



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110382522 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 30

(21) 申请号 201880015949.5

(22) 申请日 2018.01.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110382522 A

(43) 申请公布日 2019.10.25

(30) 优先权数据
62/452,015 2017.01.30 US
62/530,980 2017.07.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.04

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2018/050576 2018.01.30

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/138709 EN 2018.08.02

(73) 专利权人 加拿大国家研究委员会
地址 加拿大安大略

(72) 发明人 巴律·查克拉瓦蒂
D·斯坦尼米洛维克 Y·杜罗切尔

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

专利代理师 薛恒 王琳

(51) Int.Cl.
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 47/68 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/46 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2006133566 A1, 2006.12.21
Graham K. Farrington等. A novel platform for engineering blood-brain barrier- crossing bispecific biologics. 《FASEB Journal》. 2014,

审查员 李阳

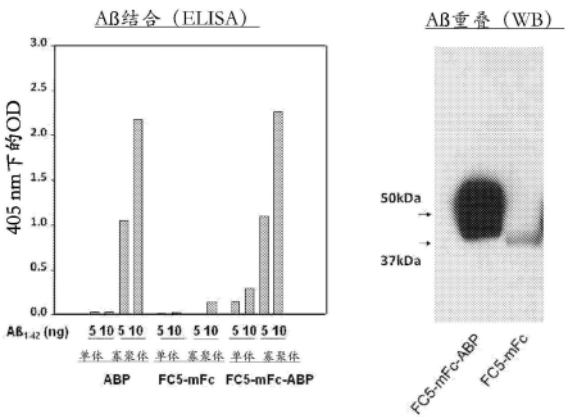
权利要求书1页 说明书44页 附图26页

(54) 发明名称

血脑屏障穿过化合物及其用途

(57) 摘要

披露了淀粉样蛋白-β结合肽的脑穿透性组合物。该组合物可以用于治疗阿尔茨海默病,例如为能够跨血脑屏障穿入脑内的双功能分子以及包含其的组合物,所述双功能分子包含经由Fc片段连接的血脑屏障穿越抗体和淀粉样蛋白-β靶向肽。披露了使用该组合物以治疗阿尔茨海默病的方法。



1. 一种融合蛋白,由以下部分组成:

a) 穿过血脑屏障 (BBB) 的单结构域抗体 (sdAb) 或其片段,其中该sdAb或其片段由EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKGLEFVSRITWGGDNFTFYSNSVKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:17) 所示的序列组成;

b) 结合 β -淀粉样蛋白的多肽,其中该结合 β -淀粉样蛋白的多肽是 β -淀粉样蛋白结合多肽 (ABP) 变体,该 β -淀粉样蛋白结合多肽变体由GTFGTGGASAQASLASKDKTPKSKSKGGSTQLKSRVKNI (SEQ ID NO:36) 所示的序列组成;

c) 由AEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:40) 所示的序列组成的人Fc1片段;以及

d) 可选地存在于该融合蛋白中的接头序列,

其中该融合蛋白包含与该人Fc1片段的N末端连接的sdAb或其片段,和与人Fc1片段的C末端连接的结合 β 淀粉样蛋白的多肽。

2. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中该融合蛋白包含该接头序列。

3. 如权利要求2所述的融合蛋白,其中该接头序列是独立选择的接头序列,该接头序列将该结合 β -淀粉样蛋白的多肽与该Fc连接。

4. 如权利要求3所述的融合蛋白,其中该接头序列是GGGGSGGGGS或GGGSGGGGS。

5. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中该融合蛋白由EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFK ITHYTMGWFRQAPGKGLEFVSRITWGGDNFTFYSNSVKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTA TPLRVDYWGQGT LVTVSSAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGTGGGGSGGGSGTFTGTGGASAQASLASKDKTPKSKSKGGSTQLKSRVKNI (SEQ ID NO:47) 所示的序列组成。

6. 一种化合物,该化合物由两个如权利要求1至5中任一项所述的融合蛋白的二聚体组成。

7. 如权利要求6所述的化合物,该化合物由两个融合蛋白的二聚体组成,每个融合蛋白由EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKGLEFVSRITWGGDNFTFYSNSVKGRFTISRDN SKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYWGQGT LVTVSSAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGTGGGGSGGGSGTFTGTGGASAQAS LASKDKTPKSKSKGGSTQLKSRVKNI (SEQ ID NO:47) 所示的序列组成。

8. 权利要求1至5中任一项所述的融合蛋白在制备用于治疗阿尔茨海默病的药物中的用途。

9. 权利要求6至7中任一项所述的化合物在制备用于治疗阿尔茨海默病的药物中的用途。

血脑屏障穿过化合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及穿过血脑屏障的化合物,及其用途。更具体地,本发明涉及可以包含穿越血脑屏障的抗体或其片段、免疫球蛋白Fc结构域或其片段、以及结合 β -淀粉样蛋白的多肽、融合蛋白的化合物及其组合物,以及所述化合物及其组合物在治疗阿尔茨海默病方面的用途。

背景技术

[0002] 神经退行性疾病(如阿尔茨海默病和帕金森病)对我们的老龄化社会来说是不断增加的负担,因为目前不存在用于这些致残病症的有效治疗。阿尔茨海默病(AD)是影响超过65岁群体的大约15%的不可逆的神经退行性病症,并且是老龄化群体中进行性智力和认知失败的主要原因(Hardy等人,2014)。

[0003] 在AD中,存在胆碱能神经元的严重丧失,随之而来的是乙酰胆碱(ACh)水平的下降,乙酰胆碱是一种参与记忆加工和储存的关键神经递质。此外,由神经递质谷氨酸诱导的兴奋性毒性也与AD的发病机理有关。因此,胆碱能增强和/或谷氨酸毒性的抑制可以改善AD中的认知。实际上,FDA批准的唯一用于治疗AD的药物是乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制剂(例如,多奈哌齐、利斯的明(rivastigmine)、加兰他敏),用以防止ACh和特定谷氨酸受体抑制剂(例如,美金刚)的丧失(Mangialasche等人,2010;Ji和Ha,2010;Savonenko等人,2012)。然而,这些对症药物的有益作用是有限的和短暂的,提供认知功能的暂时改善并且不阻止疾病的进展。虽然考虑了其他治疗方法,包括抗氧化剂、抗炎药(NSAID)、降胆固醇药和雌激素治疗,但这些治疗方法似乎均没有任何长期有益作用,特别是在改善AD患者的记忆和认知功能方面(Magialasche等人,2010;Ji和Ha,2010)。

[0004] 阿尔茨海默病的一个主要标志是39-43个氨基酸的肽 β -淀粉样蛋白(A β)以聚集体和斑块的形式在脑中积累。基于遗传、病理和生物化学研究的大量证据表明,A β ,尤其是其寡聚聚集体,在AD病理学的发展中起着核心作用(Hardy等人,2014;DeLaGarza,2003;Selkoe和Hardy,2016)。根据淀粉样蛋白假说,脑中A β 的产生和清除的长期失衡导致其随着衰老而积累和聚集。据信这些A β 聚集体引发导致突触丧失和神经元功能的一系列事件,从而导致记忆和其他认知功能的逐渐丧失(Hardy等人,2014;DeLaGarza,2003;Selkoe和Hardy,2016;Sengupta等人,2016)。

[0005] 从其前体蛋白APP产生A β 是由通过蛋白酶 β 和 γ 分泌酶对APP进行顺序蛋白水解实现的(Barageb和Sonawane,2015)。这些酶的抑制剂已被证实可降低A β 的产生,并且正在被开发为用于治疗AD的潜在药物(Hardy等人,2014;Mangialasche等人,2010;Selkoe和Hardy,2016;Ji和Ha,2010)。类似地,还正在开发螯合和/或促进A β 清除的药剂。其中值得注意的是使用AD疫苗的免疫疗法的开发。主动(A β 肽)和被动免疫(A β -抗体)两者已被证实实在预防淀粉样蛋白沉积以及清除AD转基因动物模型中预先形成的淀粉样斑块方面以及在涉及AD患者的临床试验中是有效的(Mangialasche等人,2010;Ji和Ha,2010;Morrone等人,2015;Lannfelt等人,2014;Selkoe和Hardy,2016;Goure等人,2014)。

[0006] 正在开发 β 和 γ 分泌酶的抑制剂(例如,他仑氟比(tarenflurbil)、司马西特、维贝司他(verubecestat)),这些抑制剂防止淀粉样蛋白前体蛋白(APP)的蛋白水解切割并且由此减少或抑制脑 $A\beta$ 产生。然而,它们在降低 $A\beta$ 负荷方面的治疗功效尚不清楚,并且许多这些药物在临床前或临床试验中均失败了(Savonenko等人,2012;Musiek和Holtzman,2015)。此外,由于这些酶还参与与神经元发育有关的其他酶和信号传导分子(如Notch)的加工(Savonenko等人,2012;Musiek和Holtzman,2015),因此这些抑制剂可能具有严重的非特异性副作用。

[0007] 免疫治疗方法,如主动($A\beta$ 疫苗,AN1792)和被动免疫(例如,巴匹珠单抗(Bapineuzumab)、索拉珠单抗(Solanezumab)、克瑞奈珠单抗(Crenezumab)、阿度努单抗(aducanumab)等)已被证实在减少转基因动物的 $A\beta$ 沉积和部分消除记忆缺陷方面非常有效(Monsonego和Weiner,2003;Bard等人,2000,Sevigny J等人,2016)。使用主动和被动免疫两者的若干临床试验显示脑 $A\beta$ 沉积减少,同时认知中度改善。然而,由于AD患者出现严重的炎症反应(脑膜脑炎表现)、血管源性水肿、和微出血,因此必须放弃临床试验。尽管存在这些局限性,但免疫治疗方法表明,有效螯合 $A\beta$ 并防止其沉积和毒性的药剂可能用作阻止AD进展并且甚至阻止其发展的有效药物(Rafii和Aisen,2015,Selkoe和Hardy,2016)。

[0008] AD和源自脑的其他疾病的治疗以及早期诊断仍然具有挑战性,因为大多数适合的治疗分子和诊断剂无法穿透紧密且高度限制性的血脑屏障(BBB)(Abbott,2013)。BBB构成物理屏障,该物理屏障由脑内皮细胞(BEC)形成,其内衬于血管并通过紧密连接彼此接触(Abbott,2013)。BEC之间形成的紧密连接对于BBB的完整性是必不可少的,并且防止大于500道尔顿(Da)的分子的细胞旁转运。由于脑内皮细胞表现出非常低的胞饮率(Abbott,2013),较大分子的跨细胞转运局限于高特异性受体介导的转胞吞(RMT)途径,以及被动的基于电荷的吸附介导的转胞吞作用(Abbott,2013;Pardridge,2002)。另外,高密度的外排泵(如P-糖蛋白或多药耐药蛋白-1(MDR-1))有助于从脑中除去不需要的物质(Abbott,2013)。

[0009] 虽然所有这些特征均保护脑免受病原体和毒素的侵害,但它们同样阻止大多数治疗剂的进入。事实上,少于5%的小分子治疗剂和几乎为零的较大治疗剂可以在药理学相关浓度(即,足以与中枢神经系统(CNS)靶标结合并引起药理学/治疗反应)下穿越BBB,除非它们是特异性“运输”的,即与转运蛋白分子偶联。由于缺乏有效的“载体”来跨BBB转运分子,许多针对神经退行性疾病的药物已被“搁置”或从进一步开发中被淘汰,因为它们无法以足够的量递送到脑。

[0010] 尽管在理解AD病理学的分子机制方面取得了相当大的进展,但目前还没有有效的药物或治疗方法可以阻止疾病的进展或治愈。此外,缺乏高容量和高选择性的BBB载体延迟了对源自脑的疾病(包括脑肿瘤和神经退行性疾病)的新疗法和诊断的开发。

发明内容

[0011] 本发明涉及穿过血脑屏障的化合物或组合物,及其用途。

[0012] 本发明提供结合 β -淀粉样蛋白(β -淀粉样蛋白)的多肽。结合 β -淀粉样蛋白的多肽(或蛋白质)可以选择性地结合病理相关的 β -淀粉样蛋白₁₋₄₂($A\beta_{1-42}$)聚集体,并且可以缩写为并在本文中称为ABP或ABP变体。

[0013] 本发明提供包含与穿越血脑屏障 (BBB) 的抗体或其片段连接的 β -淀粉样蛋白 (β -淀粉样蛋白) 结合多肽 (ABP或ABP变体) 的融合蛋白 (在本文中也称为化合物、组合物或构建体), 其中BBB在本文中是指穿过血脑屏障的载体抗体或片段的缩写。在优选的实施例中, 该融合蛋白包含ABP或ABP变体和BBB载体或其片段, 其中该融合蛋白的ABP和BBB组分可以经由Fc区或其部分连接。在优选的实施例中, 包含ABP或ABP变体和BBB的融合蛋白进一步包含免疫球蛋白效应子结构域 (称为Fc) 或其片段, 其中该融合蛋白的ABP和BBB组分可以经由Fc区或其部分连接。例如, 本发明的构建体可以进一步包含接头 (L), 其中L是小的连接肽或肽样链。例如, 所提供的BBB-Fc-L-ABP构建体可以是单链多肽或二聚体多肽, 其中包含BBB-Fc-L-ABP的单链多肽可以通过Fc二聚化形成二聚体。Fc二聚化可以由两个Fc CH3结构域之间大的紧密堆积的疏水界面的相互作用来介导。例如, 本发明的构建体可以包含BBB-Fc-ABP。所提供的BBB-Fc-ABP构建体可以是单链多肽 (一价) 或二聚体多肽 (二价), 其中包含BBB-Fc-ABP的单链多肽可以通过允许融合蛋白二聚化的Fc形成二聚体。本发明的化合物可以称为融合蛋白、构建体、融合分子、制剂或组合物。

[0014] 本发明的化合物可以用于治疗阿尔茨海默病 (AD)。

[0015] 结合 β -淀粉样蛋白的多肽可以包含选自下组的序列, 该组由以下组成:

[0016] SGKTEYMAFPKPFESSSSIGAEKPRNKKLP EEVESSRTPWLYEQEGEVEKPF IKTGFSVSVEKSTSS NRKNQLDTNGRRRQFDEESLESFSSMPDPVDPTTVTKTFKTRKASAAQASLASKDKTPKSKSKKRNSTQLKSRVKNI THARRILQQSNRNACNEAPETGSDFSMF EA (SEQ ID NO:27);

[0017] FSSMPDPVDPTTVTKTFKTRKASAAQASLASKDKTPKSKSK (SEQ ID NO:28);

[0018] KDKTPKSKSKKRNSTQLKSRVKNI THARRILQQSNRNACN (SEQ ID NO:29);

[0019] KTFKTRKASAAQASLASKDKTPKSKSKKRNSTQLKSRVKNI (SEQ ID NO:30)。

[0020] 结合 β -淀粉样蛋白的多肽可以是包含以下序列的变体:

[0021] X_1 TFX₂TX₃X₄ASAQASLASKDKTPKSKSKX₅X₆STQLX₇SX₈VX₉NI

[0022] 其中 X_1 =G或A, X_2 =G或V, X_3 =G或A, X_4 =G或A, X_5 =G或V, X_6 =G或V, X_7 =G或V, X_8 =G或A, X_9 =G或A (SEQ ID NO:31)。

[0023] 在具体的非限制性实施例中, ABP或其变体, 可以包含选自以下中的任一种的序列:

[0024] KTFKTRKASAAQASLASKDKTPKSKSKKR GSTQLKSRVKNI (SEQ ID NO:32);

[0025] KTFKTRKASAAQASLASKDKTPKSKSKKGGSTQLKSRVKNI (SEQ ID NO:33);

[0026] KTFKTRGASAAQASLASKDKTPKSKSKKR GSTQLKSRVKNI (SEQ ID NO:34);

[0027] KTFKTGGASAAQASLASKDKTPKSKSKKR GSTQLKSRVKNI (SEQ ID NO:35);

[0028] GTFGTGGASAAQASLASKDKTPKSKSKKGGSTQLKSRVKNI (SEQ ID NO:36);

[0029] KTFKTRKASAAQASLASKDKTPKSKSKKGGSTVKNI (SEQ ID NO:37);

[0030] KTFKTRKASAAQASLASKDKTPKSKSKKR G (SEQ ID NO:38); 以及

[0031] 与以上序列中的任一种基本上相同的序列。

[0032] 结合 β -淀粉样蛋白的多肽 (ABP) 变体可以包含选自下组的多肽序列, 该组由以下组成: SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、和SEQ ID NO:38。包含选自下组的多肽序列的ABP可以称为ABP或ABP变体, 该组由以下组成: SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ

ID NO:37、和SEQ ID NO:38。本发明另外地包含具有共有序列SEQ ID NO:31的ABP变体序列,并且可以是例如SEQ ID NO:35、或SEQ ID NO:36、或任何等同稳定的多肽序列。等同稳定的多肽序列在哺乳动物表达系统中表达和产生融合蛋白期间表现出肽稳定性。例如,本发明的ABP变体可以表现出优于现有技术ABP肽的改善的肽稳定性(参考文献WO 2006/133566)。

[0033] 本发明提供一种结合 β -淀粉样蛋白的分离多肽,该结合 β -淀粉样蛋白的分离多肽可以包含选自下组的序列,该组由以下组成:SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、和SEQ ID NO:38,或包含等同稳定的多肽序列的序列。

[0034] 本发明提供一种包含选自下组的ABP或ABP变体的融合多肽,该组由以下组成:SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、和SEQ ID NO:38。在非限制性实例中,ABP变体可以包含序列KTFKTGGASAQASLASKDKTPKSKSKKRGSTQLKSRVKNI (SEQ ID NO:35);GTFGTGGASAQASLASKDKTPKSKSKKGGSTQLKSRVKNI (SEQ ID NO:36)。

[0035] 本发明的融合蛋白可以包含穿越血脑屏障(BBB)穿过的抗体或其片段(如上所指出,BBB是穿过血脑屏障的抗体载体的缩写)。该抗体或其片段(BBB)可以结合脑内皮细胞上的表面受体表位,这些表面受体表位允许穿越血脑屏障的穿过。例如,此类表面受体表位可以是TMEM30A或胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)表位或其同种型、变体、部分、或片段。

[0036] 该抗体或其片段可以包含选自下组的序列,该组由以下组成:

[0037] 包含GFKITHYTMG (SEQ ID NO:1)的互补决定区(CDR)1序列、RITWGGDNFTFYSNSVK (SEQ ID NO:2)的CDR2序列、GSTSTATPLRVDY (SEQ ID NO:3)的CDR3序列的抗体或其片段;

[0038] 包含EYPSNFYA (SEQ ID NO:4)的CDR1序列、VSRDGLTT (SEQ ID NO:5)的CDR2序列、AIVITGVWNKVDVNSRSYHY (SEQ ID NO:6)的CDR3序列的抗体或其片段;

[0039] 包含GGTVSPTA (SEQ ID NO:7)的CDR1序列、ITWSRGTT (SEQ ID NO:8)的CDR2序列、AASTFLRILPEESAYTY (SEQ ID NO:9)的CDR3序列的抗体或其片段;以及

[0040] 包含GRTIDNYA (SEQ ID NO:10)的CDR1序列、其中X是A或T的IDWGDGGX (SEQ ID NO:11)的CDR2序列、AMARQSRVNLVDVARYDY (SEQ ID NO:12)的CDR3序列的抗体或其片段。

[0041] 该抗体或其片段可以包含选自下组的序列,该组由以下组成:

[0042] $X_1VQLVX_2SGGGLVQPGSLRLSCAASGFKITHYTMGWX_3RQAPGKX_4X_5EX_6VSRITWGGDNFTFYSNSVKGRFTISRDNKNTX_7YLQMNLSRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYWGQGLTVTVSS$ (SEQ ID NO:13),其中 $X_1=D$ 或 E , $X_2=A$ 或 E , $X_3=F$ 或 V , $X_4=E$ 或 G , $X_5=R$ 或 L , $X_6=F$ 或 W , $X_7=L$ 或 V ;

[0043] $X_1VX_2LX_3ESGGGLVQX_4GGSLRLSCX_5ASEYPSNFYAMSWX_6RQAPGKX_7X_8EX_9VX_{10}GVSRDGLTTLYADSVKGRFTX_{11}SRDNX_{12}KNTX_{13}X_{14}LQMNXX_{15}X_{16}AEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSRSYHYWGQGTX_{17}VTVSS$, (SEQ ID NO:18),其中 X_1 是 E 或 Q ; X_2 是 K 或 Q ; X_3 是 V 或 E ; X_4 是 A 或 P ; X_5 是 V 或 A ; X_6 是 F 或 V ; X_7 是 E 或 G ; X_8 是 R 或 L ; X_9 是 F 或 W ; X_{10} 是 A 或 S ; X_{11} 是 M 或 I ; X_{12} 是 A 或 S ; X_{13} 是 V 或 L ; X_{14} 是 D 或 Y ; X_{15} 是 V 或 L ; X_{16} 是 K 或 R ; 并且 X_{17} 是 Q 或 L ;

[0044] $X_1VX_2LX_3ESGGGLVQX_4GGSLRLSCX_5X_6SGGTVSPTAMGWX_7RQAPGKX_8X_9EX_{10}VX_{11}HITWSRGTTX_{12}ASSVKX_{13}RFTISRDX_{14}X_{15}KNTX_{16}YLQMNXX_{17}X_{18}EDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGTX_{19}VTVSS$, (SEQ ID NO:21),其中 X_1 是 E 或 Q ; X_2 是 K 或 Q ; X_3 是 V 或 E ; X_4 是 A 或 P ; X_5 是 A 或 E ; X_6 是 V 或

A;X₇是V或F;X₈是G或E;X₉是L或R;X₁₀是F或W;X₁₁是G或S;X₁₂是V或Y;X₁₃是D或G;X₁₄是N或S;X₁₅是A或S;X₁₆是L或V;X₁₇是K或R;X₁₈是A或S;并且X₁₉是L或Q;以及

[0045] X₁VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWX5RQAPGKX₆X₇EX₈VX₉TIDWGDGGX₁₀RYANSVKGRFTISRDNX₁₁KX₁₂TX₁₃YLQMNX₁₄LX₁₅X₁₆EDTAVYX₁₇CAMARQSRVNLDVARYDYWGQGT₁₈VTVSS (SEQ ID NO:24), 其中X₁是E或Q;X₂是K或Q;X₃是V或E;X₄是A或P;X₅是V或S;X₆是D或G;X₇是L或R;X₈是F或W;X₉是A或S;X₁₀是A或T;X₁₁是A或S;X₁₂是G或N;X₁₃是M或L;X₁₄是N或R;X₁₅是E或R;X₁₆是P或A;X₁₇是S或Y;并且X₁₈是Q或L。

[0046] 在具体的非限制性实施例中,该抗体或其片段,可以包含选自以下中的任一种的序列:

[0047] DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKEREFSRITWGGDNTFYNSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTADYYCAA GSTSTATPLRVDYWGKGTVTVSS (SEQ ID NO:14);

[0048] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWVRQAPGKGLEW VSRITWGGDNTFYNSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA GSTSTATPLRVDYWGQGT₁₈LVTVSS (SEQ ID NO:15)

[0049] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWVRQAPGKGLEW VSRITWGGDNTFYNSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA GSTSTATPLRVDYWGQGT₁₈LVTVSS (SEQ ID NO:16);

[0050] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKGLEFV SRITWGGDNTFYNSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAG STSTATPLRVDYWGQGT₁₈LVTVSS (SEQ ID NO:17);

[0051] QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFSV AGVSRDGLTTLTLYADSVKGRFTMSRDNKNTVDLQMN₁₈SVKAEDTAVYYCAI VITGVWNKVDVNSRSYHYWGQGT₁₈QTVTVSS (SEQ ID NO:19);

[0052] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFSV GVS₁₈RDGLTTLTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN₁₈SLRAEDTAVYYCAIVITG VWNKVDVNSRSY HYWGQGT₁₈LVTVSS (SEQ ID NO:20);

[0053] QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGT₁₈VSPTAMGWFRQAPGKEREFSV GHITWSRGTT₁₈RVASSVKDRFTISRDSAKNTVYLQMN₁₈SLKSEDTAVYYCAAST FLRILPEESAYTYWGQGT₁₈QTVTVSS (SEQ ID NO:22);

[0054] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGT₁₈VSPTAMGWFRQAPGKGLEFV GHITWSRGTT₁₈RYASSVKGRFTISRDNKNTVYLQMN₁₈SLRAEDTAVYYCAAST FLRILPEESAYTYWGQGT₁₈LVTVSS (SEQ ID NO:23);

[0055] QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFV ATIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMN₁₈LEPEDTAVYSCAM ARQSRVNL₁₈DVARYDYWGQGT₁₈QTVTVSS (SEQ ID NO:25);

[0056] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEW VATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDNKNTMYLQMN₁₈SLRAEDTAVYYCA MARQSRVNL₁₈DVARYDYWGQGT₁₈LVTVSS (SEQ ID NO:26);以及

[0057] 与以上序列中的任一种基本上相同的序列。

[0058] BBB可以是抗体或其片段,在优选的实施例中,BBB可以是单结构域抗体(sdAb)。该sdAb可以是人源化的。

[0059] 在优选的实施例中,该抗体或其片段(BBB)可以与Fc或其片段连接,其中BBB-Fc构建体可以形成二聚体。本发明进一步提供一种包含BBB-Fc-L-ABP的融合肽,其中该融合肽的BBB-Fc部分经由短肽接头(例如具有少于12个氨基酸的接头)与ABP连接,并且Fc或Fc片段允许所述融合肽二聚化以提供二聚体,因此保护构建体免于降解并增加其血清半衰期。Fc片段可以是任何适合的Fc片段,对其进行选择以便赋予所希望的药代动力学,其中该Fc或Fc片段有助于融合分子的长半衰期。其他优选的Fc或Fc片段实施例可以调节、修饰或抑制免疫学效应子功能(Shields等人,2001)。其他高度优选的Fc片段实施例可以介导融合肽

从脑中的清除 (Caram-Salas N, 2011)。在非限制性实例中, Fc或Fc片段可以是Fc小鼠Fc2a、或人Fc1, 选自SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41以及与其基本上相同的序列中的任一种, 具有减弱的效应子功能, 当包括在所述融合肽中时可以增强淀粉样蛋白从脑中的清除。

[0060] 在本发明的化合物中, BBB可以经由Fc片段和/或任何另外的适合接头L与ABP连接。

[0061] 本发明的化合物包含融合蛋白; 其中, 该融合蛋白包含抗体或其片段、Fc片段、和结合 β -淀粉样蛋白的多肽。该融合蛋白可以包含与Fc片段的N末端连接的抗体或其片段, 并且结合 β -淀粉样蛋白的多肽经由L (连接肽或化学接头) 与Fc片段的C末端连接。该抗体或其片段可以与Fc片段的C末端连接, 并且结合 β -淀粉样蛋白的多肽与Fc片段的N末端连接。

[0062] 因此, 本发明提供了包含选自下组的抗体或其片段的融合蛋白, 该组由以下组成: SEQ ID NO:13至SEQ ID NO:26; 结合 β -淀粉样蛋白的选自下组的多肽, 该组由以下组成: SEQ ID NO:27至SEQ ID NO:38; 以及选自下组的Fc片段, 该组由以下组成: SEQ ID NO:39至SEQ ID NO:41。所提供的Fc可以包含具有减弱的效应子功能的Fc。

[0063] 例如, 该融合蛋白可以包含SEQ ID NO:42至SEQ ID NO:52、或与其基本上相同的序列。该融合蛋白可以是单链多肽, 并且该融合蛋白的单链多肽可以是二聚体多肽。应注意, 在包含在SEQ ID NO:42至SEQ ID NO:52中的融合蛋白中提供的 (GGGSGGGGS或GGGSGGGGS) 接头可以是任何适合的接头序列。例如, 突出显示的接头序列 (例如GGGSGGGGS) 可以是任何等同的肽连接序列, 其允许所提供融合蛋白的组分 (如SEQ ID NO:53中所示) 的连接, 其中该接头可以是任何肽或化学接头。

[0064] 在一个实施例中, BBB可以与Fc片段连接, 由此形成二聚体。该Fc片段可以是任何适合的Fc片段, 例如小鼠Fc2a或人Fc1, 具有减弱的效应子功能 (Shields等人, 2001)。

[0065] 本发明的ABP变体可以包含SEQ ID NO:31, 例如, 可以是选自SEQ ID NO:32至38中的任一种的序列。如本文提供的ABP变体表现出优于现有技术ABP多肽的意想不到且显著的优点。更具体地, 本发明的ABP变体表现出增加的稳定性和生物可制造性。此外, 当经由如本文提供的接头和/或Fc片段与BBB偶联时, 包含如本文提供的ABP或变体的本发明化合物或组合物在穿过血脑屏障方面表现出协同和意想不到的功效。当经由如本文提供的选定Fc片段与BBB偶联时, 此类的ABP变体提供A β 从脑中的意想不到、快速和改善的清除。此外, 包含如本文提供的ABP或ABP变体的本发明融合蛋白在穿过BBB和改善A β 从脑中的清除方面表现出协同和意想不到的功效。

[0066] 因此, 提供了一种包含与结合 β -淀粉样蛋白的多肽 (ABP或ABP变体) 连接的血脑屏障穿过抗体或其片段 (BBB)、Fc (Fc) 的治疗组合物, 其中所述多肽赋予所提供的治疗组合物的稳定性和功效的协同增加。如图所示, 意想不到且最显著的是, 与用游离ABP进行多次治疗三个月以实现动物 (AD小鼠模型) 的相似结果 (图9A) 相比, 单次快速注射BBB-Fc-ABP在治疗24小时内使脑A β 负荷减少50% (图9B)。因此, 如本文提供的化合物被证实在减少脑A β 负荷方面比游离ABP更有效。另外, 与游离ABP或BBB-ABP (WO 2006/133566) 相比, 该包含Fc的融合蛋白提供显著更长的血清半衰期, 从而提供了一种改进的治疗化合物。 (图10)。

[0067] 本发明的ABP变体以及包含ABP的融合蛋白 (构建体) 克服了现有技术的缺点。在现有技术中, 单独ABP与BBB载体的连接 (WO 2006/133566) 不能确保有效分子的产生。包含旨

在增强血清半衰期的Fc的融合不能确保ABP有效转运穿越血脑屏障。包含BBB载体-、Fc片段-和ABP的融合分子的特定工程化和制剂提供了有效的BBB可渗透的治疗化合物。所提供的有效的血脑屏障可渗透治疗化合物包含BBB-Fc-ABP的特定工程化制剂,其中该制剂表现出化合物稳定性和功效方面的协同改善。在包含所述融合蛋白构建体的组合物中,提供了融合组合物稳定性的意想不到的增加,以及穿过血脑屏障和A β 从脑中更快清除(在24小时内)的功效的协同增加,如图9所示。

[0068] 本文提供的化合物可以称为化合物、融合蛋白、制剂、组合物或构建体。所提供的构建体可以包含抗体或其片段(其可以缩写为BBB)、Fc片段(缩写为Fc)、和结合 β -淀粉样蛋白的多肽(缩写为ABP)。所提供的构建体或组合物(其在本文中可以缩写为BBB-Fc-ABP或BBB-Fc-L-ABP)包含协同克服现有技术中遇到的关于血脑屏障穿过、功效和化合物稳定性的缺陷的组分。因此,本文提供的化合物包含一种新制剂,其在穿过血脑屏障、治疗功效和化合物稳定性方面具有优异和意想不到的功效。

[0069] 在现有技术中存在Fc融合可以增加血清半衰期的情况,尽管血清半衰期不一定在Fc融合物中增加。此外,Fc融合物不一定改善穿越血脑屏障的穿过。

[0070] 本发明提供一种结合 β -淀粉样蛋白的多肽,该多肽序列可以选自下组,该组由以下组成:SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、和SEQ ID NO:38以及在肽稳定性方面基本上相同的序列。

[0071] 本发明提供一种结合 β -淀粉样蛋白的多肽,其中当该多肽序列称为ABP或ABP变体时,ABP变体序列可以包含SEQ ID NO:31,并且可以选自下组,该组由以下组成:SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、以及在肽稳定性方面基本上相同的序列,例如SEQ ID NO:31的任何序列变体。本发明的具有SEQ ID NO:31的ABP变体克服了现有技术关于多肽稳定性的缺点。此外,本发明的包含ABP的化合物表现出改善的化合物稳定性和生物可制造性。此外,如本文提供的包含ABP或ABP变体的化合物表现出协同和意想不到的治疗改善。

[0072] 本发明的ABP变体可以包含选自SEQ ID NO:31至SEQ ID NO:38以及等同稳定的多肽序列中的任一种的序列。本发明的ABP变体优于现有技术ABP序列,其中本发明的ABP变体多肽表现出改善的稳定性(如图2A与图16之间的比较所示)。

[0073] 本发明还提供包含本发明ABP或ABP变体的融合蛋白(也称为化合物、构建体、或融合分子)。该融合蛋白可以包含Fc片段。该融合蛋白可以包含穿过血脑屏障的抗体或其片段、Fc片段、和可以选自下组的 β -淀粉样蛋白结合多肽序列,该组由以下组成:SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32-38。所提供的BBB-Fc-ABP制剂表现出化合物稳定性和从脑中除去有毒淀粉样蛋白的治疗功效的协同改善。

[0074] 融合蛋白或构建体(其在本文中可以称为BBB-Fc-ABP)可以相对于其中包含的组分在取向上变化。在本发明的化合物中,融合蛋白形成二聚体(如图1所示),其中融合肽经由Fc区二聚化。例如,在一个实施例中,所提供的化合物可以包含融合蛋白,该融合蛋白包含与Fc片段(Fc)的N末端连接的BBB和经由附接到C末端的短肽接头与Fc片段的C末端连接的ABP或ABP变体(ABP)(图1A,其中该化合物示出为融合蛋白的二聚体)。在进一步的实施例中,所提供的化合物可以包含与Fc片段(Fc)的C末端连接的BBB,其中ABP或ABP变体(ABP)可

以经由适合的接头(L)与Fc片段的N末端连接(图1B)。应注意,在构型1A中,ABP或ABP变体可以与Fc进行N末端(融合)或C末端(化学连接)融合/连接。在其他可能的构型中,BBB可以与ABP的N末端连接,并且ABP与Fc片段的N末端连接(图1C)。在又另一种可能的构型中,BBB可以与ABP的C末端连接,并且ABP与Fc片段的C末端连接(图1D)。

[0075] 本文提供的化合物包含融合蛋白,这些融合蛋白包含选自以下中的任一种的序列:SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53以及这些序列中的任一种基本上相同的序列。本发明的融合蛋白是融合蛋白(BBB-Fc-ABP或BBB-Fc-L-ABP,其中L可以是任何适合的接头)二聚体(如图1并且优选图1A或1B所示)。在非限制性实例中,所提供的化合物或融合蛋白可以包括包含序列SEQ ID NO:35(ABP-GG-G)或SEQ ID NO:36(ABP-(6G))的多肽;包含序列SEQ ID NO:17(FC5-H3)的抗体或其片段;包含序列SEQ ID NO:40(hFc1X7)的Fc片段。

[0076] 在本发明的具体非限制性实施例中,该化合物可以包含序列SEQ ID NO:46[FC5-H3-hFc1X7-L-ABP(GG-G)]或SEQ ID NO:47[FC5-H3-hFc1X7-L-ABP(6G)],其中L可以是任何适合的接头。

[0077] 本发明的化合物穿过血脑屏障。

[0078] 本发明涵盖编码如本文所述的任何本发明化合物的核酸分子。包含本发明的融合蛋白或化合物的核酸分子的载体也包括在本发明的范围内。

[0079] 本发明涵盖包含本发明化合物或融合蛋白和药学上可接受的载体、稀释剂、或赋形剂的组合物。

[0080] 包含本发明的药物组合物的试剂盒也包括在本发明的范围内。

[0081] 本发明的组合物可以用于治疗患者的阿尔茨海默病。

[0082] 本发明的组合物可以用于降低具有增加水平的脑A β 的受试者的脑或CSF中的有毒 β -淀粉样蛋白(A β)水平。

[0083] 本发明提供一种治疗阿尔茨海默病的方法,其中本发明的药物组合物可以给予至有其需要的受试者。

[0084] 本发明提供一种降低具有增加水平的脑A β 的受试者的脑中的有毒 β -淀粉样蛋白(A β)水平的方法。本发明的方法包括向患有AD的患者给予本发明的化合物。更具体地,本发明的方法包括以下步骤:向受试者重复肠胃外给予足够量的本发明的药物组合物。

[0085] 在本发明的方法中,肠胃外给予是皮下或静脉内给予。

[0086] 在重复肠胃外给予本文提供的组合物之后,本发明的方法降低了具有增加的A β 脑水平的受试者的脑中的有毒 β -淀粉样蛋白水平。更具体地,在重复肠胃外给予本发明的组合物四周内,有毒 β -淀粉样蛋白水平降低。

[0087] 在肠胃外给予本发明的组合物之后,本发明的方法降低了受试者脑脊液(CSF)中的有毒 β -淀粉样蛋白水平。更具体地,在单次肠胃外给予本发明的组合物24小时内,受试者脑脊液(CSF)中的有毒 β -淀粉样蛋白水平显著降低;其中显著降低在24小时内高达50%。

[0088] 本发明提供一种血脑屏障可渗透的单结构域抗体(sdAb),其中sdAb是骆驼科FC5或其人源化形式。与V_H形式的FC5相比,在Fc上以二价形式展示的FC5被证实具有改善的血脑屏障穿越特性(Farrington等人,2014)。

[0089] 本发明提供一种化合物,该化合物包含促进体外血脑屏障穿过的BBB和增加融合分子的血清半衰期的Fc片段,其中Fc融合物的血清半衰期变得类似于完整IgG的血清半衰期。FC5-Fc-ABP的延长的血清半衰期还增加整体脑暴露,这对于治疗慢性疾病(如阿尔茨海默病)尤其重要。

[0090] 在CHO细胞中产生FC5-Fc-ABP融合分子以及人源化形式FC5(H3)-hFc-ABP和IGF1R5-H2-ABP融合分子。用增强融合分子(SEQ ID NO.45、SEQ ID NO.46;SEQ ID NO.47、SEQ ID NO.48、SEQ ID NO.49、SEQ ID NO.50、SEQ ID NO.51、SEQ ID NO.52、SEQ ID NO.53)的生物可制造性和稳定性的特异性点突变或缺失系统地重新工程化本发明的ABP变体(如SEQ ID NO.31中所提供)。包含ABP变体的本发明的融合分子不仅保留A β 结合能力,所提供的包含ABP变体的融合分子不仅穿透血脑屏障,还有利地允许A β 从脑中清除,例如在给予24小时内A β 从脑中快速清除。

[0091] 特异性工程化本发明的ABP变体,例如ABP(GG-G)(SEQ ID NO.35)或ABP(6G)(SEQ ID NO.36),以增强构建体的稳定性和可制造性(如图16所示)。本发明构建体的增强的稳定性和生物可制造性在本领域中是显著的。因此,本发明涵盖增强所提供融合分子的稳定性和生物可制造性但还保留治疗活性的ABP和ABP变体(如图15A中所提供)。

[0092] 因此,包含不同ABP变体(如SEQ ID NO.31中所提供,如在SEQ ID NO.32-38中)的融合分子在体外保留亲本ABP的A β 寡聚体结合能力(图2B、2C、12和15A、B和C)以及亲本FC5在体外和体内的BBB穿透特性(图4、5A、6、7、17A、17B、18和19)。ABP通过载体(例如FC5)在体外和体内转运穿越BBB,如通过其在大鼠和狗CSF中的存在所确定的(图5和6)。ABP融合也被转运和递送到脑中的靶区域,如野生型和AD转基因小鼠两者的海马和皮质(图8和19)。脑递送的ABP还促进AD转基因小鼠和大鼠CSF(图9C和11A和11B)中以及皮质和海马区(图9B和11C)中的A β 清除。此外,且最重要的是,大鼠AD模型中的A β 清除与增强的海马体积和神经元连接性相关(图12A和12B)表明对治疗的所希望的药理学/生理学反应。

[0093] 意想不到且最显著的是,与用游离ABP进行多次治疗三个月以实现动物的相似结果(图9A)相比,单次快速注射BBB-Fc-ABP在治疗24小时内使脑A β 负荷减少50%(图9B)。因此,BBB-启用的ABP被证实在减少脑A β 负荷方面比游离ABP远远更有效。另外,由于其与Fc的融合,该化合物与游离-或FC5-ABP相比具有显著更长的血清半衰期,这是更好治疗的基本特征(图10)。

[0094] 在现有技术中,单独ABP与BBB载体的连接(WO 2006/133566)不能确保有效分子的产生。与用于增强血清半衰期的Fc融合也不能确保ABP有效转运穿越血脑屏障。如本发明的融合蛋白构建体中所提供的BBB载体-、Fc片段-和ABP融合分子的适合工程化和制剂提供一种有效的BBB可渗透的治疗化合物。

[0095] 这种新双功能融合分子与目前正在开发的常规治疗性抗体相比具有明显的优势。首先,BBB融合的治疗性ABP可以以更高的水平和更快的速率穿透脑,这显著提高了治疗功效。另外,ABP和BBB(例如FC5)对它们各自的受体具有相对较低的亲和力,并且因此可能更快地从脑中清除,并因此促进ABP结合的A β 的更快清除。与为较慢过程的主要采用反应性小胶质细胞/星形胶质细胞进行A β 清除的治疗性抗体(例如阿度努单抗)不同,本发明的融合分子可能采用更快的血管周围引流途径进行A β 清除。这由以下支持:与需要数月的重复多次剂量治疗以实现相似结果的游离ABP(图9B)和基于抗体的治疗相比,在治疗24小时内CNS

A β 降低近50%。

[0096] 此外,与基于抗体的治疗相比,本发明化合物不太可能引发神经炎症反应。

附图说明

[0097] 现在将参照附图借助实例来描述本发明的这些和其他特征,其中:

[0098] 图1:示出了血脑屏障穿越、淀粉样蛋白结合融合蛋白的示意图。该融合蛋白包含BBB穿越单结构域抗体(BBB或BBB载体)、Fc片段(Fc)和淀粉样蛋白结合肽(ABP)。图1示出了包含BBB-Fc-ABP的融合蛋白的对应二聚体。如图1A、1B、1C、和1D所示,以各种构型描绘了这3种组分(即BBB、Fc、和ABP)。

[0099] 图2:示出了CHO细胞中FC5-mFc-ABP和人源化FC5(H3)-hFc-ABP(ABP SEQ ID NO: 32)融合分子的产生。如图2A所示,通过SDS-PAGE(NR-非还原和R-还原条件)分离FC5融合分子后的考马斯蓝染色凝胶显示成功产生重组融合分子。图2B和图2C:通过ELISA和蛋白质印迹(WB)重叠测定法进行的游离ABP和BBB-Fc-ABP融合蛋白的A β -寡聚体结合。将游离或融合的ABP固定在ELISA板上并暴露于A β 。用A β 特异性抗体6E10或4G8检测结合的A β 。还通过SDS-PAGE分离融合分子,转移到PVDF纸并暴露于A β 。如上所述用特异性抗体检测结合的A β 。结果显示ABP在与BBB载体融合后保留其A β 寡聚体结合能力。Mo:A β 单体;Oli:A β 寡聚体

[0100] 图3:示出了AD-Tg小鼠(B6.Cg-Tg, Jackson实验室)中FC5-Fc-ABP与淀粉样蛋白沉积物结合的免疫组织荧光测定。如免疫组织荧光测定所示,ABP保留了在AD-Tg小鼠脑中结合天然产生的A β 聚集体的能力。将来自野生型和AD转基因小鼠的脑切片与IR 800标记的FC5-mFc-ABP一起孵育,并在荧光显微镜下观察结合的融合分子。在来自产生A β 沉积物的AD-Tg小鼠的脑切片中观察到选择性结合(亮点),并且在来自不产生淀粉样蛋白沉积物的野生型小鼠的脑切片中未观察到选择性结合(亮点)。

[0101] 图4:示出了在体外与ABP融合后保留了FC5的BBB渗透性。在来自大鼠和人的体外BBB模型中评估FC5-ABP融合分子的血脑屏障穿越。通过nanoLC-MRM方法(图4A、图4B和图4C)和使用Fc特异性抗体的蛋白质印迹分析(图4D,一式三份进行)检测穿越BBB的融合分子。FC5-mFc-ABP与FC5-mFc一样有效地穿越BBB,而没有BBB载体部分FC5的Fc-ABP不穿越脑内皮细胞单层。如所预期的,对照单结构域抗体EG2和A20.1,或对照完整IgG(抗HEL)不穿越血脑屏障。用人源化FC5-H3-hFc-ABP融合蛋白获得了相似的结果(图4C和图4D)。

[0102] 图5:示出了体内FC5-Fc-ABP的血清和CSF药代动力学。经由尾静脉注射以指定剂量(2.5、6.25、12.5和25mg/kg)将FC5-mFc-ABP静脉内给予至大鼠体内。连续地收集血清和CSF。使用nanoLC-MRM方法定量FC5-Fc-ABP水平。如图5所示,FC5-mFc-ABP以时间和剂量依赖性方式出现在CSF中,其中C_{max}在12h与24h之间,表明FC5在体内将ABP转运到脑和CSF室中。血清PK参数(图5和表1)显示FC5-mFc-ABP的 α -和 β -半衰期与完整IgG(含有大鼠Fc的基准抗体)的 α -和 β -半衰期相似。

[0103] 图6:示出了比格犬中FC5-mFc-ABP的血清和CSF PK曲线。通过静脉内注射向10-12岁的比格犬给予FC5-mFc-ABP,并连续地收集血清和CSF并通过nanoLC-MRM(图6A)和使用Fc特异性抗体的蛋白质印迹(图6B)分析。星号表示受血液污染的样品(未在MRM分析中示出)。可以看出,FC5-mFc-ABP以时间依赖性方式出现在CSF中,表明FC5在体内将ABP转运穿越狗血脑屏障。通过WinNonlin软件分析PK参数和CSF暴露,并显示在下表2中。

[0104] 图7:示出了在体内(大鼠模型)与人Fc(hFc)融合并与ABP(FC5-hFc-ABP)化学连接的FC5的BBB渗透性和CSF外观。根据制造商的说明书(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific)),使用异双功能交联剂碘基-SMCC(碘基琥珀酰亚胺基4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸酯)将FC5-hFc与ABP-胱胺酰胺连接。经由尾静脉以6.25mg/kg将化学缀合的分子静脉内给予至大鼠体内,并在4和24小时收集血清和CSF样品,并通过nanoLC-MRM分析。与不含BBB载体的Fc-ABP形成对比,FC5-hFc-ABP以时间依赖性方式出现在CSF中。应注意,在该化学连接的构建体中,ABP的C末端与Fc片段(随机区域)连接并且N末端是游离的,与融合构建体不同,其中是ABP的N末端与Fc的C末端融合并且ABP的C末端是游离的。ABP取向的这种逆转不影响其A β 结合能力和穿越血脑屏障的转运。

[0105] 图8:示出了在小鼠中静脉内注射后在各种脑区域(皮质和海马)中测量的FC5-mFc-ABP的水平。将15mg/kg剂量的FC5-mFc-ABP静脉内注射到野生型(WT)或AD-转基因(AD-Tg, B6.Cg-Tg, Jackson实验室)小鼠的尾静脉中,并在心脏内生理盐水(saline)灌注后4和24小时收集脑。解剖海马和皮质组织并通过nanoLC-MRM(图8A)和使用Fc特异性抗体的蛋白质印迹(图8B)分析。通过MRM在皮质和海马两者中检测属于融合分子的所有三种组分(BBB在该实例中为FC5)、Fc和ABP)的特定肽,表明FC5载体成功地将ABP递送到脑的靶区域。与典型地针对与单独的Fc或Fc片段融合的对照单结构域抗体A20.1测量的约50ng/g组织相比,在不同时间点处所测量的水平在750-1400ng/g脑组织范围内。这通过在组织提取物中探测Fc和ABP的蛋白质印迹分析进一步证实(图8B)。通过蛋白质印迹在仅接受生理盐水的动物中未检测到融合分子的蛋白质信号。存在通过蛋白质印迹在脑的靶区域中检测到的FC5-mFc-ABP水平的剂量依赖性增加。

[0106] 图9:示出了ABP对转基因(Tg)小鼠中A β 水平的影响:用单独的ABP(图9A)或与BBB载体FC5融合的ABP(图9B和图9C)治疗之间的比较。使用两种不同的AD Tg小鼠模型,即,三重转基因(3X Tg-AD, sv129/C57BL6小鼠,含有PS1M146V、APP_{Swe}和tauP301L转基因,加利福尼亚大学,F.M.LaFerla博士)和双转基因(B6.Cg-Tg,含有PSEN1dE9和APP_{Swe}转基因, Jackson实验室);将小鼠分别在3个月或2个月的时间内每隔一天皮下(sc)给予300nmol/kg游离ABP。在治疗期结束时,通过ELISA测量脑中的A β 水平。在多次治疗(每隔一天)2-3个月,单独用ABP治疗导致脑A β 减少25%-50%(图9A)。将FC5-mFc-ABP构建体静脉内注射到双转基因AD小鼠(B6.Cg-Tg, 15mg/kg;相当于220nmol/kg)体内,并在注射后24h通过ELISA和nanoLC-MRM两者测量脑A β 水平。意想不到的是,在用FC5-mFc-ABP处理24小时内观察到约50%的淀粉样蛋白减少(图9B),表明通过适当连接Fc的FC5进行ABP的有效脑递送显著增加了ABP在减少脑A β 水平方面的功效。CSF分析还表明在FC5-mFc-ABP处理后24小时内A β ₁₋₄₂水平显著降低(图9C)。通过MRM或ELISA分析检测的A β 的特征肽或表位与由ABP识别的A β 表位是关系较远的/不同的(因此,不干扰其通过ELISA或MRM的定量)。

[0107] 图10:示出了与FC5-ABP(即没有Fc组分)相比FC5-Fc-ABP构建体的血清半衰期增强的实例:经由尾静脉将FC5-ABP和FC5-Fc-ABP注射到大鼠体内,并在不同时间点收集连续血清样品,并且用FC5特异性抗体通过直接ELISA分析。从图10A中可以看出,与FC5-Fc-ABP(图10B)相比,FC5-ABP构建体在血清中被快速清除(少于1小时),表明包含Fc片段的分子的血清稳定性显著增加。

[0108] 图11:示出了FC5-mFc-ABP对Tg大鼠脑淀粉样蛋白负荷的影响:经由尾静脉对AD-

Tg大鼠每周给药生理盐水或FC5-mFc-ABP,持续4周(负荷剂量为30mg/kg,并且随后4个每周剂量为15mg/kg)。通过nanoLC MRM分析FC5-mFc-ABP和A β 的CSF水平(图11A和图11B)。在处理四周之前和之后,使用特异性A β 结合剂[18F]NAV4694通过PET扫描测定脑A β 水平。在示踪剂注射后,获取60min动态图像,获得透射扫描,重建图像并生成结合电位(BP_{ND})参数图。FC5-mFc-ABP在24小时内降低大鼠的CSF A β 水平(图11A和图11B)。如在Tg大鼠中,观察到FC5-mFc-ABP与A β 的CSF水平之间的反比关系,表明通过FC5递送到脑和CSF的ABP的靶标接合和A β 的快速清除(图11B)。这通过PET扫描进一步证实,其清楚地表明在用FC5-mFc-ABP处理四周后大鼠脑A β 水平显著降低(30%-50%)(图11C)。

[0109] 图12:示出了用生理盐水或FC5-mFc-ABP处理之前和之后的Tg大鼠的体积磁共振成像(MRI,使用具有稳态进动的快速成像)和功能性MRI(fMRI)。如图12A所示,在处理4周后,与生理盐水处理的Tg大鼠(Tg-Sal)相比,在ABP处理的Tg大鼠(Tg-ABP)中观察到增加的海马体积。如图12B所示,处理四周后的组比较显示,与生理盐水处理的Tg大鼠(Tg-Sal)相比,ABP处理的Tg大鼠(Tg-ABP)具有更大的前扣带皮层(ACC)连接性。

[0110] 图13:示出了比格犬的CSF中FC5-mFc-ABP的时间和剂量依赖性外观以及观察到的Tg小鼠(图9C)和Tg大鼠(图11A和B)中CSF A β 水平的降低。通过静脉内注射以15mg/kg和30mg/kg向10-12岁的比格犬给予FC5-mFc-ABP,并连续地收集血清和CSF,并通过nanoLC-MRM分析FC5-mFc-ABP和A β 水平。可以看出,FC5-mFc-ABP以时间和剂量依赖性方式出现在CSF中。重要的是,如在Tg小鼠和Tg大鼠中观察到的,在FC5-mFc2a-ABP注射后24小时内CSF A β 水平显著降低,表明FC5载体在较大动物中的翻译性质以及ABP在减轻CNS A β 负荷方面的跨物种功效。

[0111] 图14:示出了具有不同BBB载体的ABP融合分子的产生。为了评估ABP融合分子的多功能性,ABP成功地与另一种人源化BBB载体IGF1R5(H2)融合。如图所示,保留了分子的双功能性,ABP结合A β 寡聚体的能力(ELISA和重叠测定)以及还有IGF1R5在体外穿越BBB模型递送ABP的能力(数据未示出)。这清楚地表明ABP可以与不同的BBB穿越单结构域抗体融合以递送到脑。

[0112] 图15:示出了通过不同的单结构域抗体-Fc-ABP构建体结合的A β 寡聚体(图15A、15B和15C)。在这些构建体中的一些中,ABP已通过位点特异性突变或移除分子的C末端部分来修饰,如SEQ ID NO:35和36所示。通过ELISA方法,所有构建体均在结合A β 寡聚体方面保留了相似的效力。

[0113] 图16:示出了具有特异性突变的FC5-hFc1X7-ABP的产生,以改善稳定性和生物可制造性。携带特异性突变的FC5-hFc1X7-ABP(例如SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36的ABP)在CHO细胞中产生,并在还原(R)和非还原(NR)条件下在SDS-PAGE上分离并用考马斯蓝染色,如图2所述。将分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜,并用FC5特异性或hFc特异性或ABP特异性抗体进行免疫印迹。在另一组中,还通过重叠测定法测试了融合分子中ABP的A β 结合。用A β 特异性抗体6E10检测结合的A β 。可以看出,具有特异性突变的ABP的方法修饰显著增强了所产生分子的稳定性,如由还原和非还原条件下的单一蛋白质条带所示。

[0114] 图17:示出了各种FC5-Fc-ABP构建体和IGF1R5-Fc-ABP构建体在体外的血脑屏障渗透性。如图4所述,在体外大鼠BBB模型中评估BBB-穿越,并通过nanoLC-MRM方法检测穿越血脑屏障的分子。与人源化FC5和IGF1R载体融合的所有ABP变体有效地穿越血脑屏障。如所

预期的,A20.1,非BBB可渗透的sdAb未穿越血脑屏障,同样与A20.1融合的ABP未穿越BBB(图17A)。在图17B中,显示通过nanoLC-MRM检测融合分子的所有三种组分FC5、Fc和ABP的“指纹”肽,从而表明完整的FC5、Fc和ABP穿越BBB的穿过。

[0115] 图18:示出了人源化FC5(H3)-hFc1X7-ABP构建体(ABP,SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36)通过FC5完整地转运穿越体外血脑屏障。如图4所述,在体外大鼠BBB模型中评估血脑屏障-穿越,并通过蛋白质印迹和ELISA测定检测穿越BBB的分子。图18(1)A和B示出了分别用hFc和ABP特异性抗体探测的免疫印迹。分子大小与应用于体外血脑屏障模型的融合分子的大小完全相同。图18(1)C示出了夹心ELISA,其中通过ELISA板上的FC5-特异性抗体捕获穿越BBB后的分子并用ABP特异性抗体检测。该夹心ELISA证实,FC5(H3)-hFc1X7-ABP在体外穿越大鼠血脑屏障后保持完整。用FC5(H3)-hFc1X7-ABP(ABP,SEQ ID NO:36)获得了相似的结果;图18(2)A、B和C。

[0116] 图19:示出了人源化FC5(H3)-hFc1X7-ABP构建体(ABP,SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36)通过FC5转运穿越体内血脑屏障并完整地递送到脑。如图8所述,经由尾静脉将FC5-ABP融合分子静脉内给予到野生型和AD-Tg小鼠体内,并且在心脏内灌注后收集脑。如图18所述,将脑皮质均质化并在RIPA缓冲液中提取,并且使提取物经受蛋白质印迹和夹心ELISA分析。图19A示出了用ABP特异性抗体探测的免疫印迹。分子大小与注入动物体内的融合分子的大小完全相同。图19B示出了相同提取物,在ELISA板上用FC5特异性抗体捕获的提取物中分子的夹心ELISA,并用ABP特异性抗体检测。这证实了免疫印迹结果,FC5(H3)-hFc1X7-ABP在体内转运穿越BBB并完整地递送到脑。

[0117] 图20:示出了FC5(H3)-hFc1X7-ABP(ABP,SEQ ID NO:36)与AD-Tg小鼠脑(B6.Cg-Tg,Jackson实验室)中内源性A β 沉积物的离体结合(A)和体内结合(B)的免疫组织化学分析。将来自AD转基因小鼠的脑切片与FC5(H3)-hFc1X7-ABP(ABP,SEQ ID NO:36)一起孵育,并用HRP缀合的FC5特异性抗体显现结合的融合分子。用FC5(H3)-hFc1X7-ABP构建体观察到选择性结合(黑点),但用没有ABP的FC5(H3)-hFc1X7未观察到选择性结合(黑点)(A),表明脑中A β 沉积物的ABP依赖性结合(靶标接合)。在来自不产生淀粉样蛋白沉积物的野生型小鼠的脑切片中未观察到结合(数据未示出)。在将FC5(H3)-hFc-ABP构建体海马内注射到AD转基因小鼠体内后(注射后4小时),检测到A β 沉积物的相似结合(使用ABP特异性抗体)(B)。

[0118] 图21:示出了FC5(H3)-hFc1X7-ABP(ABP,SEQ ID NO:32)在体内的靶标接合。图21A示出了在海马内注射后AD转基因小鼠中Alexa 647标记的FC5-hFc-ABP构建体在体内与天然淀粉样蛋白- β (A β)沉积物的结合。A β 的同一性通过用Alexa 488标记的A β 特异性抗体6E10探测脑切片并证明两个信号的共定位(合并)来确认。图21B示出了通过ELISA的靶标接合的证明。在将FC5(H3)-hFc-ABP构建体海马内注射到野生型和AD转基因小鼠体内后(注射后4小时),解剖海马形成并均质化。使用FC5抗体作为捕获抗体和ABP抗体作为检测抗体,通过夹心ELISA检测FC5-ABP融合构建体。通过相同的夹心ELISA但使用A β 特异性抗体作为检测抗体,检测ABP与内源A β 的体内结合。从图21A和21B清楚可见,FC5-ABP构建体在野生型和AD转基因小鼠两者中在注射后4小时保持完整。最重要的是,在表达人A β 的Tg小鼠中,注射的ABP结合A β 并作为复合物(FC5(H3)-hFc-ABP*A β)下拉,表明ABP在体内与A β -靶标接合。

[0119] 图22:示出了非人源化和人源化FC5-Fc-ABP构建体之间的PK、PD比较。如图5所述,经由尾静脉注射以15mg/kg将FC5-mFc2a-ABP或FC5(H3)-hFc1x7-ABP静脉内给予至大鼠体

内。连续地收集血清和CSF。使用nanoLC-MRM方法定量FC5-Fc-ABP水平。如图22A所示,非人源化和人源化构建体的血清和CSF PK曲线非常相似。如图9B所述,经由尾静脉注射以15mg/kg将FC5-mFc2a-ABP或FC5(H3)-hFc1x7-ABP静脉内给予至Tg小鼠体内。如图9B所述,通过nanoLC-MRM测量CSF中的FC5-Fc-ABP和A β 水平。如图22B所示,CSF中非人源化和人源化FC5-Fc-ABP的水平相似,并且最重要的是,CSF A β 水平的变化(降低)也非常相似,表明FC5-Fc-ABP构建体的人源化不影响融合构建体的PK和PD曲线。

具体实施方式

[0120] 本发明提供多肽、包含所述多肽的融合蛋白、以及包含所述多肽和穿过血脑屏障的抗体或其片段的融合蛋白。

[0121] 本发明提供结合 β -淀粉样蛋白(β -淀粉样蛋白)的多肽。结合 β -淀粉样蛋白的多肽(或蛋白质)可以选择性地结合病理相关的 β -淀粉样蛋白₁₋₄₂(A β ₁₋₄₂)聚集体,并且可以缩写为并在本文中称为ABP或ABP变体(或统称为ABP)。

[0122] 本发明提供包含与穿越血脑屏障的抗体或其片段连接的ABP或ABP变体的融合蛋白。在优选的实施例中,包含ABP和BBB的融合蛋白另外地包含Fc或其片段,其中该融合蛋白的ABP和BBB组分可以经由Fc区或其部分连接。例如,本发明的构建体可以包含BBB-Fc-ABP或BBB-Fc-L-ABP,其中L可以是任何适合的接头。所提供的BBB-Fc-APB或BBB-Fc-L-ABP构建体可以是单链多肽或二聚体多肽,其中包含BBB-Fc-ABP的单链多肽可以经由组分Fc区形成多聚体(优选二聚体)。

[0123] 本发明涉及穿过血脑屏障的化合物,及其用途。更具体地,本发明涉及包含BBB和ABP的化合物及其在治疗阿尔茨海默病(AD)方面的用途。

[0124] 需要可以有效穿过ABP穿越血脑屏障,并通过ABP的结合提供A β 清除的治疗制剂。在现有技术中,鉴定了40-氨基酸的A β -结合肽(ABP),其选择性地结合涉及AD发展的A β ₁₋₄₂寡聚体(WO 2006/133566)。该A β 结合肽在体外抑制A β 与细胞蛋白质的结合,并抑制A β ₁₋₄₂诱导的细胞毒性(Chakravarthy等人,2013)。该A β 结合肽在体外结合AD转基因小鼠脑中的淀粉样蛋白沉积物,并且结合来自AD患者脑中的淀粉样蛋白沉积物。更重要的是,当直接注射到活AD转基因小鼠脑中时(Chakravarthy等人,2014),ABP靶向体内天然淀粉样蛋白沉积物。因此,ABP可能潜在地靶向CNS A β ,可以帮助A β 从脑中清除,并降低其毒性作用。然而,全身给予的ABP具有有限的独自穿越BBB并且进入脑实质的能力。

[0125] 因此,尽管ABP已被证实在直接应用时结合A β 沉积物,但为了结合并从脑中的清除A β ,肠胃外给予的ABP需要渗透血脑屏障。本发明有利地提供一种经由Fc片段与BBB可渗透的单结构域抗体(如FC5或IGF1R)融合的ABP,以提供双特异性血脑屏障可渗透的治疗剂(Farrington等人,2014)。本发明的BBB-Fc-ABP构建体可以二聚化,即BBB-Fc-ABP单链融合蛋白可以形成两个单链融合蛋白的二聚体以产生二聚化合物,其中二聚体的每个单链均包含BBB、Fc片段和ABP,以提供BBB-Fc-ABP二聚体。BBB-Fc-ABP或BBB-Fc-L-ABP构建体及其二聚体允许ABP穿越血脑屏障有效穿过。因此,在本发明的构建体和方法中提供了通过ABP在CSF和脑实质中的结合来有利地治疗性清除A β 。

[0126] 为了能够实现ABP的脑递送并提高其功效,40-氨基酸ABP多肽目前与Fc片段的C末端融合,而BBB可渗透的单结构域抗体(如FC5)(WO 2002/057445)与同一Fc片段的N末端融

合,以产生双特异性BBB可渗透的治疗剂(Farrington等人,2014)。在本发明的非限制性实施例中,该Fc片段可以是小鼠(SEQ ID NO:39)或人(SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:41)。在优选的实施例中,工程化本发明的Fc片段以降低效应子功能(Shields等人,2001)。例如,该Fc片段可以是hFc1x7(SEQ ID NO:40),其中BBB-Fc-ABP融合蛋白中的Fc片段有利地允许融合蛋白的二聚化以产生能够穿过血脑屏障的治疗有效的融合分子(BBB-Fc-ABP二聚体)。在一个实施例中,BBB-Fc-ABP融合蛋白可以是FC5-H3-hFc1x7-ABP(6G)(SEQ ID NO:47)及其二聚体。该融合蛋白可以包含如SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:53中所呈现的接头序列L或任何适合的接头序列。

[0127] 本发明提供一种结合 β -淀粉样蛋白(β -淀粉样蛋白)的分离多肽。本发明的多肽可以包含序列

[0128] $X_1\text{TFX}_2\text{TX}_3\text{X}_4\text{ASAQASLASKDKTPKSKSKKX}_5\text{X}_6\text{STQLX}_7\text{SX}_8\text{VX}_9\text{NI}$ (SEQ ID NO:31)

[0129] 其中 $X_1=\text{G}$ 或 A , $X_2=\text{G}$ 或 V , $X_3=\text{G}$ 或 A , $X_4=\text{G}$ 或 A , $X_5=\text{G}$ 或 V , $X_6=\text{G}$ 或 V , $X_7=\text{G}$ 或 V , $X_8=\text{G}$ 或 A , $X_9=\text{G}$ 或 A 。

[0130] 本发明的多肽(ABP和ABP变体)可以选自下组,该组由以下组成:SEQ ID NO:27至SEQ ID NO:38或与其基本上相同的序列。在一个实施例中,所提供的多肽是包含与SEQ ID NO:31基本上等价的序列的ABP变体。与其基本上等价的序列可以赋予融合分子等价的稳定性。

[0131] 本发明提供一种化合物(即融合蛋白),该化合物包含穿越血脑屏障(BBB)穿过的抗体或其片段和结合 β -淀粉样蛋白的多肽。本发明提供融合蛋白,这些融合蛋白包含BBB、结合 β -淀粉样蛋白的多肽、和Fc。

[0132] 如本文所用的术语“抗体”,在本领域中也称为“免疫球蛋白”(Ig),是指由成对的重和轻多肽链构建的蛋白质;存在各种Ig同种型,包括IgA、IgD、IgE、IgG、和IgM。当抗体正确折叠时,每条链折叠成许多不同的球状结构域,这些结构域由更线性的多肽序列连接。例如,免疫球蛋白轻链折叠成可变(V_L)和恒定(C_L)结构域,而重链折叠成可变(V_H)和三个恒定(C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3})结构域。重链和轻链可变结构域(V_H 和 V_L)的相互作用导致抗原结合区(Fv)的形成。每个结构域均具有本领域技术人员熟悉的已建立的结构。

[0133] 轻链和重链可变区负责结合靶抗原,并且因此可以在抗体之间显示出显著的序列多样性。恒定区示出较小的序列多样性,并且负责结合许多天然蛋白质以便引出重要的生物化学事件。抗体的可变区含有分子的抗原结合决定簇,并且因此确定抗体对其靶抗原的特异性。大多数序列变异性发生在六个高变区,每个变量重(V_H)和轻(V_L)链各三个;高变区结合形成抗原结合位点,并有助于抗原决定簇的结合和识别。抗体对其抗原的特异性和亲和力由高变区的结构,以及它们呈现给抗原的表面的大小、形状、和化学性质决定。存在用于鉴定高变区域的各种方案,两种最常见的是Kabat和Chothia和Lesk的那些方案。Kabat等人(1991)基于 V_H 和 V_L 结构域的抗原结合区的序列可变性来定义“互补决定区”(CDR)。Chothia和Lesk(1987)基于 V_H 和 V_L 结构域中结构环区的位置定义了“高变环”(H或L)。这些单独的方案定义了相邻或重叠的CDR和高变环区域,抗体领域的技术人员经常可互换地使用术语“CDR”和“高变环”,并且它们可以在本文中这样使用。本文根据Kabat方案鉴定CDR/环。

[0134] 如本文所提及的“抗体片段”可以包括本领域已知的任何适合的抗原结合抗体片段。该抗体片段可以是天然存在的抗体片段,或者可以通过操纵天然存在的抗体或通过使

用重组方法获得。例如,抗体片段可以包括但不限于Fv、单链Fv(scFv;由用肽接头连接的V_L和V_H组成的分子)、Fab、F(ab')₂、单结构域抗体(sdAb;由单个V_L或V_H构成的片段)、以及这些中的任一种的多价呈现。抗体片段(如刚刚描述的那些)可能需要接头序列、二硫键、或其他类型的共价键以连接片段的不同部分;本领域技术人员将熟悉不同类型片段的要求和各种方法以及用于其构造的各种方法。

[0135] 在非限制性实例中,该抗体片段可以是衍生自天然存在来源的sdAb。骆驼科来源的重链抗体(Hamers-Casterman等人,1993)缺乏轻链,并且因此其抗原结合位点由一个结构域(称为V_HH)组成。在鲨鱼中也观察到了sdAb,并且被称为V_{NAR}(Nuttall等人,2003)。可以基于人Ig重链和轻链序列工程化其他sdAb(Jespersen等人,2004;To等人,2005)。如本文所用,术语“sdAb”包括通过噬菌体展示或其他技术从任何来源的V_H、V_HH、V_L、或V_{NAR}储库直接分离的那些sdAb,衍生自上述sdAb的sdAb、重组产生的sdAb,以及通过由人源化、亲和力成熟、稳定化、溶解、骆驼化或其他抗体工程化方法进一步修饰此类sdAb而产生的那些sdAb。本发明还涵盖保留sdAb的抗原结合功能和特异性的同源物、衍生物、或片段。

[0136] SdAb具有抗体分子的所希望特性,如高热稳定性、高耐洗涤剂性、对蛋白酶的相对高的抗性(Dumoulin等人,2002)和高产量(Arbabi-Ghahroudi等人,1997);通过从免疫库中分离(Li等人,2009)或通过体外亲和力成熟(Davies和Riechmann,1996),它们还可以被工程化以具有非常高的亲和力。还可以对sdAb进行进一步修饰以增加稳定性,如引入非规范的二硫键(Hussack等人,2011a,b;Kim等人,2012)。

[0137] 本领域技术人员将非常熟悉单结构域抗体的结构(参见例如,蛋白质数据库中的3DWT、2P42)。sdAb包含保留免疫球蛋白折叠的单个免疫球蛋白结构域;最值得注意的是,仅三个CDR/高变环形成抗原结合位点。然而,并且如本领域技术人员所理解的,并非所有CDR均可以是结合抗原所需的。例如,并且不希望是限制性的,CDR中的一个、两个、或三个可以有助于通过本发明的sdAb结合和识别抗原。sdAb或可变结构域的CDR在本文中称为CDR1、CDR2、和CDR3。

[0138] 如本文所述的抗体或其片段可以穿过血脑屏障。脑通过称为血脑屏障(BBB)的特化内皮组织与身体的其他部分分开。BBB的内皮细胞通过紧密连接而连接并有效地防止许多治疗化合物进入脑。除了低速率的囊泡转运之外,BBB的一个特定特征是在BBB的近腔(脑)侧上存在一个或多个酶促屏障和ATP依赖性转运蛋白的高水平表达,包括P-糖蛋白(Gottesman和Pastani,1993;Watanabe,1995),其主动将各种分子从脑转运到血流中(Samuels,1993)。仅小的(<500道尔顿)和疏水性(Pardridge,1995)分子可以更容易地穿越BBB。因此,通过规避溶酶体降解,如上所述的抗体或其片段特异性结合表面受体、内化到脑内皮细胞中并经历转胞吞作用穿越血脑屏障的能力在神经学领域中是有用的。穿越血脑屏障的抗体或其片段可以用于携带其他分子(如治疗剂)以递送到脑组织。该抗体或其片段可以是本领域已知的任何适合的抗体或其片段,以穿过血脑屏障。

[0139] 本发明提供一种化合物或融合蛋白,该化合物或融合蛋白包含穿过血脑屏障(BBB)的抗体或其片段。本发明的抗体或片段可以结合例如跨膜蛋白30A(TM30A),如WO 2007/036021中所述,或结合胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)表位或其同种型、变体、部分、或片段。

[0140] 本发明化合物中的抗体或其片段可以包含HYTMG(SEQ ID NO:1)的互补决定区

(CDR)1序列;RITWGGDNTFYNSVKG (SEQ ID NO:2)的CDR2序列;以及GSTSTATPLRVDY (SEQ ID NO:3)的CDR3序列;或

[0141] EYPSNFYA (SEQ ID NO:4)的CDR1序列、VSRDGLTT (SEQ ID NO:5)的CDR2序列、AIVITGVWNKVDVNSRSYHY (SEQ ID NO:6)的CDR3序列;或

[0142] GGTVSPTA (SEQ ID NO:7)的CDR1序列、ITWSRGTT (SEQ ID NO:8)的CDR2序列、AASTFLRILPEESAYTY (SEQ ID NO:9)的CDR3序列;或

[0143] GRTIDNYA (SEQ ID NO:10)的CDR1序列、其中X是A或T的IDWGDGGX (SEQ ID NO:11)的CDR2序列、AMARQSRVNLDVARYDY (SEQ ID NO:12)的CDR3序列。

[0144] 如前所述,该抗体或其片段可以是骆驼科来源的sdAb或衍生自骆驼科 V_H ,并且因此可以基于骆驼科框架区;可替代地,上述CDR可以移植到 V_{NAR} 、 V_H 、 V_H 或 V_L 框架区上。在又一个替代方案中,上述高变环可以移植到任何来源(例如,小鼠或人)的其他类型的抗体片段(Fv、scFv、Fab)或可以移植CDR到其上的具有类似大小和性质的蛋白质的框架区上(例如,参见Nicaise等人,2004)。

[0145] 本发明进一步涵盖嵌合(或嵌合的)、贴面、或人源化的抗体或其片段。嵌合抗体或其片段是其中(小鼠或骆驼科来源)的天然可变结构域与一个或多个人恒定结构域连接的构建体(参见Gonzales等人2005)。抗体的贴面或重新表面包括用其对应物中的氨基酸残基替换天然抗体或其片段的框架区中的暴露残基(Padlan,1991;Gonzales等人2005)。抗体或抗体片段的人源化包括用人共有序列中发现的其对应物替换序列中的氨基酸,而不丧失抗原结合能力或特异性;当引入人受试者时,该方法降低了抗体或其片段的免疫原性。在该过程中,本文定义的CDR中的一个或多个可以融合或移植到CDR可以移植到其上的人可变区(V_H 或 V_L)、其他人抗体(IgA、IgD、IgE、IgG、和IgM)、人抗体片段框架区(Fv、scFv、Fab)、或具有相似大小和性质的人蛋白质(Nicaise等人,2004)。在这种情况下,可能保留所述一个或多个高变环的构象,以及sdAb对其靶标(即脑内皮细胞上的表位,如TMEM30A或IGF1R表位)的亲合力和特异性可能受影响最小。如本领域技术人员已知的,可能需要将某些天然氨基酸残基掺入人框架中以便保持结合和特异性。通过CDR移植进行人源化是本领域已知的(例如,参见Tsurushita等人,2005;Jones等人,1986;Tempest等人,1991;Riechmann等人,1988;Queen等人,1989;综述于Gonzales等人,2005中-还参见其中引用的参考文献),并且因此本领域技术人员将充分熟悉制备这种人源化抗体或其片段的方法。

[0146] 所提供的抗体或其片段可以是FC5抗体的人源化形式(描述于WO 2002/057445中)或IGF1R抗体。FC5(包含SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17中的任一种的序列)和IGF1R(包含SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、或SEQ ID NO:26中的任一种的序列)与脑内皮细胞上受体表位的表面结合并且随后穿过血脑屏障(BBB)。FC5也被证实可以作为载体引入穿越BBB的各种大小的分子(参见例如,WO 2011/127580)。介导FC5穿过的抗原暂时被鉴定为跨膜结构域蛋白30A(TM30A;WO 2007/036021),其富集在脑内皮细胞的表面上。

[0147] 例如,并且不希望是限制性的,该抗体或其片段可以包含以下序列:

[0148] $X_1VQLVX_2SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWX_3RQAPGKX_4X_5EX_6VSRITWGGDNTFYNSV$
 $KGRFTISRDNKNTX_7YLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYWGQGLTVTVSS$ (SEQ ID NO:13),其

中 X_1 =D或E, X_2 =A或E, X_3 =F或V, X_4 =E或G, X_5 =R或L, X_6 =F或W, X_7 =L或V,或与其基本上相同的序列;

[0149] X_1 VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCX₅ASEYPSNFYAMSWX₆RQAPGKX₇X₈EX₉VX₁₀GVSRDGLTTLYA DSVKGRFTX₁₁SRDNX₁₂KNTX₁₃X₁₄LQMNSX₁₅X₁₆AEDTAVYYCAIVITGVWVKVDVNSRSYHYWGQGT₁₇VTVSS, (SEQ ID NO:18), 其中 X_1 是E或Q; X_2 是K或Q; X_3 是V或E; X_4 是A或P; X_5 是V或A; X_6 是F或V; X_7 是E或G; X_8 是R或L; X_9 是F或W; X_{10} 是A或S; X_{11} 是M或I; X_{12} 是A或S; X_{13} 是V或L; X_{14} 是D或Y; X_{15} 是V或L; X_{16} 是K或R;并且 X_{17} 是Q或L;或与其基本上相同的序列;

[0150] X_1 VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCX₅X₆SGGTVSPTAMGWX₇RQAPGK X₈X₉EX₁₀VX₁₁HITWSRGTT RX₁₂ASSVKX₁₃RFTISRDX₁₄X₁₅KNTX₁₆YLMNSL X₁₇X₁₈EDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTYWGQGT X₁₉VTVSS, (SEQ ID NO:21), 其中 X_1 是E或Q; X_2 是K或Q; X_3 是V或E; X_4 是A或P; X_5 是A或E; X_6 是V或A; X_7 是V或F; X_8 是G或E; X_9 是L或R; X_{10} 是F或W; X_{11} 是G或S; X_{12} 是V或Y; X_{13} 是D或G; X_{14} 是N或S; X_{15} 是A或S; X_{16} 是L或V; X_{17} 是K或R; X_{18} 是A或S;并且 X_{19} 是L或Q;或与其基本上相同的序列;

[0151] X_1 VX₂LX₃ESGGGLVQX₄GGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWX₅RQAPGKX₆X₇EX₈VX₉TIDWGDGGX₁₀RY ANSVKGRFTISRDNX₁₁KX₁₂TX₁₃YLMNX₁₄LX₁₅X₁₆EDTAVYX₁₇CAMARQSRVNLVDVARYDYWGQGT₁₈VTVSS (SEQ ID NO:24), 其中 X_1 是E或Q; X_2 是K或Q; X_3 是V或E; X_4 是A或P; X_5 是V或S; X_6 是D或G; X_7 是L或R; X_8 是F或W; X_9 是A或S; X_{10} 是A或T; X_{11} 是A或S; X_{12} 是G或N; X_{13} 是M或L; X_{14} 是N或R; X_{15} 是E或R; X_{16} 是P或A; X_{17} 是S或Y;并且 X_{18} 是Q或L;或与其基本上相同的序列。

[0152] 更具体地, 并且不希望以任何方式进行限制, 该抗体或其片段可以包含选自以下中的任一种的序列:

[0153] DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKEREFSRITWGGDNTFYNSVKGR FTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTADYYCAA GSTSTATPLRVDYWG KGTQVTVSS (SEQ ID NO:14);

[0154] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWVRQAPGKGLEW VSRITWGGDNTFYNSVKGR FTISRDNKNTLYLMNSLRAEDTAVYYCAA GSTSTATPLRVDYWGQGT₁₇VTVSS (SEQ ID NO:15);

[0155] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWVRQAPGKGLEW VSRITWGGDNTFYNSVKGR FTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAA GSTSTATPLRVDYWG QGT₁₇VTVSS (SEQ ID NO:16);

[0156] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKGLEFV SRITWGGDNTFYNSVKGR FTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAAG STSTATPLRVDYWG QGT₁₇VTVSS (SEQ ID NO:17);

[0157] QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFSV AGVSRDGLTTLYADSVKGR FTMSRDNKNTVDLQMNVSKAEDTAVYYCAI VITGVWVKVDVNSRSYHYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:19);

[0158] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWFRQAPGKEREFSV GVSVDGLTTLYADSVKGR FTISRDNKNTLYLMNSLRAEDTAVYYCAIVITG VWNKVDVNSRSYHYWGQGT₁₇VTVSS (SEQ ID NO:20);

[0159] QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKEREFSV GHITWSRGTTTRVASSVKDR FTISRDSKNTVYLMNSLKSSEDVAVYYCAAST FLRILPEESAYTYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:22);

[0160] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGWFRQAPGKGLEFV GHITWSRGTTTRYASSVKGR FTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAAST FLRILPEESAYTYWGQGT₁₇VTVSS (SEQ ID NO:23)

[0161] QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWSRQAPGKDREFV ATIDWGDGGARYANSVKGR FTISRDNKNTMYLMNLEPEDTAVYSCAM ARQSRVNLVDVARYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:25);

[0162] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEW VATIDWGDGGTRYANSVKGR FTISRDNKNTMYLMNLEPEDTAVYYCA MARQSRVNLVDVARYDYWGQGT₁₇VTVSS (SEQ ID NO:26); 以及

与其基本上相同的序列。该抗体或其片段可以是单结构域抗体。

[0163] 基本上相同的序列可以包含一个或多个保守氨基酸突变。本领域已知的是,对参考序列的一个或多个保守氨基酸突变可以产生与参考序列相比在生理、化学、物理化学或功能特性上没有实质变化的突变肽;在这种情况下,参考和突变序列将被认为是“基本上相同的”多肽。保守氨基酸取代在本文中定义为氨基酸残基被取代成具有相似化学特性(例如大小、电荷、或极性)的另一氨基酸残基。可以对sdAb的框架区进行这些保守氨基酸突变,同时保持以上列出的CDR序列和抗体或片段的CDR的整体结构;因此保留了该抗体的特异性和结合。

[0164] 基本上等同的序列可以包含一个或多个保守氨基酸突变;其中突变肽是关于肽稳定性和生物可制造性基本上等同的。基本上等同可以是指关于融合分子稳定性等同;例如,如SDS PAGE(还原和非还原条件)中所见,缺乏降解产物或低分子量条带。本领域已知的是,对参考序列的一个或多个保守氨基酸突变可以产生与参考序列相比在生理、化学、物理化学或功能特性上没有实质变化的突变肽;在这种情况下,参考和突变序列将被认为是“基本上等同的”多肽。

[0165] 在非限制性实例中,保守突变可以氨基酸取代。这种保守氨基酸取代可以将碱性、中性、疏水性、或酸性氨基酸取代为同一组中的另一个。术语“碱性氨基酸”意指侧链pK值大于7的亲水性氨基酸,其典型地在生理pH下带正电荷。碱性氨基酸包括组氨酸(His或H)、精氨酸(Arg或R)、和赖氨酸(Lys或K)。术语“中性氨基酸”(也称为“极性氨基酸”)意指具有在生理pH下不带电的侧链的亲水性氨基酸,但其具有至少一个键,其中由两个原子共享的电子对被这些原子中的一个更紧密地保持。极性氨基酸包括丝氨酸(Ser或S)、苏氨酸(Thr或T)、半胱氨酸(Cys或C)、酪氨酸(Tyr或Y)、天冬酰胺(Asn或N)、和谷氨酰胺(Gln或Q)。术语“疏水性氨基酸”(也称为“非极性氨基酸”)意在包括根据Eisenberg(1984)的标准化共有疏水性标度表现出大于零的疏水性的氨基酸。疏水性氨基酸包括脯氨酸(Pro或P)、异亮氨酸(Ile或I)、苯丙氨酸(Phe或F)、缬氨酸(Val或V)、亮氨酸(Leu或L)、色氨酸(Trp或W)、蛋氨酸(Met或M)、丙氨酸(Ala或A)、和甘氨酸(Gly或G)。“酸性氨基酸”是指侧链pK值小于7的亲水性氨基酸,其典型地在生理pH下带负电荷。酸性氨基酸包括谷氨酸(Glu或E)和天冬氨酸(Asp或D)。

[0166] 序列同一性用于评估两个序列的相似性;其通过计算当两个序列比对以获得残基位置之间的最大对应性时相同的残基百分比来确定。可以使用任何已知方法计算序列同一性;例如,计算机软件可用于计算序列同一性。不希望受到限制,序列同一性可以通过软件来计算,如由瑞士生物信息学研究所维护的NCBI BLAST2服务(以及如在ca.expasy.org/tools/blast/中找到)、BLAST-P、Blast-N、或FASTA-N、或本领域已知的任何其他适当的软件。

[0167] 本发明的基本上相同的序列在氨基酸水平上与本文所述的序列可以至少90%相同;在另一个实例中,基本上相同的序列在氨基酸水平上与本文所述的序列可以至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同、或其间的任何百分比。重要的是,基本上相同的序列保留了参考序列的活性和特异性。在非限制性实施例,序列同一性的差异可能是由于一个或多个保守氨基酸突变。在非限制性实例中,本发明可以涉及一种包含与本文所述抗体的序列至少95%、98%、或99%相同的序列的抗体或其片段。

[0168] 本发明化合物的抗体或其片段可以与Fc结构域(例如但不限于人Fc结构域)连接。Fc结构域可以选自各种类别,包括但不限于IgG、IgM、或各种亚类,包括但不限于IgG1、IgG2等。在该方法中,将Fc基因与sdAb基因一起插入载体中以产生sdAb-Fc融合蛋白(Be11等人,2010;Iqbal等人,2010);重组表达融合蛋白,然后纯化。例如,并且不希望以任何方式进行限制,多价展示形式可以涵盖FC5-H3的嵌合形式及其与Fc结构域连接的突变的变体。此类抗体易于工程化和生产,可以大大延长sdAb的血清半衰期(Be11等人,2010)。

[0169] 刚刚描述的化合物中的Fc结构域可以是本领域已知的任何适合的Fc片段。该Fc片段可以来自任何适合的来源;例如,该Fc可以是小鼠或人来源。其他优选的Fc或Fc片段实施例可以调节、修饰或抑制免疫学效应子功能(Shields2001)。其他高度优选的Fc片段实施例可以介导融合肽从脑中的清除(Caram-Salas N 2011)。在具体的非限制性实例中,该Fc可以是小鼠Fc2a片段或人Fc1片段(Be11等人,2010;Iqbal等人,2010)。在具体的非限制性实例中,多聚化构建体可以包含如本文所述的分离或纯化的抗体或片段和具有SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:41的序列的Fc。因此,本文提供的BBB-Fc-ABP融合蛋白可以经由Fc形成二聚体,以提供二价、双功能BBB-Fc-ABP。

[0170] 本发明的化合物包含与结合 β -淀粉样蛋白的多肽连接的抗体或其片段。该接头可以是任何多肽,包含具有适合长度的中性或亲水性氨基酸。在非限制性实例中,该长度优选地少于12个氨基酸,并且该多肽是GGGSGGGS。使用非肽形式(如酰胺或酯键)以正确的取向,可以采用其他化学接头。例如,SEQ ID NO:53提供包含任何适合的接头的融合蛋白,其中本发明的任何融合蛋白(即SEQ ID NO:42-52)可以包含如SEQ ID NO:53中所示的任何适合的接头。结合 β -淀粉样蛋白(A β)的多肽可以结合病理相关的 β -淀粉样蛋白,如A β_{1-42} 聚集体,其与AD病理学有关;该多肽可以在体外以高亲和力(在nM范围内)结合A β 、抑制A β 与细胞蛋白的结合和A β_{1-42} 诱导的细胞毒性,并且在体内结合AD转基因小鼠脑中以及来自AD患者脑中的淀粉样蛋白沉积物。本发明化合物中的多肽不结合反向肽A β_{42-1} 。

[0171] 在本文提供的化合物中,该结合 β -淀粉样蛋白的多肽可以包含选自下组的序列,该组由以下组成:(SEQ ID NO:27);(SEQ ID NO:28);(SEQ ID NO:29);(SEQ ID NO:30);(SEQ ID NO:31);(SEQ ID NO:32);(SEQ ID NO:33);(SEQ ID NO:34);(SEQ ID NO:35);(SEQ ID NO:36);(SEQ ID NO:37);(SEQ ID NO:38);以及与其基本上相同的序列。“基本上相同的”序列如前所述。

[0172] 因此,本发明提供一种结合 β -淀粉样蛋白的多肽及其变体(即ABP和ABP变体)。ABP变体可以包含具有SEQ ID NO:31的序列,例如,所提供的ABP变体可以包含选自下组的序列,该组由以下组成:SEQ ID NO:31至SEQ ID NO:38或与其基本上等同的序列。

[0173] 因此,提供了基于ABP的详细生物物理表征的包含特定系统和方法修饰的ABP多肽序列。对ABP多肽的特定和方法上定向的修饰包括如SEQ ID NO:31中提供的本发明的新的和非显而易见的ABP变体。

[0174] 本文提供的肽可以包含ABP,该ABP包含可以选自下组的序列,该组由以下组成:SEQ ID NO:27-SEQ ID NO:38,以及与其基本上等同的序列。

[0175] 本文提供的肽可以包含ABP变体,例如,包含可以选自以下中的任一种的序列的ABP:SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:38、或任何与SEQ ID NO:31等同的序列。如本文提供,包含ABP或ABP变体的构建体表现出化合物稳定性和生物可制造性方面的有利改善(如图14中可

见)。

[0176] 本文提供的融合蛋白和化合物表现出改善的治疗功效。更具体地,所提供的化合物包含允许产生稳定的BBB-Fc-ABP融合分子以增强生物可制造性(在人哺乳动物表达系统中产生)的特异性修饰的ABP。本文提供的对ABP的特异性修饰是基于ABP的详细生物物理表征的系统和方法修饰。本文提供的修饰的ABP可以包含例如,选自SEQ ID NO:32-SEQ ID NO:38的序列,以及与其基本上等价的序列(如SEQ ID NO:31)。本文提供的化合物有利地表现出改善的稳定性和生物可制造性,以及降低脑中A β 水平的功效的最显著增加;其中在用本发明构建体处理24小时内观察到50%淀粉样蛋白减少。

[0177] 术语“连接”,在本文中也称为“缀合”,其意指两个部分直接或间接(例如,经由接头)、共价或非共价(例如,吸附、离子相互作用)连接。可以通过化学交联反应,或通过使用重组DNA方法与任何肽表达系统(如细菌、酵母或基于哺乳动物细胞的系统)组合的融合来实现共价连接。当将抗体或其片段与结合A β 的多肽或Fc缀合时,可以使用适合的接头。例如,适合的接头可以是任何多肽,包含中性或亲水性氨基酸,具有允许缀合BBB-Fc-ABP蛋白融合组分的适合的长度。例如,该接头允许融合蛋白的组分(例如,在SEQ ID NO:42-52中)相应的连接,并且不限于其中突出显示的GGGSGGGGS或(GGGS)_n接头,并且可以是任何适合的接头(即如在SEQ ID NO:53的非限制性融合蛋白中)。在非限制性实例中,该长度优选地少于12个氨基酸,并且该多肽可以是GGGSGGGGS。使用非肽形式(如酰胺或酯键)以正确的取向,可以采用其他化学接头。本领域技术人员将充分了解将抗体或其片段与多肽连接的接头或方法。用于将抗体或其片段与多肽或Fc连接的方法是本领域技术人员熟知的。

[0178] 本文提供的化合物包含抗体或其片段、结合 β -淀粉样蛋白的多肽和Fc片段,连接以提供构建体(在本文中也称为化合物或融合分子),其中该构建体包含融合蛋白及其二聚体。该抗体或其片段可以经由Fc片段或适合的接头与结合 β -淀粉样蛋白的多肽连接。

[0179] 该抗体或其片段包含选自以下中的任一种的序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO 23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26,以及与其基本上相同的序列。该抗体或其片段穿过该血脑屏障。该抗体或片段可以是sdAb;其中该sdAb可以是人源化的。

[0180] 该结合 β -淀粉样蛋白的多肽包含选自下组的序列,该组由以下组成:SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38,以及与其基本上相同的序列,并且优选包含SEQ ID NO:31的序列。

[0181] Fc片段包含选自以下中的任一种的序列:SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41,以及与其基本上相同的序列。本发明的Fc片段可以是具有减弱的效应子功能的任何适合的Fc片段。融合蛋白中所提供的Fc片段允许形成二聚体结构;其中例如包含选自由SEQ ID NO:42至SEQ ID NO:53组成的组的序列的单链融合蛋白可以形成经由其中的Fc片段缀合的二聚体结构。

[0182] 因此,本发明的化合物或构建体可以包含选自下组的序列,该组由以下组成:SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53以及与其基本上相同的序列,或其二聚体结构。

[0183] 如图1所示,本发明提供融合蛋白,这些融合蛋白包含BBB穿越单结构域抗体(BBB)、Fc片段(Fc)和淀粉样蛋白结合肽(ABP),其中每个部分可以连接以提供融合分子。例如,在本发明的非限制性实施例中,BBB可以与Fc的N末端连接并且ABP与Fc片段的C末端连接(图1A)。图1示出了包含BBB-Fc-ABP的单链融合蛋白的对应二聚体。如图1A、1B、1C、和1D所示,以各种构型描绘了这3种组分(即BBB、Fc、和ABP)。在本发明化合物的具体非限制性实例中,结合 β -淀粉样蛋白的多肽可以包含序列SEQ ID NO:31。在一个实施例中,ABP变体包含以下序列:

[0184] GTFGTGGASQAASLASKDKTPKSKSKKGGSTQLKSRVKNI (SEQ ID NO:36) (在本文中称为ABP(6G))以及与其基本上等同的序列。

[0185] 该抗体或其片段可以包含以下序列

[0186] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKGLEFVSRITWGGDNFTYSNSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVVDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:17),在本文中称为FC5-H3。

[0187] 该抗体或其片段可以进一步包含人Fc的序列,如

[0188] AEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:40),在本文中也称为hFc1X7。

[0189] 不希望以任何方式进行限制,本发明的化合物可以包含以下序列:

[0190] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKGLEFVSRITWGGDNFTYSNSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVVDYWGQGTLVTVSSAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGTGGGGSGGGSGTFTGTGASAQASLASKDKTPKSKSKKGGSTQLKSRVKNI (SEQ ID NO:47),在本文中也称为FC5-H3-hFc1X7-ABP(6G)。

[0191] 一些代表性BBB-Fc-ABP融合蛋白构建体的表格总结。

[0192]

BBB	Fc	ABP
FC5 (SEQ ID NO:14)	mFc2a (SEQ ID NO:39)	ABP (SEQ ID NO:30)
FC5 (H3) (SEQ ID NO:17)	mFc2a (SEQ ID NO:39)	ABP (SEQ ID NO:30)
FC5 (H3) (SEQ ID NO:17)	hFc1x7 (SEQ ID NO:40)	ABP (SEQ ID NO:30)
FC5 (H3) (SEQ ID NO:17)	hFc1x7 (SEQ ID NO:40)	ABP (G) SEQ ID NO:32)
FC5 (H3) (SEQ ID NO:17)	hFc1x7 (SEQ ID NO:40)	ABP (GG-G) SEQ ID NO:35
FC5 (H3) (SEQ ID NO:17)	hFc1x7 (SEQ ID NO:40)	ABP (6G) SEQ ID NO:36)
FC5 (H3) (SEQ ID NO:17)	hFc1X0 (SEQ ID NO:41)	ABP (GG-G) SEQ ID NO:35
FC5 (H3) (SEQ ID NO:17)	hFc1x7 (SEQ ID NO:40)	ABP (trc) SEQ ID NO:38)
IGF1R-5 (H2) (SEQ ID NO:26)	mFc2a (SEQ ID NO:39)	ABP (SEQ ID NO:30)

[0193] 应注意,在上表中,BBB-Fc-ABP融合蛋白构建体还可以包含接头(L),其中BBB-Fc-ABP构建体是本发明的BBB-Fc-L-ABP融合蛋白,其中L可以是GGGSGGGG或任何适合的接头,

如SEQ ID NO:53中的共有接头序列所示。

[0194] 本发明的化合物(如SEQ ID NO:47的融合蛋白中所提供)在本文中也称为FC5-H3-hFc1X7-L-ABP (6G),可以包含其中包含的每种组分的变体,例如ABP可以是ABP (GG-G),如SEQ ID NO:46中所提供。其中所提供的接头序列(如例如SEQ ID NO:42至SEQ ID NO:53中突出显示)可以是允许BBB-Fc-ABP融合蛋白连接的任何接头。本发明的化合物还可以包含另外的序列以帮助组抗体或其片段的表达、检测或纯化。可以使用本领域技术人员已知的任何此类序列或标签。例如,并且不希望是限制性的,该抗体或其片段可以包含靶向或信号序列(例如但不限于ompA)、检测/纯化标签(例如但不限于c-Myc、His₅、或His₆)、或其组合。在另一个实例中,另外的序列可以是生物素识别位点,如由Cronan等人(WO 95/04069)或Voges等人(WO/2004/076670)所述的生物素识别位点。如本领域技术人员已知的,接头序列可以与另外的序列或标签结合使用,或者可以用作检测/纯化标签。

[0195] 本发明还涵盖编码如本文所述化合物的核酸序列。鉴于遗传密码的简并性,许多核苷酸序列将具有编码多肽的作用,如本领域技术人员容易理解的。可以对核酸序列进行密码子优化以在各种微生物中表达。本发明还涵盖包含如刚刚描述的核酸的载体。此外,本发明涵盖包含如所述的核酸和/或载体的细胞。

[0196] 本发明进一步涵盖一种组合物,该组合物包含一种或多于一种如本文所述的化合物和药学上可接受的稀释剂、赋形剂、或载体。该组合物还可以包含药学上可接受的稀释剂、赋形剂、或载体。稀释剂、赋形剂、或载体可以是本领域已知的任何适合的稀释剂、赋形剂、或载体,并且必须与组合物中的其他成分相容,与组合物的递送方法相容,并且对组合物的接受者无害。该组合物可以呈任何适合的形式;例如,该组合物可以以悬浮液形式或粉末形式(例如但不限于冻干或包封)提供。例如,并且不希望是限制性的,当该组合物以悬浮液形式提供时,该载体可以包含水、生理盐水、适合的缓冲液、或添加剂以改善溶解度和/或稳定性;在适合的pH下在缓冲液中进行重构以产生悬浮液,以确保抗体或其片段的存活力。干燥粉末还可以包括添加剂以改善稳定性和/或载体以增加体积/容积;例如,并且不希望是限制性的,干燥粉末组合物可以包含蔗糖或海藻糖。本领域技术人员能够制备包含本发明化合物的适合的组合物。

[0197] 还提供了一种治疗阿尔茨海默病的方法,其中向有需要的受试者给予本发明的化合物或组合物。可以利用任何适当的给予途径,包括但不限于静脉内、腹膜内、肠胃外、颅内、肌肉内、皮下、口服、或鼻腔。给予的最佳剂量和给予途径通常通过实验确定。

[0198] 提供了一种降低具有增加的 β -淀粉样蛋白水平的受试者脑脊液(CSF)和脑实质中的有毒 β -淀粉样蛋白水平的方法。更具体地,早在单次肠胃外给予本发明的化合物24小时后,受试者脑脊液(CSF)和脑实质中的有毒 β -淀粉样蛋白水平降低。

[0199] 本发明将进一步在以下实例中进行说明。然而,应理解,这些实例仅用于说明目的,并且不应以任何方式用于限制本发明的范围。

[0200] 实例1:BBB-Fc-L-ABP融合分子的构建

[0201] 制备了包含以下的融合分子:

[0202] a) FC5 sdAb (SEQ ID NO:14)、鼠Fc (SEQ ID NO:39) 和ABP (SEQ ID NO:30),

[0203] b) 人源化形式的FC5 (FC5-H3; SEQ ID NO:17)、人Fc (SEQ ID NO:40) 和ABP (SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:34; SEQ ID NO:35; SEQ ID

NO:36;SEQ ID NO:37;SEQ ID NO:38),

[0204] c) 人源化形式的IGF1R-5sdAb(IGF1R-5-H2;SEQ ID NO:26)、鼠Fc(SEQ ID NO:39)和ABP(SEQ ID NO:30)。在图1中示出融合蛋白构建体的示意图。该融合蛋白包含BBB穿越单结构域抗体、Fc片段和淀粉样蛋白结合肽。

[0205] 实例2:BBB-Fc-L-ABP融合分子的产生

[0206] 将描述于实例1中的构建体FC5-mFc-ABP和人源化FC5(H3)-hFc-ABP在CHO细胞中表达,并且将表达的化合物在MabSelect Sure亲和柱上纯化。

[0207] 制备、表达和纯化如实例1所述的构建体,这些构建体包含与在其C末端处与ABP变体融合的小鼠或人Fc抗体片段的N末端融合的FC5变体FC5和FC5-H3_{V_H}。

[0208] 将FC5-Fc-ABP变体DNA(DNA合成供应商)克隆到哺乳动物表达载体pTT5(Durocher 2002)中。通过混合质粒载体(80%)、pTT-AKTdd(15%,蛋白激酶B的活化突变体)和pTTo-GFP(5%,以监测转染效率)与PEI MAX溶液(Polysciences目录号24765)的组合,预先形成每升细胞最终浓度为1mg DNA的复合物。PEI:DNA比率为4:1(W:W),两者均在补充的F17培养基(4mM谷氨酰胺,0.1% Kolliphor)中制备。将混合物在室温下孵育5分钟,然后加入细胞培养物中。DNA/PEI复合物的体积占最终培养物体积的10%(即,每1L培养物100ml)。在转染后24小时,向培养物中进料最终浓度为1%的胰蛋白胨N1(含40%w/v溶液,Organotechnie公司)和0.5mM丙戊酸(200mM溶液)。监测转染/产生的细胞密度和存活率以及生产力滴度(每L Fc的mg),并且当细胞存活率达到最小值65%时通过离心收获(上清液)。通过0.45μm膜过滤澄清的细胞培养基,然后将其应用于填充有5ml蛋白-A MabSelect SuRe树脂(通用电气医疗集团(GE Healthcare))的柱上。在上样后,用5体积的pH 7.1的磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)洗涤柱,并用pH 3.0的100mM柠檬酸钠缓冲液洗脱抗体。合并含有洗脱的抗体的级分,并通过上样在PBS中平衡的脱盐Econo-Pac柱(伯乐公司(BioRad))上进行缓冲液交换。然后由通过Millex GP(密理博公司(Millipore))过滤单元(0.22μm)对脱盐抗体进行无菌过滤并等分。

[0209] SDS-PAGE和Aβ重叠:将在Laemmli样品缓冲液中制备的蛋白质样品(在70°C下加热至非还原,并在95°C下加热以减少凝胶,βME或DTT)通过SDS-PAGE在12% Tris-Tricine凝胶或TGX4-15%凝胶(伯乐公司)上分离。将凝胶用考马斯蓝染色或将蛋白质转移到PVDF或硝酸纤维素膜上以进行蛋白质印迹/Aβ重叠测定。用无脂奶粉封闭免疫印迹,并且然后在室温(50-100nM)下暴露于Aβ制剂45min,并如前所述使用6E10抗体检测结合的Aβ(Chakravarthy等人2013)。

[0210] ELISA:如Chakravarthy等人(2013)所述进行Aβ结合测定。将Maxisorp96孔ELISA板(Nunc公司)用(100-500ng/孔)游离ABP(合成的)或各种FC5-ABP构建体在4°C下在PBS中被过夜。将孔用TBS-T中的1% BSA封闭30min,并且然后在温和搅动下,与在TBS-T中主要由单体和二聚体(Mo)或更高级寡聚体(Oli)组成的Aβ₁₋₄₂制剂在RT下孵育45min。在三次TBS-T洗涤后,通过在RT下在TBS-T中孵育HRP缀合的Aβ特异性抗体(6E10或4G8)90min来检测结合的Aβ。根据制造商的说明,通过比色测量在450nm下用SureBlue™ TMB试剂盒(KPL)检测结合的抗体。

[0211] 在图2A中示出通过SDS-PAGE(NR-非还原和R-还原条件)分离FC5融合分子后的考马斯蓝染色凝胶,其表明成功产生重组融合分子。在图2B和C中示出通过ELISA和蛋白质印

迹(WB)重叠测定法进行的游离ABP和FC5-Fc-ABP融合蛋白的A β -寡聚体结合。通过将样品在磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)中在4°C下包被过夜并暴露于A β 制剂(如由Chakravarthy等人,2013所述),将游离或融合的ABP固定在ELISA板上。用A β 特异性抗体6E10或4G8检测结合的A β (Chakravarthy等人,2013)。还通过SDS-PAGE分离融合分子,转移到PVDF纸并暴露于A β 寡聚体。如上所述用特异性抗体检测结合的A β 。结果显示ABP在与BBB载体融合后保留其A β 寡聚体结合能力。Mo:A β 单体;Oli:A β 寡聚体

[0212] 实例3:BBB-Fc-L-ABP融合分子在体外与AD-Tg小鼠(B6.Cg-Tg,Jackson实验室)中的A β 沉积物的结合

[0213] 使实例2中产生的构建体进行免疫组织荧光测定以评估FC5-Fc-ABP融合分子是否保留了如上所述结合小鼠脑中天然产生的淀粉样蛋白沉积物的能力(Chakravarthy等人,2014)。将来自野生型(Wt)和AD转基因(AD-Tg)小鼠的冷冻半脑包埋在OCT中,并使用Jung CM 3000低温恒温器制备10- μ m切片并储存在-80°C下。解冻组织切片并用剃刀刀片从切片上剥离OCT,并且然后在室温下与Dako蛋白封闭试剂一起孵育30min。除去封闭剂,并在TBS中轻轻洗涤切片。加入在抗体稀释剂中的IR 800标记的FC5-mFc-ABP(5.0 μ g/ μ l溶液的1:250稀释液)并在室温下孵育1h。然后用TBS洗涤切片两次,在Milli Q水中冲洗,除去过量的冲洗溶液,并用Dako荧光封片剂覆盖切片。在荧光显微镜下可视化的切片(图3)。在来自产生A β 沉积物的AD-Tg小鼠的脑切片中观察到选择性结合(亮点),并且在来自不产生淀粉样蛋白沉积物的Wt小鼠的脑切片中未观察到选择性结合,表明FC5-Fc-ABP构建体中的ABP保留了结合在AD-Tg小鼠脑中天然产生的A β 聚集体的能力。在所提供的BBB-Fc-ABP构建体中,BBB可以是FC5或抗IGF1R抗体。

[0214] 实例4:FC5-Fc-L-ABP融合分子在体外的BBB穿过

[0215] 在来自大鼠和人的体外BBB模型中评估FC5-Fc-ABP融合分子的BBB穿越(图4)。使用Papp测定的单一时间点,在体外BBB渗透性测定中筛选穿越BBB的融合分子。通过MRM-ILIS完成变体的定量(图4A、4B和4C)。

[0216] 如所述将SV40-永生化成年大鼠脑(SV-ARBEC)和人脑内皮细胞(HBEC)用于产生体外血脑屏障(BBB)模型(Garberg等人,2005;Haqqani等人,2013)。将Sv-ARBEC(80,000个细胞/膜)接种在1ml生长培养基中的0.1mg/mL鼠尾胶原I型包被的组织培养插入物(孔径-1 μ m;表面积0.9cm²,Falcon公司)上。插入组件的底部腔室含有2ml生长培养基,其补充有1:1(v/v)比率的永生化新生大鼠星形胶质细胞条件培养基。测试等摩尔量(5.6 μ M)阳性(FC5构建体)或阴性对照(A20.1,艰难梭菌(*Clostridium difficile*)毒素A结合V_HH;和来自实例1的EG2、EGFR结合V_HH)和Fc-ABP穿越大鼠或人体外BBB模型的能力。在将等摩尔量的sdAb暴露于BBB的腔侧后,在离腔侧15、30和60min后取样。然后通过质谱法定量每个样品的sdAb含量(多反应监测-同种型标记的内标;MRM-ILIS)(图4A、4B、4C)。

[0217] MRM-ILIS:所有方法均如Haqqani等人(2013)所述。简而言之,为了开发用于V_HH的SRM(选择的反应监测也称为多反应监测(MRM))测定,首先使用数据依赖性采集通过nanoLC-MS/MS分析每个V_HH以鉴定所有可电离的肽。对于每种肽,选择3至5个最强的碎片离子。开发了初始的SRM测定法以在阿摩尔量的消化物(约100-300amol)处监测这些片段。在低量下显示可重复强度比的片段(即,与较高量相比,Pearson r²≥0.95)被认为是稳定的并且被选择用于最终SRM测定。为了进一步优化该测定,还包括每种肽的洗脱时间,注意不

要选择具有接近 m/z (质荷比) 和洗脱时间的肽。

[0218] 典型的 V_H 在细胞培养基或体液(血清或脑脊液(CSF))中的多重SRM分析包括将已知量的ILIS(0.1-10nM),随后注射100-400ng的CSF或培养的培养基蛋白(0.3-1 μ L)或约50-100ng血清蛋白(1-3纳升)到nanoLC-MS系统中。在靶标的指定洗脱时间在离子阱中选择每种靶肽离子的前体 m/z (并且弃去剩余的无关离子),随后进行碰撞诱导解离(CID)破裂,并仅选择离子阱中希望的碎片离子以通过检测器进行监测。对于定量分析,将由LTQ(赛默飞世尔公司(ThermoFisher))生成的原始文件转换为标准质谱数据格式mzXML,并使用称为Q-MRM的内部软件(Quantitative-MRM;参见Haqqani等人2013)(其是MatchRx软件的修改版本)提取强度。对于每种 V_H ,针对其碎片离子中的每种产生提取离子色谱图,该碎片离子由整个洗脱时间内在0.25Da的片段 m/z 内的组合强度组成。为了获得每种片段的最终强度值,将预期保留时间的0.5min内的所有强度相加。如果其肽中的至少一种的片段显示预期的强度比(即,最终强度值显示强Pearson相关系数 $r \geq 0.95$ 且与其对应的纯 V_H 的最终强度值相比 $p < 0.05$),则将 V_H 定义为在样品中是可检测的。

[0219] 如前所述,将含有 V_H 混合物(培养基、血清、CSF)的样品还原、烷基化并用胰蛋白酶消化(Haqqani等人,2012;Gergov等人,2003)。将消化物(胰蛋白酶肽)用乙酸(5%最终浓度)酸化,并在与LTQ XL ETD或LTQ Orbitrap ETD质谱仪(赛默飞世尔公司(ThermoFisher),马萨诸塞州沃尔瑟姆)联接的反相nanoAcquity UPLC(沃特世公司(Waters),马萨诸塞州米尔福德)上分析。将所希望的样品等分试样注入并上样到300 μ m I.D. \times 0.5mm 3 μ m PepMaps C18捕获器(赛默飞世尔公司)上,然后使用从0%-20%乙腈(在0.1%甲酸中)在1分钟内、20%-46%在16min内、和46%-95%在1min内的梯度以400nL/min的流速洗脱到100 μ m I.D. \times 10cm 1.7 μ m BEH130C18 nanoLC柱(沃特世公司)上。通过电喷雾电离(ESI)将洗脱的肽电离到质谱仪中用于MS/MS和使用CID进行SRM分析以用于肽离子的片段化。CID用氦作为碰撞气体在35%的标准化碰撞能量和30ms的活化时间下进行。使用自动增益控制(AGC)目标值 6×10^3 和最大累积时间200ms,通过仪器调节进入线性离子阱的离子注入时间。

[0220] 表观渗透系数的确定:可以直接绘制量化值,或可以使用给定公式 $[Q_r/dt = \text{接收器室中的累积量相比于时间}; A = \text{细胞单层的面积}; C_0 = \text{剂量溶液的初始浓度}]$ 并绘图确定 P_{app} (表观渗透系数)值。 P_{app} 值通常用于确定分子穿越BBB的能力。 P_{app} 值是化合物穿越脑内皮单层的比渗透率的量度。

[0221] 用于检测和定量FC5构建体的特定肽示出于下表1中。

[0222] 表1

[0223]

类型	胰蛋白酶MRM肽	蛋白质
FC5 肽	ITWGGDNTFYNSVK + ILIS	FC5-mFc-ABP
mFc 肽	NTEPVLDSDGSYFMYSK	FC5-mFc-ABP、宿主IgG
ABP 肽	ASQAQSLASK	FC5-mFc-ABP
IGF1R5-H2 肽	GLEWVATIDWGDGGTR	IGF1R5-H2-mFc-ABP
IGF1R5-H2 肽	AEDTAVYYCAMAR	IGF1R5-H2-mFc-ABP
AB	LVFFAEDVGSNK	宿主APP、AB1-42或AB1-40
白蛋白	APQVSTPTLVEAAR	宿主白蛋白

[0224] 如实例2所述,还使用Fc特异性抗体通过蛋白质印迹分析分析样品(图4D,一式三份进行)。FC5-mFc-ABP与FC5-mFc一样有效地穿越血脑屏障,而没有BBB载体部分FC5的Fc-ABP不穿越脑内皮细胞单层。如所预期的,对照单结构域抗体EG2和A20.1,或对照完整IgG(抗HEL)不穿越血脑屏障。用人源化FC5(H3)-hFc-ABP融合蛋白获得了类似的结果(图4C和图4D)。用IGF1R5-mFc-ABP ABP获得了类似的结果(图17A和B)。

[0225] 实例5:FC5-Fc-L-ABP融合分子在体内的BBB穿过和药代动力学

[0226] 在体内评估实例2的构建体穿过血脑屏障进入脑中,特别是进入脑脊液(CSF)中的能力,以及量化CSF和血清中构建体的存在。经由尾静脉以指定剂量(2.5、6.25、12.5和25mg/kg)将FC5-mFc-ABP静脉内给予至大鼠体内。连续地收集血清和CSF。使用nanoLC-MRM方法定量FC5-Fc-ABP水平。

[0227] 用于Cisterna magna CSF的多次采样的技术是在NRC通过修改先前描述的方法而开发的(Huang等人,1995;Kornhuber等人,1986))。所有动物均购自查尔斯河实验室国际有限公司(Charles River Laboratories International, Inc.) (美国马萨诸塞州威明顿市(Wilmington, MA, USA))。将动物以12h光/暗循环在24°C的温度、50±5%的相对湿度下以三个一组的形式饲养,并允许自由获取食物和水。所有动物程序均经NRC动物护理委员会批准,并且符合加拿大动物保护协会指南。在所有研究中使用8-10周(体重范围,230-250g)的雄性Wistar大鼠。

[0228] 在所有实验中,将测试抗体(FC5 Fc-融合物)以等摩尔剂量(7mg/kg)静脉内给予至尾静脉中。CSF样品采集是通过针刺由小脑延髓池进行的,在96小时内多达5次。对于样品收集,用3%异氟烷将大鼠短暂且轻度麻醉,置于立体定位框架中,同时头部以45°角向下旋转。在枕骨顶部处开始的耳朵之间形成2cm的中线切口,并将肌肉分开以暴露覆盖小脑延髓池的硬脑膜。将具有连接到1ml注射器的管的27G蝶形针(QiuckMedical公司,目录号

SV27EL) 用于刺穿硬脑膜并吸出约20 μ l的CSF。然后将CSF转移到样品玻璃小瓶(沃特世公司,目录号186000384c)中并置于-80 $^{\circ}$ C冰箱中直至进一步分析。

[0229] 在可商购获得的管(BD microtainer公司,目录号365956)中从尾静脉收集血液样品。在室温下凝固15-30分钟后,通过以1100rcf (3422rpm) 离心10min除去凝块;然后将血清转移到干净的玻璃小瓶(沃特世公司,目录号186000384c)中,在干冰上冷冻并储存在-80 $^{\circ}$ C下直至进一步分析。在收集结束时,通过心脏穿刺处死大鼠。使用WinLin 6.0程序进行血液和CSF PK分析。

[0230] 使用表1中所示的肽特征,如实例4中所述通过质谱和基于nanoLC-SRM的定量分析血清和CSF样品。

[0231] CSF收集是一个精密的程序,在此过程中CSF可能易于被血液污染。由于预期CSF中 V_H 的量远小于血液(<0.1%),因此即使轻微的血液污染也会严重损害个体CSF样品的价值。因此,有必要为血液污染的CSF样品制定严格的排除标准。为了评估血液-CSF白蛋白比率,开发了nanoLC-SRM方法用于定量血浆和CSF中的白蛋白水平。基于其独特的保留时间和m/z值选择白蛋白肽APQVSTPTLVEAAR(Mol Pharm公司),以便在多重测定中对其他肽峰具有最小干扰。如上所述,使用SRM在CSF和血浆样品两者中定量肽的强度。对于每只大鼠,白蛋白比率计算如下:

[0232] 白蛋白比率=每nL分析的血浆强度/每nL分析的CSF的强度

[0233] 1500和以下的比率被认为是血液污染的。

[0234] 如图5所示,FC5-mFc-ABP以时间和剂量依赖性方式出现在CSF中,其中 C_{max} 在12h与24h之间,表明FC5在体内将ABP转运到脑和CSF室中(A)。血清PK参数(下图5和表2)显示FC5-mFc-ABP的 α -和 β -半衰期与完整IgG(含有大鼠Fc的基准抗体)的 α -和 β -半衰期相似,并且显著高于没有Fc的ABP或FC5或FC5-ABP。

[0235] 表2

[0236] 剂量范围:2.5mg/kg,6mg/kg,12mg/kg,25mg/kg,

	mAb				FC5mFc-ABP (FC5结构域)			
[0237]	参数	估计	单位	CV(%)	参数	估计	单位	CV(%)
	V1	114.6	mL/kg	2.3	V1	144.5	mL/kg	2.2
	V2	74.4	mL/kg	6.5	V2	218.4	mL/kg	27.2
	CL	0.664	mL/(kg*hr)	1.9	CL	1.056	mL/(kg*hr)	26.5
	CLd	2.682	mL/(kg*hr)	41.8	CLd	3.789	mL/(kg*hr)	10.6
	$\alpha T_{1/2}$	11.2055	hr	38.0	$\alpha T_{1/2}$	14.36	hr	14.3
	$\beta T_{1/2}$	205.279	hr	2.2	$\beta T_{1/2}$	263.8	hr	41.3
	Vss	189.0	mL/kg	1.4	Vss	362.9	mL/kg	16.3

[0238] ■血清半衰期(分布期和终末期两者)在‘基准mAb’与FC5mFc-货物之间相似

[0239] 实例6:在较大的非啮齿动物动物中将FC5-ABP构建体递送至脑

[0240] 在比格犬中评估FC5-mFc-ABP的血清和CSF PK曲线。如以上在实例5中所述,通过静脉内注射向10-12岁的比格犬给予FC5-mFc-ABP,并连续地收集血清和CSF并通过nanoLC-MRM(左图)和使用Fc特异性抗体的蛋白质印迹(图6B)分析。星号表示受血液污染的样品(未

在MRM分析中示出)。可以看出,FC5-mFc-ABP以时间依赖性方式出现在CSF中,表明FC5在体内将ABP转运穿越狗血脑屏障,证实了BBB载体的翻译性质。通过WinNonlin软件分析PK参数和CSF暴露,并显示在下表3中。

[0241] 表3

参数	单位	狗1		狗2	
		平均估计	SD	平均估计	SD
t1/2	h	96	21	89	21
AUC 0-t	ng/ml*h	8.80E+06	1.99E+06	8.84E+06	2.16E+06
AUC 0-inf_obs	ng/ml*h	1.01E+07	2.21E+06	1.04E+07	2.76E+06
Cl_obs	ml/h/kg	1.54	0.36	1.53	0.48
Vss_obs	ml/h/kg	193	7	205	10
α半衰期	h	19	10	13	8.5
β半衰期	h	114	37	166	151
AUC_{0-t,csf} / AUC_{0-t,serum}	%	0.88	0.09	0.52	0.04

[0243] 实例7:BBB渗透性

[0244] 在体内(大鼠模型)与人Fc(hFc)融合并与ABP(FC5-hFc-ABP)化学连接的FC5的BBB渗透性和CSF外观。根据制造商的说明书(赛默飞世尔科技公司),使用异双功能交联剂磺基-SMCC(磺基琥珀酰亚胺基4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸酯)将FC5-hFc与ABP-胱胺酰胺连接。经由尾静脉以6.25mg/kg将化学缀合的分子静脉内给予至大鼠体内,并在4和24小时收集血清和CSF样品,并如图5所述进行分析。FC5-hFc-ABP以时间依赖性方式出现在CSF中,然而没有BBB载体的Fc-ABP不能证实FC5介导的ABP穿越血脑屏障的转运,并且如图7所示。

[0245] 实例8:将BBB-Fc-L-ABP构建体递送至脑

[0246] 在小鼠中评估实例2的FC5-Fc-ABP构建体在体内穿过血脑屏障并穿透脑实质的能力。

[0247] 经由尾静脉以15mg/kg将FC5-mFc-L-ABP通过静脉内注射给予野生型(WT)和AD-转基因(AD-Tg,B6.Cg-Tg,Jackson实验室)小鼠(图8A和8B)或以7.5、15和30mg/kg给予AD-Tg小鼠,并循环4和24h。然后经由左颈总动脉以1ml/min的速率用10ml肝素化(100U/ml)生理盐水彻底灌注小鼠,以促进脑的特异性灌注。然后取出脑,并且解剖海马和皮质组织并立即冷冻并储存在-80℃下直至使用。使用Dounce匀浆器(在4℃下10-12次冲程)将冷冻组织在含有50mM Tris-HCl pH 8,150mM NaCl和蛋白酶抑制剂混合物(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich),安大略省奥尔维克)的冰冷均化缓冲液中匀浆。然后将样品在4℃下各自超声处理三次,每次10s,并除去不溶物质(10,000xg,在4℃下10min)。分析上清液的蛋白质

含量,并使用实例4中描述的方法和表1中所示的肽特征将约0.5 μ g蛋白质用于SRM分析(图8A)。还使用mFc特异性抗体通过蛋白质印迹分析样品(图8B)。通过MRM在皮质和海马两者中检测属于融合分子的所有三种组分(FC5、Fc和ABP)的特定“特征”肽,表明FC5载体成功地将ABP递送到脑的靶区域(仅来自FC5肽的数据在图8A中示出)。与典型地针对与单独的Fc或Fc片段融合的对照单结构域抗体A20.1测量的约50ng/g组织相比,在不同时间点处所测量的水平在750-1400ng/g脑组织范围内。这通过在组织提取物中探测Fc和ABP的蛋白质印迹分析进一步证实(8B)。通过蛋白质印迹在仅接受生理盐水的动物中未检测到融合分子的蛋白质信号。存在通过蛋白质印迹在脑的靶区域中检测到的FC5-mFc-ABP水平的剂量依赖性增加。这些结果清楚地表明FC5在野生型(WT)和AD-Tg小鼠中成功地将ABP递送到脑的靶区域(即,海马和皮质)。

[0248] 实例9: A β 从小鼠脑中的清除

[0249] 为了评估ABP对Tg小鼠中淀粉样蛋白负荷的功效,比较了单独使用ABP或FC5-ABP构建体的治疗结果。

[0250] 用单独的ABP(图9A)或与BBB载体FC5融合的ABP(图9B和9C)治疗之间的比较。使用两种不同的AD Tg小鼠模型,即,三重转基因(3X Tg-AD, sv129/C57BL6小鼠,含有PS1M146V、APP_{Swe}和tauP301L转基因,加利福尼亚大学,F.M.LaFerla博士)和双转基因(B6.Cg-Tg,含有PSEN1dE9和APP_{Swe}转基因,Jackson实验室);将小鼠分别在3个月或2个月的时间内每隔一天皮下(sc)给予300nmol/kg游离ABP。在治疗期结束时,根据制造商的测定程序,使用商业测定试剂盒(英杰公司(InVitrogen), KHB3544)通过ELISA测量脑中的A β 水平。在多次治疗(每隔一天)2-3个月后,单独用ABP治疗导致脑A β 减少25%-50%(9A)。如以上在实例8中所述,将FC5-mFc-ABP构建体静脉内注射到双转基因AD小鼠(B6.Cg-Tg, 15mg/kg;相当于220nmol/kg)体内,并在注射后24h通过ELISA和nanoLC-MRM两者测量脑A β 水平。意想不到的是,在用FC5-mFc-ABP处理24小时内观察到约50%的淀粉样蛋白减少(图9B),表明通过FC5进行ABP的有效脑递送显著增加了ABP在减少脑A β 水平方面的功效。CSF分析还表明在FC5-mFc-ABP处理后24小时内A β ₁₋₄₂水平显著降低(图9C)。通过MRM(SEQ:LVFFAEDVGSNK,表1/ELISA分析检测的A β 肽序列与由ABP识别的A β 表位是关系较远的/不同的(因此,不干扰其通过ELISA或MRM的定量)。

[0251] 实例10: 将Fc组分引入FC5-ABP构建体中增强其血清半衰期

[0252] 如实例2所述,在CHO细胞中产生FC5-ABP(FC5 SEQ ID NO 17;和ABP SEQ ID NO 36)和FC5-hFc-ABP(FC5 SEQ ID NO 17;hFc 1x7 SEQ ID NO 40和ABP SEQ ID NO 36)构建体。如实例5所述测定血清PK。将FC5-ABP和FC5-Fc-ABP构建体以15mg/kg静脉内给予至大鼠尾静脉内。连续地收集血清,并使用FC5-和ABP-特异性抗体通过直接ELISA定量FC5-ABP和FC5-Fc-ABP水平。将血清样品在磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)中稀释(1:5,000)并施加到Maxisorb板上并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。将ELISA板用3X100 μ l PBS洗涤,并在室温(RT)下用TBST中的1% BSA封闭30min。除去封闭溶液,并将板与HRP-缀合的FC5单克隆抗体一起孵育(90min)。在孵育和洗涤后,加入100 μ l SureBlue试剂并在RT下在黑暗中孵育10-15min。在反应结束时,加入100 μ l 1M HCl并在板读数器中在450nm处读取显色的颜色。如图10所示,与含有Fc组分的FC5-ABP构建体(FC5-Fc-ABP)相比,没有Fc的FC5-ABP在血清中(在1小时内)非常快速地被清除。还用ABP特异性抗体重复该测定,其结果相似。在样品施用后,首先

将ELISA板与ABP兔多克隆抗体一起孵育(90min),随后与HRP缀合的兔二抗孵育(30min),并如上所述检测结合的抗体(数据未示出)。

[0253] 实例11: A β 从大鼠脑中的清除

[0254] 经由尾静脉对AD-Tg大鼠每周给药生理盐水或FC5-mFc-ABP,持续4周(负荷剂量为30mg/kg,并且随后4个每周剂量为15mg/kg)。通过nanoLC MRM分析FC5-mFc-ABP和A β 的CSF水平。在处理四周之前和之后,使用特异性A β 结合剂[18F]NAV4694通过PET扫描测定脑A β 水平。FC5-mFc-ABP在24小时内降低大鼠的CSF A β 水平。如在Tg小鼠中,观察到FC5-mFc-ABP与A β 的CSF水平之间的反比关系,表明通过FC5递送到脑和CSF的ABP的靶标接合和A β 的快速清除(图11A和图11B)。这通过PET扫描进一步证实,其清楚地表明在用FC5-mFc-ABP处理四周后大鼠脑A β 水平显著降低(30%-50%)(图11C)。

[0255] 实例12: 增加的海马体积和改善的神经元连接性

[0256] 在实例11中描述的实验中,生理盐水和FC5-mFc-ABP处理的Tg小鼠在处理之前经受体积和功能磁共振成像(MRI)。体积MRI(图12A)显示,与生理盐水处理的对照相比,ABP处理的Tg小鼠的海马体积增加,表明ABP治疗阻止了海马萎缩。功能MRI(图12B)显示,与生理盐水处理的对照相比,ABP处理的Tg小鼠的前扣带皮层中的连接性改善,表明恢复神经元连接性。该数据证实了现在提供的显著性、功效和优越的治疗优势。

[0257] 实例13: FC5-mFc2a-ABP处理显示狗中CSF A β 水平降低

[0258] 如实例6所述,在两只剂量(15mg/kg和30mg/kg)的比格犬中评估FC5-mFc-ABP的血清和CSF PK曲线。除了通过nanoLC-MRM测量FC5-mFc2a-ABP的血清和CSF水平之外,还如实例9所述通过nanoLC-MRM测量A β 的CSF水平。可以看出,FC5-mFc-ABP以剂量和时间依赖性方式出现在CSF中(图13B)。最重要的是,如观察Tg小鼠和Tg大鼠,存在CSF A β 水平的显著降低,这与CSF FC5-mFc2a-ABP水平成反比。

[0259] 实例14: 具有不同BBB载体的ABP融合分子的产生

[0260] 为了评估ABP融合分子的多功能性,ABP成功地与另一种人源化BBB载体IGF1R5(H2)融合。如图12所示,保留了分子的双功能性,ABP结合A β 寡聚体的能力(ELISA和重叠测定)以及还有IGF1R5在体外穿越BBB模型递送ABP的能力(数据未示出)。这清楚地表明ABP可以与不同的BBB穿越单结构域抗体融合以递送到脑。

[0261] 实例15: 通过不同的BBB穿越单结构域抗体-Fc-ABP构建体结合的A β 寡聚体

[0262] 提供了具有修饰的ABP的各种FC5-Fc-ABP构建体(位点特异性突变或除去分子的C末端部分,由如表1和图15中所示的SEQ ID No所示)。如图15所示,通过ELISA方法,所有构建体均在结合A β 寡聚体方面保留了相似的效力。

[0263] 实例16: 产生具有特异性突变的FC5-hFc1X7-L-ABP以改善稳定性和生物可制造性。

[0264] 携带特异性突变的FC5-hFc1X7-L-ABP(ABP, SEQ ID NO 35; ABP, SEQ ID NO 36)在CHO细胞中产生,并在还原(R)和非还原(NR)条件下在SDS-PGE上分离并用考马斯蓝染色,如图2所述。将分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜,并用FC5特异性、hFc特异性和ABP特异性抗体进行免疫印迹。在另一组中,还通过重叠测定法测试了融合分子中ABP的A β 结合。用A β 特异性抗体6E10检测结合的A β 。可以看出,如例如通过在还原或非还原条件下的单个蛋白质条带在本文中清楚地指出(与图2A的其他ABP构建体相比,其中可以看到双蛋白质条带),用

特定突变系统修饰ABP (如这里所示,例如ABP SEQ ID NO:35和ABP SEQ ID NO:36) 显著地增强了所产生分子的稳定性。融合分子稳定性方面的这种显著增强有利地促进了均相分子的生物可制造性。

[0265] 实例17:各种FC5-Fc-L-ABP构建体和IGF1R5-Fc-ABP构建体在体外的BBB渗透性。

[0266] 如图4所述,在体外大鼠BBB模型中评估BBB-穿越,并通过nanoLC-MRM方法检测穿越血脑屏障的分子。与人源化FC5和IGF1R载体融合的所有ABP变体有效地穿越BBB。如所预期的,A20.1,非BBB可渗透的sdAb未穿越BBB,并且同样地,与A20.1融合的ABP未渗透BBB(图17A)。在图17B中,显示通过nanoLC-MRM检测融合分子的所有三种组分FC5、Fc和ABP的“指纹”肽。

[0267] 本文所述的实施例和实例是说明性的并且不意味着限制所要求保护的本发明的范围。前述实施例的变型,包括替代、修改和等同物,由发明人预期包含在权利要求中。此外,所讨论的特征组合对于本发明的解决方案可能不是必需的。

[0268] 实例18:人源化FC5-Fc-ABP构建体[FC5(H3)-hFc-ABP(具有ABP SEQ ID NO:35和ABP SEQ ID NO:36)]完整地穿越体外大鼠血脑屏障。如实例4所述评估人源化FC5-ABP融合分子的血脑屏障穿越。通过蛋白质印迹和ELISA方法分析穿越血脑屏障的融合分子。用hFc特异性抗体和ABP特异性抗体探测免疫印迹。两种抗体均识别穿越BBB(底室)的分子,并且分子大小与应用于体外BBB(顶室)的FC5-ABP融合构建体的分子大小相同,表明穿越BBB的分子保持完整。这通过夹心ELISA测定证实,其中用FC5特异性抗体捕获BBB穿越分子,并用ABP抗体检测捕获的分子。

[0269] 实例19:人源化FC5-Fc-ABP构建体[FC5(H3)-hFc-L-ABP(具有ABP SEQ ID NO:35和ABP SEQ ID NO:36)]在体内转运穿越BBB并通过FC5完整地递送到脑。如实例8所述评估人源化FC5-ABP融合分子在小鼠中的血脑屏障穿越和脑递送。在静脉内给予分子和心脏内灌注后4小时,取出脑并在RIPA缓冲液中提取皮质,并且通过用ABP特异性抗体探测的蛋白质印迹且通过夹心ELISA检测注射的FC5-ABP融合分子的存在,该夹心ELISA通过用FC5特异性捕获分子并用ABP特异性抗体检测分子。蛋白质印迹揭示皮质中存在全长FC5-ABP构建体。这通过夹心ELISA证实,其揭示了分子的完整性质,如通过由FC5特异性抗体捕获分子并用ABP特异性抗体检测捕获的分子的能力所示。

[0270] 实例20:人源化FC5-Fc-ABP构建体[FC5(H3)-hFc-ABP(ABP SEQ ID NO 36)]的离体(A)和体内(B)结合(靶标接合)

[0271] 如实例3所述进行免疫组织化学。将来自AD转基因小鼠的脑切片与FC5(H3)-hFc1X7-ABP(ABP,SEQ ID NO:36)一起孵育,并用HRP缀合的FC5特异性抗体显现结合的融合分子。作为阴性对照,将切片与无构建体或没有融合ABP的FC5-hFc构建体一起孵育。简而言之,将来自APP/PS1转基因小鼠的含有皮质和海马的福尔马林固定的40 μ m自由浮动切片在10mM柠檬酸钠缓冲液(pH 9)中于80 $^{\circ}$ C下经受抗原修复30分钟,然后冷却至室温。将切片在PBS中冲洗,用在PBS中的3% H₂O₂处理30分钟以阻断内源性过氧化物酶,然后再次冲洗。在含有0.3% triton X-100的Dako无血清蛋白质块中孵育1小时后,将切片与含有0.3% triton X-100的在Dako稀释剂中的FC5(H3)-hFc1x7-ABP或摩尔当量的FC5-hFc1x7在室温下一同孵育90分钟。在PBS中彻底冲洗后,将切片与在Dako稀释剂中的抗FC5-HRP在室温下孵育60分钟,再次冲洗,并且然后使用Vector Impact DAB按照试剂盒说明进行显色。将切

片置于Superfrost plus载玻片上,使其风干过夜,然后再水合、用甲基绿复染,浸入丙酮/0.05%乙酸(v/v)中并脱水、澄清并用Permount盖上盖玻片。用FC5(H3)-hFc1X7-ABP构建体观察到选择性结合(黑点),但用没有ABP的FC5(H3)-hFc1X7未观察到选择性结合(黑点),表明脑中A β 沉积物的ABP依赖性结合(靶标接合)。在来自不产生淀粉样蛋白沉积物的野生型小鼠的脑切片中未观察到结合(数据未示出)。

[0272] 在将FC5(H3)-hFc-ABP构建体海马内注射到AD转基因小鼠体内后,检测到A β 沉积物的相似结合(B)。在海马内注射后4小时,灌注Tg小鼠并取出脑并切片。用ABP特异性多克隆抗体显现FC5(H3)-hFc-ABP与A β 沉积物(有光泽的白点)的结合。首先将脑切片与ABP特异性单克隆抗体一起孵育,随后与Alexa-647缀合的抗兔-Fc二抗一起孵育。

[0273] 实例21:通过人源化FC5-Fc-ABP构建体(FC5(H3)-hFc-ABP(SEQ ID NO:46)在体内靶标接合。将荧光团标记的(图18A)或原初FC5-ABP(图18B)融合分子显微注射到野生型(Wt)和AD-Tg(Tg)小鼠的海马区域中。在显微注射荧光团标记的FC5-ABP融合分子后30min,取出脑、切片并在荧光显微镜下观察。如21A所示,注射的分子与A β 沉积物结合,如通过其与A β 特异性抗体的共定位所证实。在平行研究中,在海马内注射原初FC5-ABP融合分子后4小时,收集来自注射(ips)和未注射(con)区域的海马形成并在Tris缓冲生理盐水中匀浆。用FC5抗体作为捕获抗体和ABP或A β 特异性抗体作为检测抗体使海马提取物经受夹心ELISA。如21B所示,显微注射的FC5-ABP分子保持完整,并且ABP能够在体内与靶A β 接合并结合,如通过由A β 特异性抗体检测到的下拉复合物中A β 的存在所示。

[0274] 实例22:非人源化和人源化FC5-Fc-L-ABP构建体之间的PK/PD比较

[0275] 如图5所述,经由尾静脉注射以15mg/kg将FC5-mFc2a-ABP或FC5(H3)-hFc1x7-ABP静脉内给予至大鼠体内。连续地收集血清和CSF。使用nanoLC-MRM方法定量FC5-Fc-ABP水平。如图22A所示,非人源化和人源化构建体的血清和CSF PK曲线非常相似。如图9B所述,经由尾静脉注射以15mg/kg将FC5-mFc2a-ABP或FC5(H3)-hFc1x7-ABP静脉内给予至Tg小鼠体内。如图9B所述,通过nanoLC-MRM测量CSF中的FC5-Fc-ABP和A β 水平。如图22B所示,CSF中非人源化和人源化FC5-Fc-ABP的水平相似,并且最重要的是,CSF A β 水平的变化(降低)也非常相似,表明FC5-Fc-ABP构建体的人源化不影响融合构建体的PK和PD曲线。

[0276] 序列

[0277]

SEQ ID NO:	序列	描述
1	GFKITHYTMG	CDR1 FC5
2	RITWGGDNTFYNSVKG	CDR2 FC5
3	GSTSTATPLRVDY	CDR3 FC5
4	EYPSNFYA	CDR1 IGF1R-3
5	VSRDGLTT	CDR2 IGF1R-3
6	AIVITGVWNKVDVNSRSYHY	CDR3 IGF1R-3
7	GGTVSPTA	CDR1 IGF1R-4
8	ITWSRGTT	CDR2 IGF1R-4
9	AASTFLRILPEESAYTY	CDR3 IGF1R-4
10	GRTIDNYA	CDR1 IGF1R-5
11	IDWGDGGX; 其中 X 是 A 或 T	CDR2 IGF1R-5
12	AMARQSRVNLDVARYDY	CDR3 IGF1R-5
13	X ₁ VQLVX ₂ SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGW X ₃ RQAPGKX ₄ X ₅ EX ₆ VSRITWGGDNTFYNSVKGRFTISR DNSKNTX ₇ YLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRV DYWGQGTLVTVSS, 其中 X ₁ =D 或 E, X ₂ =A 或 E, X ₃ =	人源化 FC5 共有

[0278]

	F 或 V, X ₄ =E 或 G, X ₅ =R 或 L, X ₆ =F 或 W, X ₇ =L 或 V;	
14	DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWF RQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYNSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTATPLRVDYW GKGTQVTVSS	FC5
15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWV RQAPGKGLEWVSRTWGGDNTFYNSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYW GQGLTVTVSS	FC5-H1
16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWV RQAPGKGLEWVSRTWGGDNTFYNSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYW GQGLTVTVSS	FC5-H2
17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFR QAPGKGLEFVSRTWGGDNTFYNSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYW GQGLTVTVSS	FC5-H3
18	X ₁ VX ₂ LX ₃ ESGGGLVQX ₄ GGSLRLSCX ₅ ASEYPSNFYAMS WX ₆ RQAPGKX ₇ X ₈ EX ₉ VX ₁₀ GVSRDGLTTLYADSVKGRFT X ₁₁ SRDNX ₁₂ KNTX ₁₃ X ₁₄ LQMNSX ₁₅ X ₁₆ AEDTAVYYCAIVI TGVWNKVDVNSRSYHYWGQGTX ₁₇ VTVSS, 其中 X ₁ 是 E 或 Q; X ₂ 是 K 或 Q; X ₃ 是 V 或 E; X ₄ 是 A 或 P; X ₅ 是 V 或 A; X ₆ 是 F 或 V; X ₇ 是 E 或 G; X ₈ 是 R 或 L; X ₉ 是 F 或 W; X ₁₀ 是 A 或 S; X ₁₁ 是 M 或 I; X ₁₂ 是 A 或 S; X ₁₃ 是 V 或 L; X ₁₄ 是 D 或 Y; X ₁₅ 是 V 或 L; X ₁₆ 是 K 或 R; 并且 X ₁₇ 是 Q 或 L,	IGF1R-3 共有
19	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASEYPSNFYAMSWFR QAPGKEREFVAGVSRDGLTTLYADSVKGRFTMSRDNA KNTVDLQMNSVKAEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNS RSYHYWGQGTQVTVSS	IGF1R-3
20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYPSNFYAMSWFR QAPGKEREFVSGVSRDGLTTLYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVITGVWNKVDVNSRS YHYWGQGLTVTVSS	IGF1R-3-H5
21	X ₁ VX ₂ LX ₃ ESGGGLVQX ₄ GGSLRLSCX ₅ X ₆ SGGTVSPTAM GWX ₇ RQAPGKX ₈ X ₉ EX ₁₀ VX ₁₁ HITWSRGTTTX ₁₂ ASSVKX X ₁₃ RFTISRDX ₁₄ X ₁₅ KNTX ₁₆ YLQMNSLX ₁₇ X ₁₈ EDTAVYYCA ASTFLRILPEESAYTYWGQGT X ₁₉ VTVSS, 其中 X ₁ 是 E 或 Q; X ₂ 是 K 或 Q; X ₃ 是 V 或 E; X ₄ 是 A 或 P; X ₅ 是 A 或 E; X ₆ 是 V 或 A; X ₇ 是 V 或 F; X ₈ 是 G 或 E; X ₉ 是 L 或 R; X ₁₀ 是 F 或 W; X ₁₁ 是 G 或 S; X ₁₂ 是 V 或 Y; X ₁₃ 是 D 或 G; X ₁₄ 是 N 或 S; X ₁₅ 是 A 或 S; X ₁₆ 是 L 或 V; X ₁₇ 是 K 或 R; X ₁₈ 是 A 或 S; 并且 X ₁₉ 是 L 或 Q,	IGF1R-4 共有
22	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTVSPTAMGW RQAPGKEREFVGHITWSRGTTTRVASSVKDRFTISRDSAK NTVYLQMNSLKSSEDVAVYYCAASTFLRILPEESAYTYW GQGTQVTVSS	IGF1R-4
23	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGTVSPTAMGW F	IGF1R-4-H3

[0279]

	RQAPGKGLEFVGHITWSRGTTTRYASSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAASTFLRILPEESAYTY WGQGLTVTVSS	
24	X ₁ VX ₂ LX ₃ ESGGGLVQX ₄ GGSLRLSCAASGRTIDNYAMA WX ₅ RQAPGKX ₆ X ₇ EX ₈ VX ₉ TIDWGDGGX ₁₀ RYANSVKGR FTISRDNX ₁₁ KX ₁₂ TX ₁₃ YLQMNX ₁₄ LX ₁₅ X ₁₆ EDTAVYX ₁₇ CA MARQSRVNLDVARYDYWGQGT ₁₈ TVTVSS, 其中 X ₁ 是 E 或 Q; X ₂ 是 K 或 Q; X ₃ 是 V 或 E; X ₄ 是 A 或 P; X ₅ 是 V 或 S; X ₆ 是 D 或 G; X ₇ 是 L 或 R; X ₈ 是 F 或 W; X ₉ 是 A 或 S; X ₁₀ 是 A 或 T; X ₁₁ 是 A 或 S; X ₁₂ 是 G 或 N; X ₁₃ 是 M 或 L; X ₁₄ 是 N 或 R; X ₁₅ 是 E 或 R; X ₁₆ 是 P 或 A; X ₁₇ 是 S 或 Y; 并且 X ₁₈ 是 Q 或 L,	IGF1R-5 共有
25	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWS RQAPGKDREFVATIDWGDGGARYANSVKGRFTISRDN KGTMYLQMNPLEDTAVYSCAMARQSRVNLDVARY DYWGQGTQTVTVSS	IGF1R-5
26	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWV RQAPGKGLEWVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNLSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLVAR YDYWGQGLTVTVSS	IGF1R-5-H2
27	SGKTEYMAFPKPFESSSSIGAEKPRNKKLP EEVESSRTP WLYEQEGEVEKPFIKTGFSVSVEKSTSSNRKNQLDTNG RRRQFDEESLESFSSMPDPVDPPTVTFTKTRKASQA SLASKDKTPKSKSKKRNSTQLKSRVKNITHARRILQQS NRNACNEAPETGSDFSMFEA	PK-4
28	FSSMPDPVDPPTVTFTKTRKASQA SLASKDKTPKSK SK	P4 肽
29	KDKTPKSKSKKRNSTQLKSRVKNITHARRILQQSNR NA	P5 肽
30	KTFKTRKASQA SLASKDKTPKSKSKKRNSTQLKSRV KNI	P4-5 肽 (ABP)
31	X ₁ TFX ₂ TX ₃ X ₄ ASAQA SLASKDKTPKSKSKX ₅ X ₆ STQLX ₇ SX ₈ VX ₉ NI 这里 X ₁ = G 或 A, X ₂ = G 或 V, X ₃ = G 或 A, X ₄ = G 或 A, X ₅ = G 或 V, X ₆ = G 或 V, X ₇ = G 或 V, X ₈ = G 或 A, X ₉ = G 或 A (SEQ ID NO: 31)	ABP 共有
32	KTFKTRKASQA SLASKDKTPKSKSKKRGSTQLKSRV KNI	[ABP(G)]
33	KTFKTRKASQA SLASKDKTPKSKSKKGGSTQLKSRV KNI	[ABP(GG)]
34	KTFKTRGASQA SLASKDKTPKSKSKKRGSTQLKSRV KNI	[ABP(RG-G)]
35	KTFKTGGASQA SLASKDKTPKSKSKKRGSTQLKSRV KNI	[ABP(GG-G)]
36	GTFGTGGASQA SLASKDKTPKSKSKKGGSTQLKSRV KNI	[ABP(6G)]
37	KTFKTRKASQA SLASKDKTPKSKSKKGGSTVKNI	[ABP(GGspv)]
38	KTFKTRKASQA SLASKDKTPKSKSKKRG	[ABP(trc)]
39	ASEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFWNNVEVHTAQTQT	小鼠 Fc2a

[0280]

	HREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTC MVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGDSY FMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF SRTPG	
40	AEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	人 Fc1x7
41	AEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWHVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQK SLSLSPG	人 Fc1X0
42	EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFR RQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYNSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTATPLRVDYW GKGTQVTVSSASEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGK EFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE EMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK NTEPVLDSGDSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVH EGLHNHHTTKSFSRTPGTGGGSGGGGSKTFKTRKAS AQASLASKDKTPKSKSKKRNSTQLKSRVKNI	FC5-mFc2a-A BP
43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFR QAPGKGLEFVSRTWGGDNTFYNSVKGRFTISRDN NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYWG QGTLLTVSSASEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIF PPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEF KCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEM TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTE PVLDSGDSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL HNHHTTKSFSRTPGTGGGSGGGGSKTFKTRKASAQA SLASKDKTPKSKSKKRNSTQLKSRVKNI	FC5-H3-mFc2 a-L-ABP
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFR QAPGKGLEFVSRTWGGDNTFYNSVKGRFTISRDN NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYWG QGTLLTVSSAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGTGGGSGGGGSKTFKTRKASAQASL	FC5-H3-hFc1 X7-L-ABP

[0281]

	ASKDKTPKSKSKKRNSTQLKSRVKNI	
45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFR QAPGKGLEFVSRLTWGGDNTFYNSVKGRFTISRDNK NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYWG QGTTLTVSSAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGT GGGSGGGG SKTFKTRKASQAASL ASKDKTPKSKSKKRSTQLKSRVKNI	FC5-H3-hFc1 X7-L-ABP(G)
46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFR QAPGKGLEFVSRLTWGGDNTFYNSVKGRFTISRDNK NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYWG QGTTLTVSSAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG TGGGSGGGG SKTFKTGGASAQASLASKDKTPKSKSKK RGSTQLKSRVKNI	FC5-H3-hFc1 X7-L-ABP(G G-G)
47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFR QAPGKGLEFVSRLTWGGDNTFYNSVKGRFTISRDNK NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYWG QGTTLTVSSAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGT GGGSGGGGSG TFTGGASAQAS LASKDKTPKSKSKKGGSTQLKSRVKNI	FC5-H3-hFc1 X7-L-ABP(6G)
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFR QAPGKGLEFVSRLTWGGDNTFYNSVKGRFTISRDNK NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYWG QGTTLTVSS GGGSGGGG SKTFKTGGASAQASLASKD KTPKSKSKKRSTQLKSRVKNI GGGSGGGG SAEPKS SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	FC5(H3)-L-A BP(GG-G)-L hFc1X7
49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFR QAPGKGLEFVSRLTWGGDNTFYNSVKGRFTISRDNK NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRVDYWG QGTTLTVSSAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWHVDG	FC5-H3-hFc1 X0-L-ABP(G G-G)

[0282]

	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGT GGGSGGGG SKTFKTGGASAAQASLASKDKTPKSKSKKRGSTQLKSRVKNI	
50	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTTLTVSSAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGT GGGSGGGG SKTFKTGGASAAQASLASKDKTPKSKSKKRGSTQLKSRVKNI	IGF1R5-H2-hFc1X7-L-ABP (GG-G)
51	KTFKTGGASAAQASLASKDKTPKSKSKKRGSTQLKSRVKN IGGGSGGGG SAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTTLTVSS	ABP(GG-G)-L-hFc1X7-IGF1R5-H2
52	AEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGSGGGG SKTFKTGGASAAQASLASKDKTPKSKSKKRGSTQLKSRVKNI IGGGSGGGG SQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIDNYAMAWVRQAPGKGLEWVATIDWGDGGTRYANSVKGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAMARQSRVNLDVARYDYWGQGTTLTVSS	hFc1X7-L-ABP(GG-G)-L-IGF1R5-H2
53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKGLEFVSRTIWGGDNTFYSNSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSTSTATPLRV DYWGQGTTLTVSSAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEGPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGT GX₁GX₂X₃GX₄X₅GX₆ ,GTFGTGGASAAQASLASKDKTPKSKSKKGGSTQLKSRVKNI	FC5-H3-hFc1X7-L(共有)-ABP(6G)
[0283]	其中 X ₁ = A 或 G, X ₂ = A 或 G, X ₃ = S 或 T, X ₄ = G 或 V, X ₅ = G、A 或 V, X ₆ = S 或 T	

[0284] 参考文献

[0285] 本文和整个申请中提及的所有专利、专利申请和出版物均通过引用特此并入。

[0286] Abbott NJ (2013) Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inher Metab Dis*. 36(3):437-49.

[0287] Arbabi-Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, and Muyldermans S (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies, *FEBS Lett* 414, 521-526

[0288] Barageb SH, Sonawane KD (2015) Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* doi:0.10 16/j.npep.20 15.06.008

[0289] Bard F et.al. (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease *Nat Med*. 6, 916-919.

[0290] Bell A, Wang ZJ, Arbabi-Ghahroudi M, Chang TA, Durocher Y, Trojahn U, Baardsnes J, Jaramillo ML, Li S, Baral TN, O'Connor-McCourt M, Mackenzie R, and Zhang J. (2010) Differential tumor-targeting abilities of three single-domain antibody formats. *Cancer Lett*. 289, 81-90.

[0291] Caram-Salas N, Boileau E, Farrington GK, Garber E, Brunette E, Abulrob A, Stanimirovic D. In vitro and in vivo methods for assessing FcRn-mediated reverse transcytosis across the blood-brain barrier. *Methods Mol Biol*. 2011; 763:383-401.

[0292] Chakravarthy B, Michel Menard, Leslie Brown, Melissa Hewitt, Trevor Atkinson, and James Whitfield. (2013) A synthetic peptide corresponding to a region of the human pericentriolar material 1 (PCM-1) protein binds 13-amyloid (A/31-42) oligomers. *J. Neurochem*. 126, 415-424.

[0293] Chakravarthy B, Shingo Ito, Trevor Atkinson, Chantal Gaudet, Michel Menard, Leslie Brown, James Whitfield. (2014) Evidence that a synthetic amyloid-13 oligomer-binding peptide (ABP) targets amyloid-13 deposits in transgenic mouse brain and human Alzheimer's disease brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 445:656-660.

[0294] Chothia C., and Lesk A.M. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol*. 196, 901-917.

[0295] Davies J., and L. Riechmann. (1996), Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding. *Immunotechnology* 2, 169-179

[0296] DeLaGarza, V.W. (2003) Pharmacologic treatment of Alzheimer's disease: an update. *Am Fam Physician*. 68, 1365-72.

[0297] Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaighe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L.G., Muyldermans, S., Wyns, L., and Matagne, A. (2002) Single-domain

- antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* 11,500-515.
- [0298] Durocher Y, Perret S, Kamen A. (2002) High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.* 30(2):E9.
- [0299] Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., and Wall, R. (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* 179, 125-142
- [0300] Farrington GK, Caram-Salas N, Haqqani AS, Brunette E, Eldredge J, Pepinsky B, Antognetti G, Baumann E, Ding W, Garber E, Jiang S, Delaney C, Boileau E, Sisk WP, Stanimirovic DB. (2014) A novel platform for engineering blood-brain barrier-crossing bispecific biologics. *FASEB J.* 28, 4764-4778.
- [0301] Garberg, P., Ball, M., Borg, N., Cecchelli, R., Fenart, L., Hurst, R. D., Lindmark, T., Mabondzo, A., Nilsson, J. E., Raub, T. J., Stanimirovic, D., Terasaki, T., Oberg, J.-O., and Osterberg, T.
- [0302] (2005) In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicol. In Vitro* 19, 299-334
- [0303] Gonzales NR, DePascalis R, Schlom J, Kashmiri SVS (2005) Minimizing the Immunogenicity of Antibodies for Clinical Application. *Tumor Biol* 26, 31-43
- [0304] Gottesman MM and Pastan I (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Ann. Rev. Biochem.* 62, 385-427
- [0305] Goure WF, Krafft GA, Jerecic J, Hefti F. (2014) Alzheimer's Research & Therapy Targeting the proper amyloid-beta neuronal toxins: a path forward for Alzheimer's disease. *Immunotherapeutics*, 6, 42-56.
- [0306] Gergov M, Ojanpera I, Vuori E. (2003) Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. *Journal of Chromatography B*, 795, 41-53
- [0307] Hardy J, Bogdanovic N, Winblad B, Portelius E, Andreasen N, Cedazo-Minguez A, Zetterberg H. (2014) Pathways to Alzheimer's disease. *J Intern Med.* 275, 296-303.
- [0308] Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446-448.
- [0309] Haqqani, A. S., Caram-Salas, N., Ding, W., Brunette, E., Delaney, C. E., Baumann, E., Boileau, E., and Stanimirovic, D. (2013) Multiplexed evaluation of serum and CSF pharmacokinetics of brain-targeting single-domain antibodies using a NanoLC-SRM-ILIS method. *Mol. Pharm.* 10, 1542-1556
- [0310] Huang YL, Sa"ljo"A, Suneson A, Hansson HA. (1995) A new approach for multiple sampling of cisternal cerebrospinal fluid in rodents with minimal trauma and inflammation. *J Neurosci Meth*; 63:13-22.

- [0311] Hussack G.,Hirama T.,Ding W.,MacKenzie R.,and Tanha J. (2011) Engineered Single-Domain Antibodies with High Protease Resistance and Thermal Stability PLoS ONE 6,e28218.
- [0312] Hussack G,Arbabi-Ghahroudi M,van Faassen H,Songer JG,Ng KK,MacKenzie R,Tanha J (2011b)Neutralization of Clostridium difficile toxin A with single-domain antibodies targeting the cell receptor binding domain.J Biol Chem.286 (11):8961-76.
- [0313] Iqbal U.,Trojahn U.,Albaghdadi H.,Zhang J.,O'Connor M.,Stanimirovic D.,Tomanek B.,Sutherland G.,and Abulrob A. (2010)Kinetic analysis of novel mono-and multivalent VHH-fragments and their application for molecular imaging of brain tumours.Br.J.Pharmacol.160,1016-1028.
- [0314] Jespers,L.,Schon,O.,Famm,K.,and Winter,G. (2004)Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation.Nat.Biotechnol.22, 1161-1165.
- [0315] Ji W and Ha I (2010)Drug Development for Alzheimer's Disease:Recent Progress Experimental Neurobiology 19,120-131.
- [0316] Jones PT,Dear PH,Foote J,Neuberger MS,Winter G (1986)Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse.Nature 321,522-525.
- [0317] Kabat EA,Wu TT.Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities.Relative contributions of VH and VL genes,minigenes,and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites.J Immunol.1991;147:1709-19.
- [0318] Kim,D.Y.,Kandalaft,H.,Ding,W.,Ryan,S.,van Fassen,H.,Hirama,T.,Foote, S.J.,MacKenzie,R.,and Tanha,J. (2012)Disulfide linkage engineering for improving biophysical properties of human VH domains PEDS advance access August 30,2012,1-9.
- [0319] Kornhuber ME,Kornhuber J,Cimniak U. (1986)Amethod for repeated CSF sampling in the freely moving rat.J Neurosci Meth 1986;17:63-68.
- [0320] Lannfelt L,Relkin,NR,Siemers ER (2014) Amyloid-f3-directed immunotherapy for Alzheimer's disease.J Intern Med.275,284-295.
- [0321] Li S,Zheng W,Kuolee R,Hirama T,Henry M,Makvandi-Nejad S,Fjallman T, Chen W,Zhang J.Pentabody-mediated antigen delivery induces antigen-specific mucosal immune response.Mol Immunol 2009;46:1718-26.
- [0322] Mangialasche F,Solomon A,Winblad B,Mecocci P,Kivipelto M (20 10) Alzheimer's disease:clinical trials and drug development.Lancet Neurol 9,702-716
- [0323] Monsonego A,and Weiner HL (2003) Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease Science.302,834-838.

- [0324] Morrone CD, Mingzhe Liu M, Black SE, McLaurin JA (2015) Interaction between therapeutic interventions for Alzheimer's disease and physiological Aβ clearance mechanisms. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 7, Article 64, 1-16.
- [0325] Musiek ES, Holtzman DM (2015) Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and "wingmen". *Nature Neurosci*. 18, 800-806.
- [0326] Nicaise M, Valeio-Lepiniec M, Minard P, Desmadril M. (2004) Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold. *Protein Sci*. 13(7): 1882-1891.
- [0327] Nuttall, S.D., Krishnan, U.V., Doughty, L., Pearson, K., Ryan, M.T., Hoogenraad, N.J., Hattarki, M., Carmichael, J.A., Irving, R.A., and Hudson, P.J. (2003) Isolation and characterization of an IgNAR variable domain specific for the human mitochondrial translocase receptor Tom70. *Eur. J. Biochem*. 270, 3543-3554.
- [0328] Padlan EA (1991) A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol Immunol* 28, 489-498.
- [0329] Pardridge, W.M., *Adv. Drug Delivery Reviews*, 15, 5-36 (1995)
- [0330] Pardridge, W.M. Drug and gene delivery to the brain: the vascular route, *Neuron*. 2002, 36, 555-558.
- [0331] Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP, Waldmann TA (1989) A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033.
- [0332] Rafii MS, Aisen PS. (2015) Advances in Alzheimer's disease drug development. *BMC Med*. 13:62.
- [0333] Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332, 323-327.
- [0334] Samuels B.L., *J. Clin. Pharmacol.* (1993) Modulation of vinblastine resistance with cyclosporine: a phase I study. *Ther*. 54, 421-429
- [0335] Savonenko AV, Melnikova T, Hiatt A, Li T, Worley PF, Troncoso JC, Wong PC, Price DL. (2012) Alzheimer's therapeutics: translation of preclinical science to clinical drug development. *Neuropsychopharmacology*. 37, 261-277
- [0336] Selkoe DJ, and Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years *EMBO Molecular Medicine*. 8, 595-608
- [0337] Sengupta U, Nilson AN, Kaye R (2016) The Role of Amyloid-β oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine*. 6:42-49
- [0338] Sevigny J et al., (2016) The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 537, 50-56
- [0339] Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG (2001) High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and

design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R.J Biol Chem.276,6591-6604.

[0340] Tempest PR,Bremmer P,Lambert M,Taylor G,Furze JM,Carr FJ,Harris WJ (1991)Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncytial virus infection in vivo.Biotechnology 9,266-271.

[0341] To R,Hirama T,Arbabi-Ghahroudi M,MacKenzie R,Wang P,Xu P,Ni F,and Tanha J. (2005) Isolation of Monomeric Human VHS by a Phage Selection.J.Biol.Chem.280,41395-41403.

[0342] Tsurushita N,Hinton,RP,Kumar S(2005)Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax.Methods 36,69-83.

[0343] Watanabe,T. (1995)Comparative Study on Reversal Efficacy of SDZ PSC 833,Cyclosporin a and Verapamil on Multidrug Resistance in Vitro and in Vivo Acta Oncol.,34,235-241

[0344] WO 95/04069

[0345] WO/2004/076670

[0346] WO 2003/046560

[0347] WO 2002/057445

[0348] WO 2011/127580

[0349] WO 2007/036021

[0350] WO 2006/133566

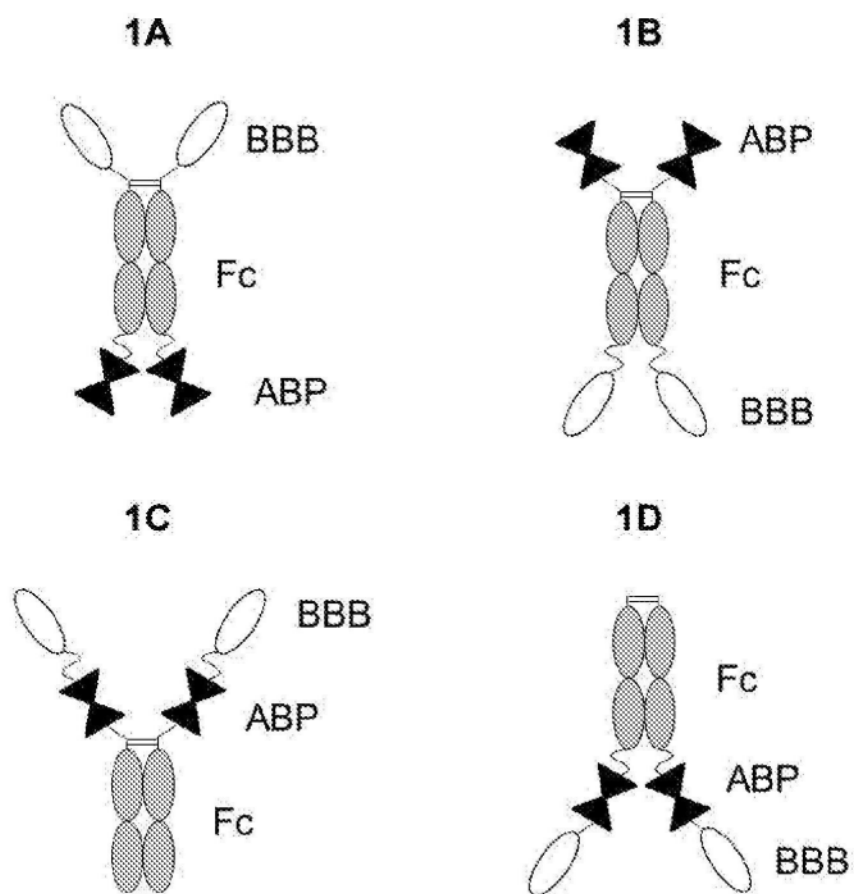


图1

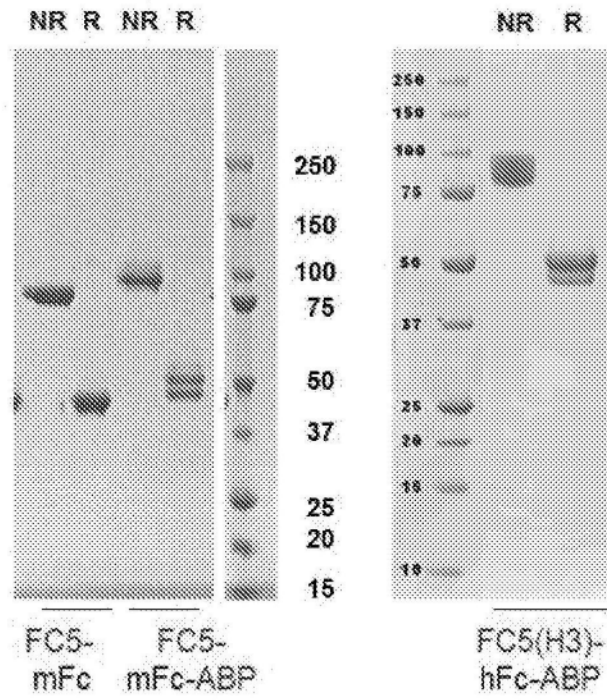


图2A

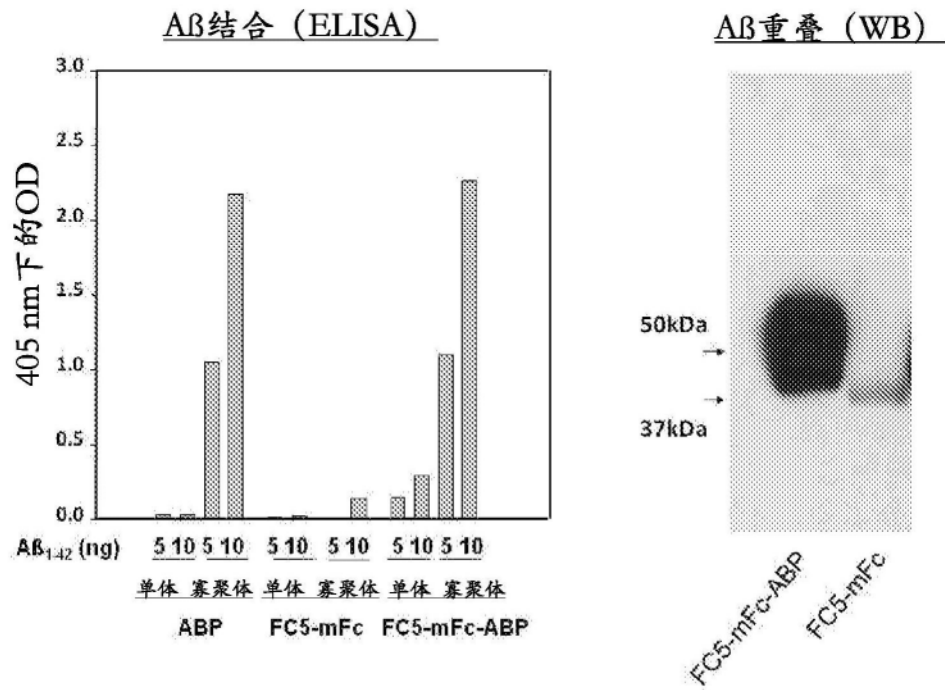


图2B

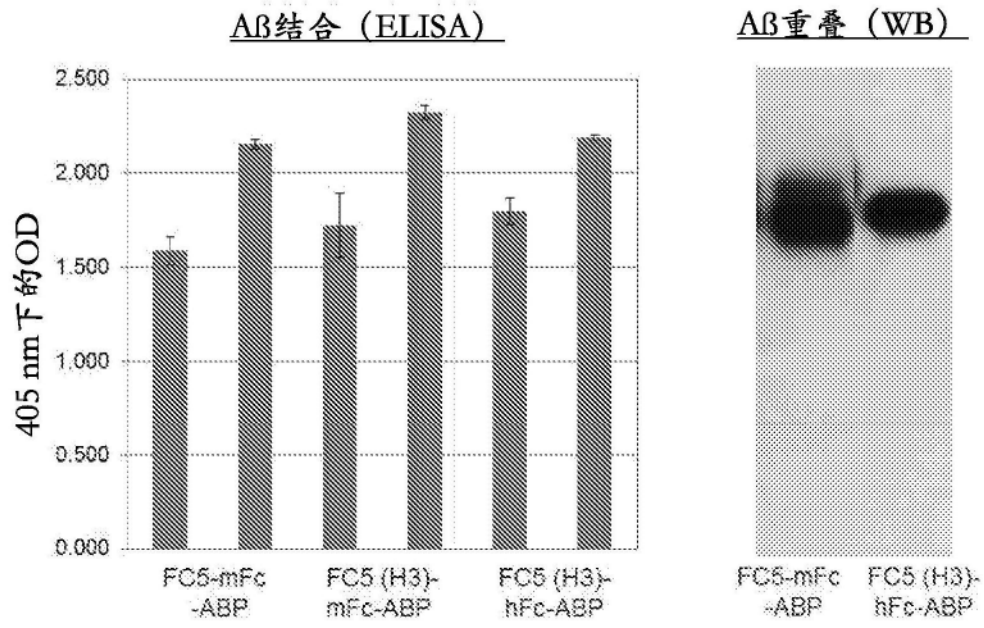


图2C

脑Aβ的IR-800-FC5-mFc-ABP结合

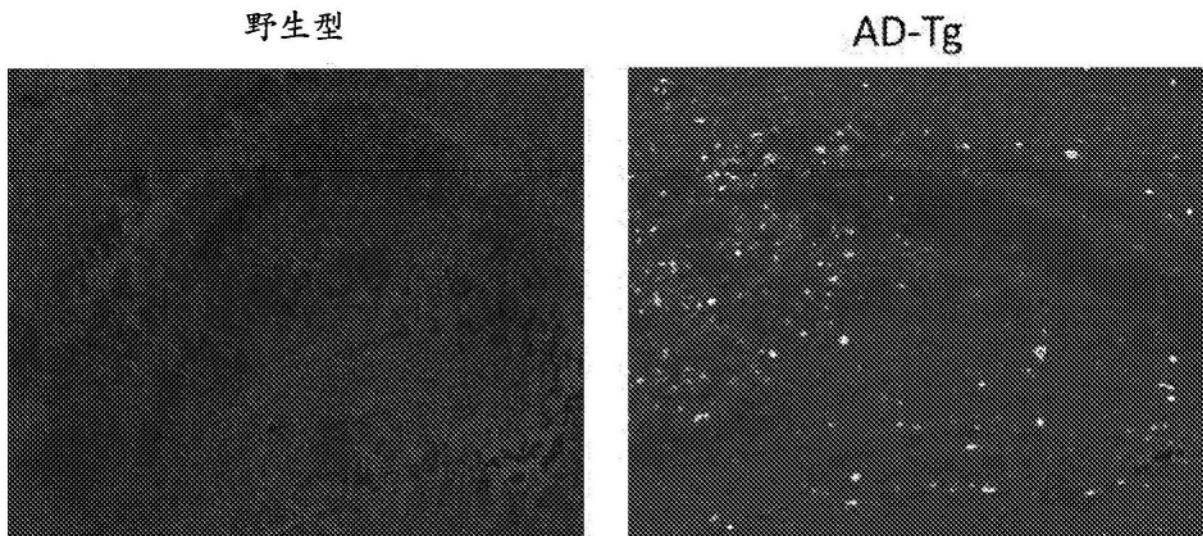


图3

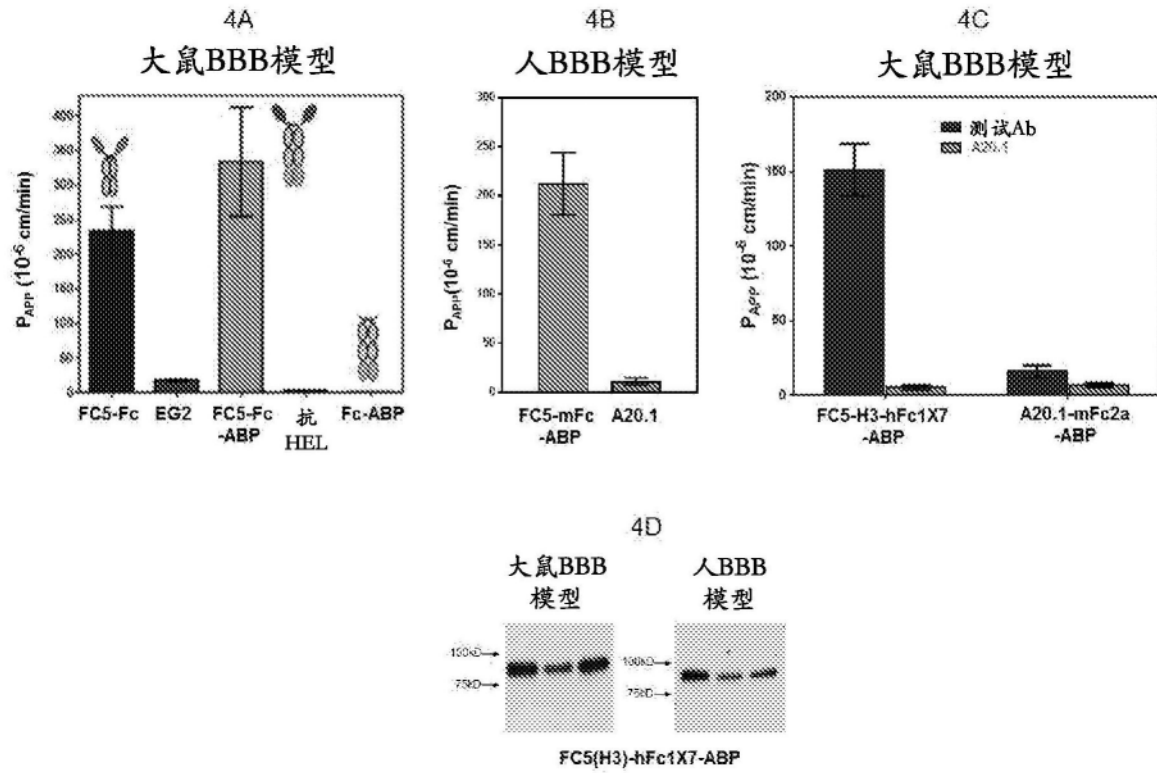


图4

静脉内注射的FC5-mFc-ABP (大鼠) 的血清和CSF PK - CSF外观

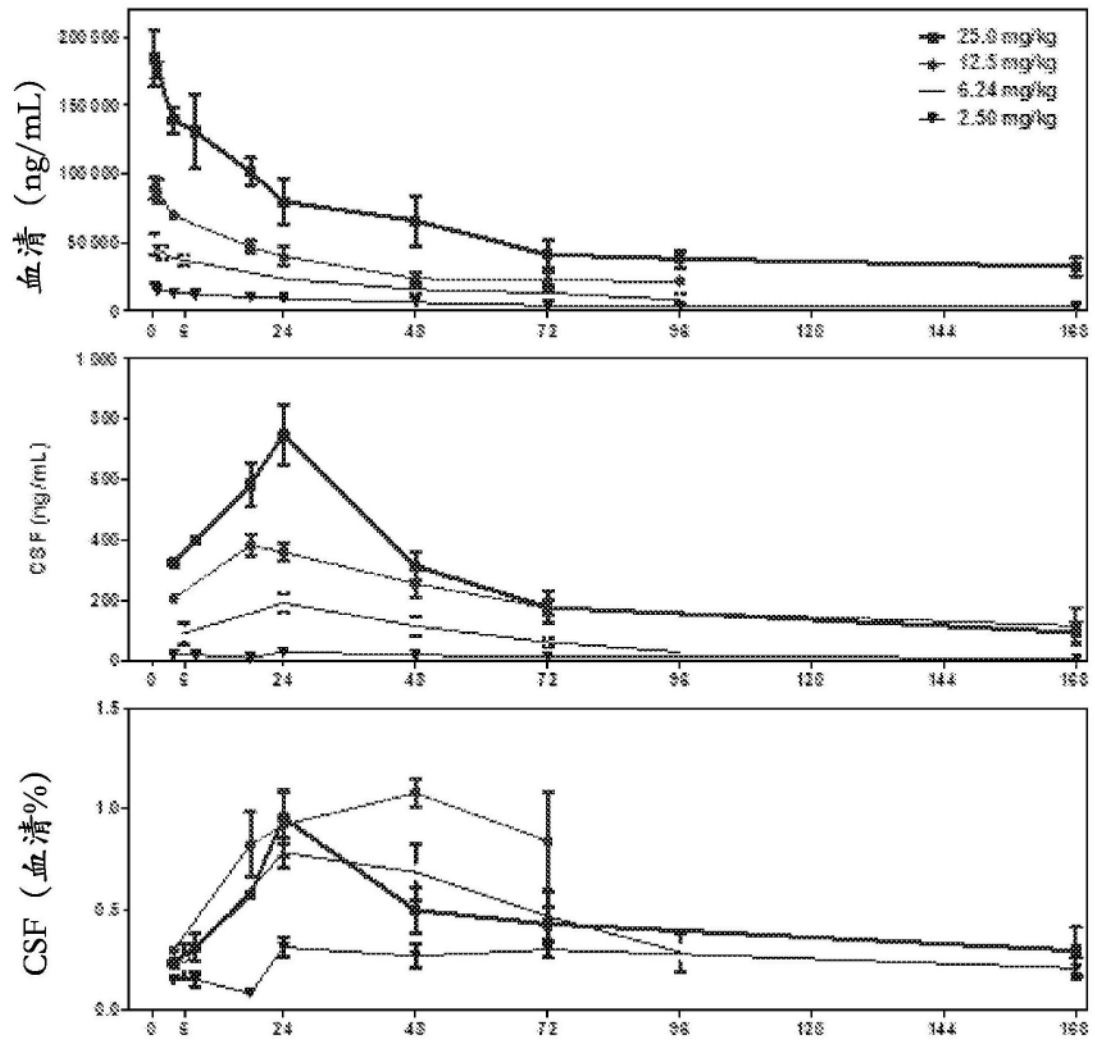


图5

静脉内注射的FC5-mFc-ABP（比格犬）的血清和CSF PK - CSF外观

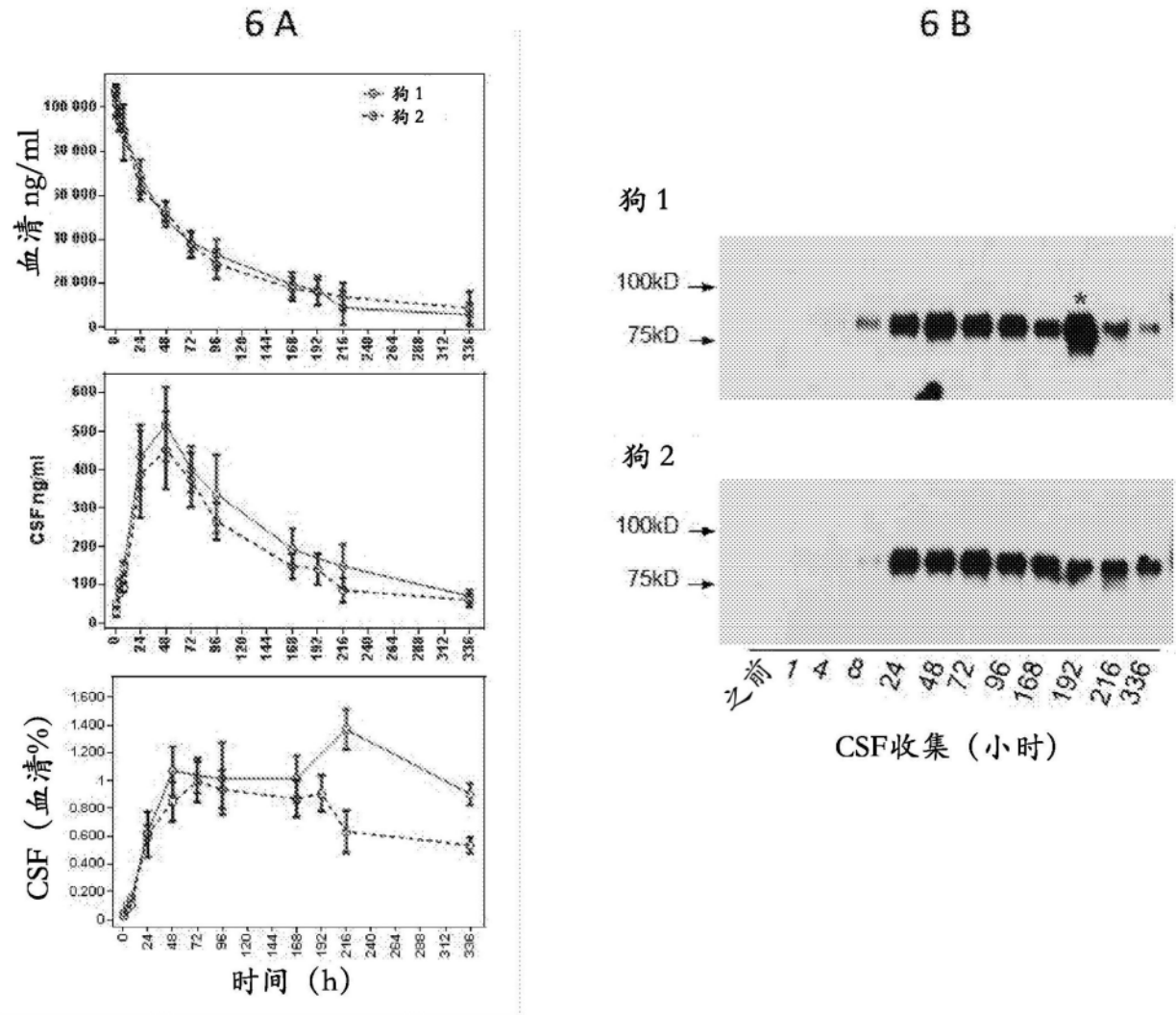


图6

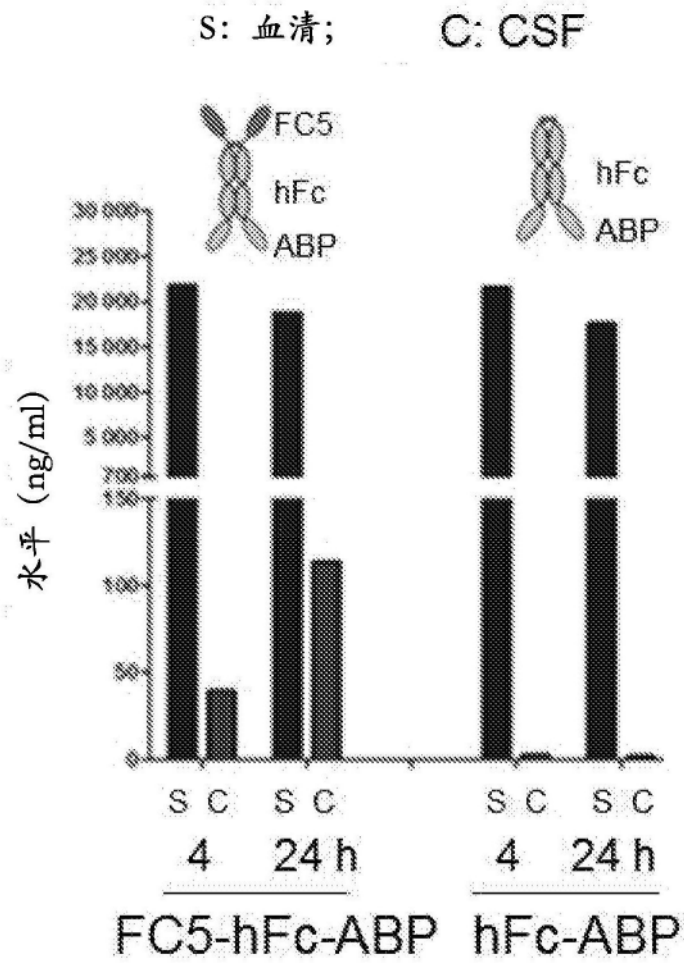


图7

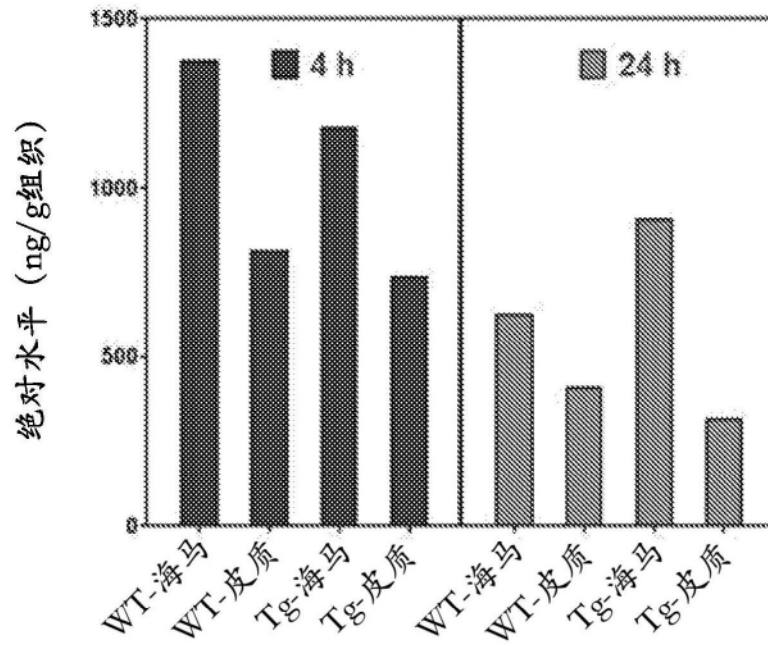


图8A

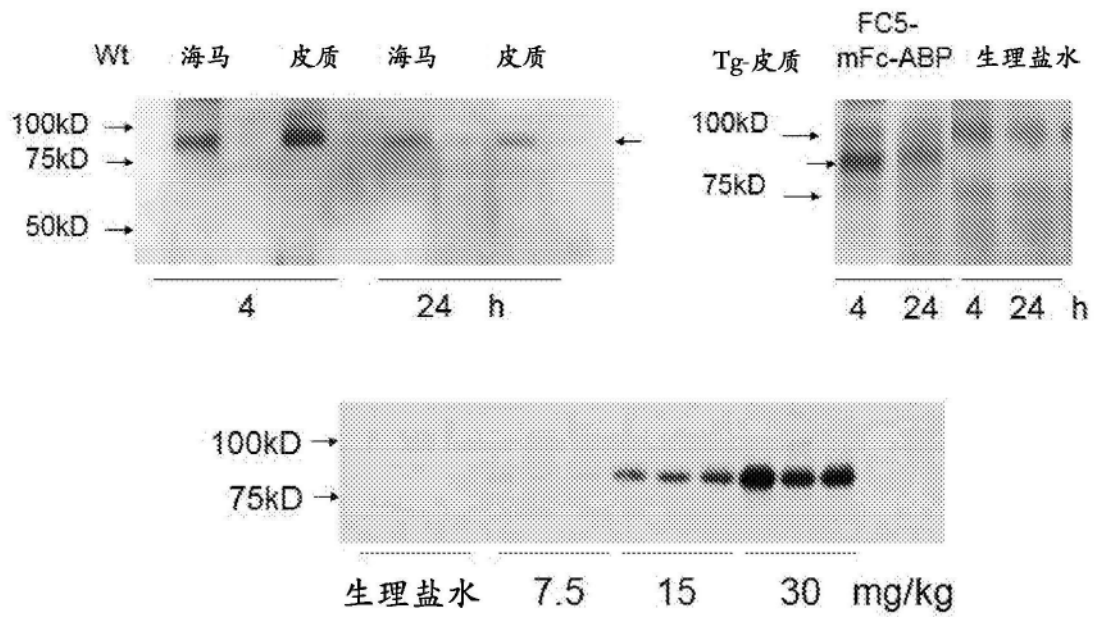


图8B

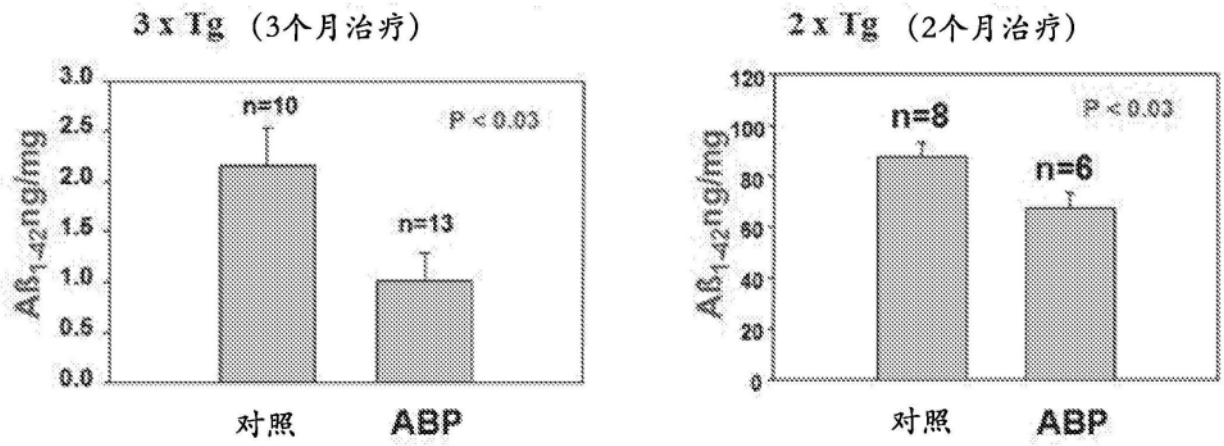


图9A

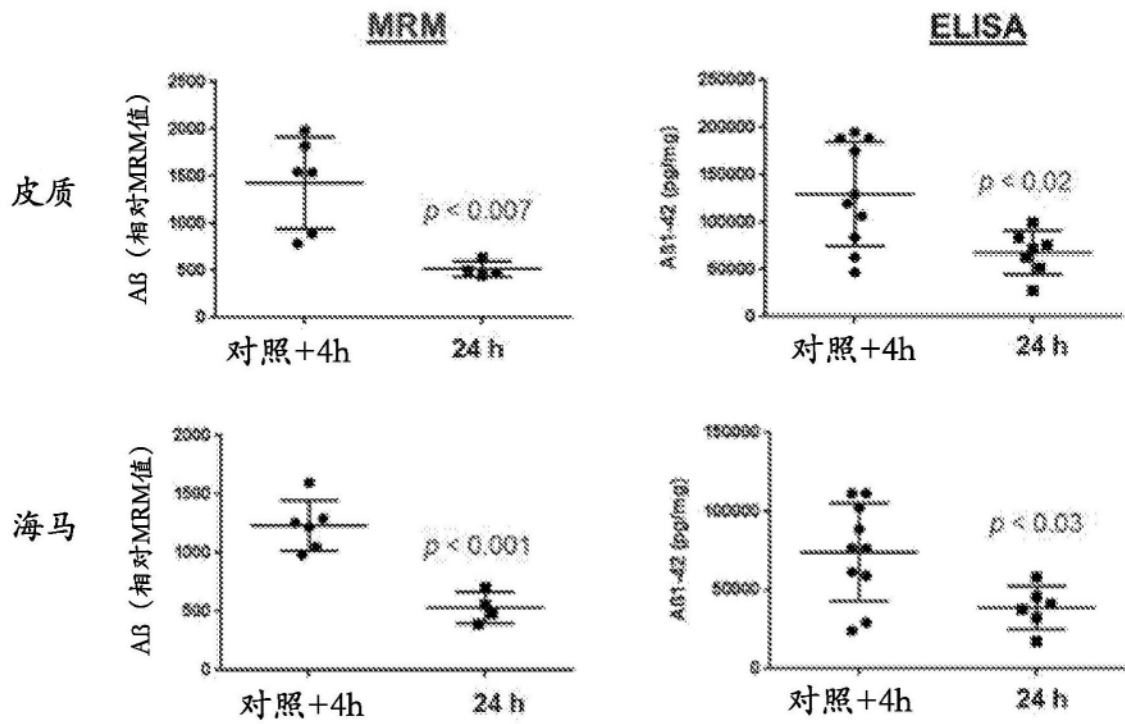


图9B

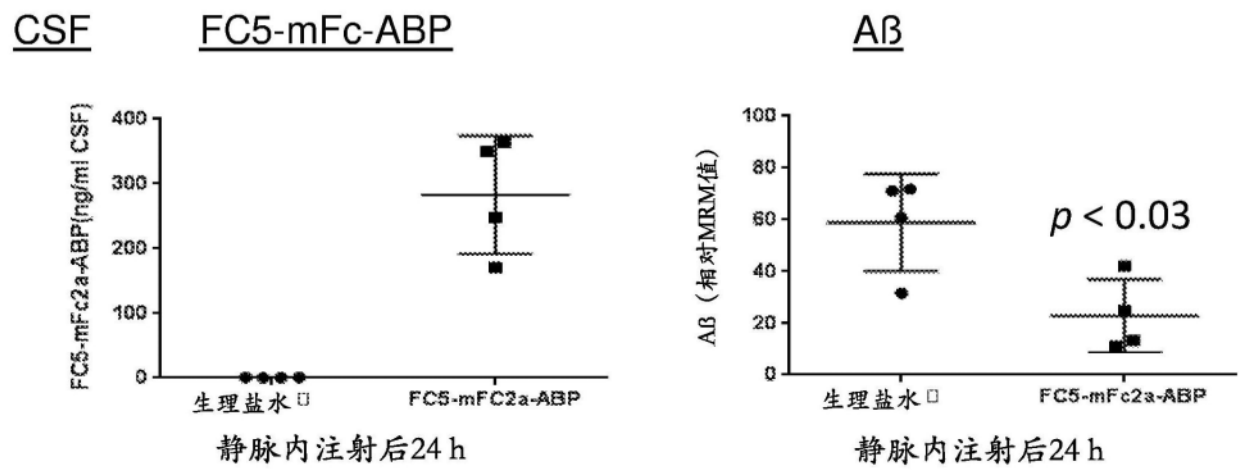
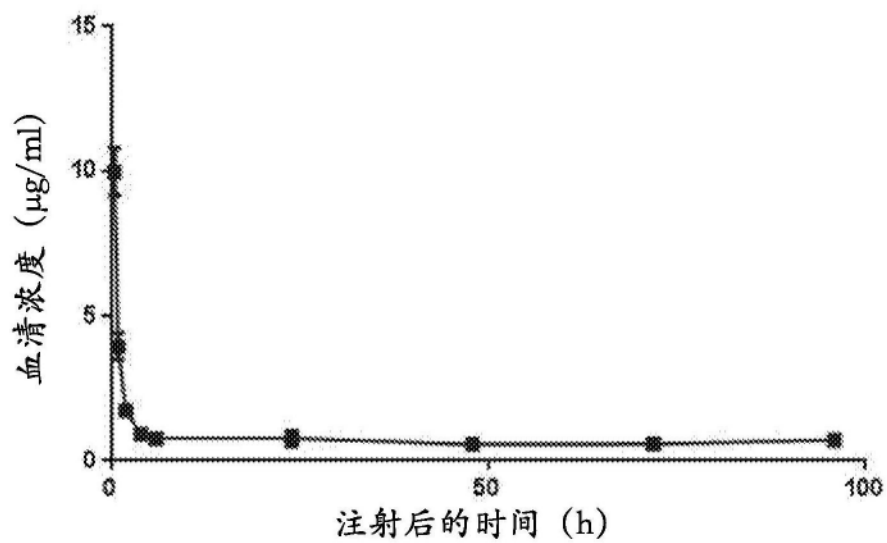


图9C

A

FC5-ABP



B

FC5-Fc-ABP

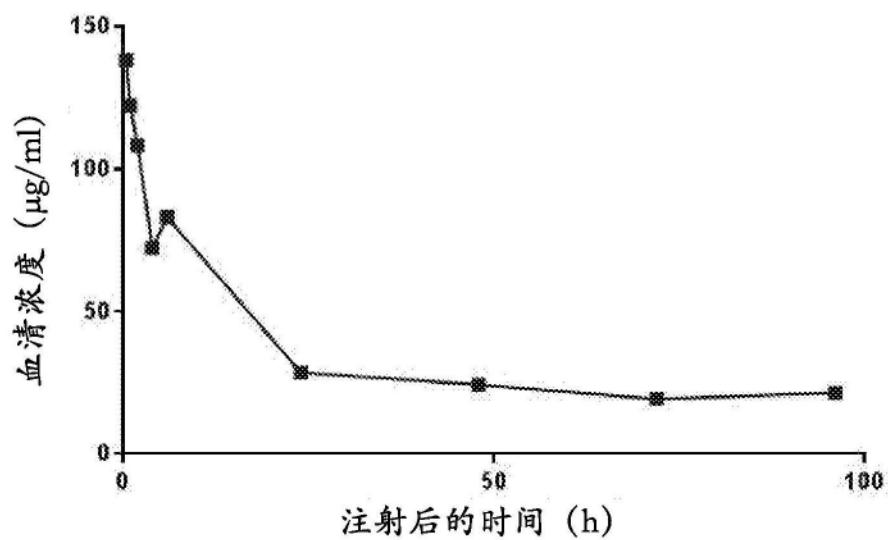


图10

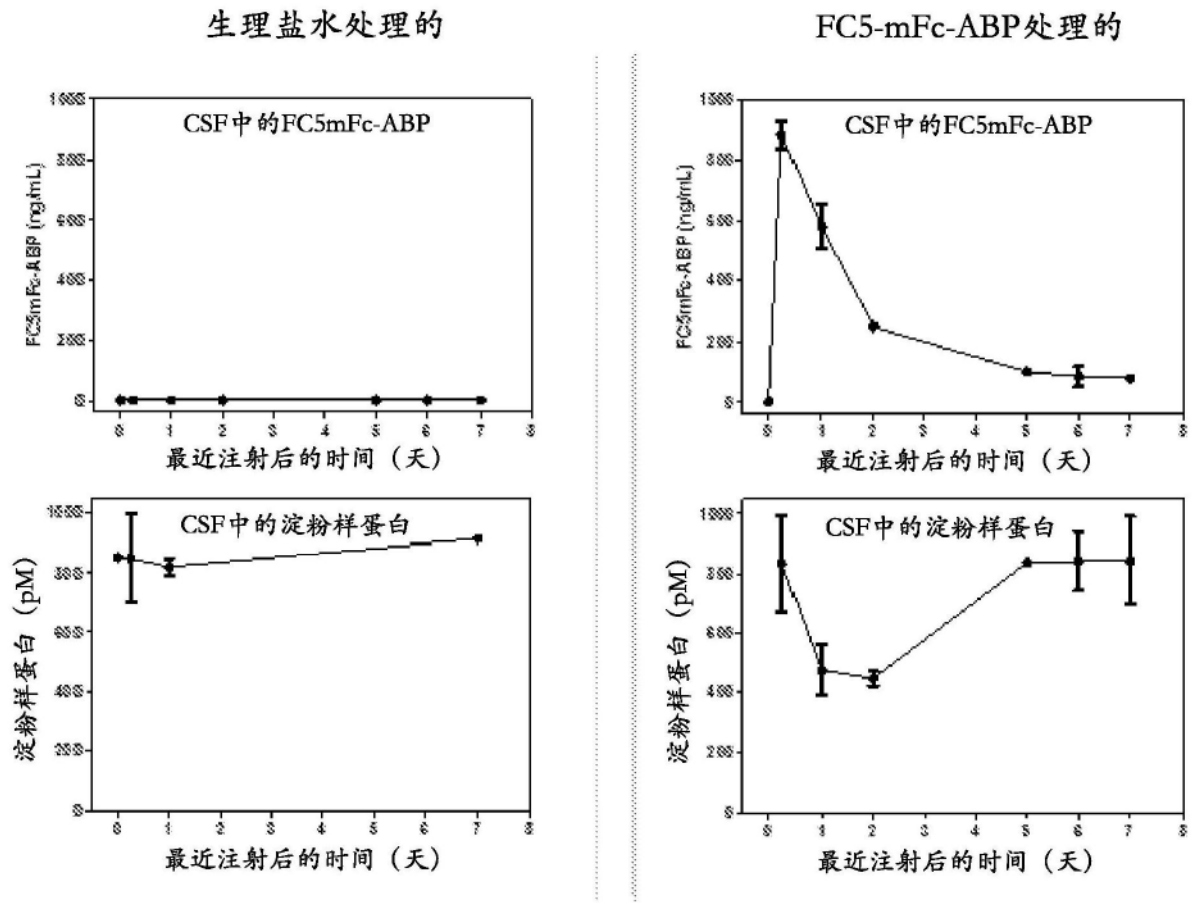


图11A

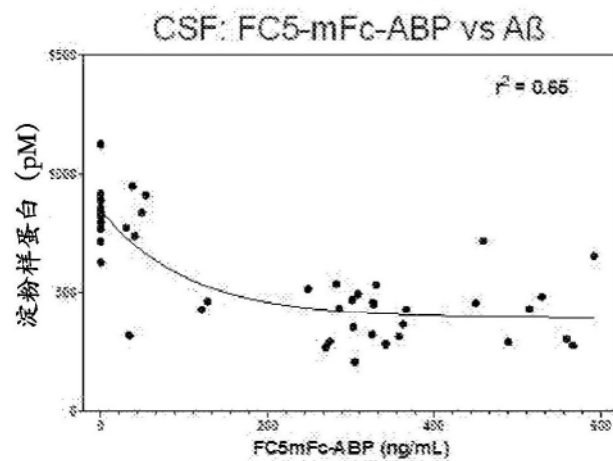


图11B

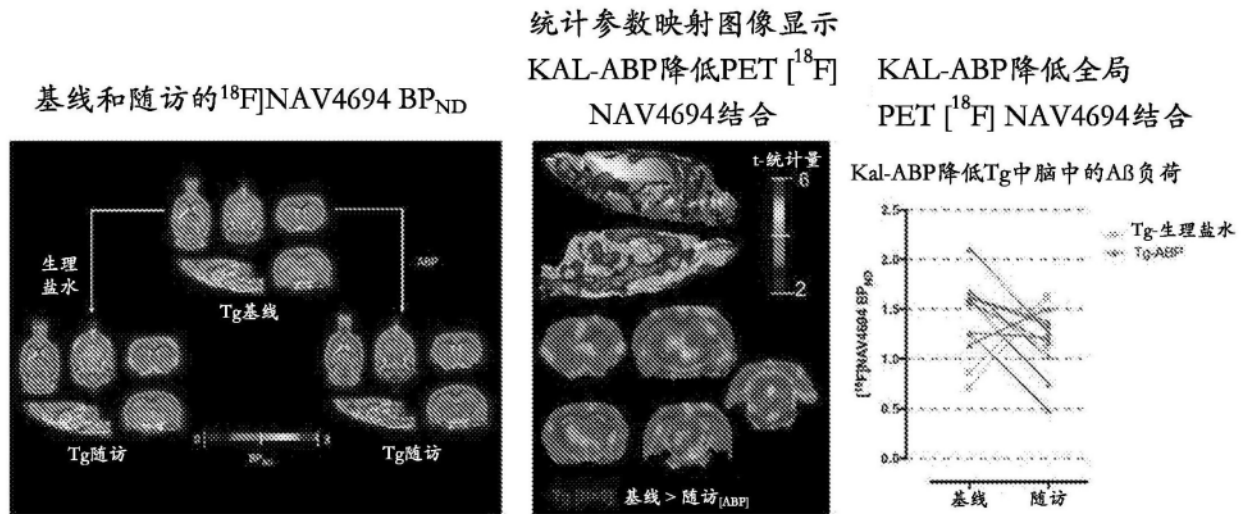


图11C

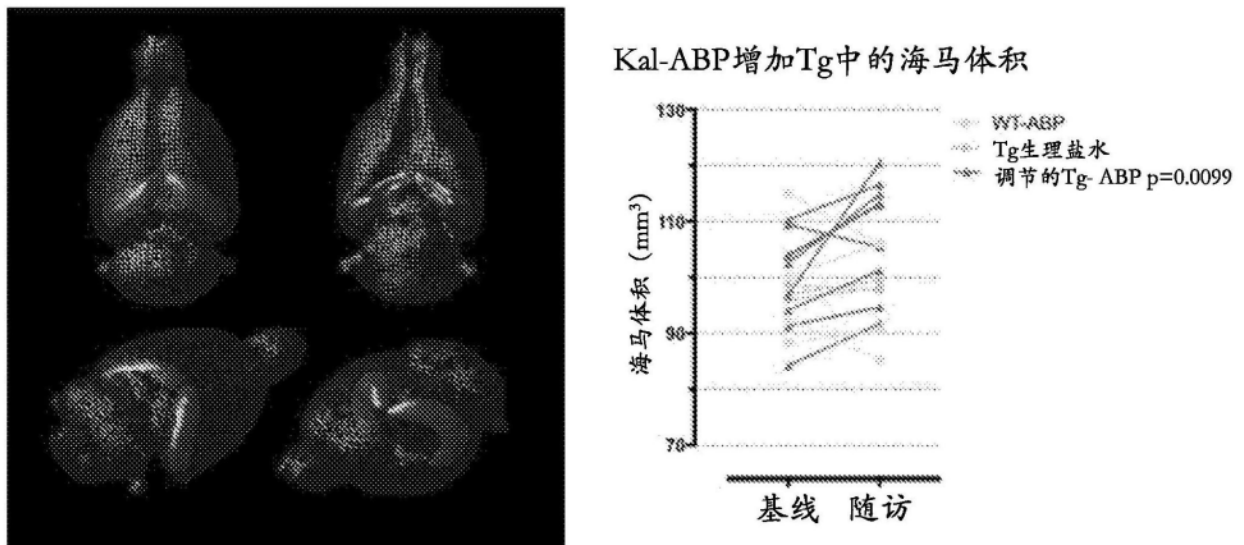


图12A

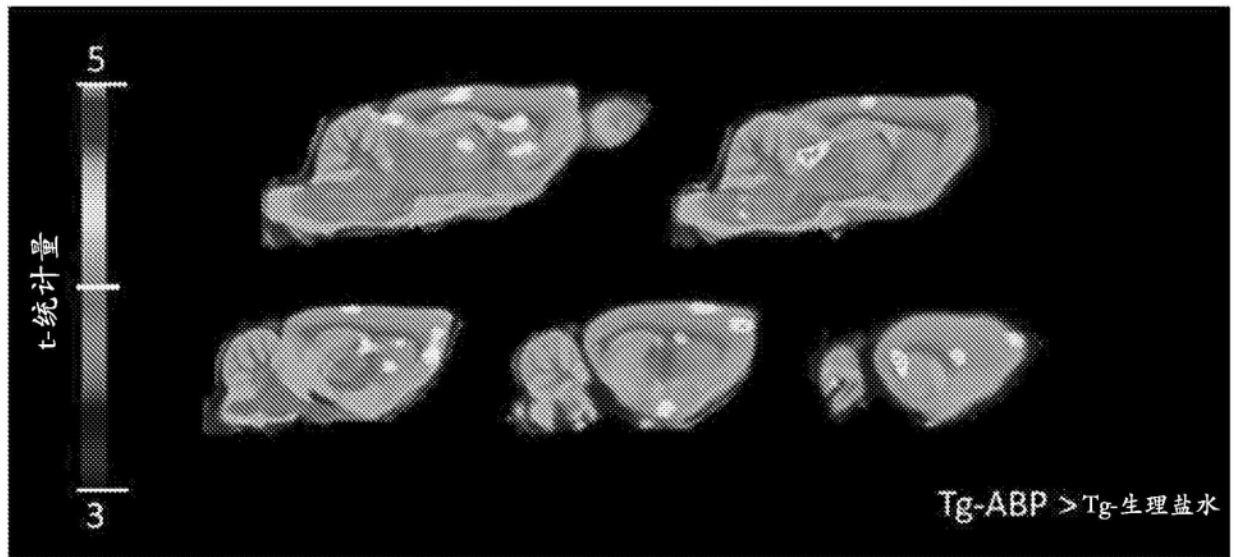


图12B

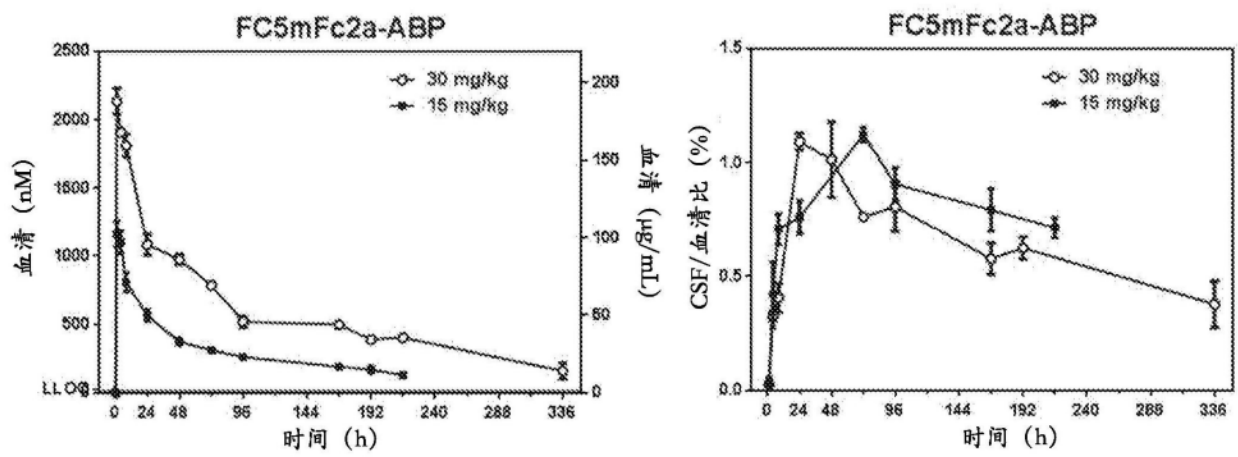


图13A

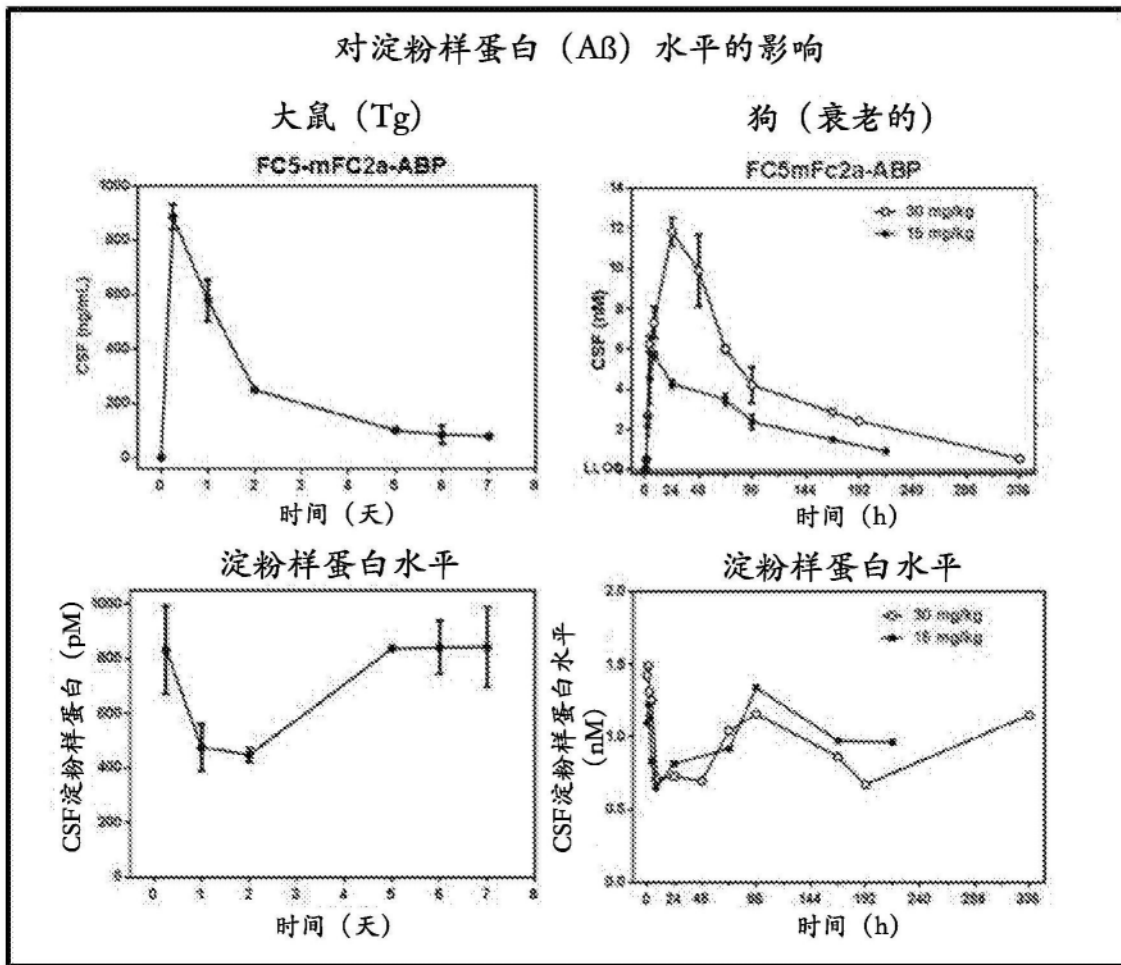


图13B

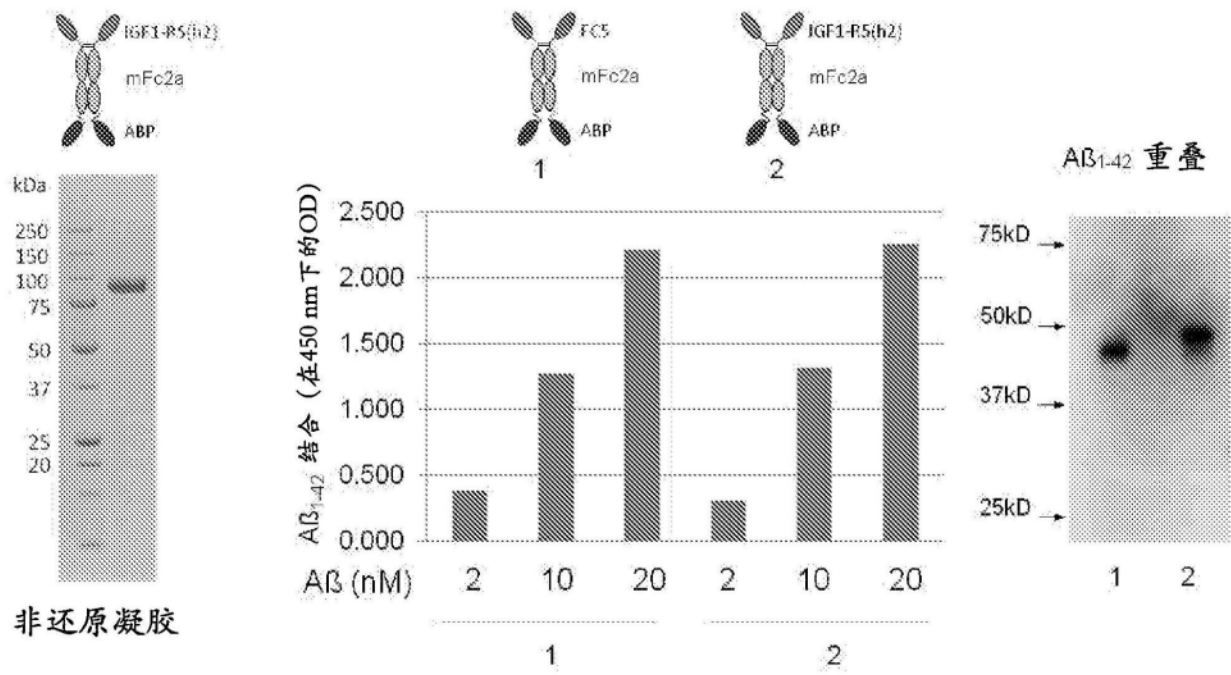


图14

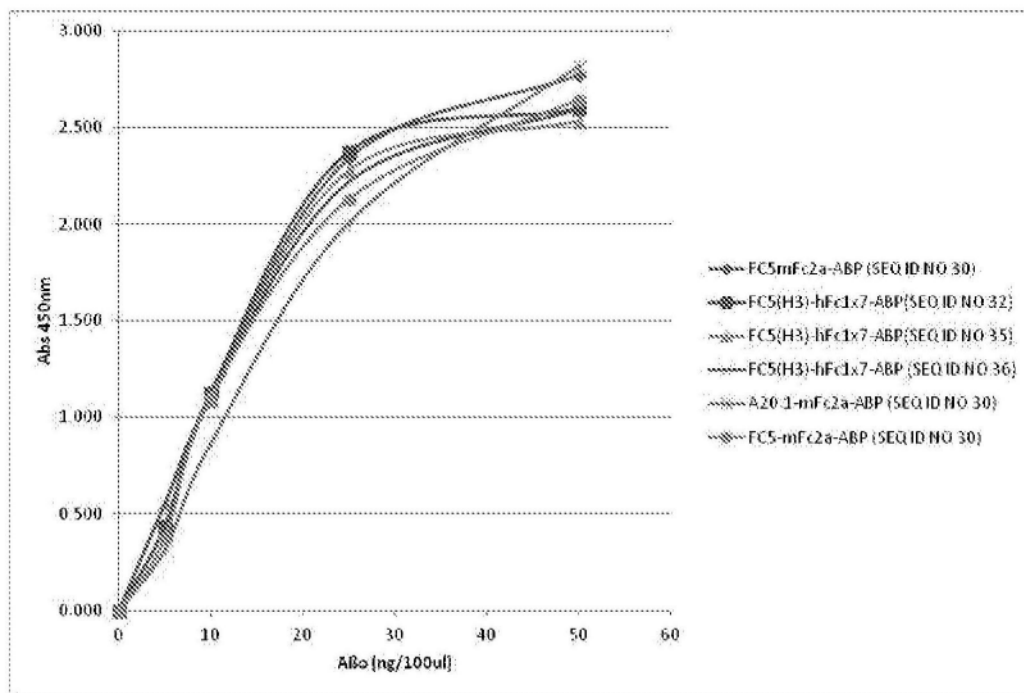


图15A

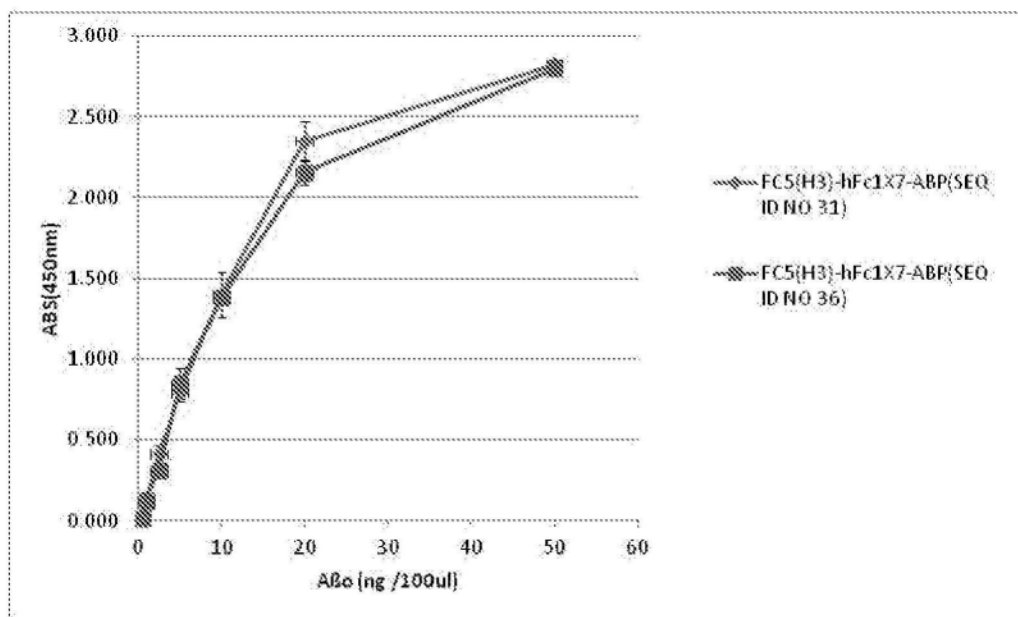


图15B

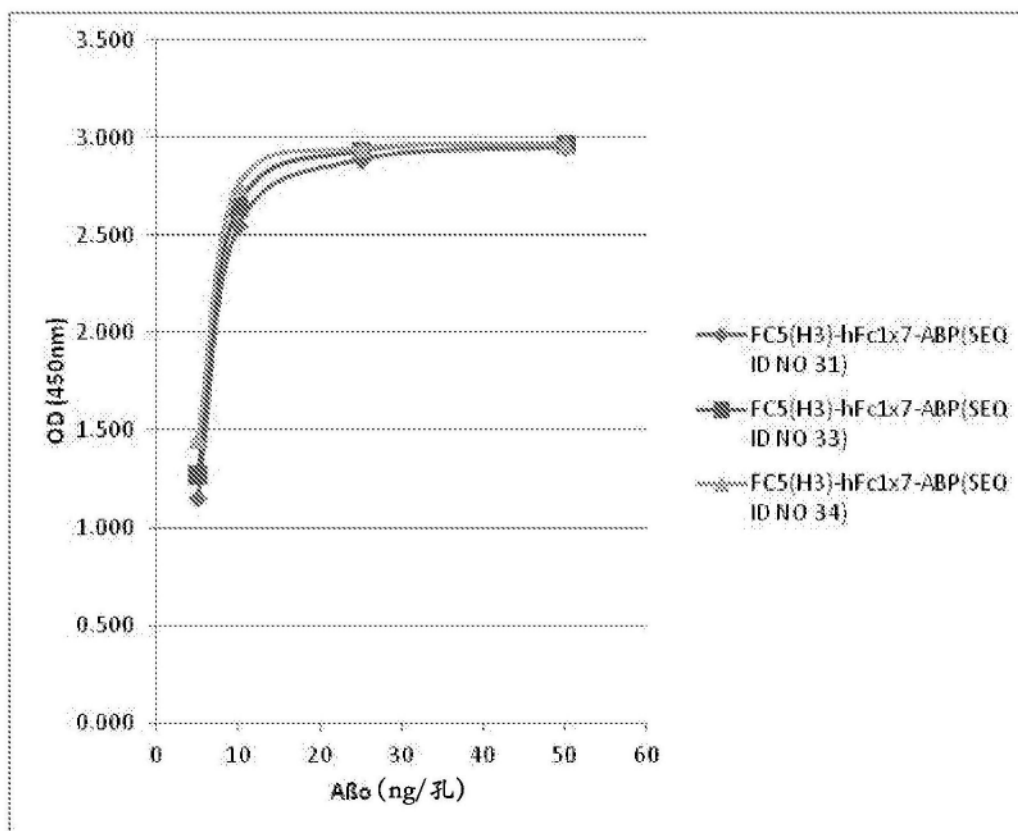
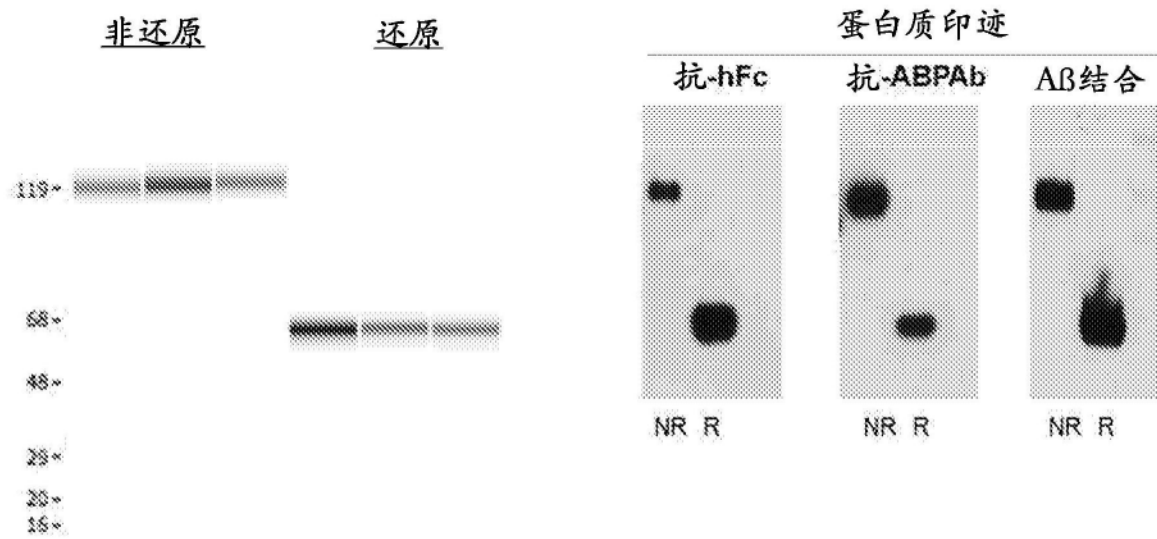


图15C

FC5(H3)-hFc1X7-ABP (ABP SEQ ID NO 35)



FC5(H3)-hFc1X7-ABP (ABP SEQ ID NO 36)

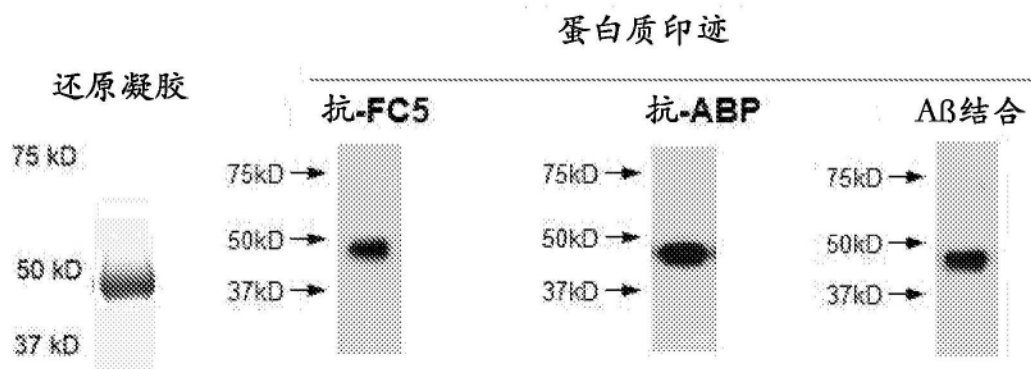


图16

每蛋白质平均Papp (平均值±SD)

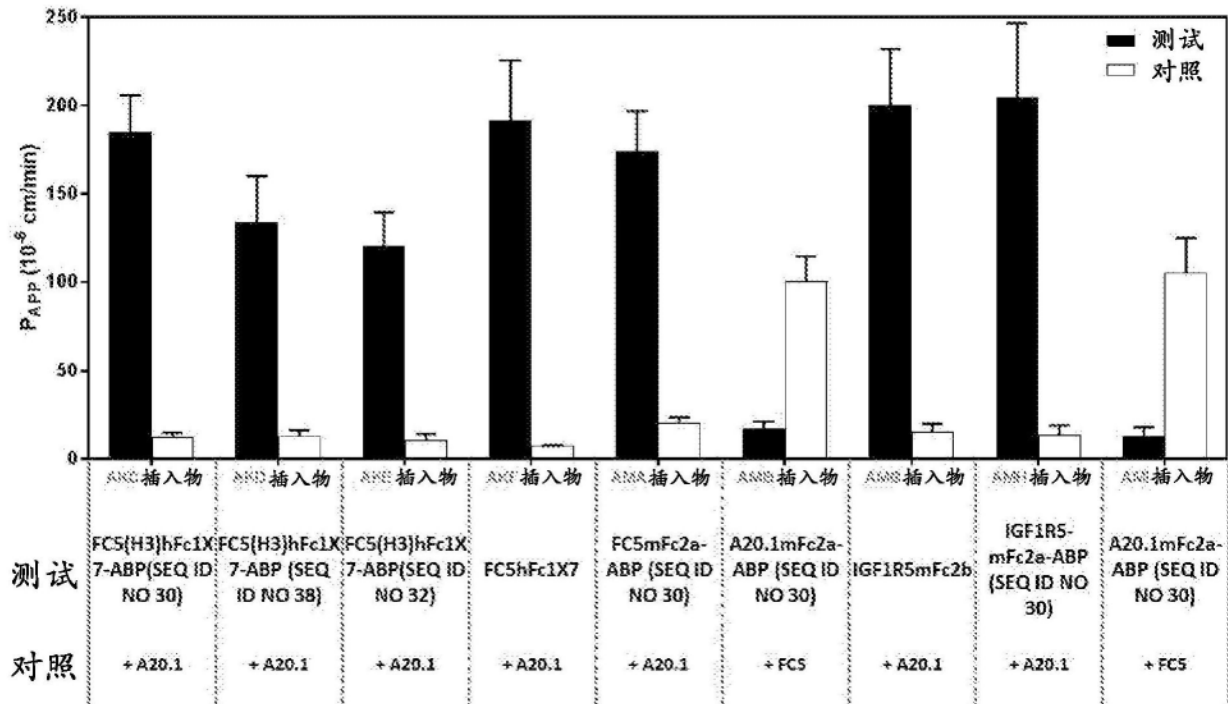


图17A

每蛋白质每插入物的平均Papp (肽的平均值±SD)

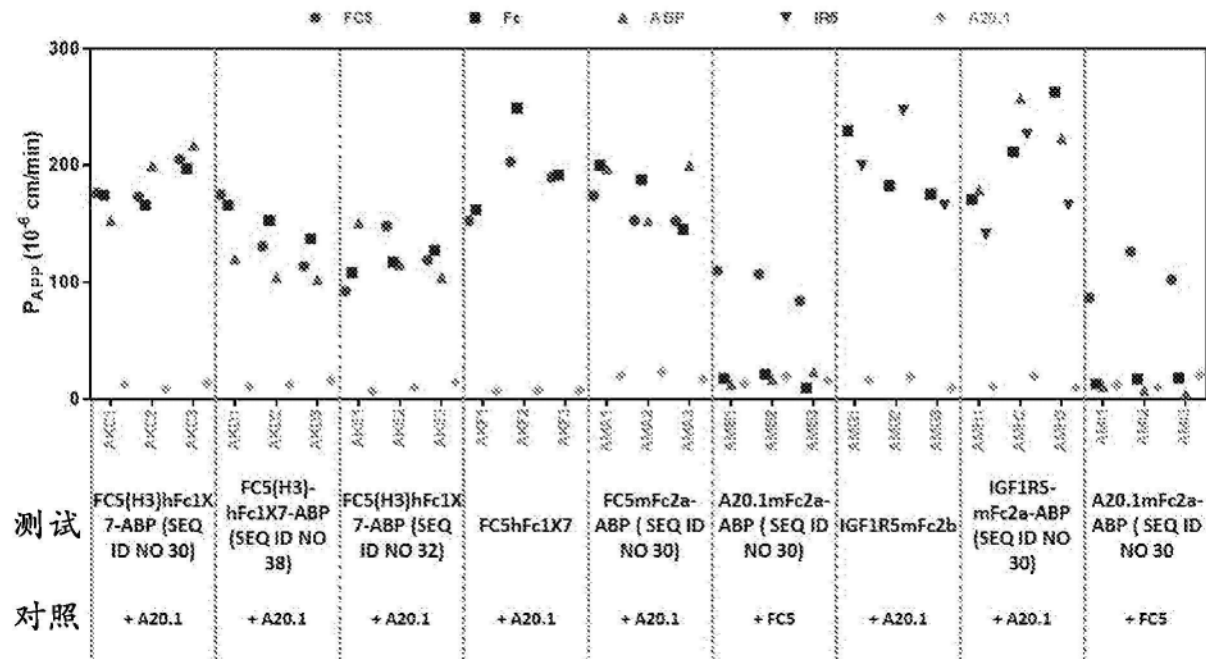


图17B

FC5(H3)-hFc-ABP完整地穿越体外大鼠BBB

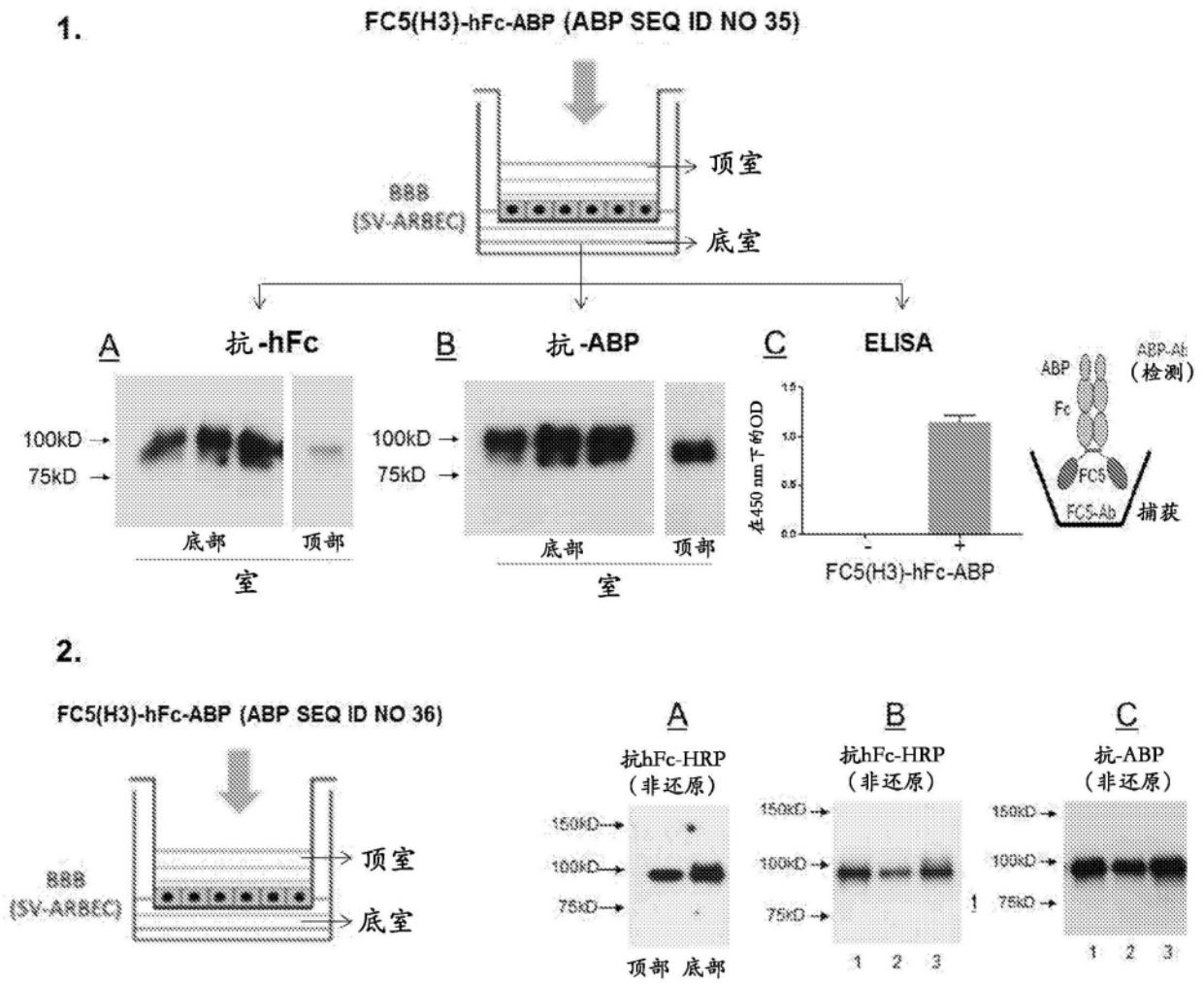
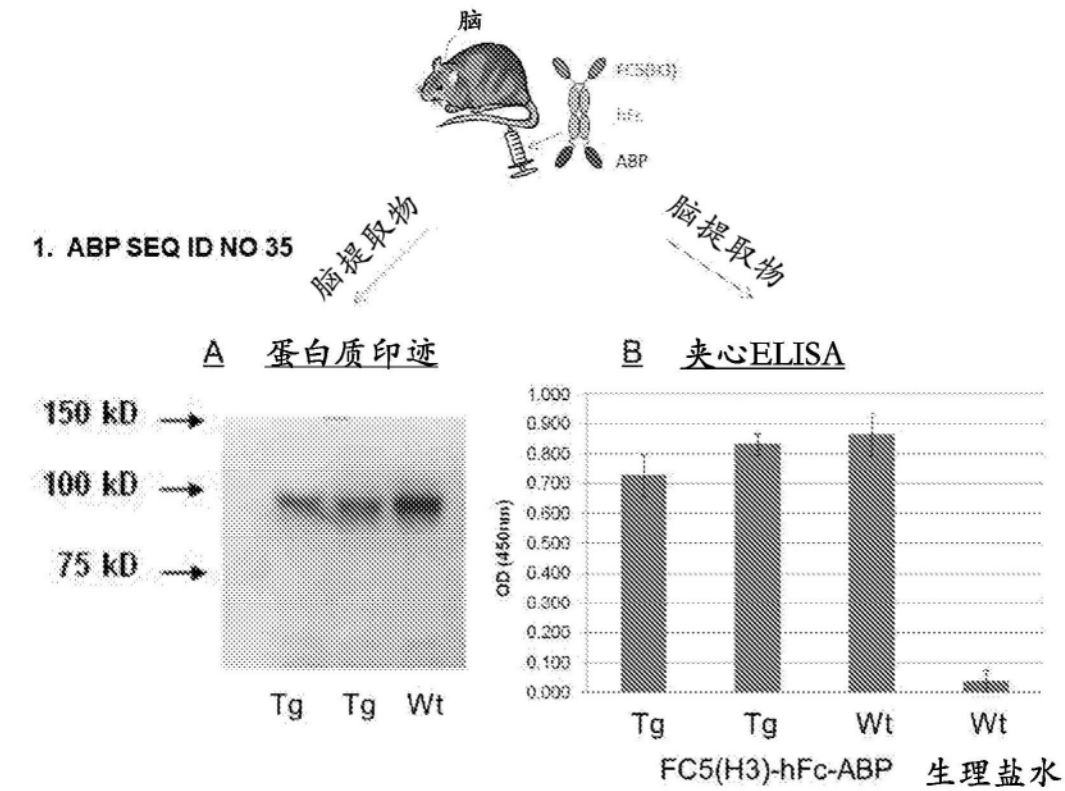


图18

FC5(H3)-hFc-ABP完整地穿越体内BBB



2. ABP SEQ ID NO 36

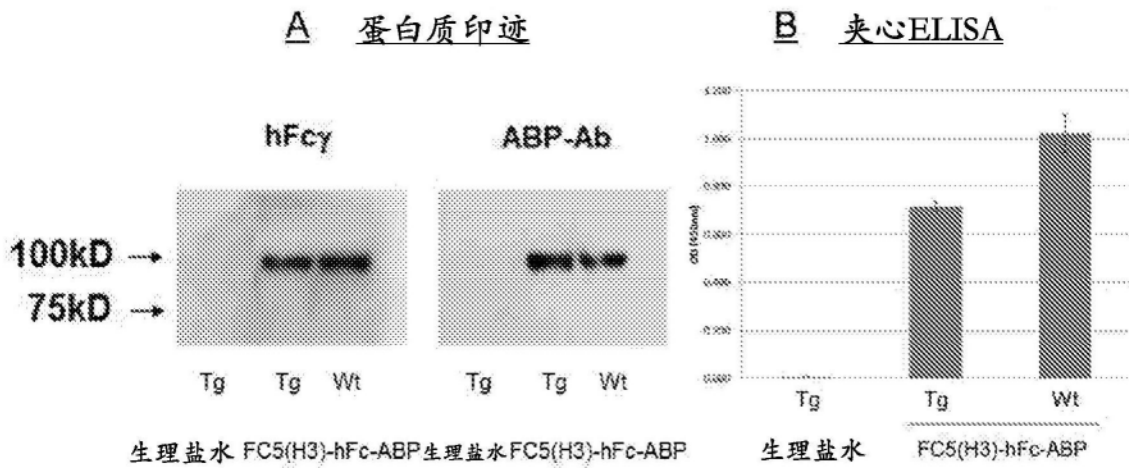
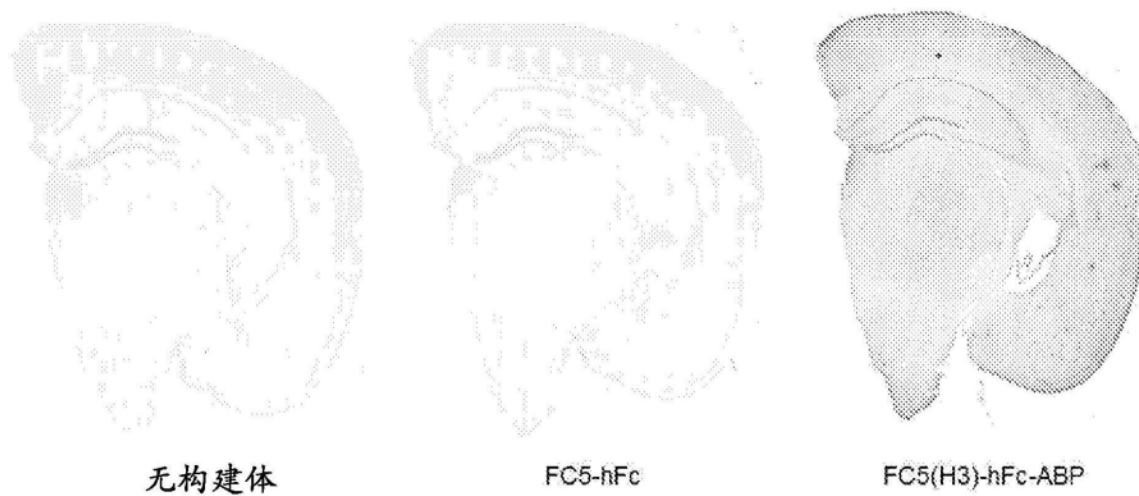


图19

A.

FC5(H3)-hFc-ABP的离体结合 (ABP SEQ ID NO 36)
(体外靶标接合)

**B.**

FC5(H3)-hFc1x7-ABP的体内结合 (ABP SEQ ID NO 36)

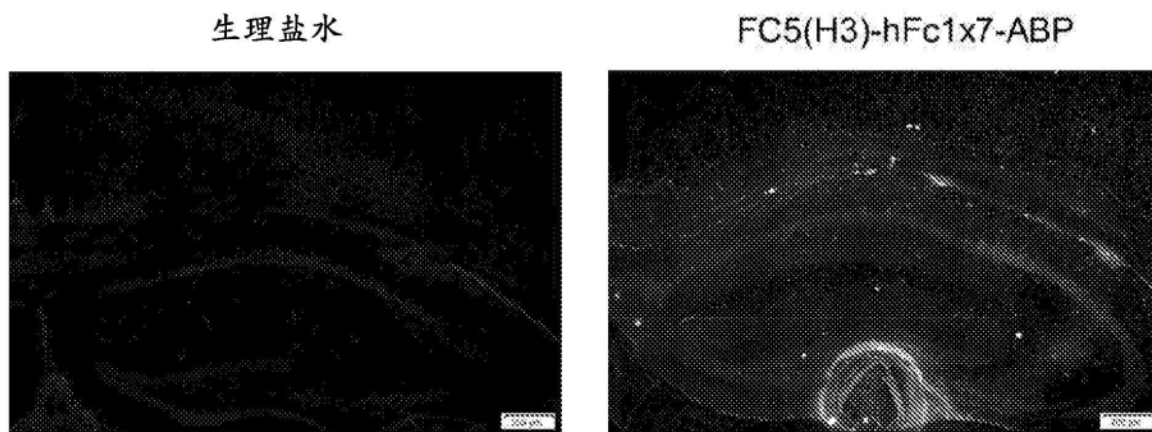


图20

通过FC5(H3)-hFc-ABP进行的体内靶标接合

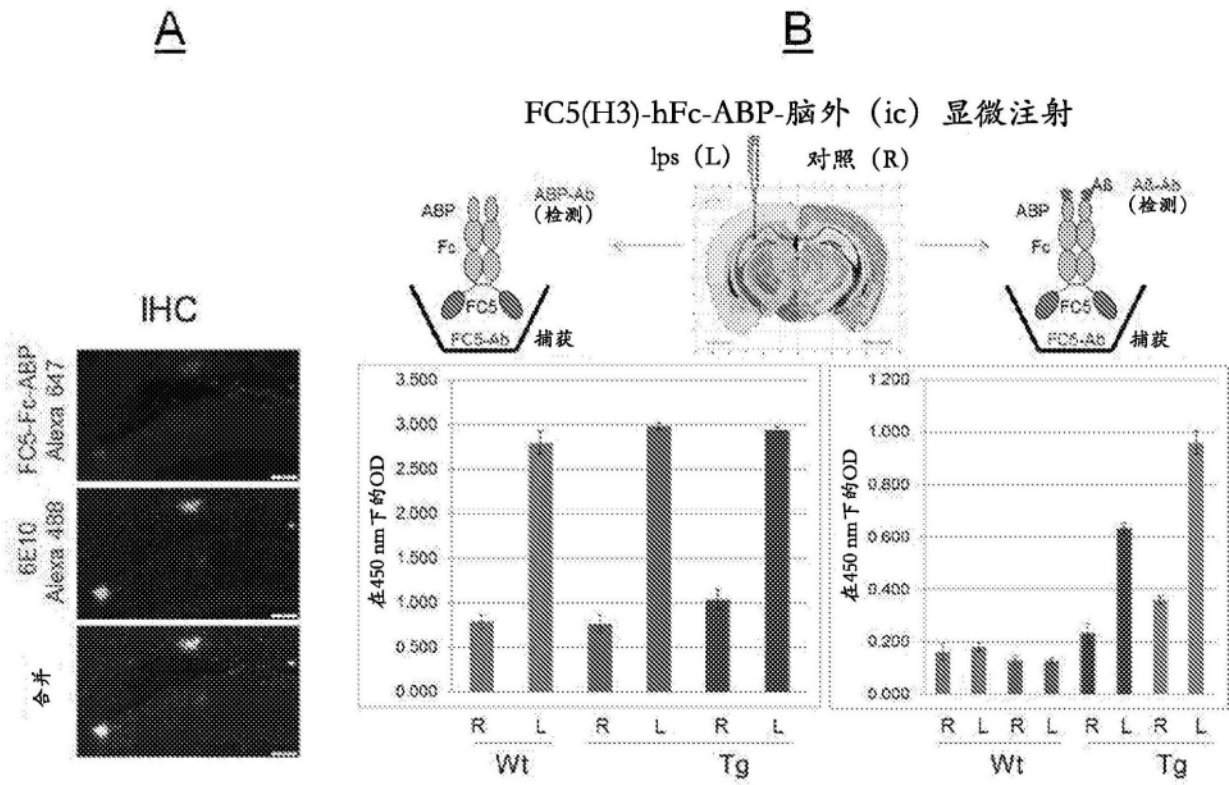


图21

非人源化与人源化FC5-Fc-ABP之间的比较

A: 大鼠中的PK研究

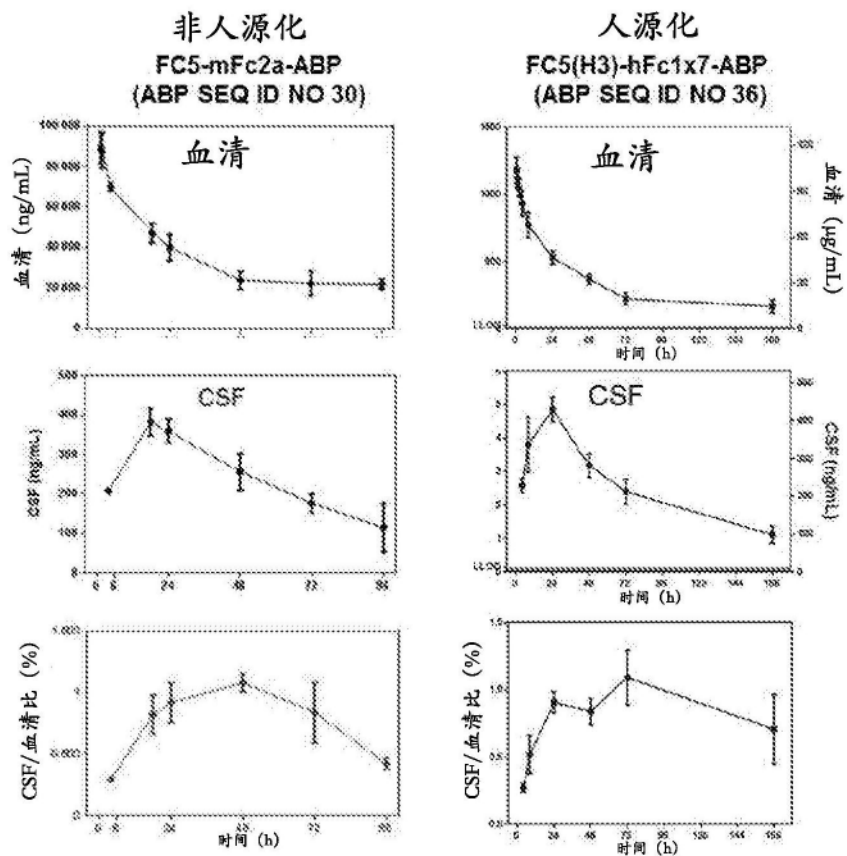


图22A

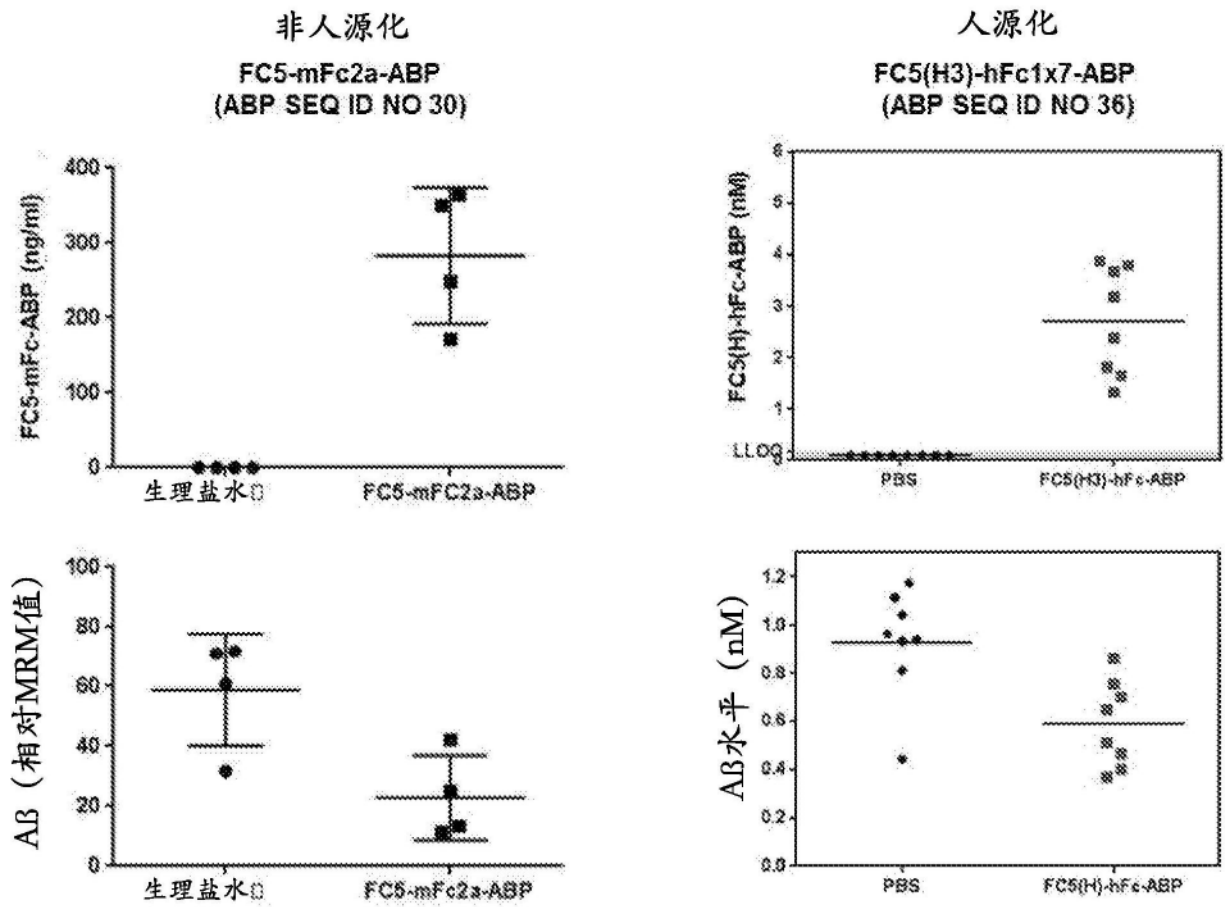
B: Tg小鼠中的PD研究

图22B