



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103782171 B

(45)授权公告日 2016.12.14

(21)申请号 201280044598.3

(22)申请日 2012.07.09

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103782171 A

(43)申请公布日 2014.05.07

(30)优先权数据
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

(73)专利权人 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

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 21/76(2006.01)

(56)对比文件
US 2011166035 A1,2011.07.07,
US 2007202547 A1,2007.08.30,
CN 1871517 A,2006.11.29,
US 2011166035 A1,2011.07.07,
审查员 万励之

权利要求书2页 说明书19页
序列表5页 附图10页

(54)发明名称

用于检测流体样品中淀粉状蛋白 β 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 $\text{A}\beta$ 寡聚体的选择性 $\text{A}\beta$ 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 $\text{A}\beta$ 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 $\text{A}\beta$ 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 $\text{A}\beta$ 寡聚体,作为替代终点用于评估疗效和/或目标接触。

1. 抗- $\text{A}\beta$ 寡聚体抗体在制备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)的诊断试剂中的用途,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,

其中所述NDPOI是 $\text{A}\beta$ 寡聚体,所述捕获抗体是抗- $\text{A}\beta$ 寡聚体抗体19.3,其包括SEQ ID NO:1的轻链可变区,SEQ ID NO:2的重链可变区和SEQ ID NO:3的重链恒定区。

2. 权利要求1的用途,其中所述哺乳动物是人。

3. 抗- $\text{A}\beta$ 寡聚体抗体19.3在制备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诊断试剂中的用途,其中所述NDPOI是 $\text{A}\beta$ 寡聚体,并且其中具有范围为0.5 pg/mL至11 pg/mL的 $\text{A}\beta$ 寡聚体水平的患者确定为具有阿尔茨海默氏症,其中所述抗- $\text{A}\beta$ 寡聚体抗体19.3包括SEQ ID NO:1的轻链可变区,SEQ ID NO:2的重链可变区和SEQ ID NO:3的重链恒定区。

4. 抗- $\text{A}\beta$ 寡聚体抗体在制备用于确定疗法治疗阿尔茨海默氏病的疗效的诊断试剂中的用途,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,

其中所述NDPOI是 $\text{A}\beta$ 寡聚体,所述捕获抗体是抗- $\text{A}\beta$ 寡聚体抗体19.3包括SEQ ID NO:1的轻链可变区,SEQ ID NO:2的重链可变区和SEQ ID NO:3的重链恒定区。

5. 抗- $\text{A}\beta$ 寡聚体抗体在制备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诊断试剂中的用途,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,

其中所述NDPOI是A β 寡聚体,所述捕获抗体是抗-A β 寡聚体抗体19.3,其包括SEQ ID NO:1的轻链可变区,SEQ ID NO:2的重链可变区和SEQ ID NO:3的重链恒定区。

用于检测流体样品中淀粉状蛋白 β 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 β (A β)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 β (A β)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 β 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 β 寡聚体的种类,其可以在体外生成,具有与内源性A β 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 β 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 β 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 β 单体的测定是已知的,其利用 β -和 γ -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 β 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 β 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(Fukumoto 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 β 单体的抗体的测量。

[0004] 从CSF或脑检测A β 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 β 寡聚体浓度的1000倍范围,并且将该浓度表示为fM。A β 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 β 寡聚体相比A β 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 β 1-16二聚体相比A β 40单体具有320倍的选择性,但是缺少避免与CSF中的A β 单体交叉反应性所需的选择性。

由于假设在CSF中的A β 寡聚体以fM水平存在,并且CSF A β 单体在1.5-2nM之间存在,所以选择性测量CSF样品中A β 寡聚体的测定对于A β 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 β 寡聚体水平作为潜在的疾病生物标记物之外,A β 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 β 寡聚物测定的目的是在使用抗寡聚体抗体治疗或改变A β 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 β 寡聚体的药效动力学(PD)变化。此外,能特异性检测结合抗A β 寡聚体抗体的A β 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 β 寡聚体。

[0007] 发明概述

[0008] 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 β 寡聚体的选择性A β 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 β 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 β 寡聚体。在一个实施方案中,本发明是选择性的A β 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 β 寡聚体目标接触(TE)测定,其可以测量结合的A β 寡聚体,作为替代终点用于治疗效果的评估。

[0009] 附图简述

[0010] 图1A-1C是图解表示,显示抗ADDL抗体19.3结合A β 寡聚体的ADDL种类(每组的中间的条)相比A β 单体或A β 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 β 、ADDLs和纤维A β 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 β 寡聚体(▲)或A β 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 β 寡聚体(▲)和A β 单体(■)在溶液中存在竞争性种类的情况下的相对亲和力。

[0011] 图2A-2C是图解表示,其显示在使用化学发光(EnVision® Multiplate 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 β 寡聚体的相对亲和力。图2A显示,描绘经A β 寡聚体浓度范围的抗A β 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 β 寡聚体方面相比其它对(图2B和2C)显著更灵敏。

[0012] 图3是使用抗-A β 寡聚体抗体19.3和82E1对于A β 寡聚体(■)相比A β 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®, Almeda, 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 β 寡聚体的灵敏度。

[0013] 图4A和4B是在人脑脊液(CSF)样品中检测的A β 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 β 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 $p < 0.0004$,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 β 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 ≤ 0.0021 。

[0014] 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 β 单体水平的图解表示,在AD样品中具有A β 42单体的水平的相应的下降和不变的A β 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 β 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 $p < 0.002$,假设人群是非高斯分布的。图5B显示两组之间不变的A β 40单体水平。

[0015] 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 β 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 -0.7445pg/mL A β 寡聚体的相关性是显著的,为 $p \leq 0.0001$ 。

[0016] 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 β 寡聚体抗体19.3/A β 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 β 寡聚体抗体19.3/A β 寡聚体复合物的表示。在抗人 κ 链(捕获)x82E1(检测)目标接触ELISA(实施例9)中19.3/A β 寡聚体的检测中观察到差异灵敏度(Differential sensitivity)。抗 κ 捕获抗体很差地区分抗-A β 寡聚体抗体19.3与人CSF中的内源抗体种类。

[0017] 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-ADDL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。

[0018] 图9A和9B分别是A β 寡聚体夹心ELISA,即药效动力学(PD)测定,和A β 寡聚体/抗体夹心ELISA,即目标接触测定的图解表示。

[0019] 发明详述

[0020] 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 β 寡聚体的方法,用于作为A β 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 β 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 β 42 CSF比例的用途(De Meyer, 等, 2010, *Arch. Neurol.*, 67:949-56)。此外,相比于对于A β 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 β 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 β 寡聚体抗体可以穿透血-脑屏障并结合A β 寡聚体,并且,当在本文中本发明的方法中使用,可以提供用于AD疗法的评估的替代终点测定。

[0021] 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 β 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 β 寡聚体抗体。虽然A β 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AB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-AB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AB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AB寡聚体高度显著性升高。这些相同的样品,用于测量AB42和AB40单体的水平,证实了在AD样品中与对照相比,AB42单体被显著减少,而AB40单体水平保持不变。本发明的AB寡聚体夹心ELISA测定表明AB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AB寡聚体水平越低。本发明的AB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。

[0022] 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-AB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AB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AB寡聚体IgG2抗体/AB寡聚体复合物。结合到19.3/IgG2同种型抗体的AB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/AB寡聚体复合物,无论是在缓冲液中,在用AB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AB寡聚体的人CSF样品中。

[0023] 为了能够获得具有独特的灵敏度的测定,来检测治疗性抗AB寡聚体IgG2抗体结合AB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AB寡聚体抗体给药。治疗性抗AB寡聚体抗体将结合个体的CSF样品中存在的任何AB寡聚体种类。此MP/抗-IgG2/抗-AB寡聚体/AB寡聚体复合物与第二抗-AB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-AB寡聚体/AB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复合物从微珠分离以减少背景。82E1-fluor的单分子代表在给药的个体的CSF中存在的抗-AB寡聚体/AB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AB寡聚体目标(图9B)。随着治疗过程中AB寡聚体的清除,所述治疗性IgG2抗体将接触更少的AB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AB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。

[0024] 本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AB寡聚体。本发明测定的开发从鉴定产生对AB寡聚体相对AB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US 61/364,210的优先权)并且本文称为19.3的选择性的抗-AB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 β 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 β 寡聚体相比对A β 单体具有约600倍更高的选择性。19.3对于A β 寡聚体的灵敏度和选择性表明在用于A β 寡聚体检测的夹心ELISA中的可用性。

[0025] 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 β 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 β 构建体,其表明二聚体或更高阶A β 寡聚体的存在。19.3 x 19.3重叠表位ELISA具有对A β 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 β 寡聚体的4.2 pg/mL的可靠定量限(LoRQ),并且来自A β 寡聚体/A β 单体的信号比例为大约1,000:1,显示该测定对于A β 寡聚体相比A β 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 β 抗体6E10的类似测定的结果更有灵敏度(图2B),其导致对A β 寡聚体的98 pg/mL的检测限(Covance, Princeton, NJ)(Gandy, 等, 2010, *Ann. NeuroI.*, 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. NeuroI.*, 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 β 寡聚体标准品,但是先前报道的fM (fg/mL)范围内的CSF A β 寡聚体水平表明选择性的基于ELISA的A β 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 β 寡聚体。

[0026] 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[®] 系统(Singulex[®], Almeda, 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 β 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 β 寡聚体/A β 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 β 42水平并且未改变A β 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 β 寡聚体种类。

[0027] 如本文所用术语“A β 寡聚体”指A β 单体的多聚体种类,其由于单体种类的自缔合而得到。A β 寡聚体主要是A β 42的多聚体,尽管A β 40的A β 寡聚体也已有报道。在合成的A β 单体体外聚集之后,或从人脑或体液分离/提取A β 种类之后,A β 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 β 寡聚体的一个种类。

[0028] 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 β 寡聚体。此蛋白与其它A β 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 β 形成。

[0029] 如本文所用术语“ADDLs”或“淀粉状蛋白- β 衍生的可扩散的配体”或“淀粉状蛋白- β 衍生的痴呆性配体”指包括两种或更多A β 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 β 42获得,也可以从任何能够稳定形成可溶性非纤维A β 寡聚体结构的A β 蛋白,例如A β 43或A β 40获得。美国专利号6,218,506和WO 01/10900。

[0030] 如本文所用术语“A β 纤维”或“纤维”或“纤维状淀粉状蛋白”指A β 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 β 单体构成的纤维状结构的A β 种类包括 β -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。

[0031] 如本文所用术语“A β 40单体”或“A β 42单体”指在无细胞或细胞环境中 β -分泌酶和 γ -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。 β -分泌酶对APP的切割产生从Asp1开始的A β 种类(编号为切割后的A β 肽序列),而 γ -分泌酶释放的A β 的C末端主要是在残基40或42。

[0032] 如本文所用术语“捕获抗体”或“A β 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 β 寡聚体或A β 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 β 寡聚体抗体19.3,并且所检测的复合物是19.3/A β 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 β 寡聚体。

[0033] 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由四条肽链组成一两条重链 γ 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。

[0034] 如本文所用术语“ κ 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 κ 或 λ 型,分别在染色体2或22上编码。两条 κ 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。

[0035] 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 β 寡聚体,也可以使用任何其它种类的体液。

[0036] 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 β 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。

[0037] 如本文所用术语“LoD”的“检测限”指在除了不存在A β 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 β 寡聚体情况下的信号被定义为“背

景”。如本文所用,对于A β 寡聚体的LoD定义为在背景的平均值之上的 ≥ 3 标准偏差。

[0038] 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 ≥ 3 的测量值 $\leq 20\%$ 的变异系数的浓度。

[0039] 选择性的抗-A β 寡聚体捕获抗体的鉴定和表征

[0040] 为了开发对A β 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 β 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 β 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°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DuIBecco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 β 寡聚体抗体的孔(实施例?)。基于其相比A β 单体或A β 纤维优先结合ADDLs的能力,选择抗体3B3用于进一步开发(图1A)。

[0041] 小鼠克隆11/3B3转化为人IgG2抗体并命名为19.3。对编码A β 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 β 寡聚体进行噬菌体文库淘选。结合生物素化的A β 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 β 寡聚体相同的方法(实施例1)制备生物素化的A β 寡聚体,但是从N-末端生物素化的A β 42肽开始(American Peptide, Sunnyvale, CA)。在上述A β 单体、A β 寡聚体和A β 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。

[0042] 从3B3的轻链亲和力成熟文库产生的抗-A β 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:

[0043] 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;

[0045] 具有下列序列的重链可变区(SEQ ID NO:2)

[0046] 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

[0047] 具有下列序列的重链恒定区(SEQ ID NO:3)

[0048] 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

[0049] 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

[0050] Ser Leu Ser Pro Gly Lys。

[0051] 抗-AB寡聚体抗体19.3的AB寡聚体选择性

[0052] 为了证实19.3对AB寡聚体相比AB40单体的结合效价,使用单独的AB寡聚体或AB40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EC50,半最大总的AB寡聚体结合的量度,对于AB寡聚体和AB40,分别为1.6 nM和4.3 nM。在此形式中,19.3抗体对A

β 寡聚体相比A β 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 β 寡聚体相比A β 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 β 寡聚体抗体19.3相比于A β 40单体选择性地结合A β 寡聚体,但是申请人寻求进一步比较当A β 寡聚体和A β 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。

[0053] 为了更精确地表示体内CSF样品,其中A β 寡聚体和A β 单体两者将存在,在竞争性ELISA形式中对于19.3对A β 寡聚体在A β 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 β 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 β 寡聚体结合的EC50浓度(图1B)。在滴定曲线中加入A β 40单体,以竞争性地将19.3从A β 寡聚体包被的表面去除,导致5.5 μ M的EC50。当每孔100 pmol A β 40单体用于包被ELISA板并且A β 寡聚体用于竞争抗体结合时,EC50是8.7 nM。这表明19.3在溶液中和在固相中相比A β 40单体对于A β 寡聚体具有更高的亲和力。因此,A β 40从A β 寡聚体取代50%的19.3所需的浓度比A β 寡聚体置换结合A β 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 β 寡聚体浓度(Georganopoulou, 等, 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 2273-2276),相比之下,A β 单体为1500 pM。因此,抗体19.3似乎具有用于检测A β 单体的背景水平以上A β 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 β 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)。

[0054] 在A β 寡聚体夹心ELISA中优先结合A β 寡聚体的抗体

[0055] 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 β 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 β 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 β 单体抗体作为捕获和检测抗体已报道作为A β 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 β 寡聚体所需的选择性。

[0056] 虽然Gandy或Xia均没有报道人CSF中A β 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 β 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® Multi-label plate reader, PerkinElmer, Waltham, MA)(图2A),产生大约1.3pg/mL的LoD。在此测定形式中,A β 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 β 寡聚体的信号相比A β 40单体具有大约1000倍的选择性。虽然此测定是用来评价A β 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 β 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)。

[0057] 表 1

[0058]

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

[0059] ¹ 相比19.3 x 82E1降低的灵敏度

[0060] ² 在人CSF中不可接受的背景(纤维蛋白原交叉反应)

[0061] ³ 相比19.3 x 82E1降低的灵敏度。

[0062] 具有改善的灵敏度的A β 寡聚体-选择性的夹心ELISA

[0063] 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[®]免疫测定系统(Singulex[®], Alameda, CA)评价,以确定对人和非人灵长类动物流体样品中A β 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。

[0064] 虽然顺磁微粒免疫测定,如Erenna[®]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 β 40和A β 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 β 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[®]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。

[0065] 使用共价偶联19.3抗体到Erenna[®]微粒(MP)小珠(以下称“19.3/MP小珠”)的Erenna[®]免疫测定系统(Singulex[®], Alameda, CA)进行19.3 x 7305夹心ELISA。19.3/MP小珠与包含A β 寡聚体或单体A β 40标准曲线的缓冲液混合。所得的19.3/MP小珠/A β 寡聚体或A β 40复合物(下文称为“A β 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 β 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[®]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 β 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 β 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 β 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AB寡聚体稀释系列的范围(其足以检测仅在缓冲液中的AB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。

[0066] 表 2

[0067]

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				

[0068] 使用Erenna® 免疫测定系统开发的AB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AB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。AB寡聚体选择性的夹心ELISA法的实施方案产生0.04pg/mL的AB寡聚体标准品的LoD, 0.42pg/mL的LLoRQ和对于AB寡聚体相对Aβ40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。

[0069] 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
[0070] LoD (pM)	0.01	0.01
LLoRQ (pM)	0.16-0.49	0.12
Aβ40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

[0071] 药效动力学(PD) 测定

[0072] 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 β 寡聚体夹心ELISA, 以检测和测量CSF样品中A β 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 β 寡聚体产生、增加A β 寡聚体清除或以其他方式改变A β 寡聚体水平后分析物, 即A β 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 β 寡聚体浓度的治疗潜力。

[0073] 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 β 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 β 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 β 寡聚体复合物中并孵育, 以结合A β 寡聚体复合物。所获得的MP小珠/19.3/A β 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[®] 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 β 寡聚体的荧光信号。如使用Erenna[®] 设备测量的A β 寡聚体相比A β 单体的标准曲线, 显示于图3。

[0074] 人CSF中的A β 寡聚体

[0075] 实施例6的19.3 x 82E1 A β 寡聚体选择性的夹心ELISA用于测量人CSF样品中A β 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 β 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 β 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 β 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 β 40和A β 42单体水平(分别为图5A和5B), 并且对于A β 40在AD和对照CSF之间是相当的(图5A), 而对于A β 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 β 42水平是由于A β 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。

[0076] 对于诊断性测定, 根据本文的本发明测定检测的信号, 即A β 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 β 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 β 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 β 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 β 寡聚体测定,具有低于25的MMSE的患者将具有 ≥ 0.5 pg/mL的检测的A β 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 β 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 ≤ 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 β 寡聚体水平,该患者将可能具有低于25的MMSE评分。

[0077] 目标接触(TE) 测定

[0078] 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 β 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 β 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 β 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 β 寡聚体的水平,以证实通过疗法的A β 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 β 寡聚体抗体的A β 寡聚体的水平在来自自己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 β 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 β 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 β 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 β 寡聚体的能力。

[0079] 为了证明A β 寡聚体-特异性抗体接触人CSF基质中A β 寡聚体的能力,申请人通过掺入抗-A β 寡聚体抗体19.3在人CSF内生成19.3/A β 寡聚体复合物,所述抗-A β 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 β 寡聚体标准品,使其既匹配内源性A β 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 β 寡聚体复合物被捕获在包被有针对人 κ 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 β 寡聚体抗体19.3被缓冲液中的抗-人 κ 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 β 寡聚体复合物,导致相比使用抗-人 κ 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 κ 捕获19.3/A β 寡聚体复合物导致较低的灵敏度,对结合100 ng/mL 19.3的A β 寡聚体达到42 pg/mL的LoD,可能由于在人CSF中具有 κ 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 β 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, NewYork, NY)。存在于CSF中的治疗性抗体将结合存在的A β 寡聚体,19.3 (IgG2)/A β 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 β 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[®] 免疫测定系统(Singulex[®], Alameda, CA)将可能改善此

平台的灵敏度。

[0080] 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

[0081] 本文使用下列缩略语:Ab:抗体; $A\beta$:淀粉状 β 蛋白;AD:阿尔茨海默氏病;ADDLs:淀粉状蛋白 β 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。

[0082] 实施例 1

[0083] ADDL制备物和 $A\beta$

[0084] $A\beta$ 40和 $A\beta$ 42(淀粉状蛋白 β 肽1-40, 淀粉状蛋白 β 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 μ L DMSO,温和搅拌向其中添加1,956 μ 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°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°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 μ M(基于 $A\beta$ 单体的分子量(MW4513)来计算)。所有样品储存在-80°C直至使用。

[0085] 实施例 2

[0086] 抗-ADDL抗体的选择

[0087] A. 淘选人源化抗体文库

[0088] 构建人源化抗-ADDL抗体h3B3的亲合力成熟文库(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。

[0089] 人源化3B3(h3B3)使用本领域中已知的方法进行亲合力成熟。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 κ 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。

[0090] 表 4

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

[0092] 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(50µg/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, 10¹¹ 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 µg/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(70µg/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0.22µm的过滤器除菌,并且制成等分试样用于噬菌体文库淘选。

[0093] 然后如表5中所总结的进行噬菌体文库淘选。

[0094] 表 5

[0095]

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

[0096] 来自Fab展示噬菌体文库(100µL,约10¹¹至10¹²pfu)的输入噬菌体用900µL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200µL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200µL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 µL 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 µL 1M Tris-HCl,pH7.5中和并添加到10 mL具有0.6-0.8的OD 600 nm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(50µg/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500µL的2×YT培养基(Teknova, Hollister, CA)悬浮,铺板于含有100µg/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。

[0097] 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 μ g/ml 氨苄青霉素和1%葡萄糖的120 μ L 2xYT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dH₂O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 μ L)直接用于上述的A β 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。

[0098] 实施例 3

[0099] 对于A β 寡聚体和A β 40确定19.3 EC₅₀

[0100] 高蛋白结合板以100 pmol/孔 A β 40或50 pmol/孔 A β 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 μ g/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 μ g/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。

[0101] 实施例 4

[0102] 用A β 寡聚体和A β 单体的竞争性结合测定

[0103] 用A β 寡聚体和A β 单体的竞争性结合测定证明了使用19.3抗体对A β 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A β 寡聚体板。使用100pmol/孔,以相同的方式制备A β 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A β 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A β 寡聚体或A β 40在室温振荡反应30分钟。对包含抗体的孔应用对于A β 寡聚体或A β 40从10 μ M开始的12点,3倍浓度曲线。对于包被A β 寡聚体的板,将A β 40添加到孔中;对于A β 40板,将A β 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。

[0104] 实施例 5

[0105] 在Envision平台上的夹心ELISA

[0106] A. A β 寡聚体测定:夹心ELISA应用于完整的A β 寡聚体制备物或人CSF。19.3 A β 寡聚体-偏好抗体以每孔0.5 μ g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 μ L/孔酪蛋白缓冲液/PBS(ThermoFisher #37528, Waltham, MA)封闭过夜。A β 寡聚体标准品或SEC级分稀释在酪蛋白缓冲液中并以100 μ L/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 μ I/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。

[0107] B. Aβ单体测定:Aβ40 (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Aβ单体的方法先前已有报道(Sankaranarayanan等, J. Pharmacol. Exp. Ther., 328:131-140)。

[0108] 实施例 6

[0109] 人CSF样品

[0110] 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Aβ40和Aβ42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。

[0111] 实施例 7

[0112] 19.3在非人灵长类动物中的药代动力学分析

[0113] 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-Aβ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Aβ寡聚体抗体19.3的水平。

[0114] 实施例 8

[0115] Aβ寡聚体夹心ELISA基于顺磁微粒的免疫测定

[0116] 使用基于顺磁微粒的免疫测定平台(Erenna® 免疫测定系统, Singulex®, Alameda, CA)进行Aβ寡聚体夹心ELISA以确定人样品或Aβ寡聚体标准品中的寡聚体水平。通过每mg MPs结合12.5 μg捕获剂, Aβ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 μg/mL,并以100 μL添加到100 μL 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℃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 μm 滤器(PaII 4187, Fort Washington, NY)过滤。抗体添加到20 μL/孔的个别样品颗粒。ELISA板在25℃孵育1小时,同时在Jitterbug (BoekeI, 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/Aβ寡聚体/82E1复合物转移到新板,吸除缓冲液并添加10 μL/孔洗脱缓冲液,随后在25℃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 μL /孔中和缓冲液的384孔板,在顺磁微粒检测器(Erenna[®], SinguLex[®], Alameda, CA)上以每孔60秒的读数时间进行读数。

[0117] A. 捕获抗体标记

[0118] 1. A β 寡聚体抗体(19.3)对Dynabeads (MP 小珠)的结合:使用磁力从50 μI Dynabeads去除上清液。在包含5 μg 19.3的200 μI 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 μI 结合和清洗缓冲液清洗复合物。

[0119] 2. 将A β 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 μI 的此溶液(5 μg 19.3/50 μI MP小珠复合物)。在200 μL 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 μI 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 μI 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 μI 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用于如上述测定方案中使用。

[0120] B. 检测抗体标记

[0121] 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 μL)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 μL 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 μL 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。

[0122] 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 β 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的终浓度。向96孔板的每个孔中添加100 μL 样品/标准品和100 μL 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 μL 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[®], Alameda, CA),其每孔读数时间为60秒。

[0123] 实施例 9

[0124] A β 寡聚体复合物夹心ELISA目标接触(TE) 测定

[0125] 可以进行A β 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 β 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 β 寡聚体复合物的效果。抗-人IgG2或抗-人 κ (两者均来自Southern Biotech, Birmingham, AL)以0.5 μ 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 μ L/孔酪蛋白缓冲液/PBS封闭过夜。19.3抗体以0.100 μ 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 β 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 β 寡聚体复合物能够形成。对抗-人 IgG2或抗-人 κ -包被的板(n=3)应用100 μ 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 μ 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Neutravidin-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[®] 读板器(PerkinElmer, Waltham, MA)上对发光进行定量。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> Savage, Mary J.
- [0003] Shughrue, Paul J.
- [0004] McCampbell, Alexander
- [0005] Wolfe, Abigail L.
- [0006] <120> 用于检测流体样品中淀粉状蛋白 β 寡聚体的方法及其用途
- [0007] <130> 23090-US-PSP
- [0008] <160> 9
- [0009] <170> 用于Windows 4.0版本的FastSEQ
- [0010] <210> 1
- [0011] <211> 115
- [0012] <212> PRT
- [0013] <213> 人工序列
- [0014] <220>
- [0015] <223> 合成的
- [0016] <400> 1
- [0017] Ala Ser Arg Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
- [0018] 1 5 10 15
- [0019] Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
- [0020] 20 25 30
- [0021] Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
- [0022] 35 40 45
- [0023] Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Arg Phe Ser
- [0024] 50 55 60
- [0025] Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
- [0026] 65 70 75 80
- [0027] Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
- [0028] 85 90 95
- [0029] Phe Gln Gly Ser Arg Leu Gly Pro Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
- [0030] 100 105 110
- [0031] Glu Ile Lys
- [0032] 115
- [0033] <210> 2
- [0034] <211> 117
- [0035] <212> PRT
- [0036] <213> 人工序列
- [0037] <220>
- [0038] <223> 合成的

[0039] <400> 2
 [0040] GIu VaI GIn Leu VaI GIu Ser Gly Gly Gly Leu VaI GIn Pro Gly Gly
 [0041] 1 5 10 15
 [0042] Ser Leu Arg Leu Ser Cys AIa AIa Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 [0043] 20 25 30
 [0044] GIy Met His Trp VaI Arg GIn AIa Pro Gly Lys Gly Leu GIu Trp VaI
 [0045] 35 40 45
 [0046] AIa Tyr Ile Ser Arg Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr AIa Asp Thr VaI
 [0047] 50 55 60
 [0048] Lys GIy Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn AIa Lys Asn Ser Leu Tyr
 [0049] 65 70 75 80
 [0050] Leu GIn Met Asn Ser Leu Arg AIa GIu Asp Thr AIa VaI Tyr Tyr Cys
 [0051] 85 90 95
 [0052] AIa Arg GIy Ile Thr Thr AIa Leu Asp Tyr Trp Gly GIn GIy Thr Leu
 [0053] 100 105 110
 [0054] VaI Thr VaI Ser Ser
 [0055] 115
 [0056] <210> 3
 [0057] <211> 326
 [0058] <212> PRT
 [0059] <213> 人工序列
 [0060] <220>
 [0061] <223> 合成的
 [0062] <400> 3
 [0063] AIa Ser Thr Lys GIy Pro Ser VaI Phe Pro Leu AIa Pro Cys Ser Arg
 [0064] 1 5 10 15
 [0065] Ser Thr Ser GIu Ser Thr AIa AIa Leu GIy Cys Leu VaI Lys Asp Tyr
 [0066] 20 25 30
 [0067] Phe Pro GIu Pro VaI Thr VaI Ser Trp Asn Ser Gly AIa Leu Thr Ser
 [0068] 35 40 45
 [0069] GIy VaI His Thr Phe Pro AIa VaI Leu GIn Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 [0070] 50 55 60
 [0071] Leu Ser Ser VaI VaI Thr VaI Pro Ser Ser Asn Phe GIy Thr GIn Thr
 [0072] 65 70 75 80
 [0073] Tyr Thr Cys Asn VaI Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys VaI Asp Lys
 [0074] 85 90 95
 [0075] Thr VaI GIu Arg Lys Cys Cys VaI GIu Cys Pro Pro Cys Pro AIa Pro
 [0076] 100 105 110
 [0077] Pro VaI AIa GIy Pro Ser VaI Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

[0078]	115	120	125
[0079]	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
[0080]	130	135	140
[0081]	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
[0082]	145	150	155
[0083]	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn		
[0084]	165	170	175
[0085]	Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp		
[0086]	180	185	190
[0087]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
[0088]	195	200	205
[0089]	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
[0090]	210	215	220
[0091]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn		
[0092]	225	230	235
[0093]	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
[0094]	245	250	255
[0095]	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
[0096]	260	265	270
[0097]	Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
[0098]	275	280	285
[0099]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
[0100]	290	295	300
[0101]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
[0102]	305	310	315
[0103]	Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0104]	325		
[0105]	<210> 4		
[0106]	<211> 25		
[0107]	<212> DNA		
[0108]	<213> 人工序列		
[0109]	<220>		
[0110]	<223> 合成的		
[0111]	<400> 4		
[0112]	tatggcttct agagatgtgg tgatg		25
[0113]	<210> 5		
[0114]	<211> 82		
[0115]	<212> DNA		
[0116]	<213> 人工序列		

[0117]	<220>	
[0118]	<223>	合成的
[0119]	<221>	尚未归类的特征
[0120]	<222>	(0)...(0)
[0121]	<223>	M = A或C
[0122]	<221>	尚未归类的特征
[0123]	<222>	(0)...(0)
[0124]	<223>	N = A, C, G或T
[0125]	<400>	5
[0126]	tgcagccacc gtacgcttga tctccagctt ggtgccctgg ccaaaggtgg ggggcacmnn	60
[0127]	mnmnmnmnm nngcagtagt ag	82
[0128]	<210>	6
[0129]	<211>	70
[0130]	<212>	DNA
[0131]	<213>	人工序列
[0132]	<220>	
[0133]	<223>	合成的
[0134]	<221>	尚未归类的特征
[0135]	<222>	(0)...(0)
[0136]	<223>	M = A或C
[0137]	<221>	尚未归类的特征
[0138]	<222>	(0)...(0)
[0139]	<223>	N = A, C, G或T
[0140]	<400>	6
[0141]	tgcagccacc gtacgcttga tctccagctt ggtgccctgg ccaaamnmn nmnmnmnmn	60
[0142]	gctgccctgg	70
[0143]	<210>	7
[0144]	<211>	24
[0145]	<212>	DNA
[0146]	<213>	人工序列
[0147]	<220>	
[0148]	<223>	合成的
[0149]	<400>	7
[0150]	aggcggccct cgaggaggtg cagc	24
[0151]	<210>	8
[0152]	<211>	83
[0153]	<212>	DNA
[0154]	<213>	人工序列
[0155]	<220>	

[0156]	<223> 合成的	
[0157]	<221> 尚未归类的特征	
[0158]	<222> (0)...(0)	
[0159]	<223> M = A或C	
[0160]	<221> 尚未归类的特征	
[0161]	<222> (0)...(0)	
[0162]	<223> N = A, C, G或T	
[0163]	<400> 8	
[0164]	agaccgatgg gcccttggtg gaggcgctgg acacggteac cagggtgccc tggccccamn	60
[0165]	nmnmnmnmnm mnnnggtgatg ccc	83
[0166]	<210> 9	
[0167]	<211> 92	
[0168]	<212> DNA	
[0169]	<213> 人工序列	
[0170]	<220>	
[0171]	<223> 合成的	
[0172]	<221> 尚未归类的特征	
[0173]	<222> (0)...(0)	
[0174]	<223> M = A或C	
[0175]	<221> 尚未归类的特征	
[0176]	<222> (0)...(0)	
[0177]	<223> N = A, C, G或T	
[0178]	<400> 9	
[0179]	agaccgatgg gcccttggtg gaggcgctgg acacggteac cagggtgccc tggccccagt	60
[0180]	agtccagmnn mnmnmnmnm ncccgggcac ag	92

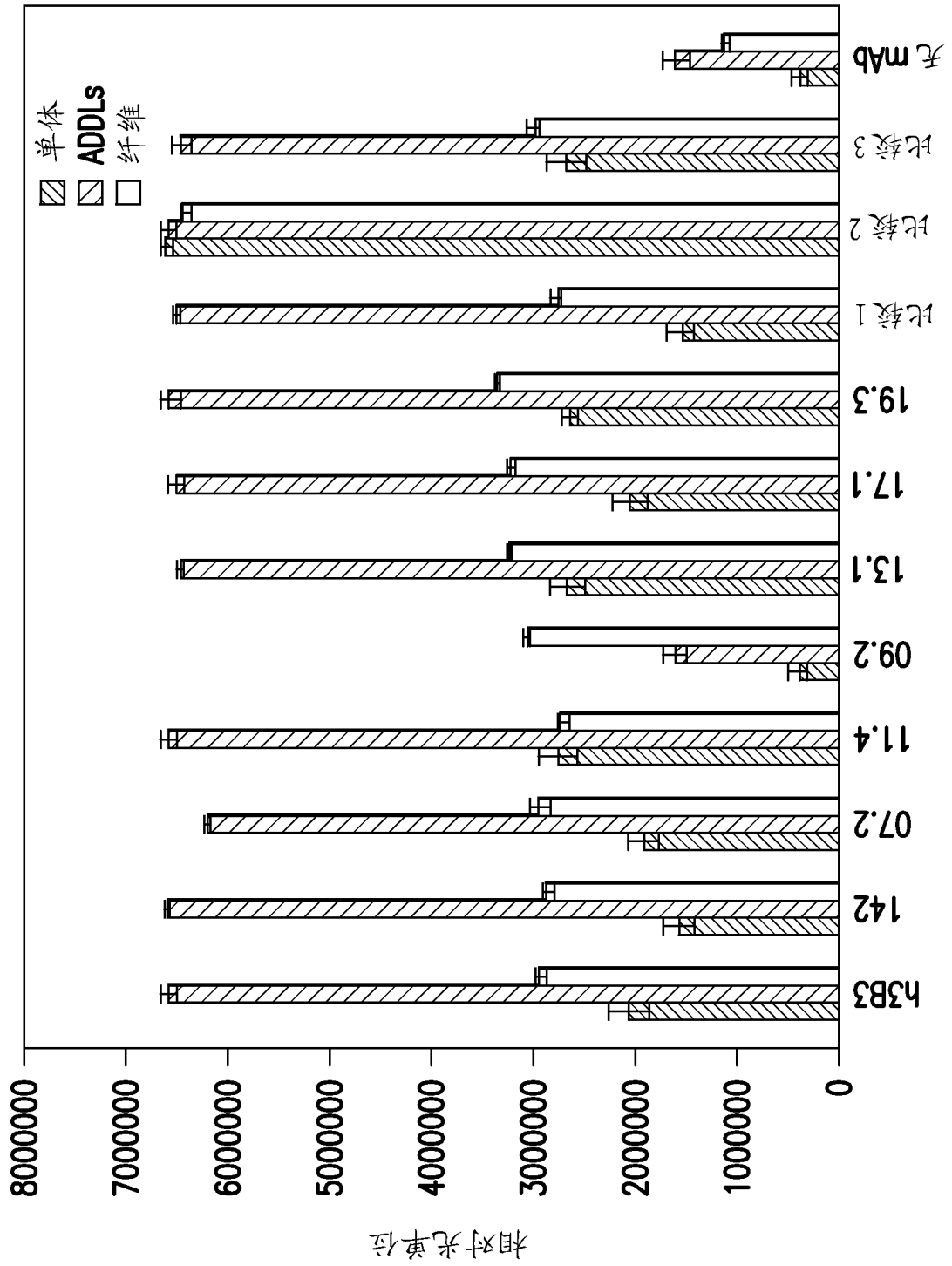


图 1A

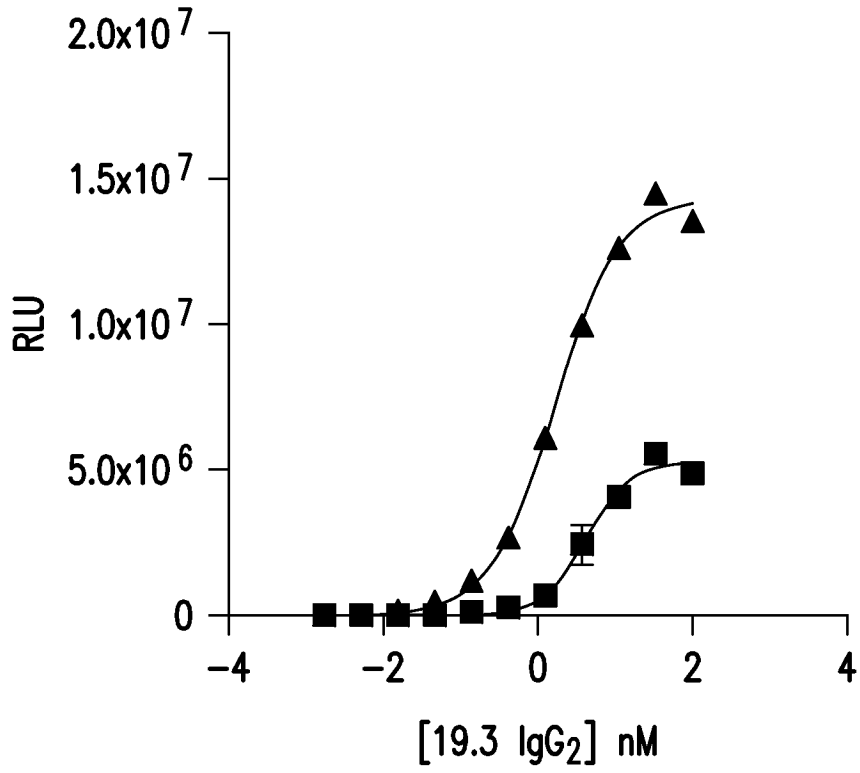


图 1B

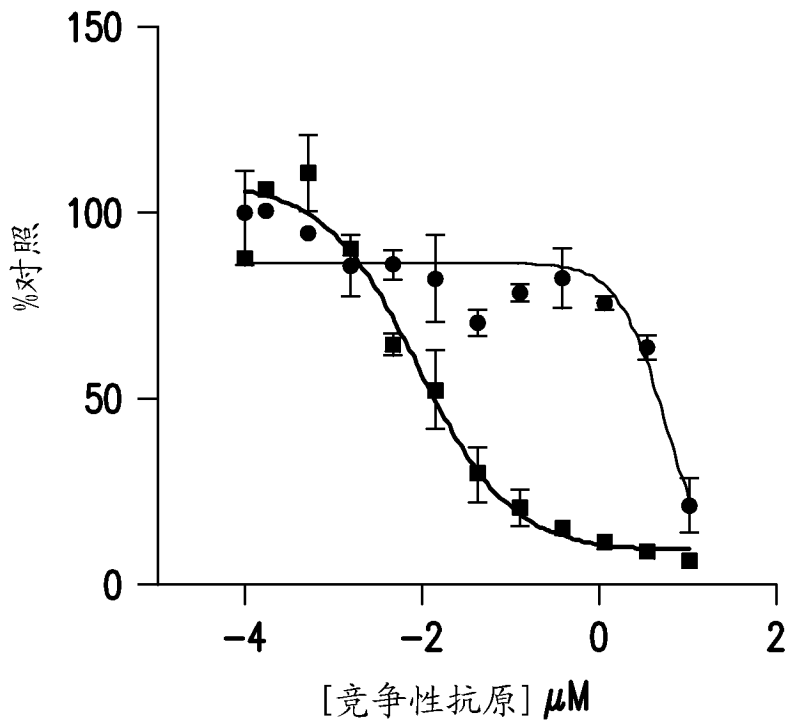


图 1C

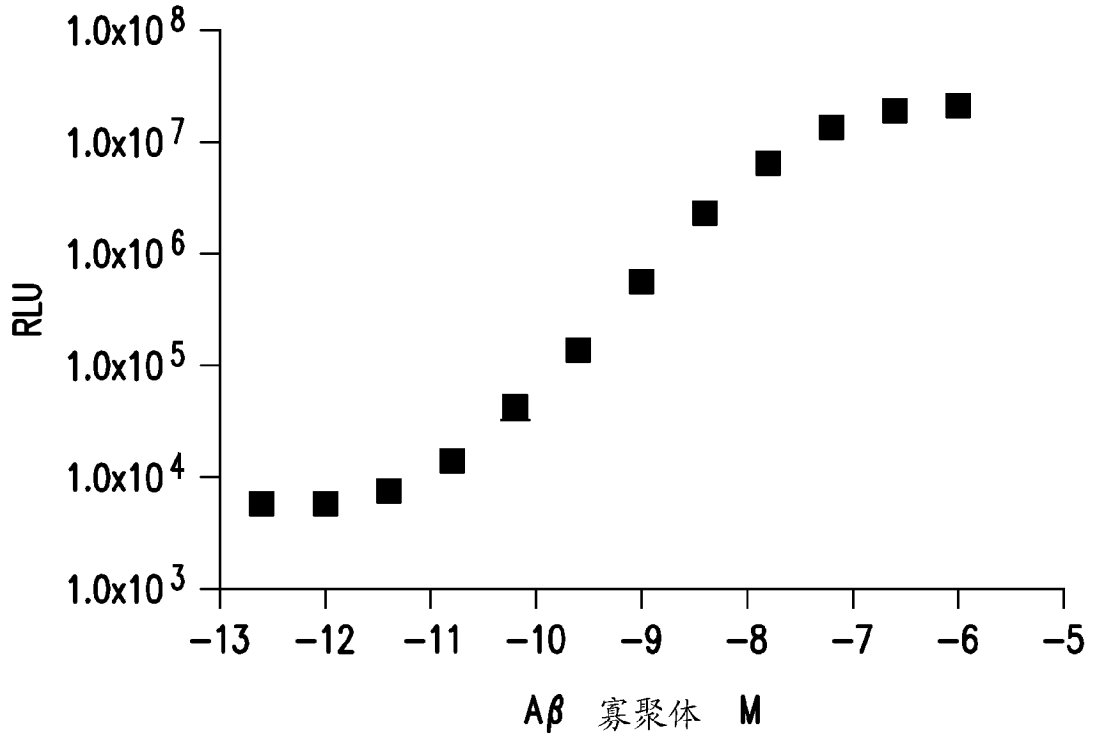


图 2A

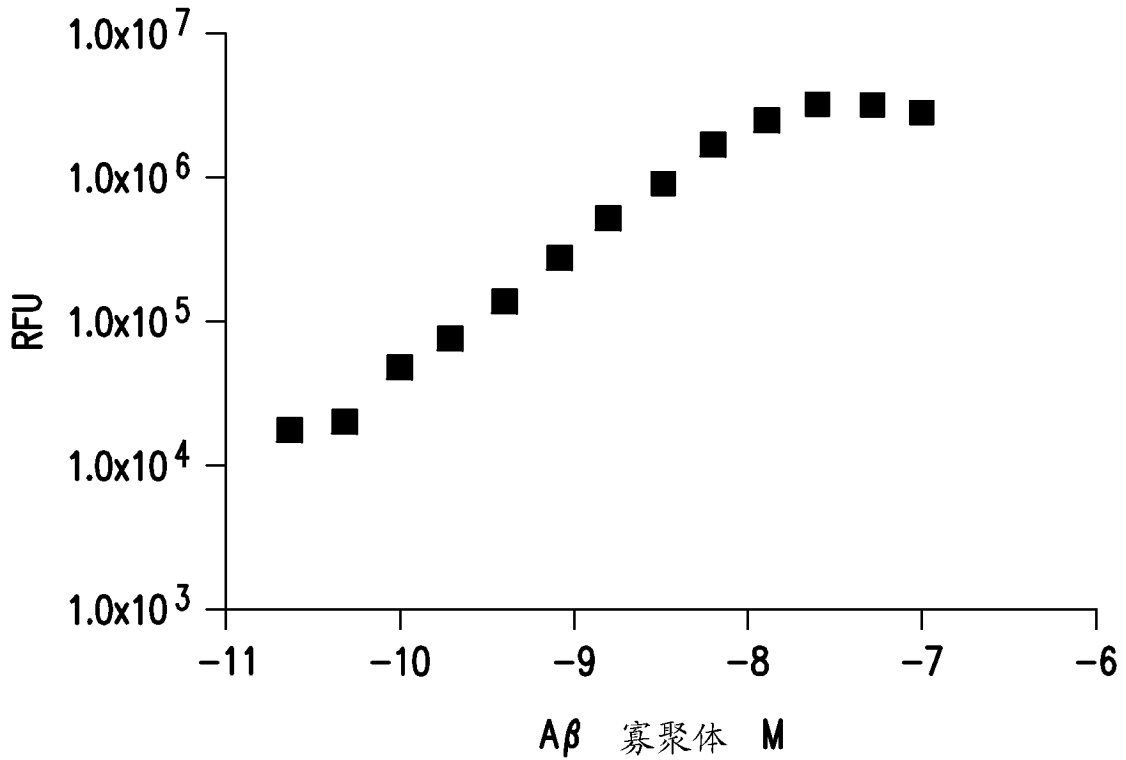


图 2B

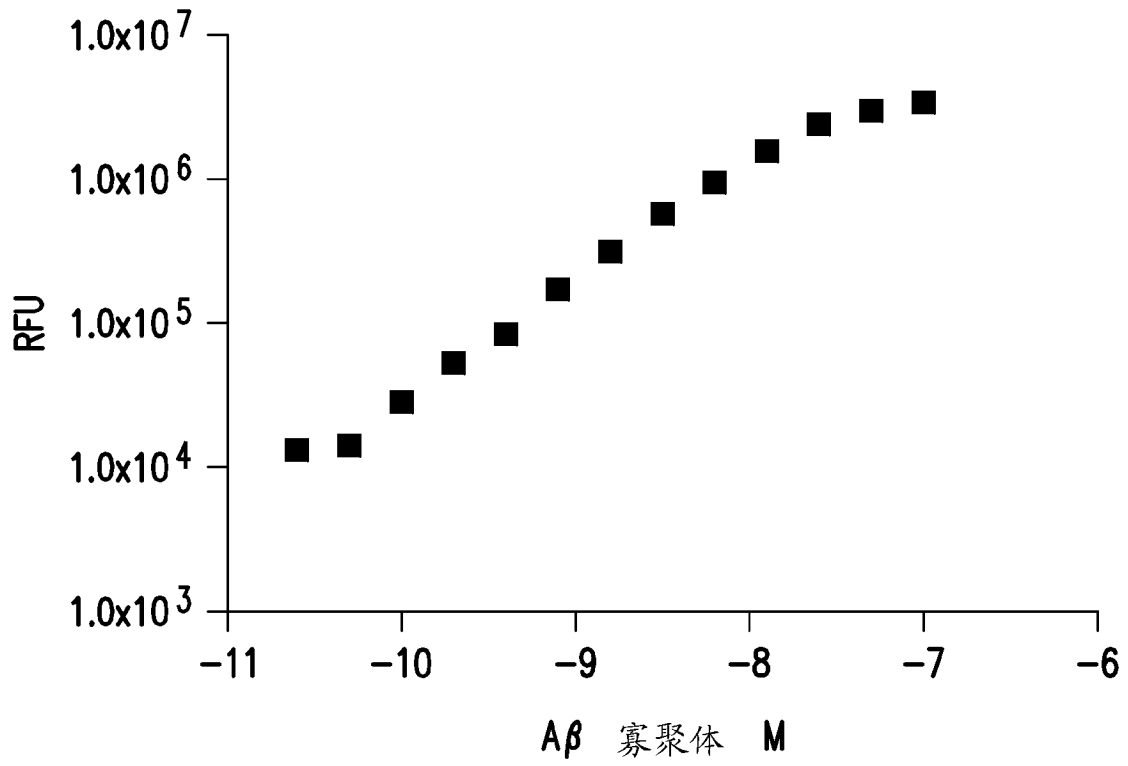


图 2C

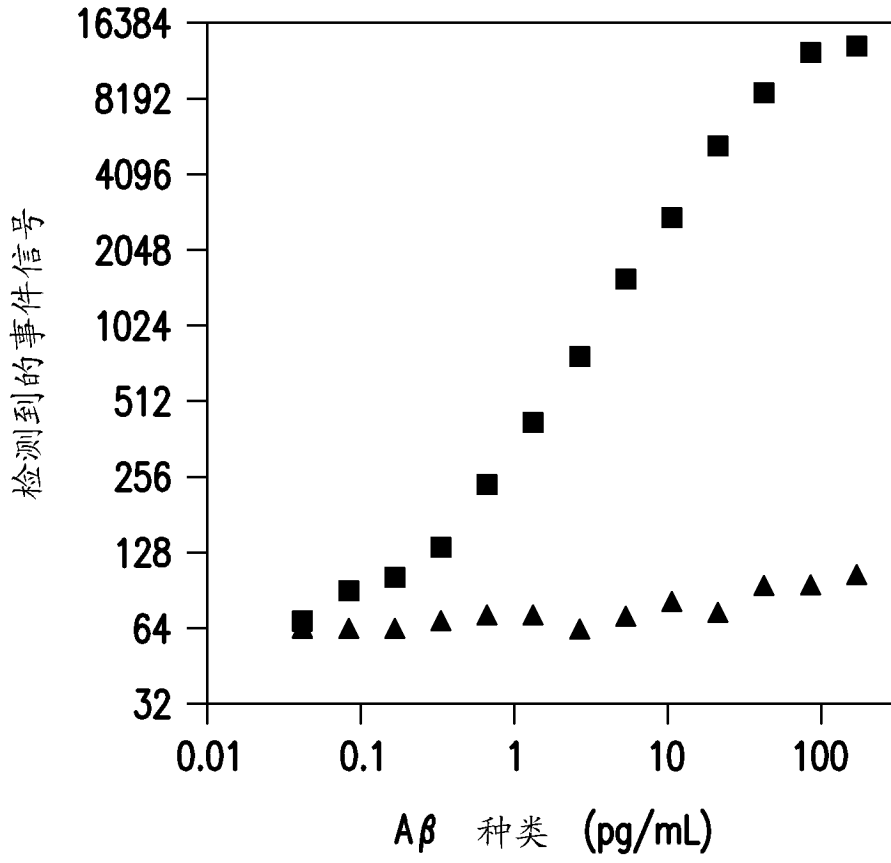


图 3

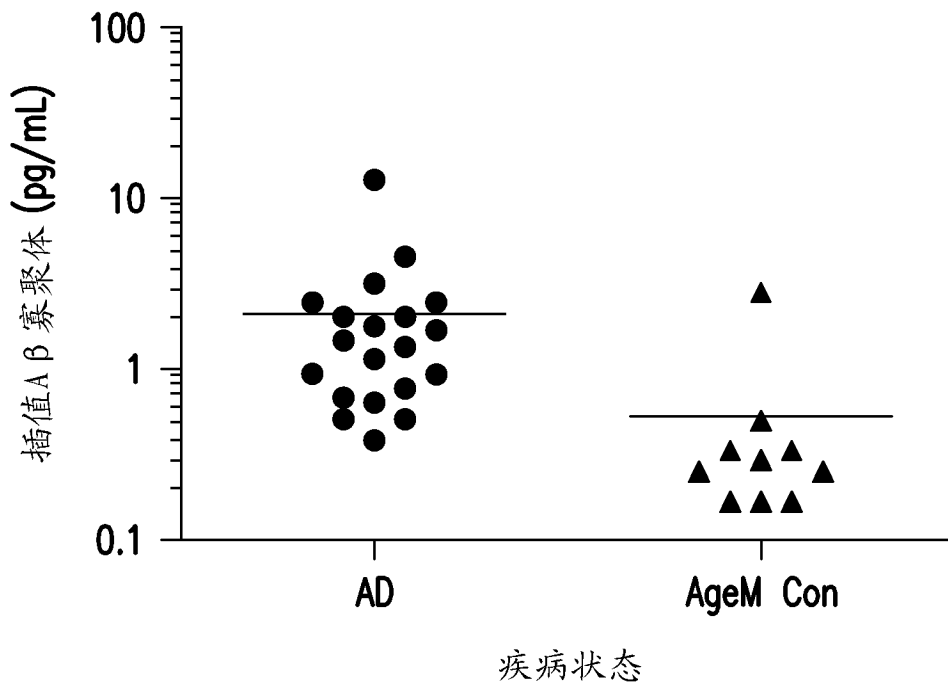


图 4A

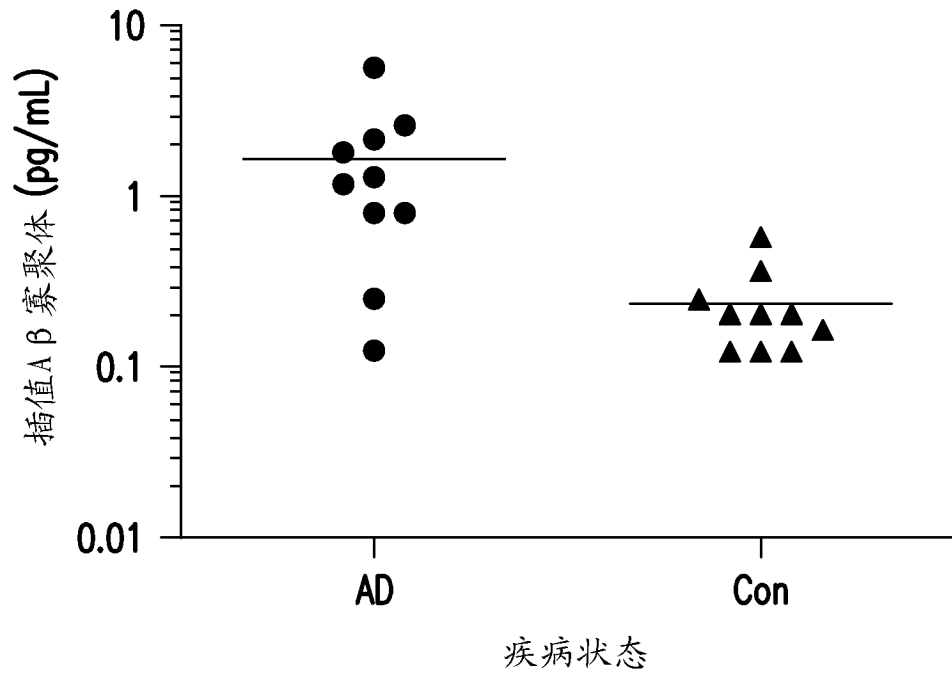


图 4B

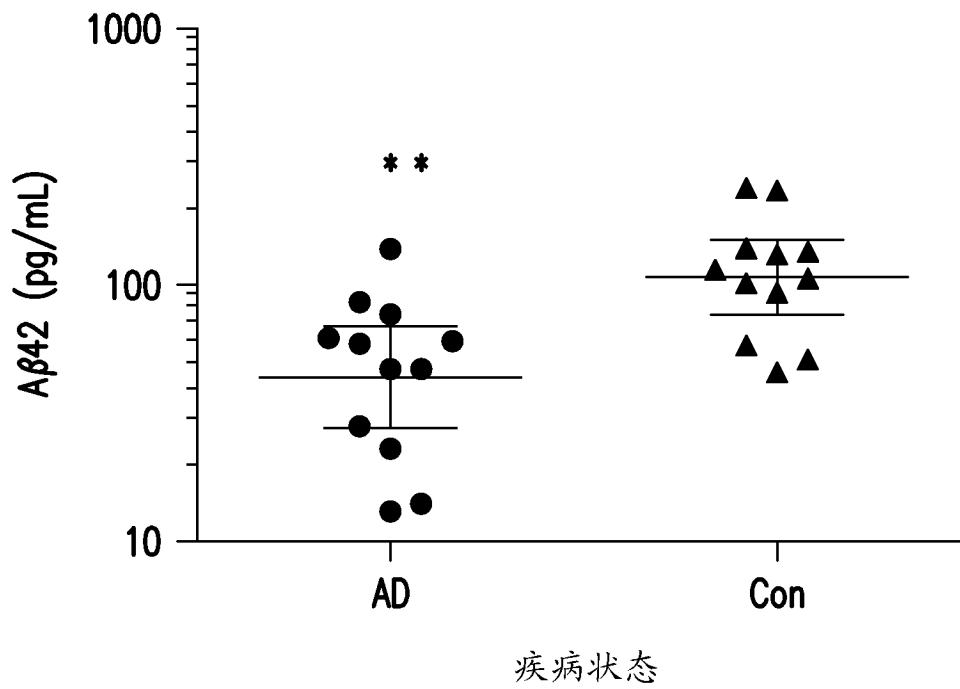


图 5A

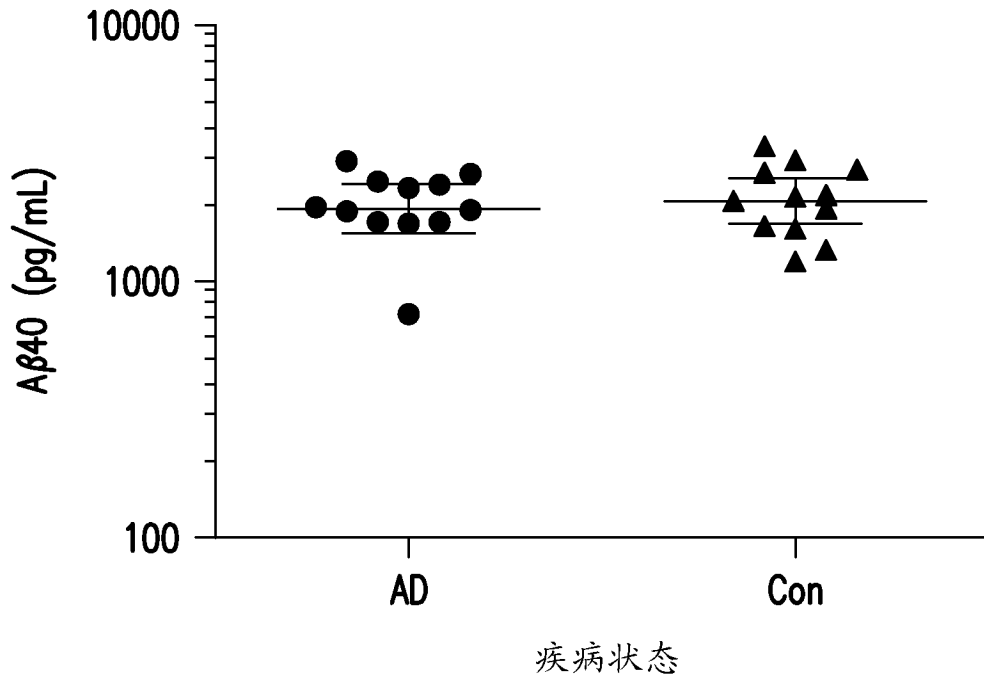


图 5B

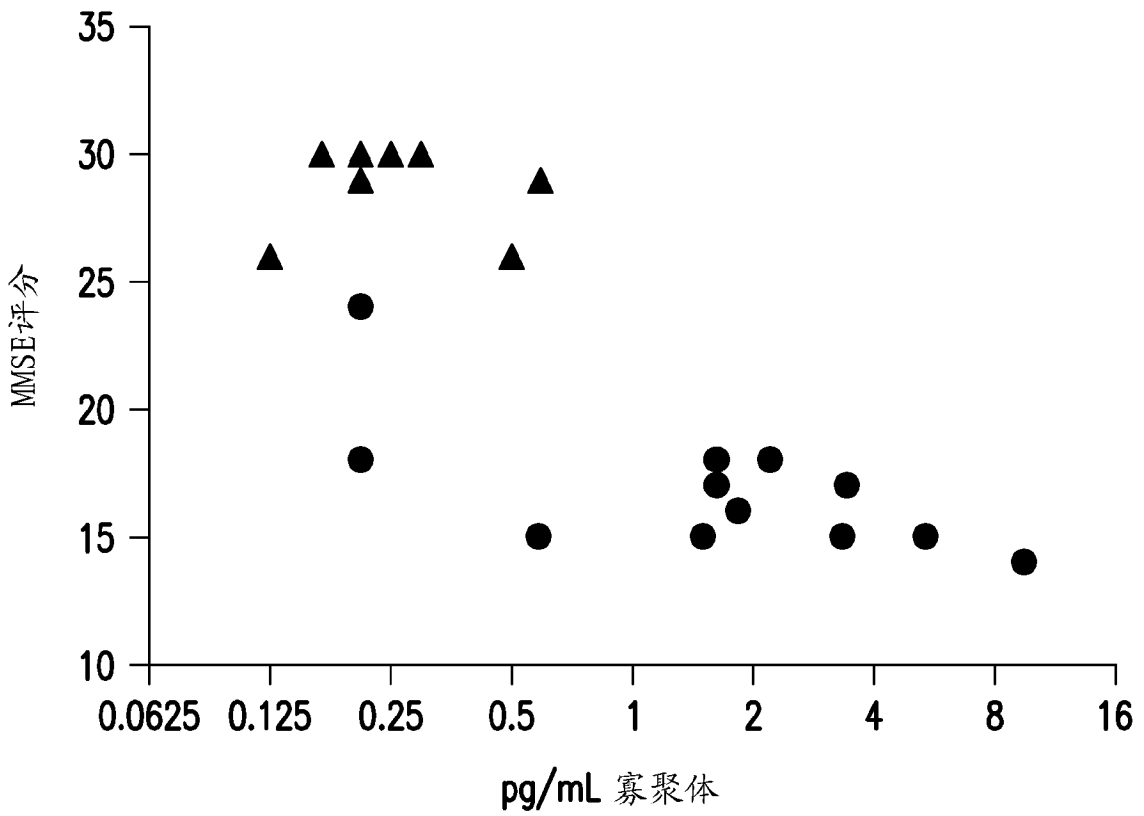


图 6

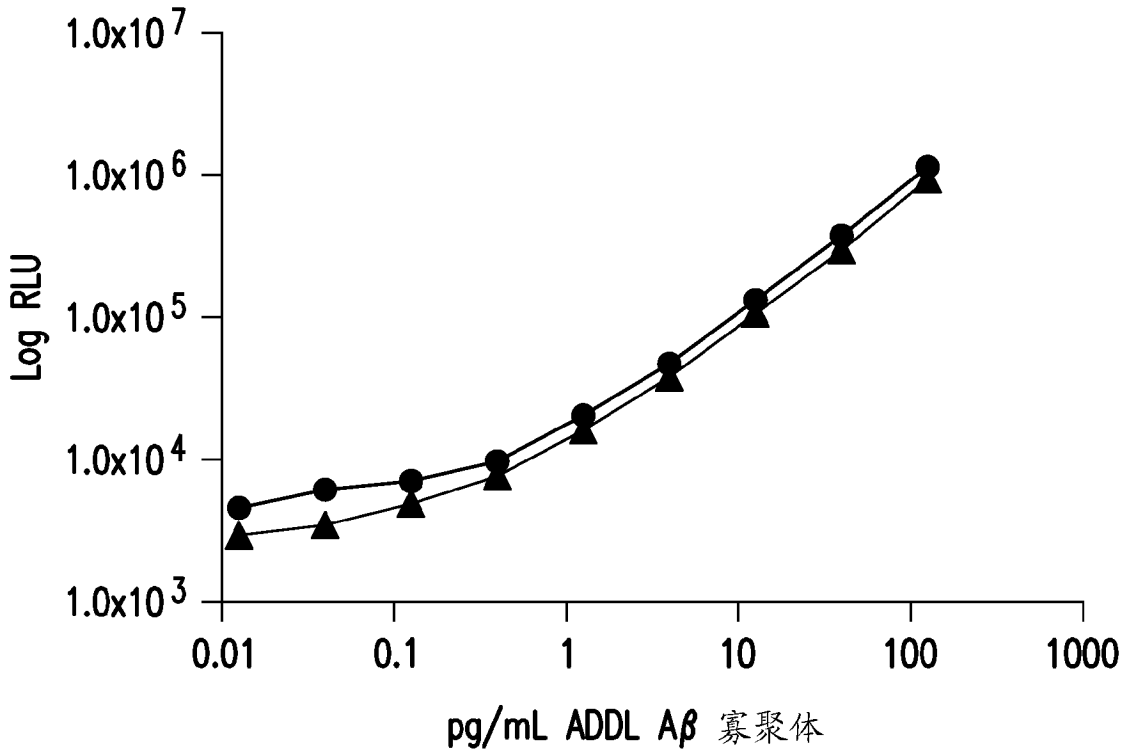


图 7A

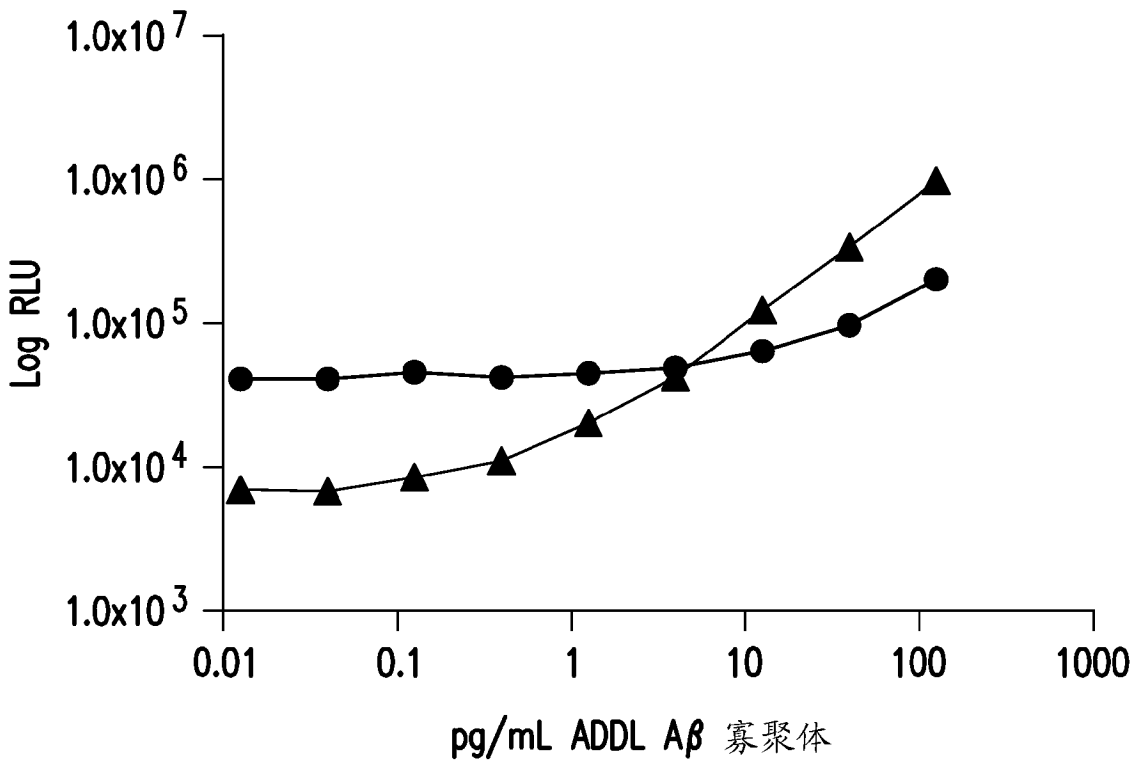


图 7B

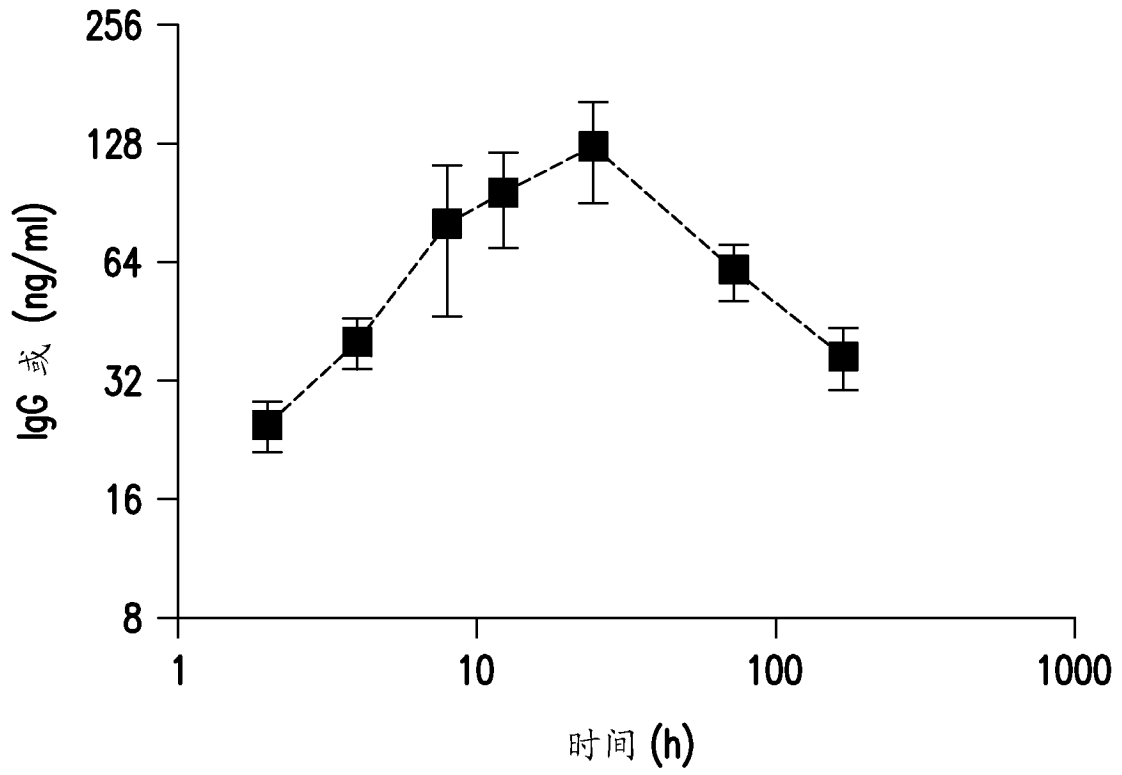
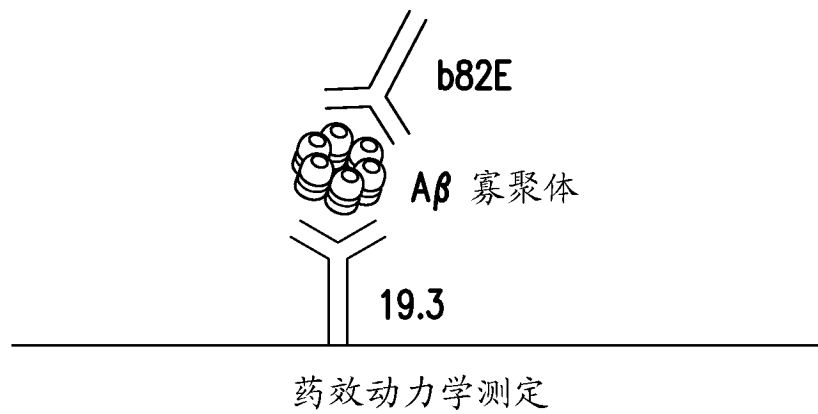


图 8

A β 寡聚体夹心ELISA



药效动力学测定

图 9A

A β 寡聚体/抗体夹心ELISA

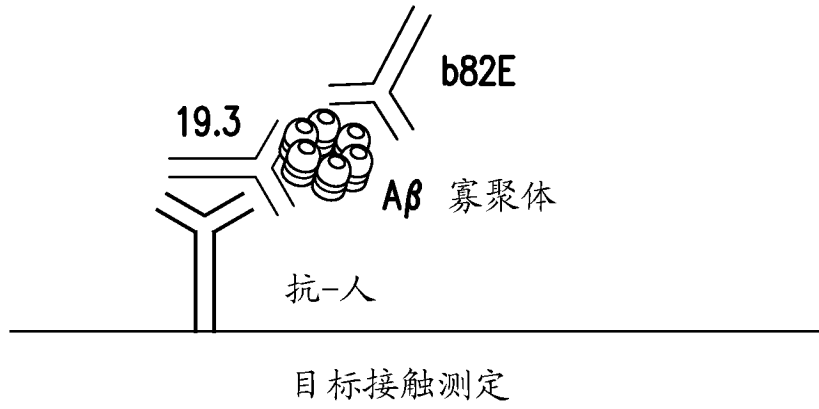


图 9B

专利名称(译)	用于检测流体样品中淀粉状蛋白 β 寡聚体的方法及其用途		
公开(公告)号	CN103782171B	公开(公告)日	2016-12-14
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	CN103782171A		
外部链接	Espacenet SIPO		

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。

