



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101842388 A

(43) 申请公布日 2010.09.22

(21) 申请号 200880106728.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.09.15

C07K 16/18 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006.01)

60/993,612 2007.09.13 US

A61P 25/28 (2006.01)

61/083,698 2008.07.25 US

G01N 33/53 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.03.12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CH2008/000382 2008.09.15

(87) PCT申请的公布数据

W02009/033309 EN 2009.03.19

(71) 申请人 德勒尼克斯治疗股份公司

地址 瑞士施利伦

申请人 苏黎世大学

(72) 发明人 S·埃韦尔特 A·奥弗德毛尔

S·凯特波伊尔 R·尼奇

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

权利要求书 2 页 说明书 18 页 序列表 14 页

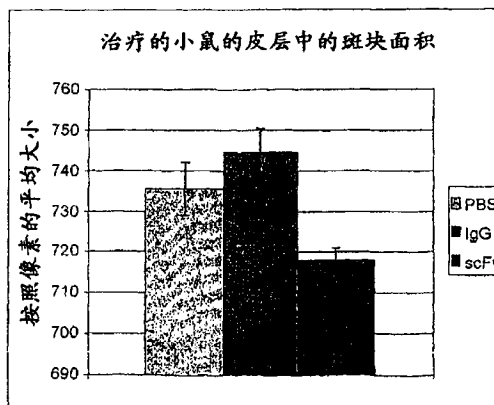
附图 16 页

(54) 发明名称

针对 β 淀粉样肽的人源化抗体

(57) 摘要

本发明公开了分离的抗体,其选择性地结合 Abeta 的 C-末端部分,并且是人源化的或完全人类的。本发明的抗体能够防止 Abeta 的寡聚化。此外,公开了诊断的方法,其包括步骤:(i) 标记抗体;(ii) 向受试者鼻内地或全身地施用有效剂量的所述抗体;和 (iii) 检测所述受试者的身体部分中所述标记的抗体的浓度和/或存在。



1. 一种分离的抗体,其选择性地结合 Abeta 的 C- 末端部分,并且是人源化的或完全人类的。
2. 权利要求 1 的抗体,其阻止 Abeta 的寡聚化。
3. 一种抗体,特别是根据权利要求 1 或 2 的,其特征在于所述抗体包含与由 SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :6 构成的组的序列具有至少 80% 同一性的一种或更多种序列。
4. 前述权利要求的任一项的抗体,其中所述抗体包含与可从人类文库获得的框架具有至少 60% 同一性的框架。
5. 前述权利要求的任一项的抗体,其中所述框架包含与可从人类文库获得的框架具有至少 60% 同一性的可变轻链片段和 / 或可变重链片段。
6. 前述权利要求的任一项的抗体,其中所述抗体是单链抗体 (scFv)。
7. 前述权利要求的任一项的抗体,其包含与由 SEQ ID NO :7.、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ IDNO :14、SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :16 构成的组的序列具有至少 60% 同一性的可变轻链片段 (VL) 序列。
8. 前述权利要求的任一项的抗体,其包含与由 SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22 和 SEQ ID NO :23 构成的组的序列具有至少 60% 相似性的可变重链片段 (VH) 序列。
9. 前述权利要求的任一项的抗体,其包含 SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :17。
10. 前述权利要求的任一项的抗体,其具有 SEQ ID NO :24。
11. 前述权利要求的任一项的抗体,其被化学修饰。
12. 前述权利要求的任一项的抗体,其与治疗试剂相连接。
13. 与标记物 (特别是 ⁶⁴Cu) 连接的权利要求 1 到 12 的任一项的抗体。
14. 前述权利要求的任一项的抗体,其展现了特征:
 - (i) 以高的和基本上相同的亲和力结合 Abeta₄₀ 和 Abeta₄₂;
 - (ii) 展示了对 Abeta 的寡聚和单体形式的高度亲和力;
 - (iii) 在体内基本上不识别淀粉样前体蛋白质 (APP);
 - (iv) 具有至少 5mg/ml、优选至少 10mg/ml、更优选至少 20mg/ml 的溶解度;和
 - (v) 显示了在人类施用时的低免疫原性或没有免疫原性。
15. 权利要求 14 的抗体,其进一步展现了至少一种、优选超过一种、最优选所有的以下特征:
 - (vi) 介导小胶质细胞对纤维状 Abeta 的摄取;
 - (vi) 结合 β -淀粉样斑块;
 - (vii) 除去脑中的 β -淀粉样斑块和 / 或防止脑中淀粉样斑块的形成;
 - (viii) 降低 Abeta 毒性和神经元对发作产生的兴奋毒素性事件的相关易感性;
 - (ix) 跨越血脑屏障;和 / 或
 - (x) 基本上恢复正常的行为;
 - (xi) 除去脑中的 β -淀粉样纤维和 / 或防止脑中淀粉样纤维的形成。
16. 一种诊断方法,其包括施用权利要求 13 的抗体的步骤。
17. 权利要求 13 的抗体的用途,其用于针对淀粉样变性或阿尔茨海默氏病诊断或筛选

受试者,或测定受试者发生淀粉样变性或阿尔茨海默氏病的风险。

18. 权利要求 16 的方法,其是 PET 成像。

19. 一种诊断或科学工具,其包含权利要求 1 到 13 的任一项的抗体。

20. 一种测试试剂盒,其包含权利要求 1 到 13 的任一项的抗体。

21. 一种药物组合物,其用于治疗、预防和 / 或延缓神经失调、特别是阿尔茨海默氏病的发展和 / 或针对阿尔茨海默氏病的被动免疫,包括权利要求 1 到 12 的任一项的抗体。

22. 一种制造治疗、预防和 / 或延迟神经失调(优选阿尔茨海默氏病)的发展的药物组合物的方法,其包括将权利要求 1 到 12 的任一项的抗体与至少一种适合的药物载体组合的步骤。

23. 一种用于哺乳动物的被动免疫的方法,其包括向哺乳动物施用权利要求 1 到 12 的抗体的步骤。

24. 一种核酸序列,其编码权利要求 1 到 10 的任一项的抗体。

25. 一种载体,其包含权利要求 24 的序列。

26. 一种宿主细胞,其包含权利要求 24 的序列或权利要求 25 的载体。

27. 一种生产权利要求 1 到 13 的任一项的抗体的方法,其包括步骤:

(i) 在容许所述抗体的合成的条件下培养权利要求 24 的宿主细胞;

(ii) 从培养物回收所述抗体。

28. 一种诊断的方法,其包括步骤:

(i) 标记抗体;

(ii) 向受试者鼻内地或全身地施用有效剂量的所述抗体;和

(iii) 检测所述受试者的身体部分中所述标记的抗体的浓度和 / 或存在。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述抗体是用 ^{64}Cu 标记的。

30. 权利要求 28 或 29 的方法,其中所述抗体是权利要求 1 到 13 的任一个。

31. 权利要求 28 到 30 的方法,其中所述抗体是单链抗体。

32. 权利要求 28 到 31 的任一项的方法,其中所述受试者经历 PET 成像。

33. 治疗神经失调的方法,其包括向需要的受试者施用治疗有效量的根据权利要求 1 到 13 的抗体的步骤。

34. 治疗的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据权利要求 22 的多核苷酸、根据权利要求 23 的载体或根据权利要求 24 的宿主细胞的步骤。

35. 一种 PET 成像的方法,其包括向受试者施用根据权利要求 13 的 ^{64}Cu 标记的抗体的步骤。

36. 一种药物组合物,其用于治疗、预防和 / 或延缓神经失调(特别是阿尔茨海默氏病)的发展和 / 或针对阿尔茨海默氏病的被动免疫,包括权利要求 1 到 12 的任一项的抗体,所述组合物适合于鼻内的、皮下的或静脉内的施用。

针对 β 淀粉样肽的人源化抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体技术的领域,更具体地涉及针对 β -淀粉样肽的人源化抗体的领域。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默氏病 (AD) 是年龄相关的神经变性失调,在 2006 年其影响了 2660 万人。一些预测预计,到 2050 年,发病率将是四倍,到时,在世界范围内每 85 人中有 1 人将患有该疾病 (Brookmeyer et al. (2007))。AD 自身显现为渐进性的认知缺陷,例如记忆丧失和认知能力的降低。

[0003] AD 的病理的中心是脑部 β -淀粉样肽 (Abeta) 的积累。Abeta 是淀粉样前体蛋白质 (APP) 的裂解产物,其在淀粉样变性途径中首先被 β -分泌酶、然后被 γ 分泌酶相继裂解。产生的 Abeta 片段具有可变的大小,而 40 个氨基酸的肽 (Abeta₄₀) 是最丰富的种类,42 个氨基酸的肽 (所谓的 Abeta₄₂) 被认为是最有害的种类。Abeta 可以在脑的细胞外隙中积累,在此它在多步骤的过程中聚集,形成神经毒性寡聚体,最后与其他物质一起产生淀粉样斑块,其是阿尔茨海默氏病的典型标志。

[0004] 治疗阿尔茨海默氏病的有前景的临床免疫学方法是被动免疫,在其中,针对 Abeta 的抗体被施用给受试者来从脑中除去 Abeta。已经提出了通过抗 Abeta 抗体的三种不同但不互相排斥的 Abeta 清除机制:(1) 纤维状 Abeta 向较低毒性形式的催化转化 (Bard et al. (2000); Bacskai et al. (2001); Frenkel et al. (2000)); (2) Abeta 沉积的调理作用,引起小胶质细胞吞噬作用 (Bard et al. (2000); Bacskai et al. (2002); Frenkel et al. (2000)); 和 (3) 促进 Abeta 从脑向循环的流出 (DeMattos et al. (2001)),所谓的外周沉没假说。

[0005] 苏黎士大学的 Mohajera 等人 (2004) 和 Gaugler 等人 (2005) 产生了针对 Abeta 的小鼠抗体,并研究了单克隆鼠抗 Abeta 抗体在体内的生物活性。

[0006] 然而,当施用给人类时,鼠抗体常常产生免疫原性。引发的抗球蛋白反应限制了鼠抗体的临床实用性 (Miller et al. (1983); Schroff et al. (1985))。

[0007] 因此,需要新的、非免疫原性的和有效的抗体,用于 Abeta 相关疾病、特别是阿尔茨海默氏病的治疗和 / 或诊断。

发明内容

[0008] 因此,本发明的一般目的是提供特异性结合 Abeta (特别是 Abeta 的 C-末端部分) 的且被人类免疫系统良好地耐受的抗体。

[0009] 在第一个方面,本发明提供了分离的抗体,其选择性地在 C-末端区域与 Abeta 结合,特别是氨基酸 30 到 40 (SEQ ID NO:26) 之间,并且是人源化的或完全人类的。所述抗体展示了对 Abeta₄₂ 和 Abeta₄₀ 的高亲和力,此外,在体内基本上不识别淀粉样前体蛋白质 (APP)。

[0010] 所谓的人源化抗体的优点在于它们引发人类免疫系统的一般是最小的反应、或没有反应的能力,因而可以被认为是人类施用时的低免疫原性的或非免疫原性的。因而,与鼠抗体相反,人源化的抗体适合于治疗目的和临床应用。

[0011] 术语“人源化”是指降低异种抗体的免疫原性的公认的技术。人源化抗体被遗传工程化,从而存在尽可能少的非人类结构。一种策略是基于异种抗体的互补决定区(CDR)移植到人类接受体框架的可变轻链VL和可变重链VH上。在另一种策略中,异种抗体的框架向人类框架突变。在两种情况中,抗原结合部分的功能的保存是关键。为了这个目的,例如,通过使用技术人员公知的分子建模的计算机程序,分析亲本序列和各种概念上的人源化产物的三维模型。所述分析,除其它之外例如允许鉴定可能直接或间接涉及抗原结合的框架残基。通常,少量的供体框架残基对于抗原结合是重要的,因为它们进入与抗原的直接接触,或者它们影响特定CDR的构象(Davies et al(1990); Chothia et al(1987))。因此,如果尚不存在,希望的是朝着被鉴定为对于抗原结合重要的那些供体框架残基来突变相应的接受体框架残基。还可能的是,人源化抗体包含既不在体内的人类种系全集(repertoire)中、也不在供体CDR或甚至供体框架中存在的残基。

[0012] 抗体的人源化的程度可以通过计算人源化抗体的框架与原始人类接受体框架的序列同一性百分比来表明,所述原始的人类接受体框架被用于产生人源化抗体并且是从人类文库获得的。优选的,本发明的抗体包含与可从人类文库获得的框架具有至少60%的同一性、(按以下顺序)更优选至少75%、至少80%、至少85%、至少90%和最优选95%或甚至100%同一性的框架。在本发明的上下文中,术语“互补决定区”或“CDR”是指构成由Kabat et al. (1991)所定义的抗原结合环体的、抗体的互补决定区。本发明的CDR和框架残基根据Kabat(Kabat et al. (1987))的定义来确定。

[0013] 在此使用的术语“抗体”是指全长抗体,例如单克隆抗体,以及具有对选定抗原足够的结合能力的其任何抗原结合片段或单链。本发明涵盖的抗原结合片段的实例包括Fab片段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fv片段;单结构域或dAb片段、分离的互补决定区(CDR);可任性地通过合成的接头连接的两个或更多个分离的CDR的组合以及单链可变片段(scFv)。“全长抗体”包括嵌合抗体,其中一个来源的抗原结合可变域联结到不同的来源的恒定域,例如,鼠抗体的可变域Fv结合到人类抗体的恒定域Fc。

[0014] 以上列举的抗体片段使用本领域普通技术人员已知的常规技术获得,与完整抗体一样来筛选所述片段的有用性。

[0015] 在本发明中,CDR来自单克隆的小鼠抗体22C4(Mohajeri et al. (2002), J. Biol. Chem. 277, pp. 33012-33017 and Neurodegenerative Dis. 1(2004), pp. 160-167)。所述鼠抗体针对Abeta的C-末端部分,更具体地针对氨基酸30到40之内的表位(SEQ ID NO:26)。

[0016] 在优选的实施方式中,所述抗体通过与它的目标结合来阻止Abeta、特别是Abeta₄₀和/或Abeta₄₂的寡聚化。

[0017] 本发明提供了包含一个或更多个互补决定区(CDR)序列的抗体,所述互补决定区序列具有与由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6构成的组的序列的至少80%的同一性。

[0018] 如已经提及的,本发明的CDR,即,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6,可以移植到适合的接受体框架中。术语“框架”是指

存在于更为趋异的 CDR 区域之间的、抗体可变区的本领域公认的部分。这样的框架区域一般被称为框架 1 到 4 (FR1、FR2、FR3 和 FR4)，提供了将重链和轻链抗体可变区内存在的三个 CDR 保持在三维空间中的支架，从而所述 CDR 可以形成抗原结合表面。适合的接受体框架优选的是免疫球蛋白衍生的抗原结合多肽的框架，它们是本领域公知的，包括但不限于，VhH 结构域、V-NAR 结构域、Vh 结构域、Fab、scFv、Bis-scFv、骆驼 IG、IfNAR、IgG、Fab2、Fab3、迷你抗体 (minibody)、双抗体 (diabodies)、三抗体 (triabodies) 和四抗体 (tetraabodies) (参见, Holliger, P. and Hudson, P. (2005), Nat. Biotechnol. 23 (9), pp. 1126-1136)。框架序列还可以是人类框架序列的共有序列。

[0019] 抗体选自免疫球蛋白的任何种类, 包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE, 以及同种型, 可以包括超过一种种类或同种型的序列。

[0020] 优选的, 所述抗体包含与可从人类文库获得的框架具有至少 60% 的同一性、(按以下顺序) 更优选至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 和最优选 95% 或甚至 100% 同一性的框架。

[0021] 本发明的抗体是重组分子, 因为 CDR 可以嫁接到人类框架上, 产生的抗体包含非人类 CDR, 和人类的或基本上人类的框架。做为选择, 所述抗体来自非人类抗体, 它的框架向人类抗体突变。两种可选方案都被术语“可从人类文库获得的”所涵盖。

[0022] 在本发明的一个实施方式中, 所述抗体是 scFv 抗体。scFv 可以是包含通过短接头肽连接的 VL 和 VH 结构域的全长 scFv, 所述短接头肽例如包含序列 GGGGS 的 1 到 4 次重复的接头, 优选 (GGGGS)₄ 肽 (SEQ ID NO :25), 或在 Alfthan et al. (1995) Protein Eng. 8 : 725-731) 中公开的接头, 或可以仅是具有对选定抗原的足够结合能力的 VL 或 VH 结构域。VL 和 VH 的连键可以是任何方向的, VL- 接头 -VH, 或 VH- 接头 -VL。

[0023] 在一个实施方式中, scFv 的框架是在还原环境下是稳定和可溶的。这些特征可以通过如 W001/48017 中公开的所谓的质量控制系统 (Quality Controlsystem) 来鉴定。所述抗体的稳定性优选的是特别稳定的 lambda 移植物的稳定性的至少一半那么好, 更优选至少与 lambda 移植物一样好, 最优选超过 lambda 移植物。Wörn et al. (2000) 描述了在约 2.0M GdnHCl 下 lambda 移植物的变性的发动。已经显示的是, 在质量控制系统中进行良好的 scFvs 在氧化条件下也是稳定和可溶的。在优选的实施方式中, 根据 Atha 和 Ingham (1981) 的方法测量的, 本发明的抗体的溶解度是至少 5mg/ml、更优选至少 10mg/ml, 最优选至少 20mg/ml。

[0024] 在进一步优选的实施方式中, 所述抗体包含可变轻链片段 (VL) 框架, 其相同于或衍生自由 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15 和 SEQ IDNO :16 构成的组的序列中所包含的框架序列。在衍生的序列的情况下, 所述序列显示了与由 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15 和 SEQ ID NO :16 构成的组的序列至少 60% 的同一性、(按以下顺序) 更优选至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 和最优选 95% 或甚至 100% 的同一性。

[0025] 在进一步优选的实施方式中, 本发明的抗体包含可变重链片段 (VH) 框架, 其相同于或来自于由 SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :20、SEQ IDNO :21、SEQ ID NO :22 和 SEQ ID NO :23 构成的组的序列中所包含的框架序列。在衍生的序列的情况下, 所述序列

显示了与由 SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22 和 SEQ ID NO :23 构成的组的序列至少 60% 的同一性、(按以下顺序)更优选至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 和最优选 95% 或甚至 100% 的同一性。

[0026] 序列 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22 和 SEQ ID NO :23 在 W003/097697 中公开。这些框架序列来自人免疫球蛋白来源,它们在还原条件下的溶解度和稳定性特征已经在所谓的质量控制系统中证实了,如在 W001/48017 中公开的。

[0027] 更优选的,所述抗体包含 SEQ ID NO :7 的 VH 片段和 SEQ ID NO :17 的 VL 序列。

[0028] 最优选的,所述抗体具有与 SEQ ID NO :24 至少 60% 相同的、更优选至少 75%、80%、90%、95% 相同的序列。在最优选的实施方式中,本发明的抗体在结构上由 SEQ ID NO :24 定义。在所述抗体中,SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :17 通过 (GGGGS)₄ 接头连接。产生的 scFv 抗体命名为 ESBA212。

[0029] 本领域普通技术人员理解的是,本发明的序列可以被改变,从而它们在氨基酸序列上与在此公开的序列不同,而保持了与 Abeta 的 C- 末端部分的选择性结合能力。因此,人源化抗体的框架区或 CDR 区都不需要精确地对应于供体 CDR 或接受体框架。其中的改变可以通过通过标准技术,例如定点诱变和 PCR 介导的诱变向抗体的核苷酸序列中导入一个或多个核苷酸取代、添加或删除来产生。这样的突变可以为不同的目的导入,例如,用于改善抗体的结合、溶解度或稳定性特征。本发明的抗体还可以包含在一个或多个非必需氨基酸残基处的保守性氨基酸替换。在另一个实施方式中,例如通过饱和诱变,突变可以沿着编码序列的全部或部分被随机地导入,产生的突变体可以筛选它们结合期望的目标的能力。

[0030] 两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置的数量的函数,考虑到为了两个序列的最佳比对需要引入的缺口的数量、每个缺口的长度。两个序列之间的序列比较和同一性百分比的确定可以使用本领域技术人员公知的数学算法来实现。同一性在此是指通过使用可在互联网上访问的 BLAST 程序 (BasicLocal Alignment Search Tools; 参见 Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) " Basic local alignment search tool. " J. Mol. Biol. 215 :403-410) 测定的。可以用 XBLAST 程序进行 BLAST 蛋白检索,分值 = 50, 字长 = 3, 来比较本发明的蛋白质分子和氨基酸序列。为了获得用于比较目的的有缺口的比对,可以利用如 Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17) :3389-3402 中描述的 Gapped BLAST。当利用 BLAST 和 GappedBLAST 程序时,可以使用各个程序 (例如, XBLAST 和 NBLAST) 的默认参数。

[0031] 本发明的蛋白质序列可以进一步用作“查询序列”来对公众数据库进行检索,例如,来鉴定相关的序列。这样的检索可以使用前述的 XBLAST 程序 (版本 2.0) 来进行。

[0032] 本发明涵盖的人源化成完全人类的抗体显示了以下特征:

[0033] (i) 结合 Abeta 的 C- 末端,因而以高亲和力和基本上相同的亲和力结合 Abeta₄₀ 和 Abeta₄₂ 两者;

[0034] (ii) 展示了对 Abeta 的寡聚和单体形式的高度亲和力;

[0035] (iii) 在体内基本上不识别淀粉样前体蛋白质 (APP);

[0036] (iv) 具有至少 5mg/ml、优选至少 10mg/ml、更优选至少 20mg/ml 的溶解度；和

[0037] (v) 显示了在人类施用时的免疫原性或没有免疫原性。

[0038] 进一步的，所述抗体优选地显示了至少一种、更优选超过一种、最优选所有的以下特征：

[0039] (vi) 介导小胶质细胞对纤维状 Abeta 的摄取；

[0040] (vi) 结合 β -淀粉样斑块；

[0041] (vii) 除去脑中的 β -淀粉样斑块和 / 或防止脑中淀粉样斑块的形成；

[0042] (viii) 降低 Abeta 毒性和神经元对发作产生的兴奋毒素性事件的相关易感性；

[0043] (ix) 跨越血脑屏障；和 / 或

[0044] (x) 基本上恢复了正常的行为；

[0045] (xi) 除去脑中的 β -淀粉样纤维和 / 或防止脑中淀粉样纤维的形成。

[0046] 本发明的抗体在体内基本上不识别淀粉样前体蛋白质 (APP)。优选的，当与对 APP 的结合亲和力相比时，对 Abeta 的结合亲和力是更高至少 2、更优选至少 5、再更优选至少 10、特别优选至少 50、最优选至少 100 倍。

[0047] 因而，在所述抗体向受试者施用，APP 不与 Abeta 竞争结合，因而所述抗体不干扰未裂解的 APP 的生物学。例如，这种特征对于与中枢神经系统中 Abeta 的异常积累和 / 或沉积相关的神经失调的诊断目的和 / 或医学治疗是特别令人感兴趣的。

[0048] 在此使用的术语“神经失调”包括但不限于阿尔茨海默氏病、轻微的认知损伤、失语症、额颞痴呆、Lewy-体疾病、帕金森氏病、Pick' s 病、Binswanger' s 病、脑淀粉样血管病、Down' s 综合症、多梗塞痴呆、Huntington' s 病、Creutzfeldt-Jakob 病、爱滋病痴呆综合症、抑郁、焦虑失调、恐怖症、Bell' s 麻痹、癫痫症、脑炎、多发性硬化；神经肌肉失调、神经肿瘤失调、脑肿瘤、神经血管的失调包括中风、神经免疫失调、神经耳科疾病、神经损伤，包括脊髓损伤、疼痛，包括神经性疼痛、儿科神经学和神经精神病学失调、睡眠失调、Tourette 综合症、轻微的认知损伤、血管性痴呆、多梗塞性痴呆、囊性纤维化、高雪氏病、其他运动障碍、青光眼和一般的中枢神经系统 (CNS) 的疾病。更优选的，本发明的抗体用于阿尔茨海默氏病、中风、神经外伤和青光眼的治疗、预防、延缓发展或诊断。

[0049] 在另一个方面，本发明的抗体被化学地修饰。化学修饰可以改变抗体的性质，例如，稳定性、溶解度、抗原结合特异性或亲和力、体内半衰期、细胞毒性和组织穿透能力。化学修饰是技术人员公知的。本发明的抗体的优选的化学修饰是 PEG 化。

[0050] 在一个实施方式中，所述抗体缀合到治疗试剂，例如，毒素或化学治疗化合物。所述抗体可以缀合到放射性同位素，例如，而限于， ^{212}Bi 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{212}At 、 ^{211}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pd 和 ^{188}Re ，用于诸如免疫治疗。

[0051] 在进一步的实施方式中，本发明的抗体可以与标记物连接。所述标记物可以容许抗体的比色检测。做为选择，所述抗体被放射性标记。最优选的，所述放射性标记物是 ^{64}Cu 。

[0052] 本发明的另一个目的是提供包含在此公开的抗体的诊断工具或科学工具。

[0053] 本发明的抗体可以用于诊断或筛选淀粉样变性或阿尔茨海默氏病的受试者，或测定受试者发生淀粉样变性或阿尔茨海默氏病的风险。

[0054] 在进一步的实施方式中，本发明此外涵盖诊断方法，包括向受试者、优选的哺乳动物施用有效量的本发明的抗体的步骤。所述方法进一步包括检测标记物的步骤。

[0055] 在进一步的实施方式中,本发明涵盖了包含在此描述的抗体的免疫分析,其中所述分析可以是体内或体外的免疫分析。所述抗体可以在液相中使用,或结合于固相。这样的免疫分析的实例包括放射免疫分析(RIA)、流式细胞计、Western 印迹和微阵列。

[0056] 此外,本发明涵盖了包含在此公开的抗体的测试试剂盒。

[0057] 在优选的实施方式中,本发明的抗体介导小胶质细胞的纤维状 Abeta 的摄取,从而降低体内 Abeta 水平。

[0058] 在进一步优选的实施方式中,本发明的抗体在施用有效量时改善了认知行为,拯救了患有阿尔茨海默氏病的患者中的不成熟的神经元的数量。

[0059] 此外,本发明涵盖包含在此公开的抗体的药物组合物,来治疗、预防和/或延迟发展以中枢神经系统中的 Abeta 的异常积累和/或沉积为特征的神经失调或淀粉样变性,特别是阿尔茨海默氏病。

[0060] 在进一步的实施方式中,本发明提供了制造用于治疗、预防和/或延迟发展上述神经失调(优选阿尔茨海默氏病)的药物组合物的方法,包括将在此公开的抗体与至少一种适合的药物载体组合的步骤。

[0061] 优选的,在此公开的药物组合物阻止和/或降低在受试者的脑中 Abeta 积累的作用。

[0062] 所述抗体可以与药学上可接受的载体组合地或与一种或更多种进一步的有效试剂组合地施用。有效试剂可以是小的有机分子和/或抗 Abeta 抗体。

[0063] 在此公开的抗体和/或药物组合物可以以不同的方式,例如,静脉内地、腹膜内、鼻内地、皮下地、肌肉注射地、表面地或皮内地、头骨内地、鞘内地施用到脑脊液中。优选的施用种类是(以这个顺序)经鼻内、皮下、静脉内、鞘内向脑脊液和颅内的施用。

[0064] 一般使用的制剂是技术人员已知的。例如,气雾制剂例如鼻喷雾制剂包括活性试剂与防腐剂和等渗试剂的纯化的水溶液或其他溶液。这样的制剂优选的被调节到与鼻粘膜相容的 pH 值和等渗状态。

[0065] 此外,其他试剂的共同施用或相继施用也是期望的。优选的,在阿尔茨海默氏病的情况下所述抗体以足够恢复正常的行为和/或认知性质的量存在。

[0066] 在进一步的实施方式中,本发明提供了治疗、预防和/或延迟发展如上所述的神经疾病的方法,包括向有需要的受试者施用有效量的本发明的抗体的步骤。

[0067] 本发明的另一个目的是提供哺乳动物的被动免疫的方法,包括向哺乳动物施用在此公开的抗体的步骤。优选的,所述被动免疫在抗 Abeta 免疫治疗的范畴内进行。

[0068] 在另一个实施方式中,本发明的特征是分离的核酸序列,其包含编码本发明所涵盖的氨基酸序列的序列。所述核酸可以是 DNA 或 RNA,可以是单链的或双链的。

[0069] 此外,本发明提供了含有 DNA 序列的克隆或表达载体,所述 DNA 序列编码本发明的多肽、最优选的抗体。

[0070] 此外,提供了携带载体和/或核酸序列的适合的宿主细胞,所述载体和/或核酸序列包含编码在此公开的氨基酸序列的序列。这可以是原核或真核细胞,特别是大肠杆菌、酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞。

[0071] 本发明的抗体可以使用重组分子生物学领域的常规技术产生。知道多肽的序列,本领域的技术人员可以通过基因合成产生编码所述多肽的相应的 cDNA。

[0072] 在另一个实施方式中,提供了生产本发明的抗体的方法,包括在容许所述抗体的合成的条件下,培养用编码所述抗体的 DNA 转化的宿主细胞,并从所述培养物回收所述分子。优选的,所述方法提供了从大肠杆菌包涵体,或如果使用的 scFv 构建体包含指导多肽进入周质的信号序列,从大肠杆菌周质纯化的 scFv 抗体。可能必需的是包括重新复性的步骤来将抗体重折叠为功能分子。

[0073] 在进一步的实施方式中,本发明提供了治疗的方法,包括向有需要的受试者施用治疗有效量的在此描述的多核苷酸、载体或宿主细胞的步骤。

[0074] 在第二方面,本发明提供了诊断的方法,包括步骤:

[0075] (i) 标记抗体;

[0076] (ii) 向受试者鼻内地或全身地施用有效剂量的所述抗体;和

[0077] (iii) 检测所述受试者的身体部分中所述标记的抗体的浓度和/或存在。

[0078] 所述抗体优选的是针对本发明的 Abeta 的氨基酸 30 到 40 之内形成的表位的人源化抗体,优选的是单链抗体(scFv)。在优选的实施方式中,所述抗体是用正电子发射同位素、最优选的 ^{64}Cu 标记的。

[0079] 在此使用的术语“有效剂量”是指足够实现或至少部分实现期望的效果,例如,可检测的信号的量。针对这种用途的有效剂量将取决于标记物的检测强度、受试者的体重以及要检查的区域的程度。

[0080] 优选的,所述受试者是哺乳动物;更优选的,所述受试者是人类。

[0081] 产生身体部分的三维图像的医学成像技术电子发射断层扫描(PET)是基于来自正电子的发射的放射性的检测。一般地,生物分子是放射活性标记的,例如,它包括放射性示踪剂同位素。在一般通过注射到血液循环中来向受试者施用标记的生物分子之时,放射活性标记的生物分子变为在感兴趣的组织浓缩的。受试者然后被置于成像扫描器中,其检测正电子的发射。

[0082] 在一个实施方式中, ^{64}Cu 标记的抗体被施用给受试者,通过将受试者置于成像扫描器中并检测正电子的发射来进行步骤 iii)。

[0083] 因而本发明涵盖 PET 成像的方法,包括向受试者施用本发明的 ^{64}Cu 标记的抗体的步骤。

[0084] 本发明的序列是以下的:

[0085] SEQ. ID. No. 1 :VL 的 CDR1

[0086] RASSSVNYMH

[0087] SEQ. ID. No. 2 :VL 的 CDR2

[0088] ATSNLAS

[0089] SEQ. ID. No. 3 :VL 的 CDR3

[0090] QQWRTNPPT

[0091] SEQ. ID. No. 4 :VH 的 CDR1

[0092] EYTMH

[0093] SEQ. ID. No. 5 :VH 的 CDR2

[0094] GVNPNYDNTSYIRKLQG

[0095] SEQ. ID. No. 6 :VH 的 CDR3

- [0096] YGGLRPYYFPMDF
- [0097] SEQ. ID. No. 7 :ESBA212 的 VL
- [0098] ADIVLTQSPSSLSASVGDRTLTTCRASSSVNYMHWYQQRPGKPPKALYATSNLASGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISLQPEDVAVYYCQQWRTPPTFGQGTKLEVKR
- [0099] SEQ. ID. No. 8 :框架 2.3 的 VL
- [0100] AEIVLTQSPSSLSASVGDRTLTTCRASQGI RNELAWYQQRPGKAPKRLIYAGSILQSGVPSFSGSGSGT
EFTLTISLQPEDVAVYYCQQYYSLPYMFGQGTKVDIKR
- [0101] SEQ. ID. No. 9 :22C4 的 VL
- [0102] DIVLTQSPAILLSASPGEKVTLTTCRASSSVNYMHWYQQKPGSPPKAWIYATSNLASGVPPDRFSASGSGTS
YSLTISRVEAEDAATYYCQQWRTPPTFGAGTKLELKR
- [0103] SEQ. ID. No. 10 :VL A
- [0104] EIVMTQSPSTLSASVGDRTLTTCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGA
EFTLTISLQPDDEFATYYCQQYKSYWTFGQGTKLTVLG ;
- [0105] SEQ. ID. No. 11 :VL B
- [0106] EIVLTQSPSSLSASVGDRTLTTCRASQGI RNELAWYQQRPGKAPKRLIYAGSILQSGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISLQPEDVAVYYCQQYYSLPYMFGQGTKVDIKR ;
- [0107] SEQ. ID. No. 12 :VL C
- [0108] EIVMTQSPATLSVSPGESAAALSCRASQGVSTNVAWYQQKPGQAPRLLIYGATTRASGVPARFSGSGSGT
EFTLTINSLQSEDFAAAYCQQYKHWPPWTFGQGTKVEIKR ;
- [0109] SEQ. ID. No. 13 :VL D
- [0110] QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGTSNIGDNYVSWYQQLPGTAPQLLIYDNTKRPSGIPDRFSGSKSG
TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWSSLSGVVFGGGTKLTVLG ;
- [0111] SEQ. ID. No. 14 :VL E
- [0112] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTLTHYLAWYQQKPGQAPRLLIYDTSKRATGVPARFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDSALYYCQQRNSWPHTFGGGTKLEIKR ;
- [0113] SEQ. ID. No. 15 :VL F
- [0114] SYVLTQPPSVSVAPGQTATVTCGGNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNT
ATLTIRRVEAGDEADYYCQVWSSSDHNVFGSGTKVEIKR ;
- [0115] SEQ. ID. No. 16 :VL G
- [0116] LPVLTQPPSVSVAPGQTARISCGNNIETISVHWYQQKpGQAPVLVSDSVRPSGIPERFSGSNSGNT
ATLTISRVEAGDEADYYCQVWSSSDYVVFVFGGGTKLTVLG ;
- [0117] SEQ. ID. No. 17 :ESBA212 的 VH
- [0118] QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSTASGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWMGGVNPYNDNTSYIRKLQGRVT
LTVDRSSSTAYMELTSLTSDDTAVYYCARYGGLRPYYFPMDFWGQGTLVTVSS
- [0119] SEQ. ID. No. 18 :框架 2.3 的 VH
- [0120] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYSFTGYFLHWVRQAPGQGLEWMGRINPDSGDTYAQKFQDRVTL
TRDTSIGTVYMELTSLTSDDTAVYYCARVPRGTYLDPWDYFDYWGQGTLVTVSS
- [0121] SEQ. ID. No. 19 :22C4 的 VH
- [0122] QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVKQSHGKSLEWIGGVNPYNDNTSYIRKLQGKVT

LTVDRSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARYGGLRPYYFPMDFWQGTSVTVSS

[0123] SEQ. ID. No. 20 :VH H

[0124] QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHVLRFLEWLPDAFDIWGQGTTLTVS S

[0125] SEQ. ID. No. 21 :VH I

[0126] EIVLTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSSQSGVPSRFRGSESGT
DFTLTISNLQPEDFATYYCQQSYRTPFTFGPGTKVEIKR

[0127] SEQ. ID. No. 22 :VH J

[0128] VQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGYSTGYFLHWVRQAPGQGLEWMGRINPDSGDTIYAQKFQDRVTL
TRDTSIGTVYMELTSLTSDDTAVYYCARVPRGTYLDPWDYFDYWGQGTTLTVSS

[0129] SEQ. ID. No. 23 :VH K

[0130] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDAGI AVAGTGF DYWGQGTTLTVSS

[0131] SEQ. ID. No. 24 :ESBA212 (根据 Kabat 的 CDR 被划了下划线, 接头序列以斜体显示)

[0132] ADIVLTQSPSSLSASVGRVTLTCRASSSVNYMHWYQQRPGKPPKAL IYATSNLASGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISNLQPEDVAVYYCQQWRTNPPTFGQGTKLEVKRGSGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGPEVKKPGASV
KVSTASGYTFEYTMHWVRQAPGQGLEWMGGVNPYNDNTSYIRKLQGRVTLTVDRSSSTAYMELTSLTSDDTAVYY
CARYGGLRPYYFPMDFWQGQGTTLTVSS

[0133] SEQ. ID. No. 2S :接头

[0134] GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS

[0135] SEQ. ID. No. 26 :Abeta₃₀₋₄₀ 表位

[0136] AIIGLMVGGVV

[0137] 除非另外定义, 此处使用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域的一个普通技术人员通常所理解的含义。虽然类似于或等同于在此描述的那些的方法和材料可以被用于本发明的实践和测试, 但是以下描述了适合的方法和材料。在冲突的情况下, 当前的说明书, 包括定义, 是支配性的。此外, 材料、方法和实施例仅是说明性的, 而不意图是限制性的。

[0138] 要理解的是, 各种实施方式、优选项和范围可以随意地组合。进一步的, 根据特定的实施方式, 选定的定义、实施方式或范围可能不适用。

[0139] 附图的简要描述

[0140] 当参考以下的详细描述时, 本发明将被更好地理解, 上文所述以外的目的将变得显而易见。这样的描述引用了附随的图画, 其中:

[0141] 附图 1 显示了 ESBA212 的轻链可变区与 ESBATech 的框架 2.3 的 VL 的序列比较, 在所述 VL 上移植了来自 22C4 的 Abeta 特异性 CDR。

[0142] 在附图 2 中, 说明了 ESBA212 的可变重链 VH 与 ESBATech 的框架 2.3 的 VH 的序列比较。

[0143] 附图 3 描绘了 ESBA212 的 VH 与来自小鼠 22C4 抗体的原始 VH 之间的序列比对。

[0144] 附图 4 显示了 ESBA212、22C4 和框架的 VH 的序列比时。

[0145] 附图 5 显示了 AD 小鼠模型中通过 ESBA212 的斑块离体标记的结果。使用了石蜡切

片或冷冻切片（非固定的和后固定的）。附图 5A：小鼠模型 SwePS1，石蜡切片；附图 5B：小鼠模型 SwePS1，冷冻切片；附图 5C：小鼠模型 SweArc，石蜡切片；附图 5D：小鼠模型 SweArc，冷冻切片。

[0146] 附图 6 描述了在人类 AD 脑中通过 ESBA212 的斑块离体标记的结果。使用了石蜡切片或冷冻切片（非固定的和后固定的）。附图 6A：石蜡切片；附图 6B：冷冻、丙酮固定的；附图 6C：冷冻，未处理的；附图 6D：冷冻；丙酮固定的，在柠檬酸盐缓冲液中沸腾 10 分钟。

[0147] 附图 7 显示了 ESBA212（附图 7A）和硫磺素（Thioflavine）S（附图 7B）对 SwePS1 小鼠的脑切片的淀粉样斑块的离体染色。

[0148] 附图 8 说明了与 FITC 标记的 Abeta42 单体结合的 ESBA212 的大小排阻层析的结果（附图 8A），在附图 8B 中是框架 FW2.3 与 FITC 标记的 Abeta42 单体孵育的对照。

[0149] 附图 9 显示了利用转基因的 SwePS1 小鼠（附图 9A：泳道 1：ESBA212，泳道 2：6E10）的脑组织匀浆和 ADDLs（附图 9B：泳道 1：Fw 2.3，泳道 2：ESBA212，泳道 3：6E10）作为抗原的两个 Abeta42 免疫印迹。ESBA212 主要识别单体，较弱地识别三聚体。

[0150] 附图 10：通过 ELISA 的 ESBA212 的亲合力的鉴定（附图 10A：对于 Abeta40；亲合常数：6.26nM；附图 10B，对于 Abeta42；亲合常数：6.31nM）。

[0151] 附图 11：ESBA212 的质谱法。

[0152] 附图 12 描绘了 FT-IR 光谱，显示了在 25 到 95°C 的不同温度下 ESBA212 的解折叠的百分比。

[0153] 附图 13：显示了在存在（泳道 1）或不存在（泳道 2）小鼠脑组织匀浆的情况下孵育的 ESBA212 的稳定性的 Western 印迹。

[0154] 附图 14：硫黄素 T 分析的结果展现了 ESBA212 在体外抑制 Abeta42 寡聚化。

[0155] 附图 15：在单次静脉内或腹膜内注射之后，随着时间的过去，ESBA212 的平均血清浓度。

[0156] 附图 16：在鼻内的（附图 16A）或静脉内的（附图 16B）施用之后结合的 ESBA212 的检测。ESBA212 独立于所选的施用途径在脑中与淀粉样斑块结合。

[0157] 附图 17：在鼻内的施用（附图 17A）和硫磺素 S 染色（附图 17A）之后 SwePS1 小鼠脑中结合的 ESBA212 的检测确认了 ESBA212 结合淀粉样斑块。

[0158] 附图 18：与 ESBA212（附图 18A 和 C）相比的，⁶⁴Cu-ESBA212（附图 18B 和 D）对淀粉样斑块的离体标记。附图 18A 和 B 显示了石蜡切片，而附图 18C 和 D 显示了冷冻切片。

[0159] 附图 19：在鼻内的施用 24 小时和 48 小时之后小鼠（SwePS1）脑切片上结合的 ESBA212 和 Cu-ESBA212 的检测。附图 19A：24 小时后的 ESBA212；附图 19B：48 小时后的 ESBA212；附图 19C：24 小时后的 Cu-ESBA212；附图 19D：48 小时后的 Cu-ESBA212。

[0160] 附图 20：在静脉内的 ESBA212 注射之后肾中 ESBA212 的检测。

[0161] 附图 21：类似于附图 16A 的进一步的鼻内施用，显示了在用 200 μg 的 ESBA212 的鼻内处理 1 小时之后灌注的动物的固定 SwePS1 小鼠脑切片上的 Aβ - 染色。

[0162] 附图 21A：用抗 His 抗体染色的

[0163] 附图 21B：用 6E10 染色的对照

[0164] 附图 21C：用抗兔 Cy3 染色的阴性对照

[0165] 附图 21D：用 22c4IgG 染色的对照。

[0166] 附图 22 :在用 PBS、22c4IgG 和 ESBA212 治疗 3 个月之后 APP^{swe}/PS1 Δ E9 小鼠中的脑 A β 40 和 42 水平。

[0167] 附图 22A :可溶级分 (TBS)

[0168] 附图 22B :不溶的级分 (GuHCl)

[0169] 附图 22C :膜结合的级分 (TBS-Triton)

[0170] 附图 23 :用 6E10 染色的和使用 ImageJ 软件评估的治疗的 APP^{swe}/PS1 Δ E9 小鼠的石蜡切片。

[0171] 附图 23A :斑块数量

[0172] 附图 23B :斑块面积。

[0173] 实施本发明的方法

[0174] 实施例 1 :ESBA212 的产生

[0175] 来自鼠抗体 22C4 的单链抗体 ESBA212 的抗原结合部分由苏黎士大学鉴定。Abeta 特异性小鼠 IgG 抗体 22C4 通过用 Abeta₃₀₋₄₂ 免疫小鼠产生,因而是针对 Abeta 的 C-末端的。根据 Burmester and Plückthun (2001) 通过 RT-PCR 进行 VL 和 VH 结构域的克隆。简要地, mRNA 来源于产生抗体 22C4 的杂交瘤细胞。进行利用 Burmester 和 Plückthun 描述的引物的 RT-PCR,来扩增 VL 和 VH 结构域。两个结构域通过 SOE-PCR (通过重叠延伸的剪接) 来组装。然后,扩增的单链可变片段 (scFv) 通过 SfiI 消化,克隆到适合的表达载体中并测序。因而获得小鼠 scFv 片段,其保持了它对 Abeta₄₂ 的特异性。所述 scFv 被人源化产生单链抗体 ESBA212 (序列比较参见附图 1 到 4。附图 1 和 2 显示了 ESBA212 与框架 2.3 的序列比对,在框架 2.3 上移植了来自 22C4 的 Abeta 特异性 CDR)。

[0176] 编码 ESBA212 的质粒被导入适合的大肠杆菌菌株 (例如 BL21),表达为包涵体。功能性单链抗体通过包涵体的重折叠和随后通过凝胶过滤纯化来获得。

[0177] 实施例 2 :在组织切片上与淀粉样斑块结合

[0178] 为了测试 scFv ESBA212 是否能够识别 Abeta,对含有淀粉样斑块的脑组织进行离体免疫染色。因而,使用了表达引起 Abeta 斑块形成的人类 APP 的各种转基因小鼠 (SweArc, SwePS1) 的脑组织切片和来自人类阿尔茨海默氏病患者的脑切片。

[0179] ESBA212 独立于使用的阿尔茨海默氏病小鼠模型在来自小鼠的冷冻和石蜡切片上与淀粉样斑块反应 (附图 5)。ESBA212 还在固定的人类阿尔茨海默氏病组织上染色斑块 (附图 6A)。特别是在血管周围,可以观察到称为淀粉样血管病的强染色。淀粉样血管病是指 β -淀粉样蛋白在大脑皮层和柔脑膜的小的和中等大小的血管中的沉积。然而,ESBA212 不结合人类冷冻切片上的淀粉样斑块,非固定的 (附图 6B) 和后固定的 (附图 6C、D) 切片也都不结合。

[0180] 在人类和啮齿动物切片之间的不同结果可以解释为转基因小鼠过量表达人类 APP,因而不同斑块种类的丰度与人类相比可能不同。Güntert 等 (2006) 描述了,在转基因小鼠模型和人类 AD 脑中分散的斑块之间存在超微结构差异。在小鼠脑中,不同大小的致密的斑块代表了大多数的。在人类 AD 患者的皮层和海马中,这种斑块类型仅发生 10%,而核心的斑块占优势 (-90%) (Güntert et al., 2006)。由于这些观察到的差异,在转基因小鼠的脑中 C-末端可能是可接近的,而在 AD 患者的脑中不是。人类脑组织的固定可能以一定方式改变淀粉样斑块的构象,否则被包埋的 C-末端表位被暴露,变为对 ESBA212 是可接近

的。

[0181] 附图 7 显示了 ESBA212 与 SwePS1 脑切片上的淀粉样斑块的特异性结合, 因为 ESBA212 的染色模式与硫黄素 S 的模式相符, 硫黄素 S 是特异性结合淀粉样蛋白质沉积物的标准的荧光染料。

[0182] 实施例 3 : 与 Abeta42 单体的结合

[0183] 通过大小排阻层析可以显示的是, ESBA212 结合 FITC 标记的 Abeta42。ESBA212 与 FITC-Abeta42 共同孵育并加载到柱上。ESBA212 和 FITC-Abeta42 一起洗脱 (附图 8A), 因为 ESBA212 的峰和 FITC-Abeta42 的峰精确地重叠, 并显示了与单独的 ESBA212 (数据未显示) 相比有 5kDa 大小的位移, 因而代表了结合的 FITC-Abeta42 (5kDa)。然而, 框架 FW2.3 含有与 ESBA212 相同的框架区域但是没有 Abeta 特异性 CDR, 当 FITC-Abeta42 与框架 FW2.3 孵育时, 存在着观察到的两个明显不同的峰, 一个是 scFv 的, 第二个是 FITC-Abeta42 的 (附图 8B)。

[0184] 实施例 4 : 与不同 Abeta42 构象的结合

[0185] 进行 Abeta42 免疫印迹来进一步表征 ESBA212 的特异性。因而, SwePS1 小鼠的脑组织匀浆以及体外产生的 ADDL (淀粉样 β -衍生的可扩散的配体, 通过 Klein 的方案) 在 SDS 凝胶上分离并转移到膜上。ESBA212 和 6E10 (Abeta 特异性 IgG 作为对照) 被用于检测 Abeta。对照抗体 6E10 识别 Abeta42 单体、 β -残端、三聚体以及全长 APP。然而, ESBA212 主更识别 Abeta42 单体 (附图 9)。

[0186] 实施例 5 : 亲和力的体外表征

[0187] ESBA212 的结合性质在 ELISA 中测试, 其中 Abeta40 和 Abeta42 分别被用作抗原。96 孔平板用稀释度缓冲液 (PBS/0.01% BSA/0.2% Tween-20) 中的 5 μ g/ml 中性亲和素 (neutravidin) 包被, 在 4°C 孵育过夜。平板然后用 TBS/0.005% Tween-20 洗涤 3 次。生物素化的 Abeta40 或 Abeta42 (稀释缓冲液中 1 μ g/ml) 添加到每个反应孔, 在室温下孵育平板 15 分钟。如上述洗涤平板, 通过添加稀释缓冲液阻断非特异性结合位点。平板在室温下孵育另外 1.5 小时, 同时摇动。在洗涤之后, 从 0 到 500nM 的制备的 ESBA212 稀释物一式三份添加到反应孔中, 在室温下 (RT) 摇动孵育 1 小时。洗涤平板, ESBA212 通过纯化的兔多克隆抗 ESBA212 抗体 (稀释缓冲液中 1 : 10000) 在 RT 下 1 小时来检测。在洗涤之后, 辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG (稀释缓冲液中 1 : 4000) 被用于检测早先结合的兔抗体, POD 用作底物。通过添加 1M HCl 停止反应, 在 450nm 读取光吸收。

[0188] 根据测量的 ESBA212 曲线, 可以计算 EC50。对于 ESBA212, 对 Abeta40 和对 Abeta42 的 EC50 被测定为处在 1-15nM 的范围内 (附图 10)。

[0189] 实施例 6 : 质量测定

[0190] 通过电喷质谱法测定 ESBA212 的精确质量。因而, 纯化 ESBA212, 在 50% 乙腈 / 0.2% 甲酸 (pH2) 中测量。质谱 (neutral mass (中性质量)) 使用 MaxEnt1 软件来解卷积。

[0191] ESBA212 的质量测定为 26517Da (附图 11)。

[0192] 实施例 7 : 通过 PEG 沉淀的溶解度测定

[0193] ESBA212 的表观溶解度在存在聚乙二醇 3000 (PEG3000) 的情况下根据 Athaand Ingham (1981) 的方法测量。ESBA212 (20mg/ml) 与等体积的含有不同浓度的

PEG3000 (30-50%) 的缓冲液孵育,产生最终蛋白质浓度 10mg/ml 和最终 PEG 浓度 15-25%。在室温下孵育 30 分钟之后,样品进行离心,上清液中的蛋白质浓度根据 280nm 的吸光度来测定。表观溶解度通过相对于上清液中测定的蛋白质浓度的对数标绘 PEG 浓度来计算。溶解度通过外推到 0% PEG 来测定。

[0194] ESBA212 的溶解度被测定为大约 20mg/ml。

[0195] 实施例 8 :热稳定性的测定

[0196] ESBA212 的热稳定性通过在 Bruker Tensor 27 光谱仪上在温度从 25-95°C 提高时测量傅里叶变换红外 (FT-IR) 光谱来测定。在测量光谱之前,ESBA212 在每个温度下放置 1-2 分钟以平衡。

[0197] ESBA212 的溶解温度 (蛋白质的 50% 解折叠) 被测定为在 62.8°C。然而,ESBA212 的解折叠在约 40°C 下已经开始 (附图 12)。

[0198] 实施例 9 :体外的 Abeta 聚集阻止

[0199] 研究 ESBA212 是否能够抑制 Abeta42 寡聚化的形成。因而,在溶液中进行硫黄素 T 分析。硫黄素 T 与聚合的 Abeta 纤丝快速地缔合,产生 482nm 处的增强的发射,与游离染料的 445nm 的相对。这种改变取决于 Abeta 的聚集的状态,因为单体的或二聚的肽不反应 (LeVine III, 1993)。

[0200] 2.5 μ M Abeta42 在存在硫黄素 T 和 500mM NaCl 的情况下与或不与 2.27 μ M ESBA212 一起孵育。如在附图 14 中可见的,在 3 小时内,ESBA212 的存在明显地体外抑制 Abeta 寡聚化,因为在 482nm 处测量的荧光没有提高。相比之下,当不向溶液添加 ESBA212 时,测量到更高的荧光值,表明 Abeta 聚合物的形成。

[0201] 实施例 10 :药物动力学性质的体内表征

[0202] 为了测定 ESBA212 的药物动力学性质,APP 转基因小鼠以及非转基因的同窝出生仔用 ESBA212 的单次注射静脉内地或腹膜内处理。在注射后预定的时点,眼窝后抽取血液,血清中 ESBA212 的数量通过定量 ELISA 来测量,使用 Pk-Summit 软件分析数据。

[0203] 动物 :对于药物动力学实验,使用 Prof. Dr. R. Nitsch (苏黎士大学) 产生的阿尔茨海默小鼠模型。这些小鼠 (PrP-APP Sw/Arc 10+) 过量表达人类 APP695,其在处于朊病毒蛋白质启动子控制下,含有在单个构建体中的 Swedish 和 Arctic 突变 (Knobloch et al, 2006)。小鼠在 C57BL/6 和 DBA/2 的杂交背景下繁殖,防止健康和繁育问题的出现。这个株系的特征是 :i) 自 6 月龄起,与损害的认知功能相关的早期细胞内 Abeta 沉积的形成 ;ii) 自 7 月龄开始斑块的形成,以及接下来数月的高度增加。 β -淀粉样斑块的这种发展与严重的脑淀粉样血管病 (CAA) 相符 (Knobloch et al. 2006)。

[0204] 用于药物动力学研究的小鼠是 6 月龄的。

[0205] 实验过程 :药物动力学参数在 ESBA212 的静脉内的或腹膜内注射之后测定。在静脉内治疗的情况下,使用 APP 转基因小鼠和非转基因的同窝小鼠。2 只动物的 7 个组接受 PBS pH 6.5 中的 15mg/kg ESBA212 的单次静脉内注射。在预定的时点 (10 和 30 分钟、1、2、4、8、12 和 24 小时) 眼窝后地抽取血液,其以每个时点可以采集 4 个样品的方式 (例外 :在 10 分钟和 24 小时仅 2 个样品)。血清中的 ESBA212 浓度通过定量 ELISA 来测量。

[0206] 在 ESBA212 的腹膜内施用的情况下,仅使用 APP 转基因小鼠。2 只动物的 7 个组接受 PBS, pH 6.5 中 20mg/kg ESBA212 的单次腹膜内注射。血液样品是如上文对静脉内的处

理描述的。

[0207] 结果：在 ESBA212 的静脉内注射之后，全身性 PK 遵循双相清除。在注射时，存在着清楚的分配阶段（ α -清除，0-1 小时）以及观察到末端清除阶段（ β -清除，8-12 小时）（附图 15）。在转基因和非转基因小鼠中，分别在 α -清除（0.26 对比 0.23h）和末端半衰期（8.79 对比 7.11h）方面没有显著差异（表 1）。并且，在转基因和非转基因小鼠中，另外计算的 PK 值是可比较的。然而，观察到的分布体积（Vd）是相当高的（77.69 和 76.72ml）。这可能暗示了 ESBA212 非常好和快速地穿透到组织中。相反，当腹膜内施用 ESBA212 时，存在着在药物动力学方面观察到的差异。可以检测到清楚的吸收阶段，具有在注射后 1 小时的峰值 ESBA212 血清浓度。然后，分布半衰期比静脉内施用之后的长大约 5 倍，这可以得到启示，当通过腹膜内的途径注射时，获得了沉积效应。然而，在腹膜内注射后计算的末端半衰期比静脉内注射稍短。还在生物体中 ESBA212 的平均留存时间（MRT）方面检测到清楚的差异，当 scFv 腹膜内地注射而不是静脉内地注射时，其更长约是 3 倍。在注射的静脉内和腹膜内途径之间的 AUC（曲线下面积）、分布容积（Vd）和清除（CL）中观察到的差异可以由腹膜内治疗的动物接受了更高剂量是 ESBA212（20mg/kg 而不是 15mg/kg）来解释。当根据对 20mg/kg 获得的值计算 15mg/kg 的腹膜内剂量的 PK 参数时，获得了以下的参数：在吸收、分布、清除半衰期方面以及在 MRT 方面没有变化。然而，AUC（79.124 μ g-h/ml）、Vd（67.52mL）和 CL（7.84ml/h）则是与静脉内注射后获得的值相当的。

[0208] 表 1：在 ESBA212 的静脉内的和腹膜内注射之后的药物动力学参数

[0209]

| | | PrP-APP Sw/Arc (tg) | PrP-APP Sw/Arc (非-tg) | PrP-APP Sw/Arc (tg) |
|--------------|------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 施用的途径 | | i. v. | i. v. | i. p. |
| 剂量 | mg/kg | 15 | 15 | 20 |
| 吸收半衰期 | h | | | 0.10 |
| 分布半衰期 | h | 0.26 | 0.23 | 1.28 |
| 清除半衰期 | h | 8.79 | 7.11 | 5.84 |
| 曲线下面积 (AUC) | μ g- h/ml | 80.663 | 66.292 | 105.491 |
| 平均留存时间 (MRT) | h | 1.23 | 1.72 | 4.32 |
| 分布容积 (Vd) | ml | 77.69 | 76.72 | 50.62 |
| 清除 (CL) | ml/h | 6.06 | 7.38 | 5.88 |

[0210] 实施例 11 :体内斑块标记

[0211] 研究当静脉内地或鼻内地施用时, ESBA212 是否能够结合淀粉样斑块。

[0212] 因此, 通过静脉内的或鼻内的施用途径, 转基因的 SwePS1 小鼠每 24h 用 210 μ g 的 ESBA212 治疗 3 次。首次施用 72h 之后, 动物用 PBS 灌注, 分析脑中 ESBA212 的存在。ESBA212 在所述 scFv 的静脉内和鼻内施用之后结合于脑中的淀粉样斑块 (附图 16)。硫黄素 S 染色确认了 ESBA212 实际地结合淀粉样斑块。用 ESBA212 鼻内地治疗的 SwePS1 小鼠的连续的脑切片显示了 ESBA212 和硫黄素 S 的相同染色模式 (附图 17)。

[0213] 实施例 12 :使用 ^{64}Cu 标记的 ESBA212 的 PET 成像

[0214] ESBA212 的 ^{64}Cu 标记 :ESBA212 偶联到结合了同位素 (^{64}Cu 的半衰期是 12.7 小时) 的 CPTA 螯合剂 (大约 200Da, 具有 4 个 N 原子的大环)。螯合剂偶联到 ESBA212 内的赖氨酸残基。偶联是轻度的, 不是每个赖氨酸都被标记。通过质量测定显示了, 平均两个 CPTA 分子结合到每个 ESBA212 分子。

[0215] 实施例 13 :通过 ^{64}Cu -ESBA212 的斑块的离体标记

[0216] 为了确定 ^{64}Cu -ESBA212 是否仍然能够结合淀粉样斑块, 对固定和非固定的 SwePS1 小鼠脑切片进行了免疫组织化学染色。 ^{64}Cu 标记不改变 ESBA212 的结合性质, 因为 ^{64}Cu -ESBA212 仍然能够结合固定以及非固定的脑切片上的淀粉样斑块 (附图 18)。

[0217] 实施例 14 :通过 ^{64}Cu -ESBA212 的斑块体内标记

[0218] 使用转基因的 SwePS1 小鼠体内研究了低温标记的 Cu-ESBA212 的结合性质。小鼠接受 210 μ g ESBA212 或 100 μ g Cu-ESBA212 的鼻内施用。动物在施用后 24 或 48 小时处死, 分别分析脑部的 ESBA212 和 Cu-ESBA212 对淀粉样斑块的结合。

[0219] 如在附图 19 中所见, 在施用 24 和 48 小时后, ESBA212 可被检测。对 Cu 标记的 ESBA212 观察到了相同的结果。因此, Cu-ESBA212 的结合性质与 ESBA212 相比在体内没有改变, 如已经离体标记所展现的。

[0220] 实施例 15 :经由肾脏的清除

[0221] 为了得到关于 ESBA212 的清除途径的某些信息, scFv 静脉内地注射到小鼠中。之后不久处死动物, 通过免疫组织化学方法分析肾脏。

[0222] ESBA212 渗入肾脏中的原尿中, 在近端小管重吸收, 在此它最可能经由溶酶体途径降解 (附图 20)。

[0223] 实施例 16 :体内斑块标记

[0224] 使用鼻内的施用, 进行类似于实施例 11 中进行的测试的进一步测试。

[0225] 转基因 SwePS1 小鼠用 200 μ g 的 ESBA212 鼻内地处理。动物在鼻内的处理之后 1h 灌注。固定的 SwePS1 小鼠脑切片上的 A β 染色如下进行并记录 :

[0226] 用抗 His 抗体染色 (附图 21A)

[0227] 用 6E10 对照染色 (附图 21B)

[0228] 用抗兔 Cy3 (附图 21C) 阴性对照染色

[0229] 用 22c4 IgG 对照染色 (附图 21D)

[0230] 实施例 17 :

[0231] APP^{swe}/PS1 Δ E9 小鼠用 PBS、22c4IgG 每周一次、和用 ESBA212 每周两次治疗 3 个月。在治疗的结束时, 灌注动物, 分离脑, 并分成两个部分。一个部分被匀质化, 产生几种提

取物,使用商售的 ELISA 测试 (The Genetics Company) 测定脑 A β 40 和 42 水平。发现的是, A β 40 和 42 水平在可溶级分 (TBS) 中提高,在不溶的级分 (GuHCl) 中降低。在膜结合级分 (TBS-Triton) 中, A β 40 水平保持不变,而 A β 42 水平提高 (参见附图 22)。这指出了 A β 从不溶级分到可溶级分的重新分配。

[0232] 另一个部分用于组织学。治疗的 APP^{swe}/PS1 Δ E9 小鼠的石蜡切片用 6E10 染色。使用 ImageJ 软件评估斑块数量和面积。

[0233] 实验揭示了,用 ESBA212 治疗的动物显示了显著降低的数量,以及降低的淀粉样斑块大小 (参见附图 23)。这进一步支持了以下思想, ESBA212 结合 A β 纤维,随后将它们破坏为单体或小的寡聚体,这将平衡朝向可溶的 A β 库移动。

[0234] 上面显示的结果支持了以下发现, ESBA212 在静脉内的和鼻内的施用后进入脑部,结合转基因小鼠的皮层和海马中的 Abeta 斑块。此外,用 scFv 鼻内地治疗的 APP^{swe}/PS1 Δ E9 小鼠展现了皮层中淀粉样斑块的降低的数量和平均大小,以及在脑提取物中不溶级分中 A β 42 的降低的水平。

[0235] 虽然显示和描述了本发明的当前优选的实施方式,明显地要理解的是,本发明不限于此,但是在以下权利要求的范围内可以被另外不同地包含或实施。

[0236] 参考文献

[0237] Alftan et al. (1995) *Protein Eng.* 8 :725-731.

[0238] Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17) :3389-3402.

[0239] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) " Basic local alignment search tool. " *J. Mol. Biol.* 215 :403-410.

[0240] Atha, Donald H. and Ingham, Kenneth C. (1981) :Mechanism of precipitation of proteins by-polyethylene glycols, *JBC* 256 :12108-12117.

[0241] Bacskai, B. J., Kajdasz, S. T., Christie, R. H., Carter, C, Games, D., Seubert, P., Schenk, D. and Hyman, B. T. (2001) :Imaging of amyloid-beta deposits in brains of living mice permits direct observation of clearance of plaques with immunotherapy. *Nat. Med.* 7, 369-372.

[0242] Bacskai, B. J., Kajdasz, S. T., McLellan, M. E., Games, D., Seubert, P., Schenk, D. and Hyman, B. T. (2002) :Non-Fc mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid-beta in vivo by immunotherapy. *J. Neurosci.* 22, 7873-7878.

[0243] Bard, F., Cannon, C, Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D. and Yednock, T. (2000) :Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* 6, 916-919.

[0244] Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM (2007) :Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* (Vol. 3(3)).

[0245] Burmester, J. and Pluckthun, A. (2001) :Construction of scFv

fragments from hybridoma or spleen cells by PCR assembly, in: *Antibody Engineering*, R. Kontermann and S. Diibell, Eds., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 19-40.

[0246] Chothia, C, and Lesk, A. M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196, 901-917.

[0247] Davies, D. R. et al., "Antibody-Antigen Complexes" *Ann. Rev. Biochem.* 59 : 439-473 (1990).

[0248] DeMattos, R. B., Bales, K. R., Cummins, D. J., Dodart, J. C., Paul, S. M. and Holtzman, D. M. (2001) : Peripheral anti-Abeta antibody alters CNS and plasma Abeta clearance and decreases brain Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8850-8855.

[0249] Frenkel, D., Katz, O. and Solomon, B. (2000) : Immunization against Alzheimer's beta-amyloid plaques via EFRH phage administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11455-11459.

[0250] Gaugler, M., Tracy, J., Kuhnle, K., Cramer, A., Nitsch, R. M. and Mohajeri, M. H. (2005) : Modulation of Alzheimer's pathology by cerebro-ventricular grafting of hybridoma cells expressing antibodies against Abeta in vivo. *FEBS Letters* 579, pp. 753-756.

[0251] Giintert, A., Dobeli, H. and Bohrmann, B. (2006) : High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* 143 : 461-475.

[0252] Holliger, P. and Hudson, P. (2005), *Nat. Biotechnol.* 23(9), pp. 1126-1136.

[0253] Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. 1991. Sequences of proteins of immunological interest. 5th ed. Bethesda, Maryland : National Institutes of Health.

[0254] Klein, W. L. (2002) : Ab toxicity in Alzheimer's disease : globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochemistry International* 41 : 345-352

[0255] Knobloch, M., Konietzko, U., Krebs, D. C., and Nitsch, R. M. (2006) : Intracellular Abeta and cognitive deficits precede beta-amyloid deposition in transgenic arcAbeta mice. *Neurobiol Aging*. 2007 Sep ; 28(9) : 1297-306. Epub 2006 Jul 31.

[0256] LeVine III, H. (1993) : Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides : Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science* 2 : 404-410.

[0257] Miller, R. et al. (1983) : Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma. *Blood* 62 : 988-995.

[0258] Mohajeri, M. H., Gaugler, M., Martinez, J., Tracy, J., Li, H., Cramer, A., Kuehnle, K., Wollmer, A. and Nitsch, R. M. (2004) : Assessment of the bioactivity of

Antibodies against beta-amyloid peptide in vitro and in vivo. Neurodegenerative dis. 1, pp. 160-167.

[0259] Schroff, R. et al. (1985) : Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. Cancer Research 45 : 879-885.

[0260] Worn A, Auf der Maur A, Escher D, Honegger A, Barberis A, Pluckthun A. (2000) : Correlation between in vitro stability and in vivo performance of anti-GCN4 intrabodies as cytoplasmic inhibitors. J Biol Chem. 275(4) : 2795-803.

<210>4

<211>5

<212>PRT

<213>Mus musculus

<400>4

Glu Tyr Thr Met His

1 5

<210>5

<211>17

<212>PRT

<213>Mus musculus

<400>5

Gly Val Asn Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Ser Tyr Ile Arg Lys Leu Gln

1 5 10 15

Gly

<210>6

<211>13

<212>PRT

<213>Mus musculus

<400>6

Tyr Gly Gly Leu Arg Pro Tyr Tyr Phe Pro Met Asp Phe

1 5 10

<210>7

<211>108

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>ESBA212 的 VL

<400>7

Ala Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1 5 10 15

<212>PRT

<213>Mus musculus

<400>9

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Lys Ala Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Thr Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210>10

<211>107

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>VL A

<400>10

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Trp Thr

| | | | |
|--|-----|-----|----|
| | 85 | 90 | 95 |
| Phe Gly Gln Gly Thr LysLeu Thr Val Leu Gly | | | |
| | 100 | 105 | |

<210>11

<211>108

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>VL B

<400>11

| | | | |
|---|-----|-----|----|
| Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Glu | | | |
| | 20 | 25 | 30 |
| Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile | | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| Tyr Ala Gly Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly | | | |
| | 50 | 55 | 60 |
| Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Leu Pro Tyr | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg | | | |
| | 100 | 105 | |

<210>12

<211>109

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>VL C

<400>12

| | | | |
|---|---|----|----|
| Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |

<213> 人工的

<220>

<223>VL E

<400>14

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Ile | Val | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ala | Thr | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Glu | Arg | Ala | Thr | Leu | Ser | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Thr | Leu | Thr | His | Tyr |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | |
| Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ala | Pro | Arg | Leu | Leu | Ile |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Tyr | Asp | Thr | Ser | Lys | Arg | Ala | Thr | Gly | Val | Pro | Ala | Arg | Phe | Ser | Gly |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Glu | Pro |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | |
| Glu | Asp | Ser | Ala | Leu | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | Arg | Asn | Ser | Trp | Pro | His |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Arg | | | | |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | | |

<210>15

<211>109

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>VL F

<400>15

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Tyr | Val | Leu | Thr | Gln | Pro | Pro | Ser | Val | Ser | Val | Ala | Pro | Gly | Gln |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Thr | Ala | Thr | Val | Thr | Cys | Gly | Gly | Asn | Asn | Ile | Gly | Ser | Lys | Ser | Val |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| His | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ala | Pro | Val | Leu | Val | Val | Tyr |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Asp | Asp | Ser | Asp | Arg | Pro | Ser | Gly | Ile | Pro | Glu | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Asn | Ser | Gly | Asn | Thr | Ala | Thr | Leu | Thr | Ile | Arg | Arg | Val | Glu | Ala | Gly |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65 | | 70 | | 75 | | 80 | | | | | | | | | |
| Asp | Glu | Ala | Asp | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Val | Trp | Asp | Ser | Ser | Ser | Asp | His |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Asn | Val | Phe | Gly | Ser | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys | Arg | | | |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | | |

<210>16

<211>109

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>VL G

<400>16

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Pro | Val | Leu | Thr | Gln | Pro | Pro | Ser | Val | Ser | Val | Ala | Pro | Gly | Gln |
| 1 | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | 15 | |
| Thr | Ala | Arg | Ile | Ser | Cys | Gly | Gly | Asn | Asn | Ile | Glu | Thr | Ile | Ser | Val |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| His | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ala | Pro | Val | Leu | Val | Val | Ser |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Asp | Asp | Ser | Val | Arg | Pro | Ser | Gly | Ile | Pro | Glu | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser |
| | | 50 | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Asn | Ser | Gly | Asn | Thr | Ala | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Gly |
| 65 | | | | 70 | | | | | | 75 | | | | 80 | |
| Asp | Glu | Ala | Asp | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Val | Trp | Asp | Ser | Ser | Ser | Asp | Tyr |
| | | | | 85 | | | | | | 90 | | | | 95 | |
| Val | Val | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Thr | Val | Leu | Gly | | | |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | | |

<210>17

<211>122

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>ESBA212 的 VH

<400>17

| | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 100 | | 105 | | 110 | | | | | |
| Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser |
| | 115 | | 120 | | | | | | | |

<210>19

<211>122

<212>PRT

<213>Mus musculus

<400>19

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Pro | Glu | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Ala |
| 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ser | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Thr | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Glu | Tyr |
| | | | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 | |
| Thr | Met | His | Trp | Val | Lys | Gln | Ser | His | Gly | Lys | Ser | Leu | Glu | Trp | Ile |
| | | 35 | | | | | | 40 | | | | | | 45 | |
| Gly | Gly | Val | Asn | Pro | Tyr | Asn | Asp | Asn | Thr | Ser | Tyr | Ile | Arg | Lys | Leu |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | | 60 | | |
| Gln | Gly | Lys | Val | Thr | Leu | Thr | Val | Asp | Arg | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65 | | | | | 70 | | | | | | 75 | | | | 80 |
| Met | Glu | Leu | Arg | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Phe | Cys |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 |
| Ala | Arg | Tyr | Gly | Gly | Leu | Arg | Pro | Tyr | Tyr | Phe | Pro | Met | Asp | Phe | Trp |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | | 110 |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Ser | Val | Thr | Val | Ser | Ser | | | | | | |
| | | | 115 | | | | | | 120 | | | | | | |

<210>20

<211>124

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>VH H

<400>20

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly |
| 1 | | | 5 | | | | | | | 10 | | | | 15 | |
| Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Ser | Tyr |

| | | | | | |
|---|-----|----|-----|----|-----|
| | 20 | | 25 | | 30 |
| Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val | | | | | |
| | 35 | | 40 | | 45 |
| Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val | | | | | |
| | 50 | | 55 | | 60 |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr | | | | | |
| 65 | | 70 | | 75 | 80 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | | | | |
| | 85 | | 90 | | 95 |
| Ala Ala His Val Leu Arg Phe Leu Glu Trp Leu Pro Asp Ala Phe Asp | | | | | |
| | 100 | | 105 | | 110 |
| Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser | | | | | |
| | 115 | | 120 | | |

<210>21

<211>108

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>VH I

<400>21

| | | | | | |
|---|-----|----|-----|----|----|
| Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly | | | | | |
| 1 | | 5 | | 10 | 15 |
| Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr | | | | | |
| | 20 | | 25 | | 30 |
| Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile | | | | | |
| | 35 | | 40 | | 45 |
| Tyr Ala Ala Ser Ser Ser Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly | | | | | |
| | 50 | | 55 | | 60 |
| Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser ASn Leu Gln Pro | | | | | |
| 65 | | 70 | | 75 | 80 |
| Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Phe | | | | | |
| | 85 | | 90 | | 95 |
| Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg | | | | | |
| | 100 | | 105 | | |

<210>22

<211>123

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>VH J

<400>22

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Val | Lys | Val | Ser | Cys | Thr | Ala | Ser | Gly | Tyr | Ser | Phe | Thr | Gly | Tyr | Phe |
| | | | | 20 | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Leu | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met | Gly |
| | | | | 35 | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Arg | Ile | Asn | Pro | Asp | Ser | Gly | Asp | Thr | Ile | Tyr | Ala | Gln | Lys | Phe | Gln |
| | | | | 50 | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Asp | Arg | Val | Thr | Leu | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Ile | Gly | Thr | Val | Tyr | Met |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | |
| Glu | Leu | Thr | Ser | Leu | Thr | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala |
| | | | | | 85 | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Arg | Val | Pro | Arg | Gly | Thr | Tyr | Leu | Asp | Pro | Trp | Asp | Tyr | Phe | Asp | Tyr |
| | | | | 100 | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | | | | | |
| | | | | 115 | | | | 120 | | | | | | | |

<210>23

<211>122

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>VH K

<400>23

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | | 15 | |
| Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Ser | Tyr |
| | | | | 20 | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Ala | Met | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 35 | 40 | 45 | |
| Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Ala Lys Asp Ala Gly Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Phe Asp Tyr Trp | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser | | | |
| 115 | 120 | | |

<210>24

<211>250

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>ESBA212

<400>24

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| Ala Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Gly Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr | | | |
| | 20 | 25 | 30 |
| Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Pro Pro Lys Ala Leu Ile | | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly | | | |
| | 50 | 55 | 60 |
| Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Thr Asn Pro Pro | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Gly Gly Gly Gly | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser | | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala | | | |
| 130 | 135 | 140 | |

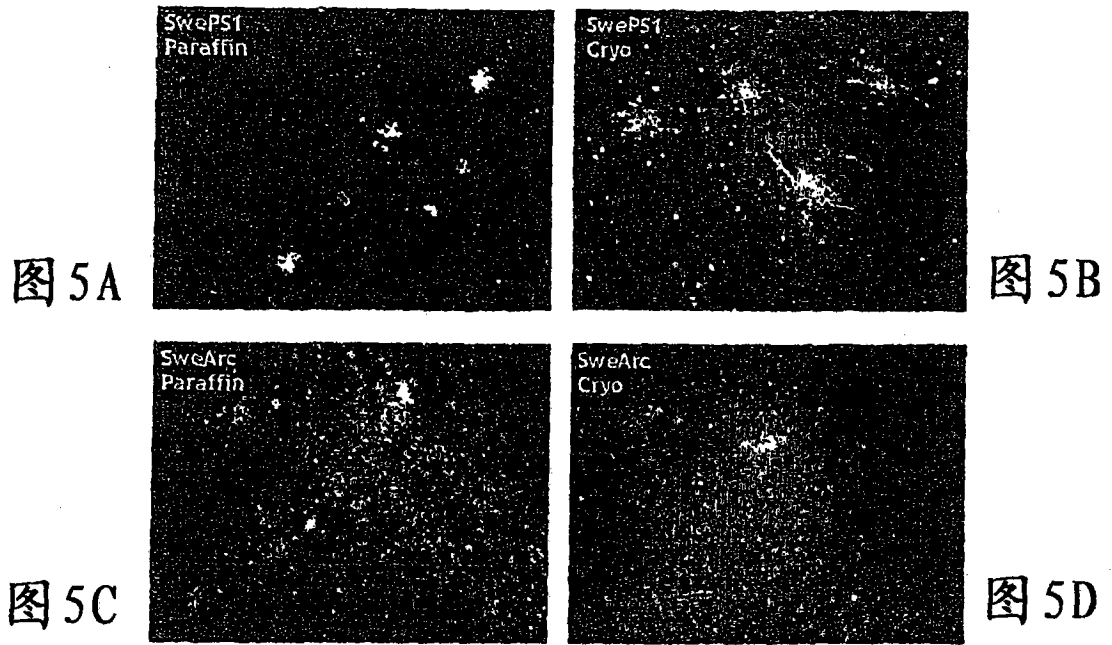


图 5

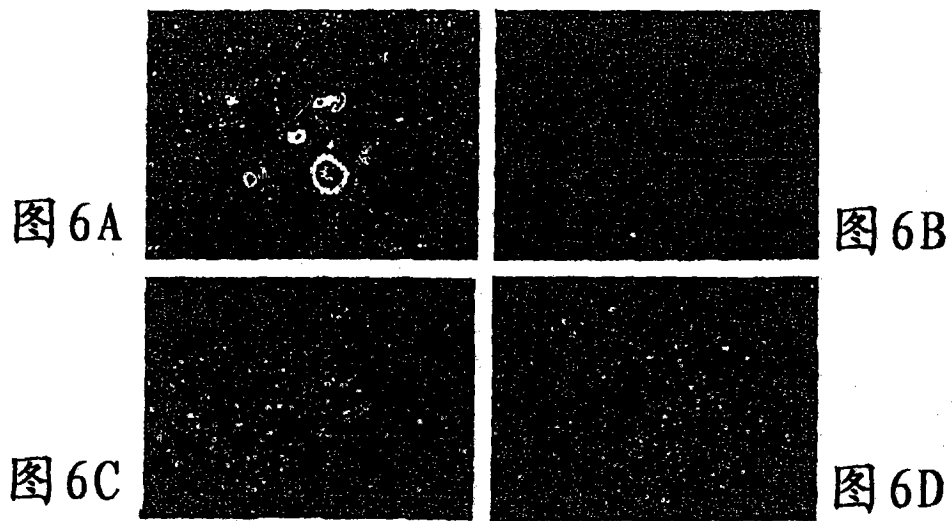


图 6

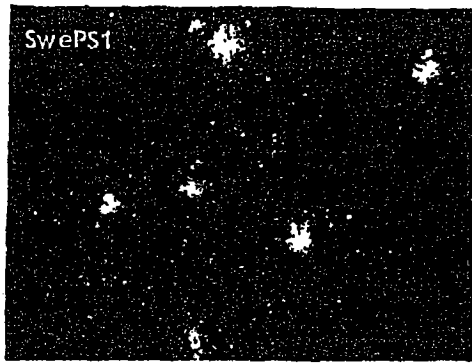


图7A

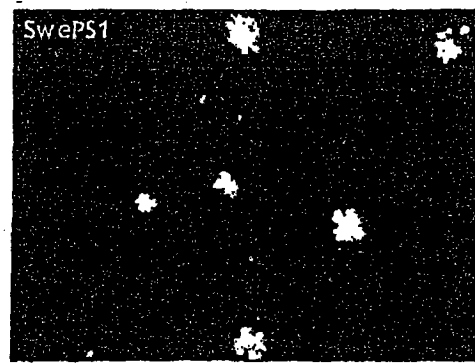
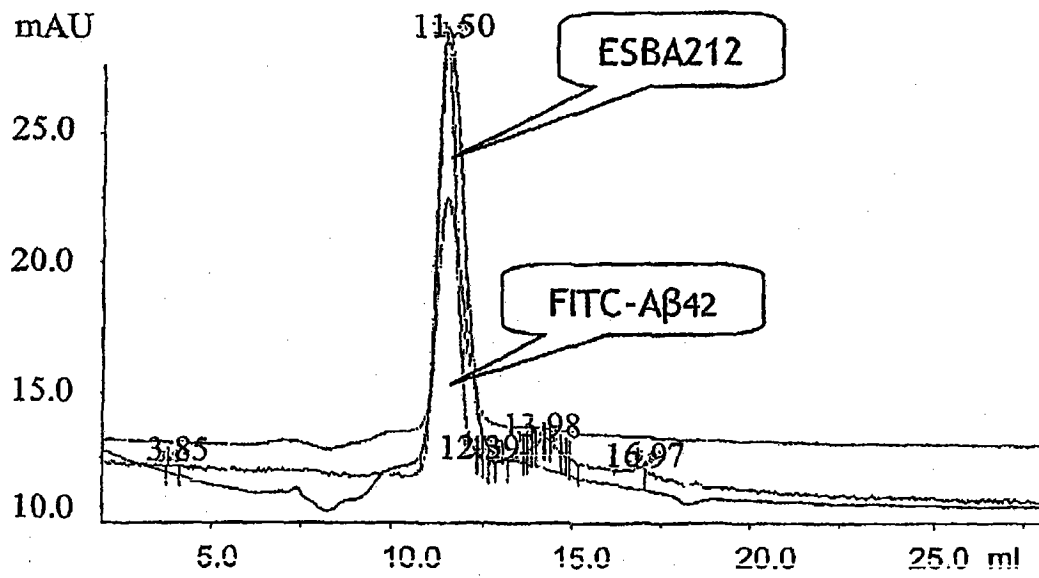
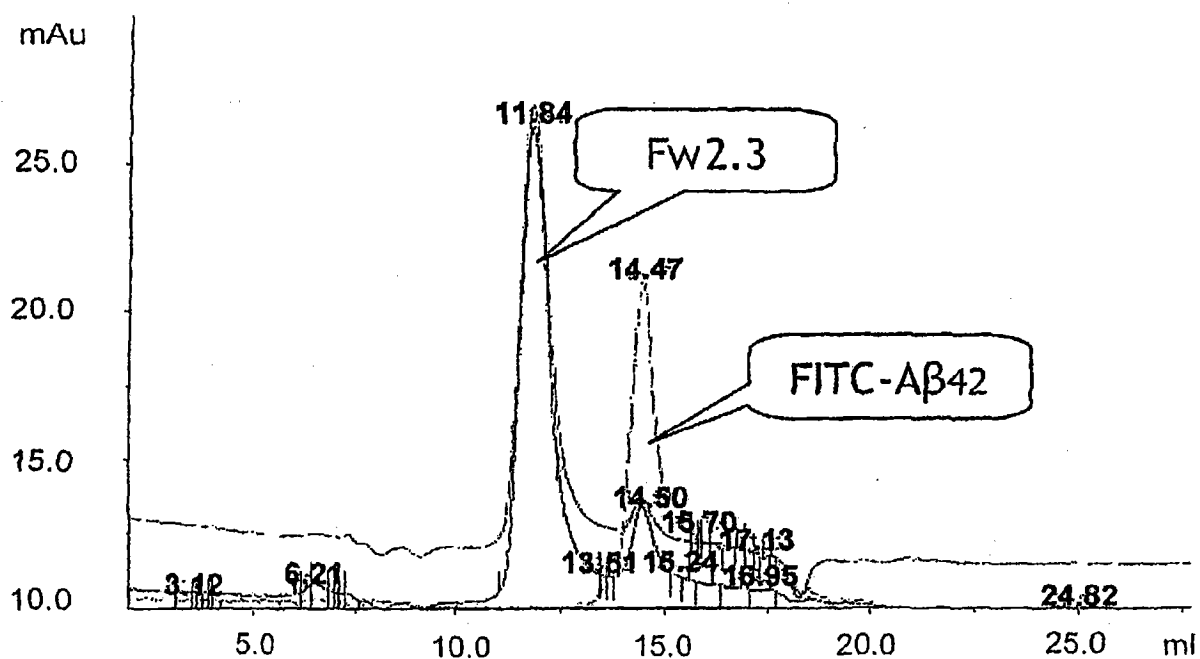


图7B



ESBA212Abeta42 005:10_UV3_495nm@ 03.PEAK

图8A



FW23Abeta42 006:10_UV2_280nm@02, PEAK

图 8B

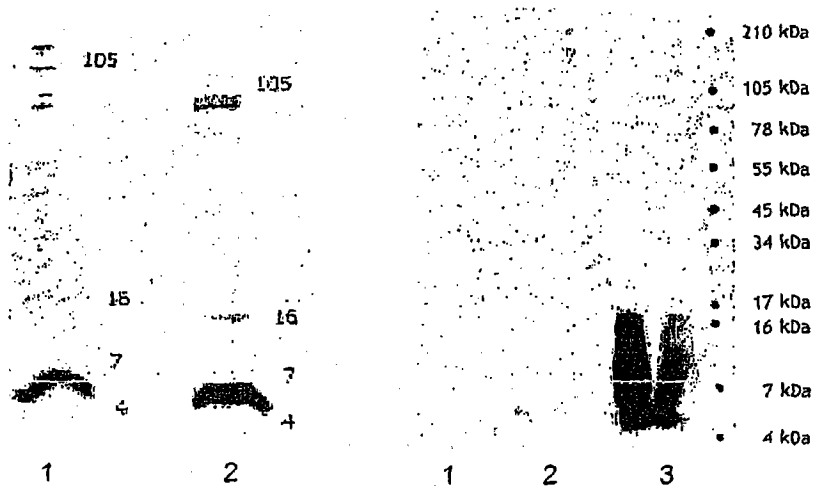


图 9A

图 9B

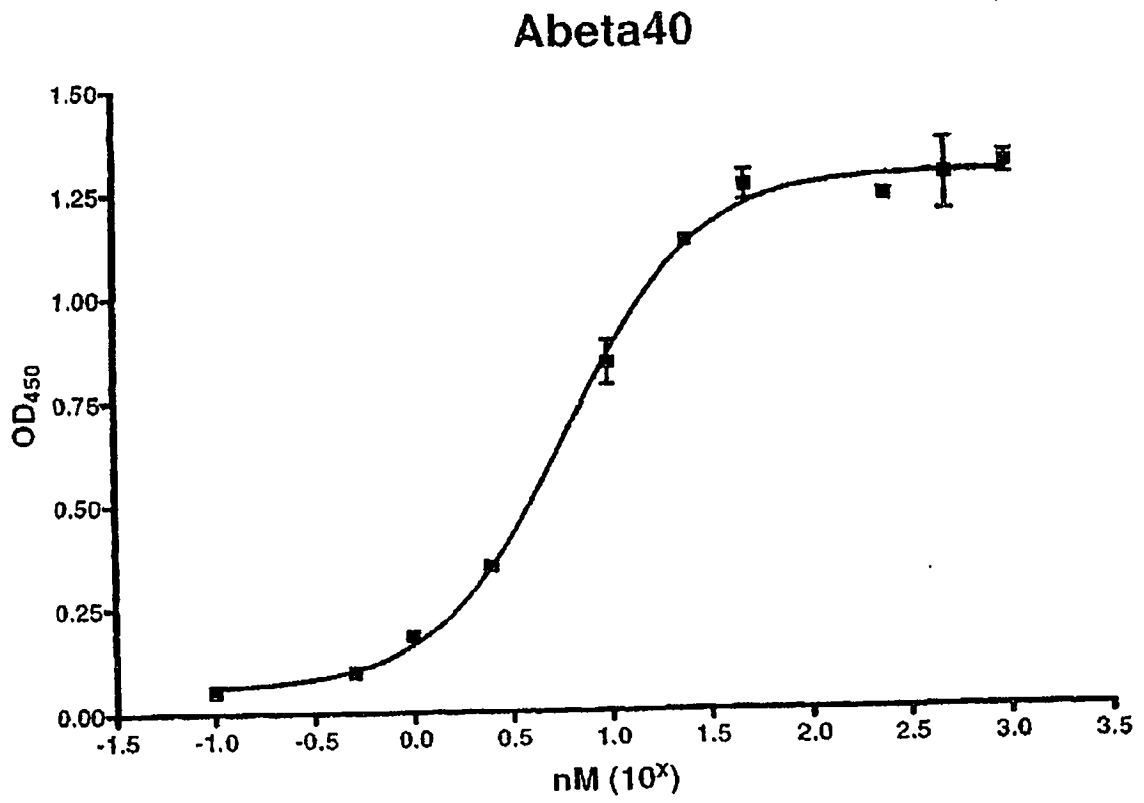


图10A

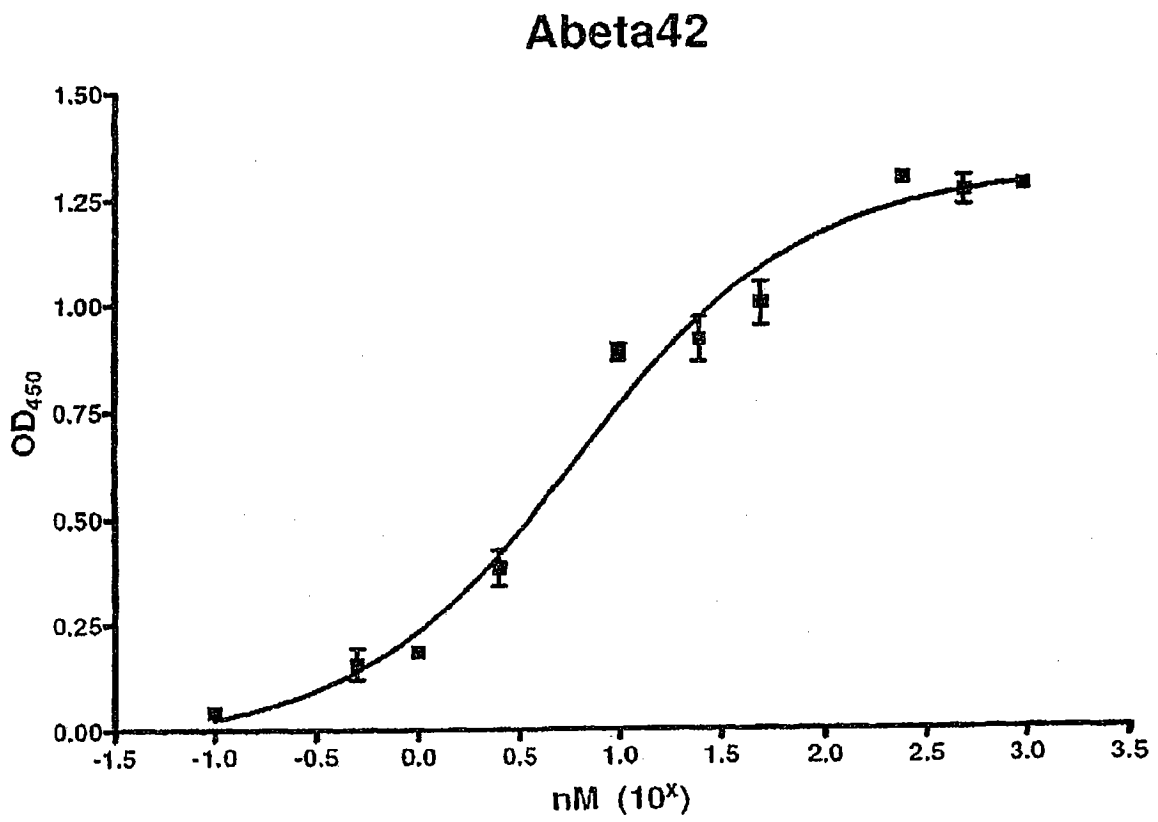


图10B

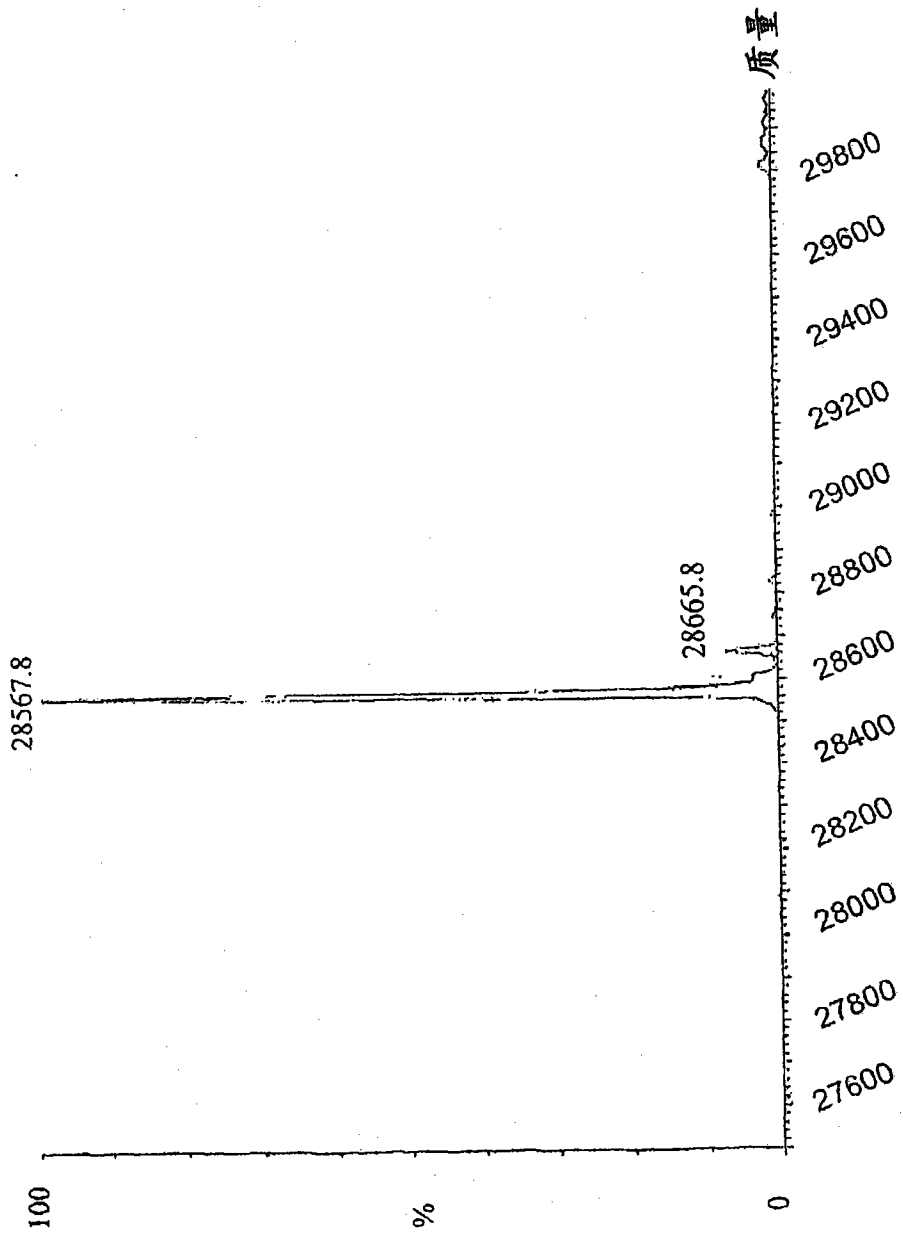


图 11

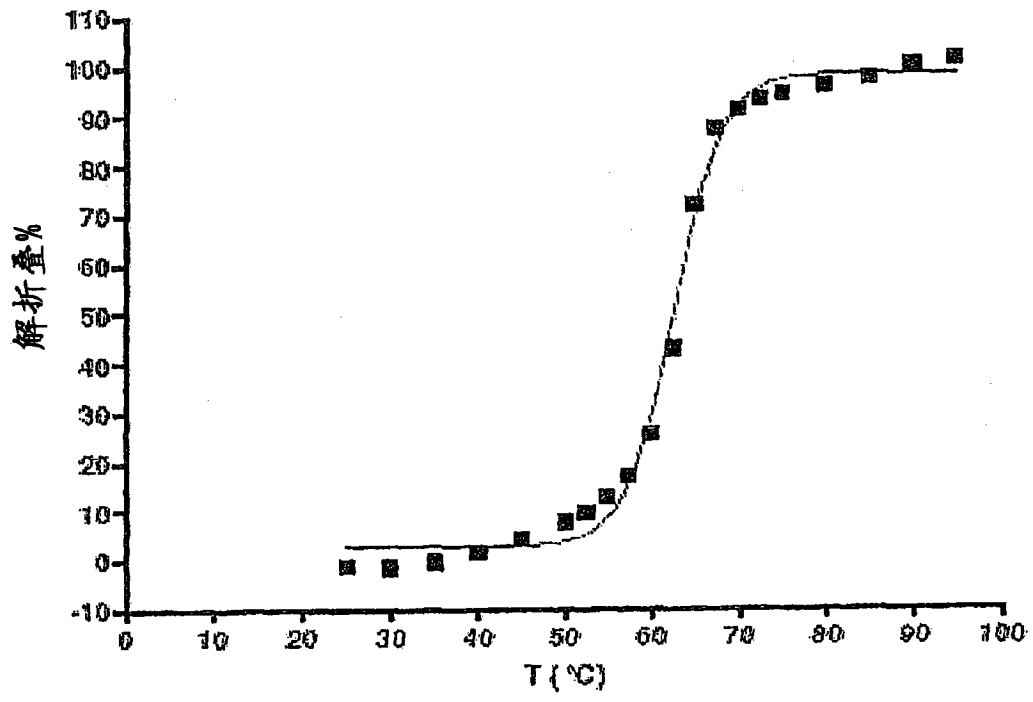


图 12



图 13

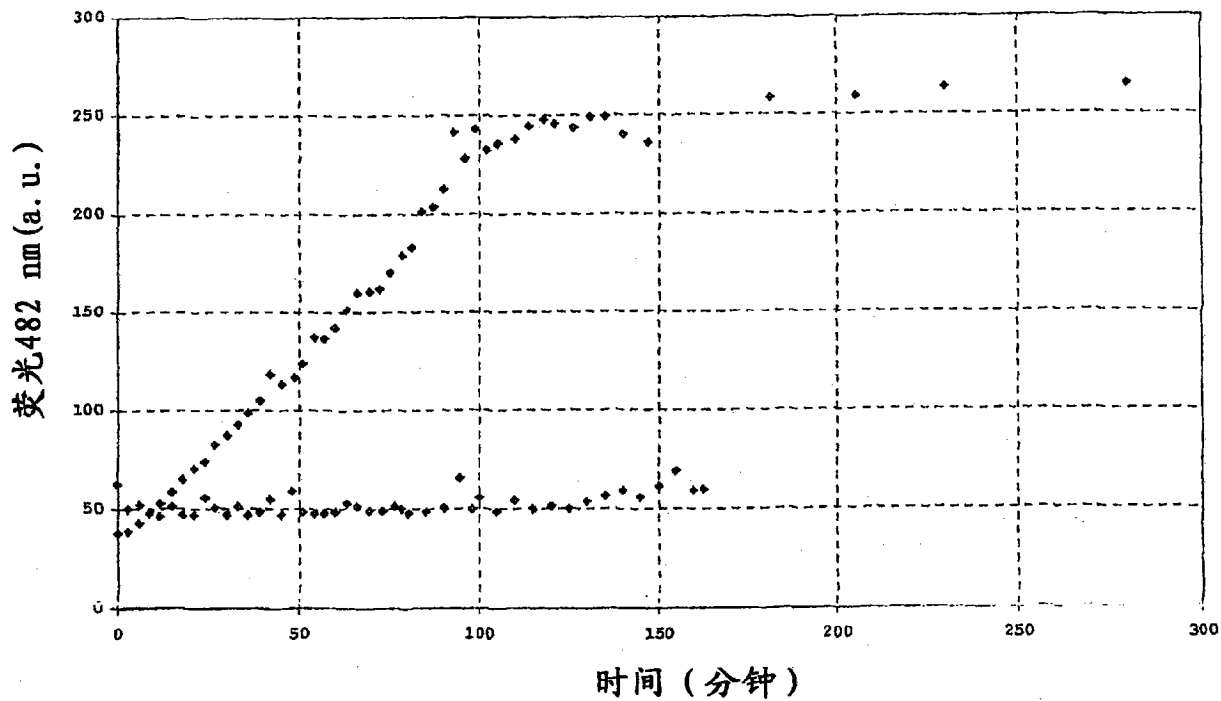


图 14

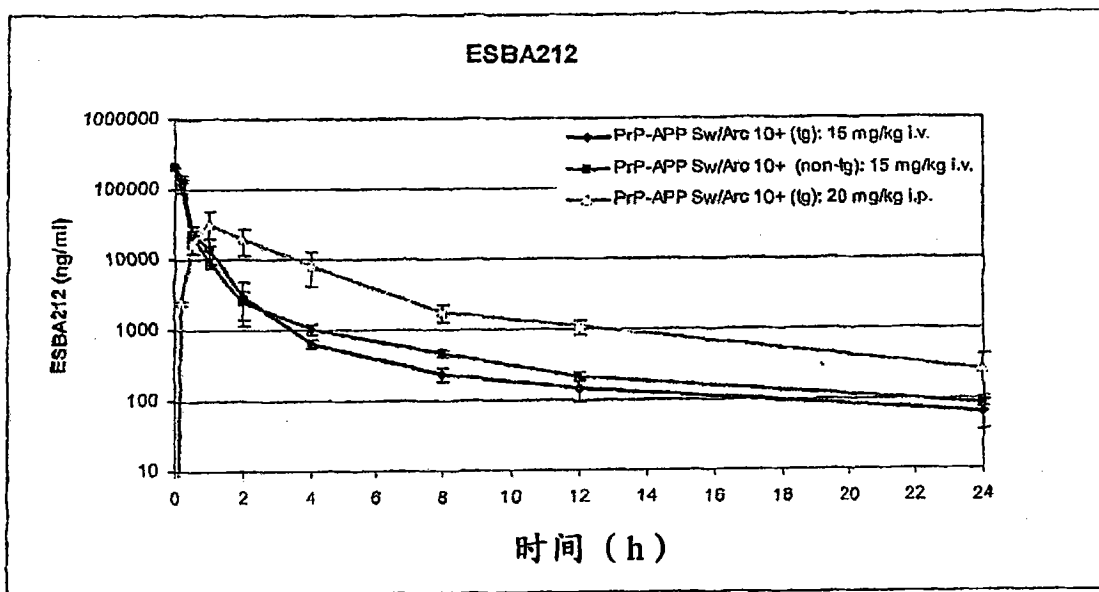


图 15

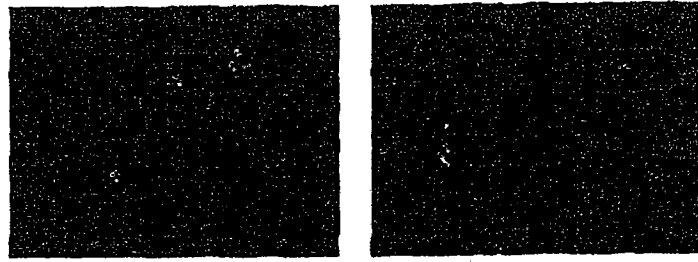


图16A

图16B

图 16

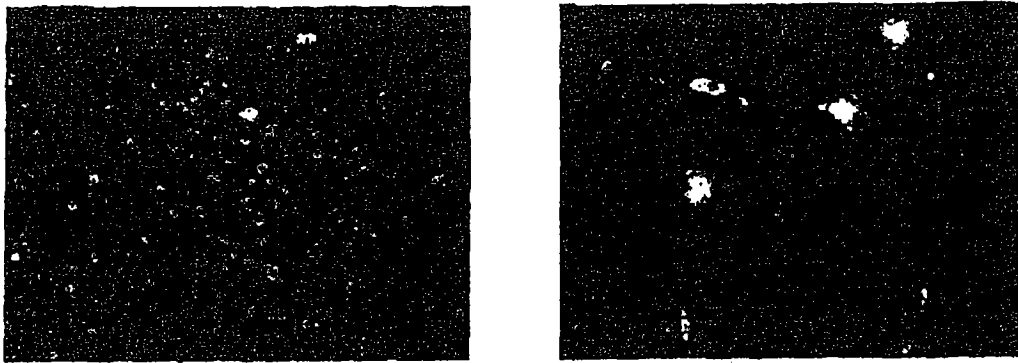


图17A

图17B

图 17

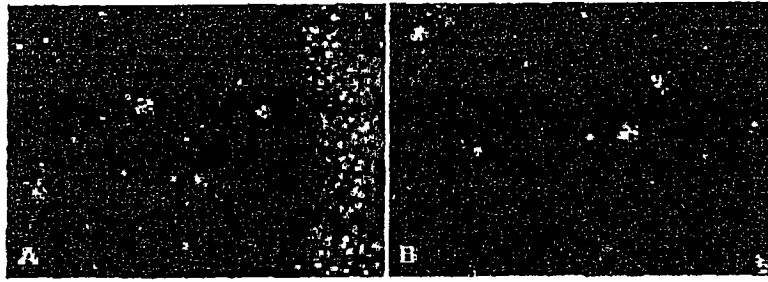


图 18A

图 18B

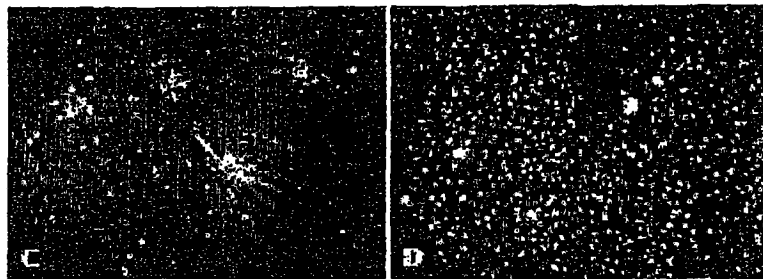


图 18C

图 18D

图 18

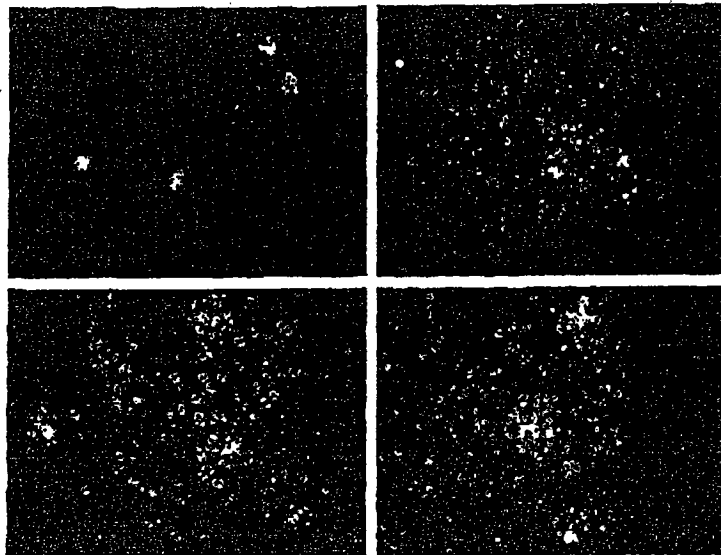


图 19A

图 19B

图 19C

图 19D

图 19

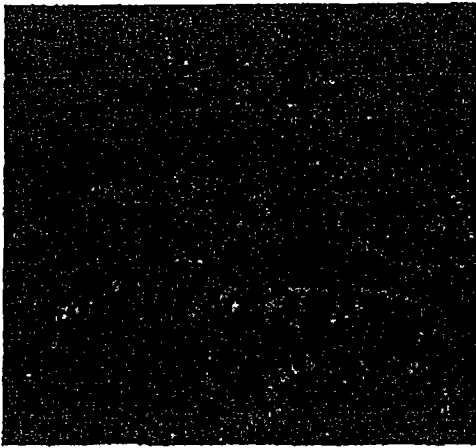


图 20

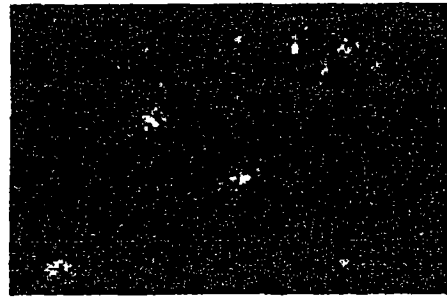


图 21A

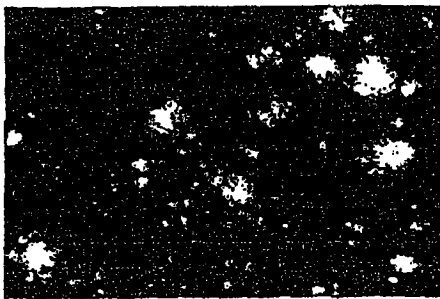


图 21B

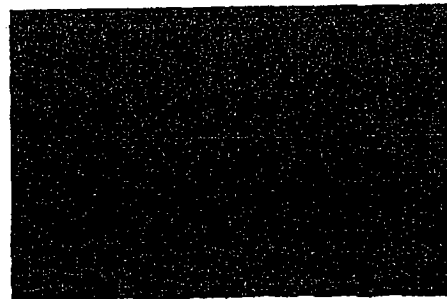


图 21C

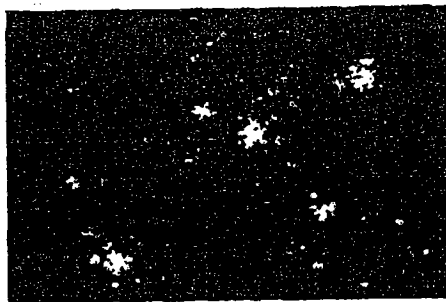


图 21D

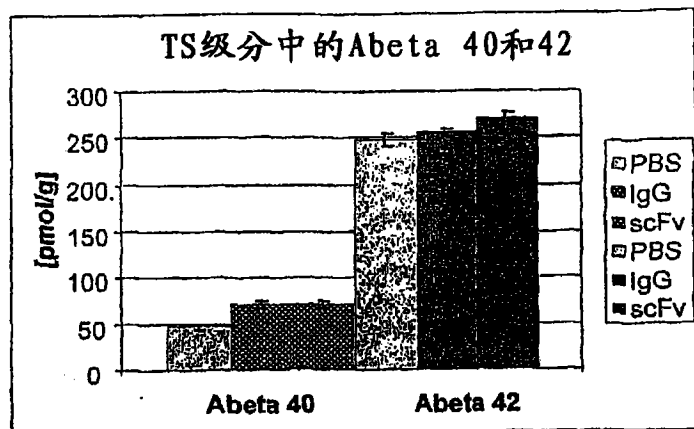


图 22A

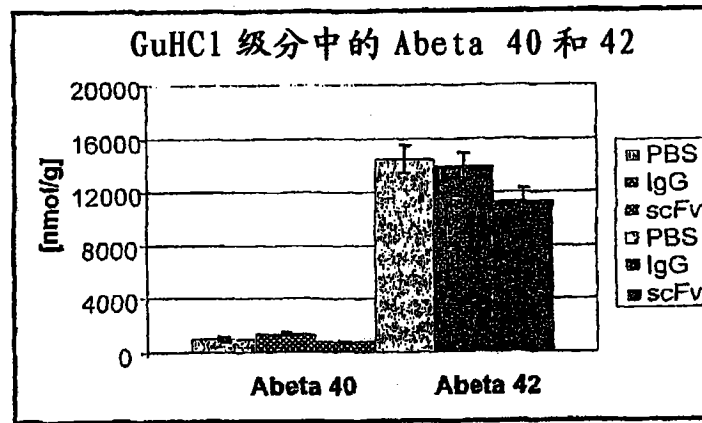


图 22B

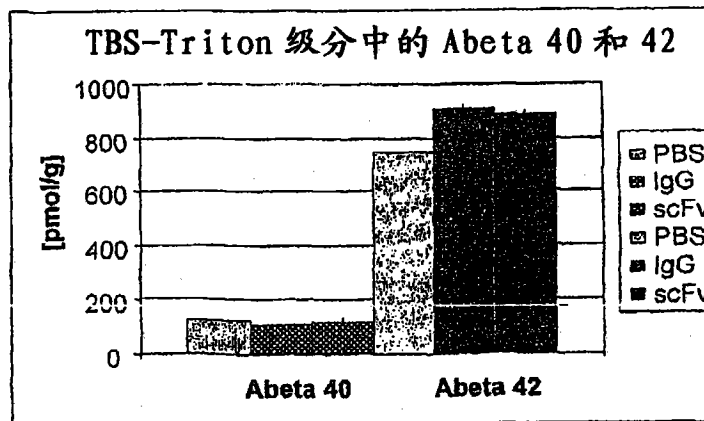


图 22C

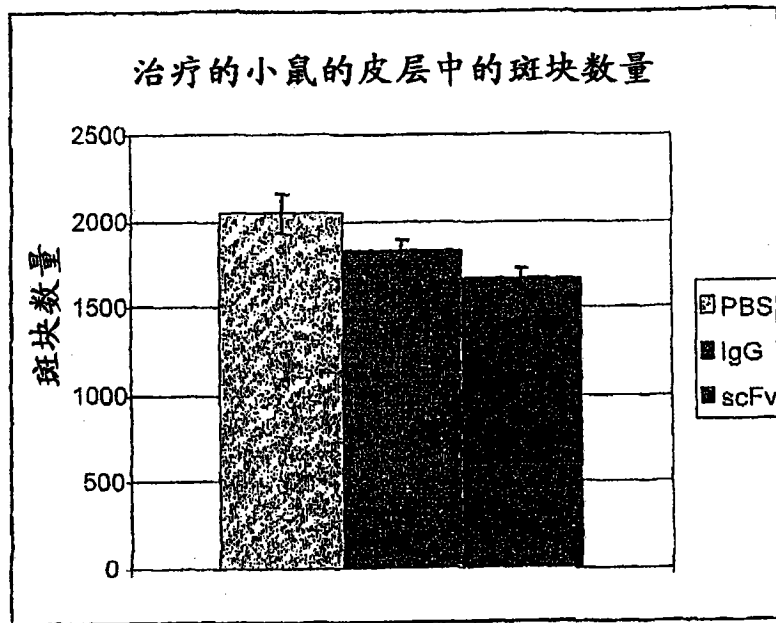


图 23A

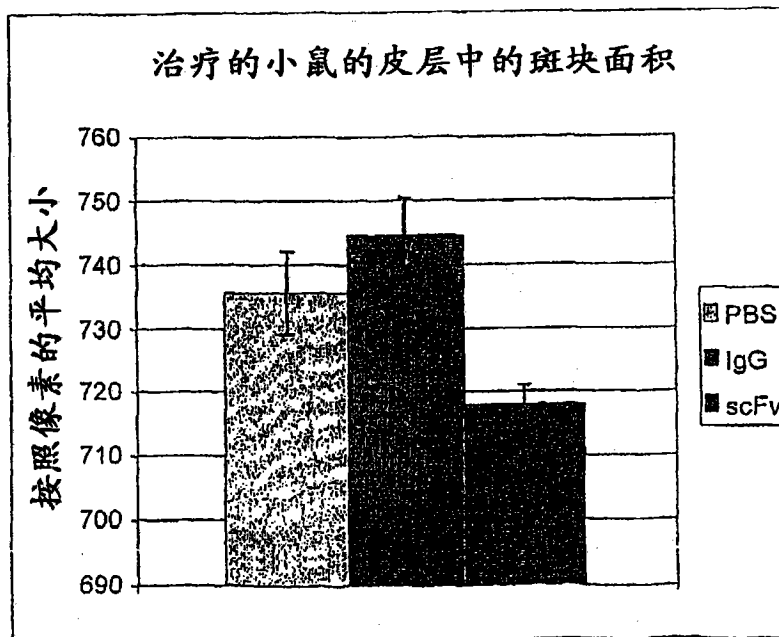


图 23B

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 针对β淀粉样肽的人源化抗体 | | |
| 公开(公告)号 | CN101842388A | 公开(公告)日 | 2010-09-22 |
| 申请号 | CN200880106728.5 | 申请日 | 2008-09-15 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 德勒尼克斯治疗股份公司 苏黎世大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 德勒尼克斯治疗股份公司 苏黎世大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 德勒尼克斯治疗股份公司 苏黎世大学 | | |
| [标]发明人 | S埃韦尔特 A奥弗德毛尔 S凯特波伊尔 R尼奇 | | |
| 发明人 | S·埃韦尔特 A·奥弗德毛尔 S·凯特波伊尔 R·尼奇 | | |
| IPC分类号 | C07K16/18 A61K39/395 A61P25/28 G01N33/53 A61K39/00 | | |
| CPC分类号 | C07K16/18 C07K2317/622 C07K2317/565 A61K2039/505 C07K2317/56 C07K2317/24 A61P25/00 A61P25/28 A61P37/02 | | |
| 优先权 | 60/993612 2007-09-13 US 61/083698 2008-07-25 US | | |
| 其他公开文献 | CN101842388B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了分离的抗体，其选择性地结合Abeta的C-末端部分，并且是人源化的或完全人类的。本发明的抗体能够防止Abeta的寡聚化。此外，公开了诊断的方法，其包括步骤：(i)标记抗体；(ii)向受试者鼻内地或全身地施用有效剂量的所述抗体；和(iii)检测所述受试者的身体部分中所述标记的抗体的浓度和/或存在。

