



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105473153 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 06

(21) 申请号 201480030678. 2

代理人 张文辉

(22) 申请日 2014. 05. 28

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/828, 004 2013. 05. 28 US

61/828, 497 2013. 05. 29 US

A61K 38/16(2006. 01)

A61K 47/48(2006. 01)

C07K 14/01(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/039760 2014. 05. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/193935 EN 2014. 12. 04

(71) 申请人 神经噬菌体制药股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 F. J. 卡尔 T. D. 琼斯 R. A. 费希尔

R. G. E. 霍尔盖特

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

权利要求书6页 说明书30页 附图9页

(54) 发明名称

包含具有减小的免疫原性的经修饰的噬菌体
G3P 氨基酸序列的多肽

(57) 摘要

本发明涉及包含足以结合和 / 或解聚淀粉样蛋白的丝状噬菌体基因 3 蛋白 (g3p) 的一部分, 例如, g3p 的 N1-N2 部分及其突变体和片段的多肽, 其中已通过氨基酸取代修饰该 g3p 氨基酸序列, 以当在体内使用时具有比对应的野生型 g3p 氨基酸序列显著更小的免疫原性。本发明的多肽保持它们结合和 / 或解聚淀粉样蛋白的能力。本发明此外还涉及这些变体 g3p- 多肽在治疗和 / 或预防与淀粉样蛋白的错误折叠或聚集相关的疾病中的用途。

1. 一种多肽,其包含起始氨基酸序列的变体,其中所述起始氨基酸序列选自:SEQ ID NO:1的氨基酸1-217、SEQ ID NO:3的氨基酸1-217、SEQ ID NO:7的氨基酸1-217,和具有以下修饰的一个或多个的任何上述氨基酸序列的突变体:氨基酸43-45处AAA对VVV的取代;取代C53W;氨基酸96-103的缺失;氨基酸212-214处AGA对QPP的取代;取代W181A、F190A和F194A;氨基酸1的缺失;和氨基酸1和2的缺失,其中:

(a)所述多肽结合和/或解聚淀粉样蛋白;

(b)所述多肽相较于包含所述起始氨基酸序列的对应多肽具有减小的免疫原性;

(c)所述变体相较于所述起始氨基酸序列具有1至9个氨基酸取代,其中每一个氨基酸取代选自下文中所示的氨基酸取代的组:

氨基酸编号	存在于起始氨基酸序列中的氨基酸	氨基酸取代
48	G	H、K、R、S、T、D、P
50	E	G、H、K、P、R
51	T	G、H、K、R、P、Q、N、W
53	C	F、H、K、N、Q、R、W、Y
54	Y	G、H、K、R、P
56	T	G、H、K、R、P
135	M	A、D、G、K、N、T、H、R、C、E、P、Q、S
137	Q	D、E
138	N	D、E、G、H、P、Q、S、T
140	R	D、E、H、Q、A、G、M、N、P、S、Y
141	F	D、E
143	N	A、G
173	S	G、P、K、D、H、R、T
174	K	R
175	A	G、H、K、P、R
176	M	G、H、K、N、R、P、Q、W
178	D	G、N、Q、S、T、F、H、K、R、W、Y
179	A	H、K、P、R
181	W	G、H、K、R、P

和

(d)当所述起始氨基酸序列为SEQ ID NO:1的氨基酸1-217时,1至9个氨基酸取代的任一个任选地另外选自下文中所示的氨基酸取代的组:

氨基酸编号	存在于所述起始氨基酸序列中的氨基酸	氨基酸取代
215	V	S、T、C、D、E、F、H、K、N、P、Q、R
218	G	C、E、N、P、Q、S、T、A、H、W
220	G	E、D、F、W、M、Y
221	S	D、E、G
223	G	D、P、E、K、N、R、T

2. 根据权利要求1所述的多肽, 其中所述起始氨基酸序列中的所述1至9个氨基酸取代的每一个选自下文中所示的氨基酸取代的组:

氨基酸编号	存在于所述起始氨基酸序列中的氨基酸	氨基酸取代
48	G	H、K、R、S、T
51	T	G、H、K、R、P、Q、N
54	Y	G、H、K、R、P
56	T	G、H、K、R、P
135	M	A、D、G、K、N、T、H、R
140	R	D、E、H、Q、A、G
141	F	D、E
143	N	A、G
173	S	G、P、K
174	K	R
176	M	G、H、K、N、R
178	D	G、N、Q、S、T
181	W	G、H、K、R

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的多肽, 其中所述起始氨基酸序列选自SEQ ID NO: 1的氨基酸1-217、SEQ ID NO: 3的氨基酸1-217和SEQ ID NO: 7的氨基酸1-217。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的多肽, 其中所述变体氨基酸序列相对于起始氨基酸序列具有2至9个氨基酸取代, 并且其中至少一个取代存在于包含SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7的氨基酸48-56的表位1; 包含SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7的氨基酸135-143的表位2; 和包含SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7的氨基酸173-181的表位3的至少两个中。

5. 根据权利要求4所述的多肽, 其中所述经修饰的氨基酸序列仅具有2个氨基酸取代, 并且其中所述取代选自下文中所示的二氨基酸取代的组:

Y54K 和 M135K	Y54K 和 M135T	Y54K 和 R140Q	Y54R 和 M135K
Y54R 和 M135T	Y54R 和 R140Q	T56H 和 M135K	T56H 和 M135T
T56H 和 R140Q	T56K 和 M135K	T56K 和 M135T	T56K 和 R140Q
Y54K 和 D178N	Y54K 和 W181H	Y54K 和 W181R	Y54K 和 K174R
Y54R 和 D178N	Y54R 和 W181H	Y54R 和 W181R	Y54R 和 K174R
T56H 和 D178N	T56H 和 W181H	T56H 和 W181R	T56H 和 K174R
T56K 和 D178N	T56K 和 W181H	T56K 和 W181R	T56K 和 K174R
M135K 和 D178N	M135K 和 W181H	M135K 和 W181R	M135K 和 K174R
M135T 和 D178N	M135T 和 W181H	M135T 和 W181R	M135T 和 K174R
R140Q 和 D178N	R140Q 和 W181H	R140Q 和 W181R	R140Q 和 K174R

6. 根据权利要求1-3中任一项所述的多肽,其中所述变体氨基酸序列相对于所述起始氨基酸序列具有3至9个氨基酸取代,并且其中至少一个取代存在于包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的氨基酸48-56的表位1;包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的氨基酸135-143的表位2;和包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的氨基酸173-181的表位3的每一个中。

7. 根据权利要求5所述的多肽,其中所述变体氨基酸序列相较于所述起始氨基酸序列仅具有3个氨基酸取代,并且所述取代选自以下组的氨基酸取代的任一个:T56H、M135K和D178N;T56K、M135K和D178N;T56K、M135T和D178N;T56H、M135K和W181R;T56H、M135T和W181R;Y54K、M135T和K174R;Y54R、M135K和K174R;Y54R、M135T和K174R;T56H、M135K和K174R;以及T56H、M135T和K174R。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的多肽,其基本上由通过肽接头或直接地与所述变体氨基酸序列的C末端融合的人或人源化免疫球蛋白Fc多肽序列组成。

9. 根据权利要求8所述的多肽,其中所述免疫球蛋白Fc多肽序列为人IgG的Fc部分。

10. 根据权利要求9所述的多肽,其中所述肽接头和人IgG的Fc部分的氨基酸序列选自SEQ ID NO:1的氨基酸218-488、SEQ ID NO:3的氨基酸218-486和SEQ ID NO:7的氨基酸218-488。

11. 一种由经修饰的起始序列组成的多肽变体,其中所述起始序列选自SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7,并且所述修饰是两个或三个氨基酸取代,所述多肽选自下文所示的多肽的任一个:

多肽编号	起始序列	表位1取代	表位2取代	表位3取代
63	SEQ ID NO:3	Y54K	M135K	无
64	SEQ ID NO:3	Y54K	M135T	无
65	SEQ ID NO:3	Y54K	R140Q	无
66	SEQ ID NO:3	Y54R	M135K	无
67	SEQ ID NO:3	Y54R	M135T	无
68	SEQ ID NO:3	Y54R	R140Q	无
69	SEQ ID NO:3	T56H	M135K	无

70	SEQ ID NO:3	T56H	M135T	无
多肽编号	起始序列	表位1取代	表位2取代	表位3取代
71	SEQ ID NO:3	T56H	R140Q	无
72	SEQ ID NO:3	T56K	M135K	无
73	SEQ ID NO:3	T56K	M135T	无
74	SEQ ID NO:3	T56K	R140Q	无
75	SEQ ID NO:3	Y54K	无	D178N
76	SEQ ID NO:3	Y54K	无	W181H
77	SEQ ID NO:3	Y54K	无	W181R
78	SEQ ID NO:3	Y54K	无	K174R
79	SEQ ID NO:3	Y54R	无	D178N
80	SEQ ID NO:3	Y54R	无	W181H
81	SEQ ID NO:3	Y54R	无	W181R
82	SEQ ID NO:3	Y54R	无	K174R
83	SEQ ID NO:3	T56H	D178N	
84	SEQ ID NO:3	T56H	无	W181H
85	SEQ ID NO:3	T56H	无	W181R
86	SEQ ID NO:3	T56H	无	K174R
87	SEQ ID NO:3	T56K	无	D178N
88	SEQ ID NO:3	T56K	无	W181H
89	SEQ ID NO:3	T56K	无	W181R
90	SEQ ID NO:3	T56K	无	K174R
91	SEQ ID NO:3	无	M135K	D178N
92	SEQ ID NO:3	无	M135K	W181H
93	SEQ ID NO:3	无	M135K	W181R
94	SEQ ID NO:3	无	M135K	K174R
95	SEQ ID NO:3	无	M135T	D178N
96	SEQ ID NO:3	无	M135T	W181H
97	SEQ ID NO:3	无	M135T	W181R
98	SEQ ID NO:3	无	M135T	K174R
99	SEQ ID NO:3	无	R140Q	D178N
100	SEQ ID NO:3	无	R140Q	W181H
101	SEQ ID NO:3	无	R140Q	W181R
102	SEQ ID NO:3	无	R140Q	K174R
110	SEQ ID NO:7	T56H	M135K	D178N
111	SEQ ID NO:7	T56H	M135K	W181H
112	SEQ ID NO:7	T56H	M135K	W181R
113	SEQ ID NO:7	T56H	M135K	K174R
114	SEQ ID NO:7	T56H	M135T	D178N

115	SEQ ID NO:7	T56H	M135T	W181H
116	SEQ ID NO:7	T56H	M135T	W181R
117	SEQ ID NO:7	T56H	M135T	K174R
118	SEQ ID NO:7	T56K	M135K	D178N
119	SEQ ID NO:7	T56K	M135K	W181H
多肽编号	起始序列	表位1取代	表位2取代	表位3取代
120	SEQ ID NO:7	T56K	M135K	W181R
121	SEQ ID NO:7	T56K	M135K	K174R
122	SEQ ID NO:7	T56K	M135T	D178N
123	SEQ ID NO:7	T56K	M135T	W181H
124	SEQ ID NO:7	T56K	M135T	W181R
125	SEQ ID NO:7	T56K	M135T	K174R
126	SEQ ID NO:7	Y54K	M135K	K174R
127	SEQ ID NO:7	Y54K	M135T	K174R
128	SEQ ID NO:7	Y54R	M135K	K174R
129	SEQ ID NO:7	Y54R	M135T	K174R
130	SEQ ID NO:7	T56H	无	D178N
131	SEQ ID NO:7	T56H	无	W181H
132	SEQ ID NO:7	T56H	无	W181R
133	SEQ ID NO:7	T56H	无	K174R
134	SEQ ID NO:7	T56K	无	D178N
135	SEQ ID NO:7	T56K	无	W181H
136	SEQ ID NO:7	T56K	无	W181R
137	SEQ ID NO:7	T56K	无	K174R

12. 根据权利要求11所述的多肽,其选自多肽编号110、112、113、116、117、118、122、127、128或129的任一个。

13. 一种药物组合物,其包含权利要求1-12中任一项所述的多肽和药学上可接受的载体。

14. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于向患者的血流中注射或输注。

15. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述组合物被配制用于向脑或CNS直接施用。

16. 一种在有此需要的患者中减少淀粉样蛋白或 τ 蛋白聚集物的方法,其包括向所述患者施用有效量的权利要求1-12中任一项所述的多肽或权利要求13-15中任一项所述的药物组合物。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述患者正表现出与淀粉样蛋白或 τ 蛋白聚合物的存在相关的神经变性疾病的症状。

18. 根据权利要求16或权利要求17所述的方法,其中当将生物标志物florbetapir在正电子发射计算机断层摄影术中用作成像剂时,所述患者对于所述生物标志物呈阳性。

19. 根据权利要求16-18中任一项所述的方法, 其中所述患者患有神经变性疾病, 其选自阿尔茨海默病, 其包括早发性阿尔茨海默病、迟发性阿尔茨海默病和症状发生前阿尔茨海默病、帕金森氏病、SAA淀粉样变性、朊白酶抑制剂C、遗传性冰岛综合症、衰老、多发性骨髓瘤、朊病毒疾病, 包括但不限于库鲁病、克雅氏病(CJD)、格斯特曼-施特劳斯纳病(GSS)、致死性家族性失眠症(FFI)、瘙痒病和牛海绵状脑炎(BSE); 肌萎缩侧索硬化(ALS)、脊髓小脑性共济失调(SCA1、SCA3、SCA6或SCA7)、亨廷顿舞蹈症、齿状核红核苍白球路易体萎缩症、脊髓和延髓性肌萎缩、遗传性脑淀粉样血管病、家族性淀粉样变性、英国人/丹麦人痴呆、家族性脑病、肌萎缩侧索硬化/帕金森-痴呆综合征、嗜银颗粒痴呆、皮质基底节变性、拳击员痴呆、弥散性神经原纤维缠结钙化、唐氏综合征、格斯特曼-施特劳斯纳病、哈勒沃登-施帕茨病、强直性肌营养不良、尼曼-皮克病C型、非关岛运动神经元疾病与神经原纤维缠结、皮克氏病、脑炎后帕金森氏病、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、进行性皮质下胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎、仅缠结型痴呆、额颞叶退化(FTLD)和额颞叶痴呆(FTD), 包括具有以下临床症状的一个或多个的患者: 行为异常型FTD(bvFTD)、进行非流利失语(PNFA)、与染色体17相关的额颞叶痴呆与帕金森、进行性核上性麻痹(PSP)和语义性痴呆(SD)。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述神经变性疾病是帕金森氏病、阿尔茨海默病或亨廷顿舞蹈症。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述神经变性疾病是阿尔茨海默病。

22. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述患者患有选自克雅氏病、库鲁病、致命性家族性失眠症或格斯特曼-施特劳斯纳综合征的朊病毒介导的疾病。

23. 一种核酸序列, 其编码权利要求1-12所述的多肽的任一个。

24. 根据权利要求23所述的核酸序列, 其还编码与所述多肽编码序列融合且与所述多肽编码序列框内融合的哺乳动物信号序列。

25. 一种载体, 其包含权利要求23或24所述的核酸序列, 其中所述核酸序列可操作地连接于所述载体中的表达控制序列。

26. 一种宿主细胞, 其包含权利要求25所述的载体。

27. 一种方法, 其产生权利要求1-12中任一项所述的多肽, 所述方法包括表达由权利要求23或24所述的核酸序列编码的蛋白质; 和分离所述表达的多肽的步骤。

28. 一种方法, 其产生权利要求1-12中任一项所述的多肽, 所述方法包括在足以允许所述多肽表达的条件下培养权利要求26所述的宿主细胞; 和分离所述表达的多肽的步骤。

包含具有减小的免疫原性的经修饰的噬菌体G3P氨基酸序列的多肽

[0001] 本发明涉及多肽,所述多肽包含足以结合和/或解聚淀粉样蛋白的丝状噬菌体基因3蛋白(g3p)的一部分,例如,g3p的N1-N2部分及其突变体和片段,其中g3p氨基酸序列已通过氨基酸取代被修饰来当在体内使用时具有比对应的野生型g3p氨基酸序列显著更小的免疫原性。本发明的多肽保留它们结合和/或解聚淀粉样蛋白的能力。本发明还涉及这些经修饰的g3p多肽用于治疗 and/或预防与淀粉样蛋白的错误折叠或聚集相关的疾病的用途。

[0002] 已证明丝状噬菌体g3p蛋白以及特别地包含g3p的N1-N2区的其多肽部分结合并解聚各种淀粉样蛋白,诸如 β -淀粉样蛋白、 τ 蛋白和朊病毒蛋白。参见共同未决的PCT申请PCT/US2012/066793以及美国临时申请US 61/801,349和US 61/801,849,所述每一个申请的公开内容通过引用并入本文。也参见,R.Krishnan等,J.Mol.Biol.(2014)。尽管存在该功效,但预期包含g3p或其N1-N2区的多肽的全身性施用可引起有害的免疫答应。然而,这些教导都未鉴定导致g3p的免疫原性性质的特定T细胞表位或建议此处提供的减少或消除这些免疫原性性质的特定修饰。

[0003] 许多重组或另外地非天然治疗性蛋白质或多肽的功效可受患者与所述治疗性蛋白质或多肽的不希望的免疫反应限制。蛋白质对免疫响应的诱导的主要因素是蛋白质内的T细胞表位,即可通过在组织相容性复合物(MHC)II类分子上的呈递刺激T细胞的活性的氨基酸序列的存在。T细胞表位通常被定义为具有结合MHC II类分子的能力的任何氨基酸残基序列。当结合于MHC分子时,T细胞表位可被T细胞受体(TCR)识别,并可通过衔接T细胞受体以促进T细胞响应来引起T细胞的活化。然而,通常应理解,结合MHC II类分子的某些T细胞表位不刺激T细胞响应,因为这些肽在向其施用所述蛋白质的生物体内被识别为“自身的”。

[0004] 一些T细胞表位可在治疗性蛋白质或多肽在细胞内降解过程中被作为肽释放,随后被MHC的分子呈递以触发T细胞的活化。对于由MHC II类分子呈递的肽,T细胞的此类活化则可通过直接刺激B细胞产生此类抗体来产生例如所述抗体响应。

[0005] MHC II类分子是一组在辅助T细胞选择和活化中起着中心作用的高度多态的蛋白质。人白细胞抗原组DR(HLA-DR)是该组蛋白质的占优势的同种型。然而,同种型HLA-DQ和HLA-DP进行相似的功能。在人中,已知DR同种型的约70种不同的同种异型,对于DQ,存在30种不同的同种异型以及对于DP,已知47种不同的同种异型。每一个个体具有2至4个DR等位基因,2个DQ和2个DP等位基因。

[0006] 个体中针对蛋白质或多肽的免疫响应严重受到T细胞表位识别影响,所述T细胞表位识别是该个体的HLA-DR同种异型的肽结合特异性的函数。为了在全球人口的背景中鉴定蛋白质或多肽内的T细胞表位,期望考虑尽可能多样的一组HLA-DR同种异型的结合性质,从而覆盖尽可能高的百分比的世界人口。

[0007] T细胞表位鉴定是表位消除的第一步。使得能够检测T细胞表位的方法在本领域中是已知的并且公开于W0 98/52976、W0 00/34317、US2007/0269435;US 7,208,147、Kern等,Nature Medicine4:975-978(1998);和Kwok等,Trends in Immunology 22:583-588

(2001)中。在这些方法中,通过在治疗性蛋白质或多肽的一级序列内使用明智的氨基酸取代来除去预测的或鉴定的T细胞表位。虽然这些参考资料使得能够进行T细胞表位的假定鉴定,但避免对生物活性的负面影响的氨基酸取代的选择不能被合理地预测。这仅可通过测试经修饰的多肽的每一个的此类活性来测定。

[0008] 因此,可能期望检查和减小g3p的N1-N2部分的免疫原性而不破坏其淀粉样蛋白-结合/解聚性质,以便可为了治疗和/或诊断目的长期全身性施用包含N1-N2部分的多肽。本发明通过鉴定N1-N2序列内的潜在T细胞表位来满足该需要。本发明还鉴定了在这些潜在T细胞表位内的特定氨基酸取代以产生变体N1-N2序列,所述变体N1-N2序列将减少或消除T细胞表位的免疫原性而不破坏变体N1-N2结合淀粉样蛋白、阻止淀粉样蛋白聚集和/或实现淀粉样蛋白斑的解聚的能力。

[0009] 在一个实施方案中,本发明还提供了多肽,所述多肽包含N1-N2氨基酸序列的变体或其突变体或片段,由于一个或多个鉴定的T细胞表位内的一个或多个氨基酸取代而具有减小的免疫原性。在一个方面,本发明提供了包含与人免疫球蛋白Fc区融合的变体N1-N2序列的融合蛋白。

[0010] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含本发明的多肽的药物组合物,以及通过向患有与错误折叠和/或聚集的淀粉样蛋白蛋白质相关的疾病或对所述疾病易感的受试者施用此类药物组合物来治疗或预防此类疾病的方法。

[0011] 在其它实施方案中,本发明提供了编码本发明的多肽的核酸分子,以及包含那些核酸分子的载体和具有此类载体的细胞。

[0012] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于产生本发明的多肽的方法。具体地,此类方法使用所述核酸分子和/或具有包含此类核酸分子的载体的细胞。

[0013] 附图简述

[0014] 图1显示具有5个通过粗体和下划线标识的T细胞表位的N1-N2-hIgG1-Fc融合蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。氨基酸1-217构成野生型g3p序列的N1-N2部分。氨基酸218-256代表由存在于M13噬菌体中的野生型g3p的富含甘氨酸的N2-C末端接头组成的接头区。该区域通过阴影来标识。氨基酸257-261代表由用于构建编码融合蛋白的核酸分子的多克隆位点编码的氨基酸。蛋白质的IgG-Fc部分始于氨基酸262。

[0015] 图2代表具有4个通过下划线标识的T细胞表位的g3p-hIgG1-Fc融合蛋白(SEQ ID NO:2)的替代实施方案的氨基酸序列。已通过删除对应于SEQ ID NO:1的氨基酸258至259的氨基酸来消除第五T细胞表位。

[0016] 图3显示具有3个通过粗体和下划线标识的T细胞表位的g3p-hIgG1-Fc融合蛋白(SEQ ID NO:3)的另一个替代实施方案的氨基酸序列。已通过V215A和G220E的取代(相较于SEQ ID NO:1)消除了第四T细胞表位,以及已通过删除对应于SEQ ID NO:1的氨基酸258和259的氨基酸消除了第五T细胞表位。

[0017] 图4A显示编码具有N末端哺乳动物信号序列的SEQ ID NO:1的g3p-hIgG1-Fc融合蛋白的DNA序列(SEQ ID NO:4)。图4B显示编码具有N末端哺乳动物信号序列的SEQ ID NO:2的g3p-hIgG1-Fc融合蛋白的DNA序列(SEQ ID NO:5)。

[0018] 图5显示编码具有N末端哺乳动物信号序列的SEQ ID NO:3的g3p-hIgG1-Fc融合蛋白的DNA序列(SEQ ID NO:6)。

[0019] 图6提供在实施例1中描述的研究中表达的供体同种异型的频率的比较。

[0020] 图7显示具有3个通过粗体和下划线标识的T细胞表位的g3p-hIgG1-Fc融合蛋白(SEQ ID NO:7)的另一个替代实施方案的氨基酸序列。已通过V215G取代(如相较于SEQ ID NO:1)消除第四T细胞表位。

[0021] 图8显示编码具有N末端哺乳动物信号序列的SEQ ID NO:7的g3p-hIgG1-Fc融合蛋白的DNA序列(SEQ ID NO:8)。

[0022] 发明详述

[0023] 在本申请中,关于参照(未修饰的)氨基酸或核酸序列的术语“经修饰的”(及其同源词)是指含有一个或多个氨基酸取代或对应的密码子取代的序列。修饰不一定需要参照序列的物理操作。只要序列含有如相较于参照序列的此类取代,其就可被认为是“经修饰的”,无论其是如何合成的。术语“变体”是指已被修饰来相较于参照序列减小免疫原性的氨基酸或核酸序列。如本文中所用,“变体g3p”或“变体N1-N2”是指这样的氨基酸序列(或编码其的核酸序列),所述序列包含丝状噬菌体g3p蛋白的N1-N2部分(例如,SEQ ID NO:1的氨基酸1-217),或(b)结合和/或解聚淀粉样蛋白的该氨基酸序列的突变体或片段(例如,SEQ ID NO:3的氨基酸1-217),其中所述氨基酸序列(或编码其的核酸序列)已被修饰来相较于参照(未修饰的)氨基酸序列减小免疫原性;以及其中所述修饰由选自表1、表2、表6或表7的任一个中所示的氨基酸取代或对应取代的组的1至9个选自氨基酸取代组成。如本文中所用,术语“对应取代”意指当将此类突变体或片段与SEQ ID NO:1的氨基酸1-217比对时,对应于表1、表2、表6或表7中的等同氨基酸取代的SEQ ID NO:1的突变体或氨基酸1-217的片段中的取代。

[0024] 结合和/或解聚淀粉样蛋白的SEQ ID NO:1的氨基酸1-217的片段的实例包括,但不限于,包含SEQ ID NO:1的氨基酸1-67的任何片段。结合和/或解聚淀粉样蛋白的SEQ ID NO:1的氨基酸1-217的片段的突变体的实例包括,但不限于:(1)SEQ ID NO:3的氨基酸1-217;(2)在氨基酸43-45处具有AAA对VVV的取代的SEQ ID NO:1的氨基酸1-217、SEQ ID NO:3的氨基酸1-217或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217;(3)具有取代C53W的SEQ ID NO:1的氨基酸1-217、SEQ ID NO:3的氨基酸1-217或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217;(4)具有氨基酸96-103的缺失的SEQ ID NO:1的氨基酸1-217、SEQ ID NO:3的氨基酸1-217或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217;(5)在氨基酸212-214处具有AGA对QPP的取代的SEQ ID NO:1的氨基酸1-217、SEQ ID NO:3的氨基酸1-217或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217;(6)具有取代W181A、F190A和F194A的SEQ ID NO:1的氨基酸1-217、SEQ ID NO:3的氨基酸1-217或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217;(7)PCT/US2012/066793中公开的其它活性突变体和片段;(8)SEQ ID NO:7的氨基酸1-217;(9)SEQ ID NO:1的氨基酸2-217、SEQ ID NO:3的氨基酸2-217或SEQ ID NO:7的氨基酸2-217;(10)SEQ ID NO:1的氨基酸3-217、SEQ ID NO:3的氨基酸3-217或SEQ ID NO:7的氨基酸3-217。

[0025] 先前已显示丝状噬菌体g3p蛋白的N1-N2部分具有淀粉样蛋白结合和解聚性质(参见PCT/US2012/066793)。天然M13噬菌体的N1-N2部分由SEQ ID NO:1的氨基酸1-217代表。相同的N1-N2氨基酸序列也存在于fd和f1丝状噬菌体中。应当理解,SEQ ID NO:1的氨基酸218-256也是天然g3p序列的部分并且通常被称为将g3p的N2区连接至g3p(CT)的C末端的富含甘氨酸的接头,也称为N3结构域。SEQ ID NO:1的氨基酸257-261代表由用于构建编码SEQ

ID NO:1的融合蛋白的核酸分子的多克隆位点编码的氨基酸。

[0026] 多肽

[0027] 因此,在一个实施方案中,本发明提供包含变体g3p或变体N1-N2的多肽。本发明的更具体的实施方案提供了包含选自SEQ ID NO:1的氨基酸1-217、SEQ ID NO:3的氨基酸1-217和SEQ ID NO:7的氨基酸1-217的起始氨基酸序列的变体的多肽,其中:(a)所述多肽结合和/或解聚淀粉样蛋白;(b)所述多肽相较于包含起始氨基酸序列的对应多肽具有减小的免疫原性;和(c)所述变体相较于所述起始氨基酸序列具有1至9个氨基酸取代,其中每一个氨基酸取代选自表1和表2中所示的氨基酸取代的组。如本文中所用,术语“包含起始氨基酸序列的对应多肽”意指除取代外具有与包含所述起始氨基酸序列的多肽相同的氨基酸序列的多肽。

[0028] 表1.针对SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217的去免疫化氨基酸取代。

[0029]

表位	氨基酸编号	存在于SEQ ID NO:1的 指定的氨基酸编号 处的氨基酸*	取代
1	48	G	H, K, R, S, T
1	51	T	G, H, K, R, P, Q, N
1	54	Y	G, H, K, R, P
1	56	T	G, H, K, R, P
2	135	M	A, D, G, K, N, T, H, R
2	140	R	D, E, H, Q, A, G
2	141	F	D, E
2	143	N	A, G
3	173	S	G, P, K
3	174	K	R
3	176	M	G, H, K, N, R
3	178	D	G, N, Q, S, T
3	181	W	G, H, K, R

[0030] 表2.针对SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217的替代性或另外的去免疫化氨基酸取代。

[0031]

表位	氨基酸编号	存在于SEQ ID NO: 1的 指定的氨基酸编号 处的氨基酸*	取代
1	48	G	D, P
1	50	E	G, H, K, F, R
1	81	T	W
1	53	C	F, H, K, N, Q, R, W, Y
2	135	M	C, E, F, Q, S
2	137	Q	D, E
2	138	N	D, E, G, H, P, Q, S, T
2	140	R	M, N, P, S, Y
2	141	F	G, N, F, Q, Y
3	173	S	D, H, R, T
3	175	A	G, H, K, P, R
3	176	M	P, Q, W
3	178	D	F, H, K, R, W, Y
3	179	A	H, K, P, R
3	181	W	P

[0032] *在表1和2中,每一个指定的氨基酸在SEQ ID NOS:1、3和7中是相同的。

[0033] 通过鉴定完全存在于N1-N2氨基酸序列内的T细胞表位来导出表1和2中所示的氨基酸取代。这通过将N1-N2序列的不同重叠肽部分针对来自一个组群的最佳地代表HLA-DR同种异型的世界人口的社区供血者的外周血单核细胞(PBMC)进行孵育以鉴定潜在T细胞表位来进行。随后将该信息经历针对已知T细胞表位的数据库的软件分析以鉴定那些潜在表位内的最佳氨基酸取代。这些方法详细地描述于实施例。

[0034] 在这些实施方案的一个方面,1-9个氨基酸取代选自表1中所示的那些氨基酸取代。在上文所示的实施方案的更具体方面,所述多肽包含仅具有特定的单氨基酸取代的SEQ ID NO:1的氨基酸1-217的变体或SEQ ID NO:3的氨基酸1-217的变体或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217的变体,其中所述取代选自表3中所示的取代之一:

[0035] 表3. SEQ ID NO:1的氨基酸1-217、SEQ ID NO:3的氨基酸1-217或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217中的特定去免疫化单氨基酸取代

[0036]

G48H	G48K	G48R	G48S
G48T	T51G	T51H	T51K
T51P	T51R	T51Q	T51N
Y54G	Y54H	Y54K	Y54P
Y54R	T56G	T56H	T56K
T56P	T56R	M135A	M135D
M135G	M135H	M135K	M135N
M135R	M135T	R140A	R140D
R140E	R140G	R140H	R140Q

F141D	F141E	N143A	N143G
S173G	S173P	M176G	M176H
M176K	M176N	D178G	D178N
D178Q	D178S	W181G	W181H
W181K	W181R	S173K	K174R
M176R	D178T		

[0037] 在一些实施方案中,多肽包含具有2-9个氨基酸取代的SEQ ID NO:1的氨基酸1-217的变体或SEQ ID NO:3的氨基酸1-217的变体、或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217的变体,其中所述取代存在于表位1、2和3的至少两个中,并且其中所述取代选自表1和2中所示的那些表位。在更具体方面,SEQ ID NO:1的氨基酸1-217的变体或SEQ ID NO:3的氨基酸1-217的变体或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217的变体中的至少2个取代选自表1中所示的那些取代。在甚至更具体方面,所述多肽包含仅具有2个氨基酸取代的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的变体,其中所述取代选自表4中所示的任何特定的二氨基酸取代:

[0038] 表4.SEQ ID NO:1的氨基酸1-217、SEQ ID NO:3的氨基酸1-217或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217中的特定的去免疫化的二氨基酸取代:

[0039]	Y54K 和 M135K	Y54K 和 M135T	Y54K 和 R140Q	Y54R 和 M135K
	Y54R 和 M135T	Y54R 和 R140Q	T56H 和 M135K	T56H 和 M135T
	T56H 和 R140Q	T56K 和 M135K	T56K 和 M135T	T56K 和 R140Q
	Y54K 和 D178N	Y54K 和 W181H	Y54K 和 W181R	Y54K 和 K174R
	Y54R 和 D178N	Y54R 和 W181H	Y54R 和 W181R	Y54R 和 K174R
	T56H 和 D178N	T56H 和 W181H	T56H 和 W181R	T56H 和 K174R
[0040]	T56K 和 D178N	T56K 和 W181H	T56K 和 W181R	T56K 和 K174R
	M135K 和 D178N	M135K 和 W181H	M135K 和 W181R	M135K 和 K174R
	M135T 和 D178N	M135T 和 W181H	M135T 和 W181R	M135T 和 K174R
	R140Q 和 D178N	R140Q 和 W181H	R140Q 和 W181R	R140Q 和 K174R

[0041] 在另一个实施方案中,所述多肽包含具有3-9个氨基酸取代的SEQ ID NO:1的氨基酸1-217的变体或SEQ ID NO:3的氨基酸1-217的变体、或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217的变体,其中至少一个氨基酸取代存在于表位1、2和3的每一个中,并且其中所述取代选自表1和表2中所示的取代。在更具体方面,SEQ ID NO:1的氨基酸1-217的变体或SEQ ID NO:3的氨基酸1-217的变体或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217的变体中的至少3个氨基酸取代选自表2中所示的取代。在甚至更具体方面,包含SEQ ID NO:1的氨基酸1-217的变体或SEQ ID NO:3的氨基酸1-217的变体或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217的变体的多肽仅具有3个氨基酸取代,其中所述取代选自表5中所示的任何特定的三氨基酸取代。

[0042] 表5.SEQ ID NO:1的氨基酸1-215、SEQ ID NO:3的氨基酸1-217或SEQ ID NO:7的氨基酸1-217中的特定的去免疫化的三氨基酸取代:

[0043]	Y54K、M135K 和 D178N	Y54K、M135T 和 D178N	Y54K、R140Q 和 D178N	Y54R、M135K 和 D178N
	Y54R、M135T 和 D178N	Y54R、R140Q 和 D178N	T56H、M135K 和 D178N	T56H、M135T 和 D178N
	T56H、R140Q 和 D178N	T56K、M135K 和 D178N	T56K、M135T 和 D178N	T56K、R140Q 和 D178N
	Y54K、M135K 和 W181H	Y54K、M135T 和 W181H	Y54K、R140Q 和 W181H	Y54R、M135K 和 W181H
	Y54R、M135T 和 W181H	Y54R、R140Q 和 W181H	T56H、M135K 和 W181H	T56H、M135T 和 W181H
	T56H、R140Q 和 W181H	T56K、M135K 和 W181H	T56K、M135T 和 W181H	T56K、R140Q 和 W181H
	Y54K、M135K 和 W181R	Y54K、M135T 和 W181R	Y54K、R140Q 和 W181R	Y54R、M135K 和 W181R
[0044]	Y54R、M135T 和 W181R	Y54R、R140Q 和 W181R	T56H、M135K 和 W181R	T56H、M135T 和 W181R
	T56H、R140Q 和 W181R	T56K、M135K 和 W181R	T56K、M135T 和 W181R	T56K、R140Q 和 W181R
	Y54K、M135K 和 K174R	Y54K、M135T 和 K174R	Y54K、R140Q 和 K174R	Y54R、M135K 和 K174R
	Y54R、M135T 和 K174R	Y54R、R140Q 和 K174R	T56H、M135K 和 K174R	T56H、M135T 和 K174R
	T56H、R140Q 和 K174R	T56K、M135K 和 K174R	T56K、M135T 和 K174R	T56K、R140Q 和 K174R

[0045] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含g3p变体的多肽,其中1至9个取代之一是选自V215A、V215S、V215G或V215T、V215C、V215D、V215E、V215F、V215H、V215K、V215N、V215P、V215Q或V215R的表位4中的取代。在另一个实施方案中,本发明提供了包含SEQ ID NO:1的氨基酸1-217的变体的多肽,其中1至9个取代之一是选自V215A、V215S、V215G、V215T、V215C、V215D、V215E、V215F、V215H、V215K、V215N、V215P、V215Q或V215R的表位4中的取代。通过测试N1-N2序列的重叠潜在的T细胞表位肽部分,本申请人已确定SEQ ID NO:1中的V215是跨越SEQ ID的氨基酸215-223(N2的末端至富含甘氨酸的接头的一部分)的潜在T细胞表位(图1中的表位4)的部分。表位4(参见SEQ ID NO:3)中的V215A和G220E取代不影响多肽结合淀粉样蛋白的能力,但随后的分析表明,当与表位1、2和3的每一个中的表1和表2中指定的某些变化组合时,这些取代的一个或两个降低所得多肽解聚淀粉样蛋白的能力。相较于SEQ ID NO:1的表位4中单个V215G取代(参见SEQ ID NO:7)不影响多肽结合或解聚淀粉样蛋白的能力。通过软件和数据库分析来预测这些表位4取代的每一个,以消除T细胞表位。类似地预测上文中所示的V215的每一个另外的取代以消除T细胞表位,同时对淀粉样蛋白结合几乎没有或没有影响。

[0046] 在更具体方面,包含SEQ ID NO:1的氨基酸1-217的变体的多肽具有上文中所示的V215取代之一以及表1或表2中所示的1至8个氨基酸取代。在甚至更具体的实施方案中,所

述1-8个氨基酸取代选自表1中所示的那些取代。在甚至更具体方面,所述多肽具有上文中所示的任一个V215取代,并且一个另外的单氨基酸取代选自表3中所示的那些取代。在更具体方面,包含SEQ ID NO:1的氨基酸1-217的变体的多肽具有上文中所示的任一个V215取代和2-8个另外的氨基酸取代,其中另外的取代存在于表位1、2和3的至少两个中,并且其中所述取代选自表1或表2中所示的那些取代。在甚至更具体的实施方案中,表位1、2和3的至少两个中的所述至少一个取代选自表1中所示的取代。在甚至更具体的实施方案中,所述多肽具有上文中所示的V215取代之一,和表4中所示的特定的二氨基酸取代之一。

[0047] 在更具体方面,包含SEQ ID NO:1的氨基酸1-217的变体的多肽具有上文中所示的任一个V215取代,和选自表1或表2中所示的那些取代的3-8个另外的氨基酸取代,其中表位1、2和3的每一个包含所述另外的取代之一。在甚至更具体的实施方案中,表位1、2和3的每一个中的取代选自表1中所示的那些取代。在更具体的实施方案中,所述多肽具有上文中所示的V215取代之一,和表5中所示的特定的三氨基酸取代之一。在甚至更具体的实施方案中,所述多肽具有V215G取代和选自以下取代的三氨基酸取代:T56H、M135K和D178N;T56K、M135K和D178N;T56K、M135T和D178N;T56H、M135K和W181R;T56H、M135T和W181R;Y54K、M135T和K174R;Y54R、M135K和K174R;Y54R、M135T和K174R;T56H、M135K和K174R;以及T56H、M135T和K174R。

[0048] 在另一个实施方案中,本发明的多肽是基本上由通过肽接头与变体g3p氨基酸序列的C末端融合或直接与变体g3p氨基酸序列的C末端融合的人或人源化免疫球蛋白Fc多肽序列组成的融合蛋白。如本文中所用,术语“肽接头”是指一系列不会干扰多肽的功能的连续氨基酸。如上文中所示,在SEQ ID NO:1-3和7中,氨基酸218-256代表通常存在于M13g3p蛋白中的富含甘氨酸的接头。可使用该接头或从而可在本发明的多肽中取代不同的接头。或者,可将Fc多肽序列直接连接于编码N2的最后一个氨基酸(例如,SEQ ID NO 1-3的氨基酸217)。接头序列和/或其不存在的选择可由本领域技术人员考虑可用于本发明的多肽的重组表达的载体以及此类接头可能赋予所述多肽的任何二级或三级结构来进行。在本实施方案的一个方面,所述Fc多肽是人IgG的Fc部分。在更具体的方面,所述多肽是其中具有选自表1、表2、或下文中的表6或表7中所示的氨基酸取代的组的1至9个氨基酸残基取代的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的变体:

[0049] 表6. 针对SEQ ID NO:1的氨基酸215-223的去免疫化氨基酸取代。

	表位	氨基酸编号	存在于 SEQ ID NO: 1 的氨基酸 1-215 中的氨基酸	取代
[0050]	4	215	V*	A*、S、G**、T
	4	218	G	C、E、N、P、Q、S、T
	4	220	G*	E*、D、F、W
	4	221	S	D、E、G
	4	223	G	D、P

[0051] 表7. 针对SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸215-223的替代性和另外的去免疫化氨基酸取代。

	表位	氨基酸编号	存在于 SEQ ID NO 1-3 的氨基酸 1-215 中的氨基酸	取代
[0052]	4	215	V***	C、D、E、F、H、K、N、P、Q、R
	4	218	G	A、H、W
	4	220	G*	M、Y
	4	223	G	E、K、N、R、T

[0053] *V215A和G220E已在SEQ ID NO:3中被取代,以便SEQ ID NO:3的变体在这些氨基酸残基上可不含其它取代。

[0054] **V215G取代已存在于SEQ ID NO:7中,以便SEQ ID NO:7的变体在这些氨基酸残基上可不含其它取代。

[0055] 在甚至更具体方面,所述多肽是具有2-9个氨基酸取代的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的变体,其中所述取代之一是表6和表7中所示的取代;并且所述取代的至少一个是表1和表2中所示的取代。在更具体的方面,所述多肽是SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的变体,并且具有2-9个氨基酸取代;表6中所示的取代的至少一个;和表1中所示的取代的至少一个。在另一个更具体方面,所述多肽是SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的变体并且具有3-9个氨基酸取代,其中所述取代的至少一个选自表6和表7中所示的取代,并且其中表位1、2和3的至少两个含有选自表1和表2中所示的取代的至少一个取代。在更具体的方面,所述多肽是SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的变体并且具有表6中所示的取代的至少一个和选自表1中所示的取代的表位1、2和3的至少两个中的至少一个取代。在另一个更具体的方面,所述多肽是SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的变体并且具有4-9个氨基酸取代;表6和表7中所示的取代的至少一个;以及选自表1和表2中所示的取代的表位1、2和3的每一个中的至少一个取代。在更具体的方面,所述多肽是SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的变体,并且具有表6中所示的取代的至少一个和选自表1中所示的那些取代的表位1、2和3的每一个中的至少一个取代。在另一个更具体的方面中,所述多肽是SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的变体,并且具有表6中所示的取代的至少一个;和至少一个表3、表4或表5中分别所示的特定取代单氨基酸取代、二氨基酸取代或三氨基酸取代。在本实施方案的另一个更具体的方面中,所述多肽是SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的变体,并且仅具有表6中所示的氨基酸取代之一和选自分别在表3、表4或表5中所示的特定的单氨基酸取代、二氨基酸取代或三氨基酸取代的仅1个、2个或3个另外的氨基酸取代。

[0056] 在可替代实施方案中,所述多肽是SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的变体,并且具有选自表1和表2中所示的氨基酸取代的组的1至9个氨基酸取代。在更具体的方面,至少一个取代示于表1中。在另一个更具体的方面,所述多肽是SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的变体,并且具有2-9个氨基酸取代和选自表1和2中所示的任何取代的表位1、2和3的至少两个中的至少一个取代。在更具体的方面中,表位1、2和3的至少2个中的至少一个取代选自表1中所示的那些取代。在另一个更具体的方面,所述多肽是SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的变体并且具有3-9个氨基酸取代,其中至少一个取代存在于表位1、2和3中的每一个中,并且选自表1和表2中所示的任何取代。在更具体的方面,表位1、2和3的每一个中的所述至少一个取代

选自表1中所示的那些取代。在甚至更具体的实施方案中,所述多肽是SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的变体并且具有选自分别在表3、表4或表5中所示的特定的单氨基酸取代、二氨基酸取代或三氨基酸取代的仅1个、2个或3个氨基酸取代。

[0057] 在另一个实施方案中,本发明的多肽是仅具有选自表4中所示的任何特定的二氨基酸取代的2个氨基酸取代的SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的变体。在另一个实施方案中,本发明的多肽是仅具有选自表5中所示的任何特定的三氨基酸取代的3个氨基酸取代的SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的变体。在更具体的实施方案中,本发明的多肽是仅具有选自表5中所示的任何特定的三氨基酸取代的3个氨基酸取代的SEQ ID NO:7的变体。在另一个更具体的实施方案中,本发明的多肽是仅具有选自任何以下组的特定的三氨基酸取代的3个氨基酸取代的SEQ ID NO:7的变体:T56H、M135K和D178N;T56K、M135K和D178N;T56K、M135T和D178N;T56H、M135K和W181R;T56H、M135T和W181R;Y54K、M135T和K174R;Y54R、M135K和K174R;Y54R、M135T和K174R;T56H、M135K和K174R;和T56H、M135T和K174R。

[0058] 核酸分子、序列、载体和宿主细胞

[0059] 在其它实施方案中,本发明提供了包含编码任何包含上述g3p变体的多肽或融合蛋白的核酸序列的分离的核酸分子。在该实施方案的一个方面,所述分离的核酸分子包含被1-9个密码子取代修饰的SEQ ID NO:4的核苷酸64-714的变体,其中每一个密码子取代对应于选自表1和表2中所示的取代和以下V215氨基酸取代的任一个的氨基酸取代:V215A、V215S、V215G或V215T、V215C、V215D、V215E、V215F、V215H、V215K、V215N、V215P、V215Q和V215R。在这些实施方案的甚至更具体的方面,所述变体核酸序列通过被选择来编码上文中所示的V215氨基酸取代的任一个的一个密码子取代和1至8个另外的密码子取代来修饰,其中所述另外的密码子取代的每一个被选择来编码表1中所示的氨基酸取代。在这些实施方案的更具体的方面,所述变体核酸序列通过被选择来编码上文中所示的V215氨基酸取代的任一个的一个密码子取代和2至8个另外的密码子取代来修饰,其中每一个另外的密码子取代编码表1中所示的氨基酸取代,并且密码子取代存在于表位1、2和3的至少两个的每一个中。在更具体的实施方案中,所述变体核酸序列通过被选择来编码上文中所示的V215氨基酸取代的任一个的一个密码子取代和3至8个另外的密码子取代来修饰,其中每一个另外的密码子取代编码表1中所示的氨基酸取代,并且密码子取代存在于表位1、2和3的每一个中。在更具体的实施方案中,所述变体核酸序列通过被选择来编码V215A氨基酸取代的一个密码子取代和被选择来编码表3中所示的单氨基酸取代之一的一个另外的密码子取代来修饰。在更具体的实施方案中,所述变体核酸序列通过被选择来编码V215G氨基酸取代之一密码子取代和被选择来编码表3中所示的单氨基酸取代之一的一个另外的密码子取代来修饰。在另一个具体的实施方案中,所述变体核酸序列通过被选择来编码上文中所示的V215A氨基酸取代之一密码子取代和被选择来编码表4中所示的特定的二氨基酸取代之一的2个另外的密码子取代来修饰。在另一个具体的实施方案中,所述变体核酸序列通过被选择来编码上文中所示的V215G氨基酸取代之一密码子取代和被选择来编码表4中所示的特定的二氨基酸取代之一的2个另外的密码子取代来修饰。在另一个具体的实施方案中,所述变体核酸序列通过被选择来编码上文中所示的V215氨基酸取代之一密码子取代和被选择来编码表5中所示的特定的三氨基酸取代之一的3个另外的密码子取代来修饰。在另一个具体的实施方案中,所述变体核酸序列通过被选择来编码上文中所示的V215G氨基酸取代之一密

码子取代和被选择来编码表5中所示的特定的三氨基酸取代之一的3个另外的密码子取代来修饰。

[0060] 在其它实施方案中,所述分离的核酸分子包含SEQ ID NO:4的核苷酸64-1530或SEQ ID NO:5的核苷酸64-1524的变体,其中所述序列通过1-9个密码子取代来修饰,其中每一个密码子取代对应于选自表1、表2中所示的取代的氨基酸取代和以下V215氨基酸取代的任一个:V215S、V215G或V215T、V215C、V215D、V215E、V215F、V215H、V215K、V215N、V215P、V215Q和V215R。在更具体的实施方案中,每一个密码子取代对应于选自表1中所示的取代的氨基酸取代和上文中所示的V215取代的任一个。在更具体的实施方案中,所述变体核酸序列通过被选择来编码上文中所示的V215氨基酸取代的任一个的一个密码子取代和1-8个另外的密码子取代来修饰,其中所述另外的密码子取代的每一个对应于选自表1中所示的取代的氨基酸取代。在更具体的实施方案中,所述变体具有对应于表3中所示的特定的单氨基酸取代之一的一个另外的密码子取代。在更具体的实施方案中,SEQ ID NO:4的核苷酸64-1530或SEQ ID NO:5的核苷酸64-1524的变体具有修饰,所述修饰由被选择来编码上文中所示的V215氨基酸取代的任一个的一个密码子取代和2-8个另外的密码子取代组成,其中每一个另外的密码子取代对应于表1中所示的氨基酸取代,并且密码子取代存在于表位1、2和3的至少两个的每一个中。在更具体的方面,所述变体具有对应于表4中所示的特定的二氨基酸取代之一的2个另外的密码子取代。在更具体的实施方案中,SEQ ID NO:4的核苷酸64-1530或SEQ ID NO:5的核苷酸64-1524的任一个的变体具有由被选择来编码上文中所示的V215氨基酸取代的任一个的一个密码子取代和3-8个另外的密码子取代组成的修饰,其中每一个另外的密码子取代对应表1中所示的氨基酸取代,并且密码子取代存在于表位1、2和3的每一个中。在更具体的方面,所述变体具有对应于表5中所示的特定的三氨基酸取代之一的3个另外的密码子取代。

[0061] 在其它实施方案中,所述分离的核酸分子包含SEQ ID NO:6的核苷酸64-1524或SEQ ID NO:8的核苷酸64-1524的变体,其中所述变体核酸序列通过1-9个密码子取代来修饰,其中每一个密码子取代对应于选自表1或表2中所示的取代的氨基酸取代。在更具体的实施方案中,每一个密码子取代对应于选自表1中所示的取代的氨基酸取代。在甚至更具体的实施方案中,所述变体具有对应于表3中所示的特定的单氨基酸取代之一的一个密码子取代。在更具体的实施方案中,SEQ ID NO:6的核苷酸64-1524或SEQ ID NO:8的核苷酸64-1524的变体通过2-8个密码子取代来修饰,其中每一个密码子取代对应于表1中所示的氨基酸取代,并且密码子取代存在于表位1、2和3的至少2个的每一个中。在更具体的方面,所述变体具有对应于表4中所示的特定的二氨基酸取代之一的2个另外的密码子取代。在更具体的实施方案中,SEQ ID NO:6的核苷酸64-1524或SEQ ID NO:8的核苷酸64-1524的变体通过3-8个密码子取代来修饰,其中每一个密码子取代对应于表1中所示的氨基酸取代,并且密码子取代存在于表位1、2和3的每一个中。在更具体的方面,所述变体具有对应于表5中所示的特定的三氨基酸取代之一的3个另外的密码子取代。在甚至更具体的方面,所述变体具有对应于以下特定组的三氨基酸取代之一的3个另外的密码子取代:T56H、M135K和D178N; T56K、M135K和D178N; T56K、M135T和D178N; T56H、M135K和W181R; T56H、M135T和W181R; Y54K、M135T和K174R; Y54R、M135K和K174R; Y54R、M135T和K174R; T56H、M135K和K174R; 和T56H、M135T和K174R。

[0062] 在本发明的核酸分子的其它实施方案中,所述核酸分子还包含编码与编码变体g3p的核酸序列的5'末端同相且直接融合的信号序列的核酸序列。在这些实施方案的一个方面,编码信号序列的核酸序列是SEQ ID NO:4的核苷酸1-63。

[0063] 本发明的核酸分子包括与上述核酸分子简并的,但编码与由任何上述核酸分子编码的氨基酸序列相同的氨基酸序列的核酸序列。

[0064] 对于重组产生,可将本发明的任何核酸分子插入适当的表达载体,所述表达载体含有用于所述插入的编码序列的转录和翻译的必需元件,或在RNA病毒载体的情况下,用于复制和翻译的必需元件。将编码核酸插入合适读框中的载体。因此,本发明提供了包含本发明的核酸分子和序列的载体。此类载体包括,但不限于,DNA载体、噬菌体载体、病毒载体、逆转录病毒载体等。可由本领域技术人员使用载体与在其中进行表达的选定的宿主细胞的相容性的众所周知的知识来选择在其中克隆本发明的核酸分子和序列的适当的载体。这可在任何哺乳动物细胞、植物细胞、昆虫细胞、细菌细胞、酵母细胞等中进行。用于这些细胞类型的每一个类型的适当的载体在本领域中是公知的并且通常是商购可得的。

[0065] 在另一个实施方案中,本发明提供了具有含有本发明的核酸分子或核酸序列的载体的宿主细胞。用于转染或转化或另外地获得本发明的载体的方法在本领域中是已知的。具有所述载体的细胞,当在适当的条件下培养时,将产生本发明的多肽。用于本发明的多肽的重组产生的载体和细胞的特定实例示于下文中的实施例部分。

[0066] 药物组合物

[0067] 在一些实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含任选地与药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂一起的包含变体g3p的任何多肽或融合蛋白。“药物组合物”是指治疗有效量的具有生理上合适的载体和/或赋形剂的如本文所述的组合物。药物组合物不引起对生物体的显著刺激。可互换使用的短语“生理上合适的载体”和“药学上可接受的载体”是指不引起对生物体的显著刺激并且不消除所施用的组合物的生物活性和性质的载体或稀释剂。术语“赋形剂”是指被添加至药物组合物以进一步促进活性成分的施用的惰性物质。实例(不限制)包括例如盐水、碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油、聚乙二醇和表面活性剂,包括,例如,聚山梨醇酯20。

[0068] 可使用一种或多种生理上可接受的包含赋形剂和辅助物质的载体以常规方式配制用于根据本发明的使用的药物组合物,所述载体促进所述活性成分加工成可作为药物使用的组合物。适当的制剂取决于所选定的施用途径和被递送的组合物的性质(例如,多核苷酸的大小和溶解度)。在这些实施方案的一个方面,将药物组合物配制用于注射或输入患者的血流。在这些实施方案的另一个方面,将药物组合物配制用于例如通过直接髓内、硬膜内或脑室内注射对患者的脑或中枢神经系统进行直接施用。

[0069] 可将本文所述的组合物配制用于肠胃外施用,例如通过推注注射或连续输注施用。用于肠胃外施用的药物组合物包括呈水溶性形式的组合物的水溶液。另外,可将活性份的混悬剂配制为油性或基于水的注射混悬剂。合适的亲脂溶剂或媒介物包括脂肪油诸如芝麻油或合成脂肪酸酯诸如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。含水注射混悬剂可含有增加混悬剂的粘度的物质,诸如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地,所述混悬剂还可含有合适的稳定剂或增加活性成分的溶解度以允许制备高度浓缩的溶液的试剂(例如,表面活性剂聚山梨醇酯(Tween 20))。基于蛋白质的试剂诸如,例如,白蛋白可用于阻止本发明的多

肽至递送表面(即,IV包、导管、针等)的吸附。

[0070] 对于口服施用,可通过将活性化合物与本领域中公知的药学上可接受的载体组合来容易地配制组合物。

[0071] 制剂可以以单位剂量形式存在,例如在小瓶、安瓿中或者在多剂量容器中提供并且任选地添加防腐剂。组合物可以是油性或水性媒介物中的混悬剂、溶液或乳液,并且可含有配制剂诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。单剂量剂型可呈液体或固体形式。可在无修饰的情况下向患者直接施用单剂量剂型或可在施用前稀释或复溶所述单剂量剂型。在某些实施方案中,可以以推注形式(例如单次注射)、单次口服剂量(包括包含多个片剂、胶囊剂、丸剂等的口服剂量)施用单剂量剂型。在替代实施方案中,可在一段时间内,诸如通过输注或通过植入泵诸如ICV泵施用单剂量剂型。在后一个实施方案中,所述单剂量剂型可以是预先充有适当量的包含变体g3p的多肽或融合蛋白的输液袋或泵贮液池。或者,可在即将向患者施用通过将适当剂量的变体g3p与输液袋或泵贮液池溶液混合来制备所述输液袋或泵贮液池。

[0072] 本发明的另一个方面包括用于制备本发明的药物组合物的方法。用于药物的配制的技术可见于例如“Remington’s Pharmaceutical Sciences,”Mack Publishing Co., Easton,Pa.(最新版本)(其通过引用整体并入本文)中。

[0073] 适合在本发明的上下文中使用的药物组合物包括其中以有效地实现期望的目的的量含有活性成分的组合物。

[0074] 特别地根据本文中提供的详细公开内容,治疗或诊断有效量的测定完全在本领域技术人员的能力范围内。

[0075] 可个别地调整剂量量和间隔以提供足以治疗或诊断特定脑疾病、病症或病况的噬菌体展示媒介物的脑水平(最低有效浓度,MEC)。所述MEC将对于每一种制剂可变化,但可根据体外数据来估计。获得MEC所必需的剂量将取决于个体特征。

[0076] 还可使用MEC值确定剂量间隔。应当使用方案来施用制剂,所述方案在10-90%的时间,优选地30-90%和最优选地50-90%的时间维持高于MEC的脑水平。

[0077] 取决于待治疗的病况的严重度和响应性,给药可以是单次或多次施用,治疗过程持续数天至数周或直至实现治愈或实现疾病状态的减少。

[0078] 待施用的组合物的量当然将取决于待治疗的或诊断的受试者、疾患的严重度、处方医生的判断等。

[0079] 如果需要,本发明的组合物可存在于包装或分配器装置诸如FDA批准的试剂盒中,所述装置可含有一种或多种包含活性成分的单位剂型。例如,包装可包含金属或塑料箔,诸如泡罩包装。包装或分配器装置可以附带施用说明书。包装或分配器还可附带以管理药物的制造、使用或销售的政府机构规定的形式存在的与容器相关联的通告,所述通告反映由机构对组合物的形式或人或兽医学施用的批准。例如,此类通告可以是由美国食品药品监督管理局对处方药批准的标签或批准的产品说明书。还可制备包含于相容性药用载体中配制的本发明的制剂的组合物,将其置于适当的容器中,并标记以用于治疗指定的病况,如同上文中进一步描述的。

[0080] 应理解,以上和以下描述仅仅是示例性和说明性的,并且不是对要求保护的本发明的限制。

[0081] 治疗用途

[0082] 本发明的另一个方面涉及本发明的任何多肽、核酸分子或组合物在治疗蛋白质错误折叠疾病,包括但不限于牵涉fA β 42、f α syn、fNM或ftau的任一个的那些疾病中的用途。

[0083] 在治疗的上文中,术语“患者”、“受试者”和“受者”可互换使用并且包括人以及其它哺乳动物。在一些实施方案中,患者是对于与蛋白质错误折叠疾病相关的生物标志物呈阳性的人。在一个实施方案中,患者表现 β -淀粉样蛋白沉积物,如利用florbetapir通过PET成像检测到的。

[0084] 术语“治疗”及其同源词旨在指在表现疾病的一个或多个临床症状的患者中减少、减缓或逆转疾病的进展。“治疗”还旨在指在表现疾病的一个或多个临床症状的患者中减少、缓解或逆转疾病的症状。在一个实施方案中,患者表现如利用florbetapir通过PET成像检测到的 β -淀粉样蛋白沉积物,并且通过治疗减少 β -淀粉样蛋白沉积物的数目。在一个实施方案中,患者表现如通过本发明的多肽或多肽组合物检测到的 β -淀粉样蛋白沉积物,并且通过治疗减少或维持 β -淀粉样蛋白沉积物的数目。在另一个实施方案中,患者表现如通过PET成像检测到的任何类型的淀粉样蛋白沉积物,并且通过治疗改善患者的认知功能。可通过McKhann等, *Alzheimer's & Dementia* 7(3):263-9(2011)的方法和测试来测定认知功能的改善。

[0085] “预防”与治疗不同,并且是指在任何临床症状发作之前向个体施用组合物。包括使用本发明的任何多肽或其组合物的预防。预防可涉及仅基于一个或多个遗传标志物,已知处于增加的发生疾病的风险中或一定会发展疾病的个体。对于各种蛋白质错误折叠疾病,已鉴定了许多遗传标志物。例如,在人淀粉样蛋白前体蛋白(hAPP)中具有Swedish突变、Indiana突变或London突变的一个或多个的个体处于增加的发展早发性阿尔茨海默病的风险中,因此为进行预防的候选者。同样地,在亨廷顿基因中具有三核苷酸CAG重复的个体,特别地具有36或更多个重复的个体,将最终发展亨廷顿舞蹈症并因此为进行预防的候选者。

[0086] 术语“蛋白质错误折叠”是指特征在于通过聚集蛋白(淀粉样蛋白形成肽),诸如,但不限于, β -淀粉样蛋白、血清淀粉样蛋白A、胰蛋白酶抑制剂C、IgG κ 轻链或朊病毒蛋白形成淀粉样蛋白蛋白质的疾病。已知与错误折叠的和/或聚集的淀粉样蛋白蛋白质相关联的疾病包括阿尔茨海默氏病(其包括早发性阿尔茨海默病、迟发性阿尔茨海默病和症状发生前阿尔茨海默病)、帕金森氏病、SAA淀粉样变性、胰蛋白酶抑制剂C、遗传性冰岛综合症、衰老、多发性骨髓瘤、朊病毒疾病,包括但不限于库鲁病、克雅氏病(CJD)、格斯特曼-施特劳斯纳病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease, GSS)、致死性家族性失眠症(FFI)、瘙痒病和牛海绵状脑炎(BSE);肌萎缩侧索硬化(ALS)、脊髓小脑性共济失调(SCA1)、(SCA3)、(SCA6)、(SCA7)、亨廷顿舞蹈症、齿状核红核苍白球路易体萎缩症、脊髓和延髓性肌萎缩、遗传性脑淀粉样血管病、家族性淀粉样变性、额颞叶痴呆症、英国人/丹麦人痴呆、进行性核上性麻痹(PSP)和家族性脑病。本发明的多肽和组合物可用于治疗“蛋白质错误折叠”疾病。

[0087] 许多这类错误折叠的和/或聚集的淀粉样蛋白蛋白质疾病在中枢神经系统(CNS)中发生。在CNS中发生的疾病的一些实例是帕金森氏病;阿尔茨海默病;额颞叶痴呆(FTD),包括具有以下临床症状的患者:行为异常型FTD(bvFTD)、进行非流利失语(PNFA)和语义性痴呆(SD);额颞叶退化(FTLD);和亨廷顿舞蹈症。本发明的多肽和组合物可以用于治疗特征在于在中枢神经系统(CNS)中发生的错误折叠和/或聚集的淀粉样蛋白蛋白质的疾病。

[0088] 蛋白质的错误折叠和/或聚集还可在CNS外部发生。淀粉样变性A(AA)(对于其前体蛋白为血清急性期载脂蛋白, SAA)和多发性骨髓瘤(前体蛋白免疫球蛋白轻和/或重链)是在CNS外部发生的两个广为人知的蛋白质错误折叠和/或聚集的蛋白质疾病。其它实例包括牵涉由如下蛋白形成的淀粉样蛋白的疾病: α 2-微球蛋白、转甲状腺素蛋白(家族性淀粉样多发性神经病变[FAP]、家族性淀粉样心肌病[FAC]和老年全身性淀粉样变性[SSA])、(apo)血清AA、载脂蛋白AI、AII和AIV、钙结合微丝蛋白(家族性淀粉样多发性神经病变的芬兰人形式)、溶菌酶、血纤蛋白原、胱蛋白酶抑制剂C(脑淀粉样血管病、遗传性脑出血伴淀粉样变, 冰岛人类型)、(前)降钙素、胰岛淀粉样多肽(IAPP淀粉样变)、心房钠因子、催乳素、胰岛素、乳凝集素(lactahedrin)、角质-上皮蛋白、乳铁蛋白、牙源性成釉细胞相关蛋白和精液凝固蛋白I。本发明的多肽和组合物可用于治疗牵涉在CNS外部发生的蛋白质错误折叠和/或聚集的疾病。

[0089] 神经变性疾病还牵涉 τ 蛋白病变。综述于Lee等, *Annu. Rev. Neurosci.* 24:1121-159 (2001)中。 τ 蛋白是在中枢和外周神经系统神经元的轴突中表达的微管相关蛋白。涵盖神经退行性 τ 蛋白病变(有时称为 τ 蛋白病变)。 τ 蛋白病变的实例包括阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化/帕金森-痴呆综合征、嗜银颗粒痴呆、皮质基底节变性、克雅氏病、拳击员痴呆、弥散性神经原纤维缠结钙化、唐氏综合征、额颞痴呆, 包括与染色体17相关的额颞叶痴呆与帕金森、格斯特曼-施特劳斯纳病、哈勒沃登-施帕茨病、强直性肌营养不良、尼曼-皮克病C型、非关岛运动神经元疾病与神经原纤维缠结、皮克氏病、脑炎后帕金森氏病、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病、进行性皮质下胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎和仅缠结型痴呆。这些疾病的的一些也可包括纤维状 β 淀粉样蛋白肽沉积物。例如, 阿尔茨海默病显示 β 淀粉样蛋白沉积物和 τ 蛋白病变。类似地, 朊病毒介导的疾病诸如克雅氏病、朊病毒蛋白脑淀粉样血管病以及格斯特曼-施特劳斯纳综合征也可具有 τ 蛋白病变。由此疾病为“ τ 蛋白病变”不应被解释为从其它神经变性疾病的分类或分组排除疾病, 其仅为了方便而提供。本发明的多肽和组合物可用于治疗神经变性疾病以及牵涉 τ 蛋白病变的疾病。

[0090] 在一个实施方案中, 药物组合物或制剂用于在表现与淀粉样蛋白的存在相关的症状或对于与蛋白质错误折叠疾病相关的生物标志物诸如florbetapir(AV-45, Eli Lilly)呈阳性的患者中减少淀粉样蛋白的方法, 其包括向所述患者施用有效量的如本文所述的药物组合物或制剂。在一个实施方案中, 施用途选自鞘内注射或输注、直接脑室内注射或输注、脑实质内注射或输注、或静脉注射或输注。

[0091] 在一个实施方案中, 药物组合物或制剂用于在表现与淀粉样蛋白的存在相关的症状或对于与蛋白质错误折叠疾病相关的生物标志物诸如florbetapir(AV-45, Eli Lilly)呈阳性的患者中维持淀粉样蛋白的水平的方法, 其包括向所述患者施用有效量的如本文所述的药物组合物或制剂。在一个实施方案中, 施用途选自鞘内注射或输注、直接脑室内注射或输注、脑实质内注射或输注、或静脉注射或输注。

[0092] 在一个实施方案中, 药物组合物或制剂用于在患者中解聚淀粉样蛋白的方法, 其包括向具有淀粉样蛋白的患者施用有效量的如本文所述的药物组合物或制剂。在一个实施方案中, 施用途选自鞘内注射或输注、直接脑室内注射或输注、脑实质内注射或输注、或静脉注射或输注。

[0093] 在一个实施方案中, 本发明的药物组合物或制剂用于在脑中引起 β -淀粉样蛋白沉

积物解聚的方法,其包括将有效量的如本文所述的药物组合物直接注射进有此需要的患者的脑内,从而在脑中引起 β -淀粉样蛋白沉积物的减少。在替代实施方案中,本发明的药物组合物或制剂用于在脑中引起 β -淀粉样蛋白沉积物解聚的方法,其包括将有效量的如本文所述的药物组合物静脉内注射递送至有此需要的患者中,从而在脑中引起 β -淀粉样蛋白沉积物的减少。

[0094] 在一个实施方案中,药物组合物或制剂用于在脑中减少淀粉样蛋白形成的方法。在脑中减少淀粉样蛋白形成可预防、治疗或减轻蛋白质错误折叠或神经变性疾病的症状或严重程度。在一个实施方案中,施用途径选自鞘内注射或输注、直接脑室内注射或输注、脑实质内注射或输注、或静脉注射或输注。

[0095] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物或制剂用于在脑中促进淀粉样蛋白清除的方法。促进淀粉样蛋白清除可预防、治疗或减轻蛋白质错误折叠或神经变性疾病的症状或严重程度。在一个实施方案中,施用途径选自鞘内注射或输注、直接脑室内注射或输注、脑实质内注射或输注、或静脉注射或输注。

[0096] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物或制剂用于在脑中抑制淀粉样蛋白聚集的方法。在脑中抑制淀粉样蛋白聚集可预防、治疗或减轻蛋白质错误折叠或神经变性疾病的症状或严重程度。在一个实施方案中,施用途径选自鞘内注射或输注、直接心室内注射或输注、脑实质内注射或输注、或静脉注射或输注。

[0097] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物或制剂用于在脑中清除毒性淀粉样蛋白寡聚物的方法。在脑中清除毒性淀粉样蛋白寡聚物可预防、治疗或减轻蛋白质错误折叠或神经变性疾病的症状或严重程度。在一个实施方案中,施用途径选自鞘内注射或输注、直接心室内注射或输注、脑实质内注射或输注、或静脉注射或输注。

[0098] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物或制剂用于在脑中阻止毒性淀粉样蛋白寡聚物的形成的方法。在脑中阻止毒性淀粉样蛋白寡聚物的形成可预防、治疗或减轻蛋白质错误折叠或神经变性疾病的症状或严重程度。在一个实施方案中,施用途径选自鞘内注射或输注、直接心室内注射或输注、脑实质内注射或输注、或静脉注射或输注。

[0099] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物或制剂用于保护神经元免受淀粉样蛋白损伤的方法。保护神经元免受淀粉样蛋白损伤可预防、治疗或减轻蛋白质错误折叠或神经变性疾病的症状或严重程度。在一个实施方案中,施用途径选自鞘内注射或输注、直接心室内注射或输注、脑实质内注射或输注、或静脉注射或输注。在一个实施方案中,预防性地施予用于保护神经元免受淀粉样蛋白损伤的本发明的药物组合物或制剂。

[0100] 在一些实施方案中,患者对于与蛋白质错误折叠和/或聚集疾病相关的生物标志物呈阳性。在一个实施方案中,所述生物标志物为florbetapir(AV45,Eli Lilly)。

[0101] 在一些实施方案中,患者正表现出与淀粉样蛋白的存在相关的神经变性疾病的症状。在各种实施方案中,所述淀粉样蛋白是fA β 42、f α syn、fNM或ftau的任一个。

[0102] 在某些实施方案中,所述神经变性疾病是帕金森氏病、阿尔茨海默病或亨廷顿舞蹈症。在一个实施方案中,所述神经变性疾病是阿尔茨海默病。在一个实施方案中,所述神经变性疾病是阿尔茨海默病并且患者表现如通过成像剂florbetapir(AV-45,Eli Lilly)检测到的 β -淀粉样蛋白。

[0103] 在一些实施方案中,患者正表现出朊病毒介导的疾病的症状。

[0104] 在某些实施方案中,所述朊病毒介导的疾病选自克雅氏病、库鲁病、致命性家族性失眠症或格斯特曼-施特劳斯纳综合征。

[0105] 在一些实施方案中,患者正表现出除阿尔茨海默病外的神经退行性 τ 蛋白病变的症状。在某些实施方案中,待治疗的疾病选自嗜银颗粒痴呆、皮质基底节变性、拳击员痴呆、弥散性神经原纤维缠结钙化、唐氏综合征、额颞痴呆,包括与染色体17相关的额颞叶痴呆与帕金森症、哈勒沃登-施帕茨病、强直性肌营养不良、尼曼-皮克病C型、非关岛运动神经元疾病与神经原纤维缠结、皮克病、脑炎后帕金森综合征、进行性皮质下胶质增生、进行性核上性麻痹、亚急性硬化性全脑炎和仅缠结型痴呆。

[0106] 在另一个实施方案中,任何上述疾病病况可通过单独地或与合适的载体(诸如,例如,脂质纳米颗粒、聚合物载体,或载体诸如病毒载体)结合地向患者直接施用(通过任何合适的途径,诸如,例如,吸入和静脉内输注)本发明的核酸分子(即,编码显示减小的免疫原性并且具有结合淀粉样蛋白、解聚淀粉样蛋白斑块和/或阻止淀粉样蛋白的聚集的变体g3p的核酸分子)来治疗。适合用于该治疗的编码本发明的变体g3p的核酸分子可以是DNA或RNA。

[0107] 诊断学

[0108] 在本发明的另一个方面,本文所述的多肽和组合物用于与本文所述的各种疾病相关的诊断应用。例如,当在体内或体外用作成像剂时,本发明的组合物的结合可以是所述蛋白质错误折叠疾病之一的诊断的部分。当用作诊断剂时,本发明的多肽还可包含可检测的标记,或可另外地在体内被检测到。可使用用于标记蛋白质的标准技术将各种标记物附接于诊断组合物的淀粉样蛋白结合组分。标记物的实例包括荧光标记物和放射性标记物。存在多种可使用的放射性标记物,但一般地所述标记物通常选自放射性标记物,包括,但不限于, ^{18}F 、 ^{11}C 和 ^{123}I 。可使用公知的化学将这些和其它放射性同位素附接于蛋白质。在一个实施方案中,使用正电子发射计算机断层摄影术(PET)来检测标记物。然而,用于放射性同位素的检测的任何其它合适的技术也可用于检测放射性示踪剂。

[0109] 可将本发明的多肽和组合物与对于 β -淀粉样蛋白是特异的成像剂诸如,例如F18-AV-45, Eli Lilly组合地用作诊断成像剂。由于目前不存在用于非- β -淀粉样蛋白聚集物的已知成像剂,因此本发明的诊断组合物与 β -淀粉样蛋白-特异性成像剂一起的使用将导致基于差示检测的非- β -淀粉样蛋白聚集物的检测。因此,在一个实施方案中,将本发明的诊断组合物与 β -淀粉样蛋白成像剂组合地用作成像剂以检测非- β -淀粉样蛋白聚集物。

[0110] 在另一个实施方案中,将本发明的多肽或组合物用作诊断成像剂来检测CNS(包括脑)中的 β -淀粉样蛋白。

[0111] 可使用针对治疗性组合物所描述的相同途径来施用本发明的诊断组合物。在一个实施方案中,施用途选自鞘内注射或输注、直接心室内注射或输注、脑实质内注射或输注、或静脉注射或输注。

实施例

[0112] 实施例1:g3p中的CD4+T细胞表位的作图

[0113] 合成87个跨越SEQ ID NO:1的氨基酸1-240的序列的重叠肽(15个氨基酸长,12个氨基酸重叠的),并在T细胞表位作图测定中测试来自人CD4+T细胞的响应。在一式六份PBMC

培养物中测试单个肽,并评估T细胞响应以鉴定表位的定位以及它们的相对效力。

[0114] 利用Lymphoprep(Axis-shield,Dundee,UK)密度离心,按照由Addenbrooke医院当地研究伦理委员会授权的批准从英国国家输血服务(Addenbrooke医院,Cambridge,UK)获得的健康社区供血者血沉棕黄层(来自24小时内抽取的血液)分离PBMC(外周血单核细胞)。使用CD8⁺RosetteSepTM(StemCell Technologies Inc,London,UK)耗竭CD8⁺T细胞。通过使用基于HLA SSP-PCR的组织分型试剂盒(Biotest,Solihull,UK)鉴定HLA-DR单元型来表征供体。还测定T细胞对对照新抗原蛋白(KLH蛋白(Pierce(Perbio),Cramlington,UK)和从IFV和EBV衍生的肽)的响应。随后冷冻PBMC,并将其贮存于液氮中直至需要。

[0115] 一个组群的55个供体被选择用于测定,以最佳地代表在世界人口中表达的HLA-DR同种异型的数目和频率。在该组群中表达的同种异型针对世界人口中表达的那些同种异型的分析显示,获得了>80%的覆盖,并且所有主要的HLA-DR等位基因(在世界人口中以>5%的频率表达的单个同种异型)得到良好代表。个体供体单元型以及世界人口与样品群体中表达的MHC II类单元型的频率的比较的详细内容分别示于表8和图3中。

[0116] 表8. 供体详细内容和单元型

[0117]

供体 编号	单元型
1	DRB1*04:01,DRB1*16:01,DRB4*01:03,DQB1*03:02,DQB1*05:02
2	DRB1*01:01,DRB1*13:02,DRB3*03:01,DQB1*05:01,DQB1*06:04
3	DRB1*03:01,DRB1*07:01,DRB3*01:01,DRB4*01:03,DQB1*02:01,DQB1*03:03
4	DRB1*09:01,DRB1*13:01,DRB3*02:02,DRB4*01:03,DQB1*03:03,DQB1*06:03
5	DRB1*13:01,DRB1*13:02,DRB3*01:01,DRB3*03:01,DQB1*06:03,DQB1*06:04
6	DRB1*04:01,DRB1*04:07,DRB4*01:03,DQB1*03:01
7	DRB1*13:01,DRB3*01:01,DQB1*06:03
8	DRB1*13:01,DRB1*15:01,DRB3*02:02,DRB5*01:01,DQB1*06:02,DQB1*06:03
9	DRB1*04:01,DRB1*11:01,DRB3*02:02,DRB4*01:03,DQB1*03:01,DQB1*03:02
10	DRB1*04:04,DRB1*12:01,DRB3*02:02,DRB4*01:03,DQB1*03:01,DQB1*03:02
11	DRB1*13:02,DRB1*15:01,DRB3*01:01,DRB5*01:01,DQB1*06:02,DQB1*06:04
12	DRB1*04:01,DRB1*15:01,DRB4*01:03,DRB5*01:01,DQB1*03:02,DQB1*06:02
13	DRB1*04:02,DRB1*07:01,DRB4*01:01,DRB4*01:03,DQB1*02:01
14	DRB1*03:01,DRB1*16:01,DRB3*01:01,DRB5*02:02,DQB1*02:01,DQB1*05:02
15	DRB1*03:01,DRB1*13:01,DRB3*02:02,DQB1*02:01,DQB1*06:03
16	DRB1*01:01,DRB1*15:01,DRB5*01:01,DQB1*05:01,DQB1*06:02
17	DRB1*01:01,DRB1*07:01,DRB4*01:03,DQB1*03:03,DQB1*05:01
18	DRB1*01:01,DRB1*09:01,DRB4*01:03,DQB1*03:03,DQB1*05:01
19	DRB1*03:01,DRB1*11:02,DRB3*01:01,DRB3*02:02,DQB1*02:01,DQB1*03:01
20	DRB1*13:01,DRB3*01:01,DRB3*02:02,DQB1*06:03
21	DRB1*01:01,DRB1*13:02,DRB3*03:01,DQB1*05:01,DQB1*06:04
22	DRB1*04:01,DRB1*04:03,DRB4*01:03,DQB1*03:02
23	DRB1*08:01,DRB1*13:01,DRB3*01:01,DQB1*04:02,DQB1*06:03
24	DRB1*03:01,DRB1*15:01,DRB3*01:01,DRB5*01:01,DQB1*02:01,DQB1*06:02
25	DRB1*03:01,DRB4*01:01,DRB3*01:01,DRB4*01:03,DQB1*02:01,DQB1*03:01
26	DRB1*01:01,DRB1*15:01,DRB5*01:01,DQB1*05:01,DQB1*06:02
27	DRB1*04:04,DRB1*07:01,DRB4*01:01,DRB4*01:03,DQB1*02:02,DQB1*03:02
28	DRB1*11:01,DRB1*15:01,DRB3*02:01,DRB5*01:01,DQB1*03:01,DQB1*06:01
29	DRB1*08:01,DRB1*15:01,DRB5*01:01,DQB1*04:02,DQB1*06:02
30	DRB1*13:02,DRB1*15:01,DRB3*03:01,DRB5*01:01,DQB1*06:02,DQB1*06:09
31	DRB1*04:01,DRB1*16:01,DRB4*01:03,DRB5*02:02,DQB1*03:02,DQB1*06:03
32	DRB1*13:02,DRB1*15:01,DRB3*03:01,DRB5*01:01,DQB1*06:02,DQB1*06:04
33	DRB1*07:01,DRB1*11:04,DRB3*02:02,DRB4*01:01,DQB1*02:02,DQB1*03:01
34	DRB1*01:03,DRB1*15:01,DRB5*01:01,DQB1*03:01,DQB1*06:02
35	DRB1*03:01,DRB1*14:01,DRB3*01:01,DRB3*02:02,DQB1*02:01,DQB1*05:03
36	DRB1*03:01,DRB1*08:01,DRB3*01:01,DQB1*02:01,DQB1*04:02
37	DRB1*03:01,DRB1*11:01,DRB3*01:01,DRB3*02:02,DQB1*02:01,DQB1*03:01
38	DRB1*07:01,DRB1*15:01,DRB4*01:03,DRB5*01:01,DQB1*02:02,DQB1*06:02
39	DRB1*03:01,DRB1*13:02,DRB3*02:02,DRB3*03:01,DQB1*02:01,DQB1*06:09

[0118]

供体 编号	单元型
40	DRB1*01:01,DRB1*13:02,DRB3*01:01,DQB1*05:01,DQB1*06:04
41	DRB1*04:07,DRB1*15:01,DRB4*01:03,DRB5*01:01,DQB1*03:01,DQB1*06:02
42	DRB1*07:01,DRB4*01:03,DQB1*02:02,DQB1*03:03
43	DRB1*03:01,DRB1*15:01,DRB3*01:05,DRB5*01:01,DQB1*02:01,DQB1*06:02
44	DRB1*07:01,DRB1*11:04,DRB3*02:02,DRB4*01:01,DQB1*02:02,DQB1*03:01
45	DRB1*03:01,DRB1*04:04,DRB3*01:01,DRB4*01:03,DQB1*02:01,DQB1*03:02
46	DRB1*04:04,DRB1*13:01,DRB3*02:02,DRB4*01:03,DQB1*03:02,DQB1*06:03
47	DRB1*04:01,DRB1*11:01,DRB3*02:02,DRB4*01:03,DQB1*03:01
48	DRB1*03:01,DRB1*04:01,DRB3*01:06,DRB4*01:03,DQB1*02:01,DQB1*03:02
49	DRB1*01:02,DRB1*13:03,DRB3*01:01,DQB1*03:01,DQB1*05:01
50	DRB1*04:07,DRB1*15:01,DRB4*01:03,DRB5*01:01,DQB1*03:01,DQB1*06:02
51	DRB1*04:07,DRB1*13:02,DRB3*03:01,DRB4*01:03,DQB1*03:01,DQB1*06:04
52	DRB1*03:01,DRB3*01:05,DQB1*02:01
53	DRB1*03:01,DRB1*07:01,DRB3*01:01,DRB4*01:01,DQB1*02:01,DQB1*02:02
54	DRB1*04:04,DRB1*15:01,DRB4*01:03,DQB1*03:02,DQB1*06:02
55	DRB1*03:01,DRB1*04:01,DRB3*01:01,DRB4*01:03,DQB1*02:01,DQB1*03:01

[0119] 将来自每一个供体的PBMC解冻,对其进行计数,并评估活力。将细胞在室温AIM-V®培养基(Invitrogen,Paisley,UK)中复苏,随后将细胞密度调整至 $2-3 \times 10^6$ PBMC/ml(增殖细胞原液)。利用游离N末端胺和C末端羧酸以1-3mg的规模合成15个氨基酸长的肽。将肽溶解在DMSO中至10mM的浓度,并且在小孔中将制备的肽培养物原液于AIM-V®培养基中稀释至5 μ M的终浓度。对于每一种肽和每一个供体,在平底96孔板中建立一式六份培养物。也以一式六份测试阳性和阴性对照培养物。对于每一个供体,还包括3个对照(KLH蛋白和从IFV和EBV衍生的肽)。对于阳性对照,以2.5 μ g/ml的终浓度使用PHA(Sigma,Dorset,UK)。

[0120] 将培养物孵育总共6天,随后向每一个孔添加0.75 μ Ci 3 [H]-胸苷(Perkin Elmer®,Beaconsfield,UK)。将培养于再孵育18小时,随后使用TomTec Mach III细胞收集器将其收集至滤垫上。通过在Microplate Beta计数器(Perkin Elmer®,Beaconsfield,UK)上以paralux低本底计数模式通过Meltilex™(Perkin Elmer®,Beaconsfield,UK)闪烁计数来测定每一个孔的Cpm。

[0121] 对于数据的分析,使用等于或大于SI ≥ 2.00 的刺激指数(SI)的阈值(考虑边界SI $\geq 1.90-1.99$ 响应)。阳性响应通过以下统计和经验阈值来定义:

[0122] 1. 通过使用不成对双样本学生t检验比较测试孔对比培养基对照孔的cpm产生的响应的显著性($p < 0.05$)。

[0123] 2. 大于2.00的刺激指数($SI \geq 2.00$),其中 $SI = \text{测试孔的平均cpm} / \text{培养基对照孔的平均cpm}$ 。以该方式提供的数据被表示为 $SI \geq 2.00, p < 0.05$ 。

[0124] 另外,通过计算来自重复培养物的原始数据的CV和SD来评估批内变化。以一式六份培养物(“非调整的数据”)设置增殖测定。为了确保批内变化低,也在除去最大和最小cpm值之后分析数据(“调整的数据”),并使用两个数据集比较供体响应的SI。通过对研究中的

所有肽计算阳性响应(上文中定义的)的平均频率(加上SD以提供本底响应率)来鉴定T细胞表位。诱导在调整和非调整的数据中高于本底响应率的增殖响应的任何肽都被认为含有T细胞表位。当两个重叠肽诱导增殖响应率时,T细胞表位被认为存在于重叠区域。据此,在所测试的多肽中鉴定了以下T细胞表位:

[0125] 表位1:C T G D E T Q C Y G T W(SEQ ID NO:1的氨基酸46-57)

[0126] 表位2:T F M F Q N N R F R N R(SEQ ID NO:1的氨基酸133-144)

[0127] 表位3:S S K A M Y D A Y W N G(SEQ ID NO:1的氨基酸194-205)

[0128] 表位4:P V N A G G G S G G G S(SEQ ID NO:1的氨基酸214-225)

[0129] 表位5:S G S G A M V R S D K T H T C(SEQ ID NO:1的氨基酸253-267)

[0130] 实施例2:通过计算机模拟分析进行的T细胞表位4和5的突变的设计

[0131] 使用iTope™和TCED™计算机模拟技术,利用来自所述表位区的重叠9聚体分析在T细胞测定中呈阳性的肽的序列。[Perry等,Drugs R D 9(6):385-96(2008)]。针对MHC II类等位基因(总共34个)的数据库测试每一个9聚体,并基于与MHC II类分子的拟合和相互作用对其进行评分。另外,将每一个9聚体针对已知的CD4+T细胞表位的数据库进行BLAST搜索,以鉴定9聚体的序列与来自在先前的T细胞测定中刺激T细胞响应的无关蛋白质的数据库肽的序列之间的任何高序列同源性。基于来自计算机模拟分析的信息,鉴定了用于从所述鉴定的表位潜在除去CD4+T细胞表位活性的突变。

[0132] 表位5跨越富含Gly的天然N2-CT接头的C末端、由用于产生SEQ ID NO:1的N1-N2人Ig Fc融合蛋白的pFUSE载体的多克隆位点(“MCS”)编码的氨基酸和人Ig Fc区的N末端。计算机模拟分析将SEQ ID NO:1的M258和V259视为负责T细胞活性的P1锚。基于它们在N1-N2编码区外部的定位,预期除去这两个氨基酸不引起功能的丧失。这两个氨基酸由MCS编码。因此,使用适当的寡核苷酸引物,通过定点诱变来产生修饰MCS并且消除编码SEQ ID NO:1的M258和V259的核苷酸的双链DNA分子。随后,使用MCS中的EcoRI和Bg1II限制性位点将所得的诱变的DNA序列重新克隆回pFUSE载体中。所得的成熟(不存在信号序列)融合蛋白省略了M258和V259。其氨基酸序列示于SEQ ID NO:2中并由SEQ ID NO:5编码。该融合蛋白保持与SEQ ID NO:1融合蛋白相同的在下述测定中结合Abeta的能力。

[0133] 表位4与N2和天然富含Gly的接头重叠。g3p蛋白的晶体结构(未显示)表明,表位4位于远离淀粉样蛋白结合区,从而可耐受氨基酸取代而不影响活性。被鉴定为P1锚的V215(SEQ ID NO:2)表面暴露,侧链略微取向朝向蛋白质核心。根据结构分析,表6和7中所示的V215的任何取代应当除去表位。另外,还应当容纳如表6和7中所示的该表位内的其它氨基酸的任何取代。使用适当的寡核苷酸引物,通过定点诱变从SEQ ID NO:5衍生编码包含V215A取代的N1-N2-Ig Fc的核酸序列(SEQ ID NO:6)。所得的成熟融合蛋白(SEQ ID NO:3)在结合测定中显示相较于具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列的融合蛋白的增强的对Abeta的结合。将SEQ ID NO:6的核酸序列用作亲代序列来生成包含表位1、2和3中的所有修饰的基因。

[0134] 实施例3:通过计算机模拟分析进行的T细胞表位1、2和3的突变的设计

[0135] 表位1正好位于N1-N2的假定的Abeta结合部分的C末端。表位1的计算机模拟分析将SEQ ID NO:1的氨基酸48-56突出显示为用于氨基酸取代和T细胞表位的去除的区域。基于现存氨基酸的性质、表面暴露和与g3p的淀粉样蛋白结合区的相互作用(如根据g3p的X射

线晶体结构解释的)将该9聚体内的氨基酸靶向用于取代。具体地,将G48、T51、Y54和T56靶向利用表1中指定的变化进行的取代。该区域中的其它潜在氨基酸取代示于表2中。

[0136] 表位2的iTope™分析将SEQ ID NO:1的氨基酸135-143指为用于减小或消除该表位的靶。基于X射线晶体结构,SEQ ID NO:1的氨基酸136-139形成环区,该环区与N1-N2的铰链区形成键,从而对于淀粉样蛋白结合活性可以是重要的。对这些氨基酸的改变是不太优选的,并且仅示于表2中。更优选的改变是针对M135、R140、F141和N143,并且示于表1中。对该9个氨基酸的区域的其它潜在改变示于表2中。

[0137] SEQ ID NO:1的氨基酸173-182通过计算机模拟分析被鉴定为在表位3内,作为用于取代的靶。表位3位于N2结构域的 α 螺旋部分中,从而策略是避免引入疏水残基和小的不带电荷的极性残基。另外,我们希望避免向该表位的C末端引入极性残基、酸性残基。基于X射线晶体学数据,我们将S173、D174、M176、D178和W182靶向利用表1中指定的变化的取代。该区域内的其它潜在氨基酸取代示于表2中。

[0138] 实施例4:具有减小的T细胞表位的N1-N2-人IgG Fc多肽的产生

[0139] 制备各自编码含有表3中所示的不同的单氨基酸取代的N1-N2-人IgG Fc融合蛋白的58个不同的核酸分子。这通过使用适当的寡核苷酸引入对SEQ ID NO:6进行定点诱变以引入所需取代,随后将PCR扩增的诱变序列重新克隆入pFUSE-hIgG1-Fc2载体(Invivogen®, Toulouse, France, Catalogue No. pfuse-hg1fc2)来实现。

[0140] 使编码这些“去免疫化的”Fc融合多肽的基因在单个pFUSE-hIgG1-Fc2载体中于FreeStyle 293-F细胞(Invitrogen, Paisley, Scotland, Catalogue#R790-07)中进行瞬时表达。在转染当天,将细胞在FreeStyle 293培养基(Invitrogen, Catalogue#12338)中稀释至 1×10^6 /mL,从而确保>90%的活力。单独地在Optimem(Invitrogen, Catalogue#31985)中稀释质粒DNA和聚乙烯亚胺(PEI),并孵育5分钟,随后将PEI缓慢地添加至DNA,并将DNA/PEI混合物在室温下孵育5分钟。孵育后,将DNA/PEI混合物逐滴添加至293-F细胞,同时旋转培养瓶。将转染的培养物在以135rpm旋转的定轨摇床平台上于37°C、8%CO₂中孵育6-7天,随后收集它们。

[0141] 通过离心收集含有多肽的培养基,并使用10xPBS调整pH。通过在4°C旋转过夜将蛋白质结合于蛋白A琼脂糖珠粒(Sigma, Dorset, UK)。用1xPBS洗涤珠粒2次,随后将其转移至SigmaPrep旋转柱(Sigma)。使用0.1M甘氨酸pH3.0通过离心洗脱样品,并在收集管中使用1/10体积的1M Tris-HCl pH8.0中和所述样品。使用2ml ZebaSpin柱(Pierce, Cramlington, UK, Catalogue#89890)将洗脱物缓冲液交换至1xPBS中。将样品过滤灭菌,并测量每一个样品的280nm处的吸光度。

[0142] 实施例5:去免疫化的多肽的ABeta结合分析

[0143] A. ABeta(AB)纤维的制备。将A β 42(1mg, rPeptideA-1002-2)溶解在六氟异丙醇(HFIP, 1mL)中,充分涡旋并于室温下孵育2-18小时直至澄清溶液出现。将等分试样(100 μ L, 100 μ g)置于1.5mL Eppendorf管中,并于真空(speed Vac, Eppendorf, Concentrator 5301)下干燥2-3小时。将所得的单体重悬浮于20 μ L DMSO中,用移液器吸取,并充分涡旋直至完全溶解。利用260 μ L的10mM HCl溶液稀释该溶液(终A β 42浓度为80 μ M),并涡旋20秒。将澄清溶液在37°C孵育(不振荡)3天以允许聚集。为了在测定中的使用,将来自所得的原液的A β 42纤维于PBS中稀释50倍至1.6 μ M的终浓度。

[0144] B.ELISA板的制备。向96孔板(F96MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE;目录号:442404, Lot 125436和128158;Denmark)的每一个孔添加200 μ L的1%BSA溶液。将板密封并在7 $^{\circ}$ C孵育3小时。随后用PBS(250 μ L/孔)洗涤板3次。我们向每一个孔添加50 μ L稀释的AB42纤维溶液(1.6 μ M),并在37 $^{\circ}$ C无遮盖孵育过夜,以完成干燥。将PBS(50 μ L/孔)添加对照孔(无AB42纤维)。随后用水洗涤板2次,并用PBS(对于每一次洗涤,使用250 μ L/孔)洗涤1次。

[0145] C.ELISA测定。将50 μ L的不同浓度的每一种多肽(以及SEQ ID NO:3的多肽)添加至每一个孔,以及非-AB42纤维涂覆的孔,并在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。随后用PBS-T(0.05%的PBS中的Tween 20)洗涤板3次,并用PBS(对于每一次洗涤,使用250 μ L/孔)洗涤3次。我们随后向每一个孔添加50 μ L的以1:2500(最终0.32 μ g/mL)稀释于PBS-T+1%牛奶(DifcoTM脱脂牛奶, Becton, Dickinson and Company, USA, 目录号:232100, 批号:7320448)中的缀合有HRP的山羊抗-人抗Fc γ (Jackson Labs, 目录号109-035-008, 批号:106617)并在37 $^{\circ}$ C孵育40分钟。随后用PBS-T洗涤板6次,并用PBS(对于每一次洗涤,使用250 μ L/孔)洗涤2次。我们随后添加50 μ L/孔OPD溶液(15mg/7.5mL 0.05M柠檬酸盐缓冲液pH-5.5/3 μ L H₂O₂),并使其显色3-6分钟。我们随后添加25 μ L/孔的4N HCl溶液以终止反应。读取板在492nm和405nm处的吸光度。从492nm吸光度扣除405nm吸光度,并将结果作为多肽的浓度的函数绘图。随后计算针于每一种去免疫化的多肽的结合的IC₅₀,并将其与针于SEQ ID NO:3的多肽计算的IC₅₀相比较。结果示于以下的表9中。

[0146] 表9. 在表位1、2或3中具有单氨基酸取代的多肽相较于SEQ ID NO:3的多肽的ABeta结合IC₅₀的相对变化

[0147]

氨基酸取代	相对于SEQ ID NO:3 的 IC ₅₀ *
表位 1 G48H	1.8
表位 1 G48K	1.1
表位 1 G48R	1.9
表位 1 G48S	1.2
表位 1 G48T	1.0
表位 1 T51G	0.8
表位 1 T51H	1.5
表位 1 T51K	2.5
表位 1 T51P	0.2
表位 1 T51R	2.0
表位 1 T51Q	0.8
表位 1 T51N	0.5
表位 1 Y54G	0.02 / 0.2
表位 1 Y54H	0.3
表位 1 Y54K	0.13 / 0.32
表位 1 Y54P	0.07
表位 1 Y54R	0.15 / 0.25
表位 1 T56G	0.1
表位 1 T56H	0.47 / 0.77
表位 1 T56K	0.5 / 0.66
表位 1 T56P	0.1 / 0.09

氨基酸取代	相对于SEQ ID NO:3 的 IC ₅₀ *
表位 1 T56R	0.8
表位 2 M135A	0.4
表位 2 M135D	0.5
表位 2 M135G	0.2
表位 2 M135H	0.1
表位 2 M135K	0.4 / 0.2
表位 2 M135N	0.3
表位 2 M135R	0.1
表位 2 M135T	0.14 / 0.3
表位 2 R140A	0.2
表位 2 R140D	0.3
表位 2 R140E	0.3
表位 2 R140G	0.2
表位 2 R140H	0.2
表位 2 R140Q	0.28 / 0.22
表位 2 F141D	0.2
表位 2 F141E	0.2
表位 2 N143A	1.9 / 1.1
表位 2 N143G	0.19 / 0.08
表位 3 S173G	0.2
表位 3 S173P	0.4

氨基酸取代	相对于SEQ ID NO:3 的 IC ₅₀ *
表位 3 M176G	0.3
表位 3 M176H	0.4
表位 3 M176K	0.2
表位 3 M176N	0.5
表位 3 D178G	0.2
表位 3 D178N	0.5 / 0.4
表位 3 D178Q	0.6
表位 3 D178S	0.3
表位 3 W181G	0.5
表位 3 W181H	0.47 / 0.87
表位 3 W181K	0.3
表位 3 W181R	0.5/0.8
表位 3 S173K	0.17 / 0.07
表位 3 K174R	1.2 / 1.0
表位 3 M176R	0.2
表位 3 D178T	0.4

[0148] *编号反映IC₅₀(取代的多肽)/IC₅₀(SEQ ID NO:3的多肽)。多个值反映结合测定中的一式二份测定。

[0149] 实施例6:全蛋白的CD4⁺T细胞响应的分析

[0150] 为了分析来自本发明的任何多肽相较于SEQ ID NO:1的CD4⁺T细胞响应,进行全蛋白T细胞测定。从如实施例1中制备的20个健康人供体的血沉棕黄层分离PBMC。将PBMC在AIM-V®培养基中从冷冻复苏,并使用Miltenyi CD14微珠和LS柱(Miltenyi Biotech, Oxford, UK)分离CD14⁺细胞。将单核细胞重悬浮于补充有1000U/ml IL-4和1000U/ml GM-CSF的AIM-V®(“DC培养基”)中至4-6×10⁶PBMC/ml,随后将其分配在24孔板(2ml的终培养体积)中。在第2天通过更换一半体积的DC培养基来饲喂细胞。到第3天,单核细胞已分化至半成熟树突细胞(DC),用抗原(包括40ug/ml的测试多肽或40ug/ml的SEQ ID NO:1的多肽和100μg/ml KLH)或仅用培养基预孵育所述半成熟树突细胞。用抗原孵育半成熟DC 24小时,随后通过洗涤细胞2次和将其重悬浮于补充有50ng/ml TNF-α(Peprotech, London, UK)的DC培养基中来除去过量抗原。在第7天,通过更换一半体积的补充有50ng/ml TNFα的DC培养基来饲喂DC,并且在第8天收集成熟DC。计数收集的成熟DC,并使用台盼蓝染料排除法来评估活力。随后对DC进行γ-辐照(4000拉德),并将其以2×10⁵个细胞/ml重悬浮于AIM-V培养基中,随后在如下的T细胞增殖和ELISpot测定中用于分析。另外,在第8天,还制备新鲜的CD4⁺T细胞。为了纯化CD4⁺T细胞,将PBMC在AIM-V®培养基中复苏,随后使用Miltenyi CD4微珠和LS柱(Miltenyi Biotech, Oxford, UK)分离CD4⁺细胞并将其以2×10⁶个细胞/ml重悬浮于AIM-V®培养基中。

[0151] 在第8天,建立T细胞增殖测定,由此将1×10⁵个自体CD4⁺T细胞添加至96孔U型底板中的载有1×10⁴个抗原的DC(10:1的比率),将AIM-V®培养基添加至终体积200ul/孔。在第14天,在25ul AIM-V®中用1uCi [³H](Perkin Elmer, Beaconsfield, UK)/孔脉冲测定板6小时,随后使用TomTec Mach III(Hamden CT, USA)细胞收集器将其收集至滤垫(Perkin Elmer)上。以一式六份培养物测试所有多肽。通过在1450Microbeta Wallac Trilux液体闪烁计数器(Perkin Elmer)上在paralux低本底计数中通过Meltilex™(Perkin Elmer)闪烁计数测定每一个孔的每分钟计数(cpm)。将每一个抗原的每分钟计数针对仅有AIM-V®培养基的对照进行标准化。

[0152] 对于ELISpot测定,用100ul/孔的PBS中的IL-2捕获抗体(R&D Systems, Abingdon, UK)涂覆ELISpot板(Millipore, Watford, UK)。随后在PBS中洗涤板2次,在封闭缓冲液(1% PBS中的BSA(Sigma))中孵育过夜,随后在AIM-V®培养基中洗涤。第8天,将1×10⁵个自体CD4⁺T细胞添加至96孔ELISpot板中的载有1×10⁴个抗原的DC(10:1的比率)。以一式六份培养物测试所有多肽制剂。对于每一个供体PBMC,还包括阴性对照(单独的AIM-V®培养基)、无细胞对照和PHA(10ug/ml)阳性对照。

[0153] 在进一步的7天孵育期后,通过在dH₂O和PBS中进行3次连续洗涤,随后添加100ul的PBS/1%BSA中的过滤的生物素化的检测抗体(R&D Systems, Abingdon, UK)来对ELISpot板进行显色。在37℃孵育1.5小时后,将板在PBS中再洗涤3次,随后添加100ul PBS/1%BSA中的过滤的链霉抗生物素蛋白-AP(R&D Systems),进行1小时(在室温下孵育)。弃去链霉抗生物素蛋白-AP,并将板在PBS中洗涤4次。向每一个孔中添加BCIP/NBT(R&D Systems),

并在室温下孵育30分钟。通过用dH₂O洗涤孔和孔的背面3次终止斑点显影。将干燥的板在Immunoscan™分析仪上进行扫描,并使用Immunoscan™第4版软件测定每孔斑点数(spw)。

[0154] 对于增殖和IL-2ELISpot测定,结果表达为刺激指数(SI),所述刺激指数被定义为测试多肽相对仅有培养基的对照的cpm(增殖测定)或斑点(ELISpot测定)比率,对于阳性T细胞响应,使用等于或大于2的SI的阈值($SI \geq 2.0$)。

[0155] 实施例7:T细胞表位1、2和3的两个或更多个中的双和三突变的设计。

[0156] 基于结合测定的结果,在表位1、2和3处选择以下取代以存在于相较于SEQ ID NO:3含有2个氨基酸取代的多肽中,每一个取代存在于不同的表位中。

[0157] 表10.包含两个表位和三个表位修饰的变体的氨基酸取代。

[0158]

表位	氨基酸	SEQ ID NO:3中的原始氨基酸	取代氨基酸
1	54	Y	K、R
1	56	T	H、K
2	135	M	K、T
2	140	R	Q
3	174	K	R
3	178	D	N
3	181	W	H、R

[0159] 通过使用适当的起始DNA的定点诱变(通常为编码如实施例3中所示制备的两个突变之一的DNA)来制备编码具有2个表10中所示的氨基酸取代(各自在不同的表位中)的N1-N2人IG Fc融合蛋白的DNA。将所得的编码这些融合蛋白的DNA用于转化细胞且表达,并且如实施例4中所示纯化所述融合蛋白,以及如实施例5中所示测试其结合。随后基于对两个氨基酸取代的多肽的结合测定的结果设计在表位1、2和3的每一个中具有一个取代的多肽。测试在表位1、2和3的每一个中具有一个取代的多肽的ABeta结合以及实施例6中所示的T细胞响应。具体地,可通过取代如下表11中指定的SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7中的某些氨基酸来产生以下双表位变体和三表位变体。

[0160] 表11.本发明的双表位变体和三表位变体多肽。

[0161]

多肽编号	起始序列	表位1取代	表位2取代	表位3取代
63	SEQ ID NO:3	Y54K	M135K	
64	SEQ ID NO:3	Y54K	M135T	
65	SEQ ID NO:3	Y54K	R140Q	
66	SEQ ID NO:3	Y54R	M135K	
67	SEQ ID NO:3	Y54R	M135T	
68	SEQ ID NO:3	Y54R	R140Q	
69	SEQ ID NO:3	T56H	M135K	
70	SEQ ID NO:3	T56H	M135T	

[0162]

多肽编号	起始序列	表位1取代	表位2取代	表位3取代
------	------	-------	-------	-------

71	SEQ ID NO:3	T56H	R140Q	
72	SEQ ID NO:3	T56K	M135K	
73	SEQ ID NO:3	T56K	M135T	
74	SEQ ID NO:3	T56K	R140Q	
75	SEQ ID NO:3	Y54K		D178N
76	SEQ ID NO:3	Y54K		W181H
77	SEQ ID NO:3	Y54K		W181R
78	SEQ ID NO:3	Y54K		K174R
79	SEQ ID NO:3	Y54R		D178N
80	SEQ ID NO:3	Y54R		W181H
81	SEQ ID NO:3	Y54R		W181R
82	SEQ ID NO:3	Y54R		K174R
83	SEQ ID NO:3	T56H	D178N	
84	SEQ ID NO:3	T56H		W181H
85	SEQ ID NO:3	T56H		W181R
86	SEQ ID NO:3	T56H		K174R
87	SEQ ID NO:3	T56K		D178N
88	SEQ ID NO:3	T56K		W181H
89	SEQ ID NO:3	T56K		W181R
90	SEQ ID NO:3	T56K		K174R
91	SEQ ID NO:3		M135K	D178N
92	SEQ ID NO:3		M135K	W181H
93	SEQ ID NO:3		M135K	W181R
94	SEQ ID NO:3		M135K	K174R
95	SEQ ID NO:3		M135T	D178N
96	SEQ ID NO:3		M135T	W181H
97	SEQ ID NO:3		M135T	W181R
98	SEQ ID NO:3		M135T	K174R
99	SEQ ID NO:3		R140Q	D178N
100	SEQ ID NO:3		R140Q	W181H
101	SEQ ID NO:3		R140Q	W181R
102	SEQ ID NO:3		R140Q	K174R
110	SEQ ID NO:7	T56H	M135K	D178N
111	SEQ ID NO:7	T56H	M135K	W181H
112	SEQ ID NO:7	T56H	M135K	W181R
113	SEQ ID NO:7	T56H	M135K	K174R
114	SEQ ID NO:7	T56H	M135T	D178N
115	SEQ ID NO:7	T56H	M135T	W181H
116	SEQ ID NO:7	T56H	M135T	W181R

[0163]

多肽编号	起始序列	表位1取代	表位2取代	表位3取代
117	SEQ ID NO:7	T56H	M135T	K174R
118	SEQ ID NO:7	T56K	M135K	D178N
119	SEQ ID NO:7	T56K	M135K	W181H
120	SEQ ID NO:7	T56K	M135K	W181R
121	SEQ ID NO:7	T56K	M135K	K174R
122	SEQ ID NO:7	T56K	M135T	D178N
123	SEQ ID NO:7	T56K	M135T	W181H
124	SEQ ID NO:7	T56K	M135T	W181R
125	SEQ ID NO:7	T56K	M135T	K174R
126	SEQ ID NO:7	Y54K	M135K	K174R
127	SEQ ID NO:7	Y54K	M135T	K174R
128	SEQ ID NO:7	Y54R	M135K	K174R
129	SEQ ID NO:7	Y54R	M135T	K174R
130	SEQ ID NO:7	T56H		D178N
131	SEQ ID NO:7	T56H		W181H
132	SEQ ID NO:7	T56H		W181R
133	SEQ ID NO:7	T56H		K174R
134	SEQ ID NO:7	T56K		D178N
135	SEQ ID NO:7	T56K		W181H
136	SEQ ID NO:7	T56K		W181R
137	SEQ ID NO:7	T56K		K174R

[0164] 使用实施例5中所示的ELISA测定法测定上文中指定的多肽的对 β -淀粉样蛋白的结合。结果示于表12和13中。相对结合值反映 IC_{50} (SEQ ID NO:3的多肽)/ IC_{50} (所测试的多肽)(例如,值越低,则所述多肽相较于SEQ ID NO:3的多肽的结合越大)。多个值反映该结合测定中的一式两份测试。

[0165] 表12. SEQ ID NO:3的多肽相对本发明的示例性多肽的相对结合值。

[0166]

多肽编号	相对结合值
63	0.12
64	0.14
65	0.18
66	0.08
67	0.1
68	0.19
69	0.29, 0.37
70	0.43, 0.45

多肽编号	相对结合值
71	0.42
72	0.40, 0.27
73	0.25, 0.39
74	0.26
75	0.11
76	0.13
77	0.18, 0.16
78	0.24, 0.20

多肽编号	相对结合值
79	0.08
80	0.16
81	0.14
82	0.2
83	0.18, 0.36
84	0.26, 0.48
85	0.24, 0.79
86	0.51, 1.08

[0167]

多肽编号	相对结合值
87	0.51, 0.83
88	0.65, 1.39
89	0.71, 1.05
90	1.43, 1.64
91	0.14
92	0.24

多肽编号	相对结合值
93	0.34
94	0.33, 0.48
95	0.07
96	0.15
97	0.14
98	0.21, 0.61

多肽编号	相对结合值
99	0.11
100	0.36
101	0.2
102	0.23

[0168] 表13. SEQ ID NO:7的多肽相对本发明的示例性多肽的相对结合值。

[0169]

多肽编号	相对结合值
110	0.671
111	0.348
112	0.564
113	0.407
114	0.447
115	0.871
116	0.7

多肽编号	相对结合值
117	0.913
118	0.35
119	0.63
120	0.755
121	0.488
122	0.493
123	0.88

多肽编号	相对结合值
124	0.538
125	0.575
126	0.391
127	0.44
128	0.72
129	0.648

[0170] 实施例8: 酸纤维素过滤阻滞测定

[0171] 本测定用于监测淀粉样蛋白纤维的去稳定化(解聚)或至非-淀粉样蛋白形成性或可溶性聚集物的重塑。所述测定主要从Chang, E. 和Kuret, J., Anal Biochem 373, 330-6, (2008)和Wanker, E.E.等, Methods Enzymol 309, 375-86, (1999)改造而来。具体地, 在37°C用不同浓度(1nM至2μM)的本发明的变体融合多肽预孵育2.5μM的fAB淀粉样蛋白纤维的制剂3天。孵育后, 稀释具有和不具有融合多肽的纤维, 并将其点在真空印迹上的酸纤维素膜上。用PBS充分洗涤膜, 并用对于Aβ的N末端是特异的抗体探测1小时。将缀合有HRP的第二Ab用于定量保留在膜上的纤维状聚集物。使用光密度扫描仪分析和数字化斑点颜色。基于每一个斑点的信号强度相对添加至每一个斑点的融合多肽的浓度计算EC₅₀(半最大有效浓度)。

[0172] 当在本测定中测试SEQ ID NO:3的多肽时, EC₅₀经测定大于2μM, 表明该多肽具有低解聚活性。也在本测定中测试SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:7的多肽, 并且每一种多肽显示100nM的EC₅₀, 这表明显著的解聚活性。基于该结果, 使用SEQ ID NO:7的多肽作为待修饰的起始氨基酸序列来产生在多肽102后的所有随后编号的多肽, 包括所有在表位1、2和3的每一个中含有去免疫化取代的变体多肽。所测试的多肽的EC₅₀值示于下面的表14中。

[0173] 表14. 本发明的示例性变体多肽的fAB淀粉样蛋白纤维解聚活性。

[0174]

多肽编号	1A8 淀粉样蛋白 纤维解聚活性 (EC ₅₀)
110	100 nM
111	100 nM
112	100 nM
113	100 nM
114	nd*
115	>2 μM
116	100 nM
117	100 nM
118	100 nM
119	100 nM
120	nd
121	100 nM
122	100 nM

多肽编号	1A8 淀粉样蛋白 纤维解聚活性 (EC ₅₀)
123	nd
124	nd
125	100 nM
126	100 nM
127	100 nM
128	100 nM
129	100 nM
130	nd
131	100-400 nM
132	nd
133	400-800 nM
134	nd
135	200 nM
136	400-800 nM

[0175] *nd=多肽的浓度范围未被测试来测定EC₅₀。在所测试的最高浓度上,这些多肽未表现显著的EC₅₀。

[0176] 如可从上述实施例看到的,本发明的变体多肽全都显示如通过ELISA测定法测定的对Aβ的结合。大多数所测试的变体多肽也显示如通过斑点印迹测定法测定的Aβ的解聚。

(SEQ ID NO:1)

```

1      A E T V E S C L A K P H T E N S F T N V W K 22
23      D D K T L D R Y A N Y E G C L W N A T G V V 44
45      V C T G D E T O C Y G T W V P I G L A I P E 66
67      N E G G G S E G G G S E D G G G S E G G G T K 88
89      P P E Y G D T P I P G Y T Y I N P L D G T Y 110
111     P P G T E Q N P A N P N P S L E E S Q P L N 132
133     T F M F Q N N R F R N R Q G A L T V Y T G T 154
155     F T Q G T D P V K T Y Y Q Y T P V S S K A M 176
177     Y D A Y W N G K F R D C A F H S G F N E D P 198
199     F V C E Y Q G Q S S D L P Q P P V N A G G G 220
221     S G G G S E G G G S E G G G S E G G G S E G G 242
243     G S E G G G S G G G S G S G A M V R S D K T 264
265     H T C P P C P A F E D L G G P S V F L F P P 286
287     K P K D T L N I S N T F E V T C V V V D V S 308
309     H E D P E V K E N W Y V D G V E V H N A K T 330
331     K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q 352
353     D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E 374
375     K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R 396
397     E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I 418
419     A V E W E S N G Q P E N S Y K T T P P V L D 440
441     S D G S E F L Y S K L T V D K S R W Q Q C N 462
463     V F S C S V M H E A L H N H T Q K S L S L 484
485     S P G K

```

图1

(SEQ ID NO:2)

```

1  A E T V E S C L A K P H T E N S F T N V W K 22
23 D D K T L D R Y A N Y E G C L W N A T G V V 44
45 V C T G D E T O C Y G T W V P I G L A I P E 66
67 N E G G G S E G G G S E G G G S E G G G T K 88
89 P P E Y G D T P I P G Y T Y I N P L D G T Y 110
111 P P G T E Q N P A N P N P S L E E S Q P L N 132
133 T F M F O N N R F R N R Q G A L T V Y T G T 154
155 F T Q G T D P V K T Y Y Q Y T P V S S K A M 176
177 Y D A Y W N G K F R D C A F H S G F N E D P 198
199 F V C E Y Q G Q S S D L P Q P P V N A G G G 220
221 S G G G S G G G S E G G G S E G G G S E G G 242
243 G S E G G G S G G G S G S G A R S D K T 262
263 H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P 284
285 K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S 306
307 H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T 328
329 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q 350
351 D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E 372
373 K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R 394
395 E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I 416
417 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D 438
439 S D G S F F L Y S K L T V D K S E R W Q Q G N 460
461 V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L 482
483 S P G K

```

图2

(SEQ ID NO.3)

```

1      A E T V E S C L A K P H T E N S F T N V W K 22
23     D D K T L D R Y A N Y E G C L W N A T G V V 44
45     V C T G D E T Q C Y G T W V P I G L A I P E 66
67     N E G G G S E G G G S E G G G S E G G G T K 88
89     P P E Y G D T P I P G Y T Y I N P L D G T Y 110
111    P P G T E Q N P A N P N P S L E E S Q P L N 132
133    T F M F Q N N R F R N R Q G A L T V Y T G T 154
155    F T Q G T D P V K T Y Y Q Y T P V S S K A M 176
177    Y D A Y W N G K F R D C A F H S G F N E D P 198
199    F V C E Y Q G Q S S D L P Q P P A N A G G E 220
221    S G G G S G G G S E G G G S E G G G S E G G 242
243    G S E G G G S G G G S G S G A R S D K T 262
263    H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P 284
285    K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S 306
307    H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T 328
329    K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H O 350
351    D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E 372
373    K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R 394
395    E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I 416
417    A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D 438
439    S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N 460
461    V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L 482
483    S P G K

```

图3

{SEQ ID NO:5}

ATGTACAGGATGCAACTCCTGCTCTTGCATTCACATAAGTCITGCACTTGTGCAGAAATTCGATGCCCTGAAAACCTGTTGAAG
 TTGCTTTAGCCAAACCCCOATACACAAAATTCAATTACTAAGCTCTGGAAAGACGACAAAACCTTTAGATCGTTACGCTAACT
 ATGAGGGCTGTGTGGAATGCTACAGGGTGTAGTTGTAGTCTGTCAGCAAACTCAGTCTTACGGTACATGCGTTCCT
 ATTGGGCTTGCTATCCCTGAATAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTCTGAGGGTGGCGGTCTCTGAGGGTGGCGG
 TACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCCGGCTATACTTATATCAACCCCTCTCGACGGCACTTATCCGCTG
 GTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTCTCTCTGTGAGGAGTCTCAGCCCTCTTAATACTTTCAATGTTTCAGAAATAT
 AGCTTCCGAAATAGCCAGCGGCAATTAACTGTTTATACCGGCACCTTTACTCAAGCCACTGACCCCGTTAAACCTTATTA
 CCAGTACACTCCTGTATCATCAAAACCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAATTCAGAGACACGCGCTTTCATCTTG
 GCYTTAATGAGGATCCATTCGTTTGTGAATATCAAGCCCAATCGTCTGACCTGCTCAACCTCTCTGTCAAATGCTGCGGCG
 GGCTCTGGTGGTTCGTGGTGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTCTGAGGGTGGCGGTCTCTGAGGG
 AGCGGGTCCGGTGGCTCTGGTTCGGTGGCGCAATCTGACAAAACCTCACACATGCCCAACCGTGGCGGCGCTCTGAGG
 TCCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTCTCCCGCCAAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA
 TGCGTGGTGGACGTGAGCCACGACAGACCCCTGAGGCTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATATGCG
 CAAACAAAGCCCGGAGGAGCAGTACACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGGCTCCTCAGCGTCCCTGACCGGACCGACTGGC
 TGAATGCCAAGGAGTACAGTGCAGGTCCTCCAAAGCCCTCCAGCCCAATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCCAA
 GGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCCCTGCCCCCAATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCCAGGTGAGGCTGACCTG
 CCTGGTCAAGGGCTTCTATCCAGGAGCATCGCGTGGAGAGCAATGGGCAAGCCGGAGACAACTACAAAGACCA
 CGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCAACCCGTGGACAAAGACCGTGGCTGCGGCGG
 AACGCTCTCTCATGCTCCGTGATGCCAGGAGGCTCTGCCAACAACCACTACACCGCAGAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
 ATGA

图4B

(SEQ ID NO:6)

ATGTCACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATTGCACCTAAGTCTTGCACTTGTCACGAATTCGATCGCTGAAACTGTTGAAAG
TTGTTTAGCAAAACCCCATACAGAAATTCATTACTAAGCTCTGCAAGACGACAAACTTTAGATCGTTACGCTAACT
ATGAGGGCTGTCTGTGGAAATGCTACAGCGTGTGTAGTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTACGGTACATGGGTTCCCT
ATTGGGCTTGCTATCCCTGAATAATGAGGTTGGTCTCTCAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGGGTCTCAGGGTGGCGG
TACTAAACCTCCTGAGTACCGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCTCTCGACGGCACTTATCCGCCCTG
GTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATATCTTTCATGTTTCAGAAATAAT
AGGTTCCGAATAAGCGAGGGGCATTAACTGTTTATACGGGCACCTTTTACTCAAGGCACCTGACCCCGTTAAAACTTATTA
CCAGTACACTCCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATCAGCGTTACTGGAACCGTAATAATCAGAGACTGGCGCTTTCATTTCTG
CCCTTAATCAGGATCCATTCTGTTGTGTAATATCAGGCCAATCGTCTGACCTGCCCTCAACCTCCTCCCAATGCTGGCGGC
GagTCTGGTGGTGTCTGGTGGCGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTCAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTCGAGGG
AGGCGGTTCCGGTGGTCTGCTGCTCCGGTCCAGATCTGACAAACTCACAATGCCCAACCGTCCCCAGCACCTGAAC
TTCCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCAAACCCCAAGCACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCAACA
TGCGTGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGCTGACGGCGCTGAGGTGCGATATGCT
CAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGTCTCAACCGTCTGACCAAGCACTGCG
TGAAATGGCAAGGATACAAAGTGCAGGTCTCCAAACAAGCCCTCCAGCCCAATCGAGAAACCACTCTCCAAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCTCGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCCAGGTACGCTGACCTG
CCYGGTCAAAAGCCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTCTACAGCAAGCTCAACCGTGGACAAAGACAGGTGGGACGACGGG
AAAGTCTTCTCATGCTCCGGTATGCACGAGGCTCTGCAACAACCACTACACGCAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
ATGA

图5

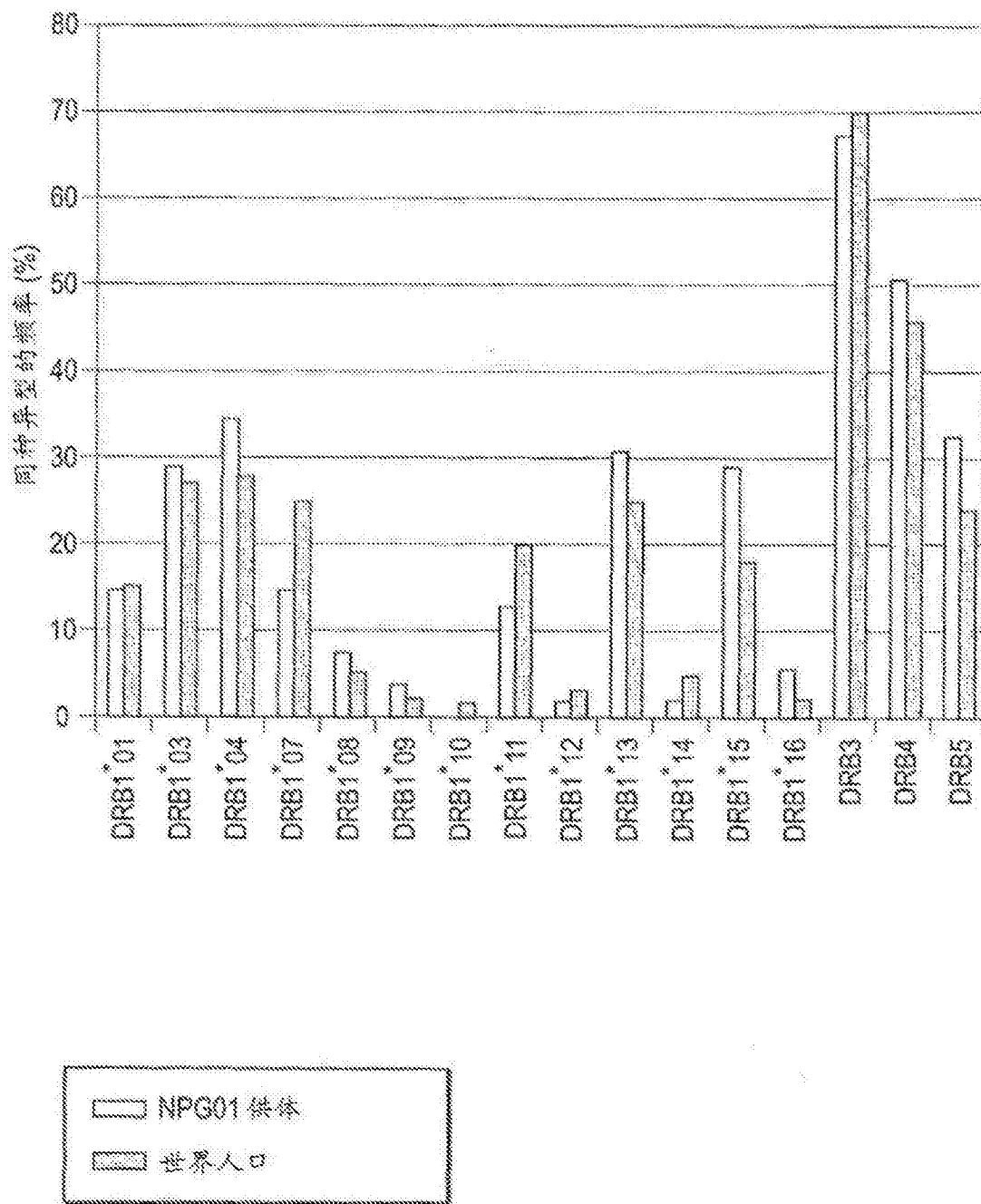


图6

(SEQ ID NO:7)

```

1      22
A E T V E S C L A K P H T E N S F T N V W K
23      44
D D K T L D R Y A N Y E G C L W N A T G V V
45      66
V C T G D E T O C Y G T W V P I G L A I P E
67      88
N E G G G S E G G G S E G G G S E G G G T K
89      110
P P E Y G D T P I P G Y T Y I N P L D G T Y
111      132
P P G T E Q N P A N P N P S L E E S Q P L N
133      154
T F M F Q N N R F R N R Q G A L T V Y T G T
155      176
F T Q G T D P V K T Y Y Q Y T P V S S K A M
177      198
Y D A Y W N G K F R D C A F H S G F N E D P
199      220
F V C E Y Q G Q S S D L P Q P P G N A G G G
221      242
S G G G S G G G S E G G G S E G G G S E G G
243      264
G S E G G G S G G G S G S G A M V R S D K T
265      286
H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P
287      308
K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S
309      330
H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T
331      352
K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q
353      374
D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E
375      396
K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
397      418
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I
419      440
A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
441      462
S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
463      484
V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L
485
S P G K

```

图7

(SEQ ID NO:8)

ATGTA CAGGATGCAACTCCTGCTTCATTGCACATAAGTCCTTGCACTTGTCCAGGAATTCCGATCGCTCAAACTGTTGAAAG
TTGCTTAGCAAAACCCCATACAGAAATTCATTACTAAACGTCCTGGAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAAACT
ATGAGGCCGTCCTGYGGAATGCTACAGCGGTGTGATTTGTACTGCTCAGCAAACTCAGTGTATTACGCTACATGGGTTCCCT
ATTGGGCTTGCTATCCCTGAATAATCAGGGTGGTGGCTCTGACGGTGGCGGTCTGACGGTGGCGGTTCGACGGGTGCGCGG
TACTAAACCTCTGAGTAGCGGTGATACACCTATTCCGGCTATACTTATAICAACCTCTCCGACGGCACTTATCCGCTG
GTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGCTCAGCCTCTTAATACTTTCAATGTTTCAGAAATAAT
AGGTTCCGAAATAGGCAGGGCGGCAATTAACTGTTTATACGGGCADTTTACTCAAGGCACGACCCCGTTAAAACTTATTA
CCAGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTCGAAACGGTAATTCAGAGACTCGGCTTCCCATTTCTG
CGCTTAATGAGGATCCATTCCGTTTGTAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCCTCAACCTCTCTGGCAATGCTGGCGGC
GGCTCTGGTGGTCTTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTCTCTGACGGTGGCGGCTCTGAGGG
AGCGGGTTCGGTGGCTCTGGTTCGGGTGCCATGGTTAGATCTGCAAAACTCAACATGCCACCGCTGCCACAGCAC
CTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGCTTCTCTCCCAAAACCCAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG
GTCAATGCTGGTGGACGTGAGCCACGAACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACCTGACGGCGGTGGAGGTGCA
TAATGCCAAGACAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACACGACGTAACGCTGCTGAGGTGAGGTCTCTCACCGTCTGCACCAAG
ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCCAGGCTCTCCACAAAGCCCTCCACGCCCAATCCAGAAAACCATCTCCAAA
GCCAAGGGAGGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGTGCCCAATCCGGAGGAGATGACCAAGAACCGAGGTACGCT
GAGCTGCCGTGCAAGGCTTCTATCCCGGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGGAGACACACTACA
AGACCAAGCCTCCCGTGGACTCCGACGGTCCCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAGACAGGTGGCAG
CAGGGGAACGCTTCTCAAGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCCACAACCACTACACCGGAGAGGCTCTCCCTGTCTCC
GGGTAAATGA

图8