



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108350053 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201680065514.2

(22)申请日 2016.11.09

(30)优先权数据

62/253,044 2015.11.09 US

62/289,893 2016.02.01 US

62/365,634 2016.07.22 US

62/393,615 2016.09.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2016/051305 2016.11.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/079835 EN 2017.05.18

(71)申请人 英属哥伦比亚大学

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省温哥华

(72)发明人 N·R·卡什曼 S·S·普洛特金

(74)专利代理机构 北京市中伦律师事务所

11410

代理人 杨黎峰 钟锦舜

(51)Int.Cl.

C07K 14/47(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61K 39/385(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 47/60(2006.01)

A61K 47/68(2006.01)

A61K 49/00(2006.01)

A61K 51/10(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

C07K 5/00(2006.01)

C07K 5/10(2006.01)

C07K 7/64(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书6页 说明书51页

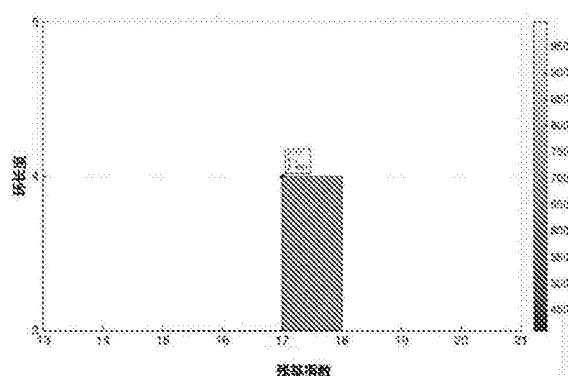
序列表9页 附图27页

(54)发明名称

淀粉样蛋白 β 表位及其抗体

(57)摘要

本公开涉及在A- β 中鉴定的表位,包括构象表位、其抗体以及制备和使用免疫原和对其特异性的抗体的方法。



1. 一种化合物, 优选为环状化合物, 其包含: A- β 肽, 所述肽包含QKL和至多8个、7个、6个A- β 残基, 和连接子, 其中, 所述连接子共价偶联至A- β 肽N-末端残基和A- β C-末端残基。

2. 根据权利要求1所述的化合物, 其中, 所述A- β 肽选自具有SEQ ID NO: 1-10中任一个所述的序列的肽, 其任选地选自QKL V (SEQ ID NO: 1)、HQKL V (SEQ ID NO: 2)、HQKL V F (SEQ ID NO: 9) 和QKL V F (SEQ ID NO: 10)。

3. 根据权利要求1或2所述的环状化合物, 其中, 所述环状化合物是环状肽。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的环状化合物, 其包含: i) 在相应的直链化合物情况下与Q相比, 处于不同构象的至少Q, 和/或 ii) 与相应的直链化合物相比, 通过熵测量的Q和/或K和/或L的构象受至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%的更多约束。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的环状化合物, 其中, 所述A- β 肽是QKL V (SEQ ID NO: 1)。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的环状化合物, 其中, 所述化合物还包含可检测标记。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的化合物, 其中, 所述连接子包含1-8个氨基酸和/或等同功能的分子和/或一个或多个可官能化部分, 或由其组成。

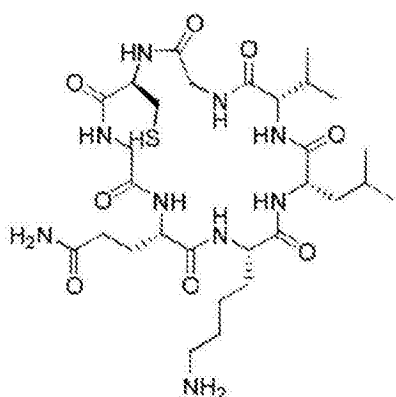
8. 根据权利要求7所述的化合物, 其中, 所述连接子氨基酸选自A和G, 和/或其中所述可官能化部分为C。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的化合物, 其中, 所述连接子包含氨基酸GCG或CGC, 或由其组成。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的化合物, 其中, 所述连接子包含PEG分子。

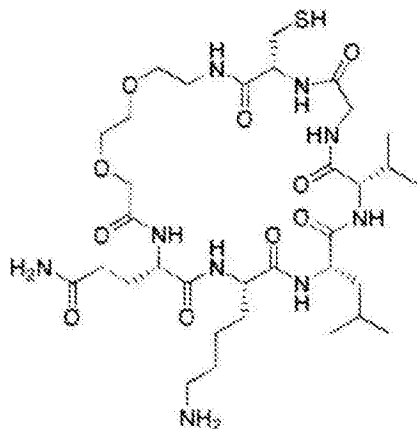
11. 根据权利要求1所述的环状化合物, 其中, 所述环状化合物选自以下结构:

环状 (CGQKLVG)



化学式: $C_{29}H_{51}N_9O_8S$
分子量: 685.84

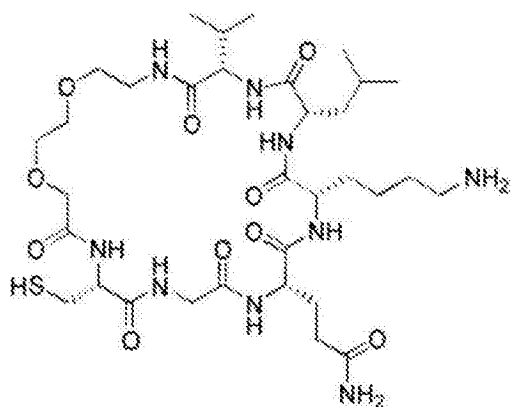
环状 (C-PEG2-QKLVG)



化学式: $C_{33}H_{59}N_9O_{10}S$
分子量: 773.94

和

环状 (CGQKLV-PEG2)



化学式: $C_{33}H_{59}N_9O_{10}S$
分子量: 773.94

12. 一种免疫原,其包含权利要求1至11中任一项所述的环状化合物。
13. 根据权利要求12所述的免疫原,其中,所述环状化合物偶联至载体蛋白质或免疫原性增强剂。
14. 根据权利要求13所述的免疫原,其中,所述载体蛋白质是牛血清白蛋白(BSA)或所述免疫原性增强剂是钥孔血蓝蛋白(KLH)。
15. 一种组合物,其包含权利要求1至11中任一项所述的化合物或权利要求12至14中任一项所述的免疫原。
16. 根据权利要求15所述的组合物,其还包含佐剂。
17. 根据权利要求16所述的组合物,所述佐剂是磷酸铝或氢氧化铝。
18. 一种分离的抗体,其特异性结合具有QKLV (SEQ ID NO:1) 序列或相关表位序列的A- β 肽,任选地如SEQ ID NO:1-10中任一个所示。
19. 根据权利要求18所述的抗体,其中,所述抗体特异性结合A- β 上的表位,其中,所述表位包含主要参与结合抗体的至少两个连续氨基酸残基,其中,所述至少两个连续氨基酸是嵌入QKLV (SEQ ID NO:1) 内的QK。
20. 根据权利要求18所述的抗体,其中,所述表位包含QKLV (SEQ ID NO:1)、HQKLV (SEQ ID NO:2)、HQKLVF (SEQ ID NO:9)或QKLVF (SEQ ID NO:10),或由其组成。
21. 根据权利要求18至20中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是特异性或选择性结合AEDV或存在于环状化合物中的相关表位肽的构象特异性和/或选择性抗体,所述环状化合物任选地为权利要求1至11中任一项所述的环状化合物,优选为具有如SEQ ID NO:3所示的序列的环状肽。
22. 根据权利要求18至21中任一项所述的抗体,其中,与A- β 单体和/或A- β 原纤维相比,所述抗体选择性结合A- β 寡聚体。
23. 根据权利要求21所述的抗体,其中,所述选择性是对A- β 寡聚体的选择比A- β 单体和/或A- β 原纤维更高至少3倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍。
24. 根据权利要求18至23中任一项所述的抗体,其中,所述抗体不特异性和/或选择性结合包含序列QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关表位的直链肽,任选地其中,直链肽的序列是用于产生抗体的环状化合物的直链形式,任选地具有如SEQ ID NO:3所示的序列的直链肽。
25. 根据权利要求18至24中任一项所述的抗体,其中,所述抗体缺乏或具有可忽略的与A- β 单体和/或A- β 原纤维斑块的原位结合。
26. 根据权利要求18至25中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是单克隆抗体或多克隆抗体。
27. 根据权利要求18至26中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是人源化抗体。
28. 根据权利要求18至27中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是选自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、纳米抗体、微型抗体、双抗体和其多聚体的抗体结合片段。
29. 根据权利要求18至28中任一项所述的抗体,其包含轻链可变区域和重链可变区域,任选地融合,所述重链可变区域包含互补决定区域CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区域包含互补决定区域CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且所述CDR的氨基酸序列包含以下序

列:

CDR-H1	GYTFTDYE	(SEQ ID NO: 11)
CDR-H2	IDPETGDT	(SEQ ID NO: 12)
CDR-H3	TSPIYYDYDWFAY	(SEQ ID NO: 13)
CDR-L1	QSLNNRTRKNY	(SEQ ID NO: 14)
CDR-L2	WAS	(SEQ ID NO: 15)
CDR-L3	KQSYNLRT	(SEQ ID NO: 16)
CDR-H1	GFSLSTSGMG	(SEQ ID NO: 21)
CDR-H2	IWWDDDK	(SEQ ID NO: 22)
CDR-H3	ARSITTVVATPFDY	(SEQ ID NO: 23)
CDR-L1	QNVRSA	(SEQ ID NO: 24)
CDR-L2	LAS	(SEQ ID NO: 25)
CDR-L3	LQHWNSPFT	(SEQ ID NO: 26)。

30. 根据权利要求18至29中任一项所述的抗体,其中,所述抗体包含重链可变区域,所述重链可变区域包含:i)如SEQ ID NO:18或28所示的氨基酸序列;ii)具有与SEQ ID NO:18或28至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中,CDR序列如SEQ ID NO:11、12、13、21、22和23所示,或iii)保守取代的氨基酸序列i)。

31. 根据权利要求18至30中任一项所述的抗体,其中,所述抗体包含轻链可变区域,所述轻链可变区域包含:i)如SEQ ID NO:20或30所示的氨基酸序列,ii)具有与SEQ ID NO:20或30至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中,CDR序列如SEQ ID NO:14、15、16、24、25和26所示,或iii)保守取代的氨基酸序列i)。

32. 根据权利要求18至31中任一项所述的抗体,其中,所述重链可变区域氨基酸序列由SEQ ID NO:17或27所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码;和/或抗体包含由SEQ ID NO:19或29所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码的轻链可变区域氨基酸序列。

33. 根据权利要求18至32中任一项所述的抗体,其中,所述重链可变区域包含SEQ ID NO:18或28所示的氨基酸序列或由其组成,和/或所述轻链可变区域包含SEQ ID NO:20或30所示的氨基酸序列或由其组成。

34. 根据权利要求18至28中任一项所述的抗体,其中,所述抗体与包含如表6和/或表8所列举的CDR序列的抗体竞争结合人A- β 。

35. 一种免疫缀合物,其包含权利要求18-34中任一项所述的抗体和可检测标记或细胞毒性剂。

36. 根据权利要求35所述的免疫缀合物,其中,所述可检测标记包含发射放射性核素的正电子,任选地用于诸如PET成像的受试者成像。

37. 一种组合物,其包含权利要求18至34中任一项所述的抗体或权利要求35或36所述的免疫缀合物,任选地具有稀释剂。

38. 一种核酸分子,其编码权利要求1至14中任一项所述的化合物或免疫原的蛋白质部分、权利要求18至34中任一项所述的抗体或权利要求35和36所述的蛋白质免疫缀合物。

39. 一种载体,其包含权利要求38所述的核酸分子。

40. 一种细胞,其表达权利要求1至34中任一项所述的抗体,任选地其中,所述细胞是包含权利要求39所述的载体的杂交瘤。

41. 一种试剂盒,其包含权利要求1-11中任一项所述的化合物、权利要求12-14中任一项所述的免疫原、权利要求18至34中任一项所述的抗体、权利要求35或36所述的免疫缀合物、权利要求37所述的组合物、权利要求38所述的核酸分子、权利要求39所述的载体或权利要求40所述的细胞。

42. 一种制备权利要求18至35中任一项所述的抗体的方法,其包括向受试者施用权利要求1-14中任一项所述的化合物或免疫原,或包含所述化合物和免疫原的组合物;以及分离抗体和/或表达对所施用的化合物或免疫原和/或A- β 寡聚体具有特异性或选择性的抗体的细胞,任选地缺乏或具有可忽略的与包含A- β 肽的直链肽的结合和/或缺乏或具有可忽略的斑块结合。

43. 一种确定生物样品是否包含A- β 的方法,该方法包括:

a. 使生物样品与权利要求18至35中任一项所述的抗体或权利要求36或37所述的免疫缀合物接触;以及

b. 检测任何抗体复合物的存在。

44. 根据权利要求43所述的方法,其用于确定所述生物样品是否含有A- β 寡聚体,该方法包括:

a. 在允许形成抗体:A- β 寡聚体复合物的条件下,使样品与对A- β 寡聚体具有特异性和/或选择性的权利要求18至35中任一项所述的抗体或权利要求36或37所述的免疫缀合物接触;以及

b. 检测任何复合物的存在;

其中,可检测复合物的存在表明所述样品可能含有A- β 寡聚体。

45. 根据权利要求43所述的方法,其中,测量所述复合物的量。

46. 根据权利要求43-45中任一项所述的方法,其中,所述样品包含脑组织或其提取物、全血、血浆、血清和/或CSF。

47. 根据权利要求43至46中任一项所述的方法,其中,所述样品是人样品。

48. 根据权利要求43至47中任一项所述的方法,其中,将样品与对照,任选地与先前样品进行比较。

49. 根据权利要求43至48中任一项所述的方法,其中,通过SPR检测A- β 的水平。

50. 一种测量受试者中A- β 水平的方法,该方法包括:

向风险中或怀疑患有AD或患有AD的受试者施用包含权利要求35或36所述抗体的免疫缀合物,其中,所述抗体缀合至可检测标记;以及检测标记,任选地定量检测标记。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中,所述标记是发射放射性核素的正电子。

52. 一种在受试者中诱导免疫响应的方法,其包括向受试者施用权利要求1至11中任一

项所述的化合物或化合物组合,任选地包含QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关表位肽序列的环状化合物、免疫原和/或包含所述化合物或所述免疫原的组合物;以及任选地分离特异性或选择性结合所施用的化合物或免疫原中的A- β 肽的细胞和/或抗体。

53. 一种抑制A- β 寡聚体增殖的方法,该方法包括使表达A- β 的细胞或组织与有需要的受试者接触或向其施用有效量的权利要求1至36中任一项所述的A- β 寡聚体特异性或选择性抗体或免疫缀合物,以抑制A- β 聚集和/或寡聚体增殖。

54. 一种治疗AD和/或其它A- β 淀粉样蛋白相关疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用i) 有效量的权利要求1-36中任一项所述的抗体或免疫缀合物,任选地A- β 寡聚体特异性或选择性抗体,或包含所述抗体的药物组合物;2) 施用包含QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关表位序列或免疫原的分离的环状化合物或包含所述环状化合物的药物组合物,或3) 向有需要的受试者施用编码1的抗体或2的免疫原的核酸,或包含所述核酸的载体。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中,使用本文所述的抗体对来自待治疗受试者的生物样品评估A- β 的存在或水平。

56. 根据权利要求53至55中任一项所述的方法,其中,施用多于一种抗体或免疫原。

57. 根据权利要求53至56中任一项所述的方法,其中,将抗体、免疫缀合物、免疫原、组合物或核酸或载体直接施用于脑或CNS的其它部分。

58. 根据权利要求53至57中任一项所述的方法,其中,所述组合物是包含与药学上可接受的稀释剂或载体混合的化合物或免疫原的药物组合物。

59. 一种分离肽,其包含由如SEQ ID NO:1-10所示序列中的任一个序列组成的A β 肽。

60. 根据权利要求59所述的分离肽,其中,所述肽是包含连接子的环状肽,其中,所述连接子共价偶联至A- β 肽N-末端残基和/或A- β C-末端残基。

61. 根据权利要求59或60所述的分离肽,其包含可检测标记。

62. 一种核酸序列,其编码权利要求59至61中任一项所述的分离肽。

一种杂交瘤,其表达权利要求18至34中任一项所述的抗体。

淀粉样蛋白 β 表位及其抗体

[0001] 相关申请

[0002] 这篇PCT申请要求2015年11月9日提交的美国专利申请序列号62/253044;2016年2月1日提交的美国专利申请序列号62/331,925;2016年7月22日提交的美国专利申请序列号62/289,893;以及2016年9月12日提交的美国专利申请序列号62/393,615的优先权权益;其各自通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及淀粉样蛋白 β (A- β 或AB) 表位及其抗体,并且更具体地涉及在A- β 寡聚体中选择性可接近的预测构象A- β 表位,以及相关抗体组合物及其用途。

背景技术

[0004] 作为36-43个氨基酸肽存在的淀粉样蛋白- β (A- β) 是通过 β 和 γ 分泌酶由淀粉样前体蛋白 (APP) 释放的产物。在阿尔茨海默病 (AD) 患者中,A- β 可存在于可溶性单体、不溶性原纤维和可溶性寡聚体中。在单体形式中,A- β 以主要为非结构化的多肽链形式存在。在原纤维形式中,A- β 可以聚集成不同的形态,通常称为菌株。这些结构中的一些已经通过固态NMR测定。

[0005] 例如,在蛋白质数据库 (PDB) 中可获得几种原纤维菌株的结构,原子分辨率三维结构数据的晶体学数据库包括三重对称AB结构 (PDB输入,2M4J);AB-40单体的双重对称结构 (PDB输入2LMN) 和AB-42单体的单链平行寄存器结构 (PDB输入2MXU)。

[0006] 2M4J的结构报道于J.X.LU,W.QIANG,W.M.YAU,C.D.SCHWIETERS,S.C.MEREDITH,R.TYCKO,MOLECULAR STRUCTURE OF BETA-AMYLOID FIBRILS IN ALZHEIMER'S DISEASE BRAIN TISSUE.CELL Vol.154 p.1257 (2013) 中,并且2MXU的结构报道于Y.XIAO,B.MA,D.MCELHENY,S.PARTHASARATHY,F.LONG,M.HOSHI,R.NUSSINOV,Y.ISHII A BETA (1-42) FIBRIL STRUCTURE ILLUMINATES SELF-RECOGNITION AND REPLICATION OF AMYLOID IN ALZHEIMER'S DISEASE.NAT.STRUCT.MOL.BIOL.Vol.22p.499 (2015) 中。

[0007] 已显示A- β 寡聚体可杀死培养物中的细胞系和神经元,并且在切片培养物和活体动物中封闭促进记忆的关键性突触活动 (称为长时程增强 (LTP))。

[0008] 至今尚未确定寡聚体的结构。此外,NMR和其它证据表明寡聚体不存在于单一明确界定的结构中,而是存在于具有有限规律性的构象可塑可延展结构体系中。而且,毒性寡聚体种类的浓度远低于单体或原纤维的浓度 (估计值会有所不同,但大约低于或高于1000倍),使得这个目标难以实现。

[0009] 美国专利5,766,846;5837672和5,593,846 (通过引用并入本文) 描述了产生针对A β 肽中心结构域的鼠单克隆抗体。W001/62801描述了在氨基酸13-28之间结合A- β 的抗体。W02004071408公开了人源化抗体。W02008088983A1描述了结合淀粉样蛋白 β (A- β) 肽并共价连接至一个或多个聚乙二醇 (PEG) 分子的抗体片段,所述抗体片段特异性结合氨基酸位置13-28之间的人A- β 肽。Solanezumab和Crenezumab结合A- β 上的氨基酸16-26。Crenezumab与

单体、寡聚体和原纤维相互作用。中间区抗体(包括solanezumab(皮摩尔亲和力)和crenezumab(纳摩尔亲和力))似乎优先结合单体A-β[1]。

[0010] 优选或选择性结合A-β寡聚体的抗体是理想的。

发明内容

[0011] 本文描述的是由残基QKLV (SEQ ID NO:1) 或其部分组成的A-β中的表位(任选地构象表位)及其抗体。该表位被鉴定为选择性地暴露于使A-β寡聚体种类与单体区分开的构象中的A-β寡聚体种类。

[0012] 一个方面包括化合物(优选地环状化合物),其包含:A-β肽,所述肽包含QKL和至多8个、7个、6个A-β残基,和连接子,其中,所述连接子共价偶联至A-β肽N-末端残基和A-βC-末端残基。

[0013] 在一种实施方式中,A-β肽选自具有SEQ ID NO:1-10中任一个所述序列的肽,其任选地选自QKLV (SEQ ID NO:1)、HQKLV (SEQ ID NO:2)、HQKLVF (SEQ ID NO:9) 和QKLVF (SEQ ID NO:10)。

[0014] 在另一种实施方式中,环状化合物是环状肽。

[0015] 在另一种实施方式中,所述环状化合物包含:i) 在相应的直链化合物情况下与Q相比,处于不同构象的至少Q,和/或ii) 与相应的直链化合物相比,通过熵测量的Q和/或K和/或L的构象受至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%的更多约束。

[0016] 在另一种实施方式中,A-β肽是QKLV (SEQ ID NO:1)。

[0017] 在另一种实施方式中,所述化合物还包含可检测标记。

[0018] 在另一种实施方式中,所述连接子包含1-8个氨基酸和/或等同功能的分子和/或一个或多个可官能化部分,或由其组成。

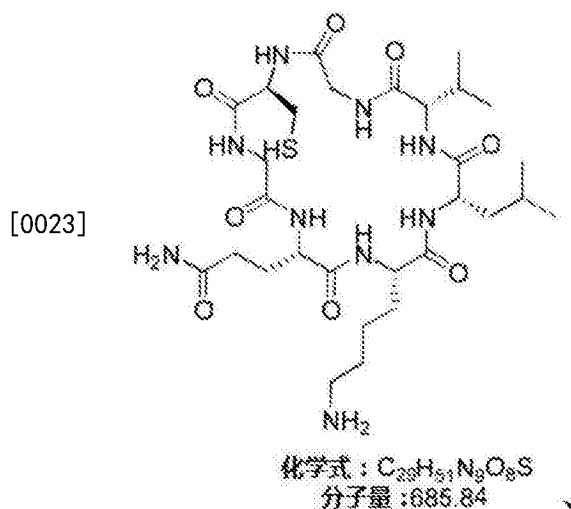
[0019] 在另一种实施方式中,所述连接子氨基酸选自A和G,和/或其中可官能化部分为C。

[0020] 在另一种实施方式中,所述连接子包含氨基酸GCG或CGC,或由其组成。

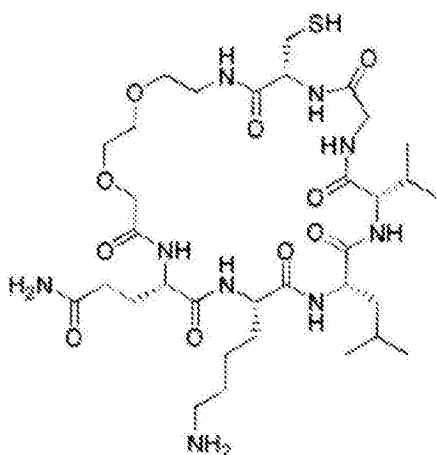
[0021] 在另一种实施方式中,所述连接子包含PEG分子。

[0022] 在另一种实施方式中,所述环状化合物选自以下结构:

环状(CGQKLVG)



环状(C-PEG2-QKLVG)

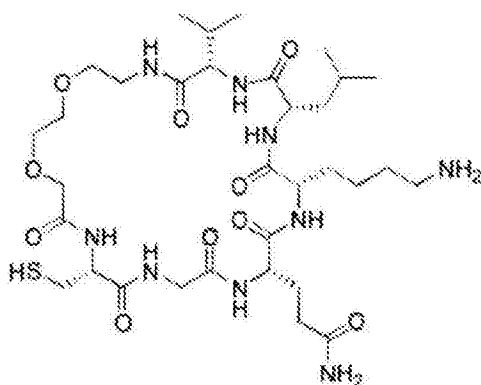


化学式: $C_{33}H_{59}N_5O_{15}S$
分子量: 773.94

[0024]

和

环状(CGQKLV-PEG2)



化学式: $C_{33}H_{59}N_5O_{15}S$
分子量: 773.94

[0025] 一个方面包括包含本文所述的环状化合物的免疫原。

[0026] 在一种实施方式中,所述化合物偶联至载体蛋白质或免疫原性增强剂。

[0027] 在另一种实施方式中,所述载体蛋白质是牛血清白蛋白 (BSA) 或免疫原性增强剂是钥孔血蓝蛋白 (KLH)。

[0028] 一个方面包括包含本文所述化合物或本文所述免疫原的组合物。

[0029] 在一种实施方式中,本文所述组合物还包含佐剂。

[0030] 在另一种实施方式中,该佐剂是磷酸铝或氢氧化铝。

[0031] 一个方面包括特异性结合具有QKLV序列 (SEQ ID NO:1) 或相关表位序列的A-β肽的分离抗体,其任选地如SEQ ID NO:1-10中任一个所示。

[0032] 在一种实施方式中,抗体特异性结合A-β上的表位,其中,所述表位包含主要参与结合抗体的至少两个连续氨基酸残基,其中,所述至少两个连续氨基酸是嵌入QKLV内的QK。

[0033] 在另一种实施方式中,所述表位包含QKLV (SEQ ID NO:1)、HQKLV (SEQ ID NO:2)、HQKLVF (SEQ ID NO:9) 或QKLVF (SEQ ID NO:10),或由其组成。

[0034] 在另一种实施方式中,抗体是特异性或选择性结合AEDV (SEQ ID NO:1) 或存在于环状化合物(任选地本文所述的环状化合物,优选具有如SEQ ID NO:3所示序列的环状肽)中的相关表位肽的构象特异性和/或选择性抗体。

[0035] 在另一种实施方式中,与A- β 单体和/或A- β 原纤维相比,所述抗体选择性结合A- β 寡聚体。

[0036] 在另一种实施方式中,所述选择性是对A- β 寡聚体的选择比A- β 单体和/或A- β 原纤维更高至少3倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍。

[0037] 在另一种实施方式中,抗体不特异性和/或选择性结合包含序列QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关表位的直链肽,任选地其中,直链肽的序列是用于产生抗体的环状化合物的直链形式,任选地具有如SEQ ID NO:3所示的序列的直链肽。

[0038] 在另一种实施方式中,该抗体缺乏或具有可忽略的与A- β 单体和/或A- β 原纤维斑块的原位结合。

[0039] 在一种实施方式中,使用本文所述的环状化合物(任选地本文所述的环肽)生产抗体。

[0040] 在一种实施方式中,所述抗体是单克隆抗体或多克隆抗体。

[0041] 在另一种实施方式中,所述抗体是人源化抗体。

[0042] 在另一种实施方式中,所述抗体是选自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、纳米抗体、微型抗体、双抗体及其多聚体的抗体结合片段。

[0043] 在另一种实施方式中,本文所述的抗体包含轻链可变区域和重链可变区域,任选地融合,所述重链可变区域包含互补决定区域CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区域包含互补决定区域CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且所述CDR的氨基酸序列包含以下序列:

CDR-H1 GYTFTDYE (SEQ ID NO: 11)

CDR-H2 IDPETGDT (SEQ ID NO: 12)

CDR-H3 TSPIYYDYDWFAY (SEQ ID NO: 13)

CDR-L1 QSLNLRTRKNY (SEQ ID NO: 14)

CDR-L2 WAS (SEQ ID NO: 15)

CDR-L3 KQSYNLRT (SEQ ID NO: 16)

[0044] CDR-H1 GFSLSTSGMG (SEQ ID NO: 21)

CDR-H2 IWWDDDK (SEQ ID NO: 22)

CDR-H3 ARSITTVVATPFDY (SEQ ID NO: 23)

CDR-L1 QNVRSA (SEQ ID NO: 24)

CDR-L2 LAS (SEQ ID NO: 25)

CDR-L3 LQHWNSPFT (SEQ ID NO: 26)

[0045] 在另一种实施方式中,所述抗体包含重链可变区域,所述重链可变区域包含:i) 如

SEQ ID NO:18或28所示的氨基酸序列;ii)具有与SEQ ID NO:18或28至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中,CDR序列如SEQ ID NO:11、12、13、21、22和23所示,或iii)保守取代的氨基酸序列i)。

[0046] 在另一种实施方式中,所述抗体包含轻链可变区域,所述轻链可变区域包含:i)如SEQ ID NO:20或30所示的氨基酸序列,ii)具有与SEQ ID NO:20或30至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%序列同一性的氨基酸序列,其中,CDR序列如SEQ ID NO:14、15、16、24、25和26所示,或iii)保守取代的氨基酸序列i)。

[0047] 在另一种实施方式中,重链可变区域氨基酸序列由SEQ ID NO:17或27所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码;和/或抗体包含由SEQ ID NO:19或29所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码的轻链可变区域氨基酸序列。

[0048] 在另一种实施方式中,所述重链可变区域包含SEQ ID NO:18或28所示的氨基酸序列或由其组成,和/或所述轻链可变区域包含SEQ ID NO:20或30所示的氨基酸序列或由其组成。

[0049] 在另一种实施方式中,抗体与包含如表6和/或表8所列举的CDR序列的抗体竞争结合人A- β 。

[0050] 一个方面包括包含本文所述抗体和可检测标记或细胞毒性剂的免疫缀合物。

[0051] 在一种实施方式中,可检测标记包含发射放射性核素的正电子,任选地用于诸如PET成像的受试者成像。

[0052] 一个方面包括包含本文所述的抗体或本文所述的免疫缀合物的组合物,任选地具有稀释剂。

[0053] 一方面包括编码本文所述化合物或免疫原的蛋白质部分、本文所述抗体或本文所述蛋白质免疫缀合物的核酸分子。

[0054] 一个方面包括包含本文所述核酸的载体。

[0055] 一个方面包括表达本文所述抗体的细胞,任选地其中,所述细胞是包含本文所述载体的杂交瘤。

[0056] 一个方面包括包含本文所述的化合物、本文所述的免疫原、本文所述的抗体、本文所述的免疫缀合物、本文所述的组合物、本文所述的核酸分子、本文所述的载体或本文所述的细胞的试剂盒。

[0057] 一个方面包括制备本文所述的抗体的方法,该方法包括向受试者施用本文所述的化合物或免疫原或包含所述化合物或免疫原的组合物,以及分离抗体和/或表达对所施用的化合物或免疫原和/或A- β 寡聚体具有特异性或选择性的抗体的细胞,任选地缺乏或具有可忽略的与包含A- β 肽的直链肽的结合和/或缺乏或具有可忽略的斑块结合。

[0058] 一个方面包括确定生物样品是否包含A- β 的方法,该方法包括:

[0059] a.使生物样品与本文所述的抗体或本文所述的免疫缀合物接触;以及

[0060] b.检测任何抗体复合物的存在。

[0061] 在一种实施方式中,生物样品含有A- β 寡聚体,该方法包括:

[0062] a.在允许形成抗体:A- β 寡聚体复合物的条件下,使样品与对A- β 寡聚体具有特异性和/或选择性的本文所述的抗体或本文所述的免疫缀合物接触;以及

[0063] b.检测任何复合物的存在;

- [0064] 其中,可检测复合物的存在表明样品可能含有A- β 寡聚体。
- [0065] 在另一种实施方式中,测量复合物的量。
- [0066] 在另一种实施方式中,样品包含脑组织或其提取物、全血、血浆、血清和/或CSF。
- [0067] 在另一种实施方式中,样品是人样品。
- [0068] 在另一种实施方式中,将样品与对照,任选地与先前样品进行比较。
- [0069] 在另一种实施方式中,通过SPR检测A- β 的水平。
- [0070] 一个方面包括测量受试者中A- β 水平的方法,该方法包括向风险中或怀疑患有AD或患有AD的受试者施用包含本文所述抗体的免疫缀合物,其中,所述抗体缀合至可检测标记;以及检测标记,任选地定量检测标记。
- [0071] 在一种实施方式中,标记是发射放射性核素的正电子。
- [0072] 一个方面包括在受试者中诱导免疫响应的方法,其包括向受试者施用本文所述的化合物或化合物组合,任选地包含QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关表位肽序列的环状化合物、免疫原和/或包含所述化合物或所述免疫原的组合物;以及任选地分离特异性或选择性结合所施用化合物或免疫原中的A- β 肽的细胞和/或抗体。
- [0073] 一个方面包括抑制A- β 寡聚体增殖的方法,该方法包括使表达A- β 的细胞或组织与有需要的受试者接触或向其施用有效量的本文所述的A- β 寡聚体特异性或选择性抗体或免疫缀合物,以抑制A- β 聚集和/或寡聚体增殖。
- [0074] 一个方面包括治疗AD和/或其它A- β 淀粉样蛋白相关疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用i) 有效量的本文所述的抗体或免疫缀合物,任选地A- β 寡聚体特异性或选择性抗体,或包含所述抗体的药物组合物;2) 施用包含QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关表位序列或免疫原的分离环状化合物或包含所述环状化合物的药物组合物,或3) 向有需要的受试者施用编码1的抗体或2的免疫原的核酸,或包含核酸的载体。
- [0075] 在一种实施方式中,使用本文所述的抗体对来自待治疗受试者的生物样品评估A- β 的存在或水平。
- [0076] 在一种实施方式中,施用多于一种抗体或免疫原。
- [0077] 在一种实施方式中,将抗体、免疫缀合物、免疫原、组合物或核酸或载体直接施用于脑或CNS的其它部分。
- [0078] 在一种实施方式中,所述组合物是包含与药学上可接受的稀释剂或载体混合的化合物或免疫原的药物组合物。
- [0079] 一个方面包括包含由如SEQ ID NO:1-10所示序列中任一序列组成的A β 肽的分离肽。
- [0080] 在一种实施方式中,肽是包含连接子的环状肽,其中,所述连接子共价偶联至A- β 肽N-末端残基和/或A- β C-末端残基。
- [0081] 在一种实施方式中,本文所述分离肽包含可检测标记。
- [0082] 一个方面包括编码本文所述的分离肽的核酸序列。
- [0083] 一个方面包括表达本文所述的抗体的杂交瘤。
- [0084] 根据以下详细描述,本公开的其它特征和优点将变得显而易见。然而,应该理解的是,在表明本公开的优选实施方式时的详细描述和特定实施例仅仅是以示例的方式给出的,因为根据该详细描述,在本公开的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人

员将变得显而易见。

附图说明

[0085] 现在将结合附图描述本公开的实施方式,其中:

[0086] 图1是描绘部分未折叠2M4J的自由能概貌图。

[0087] 图2是部分未折叠2M4J的概貌图,阈值7kcal/mol。

[0088] 图3是示出根据残基指数的曲率的示意图。长箭头标识环状肽,短箭标识直链肽。

[0089] 图4(a)是显示涉及残基Q15的侧链重原子的所有二面角的二面角分布的系列图,图4(b)是包含QKLV (SEQ ID NO:1)的环状肽的示意图。

[0090] 图5是显示涉及K16的侧链重原子的角度的二面角分布的图。

[0091] 图6是显示涉及L17的侧链重原子的角度的二面角分布的图。

[0092] 图7是显示涉及V18的侧链重原子的角度的二面角分布的图。

[0093] 图8是显示由集合坐标方法确定的暴露可能性为序列函数的图。峰值出现在中心残基17附近。

[0094] 图9是显示A-β42肽的溶解度与残基指数的图。

[0095] 图10是溶剂可接近的表面积 (SASA)、加权的SASA、 $\sigma_i \cdot \text{SASA}_i$ 和 $\sigma_i \cdot \text{SASA}_i - (\sigma_i \cdot \text{SASA}_i)_{\text{原纤维}}$ 的系列图。箭头标识每个图中的环状结构。

[0096] 图11显示了沿着残基QKLV (SEQ ID NO:1)的侧链的重原子-氢部分的SASA的图。箭头标识每个图中的环状结构。

[0097] 图12是显示包含QKLV (SEQ ID NO:1)的环状化合物的系列示意图。

[0098] 图13是显示与原纤维中那些残基的相应熵相比,环状肽环状(CGQKLVG) (SEQ ID NO:3)和直链肽CGQKLVG (SEQ ID NO:3)中QKLV (SEQ ID NO:1)的每个残基的熵变化的图。

[0099] 图14是显示环状肽和直链肽之间的Q的侧链中的Cα-Cβ-Cγ-Cδ原子之间的二面角不同的示意图。

[0100] 图15:组织培养上清液克隆与环肽和直链肽(图A)以及A-β寡聚体和A-β单体(图B)的表面等离子体共振 (SPR) 直接结合测定。

[0101] 图16:比较SPR直接结合测定与ELISA中的组织培养上清液克隆结合。

[0102] 图17:选择克隆与环状肽、直链肽、A-β单体和A-β寡聚体的SPR直接结合测定。

[0103] 图18:使用6E10阳性对照抗体(A)和针对环状(CGQKLVG) (SEQ ID NO:3)产生所选择和纯化的抗体(305-62,8H10)(B)对尸体AD脑中的斑块进行免疫组织化学染色。

[0104] 图19:使用SPR间接(捕获)结合测定对选择和纯化的抗体进行次级筛选。A-β寡聚体与捕获抗体的SPR结合响应减去A-β单体与捕获抗体的结合响应(圆圈);来自AD患者的合并可溶性脑提取物(BH)与捕获抗体的SPR结合响应减去来自非AD对照的合并脑提取物与捕获抗体的结合响应(三角形);来自AD患者的合并脑脊液(CSF)与捕获抗体的SPR结合响应减去来自非AD对照的合并CSF与捕获抗体的结合响应(正方形)。

[0105] 图20:与A-β寡聚体结合的抗体的验证。SPR传感图和不同浓度的商业制备的稳定A-β寡聚体与固定化抗体结合的结合响应图。图A显示了阳性对照mAb6E10的结果,图B显示了阴性同种型对照的结果,图C显示了针对环状(CGQKLVG) (SEQ ID NO:3)产生的抗体的结果。图D绘制了针对包含QKLV (SEQ ID No:1)的环状肽与1微摩尔浓度的A-β寡聚体产生的几

种所选择的抗体克隆的结合。

[0106] 图21A-C:显示了使用包含QKLV (SEQ ID NO:1)的环状肽产生的代表性抗体存在(星号)或不存在(正方形)时的A- β 聚集体外增殖的图。

[0107] 图22A-B:A)显示存在或不存在不同摩尔比的阴性同种型对照(A)或针对环状(CGQKLVG (SEQ ID NO:3))产生的抗体(B)时,暴露于毒性A- β 寡聚体(ABO)的大鼠原代皮质神经元的存活率的图。对照组包括单独培养的神经元(CTRL),用抗体温育的无寡聚体的神经元以及存在或不存在A寡聚体神经保护性人肌肽(HNG)培养的神经元。

[0108] 表1显示了所选择的组织培养上清液克隆的结合性质。

[0109] 表2显示了对所选择的纯化抗体的结合性质总结。

[0110] 表3列出了针对环状(CGQKLVG) (SEQ ID NO:3)产生的抗体的寡聚体结合-单体结合。

[0111] 表4列出了在福尔马林固定组织上测试的抗体的性质。

[0112] 表5是示例性毒性测定。

[0113] 表6列出了克隆305-61 (7E9)的CDR序列。

[0114] 表7列出了克隆305-61 (7E9)的重链和轻链可变序列。

[0115] 表8列出了克隆305-62 (8H10)的CDR序列。

[0116] 表9列出了克隆305-62 (8H10)的重链和轻链可变序列。

[0117] 表10是A- β 表位序列和具有连接子的选择A- β 序列的表。

[0118] 表11提供了完整的A- β 1-42人多肽序列。

具体实施方式

[0119] 产生寡聚体特异性抗体的先决条件是鉴定单体或原纤维上不存在或存在的程度低得多的A- β 肽上的靶标。这些寡聚体特异性表位在初级序列中可能与单体或原纤维中相应的片段没有不同,然而它们在寡聚体的情况下在构象上是不同的。也就是说,就寡聚体中主链和/或侧链构象而言,它们将呈现不同的构象,其不会存在于单体和/或原纤维中。

[0120] 产生于直链肽区域的抗体倾向于对寡聚体不是选择性的,因此也可以与单体结合。

[0121] 为了开发对A- β 的寡聚体形式是选择性的抗体,本发明人试图鉴定在原纤维的情况下易于破坏并且可能暴露在寡聚体表面上的原纤维序列的区域。

[0122] 如实施例所述,本发明人已经鉴定了原纤维情况下易于破坏的预测区域。本发明人设计了包含已鉴定表位的环状化合物以满足上述标准(更高的曲率、更高的暴露表面积和/或不同二面角分布)。

[0123] 可以使用包含靶标区域的环状肽产生抗体,该抗体与相同序列的直链肽(例如相应的直链序列)相比选择性结合环状肽。描述了实验结果并鉴定了表位特异性和构象选择性抗体,该抗体与合成单体相比选择性结合合成寡聚体、对于对照CSF优先结合来自AD患者的CSF和/或对于对照可溶性脑提取物优先结合来自AD患者的可溶性脑提取物。AD脑组织的进一步染色鉴定了没有或可忽略斑块结合的抗体,并且体外研究发现抗体抑制A β 寡聚体增殖和聚集。

[0124] I. 定义

[0125] 如本文所用,术语“A- β ”可以不同地称为“淀粉样蛋白beta”,“淀粉样蛋白 β ”,Abeta,A-beta或“AB”。淀粉样蛋白 β 是36-43个氨基酸的肽,并且包括所有种类的所有野生型和突变体形式,特别是人A- β 。A- β 40是指40个氨基酸的形式;A- β 42是指42个氨基酸形式等。人野生型A- β 42的氨基酸序列示于SEQ ID NO:31中。

[0126] 如本文所用,本文中的术语“A- β 单体”是指A- β (例如1-40、1-41、1-42、1-43)肽的单个亚基形式。

[0127] 如本文所用,术语“A- β 寡聚体”是指多种A- β 亚基中的任一种,其中,几个(例如至少两个)A- β 单体非共价地聚集在小于约100,或更通常小于约50个单体的构象柔性的、部分有序的三维小球中。例如,寡聚体可以含有3或4或5或更多种单体。如本文所用的术语“A- β 寡聚体”包括合成的A- β 寡聚体和/或天然的A- β 寡聚体。“天然A- β 寡聚体”是指体内形成的A- β 寡聚体,例如在患有AD的受试者的脑和CSF中。

[0128] 如本文所用,术语“A- β 原纤维”是指包含在电子显微镜下显示纤维状结构的非共价相关的单个A- β 肽的组装体的分子结构。纤维状结构通常是“交叉 β ”结构;关于多聚体的大小没有理论上限,并且原纤维可以包含成千或成千上万个单体。原纤维可以通过成千个单体聚集以形成老年斑块,这是AD的主要病理学形态诊断之一。

[0129] 如本文所用的术语“直链A- β 肽、A- β 单体和/或原纤维中Q、K、L和/或V占据的不同构象”意指与直链非结构化A- β 肽、A- β 单体和/或A- β 原纤维(例如在PDB 2MJ4和图14中所示)中的Q的所述性质相比,具有选自溶剂可及性、熵、曲率(例如在肽QKLV(SEQ ID NO:1)的情况下)和一个或多个二面角。图4A显示了与残基Q的单体或原纤维相比的不同构象分布。图5和6分别显示了残基K和L的不同类似构象分布,并且K和L可以与原纤维和单体两者区分开。不同构象可以是类似的,比比较构象更少或更多“约束”。例如图13证明了所述环状化合物中的Q、K和L比在A- β 单体中更受多约束。

[0130] 术语“氨基酸”包括所有天然存在的氨基酸以及修饰的L-氨基酸。氨基酸的原子可以包括不同的同位素。氨基酸可以包含取代氢的氘、取代氮-14的氮-15和取代碳-12的碳-13以及其它类似的变化。

[0131] 本文所用的术语“抗体”旨在包括单克隆抗体、多克隆抗体、单链、镶饰抗体、人源化抗体和其它嵌合抗体及其结合片段(包括例如单链Fab片段、Fab'2片段或单链Fv片段)。本文所指的“组织培养上清液克隆”是指由杂交瘤分泌到上清液中用于收集和研究的单克隆抗体。抗体可以来自重组来源和/或在动物(例如兔子、美洲驼、鲨鱼等)中生产。还包括可以在转基因动物中或使用生物化学技术产生或可以从诸如噬菌体文库的文库中分离的人抗体。人源化或其它嵌合抗体可以包括来自一种或多种同种型或类别或种类的序列。

[0132] 短语“分离抗体”是指已经从生产抗体的来源中去除的体内或体外生产的抗体,例如动物、杂交瘤或其它细胞系(如生产抗体的重组昆虫、酵母或细菌细胞)。分离的抗体任选地是“纯化的”,这意指至少:80%、85%、90%、95%、98%或99%的纯度。

[0133] 如本文所用的术语“结合片段”涉及包含比完好或完整抗体或抗体链更少的氨基酸残基且结合抗原或与完好抗体竞争的抗体或抗体链的一部分或部分。示例性的结合片段包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')2、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、纳米抗体、微型抗体、双抗体和其多聚体。片段可以通过化学或酶处理完好或完整的抗体或抗体链而获得。片段也可以通过重组手段获得。例如,可以通过用胃蛋白酶处理抗体产生F(ab')2片段。可以处理所

得到的F(ab')₂片段以还原二硫键而生产Fab'片段。木瓜蛋白酶消化可以导致Fab片段的形成。也可以通过重组表达技术构建Fab、Fab'和F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、微型抗体、双抗体、双特异性抗体片段和其它片段。

[0134] 本领域公认的术语“IMGT编号”或“ImMunoGeneTics数据库编号”是指编号氨基酸残基的系统,其比抗体的重链和轻链可变区域中的其它氨基酸残基或其抗原结合部分更可变(即高变)。

[0135] 当抗体被称为特异性结合例如QKLV (SEQ ID NO:1)的表位时,意指抗体特异性结合含有特定残基或其部分的肽,例如QKLV的至少2个残基,具有最小亲和力,并且不结合比例如同种型对照抗体更大的无关序列或无关序列空间取向。这样的抗体不一定与QKLV (SEQ ID NO:1)的每个残基接触,并且所述表位内的每个单个氨基酸取代或缺失不一定显著影响和/或同等影响结合亲和力。

[0136] 当抗体被称为选择性结合诸如构象表位例如QKLV (SEQ ID NO:1)的表位时,意指该抗体优先结合含有特定残基的一种或多种特定构象或具有比它以另一种构象结合所述残基更大亲和力的部分。例如,当抗体被称为相对于相应的直链肽选择性结合包含QKLV或相关表位的环状肽,抗体以比它结合直链肽至少高2倍的亲和力结合环状肽。

[0137] 如本文所用,术语“构象表位”是指其中氨基酸序列具有特定的三维结构的表位,其中相应的直链非结构化表位序列中不存在的三维结构的一个方面被同源抗体识别。特异性结合构象特异性表位的抗体识别该构象特异性表位的一个或多个氨基酸的空间排列。例如,与使用直链QKLV (SEQ ID NO:1)产生的抗体相比,QKLV (SEQ ID NO:1)构象表位指选择性识别抗体的表位。特异性和/或选择性结合构象表位的抗体特异性和/或选择性识别表位序列的一个或多个氨基酸的空间排列。例如,QKLV (SEQ ID NO:1)构象表位指特异性和/或选择性地被抗体识别的QKLV (SEQ ID NO:1)的表位,例如与相应的直链QKLV (SEQ ID NO:1)化合物相比至少2倍、3倍、5倍、10倍、50倍、100倍、250倍、500倍或1000倍以上的更高选择性。

[0138] 如本文所用的关于氨基酸或其侧链的氨基酸序列内或关于较大多肽中的氨基酸序列的术语“受约束构象”意指相对于相应的直链肽序列或序列或更大的多肽,氨基酸二面角的旋转移动性降低,导致允许的构象数目减少。这可以例如通过找到二面角自由度体系的熵降低来量化,并且QKLV (SEQ ID NO:1)被绘制在图13中。例如,如果序列中的侧链具有比直链肽更少的构象自由度,则熵将降低。这种构象限制会增强特异性产生于该抗原的抗体的构象选择性。本文所用的术语“受更多约束构象”意指一种或多种二面角的二面角分布(允许的二面角的体系)比对比构象受更多约束至少10%,如例如通过氨基酸例如Q、K、L和/或V的熵所确定的。具体而言,在受更多约束的环状构象体系中QKLV (SEQ ID NO:1)相对于原纤维中的熵的平均熵变(S(受约束)-S(直链))平均降低超过10%或降低超过20%或降低超过30%或降低超过40%,来自不受约束的构象体系,例如对于直链肽S(直链)-S(原纤维)数量(图13绘制了这种熵降低)。

[0139] 如本文所用的术语“相关表位”意指QKLV (SEQ ID NO:1)的至少两个残基,任选地KL。其是在A-βQKLV (SEQ ID NO:1)至少两个残基的N-末端和/或C-末端中包含1或2个氨基酸残基的抗原性和/或序列。示例性的相关表位可以包括SEQ ID NO:1、2、9和10中所示的A-β序列。

[0140] 如本文所用的关于抗体的术语“无或可忽略的斑块结合”或“缺乏或具有可忽略的斑块结合”意指抗体在免疫组织化学(例如原位)上不显示典型的斑块形态染色,并且染色水平与用IgG阴性(例如不相关的)同种型对照看到的水平相当或不超过2倍。

[0141] 术语“分离肽”是指例如通过重组或合成技术生产并从生产肽的来源(如重组细胞或残余肽合成反应物)中除去肽。分离肽任选地是“纯化的”,这意指至少:80%、85%、90%、95%、98%或99%的纯度和任选的药物级纯度。

[0142] 如本文所用的术语“可检测标记”是指诸如肽序列(例如myc标签,HA标签,V5标签或NE标签),可被附加或引入到本文所述的肽或化合物中且能够直接或间接生产可检测信号的荧光蛋白。例如,标记可以是不透射线的(radio-opaque),正电子发射放射性核素(例如用于PET成像)或放射性同位素(例如³H、¹³N、¹⁴C、¹⁸F、³²P、³⁵S、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I);荧光(荧光团)或化学发光(发色团)化合物(如异硫氰酸荧光素、罗丹明或萤光素);酶(如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶);成像剂;或金属离子。可检测标记也可以间接检测,例如使用第二抗体。

[0143] 通常使用的术语“表位”意指抗体特异性识别的抗原中的抗体结合位点,通常是多肽区段。如本文所用的“表位”还可以指使用所述的集合坐标方法在A- β 上鉴定的氨基酸序列或其部分,使用包含表位序列的肽可以产生抗体。例如,针对与包含鉴定靶标区域QKLV (SEQ ID NO:1)的环状化合物相对应的分离肽产生的抗体可识别所述表位序列的部分或全部。在本说明书的上下文中,当表位可接近地被抗体结合时,表位是“可接近的”。

[0144] 如本文所用的术语“更大亲和力”是指抗体X与靶标Z更强地结合(K_{on})和/或具有更小的解离常数(K_{off})的抗体结合的相对程度,并且在这种情况下抗体X对靶标Y具有比对Z更大亲和力。同样,本文中的术语“较低亲和力”是指抗体X与靶标Y更低强度地结合和/或具有比靶标Z更大的解离常数的抗体结合的程度,并且在这种情况下抗体X对靶标Y具有比对Z更低亲和力。抗体与其靶标抗原之间结合的亲和力可以表示为等于 $1/K_D$ 的 K_A ,其中, K_D 等于 K_{on}/K_{off} 。 K_{on} 和 K_{off} 值可以使用表面等离子体共振技术来测量,例如使用Molecular Affinity Screening System(MASS-1)(Sierra Sensors GmbH,Hamburg,德国)。与直链形式的相应序列(例如非环化序列)相比,例如对环状化合物(任选环状肽)中呈现的构象具有选择性的抗体对环状化合物(例如环状肽)具有更大亲和力。

[0145] 同样如本文所用,术语“免疫原性”是指引发抗体生产、激活针对免疫原抗原部分的T细胞和其它反应性免疫细胞的物质。

[0146] 关于环状化合物的术语“相应的直链化合物”是指包含或由与环状化合物相同的序列或化学部分组成但例如具有直链肽溶液中存在性质的直链(即非环化)形式的化合物(任选肽),例如相应的直链化合物可以是未环化的合成肽。

[0147] 如本文所用的关于抗体的“特异性结合”意指抗体识别表位序列并以最小亲和力结合其靶标抗原。例如,多价抗体以至少 $1e-6$ 、至少 $1e-7$ 、至少 $1e-8$ 、至少 $1e-9$ 或至少 $1e-10$ 的 K_D 结合其靶标。大于至少 $1e-8$ 的亲和力可能是优选的。诸如包含一种可变结构域的Fab片段的抗原结合片段可以以比与非片段化抗体的多价相互作用低10倍或100倍的亲和力结合其靶标。

[0148] 如本文所用的关于选择性结合A- β 形式(例如原纤维、单体或寡聚体)或环状化合物的抗体的术语“选择性结合”意指抗体以至少2倍、至少3倍、至少5倍、至少10倍、至少100

倍、至少250倍、至少500倍或至少1000倍或更高的亲和力所述形式。因此,与另一种形式和/或直链肽相比,对特定构象(例如寡聚体)更具选择性的抗体优先以至少2倍等的更大亲和力结合特定形式的A- β 。

[0149] 如本文所用的术语“连接子”意指可以共价连接至包含QKLV (SEQ ID NO:1) 表位肽(任选地连接至QKLV (SEQ ID NO:1) 肽N-末端和C-末端)的肽的化学部分以生产环状化合物。连接子可以包含间隔子和/或一个或多个可官能化的部分。通过可官能化部分的连接子可以连接至载体蛋白或免疫原增强剂例如钥孔血蓝蛋白(KLH)。

[0150] 如本文所用的术语“间隔子”意指任何非免疫原性或免疫原性较差的化学部分,其可直接或间接共价连接至肽N-末端和C-末端以生产长度比肽本身更长的环状化合物,例如间隔子可以连接至由QKLV (SEQ ID NO:1) 组成的肽的N-末端和C-末端以生产主链长度比QKLV (SEQ ID NO:1) 序列本身更长的环状化合物。也就是说,具有间隔子(例如3个氨基酸残基)的环状肽比没有间隔子的环状肽具有更大的闭环。间隔子可以包括但不限于诸如G、A或PEG重复的非免疫原性部分,例如GQKLV (SEQ ID NO:4)、GQKLVG (SEQ ID NO:5)、GGQKLVG (SEQ ID NO:6)、GQKLVGG (SEQ ID NO:7)等(特定实施方式参见图12)。间隔子可以包含或偶联至一个或多个官能化部分,例如一种或多种半胱氨酸(C)残基,其可以散布在间隔子内或与间隔子的一个或两个末端共价连接。当诸如C残基的可官能化部分共价连接至间隔子的一个或多个末端时,间隔子间接共价连接至肽。间隔子还可以包含间隔子残基中的可官能化部分,如将生物素分子引入到氨基酸残基中的情况。

[0151] 如本文所用的术语“可官能化部分”是指具有“官能团”的化学实体,其在本文所用时是指与一种原子基团或单个原子反应的另一种原子基团或单个原子(所谓的“互补官能团”)以在两个基团或原子之间形成化学相互作用。在半胱氨酸的情况下,官能团可以是反应形成二硫键的-SH。因此,例如连接子可以是CCC。与另一种原子基团的反应可以是共价键或强非共价键,例如可以具有 $K_d \sim 1e-14$ 的生物素-链霉抗生物素蛋白键的情况。本文所用的强非共价键意指具有至少 $1e-9$ 、至少 $1e-10$ 、至少 $1e-11$ 、至少 $1e-12$ 、至少 $1e-13$ 或至少 $1e-14$ 的 K_d 的相互作用。

[0152] 蛋白质和/或其它试剂可以被官能化(例如偶联)至环状肽上以帮助免疫原性,或在体外研究中充当探针。为了该目的,可以使用能够反应的任何可官能化的部分(例如形成共价或非共价但强的键)。在一种具体的实施方式中,可官能化的部分是半胱氨酸残基,其与感兴趣的蛋白质上的未配对的半胱氨酸反应以形成二硫键,其可以是例如免疫原性增强剂如钥孔血蓝蛋白(KLH),或用于体外免疫印迹或免疫组织化学测定的载体蛋白如牛血清白蛋白(BSA)。

[0153] 如本文所用的术语“与.....反应”通常意指存在电子的流动或静电电荷的转移导致形成化学相互作用。

[0154] 如本文所用的术语“动物”或“受试者”包括动物界的所有成员,包括哺乳动物,任选地包括或不包括人。

[0155] 如本文所用的“保守氨基酸取代”是其中一种氨基酸残基被另一种氨基酸残基取代而不消除蛋白质所需性质的取代。通过用具有相似疏水性、极性和R链长度的氨基酸相互替代可以制备合适的保守氨基酸取代。保守氨基酸取代的实例包括:

[0156]

保守取代	
氨基酸类型	可取代氨基酸
亲水	Ala、Pro、Gly、Glu、Asp、Gln、Asn、Ser、Thr
巯基	Cys
脂肪族	Val、Ile、Leu、Met
碱性	Lys、Arg、His
芳香	Phe、Tyr、Trp

[0157] 如本文所用的术语“序列同一性”是指两条多肽序列或两条核酸序列之间的序列同一性百分比。为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性,将序列进行比对以达到最佳比较目的(例如可以在第一个氨基酸或核酸序列的序列中引入空位以与第二个氨基酸或核酸序列进行最佳比对)。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置上的氨基酸残基或核苷酸。当第一个序列中的位置被与第二个序列中相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,然后则该分子在该位置是相同的。两个序列之间的百分比同一性是序列共有的相同位置的数目的函数(即,同一性% = 相同重叠位置的数目/位置的总数 × 次数 × 100%)。在一种实施方式中,这两个序列具有相同的长度。两个序列之间的百分比同一性的确定也可以使用数学算法完成。用于比较两个序列的数学算法的优选的非限制性实例是Karlin和Altschul的算法(Karlin和Altschul,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.87:2264-2268),在Karlin和Altschul,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:5873-5877中改进。这种算法并入Altschul等1990,J.Mol.Biol.215:403的NBLAST和XBLAST程序中。可以用NBLAST核苷酸程序参数集进行BLAST核苷酸搜索,例如分数=100,字长=12以获得与本申请的核酸分子同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序参数集进行BLAST蛋白质搜索,例如得分-50,字长=3以获得与本文所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以如Altschul等1997,Nucleic Acids Res.25:3389-3402中所述的使用空位BLAST。或者,PSI-BLAST可用于进行检测分子间远缘关系的迭代搜索(Id.)。当使用BLAST、空位BLAST和PSI-Blast程序时,可以使用各个程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数(参见例如NCBI网站)。用于比较序列的数学算法的另一种优选的非限制性实例是Myers和Miller的算法(Myers和Miller,1988,CABIOS 4:11-17)。这种算法并入作为GCG序列比对软件包的一部分的ALIGN程序(版本2.0)中。当使用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表,12的空位长度罚分和4的空位罚分。两个序列之间的同一性百分比可以使用与上述相似的技术来确定,有或没有允许空位。在计算百分比同一性时,通常只计算精确匹配。

[0158] 对于抗体,当通过IMGT或其它(例如Kabat编号惯例)最大程度地比对抗体序列时,可以确定百分比序列同一性。比对后,如果受试者抗体区域(例如重链或轻链的完整成熟可变区域)与参照抗体的相同区域进行比较,则受试者和参照抗体区域之间的百分比序列同一性是在受试者和参照抗体区域中由相同氨基酸占据的位置的数量除以两个区域的比对

位置的总数,未计数的空位乘以100以转换为百分比。

[0159] 如本文所用的术语“核酸序列”是指由天然存在的碱基、糖和糖间(主链)连接组成的核苷或核苷酸单体的序列。该术语还包括包含非天然存在的单体或其部分的经修饰或取代的序列。本申请的核酸序列可以是脱氧核糖核酸序列(DNA)或核糖核酸序列(RNA),并且可以包括天然存在的碱基,包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸苷和尿嘧啶。序列还可以含有修饰的碱基。这种修饰的碱基的实例包括氮杂和脱氮腺嘌呤、鸟嘌呤,胞嘧啶、胸苷和尿嘧啶;和黄嘌呤和次黄嘌呤。核酸可以是双链或单链的,并且代表有义链或反义链。此外,术语“核酸”包括互补核酸序列以及密码子优化或同义密码子等价物。如本文所用的术语“分离的核酸序列”是指当通过重组DNA技术生产时基本上不含细胞物质或培养基的核酸,或当化学合成时的化学前体或其它化学物质。分离的核酸也基本上不含天然位于该核酸所来源的核酸侧翼的序列(即位于核酸5'和3'末端的序列)。

[0160] “有效连接”旨在表示核酸以允许核酸表达的方式与调控序列连接。合适的调控序列可以来源于多种来源,包括细菌、真菌、病毒、哺乳动物或昆虫的基因。选择合适的调控序列取决于所选择的宿主细胞,并且可以由本领域普通技术人员容易地完成。这种调控序列的实例包括:转录启动子和增强子或RNA聚合酶结合序列,核糖体结合序列(包括翻译起始信号)。另外,根据所选择的宿主细胞和所用载体,可以将其它序列例如复制起点、额外的DNA限制性位点、增强子和赋予转录诱导性的序列并入到表达载体中。

[0161] 如本文中所用的术语“载体”包含用于核酸分子的任何中间媒介物,其使得所述核酸分子例如能够被引入到原核和/或真核细胞中和/或整合到基因组中,并包括质粒、噬菌粒、噬菌体或病毒载体(如基于逆转录病毒的载体,腺相关病毒载体等)。如本文所用的术语“质粒”通常是指染色体外遗传物质的构建体,通常是环状DNA双链体,其可独立于染色体DNA复制。

[0162] “至少适度严格的杂交条件”是指选择促进溶液中两个互补核酸分子之间的选择性杂交的条件。杂交可以发生在全部或部分核酸序列分子上。杂交部分的长度通常至少为15(例如20、25、30、40或50)个核苷酸。本领域技术人员将认识到,核酸双链体或杂合体的稳定性由 T_m 决定, T_m 在含钠缓冲液中是钠离子浓度和温度的函数($T_m = 81.5^{\circ}\text{C} - 16.6 (\text{Log}10 [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% (\text{G}+\text{C}) - 600/1)$ 或类似等式)。因此,确定杂交稳定性的洗涤条件中的参数是钠离子浓度和温度。为了鉴定与已知核酸分子相似但不相同的分子,可以假设1%错配而导致 T_m 降低约 1°C ,例如如果寻找具有>95%同一性的核酸分子,则最终洗涤温度将降低约 5°C 。基于这些考虑,本领域技术人员将能够容易地选择适当的杂交条件。在优选实施方式中,选择严格杂交条件。举例来说,可采用以下条件实现严格杂交:基于上述等式,在 $T_m - 5^{\circ}\text{C}$ 下在5x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)/5x邓波特溶液/1.0%SDS下进行杂交,接着在 60°C 下 $0.2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}$ 中洗涤。中等严格的杂交条件包括在 42°C 下3x SSC中进行洗涤步骤。然而,应该理解的是,使用不同的缓冲液、盐和温度可以实现等同的严格性。有关杂交条件的其它指导可见于:Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N.Y., 2002, 以及: Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001。

[0163] 如本文所用以及如本领域中充分理解的术语“治疗”意指用于获得有益或期望结果(包括临床结果)的方法。有益的或期望的临床结果可包括但不限于一种或多种症状或病

症的缓解或改善、疾病程度的减少、疾病状态的稳定(即不恶化),预防疾病的传播,疾病进展的延缓或减缓,疾病状态的改善或减轻,疾病复发的减少以及缓和(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的。如果不接受治疗,“治疗”也意指与预期的生存期相比延长的生存期。如本文所用的“治疗”还包括预防性治疗。例如,可以治疗具有早期AD的受试者以预防进展,可以用本文所述的化合物、抗体、免疫原、核酸或组合物治疗以预防进展。

[0164] 如本文所用的术语“施用”意指向细胞或受试者施用治疗有效剂量的本公开的化合物或组合物。

[0165] 如本文所用,短语“有效量”意指在实现期望结果所需的剂量和时间段内有效的量。施用于受试者时的有效量可以根据诸如疾病状态、年龄、性别、受试者体重等因素而变化。可以调整剂量方案以提供最佳治疗响应。

[0166] 术语“药学上可接受的”意指载体、稀释剂或赋形剂与制剂的其它组分相容并且对其接受者基本上不有害。

[0167] “包含”或“包括”一种或多种所列举的元素的组合物或方法可以包括未具体列举的其它元素。例如,“包含”或“包括”抗体的组合物可以含有单独的抗体或与其它成分组合的抗体。

[0168] 在理解本公开的范围时,如本文所用的术语“由.....组成”及其派生词旨在是指定所陈述的特征、元素、组件、组、整体和/或步骤的存在的封闭式术语,并且还排除其它未陈述的特征、元素、组件、组、整体和/或步骤的存在。

[0169] 本文通过端点列举的数值范围包括包含在该范围内的所有数字和分数(例如1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.90、4和5)。还应该理解的是,所有数字和分数都被认为是由术语“约”修饰的。此外,应该理解的是,除非内容明确地另外指出,否则“一个”,“一种”和“该”包括复数指代。术语“约”意指正在进行参照的数目的正或负0.1-50%、5-50%或10-40%,优选10-20%,更优选10%或15%。

[0170] 此外,在特定部分中描述的定义和实施方式旨在适用于本文所述的其它实施方式,如本领域技术人员将理解的那样,它们适合于这些实施方式。例如,在下面的段落中,更详细地定义了本发明的不同方面。除非有明确的相反指示,否则如此定义的每个方面可以与任何其它方面或方面组合。特别地,指示为优选或有利的任何特征可以与被指示为优选或有利的任何其它特征或特征组合。

[0171] 非上下文另有明确规定,否则冠词“一个”,“一种”和“该”的单数形式包括复数参照。例如,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可以包括多种化合物,包括它们的混合物。

[0172] II. 表位和结合蛋白

[0173] 本发明人已经在A- β 的氨基酸残基15-18处鉴定了A- β QKLV(SEQ ID NO:1)中的表位。他们已经进一步鉴定了表位或其部分可以是构象表位,并且QKLV(SEQ ID NO:1)可以选择性接近A- β 寡聚种类中的抗体结合。

[0174] 不希望受理论束缚,原纤维可以呈现具有催化低聚反应倾向的相互作用位点。这只有当正常患者中不存在的选择性原纤维表面暴露并且能够与单体发生异常相互作用(即呈递给单体)时才会发生。炎症期间存在的环境挑战诸如低pH值、渗透剂,或氧化损伤可能会引起原纤维的破坏,从而导致暴露于更弱的稳定区域。然后,有兴趣预测这些弱稳定区

域,并利用这些预测来合理设计可能靶向它们的抗体。在原纤维中可能被破坏的区域也可能是寡聚种类中暴露区域的良好候选者。

[0175] 预测倾向于病症的连续蛋白质区域的基于计算机的系统和方法在2015年11月9日提交的美国专利申请序号62/253044“通过集体坐标偏差预测被错误的蛋白表位的系统和方法”中和2009年10月6日提交的“用于预测错误折叠的蛋白质表位的方法和系统”中描述,每个的全部内容通过引用并入本文。如实施例所述,将这些方法应用于A- β 并鉴定了在A- β 寡聚体中更可接近的表位。

[0176] 如实施例所述,环状肽环状(CGQKLVG)(SEQ ID NO:3)可以捕获相对于单体和/或原纤维种类的寡聚体中表位的构象差异。例如,发现了环状7-聚环状(CGQKLVG)(SEQ ID NO:3)中几种二面角的溶剂可接近表面积、曲率和二面角分布的差异与A- β 单体和原纤维显著不同,表明环状肽提供了与直链非结构化表位不同的构象表位。

[0177] 与单体A- β 和A- β 原纤维斑块相比使用包含环状(CGQKLVG)(SEQ ID NO:2)的免疫原产生的抗体相对于直链CGQKLVG(SEQ ID NO:2)选择性结合环状(CGQKLVG)(SEQ ID NO:2)并选择性结合合成和/或天然寡聚A- β 种类。另外,产生于环状(CGQKLVG)(SEQ ID NO:2)的抗体能够抑制A- β 聚集的体外增殖并抑制神经细胞模型中A- β 寡聚体诱导的毒性。

[0178] i) QKLV(SEQ ID NO:1)“表位”化合物

[0179] 因此,本公开鉴定了由对应于A- β 上的氨基酸残基15-18的氨基酸QKLV(SEQ ID NO:1)或其部分组成的A- β 中的构象表位。

[0180] 一个方面包括包含A- β 肽的化合物,所述A- β 肽包含或由QKLV(SEQ ID NO:1)或相关表位的序列和/或任何前述的部分组成。

[0181] 在一些实施方式中,包含QKLV(SEQ ID NO:1)的A- β 肽可包括在QKLV(SEQ ID NO:1)(例如HQKLV(SEQ ID NO:2))的A- β N-末端和/或C-末端的1、2或3个额外的残基。A- β 中QKLV(SEQ ID NO:1)N-末端的3个氨基酸是VHH,QKLV(SEQ ID NO:1)的C-末端3个氨基酸是FFA。在一种实施方式中,A- β 肽是7个氨基酸、6个氨基酸或5个氨基酸的最大值。

[0182] 在一种实施方式中,A- β 肽包含在A- β 中从C-末端到QKLV(SEQ ID NO:1)的一个或两个额外的残基。

[0183] 在一种实施方式中,该化合物包含表10中列出的序列。

[0184] 在一种实施方式中,化合物还包括连接子。该连接子包含间隔子和/或一个或多个可官能化的部分。连接子可以例如包含1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸和/或等同功能的分子,例如聚乙二醇(PEG)部分,和/或其组合。在一种实施方式中,间隔子氨基酸选自非免疫原性或免疫原性较差的氨基酸残基,例如G和A,例如间隔子可以是GGG、GAG、G(PEG)G、PEG-PEG-GG等。可以包括一个或多个可官能化的部分(例如具有官能团的氨基酸)例如用于将化合物偶联至试剂或可检测标签或载体(如BSA)或免疫原性增强剂(如KLH)。

[0185] 在一种实施方式中,连接子包含GC-PEG、PEG-GC、GCG或PEG-C-PEG。

[0186] 在一种实施方式中,连接子包含1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸。

[0187] 在一种实施方式中,其中包含QKLV(SEQ ID NO:1)的A- β 肽包含在A- β 中发现的N-末端和/或C-末端到QKLV(SEQ ID NO:1)(例如HQKLV(SEQ ID NO:2))的1、2或3个额外残基,环化化合物中的连接子共价连接至A- β 残基的N-末端和/或C-末端(例如至残基H和V)。环化化合物可以合成为直链分子,在环化之前,连接子共价连接至包含QKLV(SEQ ID NO:1)的肽的

N-末端或C-末端。或者,在环化之前,连接子的一部分共价连接至N-末端,一部分共价连接至C-末端。在任一情况下,直链化合物例如以头对尾环化(例如酰胺键环化)环化。

[0188] 可以使用蛋白质化学中众所周知的技术(如固相合成或均相溶液合成)通过化学合成制备化合物的蛋白质部分。

[0189] 在一种实施方式中,该化合物是环状化合物。在一种实施方式中,环状化合物是环肽(环状肽)。

[0190] 本文提及的“环状肽”可以指完全蛋白质化合物(例如其中连接子例如为1、2、3、4、5、6、7或8个氨基酸)。应当理解的是,可以将实施例确定的针对环状肽所述的性质并入包含非氨基酸连接子分子的其它化合物(例如其它环状化合物)中。

[0191] 因此,一个方面提供了包含肽QKLV (SEQ ID NO:1) (例如AB肽) 和连接子的环状化合物,其中所述连接子共价偶联至包含QKLV (SEQ ID NO:1) 的肽(任选地当肽由QKLV (SEQ ID NO:1) 组成时,Q和V残基),任选地其中,至少Q在包含QKLV (SEQ ID NO:1) 的直链性肽中处于不同的构象,和/或单体和/或原纤维中Q的构象。并且任选地其中,至少Q或至少K或至少L在环状化合物中比在包含QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关表位序列的直链肽中占据的构象受更多约束的构象。

[0192] 包含A-β序列的直链肽可以包含在直链化合物中。在一种实施方式中,直链化合物或包含QKLV (SEQ ID NO:1) 的直链肽是相应的直链肽。在另一种实施方式中,直链肽是包含QKLV (SEQ ID NO:1) 的任何长度的A-β肽,包括例如包含A-β残基1-35的直链肽或其较小部分(如A-β残基10-20、11-20、12-20、13-20、10-19、10-18等)。在一些实施方式中,直链肽也可以是全长A-β肽。

[0193] 在一种实施方式中,所述环状化合物包括包含或由QKLV (SEQ ID NO:1) 和连接子组成的肽,其中,所述连接子偶联至所述肽的N-末端和C-末端(例如,当肽由QKLV (SEQ ID NO:1) 组成时,Q和V残基)。在一种实施方式中,在环状化合物中至少Q处于与包含QKLV (SEQ ID NO:1) 的直链肽中由Q占据的构象不同的构象中。在一种实施方式中,在环状化合物中至少Q处于与单体和/或原纤维中由Q占据的构象不同的构象中。

[0194] 在一种实施方式中,不同构象是受约束的构象。

[0195] 在一种实施方式中,与包含QKLV (SEQ ID NO:1) 的直链肽中占据的构象相比,任选地单独至少Q或其与至少K或至少L组合处于受更多约束的构象中。

[0196] 在一种实施方式中,与包含QKLV (SEQ ID NO:1) 的直链肽中占据的构象相比,Q和/或Q与K,L和/或V中的一个或多个的组合的构象以不同构象(任选地以受更多约束的构象)包含在化合物中。

[0197] 例如,不同构象可以在残基Q(任选在Q和/或K,和/或L和/或V) 中包括与直链肽和/或原纤维情况下的肽中的二面角不同的一个或多个不同的二面角。

[0198] 不同构象可以包括相对于直链肽和/或A-β原纤维,表位的一个或多个氨基酸侧链的一个或多个侧链部分的溶剂可接近的表面积(SASA) 增加或减少(特别是针对Q以及针对K或L)。

[0199] 例如,图10(上图)和图11显示了由于主链弯曲,Q和L的侧链在环状化合物中比在直链肽中更多地暴露于溶剂中,这“展示”了侧链。图11显示了侧链上的特异性部分,表明Q的SASA增加来自C_γH₂基团和/或N_εH₂基团。类似地,可以看出L的SASA增加来自C_{δ1}H₃和/或C_δ

$2H_3$ 。

[0200] 在一种实施方式中,相对于直链肽QKLV (SEQ ID NO:1),Q(任选地化合物中的K或L中的一个或多个)的SASA的增加。

[0201] 不同构象还可包括以氨基酸或环状肽QKLV (SEQ ID NO:1) 为中心的曲率相对于直链肽和/或A- β 原纤维的增加。

[0202] 在一种实施方式中,不同构象QKLV (SEQ ID NO:1) 相对于直连QKLV (SEQ ID NO:1) 具有增加的曲率。如实施例4中所述,环状表位主链的曲率相对于直链肽或原纤维情况下的肽的曲率也增加(图3)。

[0203] 测定环状(CGQKLVG) (SEQ ID NO:3),直链CGQKLVG (SEQ ID NO:3) 和在原纤维的情况下的QKLV (SEQ ID NO:1) 中Q、K、L、V的曲率值。如实施例4所述,这些是:

[0204] 环状肽:1.248 1.566 1.422 1.46

[0205] 直链肽:0.870 1.355 0.931 1.303

[0206] 原纤维:0.740 1.159 0.796 1.188

[0207] 这些的平均值是:

[0208] 环状肽:1.42

[0209] 直链肽:1.11

[0210] 原纤维:0.97

[0211] 因此,与直链肽相比,不同构象中Q和/或K、L和/或V中的一个或多个的曲率增加了至少0.1、0.2、0.3或更多弧度。

[0212] 在一种实施方式中,例如与非寡聚构象中被这些残基占据的相比,QK、QKL和/或QKLV (SEQ ID NO:1) 处于不同构象中。

[0213] 例如对于Q和K,相对于直链肽或原纤维中肽,环状肽中由溶解度加权的SASA增加。

[0214] 此外,相对于直链肽,环状肽中的侧链熵降低,使得侧链处于比直链肽更结构化的构象中。

[0215] 环状化合物中优选的构象与直链肽或原纤维中优选的构象不同。具体而言,Q的侧链中的C α -C β -C γ -C δ 原子之间的二面角在环状肽和直链肽之间不同。这在图14以及图4、5和6中示出。

[0216] 在图14中,实线箭头表示通常在环状肽中占据的二面角,虚线箭头表示通常在直链肽中占据的二面角,侧链的该部分显示为半透明。

[0217] 如本文所证明的,环状表位的曲率相对于直链肽或原纤维情况下的肽增加(图3)。还证明了残基Q和/或K和/或L和/或V中的一个或多个二面角与直链肽或原纤维的情况下肽的二面角显著不同。此外,对于表位的一个或多个氨基酸,特别是Q和K,与在原纤维情况下的肽相比,环状肽中侧链的溶剂可接近的表面积(SASA) 增加。对于这些氨基酸,相对于原纤维中的肽,环状肽中由溶解度加权的SASA增加。此外,相对于直链肽,环状肽中侧链熵降低,使得侧链处于比直链肽更结构化的构象中(图13)。

[0218] 也包括显示出类似变化的环状化合物。

[0219] 在一些实施方式中,包括包含QKLV (SEQ ID NO:1) 的肽的环状化合物可以包括QKLV (SEQ ID NO:1) 上游和/或下游的A- β 中的1、2、3或更多个残基。在这种情况下,间隔子与A- β 残基的N-末端和C-末端共价连接。

[0220] 在一种实施方式中,环状化合物是图12中的化合物。

[0221] 制备环化肽的方法是本领域已知的且包括SS环化或酰胺环化(头对尾或主链环化)。该方法在实施例5中进一步描述。例如,在其N-末端和C-末端具有“C”残基的肽(例如CGQKLVC(S_{EQ} ID NO:8))可以通过SS-环化反应以生产环状肽。

[0222] 可以将环状化合物合成为直链分子,其中在环化之前将连接子共价连接至包含A-β肽的肽的N-末端或C-末端。或者,在环化之前连接子的部分共价连接至N-末端,部分共价连接至C-末端。在任一情况下,将直链化合物例如以头对尾环化(例如酰胺键环化)进行环化。

[0223] 在一些实施方式中,连接子或间隔子间接偶联至A-β肽的N-末端和C-末端残基。

[0224] 如实施例4中所述,评估图12A的环状化合物的鉴定的构象表位的相关性。包含QKLV(S_{EQ} ID NO:1)肽的环状化合物例如可用于产生对一种或多种构象具有选择性的抗体。

[0225] 如本文所述的表位QKLV(S_{EQ} ID NO:1)和/或其部分可以是参与A-β的A-β的错误折叠增殖菌株中的潜在靶标,并且识别构象表位的抗体可以例如用于检测这种增殖菌株。

[0226] 另一方面还提供了包含本文所述的A-β肽序列的分离肽,包括直链肽和环状肽。直链肽可以例如用于选择与其缺乏结合的抗体。分离肽可以包含本文所述的连接子序列。如在CGQKLVC(S_{EQ} ID NO:3)直链肽中,连接子可共价偶联至N-末端或C-末端,或部分偶联至N-末端并部分偶联至C-末端。在环状肽中,连接子直接或间接偶联至C-末端和N-末端。

[0227] 另一方面包括包含化合物,任选地本文所述的环状化合物(例如包含例如QKL、KLV或QKLV(S_{EQ} ID NO:1))的免疫原。

[0228] 适当地制备或配制免疫原以施用于受试者,例如免疫原可以是无菌的或纯化的。在一种实施方式中,免疫原是包含QKLV(S_{EQ} ID NO:1)或相关表位序列的环状肽。

[0229] 在一种实施方式中,免疫原包含免疫原性增强剂例如钥孔血蓝蛋白(KLH)。免疫原性增强剂可以例如通过酰胺结合直接偶联至化合物,或通过连接子中的可官能化部分间接偶联至化合物。当连接子是单个氨基酸残基时(例如环状化合物中的A-β肽是6个氨基酸残基),连接子可以是可官能化的部分(例如半胱氨酸残基)。

[0230] 可以通过使用例如Lateef等(2007)所述的方法将含有受约束的表位肽的环状化合物缀合至免疫原性增强剂如钥孔血蓝蛋白(KLH)或载体如牛血清白蛋白(BSA)而生产免疫原,该方法通过引用并入本文。在一种实施方式中,使用实施例3或4中所述的方法。

[0231] 另一方面是编码本文所述化合物或免疫原的蛋白质部分的分离核酸。在实施方式中,所述核酸分子编码SEQ ID NO:1-10中所示的任一个氨基酸序列。

[0232] 在一种实施方式中,核酸分子编码本文所述的QKLV(S_{EQ} ID NO:1)或相关表位和任选地连接子。

[0233] 另一方面是包含所述核酸的载体。本文别处描述了合适的载体。

[0234] ii) 抗体、细胞和核酸

[0235] 上述化合物(特别是上述环状化合物)可以用于产生特异性结合A-β中的QKLV(S_{EQ} ID NO:1)和/或识别A-βQKLV(S_{EQ} ID NO:1)的特异性构象的抗体。如实施例中所证明的,环状化合物CGQKLVC(S_{EQ} ID NO:3)是免疫原性的,并生产许多相对于相应的直链肽特异性和/或选择性结合环状化合物的抗体。另外,针对CGQKLVC(S_{EQ} ID NO:3)产生的抗体特异性

和/或选择性结合A- β 寡聚体,缺乏或具有可忽略的斑块结合,抑制A- β 聚集体的增殖并体外抑制A- β 寡聚体诱导的神经毒性。

[0236] 因此,上述化合物(特别是上述环状化合物)可用于产生特异性结合A- β 中QKLV (SEQ ID NO:1) 和/或识别A- β 中这些残基的特定构象的抗体,包括本文所述的一个或多个差异特征。类似地,包含例如本文所述的相关表位序列(如SEQ ID NO:1、2、9或10)的环状化合物可用于产生特异性选择性结合QKLV (SEQ ID NO:1) 构象表位的抗体。

[0237] 因此,一个方面包括特异性结合具有序列QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关表位序列(例如SEQ ID NO:1、2、9或10中任一所示)的A- β 肽的抗体(包括其结合片段)。

[0238] 在一种实施方式中,A- β 肽包含在环状化合物中,任选地环状肽中,并且抗体对环状化合物中存在的A- β 部分具有特异性或选择性。

[0239] 在一种实施方式中,相对于包含QKLV (SEQ ID NO:1) 的直链肽(任选地在直链(CGQKLVG) (SEQ ID NO:3) 的情况下,例如相应的序列),在环状(CGQKLVG) (SEQ ID NO:3) 的情况下抗体选择性结合环状化合物中的A- β 肽。例如,在一种实施方式中,抗体以环状构象选择性结合QKLV (SEQ ID NO:1),并且环状构象中的QKLV (SEQ ID NO:1) 比直链结构化化合物中QKLV (SEQ ID NO:1) 具有至少2倍、至少3倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍更高的选择性,例如通过ELISA或表面等离子体共振测量的,或任选地使用本文所述的方法。

[0240] 在一种实施方式中,抗体特异性地和/或选择性结合环状化合物的A- β 肽,其中A- β 具有SEQ ID NO:1、2、4-10中任一所示的序列。

[0241] 在一种实施方式中,与直链化合物相比,所述抗体选择性结合环状化合物中存在的任何SEQ ID NO:1-10的序列的A- β 部分。

[0242] 在一种实施方式中,环状化合物是环状肽。在一种实施方式中,环状肽中的A- β 肽是SEQ ID NO:1、2、9或10中的任一。在一种实施方式中,环状肽包含SEQ ID NO:1-10中的任一序列。

[0243] 如实施例所述,可以使用实施例所述的测定选择具有一种或多种性质的抗体。

[0244] 在一种实施方式中,抗体不结合包含序列QKLV (SEQ ID NO:1) 的直链肽,任选地其中,直链肽的序列是用于产生本文所述抗体的环状序列的直链形式,任选地如SEQ ID NO:3所示。

[0245] 在一种实施方式中,抗体是构象特异性和/或选择性A- β 抗体。例如,结合特定表位构象的抗体可以被称为构象特异性抗体。这种抗体可以使用本文所述的方法进行选择。构象特异性抗体可以区别地识别特定A- β 种类或一组相关种类(例如二聚体,三聚体和其它寡聚种类),并且与另一种类或种类组相比可以具有更高的亲和力(例如与A- β 单体或原纤维种类相比)。

[0246] 在一种实施方式中,所述抗体是分离的。

[0247] 在一种实施方式中,所述抗体是外源性抗体。

[0248] 在一种实施方式中,抗体特异性结合A- β 上的表位,所述表位包含或由QKLV (SEQ ID NO:1),相关表位或其部分组成。

[0249] 如实施例所述,Q和/或QK和/或QL残基主要可接近或暴露于与单体和/或原纤维

形式不同的A- β 构象中。

[0250] 因此,另一方面是特异性结合A- β 上的表位的抗体,其中,所述表位包含或由主要参与结合抗体的至少一个氨基酸残基组成,其中,至少一个氨基酸是嵌入序列QKLV (SEQ ID NO:1) 内的Q、K或L。

[0251] 在一种实施方式中,所述表位包含或由主要参与结合抗体的至少两个连续氨基酸残基组成,其中,至少两个连续氨基酸是嵌入QKLV (SEQ ID NO:1) 内的QK或KL。

[0252] 在另一种实施方式中,所述表位由QKLV (SEQ ID NO:1) 组成。

[0253] 在一种实施方式中,抗体不特异性结合单体A- β 。在一种实施方式中,抗体不特异性结合A- β 老年斑块,例如在AD脑组织中原位结合。

[0254] 在另一种实施方式中,与天然或合成寡聚A- β 相比,抗体不会选择性结合单体A- β 。

[0255] 在一种实施方式中,抗体特异性和/或选择性地结合A- β 选择性种类,例如A- β 寡聚体。在一种实施方式中,所述选择性是对A- β 寡聚体的选择比选自A- β 单体和/或A- β 原纤维和/或包含QKLV (SEQ ID NO:1) 的直链化合物的A- β 种类更高至少3倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍。

[0256] 在一种实施方式中,A- β 寡聚体包含A- β 1-42亚基。

[0257] 在一种实施方式中,抗体缺乏A- β 原纤维斑块(也称为老年斑块)染色。可以通过将阳性对照如A- β 特异性抗体6E10和4G8 (Biolegend, San Diego, 加拿大) 或2C8 (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY) 或相对于A- β 形式的其它抗体与同种型对照比较而评估斑块染色的缺乏。如果抗体不显示典型的斑块形态学染色并且染色水平与用IgG阴性同种型对照看到的水平相当或不超过2倍,则本文所述的抗体缺乏或具有可忽略的A- β 原纤维斑块染色。该标度可以例如将同种型对照在1处和6E10在10处设定染色水平。如果该标度上的染色水平等于或低于2,则抗体缺乏A- β 原纤维斑块染色。在实施方式中,抗体显示了最小的A- β 原纤维斑块染色,例如在前述标度上,评分水平约小于或小于3。

[0258] 在一种实施方式中,所述抗体是单克隆抗体。

[0259] 为了生产单克隆抗体,可从用本文所述的免疫的受试者收获抗体产生细胞(B淋巴细胞),并通过标准体细胞融合程序与骨髓瘤细胞融合,从而永生化这些细胞并产生杂交瘤细胞。这些技术在本领域中是公知的(例如最初由Kohler和Milstein (Nature 256:495-497 (1975)) 开发的杂交瘤技术以及其它技术,如人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等Immunol. Today 4:72 (1983)), 生产人单克隆抗体的EBV-杂交瘤技术(Cole等Methods Enzymol, 121:140-67 (1986)) 和筛选组合抗体文库(Huse等Science 246:1275 (1989))。可以免疫化学筛选杂交瘤细胞以生产与本文所述的肌萎缩侧索硬化特异性表位特异性反应的抗体,并且可以分离单克隆抗体。

[0260] 对特定抗原或分子具有反应性的特异性抗体或抗体片段也可以通过筛选编码免疫球蛋白基因或其部分的表达文库而产生,所述免疫球蛋白基因或其部分在具有细胞表面成分的细菌中表达。例如,可以使用噬菌体表达文库在细菌中表达完整的Fab片段、VH区域和FV区域(参见例如Ward等Nature 41:544-546 (1989); Huse等Science 246:1275-1281 (1989) 和McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990))。

[0261] 在一种实施方式中,所述抗体是人源化抗体。

[0262] 文献中已经充分描述了来自非人种类抗体的人源化。参见例如EP-B1 0 239400和

Carter&Merchant 1997 (Curr Opin Biotechnol 8,449-454,1997,通过引入整体并入本文)。人源化抗体也容易商购获得(例如Scotgen Limited,2 Holly Road,Twickenham,Middlesex,Great Britain)。

[0263] 啮齿动物抗体的人源化形式容易通过CDR植入产生(Riechmann等Nature,332:323-327,1988)。在这种方法中,包含啮齿动物单克隆抗体的抗原结合位点的六个CDR环与相应的人框架区域连接。由于框架区域的氨基酸可能影响抗原识别,所以CDR植入通常产生亲和力降低的抗体(Foote&Winter.J Mol Biol,224:487-499,1992)。为了保持抗体的亲和力,通常需要通过定点诱变或其它重组技术置换某些框架残基,并且可以通过计算机模拟抗原结合位点来辅助(Co等J Immunol,152:2968-2976,1994)。

[0264] 人源化形式的抗体任选通过表面重修获得(Pedersen等J Mol Biol,235:959-973,1994)。在这种方法中,只有啮齿动物抗体的表面残基被人源化。

[0265] 可以通过噬菌体展示策略鉴定对特定抗原特异的人抗体(Jespersen等Bio/Technology,12:899-903,1994)。在一种方法中,将定向针对特异性抗原的啮齿动物抗体的重链克隆并与人轻链库组配对以在丝状噬菌体上展示为Fab片段。通过结合抗原选择噬菌体。随后将所选择的人轻链与人重链组配对以用于在噬菌体上展示,并且通过结合抗原再次选择噬菌体。结果是对特定抗原特异性的人抗体Fab片段。在另一种方法中,生产的噬菌体文库是成员在其外表面展示不同人抗体片段(Fab或Fv)(Dower等W091/17271和McCafferty等W092/01047)。展示具有所需特异性的抗体的噬菌体通过对特异性抗原的亲和力富集选择。从任一方法鉴定的人Fab或Fv片段可被再克隆以在哺乳动物细胞中作为人抗体表达。

[0266] 人抗体任选从转基因动物获得(美国专利号6,150,584;6,114,598和5,770,429)。在这种方法中,将嵌合或种系突变小鼠中的重链连接区域(JH)基因缺失。随后将人种系免疫球蛋白基因阵列转移至这种突变小鼠中。然后所得到的转基因小鼠能够在抗原攻击时产生完整的人抗体组。

[0267] 包括人源化抗体或人抗体的抗体选自任何类别的免疫球蛋白,包括:IgM、IgG、IgD、IgA或IgE和任何同种型,其包括:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。嵌合人源化抗体或人抗体可以包括来自一种或多种同种型或类别的序列。

[0268] 人抗体任选地作为抗原结合片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv和单结构域抗体片段)或作为其中重链和轻链通过间隔子连接的单链抗体而生产。而且,人或人源化抗体可以以单体或聚合物形式存在。人源化抗体任选地包含一条非人链和一条人源化链(即一条人源化重链或轻链)。

[0269] 另外,通过筛选抗体噬菌体展示文库可以容易地分离对本文所述表位特异性的抗体。例如,任选通过使用本发明的疾病特异性表位筛选抗体噬菌体文库以鉴定对疾病特异性表位特异性的抗体片段。鉴定的抗体片段任选用于生产可用于本发明的不同实施方式的多种重组抗体。抗体噬菌体展示文库可商购获得,例如,通过Xoma(Berkeley,California)用于筛选抗体噬菌体文库的方法在本领域中是公知的。

[0270] 另一方面是包含轻链可变区域和重链可变区域的抗体和/或其结合片段,重链可变区域包含互补决定区域CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,轻链可变区域包含互补决定区域CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且所述CDR的氨基酸序列包含如下所示的序列:

[0271]

链	CDR	序列	SEQ ID NO
重	CDR-H1	GYTFTDYE	11
	CDR-H2	IDPETGDT	12
	CDR-H3	TSPIYYDYDWFAY	13

[0272]

轻	CDR-L1	QSLNNRTRKNY	14
	CDR-L2	WAS	15
	CDR-L3	KQSYNLRT	16

[0273] 和/或

[0274]

链	CDR	序列	SEQ ID NO
重	CDR-H1	GFSLSTSGMG	21
	CDR-H2	IWWDDDK	22
	CDR-H3	ARSITTVVATPFDY	23
轻	CDR-L1	QNVRSA	24
	CDR-L2	LAS	25
	CDR-L3	LQHWNSPFT	26

[0275] 在一种实施方式中,所述抗体是单克隆抗体。在一种实施方式中,所述抗体是嵌合抗体,例如包含如表6和/或8中所列的CDR序列的人源化抗体。

[0276] 在另一种实施方式中,还提供了包含表6和/或8中的CDR和轻链可变区域和重链可变区域的抗体,任选地在单链抗体的情况下。

[0277] 在又一个方面,所述抗体包含重链可变区域,其包含:i)如SEQ ID NO:18或28所示的氨基酸序列;ii)具有与SEQ ID NO:18或28至少50%、至少60%、至少70%、至少80%序列同一性的氨基酸序列,其中,CDR序列如SEQ ID NO:11、12、13、21、22和/或23所示,或iii)保守取代的氨基酸序列i)。在另一方面中,所述抗体包含轻链可变区域,其包含i)如SEQ ID NO:20或30所示的氨基酸序列,ii)具有与SEQ ID NO:20或30至少50%、至少60%、至少70%、至少80%序列同一性的氨基酸序列,其中,CDR序列如SEQ ID NO:14、15、16、24、25和/或26所示,或iii)保守取代的氨基酸序列i)。在另一种实施方式中,重链可变区域氨基酸序列由SEQ ID NO:17或27所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码。在另一种实施方式中,所述抗体包含由SEQ ID NO:19或29所示的核苷酸序列或其密码子简并或优化形式编码的轻链可变区域氨基酸序列。在一种实施方式中,重链可变区域包含如SEQ ID NO:18或28所示的氨基酸序列。在一种实施方式中,轻链可变区域包含如SEQ ID NO:20或30所示的氨基酸序列。

[0278] 另一方面是与表6和/或表8中所列举的具有CDR序列的抗体特异性结合相同表位的抗体。

[0279] 另一方面包括与包含表6和/或表8中所列举的CDR序列的抗体竞争结合人A- β 的抗体。

[0280] 抗体之间的竞争可以例如使用其中评估测试中的抗体抑制参照抗体与共同抗原的特异性结合能力的测定来确定。如在竞争性结合测定中所测量的,如果过量的测试抗体(例如至少2倍、5倍、10倍或20倍)抑制参照抗体的结合至少50%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%,则测试抗体与参照抗体竞争。

[0281] 另一方面是与治疗性可检测标记或细胞毒性剂缀合的抗体。在一种实施方式中,可检测标记是正电子发射放射性核素。正电子发射放射性核素可用于例如PET成像中。

[0282] 另一方面涉及包含本文所述的抗体和/或其结合片段和寡聚A- β 的抗体复合物。

[0283] 另一方面是编码本文所述的抗体或其部分的分离的核酸。

[0284] 还提供了编码重链或轻链的核酸,例如编码包含本文所述的CDR-H1、CDR-H2和/或CDR-H3区域的重链或编码包含本文所述的CDR-L1、CDR-L2和/或CDR-L3区域的轻链。

[0285] 本公开还提供了编码本文公开的抗体和/或其结合片段的核酸序列的变体。例如,变体包括与核酸序列杂交的核苷酸序列,该核酸序列在至少中等严格杂交条件下编码本文公开的抗体和/或其结合片段或密码子简并或优化的序列。在另一种实施方式中,变体核酸序列具有与包括编码本文的SEQ ID NO:18、20、28和30中任一个蛋白质序列的核酸序列至少50%、至少60%、至少70%,最优选至少80%,甚至更优选至少90%,甚至最优选至少95%序列同一性。

[0286] 在一种实施方式中,所述核酸是分离的核酸。

[0287] 另一个方面是包含本文公开的核酸的表达盒或载体。在一种实施方式中,载体是分离的载体。

[0288] 载体可以是任何载体,包括适于生产抗体和/或其结合片段或表达本文所述的肽序列的载体。

[0289] 可以以已知的方式将核酸分子并入合适的确保蛋白质的表达的表达载体中。可能的表达载体包括但不限于粘粒、质粒或修饰的病毒(例如复制缺陷型逆转录病毒,腺病毒和腺相关病毒)。载体应与使用的宿主细胞相容。表达载体“适于转化宿主细胞”,这意指表达载体含有编码对应于本文所述的表位或抗体的肽的核酸分子。

[0290] 在一种实施方式中,载体适于通过基因疗法表达例如单链抗体。该载体可以适用于神经组织中的特异性表达,例如使用神经特异性启动子等。在一种实施方式中,该载体包含IRES并且允许表达轻链可变区域和重链可变区域。这种载体可用于体内递送抗体。

[0291] 合适的调控序列可以来源于多种来源,包括细菌、真菌、病毒、哺乳动物或昆虫的基因。

[0292] 这种调控序列的实例包括:转录启动子和增强子或RNA聚合酶结合序列,核糖体结合序列(包括翻译起始信号)。另外,根据所选择的宿主细胞和所用载体,可以将其它序列例如复制起点、额外的DNA限制性位点、增强子和赋予转录诱导性的序列并入到表达载体中。

[0293] 在一种实施方式中,调控序列指导或增加神经组织和/或细胞中的表达。

[0294] 在一种实施方式中,所述载体是病毒载体。

[0295] 重组表达载体还可以含有标志基因,其有助于选择用表达本文所述的抗体或表位肽的载体转化、感染或转染宿主细胞。

[0296] 重组表达载体还可以含有编码融合部分(即“融合蛋白质”)的基因,所述融合部分提供了增加的重组肽的表达或稳定性;增加的重组肽的溶解度;并通过在亲和纯化中充当配体而辅助纯化靶标重组肽,包括例如本文所述的标签和标记。此外,可将蛋白质水解切割位点添加至靶标重组蛋白质以允许在融合蛋白质纯化之后将重组蛋白质从融合部分分离。典型的融合表达载体包括将谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白质或蛋白质A分别与重组蛋白质融合的pGEX(Amrad Corp.,Melbourne,澳大利亚),pMAL(New England Biolabs,Beverly,MA)和pRIT5(Pharmacia,Piscataway,NJ)。

[0297] 例如在体外和体内将基因转移到神经元和神经组织中的系统包括基于病毒的载体,最值得注意的是单纯疱疹病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)和包括慢病毒的逆转录病毒。基因递送的不同方法包括使用裸质粒DNA以及脂质体-DNA复合物。另一种方法是使用AAV质粒,其中,DNA是聚阳离子浓缩的,将脂质包埋并通过脑内基因递送而引入脑中(Leone等,美国申请号2002076394)。

[0298] 因此,在另一方面中,可以将本文所述的化合物、免疫原、核酸、载体和抗体配制成囊泡(例如脂质体、纳米颗粒和病毒蛋白质颗粒)而例如用于递送本文所述的抗体、化合物、免疫原和核酸。特别地,包括聚合物囊泡的合成聚合物囊泡可用于施用抗体。

[0299] 另一方面还提供了表达本文所述的抗体或包含本文公开的表达盒子或载体的细胞,任选地是分离细胞和/或重组细胞。

[0300] 可以使用任何适于生产多肽的细胞产生重组细胞,例如适于生产抗体和/或其结合片段。例如,为了将核酸(例如载体)引入到细胞中,根据所使用的载体,可以将细胞转染、转化或感染。

[0301] 合适的宿主细胞包括各种原核和真核宿主细胞。例如,本文所述的肽和抗体可以在细菌细胞(例如大肠杆菌)、昆虫细胞(使用杆状病毒)、酵母细胞或哺乳动物细胞)中表达。

[0302] 在一种实施方式中,所述细胞是选自酵母细胞、植物细胞、蠕虫细胞、昆虫细胞、禽类细胞、鱼类细胞、爬行动物细胞和哺乳动物细胞的真核细胞。

[0303] 在一种实施方式中,所述细胞是融合细胞如杂交瘤细胞。

[0304] 在另一种实施方式中,所述哺乳动物细胞是骨髓瘤细胞、脾细胞或杂交瘤细胞。

[0305] 在一种实施方式中,所述细胞是神经细胞。

[0306] 适合的表达抗体或肽的酵母和真菌宿主细胞包括但不限于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*),毕赤酵母属(*genera Pichia*)或克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)以及曲霉属(*genus Aspergillus*)的各种种类。用于在酵母酿酒酵母中表达的载体的实例包括pYepSec1、pMFa、pJRY88和pYES2(Invitrogen Corporation,San Diego,加拿大)。用于转化酵母和真菌的方案对于本领域普通技术人员来说是公知的。

[0307] 其中,可适于的哺乳动物细胞包括:COS(例如ATCC号CRL 1650或1651)、BHK(例如ATCC号CRL 6281)、CHO(ATCC号CCL 61)、HeLa(例如ATCC号CCL 2)、293(ATCC号1573)和NS-1细胞。用于在哺乳动物细胞中指导表达的合适的表达载体通常包括启动子(例如源自病毒材料如多瘤病毒、腺病毒2,巨细胞病毒和猿猴病毒40)以及其它转录和翻译控制序列。哺乳动物表达载体的实例包括pCDM8和pMT2PC。

[0308] 另一方面是生产对本文所述的表位具有特异性的抗体的杂交瘤细胞系。

[0309] 组合物

[0310] 另一方面是包含本文所述的化合物、免疫原、核酸、载体或抗体的组合物。

[0311] 在一种实施方式中,所述组合物包含稀释剂。

[0312] 用于核酸的合适的稀释剂包括但不限于水、盐溶液和乙醇。

[0313] 合适的多肽(包括抗体或其片段和/或细胞)的稀释剂包括但不限于盐溶液、pH缓冲溶液和甘油溶液或适于冷冻多肽和/或细胞的其它溶液。

[0314] 在一种实施方式中,所述组合物是药物组合物,其包含本文公开的任何肽、免疫原、抗体、核酸或载体,并且任选地包含药学上可接受的载体。

[0315] 本文所述的组合物可以通过本身已知的用于制备药学上可接受的组合物的方法制备,所述组合物可以任选地作为疫苗施用于受试者,使得有效量的活性物质与药学上可接受的载体组合成混合物。

[0316] 所述药物组合物包括但不限于冻干粉末或水性或非水性无菌注射溶液或悬浮液,其可进一步含有使组合物与预期接受者的组织或血液基本相容的抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质。可存在于这种组合物中的其它组分包括例如水、表面活性剂(例如吐温)、乙醇、多元醇、甘油和植物油。临时注射溶液和悬浮液可以由无菌粉末、颗粒、片剂或浓缩溶液或悬浮液制备。该组合物可以例如但不限于作为在施用于患者之前用无菌水或盐水重构的冻干粉末来供应。

[0317] 所述药物组合物可以包含药学上可接受的载体。合适的药学上可接受的载体包括基本上化学惰性和无毒的组合物,其不干扰药物组合物的生物学活性的有效性。合适的药物载体的实例包括但不限于水、盐水溶液、甘油溶液、乙醇、N-(1(2,3-二油酰氧基)丙基)N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、二油酰基磷脂酰-乙醇胺(DOPE)和脂质体。这种组合物应该含有治疗有效量的化合物以及合适量的载体以便提供直接施用于患者的形式。

[0318] 所述组合物可以是药学上可接受的盐的形式,其包括但不限于与游离氨基形成的那些形式,例如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些,以及与游离羧基形成的那些形式,例如衍生自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些。

[0319] 在包含本文所述的化合物或免疫原的实施方式中,所述组合物包含佐剂。

[0320] 可以使用的佐剂例如包括固有佐剂(例如脂多糖),其通常是用作疫苗的杀死或减毒细菌的组分。外在佐剂是免疫调节剂,其通常与抗原非共价连接并被配制成增强宿主免疫响应。常规使用氢氧化铝、硫酸铝和磷酸铝(通常统称为明矾)作为佐剂。广泛的外在佐剂可引起对免疫原的强效免疫响应。这些包括诸如Stimulons(QS21,Aquila,Worcester,Mass.)或由其产生的颗粒如ISCOM和(免疫刺激复合物)和与膜蛋白抗原(免疫刺激复合物)复合的ISCOMATRIX,具有矿物油的普朗尼克聚合物,杀死分枝杆菌的矿物油,弗氏完全佐剂,细菌产物如胞壁酰二肽(MDP)和脂多糖(LPS)以及脂质A和脂质体。

[0321] 在一种实施方式中,所述佐剂是氢氧化铝。在另一种实施方式中,所述佐剂是磷酸铝。水包油乳剂包括角鲨烯;花生油;MF59(W090/14387);SAF(Syntex Laboratories,Palo Alto,Calif.)和Ribi™(Ribi Immunochem,Hamilton,Mont.)。水包油乳剂可以与免疫刺激剂一起使用,例如胞壁酰肽(例如,N-乙酰胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP),-乙

酰-正异丙氨酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺 (nor-MDP), N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酰氧基)-乙胺 (MTP-PE), N-乙酰葡萄糖胺基-N-乙酰基胞壁酰-L-Ala-D-异谷氨酸-L-Ala-二棕榈酰氧基丙酰胺 (DTP-DPP) 三酰胺 (TM)) 或其它细菌细胞壁组分。

[0322] 佐剂可以作为单一组合物与免疫原一起施用。或者,可以在施用免疫原之前、同时和/或之后施用佐剂。

[0323] 通常,佐剂在磷酸盐缓冲盐水中用作0.05至1.0%的溶液。佐剂增强免疫原的免疫原性,但本身不一定是免疫原性的。佐剂可通过将免疫原局部保留在施用位点附近以产生储库效应而促进免疫原向免疫系统细胞的缓慢、持续释放。佐剂还可以将免疫系统的细胞吸引到免疫原储库并刺激这些细胞以引发免疫响应。如此,实施方式可以包括进一步包含佐剂的组合物。

[0324] 用于肠胃外免疫的佐剂包括铝化合物(例如氢氧化铝、磷酸铝和羟基磷酸铝)。根据标准方案,抗原可以与铝化合物沉淀或吸附到铝化合物上。其它佐剂如RIBI (ImmunoChem, Hamilton, MT) 也可用于肠胃外施用。

[0325] 用于粘膜免疫的佐剂包括细菌毒素(例如霍乱毒素(CT), 大肠杆菌热不稳定毒素(LT), 艰难梭菌毒素A和百日咳毒素(PT))或其组合、亚基、类毒素或其突变体)。例如,可以使用天然霍乱毒素亚基B(CTB)的纯化制剂。片段、同系物、衍生物以及与这些毒素的融合物也是合适的,只要它们保留佐剂活性即可。优选使用毒性降低的突变体。已经描述了合适的突变体(例如在W095/17211 (Arg-7-Lys CT突变体)、W096/6627 (Arg-192-Gly LT突变体)和W095/34323 (Arg-9-Lys和Glu-129-Gly PT突变体)中)。可用于所述方法和组合物中的额外的LT突变体包括例如Ser-63-Lys、Ala-69-Gly、Glu-110-Asp和Glu-112-Asp突变体。其它佐剂(例如各种来源(例如大肠杆菌、明尼苏达沙门氏菌,鼠伤寒沙门氏菌或弗氏志贺氏菌,皂苷或聚丙交酯乙交酯(PLGA)微球的细菌单磷酰脂质A (MPLA))也可用于粘膜施用。

[0326] 其它佐剂包括细胞因子例如白细胞介素(例如IL-1、IL-2和IL-12),趋化因子(例如CXCL10和CCL5),巨噬细胞刺激因子和/或肿瘤坏死因子。可以使用的其它佐剂包括CpG寡核苷酸(Davis, Curr Top Microbiol Immunol., 247:171-183, 2000)。

[0327] 水包油乳液包括角鲨烯;花生油;MF59 (W090/14387);SAF (Syntex Laboratories, Palo Alto, Calif.)和RibiTM (Ribi Immunochem, Hamilton, Mont.)。水包油乳剂可以与免疫刺激剂一起使用,例如胞壁酰肽(例如,N-乙酰胞壁酰-L-苏氨酰-D-异谷氨酰胺 (thr-MDP), -乙酰-正异丙氨酰-L-丙氨酰-D-异谷酰胺 (nor-MDP), N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酰氧基)-乙胺 (MTP-PE), N-乙酰葡萄糖胺基-N-乙酰基胞壁酰-L-Ala-D-异谷氨酸-L-Ala-二棕榈酰氧基丙酰胺 (DTP-DPP) 三酰胺 (TM)) 或其它细菌细胞壁组分。

[0328] 可用于粘膜和肠胃外免疫的佐剂包括聚磷腈(例如W095/2415)、DC-胆固醇 (3b-(N-(N',N'-二甲基氨基甲烷)-氨基甲酰基)胆固醇(例如美国专利号5,283,185和W096/14831)和QS-21(例如W088/9336)。

[0329] 佐剂可以与免疫原偶联用于施用。例如,脂质如棕榈酸可以直接与一种或多种肽偶联,使得包含免疫原的肽的构象变化不影响对免疫原的免疫响应性质。

[0330] 佐剂可以作为单一组合物与免疫原一起施用。此外,佐剂可以在施用免疫原之前,

同时或之后施用。

[0331] 在一种实施方式中,所述组合物包含本文所述的抗体。在另一种实施方式中,所述组合物包含本文所述的抗体和稀释剂。在一种实施方式中,所述组合物是无菌组合物。

[0332] III. 试剂盒

[0333] 另一方面涉及一种试剂盒,其包含本文所述的i) 抗体和/或其结合片段,ii) 核酸,iii) 组合物,或iv) 重组细胞,其包含在小瓶(例如无菌小瓶或其它壳体)中,并且任选地包含参照剂和/或其使用说明书。

[0334] 在一种实施方式中,所述试剂盒还包含一个或多个收集瓶、标准缓冲液和检测试剂。

[0335] IV. 方法

[0336] 包括制备本文所述的化合物、免疫原和抗体的方法。

[0337] 特别地,提供了制备对QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关表位的构象表位具有选择性的抗体的方法,其包括向受试者(任选地非人受试者)施用包含本文所述的表位序列的构象限制化合物(任选地包含QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关表位的环状化合物),以及分离抗体产生细胞或特异性或选择性结合所述环状化合物的抗体,并且任选地i) 特异性或选择性地结合合成和/或天然寡聚体和/或不具有或具有可忽略的老年斑块结合原位组织样品的或者不具有或具有可忽略的与相应直链肽的结合。环状化合物例如可以包含本文所述的含有本文所述环状化合物的任何“表位”。

[0338] 在一种实施方式中,该方法用于使用例如本文所述的方法制备单克隆抗体。

[0339] 在一种实施方式中,该方法用于使用例如本文所述的方法制备人源化抗体。

[0340] 如本文和实施例中所述选择使用环状化合物生产的抗体。在一种实施方式中,所述方法包括任选地使用本文所述的方法分离特异性或选择性结合环状肽的抗体与直链肽,该抗体对表位序列是特异性的,且特异性结合寡聚体和/或缺乏或可忽略地原位结合斑块和/或相应的直链肽。

[0341] 另一方面提供了检测生物样品是否包含A- β 的方法,所述方法包括使生物样品与本文所述的抗体接触并检测任何抗体复合物的存在。在一种实施方式中,所述方法用于检测生物样品是否包含A- β 。在一种实施方式中,所述方法用于检测样品是否包含A- β ,其中,QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关表位处于不同构象,例如其中与由非寡聚构象中的Q、L或V占据构象相比,至少Q、L或V处于不同构象中。

[0342] 在一种实施方式中,该方法包括:

[0343] a. 在允许生产抗体:A- β 寡聚体复合物的条件下,使生物样品与对A- β 寡聚体具有特异性和/或选择性的本文所述的抗体接触;以及

[0344] b. 检测任何复合物的存在;

[0345] 其中,可检测复合物的存在表明样品可能含有A- β 寡聚体。

[0346] 在一种实施方式中,将形成的复合物的水平与测试抗体例如合适的Ig对照或无关抗体进行比较。

[0347] 在一种实施方式中,定量检测并测量生产的复合物的量。测量可以例如相对于标准。

[0348] 在一种实施方式中,将测量的量与对照进行比较。

[0349] 在另一种实施方式中,该方法包括:

[0350] a.在允许生产抗体-抗原复合物的条件下,使所述受试者的生物样品与本文所述的抗体接触;

[0351] b.测量测试样品中抗体-抗原复合物的量;

[0352] c.将测试样品中抗体-抗原复合物的量与对照进行比较;

[0353] 其中,检测生物样品中的抗体-抗原复合物与对照相比,表明样品包含A- β 。

[0354] 所述对照可以是样品对照(例如来自没有AD的受试者,或来自具有特定形式的AD,轻度、中度或高度的受试者),或者是来自相同受试者的先前样品以用于监测受试者中A- β 寡聚物水平的变化。

[0355] 在一种实施方式中,使用本文所述的抗体。

[0356] 在一种实施方式中,包含QKLV (SEQ ID NO:1) 构象表位的A- β 是A- β 寡聚体,其中,检测抗原:抗体复合物的存在表明样品可含有A- β 寡聚体。

[0357] 在一种实施方式中,抗体特异性和/或选择性识别包含QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关构象表位的A- β 的构象,并且检测生物样品中的抗体抗原复合物表明样品包含A- β 寡聚体。

[0358] 在一种实施方式中,所述样品是生物样品。在一种实施方式中,所述样品包含脑组织或其提取物和/或CSF。在一种实施方式中,所述样品包含全血、血浆或血清。在一种实施方式中,所述样品从人受试者获得。在一种实施方式中,所述受试者被怀疑患有AD、处于患有AD风险中或患有AD。

[0359] 可以使用许多方法检测A- β :抗体复合物,从而使用本文所述抗体而确定包含QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关构象表位和/或A- β 寡聚体的A- β 是否存在于生物学样品中,该方法包括免疫测定法(如流式细胞术、免疫印迹,ELISA和免疫沉淀),然后进行SDS-PAGE、免疫细胞化学法。

[0360] 如实施例所述,表面等离子体共振技术可用于评估构象特异性结合。如果抗体被标记或使用对复合抗体特异性的可检测标记的第二抗体,则可以检测标记。常用的试剂包括荧光发射和HRP标记的抗体。在定量方法中,可以通过与标准或对照比较来测量生产的信号量。测量也可以是相对的。

[0361] 另一方面包括测量受试者或组织中A- β 的水平或成像的方法,任选地其中,待测量或成像的A- β 是寡聚A- β 。在一种实施方式中,该方法包括向风险中或怀疑患有AD或患有AD的受试者施用缀合至可检测的标记的抗体;并且检测标记,任选地定量检测标记。在一种实施方式中的标记是可以例如用于PET成像的正电子发射放射性核素。

[0362] 另一方面包括在受试者中诱导免疫响应的方法,其包括向受试者施用本文所述的化合物,任选地包含QKLV (SEQ ID NO:1) 或相关表位肽序列的环状化合物,所述免疫原和/或组合物包含所述化合物或所述免疫原;以及任选地分离特异性或选择性结合所施用的化合物或免疫原中的A- β 肽的细胞和/或抗体。在一种实施方式中,所述组合物是包含与药学上可接受的稀释剂或载体混合的化合物或免疫原的药物组合物。

[0363] 在一种实施方式中,所述受试者是诸如啮齿动物的非人受试者。在一种实施方式中,使用产生抗体产生细胞产生杂交瘤细胞系。

[0364] 在一种实施方式中,所施用的免疫原包含图12中所示的化合物。

[0365] 本文证明了针对环状CGQKLVG (SEQ ID NO:2) 产生的抗体可以特异性和/或选择性

结合A-β寡聚体并且缺乏A-β斑块染色。寡聚A-β种类被认为是AD中的有毒增殖种类。进一步如图21所示,使用环状(CGQKLVG) (SEQ ID NO:3)产生的并且对寡聚体具有特异性的抗体抑制了A-β聚集和A-β寡聚体增殖。另外,这种抗体在体外测定中抑制了A-β寡聚体对神经细胞的毒性(图22)。因此,还提供了抑制A-β寡聚体增殖的方法,该方法包括使表达A-β的细胞或组织与有需要的受试者接触或向有需要的受试者施用有效量的本文所述的A-β寡聚体特异性或选择性抗体以抑制A-β聚集和/或寡聚体增殖。可以如实施例10所述监测体外测定。

[0366] 抗体也可用于治疗AD和/或其它A-β淀粉样蛋白相关疾病。例如,路易体痴呆的变体和包涵体肌炎(肌肉疾病)表现出与AD相似的斑块,并且A-β也可以在脑淀粉样蛋白血管病中形成聚集体。如上所述,产生的对环状(CGQKLVG) (SEQ ID NO:3)的抗体结合被认为是AD中A-β产毒种类的寡聚A-β并抑制产毒A-β寡聚体的形成和增殖。

[0367] 因此,另一方面是治疗AD和/或其它A-β淀粉样蛋白相关疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用i)有效量的本文所述的抗体或免疫缀合物,任选地A-β寡聚体特异性或选择性抗体,或包含所述抗体的药物组合物;或2)向有需要的受试者施用包含QKLV (SEQ ID NO:1)或相关表位序列或免疫原的分离的环状化合物,或包含所述环状化合物的药物组合物。

[0368] 在一种实施方式中,使用本文所述的抗体评估来自待治疗的受试者的生物样品中A-β的存在或水平。在一种实施方式中,用抗体治疗具有可检测的A-β水平的受试者(例如体外测量的或通过成像测量的A-β抗体复合物)。

[0369] 抗体和免疫原可以例如包含在如本文所述的药物组合物中,并且例如配制在囊泡中以用于改善递送。

[0370] 靶向环状CGQKLVG (SEQ ID NO:3)和/或相关抗体的一种或多种抗体可以组合施用。另外,本文公开的抗体可以与一种或多种其它治疗例如β-分泌酶抑制剂或胆碱酯酶抑制剂一起施用。

[0371] 在一种实施方式中,所述抗体是构象特异性/选择性抗体,任选地特异性或选择性结合A-β寡聚体。

[0372] 还提供了所述组合物、抗体、分离肽、免疫原和核酸在治疗AD中的应用。

[0373] 本文所述的组合物、化合物、抗体、分离肽、免疫原和核酸、载体等可以例如通过肠胃外、静脉内、皮下、肌肉内、颅内、心室内、鞘内、眶内、眼、椎管内、脑池内、腹膜内、鼻内、气雾剂而施用或口服施用。

[0374] 在某些实施方式中,全身性施用药物组合物。

[0375] 在其它实施方式中,所述药物组合物直接施用于脑或CNS的其它部分。例如,这样的方法包括使用可植入导管和泵,这用于通过导管将预定剂量排出到输注位点。本领域的技术人员将进一步认识到,导管可以通过允许导管可视化的手术技术植入,以便将导管定位成与脑中所需的施用或输注位点相邻。Elsberry等的美国专利5,814,014“通过脑输注治疗神经退行性病症的技术”描述了这种技术,其通过引用并入本文。还考虑了诸如在美国专利申请20060129126 (Kaplitt,在“用于将物质输注到患者脑中的输注设备和方法”中)中所述的那些方法。用于将药物递送至脑和CNS的其它部分的装置可商购获得(例如SynchronMed®EL Infusion System;Medtronic,Minneapolis,Minnesota)。

[0376] 在另一种实施方式中,使用诸如修饰待施用的化合物以允许受体介导穿过血脑屏

障的转运的方法而将药物组合物施用于脑。

[0377] 其它实施方式考虑将本文所述的组合物、化合物、抗体、分离肽、免疫原和核酸与已知促进穿过血脑屏障的转运的生物活性分子共同施用。

[0378] 在某些实施方式中,还考虑到用于穿过血脑屏障施用本文所述的组合物、化合物、抗体、分离肽、免疫原和核酸的方法,如美国专利7012061“增加血脑屏障通透性的方法”中所述,其旨在瞬时增加血脑屏障的通透性,其通过引用并入本文。

[0379] 本领域技术人员将认识到用于将本文所述的组合物、化合物、抗体、分离肽、免疫原和核酸直接施用至脑或穿过血脑屏障施用的各种合适的方法,并且能够修饰这些方法以便安全地施用本文所述的产品的。

[0380] 以上公开总体上描述了本申请。通过参考以下具体实施例可以获得更完整的理解。这些实施例仅用于说明的目的而描述,并非旨在限制本申请的范围。当情况可能表明或提供便利时,考虑形式的变化和等同替换。尽管本文使用了特定术语,但这些术语意在描述性的意思,而不是为了限制的目的。

[0381] 以下非限制性实施例是对本公开的说明:

[0382] 实施例

[0383] 实施例1

[0384] 用于预测A-β寡聚体特异性表位的Gō模型方法

[0385] 一个表位预测模型基于来自天然状态未折叠的部分蛋白质的自由能概貌。天然状态被认为是实验衍生的原纤维结构。当通过给定量的初级序列从天然状态部分未折叠蛋白质时,候选表位是连续的序列片段,其花费最少的自由能至无序。给定蛋白质构象的自由能来源于几种贡献,包括构象熵和有利于未折叠状态的极性官能团的溶剂化,以及静电和范德华力内部蛋白质相互作用的丧失,这些相互作用可热稳定天然状态。

[0386] A. 蛋白质部分未折叠概貌的Gō类模型

[0387] 解释在未折叠过程中发生的自由能变化的近似模型将固定能量分配给天然状态下的所有接触,其中,接触定义为固定截断距离 r_{cutoff} 内的一对重(非氢)原子。在先前的蛋白质折叠研究中,Gō类模型已成功实施。Gō类模型分离了天然蛋白质相互作用的拓扑结构所产生的影响,实际上,未折叠的自由能概貌可以很容易地由单一天然状态结构计算得到。

[0388] 未折叠片段的总自由能成本取决于要破坏的相互作用的量以及未折叠区域的构象熵项。

[0389] 在下面的等式中,小写字母变量是指原子,而大写字母变量是指残基。设T是蛋白质中所有残基的集合,U是蛋白质中未折叠的残基集合,F是蛋白质中折叠的残基子集(因此 $T=U \cup F$)。高度天然的未折叠机制由多个连续的无序残基链组成。这里采用了单个连续未折叠链的近似值,计算了扰乱该连续链的自由能成本。

[0390] 用于未折叠残基U集合的总自由能变化 $\Delta F_{G\ddot{o}}(U)$ 是:

$$[0391] \quad \Delta F_{G\ddot{o}}(U) = \Delta E_{G\ddot{o}}(U) - T\Delta S_{G\ddot{o}}(U) \quad (1)。$$

[0392] 由通过未折叠U残基集合而破坏的相互作用量给出了未折叠焓函数 $\Delta E_{G\ddot{o}}(U)$:

$$[0393] \quad \Delta E_{Go}(\mathcal{U}) = a \sum_{\substack{i > j \\ \text{Atoms } i \in \mathcal{I}, j \in \mathcal{U}}} \Theta(r_{cutoff} - |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|) \quad (2)。$$

[0394] 在等式2中,i,j之和是所有独特的重原子对,其在未折叠区域中具有一个或两个原子, $\mathbf{r}_i$ 和 $\mathbf{r}_j$ 是原子i和j的坐标, r_{cutoff} (取到4.8Å)是相互作用距离的截断(cut-off)。如果x是非0的正值, $\Theta(x)$ 是由 $\Theta(x)=1$ 定义的Heaviside函数。可以选择每个接触点a的能量以重述在室温下完全未折叠蛋白质时的整体实验稳定性 $\Delta F_{Exp}(U) | U=T$:

$$[0395] \quad a = \frac{\Delta F_{Exp}(\mathcal{U})|_{\mathcal{U}=T} + T \Delta S_{Go}(\mathcal{U})|_{\mathcal{U}=T}}{\sum_{i,j \in \mathcal{I}} \Theta(r_{cutoff} - |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|)} \quad (3)$$

[0396] 结果不取决于该值;它只是在整个问题中设定全部能量规模。在目前的模型中,这个自由能被认为是一个等于4.6kcal/mol的常数。这个值并不是主要关心的问题,因为它是相同蛋白质的不同区域的相对自由能成本,该蛋白质在表位预测方法中寻求无序。

[0397] 下面在B中讨论未折叠熵项 $\Delta S_{Go}(U)$ 的计算。

[0398] B. 熵计算

[0399] 处于未折叠状态的蛋白质可接近的微状态的数量远大于天然状态下可接近的数量,因此在未折叠时存在构象熵的有利增益。通过对未折叠区域中的所有残基K进行求和来计算未折叠区段U的总熵:

$$[0400] \quad \Delta S_{Go}(\mathcal{U}) = \sum_{K \in \mathcal{U}} \left(\Delta S_{bb,K} + \left(1 - \frac{A_{f,K}}{A_{\mathcal{U},K}}\right) \Delta S_{bu \rightarrow ex,K} + \Delta S_{ex \rightarrow sol,K} \right) \quad (4)。$$

[0401] 其中, $\Delta S_{bb,K}$, $\Delta S_{bu \rightarrow ex,K}$, $\Delta S_{ex \rightarrow sol,K}$ 是参考文献[3]中列出的残基K的三种构象熵组分: $\Delta S_{bb,K}$ 是由天然状态到未折叠状态的主链熵变, $\Delta S_{bu \rightarrow ex,K}$ 是从埋藏在蛋白质内部到蛋白质表面的侧链的熵变,并且, $\Delta S_{ex \rightarrow sol,K}$ 是从表面到溶液的侧链获得的熵。

[0402] 对未折叠状态构象熵应用修正,因为在单一序列中,部分未折叠链的近似端点固定在它们在天然结构中的位置上。这意味着为了约束部分未折叠结构中的端点(其不存在于完全未折叠状态中)而存在循环熵惩罚。

$$[0403] \quad \Delta S_{\text{返回}} = -k_B \ln(f_w(R|N) \Delta \tau) \quad (5)$$

[0404] 这里 $f_w(R|N) \Delta T$ 通过计算理想的随机步行返回到以N步之后的位置R为中心的体积 ΔT 的框的概率而发现,而在步行期间没有穿透回蛋白质。对于短于约 $n \approx 20$ 个残基的链长,熔融链的大小比蛋白质直径小得多,并且蛋白质的空间排除体积被很好地视为不可穿透的平面。熔融链的聚合状态的数量必须乘以从蛋白质表面上的起点行进到熔融聚合物再次进入蛋白质而不接触或穿过不可穿透的平面的位置的随机行走的分数。上述状态分数可以写成下面的形式:

$$[0405] \quad f_w(\mathbf{R}|N) = \frac{a}{N^{3/2}} \exp\left(-\frac{3R^2}{2Nl^2} - \frac{N^2 V_c}{2l^3}\right) \quad (6)$$

[0406] 其中R是出口位置和入口位置之间的端点到端点距离,N是熔融区域的残基数量,

并且 a , I , V_c 是通过拟合未折叠的多肽模拟而确定的参数。参数 I 是两个 $C\alpha$ 原子之间的有效弧长, V_c 是每个残基的平均排除体积。通过将等式6拟合到模拟结果中, 获得参数 $a = 0.0217$, $I = 4.867$, $V_c = 3.291$ 的值。这种熵惩罚是通用的并且与序列无关。

[0407] 硫键需要在环路熵项中额外考虑, 因为它们进一步限制未折叠片段的运动。当存在时, 二硫化物被视为必须通过环路的额外节点, 实际上将整个环路分成两个小环路, 两个小环路均受到上述边界条件的限制。

[0408] C. 由自由能概貌预测的表位

[0409] 一旦获得了部分未折叠蛋白质的自由能概貌, 则应用可变量阈值 E_{th} , 并且含有不少于3个氨基酸且具有低于阈值的自由能成本的片段被预测为候选表位。关于改变阈值 E_{th} , 预测是稳定的。

[0410] II. 破坏原纤维结构的来自A- β 的表位预测

[0411] 根据2M4J中的天然结构, 如在1A中所述的使用Coarse类模型计算未折叠自由能概貌。结果显示在图1中。在该分析中, 表位QKLV (SEQ ID NO:1) 作为候选表位出现。

[0412] 对于自由能量成本小于10kcal/mol的所有表位, 以cal/mol为单位的自由能量成本显示。用给出 x , y , z 值的方框标记的表位位于残基ID17 (x 轴) 中心, 并具有长度4 (y 轴), 因此由残基15-18或QKLV (SEQ ID NO:1) 组成。对于偶数表位, “中心”按惯例定义为数字中心右侧的残基, 仅用于绘制图形。

[0413] 图1示出了低于阈值 $E_{th} = 10\text{kcal/mol}$ 的自由能概貌的俯视图, 其中, x 轴是片的中心, y 轴是片的长度, 并且颜色的深度代表熔化相应部分所需的自由能。从图1中, 在10kcal/mol的能量范围内, 由残基15-18或序列QKLV (SEQ ID NO:1) 组成的表位在作为PDB 2M4J结构的链A、B和C中的预测表位出现。

[0414] 原纤维模型含有链“A”至“I”。例如, 所确定的原纤维结构由9条链的重复单元组成, 其被鉴定为链A-I。鉴定的表位呈现链A、B和C。

[0415] 同样, 对于原纤维结构2MXU的结构A- β , 序列14-18的表位出现链A (序列HQKLV; 图2)。与单体或原纤维A- β 相比, HQKLV (SEQ ID NO:2) 与不同构象中Q和/或QK增加的溶剂暴露一致。

[0416] 实施例2

[0417] Iii. 集合坐标预测

[0418] 用于预测错误折叠表位的第二种方法由称为“集合坐标偏差”的方法提供, 其在美国专利申请序列号62/253044, 2015年11月9日提交的“通过集合坐标偏差预测错误折叠蛋白质表位的系统和方法”中描述, 并通过引用并入本文。如其中所述, 该方法使用基于分子动力学的模拟, 其对蛋白质(或肽-聚集体)施加全局坐标偏差以迫使蛋白质(或肽-聚集体)错误折叠, 然后预测部分非结构化蛋白质(或肽聚集体)的最可能未折叠的区域。进行偏差模拟, 并且对应于每个残基指数的溶剂可接近的表面积(SASA) (与所考虑的蛋白质的初始结构相比)。SASA表示对 H_2O 可接近的表面区域。SASA的正面变化(与所考虑的蛋白质的初始结构相比)可以被认为是指示相关残基指数的区域中的未折叠。将该方法应用于三种A- β 菌株, 每个菌株有自己的形态: A β -40肽(或单体)的三重对称结构(PDB输入2M4J), A β -40单体的二重对称结构(PDB输入2LMN)以及A β -42单体的单链平行寄存器结构(PDB条目2MXU) (例如一个 β 表, 其中, 来自一条链的残基与来自相邻链的相同残基相互作用)。

[0419] 使用如美国专利申请序列号62/253044中所述的集合坐标方法对每个初始结构进行模拟。CHARMM力场参数描述如下:K.Vanommeslaeghe,E.Hatcher,C.Acharya,S.Kundu,S.Zhong,J.Shim,E.Darian,O.Guvench,P.Lopes,I.Vorobyov,和A.D.Mackerell。Charmm普通力场:药物类分子的力场与charmm全原子加性生物力场相容。Journal of Computational Chemistry,31(4):671-690,2010;和P.Bjelkmar,P.Larsson,M.A.Cuendet,B.Hess,和E.Lindahl。在GROMACS中实施CHARMM力场:分析来自相关图,虚拟相互作用位点和水模型的蛋白质稳定性效应。J.Chem.Theo.Comp.,6:459-466,2010,二者均通过引用并入本文,其中TIP3P水。

[0420] 在偏差到初始结构的80%之后,分析了3重对称A- β 结构2M4J的一个单体,氨基酸侧链的SASA为残基指数的函数。出现可靠增加的SASA的区域是残基14-17,对应于残基HQKL,如图8所示。与单体或原纤维A- β 相比,HQKL与不同构象中Q和/或QK溶剂暴露增加一致。

[0421] 针对3倍的A- β 40(2M4J)和2倍的A- β 40(2LMN)结构预测了由残基14-17组成的表位。

[0422] 由A- β 40(2MXU)预测由残基15-19组成的表位,并且预测由残基15-20组成的表位用于A- β 42受约束的末端。

[0423] 不同的偏差证明了预测的表位的一般结构确实取决于偏差的显著程度。

[0424] 图13是原纤维对于直链肽CGQKLVG(SEQ ID NO:3)和环状肽环状(CGQKLVG)(SEQ ID NO:3)的熵图。如其中所示,与直链肽相比,环状化合物的侧链熵降低,表明与当侧链处于直链肽中时(即游离A- β 单体时)相比,侧链受更多构象约束。

[0425] 实施例3

[0426] 包含QKLV(SEQ ID NO:1)的受约束肽结构可以模拟使用所述预测程序鉴定的构象表位。设计并评估包括图12所示结构的环状结构。如实施例4中所述评估图12A所示的环状结构。

[0427] 实施例4

[0428] 确定包含构象表位QKLV(SEQ ID NO:1)的结构,其近似于其在A- β 寡聚体中的预测取向

[0429] 评估包含QKLV(SEQ ID NO:1)表位的环状化合物(如图5A所示)以提供具有与A- β 原纤维和单体中的表位取向的构象相关或不相似性的表位。

[0430] I. 环状肽的曲率

[0431] 图12(a)中所示的环状肽化合物主链的曲率具有与原纤维或单体的不同的谱(它更大),意味着针对环状肽的抗体可以表现出与单体或原纤维不同的构象体系的种类的选择性。曲率谱如图3所示。

[0432] 图3是显示曲率为残基指数函数的谱图。显示了环状肽CGQKLVG(SEQ ID NO:3)的平衡体系的平均曲率(长箭头),以及直链肽的曲率(短箭头),原纤维中各种单体的曲率(肽的细曲线长度),以及原纤维的平均曲率(肽的粗曲线长度)。

[0433] 本文所用的曲率是指主链曲率,并且被定义为随着主链沿着主链移动的切向量的变化率。这可以通过取连续C $_{\alpha}$ 原子之间的单位切向量来量化,然后注意它是如何从一个切线改变到下一个切线。本文所用的精确数学定义是微分几何中空间曲线曲率传统定义的离

散形式： $k_{i+1} = \arccos(t_i \cdot t_{i+1})$ ，其中 t_i 是从 $C_\alpha(i)$ 到 $C_\alpha(i+1)$ 的单位切向量。然后曲率就是一个弧度角，根据主链配置的不同，原则上可以从0(平行)到 π (反平行)变化。

[0434] 在原纤维的情况下分别确定环状(CGQKLVG)(SEQ ID NO:3)、直链CGQKLVG(SEQ ID NO:3)和QKLV(SEQ ID NO:1)中的Q、K、L、V的曲率值如下：

[0435] 环状肽:1.248 1.566 1.422 1.46

[0436] 直链肽:0.870 1.355 0.931 1.303

[0437] 原纤维:0.740 1.159 0.796 1.188。

[0438] 平均值为：

[0439] 环状肽:1.42

[0440] 直链肽:1.11

[0441] 原纤维:0.97。

[0442] 对于曲率谱和下面的二面角分布，使用Charmm27从明确溶剂(SPC)中的平衡模拟获得数据。环状肽体系：模拟时间1ns，含有500帧，直链肽体系：模拟时间10ns，含有1000帧，2m4j体系：680ps，含有68帧。

[0443] 因为环状表位的曲率较大，含有这些残基的寡聚体的假想转向将具有不同于原纤维或单体中的主链取向，然而曲率的程度不是非物理的—表征环状肽的曲率值在原纤维的几个位置获得。

[0444] II.二面角分布

[0445] 作为鉴定的表位可以定义A- β 中的寡聚体特异性表位的进一步计算支持，代表寡聚体中暴露的表位的环状肽中二面角的分布(图12a)，其具有与原纤维或单体中相应分布显著不同的分布。

[0446] 对于许多侧链二面角，环状肽中Q15的二面角分布与来自单体或原纤维的分布(图4A)显著不同。

[0447] 图4B显示了环状肽CGQKLVG(SEQ ID NO:3)的图像；图像来自平衡分子动力学模拟。在该图像中，谷氨酰胺(Q)残基具有以 C_α ， C_β ， G_x 和 C_δ 原子呈现的侧链且以黑色珠显示，且相应的二面角键显示为黑色。与由直链肽或原纤维情况下残基探索的相应二面角分布相比，环状肽中的二面角具有显著不同的二面角分布(参见图4A，Res-Q:CA-CB-CG-CD)。

[0448] 同样，可以检查K、L和V的二面角分布。K16的二面角分布显示于图5中。K的差异明显不如Q的差异。

[0449] 在图6中示出了L17的二面角分布。

[0450] 在图7中示出了V18的二面角分布。

[0451] 尽管L17显示与直链肽分布有一些差异，特别是对于涉及区分直链和环状构象的主链原子的二面角，与直链或原纤维分布显示出最显著差异的残基是Q15。

[0452] 例如在QKL或QKLV的情况下Q15-K16可以是表位上的关键残基。通过本文所述的表面积和溶解度分析来提供对这些残基重要性的进一步支持。

[0453] III.表位的溶解度和抗原性

[0454] 根据CamSol预测方案[4]的A- β 42残基的溶解度显示在图9中。图9中的残基QKLV(SEQ ID NO:1)分别具有-0.899，-0.936，-1.46和-1.51。随着向C-末端继续，溶解度降低。

[0455] 可溶性越高的残基越可能在任何A- β 种类的表面上遇到，尤其是它更可能位于寡

聚体表面上或附近。残基将溶解在未结构化单体的表面上,并且可能不会溶解在原纤维的表面(由于有组织的结构)。寡聚体将被部分地和动态地结构化,使得原纤维中不能溶剂接近的特异性残基的暴露(任选地与一种或多种构象特征组合)可以将寡聚体与原纤维区分开。

[0456] 残基*i*的相对溶解度因子 σ_i 可以被定义为:

$$[0457] \quad \sigma_i = \frac{s_i - s_{\min}}{s_{\max} - s_{\min}}$$

[0458] 其中 s_i 是残基*i*的溶解度,并且 $s_{\max}$ 和 $s_{\min}$ 是给定残基范围内溶解度的最大值和最小值。这里,简单地设定绘图值的范围,将残基的范围任选择为HQKLVF (SEQ ID NO:9),以便 $s_{\max}=0.0302$, $s_{\min}=-1.51$ 。

[0459] 当SASA通过残基的溶解度加权时,更强调组QKLV (SEQ ID NO:1)中的N-末端残基。图10绘制了溶剂可接近的表面积(SASA),通过每个残基的溶解度因子加权的SASA($\sigma_i \cdot \text{SASA}_i$)。 $\sigma_i \cdot \text{SASA}_i$ 减去原纤维中的值,即单体和环状肽中比原纤维增加的数量原纤维($\sigma_i \cdot \Delta \text{SASA}_i$)。

[0460] 通过溶解度加权导致Q和K残基具有在寡聚体表面上差异暴露的最大可能性和抗原性。

[0461] 基于残基侧链部分的溶剂可接近的表面积的剖析

[0462] 将各种残基的侧链分离成原子团,如图11所示,表明随着接近侧链末端,存在溶剂暴露的更大总体趋势。例如将Q15细分为 $C_{\beta}-H_2$, $C_{\gamma}-H_2$, C_{δ} , O_{ϵ} 和 $N_{\epsilon}-H_2$,与原纤维或单体相比,在环状肽中 $N_{\epsilon}-H_2$ 具有最多的SASA。对于侧链末端附近的部分,原纤维的溶剂暴露的偏差w.r.t.也有增加的趋势。

[0463] 实施例5

[0464] 包含构象约束表位的环状化合物构建体

[0465] 包含QKLV (SEQ ID NO:1) 例如环状 (CGQKLVG) (SEQ ID NO:3) 的肽可以头对尾环化。

[0466] 可以使用已知方法(如单独的Fmoc基固相肽合成或与其它方法组合)合成包含QKLV (SEQ ID NO:1) 和优选包含2、3或4个氨基酸和/或PEG单元的连接子的直链肽。PEG分子可以在N-末端与胺基偶联,例如使用Hamley 2014[6]和Roberts等2012[7]中描述的偶联化学方法,每个通过引入并入本文。直链肽化合物可以通过共价结合1) 肽+连接子的氨基末端和羧基末端以形成肽键(例如环化主链), 2) 在肽+连接子中具有侧链的氨基末端或羧基末端或3) 肽+连接子中的两条侧链而环化。

[0467] 环状化合物中的键可以是所用规则的肽键(同型环状肽)或包括其它类型的键如酯、醚、酰胺或二硫键(杂环环状肽)。

[0468] 肽可以通过在N-末端或C-末端或在肽内部包括例如半胱氨酸和高半胱氨酸的含巯基或硫醇残基的氧化而环化。例如,侧接肽的两个半胱氨酸残基可被氧化以形成二硫键。可以使用的氧化剂包括例如氧气(空气)、二甲基亚砷、氧化谷胱甘肽、胱氨酸、氯化铜(II)、铁氰化钾、三氟乙酸铈(III)或与本领域技术人员已知的其它氧化剂,并且可以与本领域技术人员已知的方法一起使用。

[0469] 美国专利公开号2009/0215172描述了与环状肽合成有关的方法和组合物。美国专利公开号2010/0240865、美国专利公开号2010/0137559和美国专利7,569,541描述了用于环化的各种方法。在PCT公开号W001/92466和Andreu等,1994.Methods in Molecular Biology 35:91-169中描述了其它实例。

[0470] 更具体地,可以通过添加包含侧接和/或插入间隔子中具有半胱氨酸残基的间隔子的连接子构建包含QKLV (SEQ ID NO:1) 表位的环状肽。通过在添加到肽的N-末端和C-末端的非天然半胱氨酸残基之间产生二硫键,可以将肽构建成环状构象。它也可以通过在N-末端和C-末端氨基酸之间形成肽键(例如头对尾环化)而合成为环状化合物。

[0471] 通过CPC Scientific Inc. (Sunnyvale CA, 美国) 按照标准制造程序进行肽合成。

[0472] 例如,使用添加到包含QKLV (SEQ ID NO:1) 肽的N-末端和C-末端的半胱氨酸残基之间的二硫键以受约束的环状构象构建包含构象表位QKLV (SEQ ID NO:1) 的环状 (CGQKLVC) 环状肽。将两个非天然半胱氨酸残基添加至GQKLV (SEQ ID NO:4), 其中一个位于C-末端, 另一个位于N-末端。两个半胱氨酸在受控条件下被氧化以形成二硫桥或头对尾反应以产生肽键。

[0473] 如上所述,设计环状肽的结构以模拟A- β 寡聚体中QKLV (SEQ ID NO:1) 的氨基酸侧改变的构象和取向。

[0474] 环状 (CGQKLVC)

[0475] 例如使用基于Fmoc基固相肽合成包含间隔子GCG和表位肽QKLV (SEQ ID NO:1) 的直链肽,固相可以在环酰胺树脂或2-氯三苯甲基树脂上。

[0476] 可以通过直链肽CGQKLVC (SEQ ID NO:3) 的酰胺缩合制备环状 (CGQKLVC) (SEQ ID NO:3)。

[0477] 可以通过直链化合物C-PEG2-QKLVC的酰胺缩合制备环状 (C-PEG2-QKLVC)。

[0478] 免疫原构建

[0479] 可通过使用例如Lateef等(2007)所述的方法将含有受约束的表位肽的环状化合物缀合至免疫原性增强剂如钥孔血蓝蛋白 (KLH) 或载体如牛血清白蛋白 (BSA), 该方法通过引用并入本文。

[0480] 实施例6

[0481] 抗体的产生和选择

[0482] 将构象受约束的化合物(例如包含QKLV (SEQ ID NO:1) 如环状 (CGQKLVC) (SEQ ID NO:3) 肽的环状肽) 与钥孔血蓝蛋白 (KLH) 连接。按照加拿大动物护理委员会批准的方案,将环状肽送入小鼠单克隆抗体生产 (ImmunoPrecise Antibodies LTD (Victoria BC, 加拿大)) 中。使用与BSA连接的用于生产抗体的构象肽或相关肽(例如环状 (CGQKLVC-肽) (SEQ ID NO:3)) 筛选小鼠血清。IgG分泌阳性克隆进行大规模生产。

[0483] 如实施例8中进一步描述的,使用包含环状 (CGQKLVC) (SEQ ID NO:3) 的免疫原制备杂交瘤。通过ELISA和SPR筛选杂交瘤上清液以优先结合环状 (CGQKLVC) (SEQ ID NO:3) 肽与如本文所述的直链(非结构化)肽。使用蛋白质G对IgG分泌阳性克隆进行大规模生产并进一步纯化。

[0484] 实施例7

[0485] 评估其对斑块/原纤维的结合或缺乏

[0486] 对于免疫染色,使用本文所述的抗体、阳性对照6E10 (1 μ g/ml) 和同种型对照IgG1、IgG2a、IgG2b或IgG3 (1 μ g/ml, Abcam) 作为初级抗体。在4 $^{\circ}$ C温育切片过夜,并在TBS-T中洗涤3 $\times$ 5分钟。将抗小鼠IgG辣根过氧化物酶缀合物 (1:1000, ECL) 应用于切片并温育45分钟,然后在TBS-T中洗涤3 $\times$ 5分钟。当达到靶向背景染色的期望水平时,应用DAB发色试剂 (Vector Laboratories, Burlington ON, 加拿大) 并使用蒸馏水冲洗切片。用梅耶氏苏木素 (Mayer's haematoxylin) 复染切片,脱水并涂抹盖玻片。在光学显微镜 (Zeiss Axiovert200M, Carl Zeiss Canada, Toronto ON, 加拿大) 下检查载玻片,并使用Leica DC300 digital camera and software (Leica Microsystems Canada Inc., Richmond Hill, ON) 在50、200和400X放大倍数下捕获代表性图像。

[0487] 实施例8

[0488] 方法和材料

[0489] 免疫原

[0490] 环状和直链肽由CPC Scientific, Sunnyvale, CA, USA产生。使用三氟乙酸盐抗衡离子方案将肽与KLH (用于免疫) 和BSA (用于筛选) 缀合。将肽脱盐并通过MS和HPLC检查并认为95%纯度。将肽运送至IPA以用于在小鼠中生产单克隆抗体。

[0491] 抗体

[0492] 产生许多杂交瘤和单克隆抗体至与钥孔血蓝蛋白 (KLH) 连接的环状 (CGQKLVG) (SEQ ID NO:3)。

[0493] 免疫50日龄雌性BALB/c小鼠 (Charles River Laboratories, Quebec)。在19天的时间内给予一系列含有抗原但不含佐剂的皮下含水注射剂。每只小鼠每次注射0.5mg/mL的环状肽-KLH无菌盐水溶液,用100 μ g肽免疫小鼠。小鼠被安置在Lab Products的通风架系统 (ventilated rack system) 中。所有4只小鼠在第19天被安乐死,收获淋巴细胞用于杂交瘤细胞系的产生。

[0494] 融合/杂交瘤开发

[0495] 在聚乙二醇 (PEG 1500) 的存在下分离淋巴细胞并与鼠SP2/0骨髓瘤细胞融合。使用HAT选择培养融合细胞。该方法使用半固体甲基纤维素基HAT选择性培养基以将杂交瘤选择和克隆组合到一个步骤中。单细胞衍生的杂交瘤生长在半固体培养基上以形成单克隆菌落。融合事件10天后,将所得杂交瘤克隆转移到96孔组织培养板中并在含有HT的培养基中生长,直至达到对数生长中期 (5天)。

[0496] 杂交瘤分析 (筛选)

[0497] 使用山羊抗-IgG/IgM (H&L) -HRP二级抗体通过筛选抗原 (环状肽-BSA (初次筛选)) 的间接ELISA测试来自杂交瘤的组织培养上清液,并对IgG和IgM抗体进行探测以及用TMB底物开发。在该测定中克隆 $>0.20D$ 用于下一轮测试。阳性培养物在筛选抗原以确认分泌并在不相关抗原 (人转铁蛋白) 上重新检测以消除非特异性mAb并排除假阳性。通过抗体捕获ELISA以确定它们是IgG还是IgM同种型而同种分析所有感兴趣的克隆。还通过间接ELISA对其它环状肽-BSA缀合物以及直链肽-BSA缀合物测试以评估交叉反应性而测试所有感兴趣的克隆。

[0498] 使用与BSA缀合的环状 (CGQKLVG) (SEQ ID NO:3) 通过间接ELISA筛选小鼠杂交瘤抗体。

[0499] ELISA抗体筛选

[0500] 简而言之,在4℃在100uL/孔碳酸盐包被缓冲液 (pH9.6) 0/N中用0.1uL/孔环状 (CGQKLVG)-缀合-BSA (SEQ ID NO:3) 包被ELISA板,并室温下用3%脱脂奶粉的PBS溶液封闭1小时。初级抗体:在37℃下将杂交瘤上清液以100μL/孔振荡温育1小时。在37℃下将次级抗体:1:10,000山羊抗小鼠IgG/IgM (H+L)-HRP以100μL/孔在PBS-Tween中振荡1小时。所有洗涤步骤用PBS-Tween进行30分钟。以50uL/孔添加底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB),在暗处显影并用等体积的1M HCl停止。

[0501] 选择阳性克隆以用于进一步测试。通过间接ELISA测定小鼠杂交瘤的阳性克隆对环状 (CGQKLVG) (SEQ ID NO:3) 缀合的BSA和人转铁蛋白 (HT) 的反应性。1) 在4℃下在100uL/孔碳酸盐包被缓冲液 (pH9.6) 0/N中用0.1uL/孔环状 (CGQKLVG)-缀合-BSA (SEQ ID NO:3); 或在37℃下在dH₂O 0/N中以50μL/孔的0.25μg/孔HT抗原包被板。初级抗体:在37℃下将杂交瘤上清液以100μL/孔振荡温育1小时。在37℃下将次级抗体:1:10,000山羊抗小鼠IgG/IgM (H+L)-HRP以100μL/孔在PBS-Tween中振荡1小时。所有洗涤步骤用PBS-Tween进行30分钟。以50uL/孔添加底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB),在暗处显影并用等体积的1M HCl停止。

[0502] ELISA环状与直链CGQKLVG (SEQ ID NO:3) 化合物的选择性

[0503] 1) 在4℃下在100uL/孔碳酸盐包被缓冲液 (pH9.6) 0/N中用0.1uL/孔环状 (CGQKLVG)-缀合-BSA (SEQ ID NO:3) 在4℃下在100uL/孔碳酸盐包被缓冲液 (pH9.6) 0/N中用0.1uL/孔直链 (CGQKLVG)-缀合-BSA (SEQ ID NO:3); 或3) 在4℃下在100uL/孔碳酸盐包被缓冲液 (pH9.6) 0/N中用0.1uL/孔负肽包被ELISA板。初级抗体:在37℃下将杂交瘤上清液以100μL/孔振荡温育1小时。在37℃下将次级抗体:1:10,000山羊抗小鼠IgG/IgM (H+L)-HRP以100μL/孔在PBS-Tween中振荡1小时。所有洗涤步骤用PBS-Tween进行30分钟。以50uL/孔添加底物TMB,在暗处显影并用等体积的1M HCl停止。

[0504] 同种分型

[0505] 使用抗体捕获实验对杂交瘤抗体进行同种分型。在4℃下用1:10,000山羊抗小鼠IgG/IgM (H&L) 抗体以100μL/孔碳酸盐包被缓冲液 (pH9.6) 包被捕获板过夜。没有使用封闭步骤。添加初级抗体 (杂交瘤上清液) (100ug/mL)。在37℃下将次级抗体:1:5,000山羊抗小鼠IgG γ-HRP或1:10,000山羊抗小鼠IgMμ-HRP以100μL/孔在PBS-Tween中振荡1小时。所有洗涤步骤用PBS-Tween进行30分钟。以50uL/孔添加底物TMB,在暗处显影并用等体积的1M HCl停止。

[0506] SPR结合测定-初级和次级筛选

[0507] 与Aβ单体和寡聚体结合的抗体的SPR分析

[0508] A-β单体和寡聚体制备将重组A-β40和42肽 (California Peptide, Salt Lake City UT, USA) 溶解于冰冷的六氟异丙醇 (HFIP) 中。通过蒸发过夜除去HFIP并在SpeedVac离心机中干燥。为了制备单体,将肽膜在DMSO中重构至5mM,在dH₂O中进一步稀释至100μM并立即使用。通过将5mM DMSO肽溶液在不含酚红的F12培养基 (Life Technologies Inc., Burlington ON, Canada) 中稀释至终浓度为100μM并在4℃温育24小时至7天而制备寡聚体。

[0509] SPR分析使用分子亲和力筛选系统 (MASS-1) (Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Germany) 进行所有SPR测量,采用高强度激光和高速光学扫描的分析生物传感器实时监测

结合相互作用。使用SPR直接结合测定进行组织培养上清液的初步筛选,由此将BSA缀合的肽A- β 42单体和A- β 42寡聚体共价固定在高胺容量(HAC)传感器芯片(Sierra传感器芯片 GmbH,Hamburg,德国)的单个流通细胞上并且抗体流过表面。使用SPR间接(捕获)结合测定在次级筛选中分析蛋白G纯化的mAbs,由此将抗体捕获在蛋白质A-衍生的传感器芯片(XanTec Bioanalytics GmbH,Duesseldorf,Germany)上,且A- β 40单体、A- β 42寡聚体、可溶性脑提取物和脑脊液流过表面。在SPR直接结合测定中,通过将A- β 42单体和A- β 42寡聚体共价固定在HAC传感器芯片的单个流通细胞上并流过纯化的mAb证实了抗体的特异性。

[0510] 可溶性脑提取物和CSF样品的SPR分析

[0511] 可溶性脑提取物和CSF制备从UBC阿尔茨海默病和相关病症诊疗中评估的患者获得人脑组织和CSF。可能性AD的临床诊断基于NINCDS-ADRDA标准[5]。将CSF收集在聚丙烯管中、处理、等分到100 μ L聚丙烯小瓶中,并在腰椎穿刺后1小时内储存在-80 $^{\circ}$ C。

[0512] 均质化:称重人脑组织样品,随后浸入一定体积的新鲜冰冷的TBS(补充有来自加拿大Laval QC的Roche Diagnostics的无EDTA蛋白酶抑制剂混合物)中,使得脑组织的最终浓度为20% (w/v)。使用机械探针匀浆器(3x30秒脉冲,中间停留30秒,全部在冰上进行)将组织均质化在该缓冲液中。然后使TBS均质化样品进行超速离心(70,000 $\times$ g,90分钟)。收集上清液、等分并在-80 $^{\circ}$ C下储存。使用BCA蛋白测定(Pierce Biotechnology Inc,Rockford IL,美国)确定TBS匀浆的蛋白质浓度。

[0513] PR分析将来自4名AD患者和4名年龄匹配对照的脑提取物以及来自9名AD患者和9名年龄匹配对照的CSF样品合并并分析。将纯化的mAb捕获在蛋白质A衍生的传感器芯片的单独的流动细胞上,并将稀释的样品注射在表面上180秒,然后在缓冲液中解离120秒并进行表面再生。通过减去小鼠对照IgG参照表面结合和测定缓冲液来双重参照结合响应,并比较不同组样品。

[0514] 评估其对A- β 单体的结合或缺乏

[0515] 在组织培养上清液的初级筛选中,将A- β 42单体和A- β 42寡聚体用于直接结合测定。在次级筛选中,A- β 40单体和A- β 42寡聚体、可溶性脑提取物和CSF样品用于间接(捕获)结合测定。

[0516] 初级筛选

[0517] 筛选组织培养上清液中是否存在针对其同源环状肽的抗体结合。将每个样品稀释并在固定的肽和BSA参照表面上一式两份注射120秒,然后仅在300秒解离相注射运行缓冲液。在每个分析周期之后,再生传感器芯片表面。通过减去BSA参照表面和空白运行缓冲液注射的结合和在解离相中收集的响应报告点的结合来双重参照传感图。

[0518] 寡聚体结合测定

[0519] 接下来合成的A- β 42寡聚体如上产生并固定,分析抗体结合反应。将与A- β 42寡聚体的抗体结合响应与对环状的结合响应进行比较。

[0520] 验证与A- β 寡聚体的结合

[0521] 为了进一步验证和证实A- β 42寡聚体结合,将抗体共价固定,随后注射到商业制备的稳定A- β 42寡聚体(SynAging SAS,Vandœuvre-lès-Nancy,法国)的表面上。

[0522] 结果

[0523] ELISA测试发现大部分杂交瘤克隆结合环状肽。

[0524] 通过ELISA测试下一个克隆对环状-和直链-CGQKLVG (SEQ ID NO:3) 化合物的结合选择性。与直链CGQKLVG缀合的-BSA (SEQ ID NO:3) 相比,许多克隆优先结合环状(CGQKLVG)-缀合的-BSA (SEQ ID NO:3)。

[0525] 同种分型显示大多数克隆是包括IgG1、IgG2a和IgG3克隆的IgG。还鉴定了几个IgM和IgA克隆,但没有进一步追踪。

[0526] 使用表面等离子共振进行直接结合分析以筛选与SEQ ID NO:3的环状肽结合的组织培养上清液中的抗体。

[0527] 图16绘制了SPR直接结合测定数据与ELISA结合数据,并显示SPR直接结合与ELISA结果之间存在相关性。当在ELISA中有强结合时,仅SPR中的强结合发生。

[0528] 对克隆测试其结合如上所述制备的环状肽、直链肽、A- β 1-42单体和A- β 1-42寡聚体的能力。如上所述使用MASS-1进行结合测定(直接结合测定)。基于如表1所示进行的结合测定选择许多克隆。

[0529] 选择的克隆是IgG mAb。初级筛选中的负数表示无结合(例如小于同种型对照)。

[0530] 表1

[0531] 305

[0532]

	环状-肽 (RF)	直链-肽 (RF)	A β 42 单体 (RF)	A β 42 寡聚体 (RF)
2A8	555.1	6.1	15.5	75.8
3D8	639.7	5.7	20.9	45
4C2	562.2	-4.3	34	161.8
4C12	433.3		24.7	73.1
5D3	292.7	19.1	12.8	47.4
5G1	295.5	126.9	-17.6	46.2
6E2	211	12.4	36.6	77.5
7E9	695.4	7.7	55.1	86
8B10	522.7	83.8	32.8	68.5
9B3	394.6	26.4	7.2	56.6
10B6	262.3	9.5	-12.4	71.9
13D8	259.8	3.2	7	31.7
12F4	554.8	-0.8	28.7	89.2

[0533] ELISA预筛选

[0534] 杂交瘤上清液的ELISA预筛选鉴定了与直链肽相比显示与环状肽增加结合的克隆。一部分克隆对KLH-表位连接子肽具有反应性。这些被排除在进一步研究之外。使用本文所述的同种分型程序将大部分克隆确定为IgG同种型。

[0535] 通过表面等离子体共振测量的直接结合-初级筛选

[0536] 使用表面等离子体共振,测试含有组织培养上清液的抗体克隆与环状肽、直链肽、A- β 寡聚体和A- β 单体的直接结合。

[0537] 结果在图15中示出。图A显示了对于连接子区域没有反应性的IgG克隆,与环状肽和直链肽(非结构化)结合的抗体。图B显示了与A- β 寡聚体和A- β 单体的结合的抗体。许多克隆对环状肽具有升高的反应性,所有克隆(除一个之外)对直链肽具有最小或没有反应性。A- β 寡聚体结合具有一般选择性。

[0538] 对于选择克隆,比较结合分布谱显示在图17中。在环状肽(环状)、直链肽(正方形)、A- β (A β) 单体(正三角形)和A- β 寡聚体(A β O)(倒三角形)的情况下,使用针对特异性表位的表面等离子体共振评估每个克隆的直接结合。

[0539] 实施例9

[0540] 次级筛选

[0541] 免疫组织化学

[0542] 对冷冻的人脑切片进行免疫组织化学,没有固定或抗原修复。在加湿室中,通过与无血清蛋白封闭试剂(Dako Canada Inc.,Mississauga,ON,加拿大)温育1小时而封闭非特异性染色。使用以下一级抗体进行免疫染色:全部购自Biolegend的小鼠单克隆同种型对照IgG1、IgG2a和IgG2b以及抗淀粉样蛋白6E10,以及选择的对环状肽具有反应性的纯化克隆。所有抗体以1 μ g/mL使用。在室温下温育切片1小时,并在TBS-T中洗涤3x5分钟。将抗小鼠IgG辣根过氧化物酶缀合物(1:1000,ECL)施用于切片并温育45分钟,然后在TBS-T中洗涤3x5分钟。当达到靶向背景染色的期望水平时,应用DAB发色试剂(Vector Laboratories,Burlington ON,加拿大)并使用蒸馏水冲洗切片。用梅耶氏苏木素(Mayer's haematoxylin)复染切片,脱水并涂抹盖玻片。在光学显微镜(Zeiss Axiovert 200M,Carl Zeiss Canada,Toronto ON,加拿大)下检查载玻片,并使用Leica DC300digital camera and software(Leica Microsystems Canada Inc.,Richmond Hill,ON)在20和40X放大倍数下捕获代表性图像。使用“色阶自动校正(Levels Auto Correction)”在Adobe Photoshop中优化图像。

[0543] CSF和脑提取物

[0544] 经UBC临床研究伦理委员会(C04-0595)批准,从马里兰大学脑和组织银行获得人脑组织。从UBC医院诊所的阿尔茨海默病和相关病症中评估的患者获得CSF。该研究获得了UBC临床研究伦理委员会的批准,并且在收集CSF样品之前获得了参与者或法定亲属的书面同意。可能性AD的临床诊断基于NINCDS-ADRDA标准。将CSF收集在聚丙烯管中、处理、等分成100 μ L聚丙烯小瓶,并在腰椎穿刺后1小时内储存在-80 $^{\circ}$ C。

[0545] 均质化:称重人脑组织样品,随后浸入一定体积的新鲜冰冷的TBS和来自Roche Diagnostics的无EDTA蛋白酶抑制剂混合物(Laval QC,加拿大)中,使得脑组织的最终浓度为20%(w/v)。使用机械探针匀浆器(3x30秒脉冲,中间停留30秒,全部在冰上进行)将组织均质化在该缓冲液中。然后使TBS均质化样品进行超速离心(70,000 $\times$ g,90分钟)。收集上清液、等分并在-80 $^{\circ}$ C下储存。使用BCA蛋白测定(Pierce Biotechnology Inc,Rockford IL,美国)确定TBS匀浆的蛋白质浓度。

[0546] CSF:合并来自9名捐献者的AD和9名没有AD的捐献者的CSF。对所有抗体,通过SPR使用浓度为30微克/mL的纯化IgG分析样品。将小鼠IgG用作抗体对照,并且所有实验重复至少2次。

[0547] 使用抗体6E10证实了CSF和脑提取物中的阳性结合。

[0548] SPR分析:将来自AD患者的4个脑提取物和来自年龄匹配的对照的4个脑提取物合并并分析。在TBS中均质化的脑样品包括额叶皮质布罗德曼(Brodmann)区域9。使用分子亲和力和筛选系统(MASS-1)(Sierra Sensors GmbH,Hamburg,Germany)进行所有实验,如实施例6中所述,采用高强度激光和高速光学扫描的分析型生物传感器实时监测结合相互作用。针对本文所述的环状肽产生的纯化抗体被捕获在蛋白A-衍生的传感器芯片的分离的流动细胞上,并将稀释的样品注射在表面上180秒,然后在缓冲液中解离120秒并表面再生。通过减去小鼠对照IgG参照表面结合和测定缓冲液来双重参照结合响应,并比较不同组样品。

[0549] 结果

[0550] CSF脑提取物和免疫组织化学

[0551] 测试几种克隆在CSF中结合A-β的能力,尸体AD脑的可溶性脑提取物和组织样品显示在表2中。表2中的阳性强度由数字加号表示。

[0552] 表2和表3提供了如本文所述通过SPR测量的所选克隆对寡聚体对单体的结合选择性的数据。

[0553] IHC结果也概括在表2中,其中“+/-”表示与同种型对照相似或不同的染色,但没有清晰的斑块形态。

[0554] 图18显示了与用6E10抗体观察到的阳性斑块染色相比,用克隆8H10 (62) 在新鲜冷冻切片上缺乏斑块染色的实例。

[0555] 图19显示了针对包含QKLV (SEQ ID NO:1) 的环状肽产生的抗体结合A-β寡聚体优于单体,并且还优先结合AD患者的脑提取物和/或CSF中的A-β。

[0556] 如表2、3和图18和19所示,针对包含QKLV (SEQ ID NO:1) 的环状肽产生的抗体包括结合脑提取物和/或CSF中的A-β的克隆,但没有明显地与SPR上的单体结合,并且没有通过IHC明显地结合斑块原纤维。

[0557] 表2:结合特征的总结

[0558]

表 2					
	克隆#	寡聚体/ 单体	CSF AD/非 AD	脑提取物 AD/非 AD	IHC-斑块染色
环状 (CGQKLVG) (SEQ ID NO: 3)	305-59 (5G1)	+	-	++	+/-
	305-61 (7E9)	-	++	-	+
	305-62 (8H10)	+/-	-	+	-

[0559] *评分相对于同一样品类别中的其它克隆。

[0560] 表3.A-β寡聚体结合RU值减去单体结合

[0561]

测试克隆	305-62 (8H10)
RU	227.7

[0562] 实施例10

[0563] 合成寡聚体结合

[0564] 测试商业制备的合成淀粉样蛋白β寡聚体 (SynAging SAS, Vanduvre-lès-Nancy) 的系列2倍稀释液 (7.8nM至2000nM) 与共价固定化抗体的结合。对照抗体mAb6E10的结果示于图20A中,小鼠对照IgG示于图20B中,图20C显示了使用针对环状 (CGQKLVG) (SEQ ID NO: 3) 产生的抗体的结果。

[0565] 实施例11

[0566] 福尔马林固定组织的免疫组织化学研究

[0567] 使用抗环状CGQKLVG (SEQ ID NO:3) 产生的抗体评估人脑组织。该患者以前曾用三方面的方法对阿尔茨海默病进行过鉴定和诊断：(i) Bielschowsky银法显示老年斑块和神经原纤维缠结，(ii) 刚果红显示淀粉样蛋白和 (iii) tau免疫组织化学显示缠结和证实老年斑块是“神经炎”。该组织用于测试所选单克隆抗体克隆的斑块反应性。将脑组织固定在10%福尔马林缓冲液中几天，并在Sakura VIP组织处理器中石蜡处理。组织切片用1g/ml抗体进行探测有无微波抗原修复 (AR)。包括泛淀粉样蛋白β反应性抗体6E10以及选择的抗体克隆作为阳性对照。用抗体稀释剂 (Ventana) 稀释抗体稀释，并用OptiView DAB (Ventana) 显色。在Ventana Benchmark XT IHC染色器上进行染色。使用Olympus BX45显微镜获得图像。图像由具有神经病理学专业知识的专业病理学家盲目分析。

[0568] 如下表4所示，使用固定的组织，测试的抗体对于具有或不具有抗原修复的老年斑淀粉样蛋白的特异性染色是阴性的。6E10被用作阳性对照。

[0569] 表4

[0570]

表位	待测试的抗体	令人信服的老年斑块淀粉样蛋白特异性染色的证据	
		无 AR	有 AR
305	59 (5G1)	可能的弱染色	阴性
	61 (7E9)	阴性	阴性
	62 (8H10)	阴性	阴性
阳性对照	6E10	强阳性	强阳性

[0571] 实施例12

[0572] 寡聚体增殖的抑制

[0573] 通过使用硫磺素T (ThT) 结合检查它们对淀粉样蛋白β (Aβ) 增殖的影响体外测试抗体的生物学功能性。Aβ聚集由预先形成的小Aβ寡聚体的核诱导并且通过其增殖，并且从单体Aβ到可溶性寡聚体到不溶性原纤维的完整过程伴随着β片形成的伴随增加。这可以通过ThT (一种苯并噻唑盐) 进行监测，当其结合β折叠结构并导致荧光增强时，其激发和发射最大值分别从385nm变为450nm和445nm变为482nm。简而言之，将Aβ1-42 (Bachem Americas Inc., Torrance, CA) 溶解、超声处理，在Tris-EDTA缓冲液 (pH7.4) 中稀释并添加到黑色96-孔微量滴定板 (Greiner Bio-One, Monroe, NC) 中，向其中添加等体积的环状肽产生的抗体或不相关的小鼠IgG抗体同种型对照，导致Aβ1-42肽与抗体的摩尔比为1:5。添加ThT并将平板在室温下温育24小时，使用Wallac Victor3v 1420多标记计数器 (PerkinElmer, Waltham, MA) 每小时记录ThT荧光测量 (在440nm处激发，在486nm发射)。从所有孔中减去来自背景缓冲液的荧光读数，并且从相应的孔中进一步减去仅来自抗体的孔的读数。

[0574] 如图21所示，通过ThT荧光监测的Aβ42聚集显示出以最小荧光初始滞后阶段为特征的S形形状，具有荧光快速增加的指数阶段，最后是平台阶段，在此期间Aβ分子种类处于平衡状态并且在其中没有荧光增加。Aβ42与不相关小鼠抗体的共温育对聚集过程没有任何显著影响。相反，Aβ42与测试抗体的共温育完全抑制了聚集过程的所有阶段。用抗体克隆61、62和64获得的结果显示在图21中。由于ThT聚集测定模拟AD发病机制中关键的单体、寡

聚体、初原纤维和原纤维的A β 增殖和聚集的体内生物物理/生物化阶段,所以抗环状CGQKLVG (SEQ ID NO:3)的抗体证明完全消除该过程的潜力。使用小鼠IgG对照进行同种型对照显示无抑制作用。

[0575] 实施例13

[0576] 实现阿尔茨海默病免疫疗法的最佳谱:合理产生对毒性A- β 寡聚体特异性的抗体。

[0577] 目标:产生对毒性淀粉样蛋白-寡聚体(A β O)特异性的抗体

[0578] 背景:目前的证据表明,与单体和原纤维相反,增殖的朊病毒样A β O菌株优先对神经元具有毒性并触发阿尔茨海默病(AD)中的tau病理。此外,剂量限制性不良反应与临床试验中的A纤维识别有关。这些观察结果表明,为了安全性和有效性,可能需要特异性中和毒性A β O。

[0579] 设计/方法:如本文所述采用计算模拟,使用具有标准化力场的分子动力学来扰乱沉积在蛋白质数据库中的A β 原纤维的原子级结构。据推测,弱稳定区域可能暴露于新生初原纤维或寡聚体中。聚类分析、曲率、暴露于溶剂、溶解度、二面角分布和拉氏角分布全部用于表征预测表位的构象性质,当在寡聚体与单体或原纤维的情况下呈现时,所述预测表位量化抗原谱中的差异。以环状形式合成候选肽表位,其可以模拟区域A β O构象,与载体蛋白缀合,并用于在小鼠中产生单克隆抗体。通过SPR和免疫组织化学筛选纯化的抗体。

[0580] 结果:

[0581] 基于识别同源结构化肽和合成A β O的能力,选择针对5个预测表位的66个IgG克隆进行纯化,几乎不结合未结构化的肽、连接子肽或A β 单体。与对照相比,额外的筛选鉴定了优先结合AD患者的CSF和脑提取物中天然可溶性A β O的抗体。AD脑的免疫组织化学分析允许选择不与斑块反应的抗体克隆。

[0582] 结论:计算上鉴定的A β O表位允许产生具有与天然AD A β O选择性结合的期望的靶分布的抗体,而对单体或原纤维没有显著的交叉反应性。

[0583] 实施例14

[0584] 毒性抑制测定

[0585] 可以在大鼠原代皮层神经元测定中测试通过抗环状肽而产生的抗体来抑制A- β 42寡聚体的毒性。

[0586] 将抗体和对照IgG各自调节至例如2mg/mL的浓度。测试A- β 寡聚体和抗体以及载体对照,单独的A- β 寡聚体和阳性对照如神经保护肽人肌肽HNG的各种摩尔比。

[0587] 表5中示出了示例性设置。

[0588] 在室温预温育10分钟后,用培养基将体积调节至840微升。该溶液在37°C温育5分钟。然后将溶液直接添加到原代皮层神经元中,并将细胞温育24小时。使用MTT测定可以测定细胞活力。

[0589] 表5

[0590]

A β O / AB 摩尔比	A β O (μ L)	A β O (μ M)	AB (μ M)	AB (μ L)	培养基(μ L)	终体积(μ L)
5/1	1.68	4.2	0.84	12.73	185.6	200

[0591]

1/1	1.68	4.2	4.20	63.64	134.7	200
1/2	1.68	4.2	8.4	127.27	71.1	200

A β O 工作溶液: 2.2 mg/mL - 500 μ MCTRL 载体: 1.68 的 μ L 寡聚体缓冲液 + 127.3 μ L PBS + 711 μ L 培养基CTRL A β O: 1.68 的 μ L A β O + 127.3 μ L PBS + 711 μ L 培养基CTRL HNG: 1.68 的 μ L A β O + 8.4 μ L HNG (100 nM 最终) + 127.3 μ L PBS + 702.6 μ L 培养基

[0592] 该测试使用305抗体克隆62进行。仅抗体显示无毒性(图22A)。对于所有寡聚体抗体浓度:1:5、1:1和2:1,观察到剂量依赖性的A- β 寡聚体毒性抑制(图22B)。

[0593] 实施例15

[0594] 体内毒性抑制试验

[0595] 可通过小鼠行为测定在体内测试通过针对环状肽产生的抗体抑制A- β 42寡聚体的毒性。

[0596] 在脑室内(ICV)注射到小鼠之前,将抗体和同种型对照与A- β 42寡聚体各自以2种或更多种不同摩尔比预先混合。对照组包括单独注射载体、单独注射寡聚体、单独注射抗体和阳性对照(例如神经保护肽人肌肽蛋白)的小鼠。或者,可以在ICV注射寡聚体之前,期间和/或之后全身施用抗体。在ICV注射寡聚体后大约4-7天开始,在学习和记忆的行为测定中评估认知,例如小鼠空间识别测试(SRT),Y-迷宫测定,Morris水迷宫模型和新物体识别模型(NOR)。

[0597] 小鼠空间识别测试(SRT)评估地形记忆、海马功能测量(SynAging)。该模型使用两室设备,其中室的形状、图案和颜色不同(即地形差异)。这些室通过一个清晰的有机玻璃走廊(Plexiglass corridor)连接起来。首先将单个小鼠置于该装置中5分钟的探索阶段,在该阶段只允许进入其中一个室。然后将小鼠放回家笼30分钟,并放回设备中5分钟“选择”阶段,在此期间它们可以进入两个室。具有正常认知功能的小鼠记住先前探测的室并且在新室中花费更多时间。区分指数(DI)计算如下: $DI = (TN - TF) / (TN + TF)$, 其中, TN是在新室中花费的时间量, TF是在熟悉室中花费的时间量。有毒的A- β 寡聚体导致DI减少,该减少可由人肌肽阳性对照部分拯救。在ICV注射后不同时间点的该测定的性能可用于估计针对环状肽产生的抗体在体内抑制A- β 寡聚体毒性的潜力。

[0598] Y-迷宫测定(SynAging)是主要由前额皮质(工作记忆)和海马(空间分量)介导的空间工作记忆的测试。小鼠被放置在一个Y形的迷宫里,其中,它们可以探索2只臂。具有完整短期记忆的小鼠将在连续试验中在两个臂之间交替。用毒性A- β 寡聚体注射ICV的小鼠认知受损,显示了替代随机行为接近50%的随机值(相对于正常动物约70%)。胆碱酯酶抑制剂多奈哌齐(Aricept)或人肌肽部分或完全逆转了这种损害。该测定提供了测试抗体对A- β 寡聚体毒性保护活性的另一种体内评估。

[0599] Morris水迷宫是另一种广泛接受的认知模型,研究空间学习和长期地形记忆,主要依赖于海马功能(SynAging)。训练小鼠在多次试验中发现隐藏在不透明水面下的平台。它们在回忆平台位置时的学习表现基于记录的视觉线索和录像。它们的学习速度是多天测量的,即从放出到水中直到找到平台为止的稳步减少的时间。认知正常的小鼠需要越来越少的时间在连续的日子找到平台(学习)。为了分析长期记忆,在训练后多天重复测试:平台被拿走并且在前平台位置上的交叉数量或第一次穿过的时间被用作评估长期记忆的措施。用毒性A- β 寡聚体注射ICV的小鼠在学习和长期记忆方面显示缺陷,并提供估计测试抗体保护活性的模型。

[0600] 新颖的物体认知(NOR)模型利用啮齿动物的正常行为以研究新物体比已知物体明显更长的时间,其主要取决于皮质内周皮层功能(SynAging)。在采集试验中,允许小鼠或大鼠探索两个相同的物体。在短暂的试验间期之后,其中一个物体被替换为一个新物体。动物返回竞技场并记录积极探索每个物体所花费的时间。正常的啮齿动物会回忆起熟悉的物体,并会花费更多时间探索新物体。相反,A- β 寡聚体处理的啮齿动物表现出明显的认知障碍,并且将花费相似的时间来研究“熟悉”和“新”物体。这可以用已知的临床认知增强剂(例如多奈哌齐)暂时逆转。NOR测定可以在纵向研究中进行多次以评估测试抗体的潜在认知益处。

[0601] 除了行为测定之外,可以收集脑组织并分析突触标记物(PSD95、SNAP25、突触泡蛋白)和炎症标记物(IL-1 β)的水平。在ICV注射寡聚体后约14天将小鼠处死,并用盐水灌注。收集海马,速冻并储存于-80°C直至分析。均质化样品的蛋白质浓度由BCA确定。使用ELISA试剂盒(Cloud-Clone Corp,USA)测定突触标记物的浓度。通常,注射A- β 寡聚体的小鼠突触标记物减少了25-30%,并且通过人肌肽阳性对照恢复至90-100%。在注射A- β 寡聚体的小鼠中IL-1 β 炎症标志物的浓度增加约3倍,并且这种增加在很大程度上被人肌肽阻止。这些测定法提供了测试抗体在分子水平上的保护活性的另一种测量。

[0602] 实施例16

[0603] 体内增殖抑制测定

[0604] 可以在阿尔茨海默病(AD)的各种啮齿动物模型中研究A- β 毒性寡聚体的体内增殖和相关病理学。例如,用于人APP(例如APP23小鼠)或人APP和PSEN1(APPPS1小鼠)的转基因小鼠表达升高水平的A- β 并且随着年龄伴随着炎症和神经元损伤而表现出逐渐淀粉样蛋白沉积。脑内接种含有寡聚体的脑提取物可显著加速该过程(13,14)。这些模型提供了研究脑内或全身施用的测试抗体对A- β 寡聚体增殖的抑制的系统。

[0605] 实施例17

[0606] CDR测序-305-7E9.1

[0607] 选择确定具有IgG3重链和 κ 轻链的305-7E9.1用于重链和轻链的CDR和可变区域。

[0608] 使用5'RACE和扩增合适的小鼠免疫球蛋白重链(IgG1/IgG3/IgG2A)和轻链(κ)可变区域序列的基因特异性反向引物进行RT-PCR。

[0609] 切下特异性条带并克隆到pCR-Blunt II-TOP0载体中进行测序,并将构建体转化到大肠杆菌(E.coli)中。

[0610] 在测序前,挑取每个链的至少8个菌落并进行PCR筛选扩增区域的存在。选择PCR阳性克隆进行测序。

[0611] CDR序列在表6中。重链和轻链的可变部分的共有DNA序列和蛋白质序列提供于表7中。

[0612] 表6

[0613]

链	CDR	序列	SEQ ID NO
重	CDR-H1	GYTFTDYE	11
	CDR-H2	IDPETGDT	12
	CDR-H3	TSPIYYDYDFAY	13
轻	CDR-L1	QSLNNRTRKNY	14
	CDR-L2	WAS	15
	CDR-L3	KQSYNLRT	16

[0614] 表7

[0615] 共有DNA序列和可变区域的翻译蛋白质序列。根据IMTG/LIGM-DB, 互补决定区域(CDR)被加下划线

[0616]

同种型	共有 DNA 序列	蛋白质序列
IgG3 SEQ ID NO:17、18	ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTA ATTGCAGGTGTCCAATCCCAGGTTCAACTGCAGCAGTC TGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACG CTGTCTGCAAGGCTTCG GGCTACACATTACTGACTA TG AAATGCACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCC TGGAATGGATTGGAGCT ATTGATCCTGAAACTGGTGA TACT GCCTACAATCAGGAGTTCAAGGGCAAGGCCACA CTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGA GCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTA CTGT ACAAGCCCCATCTACTATGATTACGACTGGTTT GCTTACT TGGGGCCACGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGC AGCTACAACAACAGCCCCATCT	MEWSWVFLFLLSVI AGVQSQVQLQQSG AELVRPGASVTLSC KASGY TFTDY EMH WVKQTPVHGLEWI GA IDPETGDT AYN QEFK GKATLTADKS SSTAYMELRSLTSED SAVYYCT SPIYYDY DWFAY WGHGTLVT VSAATTTAPS
κ SEQ ID NO:19、20	ATGGATTACAGGCCAGGTTCTTATATTGCTGCTGCTAT GGGTATCTGGTACCTGTGGGGACATTGTGATGTCACAGT CTCCATCCTCCCTGGCTGTGTGCAGCAGGAGAGAAGGTC ACTATGAGCTGCAAATCCAGT CAGAGTCTGCTCAACA ATAGAACCCGAAAGA ACTACT TGGCTTGGTACCAGCA GAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTACT TGGG CATCC ACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACA GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCA AGCAATCTTATAATCTTCGGACG TTCCGGTGGAGGCAC CAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCT	MDSQAQVLILLLLW VSGTCGDIVMSQSP SSLAVSAGEKVTMS CKSS QSLNNRTR KNY LAWYQQKPGQ SPKLLIY W ASTRES GVPDRFTGSGSGTD FTLTISVQAEDLAV YYCK QSYNLRT FG GGTKLEIKRADA

[0617] 实施例9

[0618] CDR测序-305-8H10

[0619] 选择确定具有IgG1重链和κ轻链的305-8H10用于重链和轻链的CDR和可变区域。

[0620] 使用5'RACE和扩增合适的小鼠免疫球蛋白重链(IgG1/IgG3/IgG2A)和轻链(κ)可变区域序列的基因特异性反向引物进行RT-PCR。

[0621] 切下特异性条带并克隆到pCR-Blunt II-TOP0载体中进行测序,并将构建体转化

到大肠杆菌(E.coli)中。

[0622] 在测序前,挑取每个链的至少8个菌落并进行PCR筛选扩增区域的存在。选择PCR阳性克隆进行测序。

[0623] CDR序列在表8中。重链和轻链的可变部分的共有DNA序列和蛋白质序列提供于表9中。

[0624] 表8

[0625]

链	CDR	序列	SEQ ID NO
重	CDR-H1	GFSLSSTSGMG	21
	CDR-H2	IWWDDDK	22
	CDR-H3	ARSITTVVATPFDY	23
轻	CDR-L1	QNVSA	24
	CDR-L2	LAS	25
	CDR-L3	LQHWNSPFT	26

[0626] 表9

[0627] 共有DNA序列和可变区域的翻译蛋白质序列。根据IMTG/LIGM-DB,互补决定区域(CDR)被加下划线

[0628]

同种型	共有 DNA 序列	蛋白质序列
-----	-----------	-------

[0629]

IgG1 SEQ ID NO:27、28	ATGGACAGGCTTACTTCTTCATTCCTGCTGCTGATTGTCC CTGCATATGCTTGTCCCAAGTTACTCTAAAAGAGTCTGG CCCTGGGATATTGAAGCCCTCACAGACCCTCAGTCTGAC TTGTTCTTTCTCT GGGTTTCACTGAGCACTTCTGGTAT GGGTGTAGGCTGGATTCGTCAGCCTTCAGGGAAGGGTCT GGAGTGGCTGGCACAC ATTGGTGGGATGATGATAAGT ACTATAACCCATCCCTGAAGAGCCAGCTCACAATCTCCA AGGATACCTCCAGAAACCAGGTATTCTCAAGATCACCA GTGTGGACACTGCAGATACTGCCACTTACTACTGT GCTC GAAGTATTACTACGGTAGTAGCTACGCCCTTTGACTAC TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAA ACGACAC	MDRLTSSFLLLI AYVLSQVTLKESG PGILKPSQTLSLTC SFS GFSLSSTSGMG VGWIRQPSGKGLE WLAHI IWWDDDK YYNPSLKSQLTISK DTSRNQVFLKITS VDTADTATYYCA RSITTVVATPFDY WGQGTTLTVSSA KTT
κ SEQ ID NO:29、30	ATGGGCATCAAGATGGAGTTTCAGACCCAGGTCTTTGTAT TCGTGTTGCTCTGGTTGTCTGGTGTGATGGAGACATTGT GATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGG AGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGT CAGAATG TTCGTTCTGCT GTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGG CAGTCTCCTAAAGCACTGATTTAC CTGGCATCCA ACCGG CACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCATTCTG AAGACCTGACAGATTATTCTGT CTGCAACATTGGAATT CTCCGTTACGTT CGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATA AAACGGGCTGATGCT	MGIKMEFQTQVF VFVLLWLSGVDG DIVMTQSQKFMST SVGDRVSITCKAS QNVSA VAWYQQ KPGQSPKALII LA SNRHTGVPDRFTG SGSGTDFTLTISNV HSEDLTDYF CLQH WNSPFT FGGGTK LEIKRADA

[0630] 表10 A-β序列和具有连接子的A-β序列

[0631] QKL V (SEQ ID NO:1)

- [0632] HQKLV (SEQ ID NO:2)
[0633] CGQKLVG, 环状CGQKLVG (SEQ ID NO:3)
[0634] GQKLV (SEQ ID NO:4)
[0635] GQKLVG (SEQ ID NO:5)
[0636] GGQKLVG (SEQ ID NO:6)
[0637] GQKLVGG (SEQ ID NO:7)
[0638] CGQKLVGC (SEQ ID NO:8)
[0639] HQKLVF (SEQ ID NO:9)
[0640] QKLVF (SEQ ID NO:10)
[0641] 表11完整A- β 1-42
[0642] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO:31)

[0643] 尽管已经参照目前被认为是优选实施例的内容描述了本申请,但是应该理解,本申请不限于所公开的实施例。相反,本申请旨在覆盖包括在所附权利要求的精神和范围内的各种修改和等同设置。

[0644] 所有的出版物、专利和专利申请都通过引用整体并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地指示为通过引用整体并入。具体而言,与本文提供的每个登录号相关的序列,包括例如在表或其它地方提供的登录号和/或生物标志序列(例如蛋白质和/或核酸),通过引用整体并入本文。

[0645] 权利要求的范围不应受优选实施方式和实施例的限制,而应作为整体给予与说明书一致的最宽泛的解释。

[0646] 说明书中提到的参考文献引用

[0647] [1] SCIENTIFIC REPORTS | 5:9649 | DOI:10.1038/srep09649

[0648] [2] Vincent J. Hilser and Ernesto Freire. Structure-based calculation of the equilibrium folding pathway of proteins. correlation with hydrogen exchange protection factors. J. Mol. Biol., 262:756-772, 1996. The COREX approach.

[0649] [3] Samuel I. A. Cohen, Sara Linse, Leila M. Luheshi, Erik Hellstrand, Duncan A. White, Luke Rajah, Daniel E. Otzen, Michele Vendruscolo, Christopher M. Dobson, and Tuomas P. J. Knowles. Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110 (24) :9758-9763, 2013.

[0650] [4] Pietro Sormanni, Francesco A. Aprile, and Michele Vendruscolo. The camsol method of rational design of protein mutants with enhanced solubility. Journal of Molecular Biology, 427 (2) :478-490, 2015.

[0651] [5] Deborah Blacker, MD, ScD; Marilyn S. Albert, PhD; Susan S. Bassett, PhD; Rodney C. P. Go, PhD; Lindy E. Harrell, MD, PhD; Marshai F. Folstein, MD Reliability and Validity of NINCDS-ADRDA Criteria for Alzheimer's Disease The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. Arch Neurol. 1994; 51 (12) :1198-1204. doi:10.1001/archneur.1994.00540240042014.

[0652] [6] Hamley, I. W. PEG-Peptide Conjugates 2014; 15, 1543-1559; dx.doi.org/

10.1021/bm500246w

[0653] [7]Roberts,MJ et al Chemistry for peptide and protein PEGylation 64: 116-127.

序列表

<110> 英属哥伦比亚大学

<120> 淀粉样蛋白 β 表位及其抗体

<130> 7685-P50184PC00

<150> 62/253,044

<151> 2015-11-09

<150> 62/289,893

<151> 2016-02-01

<150> 62/365,634

<151> 2016-07-22

<150> 62/393,615

<151> 2016-09-12

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Gln Lys Leu Val

1

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

His Gln Lys Leu Val

1

5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 3

Cys Gly Gln Lys Leu Val Gly

1

5

<210> 4

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 4
Gly Gln Lys Leu Val
1 5
<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 5
Gly Gln Lys Leu Val Gly
1 5
<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 6
Gly Gly Gln Lys Leu Val Gly
1 5
<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的构建体
<400> 7
Gly Gln Lys Leu Val Gly Gly
1 5
<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 8

Cys Gly Gln Lys Leu Val Gly Cys

1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

His Gln Lys Leu Val Phe

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Gln Lys Leu Val Phe

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 11

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 12

Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asp Thr

1 5

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 13

Thr Ser Pro Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr

1 5 10
 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 14
 Gln Ser Leu Leu Asn Asn Arg Thr Arg Lys Asn Tyr

1 5 10
 <210> 15
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 15

Trp Ala Ser

1
 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 16

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr

1 5
 <210> 17
 <211> 438
 <212> DNA
 <213> 小家鼠
 <400> 17

atggaatgga gctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ttgcaggtgt ccaatcccag 60
 gttcaactgc agcagtcctgg ggcagagctg gtgaggcctg gggcttcagt gacgctgtcc 120
 tgcaaggctt cgggctacac atttactgac tatgaaatgc actgggtgaa gcagacacct 180
 gtgcatggcc tggaatggat tggagctatt gatcctgaaa ctggtgatac tgcctacaat 240
 caggagttca agggcaagge cacaactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 gagctccgca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtacaag ccccatctac 360
 tatgattacg actggtttgc ttactggggc cacgggaactc tggtcactgt ctctgcagct 420
 acaacaacag ccccatct 438

<210> 18
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 18

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Ile Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Ser Pro Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr
 115 120 125
 Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Thr Thr Thr Ala
 130 135 140

Pro Ser

145

<210> 19

<211> 438

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 19

atggaatgga gctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ttgcaggtgt ccaatcccag 60
 gttcaactgc agcagtctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggttcagt gacgctgtcc 120
 tgcaaggctt cgggctacac atttactgac tatgaaatgc actgggtgaa gcagacacct 180
 gtgcatggcc tggaatggat tggagctatt gatcctgaaa ctggtgatac tgcctacaat 240
 caggagtcca agggcaagge cacaactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 gagctccgca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtacaag ccccatctac 360
 tatgattacg actggtttgc ttactggggc cacgggaactc tggtcactgt ctctgcagct 420
 acaacaacag ccccatct 438

<210> 20

<211> 136

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 20

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asn Asn Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala
 130 135

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 21

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly
 1 5 10

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 22

Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 23

Ala Arg Ser Ile Thr Thr Val Val Ala Thr Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 24

Gln Asn Val Arg Ser Ala

1 5

<210> 25

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 25

Leu Ala Ser

1

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 26

Leu Gln His Trp Asn Ser Pro Phe Thr

1 5

<210> 27

<211> 436

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 27

atggacaggc ttacttcttc attcctgctg ctgattgtcc ctgcatatgt cttgtcccaa 60
gttactctaa aagagtctgg ccctgggata ttgaagccct cacagaccct cagtctgact 120
tggtctttct ctgggttttc actgagcact tctggatatgg gtgtaggctg gattcgtcag 180
ccttcaggga agggctctgga gtggctggca cacatttggt gggatgatga taagtactat 240
aaccatccc tgaagagcca gtcacaate tccaaggata cctccagaaa ccaggtattc 300
ctcaagatca ccagtgtgga cactgcagat actgccatt actactgtgc tcgaagtatt 360
actacggtag tagctacgcc ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 420
tcagccaaaa cgacac 436

<210> 28

<211> 145

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 28

Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys
 20 25 30
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45
 Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg
 85 90 95
 Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ile Thr Thr Val Val Ala Thr Pro Phe
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 130 135 140

Thr

145

<210> 29

<211> 405

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 29

atgggcatca agatggagtt tcagaccag gtctttgtat tcgtgttgct ctggttgtct 60
 ggtgttgatg gagacattgt gatgaccag tctcaaaaat tcatgtccac atcagtagga 120
 gacagggtca gcatcacctg caaggccagt cagaatgttc gttctgctgt agcctggat 180
 caacagaaac cagggcagtc tcctaaagca ctgatttacc tggeatccaa ccggcacact 240
 ggagtccctg atcgcttcac aggcagtgga tctgggacag atttactct caccattagc 300
 aatgtgcatt ctgaagacct gacagattat ttctgtctgc aacattggaa ttctccgttc 360
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgggctg atgct 405

<210> 30

<211> 135

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 30

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

Leu	Trp	Leu	Ser	Gly	Val	Asp	Gly	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Gln	
20				25				30								
Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Lys	
35				40				45								
Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Arg	Ser	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	
50				55				60								
Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Ala	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Arg	His	Thr	
65				70				75				80				
Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	
85				90				95								
Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val	His	Ser	Glu	Asp	Leu	Thr	Asp	Tyr	Phe	Cys	
100				105				110								
Leu	Gln	His	Trp	Asn	Ser	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	
115				120				125								
Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala										
130				135												
<210> 31																
<211> 42																
<212> PRT																
<213> 智人																
<400> 31																
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	Ile	Ala							
35				40												

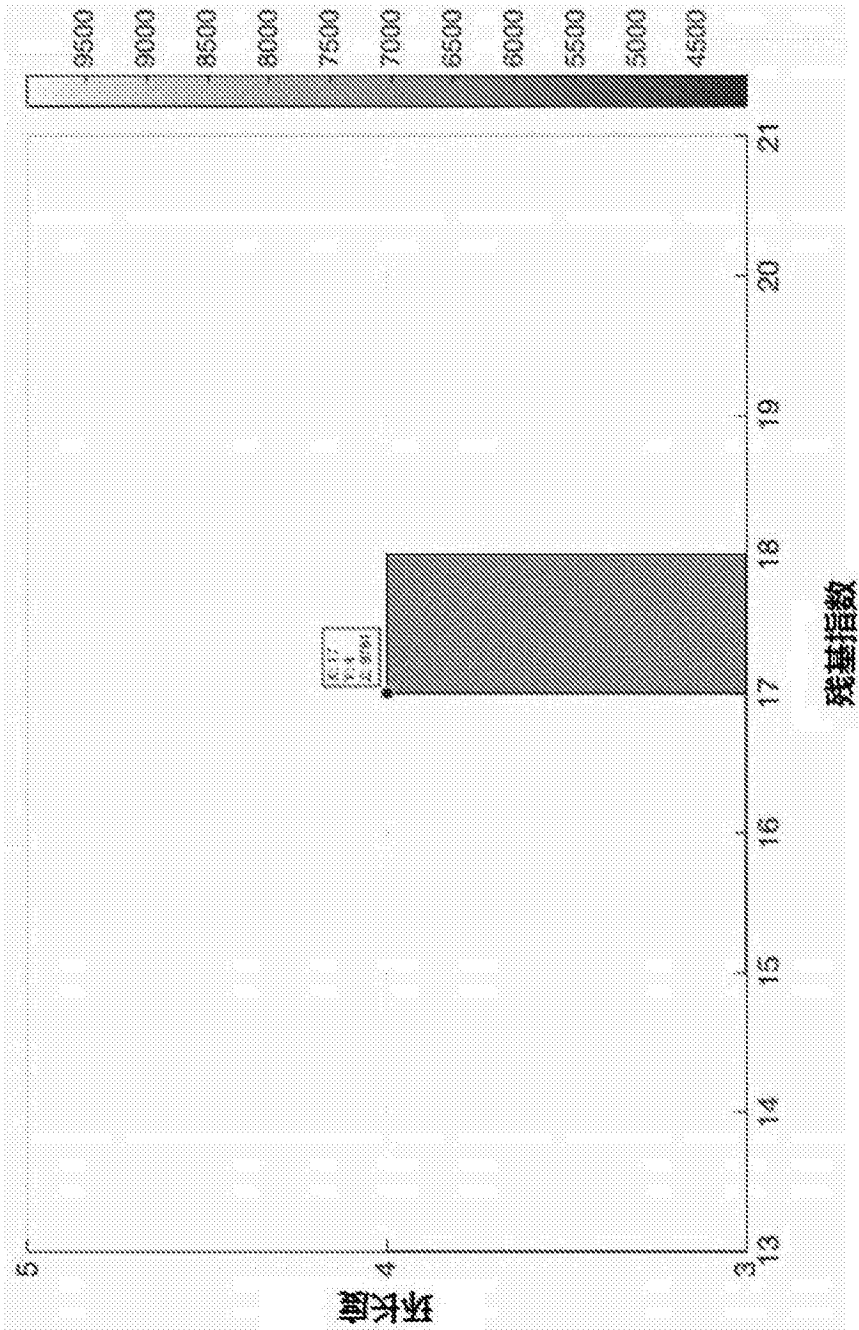


图1

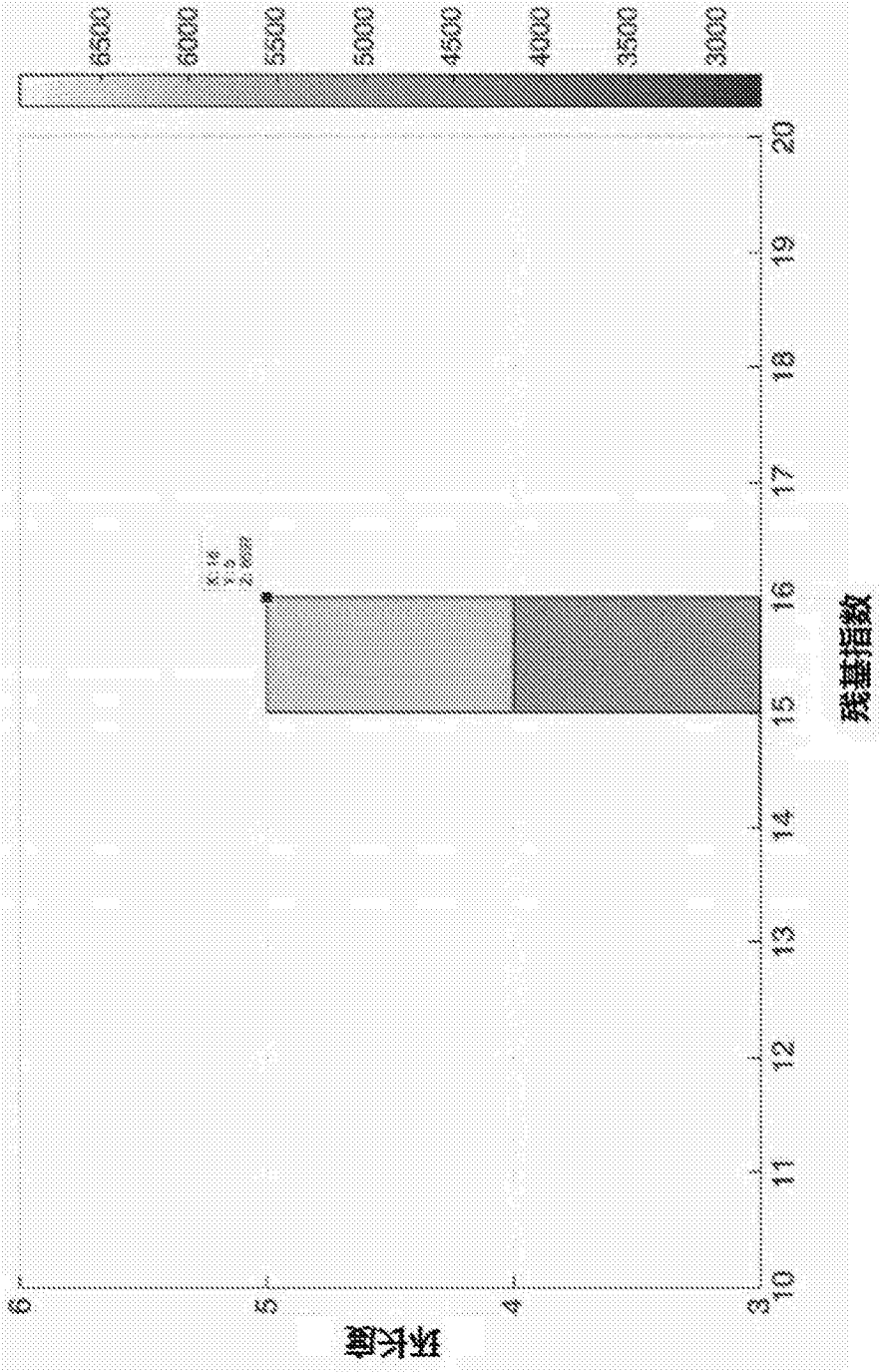


图2

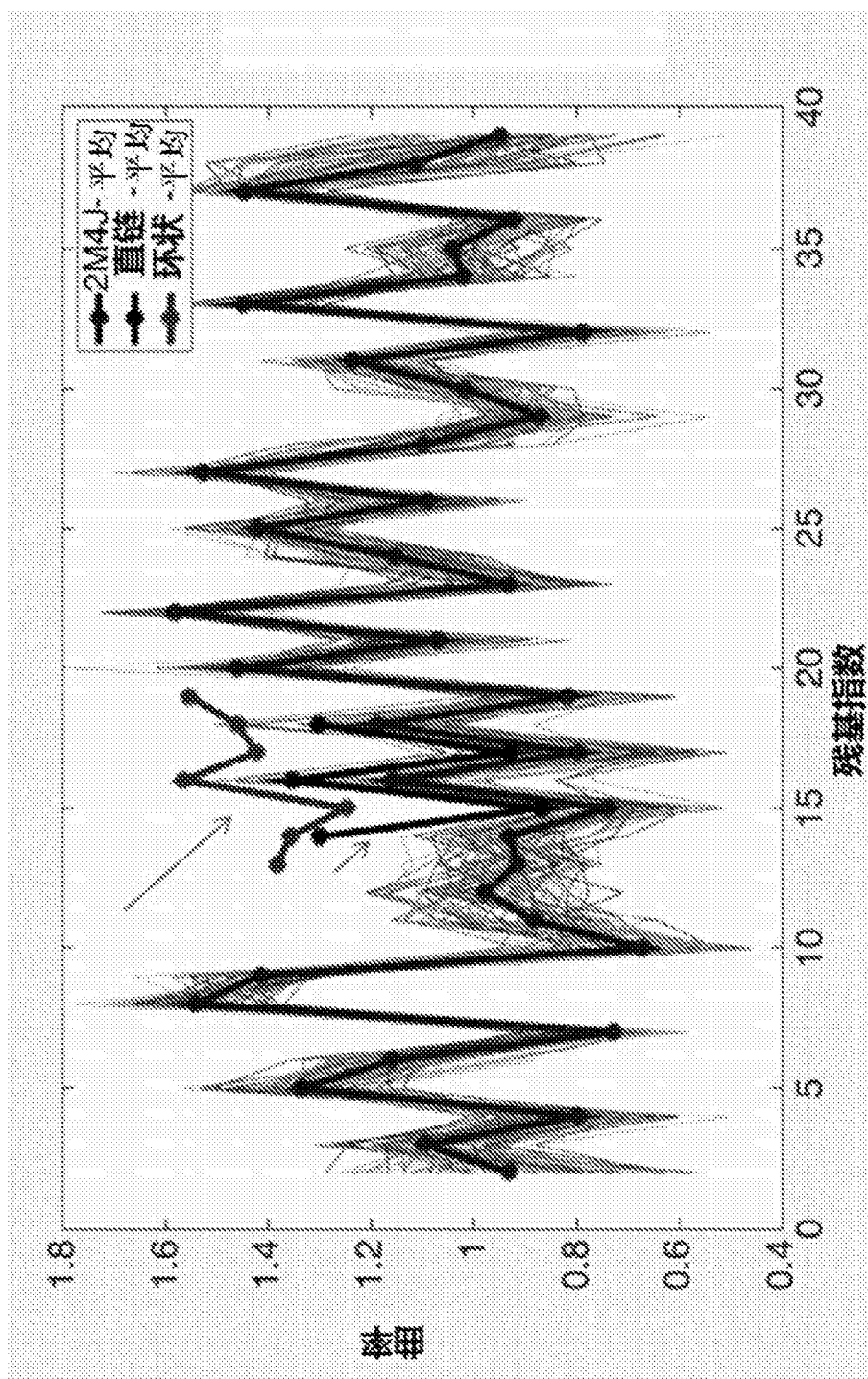


图3

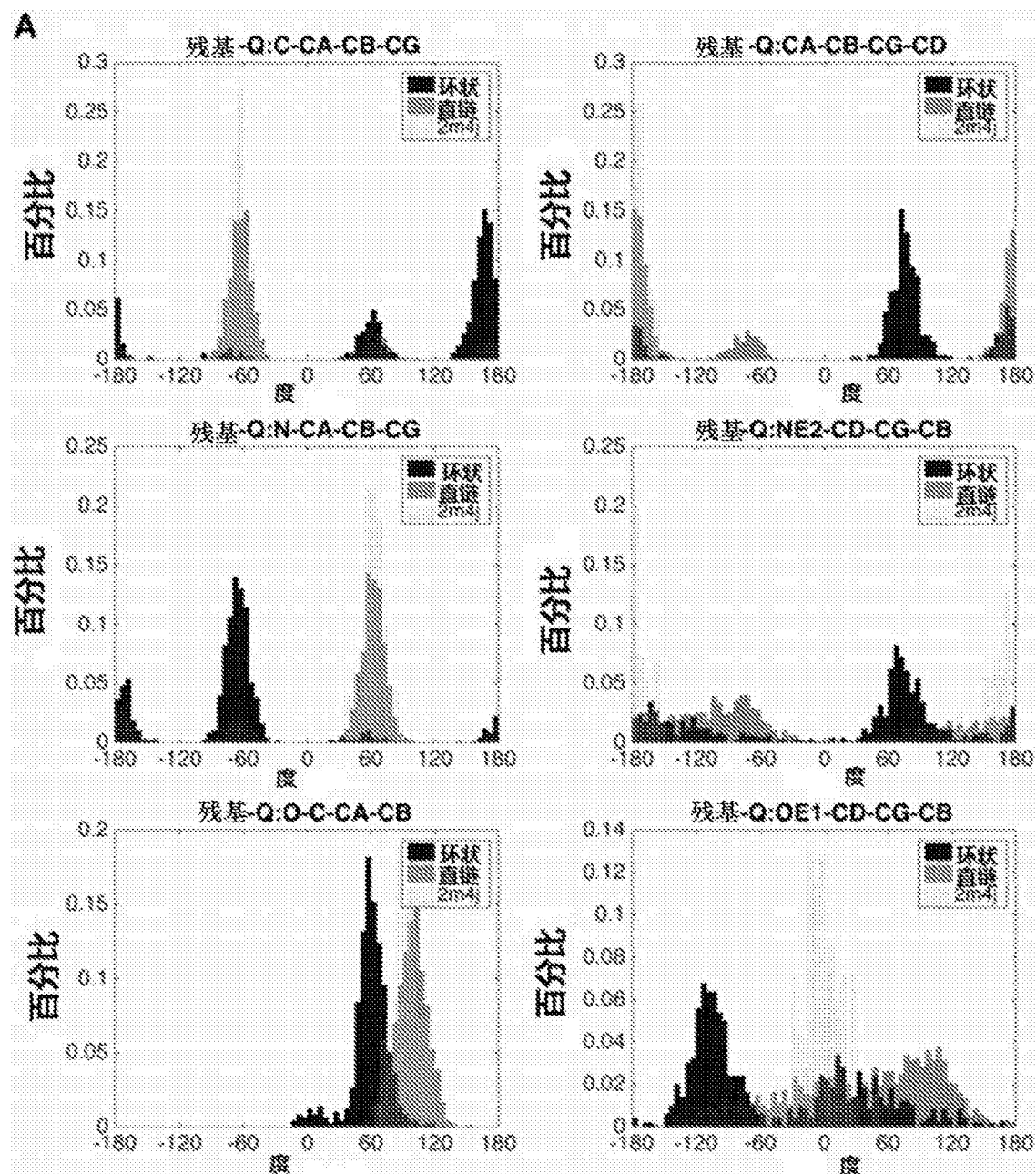


图4

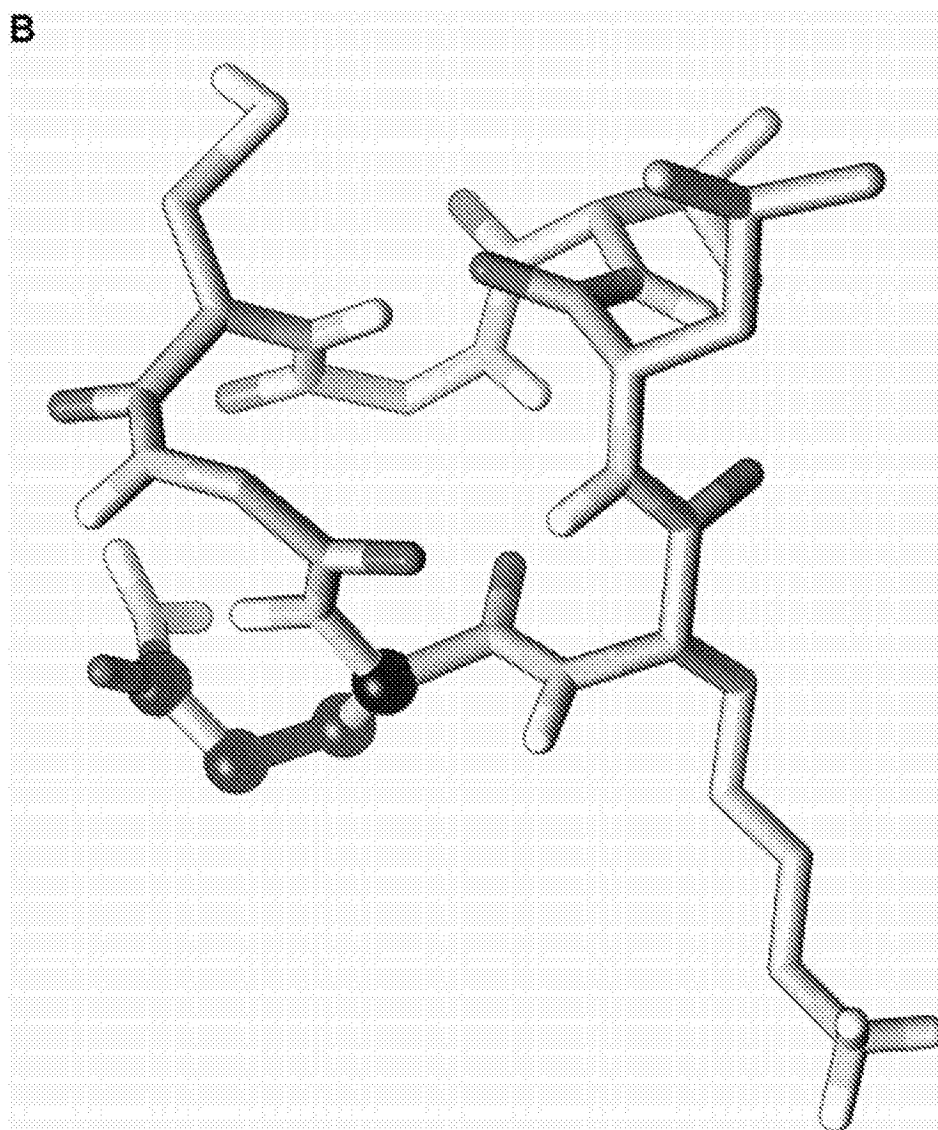


图4(续)

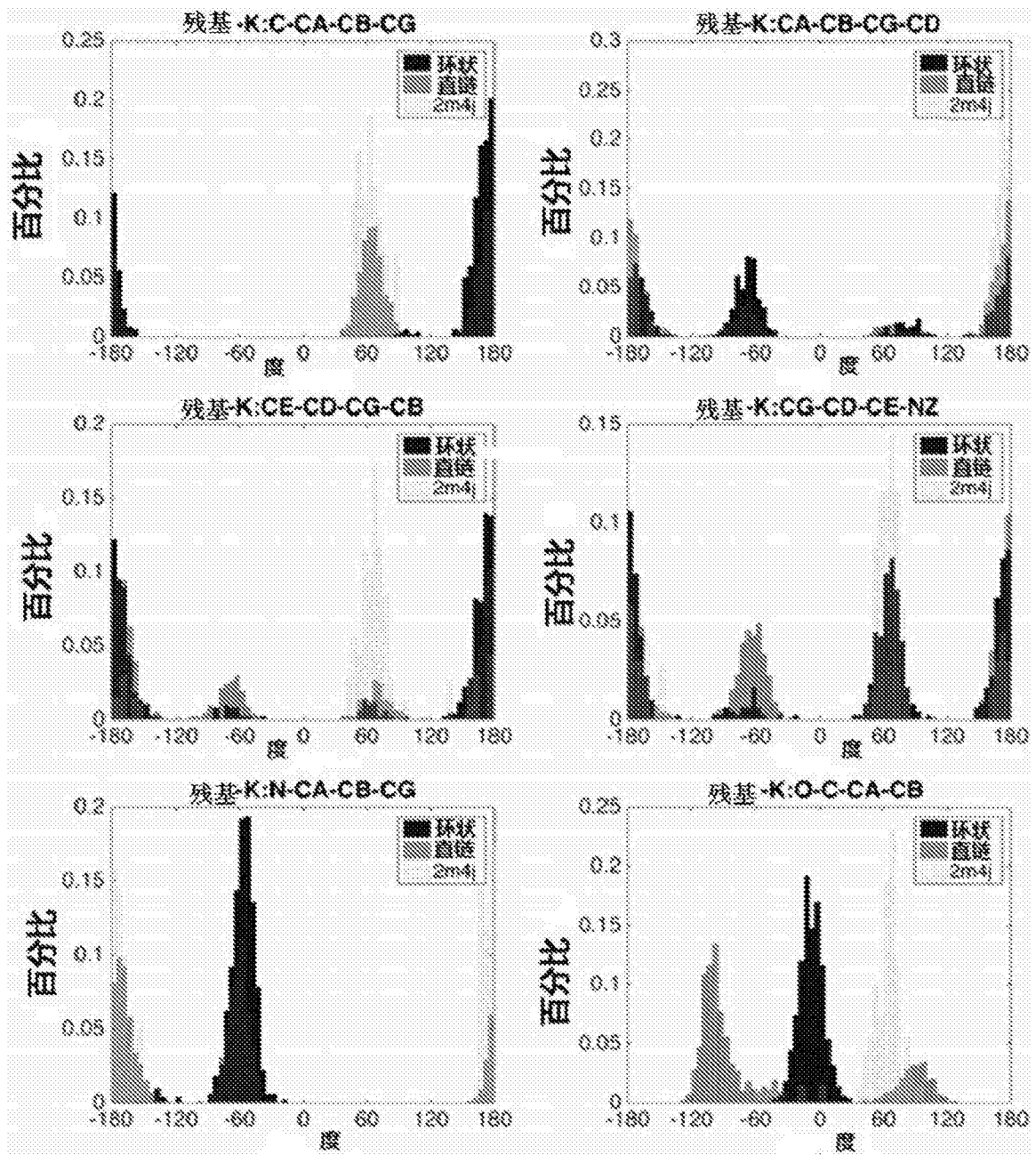


图5

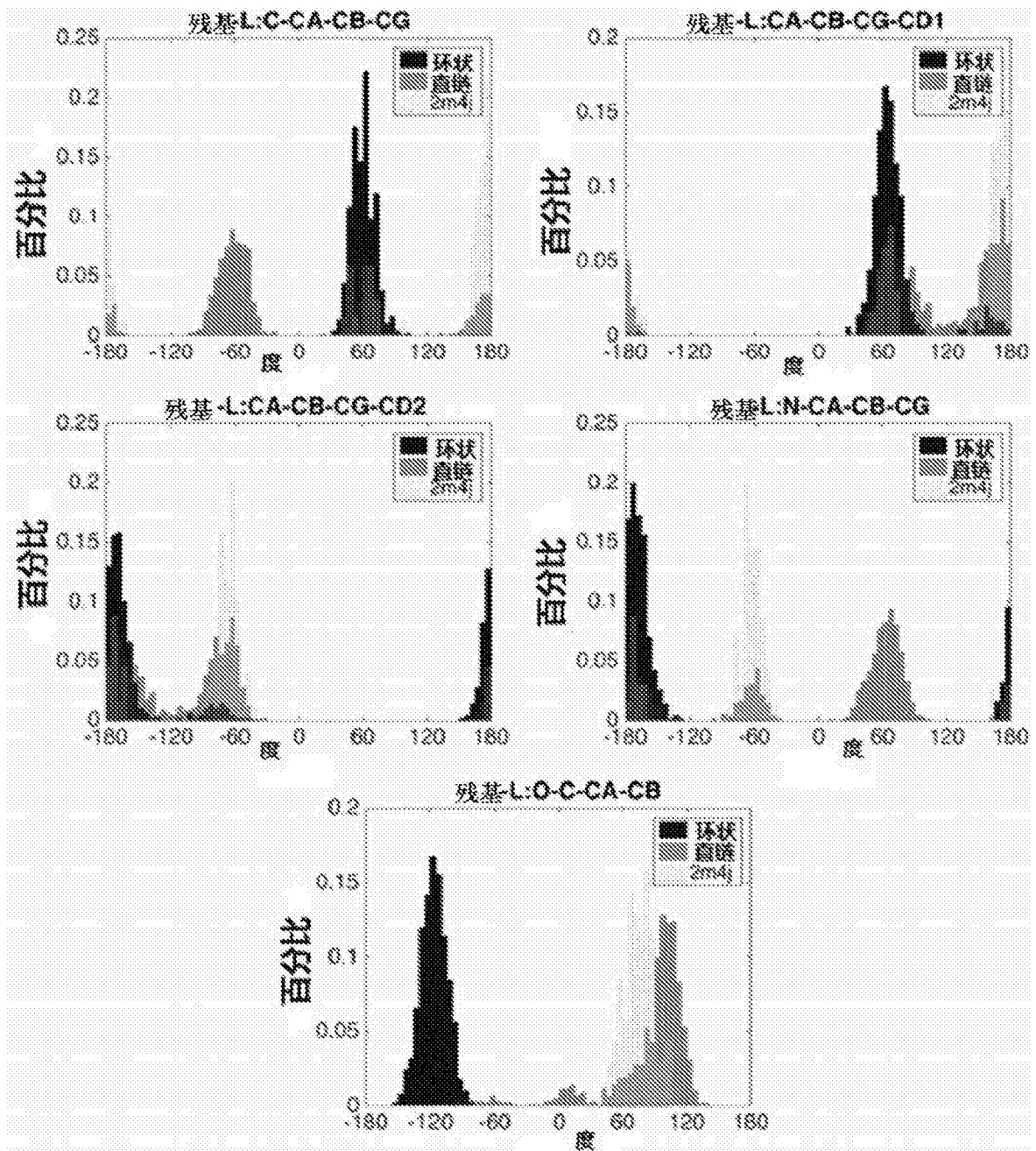


图6

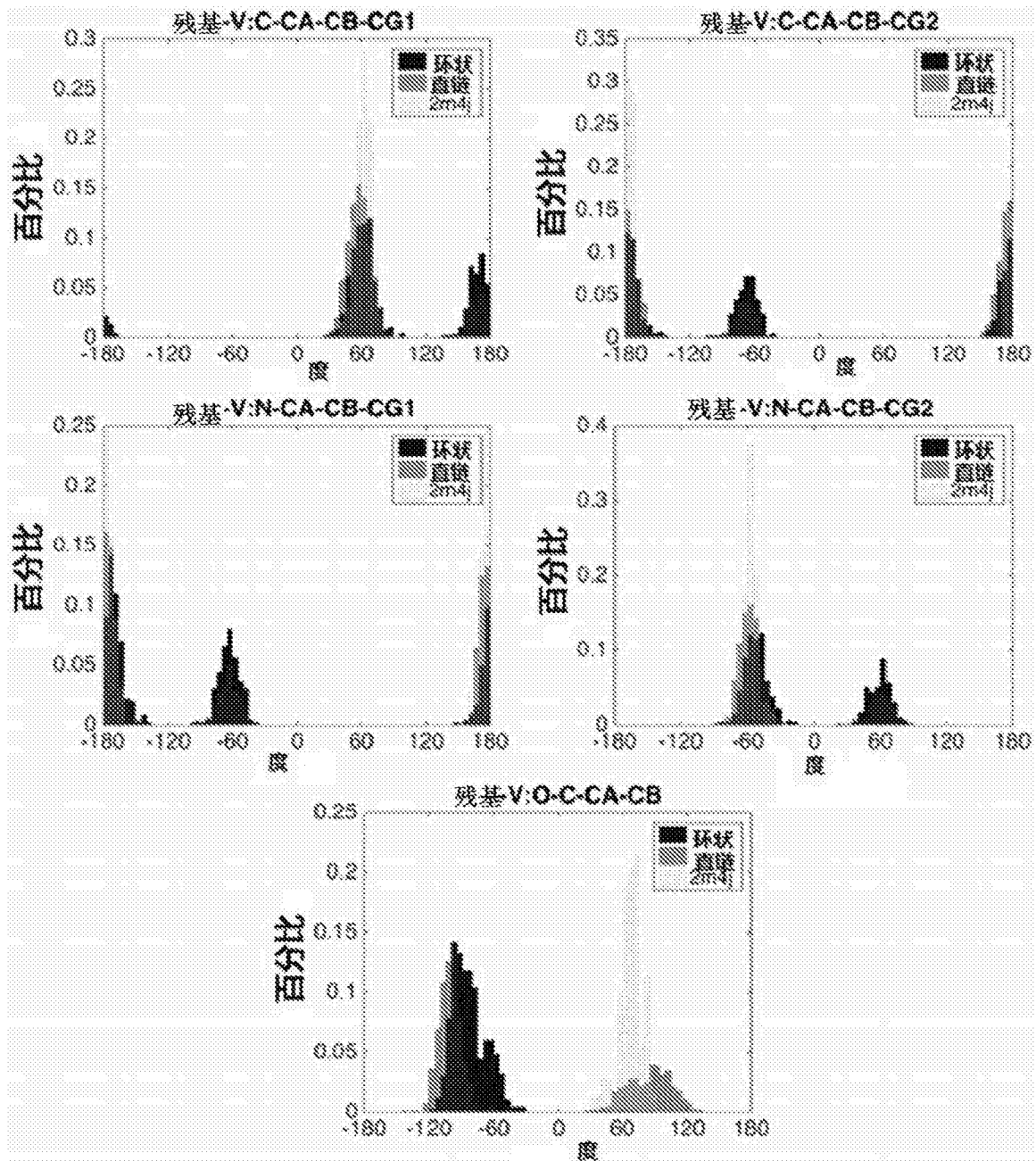


图7

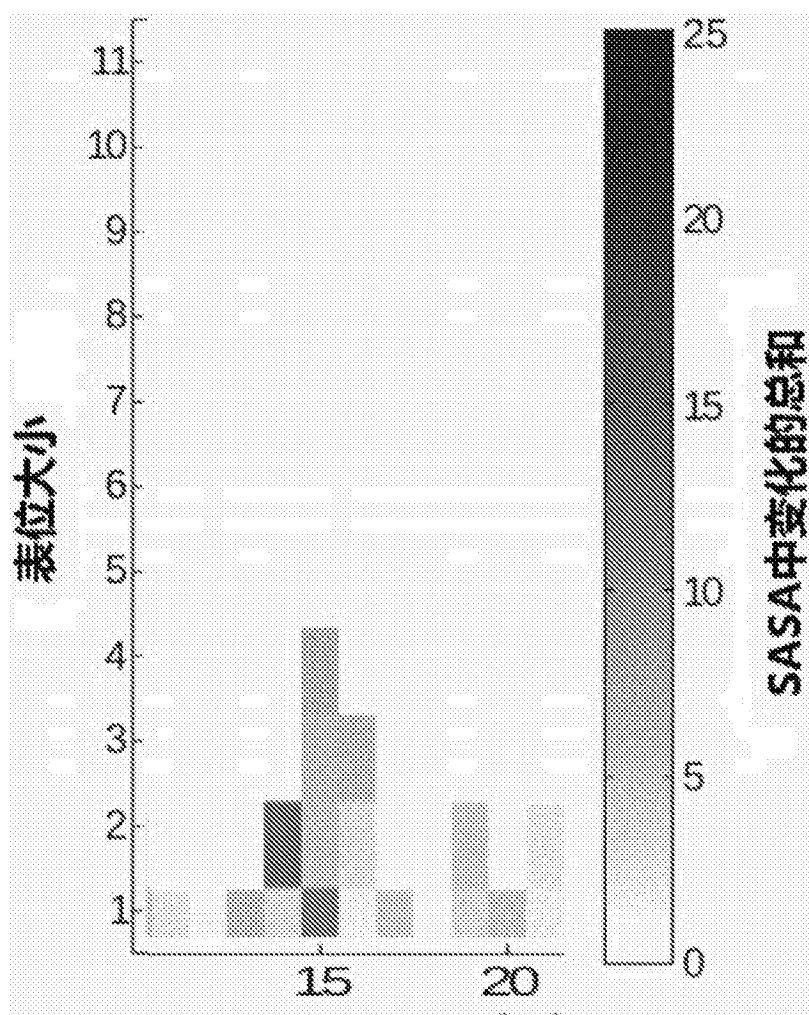


图8

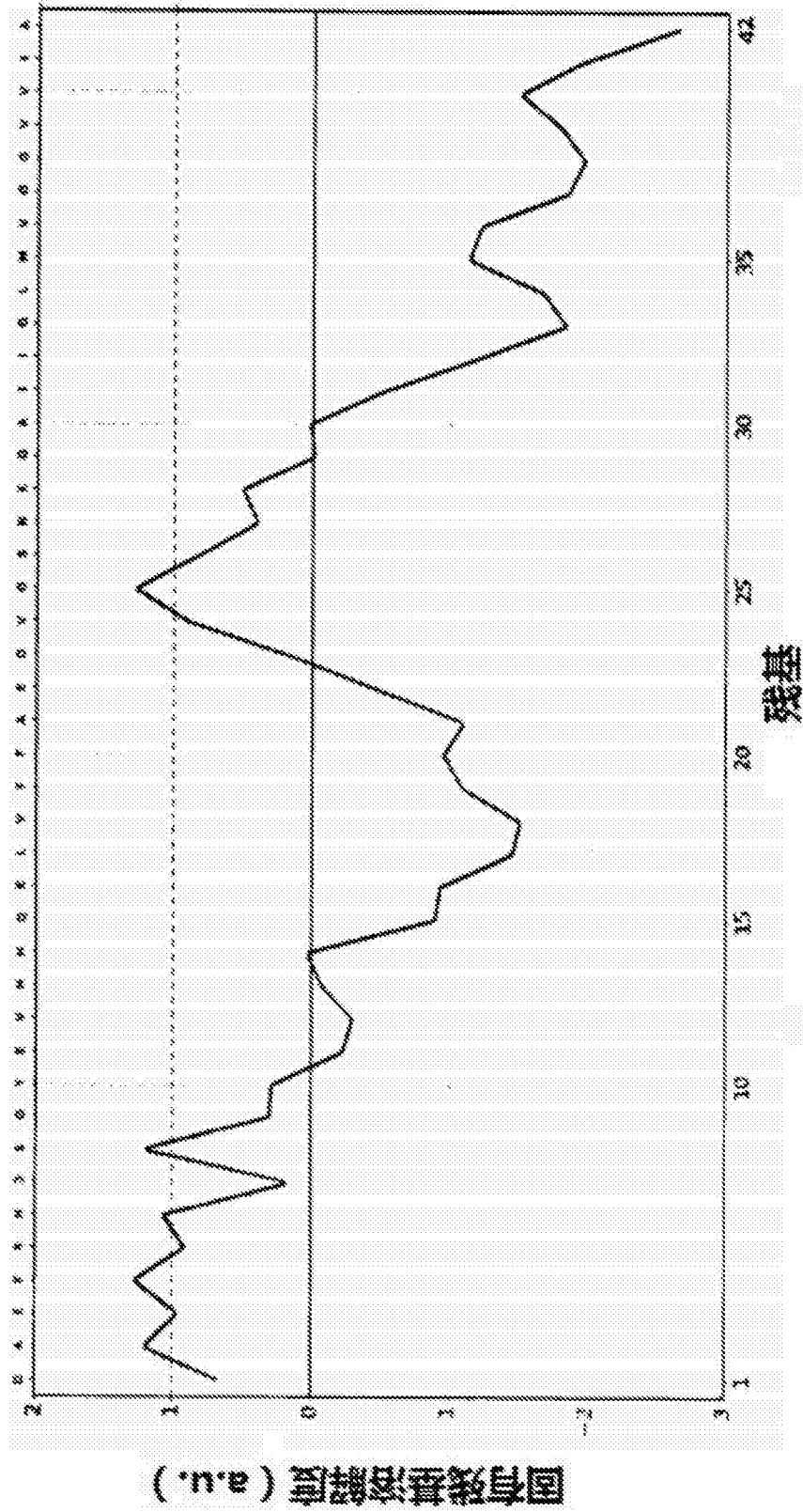


图9

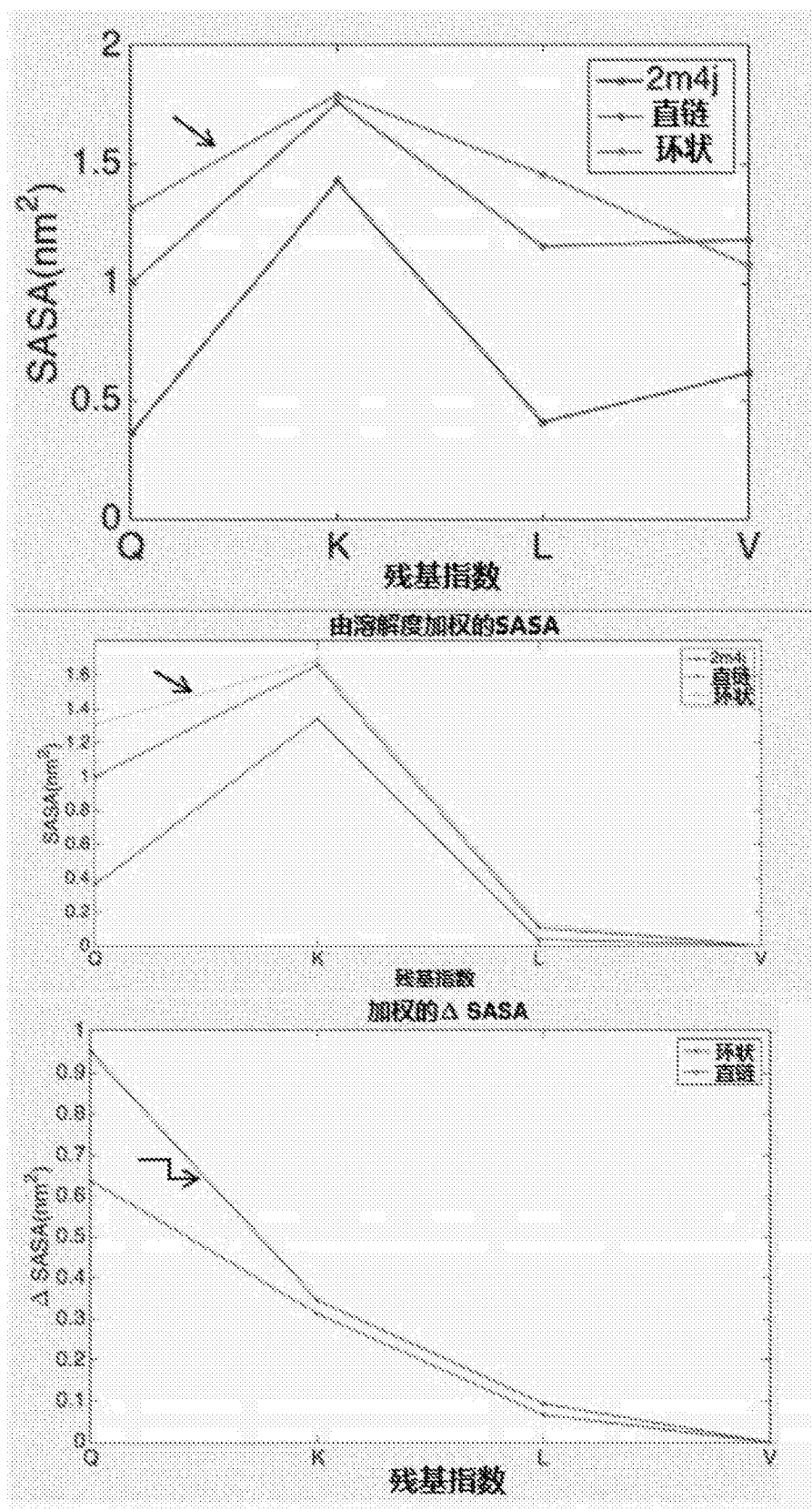


图10

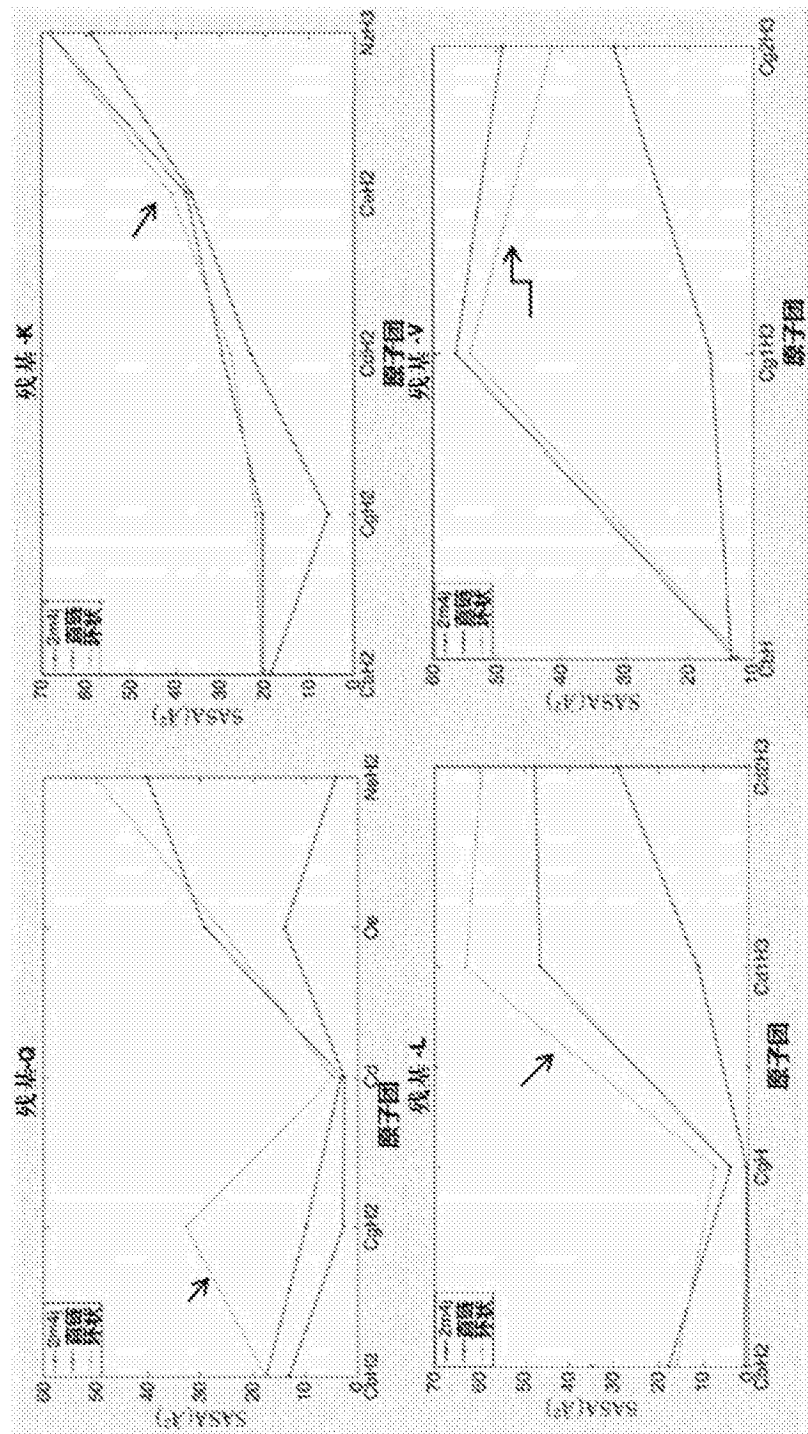


图11

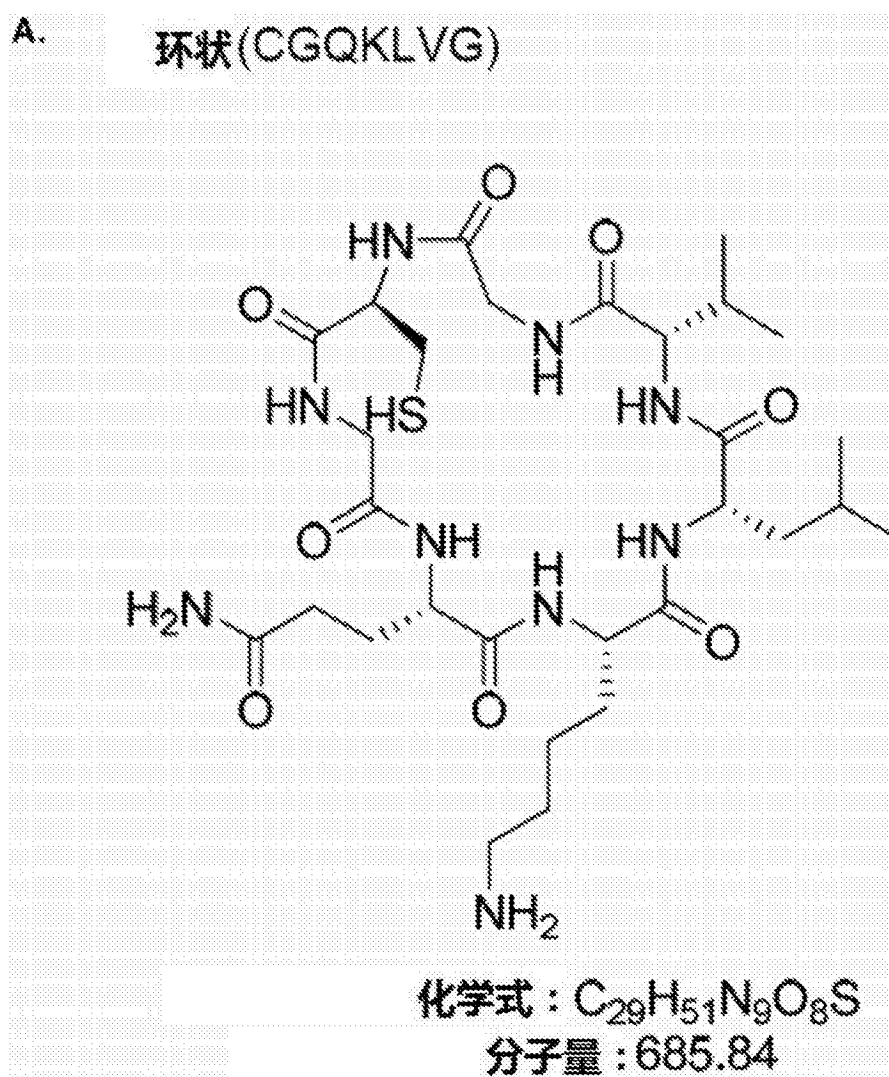
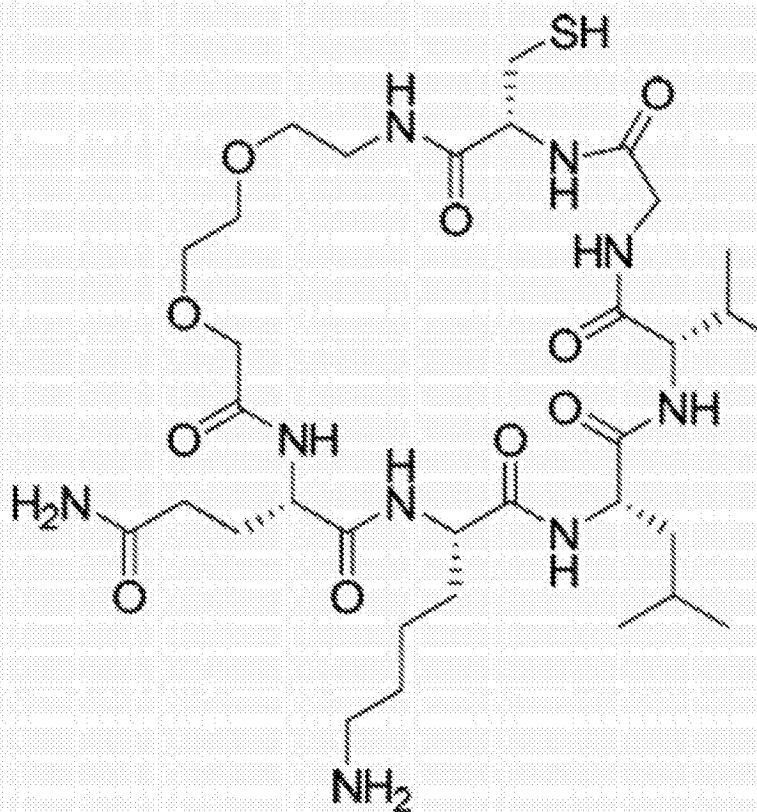


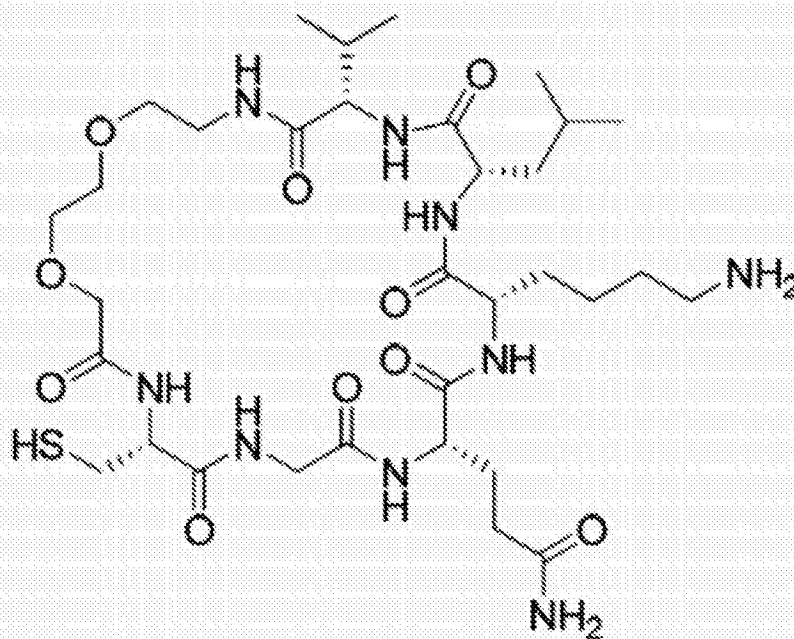
图12

B. 环状(C-PEG2-QKLVG)

化学式 : C₃₃H₅₉N₉O₁₀S
分子量 : 773.94

图12(续)

c. 环状(CGQKLV-PEG2)



化学式 : $C_{33}H_{59}N_9O_{10}S$
分子量 : 773.94

图12(续)

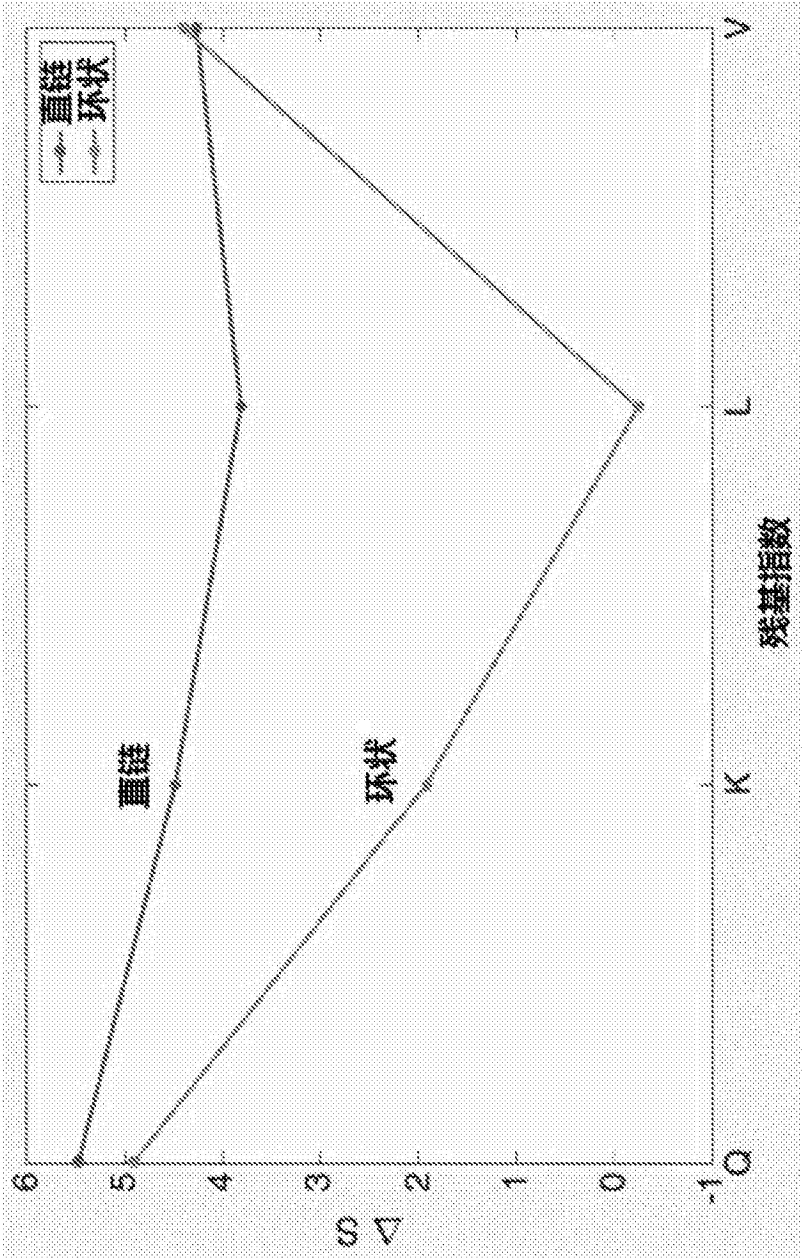


图13

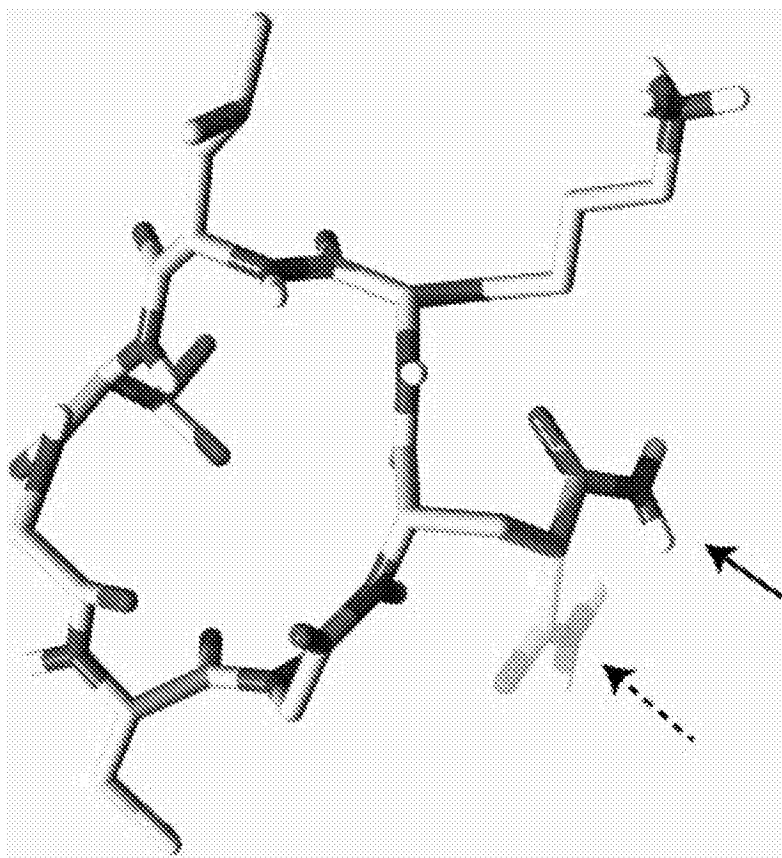


图14

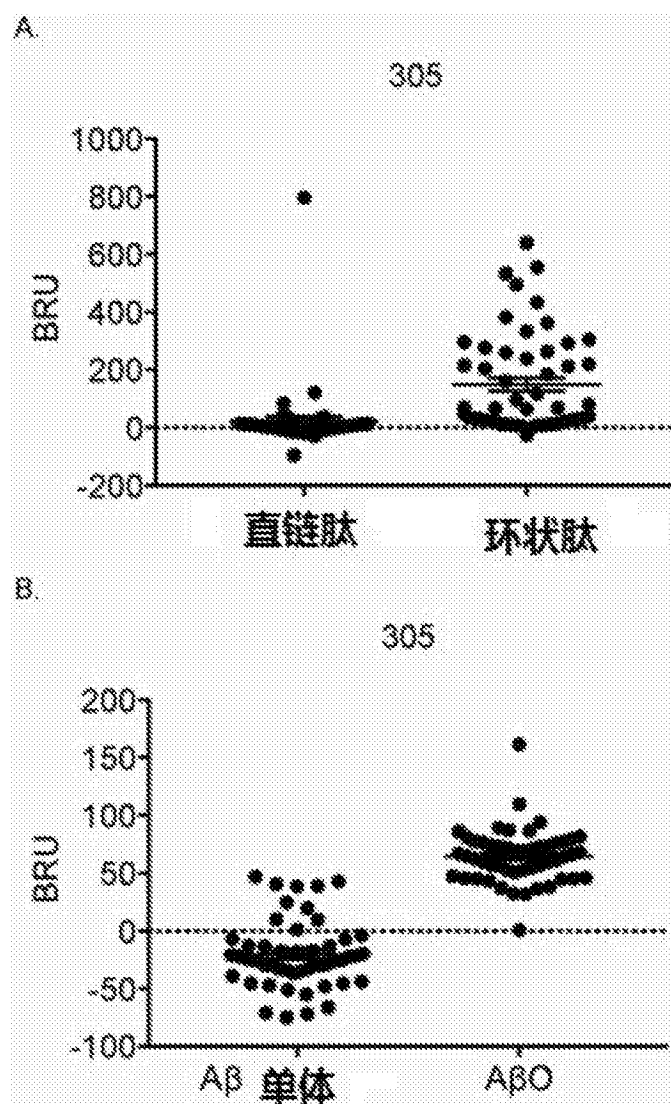


图15

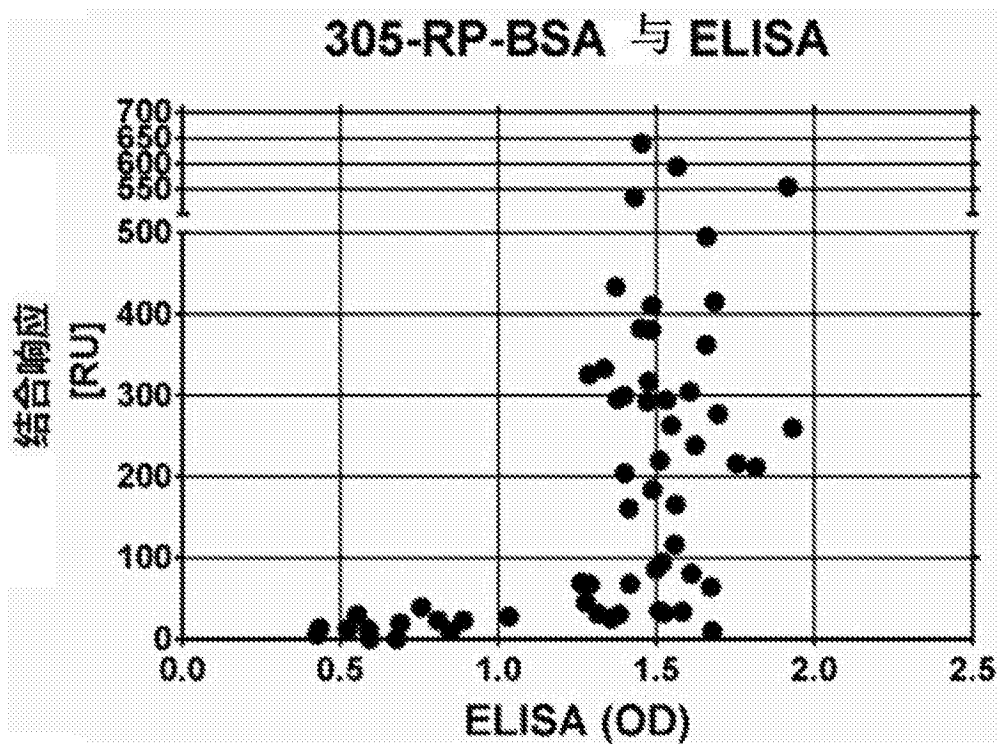


图16

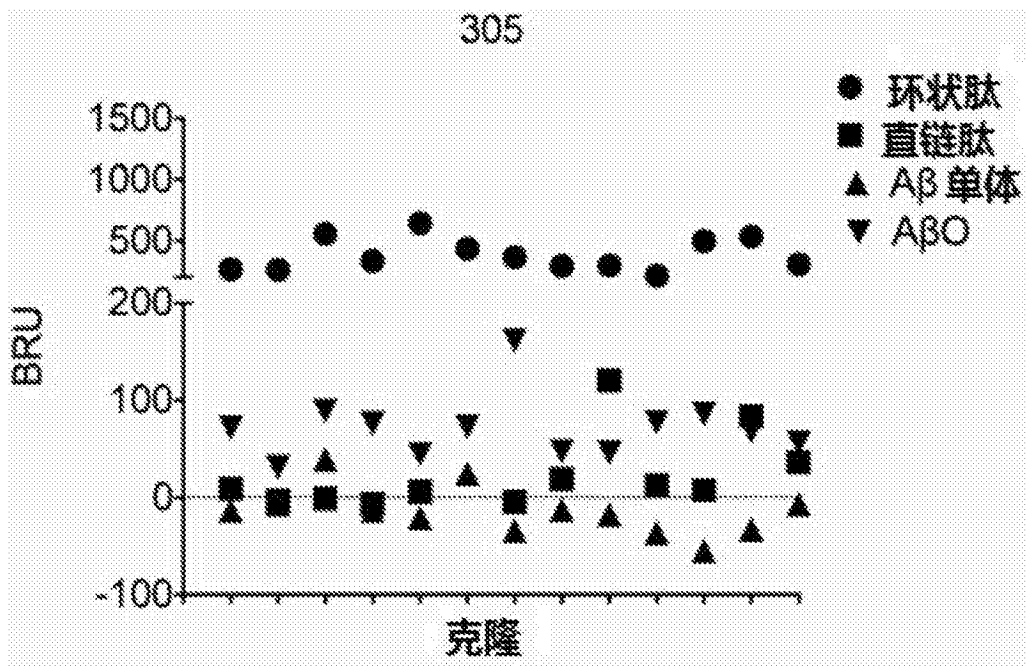


图17

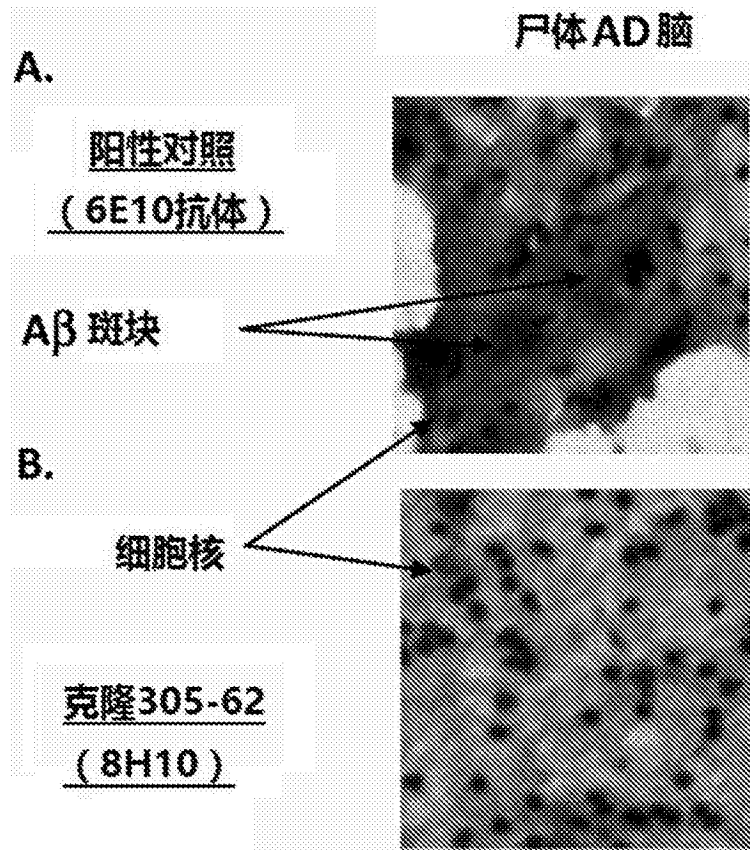


图18

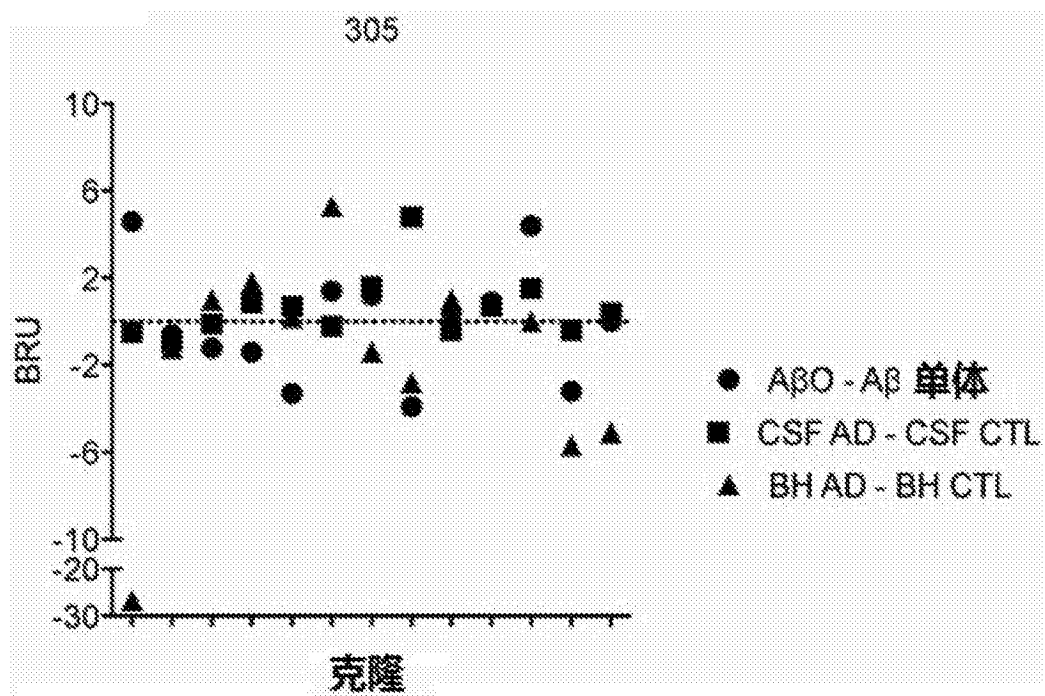


图19

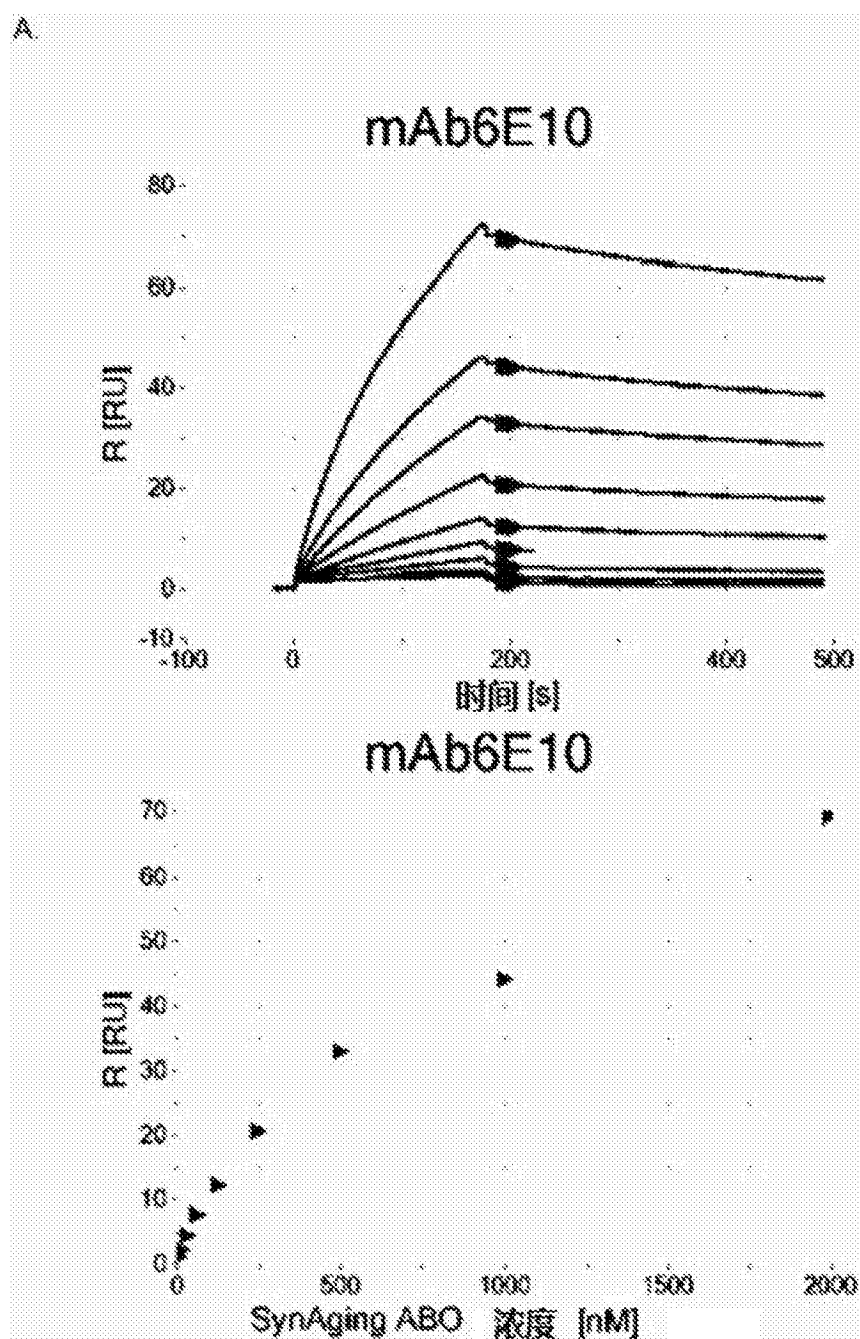


图20

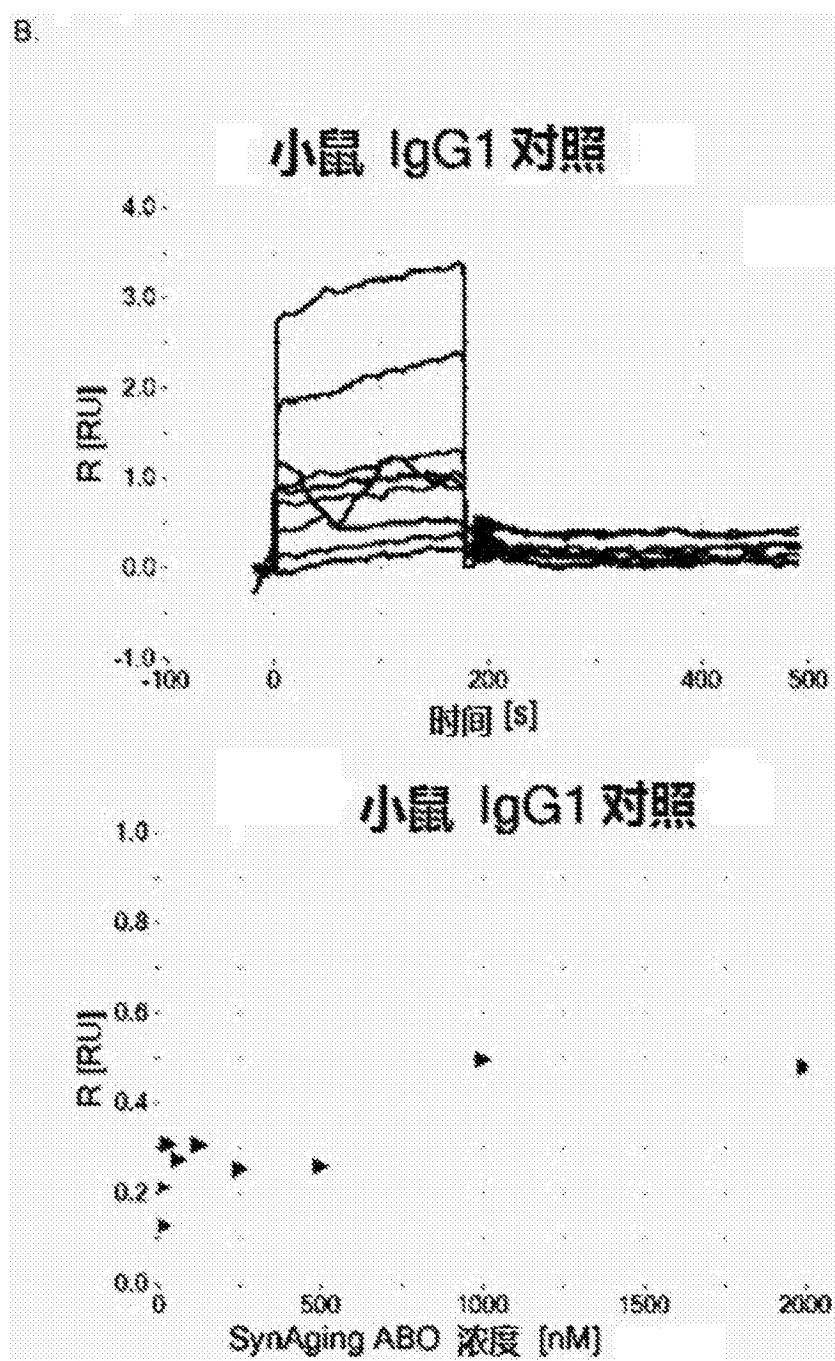


图20 (续)

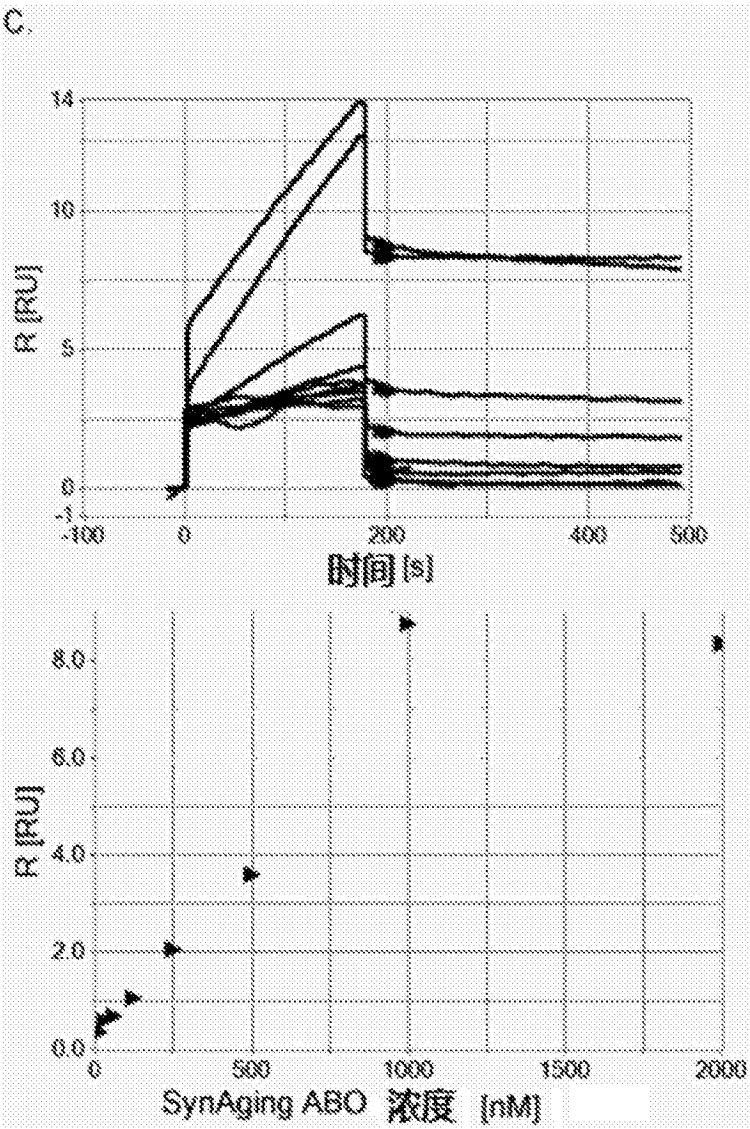


图20 (续)

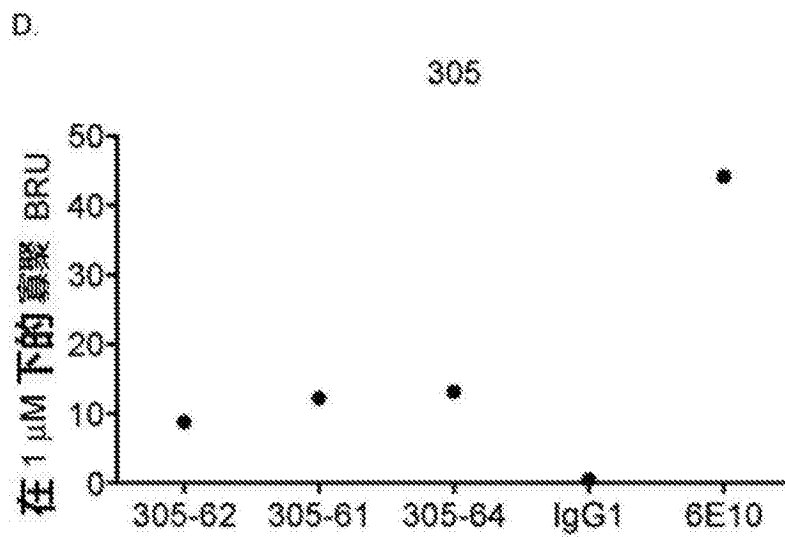


图20 (续)

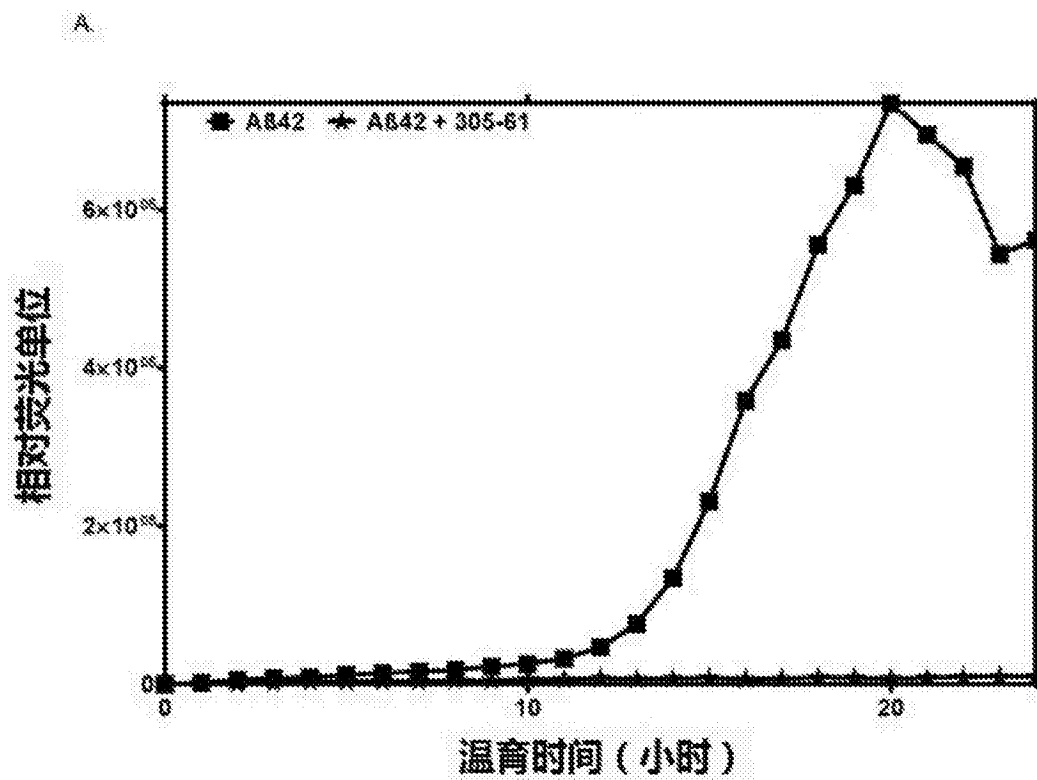


图21

B.

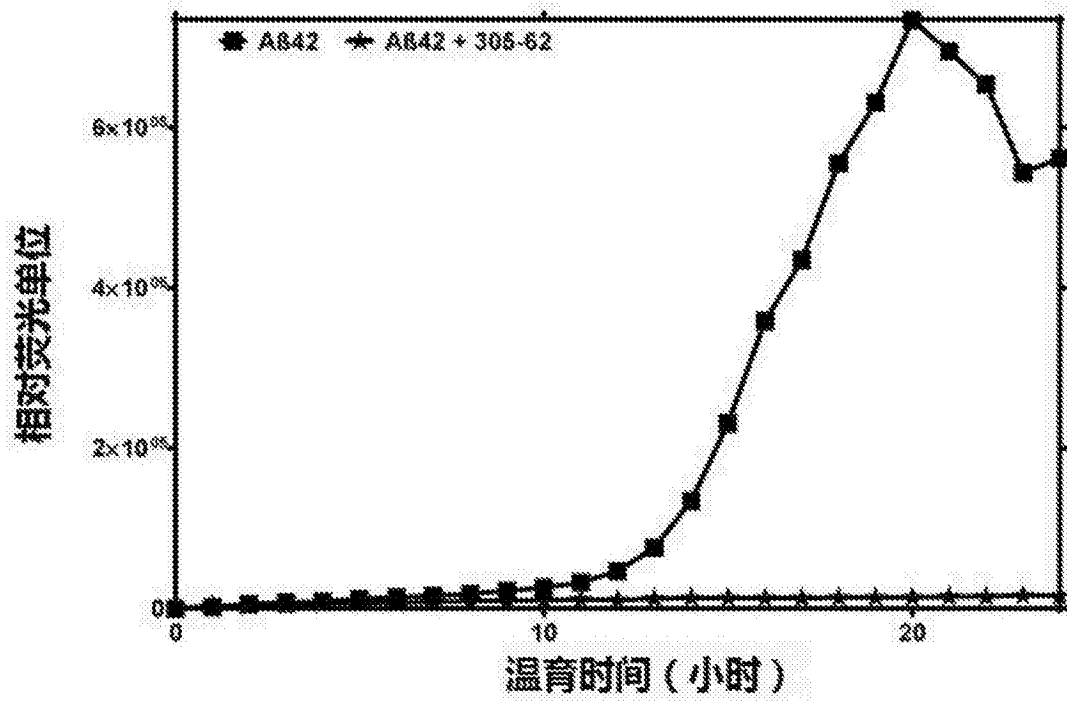


图21 (续)

C.

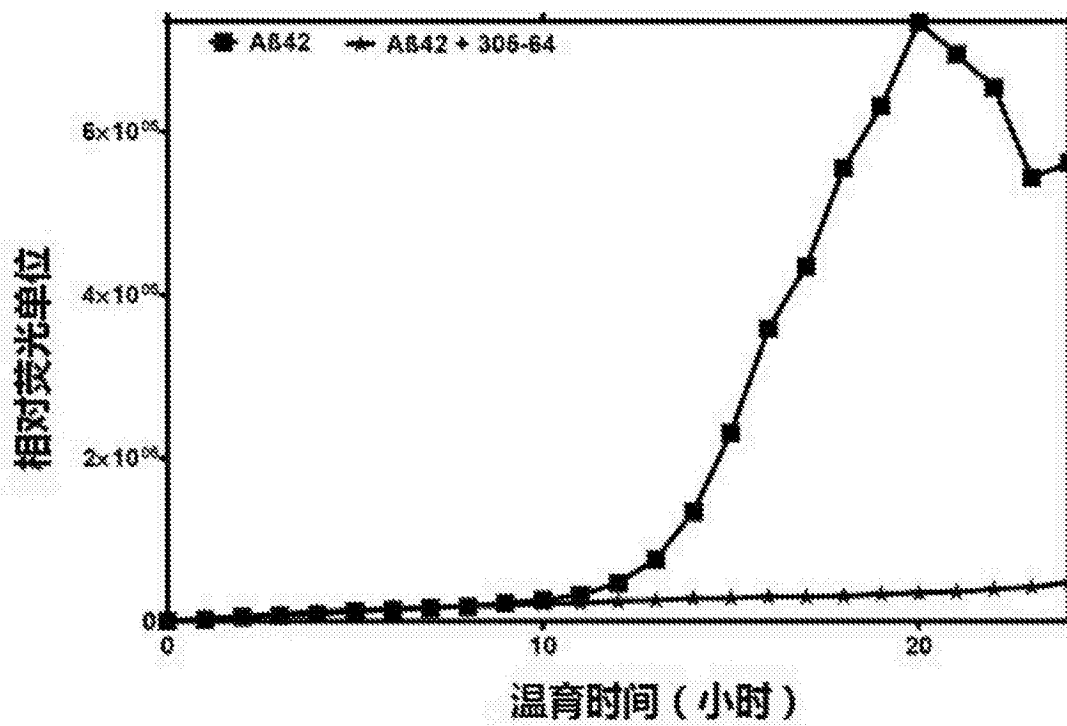


图21 (续)

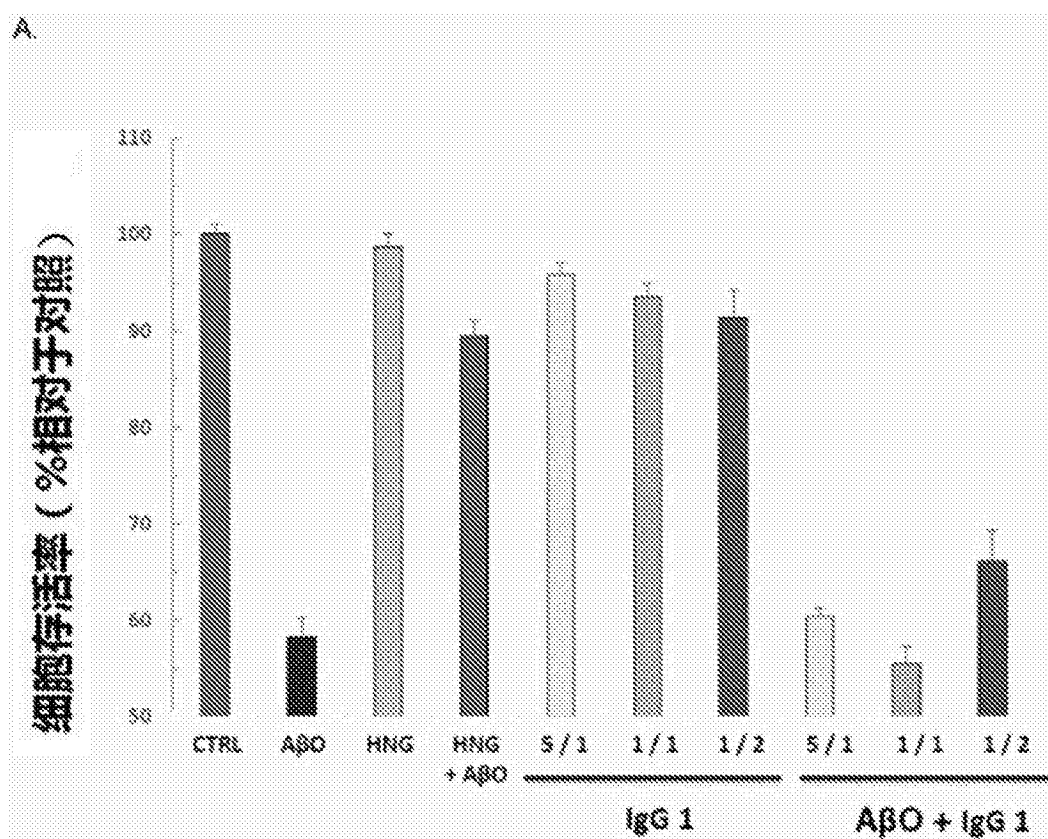


图22

B.

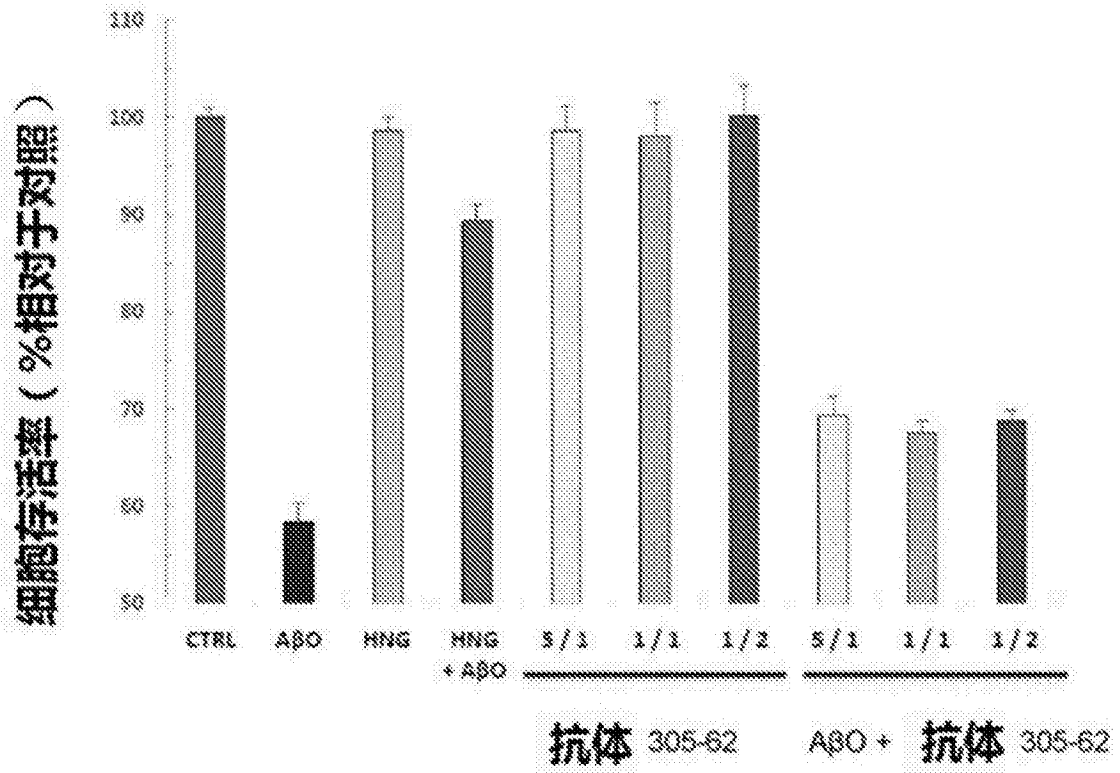


图22 (续)