量出现进一步变化,和/或不具有寡聚体特征性的分子量的形式。被针对单体A $\beta$ 的抗体识别的某些表位、尤其是C-端表位,在寡聚体A $\beta$ 中不可检测。这可能起因于表位的一部分到完全掩蔽,所述掩蔽由构成寡聚体A $\beta$ 的单个A $\beta$ 肽之间的物理结合、构成寡聚体A $\beta$ 的单个A $\beta$ 肽中破坏表位的结构重排或两者的组合造成。因此,寡聚体A $\beta$ 的量在功能上可以被定义为(1)在用解聚试剂处理后测量到的单体和寡聚体A $\beta$ 的量与(2)不用解聚试剂处理时测量到的单体A $\beta$ 的量之间的差。

[0051] 在逐渐的分子重排和进一步聚合后,寡聚体A $\beta$ 产生具有超过20个A $\beta$ 肽和延长的原纤丝状以及随后纤丝状结构的聚集体。与在生理条件下可溶的寡聚体A $\beta$ 不同,纤丝状A $\beta$ 通常在生理条件下不溶。由于其不溶性,纤丝状A $\beta$ 存在于沉积物例如淀粉样斑块中。已提出,由纤丝状A $\beta$ 形成的斑块可能造成与阿兹海默氏病相关的认知缺陷。可替代地或此外,已提出寡聚体A $\beta$ 作为阿兹海默氏病的致病因子。不论寡聚体A $\beta$ 是致病因子还

是致病因子的中间体,在本发明的方法中它的分析是用于诊断、预后或监测的有用指示物。

[0052] A $\beta$  40 和 A $\beta$  42 是人类中存在的最常见的 A $\beta$  形式。A $\beta$  40 在血液和 CSF 中的丰度比 A $\beta$  42 高约 10 倍,但是 A $\beta$  42 是聚集的 A $\beta$  中存在的主要形式。例如, Roher 等 (Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 90:10836(1993)) 发现, A $\beta$  42 在神经炎斑块中占 A $\beta$  的 90%,并且在实质血管沉积物中占 A $\beta$  的 75%。此外, A $\beta$  42 在溶液中具有形成寡聚体的更大倾向,并且 A $\beta$  42 寡聚体比 A $\beta$  40 寡聚体明显更快地形成纤丝。Bitan 等, Proc. Nat' l Acad. Sci USA 100:330(2003)。由于它们的相对丰度,在体液例如血液、血清、血浆或 CSF 中 A $\beta$  40 或 A $\beta$  x-40 和 / 或 A $\beta$  42 或 A $\beta$  x-42 的测量,可以用作总可溶 A $\beta$  的测量的代用品,而不用各个检测其他形式的 A $\beta$  (例如 A $\beta$  x-37、A $\beta$  x-38、A $\beta$  x-39、A $\beta$  x-41)。然而,本发明的方法包括任何形式的 A $\beta$  (例如 A $\beta$  x-37、A $\beta$  x-38、A $\beta$  x-39、A $\beta$  x-40、A $\beta$  x-41、A $\beta$  x-42) 单独或组合的测量。在 CSF 的测量中,优选地至少测量 A $\beta$  42 或 A $\beta$  x-42。在血液的测量中,优选地至少测量 A $\beta$  40 或 A $\beta$  x-40。

### [0053] III. 测量单体和寡聚体 A $\beta$

[0054] 本发明的方法可以测量体液中寡聚体 A $\beta$  的量。这种测量优选地通过测量寡聚体 A $\beta$  和单体 A $\beta$  的合并量以及单体 A $\beta$  的量两者来进行。可选地或此外,本发明的方法可以直接测量寡聚体 A $\beta$  的量。除了其他单位之外,量可以以重量或结合信号的单位来测量。通过使用已知量被分析物的校准曲线,可以将信号强度的任意单位转变成重量。

[0055] 可以使用各种技术来测量单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量以及单体 A $\beta$  的量。优选的技术包括使用抗体检测靶抗原的定量免疫亲和测定法。使用抗体的组合是优选的,例如在夹心类型的免疫亲和测定法中。测定法优选地包括至少一种捕获抗体和至少一种报告抗体,所述捕获和报告抗体识别同一靶分子上的不同表位。定量免疫亲和测定法、包括夹心测定法,可以是固相 (例如 ELISA 或基于珠的 (例如基于 Luminex® 珠的)) 或液相 (例如电化学发光)。定量免疫亲和测定法被一般性描述在例如《抗体实验指南》(Antibodies:A Laboratory Manual), Harlow 和 Lane, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY(1988) 中。用于检测从人类受试者获得的样品中的 A $\beta$  的 ELISA 夹心测定法的实例,描述在 WO 99/27944 和美国专利 7,700,309 中。或者,可以使用质谱术或电泳 (例如毛细管或凝胶电泳),然后通过定量蛋白质印迹法来检测和定量单体和 / 或寡聚体 A $\beta$ ,所述任一种技术任选地与免疫亲和捕获技术 (例如免疫测定) 和 / 或蛋白质纯化技术 (例如沉淀和 / 或层析,例如 HPLC) 相组合来进行。A $\beta$  的基于质谱术的分析已描述在例如 Iurascu 等, Anal. Bioanal. Chem. 395:2509(2009), Portelius 等, Acta Neuropathol. 120:185(2010) 和 Wang 等, J. Biol. Chem. 271:31894(1996) 中。

[0056] 对于样品中单体 A $\beta$  的量的基于免疫亲和的测量来说,在测定法中使用的至少一种抗体应该辨别单体和寡聚体 A $\beta$ 。适合的抗体包括结合 A $\beta$  的 C-端区域 (即 29-43 位氨基酸残基) 中的表位的抗体,优选为 C-端的末端特异性抗体。由于可对单体和寡聚体 A $\beta$  进行区分的构象变化以及与其相关的隐藏的肽-肽相互作用和空间位阻,单体 A $\beta$  上存在的某些表位不存在于寡聚体 A $\beta$  上或者在其上被掩盖 (masked),并且特异性针对单体 A $\beta$  的 C-端区域中的表位的抗体一般不结合寡聚体 A $\beta$ 。因此,这样的抗体允许基本上只检测包含单体和寡聚体 A $\beta$  两者的样品中的单体 A $\beta$ 。C-末端末端特异性抗体可以特异性针对例如 A $\beta$  37、A $\beta$  38、A $\beta$  39、A $\beta$  40、A $\beta$  41 或 A $\beta$  42。优选的 C-末端末端特异性抗体包括特异

性针对 A $\beta$  40 的 C- 端的抗体（例如单克隆抗体 2G3）和特异性针对 A $\beta$  42 的 C- 端的抗体（例如单克隆抗体 21F12）。这样的 C- 端表位特异性抗体可以单独地或与一种或多种其他 C- 端表位特异性抗体（例如末端特异性针对 A $\beta$  37、A $\beta$  38、A $\beta$  39、A $\beta$  40、A $\beta$  41、A $\beta$  42 或 A $\beta$  43 的一种或多种抗体）组合使用，以结合样品中的 A $\beta$ 。

[0057] 在夹心测定法中，辨别单体和寡聚体形式的一种或多种抗体可以是捕获或报告抗体，但优选为一种或多种捕获抗体。在这样的夹心测定法中使用的其他一种或多种抗体结合单体 A $\beta$  上与一种或多种辨别性抗体所结合的表位不同的表位。为了简单起见，一种或多种辨别性抗体被称为捕获抗体，并且结合不同表位的一种或多种抗体被称为报告抗体（但是相反的特异性也是可能的）。例如，当 C- 端表位特异性抗体被用于捕获单体 A $\beta$  时，中央表位（在 12-28 位残基内）特异性抗体（例如单克隆抗体 266）或 N- 端表位（即在 1-11 位残基内）特异性抗体（例如单克隆抗体 3D6 或 10D5）可以用作报告抗体。结合中央表位的抗体的使用允许检测 A $\beta$  的 N- 端截短的形式，一些或所有这些形式可能不能使用 N- 端报告抗体检测。

[0058] 对于样品中单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量的基于免疫亲和的测量来说，可以将样品用将寡聚体 A $\beta$  解聚成单体 A $\beta$  的试剂（例如溶剂）处理。然后将解聚的样品稀释以将解聚试剂的浓度降低到免疫亲和剂（即捕获和 / 或报告抗体）所耐受的水平。抗体的解聚试剂耐受性可以凭经验确定。可以使用能够解聚寡聚体 A $\beta$  并且在适当稀释后不抑制解聚的单体 A $\beta$  的基于抗体的识别的任何试剂。适合的解聚试剂包括离液剂、非离子型去污剂、增溶剂或亲脂性增强剂或其任何组合（例如离液剂与去污剂的组合）。出于将寡聚体 A $\beta$  转变成单体的计划目的，解聚试剂可以单个地或以任何有效的组合、以任何有效的比率使用。适合的离液剂包括例如盐酸胍、异硫氰酸胍、脲、硫脲、高氯酸锂和碘化钾。适合的非离子型去污剂包括 Tween® 系列去污剂、Triton® 系列去污剂和 Brij® 系列去污剂。其他增溶剂 / 亲脂性增强剂包括六氟异丙醇和大小在 10,000 至 50,000Da 范围内的聚合物（例如聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、多酚的聚合物）。

[0059] 最高解聚试剂浓度取决于免疫亲和剂（即捕获和 / 或报告抗体）的耐受性和方法的灵敏度两者。通常，解聚样品的约 1:5 至约 1:40（例如约 1:5 至约 1:20 或约 1:10）的稀释将确保抗体的解聚试剂耐受性，并对方法的灵敏度具有极小或没有影响。因此，如果在免疫测定法中脲（或盐酸胍）的最高可耐受浓度被确定是 0.5M，并且在免疫测定法之前将解聚的样品 1:10 稀释，那么在解聚样品中容许的解聚试剂的最高浓度为 5M。对于去污剂、增溶剂 / 亲脂性增强剂（例如聚合物）和溶剂 / 解聚试剂的组合，可以进行类似的分析。例如，对于约 10,000 至约 40,000Da 的聚合物来说，最高浓度可以在约 5% 至约 10% 的范围内。

[0060] 将样品用解聚试剂处理，使得样品中所有或基本上所有的 A $\beta$  处于单体状态（即进一步的处理不能可检测地增加在随后的测定法中的信号）。解聚试剂处理过的样品中单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量可以通过免疫测定法、优选为夹心测定法来测量。由于在解聚试剂处理过的样品中不需要区分单体和寡聚体 A $\beta$ （即由于在解聚试剂处理过的样品中基本上不存在寡聚体 A $\beta$ ），因此可以使用针对 A $\beta$  的结合不重叠表位的任何抗体的组合作为捕获和报告抗体。然而，为了测定法之间的更直接的可比性，将与用于测量样品（即尚未用解聚试剂处理的样品）中单体 A $\beta$  的量相同的测定法，也优选地用于（最好地实践）测量解

聚试剂处理过的样品中单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量。因此,例如,如果使用以 C-端特异性捕获抗体和中央或 N-端表位特异性报告抗体为特点的夹心测定法来测量单体 A $\beta$  的量,则优选地使用包括相同的 C-端表位特异性捕获抗体和中央或 N-端表位特异性报告抗体的相同的夹心测定法来测量单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量。如果使用不同的测定法来进行两种测量,则可以通过参考具有已知浓度的单体 A $\beta$  或单体和寡聚体 A $\beta$  的对照样品的测量将测量值适当地归一化,以补偿抗体结合的不同强度。

[0061] 单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量的测量,也可以通过将单体 A $\beta$  (例如如上所述)和寡聚体 A $\beta$  的分开测量简单相加来实现。对于基于免疫亲和的测量来说,这可以通过使用识别寡聚体 A $\beta$  但不识别单体 A $\beta$  的抗体测量从受试者获得的体液样品中寡聚体 A $\beta$  的量来实现。不结合单体 A $\beta$  的特异性针对寡聚体 A $\beta$  的抗体已描述在例如 W004/031400 中。

[0062] 取决于测定法的格式,单体 A $\beta$  与合并的单体和寡聚体 A $\beta$  之间的辨别可能不是绝对的。换句话说,与寡聚体 A $\beta$  相比优选结合单体 A $\beta$  的抗体可能不绝对的辨别,或者用解聚试剂的处理可能不会将 100%的寡聚体 A $\beta$  转变成单体 A $\beta$ 。此外,由于与遮蔽用于辨别单体和寡聚体 A $\beta$  的表位(例如 C-端表位)的蛋白质或其他大分子的结合,某些事实上是单体的 A $\beta$  可能被评定为寡聚体。尽管缺乏完全精确性,但在用解聚试剂处理之前和之后使用包括与寡聚体 A $\beta$  相比优选结合单体 A $\beta$  的抗体(例如末端特异性的 C 端抗体)的免疫测定法测量体液样品,可以被当作单体 A $\beta$  以及合并的单体和寡聚体 A $\beta$  的测量的可接受的代用品,并因此进行随后的数据分析。

[0063] 以不同方式来看,所述方法可以通过在用和不用解聚试剂处理的体液样品中 A $\beta$  的差异检测来进行,而不需将检测到的物质表征为是单体、寡聚体、与蛋白质结合的单体还是其他物质。在这样的方法中,在来自于受试者的体液样品中检测 A $\beta$  的量,其中所述样品尚未用解聚试剂处理,并在来自于所述受试者的另一个体液样品中检测 A $\beta$  的量,其中所述样品已用解聚试剂处理,并将检测到的 A $\beta$  的量进行比较。检测使用末端特异性针对 A $\beta$  的 C-端的抗体或与寡聚体 A $\beta$  相比优选地结合单体 A $\beta$  的另一种抗体来进行。所述比较确定了使用和不使用解聚步骤处理时测量到的 A $\beta$  的量的比率或差值。所述比率或差值可以以与单体与寡聚体 A $\beta$  的比率或差值相似的方式用于阿兹海默氏病的诊断、预后或监测。因此,寡聚体与单体 A $\beta$  的比率、商数或差值以及它们的测量和解释和对差异治疗方案的应用的所有讨论,在细节上作必要的修改后适用于在存在和不存在解聚试剂的情况下,使用利用与寡聚体 A $\beta$  相比优选地结合单体 A $\beta$  的抗体的免疫测定法测量的 A $\beta$  的量之间的比率。例如,不使用解聚试剂的量与使用解聚试剂的量的较小的商数或使用解聚试剂与不使用解聚试剂的量之间的较大差值,指示了所述受试者的发生疾病的更高的易感性、疾病存在的更高的可能性或病情的恶化。同样地,在其他方法中,可以将被测试的受试者群体根据上述商数或差值分层为第一和第二子群体,并使所述子群体经历差异治疗方案。例如,具有较小商数或较大差值的子群体可以用预防或治疗阿兹海默氏病的药物治疗,具有较大商数或较小差值的子群体可以不用所述药物治疗(包括不接受治疗)。

[0064] 优选地,单体 A $\beta$  的量和单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量的测量在同一样品,例如同一样品的不同等份试样上进行。然而,测量可以在不同样品上进行,只要存在合理的基础相信样品是基本上相同的即可,例如当多个样品在基本上相同的时间从同一受试者的基本上相同的位置顺序收集时。单体 A $\beta$  的量和单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量的测量,可以同时或顺

序地,优选地使用相同的试剂和仪器来进行。对于从接受用于阿兹海默氏病的被动免疫治疗(即接受特异性针对A $\beta$ 的治疗性抗体例如百平珠单抗)的受试者获得的样品来说,任选地在进行免疫测定法之前将样品用中和所述治疗性抗体的试剂(例如中和百平珠单抗的抗独特型抗体,例如JH11.22G2)进行处理。或者,测定法可以使用针对中央和C-端区域的抗体作为捕获和报告抗体来进行。百平珠单抗不干扰这样的测定法,因为它与远离中央或C-端抗体的位点结合。

#### [0065] IV. 特异性针对A $\beta$ 的抗体

[0066] 用于检测A $\beta$ 的抗体可以被近似分类为结合A $\beta$ 的N-端、中央或C-端表位。N-端表位是1-11位残基,中央表位是12至28位残基,C-端表位是29位残基至C-端(例如37、38、39、40、41、42或43位残基)。结合A $\beta$ 的C-端区域中的表位的抗体包括例如抗体2G3、21F12和369.2B。结合A $\beta$ 的中央区域中的表位的抗体包括例如抗体266、15C11、2B1、1C2、4G8和9G8。结合A $\beta$ 的N-端区域中的表位的抗体包括例如抗体12B4、12A11、6C6、3A3、2H3、10D5和3D6。

[0067] 2G3是与位于人类A $\beta$ 中的C-端表位特异性结合的mAb,具体为在A $\beta$ 40的C-端处结合(Johnson-Wood等,PNAS February 18,1997vol.94,1550-1555)。

[0068] 21F12是与位于人类A $\beta$ 中的C-端表位特异性结合的mAb,具体为在A $\beta$ 42的C-端处结合(Johnson-Wood等,PNAS February 18,1997vol.94no.41550-1555)。

[0069] 369.2B是与位于人类A $\beta$ 中的C-端表位特异性结合到的mAb,具体为在A $\beta$ 42的C-端处结合。369.2B抗体及其变体描述在例如US5,786,180中。

[0070] 末端特异性针对一种形式的人类A $\beta$ 上的C-端表位的大量其他抗体已描述在科学文献中和/或是可商购的(参见例如Horikoshi等,Biochem.Biophys.Res.Commun.319,733-7(2004),其提到了杂交瘤82E1、1A10和1C3,其中第一种末端特异性针对A $\beta$ 40,第二和第三种特异性针对A $\beta$ 42;Iwatsubo等,Neuron 13,45-53(1994);Barelli等,Mol.Med.3,695-707(1997);Levites等,J.Clin.Invest.116,193-201(2006);万维网alzforn.org/res/com/an;Novos,Biologicals,目录号NB300-225(末端特异性针对A $\beta$ 40)和Autogen Bioclear目录号ABT109(末端特异性针对A $\beta$ 42))。

[0071] 266是与位于人类A $\beta$ 中的中央表位,具体为16-24位残基特异性结合的mAb。266抗体及其变体描述在例如US 20050249725和W001/62801中。产生266单克隆抗体的细胞系,于2004年7月20日根据布达佩斯公约(Budapest Treaty)的条款保藏在ATCC,保藏号为PTA-6123。

[0072] 15C11是与位于人类A $\beta$ 中的中央表位,具体为19-22位残基特异性结合的mAb的mAb。15C11抗体及其变体描述在例如美国专利7,625,560和W0 2006/066049中。产生15C11单克隆抗体的细胞系,于2005年12月13日根据布达佩斯公约(Budapest Treaty)的条款保藏在ATCC,保藏号为PTA-7270。

[0073] 2B1是与位于人类A $\beta$ 中的中央表位,具体为19-23位残基特异性结合的mAb。2B1抗体及其变体描述在例如US 20060257396和W0 2006/066171中。产生2B1抗体的细胞系,于2005年11月1日根据布达佩斯公约(Budapest Treaty)的条款保藏在ATCC,保藏号为PTA-7202。

[0074] 1C2是与位于人类A $\beta$ 中的中央表位,具体为16-23位残基特异性结合的mAb。1C2

抗体及其变体描述在例如 US 20060257396 和 WO 2006/066171 中。产生 1C2 抗体的细胞系，于 2005 年 11 月 1 日根据布达佩斯公约 (Budapest Treaty) 的条款保藏在 ATCC，指派的登记号为 PTA-7199。

[0075] 9G8 是与位于人类 A $\beta$  中的中央表位，具体为 16-21 位残基特异性结合的 mAb。9G8 抗体及其变体描述在例如 US 7,625,560 和 WO 2006/066049 中。产生 9G8 抗体的细胞系，于 2005 年 11 月 1 日根据布达佩斯公约 (Budapest Treaty) 的条款保藏在 ATCC，指派的登记号为 PTA-7201。

[0076] 4G8 是与位于人类 A $\beta$  中的中央表位，具体为 17-24 位残基特异性结合的 mAb (Covance SIG-39220)。

[0077] 12B4 是与位于人类 A $\beta$  中的 N-端表位，具体为 3-7 位残基特异性结合的 mAb。12B4 抗体及其变体描述在 US20040082762 和 W003/077858 中。

[0078] 12A11 是与位于人类 A $\beta$  中的 N-端表位，具体为 3-7 位残基特异性结合的 mAb。12A11 抗体及其变体描述在例如 US20050118651A1、US 20060198851、W004/108895A2 和 WO 2006/066089 中。产生 12A11 单克隆抗体的细胞系，于 2005 年 12 月 13 日根据布达佩斯公约 (Budapest Treaty) 的条款保藏在 ATCC，保藏号为 PTA-7271。

[0079] 6C6 是与位于人类 A $\beta$  中的 N-端表位，具体为 3-7 位残基特异性结合的 mAb。6C6 抗体及其变体描述在例如 US 20060257396 和 WO 2006/066171 中。产生抗体 6C6 的细胞系，于 2005 年 11 月 1 日根据布达佩斯公约 (Budapest Treaty) 的条款保藏在 ATCC，指派的登记号为 PTA-7200。

[0080] 3A3 是与位于人类 A $\beta$  中的 N-端表位，具体为 3-7 位残基特异性结合的 mAb。2H3 是特异性结合到位于人类 A $\beta$  中的 N-端表位，具体为 2-7 位残基的 mAb。3A3 和 2H3 抗体及其变体描述在例如 US 20060257396 和 WO 2006/066171 中。产生抗体 2H3 和 3A3 的细胞系分别具有 ATCC 登记号 PTA-7267 和 PTA-7269，于 2005 年 12 月 13 日根据布达佩斯公约 (Budapest Treaty) 的条款被保藏。

[0081] 3D6 是特异性结合到位于人类 A $\beta$  中的 N-端表位，具体为 1-5 位残基特异性结合的 mAb。产生 3D6 单克隆抗体的细胞系 (RB963D6. 32. 2. 4)，于 2003 年 4 月 8 日根据布达佩斯公约 (Budapest Treaty) 的条款保藏在美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Va. 20108, USA)，保藏号为 PTA-5130。10D5 是特异性结合到位于人类 A $\beta$  中的 N-端表位，具体为 3-7 位残基的 mAb。产生 10D5 单克隆抗体的细胞系 (RB4410D5. 19. 21)，于 2003 年 4 月 8 日根据布达佩斯公约 (Budapest Treaty) 的条款保藏在 ATCC，保藏号为 PTA-5129。3D6 和 10D5 抗体及其人源化和嵌合形式进一步描述在例如 US 20030165496 和 20040087777 以及 W002/088306、W002/088307、W002/46237 和 W004/080419 中。其他人源化 3D6 抗体描述在 US 20060198851 和 WO 2006/066089 中。

[0082] 可用于测量体液中单体和 / 或寡聚体 A $\beta$  的量的其他抗体可以重新分离。抗体可以源自于任何适合的动物，包括兔、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、山羊、奶牛和鸡的免疫。或者，抗体可以通过体外选择方法例如噬菌体展示或通过转基因小鼠进行免疫来生产，所述技术允许其他类型的抗体，包括人类抗体或纳米抗体。

[0083] 抗体可以是多克隆、单克隆、嵌合或人源化的。末端特异性抗体通过用以希望特异性针对的 A $\beta$  末端为终结的短肽 (例如 4-8 个氨基酸) 进行免疫来制造。例如，A $\beta$  38-42

肽可以用作免疫原以产生针对 A $\beta$  42 的末端特异性抗体, A $\beta$  37-41 可以用作免疫原以产生针对 A $\beta$  41 的末端特异性抗体, A $\beta$  36-40 可以用作免疫原以产生针对 A $\beta$  40 的末端特异性抗体, A $\beta$  35-39 可以用作免疫原以产生针对 A $\beta$  39 的末端特异性抗体, A $\beta$  34-38 可以用作免疫原以产生针对 A $\beta$  38 的末端特异性抗体, 或者 A $\beta$  33-37 可以用作免疫原以产生针对 A $\beta$  37 的末端特异性抗体。将所述短肽连接到载体以协助引发免疫应答。筛选抗体的相对于较长形式的 A $\beta$ 、APP 或它们的片段来说优先结合所需形式的 A $\beta$  的能力, 所述片段包括作为较长蛋白质的一部分、但是不具有所需末端特异性所针对的游离末端的免疫原的氨基酸。多克隆末端特异性抗体可以通过类似的免疫, 并在 A $\beta$  的较长形式、APP 或它们的片段的亲和柱上除去缺乏所需特异性的抗体来制造, 所述片段包括不具有所需末端特异性所针对的游离末端的免疫原的氨基酸。适合的抗体及其片段可以重组生产。此外, 可以使用模拟抗体的结合特异性的其他重组蛋白(参见例如 WO/2009/140039 所描述的 synbodies)。

[0084] 特异性针对 A $\beta$  的抗体, 可以使用包含所需目标表位例如 A $\beta$  的 N-端区域(即 1-11 位氨基酸残基)中的表位、中央区域(即 12-28 位氨基酸残基)中的表位或 C-端区域(即 29-43 位氨基酸残基)中的表位的免疫原来制备。可以将载体分子偶联到免疫原, 并用于通过常规技术制备抗血清或单克隆抗体。适合的免疫原通常具有 A $\beta$  内的至少 5 个连续残基, 并且可能包括超过 6 个残基。载体分子包括血清白蛋白、钥孔帽贝血蓝蛋白或其他适合的蛋白质载体, 正如在 Hudson 和 Hay, 《实用免疫学》(Practical Immunology), Blackwell Scientific Publications, Oxford, (1980), 第 1.3 章中一般性描述的。

[0085] 取决于所使用的测量测定法, 抗体可以是修饰或未修饰的。例如, 可以将捕获抗体偶联到亲和试剂例如生物素、亲和素或短肽(例如 his- 标签)。然后通过特异的高亲和性相互作用(例如生物素与亲和素或链亲合素的结合)将亲和试剂连接到固相基材。固相基材可以是例如珠, 或孔的表面, 并且可以使用亲和试剂的高亲和性相互作用将捕获抗体附连到固相基材。或者, 可以将特异性针对捕获抗体的一部分(例如恒定区)的第二抗体吸附到固相基材(例如塑料碟、珠), 并用于将捕获抗体附连到固相基材。同样地, 可以对报告抗体进行修饰以包含标记物, 或者可以使用特异性针对报告抗体的一部分(例如恒定区)的第二抗体来提供标记物。报告抗体或第二抗体上的标记物可以是例如酶(例如通过化学连接物连接或与抗体框内融合)、荧光分子、化学发光试剂、发色团、放射性同位素或提供可定量信号的任何其他化学品或试剂。

#### [0086] V. 样品

[0087] 本发明的方法测量从受试者获得的样品中单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量、单体 A $\beta$  的量和/或直接测量寡聚体 A $\beta$  的量。方法可以包括从受试者获得样品和/或在进行测量之前处理样品。受试者通常为人类, 但是也可以是哺乳动物例如啮齿动物, 优选为小鼠, 例如起到阿兹海默氏病模型作用的转基因小鼠。体液包括例如脑脊液(CSF)、血液、尿液和腹膜液。血液可以意味着全血以及血浆或血清。

[0088] 样品制备可以包括样品的储存(例如在室温, 在 4 $^{\circ}$ C 或冷冻)和/或运输。其他处理可以包括例如将血液离心以获得血浆, 或将血液凝结并离心以获得血清。进一步的样品制备, 如果存在的话, 取决于用于测量单体和/或寡聚体 A $\beta$  的量的测定法格式, 并且可以包括生物化学步骤例如蛋白质沉淀和/或柱层析。然而, 已观察到聚苯乙烯收集管结合 A $\beta$ , 导致样品质量损失, 而聚丙烯管不表现出类似的 A $\beta$  结合亲和性, 并且是优选的。

### [0089] VI. A $\beta$ 测量值的使用

[0090] 可以将合并的单体和寡聚体 A $\beta$  (或寡聚体 A $\beta$ ) 和单体 A $\beta$  的量的原始测量值加工成在阿兹海默氏病的诊断、预后和监测中有用的信息。所述方法通常提供体液中单体 A $\beta$  的量和单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量。可以将这些量进行比较, 以提供受试者状况的几种有用参数。优选地, 确定单体 A $\beta$  的量与单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量之间的比率。所述比率可以表示成单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的商数或与之相反 (反商数)。由于反商数是商数的倒数, 因此比率的确定被认为是确定商数和反商数两者。单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的商数是体液中的总 A $\beta$  采取单体形式的分数的度量。用 1 减去这一分数, 给出体液中的总 A $\beta$  中寡聚体 A $\beta$  的分数。商数或分数也可以表示成百分率。所述量也可以通过从单体和寡聚体 A $\beta$  的量中减去单体 A $\beta$  的量以给出寡聚体 A $\beta$  的量来比较。或者, 所述量可以通过确定单体 A $\beta$  与寡聚体 A $\beta$  之间的比率来比较。通过这些比较确定的参数被合称为与寡聚体 A $\beta$  相关的参数。

[0091] 与寡聚体 A $\beta$  相关的参数被用于诊断、预后或监测。诊断、预后和监测未必相互排斥, 因为当应用于疾病状态和发展的连续体系时, 同一参数可以以各种不同方式使用。例如, 参数可以指示受试者的当前状况 (诊断) 和预测未来状况 (预后)。参数可以提供当前诊断并且可以是在监测中使用的一系列参数之一。一般来说, 体液中寡聚体 A $\beta$  的量增加, 与所述受试者的疾病的增加的易感性、疾病存在的增加的可能性或病情的恶化相关。采取比率、尤其是体液中单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  之间的比率的形式的参数, 对于减少由于在受试者之间体液中 A $\beta$  总含量的差异导致的失真来说是优选的。寡聚体 A $\beta$  的量增加, 减小了单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的商数。因此, 单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的商数降低, 与所述受试者的发生疾病的增加的风险、疾病存在的增加的可能性或病情的恶化相关。同样地, 寡聚体 A $\beta$  的增加减小了单体 A $\beta$  比寡聚体 A $\beta$  的商数, 并且减小的商数与所述受试者的发生疾病的增加的风险、疾病存在的增加的可能性或病情的恶化相关。相反, 寡聚体 A $\beta$  的增加提高了寡聚体和单体 A $\beta$  比单体 A $\beta$  的商数或寡聚体 A $\beta$  比单体 A $\beta$  的商数; 提高的商数与所述受试者的发生疾病的增加的风险、疾病存在的增加的可能性或病情的恶化相关。单体和寡聚体 A $\beta$  的比较可以以其他方式进行处理, 并同样地与所述受试者的发生疾病的增加或降低的风险、疾病存在的增加或降低的可能性或病情的改善或恶化相关联。

[0092] 通过单体和寡聚体 A $\beta$  的测量值的比较确定的各种参数, 可以与基线值进行比较, 以协助阿兹海默氏病的诊断、预后或监测。基线值可以从受试者的对照组确定的参数值。对照组可以是阴性对照组或阳性对照组。适合的阴性对照组是低于 60 岁并且没有阿兹海默氏病的任何已知征兆或症状或其任何已知的遗传风险的个体。适合的阳性对照组是被诊断患有阿兹海默氏病的个体。或者, 基线值可以是以前从同一受试者获得的参数值。

[0093] 在受试者的阴性对照组中, 单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的商数的基线值预期为约 1.0 (例如在约 0.90 至约 1.10 之间)。低于阴性对照组中的平均商数的商数指示了受试者对阿兹海默氏病具有增加的易感性, 或具有阿兹海默氏病存在的增加的可能性。受试者中的商数与群体中的平均商数之间具有至少 95% 置信度的统计学显著的差异, 在形成诊断或预后中特别有用。然而, 更小的置信区间 (例如约 67 至 95% 置信度之间) 在标示受试者有风险并启动其他生物标志物的测定或商数的随时间监测中, 也是有价值的。低于受试者的以前确定的基线值的商数 (超过实验误差, 优选地使用至少 95% 的置信度评估) 指示了

受试者的病情恶化。

[0094] 参数的基线（有时被称为阈值）也可以根据试验受试者的以前的测定来定义。例如，可以在没有有症状的阿兹海默氏病的受试者群体中测量参数例如单体比单体和寡聚体 A $\beta$  的商数，并随后跟踪所述群体以确定哪些受试者发生阿兹海默氏病。然后可以将基线或阈值设定成使得在已知的误差幅度内，落于所述阈值之下的受试者具有一种结果（例如发生阿兹海默氏病），并且高于所述阈值的受试者具有另一种结果（例如保持没有阿兹海默氏病）。具有正好处于阈值处的参数值的受试者，通常根据阈值的设定方式被全部指定到一种结果或另一种结果，或者可以评定为不确定。误差概率和随之而来的假阳性和假阴性的可能性，可以通过阈值被设定的值来控制。作为另一个实例，可以通过比较已知患有或不患有阿兹海默氏病的群体中的参数值来设定阈值，以确定阿兹海默氏病是否存在。同样地，阈值的精确值可以被设定成将假阳性和假阴性的数量保持在容许范围内。容许范围对于不同的健康护理人员来说可能不同，但是优选地阈值被选择成使得假阳性和 / 或假阴性的数量少于 20%、少于 15%、少于 10% 或优选地少于 5%。不同的阈值可用于不同的诊断、预后和监测。优选地，基线和阈值的值使用与用于在试验受试者中确定比率相同的测定法格式（例如相同的测定法类型和相同的试剂，例如在免疫亲和夹心测定法中使用的相同的特异性捕获和报告抗体）来确定。同样地，基线和阈值的值优选地使用与用于在试验受试者中确定比率相同的样品制备技术来确定。

[0095] 来自于单体和寡聚体 A $\beta$  的测量量的比较的参数，通常与受试者的其他征兆和症状、尤其是受试者认知能力的评估和 / 或其他生物标志物的水平相组合，协助提供预后、诊断或监测信息。ADAS-CO 11、ADAS-CO 12、DAASD、CDR-SB、NTB、NPI、MMSE 是用于评估认知功能的公知的量表。其他生物标志物包括 <sup>[18F]</sup>FDG、MRI 标志物 (BBSI 和 VBSI)、CSF 生物标志物 A $\beta$  42、Tau 和 / 或 P-Tau，以及脑中 A $\beta$  的 PET 成像。受试者中阿兹海默氏病的征兆和症状，如果存在的话，可以确定分析的目标。例如，在无症状受试者中，目标通常是确定阿兹海默氏病的易感性和 / 或监测朝向疾病的发展，如果有任何迹象，则进行下一步。在具有认知缺损的受试者中，目标可以是确定发生阿兹海默氏病的易感性和监测朝向疾病的发展，但是目标也可以是确定或排除阿兹海默氏病是否存在。在已经通过其他判据（例如 DSM-IV-TR）被诊断为患有阿兹海默氏病的受试者中，目标可以是确定疾病阶段、证实诊断或监测疾病的未来发展。在待治疗受试者中，目标可以是测量对治疗的响应。

[0096] 因此，例如，在没有显示出认知下降症状的受试者中，低于阴性对照组（如上所定义）的基线值的单体 A $\beta$  的量比单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量的商数，指示了所述受试者相对于对照群体具有发生阿兹海默氏病的增加的易感性。对于同一受试者来说，低于所述受试者的以前确定的商数的单体 A $\beta$  的量比单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量的商数，指示了朝向阿兹海默氏病的发展。

[0097] 对于显示出轻度认知缺损 (MCI) 症状的受试者来说，低于阴性对照受试者的特定基线值的单体 A $\beta$  的量比单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量的商数，指示了所述受试者具有发生阿兹海默氏病的提高的易感性。轻度认知缺损本身是确认的病症，并且可能是阿兹海默氏病的前驱阶段，但是也可能由于其他原因发生。因此，较低商数与 MCI 症状的组合，指示了与具有 MCI 和正常商数或具有相同商数而没有 MCI 的受试者相比阿兹海默氏病的提高的易感性。对于具有 MCI 的受试者来说，低于以前对所述受试者确定的商数的商数指示了朝向

阿兹海默氏病的发展。

[0098] 对于显示出无论是否分类为 MCI 的总体认知下降症状的受试者来说,所述下降可能与阿兹海默氏病或其发生相关,或者可能是无关的痴呆症。在这样的个体中,低于阴性对照受试者的基线值的单体 A $\beta$  的量比单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量的商数,任选地与疾病的其他征兆和症状组合,可用于诊断或排除阿兹海默氏病。

[0099] 对于已被诊断为患有阿兹海默氏病的受试者来说,低于阈值的单体 A $\beta$  的量比单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量的商数,可用于对病症进行分级。例如,阈值可以被定义为对应于阿兹海默氏病的特定阶段(例如轻度、中度、晚期)。低于以前为所述受试者确定的商数的商数,指示了受试者的病情正在恶化。因此,可以使用商数来监测受试者的状况。如果受试者正接受阿兹海默氏病疗法(例如免疫疗法,例如百平珠单抗免疫疗法),则可以使用商数来监测对疗法的响应。商数随时间的变化依赖于治疗药剂。对于免疫疗法来说,随着脑中的 A $\beta$  沉积物被溶解并释放到体液,治疗药剂可能引起体液中商数在一开始降低。然而,最后,随着寡聚体 A $\beta$  从体液中清除,所述商数可能增加。在其他药剂例如抑制 A $\beta$  聚集的小分子中,所述商数可能对成功的治疗作出响应而增加,并且没有暂时的降低。

[0100] 对单体 A $\beta$  的量比单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量的商数的讨论是出于说明的目的,但是前面提到的任何参数都可以另外地或可替换地以类似方式使用。当然,在方法中存在一些表面差异。例如,当使用单体 A $\beta$  和寡聚体 A $\beta$  比单体 A $\beta$  的商数时,高于(而不是低于)特定基线或阈值的值指示了受试者具有或易于发生与 A $\beta$  相关的病症。从阴性对照受试者群体产生的基线值预期可以为约 1.0(例如在约 0.95 至约 1.10 之间)。对于寡聚体 A $\beta$  的量来说,指示阿兹海默氏病或对这种病症的易感性的阈值,可以为约 0.3ng/mL。

[0101] 在来自于受试者的样品中 Tau 或磷酸化 Tau(即 P-Tau)的量,是可以与从单体和寡聚体 A $\beta$  的量计算的参数联合使用以协助与 A $\beta$  相关的病症的诊断或预后或协助监测与 A $\beta$  相关的病症的优选的生物标志物。Tau 是在阿兹海默氏病患者脑中的神经元纤维缠结中存在的微管结合蛋白(Goedert 等, *Neuron* 3:519-526(1989);Goedert, *TINS* 16:460-465(1993))。CSF 中 Tau、尤其是 P-Tau 水平的增加,已与神经元损伤和阿兹海默氏病相关联。例如,CSF 中约 300pg 每毫升的 Tau,可以用作患有阿兹海默氏病的阈值指示物,其中 CSF 中超过或等于 300pg/mL 的 Tau 的量,指示了受试者具有或易于发生与 A $\beta$  相关的病症的更高的可能性,并且 CSF 中低于 300pg/mL 的 Tau 的量,指示了受试者不具有或不易于发生与 A $\beta$  相关的病症的更高的可能性(参见美国专利 7,700,309)。

[0102] Tau 可以通过例如免疫测定法来检测。有用的检测技术包括例如免疫亲和夹心测定法,其包含均特异性针对 Tau 的捕获抗体和标记的报告抗体(参见美国专利 7,700,309 和 PCT/US11/033649)。针对 Tau 的抗体是可商购的(例如从 Sigma, St. Louis, MO),或者是已知的(美国专利 7,700,309),或者可以通过常规方法来制备。

[0103] 本发明的方法可能需要从受试者获得或接收体液样品,对样品进行测定以测量一种或多种被分析物(例如单体 A $\beta$  和单体加上寡聚体 A $\beta$ )的量,对测量到的值进行数据分析以提供诊断、预后或监测信息,并且将所述信息交流给受试者、照顾者或卫生护理提供者。在某些方法中,所有步骤由同一实体(例如医疗机构、医院或卫生护理组织)中的一个或多个个体进行。或者,方法可以由来自于在合同下工作或以其他方式合作的不同实体的个体来进行。例如,一个实体中的个体可以订购测定法并获得受试者样品,并将信息交流给

受试者或照顾者。另一个组织中的个体可以进行测定法和一些或所有数据分析。

#### [0104] VII. 计算机实施

[0105] 方法的一个或多个步骤（除了湿法化学步骤之外）可以在适当编程的计算机中进行。一种或多种与寡聚体 A $\beta$  相关的参数的计算可以在这样的计算机中进行。来自于任何 A $\beta$  形式（单体、单体加上寡聚体、用或不用变性溶剂处理）的测量的原始数据，可以使用例如储存在计算机中的将原始信号与数值相关联的校准曲线，在计算机中加工成数值（例如量或浓度）。计算机也可以被编程，以提供采取任何被检测的形式的 A $\beta$  的实测量、与寡聚体 A $\beta$  相关的参数的值、患者的状况（例如诊断、预后、监测、疾病发展、发生阿兹海默氏病的风险）和 / 或治疗选项的输出。

[0106] 本发明可以在硬件和 / 或软件中实施。例如，本发明的不同方面可以在用户端逻辑或服务端逻辑中实施。本发明或其组成部分可以体现在含有逻辑指令和 / 或数据的固定媒介程序组件中，所述指令和 / 或数据当装载到适当配置的计算机装置中时，使所述装置按照本发明执行。可以将含有逻辑指令的固定媒介递送给固定媒介的观察者以物理装载到观察者的计算机中，或者含有逻辑指令的固定媒介可以驻留在远端服务器，观察者通过通讯媒介进入所述服务器以便下载程序组件。

[0107] 硬件可以是个人计算机或任何与远端数据应用交互的信息装置，例如数字化电视、蜂窝电话或个人数字助理。驻留在主存储器或辅助存储器中的信息可用于编程这样的系统，并且可以表现为碟类型的光或磁介质、磁带、固态动态或静态存储器等。例如，本发明可以全部或部分体现为记录在这样的固定媒介上的软件。储存在主存储器上的各种程序可以包括接收与多种 A $\beta$  形式（单体、单体加上寡聚体、用或不用变性溶剂处理）的测量相关的信号的程序，将这样的信号加工成数值（例如量或浓度）的程序，从这些实测量计算与寡聚体 A $\beta$  相关的参数的值的程序，根据受试者状况、预后或治疗计划来解释与 A $\beta$  相关的参数的程序等。这样的程序可以部分地通过将受试者中与寡聚体 A $\beta$  相关的参数的一个或多个计算值，同与受试者的状况、预后或治疗计划相关的这样的值的储存的数据库进行比较来工作。计算机存储器也可以储存程序，以提供采取任何被检测的形式的 A $\beta$  的实测量、与寡聚体 A $\beta$  相关的参数的值、患者的状况（例如发生阿兹海默氏病的风险）和 / 或治疗选项的输出。可以将输出提供在例如显示器上或储存到其他存储装置（例如 ZIP 碟、CD-R、DVD、软盘、闪存卡）和 / 或打印到硬拷贝例如在纸上。处理的结果可以整体或部分储存或显示，这由用户决定。

#### [0108] VIII. 临床试验

[0109] 上面确定的与寡聚体 A $\beta$  相关的参数，可用于确定是否将受试者征召到临床试验中。所述临床试验可用于试验可能对阿兹海默氏病的预防或治疗有用的药物。所述药物可以是例如抗体（例如特异性针对 A $\beta$  的抗体）或被设计用于诱导针对 A $\beta$  的抗体的免疫原。

[0110] 将与寡聚体 A $\beta$  相关的参数与适合的阈值进行比较。适合的阈值取决于所使用的与寡聚体 A $\beta$  相关的参数和试验目的。例如，阈值可以被选择成只鉴定具有患有阿兹海默氏病的高可能性的受试者，或者它可以被选择成鉴定对阿兹海默氏病具有高易感性的受试者。群体中具有高于或低于阈值的与寡聚体 A $\beta$  相关的参数的受试者，具备参加临床试验的资格。例如，群体中具有低于适合阈值的单体 A $\beta$  的量比单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量的商数的受试者，具备参加临床试验的资格，而群体中具有高于阈值的商数的受试者，不具备

参加临床试验的资格。或者,群体中具有高于适合阈值的寡聚体和单体 A $\beta$  比单体 A $\beta$  的反商数或寡聚体 A $\beta$  的量的受试者,具备参加临床试验的资格,而群体中具有低于阈值的这样的商数或量的受试者,不具备参加临床试验的资格。使用与寡聚体 A $\beta$  相关的参数作为在临床试验中征召受试者的判据产生了更均匀的群体,其中不存在或存在更少的缺乏阿兹海默氏病或对疾病的高易感性的个体,并且不太可能显示出对将要试验的治疗的假阳性响应。

#### [0111] IX. 改变的治疗方案

[0112] 上面确定的与寡聚体 A $\beta$  相关的参数也可用于确定哪些受试者接受或不接受治疗方案。将这样的参数与适合的阈值进行比较。根据所述比较,可以向受试者给药药物以实施阿兹海默氏病的预防或治疗。或者,对于已经接受用于与 A $\beta$  相关的病症的预防或治疗的药物的受试者来说,所述比较可以指示受试者正接受的剂量应该增加、降低还是取消并代之以不同药物。

[0113] 例如,未接受阿兹海默氏病的任何治疗或预防的受试者,可以被分类为具有高于或低于阈值的单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的商数,其中低于阈值的受试者随后接受治疗或预防,等于或高于阈值的受试者不接受治疗或预防。已接受用于阿兹海默氏病的预防或治疗的药物的受试者,可以根据单体 A $\beta$  比合并的单体和寡聚体 A $\beta$  的商数高于还是低于阈值进行分类,其中高于阈值的受试者继续接受药物,低于阈值的受试者进行药物剂量的调整,或者改为用于阿兹海默氏病的预防或治疗的新药物。或者,对于已经接受药物的受试者来说,可以将商数与对应于以前为所述受试者确定的相同参数的商数的基线值进行比较。如果商数低于基线值,可以提高剂量或者受试者改为用于阿兹海默氏病的预防或治疗的新药物。如果商数高于基线值,受试者的药物剂量可以降低或保持不变。

[0114] 其他与寡聚体 A $\beta$  相关的参数,例如单体和寡聚体 A $\beta$  比单体 A $\beta$  的商数(反商数)或寡聚体 A $\beta$  的量,也可用于改变具有与 A $\beta$  相关的病症或易于发生与 A $\beta$  相关的病症的受试者的治疗方案的方法中。所述方法与上面描述的方法类似,区别在于当将商数或寡聚体 A $\beta$  的量与阈值进行比较时,高于阈值或基线值的商数或量可以导致为受试者(例如未接受任何治疗的受试者)开出药物以实施阿兹海默氏病的预防或治疗,提高受试者的药物剂量,或使受试者改换为用于阿兹海默氏病的预防或治疗的新药物。低于阈值或基线值的反商数或寡聚体 A $\beta$  的量可以导致降低受试者的药物剂量或保持剂量不变。

[0115] 单体 A $\beta$  以及单体和寡聚体 A $\beta$  的量和从这些值的比较确定的与寡聚体 A $\beta$  相关的参数中的任一种,也可用于确定将两种或更多种治疗方案中的哪一种施用于群体中的受试者。使用与寡聚体 A $\beta$  相关的参数将群体分层为第一和第二子群体,其中在所述群体之间与 A $\beta$  相关的参数具有统计学显著的差异。例如,第一子群体中单体 A $\beta$  比单体和寡聚体 A $\beta$  的比率的平均值以统计学显著的差额不同于第二群体中所述比率的平均值。将第一子群体中的受试者用第一治疗方案治疗,并将第二子群体中的受试者用不同于第一治疗方案的第二治疗方案治疗。治疗方案可以是空方案(即受试者不接受治疗)。因此,例如,第一子群体中的受试者可以接受用于阿兹海默氏病的预防或治疗的药物,并且第二子群体中的受试者可以不接受药物(或者至少不接受与第一子群体中的受试者相同的药物)。当例如与第二子群体相比,在第一子群体的受试者中 A $\beta$  的单体比单体和寡聚体形式的比率的较低时,给出这样的差异方案。或者,第一子群体中的受试者可以接受用于阿兹海默氏病的预防

或治疗的第一药物,并且第二子群体中的受试者可以接受第二种这样的药物。或者,第一和第二子群体中的受试者可以接受用于阿兹海默氏病的预防或治疗的同一药物的不同剂量、频率或路线的治疗。将某些群体分层,使得一个子群体中的所有受试者具有等于或高于阈值的与寡聚体 A $\beta$  相关的参数的值,并且另一个子群体中的所有受试者具有等于或低于阈值的与寡聚体 A $\beta$  相关的参数的值。在这里以及本申请中的别处,具有精确地等于阈值的参数值的受试者,通常根据阈值的设定方式被全部指派到一个子群体或另一个子群体,或者被评定为不确定并且不包含在任一群体中。治疗群体及其子群体中受试者的数目应该足以使在子群体之间,一个或多个与寡聚体 A $\beta$  相关的参数的差异达到统计学显著的程度。例如,所述方法可以应用于包含至少 20、50、100、1000 或 10,000 个受试者的群体。

[0116] 本发明还提供了在如上所述分层的子群体中对受试者进行差异治疗的方法。不同子群体中的受试者,可以通过接受或不接受用于阿兹海默氏病的预防或治疗的同一药物,通过接受用于阿兹海默氏病的预防或治疗的不同药物,或通过接受用于阿兹海默氏病的预防或治疗的同一药物的不同给药剂量、频率或途径,进行差异治疗。

#### [0117] X. 试剂盒

[0118] 本发明还提供了用于执行协助阿兹海默氏病的诊断、预后和监测的测定法的试剂盒。试剂盒可以包括可用于测量样品、例如从受试者获得的体液中单体 A $\beta$  的量的两种或更多种 A $\beta$  特异性抗体。抗体可以例如可用于进行免疫亲和夹心测定法。优选地,试剂盒包括特异性针对 A $\beta$  的至少一种捕获抗体和特异性针对 A $\beta$  的至少一种报告抗体,所述报告抗体能够与所述至少一种捕获抗体同时结合于单体 A $\beta$ 。至少一种捕获抗体或至少一种报告抗体中的任一者被选择成特异性结合单体 A $\beta$  并且不能结合寡聚体 A $\beta$ 。例如,所述至少一种捕获抗体可以包括结合 C-端表位的抗体,并且所述至少一种报告抗体可以包括结合 N-端和 / 或中央表位的抗体。或者,所述至少一种捕获抗体可以包括结合 N-端和 / 或中央表位的抗体,并且所述至少一种报告抗体包括结合 C-端表位的抗体。适合的抗体包括本文中描述的任何抗体,包括这样的抗体的任何片段。优选的 C-端表位特异性抗体包括末端特异性针对 A $\beta$  40 的抗体 (例如 mAb 2G3) 和末端特异性针对 A $\beta$  42 的抗体 (例如 mAb21F12),但是代替或除了末端特异性针对 A $\beta$  40、A $\beta$  42 的抗体之外,可以包括末端特异性针对 A $\beta$  37、A $\beta$  38、A $\beta$  39 或 A $\beta$  41 中的所有或任一者的一种或多种抗体。优选的中央表位特异性抗体包括特异性针对 A $\beta$  的 12-28 位氨基酸残基中的表位的抗体 (例如 mAb 266)。N-端表位特异性抗体包括特异性针对 A $\beta$  的 1-11 位氨基酸残基中的表位,优选为 A $\beta$  的 3-7 位氨基酸残基 (例如 mAb 10D5) 或 A $\beta$  的 1-5 位氨基酸残基 (例如 mAb 3D6) 中的表位的抗体。

[0119] 试剂盒中的捕获抗体任选地偶联于亲和试剂例如生物素、亲和素或肽标签 (例如 his- 标签)。或者,试剂盒可以包括特异性结合捕获抗体的第二抗体。试剂盒中的报告抗体任选地偶联于标记物例如酶、荧光分子、化学发光试剂、发色团、放射性同位素或提供可定量信号的任何其他化学品或试剂。或者,试剂盒可以包括特异性结合报告抗体并包括适合的标记物的第二抗体。

[0120] 本发明的试剂盒可以进一步包括适合于解聚寡聚体 A $\beta$  的解聚试剂 (例如溶剂)。解聚试剂可以是例如本文中描述的任何解聚试剂。本发明的试剂盒也可以包括用于阻断来自于受试者的样品中存在的治疗性抗体的试剂。例如,阻断试剂可以是抗独特型抗体,例如

特异性针对百平珠单抗的抗独特型抗体（例如 mAb JH11. 22G2）。本发明的试剂盒还可以包括使用试剂盒的内含物以进行本文中描述的测量例如单体 A $\beta$  的测量或单体和寡聚体 A $\beta$  的合并测量，或确定与寡聚体 A $\beta$  相关的参数例如上面描述的比率的说明书。

#### [0121] XI. 转基因动物测定法

[0122] 已经报道了阿兹海默氏病的许多动物模型（参见例如 WO 93/14200、美国专利 5,604,102、5,387,742 和 6,717,031）。用于阿兹海默氏病的特别有用的动物模型包括哺乳动物模型，更具体为啮齿动物模型，尤其是鼠类和仓鼠模型。这样的动物模型可以包含编码并表达人类 APP 或其片段的转基因。人类 APP 转基因可以包含在动物模型中促进或加速阿兹海默氏病发生的突变。所述突变可以例如与阿兹海默氏病的遗传形式相关。例如，与 London 或 Indiana 家族性阿兹海默氏病突变相关的，APP 的 717 位氨基酸处的突变或 Swedish 突变（即天冬酰胺<sup>595</sup>-亮氨酸<sup>596</sup>）。这样的突变已描述在例如美国专利号 7,700,309 和 6,717,031 中。这些模型可用于筛选化合物影响阿兹海默氏病的过程以改善和加剧病症两者的能力。由于阿兹海默氏病以体液中单体 A $\beta$  的量的降低和寡聚体 A $\beta$  的量的增加为特征，因此对阿兹海默氏病的有效治疗改变与寡聚体 A $\beta$  相关的参数。例如，加速阿兹海默氏病进程的药剂倾向于降低样品中单体 A $\beta$  的量比单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量的商数。相反，减缓或停止阿兹海默氏病进展的药剂可能倾向于提高样品中单体 A $\beta$  的量比单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量的商数，尽管在任何提高之前可能存在暂时的降低。这样的试验化合物包括抗体或其片段、蛋白质、小的有机化合物等。

[0123] 方法包括将试验化合物给药于阿兹海默氏病的转基因动物模型，测量来自于动物的体液样品中单体 A $\beta$  以及寡聚体 A $\beta$  和单体 A $\beta$  的合并量，测量单体 A $\beta$  并测量寡聚体 A $\beta$ ，或简单地测量寡聚体 A $\beta$ ；并根据所述测量确定动物的一种或多种与寡聚体 A $\beta$  相关的参数。取决于所确定的与寡聚体 A $\beta$  相关的参数，与相关基线值相比的参数统计数据的增加或降低，指示了测试化合物改善或加重阿兹海默氏病。基线值可以从尚未接受试验化合物的对照动物组（例如遗传上相似或一致的动物组）确定。

[0124] 例如，方法可以包括测量来自于动物的体液中单体 A $\beta$  的量，测量体液中单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量，确定体液的单体 A $\beta$  的实测量比单体和寡聚体 A $\beta$  的实测合并量的商数，并且将所述商数与适合的基线值进行比较。如果商数高于基线值，试验化合物被鉴定为可能对阿兹海默氏病的预防或治疗有用的药物。或者，如果商数低于基线值，试验化合物被鉴定为加重或加速阿兹海默氏病进展的药物。

[0125] 或者，方法可以包括测量来自于动物的体液中单体 A $\beta$  的量，测量体液中单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量，确定体液的单体和寡聚体 A $\beta$  的实测合并量比单体 A $\beta$  的实测量的反商数，并将所述反商数与适合的基线值进行比较。如果商数低于基线值，试验化合物被鉴定为可能对阿兹海默氏病的预防或治疗有用的药物。或者，如果商数高于基线值，试验化合物被鉴定为加重或加速阿兹海默氏病进展的药物。

[0126] 或者，方法可以包括测量来自于动物的体液中单体 A $\beta$  的量，测量体液中单体和寡聚体 A $\beta$  的合并量，确定体液中寡聚体 A $\beta$  的量，并且将寡聚体 A $\beta$  的量与适合的基线值进行比较。如果所述量低于基线值，试验化合物被鉴定为可能对阿兹海默氏病的预防或治疗有用的药物。或者，如果所述量高于基线值，试验化合物被鉴定为加重或加速阿兹海默氏病进展的药物。这样的方法也可以通过直接测量寡聚体 A $\beta$  的量来进行。

[0127] XII. 变化形式

[0128] 上面对阿兹海默氏病和 A $\beta$  所描述的同样的原理和策略,在适当修改后可用于其他促淀粉样变 (amyloidogenic) 疾病及其组分肽。换句话说,体液中单体促淀粉样变肽比寡聚体加上单体促淀粉样变肽的比率 (或如上讨论的其他相关参数),被用于提供受试者的诊断、预后或监测,其中单体比寡聚体加上单体促淀粉样变肽的相对低的商数指示了所述受试者的疾病的存在或易感性或病情的恶化。促淀粉样变疾病及其组分肽的一些实例是:2 型糖尿病, IAPP (Amylin); 帕金森氏症和其他路易体病,  $\alpha$ -突触核蛋白;可传播性海绵状脑病 (例如牛海绵状脑病), PrPSc; 亨廷顿氏舞蹈症, 亨廷顿蛋白;甲状腺髓样癌, 降钙素 (ACa1); 心律失常和孤立性心房淀粉样变性, 心房钠因子 (AANF); 动脉粥样硬化, 载脂蛋白 AI (AApoA1); 反应性淀粉样变性、家族性地中海热、伴有荨麻疹和耳聋的家族性淀粉样肾病, 和类风湿性关节炎, 血清淀粉样肽 A (AA); 主动脉内侧淀粉样病变, medin (AMed); 催乳素瘤, 催乳素 (APro); 家族性淀粉样多神经病, 甲状腺素运载蛋白 (ATTR); 遗传性非神经病性系统性淀粉样变性, 溶菌酶 (ALys); 与透析相关的淀粉样变性,  $\beta$ -2 微球蛋白 (A $\beta$  2M); 芬兰型淀粉样变性, 凝溶胶蛋白 (AGel); 格子状角膜变性, 角膜上皮素 (Aker); 脑淀粉样血管病 (冰岛型), 胱抑素 (ACys); 系统性 AL 淀粉样变性或多发性骨髓瘤, 免疫球蛋白轻链 AL; 散发性包含体肌炎, S-IBM; 伴有几种免疫细胞体液不调的重链淀粉样变性。促淀粉样变疾病以及它们的肽的其他实例提供在美国专利 6, 936, 246 的表 1 中。

[0129] 尽管出于清晰理解的目的已对本发明进行了详细描述,但可以在权利要求书的范围内实践某些修改。本文中引用的所有出版物和专利文献以其全部内容为所有目的通过参考并入本文,其程度等同于对每个所述文献单独地进行如此描述。除非可以从上下文明显看出,否则任何步骤、特点、方面、要素或实施方式可以彼此组合使用。

专利名称(译)	阿兹海默氏病的诊断、预后和监测中的寡聚体A $\beta$		
公开(公告)号	<a href="#">CN104662423A</a>	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	CN201380021783.5	申请日	2013-03-13
申请(专利权)人(译)	杨森阿尔茨海默氏症免疫治疗公司		
当前申请(专利权)人(译)	杨森阿尔茨海默氏症免疫治疗公司		
[标]发明人	丹尼尔·基德 约翰尼斯·鲁尔夫·施特雷费尔		
发明人	丹尼尔·基德 约翰尼斯·鲁尔夫·施特雷费尔		
IPC分类号	G01N33/53 C12P21/04		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N33/5088 G01N2333/4709 G01N2800/2821 G01N2800/52		
代理人(译)	杨青		
优先权	61/610390 2012-03-13 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了用于阿兹海默氏病的诊断、预后和监测的方法。所述方法包括测量从受试者获得的样品中合并的单体和寡聚体A $\beta$ 的量和单体A $\beta$ 的量，并确定比率。所述比率可用于诊断、预后和/或监测阿兹海默氏病。