



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102300582 A

(43) 申请公布日 2011.12.28

(21) 申请号 201080005669. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010.01.29

A61K 38/17(2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 25/28(2006.01)

09151790.4 2009.01.30 EP

C07K 14/785(2006.01)

61/148,541 2009.01.30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.07.27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/SE2010/050097 2010.01.29

(87) PCT申请的公布数据

W02010/087771 EN 2010.08.05

(71) 申请人 阿尔法贝塔公司

地址 瑞典优斯宏

(72) 发明人 伊恩·约翰森

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 吴小明

权利要求书 3 页 说明书 23 页

序列表 16 页 附图 11 页

(54) 发明名称

用于治疗阿尔茨海默病的化合物和方法

(57) 摘要

本发明公开一种分离的蛋白,其选自由下列各项组成的组:(i)包含与来自哺乳动物的肺表面活性蛋白C前体(CTproSP-C,"CTC")的C端结构域具有至少70%同一性的氨基酸序列的蛋白;和(ii)包含与来自哺乳动物的CTproSP-C的Brichos结构域具有至少70%同一性的氨基酸序列的蛋白,所述分离的蛋白用于治疗包括人的哺乳动物中的阿尔茨海默病。

1. 一种分离的蛋白,其选自由下列各项组成的组:

包含与来自人 (SEQ ID NO :2),牛 (SEQ ID NO :5),恒河猴 (SEQ ID NO :6),小鼠 (SEQ ID NO :7),水貂 (SEQ ID NO :8),兔 (SEQ ID NO :9) 或大鼠 (SEQ ID NO :10) 的肺表面活性蛋白 C 前体 (CTproSP-C) 的 C 端结构域具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白,和

包含与来自人 (SEQ ID NO :4),牛 (SEQ ID NO :12),恒河猴 (SEQ ID NO :13),小鼠 (SEQ ID NO :14),水貂 (SEQ ID NO :15),兔 (SEQ ID NO :16) 或大鼠 (SEQ ID NO :17) 的 CTproSP-C 的 Brichos 结构域具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白,

所述分离的蛋白用于治疗包括人的哺乳动物中的阿尔茨海默病。

2. 按照权利要求 1 所述的分离的蛋白,其选自由包含下述氨基酸序列的蛋白组成的组,所述氨基酸序列具有:

哺乳动物 CTproSP-C 的 Brichos 结构域的所有保守残基 (SEQ ID NO :18),并且

与来自人 (SEQ ID NO :2),牛 (SEQ ID NO :5),恒河猴 (SEQ ID NO :6),小鼠 (SEQ ID NO :7),水貂 (SEQ ID NO :8),兔 (SEQ ID NO :9) 或大鼠 (SEQ ID NO :10) 的 CTproSP-C 具有至少 70% 同一性;或与来自人 (SEQ ID NO :4),牛 (SEQ ID NO :12),恒河猴 (SEQ ID NO :13),小鼠 (SEQ ID NO :14),水貂 (SEQ ID NO :15),兔 (SEQ ID NO :16) 或大鼠 (SEQ ID NO :17) 的 CTproSP-C 的 Brichos 结构域具有至少 70% 同一性。

3. 按照权利要求 2 所述的分离的蛋白,其选自由包含下述氨基酸序列的蛋白组成的组,所述氨基酸序列具有:

哺乳动物 CTproSP-C 的所有保守残基 (SEQ ID NO :11),并且

与来自人 (SEQ ID NO :2),牛 (SEQ ID NO :5),恒河猴 (SEQ ID NO :6),小鼠 (SEQ ID NO :7),水貂 (SEQ ID NO :8),兔 (SEQ ID NO :9) 或大鼠 (SEQ ID NO :10) 的 CTproSP-C 具有至少 70% 同一性。

4. 按照权利要求 1-3 中任一项所述的分离的蛋白,其选自由下列各项组成的组:

包含与人 CTproSP-C (SEQ ID NO :2) 具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白,和

包含与人 CTproSP-C 的 Brichos 结构域 (SEQ ID NO :4) 具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白。

5. 按照权利要求 1-4 中任一项所述的分离的蛋白,其由少于或等于 200 个氨基酸残基组成。

6. 按照权利要求 5 所述的分离的蛋白,其由少于或等于 150 个氨基酸残基组成。

7. 按照权利要求 1-6 中任一项所述的分离的蛋白,其由多于或等于 90 个氨基酸残基组成。

8. 按照权利要求 7 所述的分离的蛋白,其由多于或等于 100 个氨基酸残基组成。

9. 按照权利要求 1-8 中任一项所述的分离的蛋白,其选自由下列各项组成的组:

来自人 (SEQ ID NO :2),牛 (SEQ ID NO :5),恒河猴 (SEQ ID NO :6),小鼠 (SEQ ID NO :7),水貂 (SEQ ID NO :8),兔 (SEQ ID NO :9) 或大鼠 (SEQ ID NO :10) 的 CTproSP-C,

来自人 (SEQ ID NO :4),牛 (SEQ ID NO :12),恒河猴 (SEQ ID NO :13),小鼠 (SEQ ID NO :14),水貂 (SEQ ID NO :15),兔 (SEQ ID NO :16) 或大鼠 (SEQ ID NO :17) 的 CTproSP-C 的 Brichos 结构域,和

来自人的 CTproSP-C 的延长的 Brichos 结构域,所述延长的 Brichos 结构域具有 SEQ

ID NO :21。

10. 按照权利要求 9 所述的分离的蛋白,其选自由下列各项组成的组:人 CTproSP-C(SEQ ID NO :2),人 CTproSP-C 的 Brichos 结构域 (SEQ ID NO :4),和具有 SEQ ID NO :21 的人 CTproSP-C 的延长的 Brichos 结构域。

11. 按照前述权利要求中任一项所述的分离的蛋白,其中与人 proSP-C(SEQ ID NO :1) 中亮氨酸-188 相对应的位置不是谷氨酰胺。

12. 按照权利要求 11 所述的分离的蛋白,其中与人 proSP-C(SEQ ID NO :1) 中亮氨酸-188 相对应的位置是严格保守的。

13. 一种药物组合物,其包括治疗有效量的权利要求 1-12 中任一项所述的分离的蛋白,和对其适合的药用载体,所述药物组合物用于治疗包括人的哺乳动物中的阿尔茨海默病。

14. 治疗在需要其的哺乳动物中的阿尔茨海默病的方法,所述哺乳动物包括人,所述方法包括给所述哺乳动物施用治疗有效量的权利要求 1-12 中任一项所述的分离的蛋白或权利要求 13 所述的药物组合物。

15. 按照权利要求 14 所述的方法,其中所述治疗选自由预防治疗、减轻治疗和治愈治疗组成的组。

16. 权利要求 1-12 中任一项所述的分离的蛋白用于制备用于治疗包括人的哺乳动物中的阿尔茨海默病的药物的应用。

17. 一种由少于或等于 150 个氨基酸残基组成的分离的蛋白,其选自由下列各项组成的组:

包含与来自人 (SEQ ID NO :2),牛 (SEQ ID NO :5),恒河猴 (SEQ ID NO :6),小鼠 (SEQ ID NO :7),水貂 (SEQ ID NO :8),兔 (SEQ ID NO :9) 或大鼠 (SEQ ID NO :10) 的肺表面活性蛋白 C 前体 (CTproSP-C) 的 C 端结构域具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白,和

包含与来自人 (SEQ ID NO :4),牛 (SEQ ID NO :12),恒河猴 (SEQ ID NO :13),小鼠 (SEQ ID NO :14),水貂 (SEQ ID NO :15),兔 (SEQ ID NO :16) 或大鼠 (SEQ ID NO :17) 的 CTproSP-C 的 Brichos 结构域具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白,所述分离的蛋白用作药物。

18. 按照权利要求 17 所述的分离的蛋白,其选自由包含下述氨基酸序列的蛋白组成的组,所述氨基酸序列具有:

哺乳动物 CTproSP-C 的 Brichos 结构域的所有保守残基 (SEQ ID NO :18),并且

与来自人 (SEQ ID NO :2),牛 (SEQ ID NO :5),恒河猴 (SEQ ID NO :6),小鼠 (SEQ ID NO :7),水貂 (SEQ ID NO :8),兔 (SEQ ID NO :9) 或大鼠 (SEQ ID NO :10) 的 CTproSP-C 具有至少 70% 同一性;或与来自人 (SEQ ID NO :4),牛 (SEQ ID NO :12),恒河猴 (SEQ ID NO :13),小鼠 (SEQ ID NO :14),水貂 (SEQ ID NO :15),兔 (SEQ ID NO :16) 或大鼠 (SEQ ID NO :17) 的 CTproSP-C 的 Brichos 结构域具有至少 70% 同一性。

19. 按照权利要求 18 所述的分离的蛋白,其选自由包含下述氨基酸序列的蛋白组成的组,所述氨基酸序列具有:

哺乳动物 CTproSP-C 的所有保守残基 (SEQ ID NO :11),并且

与来自人 (SEQ ID NO :2),牛 (SEQ ID NO :5),恒河猴 (SEQ ID NO :6),小鼠 (SEQ ID NO :7),水貂 (SEQ ID NO :8),兔 (SEQ ID NO :9) 或大鼠 (SEQ ID NO :10) 的 CTproSP-C 具有

至少 70% 同一性。

20. 按照权利要求 17-19 中任一项所述的分离的蛋白,其选自由下列各项组成的组:包含与人 CTproSP-C(SEQ ID NO:2) 具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白,和包含与人 CTproSP-C 的 Brichos 结构域 (SEQ ID NO:4) 具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白。

21. 按照权利要求 17-20 中任一项所述的分离的蛋白,其由多于或等于 90 个氨基酸残基组成。

22. 按照权利要求 21 所述的分离的蛋白,其由多于或等于 100 个氨基酸残基组成。

23. 按照权利要求 17-22 中任一项所述的分离的蛋白,其选自由下列各项组成的组:来自人 (SEQ ID NO:2),牛 (SEQ ID NO:5),恒河猴 (SEQ ID NO:6),小鼠 (SEQ ID NO:7),水貂 (SEQ ID NO:8),兔 (SEQ ID NO:9) 或大鼠 (SEQ ID NO:10) 的 CTproSP-C,

来自人 (SEQ ID NO:4),牛 (SEQ ID NO:12),恒河猴 (SEQ ID NO:13),小鼠 (SEQ ID NO:14),水貂 (SEQ ID NO:15),兔 (SEQ ID NO:16) 或大鼠 (SEQ ID NO:17) 的 CTproSP-C 的 Brichos 结构域,和

来自人的 CTproSP-C 的延长的 Brichos 结构域,所述延长的 Brichos 结构域具有 SEQ ID NO:21。

24. 按照权利要求 23 所述的分离的蛋白,其选自由下列各项组成的组:人 CTproSP-C(SEQ ID NO:2),人 CTproSP-C 的 Brichos 结构域 (SEQ ID NO:4),和具有 SEQ ID NO:21 的人 CTproSP-C 的延长的 Brichos 结构域。

25. 按照权利要求 17-24 中任一项所述的分离的蛋白,其中与人 proSP-C(SEQ ID NO:1) 中亮氨酸 -188 相对应的位置不是谷氨酰胺。

26. 按照权利要求 25 所述的分离的蛋白,其中与人 proSP-C(SEQ ID NO:1) 中亮氨酸 -188 相对应的位置是严格保守的。

27. 一种药物组合物,其包括治疗有效量的权利要求 17-26 中任一项所述的分离的蛋白和对其适合的药用载体。

用于治疗阿尔茨海默病的化合物和方法

发明领域

[0001] 本发明属于医药领域。更具体地,本发明涉及用于治疗哺乳动物(诸如人)中的阿尔茨海默病的药物和医学治疗。

[0002] 发明背景

[0003] 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)是人类中痴呆的一种最常见的原因。其是一种与患有该病的个体的脑中的神经细胞变性相关的慢性致死性疾病,其特征在于,存在由淀粉状蛋白 β 肽($A\beta$ -肽)的胞外沉积物组成的淀粉状蛋白斑。由 $A\beta$ 聚集引起的神经细胞萎缩导致乙酰胆碱和其它信号传导物质的匮乏。已知 $A\beta$ -肽,具有40-42个氨基酸残基,由淀粉状蛋白前体蛋白(APP)的加工产生,所述淀粉状蛋白前体蛋白(APP)是一种主要由中枢神经系统的神经元表达的膜蛋白,但是不完全了解关于这种加工的原因。释放的 $A\beta$ 肽包含APP跨膜区的一部分($A\beta$ 残基29-40/42),并且包括不一致的螺旋,即,由具有形成 β -链的高度倾向的氨基酸组成的螺旋。当离开其稳定的膜环境时, $A\beta$ 倾向于错误折叠和聚集。

[0004] 目前用于治疗阿尔茨海默病的治疗方法主要是涉及治疗症状,并且包括胆碱能替换治疗,例如,抑制乙酰胆碱酯酶,与可溶的 $A\beta$ 低聚物相互作用的小抑制剂,和防止已经形成的 β -折叠结构延长的所谓的 β -折叠中断剂(breaker)。

[0005] 另一种提议的防止聚集的策略已经利用功能上定义为蛋白伴侣的分子。蛋白伴侣通过在复杂的细胞内环境中辅助蛋白正确折叠而起重要作用。多种分子伴侣,诸如热激蛋白(Hsp),已知在折叠过程中是重要的,并且已被广泛研究。这些蛋白伴侣中的一些显然能够与某些多肽的淀粉状蛋白原纤维形成相互作用并且对某些多肽的淀粉状蛋白原纤维形成有影响。 $A\beta_{1-42}$ 的聚集被Hsp90或Hsp70/Hsp40组合抑制(CG Evans等,J Biol Chem(生物化学杂志)281:33182-33191,2006)。此外,已经表明细胞外蛋白伴侣簇蛋白(脱脂载脂蛋白J)抑制包括 $A\beta$ (E Matsubara等,Biochem J(生物化学杂志)316(Pt 2):671-679,1996)和朊病毒蛋白的片段(S McHattie和N Edington,Biochem Biophys Res Commun(生物化学生物物理学研究通讯)259:336-340,1999)的多种多肽的原纤维形成。结构多样的蛋白伴侣在预防淀粉状蛋白病中的作用并不确定,并且一些报道甚至表明蛋白伴侣促进淀粉状蛋白原纤维形成,参见,例如,SK DeBburman等.Proc NatAcad Sci USA(美国国家科学院学报)94:13938-13943,1997。除了分子蛋白伴侣,在错配疾病的情形中已经研究了化学和药学蛋白伴侣的作用。目前,对于任何淀粉状蛋白疾病尚未找到使用蛋白伴侣或其它方式的有效治疗。

[0006] 针对 $A\beta$ 肽的单克隆抗体防止聚集成神经毒性原纤维,并且溶解已经形成的淀粉状蛋白。然而,抗体治疗成本非常高,并且与不同严重性的副作用相关。在转基因小鼠阿尔茨海默病模型中用 β -淀粉状蛋白接种已经表现出淀粉状蛋白斑数目和整体淀粉状蛋白负荷的显著减少以及甚至一些认知表现的改善。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明的一个目的是减少 $A\beta$ -肽向淀粉状蛋白原纤维的聚集。

[0009] 本发明还有一个目的是减少哺乳动物脑中由 A β -肽的胞外沉积物组成的淀粉状蛋白斑的形成。

[0010] 本发明的另一个目的是提供用于治疗包括人的哺乳动物中的阿尔茨海默病的新治疗选择。

[0011] 对于这些和其它将通过下述描述变得清楚的目的,本发明提供一种分离的蛋白,其选自由下列各项组成的组:(i) 包含与来自人 (SEQ ID NO :2),牛 (SEQ ID NO :5),恒河猴 (SEQ ID NO :6),小鼠 (SEQ ID NO :7),水貂 (SEQ ID NO :8),兔 (SEQ ID NO :9) 或大鼠 (SEQ ID NO :10) 的肺表面活性蛋白 C 前体 (CTproSP-C) 的 C 端结构域具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白;和 (ii) 包含与来自人 (SEQ ID NO :4),牛 (SEQ ID NO :12),恒河猴 (SEQ ID NO :13),小鼠 (SEQ ID NO :14),水貂 (SEQ ID NO :15),兔 (SEQ ID NO :16) 或大鼠 (SEQ ID NO :17) 的 CTproSP-C 的 Brichos 结构域具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白,所述蛋白用作药物。

[0012] 已经令人惊讶地发现这种分离的蛋白具有减少淀粉状蛋白原纤维形成和减少 A β -肽聚集的能力。考虑到在关于 CTproSP-C 蛋白伴侣活性的内源性靶标 (SP-C 和 proSP-C) 和与阿尔茨海默病相关的 A β -肽之间的结构不同性,这是特别令人惊讶的。由于 proSP-C 基因仅在肺组织中表达,这也是高度令人惊讶的。本发明基于本文公开的关于先前未知的 CTproSP-C 的底物特异性的令人惊讶的研究。

[0013] 在一个实施方案中,所述分离的蛋白选自包含下述氨基酸序列的蛋白组成的组,所述氨基酸序列具有 (a) 哺乳动物 CTproSP-C Brichos 结构域的所有保守残基 (SEQ ID NO :18),且 (b1) 与来自人 (SEQ ID NO :2),牛 (SEQ ID NO :5),恒河猴 (SEQ ID NO :6),小鼠 (SEQ ID NO :7),水貂 (SEQ ID NO :8),兔 (SEQ ID NO :9) 或大鼠 (SEQ ID NO :10) 的 CTproSP-C 具有至少 70% 同一性;或 (b2) 与来自人 (SEQ ID NO :4),牛 (SEQ ID NO :12),恒河猴 (SEQ ID NO :13),小鼠 (SEQ ID NO :14),水貂 (SEQ ID NO :15),兔 (SEQ ID NO :16) 或大鼠 (SEQ ID NO :17) 的 CTproSP-C 的 Brichos 结构域具有至少 70% 同一性。换一种方式,本实施方案暗示,在相对应的位置,所述具有哺乳动物 CTproSP-C Brichos 结构域的所有保守残基 (SEQ ID NO :18) 的分离蛋白包含人 CTproSP-C (SEQ ID NO :4) Brichos 结构域的所有下述保守残基:Phe-1, Gly-4, Ser-5, Thr-6, Gly-7, Val-9, Asp-12, Tyr-13, Gln-14, Leu-16, Leu-17, Ala-19, Tyr-20, Lys-21, Pro-22, Ala-23, Pro-24, Gly-25, Thr-26, Cys-28, Tyr-29, Met-31, Lys-32, Ala-34, Pro-35, Ile-38, Pro-39, Ser-40, Leu-41, Glu-42, Ala-43, Arg-46, Lys-47, Gln-70, Gly-73, Gly-77, Ser-81, Phe-87, Leu-88, Gly-89, Val-92, Thr-94, Leu-95, Cys-96, Gly-97, Glu-98, Pro-100, Leu-101 和 Tyr-103。

[0014] 在一个实施方案中,所述分离的蛋白选自包含下述氨基酸序列的蛋白组成的组:所述氨基酸序列具有 (a) 哺乳动物 CTproSP-C 的所有保守残基 (SEQ ID NO :11),和 (b) 与来自人 (SEQ ID NO :2),牛 (SEQ ID NO :5),恒河猴 (SEQ ID NO :6),小鼠 (SEQ ID NO :7),水貂 (SEQ ID NO :8),兔 (SEQ ID NO :9) 或大鼠 (SEQ ID NO :10) 的 CTproSP-C 具有至少 70% 同一性。换一种方式,本实施方案暗示,在相对应的位置,所述具有哺乳动物 CTproSP-C 的所有保守残基 (SEQ ID NO :11) 的分离的蛋白包含人 CTproSP-C (SEQ ID NO :2) 的所有下述保守残基:His-1, Met-2, Ser-3, Gln-4, Lys-5, His-6, Thr-7, Glu-8, Met-9, Val-10, Leu-11, Glu-12, Met-13, Ser-14, Pro-18, Glu-19, Gln-21, Leu-24, Ala-25, Thr-32, Ala-34,

Thr-35, Phe-36, Gly-39, Ser-40, Thr-41, Gly-42, Val-44, Asp-47, Tyr-48, Gln-49, Leu-51, Leu-52, Ala-54, Tyr-55, Lys-56, Pro-57, Ala-58, Pro-59, Gly-60, Thr-61, Cys-63, Tyr-64, Met-66, Lys-67, Ala-69, Pro-70, Ile-73, Pro-74, Ser-75, Leu-76, Glu-77, Ala-78, Arg-81, Lys-82, Gln-105, Gly-108, Gly-112, Ser-116, Phe-122, Leu-123, Gly-124, Val-127, Thr-129, Leu-130, Cys-131, Gly-132, Glu-133, Pro-135, Leu-136 和 Tyr-138。

[0015] 在一个实施方案中,所述分离的蛋白选自由下列各项组成的组:(i) 包含与人 CTproSP-C(SEQ ID NO:2) 具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白;和 (ii) 包含与人 CTproSP-C 的 Brichos 结构域 (SEQ ID NO:4) 具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白。

[0016] 在某些实施方案中,本发明所述的分离的蛋白由少于或等于 500 个,诸如少于或等于 250 个,诸如少于或等于 200 个,诸如少于或等于 150 个氨基酸残基组成。在某些实施方案中,本发明所述的分离的蛋白由多于或等于 90 个,诸如多于或等于 100 个,诸如多于或等于 150 个氨基酸残基组成。优选的大小范围为 90-200 个氨基酸残基,诸如 100-150 个氨基酸残基。

[0017] 在一个实施方案中,所述分离的蛋白选自由下列各项组成的组:(i) 来自人 (SEQ ID NO:2),牛 (SEQ ID NO:5),恒河猴 (SEQ ID NO:6),小鼠 (SEQ ID NO:7),水貂 (SEQ ID NO:8),兔 (SEQ ID NO:9) 或大鼠 (SEQ ID NO:10) 的 CTproSP-C,和 (ii) 来自人 (SEQ ID NO:4),牛 (SEQ ID NO:12),恒河猴 (SEQ ID NO:13),小鼠 (SEQ ID NO:14),水貂 (SEQ ID NO:15),兔 (SEQ ID NO:16) 或大鼠 (SEQ ID NO:17) 的 CTproSP-C 的 Brichos 结构域。

[0018] 在具体的实施方案中,所述分离的蛋白选自由人 CTproSP-C (SEQ ID NO:2),人 CTproSP-C 的 Brichos 结构域 (SEQ ID NO:4),和具有 SEQ ID NO:21 的来自人的 CTproSP-C 的延长的 Brichos 结构域组成的组。具有 SEQ ID NO:21 的延长的 Brichos 结构域的优点在于其比 Brichos 结构域更稳定,而 Brichos 结构域和延长的 Brichos 结构域二者具有与全长 CTproSP-C 蛋白相同的功能。在一个特定的实施方案中,所述分离的蛋白是人 CTproSP-C (SEQ ID NO:2)。在另一个特定的实施方案中,所述分离的蛋白是人 CTproSP-C 的 Brichos 结构域 (SEQ ID NO:4)。

[0019] 在一个实施方案中,与人 proSP-C (SEQ ID NO:1) 中亮氨酸 -188 相对应的位置不是谷氨酰胺。在另一个实施方案中,与人 proSP-C (SEQ ID NO:1) 中亮氨酸 -188 相对应的位置是严格保守的。

[0020] 按照一个实施方案,所述分离的蛋白适合用于治疗包括人的哺乳动物中的阿尔茨海默病,包括阿尔茨海默型痴呆。

[0021] 按照一个实施方案,本发明提供选自由预防治疗、减轻治疗和治愈治疗组成的组的治疗。

[0022] 按照另一个方面,本发明提供一种药物组合物,其包括治疗有效量的本发明所述的分离的蛋白和对其适用的药用载体。

[0023] 按照一个实施方案,所述药物组合物用于治疗包括人的哺乳动物的阿尔茨海默病。

[0024] 按照一个方面,本发明提供治疗需要所述治疗的哺乳动物(包括人)中的阿尔茨海默病的方法,所述方法包括给所述哺乳动物施用治疗有效量的本发明所述的分离的蛋白或本发明所述的药物组合物。

[0025] 按照一个实施方案,本发明提供选自由预防治疗、减轻治疗和治愈治疗组成的组的治疗。

[0026] 按照另一个方面,本发明提供本发明所述的分离的蛋白用于制备用于治疗包括人的哺乳动物中的阿尔茨海默病的药物的应用。

[0027] 附图简述

[0028] 图 1 显示 proSP-C 加工的示意图,和已知的哺乳动物 CTproSP-C 氨基酸序列 (SEQ ID NOS :2,5-11) 的比对。

[0029] 图 2 显示 CTproSP-C_{Bri} 和 CTproSP-C 与在纤维素膜上 SP-C 衍生的肽斑点的结合。

[0030] 图 3 显示 CTproSP-C 与在纤维素膜上的肽斑点的结合,A β 肽样品的 SDS-PAGE 和 A β 肽样品的透射电子显微照片。

[0031] 图 4 显示 A β 肽样品的透射电子显微照片。

[0032] 图 5 显示用或不用 CTproSP-C 温育的可溶性 A β 肽级分的 SDS-PAGE。

[0033] 图 6 显示关于单独的 A β 肽或在存在 CTproSP-C 条件下的 MALDI-MS 图像。

[0034] 图 7 显示用抗体 4G8 或 S- 蛋白探测的 A β 和 A β +CTproSP-C 的 SEC 级分的免疫印迹分析。

[0035] 图 8 显示在碳酸氢铵缓冲液中与 A β 混合的 CTproSP-C 的纳米喷射 ESI-MS 光谱。

[0036] 图 9 显示 CTproSP-C 和 CTproSP-C 与 A β 的混合物的纳米喷射 ESI-MS 光谱,以及该混合物的 MS/MS 光谱。

[0037] 图 10 显示在不存在和存在等摩尔量的 CTproSP-C 的条件下热诱导的 ADH 聚集和还原诱导的胰岛素聚集。

[0038] 图 11 显示靶标肽与 CTproSP-C 或截短的 CTproSP-C 的相对结合,其为靶标肽浓度的函数。

[0039] 图 12 显示存在和不存在 CTproSP-C 时的 A β (1-40) 和 A β (1-42) 在 217nm 随时间变化的 CD 信号的幅度。

[0040] 所附序列的列表

[0041] SEQ ID NO :1 人 proSP-C

[0042] SEQ ID NO :2 人 CTproSP-C

[0043] SEQ ID NO :3 人 SP-C

[0044] SEQ ID NO :4 人 CTpro SP-C_{Bri}

[0045] SEQ ID NO :5 牛 CTproSP-C

[0046] SEQ ID NO :6 恒河猴 (rhesus macaque)CTproSP-C

[0047] SEQ ID NO :7 小鼠 CTproSP-C

[0048] SEQ ID NO :8 水貂 CTproSP-C

[0049] SEQ ID NO :9 兔 CTproSP-C

[0050] SEQ ID NO :10 大鼠 CTproSP-C

[0051] SEQ ID NO :11 保守的哺乳动物 CTproSP-C

[0052] SEQ ID NO :12 牛 CTproSP-C_{Bri}

[0053] SEQ ID NO :13 恒河猴 CTproSP-C_{Bri}

- [0054] SEQ ID NO :14 小鼠 CTproSP-C_{Brichos}
[0055] SEQ ID NO :15 水貂 CTproSP-C_{Brichos}
[0056] SEQ ID NO :16 兔 CTproSP-C_{Brichos}
[0057] SEQ ID NO :17 大鼠 CTproSP-C_{Brichos}
[0058] SEQ ID NO :18 保守的哺乳动物 CTproSP-C_{Brichos}
[0059] SEQ ID NO :19 人 A β 肽₁₋₄₀
[0060] SEQ ID NO :20S- 标记的人 CTproSP-C
[0061] SEQ ID NO :21 人 CTproSP-C_{Brichos 86-197}
[0062] 发明详述

[0063] 已经令人惊讶地发现,CTproSP-C(也称为“CTC”),包含与哺乳动物 CTproSP-C 具有至少 70%同一性的氨基酸序列的蛋白,和包含与哺乳动物 CTproSP-C 的 Brichos 结构域具有至少 70%同一性的氨基酸序列的蛋白,具有减少淀粉状蛋白原纤维形成和 A β -肽聚集的能力。

[0064] 按照第一方面,本发明提供一种分离的蛋白,其选自由下列各项组成的组:

[0065] (i) 包含与来自人 (SEQ ID NO :2),牛 (SEQ ID NO :5),恒河猴 (SEQ ID NO :6),小鼠 (SEQ ID NO :7),水貂 (SEQ ID NO :8),兔 (SEQ ID NO :9) 或大鼠 (SEQ ID NO :10) 的肺表面活性蛋白 C 前体 (CTproSP-C) 的 C 端结构域具有至少 70%同一性的氨基酸序列的蛋白,和
[0066] (ii) 包含与来自人 (SEQ ID NO :4),牛 (SEQ ID NO :12),恒河猴 (SEQ ID NO :13),小鼠 (SEQ ID NO :14),水貂 (SEQ ID NO :15),兔 (SEQ ID NO :16) 或大鼠 (SEQ ID NO :17) 的 CTproSP-C 的 Brichos 结构域具有至少 70%同一性的氨基酸序列的蛋白,所述分离的蛋白用作药物。

[0067] 术语“%同一性”在用在整个说明书和后附的权利要求书中时是按下述计算的。将查询序列与靶序列用 CLUSTAL W 算法比对 (Thompson, J. D., Higgins, D. G. 和 Gibson, T. J., Nucleic Acids Research (核酸研究), 22 :4673-4680 (1994))。在与比对序列中最短的序列相对应的窗口进行比较。比较在每个位置的氨基酸残基,并且将在所述查询序列中具有与在靶序列中的相同的对应性的位置的百分数报道为%同一性。

[0068] 术语“%相似性”在用在整个说明书和后附的权利要求书中时是如关于“%同一性”一样计算的,不同的是疏水残基 Ala, Val, Phe, Pro, Leu, Ile, Trp, Met 和 Cys 是相似的;碱性残基 Lys, Arg 和 His 是相似的;酸性残基 Glu 和 Asp 是相似的;并且亲水、不带电荷的残基 Gln, Asn, Ser, Thr 和 Tyr 是相似的。在这种情形中,剩余的天然氨基酸 Gly 不与任意其它氨基酸相似。

[0069] 在本说明书中,本发明所述的备选实施方案满足相对应的相似性百分数,而不是指定的同一性百分数。其它备选的实施方案满足指定的同一性百分数以及另一个更高的相似性百分数,其选白关于每种序列的优选的同一性百分数的组。例如,分离的蛋白序列可以与另一种蛋白序列 70%相似;或其可以与另一种序列 70%相同;或者其可以与另一种序列 70%相同并且 90%相似。

[0070] 肺表面蛋白 C (SP-C; SEQ ID NO :3) 是一种具有 35 个氨基酸残基的疏水性、乙酰化的跨膜肽。其合成为 197 个氨基酸残基的蛋白前体 (在包括人的某些物种中存在 191 个氨基酸的变体),即肺表面蛋白 C 前体 (proSP-C; SEQ ID NO :1)。ProSP-C 仅在肺泡 II 型上

皮细胞中表达,并且用其在ER腔内的C端锚定在内质网(ER)膜蛋白中。ProSP-C进行蛋白水解分解(见图1A),并且成熟的SP-C肽对应于人proSP-C的残基24-58。SP-C和其它蛋白以及脂质成分分泌到肺泡中,并且负责降低在气/液界面处的表面张力,由此防止在最终呼气时肺泡破裂。如在图1A中进一步所述,proSP-C的加工还产生C端片段,即肺表面活性蛋白C前体的C端结构域(CTproSP-C;SEQ ID NOS:2,5-10;图1B)。成熟的CTproSP-C蛋白对应于人proSP-C的残基59-197。

[0071] 在某些实施方案中,本发明所述的分离的蛋白由少于或等于500个,诸如少于或等于250个,诸如少于或等于200个,诸如少于或等于150个氨基酸残基组成。在某些实施方案中,本发明所述的分离的蛋白由多于或等于90个,诸如多于或等于100个,诸如多于或等于150个氨基酸残基组成。优选的大小范围是90-200个氨基酸残基,诸如100-150个氨基酸残基。

[0072] SP-C(SEQ ID NO:3)并且因此还有proSP-C(SEQ ID NO:1)包含跨膜(TM) α -螺旋(对应于残基9-34),其仅由缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸组成(“聚-Val”区),具有形成 β -链的高度倾向。其是非常保守的并且缺少已知的同源蛋白。因此,不一致的SP-C螺旋在溶液中是亚稳态的,并且可以自发转变成 β -折叠聚集物和淀粉状蛋白原纤维。已经在肺泡蛋白质沉积症(pulmonary alveolar proteinosis)(PAP)患者的肺泡中观察到SP-C原纤维,但在健康的对照中没有观察到。

[0073] 此外,CTproSP-C(SEQ ID NO:2)并且因此以及proSP-C(SEQ ID NO:1)包含已知为Brichos结构域(CTproSP-C_{Brichos};SEQ ID NO:4)的结构域,其对应于人proSP-C(SEQ ID NO:1)的残基94-197。Brichos结构域包含约100个氨基酸,并且发现其存在于与变性和增殖性疾病相关的一些蛋白中,诸如Bri,存在于与淀粉状蛋白形成和家族性英国和丹麦痴呆相关的一些蛋白中,和存在于与胃癌相关的CA11中。还已知,Brichos结构域中的突变与肺病、proSP-C错误折叠和细胞内聚集体的形成相关。具有外显子4缺失的proSP-C(proSP-C ^{Δ Exon4})的增加的表达产生C端变短的蛋白前体,导致转基因小鼠中的肺畸形发生和转染细胞中的ER压力。Brichos结构域中的另一种突变,导致在蛋白前体位置188的亮氨酸交换为谷氨酰胺(proSP-C^{L188Q}),其与显性遗传的间质性肺病(interstitial lung disease)相关。在来源于肺的A549细胞中或人胚肾(HEK)293细胞中表达Brichos突变体proSP-C ^{Δ Exon4}或proSP-C^{L188Q}导致增加的引起凋亡的不溶聚集体的形成。相反,位于Brichos结构域和跨膜结构域(SP-C)之间的区域中的另外两种突变,proSP-C^{I73T}和proSP-C^{E66K},与改变的细胞内运输相关而不是与聚集相关。因此,在proSP-C和CTproSP-C中的Brichos结构域参与防止(pro)SP-C聚集。在一个实施方案中,与人proSP-C中亮氨酸-188相对应的位置不是谷氨酰胺。在另一个实施方案中,与人proSP-C中亮氨酸-188相对应的位置严格保守。显然,与人proSP-C中亮氨酸-188相对应的位置在CTproSP-C(在人中亮氨酸-130)和CTproSP-C_{Brichos}(在人中亮氨酸-95)以及在某些其它物种中具有不同的数字,参见图1B以及SEQ ID NOS:1-2和4-18。

[0074] CTproSP-C结合非螺旋SP-C的聚缬氨酸部分,并且这种结合导致组合的CTproSP-C/SP-C系统的增加的螺旋含量。特别地,重组人CTproSP-C与全长非螺旋SP-C的结合导致SP-C的 α -螺旋形成。

[0075] 重组人CTproSP-C与SP-C的结合通过在CTproSP-C Brichos结构域(人

proSP-C⁹⁴⁻¹⁹⁷;SEQ ID NO:4)和在包含疏水残基(Val, Leu, Ile)的SP-C"聚-Val"区(Sp-C¹³⁻³⁵)中存在的结合基序发生。

[0076] ProSP-C还在其它哺乳动物物种中表达,并且提供相对应的SP-C和CTproSP-C分裂产物。来自牛、恒河猴、小鼠、水貂、兔和大鼠的相对应的CTproSP-C氨基酸序列显示在SEQ ID NO 3-8中。其高度保守性(超过70%的同一性)暗示与人CTproSP-C相同的功能,其在天然环境中参与稳定SP-C和proSP-C,但是如本文所公开的,还包括稳定A β 蛋白。如本文所示,CTproSP-C的这两种功能在结构上是相关的,并且因此本发明包括包含与任何哺乳动物CTproSP-C,特别是来自人(SEQ ID NO:2),牛(SEQ ID NO:5),恒河猴(SEQ ID NO:6),小鼠(SEQ ID NO:7),水貂(SEQ ID NO:8),兔(SEQ ID NO:9)或大鼠(SEQ ID NO:10)的CTproSP-C;并且优选与来自人的CTproSP-C(人proSP-C⁵⁹⁻¹⁹⁷;SEQ ID NO:2)具有至少70%,优选至少80%,优选至少90%,更优选至少95%同一性的氨基酸序列。

[0077] 哺乳动物CTproSP-C(SEQ ID NO:2,5-10)的高度保守性从图1B清楚可见,其表现已知的哺乳动物物种之间的严格保守的氨基酸残基("严格的";SEQ ID NO:11)。这些氨基酸残基的保守性暗示这些氨基酸残基在CTproSP-C中的功能。在一个优选的实施方案中,所述分离的蛋白与哺乳动物物种之间的保守氨基酸残基相对应的这些氨基酸残基与所述保守的氨基酸残基相同,即,所述分离的蛋白包含SEQ ID NO:11的定义的氨基酸残基。即,除了与特定CTproSP-C的整体同一性/相似性程度,所述分离的蛋白与哺乳动物物种之间的保守氨基酸残基相对应的那些氨基酸残基与本实施方案中所述的保守氨基酸残基相同。换一种方式,本实施方案暗示,在相对应的位置,具有哺乳动物CTproSP-C所有保守残基(SEQ ID NO:11)的分离的蛋白包含人CTproSP-C(SEQ ID NO:2)的所有下述保守残基:His-1, Met-2, Ser-3, Gln-4, Lys-5, His-6, Thr-7, Glu-8, Met-9, Val-10, Leu-11, Glu-12, Met-13, Ser-14, Pro-18, Glu-19, Gln-21, Leu-24, Ala-25, Thr-32, Ala-34, Thr-35, Phe-36, Gly-39, Ser-40, Thr-41, Gly-42, Val-44, Asp-47, Tyr-48, Gln-49, Leu-51, Leu-52, Ala-54, Tyr-55, Lys-56, Pro-57, Ala-58, Pro-59, Gly-60, Thr-61, Cys-63, Tyr-64, Met-66, Lys-67, Ala-69, Pro-70, Ile-73, Pro-74, Ser-75, Leu-76, Glu-77, Ala-78, Arg-81, Lys-82, Gln-105, Gly-108, Gly-112, Ser-116, Phe-122, Leu-123, Gly-124, Val-127, Thr-129, Leu-130, Cys-131, Gly-132, Glu-133, Pro-135, Leu-136和Tyr-138。

[0078] 来自图1B的比对的另一种观察在于,关于个体哺乳动物物种的序列,保守的哺乳动物序列包含缺口。因此,认为所述分离的蛋白与例如人CTproSP-C的比对可以包含一些缺口,例如,0-5个缺口或0-3个缺口。在人CTproSP-C中,在某些哺乳动物物种中缺少残基88-93,101-103和115,而一种或多种哺乳动物物种在人CTproSP-C的残基16-17和115-116之间具有另外的残基。

[0079] 在一个实施方案中,本发明包括作为哺乳动物CTproSP-C蛋白,特别是来自人(SEQ ID NO:2),牛(SEQ ID NO:5),恒河猴(SEQ ID NO:6),小鼠(SEQ ID NO:7),水貂(SEQ ID NO:8),兔(SEQ ID NO:9)或大鼠(SEQ ID NO:10)的CTproSP-C蛋白;并且优选是来自人的CTproSP-C(人proSP-C⁵⁹⁻¹⁹⁷;SEQ ID NO:2)的蛋白。表述"CTproSP-C"通常是指任何哺乳动物CTproSP-C,且优选是指人CTproSP-C。

[0080] 此外,CTproSP-C的Brichos结构域具有与全长CTproSP-C相同的结合能力。因此,本发明包括包含这样的氨基酸序列的蛋白,所述氨基酸序列与哺乳动物的Brichos结构

域,优选与人 (SEQ ID NO :2),牛 (SEQ ID NO :5),恒河猴 (SEQ ID NO :6),小鼠 (SEQ ID NO :7),水貂 (SEQ ID NO :8),兔 (SEQ ID NO :9) 或大鼠 (SEQ ID NO :10)CTproSP-C 的 Brichos 结构域,更优选与人 CTproSP-C 的 Brichos 结构域 (人 proSP-C⁹⁴⁻¹⁹⁷;SEQ ID NO :2) 具有至少 70%,优选至少 80%,优选至少 90%,并且优选至少 95% 的同一性。

[0081] 在一个实施方案中,本发明包括这样的蛋白,其包含哺乳动物的 Brichos 结构域,优选人、牛、恒河猴、小鼠、水貂、兔或大鼠的 CTproSP-C 的 Brichos 结构域,更优选人 CTproSP-C 的 Brichos 结构域 (人 proSP-C⁹⁴⁻¹⁹⁷;SEQ ID NO :2)。表述“proSP-C 的 Brichos 结构域”,“proSP-C_{Brichos}”,“CTproSP-C 的 Brichos 结构域”和“CTproSP-C_{Brichos}”通常是指任何哺乳动物 proSP-C 的 Brichos 结构域,并且优选是指人 proSP-C 的 Brichos 结构域。

[0082] 在一个实施方案中,本发明包括作为哺乳动物 CTproSP-C 蛋白的 Brichos 结构域,特别是来自人 (SEQ ID NO :4),牛 (SEQ ID NO :12),恒河猴 (SEQ ID NO :13),小鼠 (SEQ ID NO :14),水貂 (SEQ ID NO :15),兔 (SEQ ID NO :16) 或大鼠 (SEQ ID NO :18) 的 CTproSP-C 蛋白的 Brichos 结构域;并且优选是人 CTproSP-C 的 Brichos 结构域 (人 proSP-C⁵⁹⁻¹⁹⁷;SEQ ID NO :4) 的蛋白。

[0083] 哺乳动物 CTproSP-C 的 Brichos 结构域 (SEQ ID NO :4,12-17) 的高度保守性从图 1B 清楚可见,其表现已知的哺乳动物物种之间的严格保守的氨基酸残基 (“严格的”;SEQ ID NO :18)。这些氨基酸残基的保守性暗示这些氨基酸残基在 CTproSP-C_{Brichos} 中的功能。在一个优选的实施方案中,所述分离的蛋白与哺乳动物物种之间的保守氨基酸残基相对应的这些氨基酸残基与所述保守的氨基酸残基相同,即,所述分离的蛋白包含 SEQ ID NO :18 的定义的氨基酸残基。即,除了与特定 CTproSP-C_{Brichos} 的整体同一性 / 相似性程度,所述分离的蛋白与哺乳动物物种之间的保守氨基酸残基相对应的那些氨基酸残基与本实施方案中所述的保守氨基酸残基相同。换一种方式,本实施方案暗示,在相对应的位置,具有哺乳动物 CTproSP-C_{Brichos} 结构域所有保守残基 (SEQ ID NO :18) 的分离的蛋白包含人 CTproSP-C_{Brichos} 结构域 (SEQ ID NO :4) 的所有下述保守残基:Phe-1,Gly-4,Ser-5,Thr-6,Gly-7,Val-9,Asp-12,Tyr-13,Gln-14,Leu-16,Leu-17,Ala-19,Tyr-20,Lys-21,Pro-22,Ala-23,Pro-24,Gly-25,Thr-26,Cys-28,Tyr-29,Met-31,Lys-32,Ala-34,Pro-35,Ile-38,Pro-39,Ser-40,Leu-41,Glu-42,Ala-43,Arg-46,Lys-47,Gln-70,Gly-73,Gly-77,Ser-81,Phe-87,Leu-88,Gly-89,Val-92,Thr-94,Leu-95,Cys-96,Gly-97,Glu-98,Pro-100,Leu-101 和 Tyr-103。

[0084] 在一个实施方案中,本发明包括作为哺乳动物 CTproSP-C 蛋白 Brichos 结构域,特别是来自人 (SEQ ID NO :4),牛 (SEQ ID NO :12),恒河猴 (SEQ ID NO :13),小鼠 (SEQ ID NO :14),水貂 (SEQ ID NO :15),兔 (SEQ ID NO :16) 或大鼠 (SEQ ID NO :18) 的 CTproSP-C 蛋白的 Brichos 结构域;并且优选是来自人的 CTproSP-C Brichos 结构域 (人 proSP-C⁵⁹⁻¹⁹⁷;SEQ ID NO :4) 的蛋白。

[0085] 在一个具体的实施方案中,所述分离的蛋白可以包含 Brichos 结构域和多个来自 CTproSP-C 非 Brichos 部分的残基。例如,SEQ ID NO :21 包含人 CTproSP-C 的 Brichos 结构域和来自人 CTproSP-C 的非 Brichos 部分的 8 个另外的氨基酸残基。功能得到保留,但是所得到的蛋白比单独的 Brichos 结构域更稳定,并且因此可以有利地提供更高产量的非聚集蛋白。

[0086] 在细胞膜内,多肽需要暴露非极性侧链,并且隐藏极性骨架。因此,仅缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸促使插入到内质网(ER)膜中,并且形成 α -螺旋是插入过程的重要部分。ProSP-C是具有单个 α -螺旋跨膜结构域的完整的ER膜蛋白,所述 α -螺旋跨膜结构域由多个缬氨酸和一些异亮氨酸和亮氨酸组成,并且该结构域产生成熟的SP-C(人SP-C,SEQ ID NO:3)。由于缬氨酸和异亮氨酸残基的高 β -折叠倾向性,也正是这一特征在体外和活细胞中使得SP-C和proSP-C倾向于形成 β -折叠聚合物(淀粉状蛋白原纤维)。

[0087] 存在内源性抗-淀粉状蛋白功能,由此proSP-C的ER腔、C-端结构域(CTproSP-C)通过尚未解决的机制防止proSP-C和SP-C的跨膜片段聚集成 β -折叠。SP-C是高度保守的,缺少同源蛋白,并且其疏水性“聚-Val”区包含缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸。然而,令人惊讶地,CTproSP-C的亲合性不限于这三个疏水性氨基酸残基。CTproSP-C识别具有空前特异性的5-7个残基的片段。CTproSP-C结合缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸或酪氨酸的片段,但不结合丙氨酸、色氨酸、甘氨酸、脯氨酸或苏氨酸对应体。因此,CTproSP-C按照生物学疏水性级别结合促使膜插入的残基(T Hessa等, Nature(自然)433,377-381,2005)并且结合酪氨酸。在生物学疏水性等级和通过与纤维素-结合的肽结合所揭示的CTproSP-C底物特异性之间的例外在于CTproSP-C结合酪氨酸片段。这可以通过酪氨酸残基在CTproSP-C中是暴露的并且结合疏水染料1,1'-二(4-苯胺-5,5'-萘磺酸酯)进行解释。此外,CTproSP-C专一地结合处于非螺旋构象的肽。

[0088] CTproSP-C的底物特异性与Hsp70家族蛋白伴侣BiP和DnaK具有相似性,Hsp70家族蛋白伴侣BiP在通过ER膜易位后结合所述疏水多肽片段。BiP识别具有交替模式的疏水残基的7-残基肽片段,其与延长的肽结构对结合的需要相容。然而,缬氨酸在与BiP结合的肽中是表现不足(under represent)的,而CTproSP-C不结合聚-Trp,聚-Trp是BiP底物中最有利的残基。同样地,DnaK结合所需要的中间5个残基的性质与CTproSP-C的底物特异性相似,但是对于CTproSP-C没有观察到对于侧连碱性残基的DnaK需要。

[0089] 综上所述,这些数据直接提示对CTproSP-C功能的解释;其通过结合尚未达到 α -螺旋的、膜插入构象的proSP-C候选物跨膜片段的任何部分而防止 β -折叠聚集。通过识别特定的氨基酸序列而靶向在proSP-C跨膜结构域内的任何短片段将是不可能的。

[0090] 总之,CTproSP-C是一种SP-C蛋白伴侣,并且CTproSP-C关于SP-C的天然稳定、促进螺旋作用通过结合SP-C的疏水“聚-Val”区(人SP-C的残基13-35,SEQ ID NO:3)而发生,所述疏水“聚-Val”区主要包含缬氨酸(10个残基)、异亮氨酸和亮氨酸,但不包含苯丙氨酸。事实上,尽我们所知,CTproSP-C对于苯丙氨酸的亲合力先前是未知的。此外,上述CTproSP-C底物特异性,按定义来说,暗示其可以结合未能形成可以插入到膜内的紧凑的、螺旋构象的其它候选跨膜片段。

[0091] 与SP-C相反,A β 肽(SEQ ID:19)具有形成 β -折叠倾向的靶区域跨越残基16-23,并且包含两个苯丙氨酸残基,但是仅有一个缬氨酸残基。因此,令人高度惊讶地是本发明所述的分离的蛋白具有减少淀粉状蛋白纤维形成并且减少A β 肽聚集的能力。在本发明中对CTproSP-C针对与阿尔茨海默病相关的淀粉状蛋白 β -肽(A β ₁₋₄₀;SEQ ID NO:19)的活性进行了实验评估。

[0092] 当从膜释放时,A β 由其前体蛋白APP的TM片段分裂下来,聚集成淀粉状蛋白原纤维,并且包含区域L₁₇VFF₂₀和I₃₁IGLMVGGV₄₀,如果所述区域以非螺旋构象存在,它们匹配

CTproSP-C 底物特异性。事实上, CTproSP-C 完全阻断淀粉状蛋白原纤维形成和 A β 的聚集。CTproSP-C 捕获除 proSP-C 的跨膜结构域之外的淀粉状蛋白形成多肽的能力表明其识别的特性, 即对于膜插入的充分的疏水性和非螺旋构象, 通常推动淀粉状蛋白形成。这与这样的观察相符, 即, 疏水性和 β -折叠倾向可以用来阐释淀粉状蛋白形成蛋白的聚集率。CTproSP-C 是发现联系 proSP-C, SP-C 和 A β 肽的未折叠跨膜片段的识别和淀粉状蛋白防止的第一种蛋白伴侣。

[0093] 因此, 本发明特别提供选自自由下列各项组成的组的分离的蛋白: (i) 包含与来自人 (SEQ ID NO :2), 牛 (SEQ ID NO :5), 恒河猴 (SEQ ID NO :6), 小鼠 (SEQ ID NO :7), 水貂 (SEQ ID NO :8), 兔 (SEQ ID NO :9) 或大鼠 (SEQ ID NO :10) 的肺表面活性蛋白 C 前体 (CTproSP-C) 的 C 端结构域具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白; 和 (ii) 包含与来自人 (SEQ ID NO :4), 牛 (SEQ ID NO :12), 恒河猴 (SEQ ID NO :13), 小鼠 (SEQ ID NO :14), 水貂 (SEQ ID NO :15), 兔 (SEQ ID NO :16) 或大鼠 (SEQ ID NO :17) 的 CTproSP-C 的 Brichos 结构域具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的蛋白, 所述分离的蛋白用作药物, 用于治疗包括人的哺乳动物中的阿尔茨海默病, 包括阿尔茨海默型痴呆。

[0094] 在具体的实施方案中, 所述治疗可以是预防治疗。在其它具体的实施方案中, 所述治疗可以是减轻治疗。在某些具体的实施方案中, 所述治疗可以是治愈治疗。

[0095] 按照另一个方面, 本发明提供一种药物组合物, 其包含治疗有效量的本发明所述的分离的蛋白和对其适用的药用载体。所述药物组合物有效用于治疗包括人的哺乳动物中的阿尔茨海默病, 包括阿尔茨海默型痴呆。

[0096] 按照一个相关的方面, 本发明提供本发明所述的分离的蛋白用于制备用于治疗包括人的哺乳动物中的阿尔茨海默病 (包括阿尔茨海默型痴呆) 的药物中的应用。

[0097] 本发明所述的分离的蛋白可以结合到药物组合物中。所述组合物典型地包括候选化合物和适合的药用载体。当用于本文时, “适合的药用载体” 包括溶剂、分散介质、包衣、等张和吸收延迟剂等, 其与药物施用相容。辅助的活性化合物也可以结合在所述组合物中。

[0098] 配制药物组合物与其目的施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外 (例如, 静脉内、皮内、皮下)、口服、鼻内 (例如, 吸入)、经皮、经黏膜、鞘内、脑室内 (例如, 使用具有内嵌的滤器的 Omayo 储器 - 分流器, 其被手术放置在脑池空间中)、和直肠施用。

[0099] 用于组合物的潜在有用的肠胃外递送系统包括缓慢溶解的聚合物颗粒, 可植入的输注系统, 和脂质体。用于肠胃外应用的溶液或混悬液可以包括下述成分: 无菌稀释剂, 诸如注射用水, 盐溶液, 不挥发性油, 聚乙二醇, 甘油, 丙二醇或其它合成的溶剂; 抗菌剂, 诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯; 抗氧化剂, 诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠; 螯合剂, 诸如乙二胺四乙酸; 缓冲剂, 诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐, 和用于调整张力的试剂, 诸如氯化钠或葡萄糖。pH 可以用酸或碱调节, 诸如用盐酸或氢氧化钠来调节。肠胃外制剂可以被封在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0100] 也可以通过将本发明所述的分离的蛋白直接递送到中枢神经系统、优选递送至脑而实行阿尔茨海默病的治疗。

[0101] 适于注射用的药物组合物包括无菌水溶液 (在水溶性情形中) 或分散液和用于即时制备无菌注射液或分散液的无菌粉剂。对于静脉内施用, 适合的载体包括生理盐水, 抑菌水, Cremophor EL™ 或磷酸缓冲盐水 (PBS)。在所有情形中, 所述组合物必须是无菌的, 并且

在存在容易注射的程度上应该是流体。其在制备和储存的条件下应该是稳定的,并且必须保存免受诸如细菌和真菌的微生物的污染作用。所述载体可以是溶剂或分散介质,例如,其包含水、乙醇、多元醇(例如,甘油,丙二醇,和液态聚乙二醇等)、和它们的适当的混合物。例如,可以通过利用在本发明所述的分离的蛋白颗粒上的涂层(例如,磷脂酰胆碱),在分散的情形中通过维持所需要的颗粒尺寸并且通过利用表面活性剂来保持适当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯,氯代丁醇,苯酚,抗坏血酸,硫柳汞等,实现微生物作用的防止。在许多情形中,优选地在所述组合物中包括等张剂。所述试剂的实例包括糖,多元醇,诸如甘露醇和山梨醇,和氯化钠。可以通过在所述组合物中包含延迟吸收的试剂,例如,单硬脂酸铝或明胶,来导致可注射组合物的延长的吸收。

[0102] 无菌注射液可以这样制备:通过将本发明所述的分离的蛋白以需要的量结合在适当的溶剂中,当需要时,与上述列举的一种成分或成分组合一起结合在适当的溶剂中,然后过滤除菌。一般地,分散液通过将本发明所述的分离的蛋白结合到无菌赋形剂中而制备,所述无菌赋形剂包含基本的分散介质和上述列举的那些中所需要的其它成分。在用于制备无菌注射液的无菌粉剂的情形中,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,这产生本发明所述的分离的蛋白加来自其先前无菌过滤溶液的任何另外需要的成分的粉剂。

[0103] 口服组合物通常包含惰性稀释剂或可食用的载体。为了口服治疗施用的目的,本发明所述的分离的蛋白可以与赋形剂结合并且以片剂、药片、或胶囊(例如,明胶胶囊)形式使用。

[0104] 可以包含药物相容的结合剂、和/或辅助物质作为组合物的一部分。片剂、药丸、胶囊、药片等可以包含任意下述成分、或相似性质的化合物:结合剂,诸如微晶纤维素,西黄蓍胶或明胶;赋形剂,诸如淀粉或乳糖;崩解剂,诸如褐藻酸,Primogel,或玉米淀粉;润滑剂,诸如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,诸如胶质二氧化硅;增甜剂,诸如蔗糖或糖精;或调味剂,诸如胡椒薄荷,水杨酸甲酯,或橙味调味剂。

[0105] 对于通过吸入施用,化合物以来自包含适当的推动剂(例如,气体,诸如二氧化碳)的加压容器或分散器、或喷雾器的气雾剂喷雾的形式递送。

[0106] 系统施用还可以通过经黏膜或经皮方式进行。对于经黏膜或经皮施用,在制剂中使用适于要被透过的屏障的渗透剂。所述渗透剂在本领域中通常是已知的,并且包括,例如,对于经黏膜施用,去污剂,胆汁盐,和梭链孢酸衍生物。经黏膜施用可以通过使用鼻喷雾或栓剂实现。对于经皮施用,将本发明所述的分离的蛋白配制成本领域通常已知的药膏、软膏、凝胶、或油膏。

[0107] 本发明所述的分离的蛋白也可以制备成栓剂(例如,具有常规的栓剂基质,诸如可可脂和其它甘油酯)或用于直肠递送的滞留型灌肠剂(retention enemas)的形式。

[0108] 在一个实施方案中,本发明所述的分离的蛋白用保护所述化合物免受机体快速清除的载体制备,所述载体诸如可控释放的制剂,包括植入物和微胶囊化的递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯,聚酞,聚乙醇酸,胶原,聚原酸酯(polyorthoesters),和聚乳酸。制备所述制剂的方法是本领域技术人员所清楚的。脂质体混悬液(包括用单克隆抗体靶向特异性感染阿尔茨海默病的细胞的脂质体)也可以用作药用载体。这些可以按照本领域技术人员已知的方法制备。

[0109] 为了施用容易和剂量均匀,便利地配制剂量单位形式的口服或肠胃外组合物。剂

量单位形式用在本文中是指适合用作用于待治疗的受试者的单一剂量的物理分开的剂量,每个剂量包含与所需要的药物载体联系的预定量的本发明所述的分离的蛋白,所述量被计算来产生需要的治疗效果。

[0110] 本发明所述的分离的蛋白的毒性和治疗效果可以通过在细胞培养物或实验动物中的标准药理学步骤确定,例如,用于确定 LD_{50} (对 50% 的群体致死的剂量) 和 ED_{50} (在 50% 的群体中治疗有效的剂量)。可以使用适当的动物模型,诸如在 Sturchler-Pierrat 等, *Rev Neurosci* (神经学综述), 10:15-24, 1999; Seabrook 等, *Neuropharmacol* (神经药理学) 38:1-17, 1999; DeArmond 等, *Brain Pathology* (脑病理学) 5:77-89, 1995; Telling, *Neuropathol Appl Neurobiol* (神经病理学应用神经生物学) 26:209-220, 2000; 和 Price 等, *Science* (科学) 282:1079-1083, 1998 中关于淀粉样变性病 (amyloidoses) 所述的那些。

[0111] 毒性和治疗效果之间的剂量比率是治疗指数,并且其可以表示为 LD_{50}/ED_{50} 比率。优选表现出高治疗指数的化合物。尽管可以使用表现出毒性副作用的化合物,但是应该慎重设计将所述化合物靶向感染组织部位的递送系统,以将对未感染的细胞的潜在的伤害最小化并且由此减少副作用。

[0112] 由细胞培养物测定和动物研究获得的数据可以用于配制一定范围的用于人的剂量。化合物的剂量优选在一定范围的循环浓度之内,所述浓度包括具有很少或没有毒性的 ED_{50} 。

[0113] 剂量可以在该范围内变化,这取决于所用的剂型和所用的施用途径。对于本发明的方法中所用的任何化合物,最初可以由细胞培养物测定来估算治疗有效剂量,其中例如,在所述细胞培养物测定中,观察到原纤维形成的速率或细胞死亡的速率。可以在动物模型中配制剂量,以获得包括在细胞培养物中确定的 IC_{50} (即,获得半最大症状抑制的测试化合物的浓度) 的循环血浆浓度范围。这样的信息可以用来更准确地确定在人的有用剂量。例如,可以通过高效液相色谱测量血浆中的水平。

[0114] 如本文定义的,本发明所述的分离的蛋白的治疗有效量 (即,有效剂量) 在约 0.1-100mg/kg 体重,更优选约 1-100mg/kg 体重,并且甚至更优选约 1-50mg/kg 体重的范围内。所述化合物可以在延长的时间阶段施用给受试者例如,在受试者的生命过程中。1mg/kg-100mg/kg 的剂量通常是合适的,诸如在设计在脑中起作用的抗体的情形中是这样。

[0115] 在一些情形中,所述化合物可以每周一次施用约 1-10 周,优选 2-8 周,更优选约 3-7 周,并且甚至更优选约 4, 5, 或 6 周。所述化合物还可以长期施用。专业技术人员应该理解,某些因素可能影响有效治疗受试者所需要的剂量和时间,包括但不限于,疾病或病症的严重性,先前的治疗,受试者整体健康和 / 或年龄,和存在的其它疾病。此外,用治疗有效量的化合物治疗受试者可以包括单次治疗,或者优选地,可以包括一系列的治疗。

[0116] 可以以多种方式制备本发明所述的重组分离的蛋白,其包括人 CTproSP-C 及其 Bricos 结构域,用于施用给表达人 APP 的小鼠或人。所述重组蛋白可以按实施例 1 所述纯化。为了增加蛋白通过血脑屏障 (BBB) 的可能性,考虑了一些方法。

[0117] 对于药物通过 BBB, 已经出现了几种主要的策略。它们利用内源性转运系统,通过受体介导的胞转作用或利用特定的受体 (例如,用于葡萄糖、氨基酸或肽的特定受体)。作为用于携带多种货物穿过 BBB 的载体,肽似乎是特别引人注意的。已经表明多种不同的肽

引发胞吞作用（典型地通过 LDL-受体）并且能够递送货物穿过 BBB。这些肽中的一些是两性带正电荷细胞穿过肽（CPPs, 例如, 渗透素 (penetratin), ApoE 衍生的肽以及其它), 但是这些在较高的剂量也可能是高度毒性的。如 synB 家族的其它物质也是带正电荷的, 但是不具有疏水部分。多种引发内吞作用的肽的缺点在于, 为了有效, 它们需要相对较大, 从而形成似乎与有效的摄入相关的稳定的 α -螺旋。通过胞转作用递送的优势在于, 货物可以非常大量并且非常可变化。其中已经表明通过可饱和转运系统穿过 BBB 的特异性内源肽将作用为用于药物递送的载体的途径也是可行的备选方案。这种类型的一些相对短的肽, 如 MIF-1 (Pro-Leu-Gly, 来源于催产素) 和肽 T (8 个残基, 来源于 HIV 包膜), 已经表明有效转运穿过 BBB。参见, 例如, de Boer AG 和 Gaillard PJ, Clin Pharmacokinet. (临床药物动力学) 46 :553-76, 2007 ; de Boer AG 和 Gaillard PJ, Annu Rev Pharmacol Toxicol. (药理学毒物学年度综述) 47 :323-55, 2007 ; Pardridge WM, Drug Discov Today. (今日药物发现) 12 :54-61, 2007, 关于穿过 BBB 递送方法的描述。在现在的情形中, 考虑所述肽或蛋白可以与 CTproSP-C 或其 Brichos 结构域混合, 或者备选地, 它们可以这样表达以与 CTproSP-C 或其 Brichos 结构域共价连接。

[0118] 在其它制剂中, CTproSP-C 或其 Brichos 结构域可以与用于穿过 BBB 递送的纳米颗粒连接 (Lockman PR 等., Drug Dev Ind Pharm. (药物开发和工业药学) 28 :1-13, 2002 ; Tosi G 等., Expert Opin Drug Deliv. (药物递送专家观点) 5 :155-74, 2008)。

[0119] 也可以利用修饰诸如脂质化来稳定蛋白并且增加摄入和组织渗透性 (例如, 渗透到脑)。用于抗体脂质化的方法由 Cruikshank 等, J Acquired Immune Deficiency Syndromes Hum Retrovirol (获得性免疫缺陷综合征人反转录病毒杂志) 14 :193, 1997 所述。

[0120] 当本发明所述的分离的蛋白要施用给动物 (例如, 人) 来治疗阿尔茨海默病时, 医师、兽医或研究人员可以, 例如, 先开相对低的剂量, 随后增加剂量直到获得适当的响应。另外, 应该理解, 对于任何具体的动物受试者的特定的剂量水平取决于多种因素, 包括所用的特定化合物的活性, 受试者的年龄、体重、整体健康、性别和饮食, 施用的时间, 施用的途径, 排泄速率, 任何药物组合, 和表达或被调控的活性的程度。

[0121] 本发明的药物组合物可以与施用说明书一起包含在容器、包裹、或分配器中。例如, 说明书可以包括使用所述组合物来治疗患有或有危险患有阿尔茨海默病的个体的指导。

[0122] 按照另一个方面, 本发明提供治疗需要其的哺乳动物 (包括人) 中的阿尔茨海默病 (包括阿尔茨海默型痴呆) 的方法, 所述方法包括给所述哺乳动物施用治疗有效量的本发明所述的分离的蛋白或本发明所述的药物组合物。

[0123] 在具体的实施方案中, 所述治疗可以是预防治疗。在其它具体的实施方案中, 所述治疗可以是减轻治疗。在某些具体的实施方案中, 所述治疗可以是治愈治疗。

[0124] 本发明提供治疗有危险 (或易于) 患有阿尔茨海默病的受试者的预防性和治疗性方法。当用于本文时, 术语“治疗”定义为给患者使用或施用本发明所述的分离的蛋白, 或向来自患有阿尔茨海默病、具有疾病症状或易患病体质的患者的分离的组织或细胞系使用或施用本发明所述的分离的蛋白, 目的是治愈、愈合、缓和、减轻、改变、补救、改进、改善或影响所述疾病、疾病症状或易患疾病的体质。

[0125] 在一个方面中,本发明提供用于预防与由 A β 肽引起的原纤维形成相关的疾病或病况(即,减少感染(contracting)的危险,或减少出现与疾病或病况相关的症状的速率)的方法,所述方法通过向受试者施用本发明所述的分离的蛋白,所述分离的蛋白减少多肽聚集和/或稳定多肽的 α -螺旋形式。例如,可以通过本领域已知的任何适当的诊断或预后测定或它们的组合来鉴定有危险患有阿尔茨海默病的受试者。施用预防剂可以在所述疾病特有的症状显现之前进行,以使所述疾病得到预防,或者备选地延迟其进展。

[0126] 本发明所述的分离的蛋白可以以治疗有效的剂量施用给患者,从而预防、治疗或改善涉及与阿尔茨海默病相关的原纤维形成的病症。治疗有效剂量是指足以引起病症症状改善的化合物的量。所述化合物的毒性和治疗功效可以通过上述标准药理学步骤确定。

[0127] 还考虑本发明所述的蛋白可以通过基因治疗施用,诸如使用表达载体、质粒或病毒来转染神经系统中的细胞,优选脑中的细胞,以使所述分离的蛋白由中枢神经系统中的这些细胞表达。这有效用于阿尔茨海默病的治疗。

[0128] 现在,将通过下述非限制性实施例进一步举例说明本发明。

实施例

[0129] 实施例 1-表达和分离重组人 CTproSP-C_{Bri}chos(人 proSP-C⁹⁴⁻¹⁹⁷;SEQ ID NO:4),重组人 CTproSP-C(proSP-C⁵⁹⁻¹⁹⁷;SEQ ID NO:2)和重组人 CTproSP-CL^{188Q}。

[0130] 按照 Johansson 等, J Biol Chem(生物化学杂志)281:21032-21039,2006 所述制备 CTproSP-C 和 CTproSP-CL^{188Q} 构建体。由 CTproSP-C 构建体和下述引物(DNA technology AIS(DNA 技术 AIS), Aarhus, 丹麦):5'-GGTGCCATGGCTTTCTCCATCGGCTCCACT-3'(正向引物)和 5'-CTCTAGAGGATCCGGATCCCTAGATGTAGTAGAGCGGCACCTCC-3'(反向引物)扩增 CTproSP-C_{Bri}chos 构建体;下划线序列分别是 BamHI 和 NcoI 分裂位点。将扩增的 DNA 片段用 BamHI 和 NcoI 消化,并且连接到表达载体 pET-32c(Novagen, Madison, WI)上。该载体包含硫氧还蛋白、六组氨酸和插入位点上游 S- 标记的编码区。

[0131] 为了表达 CTproSP-C 和 CTproSP-C_{Bri}chos, 将转化的大肠杆菌(E. coli)菌株 Origami(DE3)pLysS(Novagen, Madison, WI)在含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 Luria-Bertani 培养基中在 37 $^{\circ}$ C 在持续搅动下生长 16 小时。将温度降低至 25 $^{\circ}$ C, 并且在 OD₆₀₀ = 1.1 时通过加入 IPTG 至 0.5mM 而诱导表达, 并且将细菌再生长 4 小时。然后, 通过以 6000xg 离心 20 分钟而收集细胞, 用在 20mM Tris-HCl, pH 8, 2mM MgCl₂ 中的溶菌酶和 DNA 酶温育, 并且将其进一步上样到 Ni-NTA 琼脂糖柱上。将该柱用 100ml 20mM Tris, pH 8 洗涤, 然后用 20ml 含有 20mM 咪唑的 20mM Tris, pH 8 洗涤。然后, 用在 20mM Tris, pH 8 中的 150mM 咪唑洗脱靶蛋白。将洗脱的蛋白针对 20mM Tris, pH 8 透析, 然后通过 8 $^{\circ}$ C 以 0.002 的酶/底物重量比率, 用凝血酶分裂 3 小时而去除硫氧还蛋白和 His 标记。在这之后, 将咪唑添加至 15mM 的浓度, 并且将溶液再上样到 Ni-NTA 琼脂糖柱上, 以去除释放的硫氧还蛋白-His 标记。按先前所述(Johansson 等, J Biol Chem(生物化学杂志)281:21032-21039,2006)表达并且纯化 CTproSP-C^{L188Q}。简言之, 将蛋白在大肠杆菌中表达为具有硫氧还蛋白/His₆/S- 标记的融合蛋白。使用固定的金属亲和和离子交换层析纯化该蛋白。将凝血酶用来去除硫氧还蛋白-标记和 His₆- 标记。蛋白纯度用 SDS-PAGE 和非变性 PAGE 检验。

[0132] 所有得到的蛋白都是 S- 标记的,例如, S- 标记的人 CTproSP-C(SEQ ID NO :20)。除非另外指明,这些 S- 标记的蛋白用在下述实施例中。

[0133] 实施例 2- 分析 CTproSP-C_{Brichos}, CTproSP-C 和 CTproSP-CL^{188Q} 与在纤维素膜上的 SP-C 衍生的肽斑点的结合

[0134] SPOT 膜 (Frank R, J Immunol Meth(免疫学方法杂志), 267 :13-26, 2002), 其含有来源于 SP-C 的 10 个 - 残基的片段 (proSP-C²⁴⁻⁵⁸), 购自 Sigma Genosys (剑桥, 英国)。将该膜在甲醇中浸泡 5 分钟, 然后用 T-TBS (50mM Tris, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH 8, 含有 0.05% 吐温) 洗涤 3x30 分钟, 接着在 22°C 用在 T-TBS 中的 1 μg/ml CTproSP-C_{Brichos}, CTproSP-C 或 CTproSP-C^{L188Q} 温育 1 小时。然后, 将膜用在 TBS 中的 2% BSA 封闭 1 小时。在用 T-TBS 4x 洗涤 1 小时后, 将膜用在含有 2% BSA 的 T-TBS 中 1 : 5000 稀释的 HRP- 缀合的 S 蛋白 (Novagen, Madison, WI) 温育。然后, 将膜再次用 T-TBS 4x 洗涤 1 小时, 并且通过 ECL 按照供应商的使用说明显现结合。

[0135] 如上述详述, 探测结合到纤维素膜上的具有与完整的 SP-C 氨基酸序列 (SEQ ID NO :3) 相对应的重叠序列的 10 个 - 残基肽与 CTproSP-C (SEQ ID NO :4) 的结合。

[0136] 图 2A 显示 CTproSP-C 与含有来源于 SP-C 的 10 个 - 残基片段的斑点的结合。肽斑点 1-25 覆盖 N- 至 C- 端方向的 SP-C 序列 (参见图 2B), 例外的是斑点 8, 9, 11, 12, 17 和 18 (见下述)。斑点 7 包含 SP-C 中的 KRLLIVVVVV 区段, 而斑点 8 和 9 分别包含其 Leu- 置换的 (KRLLLLLLLL) 或 Ala- 置换的 (KRAAAAAAAAA) 形式。以相同的方式, 斑点 10-12 分别包含 RLLIVVVVVV (SP-C 中的位置 12-21), RLLLLLLLLL, 和 RAAAAAAAAA, 斑点 16-18 分别包含 VVVVVLVVVV (SP-C 中的位置 17-26), LLLLLLLLLL, 和 AAAAAAAAAA。斑点 21 和 23 包含相同的肽 (LVVVVIVGAL)。

[0137] 图 2B 显示 CTproSP-C 结合肽沿着 SP-C 序列的总结。虚线标记不与 CTproSP-C 结合的肽, 而实线表示与 CTproSP-C 结合的肽。SP-C 序列的下划线部分对应于其跨膜区。编号 1-35 是指成熟的 SP-C 肽 (SEQ ID NO :3), 在 proSP-C (SEQ ID NO :1) 中相对应的残基是 24-58。

[0138] 因此, 图 2A-B 显示结合基序存在于包含疏水残基的区域中, 即, 来源于 SP-C 跨膜“聚 -Val”区的肽。在图 2A 中分别比较斑点对 7/8, 10/11 和 16/17, 用聚 -Leu 替换聚 -Val 基序没有导致结合变化。相反, 在图 2A 中分别比较斑点 7/9, 10/12 和 16/18, 用聚 -Ala 替换聚 -Val 导致结合消除。

[0139] 将与用于分析 CTproSP-C 底物特异性相同的肽斑点膜用 CTproSP-C_{Brichos} (proSP-C⁹⁴⁻¹⁹⁷) 探测, 其表现出与 CTproSP-C (proSP-C⁵⁹⁻¹⁹⁷) 的结合模式非常相似的结合模式。如在图 2C 中所示, Brichos 结构域重现 CTproSP-C 结合特性。相反, CTproSP-C^{L188Q} 不结合 SP-C 的任何片段 (图 2D)。因此, CTproSP-C 和 CTproSP-C_{Brichos} 具有相同的底物特异性, 而 CTproSP-C^{L188Q} 表现出消除的底物结合。

[0140] 实施例 3-CTproSP-C 及其 Brichos 结构域的底物特异性

[0141] 为了研究重组人 CTproSP-C 及其 Brichos 结构域与所示残基的纤维素 - 结合的十聚体的结合, 将所示氨基酸残基的十聚体共价附着到纤维素 SPOT 膜 (Frank R, J Immunol Meth(免疫学方法杂志), 267 :13-26, 2002) 上。按实施例 1 所述在大肠杆菌中生产重组人 S- 标记的 CTproSP-C (SEQ ID NO :20) 和人 CTproSP-C 的 (S- 标记的) Brichos 结构域。

[0142] 将膜用在含有 0.05%吐温的 50mM Tris,137mM NaCl,2.7mM KCl,pH 8(T-TBS) 中的 $1\mu\text{g/ml}$ CTproSP-C 在 22°C 温育 1 小时。在用 2% BSA 封闭 1 小时并且用 T-TBS 4x 洗涤 1 小时后,将膜用 1 : 5000 稀释的 HRP- 缀合的 S- 蛋白 (Novagen, Madison, WI) 温育。然后,将膜按上述再次洗涤,并且通过增强的化学发光显现结合的 S- 标记的 CTproSP-C, 参见图 3A。CTproSP-C 结合 V, I, L, F, M, 或 Y 的片段,但是不结合 A, W, G, P, 或 T 的对应体。因此,CTproSP-C 按照生物学疏水性等级结合促进膜插入的残基并且结合 Y。突变的人 CTproSP-C^{L188Q} 用作对照,其不结合人 Bri 蛋白的 SP-C 和 ER- 腔部分,并且均不能结合任意膜结合的肽。

[0143] 人 CTproSP-C 的 Brichos 区重现人 CTproSP-C 的结合能力。(数据未显示)

[0144] 实施例 4-CTproSP-C 的底物特异性

[0145] 为了研究 CTproSP-C 的结合特异性,将在非螺旋(靶标,非- α ,第一泳道)或处于螺旋构象(靶标, α ,第二泳道)的 LLLLLLLLILLIILGALL 肽,和非-靶标肽(第三和第四泳道)共价附着到纤维素 SPOT 膜 (Frank R, J Immunol Meth(免疫学方法杂志), 267 :13-26, 2002) 上。对于不同的构象,将肽由 50%的水性甲酸印迹,在甲酸中所述肽以 β -链构象存在,或由乙醇印迹,在乙醇中其是螺旋的。为了排除不同的溶剂引起 CTproSP-C 的假象结合的可能性,将非-靶标肽(IPCCPV)由 50%的水性甲酸(第三泳道)或乙醇(第四泳道)吸附。使用 PR 648 Slot Blot 多孔过滤器 (Amersham Biosciences(安玛西亚生物学), 美国)将肽印迹到硝基纤维素膜(Whatman, 德国)上。添加 $1\mu\text{g/ml}$ 重组人 CTproSP-C, 并且在 22°C 温育 2 小时。然后,将膜用 Tris- 缓冲盐水, pH 7 重复洗涤,并且通过如实施例 3 的免疫检测和增强的化学发光显现结合的 CTproSP-C。如在图 3b 中所示, CTproSP-C 专一地结合采取非螺旋构象的肽。

[0146] 实施例 5-CTproSP-C 的抗-淀粉状蛋白特性

[0147] 在实验开始时和在 37°C 单独(-)或与 $2.5\mu\text{M}$ CTproSP-C(+) 温育 7 天后,可溶 $A\beta_{1-40}$ ($25\mu\text{M}$) 的量。电子显微照片显示来自单独的 $A\beta$ 的丰富的淀粉状蛋白原纤维,对于 $A\beta$ +CTproSP-C 在 6 天温育后缺少淀粉状蛋白原纤维。在实验开始时,在任何样品中没有观察到原纤维。在将 $A\beta$ 由储液稀释在 DMSO 中后,该实验用在 10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 150mM 氯化钠中的 $A\beta$ 进行。将 $A\beta_{1-40}$ 在 37°C 在搅动下用和不用 $2.5\mu\text{M}$ CTproSP-C 温育。

[0148] 在实验开始和在 7 天后,取出样品以确定聚集水平。将样品以 $16000\times g$ 离心 6 分钟,取出上清,并且以 $16000\times g$ 再离心 2 分钟。然后,通过非还原条件下在 10-16% Tris- 三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tris-Tricine)凝胶上的 SDS-PAGE 并且用考马斯染色而分析来自最后离心的上清。对于电子显微镜检,将 $2\mu\text{l}$ 的等分试样在 200- 目的铜栅格上吸附 1 分钟,并且用 2% 乙酸双氧铀(uranyl acetate) 染色 30 秒,然后使用在 75kV 操作的日立 H7100 显微镜 (Hitachi H7100 microscope) 检验并且照相。

[0149] 得到的 SDS-PAGE 凝胶和照片显示在图 3c 中。显然 CTproSP-C 在体外完全阻断 $A\beta$ 的淀粉状蛋白原纤维形成和聚集。

[0150] 实施例 6-CTproSP-C 防止 $A\beta_{1-40}$ 的原纤维形成

[0151] $A\beta_{1-40}$ (SEQ ID NO :19) 购自 Bachem(德国)并且以冻干状态保存在 -70°C 备用。为了促进单体起始的溶液,将肽以 1mg/ml 在二甲亚砜(DMSO)中溶解、振荡并且声波处理,然后稀释在工作缓冲液中。

[0152] 如实施例 1 所述表达并且纯化人重组 CTproSP-C (SEQ ID NO :20)。

[0153] $A\beta_{1-40}$ 聚集和原纤维形成实验用在含有 10% (v/v) DMSO 的 10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 150mM 氯化钠中的 25 μ M 的 $A\beta$ 浓度进行。将 $A\beta_{1-40}$ 用和不用 25 和 2.5 μ M CTproSP-C 在 37°C 在搅动下温育。在不同的时间点, 取出样品确定聚集水平。将样品以 16000 \times g 离心 6 分钟, 取出上清并且以 16000 \times g 再离心 2 分钟。然后, 通过非还原条件下在 10-16% Tris-三(羟甲基)甲基甘氨酸 (Tris-Tricine) 凝胶上的 SDS-PAGE 并且用考马斯染色而分析来自最后离心的上清。作为对照, 将 $A\beta_{1-40}$ 用 2.5 μ M 鸡半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (MW 13.3kDa) 或人抗凝血酶 (MW 58kDa) 以与上述相同的方式温育。

[0154] 为了确定原纤维形成的程度, 将 $A\beta_{1-40}$ 用或不用 2.5 μ M CTproSP-C、以及 25 μ M 鸡半胱氨酸蛋白酶抑制剂或牛血清白蛋白按上述温育。6 天后, 取出样品, 并且通过透射电子显微镜 (TEM) 分析, 参见下文。

[0155] 为了研究 CTproSP-C 解离已经形成的原纤维的能力, 将 25 μ M $A\beta_{1-40}$ 在 37°C 摇动条件下温育 6 天, 原纤维的存在通过 TEM 验证, 然后加入 CTproSP-C 至终浓度 25 μ M。将样品再温育 1-7 天, 并且然后再使用 TEM 估算原纤维的量。

[0156] 对于每份样品, 将 2 μ l 的等分试样在 200-目的铜栅格上吸附 1 分钟, 并且用 2% 乙酸双氧铀染色 30 秒, 然后使用在 75kV 操作的日立 H7100 显微镜 (Hitachi H7100 microscope) 检验并且照相。

[0157] 将 $A\beta_{1-40}$ 在存在和不存在 CTproSP-C 的条件下以 1 : 1 和 10 : 1 的摩尔比温育。图 4 显示在温育 6 天后获得的 TEM 照片。简言之, 图 4 显示由在 37°C 在具有 10% DMSO (v/v) 的 10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 150mM 氯化钠中单独温育的 25 μ M $A\beta_{1-40}$ (A), 与 25 μ M CTproSP-C (B), 2.5 μ M MCTproSP-C (C), 25 μ M BSA (D) 或 25 μ M 鸡半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (E) 一起温育的 25 μ M $A\beta_{1-40}$ 形成的 16000 \times g 沉淀物的透射电子显微照片。标尺 = 100nm。

[0158] 在温育 6 天后获得的 TEM 照片显示在存在 CTproSP-C 的条件下, 甚至在小于等摩尔比例 (图 4B-C) 时, $A\beta_{1-40}$ 的原纤维形成 (图 4A) 完全被消除。相对于 $A\beta_{1-40}$ 等摩尔量的鸡半胱氨酸蛋白酶抑制剂和 BSA 均不防止 $A\beta_{1-40}$ 原纤维形成 (图 4D-E), 这表明 CTproSP-C 和 $A\beta_{1-40}$ 之间相互作用的特异性。

[0159] 将预先形成的 $A\beta_{1-40}$ 的淀粉状蛋白原纤维与 CTproSP-C 以相对于用来形成原纤维的 $A\beta_{1-40}$ 浓度为 1 : 1 摩尔比例温育。在用 CTproSP-C 温育多至 7 天后, 在通过 TEM 观察到的原纤维的量或表现上没有变化 (数据未显示)。这些实验表明, CTproSP-C 不具有解离已经形成的原纤维的能力, 而是与在原纤维形成途径上的物质 (species) 相互作用。

[0160] 实施例 7-CTproSP-C 防止 $A\beta_{1-40}$ 聚集

[0161] 将 $A\beta_{1-40}$ 用 CTproSP-C 以及对照蛋白鸡半胱氨酸蛋白酶抑制剂或人抗凝血酶以 $A\beta$ / 蛋白摩尔比例 10 : 1 进行温育。7 天后, 通过 SDS-PAGE 分析在以 16000 \times g 离心后的可溶 $A\beta_{1-40}$ 的量。

[0162] 图 5 显示将 25 μ M $A\beta_{1-40}$ 在具有 10% DMSO (v/v) 的 10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 150mM 氯化钠中在存在或不存在 2.5 μ M CTproSP-C (CTC), 鸡半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (Cyst) 或人抗凝血酶 (HAT) 的条件下温育 0 和 7 天的 16000 \times g 可溶级分的 SDS-PAGE (A); 和将 25 μ M $A\beta_{1-40}$ 在具有 10% DMSO (v/v) 的 10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 150mM 氯化钠中在存在或不存在 2.5 μ M CTproSP-C 的条件下温育 0 或 20 天的 16000 \times g 可溶级分的

SDS-PAGE(B)。

[0163] 对于所有混合物,在 $t = 0$ 时 $A\beta$ 的量是相等的,但是 7 天后,从具有单独的 $A\beta$ 或与鸡半胱氨酸蛋白酶抑制剂共同温育的样品没有观察到 $A\beta$ 。在与抗凝血酶共同温育的样品中观察到少量的可溶 $A\beta$,而含有 CTproSP-C 的样品表现出与在 $t = 0$ 时观察到的几乎等量的可溶 $A\beta$ (图 5A)。甚至在将 CTproSP-C 和 $A\beta$ 共同温育 20 天后,仍发现可溶的 $A\beta$ (图 5B)。

[0164] 如在图 5 中所示,CTproSP-C 能够保持 $A\beta$ 可溶状态多至 20 天,并且相似尺寸的对照蛋白不能做到这样进一步表明 CTproSP-C 作用是基于特定的相互作用。

[0165] 实施例 8-CTproSP-C 防止 $A\beta_{1-40}$ 聚集

[0166] 将 $A\beta_{1-40}$ 溶解在 DMSO 中至浓度 $231 \mu M$,并且用或不用在 50mM 乙酸铵缓冲液, pH 7.0 中的 $25 \mu M$ CTproSP-C 稀释至浓度 $25 \mu M$ 。立即取来自每份混合物的样品进行 MALDI 分析。然后将溶液在 $37^\circ C$ 搅动下温育 2 天,然后在 $22^\circ C$ 不摇动再温育 4 天。

[0167] 对于基质-辅助的激光解吸离子化(matrix-assisted laser desorption ionisation) (MALDI) 分析,将样品稀释在具有 0.1% 的三氟乙酸(TFA)的 30% 乙腈中至 $A\beta_{1-40}$ 浓度 $4 \mu M$,将 $0.5 \mu l$ 的每种样品与在 30% 乙腈,0.1% TFA 中的 $0.5 \mu l$ 的 $0.8 \mu M$ 的促生长素抑制素混合。将混合物上样在由在丙酮中的 20mg/ml 溶液预先结晶在 MALDI 靶标板上的芥子酸层顶部,并且与溶解在 50% 乙腈,0.1% TFA 中的 $1 \mu l$ 芥子酸 (20mg/ml) 共结晶。在以利用延迟的提取的线性模型操作的 Bruker Autoflex (Bruker Daltonics, Billerica, MA) 质谱仪上获得在 2000-10000 质量/电荷比例(m/z)的数据。对于每种样品自动获得 1000 次发射;对于 50 个不同的位置,使用预先确定的发射模式,平均每个位置 20 次激光发射的各个批次。

[0168] 当将 $25 \mu M$ $A\beta_{1-40}$ 用或不用等摩尔量的 CTproSP-C 在 $37^\circ C$ 在搅动条件下温育 2 天并且在 $22^\circ C$ 再温育 4 天时,CTproSP-C 对 $A\beta_{1-40}$ 聚集的抑制作用是明显的。通过 MALDI MS 分析样品中单体、可溶 $A\beta_{1-40}$ 的存在,使用促生长素抑制素作为内部非聚集标准以获得关于肽的可靠的浓度估算。使用对于每种 MALDI 靶标的一些不同点的自动收集,以最小化人为的误差和偏见。

[0169] 图 6 显示使用促生长素抑制素(理论质量 3149.61Da)作为内部标准在通过 MALDI MS 估测的溶液中 $A\beta_{1-40}$ (理论质量 4329.86Da) 的定量。组 (A) 和 (B) 显示单独的 $25 \mu M$ $A\beta_{1-40}$,而 (C) 和 (D) 显示 $25 \mu M$ $A\beta_{1-40}+25 \mu M$ CTC。(A) 和 (C) 中的样品在温育前分析,并且 (B) 和 (D) 中的样品在 pH7.0 的 50mM 乙酸铵缓冲液中,在 $37^\circ C$ 搅动下温育 2 天且在 $22^\circ C$ 再温育 4 天后进行分析。

[0170] 使用这一方法,获得在促生长素抑制素和 $A\beta_{1-40}$ 浓度之间的良好的相关性 ($R^2 > 0.9$)。单独温育的 $A\beta_{1-40}$ 表现出相对于促生长素抑制素的可溶肽的 80% 减少(图 6A 和 6B),而在含有 $A\beta_{1-40}$ 和 CTproSP-C 的样品中,可溶的 $A\beta_{1-40}$ 的量随着分析的时间阶段保持不变(图 6C 和 6D)。因此,MALDI 质谱证实 CTproSP-C 具有对 $A\beta_{1-40}$ 聚集的抑制性作用,即,保持 $A\beta_{1-40}$ 处于可溶的、单体状态。

[0171] 实施例 9-使用大小-排阻层析 (SEC) 和免疫印迹分析进行 CTproSP-C 与 $A\beta_{1-40}$ 的相互作用研究

[0172] 利用与免疫印迹偶联的 SEC 来研究 $A\beta_{1-40}$ 与 CTproSP-C 之间的相互作用。在

附在 FPLC 仪器 (Amersham Biosciences (安玛西亚生物科学)) 上的 Superdex 200 柱 (Amersham Biosciences (安玛西亚生物科学), Uppsala, 瑞典) 上进行 SEC。将柱用 10mM 磷酸钠缓冲液 pH 7.0, 150mM 氯化钠平衡, 并且记录在 214nm 的吸光度。将该柱最初用凝血因子 I (340kDa), 醛缩酶 (158kDa), 牛血清白蛋白 (67kDa) 和鸡半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (13.3kDa) 校准。

[0173] 对于相互作用研究, 在 10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 150mM 氯化钠, 10% (v/v) DMSO 中制备三种不同的样品: (i) 34 μ M $A\beta_{1-40}$, (ii) 34 μ MCTproSP-C 和 (iii) 各 34 μ M 的 $A\beta_{1-40}$ 和 CTproSP-C。在制备后将所有的样品直接应用到柱上, 并且用与用于平衡相同的缓冲液以 0.7ml/ 分钟的流速洗脱。从所有的运行中收集 1.2ml 的级分, 并且使用 PR 648 Slot Blot 多孔过滤器 (Amersham Biosciences (安玛西亚生物科学), 美国) 将 100 μ l/ 级分印迹到硝基纤维素膜 (Whatman, 德国) 上。

[0174] 对于包含 $A\beta_{1-40}$ 和 CTproSP-C 二者的样品, 分析两组印迹, 以允许检测两种肽。为了检测 $A\beta_{1-40}$, 将膜在磷酸缓冲盐水 (PBS), pH 7.4 中煮沸 5 分钟, 并且允许在 TBS- 吐温 (0.1%) 中冷却, 然后用 5% 脱脂奶粉封闭。将膜用单克隆抗体 4G8 (1 : 2000, Signet, UK) 探测, 然后用抗-小鼠 HRP- 缀合的二级抗体 (1 : 5000, GE Healthcare (GE 卫生保健), UK) 探测。为了检测 S- 标记的 CTproSP-C, 将膜用 5% 脱脂奶粉封闭, 并用 HRP- 缀合的 S- 蛋白 (1 : 5000, Novagen, 美国) 探测。使用增强的化学发光 (Millipore) 来检测两种情形中的抗体结合。照片 J 用来测量斑点的强度。

[0175] 图 7 显示用抗体 4G8 或 S- 蛋白探测的 $A\beta$ 和 $A\beta$ +CTproSP-C (" CTC ") 的 SEC 级分的免疫印迹分析。图 7A 显示与洗脱体积 85-89ml 相对应的 SEC 级分的免疫印迹分析。左侧显示上样到柱上的样品中的多肽内容物。上面两排用识别 $A\beta_{1-40}$ 的抗体 4G8 探测, 并且下面两排用 S- 蛋白探测以检测 S- 标记的 CTproSP-C (SEQ ID NO :20)。图 7B 和 7C 显示用抗体 4G8 (B) 或 S- 蛋白 (C) 探测的 SEC 级分 (洗脱体积 75-110ml) 的免疫印迹的强度。含有 $A\beta$ +CTproSP-C 的样品由实线表示, 而单独的 $A\beta$ (B) 和单独的 CTproSP-C (C) 由虚线表示。箭头标记由具有已知质量的蛋白的洗脱位置估测的分子质量。该附图代表三次独立的运行。

[0176] $A\beta_{1-40}$ 的 214nm 吸光度模式表明与存在以外水体积洗脱的低数目寡聚体物质和少量的较大物质相容的模式 (未显示), 这表明存在前纤维 (pre-fibrillar) 可溶的寡聚体。

[0177] 在 $A\beta_{1-40}$ +CTproSP-C 样品中, 不存在较大的 $A\beta$, 这进一步支持来自聚集测定的结果。CTproSP-C 自身表现为两组低聚物。明显的主导峰在与三聚体 - 五聚体大小相对应的位置洗脱, 并且另一个峰在与十二聚体相对应的位置洗脱。这一结果与分析式超离心和 ESI 质谱数据充分一致, 表明 CTC 三聚体及其寡聚体是主要物质 (C Casals 等, Febs J, 275 : 536-547, 2008)。

[0178] 与单独的 CTproSP-C 洗脱相比较, 关于 $A\beta_{1-40}$ +CTproSP-C 的 SEC 的吸光度模式表明与 CTproSP-C 三聚体 - 五聚体相对应的峰增加约 30%, 这表明 $A\beta$ 结合并且稳定 CTproSP-C 三聚体 - 五聚体。与 $A\beta$ /CTproSP-C 复合物相对应的特有的峰无一能够通过吸光度测量检测到, 这可能是由于单独的 CTproSP-C 的相当大的洗脱体积。

[0179] 然而, $A\beta_{1-40}$ 和 CTproSP-C 的混合物的 SEC, 然后进行级分的斑点印迹分析, 清楚地表现与单独的多肽相比较的特有的峰 (图 7)。这表示 $A\beta$ 和 CTproSP-C 相互作用并且

形成稳定的复合物。所观察到的新的峰与约 110kDa 的复合物相对应,并且伴有与~ 52kDa 相对应的 A β 峰的损失(图 7B 和 C)。暗示地,因此新的物质可以是与 CTC 三聚体(55kDa)结合的 A β ₁₋₄₀(52kDa)的 12-mer。

[0180] 因此,SEC 表明两种分子相互作用并且形成在层析过程中稳定的复合物。似乎所形成的复合物由与 A β 12-mer 相互作用的 CTproSP-C 三聚体组成。这些发现与存在 A β 寡聚体相容,A β 寡聚体是可能的胶囊样结构,其能够在 SEC 和 SDS-PAGE 过程中保持完整无损并且能够与 CTproSP-C 缔合。

[0181] 实施例 10- 使用电雾化电离质谱 (ESI-MS) 进行的 CTproSP-C 和 A β ₁₋₄₀ 相互作用研究

[0182] 为了进一步研究 A β /CTproSP-C 复合物形成,使用 ESI 质谱分析 A β ₁₋₄₀ 和 CTproSP-C 的混合物以及单独的多肽。

[0183] 将以 1.1mM 的浓度在 -20°C 保存在 20mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 30mM 氯化钠中的 CTproSP-C(理论平均分子量 18264.89Da) 在 10mM 乙酸铵缓冲液, pH 6.9 中稀释至 10 μ M, 仅用于分析。将 A β ₁₋₄₀(理论平均分子量 4329.9Da) 溶解在具有 1% (v/v) 氨水的 10mM 碳酸氢铵缓冲液, pH10.8 中至 A β 浓度为 100 μ M, 并且保存在 -20°C 备用。当 CTproSP-C 和 A β ₁₋₄₀ 在一起分析时,在终 pH 为 7-8 的 10mM 碳酸氢铵缓冲液中制备 10 μ M CTC 和 50 μ M A β ₁₋₄₀ 的混合物。

[0184] 在 MassLynx 4.1 程序的控制下以阳离子模式操作的装备有 Z-雾化源的 QTOF Ultima API 质谱仪 (Waters, Milford, MA) 上获得数据, 1000-5000m/z, 每次扫描 2 秒, 扫描间时间间隔 0.1 秒。样品通过来自金属-包被的硼硅酸盐玻璃毛细状针 (Proxeon Biosystems, Odense, 丹麦) 的纳米流点雾化界面引入, 并且源温度设定为 80°C。雾化条件用 1.2-1.9kV 的毛细管电压调谐, 并且锥形和 RF 透镜能量分别为 100 和 38V。限制 ES 界面区的抽吸, 使得在背衬式皮拉尼真空压力计 (backing pirani vacuum gauge) 上的读数由 1.8 到 1.95mbar, 并且使用 5.85×10^{-5} mbar 的分析器压力, 其使用氩气作为碰撞气体。在 MS 模式中, 碰撞电压设定为 10V, 并且在 MS/MS 模式中, CTproSP-C/A β ₁₋₄₀ 复合物通过将碰撞电压增加至 80V 而分裂。该装置以分辨率为 10,000 (FWHM 定义) 的 V- 模式 (单反射镜模式) 操作, 并且质量等级针对 PEG-3400 校正。

[0185] 图 8 显示在 10mM 碳酸氢铵缓冲液, pH 7-8 中与 50 μ M A β ₁₋₄₀ 混合的 10 μ M CTproSP-C (CTC) 的纳米-雾化 ESI-MS 光谱。标记的峰对应 CTproSP-C 和具有不同电荷状态的 A β ₁₋₄₀ 的异聚体, 其由单独的 CTC 或 A β ₁₋₄₀ 的光谱推测而来。

[0186] 比较由单个的肽和混合样品获得的峰模式表明在 A β ₁₋₄₀ 和 CTproSP-C 之间形成复合物。发现 CTproSP-C 寡聚体 (图 8, 未注解的峰)。对于所述混合物, 出现一些不与 CTproSP-C 或 A β 的同聚体相对应但是可能另外指定为 CTproSP-C/A β 异聚体的峰 (图 8)。发现与具有 9 个 (m/z 2511) 或 10 个 (m/z 2260) 电荷的一个 A β ₁₋₄₀ 结合的一个 CTproSP-C 相对应的低信号强度的峰。观察到对应于与一个 A β ₁₋₄₀ 肽复合的 CTproSP-C 三聚体的具有 16-23 个电荷 (m/z 3696-2572) 的完整电荷状态的包膜 (charge state envelope)。

[0187] 选择 m/z 3485 的峰 (图 8) 用于 MS/MS, 以验证其表示两种肽的复合物, 即, 通过 MS/MS 分裂 CTproSP-C/A β 复合物, 所述 m/z 3485 的峰不在单独的 CTproSP-C 光谱中存在, 并且对应于 [3CTproSP-C+A β]¹⁷⁺。图 9 显示 (A) 在 10mM 碳酸氢铵缓冲液, pH 7-8 中

的 $10 \mu\text{M}$ CTproSP-C(CTC) 和 (B) 在碳酸氢铵缓冲液, pH 7-8 中与 $50 \mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{1-40}$ 混合的 $10 \mu\text{M}$ MCTproSP-C 纳米雾化 ESI-MS 光谱。在图 9C 中,选择在图 9B 中混合样品中 m/z 3484 观察到的离子进行 MS/MS,所用的碰撞电压为 80V。图 9D 是图 9C 1000-1600 的 m/z 范围的放大,其中标记对应于由 CTproSP-C/ $\text{A}\beta$ 复合物释放的 $\text{A}\beta_{1-40}$ 的峰。

[0188] 将碰撞电压由 10V 增加至 80V,这明显足以分裂复合物的部分。这产生多个子离子,主要对应于 CTproSP-C 和 $\text{A}\beta_{1-40}$ 单体,但是也对应于 CTproSP-C 三聚体(图 9C 和 9D)。有趣的是,在所述子离子中,发现 CTproSP-C 的六聚体,这表明至少所选离子的一部分实际上对应于 $[\text{6CTproSP-C}+2\text{A}\beta]^{34+}$ 或更大的异聚体。在碰撞后的光谱中还存在由二聚体 CTproSP-C 和具有 10(m/z 4087) 和 9(m/z 4541) 电荷的单体 $\text{A}\beta_{1-40}$ 组成的异聚体,其在 MS 模式中没有发现(图 9C 和 9D)。

[0189] 因此,使用 ESI 质谱法,所发现的主要的复合物是与单体 $\text{A}\beta$ 相互作用的 CTproSP-C 三聚体(图 8)。CID 实验证实所述复合物的 $\text{A}\beta$ /CTproSP-C 性质(图 9)。CTproSP-C/ $\text{A}\beta$ 复合物的化学计量在 SEC 和 ESI-MS 数据之间明显不同。在破坏 $\text{A}\beta$ 胶束或类似的聚集物方面,ESI-MS 可能比 SEC 更有效,而不破坏直接的 CTproSP-C/ $\text{A}\beta$ 相互作用。将 SEC 和 ESI-MS 数据合并表明 CTproSP-C 三聚体能够结合一个以近似十二聚体组件存在的 $\text{A}\beta$ 分子。

[0190] 实施例 11- 蛋白伴侣测定

[0191] 为了评估 CTproSP-C 作用为经典蛋白伴侣的能力,即,防止不稳定的蛋白聚集的能力,使用用醇脱氢酶 (ADH) 或胰岛素的测定。

[0192] 通过在 Cary 3 分光光度计 (Varian Techtron, Mulgrave, 澳大利亚) 中测量光散射(在 360nm 的表观吸光度),将有和无 CTproSP-C 存在的来自面包酵母的 ADH 的热诱导的聚集在 50°C 追踪 15 分钟。所有的实验用分别为 $6.25 \mu\text{M}$ 的 ADH 和 CTproSP-C 浓度进行,并且在 20mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.4, 150mM 氯化钠中制备样品。

[0193] 图 10A 显示在不存在(虚线)和存在(实线)等摩尔量的 CTproSP-C(CTC) 的条件下热诱导的 ADH 的聚集。在 50°C , ADH 在 5 分钟内开始聚集。加入等摩尔量的 CTproSP-C 导致 ADH 聚集之前迟滞期的较小延长。与蛋白伴侣的作用相比,例如,导致完全防止 ADH 聚集的 sHsp α -晶体蛋白 (JI Clark & QL Huang, Proc Natl Acad Sci USA (美国国家科学院学报) 93:15185-15189, 1996), 这种作用是小的。

[0194] 有和无 CTproSP-C 的胰岛素 β -链的还原-诱导的聚集同样通过测量 360nm 的表观吸光度进行监测。将包含在 50mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 100mM 氯化钠中的 $40 \mu\text{M}$ 胰岛素 (Sigma, 瑞典) 的溶液,用或不用摩尔比例 1 : 1 的 CTproSP-C 在 41°C 预先温育 5 分钟。然后加入二硫苏糖醇 (DTT) 至终浓度 $20 \mu\text{M}$, 并且在 41°C 监测 360nm 处吸光度的变化达 15 分钟。

[0195] 图 10B 显示在不存在(虚线)和存在(实线)等摩尔量的 CTproSP-C(CTC) 的条件下还原-诱导的胰岛素聚集。在 41°C 胰岛素的还原导致在约 3 分钟后开始聚集。以 1 : 1 摩尔比例加入 CTproSP-C 完全不影响胰岛素聚集。

[0196] 这些结果似乎表明,CTproSP-C 不能防止 ADH 和胰岛素聚集。这表明 CTproSP-C 不具有传统的蛋白伴侣(诸如 Hsp70 或 sHsps) 的典型特性。

[0197] 实施例 12-CTproSP-C 及其 Brichos 结构域的底物结合特异性

[0198] 按实施例 1 所述生产截短的人 CTproSP-C。与原始 Brichos 结构域构建体的位置 94 相比较,该蛋白在 proSP-C 中的位置 86 起始,导致人 CTproSP-C 的 Brichos 结构域的延长形式。延长的 CTproSP-C_{Brichos} 蛋白的序列为 SEQ ID NO :21。

[0199] 在存在不同浓度的三肽 VVV 和 LLL 的条件下,通过 ESI-MS 研究延长的 CTproSP-C_{Brichos} 和 CTproSP-C 的底物结合特异性。由解卷积的光谱 (deconvolution spectra) 确定蛋白-三肽异聚体 [PL] 和蛋白 (即,延长的 CTproSP-C_{Brichos} 或 CTproSP-C) [P] 的相对浓度。将 [PL]/[P] 的比率以三肽浓度的函数绘图,以获得关于两种蛋白和两种配体的结合曲线。如在图 11 中所示,发现延长的 CTproSP-C_{Brichos} (" BRICHOS") 和 CTproSP-C (" CTC") 以相似的方式结合两种三肽 LLL (图 11A) 和 VVV (图 11B)。因此,延长的 Brichos 结构域具有与全长 CTproSP-C 相同的底物结合模式。

[0200] 实施例 13- 使用 A β 肽和 CTC 进行的圆二色 (CD) 光谱研究

[0201] A β 形成导致其聚集并且最终形成原纤维的 β -折叠结构。我们的目的是确定 CTproSP-C 是否能够稳定随机卷曲状态的 A β 肽,因此防止 A β 肽形成 β -折叠和原纤维。CTproSP-C 是一种已经发现与 A β 肽相互作用的蛋白。我们利用 CD 光谱使用 A β (1-40) 以及 A β (1-42) 来研究其与 CTproSP-C 的相互作用。

[0202] 将 A β 肽预先用 TFA 和 HFIP 处理,然后通过振荡和声波处理在 20mM NaOH 中溶解至 200 μ M 的浓度。然后,将该肽溶液用 10mM 磷酸缓冲液, pH 7 稀释至最终肽浓度 20 μ M。CTproSP-C 以 20 μ M 的浓度使用。用 Jasco J-810-150S 分光偏振仪 (Jasco, Tokyo, 日本), 使用 1nm 的带宽和 2 秒的响应时间,在 22°C 记录远紫外区 (190-260nm) 的 CD 光谱,并且收集 10 个数据点 /nm。以波长的函数绘制以 mdeg 为单位的 CD 信号。

[0203] 在数个小时后, A β (1-40) 和 A β (1-42) 已经由时间 = 0 时的主要的随机二级结构转变为主要为 β -折叠的结构。与单独的 A β (1-40) 或 A β (1-42) 的行为相反,以等摩尔量存在 CTproSP-C 保持 A β 构象至少 5 小时基本上不变。从 CTproSP-C 与 A β (1-40) 或 A β (1-42) 的混合物的 CD 光谱中,减去 CTproSP-C 的贡献。所得到的光谱表示,在观察时间期间中,两种 A β 肽保持主要的随机构象,由此避免 β -折叠聚集。

[0204] 表示相同数据的备选方式是绘制关于有和无 CTproSP-C " CTC" 的 A β (1-40) 和 A β (1-42) 的 217nm CD 信号 (β -折叠含量的量度) 幅度随时间的变化,如图 12 所示。这表明,尽管对于 A β (1-40) (图 12A) 或 A β (1-42) (图 12B), CD_{217nm} 信号幅度随时间增加 (正方形),但是存在 (1 : 1) CTproSP-C (圆形) 很大程度消除了这种增加。

[0205] 这些结果表明人 CTproSP-C 对 A β (1-40) 和 A β (1-42) 具有相似的结构影响。

[0206] 实施例 14- 细胞培养物实验

[0207] A β 多聚化产生对培养物中的细胞有毒的组件 (assemblies)。使用 MTT (3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溴化物) 来监测用不存在或存在 CTproSP-C 或 CTproSP-C_{Brichos} 条件下聚合的 A β ₁₋₄₂ 处理后的 PC12 细胞的氧化能力。

[0208] 将 PC12 细胞在补充了 10% 胎牛血清和青霉素 / 链霉素 (National Veterinary Institute (国立兽医研究所), 瑞典) 的 DMEM 培养基中,在 5% 二氧化碳中培养。将细胞以适当的密度接种在 96-孔 Cell+ 板 (Sarstedt, 瑞典) 中。次日,将培养基更换为无酚红的补充了 10% 胎牛血清和青霉素 / 链霉素的 DMEM (45 μ l / 孔)。典型地,直接 (4 小时处理实验) 或在 37°C 单独或用等摩尔或 5 倍摩尔过量浓度的 CTproSP-C 或 CTproSP-C_{Brichos} 预先

温育 4 小时 (18 小时处理实验) 后, 加入 $10 \mu\text{M}$ 的 $\text{A}\beta_{1-42}$ ($5 \mu\text{l}/\text{孔}$), 产生 $1 \mu\text{M}$ 的终浓度。将具有用于 $\text{A}\beta$ 制备的等量的溶剂的 PBS 用作对照处理。将细胞用处理温育 4 或 18 小时, 然后加入以 $0.6\text{mg}/\text{ml}$ 溶解在无酚红 DMEM 中的 MTT ($50 \mu\text{l}/\text{孔}$), 产生 $0.3\text{mg}/\text{ml}$ MTT 的终浓度, 并且在 37°C 用所述细胞温育 2 小时。使用包含在水中的 50% 二甲基甲酰胺和 20% SDS 的溶解缓冲液溶解紫色甲臞晶体, 直接加入到细胞培养基中 ($100 \mu\text{l}/\text{孔}$)。记录在 575nm 的吸光度, 并且将对照处理设定为 100% 存活的细胞。

[0209] 实施例 15- 在转基因小鼠中的实验

[0210] 将表达具有与人中的阿尔茨海默相关的一个或多个突变的人 $\text{A}\beta$ 前体 (APP) 的小鼠典型地用来评估治疗策略。向仅表达具有 Swedish 突变的 APP (APP K670N/M671L) 或具有 Swedish 突变加 Arctic 突变 (APP E693G) (Lord A 等., Neurobiol Aging (神经学衰老) 27:67-77, 2006) 的 APP 的小鼠, 静脉内、腹膜内、鼻内、或颅骨内施用 $3-15\text{mg}/\text{kg}$ 剂量的 CTproSP-C 或 CTproSP-C_{Brichos}, 每周 1-3 次, 持续 10-30 周。尽管也使用其它量度, 诸如可溶的和不可溶的 $\text{A}\beta$ 的量和行为参数, 但是通过与假-或未处理的对照相比较组织学检验在 CNS 中的斑沉积而评估治疗的作用。

[0211] 实施例 16- 施用给人

[0212] 给健康的个人和患有阿尔茨海默病的个人静脉内、腹膜内、鼻内、或颅骨内施用剂量为 $3-15\text{mg}/\text{kg}$ 的 CTproSP-C 或 CTproSP-C_{Brichos}, 一周 1-3 次, 持续 10-30 周。通过与假-或未处理的对照相比较组织学检验在 CNS 中的斑沉积而评估治疗的作用。也使用其它量度, 诸如可溶的和不可溶的 $\text{A}\beta$ 的量和行为参数。

[0001]

序列表

<110> 阿尔法贝塔公司
 <120> 用于治疗阿尔茨海默病的化合物和方法
 <130> PC-21044930
 <150> US 61/148,541
 <151> 2009-01-30
 <150> EP 09151790
 <151> 2009-01-30
 <160> 21
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)
 <400> 1
 Met Asp Val Gly Ser Lys Glu Val Leu Met Glu Ser Pro Pro Asp Tyr
 1 5 10 15
 Ser Ala Ala Pro Arg Gly Arg Phe Gly Ile Pro Cys Cys Pro Val His
 20 25 30
 Leu Lys Arg Leu Leu Ile Val Val Val Val Val Val Leu Ile Val Val
 35 40 45
 Val Ile Val Gly Ala Leu Leu Met Gly Leu His Met Ser Gln Lys His
 50 55 60
 Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Ile Gly Ala Pro Glu Ala Gln Gln
 65 70 75 80
 Arg Leu Ala Leu Ser Glu His Leu Val Thr Thr Ala Thr Phe Ser Ile
 85 90 95
 Gly Ser Thr Gly Leu Val Val Tyr Asp Tyr Gln Gln Leu Leu Ile Ala
 100 105 110
 Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr Ile Met Lys Ile Ala Pro
 115 120 125
 Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Asn Arg Lys Val His Asn Phe
 130 135 140
 Gln Met Glu Cys Ser Leu Gln Ala Lys Pro Ala Val Pro Thr Ser Lys
 145 150 155 160
 Leu Gly Gln Ala Glu Gly Arg Asp Ala Gly Ser Ala Pro Ser Gly Gly
 165 170 175
 Asp Pro Ala Phe Leu Gly Met Ala Val Asn Thr Leu Cys Gly Glu Val

[0002]

180	185	190
Pro Leu Tyr Tyr Ile 195		
<210> 2		
<211> 139		
<212> PRT		
<213> 人 (Homo sapiens)		
<400> 2		
His Met Ser Gln Lys His Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Ile Gly 1 5 10 15		
Ala Pro Glu Ala Gln Gln Arg Leu Ala Leu Ser Glu His Leu Val Thr 20 25 30		
Thr Ala Thr Phe Ser Ile Gly Ser Thr Gly Leu Val Val Tyr Asp Tyr 35 40 45		
Gln Gln Leu Leu Ile Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr 50 55 60		
Ile Met Lys Ile Ala Pro Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Asn 65 70 75 80		
Arg Lys Val His Asn Phe Gln Met Glu Cys Ser Leu Gln Ala Lys Pro 85 90 95		
Ala Val Pro Thr Ser Lys Leu Gly Gln Ala Glu Gly Arg Asp Ala Gly 100 105 110		
Ser Ala Pro Ser Gly Gly Asp Pro Ala Phe Leu Gly Met Ala Val Asn 115 120 125		
Thr Leu Cys Gly Glu Val Pro Leu Tyr Tyr Ile 130 135		
<210> 3		
<211> 35		
<212> PRT		
<213> 人 (Homo sapiens)		
<400> 3		
Phe Gly Ile Pro Cys Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Val 1 5 10 15		
Val Val Val Val Val Leu Ile Val Val Val Ile Val Gly Ala Leu Leu 20 25 30		
Met Gly Leu 35		
<210> 4		

[0003]

<211> 104
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)
 <400> 4
 Phe Ser Ile Gly Ser Thr Gly Leu Val Val Tyr Asp Tyr Gln Gln Leu
 1 5 10 15
 Leu Ile Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr Ile Met Lys
 20 25 30
 Ile Ala Pro Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Asn Arg Lys Val
 35 40 45
 His Asn Phe Gln Met Glu Cys Ser Leu Gln Ala Lys Pro Ala Val Pro
 50 55 60
 Thr Ser Lys Leu Gly Gln Ala Glu Gly Arg Asp Ala Gly Ser Ala Pro
 65 70 75 80
 Ser Gly Gly Asp Pro Ala Phe Leu Gly Met Ala Val Asn Thr Leu Cys
 85 90 95
 Gly Glu Val Pro Leu Tyr Tyr Ile
 100
 <210> 5
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 牛 (Bos taurus)
 <400> 5
 His Met Ser Gln Lys His Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Ile Thr
 1 5 10 15
 Gly Pro Glu Ala Gln Gln Arg Leu Ala Leu Ser Glu Arg Val Gly Thr
 20 25 30
 Thr Ala Thr Phe Ser Ile Gly Ser Thr Gly Thr Val Val Tyr Asp Tyr
 35 40 45
 Gln Arg Leu Leu Ile Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr
 50 55 60
 Ile Met Lys Met Ala Pro Gln Asn Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Thr
 65 70 75 80
 Arg Lys Leu Gln Asn Phe Gln Ala Lys Pro Gln Val Pro Ser Ser Lys
 85 90 95
 Leu Gly Gln Glu Gln Gly His Asp Ala Gly Ser Ala Phe Ser Gly Asp
 100 105 110
 Leu Ala Phe Leu Gly Arg Thr Val Ser Thr Leu Cys Gly Glu Val Pro

[0004]

115	120	125
Leu Tyr Tyr Thr 130		
<210> 6		
<211> 133		
<212> PRT		
<213> 恒河猴 (<i>Macaca mulatta</i>)		
<400> 6		
His Met Ser Gln Lys His Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Ile Gly 1 5 10 15		
Ala Pro Glu Ala Gln Gln His Leu Ala Arg Ser Gly His Leu Val Thr 20 25 30		
Thr Ala Thr Phe Ser Phe Gly Ser Thr Gly Leu Val Val Tyr Asp Tyr 35 40 45		
Gln Arg Leu Leu Ile Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Trp Cys Tyr 50 55 60		
Ile Met Lys Thr Ala Pro Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Thr 65 70 75 80		
Arg Lys Val Gln Asn Phe Gln Ala Lys Pro Ala Val Pro Thr Ser Lys 85 90 95		
Leu Asp Gln Val Glu Gly Arg Asp Ala Gly Ser Ala Pro Ser Arg Gly 100 105 110		
Asp Leu Ala Phe Leu Gly Met Ala Val Ser Thr Leu Cys Gly Glu Val 115 120 125		
Pro Leu Tyr Tyr Ile 130		
<210> 7		
<211> 135		
<212> PRT		
<213> 小鼠 (<i>Mus musculus</i>)		
<400> 7		
His Met Ser Gln Lys His Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Ile Gly 1 5 10 15		
Ala Pro Glu Thr Gln Lys Arg Leu Ala Pro Ser Glu Arg Ala Asp Thr 20 25 30		
Ile Ala Thr Phe Ser Ile Gly Ser Thr Gly Ile Val Val Tyr Asp Tyr 35 40 45		
Gln Arg Leu Leu Thr Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Tyr Cys Tyr		

[0005]

50 55 60
 Ile Met Lys Met Ala Pro Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Phe Ala
 65 70 75 80
 Arg Lys Leu Gln Asn Phe Arg Ala Lys Pro Ser Thr Pro Thr Ser Lys
 85 90 95
 Leu Gly Gln Glu Glu Gly His Asp Thr Gly Ser Glu Ser Asp Ser Ser
 100 105 110
 Gly Arg Asp Leu Ala Phe Leu Gly Leu Ala Val Ser Thr Leu Cys Gly
 115 120 125
 Glu Leu Pro Leu Tyr Tyr Ile
 130 135

<210> 8
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 水貂 (Mustela vison)
 <400> 8

His Met Ser Gln Lys His Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Glu Ala Gln Gln Arg Leu Ala Leu Gln Glu Arg Ala Gly Thr
 20 25 30
 Thr Ala Thr Phe Ser Ile Gly Ser Thr Gly Ile Val Val Tyr Asp Tyr
 35 40 45
 Gln Arg Leu Leu Ile Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr
 50 55 60
 Ile Met Lys Met Ala Pro Glu Asn Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Thr
 65 70 75 80
 Arg Lys Phe Gln Asn Phe Gln Val Lys Pro Ala Val Ser Thr Ser Lys
 85 90 95
 Leu Gly Gln Glu Glu Gly His Asn Ala Gly Ser Ala Ser Pro Gly Asp
 100 105 110
 Leu Asp Phe Leu Gly Thr Thr Val Ser Thr Leu Cys Gly Glu Val Pro
 115 120 125
 Leu Tyr Tyr Ile
 130

<210> 9
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> 兔 (Oryctolagus cuniculus)

[0006]

<400> 9

His Met Ser Gln Lys His Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Pro Glu Val Gln Gln Arg Leu Ala Leu Ser Glu Trp Ala Gly Thr
 20 25 30

Thr Ala Thr Phe Pro Ile Gly Ser Thr Gly Ile Val Thr Cys Asp Tyr
 35 40 45

Gln Arg Leu Leu Ile Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr
 50 55 60

Leu Met Lys Met Ala Pro Asp Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Ala
 65 70 75 80

Arg Lys Phe Gln Ala Asn Pro Ala Glu Pro Pro Thr Gln Arg Gly Gln
 85 90 95

Asp Lys Gly Pro Ala Ala Gly Pro Ala Ser Ser Gly Gly Glu Leu Ala
 100 105 110

Phe Leu Gly Ala Ala Val Ser Thr Leu Cys Gly Glu Val Pro Leu Ile
 115 120 125

Tyr Ile
 130

<210> 10

<211> 136

<212> PRT

<213> 大鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 10

His Met Ser Gln Lys His Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Ile Gly
 1 5 10 15

Gly Ala Pro Glu Thr Gln Lys Arg Leu Ala Leu Ser Glu His Thr Asp
 20 25 30

Thr Ile Ala Thr Phe Ser Ile Gly Ser Thr Gly Ile Val Leu Tyr Asp
 35 40 45

Tyr Gln Arg Leu Leu Thr Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Tyr Cys
 50 55 60

Tyr Ile Met Lys Met Ala Pro Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu
 65 70 75 80

Ala Arg Lys Phe Lys Asn Phe Gln Ala Lys Ser Ser Thr Pro Thr Ser
 85 90 95

[0007]

Lys Leu Gly Gln Glu Glu Gly His Ser Ala Gly Ser Asp Ser Asp Ser
 100 105 110

Ser Gly Arg Asp Leu Ala Phe Leu Gly Leu Ala Val Ser Thr Leu Cys
 115 120 125

Gly Glu Leu Pro Leu Tyr Tyr Ile
 130 135

<210> 11
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 哺乳动物中严格保守的序列

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(18)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> 可能的缺口位置

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(24)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(32)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (34)..(34)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (38)..(39)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (44)..(44)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (46)..(47)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(51)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

[0008]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (54)..(54)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (63)..(63)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (66)..(66)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (69)..(69)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (72)..(73)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (80)..(81)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (84)..(105)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89)..(94)
<223> 可能的缺口位置

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (107)..(108)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (110)..(112)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (114)..(118)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (116)..(118)
<223> 可能的缺口位置

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (120)..(124)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (128)..(129)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

[0009]

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (131)..(131)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (137)..(137)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (140)..(140)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (142)..(142)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

 <400> 11

 His Met Ser Gln Lys His Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Xaa Xaa
 1 5 10 15

 Xaa Xaa Pro Glu Xaa Gln Xaa Xaa Leu Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

 Thr Xaa Ala Thr Phe Xaa Xaa Gly Ser Thr Gly Xaa Val Xaa Xaa Asp
 35 40 45

 Tyr Gln Xaa Leu Leu Xaa Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Xaa Cys
 50 55 60

 Tyr Xaa Met Lys Xaa Ala Pro Xaa Xaa Ile Pro Ser Leu Glu Ala Xaa
 65 70 75 80

 Xaa Arg Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

 Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Leu Gly Xaa
 115 120 125

 Xaa Val Xaa Thr Leu Cys Gly Glu Xaa Pro Leu Xaa Tyr Xaa
 130 135 140

 <210> 12
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> 牛 (Bos taurus)

 <400> 12

 Phe Ser Ile Gly Ser Thr Gly Thr Val Val Tyr Asp Tyr Gln Arg Leu
 1 5 10 15

[0010]

Leu Ile Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr Ile Met Lys
20 25 30

Met Ala Pro Gln Asn Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Thr Arg Lys Leu
35 40 45

Gln Asn Phe Gln Ala Lys Pro Gln Val Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gln
50 55 60

Glu Gln Gly His Asp Ala Gly Ser Ala Phe Ser Gly Asp Leu Ala Phe
65 70 75 80

Leu Gly Arg Thr Val Ser Thr Leu Cys Gly Glu Val Pro Leu Tyr Tyr
85 90 95

Thr

<210> 13
<211> 98
<212> PRT
<213> 恒河猴 (*Macaca mulatta*)
<400> 13

Phe Ser Phe Gly Ser Thr Gly Leu Val Val Tyr Asp Tyr Gln Arg Leu
1 5 10 15

Leu Ile Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Trp Cys Tyr Ile Met Lys
20 25 30

Thr Ala Pro Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Thr Arg Lys Val
35 40 45

Gln Asn Phe Gln Ala Lys Pro Ala Val Pro Thr Ser Lys Leu Asp Gln
50 55 60

Val Glu Gly Arg Asp Ala Gly Ser Ala Pro Ser Arg Gly Asp Leu Ala
65 70 75 80

Phe Leu Gly Met Ala Val Ser Thr Leu Cys Gly Glu Val Pro Leu Tyr
85 90 95

Tyr Ile

<210> 14
<211> 100
<212> PRT
<213> 小鼠 (*Mus musculus*)
<400> 14

Phe Ser Ile Gly Ser Thr Gly Ile Val Val Tyr Asp Tyr Gln Arg Leu
1 5 10 15

[0011]

Leu Thr Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Tyr Cys Tyr Ile Met Lys
20 25 30

Met Ala Pro Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Phe Ala Arg Lys Leu
35 40 45

Gln Asn Phe Arg Ala Lys Pro Ser Thr Pro Thr Ser Lys Leu Gly Gln
50 55 60

Glu Glu Gly His Asp Thr Gly Ser Glu Ser Asp Ser Ser Gly Arg Asp
65 70 75 80

Leu Ala Phe Leu Gly Leu Ala Val Ser Thr Leu Cys Gly Glu Leu Pro
85 90 95

Leu Tyr Tyr Ile
100

<210> 15
<211> 97
<212> PRT
<213> 水貂 (Mustela vison)

<400> 15

Phe Ser Ile Gly Ser Thr Gly Ile Val Val Tyr Asp Tyr Gln Arg Leu
1 5 10 15

Leu Ile Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr Ile Met Lys
20 25 30

Met Ala Pro Glu Asn Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Thr Arg Lys Phe
35 40 45

Gln Asn Phe Gln Val Lys Pro Ala Val Ser Thr Ser Lys Leu Gly Gln
50 55 60

Glu Glu Gly His Asn Ala Gly Ser Ala Ser Pro Gly Asp Leu Asp Phe
65 70 75 80

Leu Gly Thr Thr Val Ser Thr Leu Cys Gly Glu Val Pro Leu Tyr Tyr
85 90 95

Ile

<210> 16
<211> 95
<212> PRT
<213> 兔 (Oryctolagus cuniculus)

<400> 16

Phe Pro Ile Gly Ser Thr Gly Ile Val Thr Cys Asp Tyr Gln Arg Leu
1 5 10 15

[0012]

Leu Ile Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr Leu Met Lys
 20 25 30

Met Ala Pro Asp Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Ala Arg Lys Phe
 35 40 45

Gln Ala Asn Pro Ala Glu Pro Pro Thr Gln Arg Gly Gln Asp Lys Gly
 50 55 60

Pro Ala Ala Gly Pro Ala Ser Ser Gly Gly Glu Leu Ala Phe Leu Gly
 65 70 75 80

Ala Ala Val Ser Thr Leu Cys Gly Glu Val Pro Leu Ile Tyr Ile
 85 90 95

<210> 17
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> 大鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 17

Phe Ser Ile Gly Ser Thr Gly Ile Val Leu Tyr Asp Tyr Gln Arg Leu
 1 5 10 15

Leu Thr Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Tyr Cys Tyr Ile Met Lys
 20 25 30

Met Ala Pro Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Ala Arg Lys Phe
 35 40 45

Lys Asn Phe Gln Ala Lys Ser Ser Thr Pro Thr Ser Lys Leu Gly Gln
 50 55 60

Glu Glu Gly His Ser Ala Gly Ser Asp Ser Asp Ser Ser Gly Arg Asp
 65 70 75 80

Leu Ala Phe Leu Gly Leu Ala Val Ser Thr Leu Cys Gly Glu Leu Pro
 85 90 95

Leu Tyr Tyr Ile
 100

<210> 18
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 哺乳动物中严格保守的序列

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(3)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>

[0013]

<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(11)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (33)..(33)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36)..(37)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (44)..(45)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(69)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (53)..(58)
<223> 可能的缺口位置

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (71)..(72)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (74)..(76)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (78)..(82)
<223> 不严格保守的氨基酸残基

<220>

[0014]

<221> MISC_FEATURE
 <222> (80)..(82)
 <223> 可能的缺口位置

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (84)..(88)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (92)..(93)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (95)..(95)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (101)..(101)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (104)..(104)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (106)..(106)
 <223> 不严格保守的氨基酸残基

 <400> 18

 Phe Xaa Xaa Gly Ser Thr Gly Xaa Val Xaa Xaa Asp Tyr Gln Xaa Leu
 1 5 10 15

 Leu Xaa Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Xaa Cys Tyr Xaa Met Lys
 20 25 30

 Xaa Ala Pro Xaa Xaa Ile Pro Ser Leu Glu Ala Xaa Xaa Arg Lys Xaa
 35 40 45

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

 Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Leu Gly Xaa Xaa Val Xaa Thr
 85 90 95

 Leu Cys Gly Glu Xaa Pro Leu Xaa Tyr Xaa
 100 105

 <210> 19
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

 <400> 19

[0015]

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

<210> 20
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> S- 标记的人 CTproSP-C

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> S- 标记

<400> 20

Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His
 1 5 10 15

Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met Ala
 20 25 30

His Met Ser Gln Lys His Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Ile Gly
 35 40 45

Ala Pro Glu Ala Gln Gln Arg Leu Ala Leu Ser Glu His Leu Val Thr
 50 55 60

Thr Ala Thr Phe Ser Ile Gly Ser Thr Gly Leu Val Val Tyr Asp Tyr
 65 70 75 80

Gln Gln Leu Leu Ile Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr
 85 90 95

Ile Met Lys Ile Ala Pro Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Thr
 100 105 110

Arg Lys Val His Asn Phe Gln Met Glu Cys Ser Leu Gln Ala Lys Pro
 115 120 125

Ala Val Pro Thr Ser Lys Leu Gly Gln Ala Glu Gly Arg Asp Ala Gly
 130 135 140

Ser Ala Pro Ser Gly Gly Asp Pro Ala Phe Leu Gly Met Ala Val Ser
 145 150 155 160

Thr Leu Cys Gly Glu Val Pro Leu Tyr Tyr Ile

[0016]

165

170

<210> 21
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)
 <400> 21
 Glu His Leu Val Thr Thr Ala Thr Phe Ser Ile Gly Ser Thr Gly Leu
 1 5 10 15
 Val Val Tyr Asp Tyr Gln Gln Leu Leu Ile Ala Tyr Lys Pro Ala Pro
 20 25 30
 Gly Thr Cys Cys Tyr Ile Met Lys Ile Ala Pro Glu Ser Ile Pro Ser
 35 40 45
 Leu Glu Ala Leu Asn Arg Lys Val His Asn Phe Gln Met Glu Cys Ser
 50 55 60
 Leu Gln Ala Lys Pro Ala Val Pro Thr Ser Lys Leu Gly Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Gly Arg Asp Ala Gly Ser Ala Pro Ser Gly Gly Asp Pro Ala Phe Leu
 85 90 95
 Gly Met Ala Val Asn Thr Leu Cys Gly Glu Val Pro Leu Tyr Tyr Ile
 100 105 110

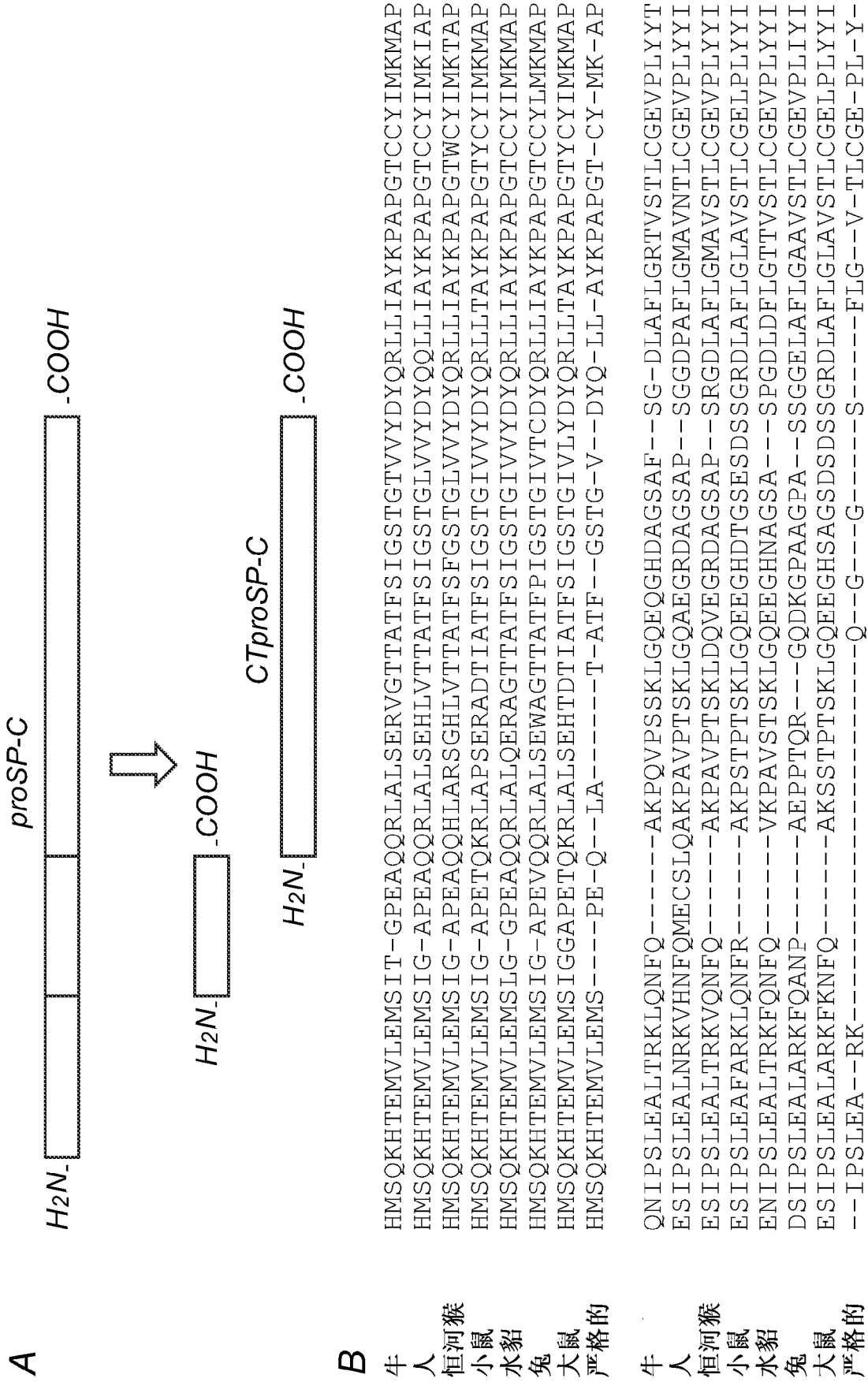


图 1
44

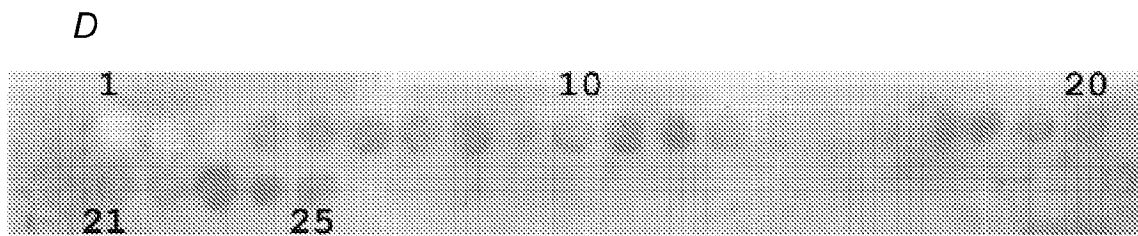
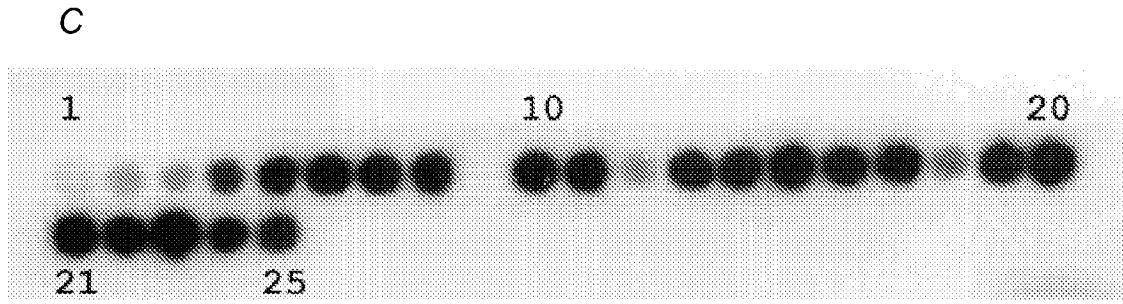
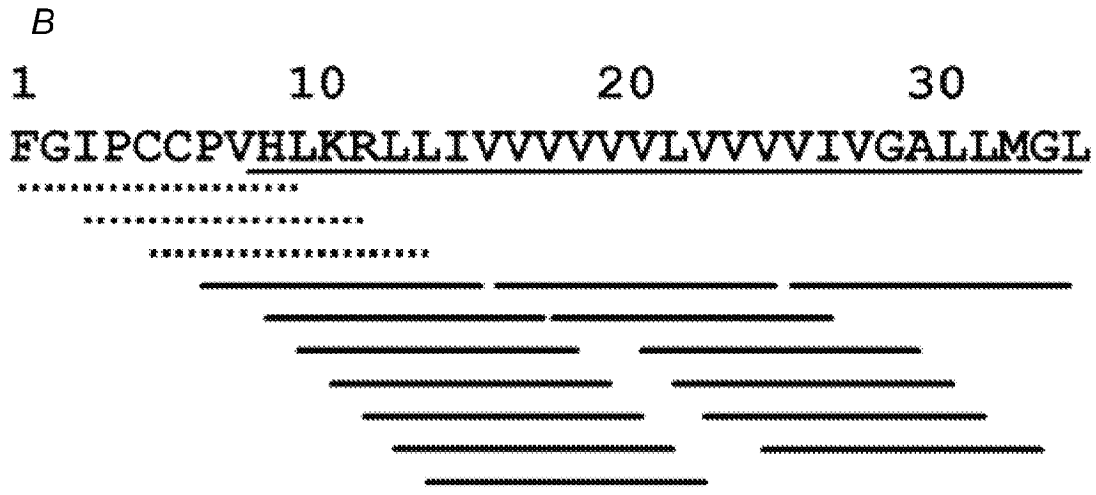
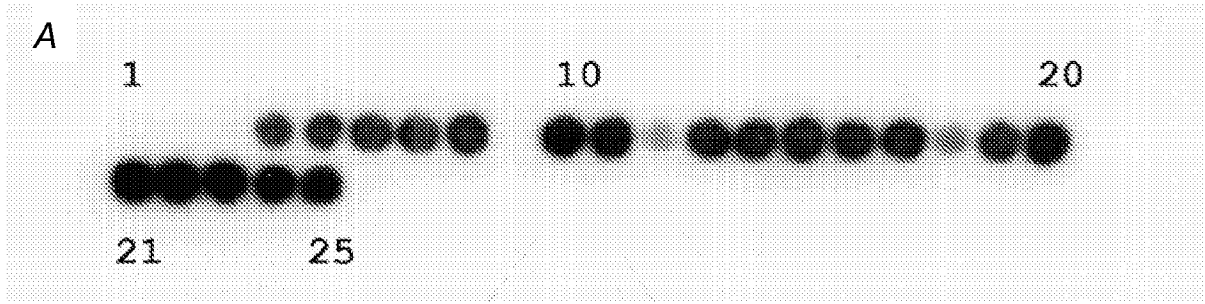


图 2

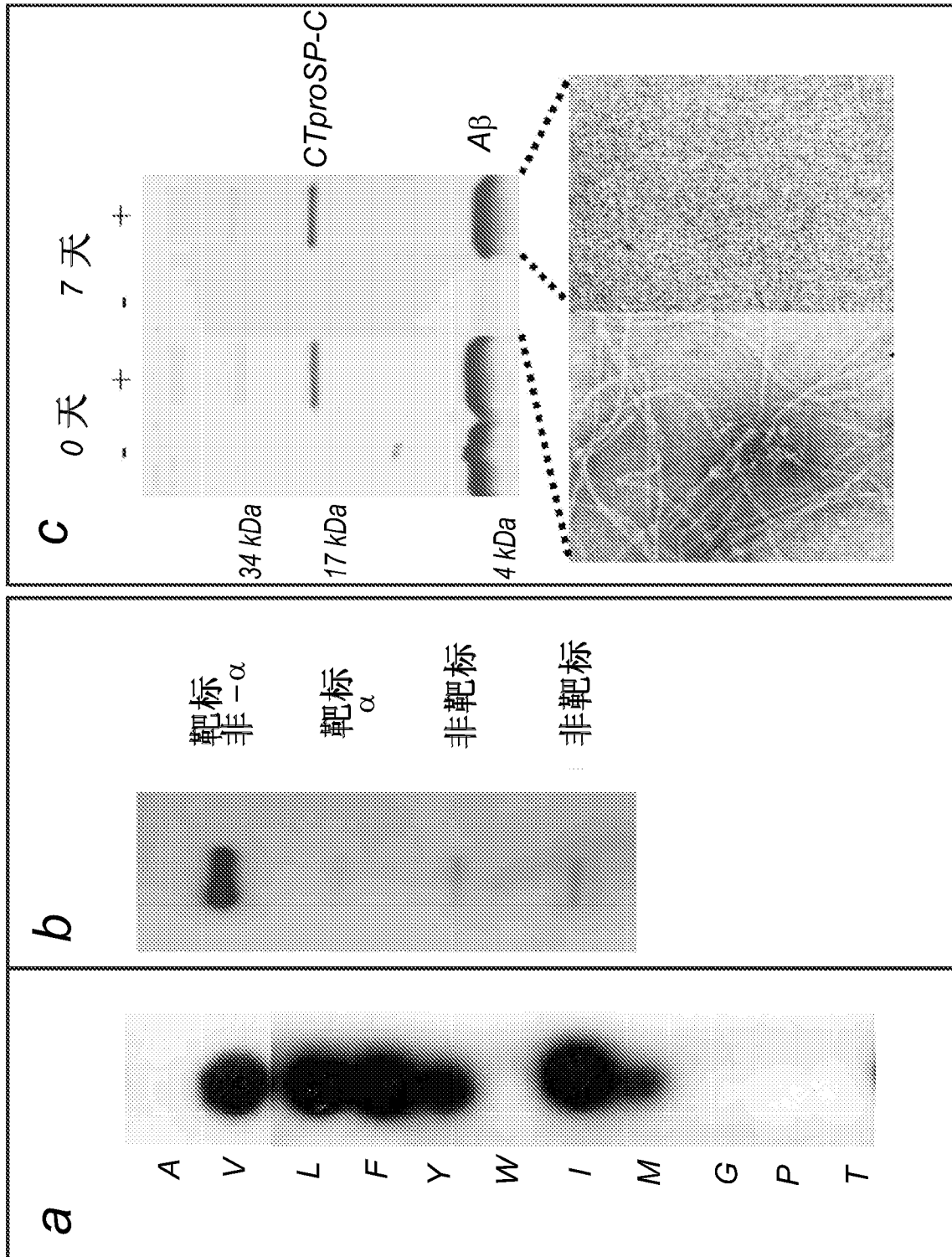


图 3

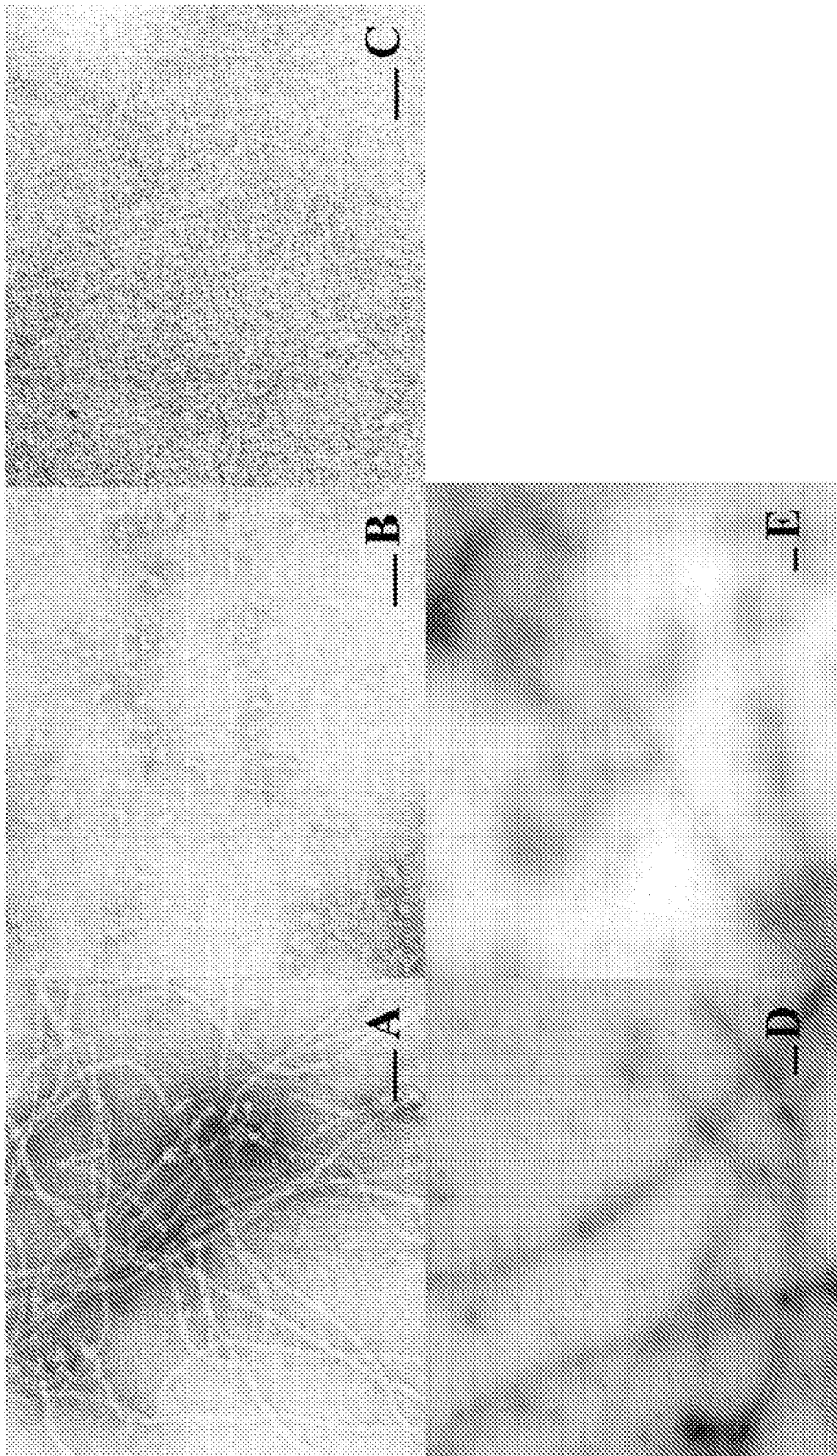


图 4

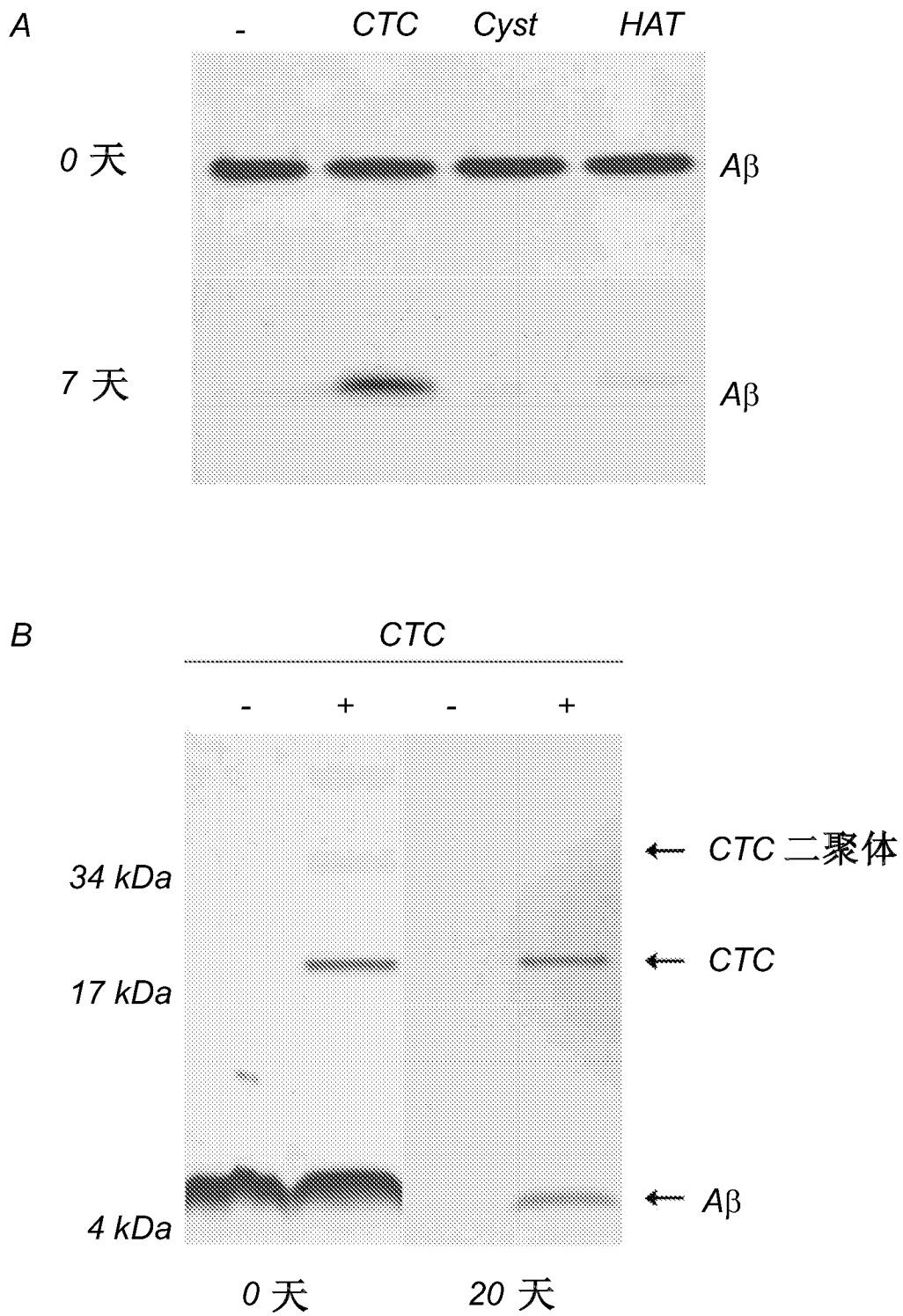


图 5

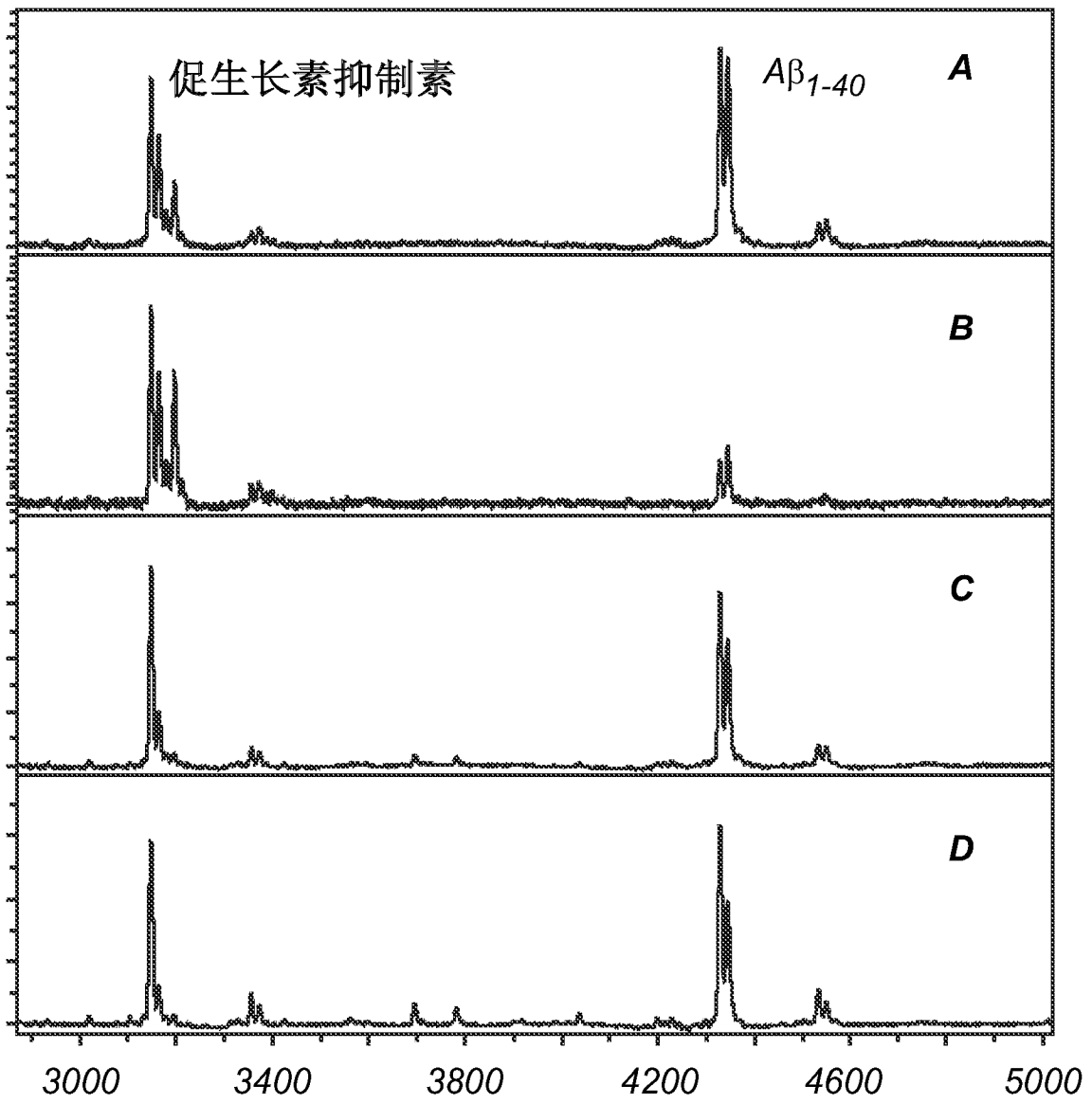


图 6

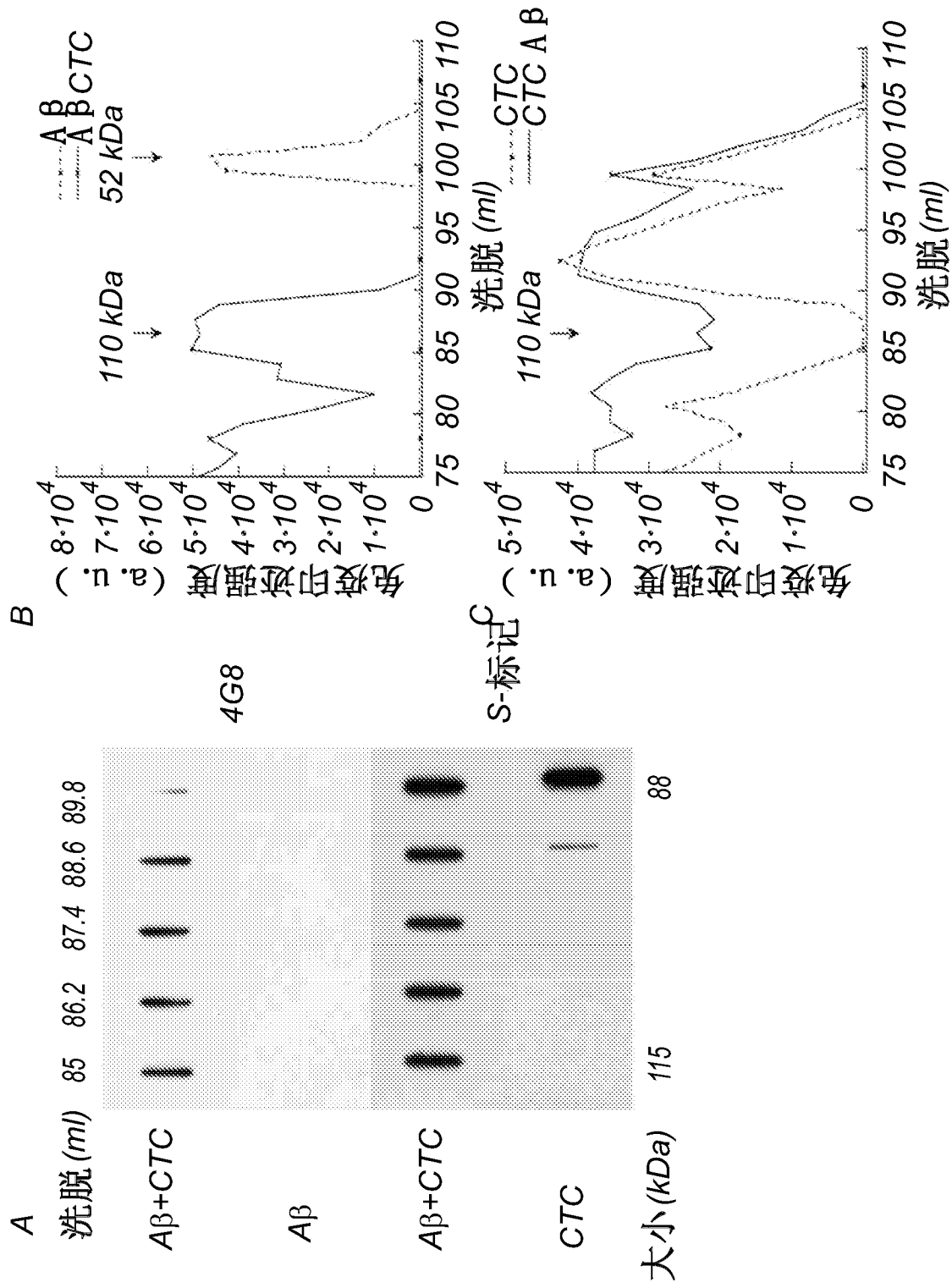


图 7

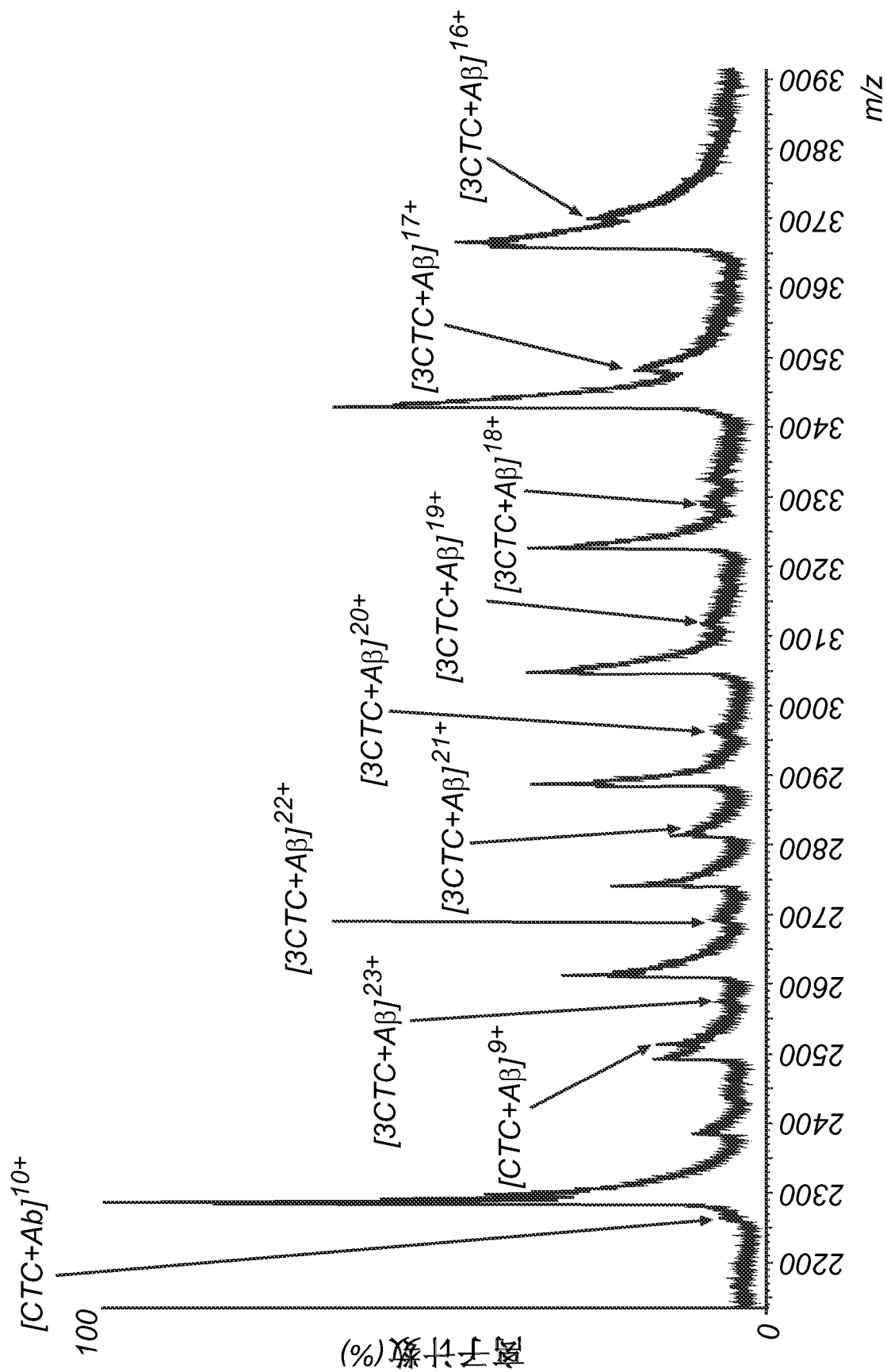


图 8

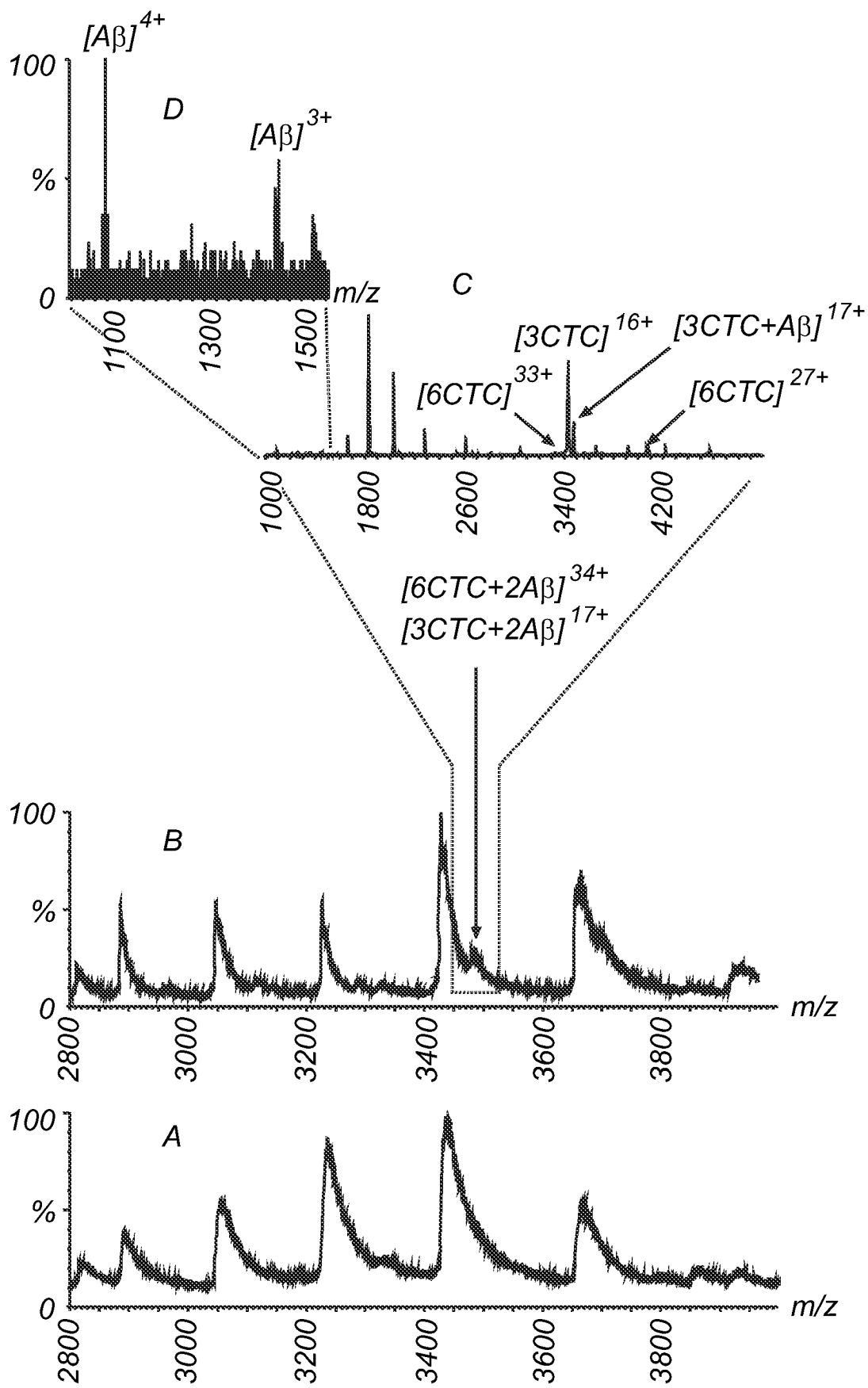


图 9

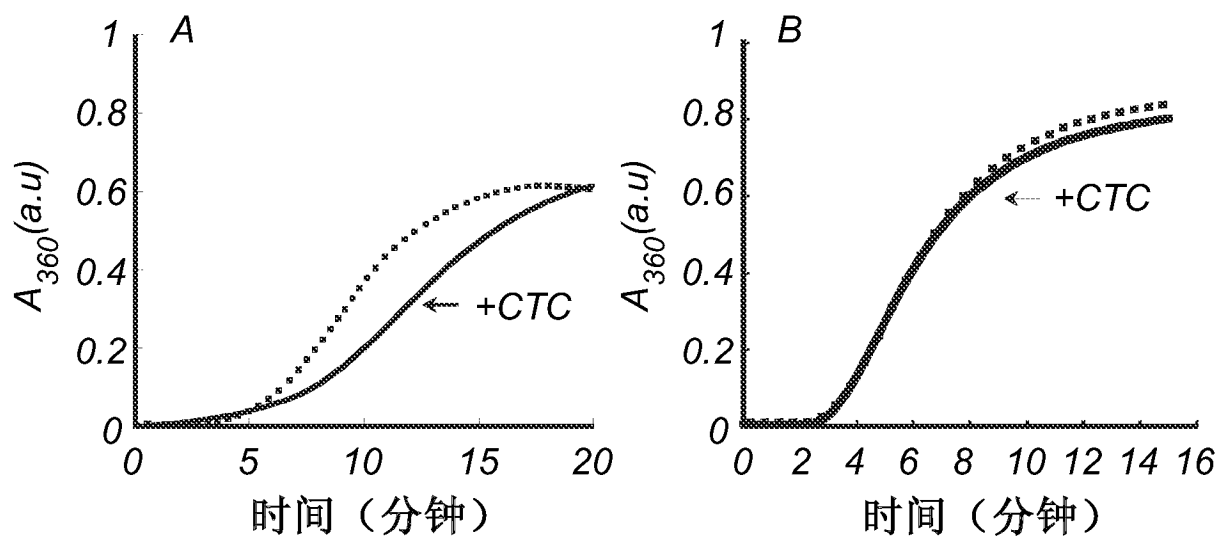


图 10

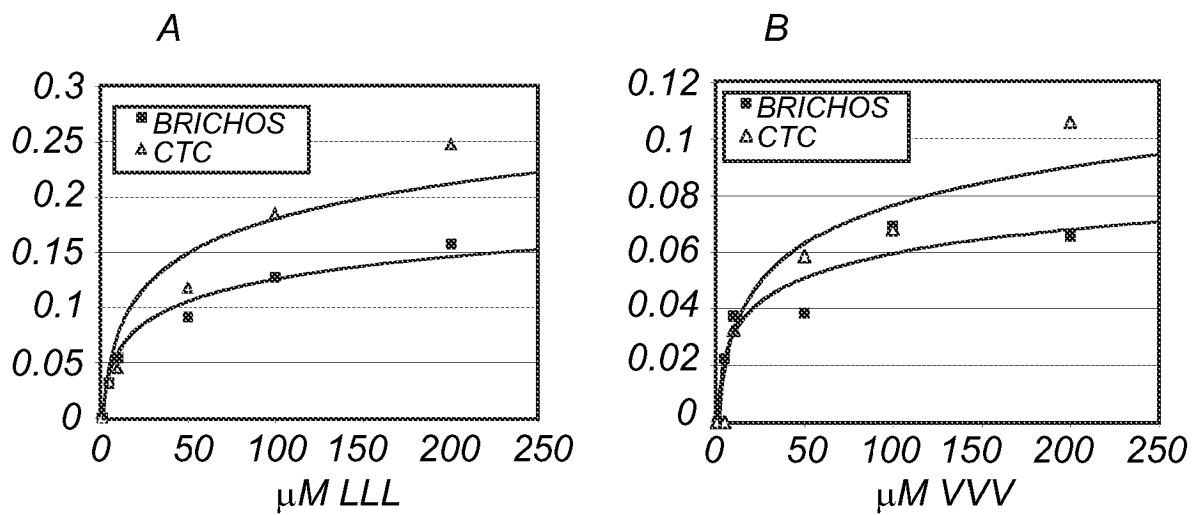


图 11

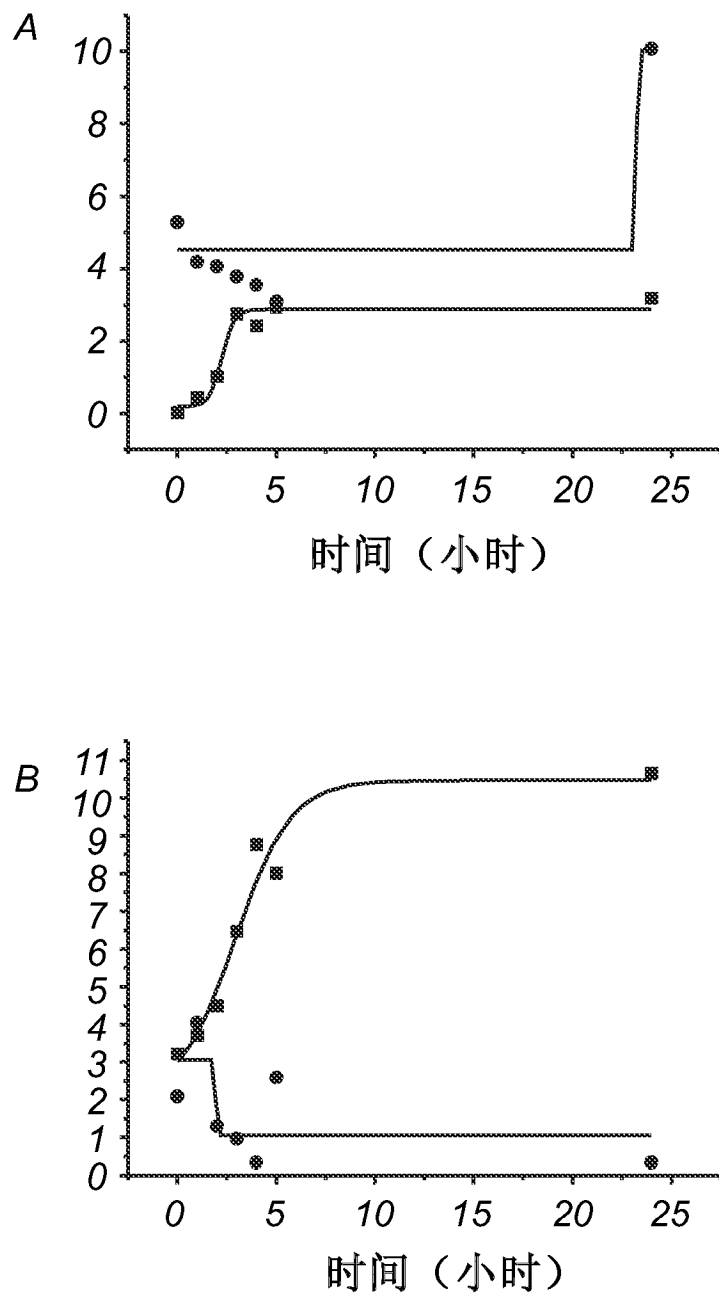


图 12