



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1922209 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 05

(21) 申请号 200580005685. 8 *C12N 15/13* (2006. 01)

(22) 申请日 2005. 02. 17 (56) 对比文件

(30) 优先权数据 同上.

60/546, 764 2004. 02. 23 US WO 0246237 A2, 2002. 06. 13, 说明书第 3 页

(85) PCT 申请进入国家阶段日 第 5 行—第 114 页第 22 行.

2006. 08. 23 审查员 马岚

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2005/005198 2005. 02. 17

(87) PCT 申请的公布数据

W02005/082939 EN 2005. 09. 09

(73) 专利权人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 R·B·德马托斯 U·库希波特拉

H·C·杨 D·B·麦克鲁尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 25/28 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页

(54) 发明名称
抗 A B 抗体

(57) 摘要

本发明提供了包含抗 A B 抗体的适合施用于人体受试者的组合物, 其不具有或具有可接受的低水平的 A B 肽、不具有或具有可接受的低水平的非人 A B 肽、或者具有不可检测的 A B 肽浓度。

1. 制备 A β 抗体的方法,其包括以下步骤:
 - a. 在内源表达 A β 肽的细胞中表达所述抗体;
 - b. 向用于生长细胞的培养基中添加 β -分泌酶抑制剂或 γ -分泌酶抑制剂;
 - c. 自生长培养基纯化抗体,其中纯化的抗体包含低于 0.02ng/mL A β 肽。
2. 权利要求 1 的方法,其中向培养基中添加 γ -分泌酶抑制剂。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中细胞为哺乳动物细胞。
4. 权利要求 1 或 2 的方法,其中细胞为仓鼠、人或小鼠细胞。
5. 权利要求 1 或 2 的方法,其中细胞选自 CHO、HEK293、PER. C6 和 NS0 细胞。

抗 A β 抗体

发明领域

[0001] 本发明属于药物领域。更具体的说,本发明涉及包含抗 A β 抗体的组合物,其中组合物中不含有或含有可接受的低水平的 A β 肽。

[0002] 发明背景

[0003] 淀粉状蛋白斑主要的组成成分为 39 到 43 个氨基酸的 A β 肽。A β 肽是由 I 型膜内在蛋白质 - 淀粉状蛋白前体蛋白 (APP) 通过蛋白水解得到的。分泌在细胞培养基中的主要形式为 A β 肽 (1-39/40 或 X-39/40), 而其长片段形式 A β 肽 (1-42/43 或 X-42/43) 的可溶性较低, 更倾向于聚集形成淀粉状蛋白沉积物的成核种子。包含有 A β 肽 (1-42/43) 的淀粉状蛋白沉积物与一些病症和疾病相关, 如阿尔茨海默病、唐氏综合征、脑淀粉样血管病、血管性痴呆、轻度认知障碍等。

[0004] 对于涉及这类含有 A β 肽的异常沉积相关的疾病的治疗性治疗集中在阻止 A β 肽的产生和 / 或其聚集成斑、也包括减少或消除淀粉状蛋白斑上。另一种治疗方法涉及通过例如主动免疫 (WO 99/27944), 由施用多肽, 诱导其对于 A β 肽产生免疫原性应答。然而, 近期, 应用合成的人 A β 1-42 肽的主动免疫法的 2A 期研究被暂缓实施, 因为有 4 名病人出现了在中枢神经系统 (CNS) 发炎的临床体征。自从暂停后, 又有另外的 11 位病人出现了 CNS 发炎的相关症状 (Orgogozo 等人, 神经学 (Neurology), 61 :46-54 (2003) ;Schenk 等人, Curr. Opin. Immun., 16 :599-606 (2004))。施用 A β 肽治疗阿尔茨海默病引起了不利事件, 因此, 为病人治疗需要更加考虑安全问题。

[0005] 另一种替代的靶向 A β 肽的免疫学方法是施用特异性针对这种肽的抗体, 例如通过被动免疫。尽管被动免疫并不能如主动免疫那样在 T 细胞和 B 细胞中建立记忆, 但是被动方法不引起围绕主动免疫的安全性担心。

[0006] 先前的报道表明, 多种细胞系如 K562、M17、HEK293、CHO 和 HUVEC 产生 A β 肽 (Shoji 等人, 科学 (Science), 258 :126-129 (1992) ;Haass 等人, 自然 (Nature), 359 :322-325 (1992))。因此, 很多可以用来表达临床应用的人或人源化抗体的细胞系, 如 CHO 和 HEK293 都内源地含有 APP 全蛋白, 以及剪切 APP 并由此天然表达 A β 肽所需要的 γ - 和 β - 分泌酶。

[0007] 令人惊讶地, 在制备抗 A β 抗体的过程中, 发现在大多数通常用来重组表达抗体的哺乳动物细胞系中, 内源产生的 A β 肽以低水平结合至表达的抗 A β 抗体, 并且在细胞培养和抗体纯化过程中一直被携带。伴随着重组产生的抗 A β 抗体物质中的 A β 肽的污染, 可能会增加病人的免疫原性反应, 造成关键重要的 A β 肽的被阻断、移除或减少。另外, 当细胞中如在 CHO 细胞系中内源产生的 A β 肽是非人的时, 结合在表达的抗 A β 抗体上的非人 A β 肽的免疫原性暗示可能会引起更重大的病人安全性担忧, 并且由此造成及其重要的 A β 肽的被阻断、移除或减少。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了适合施用于人类受试者的组合物, 其包含没有 A β 肽或者有可接受的低水平的 A β 肽的抗 A β 抗体。

[0010] 本发明也提供了适合施用于人类受试者的组合物,其包含没有或有可接受的低水平的非人 A β 肽的抗 A β 抗体。

[0011] 本发明还提供了适合施用于人类受试者的组合物,其包含具有不可检测到的 A β 肽浓度的抗 A β 抗体。

[0012] 本发明也提供了用于制备没有 A β 肽或具有可接受的低水平的 A β 肽的抗 A β 抗体的方法。

[0013] 本发明的一个实施方案是提供了在 NS0 细胞中表达抗体。另一个实施方案提供了将抗体表达在细胞中,在这类细胞中,通过将特定基因如编码 APP、 β -分泌酶或一个 γ -分泌酶的基因缺失,或者通过增加 α -分泌酶的表达量,从而使 A β 的产生被消除。更进一步的实施方案提供了将抗体在含有 β -或 γ -分泌酶抑制剂的细胞培养基中制备。还有,另一个实施方案提供了用酸化和大小排阻层析纯化 A β 肽的抗体。

[0014] 因此,本发明提供了应用本发明的组合物治疗患有病症和疾病的人类病人的方法,所述病症和疾病包括如阿尔茨海默病、唐氏综合征、脑淀粉样血管病、血管性痴呆、轻度认知障碍等。

[0015] 发明详述

[0016] 为了本发明的目的,如其中所公开的和要求保护的下列术语定义如下。

[0017] “抗体”是指完整抗体,包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、重组抗体、转基因抗体、移植抗体和单链抗体等,或者任意的融合蛋白、偶联物、片段,或其包含有一个或多个能够选择性的结合至 A β 肽上的结构域的衍生物。因此抗体包括完整的免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体或者任意这些中免疫有效的片段。抗体片段的意思为本领域众所周知的 Fv、二硫键连接的 Fv、scFv、Fab、Fab' 或者 F(ab')₂ 片段。表达“抗 A β 抗体”的意思是一种能够识别或结合至 A β 肽上的抗体。

[0018] 术语“人源化抗体”指的是抗体是由部分或者全部的衍生自人抗体种系的氨基酸序列或重排序列组成的,通过改变具有非人互补决定区(CDR)的抗体序列得到。将可变区的构架区用相应的人构架区替代,同时保留非人 CDR 基本上完整。人构架区区域包含有基因组构架区,同时也包含有一个或多个氨基酸替代的区域。特别指出的是,这种替代包括将在人类构架区中的一个特定位置的氨基酸用非人 CDR 的天然构架区中相应位置的氨基酸替代。本文中的人源化抗体中的抗体并不局限为全长的抗体,也可以包括片段和单链形式。

[0019] 本文中术语“A β 肽”或“A β ”包括了由淀粉状蛋白前体蛋白(APP)在体内通过蛋白水解得到的 39、40、41、42、和 43 个氨基酸肽及这些肽的任意片段,如由这些肽衍生的 N-末端缩短肽(例如,表示为如 x-42,其中 x = 1, 2, 3 等等),由 1-39、40、41 和 42 肽衍生的 C-末端缩短肽,和在两端都缩短的肽。详细的每个全长氨基酸肽序列可以参见 SEQ ID NO: 1 人 A β 肽和 SEQ ID NO: 2 啮齿类动物 A β 肽(即为,小鼠、仓鼠)。

[0020] 如本文中用到的,术语“ β -分泌酶”指的是加工 APP 时剪切 APP 产生 A β 肽氨基末端的酶。术语“ γ -分泌酶”指的是加工 APP 时在 β -分泌酶之后剪切 APP 生成 A β 肽羧基末端的酶复合体。术语“ α -分泌酶”指的是加工 APP 的酶,其在一种通路中在 A β 序列(在 A β 肽残基的 16 和 17 之间)中间剪切 APP 形成可溶的 APP 由此不能产生 A β 肽。“ β -或 γ -分泌酶抑制剂”是指抑制(阻断或减少) β -或 γ -分泌酶酶活性的分子。

[0021] “可接受的低水平的 A β 肽”是指在抗 A β 抗体制品中,尤其是在药物组合物中污

染的 A β 肽的水平,在这种水平下被认为是安全的,并且因此可被接受地或适合地施用于人类受试者。特别地,可接受的低水平的 A β 肽指在施用抗 A β 抗体的病人中不会引起免疫原性反应和 / 或增强的免疫原性反应。可接受的低水平可以由本领域的技术人员根据在药物组合物和制剂开发中在安全性方面通常应用和接受的实践确定。

[0022] A β 肽的“不可检测到的浓度”是指在用通常应用的方法测量在抗 A β 抗体制品中的 A β 肽的浓度时,A β 肽的浓度低于方法检测到的极限水平。这些方法包括,但是并不局限于,ELISA、酸-脲凝胶 / 蛋白印迹分析(如在实施例 1-3 中描述)、质谱分析法、分析型层析法,或其他高灵敏的分析方法。例如,在实施例 1-3 中描述的酸凝胶 / 蛋白印迹分析的最大灵敏度为 $\sim 1\text{pg A}\beta / \mu\text{g IgG}$,而在实施例 3 中应用的 ELISA 检测的极限为 0.02ng/mL 。低于这些各自方法检测极限的 A β 的浓度即为不可检测到的。

[0023] 本发明的组合物可以由本领域的任意的一些已知方法制备。下列的方法是作为举例说明的,但是并不限制本发明。

[0024] 通常,重组抗体制备通过被分为三个主要阶段的方法来实现:细胞系生成,细胞培养、和纯化。因此,在生成细胞系后,本发明抗 A β 抗体通常通过包括在细胞系中表达抗体和纯化抗体的方法来制备。在任何这些阶段的改变都将影响所生成抗体的表达或者特性。在细胞系生成阶段,许多的改变会影响抗体的表达,包括用于转化细胞以使抗体表达的载体构建体和包含在其中的前导序列、细胞类型的选择、转染细胞的选择、基因扩增和细胞系的筛选。筛选的细胞系中抗体的表达依赖于细胞培养中培养基的应用。培养基的改变如温度、养分和溶解氧的改变会影响表达和产品的质量。抗体在细胞培养物中表达后,纯化技术如多种层析技术、过滤和缓冲液更换可以改变所需产物的性质,也可以改变纯度和污染物的性质。考虑到这些通常的重组抗体制备阶段,本发明可以通过应用特殊技术或在每个这些阶段中做特别更改来达到。

[0025] 制备本发明的组合物的方法涉及到细胞系的特殊来源及对细胞系的修饰。如前文所述的,细胞系影响抗体表达。制备本发明的组合物的方法包括应用哺乳动物细胞系表达抗 A β 抗体。优选地,哺乳动物细胞系为仓鼠、人、或小鼠细胞系。更优选地,哺乳动物细胞系为 CHO、HEK293、PER.C6、或 NS0。最优选地,哺乳动物细胞系为 CHO 或 NS0。对于产生具有不可检测到浓度的 A β 肽的抗 A β 抗体,应用 NS0 细胞重组地产生抗 A β 抗体是优选的(见实施例 3)。

[0026] 缺失 APP 或者分泌酶(β -或 γ -分泌酶)之一的哺乳动物细胞系可以用来表达重组抗体。缺失或具有减少水平的 APP、 β -或 γ -分泌酶的细胞系可以通过多种细胞系操作和改变来得到。在其中编码 APP、 β -或 γ -分泌酶的基因被敲除的细胞可以通过本领域中众所周知的方法生成。可供选择的,对于细胞系的修饰可以产生这种缺失基因的效果。一个有用的细胞修饰的例子涉及应用已知的 RNA 干扰方法降解不需要蛋白(例如,APP 或 β -或 γ -分泌酶)的 RNA 转录本从而显著性的降低 A β 肽的表达量。为使 RNA 干扰可行,细胞可以稳定地或瞬时地转染或感染一段 DNA 序列,这段序列可以提供质粒或病毒介导的小的发夹 RNA 结构的表达,根据本领域中已知的方法,这种结构会特异性的结合至目的转录物并且发动对于这种转录物的剪切和降解(Banan 和 Puri, Curr. Pharm. Biotechnol., 5 :441-50(2004);Nesterova 和 Cho-chung, Curr. Drug Targets, 5 : 683-9(2004);Medema, Biochem J., 380 :593-603, (2004))。作为代替哺乳动物细胞培养

物的另一种选择,转基因植物或者植物细胞培养物也被用来表达蛋白质 (Hellwig 等人, 2004, *Nature Biotechnology*, 22 :1415(2004)),这可成为产生缺失 A β 的抗体的另一种途径。同样的,很多种酵母也普遍被用来作为哺乳动物细胞培养物的替代并且可以用作缺失 A β 的抗体的表达。这些方法的应用减少或阻断了 A β 肽的产生。

[0027] 用于制备本发明组合物的方法还涉及细胞培养物的改变。这些方法优选地包括在细胞培养物中混合 β - 或 γ - 分泌酶抑制剂以产生具有可接受的低水平 A β 肽的抗 A β 抗体。已知多种 β - 或 γ - 分泌酶抑制剂 (例如,美国专利 No. 6, 486, 350, 美国专利 No. 6, 627, 739, Dovey 等人, *JNeurochem.*, 76 :173-181(2001) ;Yue-Ming 等人, *Nature*, 405 : 689-694(2000)),可将它们用于这些方法中。

[0028] 另一个制备本发明组合物的方法是在细胞培养物中增加可溶性 APP 的产生,由此减少产生的 A β 肽的量。在细胞系中通过增加 α - 分泌酶的活性来增加可溶性 APP 的产生。具有增强的 α - 分泌酶活性的细胞系可以通过本领域公知的方法生成。可选择地,可溶性 APP 的产生也可以通过向 CHO 细胞中加入铜 (Borchardt 等人, *Biochem J.* 344 : 431-467(1999))。在亲代 CHO-K1 细胞和具有铜抗性的 CHO-CUR3 细胞中,铜添加也极大的减少了 A β 肽的水平。

[0029] 制备本发明组合物的方法也涉及了多种纯化技术。这些技术包括从细胞培养物中进行抗体的 A 蛋白捕捉。之后的纯化可以包括应用试剂将抗 A β 抗体从 A β 肽上解离,之后根据这两种本体的层析差别将抗体从抗原上分离。优选的解离剂包括酸、尿素、硫氰酸、和去污剂。在达到抗体和抗原的解离后,利用能够将解离的抗 A β 抗体从 A β 肽上分离的层析技术,将抗原从抗体或抗体-抗原复合体中移除。这些层析技术优选地为大小排阻层析、离子交换层析、反向层析、和疏水作用层析。另外切向流过滤也用来作为另一种技术从抗体上分离抗原。在一个优选的纯化方法中,本发明的组合物通过几步纯化,包括 A 蛋白捕捉、中和、稀释、抗体酸化、大小排阻层析、和中和 (见实施例 2)。

[0030] 另一种层析方法应用能结合至 A β 肽的另一个表位的固定化抗体或者一种对 A β 肽具有更高亲和性的抗体来分离和移除抗体-抗原复合体或抗原。

[0031] 本发明的组合物可以用来治疗患有病症和疾病的人类病人,所述病症和疾病包括如阿尔茨海默病、唐氏综合征、脑淀粉样血管病、血管性痴呆、轻度认知障碍等。A β 肽可能引起对病人潜在的免疫原性危险,如果 A β 肽非人,则潜在的健康担忧会更大。因此,阻断、移除或减少 A β 肽是关键。

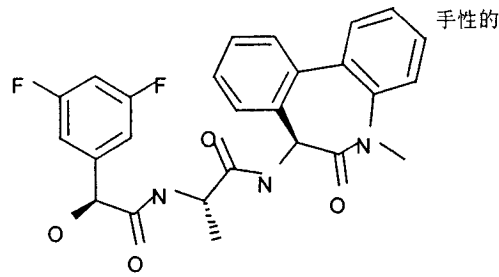
[0032] 本发明的组合物适合以药物组合物施用于人类受试者,其中药物组合物包括抗 A β 抗体和可药用赋形剂。可药用赋形剂的例子包括缓冲液、表面活性剂、防腐剂、溶解剂、等渗剂、稳定剂等,其设计要适合选择的施用形式。Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Co., Easton PA, 最新版引入本文作为参考文献,提供了技术人员普遍知道的制剂技术的概略。

[0033] 下列实施例意图说明但是并不限制本发明。

[0034] 实施例 1

[0035] 在包含有 γ - 分泌酶抑制剂的细胞培养物中表达抗 A β 肽。

[0036]



[0037] 将 γ -分泌酶抑制剂 (WO 98/28268) 加入表达抗 A β 抗体的 HEK293 细胞培养物中,以减少细胞天然表达的 A β 肽的量。本实施例中细胞培养物样品包括没有加入抑制剂的对照培养物,持续 5 天(五天的转染)在时间 = 0 和每 24 小时后加入 1nM 的抑制剂的培养物,和在时间 = 0 时加入 1nM 抑制剂的培养物。这些样品用 A 蛋白柱子和大小排阻层析纯化。这些样品用下面详述的酸-脲凝胶分离和随后的蛋白印迹分析法分析 A β 肽的含量。这一方式产生和分析的抗 A β 的结果在下面的表 1 中显示。

[0038] 以下的步骤描述了一项将样品通过甲酸变性和随后通过酸-脲聚丙烯酰胺基质进行电泳的技术。

[0039] 第 1 天

[0040] 仪器准备

[0041] 1) 为灌胶准备清洁和组装丙烯酸酰胺凝胶板。例如将 Hoeffer 板装入灌制架子(16cm \times 14cm 板,1.5mm 间隔)上。用去污剂彻底清洗板子,在蒸馏 H₂O(dH₂O) 中漂洗,在丙酮中漂洗,最后在 100% EtOH 中漂洗。

[0042] 2) 在 10cm 处(22%分离胶)和 11.75cm 处(10%分级胶)处标记板子。

[0043] 制备凝胶和凝胶的浓度

[0044] 1) 丙烯酸酰胺(40%溶液,如预制的 Bio-Rad/cat#161-0148)

[0045] 2) 凝胶成分:

[0046]	4%浓缩胶	10%	22%
[0047] 尿素	5.76g	2.88g	11.56g
[0048] 40%丙烯酸酰胺	1.6mL	2mL	17.6mL
[0049] GAA	1.6mL	800 μ L	3.2mL
[0050] TEMED(2.5%)	450 μ L	200 μ L	600 μ L
[0051] APS(10%)	100 μ L	100 μ L	100 μ L
[0052] dH ₂ O	至 16mL	至 8mL	至 32mL

[0053] 向 50ml 圆锥管中加入尿素、丙烯酸酰胺、冰醋酸(GAA)、和 dH₂O。简单漩涡搅拌后在 55 $^{\circ}$ C 水浴中温育。每几分钟漩涡搅拌直到尿素完全溶解。除去 22%和 10%溶液中的气体并将其置于冰上,将 4%浓缩胶(stacker)保留在水浴中。

[0054] 倒胶(在室温下)

[0055] 1) 向 22%溶液中加入 N,N,N',N'-四甲基亚乙基二胺(TEMED),温和颠倒几次混匀。下一步加入 10% APS(过硫酸铵)温和颠倒几次混匀。用 25ml 移液管,缓慢的将溶液灌入板子之间,直到到达 10cm 标记处。

[0056] 2) 细心的加入 750 μ l 5% GAA 覆盖物。用 P1000 移液管非常缓慢的将 5% GAA 从玻璃板的一端缓慢注入至 22%分离胶上。

[0057] 3) 在室温下使之聚合至少 1 小时。

[0058] 4) 以与对 22% 同样的形式向 10% - 丙烯酰胺溶液中加入 TEMED 和 10% APS。移去覆盖物, 加入溶液到 11.75cm 的第二个标记处。与上述一样, 再次细心地加入 750 μ l 5% GAA 覆盖。在室温下使凝胶聚合 30 分钟。

[0059] 5) 在加入 4% 的浓缩溶液之前, 将凝胶架子置于 37°C 温箱中 15 分钟使胶温热。这样目的是使孔恰当地聚合。除去 4% 浓缩液中的气体并且保存在 55°C 下。除去覆盖物。加入 TEMED, 颠倒几次, 之后加入 10% APS。迅速将溶液灌入并且插入一个干净 - 干燥的 12 孔梳子 (或 15 孔梳子)。在倒入浓缩胶后, 将架子放回温箱中 15 分钟后取出。在长工作台上使之聚合。浓缩胶大约至少需要 1.5 小时才能完全聚合。

[0060] *注意: 在聚合步骤中, 在分离胶中可能会出现气泡。在聚合过程中以及之后, 由于凝胶温度的变化形成这些气泡。这些间隙并不影响技术的执行。

[0061] 样品制备

[0062] 在一个单独的泳道加入达 3mg 的蛋白质的分析将得到合理的条带结果。分析蛋白质的条件如下。

[0063] 样品:

[0064] 100mg/mL (最大的蛋白质浓度) 的蛋白的 30 μ l

[0065] 80 μ l 甲酸 (98%) (ICN cat#15162-90)

[0066] 20 μ l 酸上样缓冲液 (80% 甲酸, 60% 蔗糖和 0.02% 甲基绿; 将 6g 蔗糖溶解在 ~8ml ~99% 的甲酸中制备缓冲液。加热并且搅拌混合物。当蔗糖溶解后, 用约 99% 甲酸调节溶液体积至 10ml。加入 2 μ l 11% 的甲基绿溶液)

[0067] 1 μ l β -巯基乙醇

[0068] *注意: 根据需要调节体积。但是确保最终甲酸的浓度应当是介于 70% 到 90% 之间。

[0069] 蛋白梯

[0070] Pharmacia 分子量标记, M. W. 范围 2,512-16949 (cat#80-1129-83)

[0071] 在 1ml PBS 中重建蛋白。等分成每份 10 μ l 在 -20°C 下冰冻。每次需要应用蛋白梯标记时解冻 1 份, 加入 90 μ l 甲酸 (98%), 20 μ l 酸上样缓冲液, 和 1 μ l β -巯基乙醇。

[0072] *注意: 不要根据产品说明重建这些蛋白梯 (因为 SDS 会引起蛋白梯成片)。

[0073] RSA 样品.

[0074] 每块胶电泳时最外面的两条泳道会发生变形。为了帮助最低限度的减少变形所造成的负面影响, 在胶每侧的外泳道上 BSA 样品。BSA 样品 = 1 μ l 的 5% 的 BSA, 90 μ l 甲酸 (98%), 20 μ l 酸上样缓冲液, 和 1 μ l β -巯基乙醇。

[0075] 电泳跑胶:

[0076] 预电泳: 在冷室里组装仪器。将槽底部 (四分之三体积) 充满预冷的酸凝胶电泳缓冲液。向上层槽中加入适量的缓冲液。在 250 伏下, 从凝胶阳极到阴极预电泳 30 分钟。

[0077] *去除凝胶底部的任何气泡并且确认缓冲液不会从上层槽漏出。

[0078] **酸凝胶电泳缓冲液 = 250ml 冰醋酸 + 3750ml dH₂O

[0079] 上样样品: 在上样前用缓冲液漂洗孔泳道以帮助去除多余的尿素。上样, 上蛋白梯和外层的 BSA 样品。注意要电泳两道蛋白梯, 这样在转膜前, 含有多肽梯的一条泳道可以被

剪下并且用考马斯亮蓝染色。

[0080] 电压步骤:根据下列条件从阳极到阴极电泳:

[0081] ■在 25 伏下 15 分钟

[0082] ■在 50 伏下 15 分钟

[0083] ■在 100 伏下 15 分钟

[0084] ■在 200 伏下 15 分钟

[0085] ■在 275 伏下 约 15 小时

[0086] **电泳过夜直到染料的前端距离底部~ 2 到 2.5 厘米,如果在傍晚开始电泳则大概第二天早上达到。

[0087] 第二天

[0088] 酸脲凝胶的转移条件(在 4°C 冷室中进行)

[0089] 在转移的前夜,制备下列缓冲液并且保存在冷室中。

[0090] 转移缓冲液:

[0091] Tris-碱 12.36g

[0092] 甘氨酸 57.6g

[0093] 甲醇 800mL

[0094] dH₂O 加至 4 升

[0095] 在转膜前中和酸-脲凝胶。将凝胶小心的取出并放置在洗过的玻璃盘中。加入 200mL 转膜缓冲液温和摇动 15 分钟。总共重复四次这种清洗步骤。按每次正常条件(100 伏下 2.5 小时)进行转膜。

[0096] 丽春红 S 染色和脱色

[0097] 转膜后,通过丽春红-S 染色看到蛋白梯中的蛋白质。硝酸纤维素膜于溶解在 5% 醋酸中的 0.1% Pon-S 溶液中进行染色 5 分钟。用 dH₂O 将膜脱色(3 次短暂的清洗),数码扫描膜并用钝的铅笔标记蛋白梯。保存文件。

[0098] *注意:这一蛋白梯仅用作对比目的。这项技术根据多肽的分子量(大小)和电荷分离多肽。例如,具有相同分子量但是不同电荷的两个多肽可能不具有相同的净迁移。因为这一原因,通常至少在一个泳道中电泳 Aβ 肽标准蛋白质,从而得到 Aβ 肽的精确鉴定。

[0099] **重要的:并不是所有的多肽标准梯的条带都被转移。当用考马斯亮蓝染色的蛋白梯与丽春红染色的硝酸纤维素膜对比时,很明显 10.7kDa 和 6.2Kda 条带没有被转移。

[0100] 蛋白印迹条件

[0101] 在 PBS 中煮沸硝酸纤维素膜 5 分钟。应用常用的蛋白印迹方法。

[0102] 封闭步骤:

[0103] 在 50ml 体积溶有 5% 牛奶的 1×tris-缓冲盐水 /0.125% 吐温 20® (TBS/T) 中将膜封闭 45 分钟。

[0104] 一抗

[0105] 应用挑选的几个(例如 3 个)抗 Aβ 抗体使得所选的抗体的结合表位可以结合到 Aβ 肽的不同区域。确保选择的抗体允许在至少 79pg 标准可视。一抗溶液溶解在 0.5% 牛奶 TBS/T 中,例如,1 : 1000 将所选抗体稀释在 20mL 总体积中。将一抗置于摇床上过夜。

[0106] 第三天

[0107] 洗膜

[0108] 在溶有 1% BSA 的 TBS/T 中洗膜 3 次, 每次 10-15 分钟。

[0109] 二抗

[0110] 二抗溶液为在 50mL 总体积中以 1 : 6000 将抗小鼠 HRP (Catalog#7076Cell Signaling) 稀释在 1% 牛奶 TBS/T 中。将膜置于二抗中 3 小时。

[0111] 在二抗后, 用 TBS/T 洗膜 3 次, 每次 15 分钟。

[0112] 显色

[0113] 在显色前, 将膜放在增强化学发光 (ECL) 溶液 (Pierce Super SignalWest Pico Catalog#34080) 中 5 分钟。

[0114] 本方法的最大灵敏度取决于在蛋白印迹方法中应用的试剂。对于上述详述的实施例, 其分析的最大灵敏度为 ~ 1pg/μg IgG。对于样品, IgG 浓度 (mg/mL) 是根据测量 280nm 的吸光度之后将其值除以消光系数 1.4 得到的。

[0115] 根据本实施例生成的样品的分析提供了下列结果 :

[0116] 表 1. 具有或不具有 γ -分泌酶抑制剂的细胞产生的纯化抗体的酸脲凝胶分析。

[0117]

样品	FL ¹ (pg/μg IgG)	T1 ² (pg/μg IgG)	T2 ³ (pg/μg IgG)	总 hAβ 40 (pg/μg IgG)
无抑制剂	70	38	70	178
持续 5 天每 24 小时加入抑制剂	4	0	3	7
在 T = 0 时加入抑制剂	56	27	52	135

[0118] ¹ 全长的 hAβ 40

[0119] ²N- 末端截短的 hAβ 40, #1

[0120] ³N- 末端截短的 hAβ 40, #2

[0121] 实施例 2

[0122] 通过酸解交联抗体和 Aβ 肽纯化抗 Aβ 抗体。

[0123] 自细胞培养物中生长的 HEK293 细胞表达抗 Aβ 抗体。通过将培养基加入 A 蛋白-琼脂糖柱子中并且用 pH3.1 的 100mM 甘氨酸缓冲液洗脱纯化抗体。从 A 蛋白洗脱下的液体组分通过加入小量体积的 pH8.0 的 1M Tris 缓冲液将其 pH 调节至 pH7.4 左右。之后这些洗脱组分合并通过 1 : 1 的比例稀释到 1M 甘氨酸中使其 pH 值调节到 pH2 左右。在室温下温育 10 分钟后, 酸化的合并物在 26/60 Superdex 200 柱子 (Amersham) 中进行大小排阻层析, 柱子流速 30cm/hr, 使用 50mM 甘氨酸、150mM NaCl, pH2 的流动相。从大小排阻柱中洗脱下的抗体通过加入 Tris 缓冲液中和并且用 pH7.4 的 PBS 透析。

[0124] 变性酸 / 脲梯度聚丙烯酰胺凝胶分析 (这一技术更深层的描述见实施例 1) 对于用酸解离纯化方法生成的样品提供单位为 pg 每 μg IgG 的 Aβ 肽的质量估计。下列结果是应用这一酸解离纯化法得到的抗 Aβ 抗体纯化后的结果。

[0125] 表 2. 酸脲凝胶分析来自 HEK293 细胞的纯化抗体:单一的大小排阻层析(无酸化)或酸化和大小排阻层析。

[0126]

样品	FL ¹ (pg/ μ g IgG)	T1 ² (pg/ μ g IgG)	T2 ³ (pg/ μ g IgG)	总 hA β 40 (pg/ μ g IgG)
HEK 293, 无酸, SEC	39	0	0	39
HEK 293, 酸 和 SEC	11	0	0	11

[0127] ¹ 全长的 hA β 40

[0128] ²N- 末端截短的 hA β 40, #1

[0129] ³N- 末端截短的 hA β 40, #2

[0130] 实施例 3

[0131] NS0 细胞中抗 A β 抗体的表达

[0132] 自细胞培养物中生长的 NS0 细胞表达抗 A β 抗体。通过将培养基加入 A 蛋白-琼脂糖柱子中并且用 pH3.1 的 100mM 甘氨酸缓冲液,洗脱纯化抗体。从 A 蛋白洗脱下的组分合并通过加入 pH8.0 的 1M Tris 缓冲液将其 pH 调节至 pH7.4 左右。之后这些洗脱组分合并通过 1:1 的比例用 PBS 稀释并且在 26/60 Superdex 200 柱子 (Amersham) 中进行大小排阻层析,柱子用流速为 30/hr 的含有 PBS、150mM NaCl, pH7.4 的流动相。从大小排阻柱中洗脱下的抗体用 pH7.4 的 PBS 透析。通过变性酸/脲梯度聚丙烯酰胺凝胶分析, A β 肽在用本方法产生的抗 A β 抗体中没有被检测出来。

[0133] ELISA 分析用于定量 A β 肽的浓度。在冷藏条件下,96-孔 ELISA 板 (Nunc MaxiSorp™F96 或 C96) 孔用抗 A β 抗体(例如,2 个或更多)包被过夜,其中抗体识别中心 A β 肽(例如,17-25)结合区外的表位,其在包被缓冲液中的浓度为例每一抗体 7.5 μ g/mL。当从板中抽吸掉包被溶液后,其孔使用于具有 EDTA(3mM)和吐温**20**®(0.5% w/v)的 HEPES-缓冲盐水中的 HBST/Blotto(0.25% w/v 无脂干奶粉 300 μ L/孔室温封闭孔 1 到 2 小时并且用 1X 洗涤缓冲液(具有 0.1% v/v 吐温**20**®的 1XPBS)清洗 1 次后抽吸走。含有抗体的样品被适当地在 HBST/Blotto 中稀释后置于 ELISA 板(100 μ L 每孔)中。向对应的稀释液中加入额外的 0.4ng/mL 合成的啮齿动物 A β 肽 1-40 以确保在稀释的样品基质中精确定量。合成的啮齿动物 A β 肽 1-40 与纯化的抗 A β 抗体(含有 < 1ppm 的总的啮齿动物 A β 肽)一起用作标准蛋白。包含抗体的对照样品(作为总 A β 肽对照)和掺入抗体的合成啮齿动物 A β 肽(1-42)的对照样品(作为 A β 肽 1-42 对照)也被检测。将 ELISA 板在室温下温育 1-2 小时。将孔用洗涤缓冲液清洗 4 次后抽吸。之后,向每孔中加入 100 μ L/孔的在 HBST/Blotto 中稀释的(1:10,000)猴抗-人 IgG-碱性磷酸酶偶联物 (Jackson Immunoresearch, #709-056-149)。在室温下温育 1 到 2 小时、用洗涤缓冲液清洗 4 次并且抽吸后,向每孔中加入 100 μ L 溶解在 1X DEA 缓冲溶液中的 1.0mg/mL pNPP 底物 (Kirkegaard&Perry Laboratories, Inc., #50-80-00) 溶液。ELISA 板在室温下定期摇动温育。当颜色显色充分(通常 2.0 到 2.5 个吸光度单位)后,根据标准参照用酶标仪在

405nm 处为标准蛋白读出吸光度。检测的限度为 0.02ng/mL。定量限度为 0.1ng/mL。用 AAA 分析确定标准蛋白浓度。对于样品, IgG 浓度 (mg/mL) 通过测量在 280nm 的吸光度并且将此值除以消光系数 1.4 得到。应用以上描述的这种 ELISA 分析在 NS0 细胞中表达的抗 A β 抗体, 没有检测到 A β 多肽。

[0134] 实施例 4

[0135] 阳离子交换减少人源化抗 A β 抗体制品中的 A β 肽

[0136] 人源化抗 A β 抗体制品在 CHO 细胞中表达。通过将培养基加入 A 蛋白-琼脂糖柱子中并且用 pH3.1 的 100mM 甘氨酸缓冲液洗脱纯化抗体。从 A 蛋白洗脱下的组分合并通过加入 pH8.0 的 1M Tris 缓冲液将其 pH 调节至 pH7.4 左右。通过 ELISA 测定, 抗体制品中包含 15-20ppm 仓鼠 A β 肽。

[0137] 抗体进一步根据下述用阳离子交换层析纯化。开始的抗体物质通过 50mM pH5.2 的乙酸钠 (5 倍体积, 用 30K 截止 PES 切向流超滤膜) 滤过以减少制品的传导性从而使其上样到阳离子交换柱中。滤过的蛋白质溶液之后加入在 50mM pH 5.2 乙酸钠中平衡的 SP 琼脂糖高效 (GE Healthcare) 柱 (0.66 \times 15cm, 每 mL 柱体积上样 15mg 蛋白质)。所有的操作在室温下进行且其线性速度为 115cm/hr。通电后, 用 5 倍柱体积的 50mM pH5.2 乙酸钠洗涤, 且抗体是逐步被洗脱 (5 倍柱体积的 50mM 乙酸钠, 135mM NaCl, pH5.2) 或者用在 pH5.2 的 50mM 乙酸钠中线性梯度为从 0 到 150mM NaCl 的 15 倍柱体积洗脱。合并主要峰的组分被 (以达到大约 90% 的产率)。用这种方式纯化抗 A β 抗体得到的合并物含有的 A β 肽含量比开始物质低 (在逐步洗脱物质中为 10ppm 和在梯度洗脱物质中为 9ppm)。

[0138] 实施例 5

[0139] 免疫纯化减少抗 A β 抗体中的 A β

[0140] 生长在细胞培养物中的 HEK293 细胞表达结合在人 A β 氨基酸 13-28 的中心结构域上的抗 A β 抗体。通过应用针对 A β 40 羧基端并偶联在琼脂糖珠子上的单克隆抗体 2G3 进行免疫纯化可以将污染的人 A β 肽从抗体中分离出来。抗体制品与 2G3 偶联的珠子在 10 : 1 的体积比下旋转过夜。在过夜温育后, 沉淀琼脂糖珠子以移除 2G3-A β 复合体。之后在免疫纯化之前和之后应用 ELISA 确定在抗 A β 抗体中存在的 A β 肽的量。

[0141] 发现用在本方式免疫纯化和用 ELISA 分析的抗 A β 抗体制品中在纯化前含有 10-25pgA β / μ g IgG, 在纯化后则不含有可以检测到的 A β 。污染的 A β 减少通过实施例 1 中描述的酸凝胶 / 蛋白分析确定。