



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103782171 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201280044598. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 07. 09

*G01N 33/53* (2006. 01)

(30) 优先权数据

*G01N 21/76* (2006. 01)

61/507332 2011. 07. 13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 03. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/045886 2012. 07. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/009667 EN 2013. 01. 17

(71) 申请人 默沙东公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 M. 萨瓦奇 P. 舒鲁埃 A. 沃尔夫

A. 麦坎贝尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 温宏艳 万雪松

权利要求书2页 说明书20页

序列表6页 附图16页

(54) 发明名称

用于检测流体样品中淀粉状蛋白  $\beta$  寡聚体的方法及其用途

(57) 摘要

本发明涉及能够可靠地并且灵敏地检测患者的生物样品中的 A $\beta$  寡聚体的选择性 A $\beta$  寡聚体免疫测定。在一个实施方案中,本发明的测定使用一对抗 A $\beta$  寡聚体的抗体,19.3 和 82E1,来检测和定量在脑脊液(CSF)样品中的 A $\beta$  寡聚体。本发明测定可以用于区分阿尔茨海默氏病(AD)患者与非-AD 患者和/或根据其疾病的严重程度对 AD 患者分层。本发明测定还可以用作目标接触测定,其可以测量结合的 A $\beta$  寡聚体,作为替代终点用于评估疗效和/或目标接触。

1. 用于从患者获得的生物样品中确定目的神经元源性蛋白水平 (NDPOI) 的方法,其包括:

(a) 从哺乳动物获得具有 NDPOI 的生物样品;

(b) 在足以形成 NDPOI/ 捕获抗体 /MP 小珠复合物的条件下,使所述生物样品与捕获抗体 / 顺磁微粒小珠 (抗体 /MP 小珠) 接触;

(c) 在足以形成 POI/ 捕获抗体 /MP 小珠 / 检测抗体复合物的条件下,使步骤(b) 的所述 NDPOI/ 捕获抗体 /MP 小珠复合物与荧光标记的检测抗体接触;和

(d) 检测从步骤(c) 的所述复合物生成的荧光信号;

其中步骤(d) 的所述荧光信号代表所述 NDPOI 的量。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述 NDPOI 是 A $\beta$  寡聚体。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述哺乳动物是人。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述捕获抗体是选自 19.3、7305、82E1 和 W02 的抗 -A $\beta$  寡聚体抗体。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述检测抗体是选自 82E1、7305 和 6E10 的抗 -A $\beta$  寡聚体抗体。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述捕获抗体是 19.3 并且所述检测抗体是 82E1。

7. 权利要求的方法,其用于通过确定在从患者获得的生物样品中目的神经元源性蛋白 (NDPOI) 的水平而鉴定具有阿尔茨海默氏症的患者,其中所述 NDPOI 是 A $\beta$  寡聚体,并且其中具有范围为 0.5 pg/mL 至 11 pg/mL 的 A $\beta$  寡聚体水平的患者确定为具有阿尔茨海默氏症。

8. 用于确定疗法治疗阿尔茨海默氏病的疗效的方法,其包括:

(a) 从患者获得具有目的神经元源性蛋白 (NDPOI) 的生物样品;

(b) 在足以形成 NDPOI/ 捕获抗体 /MP 小珠复合物的条件下,使所述生物样品与捕获抗体 / 顺磁微粒小珠 (抗体 /MP 小珠) 接触;

(c) 在形成 NDPOI/ 捕获抗体 /MP 小珠 / 检测抗体复合物的条件下,使步骤(b) 的所述 NDPOI/ 捕获抗体 /MP 小珠复合物与荧光标记的检测抗体接触;和

(d) 检测从步骤(c) 的所述复合物生成的荧光信号,并且其中所述荧光信号代表所述 NDPOI 的量;

(e) 对有需要的所述患者施用测试疗法;

(f) 从所述患者获得具有 NDPOI 的第二生物样品;

(g) 用来自所述患者的第二生物样品重复步骤 (b) 至 (d);和

(h) 比较从所述第二生物样品检测的荧光信号与来自第一生物样品的所述信号;

其中所检测的荧光信号降低代表有效的疗法。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述 NDPOI 是 A $\beta$  寡聚体。

10. 权利要求 8 的方法,其中所述捕获抗体是 19.3 并且所述检测抗体是 82E1。

11. 用于确定结合目的神经元源性蛋白 (NDPOI) 的治疗性抗体的目标接触的方法,其包括:

(a) 对哺乳动物施用治疗性抗体;

(b) 从所述哺乳动物获得具有 NDPOI 的生物样品;

(c) 在足以形成 NDPOI/ 捕获抗体 /MP 小珠复合物的条件下,使所述生物样品与捕获抗体 / 顺磁微粒小珠 ( 抗体 /MP 小珠 ) 接触 ;

(d) 在形成 NDPOI/ 捕获抗体 /MP 小珠 / 检测抗体复合物的条件下,使步骤(b) 的所述 NDPOI/ 捕获抗体 /MP 小珠复合物与荧光标记的检测抗体接触 ;和

(e) 检测从步骤(c) 的所述复合物生成的荧光信号,并且其中荧光信号代表 NDPOI/ 治疗性抗体的目标接触。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述 NDPOI 是 A $\beta$  寡聚体。

13. 权利要求 11 的方法,其中所述捕获抗体是 19.3 并且所述检测抗体是 82E1。

## 用于检测流体样品中淀粉状蛋白 $\beta$ 寡聚体的方法及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于检测生物样品中与阿尔茨海默氏病(AD)相关的淀粉状蛋白  $\beta$  ( $A\beta$ ) 寡聚体的方法。本发明还提供用于诊断和评价用于 AD 的治疗的方法。

### 技术背景

[0002] 阿尔茨海默氏病(AD)是破坏性的神经变性疾病,其特征为在涉及学习和记忆的大脑区域的淀粉状蛋白  $\beta$  ( $A\beta$ ) 斑块积累。虽然一度认为这些大的不溶性斑块导致 AD,但现在证据证明小的可扩散的  $A\beta$  的寡聚体可以是负责的。淀粉状蛋白衍生的可扩散的配体(ADDLs)是  $A\beta$  寡聚体的种类,其可以在体外生成,具有与内源性  $A\beta$  寡聚体类似的性质(美国专利号 6,218,506; Klein, 等, 2004, Neurobiol. Aging 25:569-580; Lambert, 等, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95:6448-6453)。  $A\beta$  寡聚体存在于 AD 患者的脑中,它们结合神经元,并且它们诱导神经元形态学和记忆中的缺陷。用结合  $A\beta$  寡聚体的抗体的研究已经证明在神经元形态学和记忆中的改善。

[0003] 虽然测量  $A\beta$  单体的测定是已知的,其利用  $\beta$ -和  $\gamma$ -分泌酶对淀粉状蛋白前体蛋白(APP)的活性,但是很少的测定已报道在正常对照和 AD 中特异性和可靠地检测人流体样品如脑脊液(CSF)中的  $A\beta$  寡聚体(Georganopoulou, 等, 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 102:2273-2276; Fukumoto, 等, 2010, FASEB J., 24:2716-2726; Gao, 等, 2010, PLoS One, 2010 Dec. 30; 5(12):e15725)。报道的  $A\beta$  寡聚体测定已采用了许多方法,包括偶联生物条形码 PCR 扩增平台的 ADDL 特异性抗体(Georganopoulou, 等, 2005)、重叠表位 ELISA(Gandy, 等, 2010, Ann. Neurol., 68:220-230.; Xia, 等, 2009, Arch. Neurol., 66:190-199),也第一次与尺寸排阻层析配对(Fukomoto 等, 2010),以及淀粉状蛋白亲和基质方法(Gao, 等, 2010; Tanghe, 等, 2010, Int. J. Alz. Dis., Sep. 2, pii: 417314),随后是低聚物的解离和用  $A\beta$  单体的抗体的测量。

[0004] 从 CSF 或脑检测  $A\beta$  寡聚体也使用:凝胶电泳,随后是 Western 印迹(Klyubin 等, 2008, J. Neurosci., 28:4231-4237; Hillen, 等, 2010, J. Neurosci., 30:10369-10379),或之前是尺寸排阻层析(Shankar, 等, 2011, Methods Mol. Biol., 670:33-44),取决于电泳方法后维持的寡聚体的分子量。但是,电泳和印迹技术不提供在正常对照 CSF 中看到这些种类所需的灵敏度(Klyubin, 等, 2008)。并且,Georganopoulou 的发现证明  $A\beta$  寡聚体浓度的 1000 倍范围,并且将该浓度表示为 fM。  $A\beta$  寡聚体种类代表了大范围的分子量,并且,因此,精确的体积摩尔浓度分配是有问题的。Georganopoulou 测定是半定量的,并且展示了三个数量级的分析目标浓度范围,具有在 100aM 的更低的检测限。报道最多的方法(Georganopoulou, 等 2005; Gao, 等, 2010; Fukumoto, 等, 2010; Gandy, 等, 2010)没有评估来自  $A\beta$  寡聚体相比  $A\beta$  单体的信号之间的选择性,所以所提到的浓度需要谨慎看待。Xia 测定(Xia, 等, 2009, Arch. Neurol., 66:190-199),是 Immunobiological Laboratories, Inc. (Minneapolis, MN) 市售的测定,宣称对于他们的

A $\beta$  1-16 二聚体相比 A $\beta$  40 单体具有 320 倍的选择性,但是缺少避免与 CSF 中的 A $\beta$  单体交叉反应性所需的选择性。由于假设在 CSF 中的 A $\beta$  寡聚体以 fM 水平存在,并且 CSF A $\beta$  单体在 1.5-2nM 之间存在,所以选择性测量 CSF 样品中 A $\beta$  寡聚体的测定对于 A $\beta$  寡聚体相对单体必须具有出色的选择性。

[0005] 除了测量人 CSF 内 A $\beta$  寡聚体水平作为潜在的疾病生物标记物之外, A $\beta$  寡聚体还已被用作治疗性单克隆抗体的目标以治疗 AD (参见,例如,美国专利号 7,811,563, 7,780,963 和 7,731,962)。据认为,这些抗体进入 CNS 并将毒性的 ADDL 种类从脑清除,通过 1) 通过 Fc 介导的小胶质细胞的激活的催化反转, 2) 进入脑血管的抗体 /ADDL 复合物的清除,或 3) 在抗体结合并改善降解酶的接触后 ADDLs 的酶消化,所述降解酶例如脑啡肽酶、胰岛素降解酶、纤溶酶、内皮素转化酶 (ECE-1 和 -2)、基质金属蛋白酶 (MMP-2、-3 和 -9) 和血管紧张素转化酶 (ACE)。因此,选择性的 A $\beta$  寡聚物测定的目的是在使用抗寡聚体抗体治疗或改变 A $\beta$  单体 / 寡聚体形成或清除的其它治疗之后,测量中枢神经系统 A $\beta$  寡聚体的药效动力学 (PD) 变化。此外,能特异性检测结合抗 A $\beta$  寡聚体抗体的 A $\beta$  寡聚体的测定,即目标接触 (TE) 测定,对于治疗后治疗性抗体的评估将是非常宝贵的。

[0006] 本发明提供这样的测定,其能够可靠地并且灵敏地检测人流体样品中的 A $\beta$  寡聚体。

#### [0007] 发明概述

本发明涉及能够可靠地并且灵敏地检测患者的生物样品,即患者的流体样品中的 A $\beta$  寡聚体的选择性 A $\beta$  寡聚体测定。本发明的测定使用一对具有高度选择性的抗 A $\beta$  寡聚体的抗体, 19.3 和 82E1, 来检测和定量在脑脊液 (CSF) 样品中的 A $\beta$  寡聚体。在一个实施方案中,本发明是选择性的 A $\beta$  寡聚物的药效动力学 (PD) 测定,其可以将阿尔茨海默氏病 (AD) 患者和非 AD 患者区分开来和 / 或根据其疾病的严重程度分层 AD 患者。在又一个实施方案中,本发明是选择性的 A $\beta$  寡聚体目标接触 (TE) 测定,其可以测量结合的 A $\beta$  寡聚体,作为替代终点用于治疗效果的评估。

#### [0008] 附图简述

图 1A-1C 是图解表示,显示抗 ADDL 抗体 19.3 结合 A $\beta$  寡聚体的 ADDL 种类 (每组的中间的条) 相比 A $\beta$  单体或 A $\beta$  纤维的选择性。图 1A 显示一组人源化的 (h3B3) 和亲和力成熟的抗 ADDL (14.2、7.2、11.4、9.2、13.1、17.1 和 19.3) 抗体和三个比较性抗体 (比较 1、2 和 3) 对单体 A $\beta$ 、ADDLs 和纤维 A $\beta$  的 ELISA 结合。比较性抗体 2 已知是对于 ADDLs 的非选择性的抗体。本测定的背景通过从 ELISA 去除捕获抗体来确定 (无 mAb)。误差条表示平均值的标准误差。图 1B 显示在板用 A $\beta$  寡聚体 (▲) 或 A $\beta$  单体 (■) 包被的单面 ELISA 中,人源化抗体 19.3 的相对亲和力和最大结合特征。图 1C 显示竞争性 ELISA 和 19.3 对包被在 ELISA 板上的 A $\beta$  寡聚体 (▲) 和 A $\beta$  单体 (■) 在溶液中存在竞争性种类的情况下的相对亲和力。

[0009] 图 2A-2C 是图解表示,其显示在使用化学发光 (EnVision® Multilable Reader, Perkin Elmer, Waltham, MA) 作为检测方法的夹心 ELISA 形式中三对抗体的灵敏度和它们对 A $\beta$  寡聚体的相对亲和力。图 2A 显示,描绘经 A $\beta$  寡聚体浓度范围的抗 A $\beta$  寡聚体抗体 19.3 作为捕获抗体和 82E1 作为检测抗体。图 2B 和 2C 描绘 6E10 和 19.3 分别均作为捕获和检测抗体。19.3 x 82E1 夹心 ELISA 对 (图 2A) 在检测 A $\beta$  寡聚体方面相比其它对 (图

2B 和 2C) 显著更灵敏。

[0010] 图 3 是使用抗  $A\beta$  寡聚体抗体 19.3 和 82E1 对于  $A\beta$  寡聚体 (■) 相比  $A\beta$  单体 (▲) 的检测的灵敏度和选择性的图解表示, 如使用顺磁性微粒探测器, 例如 Erenna® 数字检测器 (Singulex®, Alameda, CA) 所测量的。使用顺磁性微粒探测器显著提高了用 19.3/82E1 抗体对检测  $A\beta$  寡聚体的灵敏度。

[0011] 图 4A 和 4B 是在人脑脊液 (CSF) 样品中检测的  $A\beta$  寡聚体的水平的图解表示。图 4A 显示在本文使用本发明的方法的设盲的评价中  $A\beta$  寡聚体水平在 AD 患者中比年龄匹配的对照, 即非 AD 患者中高 4 倍。如采用双向 t 检验和 Mann Whitney 秩分析确定, 差异是统计学显著的, 达  $p \leq 0.0004$ , 假设人群是非高斯分布的。图 4B 显示在本文使用本发明的方法的设盲的评价中  $A\beta$  寡聚体水平在 AD 患者中比年轻的对照, 即非 AD 患者高 8 倍。使用如图 4A 中相同的统计学方法, 这些组之间的差异也是统计学显著的, 为  $p$ - 值  $\leq 0.0021$ 。

[0012] 图 5A 和 5B 是在临床证实的 AD 或年轻对照 (即非 AD) 患者的 CSF 中  $A\beta$  单体水平的图解表示, 在 AD 样品中具有  $A\beta$  42 单体的水平的相应的下降和不变的  $A\beta$  40 单体的水平。这表示对于 AD 患者观察到的一般模式并证实在图 4B 中评价的样品的疾病状态。图 5A 显示在 AD CSF 样品中降低的  $A\beta$  42 单体水平。如采用双向 t 检验和 Mann Whitney 秩分析确定, 差异是统计学显著的, 达  $p \leq 0.002$ , 假设人群是非高斯分布的。图 5B 显示两组之间不变的  $A\beta$  40 单体水平。

[0013] 图 6 是简易精神状态检查 (MMSE) 评分 (作为认知表现的量度) 和使用本文中本发明测定测量的  $A\beta$  寡聚体水平之间相关性的图解表示。图 4B 中描绘的所有患者包括在此相关性中。在  $-0.7445\text{pg/mL}$   $A\beta$  寡聚体的相关性是显著的, 为  $p \leq 0.0001$ 。

[0014] 图 7A 和 7B 是目标接触测定的图解表示。图 7A 是掺入人 CSF (●) 或酪蛋白缓冲液 (▲) 的先体外后体内形成的抗  $A\beta$  寡聚体抗体 19.3/ $A\beta$  寡聚体复合物的表示。图 7B 是掺入人 CSF (●) 或酪蛋白缓冲液 (▲) 的先体外后体内形成的抗  $A\beta$  寡聚体抗体 19.3/ $A\beta$  寡聚体复合物的表示。在抗人  $\kappa$  链 (捕获) x82E1 (检测) 目标接触 ELISA (实施例 9) 中 19.3/ $A\beta$  寡聚体的检测中观察到差异灵敏度 (Differential sensitivity)。抗  $\kappa$  捕获抗体很差地区分抗  $A\beta$  寡聚体抗体 19.3 与人 CSF 中的内源抗体种类。

[0015] 图 8 是使用采用小脑延髓池开口的恒河猴模型静脉内推注施用 20 mg/kg 剂量后, 在灵长类动物 (三只雄性恒河猴) 脑脊液 (CSF) 中评估的抗  $A\beta$  寡聚体抗体 19.3 的 PK 的图解表示。在给药后约 24 小时, 抗体 19.3 以 100 ng/mL 存在于 CSF 中。

[0016] 图 9A 和 9B 分别是  $A\beta$  寡聚体夹心 ELISA, 即药效动力学 (PD) 测定, 和  $A\beta$  寡聚体 / 抗体夹心 ELISA, 即目标接触测定的图解表示。

[0017] 发明详述

申请人在本文中提供能够可靠地和灵敏地检测在患者 CSF 中  $A\beta$  寡聚体的方法, 用于作为  $A\beta$  寡聚体的药效动力学和目标接触测量使用。本发明的方法可以将 AD 患者与非 AD 患者区分开并基于 AD 患者中 CNS  $A\beta$  寡聚体升高的水平分层 AD 疾病状态, 类似于先前报道的对于 tau/ $A\beta$  42 CSF 比例的用途 (De Meyer, 等, 2010, *Arch. Neurol.*, 67:949-56)。此外, 相比于对于  $A\beta$  单体的水平观察到的较差相关性, 检测大部分神经毒性种类的  $A\beta$  寡聚体测定可以与认知表现中的变化更好地关联, 并且是认知表现中变化的更动态的量度。申请人在本文第一次证明外周施用的抗  $A\beta$  寡聚体抗体可以穿透血-脑屏障并结合  $A\beta$  寡

聚体,并且,当在本文中本发明的方法中使用时,可以提供用于 AD 疗法的评估的替代终点测定。

[0018] 申请人在本文中已经开发了高灵敏度的测定法及其用途,所述测定法在生物样品中,即,流体样品中检测和测量神经元衍生蛋白的水平。在本发明的一个实施方案中,神经元衍生蛋白是 A $\beta$  寡聚体,并且流体样品是脑脊液 (CSF) 样品。本发明方法利用顺磁微粒检测在夹心 ELISA 中使用两种选择性的抗 -A $\beta$  寡聚体抗体。虽然 A $\beta$  寡聚体已在生物样品中,特别是在 CSF 中发现 (Georganopoulou, 等, 2005 ; Klyubin 等, 2008), 但是与已知检测方法相关的限制 (包括灵敏度和选择性) 尚不能实现可靠地检测,更不用说,对 A $\beta$  寡聚体定量,以用于对患者的疾病状态进行分类或用于 AD 疗法的开发。使用两种抗 -A $\beta$  寡聚体抗体 19.3 和 82E1, 连同顺磁微粒检测, 本文申请人能够开发夹心 ELISA 测定, 以在生物样品中检测 A $\beta$  寡聚体, 到 40 fg/mL 的检测限。采用此测定, 本文申请人证明在临床证实的 AD 样品中, 相比年轻的或年龄匹配的对照的 A $\beta$  寡聚体高度显著性升高。这些相同的样品, 用于测量 A $\beta$  42 和 A $\beta$  40 单体的水平, 证实了在 AD 样品中与对照相比, A $\beta$  42 单体被显著减少, 而 A $\beta$  40 单体水平保持不变。本发明的 A $\beta$  寡聚体夹心 ELISA 测定表明 A $\beta$  寡聚体浓度和在广泛用于测量 AD 的严重程度的认知测试, 称为简易精神状态检查 (MMSE) 中性能之间的显著的相关性; 认知得分越高 (最多为 30 的值, 其是认知正常的), CSF 中的 A $\beta$  寡聚体水平越低。本发明的 A $\beta$  寡聚体夹心 ELISA 测定可以与额外的患者样本用于产生与已知的流体、成像和认知的生物标志物的进一步的相关性。

[0019] 除了上文的药效动力学测定之外, 申请人已经开发了对人 IgG2/ 抗 -A $\beta$  寡聚体复合物具有选择性, 使得它可以用于人 CSF 样品的目标接触 (TE)。如在后面的实施例所述, 本文所述的 TE 测定克服了将非天然人 IgG2 抗体 (抗 A $\beta$  寡聚体, IgG2 抗体) 与存在于人 CSF 中的过多内源性 IgG 抗体选择性地区分的挑战。TE 测定的选择性通过使用高度选择性的抗 IgG2 同种型捕获 (Southern Biotech, Birmingham, AL, #9060-05) 抗体而实现, 所述捕获抗体能够从存在于人类 CSF 中内源的 IgG2 种类中捕获 A $\beta$  寡聚体 IgG2 抗体 / A $\beta$  寡聚体复合物。结合到 19.3/IgG2 同种型抗体的 A $\beta$  寡聚体的检测使用商业抗体, 82E1 (Immunobiological Laboratories, Inc., Minneapolis, MN) 完成。这种方法能够可靠和一致地检测 19.3-IgG2 抗体 / A $\beta$  寡聚体复合物, 无论是在缓冲液中, 在用 A $\beta$  寡聚体抗体处理的动物的转基因 Tg2576 脑提取物中, 还是掺入外源抗体和 A $\beta$  寡聚体的人 CSF 样品中。

[0020] 为了能够获得具有独特的灵敏度的测定, 来检测治疗性抗 A $\beta$  寡聚体 IgG2 抗体结合 A $\beta$  寡聚体的复合物, 如下文药效动力学 (PD) 测定中所述, 抗人 IgG2 抗体结合到磁性微粒 (MP) 上。MP/ 抗人 IgG2 复合物与从个体取得的 CSF 样品混合, 所述个体用 IgG2 同种型 (治疗性 IgG2 抗体) 的治疗性抗 A $\beta$  寡聚体抗体给药。治疗性抗 A $\beta$  寡聚体抗体将结合个体的 CSF 样品中存在的任何 A $\beta$  寡聚体种类。此 MP/ 抗 -IgG2/ 抗 -A $\beta$  寡聚体 / A $\beta$  寡聚体复合物与第二抗 -A $\beta$  寡聚体抗体 82E1 混合, 所述 82E1 上连接荧光染料 (fluor)。所述 MP/ 抗 -IgG2/ 抗 -A $\beta$  寡聚体 / A $\beta$  寡聚体 / 82E1-fluor 复合物凭借微粒的磁性性质充分清洗, 并且 82E1-fluor 复合物从微粒分离以减少背景。82E1-fluor 的单分子代表在给药的个体的 CSF 中存在的抗 -A $\beta$  寡聚体 / A $\beta$  寡聚体复合物的初始水平。此测定将能够证实, 治疗性 IgG2 抗体接触 A $\beta$  寡聚体目标 (图 9B)。随着治疗过程中 A $\beta$  寡聚体的清除, 所述治

疗性 IgG2 抗体将接触更少的 A $\beta$  寡聚体并从而展示减少的信号。因此,目标接触测定将能够测量对所评价的治疗性抗体的有效性。药效动力学测定(图 9A)也将展示减少的信号,其将归因于减少的 A $\beta$  寡聚体的存在,例如在治疗后。因此,对于用于 AD 治疗的任何疗法的有效性的评价,药代动力学测定可以用作替代终点。

[0021] 本文发明是灵敏的和选择性的夹心 ELISA 测定,其检测并定量来自 AD 和人对照个体的 CSF 样品中的内源 A $\beta$  寡聚体。本发明测定的开发从鉴定产生对 A $\beta$  寡聚体相对 A $\beta$  单体和纤维具有选择性的抗体的小鼠杂交瘤开始。申请人开发的(共同未决的申请 PCT/US2011/XXXXXX,要求 USSN 61/364,210 的优先权)并且本文称为 19.3 的选择性的抗-A $\beta$  寡聚体抗体,进行人源化到 IgG2 同种型,并进一步通过单面 ELISA 表征其对 A $\beta$  寡聚体的亲和力,具有约 1.6nM 的 EC50。对 19.3 抗体在溶液中和固相中对 ADDLs 的亲力的进一步的评价,当以竞争性 ELISA 形式评价时,证明 19.3 对 A $\beta$  寡聚体相比对 A $\beta$  单体具有约 600 倍更高的选择性。19.3 对于 A $\beta$  寡聚体的灵敏度和选择性表明在用于 A $\beta$  寡聚体检测的夹心 ELISA 中的可用性。

[0022] 在夹心 ELISA 形式中,组合三种不同抗体如检测抗体 19.3、7305(美国专利号 7,780,963,其通过引用以其整体并入本文)和 82E1,在它们生物素化之后,评价 19.3 抗体作为对于 A $\beta$  寡聚体的潜在的捕获剂。在重叠表位测试中,检验生物素化的 19.3 作为检测抗体并与作为捕获抗体的 19.3 配对。重叠表位的存在将指示具有多个表位的 A $\beta$  构建体,其表明二聚体或更高阶 A $\beta$  寡聚体的存在。19.3 x 19.3 重叠表位 ELISA 具有对 A $\beta$  寡聚体的 98 pg/mL 的检测限(LoD)(图 2C)。对于抗体对 19.3 和 82E1(“19.3 x 82E1 夹心 ELISA”)的夹心 ELISA(图 2A),以及 19.3 x 7305 夹心 ELISA(数据未显示),1.3 pg/mL 的(LoD),对于 A $\beta$  寡聚体的 4.2 pg/mL 的可靠定量限(LoRQ),并且来自 A $\beta$  寡聚体/A $\beta$  单体的信号比例为大约 1,000:1,显示该测定对于 A $\beta$  寡聚体相比 A $\beta$  40 单体选择性高 1,000 倍。申请人发现非-重叠表位测定,即 19.3 x 82E1 夹心 ELISA 相比最近公开的对于采用商品化 A $\beta$  抗体 6E10 的类似测定的结果更有灵敏度(图 2B),其导致对 A $\beta$  寡聚体的 98 pg/mL 的检测限(Covance, Princeton, NJ)(Gandy, 等, 2010, *Ann. Neurol.*, 68:220-230),并且相比采用商品化抗体 82E1 的重叠表位测定同等敏感(Xia, 等 2009, *Arch. Neurol.*, 66:190-199)(Immunobiological Laboratories, Inc., Minneapolis, MN)。虽然使用化学发光检测进行的夹心 ELISA(图 2A、2B 和 2C)足以检测 A $\beta$  寡聚体标准品,但是先前报道的 fM (fg/mL)范围内的 CSF A $\beta$  寡聚体水平表明选择性的基于 ELISA 的 A $\beta$  寡聚体测定将需要十至一百倍更高的灵敏度,以可靠地检测和定量 CSF 样品中的 A $\beta$  寡聚体。

[0023] 为了增加夹心 ELISA 测定的灵敏度,申请人评价了在顺磁微粒检测系统中的两种抗体对的性能,所述顺磁微粒检测系统具体为 Erenna<sup>®</sup> 系统(Singulex<sup>®</sup>, Alameda, CA),利用从夹心 ELISA 复合物解偶联的荧光标签的检测抗体的检测。对 19.3 x 82E1 夹心 ELISA 的性能进行改善,使得 19.3 x 82E1 抗体对能够以相比年龄匹配的或更年轻的对照样品更高的水平检测 AD CSF 样品中 A $\beta$  寡聚体信号。更具体地,所述测定 LoD 改善了大约三十倍,达到 0.04 pg/mL,而 LoRQ 改善了十倍,达到 0.42 pg/mL。类似地, A $\beta$  寡聚体/A $\beta$  单体比例也改善了,达到 5,000:1。如用此测定所测量的,AD CSF 样品降低了 A $\beta$  42 水平并且未改变 A $\beta$  40 水平,这是 AD 患者的特征。总之,使用顺磁微粒检测系统的 19.3 x 82E1 夹心 ELISA 能够可靠并特异性地测量人 CSF 中的 A $\beta$  寡聚体种类。

[0024] 如本文所用术语“ $A\beta$  寡聚体”指  $A\beta$  单体的多聚体种类,其由于单体种类的自缔合而得到。 $A\beta$  寡聚体主要是  $A\beta 42$  的多聚体,尽管  $A\beta 40$  的  $A\beta$  寡聚体也已有报道。在合成的  $A\beta$  单体体外聚集之后,或从人脑或体液分离 / 提取  $A\beta$  种类之后, $A\beta$  寡聚体可以包括二体、三体、四体和更高阶种类的动态范围。ADDLs 是  $A\beta$  寡聚体的一个种类。

[0025] 如本文所用术语“神经元源性蛋白”或“目的神经元源性蛋白”指在脑中的神经元中生成的蛋白和 / 或由脑中的神经元生成的蛋白,其可以通过本文的本发明测定进行测量。在本文中本发明的一个实施方案中,神经元源性蛋白是存在于人的脑脊液 (CSF) 样品中的  $A\beta$  寡聚体。此蛋白与其它  $A\beta$  寡聚体的区别在于,其可以在神经元以外的细胞或组织中由  $A\beta$  形成。

[0026] 如本文所用术语“ADDLs”或“淀粉状蛋白- $\beta$  衍生的可扩散的配体”或“淀粉状蛋白- $\beta$  衍生的痴呆性配体”指包括两种或更多  $A\beta$  蛋白单体的神经毒性的、可溶的、球状、非纤维的寡聚体结构。更高阶的寡聚体结构不仅可以从  $A\beta 42$  获得,也可以从任何能够稳定形成可溶性非纤维  $A\beta$  寡聚体结构的  $A\beta$  蛋白,例如  $A\beta 43$  或  $A\beta 40$  获得。美国专利号 6, 218, 506 和 WO 01/10900。

[0027] 如本文所用术语“ $A\beta$  纤维”或“纤维”或“纤维状淀粉状蛋白”指  $A\beta$  的不溶性种类,其可以在人和转基因小鼠脑组织中检测到,这是由于它们与染料,例如硫代黄素 S 的双折射性。形成由  $A\beta$  单体构成的纤维状结构的  $A\beta$  种类包括  $\beta$ -折叠片。这些种类被认为是在 AD 大脑中发现的细胞外淀粉状蛋白斑结构的中间前体。

[0028] 如本文所用术语“ $A\beta 40$  单体”或“ $A\beta 42$  单体”指在无细胞或细胞环境中  $\beta$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶的对淀粉状蛋白前体 (APP) 的酶切割 (即天冬氨酸蛋白酶活性) 的直接产物。 $\beta$ -分泌酶对 APP 的切割产生从 Asp1 开始的  $A\beta$  种类 (编号为切割后的  $A\beta$  肽序列), 而  $\gamma$ -分泌酶释放的  $A\beta$  的 C 末端主要是在残基 40 或 42。

[0029] 如本文所用术语“捕获抗体”或“ $A\beta$  寡聚体捕获抗体”或“抗-人 IgG2 捕获抗体”指在本文的测定中用作捕获抗体的抗体。如本文所用捕获抗体结合  $A\beta$  寡聚体或  $A\beta$  寡聚体 / 抗体复合物,其在流体样品中测量和 / 或检测。在本发明的一个实施方案中,所述捕获抗体是抗- $A\beta$  寡聚体抗体 19.3, 并且所检测的复合物是 19.3/ $A\beta$  寡聚体。在另一个实施方案中,所述捕获抗体是抗-人 IgG2 捕获抗体并且所检测的复合物是 IgG2/19.3/ $A\beta$  寡聚体。

[0030] 如本文所用术语“IgG”或“IgG2”指作为抗体分子发挥功能的任何蛋白。每个 IgG 由四条肽链组成—两条重链  $\gamma$  和两条轻链。每个 IgG 具有两个抗原结合位点。在人中有四个 IgG 亚类 (IgG1、2、3 和 4), 按照在血清中它们的丰度顺序命名 (IgG1 是丰度最高的)。铰链区的结构赋予四类 IgG 的每一类其独特的生物学概况。

[0031] 如本文所用术语“ $\kappa$  轻链”指包含抗原结合结构域和恒定区两者的免疫球蛋白 G (IgG) 的部分。每个抗体分子具有两条轻链,其可以是  $\kappa$  或  $\lambda$  型,分别在染色体 2 或 22 上编码。两条  $\kappa$  轻链将在 B 细胞内产生,连同两条重链通过二硫键组装以形成完整的 IgG 抗体分子,并且被分泌以作为体液免疫防御系统的一部分发挥功能。

[0032] 如本文所用术语“生物样品”或“流体样品”指相比于组织或脊椎动物的任何类型的流体。可在本文的测定中使用的典型实例是血液、尿液、泪液、唾液和脑脊液,其在本发明的一个实施方案中使用。如果存在  $A\beta$  寡聚体,也可以使用任何其它种类的体液。

[0033] 如本文所用术语“阿尔茨海默氏病”或“AD”或“淀粉样蛋白形成性疾病”指与大脑中 A $\beta$  斑块或神经纤维缠结形成或沉积相关的神经元退化导致的一系列痴呆或认知损伤,所述大脑来自下列疾病范围:包括但不限于唐氏综合征、路易体痴呆、帕金森氏病、临床前阿尔茨海默氏病、由于阿尔茨海默氏病的轻度认知功能障碍、早发性阿尔茨海默氏病(EOD)、家族性阿尔茨海默氏病(FAD)、由于阿尔茨海默氏病的痴呆的直通提前认知损伤(thru the advance cognitive impairment of dementia due to Alzheimer's disease)(Jack, 等, 2011, *Alzheimer's Dement.*, May 7(3):257-262),以及与ApoE4等位基因的存在有关的疾病。

[0034] 如本文所用术语“LoD”的“检测限”指在除了不存在 A $\beta$  寡聚体之外相同的样品之上在可以被检测的最低浓度的测定的灵敏度。不存在 A $\beta$  寡聚体情况下的信号被定义为“背景”。如本文所用,对于 A $\beta$  寡聚体的 LoD 定义为在背景的平均值之上的  $\geq 3$  标准偏差。

[0035] 如本文所用“可靠定量的下限”或“LLoRQ”指组合变异系数的测定的灵敏度,以指示可以可靠地和可重复地从背景区别的最低浓度。该限值通常定义测定在灵敏度的低端的实际工作范围,并且是,可提供跨  $\geq 3$  的测量值  $\leq 20\%$  的变异系数的浓度。

#### [0036] 选择性的抗-A $\beta$ 寡聚体捕获抗体的鉴定和表征

为了开发对 A $\beta$  寡聚体选择性的和特异性的测定,申请人首先寻求鉴定对 ADDLs (A $\beta$  寡聚体的非纤维种类)选择性和特异性的抗体。如下生成抗 ADDL 的小鼠单克隆抗体,3B3 (美国专利号 7811563 和 7780963):通过用 1:1 混合弗氏(第一和第二疫苗,皮下)或不完全弗氏佐剂(所有后续的疫苗接种,腹腔内)的 ADDL A $\beta$  寡聚体种类免疫小鼠。每次注射由等价于  $194 \pm 25 \mu\text{g}$  总蛋白的纯化的 ADDLs 组成。来自具有最高滴度的血清的小鼠的脾脏与 SP2/0 骨髓瘤细胞在聚乙二醇的存在下融合,并接种到 96 孔板中。细胞在  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ , 在  $200 \mu\text{L}$  次黄嘌呤-氨基蝶呤胸腺嘧啶核苷(HAT)选择培养基中培养 10 天。培养物在第 10 天用补充有  $10\%$  的胎牛血清(FBS)的 Iscove 氏改良的 Dulbecco 氏培养基(IMDM)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)补料一次,并在第 14 天去除培养物上清液以使用单面 ELISA 筛选阳性的包含 A $\beta$  寡聚体抗体的孔(实施例?)。基于其相比 A $\beta$  单体或 A $\beta$  纤维优先结合 ADDLs 的能力,选择抗体 3B3 用于进一步开发(图 1A)。

[0037] 小鼠克隆 11/3B3 转化为人 IgG2 抗体并命名为 19.3。对编码 A $\beta$  寡聚体结合结构域的 3B3 可变重链和轻链结构域区进行测序,并且产生的编码这些 CDR 的 cDNA 引入人 IgG2 背景。用在 pFab3D 噬菌体展示载体中引入的 3B3 的可变重链和轻链结构域产生亲和力成熟文库。连接产物转染到大肠杆菌 TG1 细胞中,并且产生的噬菌体培养物上清液进行滴定,浓缩,并且制备等分试样用于噬菌体文库淘选。随后使用生物素化的 A $\beta$  寡聚体进行噬菌体文库淘选。结合生物素化的 A $\beta$  寡聚体的噬菌体被洗脱并再次添加到大肠杆菌 TG1 细胞。使用与 A $\beta$  寡聚体相同的方法(实施例 1)制备生物素化的 A $\beta$  寡聚体,但是从 N-末端生物素化的 A $\beta$  42 肽开始(American Peptide, Sunnyvale, CA)。在上述 A $\beta$  单体、A $\beta$  寡聚体和 A $\beta$  纤维差异结合 ELISA 中,噬菌体上清液(约  $100\mu\text{l}$ )直接用于分析。

[0038] 从 3B3 的轻链亲和力成熟文库产生的抗-A $\beta$  寡聚体抗体 19.3,已被描述和表征于共同未决的申请 PCT/US2011/XXXXXXX,要求 2010 年 7 月 14 日提交的 61/364,210 的优先权,并且如本文所用的是分离的抗体,其包括:

具有下列序列的轻链可变区 (SEQ ID NO:1)

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

具有下列序列的重链可变区 (SEQ ID NO:2)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
Ala Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
Ala Arg Gly Ile Thr Thr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
Val Thr Val Ser Ser; 和

具有下列序列的重链恒定区 (SEQ ID NO:3)

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

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

[0039] 抗-A $\beta$ 寡聚体抗体 19.3 的 A $\beta$ 寡聚体选择性

为了证实 19.3 对 A $\beta$ 寡聚体相比 A $\beta$ 40 单体的结合效价,使用单独的 A $\beta$ 寡聚体或 A $\beta$ 40 单体包被的板与常规的抗体滴定曲线完成单面 ELISA(图 1B)。19.3 的 EC<sub>50</sub>,半最大总的 A $\beta$ 寡聚体结合的量度,对于 A $\beta$ 寡聚体和 A $\beta$ 40,分别为 1.6 nM 和 4.3 nM。在此形式中,19.3 抗体对 A $\beta$ 寡聚体相比 A $\beta$ 40 单体表现出高大约三倍的最大结合,而效价高大约 3.7 倍。如在图 1B 中所示,当两者独立地固定在测定板表面上时,19.3 对 A $\beta$ 寡聚体相比 A $\beta$ 40 单体具有更大的亲和力。因此,虽然当各自独立地结合到测定板时,本文鉴定的抗-A $\beta$ 寡聚体抗体 19.3 相比于 A $\beta$ 40 单体选择性地结合 A $\beta$ 寡聚体,但是申请人寻求进一步比较当 A $\beta$ 寡聚体和 A $\beta$ 单体种类两者同时存在时(例如这将发生在体液或组织样品中,在溶液中或固定在测定板上)19.3 的相对结合特性。

[0040] 为了更精确地表示体内 CSF 样品,其中 A $\beta$ 寡聚体和 A $\beta$ 单体两者将存在,在竞争性 ELISA 形式中对于 19.3 对 A $\beta$ 寡聚体在 A $\beta$ 40 单体的存在下的亲和力进行了测试(图 1C)。如下制备 ELISA 板:首先以每孔 50pmol 用 A $\beta$ 寡聚体的制备物包被,并然后向每孔中添加以 2nM 终浓度的 19.3 抗体。此 19.3 的浓度,即 2nM,代表了在单面 ELISA 中确定的对 A $\beta$ 寡聚体结合的 EC<sub>50</sub> 浓度(图 1B)。在滴定曲线中加入 A $\beta$ 40 单体,以竞争性地将 19.3 从 A $\beta$ 寡聚体包被的表面去除,导致 5.5  $\mu$ M 的 EC<sub>50</sub>。当每孔 100 pmol A $\beta$ 40 单体用于包被 ELISA 板并且 A $\beta$ 寡聚体用于竞争抗体结合时,EC<sub>50</sub> 是 8.7 nM。这表明 19.3 在溶液中和在固相中相比 A $\beta$ 40 单体对于 A $\beta$ 寡聚体具有更高的亲和力。因此,A $\beta$ 40 从 A $\beta$ 寡聚体取代

50%的 19.3 所需的浓度比 A $\beta$  寡聚体置换结合 A $\beta$  40 的 19.3 所需的浓度高大约 600 倍。在来自 AD 患者的 CSF 中已报道了至多达 0.200 pM 的 A $\beta$  寡聚体浓度 (Georganopoulou, 等, 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 102:2273-2276), 相比之下, A $\beta$  单体为 1500 pM。因此, 抗体 19.3 似乎具有用于检测 A $\beta$  单体的背景水平以上 A $\beta$  寡聚体所需的选择性的程度。19.3 抗体偶联检测抗体 82E1, 用于进一步的测定开发, 所述 82E1 先前报道于用来检测 AD 脑中 A $\beta$  寡聚体的 ELISA 形式中 (Xia, 等, 2009, Arch. Neurol., 66:190-199)。当 82E1 (Immunobiological Laboratories (IBL), Inc., Minneapolis, MN) 用作捕获和检测抗体两者时, 82E1/82E1 ELISA, 此抗体具有低于使用人 CSF 所需水平的选择性 (数据未显示)。

**[0041] 在 A $\beta$  寡聚体夹心 ELISA 中优先结合 A $\beta$  寡聚体的抗体**

在夹心 ELISA 形式中捕获和检测抗体对的筛选中 (表 1), 19.3 作为捕获抗体与 7305 (抗 -A $\beta$  寡聚体抗体, 20C2, 美国专利号 7780963, 其通过引用以其整体并入本文中) 或 82E1 (Immunobiological Laboratories (IBL), Inc., Minneapolis, MN) 的组合在酪蛋白封闭缓冲液中以 A $\beta$  寡聚体标准曲线可比较地进行, 各自给出在 4pg/mL 以下的检测限 (LoD) (图 2A)。使用抗 -A $\beta$  单体抗体作为捕获和检测抗体已报道作为 A $\beta$  寡聚体测定, 但是没有报道灵敏度或选择性的绝对水平 (6E10/6E10; Gandy, 等, 2010, Ann. Neurol., 68:220-230), 或者选择性低于 (82E1/82E1; Xia, 等, 2009, Arch. Neurol., 66:190-199) 测量人 CSF 中 A $\beta$  寡聚体所需的选择性。

**[0042]** 虽然 Gandy 或 Xia 均没有报道人 CSF 中 A $\beta$  寡聚体的检测, 但是申请人对 6E10 的内部工作和通过 IBL 发表的关于 82E1 的报告表明, 它们的灵敏度可以在检测人 CSF 中 A $\beta$  寡聚体所需要的范围内。本文中申请人比较了使用相同的抗体用于捕获和检测抗体, 如 6E10/6E10 (图 2B) 和 19.3/19.3 (图 2C), 以及仅使用 19.3 作为捕获抗体的夹心 ELISA 测定对 (图 2A, 用 82E1 检测)。如表 1 所示, 相比无论 19.3/7305 或 19.3/82E1, 6E10/6E10 和 19.3/19.3 都表现出降低大约一百倍的灵敏度。利用发光检测技术的 19.3/82E1 ELISA (EnVision® Multilabel plate reader, PerkinElmer, Waltham, MA) (图 2A), 产生大约 1.3pg/mL 的 LoD。在此测定形式中, A $\beta$  寡聚体的 LLoRQ 为 4.2pg/mL (在此最低量度具有小于 20% 的方差系数) 并且测定对于 A $\beta$  寡聚体的信号相比 A $\beta$  40 单体具有大约 1000 倍的选择性。虽然此测定是用来评价 A $\beta$  寡聚体的制备物, 但其灵敏度不足以与先前的估计一致的水平可靠地检测人 CSF 中的 A $\beta$  寡聚体水平 (Georganopoulou, 等, 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 102:2273-2276)。19.3 x 82E1 夹心 ELISA 进一步使用顺磁微粒检测免疫测定平台, 其已报道为对检测人体液中的分析物具有更高的灵敏度 (Erenna®, Singulex®, Alameda, CA)。

**[0043] 表 1**

检测抗体	捕获抗体		
	19.3	7305	6E10
19.3	1		
7305	2	2	
6E10			1
82E1	✓		

<sup>1</sup> 相比 19.3 x 82E1 降低的灵敏度

<sup>2</sup> 在人 CSF 中不可接受的背景（纤维蛋白原交叉反应）

<sup>3</sup> 相比 19.3 x 82E1 降低的灵敏度。

[0044] 具有改善的灵敏度的 A $\beta$  寡聚体 - 选择性的夹心 ELISA

19.3 和 7305 (19.3 x7305) 和 19.3 和 82E1 (19.3 x82E1) 抗体对(表 1) 均在夹心 ELISA 中使用顺磁微粒检测免疫测定系统, Erenna<sup>®</sup> 免疫测定系统(Singulex<sup>®</sup>, Almeda, CA) 评价, 以确定对人和非人灵长类动物流体样品中 A $\beta$  寡聚体的测量的测定灵敏度是否可以进一步改善。在本发明的一个实施方案中, 所述免疫测定使用人 CSF 样品进行。

[0045] 虽然顺磁微粒免疫测定, 如 Erenna<sup>®</sup> 免疫测定系统, 已被用于以纳摩尔(nM) 的范围存在于生物样品中的生物标志物, 如 A $\beta$  40 和 A $\beta$  42, 但在本文的申请人的工作之前还没有证明, 这样的免疫测定系统可以特异性和可靠地检测以飞摩尔(fM) 的范围存在于 CSF 样品中的生物标记物, 如本文的 A $\beta$  寡聚体。不希望受任何理论的束缚, 申请人相信, 并已经证明, 所要求保护的测定的特异性和灵敏度是由于在夹心 ELISA 中选择和使用的抗 -ADDL 抗体对的特异性和灵敏度。类似地, 虽然申请人已使用 Erenna<sup>®</sup> 免疫测定系统以阐释所要求保护的测定, 但是有可能在本发明的方法中可以采用具有相当的灵敏度的其它检测系统。

[0046] 使用共价偶联 19.3 抗体到 Erenna<sup>®</sup> 微粒 (MP) 小珠 (以下称“19.3/MP 小珠”) 的 Erenna<sup>®</sup> 免疫测定系统 (Singulex<sup>®</sup>, Almeda, CA) 进行 19.3 x 7305 夹心 ELISA。19.3/MP 小珠与包含 A $\beta$  寡聚体或单体 A $\beta$  40 标准曲线的缓冲液混合。所得的 19.3/MP 小珠 / A $\beta$  寡聚体或 A $\beta$  40 复合物(下文称为“A $\beta$  寡聚体复合物”)进行洗涤并且荧光标签的 7305 或 82E1 检测抗体结合到 A $\beta$  寡聚体复合物。使用能够单分子计数的专有的检测技术的 Erenna<sup>®</sup> 设备 (参见, 美国专利号 7, 572, 640) 在其从夹心 ELISA 释放后测量荧光标记的检测抗体。如表 2 来自 19.3 x7305 测定的数据所示, 使用 A $\beta$  寡聚体在缓冲液中的标准品的 2 倍稀释, 与线性 2 倍稀释的荧光信号比对(检测事件的平均值)。通过干净的恒河猴 CSF 产生的信号, 或引入 A $\beta$  寡聚体的标准曲线的 CSF 生成的信号, 证明由于标签的 7305 抗体结合的荧光信号在这两种情况下是等效的, 而 19.3 x82E1 夹心测定能够检测对完整的标准曲线的掺入的 A $\beta$  寡聚体。在使用 7305 作为检测抗体的测定形式中, 这表明有非特异性背景(来自恒河猴 CSF 中存在的某物), 对于 A $\beta$  寡聚体稀释系列的范围(其足以检测仅在缓冲液中的 A $\beta$  寡聚体) 是饱和的。随后, 所述荧光信号被发现对于裸的微粒的信号是相同的, 即使在不存在 19.3 抗体偶联的情况下(数据未示出), 这也与由于 7305 的抗体的交叉反应性的非特异性信号一致。

[0047] 表 2

标准品稀释液	预期的 [ADDLs] pM	n	DE 平均值	SD	CV %	Interp [ADDLs] pM 平均值	SD	CV %	% 回收率
标准品稀释液	5.00	3	5579	506	9	5.1	0.5	10	103
	1.67	3	1942	235	12	1.7	0.2	13	100
	0.56	3	691	152	22	0.5	0.1	25	96
	0.19	3	324	43	13	0.2	0.1	17	116
	0.06	3	131	34	26	0.1	0.1	49	88
	0.00	3	72	28	39	ND			
恒河猴 CSF- 缺失的	5.00	3	9097	88	1				
	1.67	3	9112	195	2				
	0.56	3	8721	166	2				
	0.19	3	8785	269	3				
	0.06	3	8744	273	3				
	0.00	3	8678	519	6				
恒河猴 CSF- 非缺失的	5.00	3	10353	237	2				
	1.67	3	9719	495	5				
	0.56	3	9902	546	6				
	0.19	3	9971	319	3				
	0.06	3	9721	329	3				
	0.00	3	10515	282	3				

[0048] 使用 Erenna® 免疫测定系统开发的 A $\beta$  寡聚体选择性的夹心 ELISA 的第二个实施方案用 82E1 替换 7305 检测抗体,也偶联荧光标签。如表 3 所示,此测定的实施方案消除了干净的恒河猴 CSF 和 A $\beta$  寡聚体缺失的恒河猴 CSF 中的非特异性信号,进一步支持了 7305 抗体已是非特异性信号的来源的观点。不希望受任何理论的束缚,对于 19.3/7305 抗体对观察到的高背景信号被认为是由于 CSF 的纤维蛋白原结合到 MP 珠,这对于 19.3/82E1 抗体对没有观察到。A $\beta$  寡聚体选择性的夹心 ELISA 法的实施方案产生 0.04pg/mL 的 A $\beta$  寡聚体标准品的 LoD, 0.42pg/mL 的 LLoRQ 和对于 A $\beta$  寡聚体相对 A $\beta$  40 单体 5000 倍的测定选择性(图 3)。在这些发现的基础上,申请人选择此测定形式用于进一步优化。

[0049] 表 3

参数	19.3/7305 抗体对	19.3/82E1 抗体对
斜率检测到的事件(pM)	1,200	4,000
背景	70	100
LoD (pM)	0.01	0.01
LLoRQ (pM)	0.16-0.49	0.12
A $\beta$ 40 单体交叉反应性	0.02%	0.04%
缺失的恒河猴 CSF (pM)	80	<0.12
非缺失的恒河猴 CSF (pM)	200	0.35

[0050] 药效动力学 (PD) 测定

使用上述发现,申请人已使用 19.3 和 82E1 抗体对开发了选择性的 A $\beta$  寡聚体夹心 ELISA,以检测和测量 CSF 样品中 A $\beta$  寡聚体的水平。此测定将迄今被称为药效动力学(PD)测定,这是由于其评估在治疗以抑制 A $\beta$  寡聚体产生、增加 A $\beta$  寡聚体清除或以其他方式改变 A $\beta$  寡聚体水平后分析物,即 A $\beta$  寡聚体水平(图 9A)中的变化的用途。PD 测定也可以用于将 AD 患者与非 AD 患者区分开,即诊断,以监测疾病进展,即预后,或监测改变疾病的治疗

改变 A $\beta$  寡聚体浓度的治疗潜力。

[0051] 该 PD 测定,如实施例 7 中所述,将偶联到顺磁微粒(MP)小珠上的 19.3 抗体(MP 小珠 /19.3)置于 ELISA 板上的孔中。向孔中添加人 CSF 或 A $\beta$  寡聚体标准品(以稀释系列添加到 Tris 缓冲液和牛血清白蛋白)。孔中存在的任何 A $\beta$  寡聚体被 19.3/MP 小珠结合,并且过量的溶液被清洗去除。在测定缓冲液(具有 1% 曲拉通 X-100、d-脱硫生物素、BSA 的 Tris 缓冲液)中作为检测抗体的荧光标记的 82E1 添加到清洗的 MP 小珠 /19.3/A $\beta$  寡聚体复合物中并孵育,以结合 A $\beta$  寡聚体复合物。所获得的 MP 小珠 /19.3/A $\beta$  寡聚体 /82E1 复合物用洗脱缓冲液清洗,并且荧光标记的 82E1 抗体用任何未结合的抗体一起被洗脱。用顺磁微粒检测器,例如 Erenna<sup>®</sup> 设备(其中溶液流经并被激光激发)的检测,允许单分子的检测(荧光标签发射特定光波长的光子)以生成并测量等效于所检测的分子即 A $\beta$  寡聚体的荧光信号。如使用 Erenna<sup>®</sup> 设备测量的 A $\beta$  寡聚体相比 A $\beta$  单体的标准曲线,显示于图 3。

#### [0052] 人 CSF 中的 A $\beta$ 寡聚体

实施例 6 的 19.3 x 82E1 A $\beta$  寡聚体选择性的夹心 ELISA 用于测量人 CSF 样品中 A $\beta$  寡聚体的内源水平(图 4A 和 4B)。在两个分开的样品群组中,由于 A $\beta$  寡聚体的存在生成的荧光信号在 AD(使用 MMSE 评分低于 25 作为可能的 AD 进行临床诊断的)CSF 中相比年轻或健康的年龄匹配的对照显著升高。在来自 Precision Medicine (Solana Beach, CA) 的 CSF 样品中,所观察到的 A $\beta$  寡聚体的绝对水平在 AD 中(N=20)是 2.1 +/- 0.61 pg/mL,并且在年龄匹配的对照中(N=10)是 0.53 +/- 0.26 pg/mL,具有 p<0.0004 的 t-检验,双向 Mann-Whitney 评分(图 4A)。在来自 Bioreclamation (Hicksville, NY) 的 CSF 样品中,所观察到的 A $\beta$  寡聚体的绝对水平在 AD 中(N=10)是 1.66 +/- 0.5 pg/mL,并且在对照中(N=10)是 0.24 +/- 0.05 pg/mL,具有 p<0.0021 的 t-检验,双向 Mann-Whitney 评分(图 4B)。组合两个群组,90% 诊断的 AD CSF 样品高于 0.42 pg/mL 的 LLoRQ,而仅 20% 年龄匹配的对照或 10% 的年轻对照高于此限值。所有值均高于 0.04 pg/mL 的 LoD。测量在从 Bioreclamation 获得的 CSF 样品中 A $\beta$  40 和 A $\beta$  42 单体水平(分别为图 5A 和 5B),并且对于 A $\beta$  40 在 AD 和对照 CSF 之间是相当的(图 5A),而对于 A $\beta$  42,它们在 AD 样品中显著降低(图 5B)。这在先前报道作为 AD CSF 的特征(De Meyer, 等, 2010, Arch. Neurol. 67:949-956; Jack, 等, 2010, Lancet Neurol. 9:119-128),并且证实了这些样品的正确诊断。不希望被任何理论所束缚,申请人认为在 AD CSF 样品中更低的 A $\beta$  42 水平是由于 A $\beta$  42 在 AD 大脑的淀粉状蛋白沉积中的保留。特异性地检测和定量这些观察到的差异的能力表明,这些生物标志物可以用作 AD 的诊断和预后量度。

[0053] 对于诊断性测定,根据本文的本发明测定检测的信号,即 A $\beta$  寡聚体的水平,对于 AD 患者通常将比对于非 AD 患者观察到的信号高多于三倍(达到 > 0.5 pg/mL 的水平)。这与图 4A(其中 A $\beta$  寡聚体在 AD CSF 中的水平相比年龄匹配的对照高 4 倍)和图 4B(其中 A $\beta$  寡聚体在 AD CSF 中的水平高 8 倍)中显示的数据一致。此数据还支持本发明的 A $\beta$  寡聚体测定在疾病的早期阶段鉴定患者的用途(即,预后测定)。对于 AD 的发展年龄是最大的风险因素,并且在 AD 和年龄匹配的对照之间观察到的差异小于 AD 和年轻对照之间。类似地,对于预后 A $\beta$  寡聚体测定,具有低于 25 的 MMSE 的患者将具有  $\geq 0.5$  pg/mL 的检测的 A $\beta$  寡聚体信号(比具有 MMSE 高于 25/正常的患者高 4 到 8 倍),相比之下,对于 A $\beta$  42 单体检测的信号在 AD CSF 中相比对照低大约 2 倍。图 6 表明,如果使用 MMSE 评分  $\leq 25$  作为

截止值 (Mungas, D., 1991, *Geriatrics* 46 (7): 54-58), 高于其则认为患者是“正常的健康的”, 并且低于其, 则认为患者轻度认知损伤, 或者具有AD, 则可以预期高于0.5 pg/mL的A $\beta$ 寡聚体水平, 该患者将可能具有低于25的MMSE评分。

#### [0054] 目标接触 (TE) 测定

类似地, 使用上述发现, 申请人已使用抗人 IgG2 抗体 x 82E1 抗体对开发了选择性的夹心 ELISA, 以检测和定量在来自用抗-A $\beta$ 寡聚体 19.3 IgG2 抗体 (即, 治疗性抗体) 治疗的患者的 CSF 样品中结合的 A $\beta$ 寡聚体的水平。此测定将迄今被称为目标接触测定 (TE 测定), 这是由于其测量体内结合治疗性 (捕获) 抗体的 A $\beta$ 寡聚体的用途。因此, 所述 TE 测定可以用于测量结合治疗性体的 A $\beta$ 寡聚体的水平, 以证实通过疗法的 A $\beta$ 寡聚体的接触。不希望被任何理论所束缚, 申请人认为结合治疗性抗-A $\beta$ 寡聚体抗体的 A $\beta$ 寡聚体的水平在来自用所述疗法治疗一段时间的受试者的 CSF 样品中将更低。在施用后增加或不改变的结合的 A $\beta$ 寡聚体的水平表明该疗法不适用于 AD 的治疗。另外, 也可以是这样的情况, 仅仅通过隔绝 A $\beta$ 寡聚体并使它们结合治疗抗体, 由于与大脑中的神经元的相互作用减少, 在急性表现中可以得到益处。然而, 此益处可能不会与 A $\beta$ 寡聚体的本身变化有关。目标接触测定将在最低程度上评估治疗性抗体在 CSF 内接触 A $\beta$ 寡聚体的能力。

[0055] 为了证明 A $\beta$ 寡聚体-特异性抗体接触人 CSF 基质中 A $\beta$ 寡聚体的能力, 申请人通过掺入抗-A $\beta$ 寡聚体抗体 19.3 在人 CSF 内生成 19.3/A $\beta$ 寡聚体复合物, 所述抗-A $\beta$ 寡聚体抗体 19.3 达到认为在用 20 mg/kg (100 ng/mL, 图 8) 静脉内给药的恒河猴中 24 小时存在的水平。向此掺入 19.3 的人 CSF 样品中添加递增量的 A $\beta$ 寡聚体标准品, 使其既匹配内源性 A $\beta$ 寡聚体浓度 (0.1-5.0 pg/mL) (图 4A 和 4B) 又使它们显著高于正常范围。在人 CSF 中形成的 19.3 x A $\beta$ 寡聚体复合物被捕获在包被有针对人  $\kappa$  轻链的抗体或针对人类 IgG2 的抗体的 96 孔 ELISA 板上, 然后用生物素化的 82E1 (b82E1) 检测, 如同对于 PD 测定所进行的 (图 3A)。抗-A $\beta$ 寡聚体抗体 19.3 被缓冲液中的抗-人  $\kappa$  和抗-人 IgG2 (▲, 图 7A 和 7B) 所充分识别, 因为该抗体包含这些特征两者。如图 7A 中所示 (●, CSF), 所述测定使用抗-人 IgG2 作为捕获抗体和 82E1 作为检测抗体, 以检测和测量 19.3/A $\beta$ 寡聚体复合物, 导致相比使用抗-人  $\kappa$  作为捕获抗体的测定 (●, CSF, 图 7B), 在人 CSF 中显著更高的灵敏度。两个测定在酪蛋白缓冲液中均具有等效的灵敏度。使用抗-人  $\kappa$  捕获 19.3/A $\beta$ 寡聚体复合物导致较低的灵敏度, 对结合 100 ng/mL 19.3 的 A $\beta$ 寡聚体达到 42 pg/mL 的 LoD, 可能由于在人 CSF 中具有  $\kappa$  轻链的 IgG 种类相比 IgG 种类更高的背景水平, 这导致使用抗-IgG2 的测试形式更高的灵敏度。使用 19.3 或相关的 IgG2 抗-A $\beta$ 寡聚体抗体作为治疗性抗体对人或实验动物给药后, 可以预期治疗性抗体以 0.1-0.2% 的给药水平表现在 CSF 中 (Thompson, 2005, *Proteins of the Cerebrospinal Fluid*, Elsevier Academic Press, New York, NY)。存在于 CSF 中的治疗性抗体将结合存在的 A $\beta$ 寡聚体, 19.3 (IgG2)/A $\beta$ 寡聚体复合物将被抗-IgG2 捕获抗体 (通过抗-人 19.3 IgG2 抗体) 捕获, 并且 A $\beta$ 寡聚体复合物将然后用 82E1 检测。使用在上述 PD 测定中利用的顺磁微粒检测系统, 例如 Erenna<sup>®</sup> 免疫测定系统 (Singulex<sup>®</sup>, Alameda, CA) 将可能改善此平台的灵敏度。

[0056] 随着时间推移, 在用抗-A $\beta$ 寡聚体抗体治疗性处理后, 预期对于 19.3/A $\beta$ -寡聚体复合物检测的信号将降低 (相比处理前的水平)。结合的 A $\beta$ 寡聚体的量, 无论是对于这

些复合物急性测量的还是在治疗处理一段时间后测量的,代表了与目标(即 A $\beta$  寡聚体)接触的治疗性抗体的比例,并且可以充当对治疗性抗体疗效的替代。

## 实施例

[0057] 本文使用下列缩略语:Ab:抗体;A $\beta$ :淀粉状 $\beta$ 蛋白;AD:阿尔茨海默氏病;ADDLs:淀粉状蛋白 $\beta$ 衍生的可扩散的配体;aM:阿摩尔;CSF:脑脊液;DE平均值:检测的事件平均值;DMSO:二甲亚砜;HFIP:1,1,1,3,3,3六氟-2-丙醇;HMW:高分子量;LMW:低分子量;LoD:检测限;LLoRQ:可靠的定量下限。

### [0058] 实施例 1

#### ADDL 制备物和 A $\beta$

A $\beta$  40 和 A $\beta$  42 (淀粉状蛋白 $\beta$ 肽 1-40, 淀粉状蛋白 $\beta$ 肽 1-42) 从 American Peptide Co., Sunnyvale, CA 获得。A $\beta$  42 溶于 1,1,1,3,3,3 六氟-2-丙醇 (HFIP), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 以消除任何事先存在的二级结构,其可以作为聚集的“种子”。通过蒸发去除 HFIP 以形成 A $\beta$  42 膜。A $\beta$  42 肽膜(从 100% HFIP 溶剂干燥出的 1 mg A $\beta$  42) 溶于 44  $\mu$ L DMSO, 温和搅拌向其中添加 1,956  $\mu$ l 冷的 F12 培养基 (GIBCO®, Invitrogen, Carlsbad, CA, Cat # ME100014L1), 并且在室温孵育 18 至 24 小时。样品在室温下在 14,200 g 离心 10 分钟。上清液转移到新管,并通过 0.5ml 柱 YM-50 过滤管 (Millipore, Bedford MA; Cat# UFC505096, 0.5 ml) 经由在 4,000 rpm 在 4 $^{\circ}$ C 下离心 15 分钟过滤。通过反转过滤器插入物,替换到新的收集管中,并以 4,000 rpm 在 4 $^{\circ}$ C 下离心 5 分钟收集滞留物。在过滤前,通过 Bradford 测定 (BioRad, Hercules, CA, Cat#\_23236) 测量蛋白质浓度,并报告为  $\mu$ M (基于 A $\beta$  单体的分子量 (MW4513) 来计算)。所有样品储存在 -80 $^{\circ}$ C 直至使用。

### [0059] 实施例 2

#### 抗-ADDL 抗体的选择

##### A. 淘选人源化抗体文库

构建人源化抗-ADDL 抗体 h3B3 的亲和力成熟文库(参见,美国专利号 7,811,563 和 7,780,963), 其中部分轻链 CDR3 氨基酸序列进行随机诱变。为了覆盖整个 CDR3 区,建立了两个子文库。一个文库由亲本重链可变区和轻链 CDR3 的左半部的突变的氨基酸组成,并且另一个由亲本重链可变区和轻链 CDR3 的右半部的突变的氨基酸组成。类似的策略用于重链 CDR 随机诱变,具有三个子文库。

[0060] 人源化 3B3 (h3B3) 使用本领域中已知的方法进行亲和力成熟。在 Fab 展示载体 (pFab3D) 中克隆 h3B3 可变区。在此载体中,重链和轻链可变区在框内插入以分别匹配恒定区的 CH1 结构域和  $\kappa$  恒定区。在 Fab3D 中,myc 表位和 6 个连续组氨酸的氨基酸在 CH1 序列之后,然后将其连接到噬菌体 pIII 蛋白以供展示。在重链和轻链 CDR3 中所有位置使用在 PCR 引物内置的简并寡核苷酸序列进行随机诱变。为容纳物理大小,子文库构建为每个侧重于 5-6 个氨基酸。人 3B3 (H3B3) 的载体 DNA 用作模板 DNA 以使用突变的 PCR 引物扩增重和轻链两者(表 4)。PCR 扩增后,合成的 DNA 片段在 1.3% 琼脂糖凝胶上电泳,去除引物并且可变片段用下列限制性内切酶消化:对于轻链可变克隆是 BsiWI 和 XbaI 克隆位点,对于重链可变克隆是 XhoI 和 ApaI。

[0061] 表 4

<b>3B3 亲和力成熟文库</b>	<b>正向 PCR 引物</b>	<b>反向 PCR 引物</b>
<b>轻链文库</b>	<b>SEQ ID NO:4</b>	<b>SEQ ID NO:5</b> <b>SEQ ID NO:6</b>
<b>重链文库</b>	<b>SEQ ID NO:7</b>	<b>SEQ ID NO:8</b> <b>SEQ ID NO:9</b>

[0062] 为了构建在 pFab3D 噬菌体展示载体中的亲和力成熟文库, pFab3D-3B3 DNA 用相同对的限制性内切酶消化, 纯化并且重链或轻链可变区的 PCR 片段用 T4 连接酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 在 16°C 连接过夜。连接产物然后转染到大肠杆菌 TG1 电穿孔感受态细胞 (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA), 并且细菌培养物的等分试样铺板于 LB 琼脂 - 羧苄青霉素 (50  $\mu$ g/ mL) 板, 以滴定文库大小。剩余的培养物或者铺板在具有羧苄青霉素的大板上, 并在 30°C 下孵育过夜以获得大肠杆菌库库存, 或者通过用辅助噬菌体 M13K07 (Invitrogen, Carlsbad, CA,  $10^{11}$  pfu/mL) 在室温孵育而感染, 并且在 37°C 下孵育 10 分钟。然后, 添加具有羧苄青霉素 (50  $\mu$ g/mL) 的 2TY 培养基, 并在 37°C 振荡孵育 1 小时。然后添加卡那霉素 (70  $\mu$ g/mL), 并且培养物在 30°C 振荡生长过夜。滴定噬菌体培养上清液并通过用 20% (v/v) 的 PEG (聚乙二醇)/NaCl 沉淀浓缩, 再悬浮于 PBS 中, 用 0.22  $\mu$ m 的过滤器除菌, 并且制成等分试样用于噬菌体文库淘选。

[0063] 然后如表 5 中所总结的进行噬菌体文库淘选。

[0064] 表 5

淘选轮次	轮次 1	轮次 2	轮次 3	轮次 4
抗原浓度	180nM	60nM	20nM	10nM

[0065] 来自 Fab 展示噬菌体文库 (100  $\mu$ l, 约  $10^{11}$  至  $10^{12}$  pfu) 的输入噬菌体用 900  $\mu$ l 封闭液 (3% 脱脂牛奶 / PBS) 封闭, 以减少噬菌体表面的非特异性结合。链霉亲和素包被的小珠通过在磁性分离器中收集 200  $\mu$ l 的小珠悬浮液并除去上清液制得。小珠然后悬浮在 1mL 封闭液中, 并在旋转混合器上混合 30 分钟。为了去除非特异性的链霉亲和素结合噬菌体, 封闭的噬菌体文库与封闭的链霉亲和素包被的小珠混合并置于旋转混合器上混合 30 分钟。来自去选择 (de-selection) 过程的噬菌体悬浮液转移到新的管中, 并添加 200  $\mu$ l 抗原, 10% bADDL, 并孵育两小时用于抗体和抗原结合。孵育后, 将混合物添加到封闭的链霉亲和素包被的小珠并在旋转混合器上孵育一小时, 以捕获链霉亲和素小珠上的 Ab/Ag 复合物。带有捕获的 10% bADDL/ 噬菌体复合物的小珠用 PBS/0.05% 吐温 20 清洗五次, 并然后用 PBC 单独清洗两次。结合的噬菌体用 200  $\mu$ l 100mM TEA 从 bADDL 上洗脱并孵育 20 分钟。洗脱的噬菌体然后转移到 50mL 管中, 用 100  $\mu$ l 1M Tris-HCl, pH7.5 中和并添加到 10 mL 具有 0.6-0.8 的 OD<sub>600 nm</sub> 的大肠杆菌 TG1 细胞中。在 37°C 下振荡孵育一小时后, 培养等分试样铺板于 LB 琼脂 - 羧苄青霉素 (50  $\mu$ g/ mL) 的板, 以滴定输出的噬菌体数目, 并且剩余的细菌离心并用 500  $\mu$ l 的 2 $\times$ YT 培养基 (Teknova, Hollister, CA) 悬浮, 铺板于含有 100  $\mu$ g/ml 羧苄青霉素和 1% 葡萄糖的生物测定 YT 琼脂板 (Teknova, Hollister, CA)。生物测定板在 30°C 生长过夜。

[0066] 每一轮淘选后, 随机挑选单克隆以在 96 孔板中产生噬菌体。在 96 孔板中制备噬菌体的方法类似于上述, 不同之处在于没有使用噬菌体沉淀步骤。包含生长在含有 100  $\mu$ g/ml 羧苄青霉素和 1% 葡萄糖的 120  $\mu$ l 2 $\times$ YT 培养基 (16g 细菌蛋白胨, 10g 细菌-酵母提取

物,5g NaCl (都来自 BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), 加 ddH<sub>2</sub>O 到 1 L (高压灭菌) 在 HiGro® 摇床 (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI) 中孵育过夜, 在 30°C 以 450 rpm 振荡。噬菌体上清液 (约 100 μL) 直接用于上述的 Aβ DDL 结合 ELISA 分析。噬菌体对 ADDLs 的结合使用缀合辣根过氧化物酶 (HRP) 的抗 -M13- 抗体 (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Waukesha, WI) 检测。

#### [0067] 实施例 3

对于 Aβ 寡聚体和 Aβ 40 确定 19.3 EC50

高蛋白结合板以 100 pmol/孔 Aβ 40 或 50 pmol/孔 Aβ 寡聚体/PBS 在 4°C 包被过夜。次日, 板用 PBS + 0.05% 吐温 -20 清洗 5 次并用酪蛋白封闭缓冲液 (Thermo Scientific, Waltham, MA) 和 0.05% 吐温 -20 封闭过夜。在实施例 2 中鉴定的 19.3 抗体, 以 0 至 15 μg/ml 在 12 点三倍稀释系列中测试。在室温孵育两小时后, 清洗板并且以 0.08 μg/ml 添加缀合碱性磷酸酶的抗 - 人 IgG (ThermoScientific, Waltham, MA)。在室温孵育 45 分钟后, 清洗板并添加 Tropix CDP star (Applied Biosystems, Foster City, CA)。30 分钟后在 EnVision® 读板器 (PerkinElmer, Waltham, MA) 上检测发光。使用 GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 软件完成曲线拟合。

#### [0068] 实施例 4

用 Aβ 寡聚体和 Aβ 单体的竞争性结合测定

用 Aβ 寡聚体和 Aβ 单体的竞争性结合测定证明了使用 19.3 抗体对 Aβ 寡聚体的偏好。如上文实施例 3 中通过酪蛋白缓冲液封闭步骤制备 Aβ 寡聚体板。使用 100pmol/孔, 以相同的方式制备 Aβ 40 单体 - 包被的板。来自实施例 2 的 19.3 抗体, 以 4nM (如上文实施例 3 中确定的对 Aβ 寡聚体的 EC50) 应用到每孔, 在酪蛋白封闭缓冲液基质中, 并且允许与 Aβ 寡聚体或 Aβ 40 在室温振荡反应 30 分钟。对包含抗体的孔应用对于 Aβ 寡聚体或 Aβ 40 从 10 μM 开始的 12 点, 3 倍浓度曲线。对于包被 Aβ 寡聚体的板, 将 Aβ 40 添加到孔中; 对于 Aβ 40 板, 将 Aβ 寡聚体添加到孔中。板在室温孵育一个半小时。残留抗体结合的检测和 EC50 计算均在上文实施例 3 中确定。

#### [0069] 实施例 5

在 Envision 平台上的夹心 ELISA

A. Aβ 寡聚体测定: 夹心 ELISA 应用于完整的 Aβ 寡聚体制备物或人 CSF。19.3 Aβ 寡聚体 - 偏好抗体以每孔 0.5 μg 在碳酸氢钠缓冲液 (ThermoFisher #28382, Waltham, MA) 中在 4°C 包被过夜。次日, 孔用含 0.05% 吐温 20 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS-T) 清洗并在 4°C 用添加 0.1% 吐温的 200 μL/孔酪蛋白缓冲液/PBS (ThermoFisher #37528, Waltham, MA) 封闭过夜。Aβ 寡聚体标准品或 SEC 级分稀释在酪蛋白缓冲液中并以 100 μL/孔添加。使用在标准曲线的线性范围内提供信号的稀释度用于计算。次日, 板用 PBS-T 清洗 5 次, 并且以 100 μL/孔添加在酪蛋白缓冲液中的 Biotin-82E1 (IBL, No.10326, Toronto, Ontario, Canada) 在室温下一小时。板用 PBS-T 再次清洗, 并且在室温添加 Neutravidin-AP (ThermoFisher #31002, Waltham, MA) 30 分钟。最后, 在额外的 PBS-T 清洗后, 添加 Tropix® CDP®-Star 化学发光底物 (Life Technologies™, Carlsbad, CA) 30 分钟。在 EnVision® (PerkinElmer, Waltham, MA) 读板器上对发光进行定量。

[0070] B. Aβ 单体测定: Aβ 40 (American Peptide Co, Sunnyvale, CA) 溶于

1, 1, 1, 3, 3, 3 六氟 -2- 丙醇 (HFIP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。通过蒸发去除 HFIP, 并且干燥的肽膜然后重溶于二甲亚砜 (DMSO, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)。用于进行 ELISA 和 / 或试剂的生物素化的标准方法可以见于 Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Harlow E, Lane D (1988)。使用夹心 ELISA 方案使用可商购获得的抗体, 例如 6E10、12F4 和 G210 (Covance, Princeton, NJ) 检测 A $\beta$  单体的方法先前已有报道 (Sankaranayaranan 等, J. Pharmacol. Exp. Ther., 328:131-140)。

#### [0071] 实施例 6

##### 人 CSF 样品

来自临床证实的 AD、年轻对照或年龄匹配对照患者的 CSF 样品购自 BioReclamation (Hicksville, NY) 或 Precision Med (Solana Beach, CA)。使用通常接受的简易精神状态检查 (MMSE) 进行认知诊断。通过 ELISA 对 A $\beta$  40 和 A $\beta$  42 单体的分别测量证实样品的性质 (实施例 5B), 其已报道为在 AD CSF 中未改变或未显著降低。

#### [0072] 实施例 7

##### 19.3 在非人灵长类动物中的药代动力学分析

为了证实 19.3 在灵长类动物 CSF 中的存在, 在小脑延髓池开口的恒河猴的群组中对抗 -A $\beta$  寡聚体抗体 19.3 进行了研究。使用抗体 19.3 (20 mg/kg) 的单次静脉内推注对 6 只动物 (三只雄性 / 三只雌性) 给药。在多个时间点从小脑延髓池口收集 CSF 样品, 并且抗体 19.3 在 CSF 中的浓度用抗 -人 IgG ELISA 测定来确定。申请人发现抗体 19.3 能够穿入灵长类动物 CSF, 在那里其在前 24 小时期间浓度增加并且在约 100 ng/mL 达到峰值。此浓度指导掺入人 CSF 用于目标接触测定的开发的抗 A $\beta$  寡聚体抗体 19.3 的水平。

#### [0073] 实施例 8

##### A $\beta$ 寡聚体夹心 ELISA 基于顺磁微粒的免疫测定

使用基于顺磁微粒的免疫测定平台 (Erenna<sup>®</sup> 免疫测定系统, Singulex<sup>®</sup>, Alameda, CA) 进行 A $\beta$  寡聚体夹心 ELISA 以确定人样品或 A $\beta$  寡聚体标准品中的寡聚体水平。通过每 mg MPs 结合 12.5  $\mu$ g 捕获剂, A $\beta$  寡聚体抗体 19.3 制备用于捕获的微粒 (MPs) (参见下文方法)。结合 19.3 的 MPs 在测定缓冲液 (具有 1% 曲拉通 X-100, D- 脱硫生物素, 0.1% 牛血清白蛋白的 Tris 缓冲液) 中稀释到 100  $\mu$ g/mL, 并以 100  $\mu$ L 添加到 100  $\mu$ L CSF 样品或标准品 (稀释在 Tris 缓冲液和 3% 牛血清白蛋白中), 随后在 25 $^{\circ}$ C 孵育两小时。MPs 经磁性床保留, 并且未结合的材料在单个清洗步骤中, 使用测定稀释液使用 THydroflex 洗板器 (Tecan, Männedorf, Switzerland) 去除。Alexa- 荧光标记的检测抗体 82E1 (如下文实施例制备) 稀释到 500 pg/mL 的终浓度, 并且经 0.2  $\mu$ m 滤器 (Pall 4187, Fort Washington, NY) 过滤。抗体添加到 20  $\mu$ L/ 孔的个别样品颗粒。ELISA 板在 25 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 同时在 Jitterbug (Boekel, Feasterville, PA) 中振荡。孔用测定缓冲液清洗 4 次以去除任何未结合的检测试剂。MP/19.3/A $\beta$  寡聚体 /82E1 复合物转移到新板, 吸除缓冲液并添加 10  $\mu$ L/ 孔洗脱缓冲液, 随后在 25 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟, 同时在 Jitterbug 中以速度 5 振荡。洗脱的荧光标记的检测抗体 82E1 转移到包含 10  $\mu$ L/ 孔中和缓冲液的 384 孔板, 在顺磁微粒检测器 (Erenna<sup>®</sup>, Singulex<sup>®</sup>, Alameda, CA) 上以每孔 60 秒的读数时间进行读数。

#### [0074] A. 捕获抗体标记

1. A $\beta$  寡聚体抗体 (19.3) 对 Dynabeads (MP 小珠) 的结合: 使用磁力从 50  $\mu$ l Dynabeads 去除上清液。在包含 5  $\mu$ g 19.3 的 200  $\mu$ l 抗体结合和清洗缓冲液, 例如 RIPA 缓冲液 [#9806, Cell Signaling Technologies, Beverly, MA] 中重悬 Dynabeads。在室温下转动孵育 10 分钟。用磁力从 19.3/MP 小珠复合物去除上清液。用 200  $\mu$ l 结合和清洗缓冲液清洗复合物。

[0075] 2. 将 A $\beta$  寡聚体抗体 (19.3) 偶联到 Dynabeads (MP 小珠): 仅在使用之前, 制备 5 mM BS3 溶液 (双(硫代琥珀酰亚胺基)辛二酸酯, Cat. # 21580 Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA), 在缀合缓冲液中 (20 mM 磷酸钠, 0.15 M NaCl (pH 7-9)); 每个样品需要 250  $\mu$ l 的此溶液 (5  $\mu$ g 19.3/50  $\mu$ l MP 小珠复合物)。在 200  $\mu$ l 缀合缓冲液中清洗偶联 19.3 的 MP 小珠 (19.3/MP 小珠) 两次。置于磁力上, 并去除上清液。在 250  $\mu$ l 5 mM BS3 中重悬 19.3/MP 小珠。在室温孵育 30 分钟, 同时倾斜/旋转。通过添加 12.5  $\mu$ l 淬灭缓冲液 (1M Tris HCl (pH 7.5)) 来淬灭交联反应, 并在室温孵育 15 分钟, 同时倾斜/旋转。用 200  $\mu$ l PBST 清洗交联的 MP 小珠三次。在测定缓冲液中将 MP 小珠稀释到 100  $\mu$ g/mL 用于如上述测定方案中使用。

#### [0076] B. 检测抗体标记

偶联 Alexa Fluor 546 到 82E1: 根据制造商的方案, 将 82E1 偶联到相当于 Alexa Fluor 546 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的荧光标签。简而言之, 将 82E1 稀释到 1 mg/mL 并且添加十分之一体积的 1M 碳酸氢钠缓冲液。此 82E1 溶液 (100  $\mu$ L) 添加到 Alexa Fluor 546 染料的小瓶, 并且小瓶加盖, 温和反转以溶解染料并在室温搅拌 1 小时。离心柱以从检测抗体分离任何未标记的荧光标签, 同时将 Component C (BioGel® P-30, BioRad, Hercules, CA) 精细尺寸排阻纯化树脂装载到柱上。在凝胶缓冲液排干后, 将 100  $\mu$ L 19.3/MP 小珠和染料反应体积添加到在离心柱顶部的树脂的中心, 并吸附进凝胶床。在室温向柱上缓慢添加 100  $\mu$ L 洗脱缓冲液 (0.01 M 磷酸钾, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 与 0.2 mM 叠氮钠)。添加额外的洗脱缓冲液, 并且当柱子运行时, 对柱子照明以使染色的/标签的抗体前端可视化。第一条柱染料线是标记的抗体。游离的染料保留在柱床中, 弃掉离心柱。

[0077] 从 Bioreclamation (Hicksville, NY) 获得人 CSF 样品并且在融化后保持在冰上。在取样前, CSF 样品用 0.05% 吐温 -20 (将 2.5% 吐温 -20 原液 1:50 稀释到 CSF 中) 处理。样品或 A $\beta$  寡聚体标准品稀释到具有 3% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 Tris 缓冲的盐水 (TBS) 中。在包含 TBS/0.1% BSA/1.0% 曲拉通 X-100 的测定缓冲液中将偶联 19.3 的 MPs 稀释到 100  $\mu$ g/mL 的终浓度。向 96 孔板的每个孔中添加 100  $\mu$ L 样品/标准品和 100  $\mu$ L 包被 19.3 的 MPs。样品在室温 (RT) 与 MPs 孵育 60 分钟并在添加 TBS/0.1% BSA/1.0% 曲拉通 X-100 MP 重悬缓冲液后使用磁性分离清洗一次。荧光 - 标记的检测抗体 82E1 以每孔 20  $\mu$ L 添加, 并在室温孵育 30 分钟, 随后使用磁力分离用 MP 重悬缓冲液清洗 4 次。从检测抗体 82E1 上洗脱掉荧光标签并在室温孵育 5 分钟。洗脱液转移到包含中和缓冲液的微孔板中, 并且转移到能够读出磁性微粒 (MPs) 的检测装置中, 例如 Erenna® 设备 (Singulex®, Almeda, CA), 其每孔读数时间为 60 秒。

#### [0078] 实施例 9

A $\beta$  寡聚体复合物夹心 ELISA 目标接触 (TE) 测定

可以进行 A $\beta$  寡聚体复合物夹心 ELISA 用于作为目标接触测定使用, 以检测体外或

体内形成的抗体 /A $\beta$  寡聚体复合物,用于治疗性抗体以显示目标接触或证明治疗性抗体减少 19.3/A $\beta$  寡聚体复合物的效果。抗 - 人 IgG2 或抗 - 人  $\kappa$  (两者均来自 Southern Biotech, Birmingham, AL) 以 0.5  $\mu$ g 每孔在碳酸氢钠缓冲液 (BupH 碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液包装, #28382, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham MA) 中在 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。次日,孔用含 0.05% 吐温 20 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS-T; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 清洗并在 4 $^{\circ}$ C 用添加 0.1% 吐温的 200  $\mu$ L/ 孔酪蛋白缓冲液 /PBS 封闭过夜。19.3 抗体以 0.100  $\mu$ g/mL 掺入在微量离心管 (Axygen, Inc., Union City, CA, MCT-175-L-C) 中的酪蛋白缓冲液 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham MA) 或人 CSF。A $\beta$  寡聚体以不同浓度掺入以给出标准曲线,保持 19.3 水平恒定。样品在 4 $^{\circ}$ C 搅动 1 小时以使抗体 (19.3)/A $\beta$  寡聚体复合物能够形成。对抗 - 人 IgG2 或抗 - 人  $\kappa$  - 包被的板 (n=3) 应用 100  $\mu$ l 样品 / 孔,并在 4 $^{\circ}$ C 在板摇床上孵育过夜。次日,板用 PBS-T 清洗 5 次,并且 1:5000 稀释在酪蛋白缓冲液 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO),0.1% 吐温 20 中的 Biotin-82E1 (IBL, Minneapolis, MN, No.10326) 以 100  $\mu$ l/ 孔添加,在室温 1 小时。板用 PBS-T 再次清洗,并且然后添加 1:20,000 稀释在酪蛋白缓冲液中的 Neutraavidin-AP (ThermoFisher #31002, Waltham, MA),在室温 30 分钟。进行额外的 PBS-T 清洗后,应用 Tropix CDP star 发光底物 (Applied Biosystems, Foster City, CA, T2214)30 分钟。在 EnVision<sup>®</sup> 读板器 (PerkinElmer, Waltham, MA) 上对发光进行定量。

## 序列表

<110> Savage, Mary J.

Shughrue, Paul J.

McCampbell, Alexander

Wolfe, Abigail L.

<120> 用于检测流体样品中淀粉状蛋白  $\beta$  寡聚体的方法及其用途

<130> 23090-US-PSP

<160> 9

<170> 用于 Windows 4.0 版本的 FastSEQ

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

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

	100		105		110
Glu Ile Lys					
	115				
<210> 2					
<211> 117					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 合成的					
<400> 2					
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 Phe					
	20		25		30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
	35		40		45
Ala Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val					
	50		55		60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Arg Gly Ile Thr Thr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu					
	100		105		110
Val Thr Val Ser Ser					
	115				

<210> 3

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的



290	295	300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
305	310	315
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		320
	325	

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 4

tatggcttct agagatgtgg tgatg

25

<210> 5

<211> 82

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<221> 尚未归类的特征

<222> (0)... (0)

<223> M = A 或 C

<221> 尚未归类的特征

<222> (0)... (0)

<223> N = A, C, G 或 T

<400> 5

tgcagccacc gtacgcttga tctccagctt ggtgccctgg ccaaaggtgg ggggcacmnn 60

mnmnmnmnm nngcagtagt ag

82

<210> 6

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<221> 尚未归类的特征

<222> (0)... (0)

<223> M = A 或 C

<221> 尚未归类的特征

<222> (0)... (0)

<223> N = A, C, G 或 T

<400> 6

tgcagccacc gtacgcttga tctccagctt ggtgccctgg ccaaamnnmn nmnnmnnmnn 60  
gctgccctgg 70

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 7

aggcggccct cgaggagggtg cagc 24

<210> 8

<211> 83

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<221> 尚未归类的特征

<222> (0)... (0)

<223> M = A 或 C

<221> 尚未归类的特征

<222> (0)... (0)

<223> N = A, C, G 或 T

<400> 8

agaccgatgg gcccttggtg gaggcgctgg acacggtcac cagggtgccc tggccccamn 60

nmnmnmnmnm mnggtgatg ccc 83

<210> 9

<211> 92

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<221> 尚未归类的特征

<222> (0)... (0)

<223> M = A 或 C

<221> 尚未归类的特征

<222> (0)... (0)

<223> N = A, C, G 或 T

<400> 9

agaccgatgg gcccttggtg gaggcgctgg acacggtcac cagggtgccc tggccccagt 60

agtccagmnn mnmnmnmnm ncccgggcac ag 92

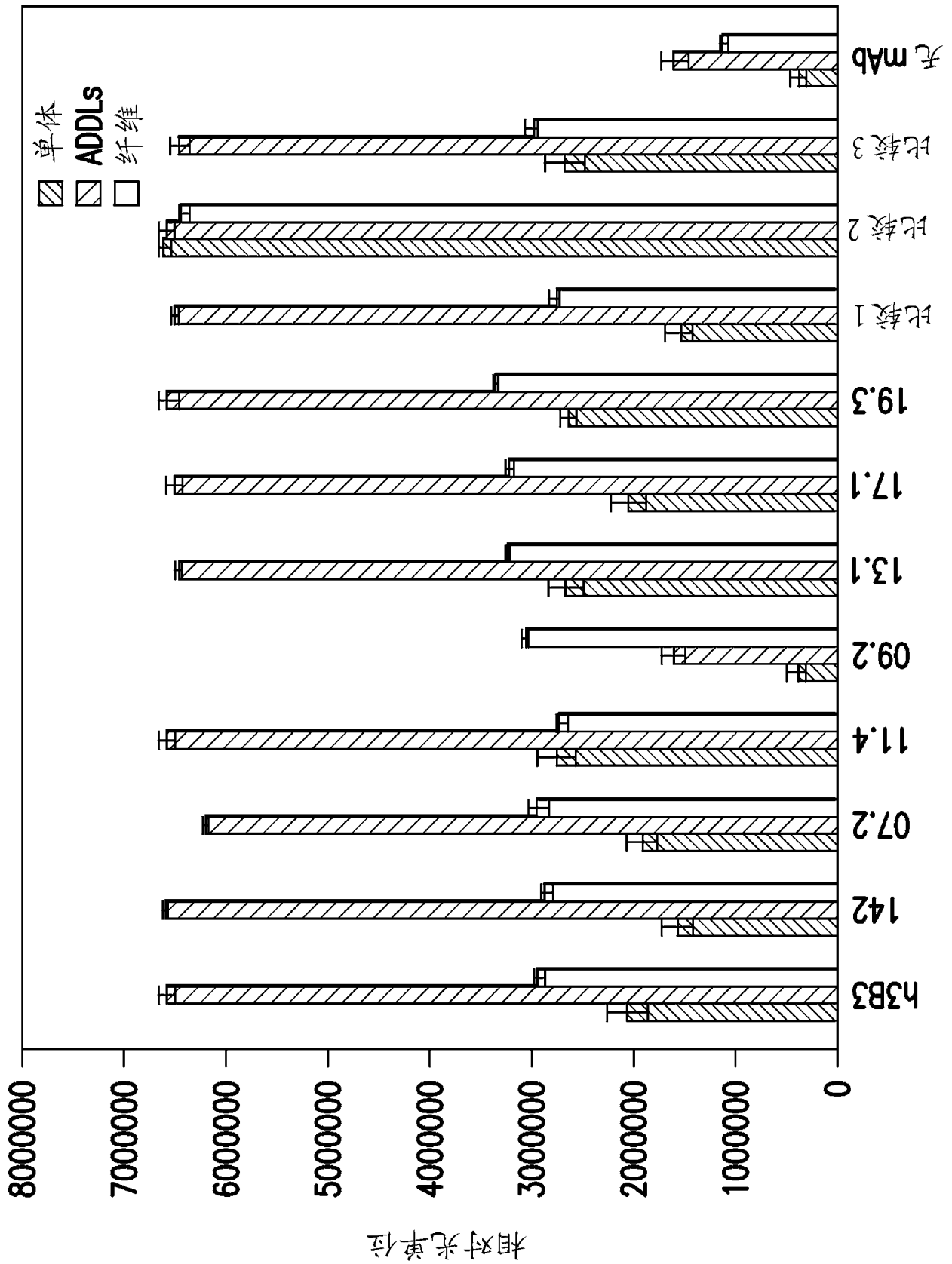


图 1A

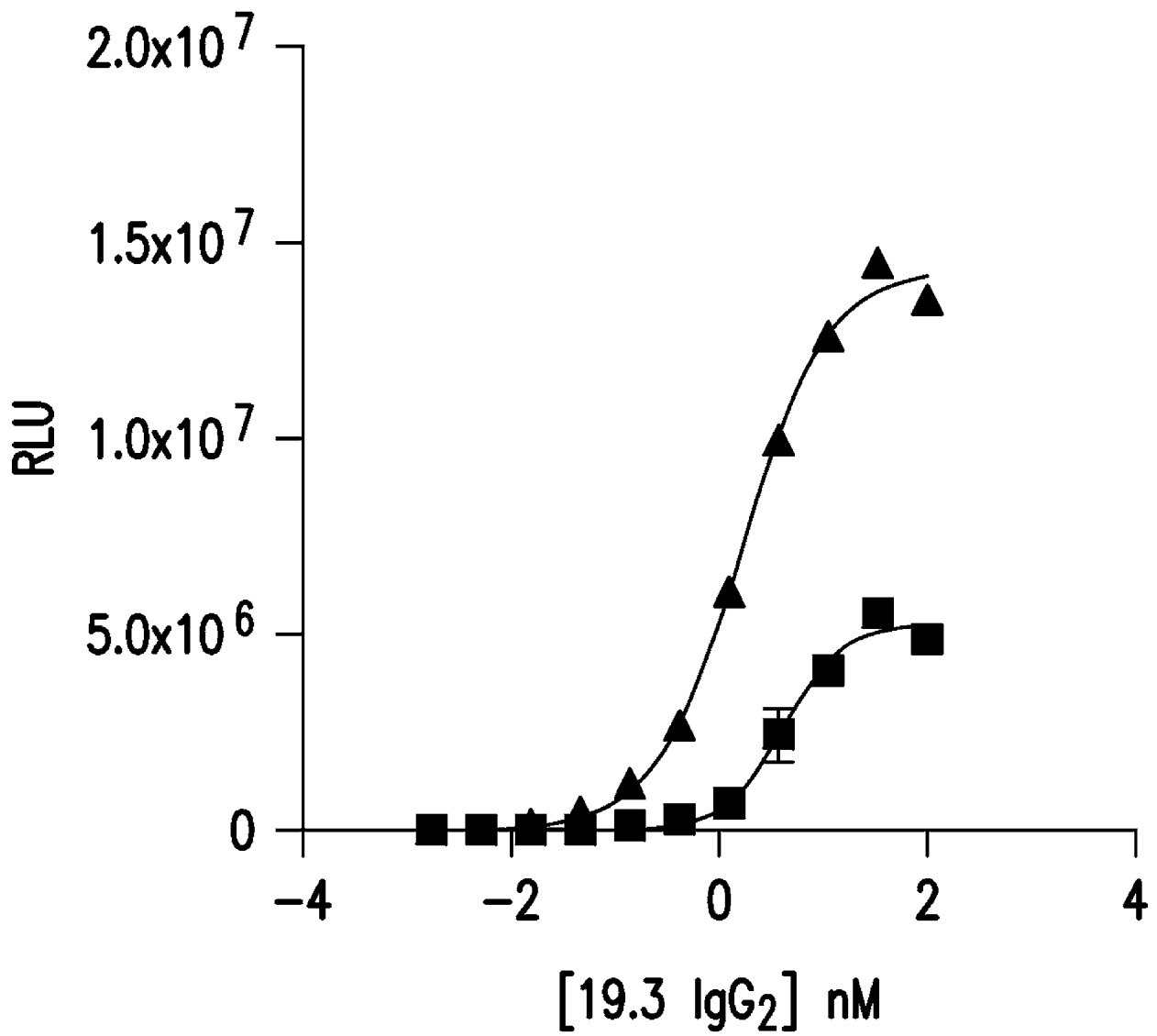


图 1B

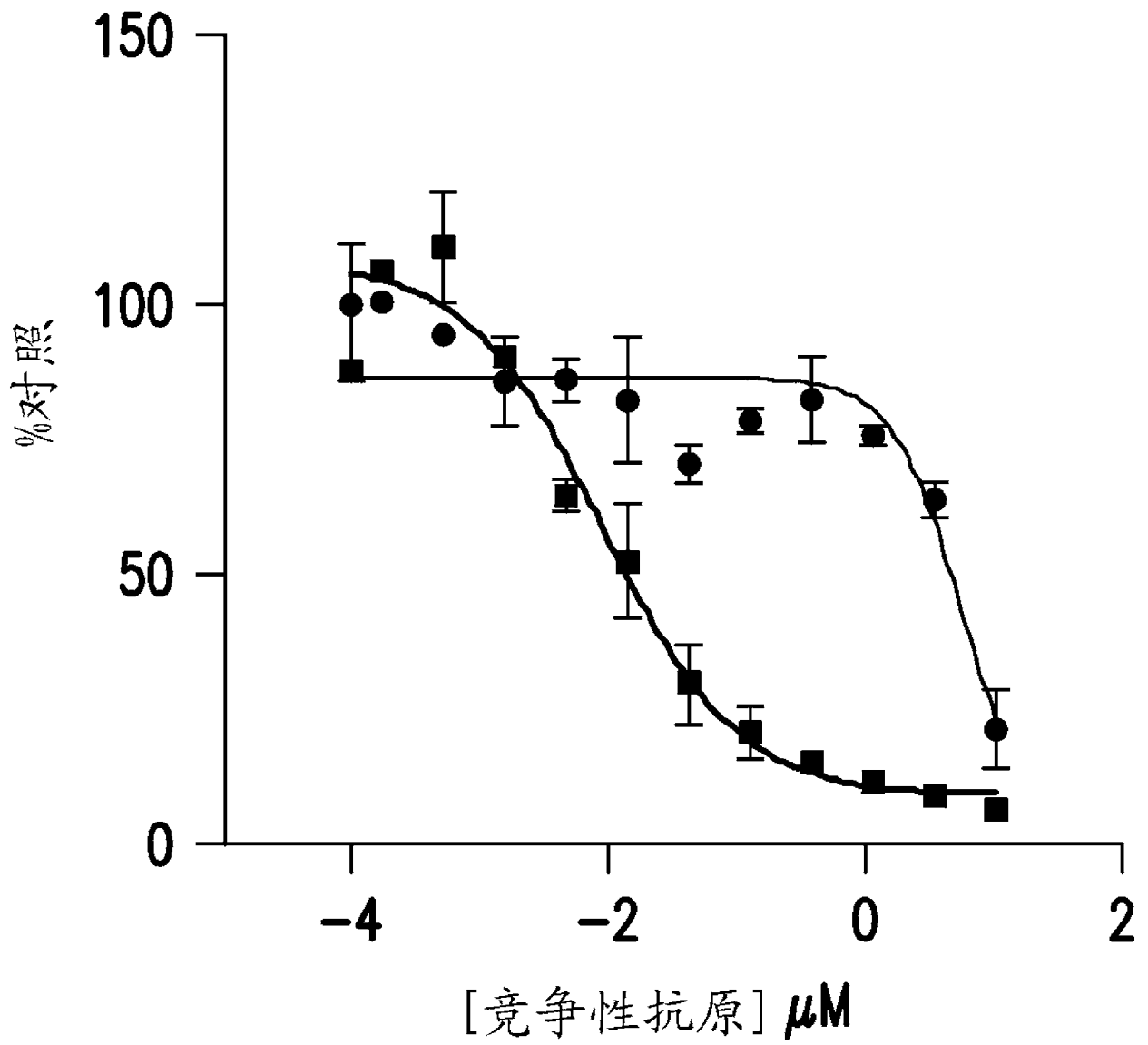


图 1C

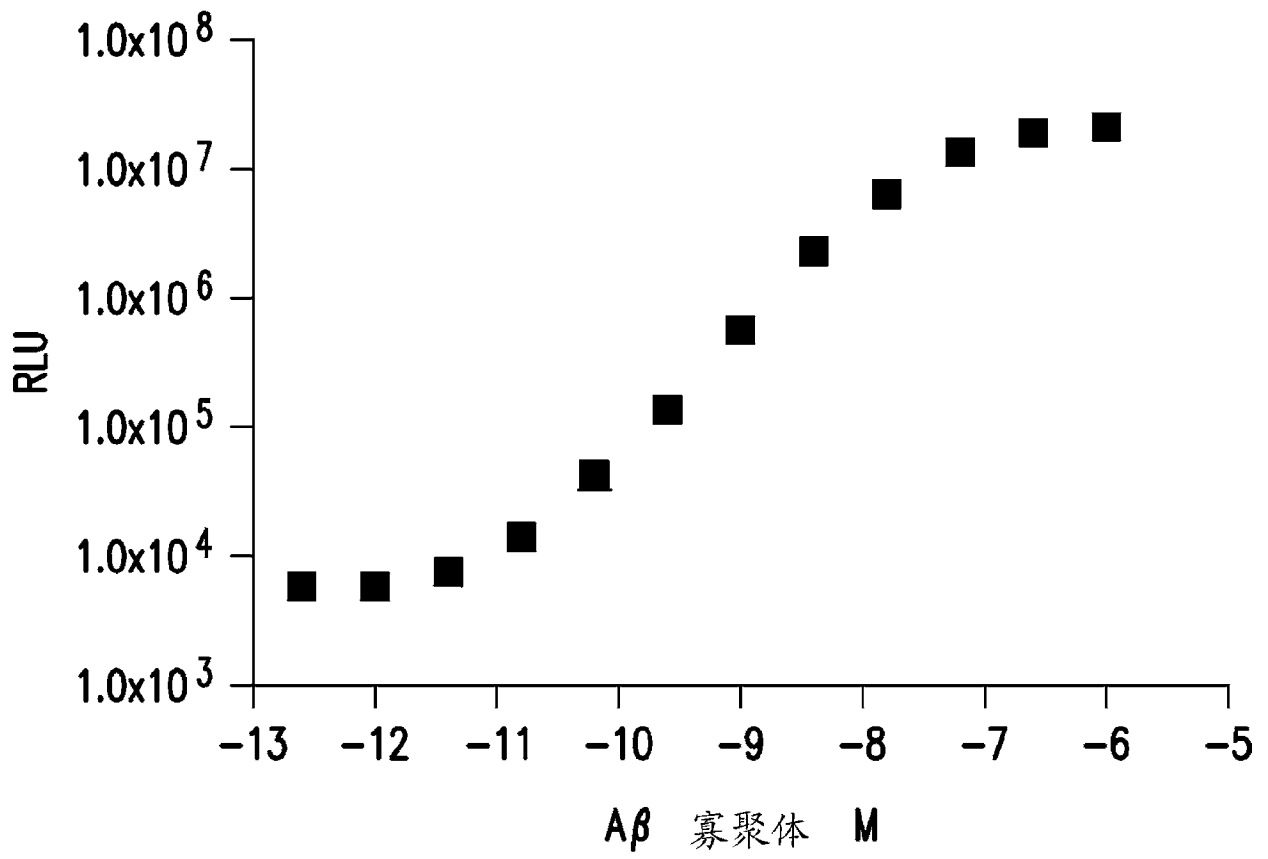


图 2A

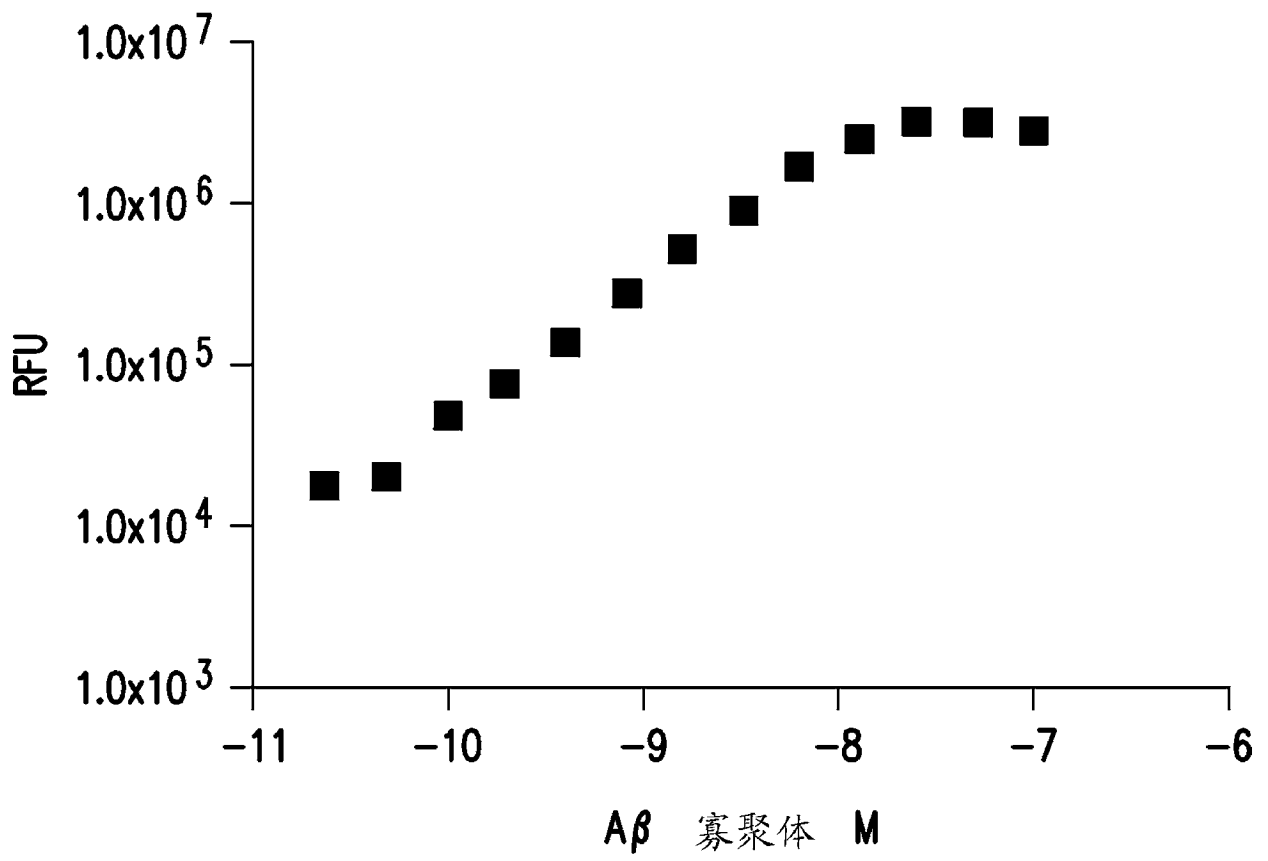


图 2B

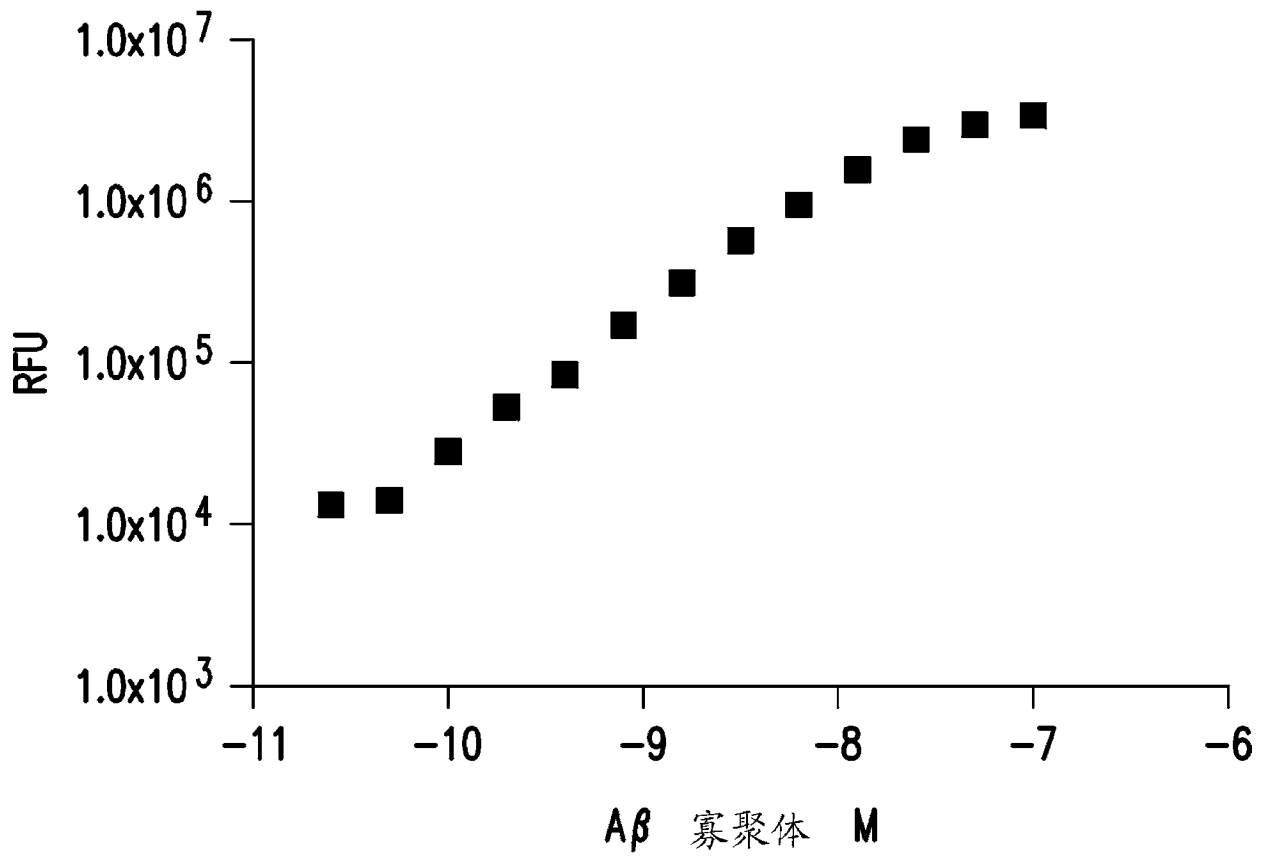


图 2C

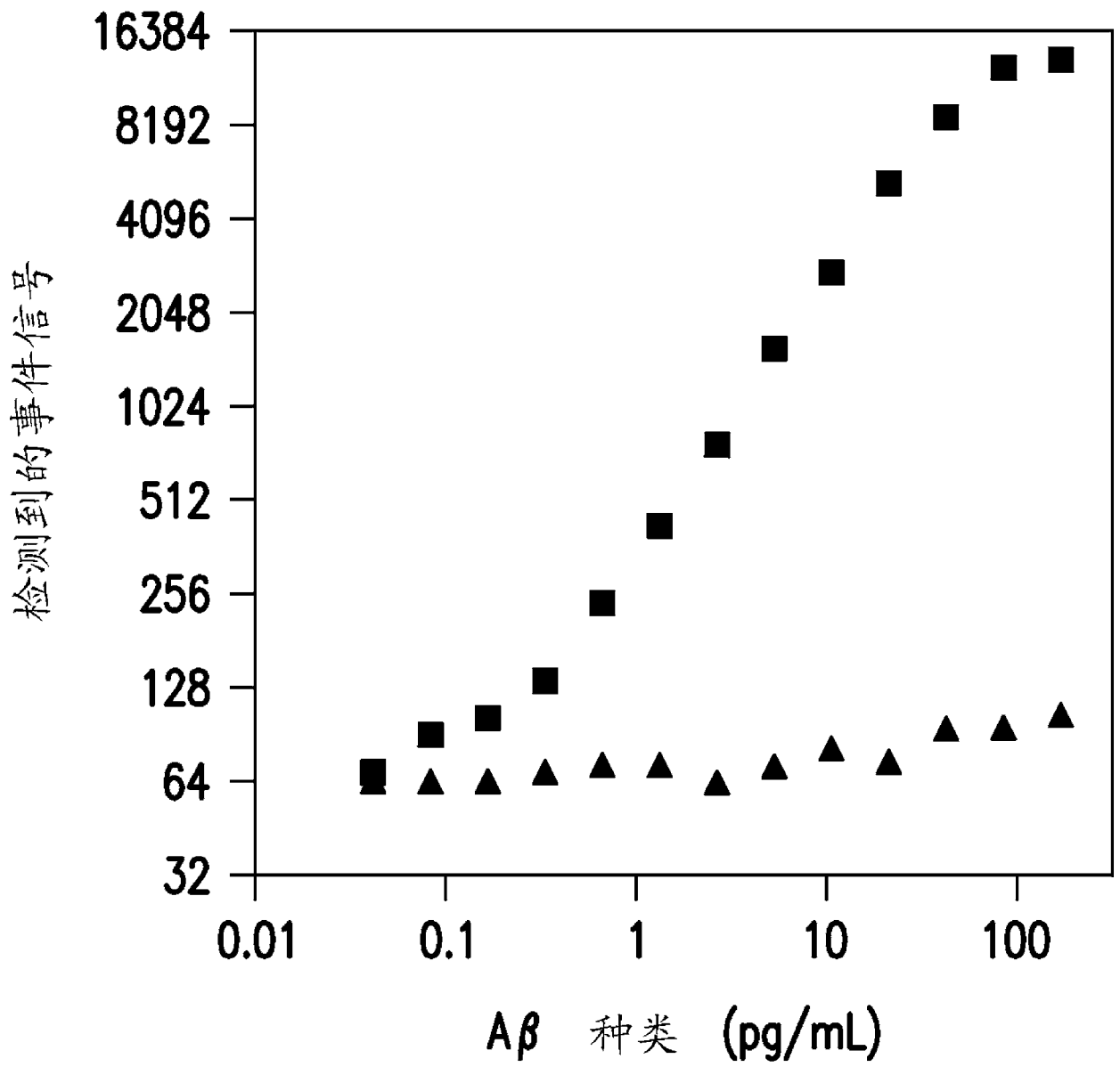


图 3

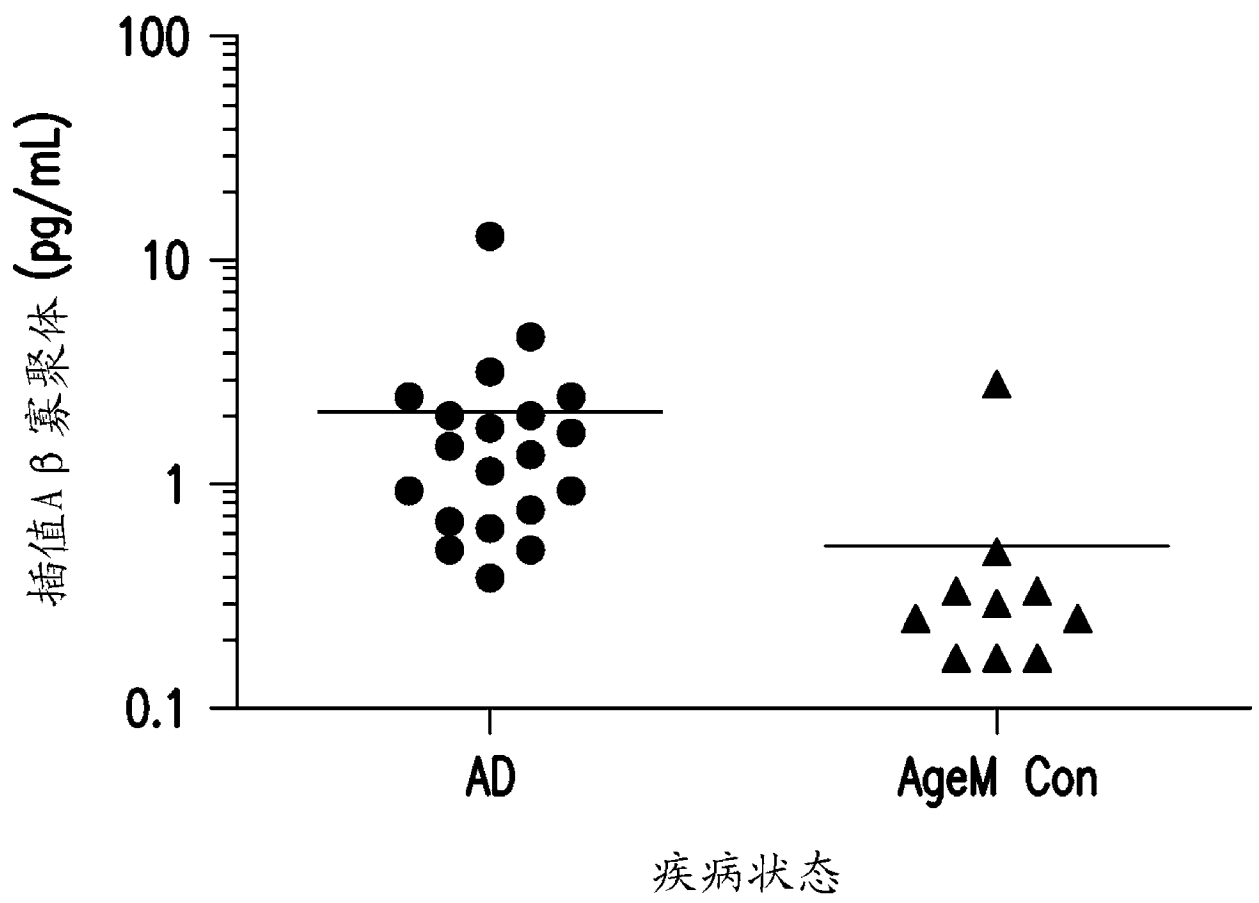


图 4A

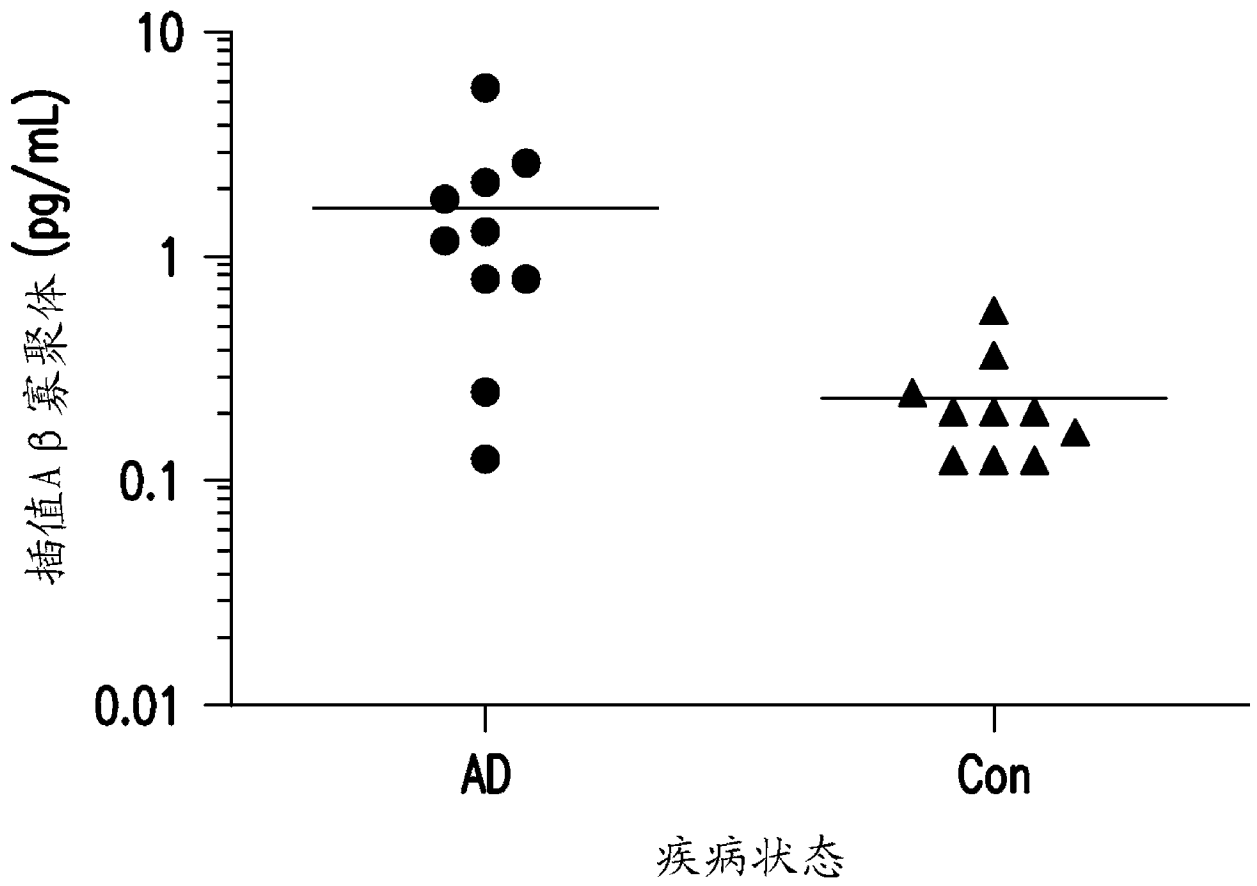


图 4B

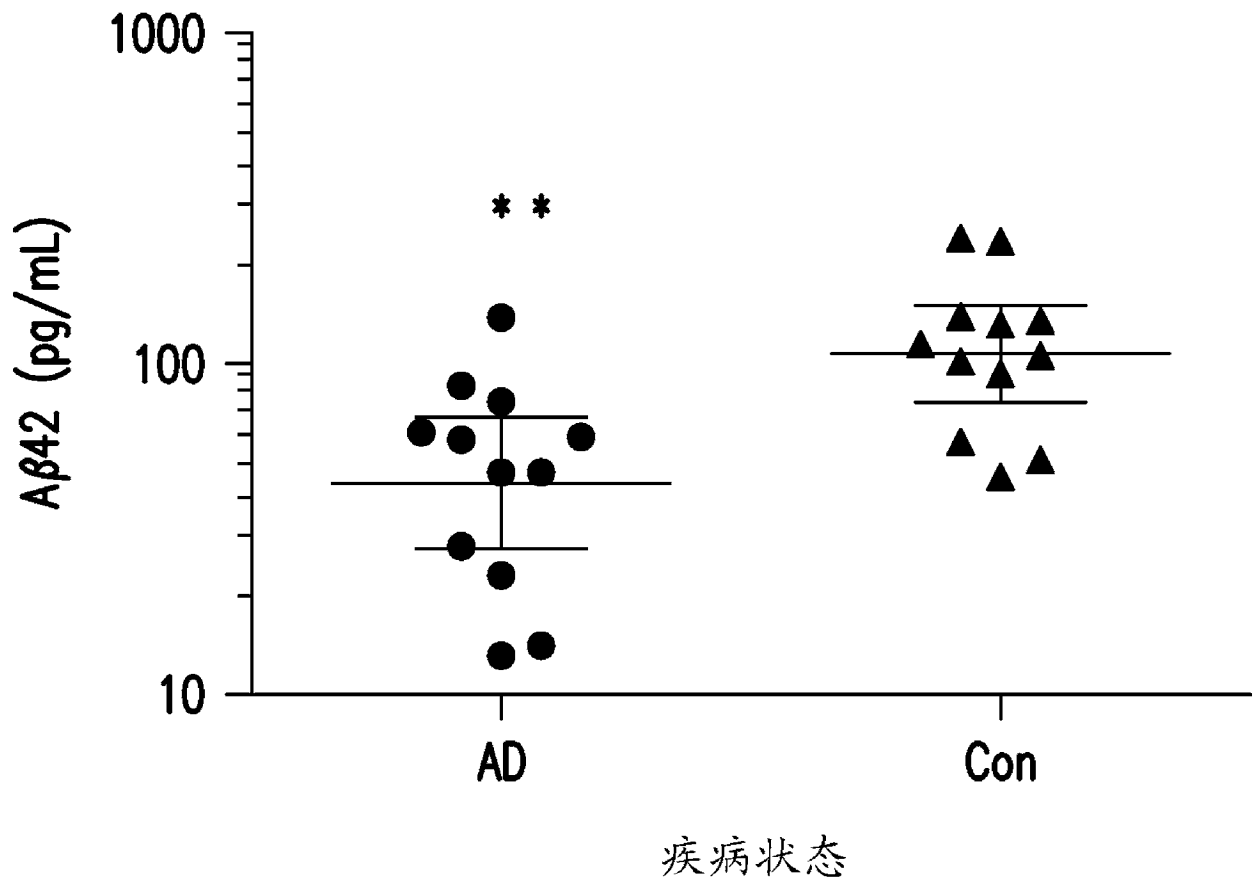


图 5A

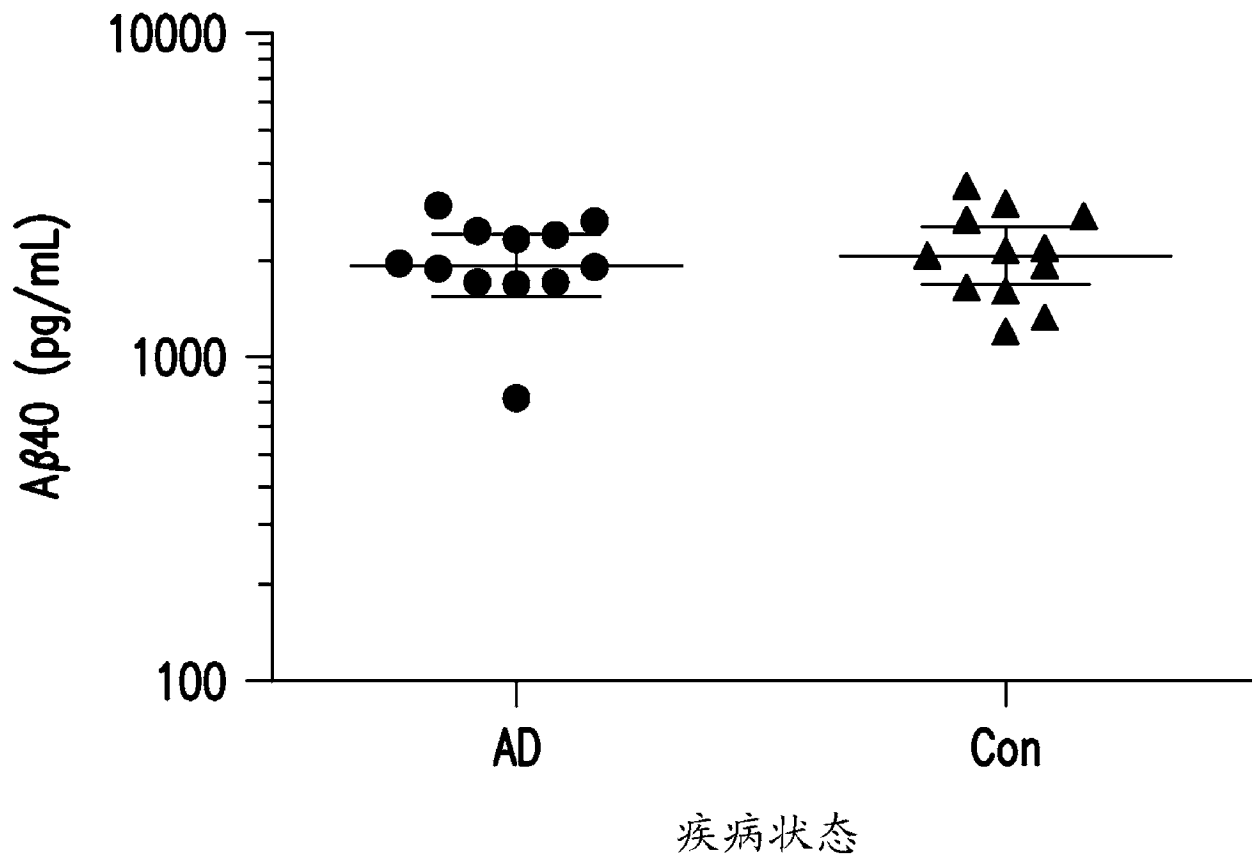


图 5B

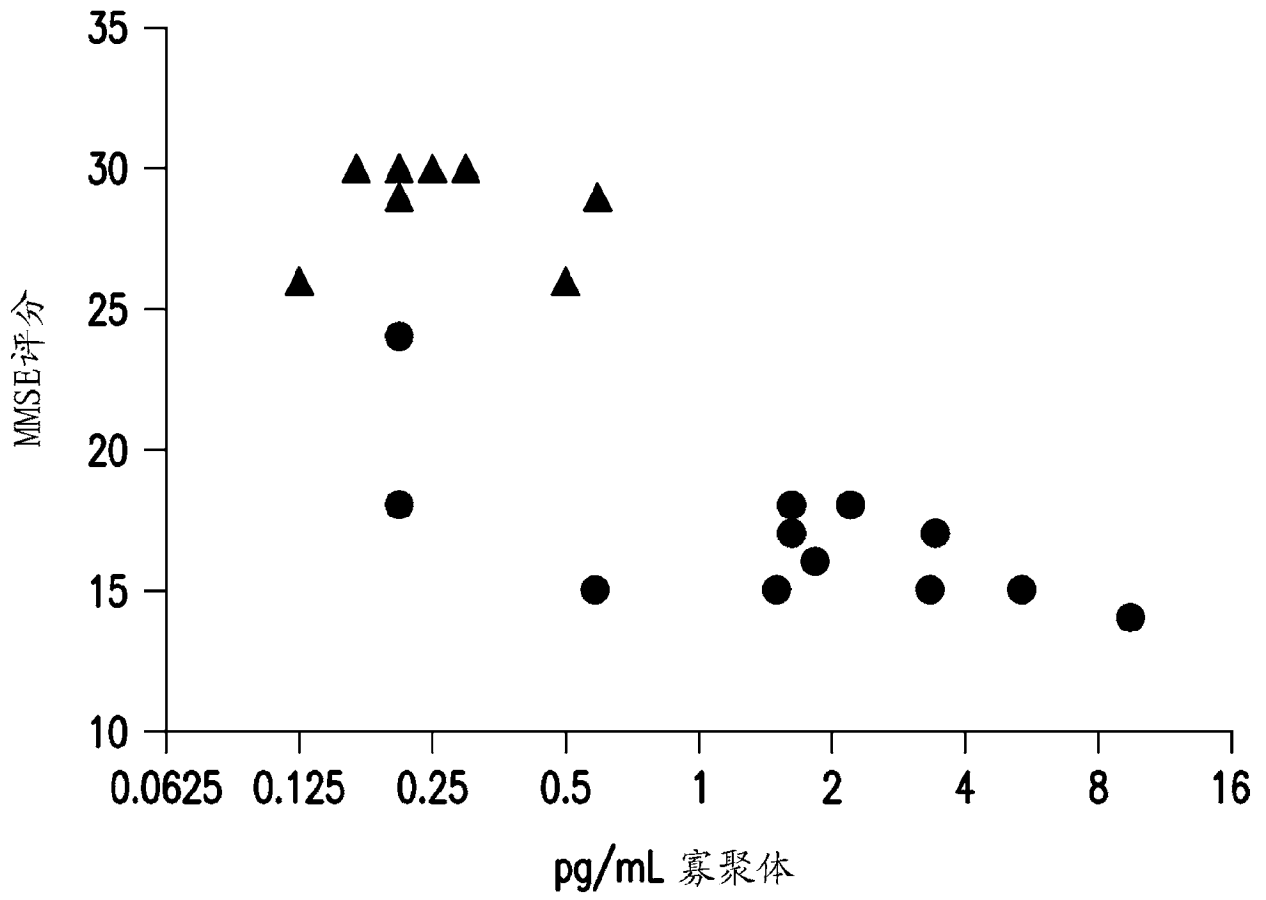


图 6

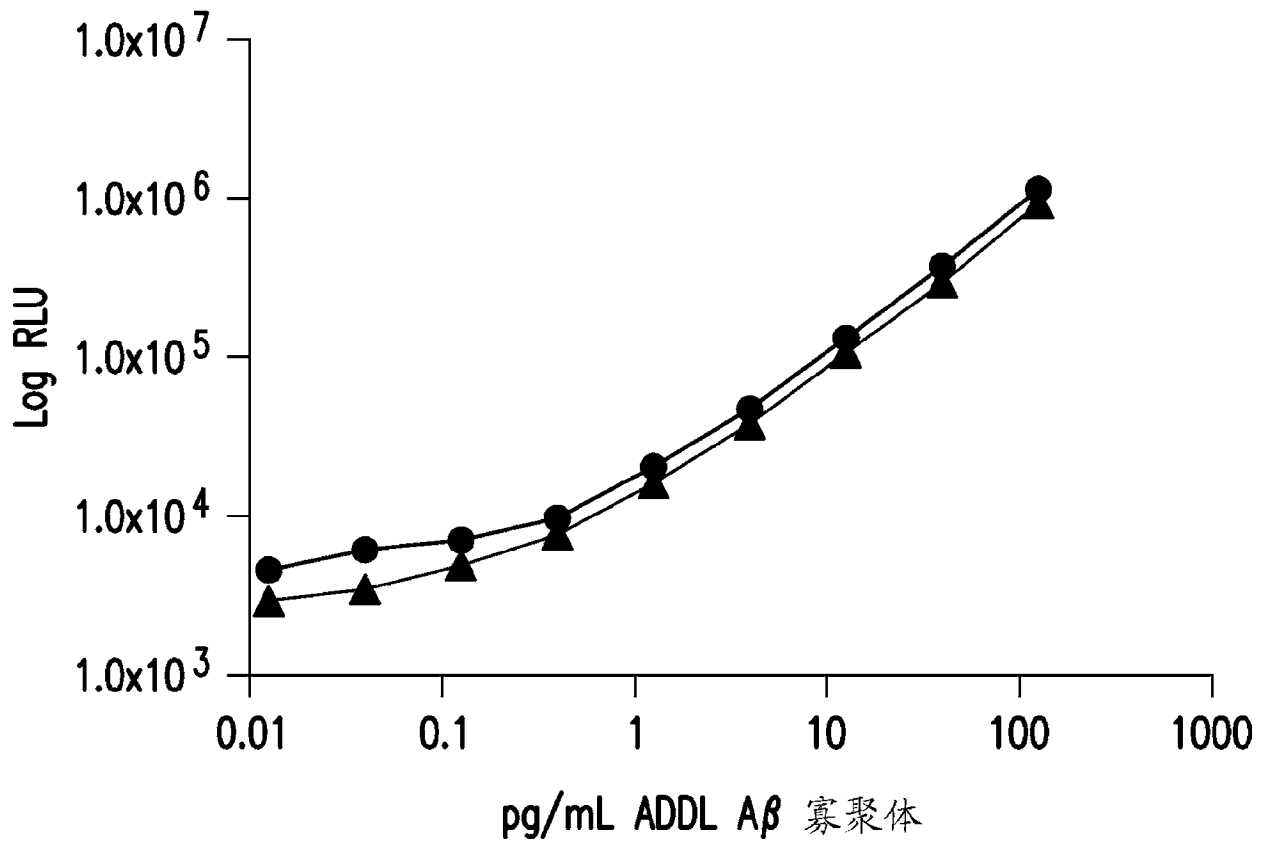


图 7A

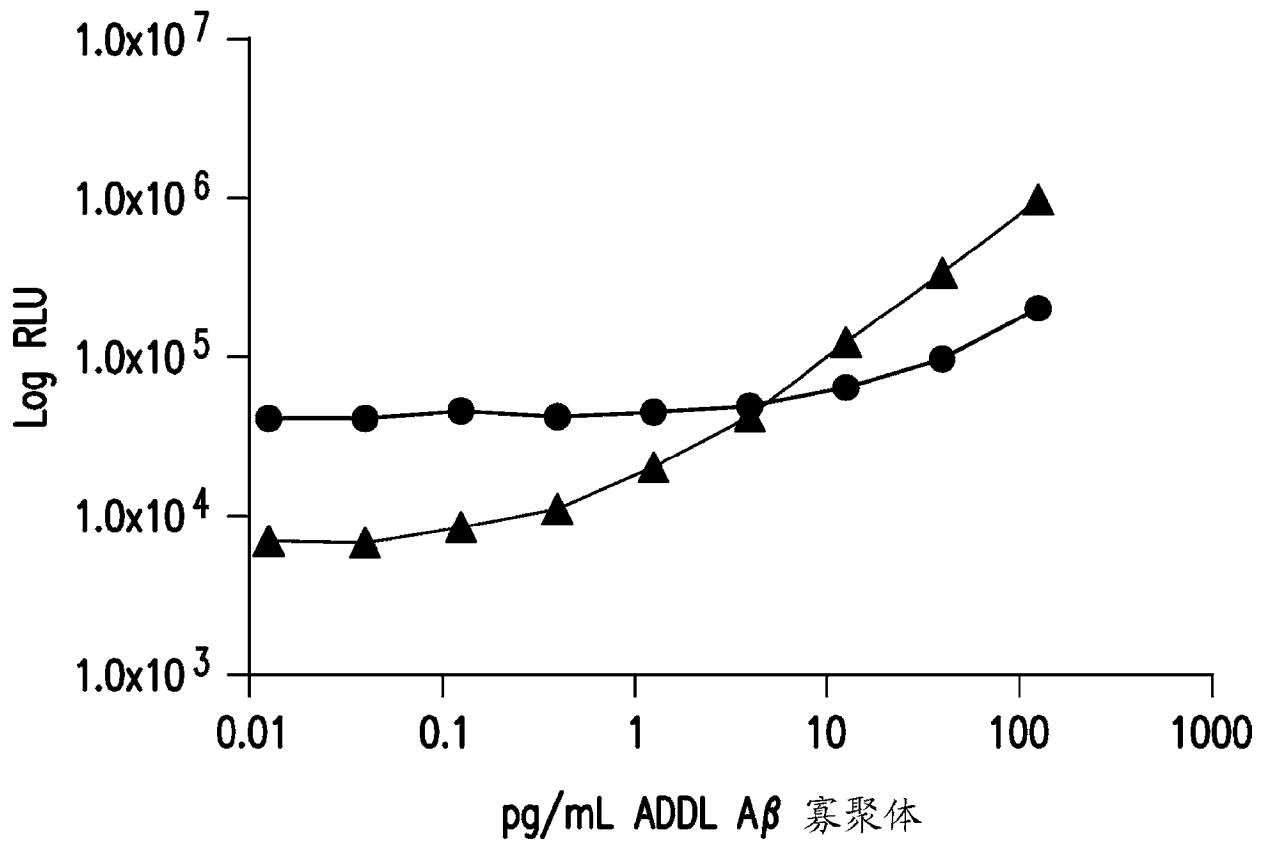


图 7B

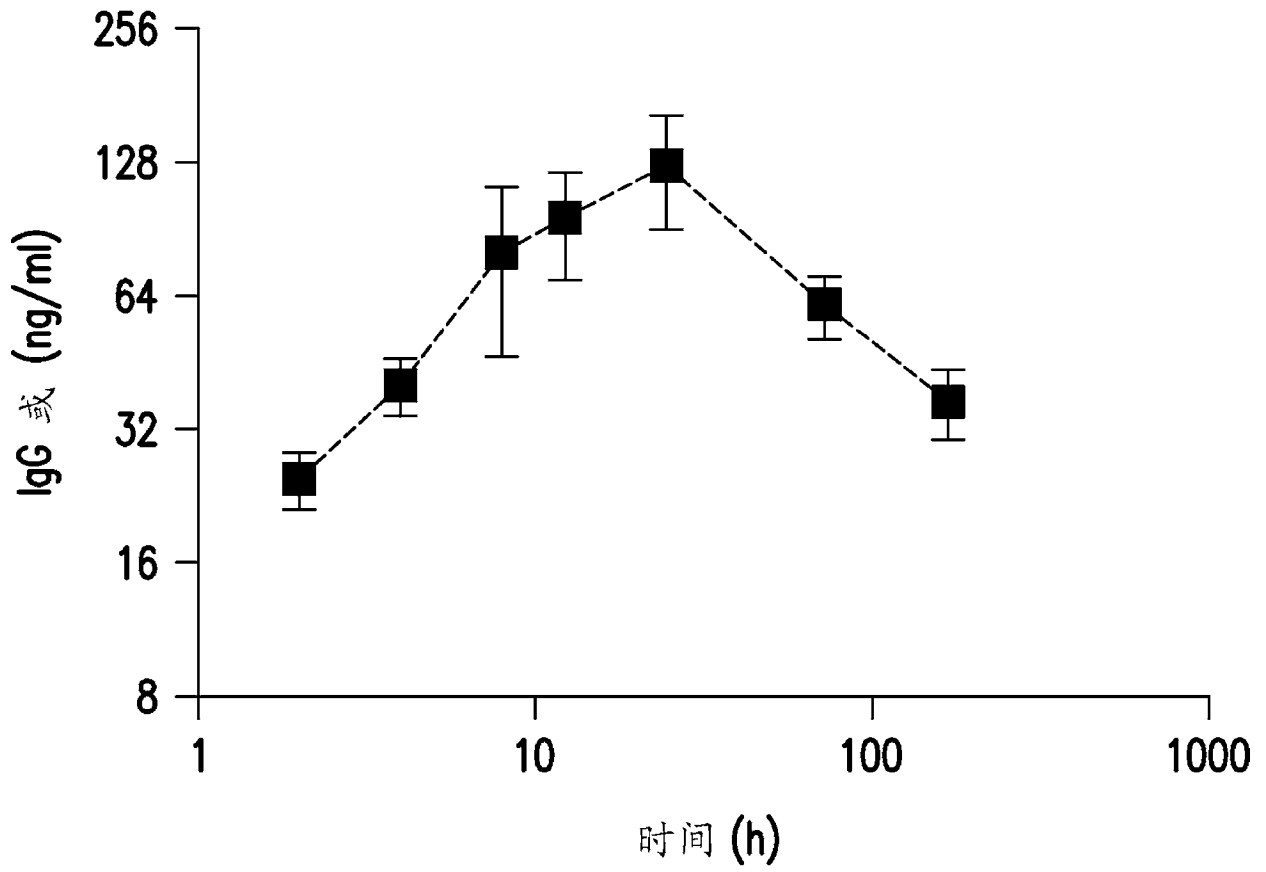
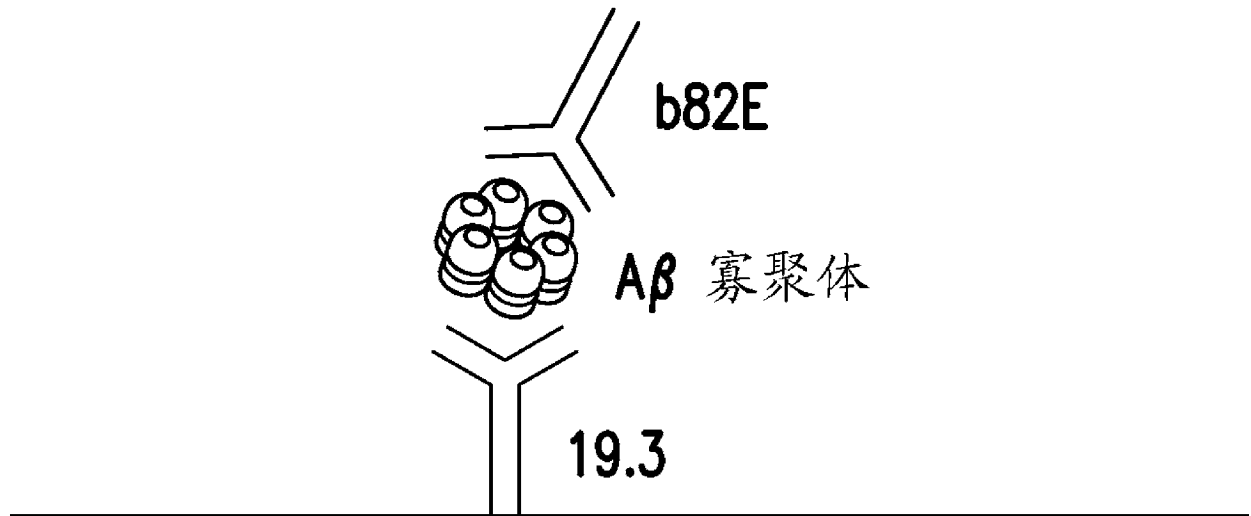


图 8

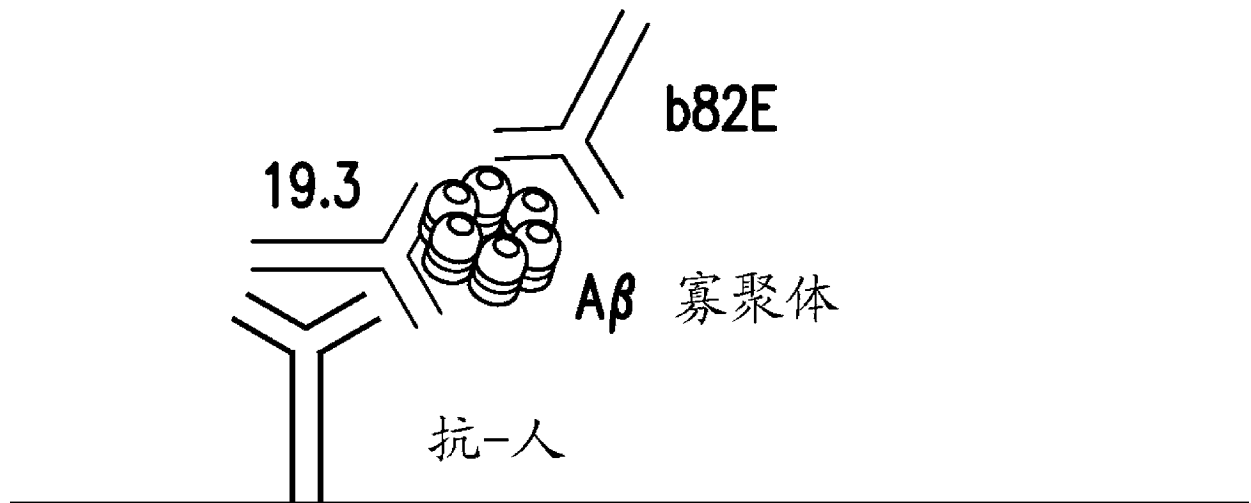
### A $\beta$ 寡聚体夹心ELISA



药效动力学测定

图 9A

### A $\beta$ 寡聚体/抗体夹心ELISA



目标接触测定

图 9B

专利名称(译)	用于检测流体样品中淀粉状蛋白 $\beta$ 寡聚体的方法及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN103782171A</a>	公开(公告)日	2014-05-07
申请号	CN201280044598.3	申请日	2012-07-09
申请(专利权)人(译)	默沙东公司		
当前申请(专利权)人(译)	默沙东公司		
[标]发明人	M 萨瓦奇 P 舒鲁埃 A 沃尔夫 A 麦坎贝尔		
发明人	M.萨瓦奇 P.舒鲁埃 A.沃尔夫 A.麦坎贝尔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/6896 C07K16/18 C07K2317/24 G01N2800/2821 G01N2800/52		
代理人(译)	万雪松		
优先权	61/507332 2011-07-13 US		
其他公开文献	CN103782171B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及能够可靠地并且灵敏地检测患者的生物样品中的 $A\beta$ 寡聚体的选择性 $A\beta$ 寡聚体免疫测定。在一个实施方案中，本发明的测定使用一对抗 $A\beta$ 寡聚体的抗体，19.3和82E1，来检测和定量在脑脊液 (CSF) 样品中的 $A\beta$ 寡聚体。本发明测定可以用于区分阿尔茨海默氏病(AD)患者与非-AD患者和/或根据其疾病的严重程度对AD患者分层。本发明测定还可以用作目标接触测定，其可以测量结合的 $A\beta$ 寡聚体，作为替代终点用于评估疗效和/或目标接触。

