



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107531796 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201680021081.0

保罗·莫雷尔

(22)申请日 2016.03.23

(74)专利代理机构 中国商标专利事务所有限公司 11234

(30)优先权数据

1505239.2 2015.03.27 GB

1600871.6 2016.01.18 GB

代理人 宋义兴 曾海艳

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.10.10

(51)Int.Cl.

C07K 16/40(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2016/050804 2016.03.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/156803 EN 2016.10.06

(71)申请人 神经生物有限公司
地址 英国牛津郡

(72)发明人 苏珊·格林菲尔德
萨拉·加西亚-瑞茨

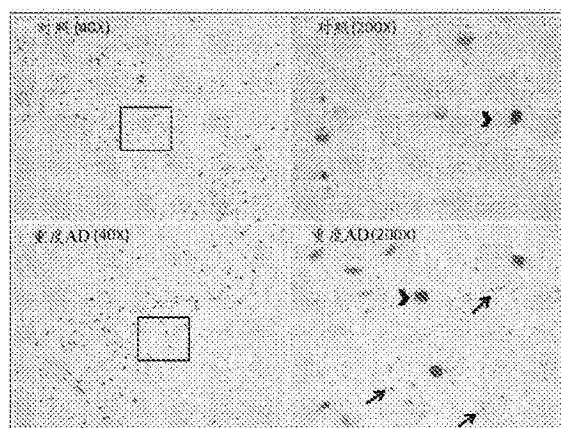
权利要求书3页 说明书26页
序列表8页 附图18页

(54)发明名称

识别AChE的T14肽的抗体

(57)摘要

本发明涉及抗体,并且特别涉及用于诊断和治疗神经退行性病症如阿尔茨海默病和帕金森病的抗体。本发明延伸到神经退行性病症的诊断和治疗方法,以及用于分离供治疗这些疾病的新型治疗性化合物的测定和筛选。



1. 一种抗体或其抗原结合片段,其特异性结合SEQ ID No:3或其变体或片段。
2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其不结合SEQ ID No:2。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其不结合SEQ ID No:4。
4. 根据任何前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其不结合SEQ ID No:8。
5. 根据任何前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其为多克隆抗体或其抗原结合片段。
6. 根据任何前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其在兔子、小鼠或大鼠中,优选地兔子中产生。
7. 根据任何前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其为单克隆抗体或其抗原结合片段。
8. 根据任何前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述其抗原结合片段具SEQ ID No:3特异性或对SEQ ID No:3内的表位具免疫特异性。
9. 根据任何前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合于SEQ ID No:3的C端中的一个或多个氨基酸。
10. 根据任何前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合于SEQ ID No.5中的一个或多个氨基酸。
11. 根据任何前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合于所述表位中的C端赖氨酸(K)残基。
12. 根据任何前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合于SEQ ID No.6中的一个或多个氨基酸。
13. 根据任何前述权利要求所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合于SEQ ID No.6。
14. 一种抗体或其抗原结合片段,其通过包括以下的方法获得:
 - (i) 用SEQ ID No:3或SEQ ID No:7或其变体或片段使宿主生物体免疫;和
 - (ii) 从所述宿主收集所述抗体或其抗原结合片段。
15. 根据权利要求14所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述宿主是哺乳动物。
16. 根据权利要求14或权利要求15所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述变体或片段包含SEQ ID No:6或由SEQ ID No:6组成。
17. 根据权利要求14至16中的任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述方法包括对所述宿主动物放血,然后从血清中收集所述抗体或其抗原结合片段。
18. 根据权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中使所述血清通过具有共价结合的肽-支撑物的重力柱。
19. 一种SEQ ID No:3或SEQ ID No:7,或其变体或片段,其用作抗原。
20. 根据权利要求19所述使用的SEQ ID No:3或SEQ ID No:7或其变体或片段,其中所述抗原用作抗体结合的表位。
21. 根据权利要求19或权利要求20所述使用的SEQ ID No:3或SEQ ID No:7或其变体或片段,其中所述变体或片段包含SEQ ID No:6或由SEQ ID No:6组成。
22. 一种抗体-药物结合物(ADC),其包含根据权利要求1至18中的任一项所述的抗体或其抗原结合片段,和细胞毒性部分。

23. 根据权利要求1至18中的任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或根据权利要求21所述的抗体-药物结合物,其各自任选地衍生化,用于治疗或诊断。

24. 根据权利要求1至18中的任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或根据权利要求21所述的抗体-药物结合物,其各自任选地衍生化,用于治疗、预防或改善神经退行性病症。

25. 根据权利要求24所述使用的抗体或其抗原结合片段,其中所述神经退行性病症选自:阿尔茨海默病;帕金森病;亨廷顿氏病;运动神经元疾病;脊髓小脑1型、2型和3型;肌萎缩性侧索硬化(ALS);和额颞叶痴呆。

26. 根据权利要求24或25所述使用的抗体或其抗原结合片段,其中所述神经退行性病症是阿尔茨海默病。

27. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至18中的任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或根据权利要求21所述的抗体-药物结合物,其各自任选地衍生化;和任选地药学上可接受的载体。

28. 一种用于制造根据权利要求27所述的药物组合物的方法,所述方法包括将治疗有效量的各自任选地衍生化的根据权利要求1至18中的任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求21所述的抗体-药物结合物与药学上可接受的载体组合。

29. 根据权利要求27所述的组合物或根据权利要求28所述的方法,其中所述组合物是神经退行性病症治疗组合物。

30. 一种SEQ ID No:3或其变体或片段,其用作用于检测或诊断神经退行性病症的生物标志物。

31. 根据权利要求30所述的SEQ ID No:3或其变体或片段,其中用作生物标志物的所述SEQ ID No:3的变体或片段包含SEQ ID No:6或由SEQ ID No:6组成。

32. 一种用于诊断患有神经退行性病症或其倾向的受试者或用于提供所述受试者病状的预后的试剂盒,所述试剂盒包括用于检测来自测试受试者的样品中存在的抗原浓度的检测装置,其中所述检测装置包含任选地衍生化的根据权利要求1至18中的任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述样品中抗原的存在表明所述受试者患有神经退行性病症。

33. 一种用于诊断患有神经退行性病症或其倾向的受试者或用于提供所述受试者病状的预后的方法,所述方法包括检测从受试者获得的样品中存在的抗原浓度,其中使用任选地衍生化的根据权利要求1至18中的任一项所述的抗体或其抗原结合片段实现所述检测,并且其中所述样品中抗原的存在表明所述受试者患有神经退行性病症。

34. 根据权利要求32所述的试剂盒或根据权利要求33所述的方法,其中所述样品包括脑脊髓液(CSF)。

35. 根据权利要求32所述的试剂盒或根据权利要求33所述的方法,其中所述样品包括血液、尿液或组织。

36. 根据权利要求35所述的试剂盒或方法,其中所述样品包括血液。

37. 根据权利要求30或权利要求31所述使用的SEQ ID No:3或其变体或片段,或根据权利要求32至36中的任一项所述的试剂盒或方法,其中所述神经退行性病症选自:阿尔茨海默病;帕金森病;亨廷顿氏病;运动神经元疾病;脊髓小脑1型、2型和3型;肌萎缩性侧索硬化(ALS);和额颞叶痴呆,并且优选是阿尔茨海默病。

38. 一种根据权利要求1至18中的任一项所述的抗体或其抗原结合片段的用途,其在药

物发现筛选中鉴定用于治疗、预防或改善神经退行性病症的治疗性化合物。

39. 一种比色或荧光标记的T14肽 (SEQ ID No:3) 的离体用途,其用于鉴定抑制T14肽 (SEQ ID No:3) 合成或活性的药剂。

40. 一种鉴定用于治疗、预防或改善神经退行性病症的候选药剂的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 在体外或离体使细胞与测试剂在根据权利要求1至18中的任一项所述的抗体或其抗原结合片段的存在下接触;和

(ii) 使用所述抗体或其抗原结合片段来检测T14肽 (SEQ ID No:3) 的存在、浓度或活性,其中不存在T14肽或者T14肽合成、浓度或活性与对照相比降低指示所述药剂是用于治疗、预防或改善以不适当的补体激活为特征的疾病的候选物。

41. 一种用于鉴定抑制T14肽 (SEQ ID No:3) 合成或活性的药剂的测定法,所述测定法包括:

(i) 基于细胞的表达系统;

(ii) 根据权利要求1至18中的任一项所述的抗体或其抗原结合片段;和

(iii) 被配置以允许至少一种测试剂与所述表达系统接触的容器。

42. 一种用于鉴定调节T14肽 (SEQ ID No:3) 合成或活性的药剂的方法,所述方法包括:

(i) 在体外或离体使细胞与测试剂在根据权利要求1至18中的任一项所述的抗体或其抗原结合片段的存在下接触;和

(ii) 使用所述抗体或其抗原结合片段来检测T14肽 (SEQ ID No:3) 的存在、浓度或活性,其中T14合成、浓度或活性与对照相比的改变指示所述测试剂调节T14肽 (SEQ ID No:3) 合成或活性。

识别AChE的T14肽的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体,并且特别涉及用于诊断和治疗神经退行性病症如阿尔茨海默病和帕金森病的抗体。本发明延伸到神经退行性病症的诊断和治疗方法,以及用于分离供治疗这些疾病的新型治疗性化合物的测定和筛选。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病主要影响65岁以上的男性和女性,并且被诊断患有该疾病的可能性随着年龄增长而大幅增加。由于未来40年全球65岁以上成年人的百分比预期会增长,阿尔茨海默病的发病率预期将增加一倍以上,从2010年的2100万例逐步升至2050年的5300万(统计资料来自www.alzheimersresearchuk.org和www.alz.org)。阿尔茨海默病患者的预期数量的这种指数级增长,不仅代表了未满足的医疗需求的主要领域,而且为治疗和诊断提供了重要的市场机会,因为目前尚无完全有效的治疗所述疾病的方法。

[0003] 在过去10年中,尚未有专门针对阿尔茨海默病的新药物,也没有更普遍针对神经退行性疾病的新药物。原因在于,迄今为止尚未确定可因此用药物靶向的基本的潜在脑机制。负责神经退行过程的主要竞争者是‘淀粉样蛋白假说’,其中神经元死亡归因于淀粉样蛋白的毒性沉积物对细胞膜的破坏,这是尸检的阿尔茨海默病脑的特征,并由淀粉样蛋白前体蛋白的异常切割引起。然而,这种‘淀粉样蛋白假说’并没有解释阿尔茨海默病和帕金森病所经常观察到的共同病变,没有解释尽管淀粉样蛋白在所有脑细胞中潜在普遍存在但易于退化的细胞具有特征选择性,没有解释在动物痴呆模型中不存在淀粉样蛋白沉积物,也没有解释实际上在认知缺陷不明显的某些脑区域中存在淀粉样蛋白。尽管在过去二十年中流行以淀粉样蛋白形成作为药物靶标,但是基于这种理论的治疗尚未证实有效。更大的可能性是,一旦神经退行性过程正在进行,则淀粉样蛋白将另外作为较小特异性的次要的加剧效应而产生。

[0004] 鉴定神经退行性疾病的主要机制的一个线索可能是只有各种神经元组主要易受攻击。此外,易患阿尔茨海默病、帕金森病和运动神经元疾病的各种细胞亚组仍彼此相邻,并形成从脑干延伸到前脑的连续‘中枢’,所有这些细胞亚组都向上和向外向较高的脑中心发出弥散性投射。因此,尽管它们在递质中具有异质性,但是这些神经元组被统称为译制‘全球’神经元,以将它们与大脑的大部分其它部位如小脑、丘脑、皮质等中更熟悉和局限性的细胞回路区分开。虽然在几十年前的神经退行性疾病中关键的是使用了不同的术语(‘异树突状核’),但先前已经鉴定了这些选择性易受攻击的全球神经元。

[0005] 全球神经元的亚组具有一个共同的具体特征,这可能解释了以下令人困惑和尚未解答的问题:为什么只有这些细胞屈服于进行性死亡,而其在大脑中其它部位的对应物即使在中风损伤时也不会:它们在进入和整个成年期保持强大的可塑性,并伴随着对帮助和维持生长的物质‘营养因子’的特异敏感性。在发育中的大脑中,营养因子通过刺激钙流入而起作用,这触发细胞内的一系列事件,最终导致选择性分化和生长。然而,在较高剂量或较长时间暴露时,持续的钙进入对神经元可能是有毒的。最重要的是,钙进入是否触发营养

或毒性作用的另一个决定因素是年龄：随着神经元成熟，前一时期细胞内钙的营养水平变得致命。

[0006] 本发明人先前已提出，神经退行性过程实际上是一种异常激活的发展过程。为了支持这种假说，在阿尔茨海默病大脑中实际上报道了脑干“中枢”神经元的营养过度 (Bowser等, 1997,《脑病理学 (Brain Pathol.)》, 7:723-30)。如果这个中枢的大面积被破坏, 则将出现一种以上的神经退行性疾病, 就像阿尔茨海默病和帕金森病共同病变的常见但尚未得到解释的病例一样。有趣的是, 全球神经元的易受攻击的中枢内的所有神经元, 尽管存在递质异质性, 但都含有熟悉的酶乙酰胆碱酯酶 (AChE)。因此, AChE存在于不能执行其正常功能的神经元中, 因为这些亚组的细胞作为去甲肾上腺素能蓝斑、多巴胺能黑质或血清素能中枢核, 在任何情况下都不含通常的底物乙酰胆碱。与其正常的酶促作用的进一步出乎意料的偏差是, AChE实际上是从全球神经元释放出来的, 大概是自身作为某种类型的细胞间信使。一般来说, AChE现在被广泛且充分公认为在神经和非神经组织的各种情况下都具有营养活性的信号分子。

[0007] 本发明人之前已经证实, 独立于其酶作用而作为营养剂起作用的AChE的确触发钙进入神经元。因此, 可能的是, 在全球神经元内, AChE具有沿着营养毒性轴排列的双重非经典作用, 这取决于数量、可用性持续时间以及最显著地年龄。如果标准神经元在成年期受损, 如在中风时, 则其它神经元将会在功能上补偿。相比之下, 全球神经元将通过请求他们的营养资源来回应以试图再生。但是由于后续的钙流入在较老的成熟细胞中将是致命的, 所以造成的损伤会触发在神经退行性疾病的特征性恶性循环中补偿的进一步尝试。

[0008] 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 以不同形式在不同发育阶段表达, 所有这些都具有相同的酶活性, 但具有非常不同的分子组成。“尾部” (T-AChE) 在突触表达, 并且本发明人先前已经鉴定出可从C端切割的两种肽, 一种被称为“T14”, 其在被称为“T30”的另一种肽内, 并且它们都与 β -淀粉样蛋白的可比较区域具有强烈的序列同源性。AChE C端肽“T14”已经被鉴定为负责其非水解作用范围的AChE分子的显著部分。合成的具14个氨基酸的肽类似物 (即“T14”) 以及随后其嵌入的较大的更稳定且更有效的氨基酸序列 (即“T30”) 显示与对于‘非胆碱能’ AChE所报道相似的作用, 而T30序列内的惰性残基 (即“T15”) 没有作用。

[0009] T14和T30的急性作用是：它们 (i) 在数毫秒到数小时的时间尺度上调节钙进入脑切片中的神经元；(ii) 在PC 12细胞中以及在体外在神经元器官型培养物中损害细胞活力；(iii) 调节‘补偿性’钙诱导的来自神经元和PC 12细胞的AChE释放；(iv) 激活脑切片中的卵母细胞和神经元中的钙电流；(v) 在毒性作用中与淀粉样蛋白协同作用；和(vi) 参与淀粉样蛋白前体蛋白产生和淀粉样蛋白 β (A β) 肽释放。T14和T30的慢性作用是：它们 (i) 减少神经元生长；(ii) 诱导细胞凋亡；(iii) 增加AChE释放；(iv) 结合并调节 $\alpha 7$ 烟碱受体；和(v) 增强 $\alpha 7$ 受体在细胞表面上的表达超过24小时, 从而提供进一步毒性的前馈机制。

[0010] 由于T14和T30比 β -淀粉样蛋白在诱导毒性方面具有更高的选择性, 并且与淀粉样蛋白加剧毒性也具有协同作用, 所以假定任何阻断T14或T30的毒性作用的药剂也会降低淀粉样蛋白的较小选择性和后续毒性作用。

[0011] 如实施例中所讨论, 本发明人现在已经分离出一种新型抗体, 其以高特异性结合T14肽 (SEQ ID No:3), 并且其不结合T30肽 (SEQ ID No:2) 或者不结合 β -淀粉样蛋白。因此, 这种抗体在神经退行性病症如阿尔茨海默病或帕金森病的诊断和治疗中将具有显著效用。

发明内容

[0012] 因此,根据本发明的第一方面,提供了特异性结合SEQ ID No:3或其变体或片段的抗体或其抗原结合片段。

[0013] 有利的是,实施例中描述的数据表明本发明的抗体以非常高的特异性结合T14肽。任何与T30结合的抗体都会增加检测到实际上是较大肽的惰性成分的抗原的风险,这应该避免。然而,根据本发明的抗体仅特异性结合于T14,或其变体或片段,而不结合于T30,因此可以确定其生物活性的毒性作用将被隔离和阻断。所述抗体令人惊讶地在生物组织、甚至已经被深层冷冻的组织中存活。最令人惊讶的是,与对照脑相比,在阿尔茨海默病样品中可以检测到显著的差异。因此,这些研究结果表明本发明的抗体可以用作诊断工具以及用于治疗干预。

[0014] 乙酰胆碱酯酶是水解乙酰胆碱的丝氨酸蛋白酶,并且是本领域技术人员所熟知的。在脑中发现的乙酰胆碱酯酶的主要形式被称为尾部乙酰胆碱酯酶(T-AChE)。人类尾部乙酰胆碱酯酶的一个实施方案的蛋白质序列(Gen Bank:AAA68151.1)的长度为614个氨基酸,并且在本文中SEQ ID No:1提供,如下:

[0015]

```
1 mrppqcllht psalaspilil llwllegggvg aegredaeil vtvrgrlrg irlktpggpv
61 saflgipfae ppmgprflp pepkqpwaqv vdatffqsvc ygyvdtlypg fegtemwnpn
121 relsedclyl nwtppyprpt sptpvlwiy gggfysgass ldvydgrflv qaertvlvsm
181 nyrvgafgfl alpgsreapq nvglldqrla lqvvqenvaa fggdptsvtl fgesagaasv
241 qmhllapper glfhravls gapagpwatv gmgearrrat qlahlvgepp ggtggndtel
301 vacrltrpaq vlvnheshvl pgesvfrfaf vpvvqgdfis dtpealinag dfhqlqlvlg
361 vvkdeggyfl vygapgfskd neslisraef lagrvvgvpq vsdlaseavv lhytdwihpe
421 dparlreals dvvgdbnvc pvaqlagrla aggarvyayv fehrastlsw plwmqvphgy
481 elefifgipl dprnrytae kifagrlmry wanfartgdp neprdpkapq wppytagaqq
541 yvsldlrple vrrglraqac afwnrflpkl lsatdtldea erqwkafhr wssyavhwkn
601 qfdhyskqdr csdl
```

[SEQ ID No:1]

[0016] T30的氨基酸序列(其对应于SEQ ID No:1的最后30个氨基酸残基)在本文中SEQ ID No:2提供,如下:

[0017] KAEFHRWSSYMVHWKNQFDHYSKQDRCSL

[0018]

[SEQ ID No:2]

[0019] 优选地,所述抗体或其抗原结合片段不结合于SEQ ID No:2。如上文所讨论,通过开发靶向T30的抗体,将存在检测到实际上是较大肽的惰性成分的抗原的风险。然而,有利的是,本发明的抗体反而与T14特异性结合,因此可以确定它隔离且阻断仅T14的生物活性的毒性作用。

[0020] T14的氨基酸序列(其对应于位于SEQ ID No:1末端的14个氨基酸残基,并缺乏T30中存在的最后15个氨基酸)在本文中SEQ ID No:3提供,如下:

[0021] AEFHRWSSYMVHWK

[0022]

[SEQ ID No:3]

[0023] T15的氨基酸序列(其对应于SEQ ID No:1的最后15个氨基酸残基)在本文中SEQ ID No:4提供如下:

[0024] NQFDHYSKQDRCSL

[0025] [SEQ ID No:4]

[0026] 优选地,所述抗体或其抗原结合片段不结合于SEQ ID No:4。T15是T30的惰性成分,因此作为T14的抗体选择性的适当对照。

[0027] β -淀粉样蛋白(A β)的一部分的氨基酸序列在本文中SEQ ID No:8提供,如下:

[0028] DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

[0029] [SEQ ID No:8]

[0030] 优选地,所述抗体或其抗原结合片段不结合于SEQ ID No:8。

[0031] 本发明延伸至具有针对SEQ ID No:3的免疫特异性的全抗体(即免疫球蛋白),以及相应全长抗体的抗原结合片段或区域。

[0032] 所述抗体或其抗原结合片段可以是单价、二价或多价的。单价抗体是包含由二硫桥相连的重(H)链与轻链(L)的二聚体(HL)。二价抗体是包含由至少一个二硫桥相连的两个二聚体的四聚体(H₂L₂)。也可以例如通过连接多个二聚体来产生多价抗体。抗体分子的基本结构由两个相同的轻链和两个相同的重链组成,这些链非共价缔合并可通过二硫键连接。每个重链和轻链含有约110个氨基酸的氨基末端可变区,其余链中含有恒定序列。所述可变区包括形成抗体分子的抗原结合位点并决定其对抗原即SEQ ID No:3或其变体或片段(例如表位)的特异性的几个高变区或互补决定区(CDR)。在重链和轻链的CDR的任一侧是框架区,它是锚定和定向CDR的相对保守的氨基酸序列。抗体片段可包括双特异性抗体(BsAb)或嵌合抗原受体(CAR)。

[0033] 恒定区由五个重链序列(μ 、 γ 、 ζ 、 α 或 ϵ)之一和两个轻链序列(κ 或 λ)之一组成。重链恒定区序列决定抗体的同种型和分子的效应功能。

[0034] 优选地,所述抗体或其抗原结合片段是分离的或纯化的。

[0035] 在一个优选的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包括多克隆抗体,或其抗原结合片段。所述抗体或其抗原结合片段可在兔子、小鼠或大鼠中产生。

[0036] 如实施例所述,本发明人已经从兔子制备了高度特异性的多克隆抗体。优选地,所述抗体或其抗原结合片段是通过以下获得:用SEQ ID No:3或其变体或片段使宿主动物免疫,然后收集所述抗体或其抗原结合片段。所述宿主动物最优选是兔子。

[0037] 在另一个优选实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包括单克隆抗体或其抗原结合片段。优选地,本发明的抗体是人类抗体。如本文所用,术语“人类抗体”可以指抗体,例如单克隆抗体,其包含与对SEQ ID No:3或其变体或片段展现免疫特异性的特定人类抗体中所存在的基本上相同的重链和轻链CDR氨基酸序列。与参考序列相比,与重链或轻链CDR基本上相同的氨基酸序列展现相当大程度的序列同一性。这种同一性是明确已知的或可识别为代表特定人类抗体的氨基酸序列。基本上相同的重链和轻链CDR氨基酸序列可具有例如氨基酸的少量修饰或保守取代。这样的人类抗体维持其选择性结合SEQ ID No:3或其变体或片段的功能。

[0038] 术语“人类单克隆抗体”可包括具有例如通过重组方法如通过噬菌体文库、通过淋巴细胞或通过杂交瘤细胞产生而产生的基本上或完全人类CDR氨基酸序列的单克隆抗体。

[0039] 术语“人源化抗体”可以指来自非人类物种(例如小鼠或兔子)的抗体,其蛋白质序列已被修饰以增加其与人类中自然产生的抗体的相似性。

[0040] 所述抗体可以是重组抗体。术语“重组人类抗体”可包括使用重组DNA技术产生的

人类抗体。

[0041] 术语“抗原结合区”可以指抗体对其靶抗原(例如SEQ ID No:3的肽,或其变体或片段)具有特异性结合亲和力的区域。优选地,所述片段是表位。结合区可以是高变CDR或其功能部分。术语CDR的“功能部分”可以指CDR内对靶抗原显示特异性亲和力的序列。CDR的功能部分可包含与SEQ ID No:3或其片段特异性结合的配体。

[0042] 术语“CDR”可以指重和轻的可变链中的高变区。在抗体的每个重链和轻链中可能有一个、两个、三个或更多个CDR。通常,每个链上至少有三个CDR,当构造在一起时,其形成抗原结合位点,即抗原结合或特异性反应的三维结合位点。然而,假设在某些抗体的重链中可能有四个CDR。

[0043] 当互相比对时,CDR的定义也包括氨基酸残基的重叠或子集。涵盖特定CDR或其功能部分的确切残基数将根据CDR的序列和大小而变化。鉴于抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可以常规地确定哪些残基包含特定CDR。

[0044] 术语抗体的“功能片段”可以指保留功能活性的抗体的一部分。功能活性可以是例如抗原结合活性或特异性。功能活性也可以是例如由抗体恒定区提供的效应功能。术语“功能片段”还旨在包括例如通过人类单克隆抗体的蛋白酶消化或还原以及通过本领域技术人员已知的重组DNA方法产生的片段。人类单克隆抗体功能片段包括例如单个重链或轻链及其片段,例如VL、VH和Fd;单价片段,例如Fv、Fab和Fab';二价片段,例如F(ab')₂;单链Fv(scFv);和Fc片段。

[0045] 术语“VL片段”可以指人类单克隆抗体的轻链的片段,其包括轻链可变区的全部或部分,包括CDR。VL片段还可以包括轻链恒定区序列。

[0046] 术语“VH片段”可以指人类单克隆抗体的重链的片段,其包括重链可变区的全部或部分,包括CDR。

[0047] 术语“Fd片段”可以指连接到第一重链恒定区的重链可变区,即VH和CH-1。“Fd片段”不包括轻链,或者重链的第二和第三恒定区。

[0048] 术语“Fv片段”可以指人类单克隆抗体的单价抗原结合片段,包括重链和轻链的可变区的全部或部分,并且不存在重链和轻链的恒定区。重链和轻链的可变区包括例如CDR。例如,Fv片段包括重链和轻链的约110个氨基酸的氨基末端可变区的全部或部分。

[0049] 术语“Fab片段”可以指大于Fv片段的人类单克隆抗体的单价抗原结合片段。例如,Fab片段包括可变区,以及重链和轻链的第一恒定结构域的全部或部分。因此,Fab片段还包括例如重链和轻链的约110至约220的氨基酸残基。

[0050] 术语“Fab'片段”可以指大于Fab片段的人类单克隆抗体的单价抗原结合片段。例如,Fab'片段包括轻链的全部、重链的可变区的全部,以及重链的第一和第二恒定结构域的全部或部分。例如,Fab'片段可以另外包括重链的氨基酸残基220至330的一部分或全部。

[0051] 术语“F(ab')₂片段”可以指人类单克隆抗体的二价抗原结合片段。F(ab')₂片段包括例如两个重链和两个轻链的可变区的全部或部分,并且还可以包括两个重链和两个轻链的第一恒定结构域的全部或部分。

[0052] 术语“单链Fv(scFv)”可以指与短连接肽连接的重链(VH)和轻链(VL)的可变区的融合物。

[0053] 术语“双特异性抗体(BsAb)”可以指通过较短的连接肽彼此连接的包含两个scFv

的双特异性抗体。

[0054] 本领域技术人员知道抗体的片段的确切边界并不重要,只要片段保持功能活性即可。使用众所周知的重组方法,本领域技术人员可以工程改造多核苷酸序列以表达具有特定应用所需的任何终点的功能片段。抗体的功能片段可包含具有与人类抗体基本上相同的重链和轻链可变区的片段或由具有与人类抗体基本上相同的重链和轻链可变区的片段组成。

[0055] 优选地,关于本发明的第一方面,其抗原结合片段具SEQ ID No:3特异性或对SEQ ID No:3内的表位具免疫特异性。其抗原结合片段可包含以下或由以下组成:选自VH、VL、Fd、Fv、Fab、Fab'、scFv、F(ab')₂和Fc片段的任何片段。

[0056] 其抗原结合片段可包含以下或由以下组成:VL的抗原结合区序列中的任一个,VH的抗原结合区序列中的任一个,或人类抗体的VL和VH抗原结合区的组合。VH和VL抗原结合区序列的适当数目和组合可由本领域技术人员根据抗原结合片段的期望的亲合力和特异性以及预期用途来确定。抗体的功能片段或抗原结合片段可以使用本领域技术人员熟知的方法容易地产生和分离。这些方法包括例如蛋白水解方法、重组方法和化学合成。用于分离功能片段的蛋白水解方法包括使用人类抗体作为原料。适用于人类免疫球蛋白的蛋白水解的酶可包括例如木瓜蛋白酶和胃蛋白酶。本领域技术人员可以容易地选择适当的酶,这取决于例如是否需要单价或二价片段。例如,木瓜蛋白酶切割产生结合抗原的两个单价Fab'片段以及Fc片段。胃蛋白酶切割例如产生二价F(ab')₂片段。可以使用例如DTT或2-巯基乙醇进一步还原本发明的F(ab')₂片段以产生两个单价Fab'片段。

[0057] 通过蛋白水解产生的抗体的功能或抗原结合片段可通过亲和及柱色谱程序纯化。例如,未消化的抗体和Fc片段可通过与蛋白A结合来除去。另外,功能片段可通过使用例如离子交换和凝胶过滤色谱法根据其电荷和大小进行纯化。这些方法是本领域技术人员公知的。

[0058] 抗体或其抗原结合片段可通过重组方法产生。优选地,最初分离编码抗体重链和轻链的所需区域的多核苷酸。这些区域可以包括例如重链和轻链的可变区的全部或部分。优选地,这些区域可以特别包括重链和轻链的抗原结合区,优选抗原结合位点,最优选CDR。

[0059] 编码根据本发明的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸可使用本领域技术人员已知的方法制备。编码所述抗体或其抗原结合片段的多核苷酸可通过本领域已知的寡核苷酸合成方法直接合成。可选地,可使用本领域已知的重组方法合成和连接较小的片段以形成较大的功能片段。

[0060] 如本文所用,术语“免疫特异性”可以指结合区能够通过与其特异性结合而与SEQ ID No:3或其变体或片段进行免疫反应。抗体或其抗原结合片段可以选择性地与抗原(例如SEQ ID No:3或其变体或片段)相互作用,亲和常数约为 10^{-5} 至 10^{-13}M^{-1} ,优选为 10^{-6} 至 10^{-9}M^{-1} ,甚至更优选为 10^{-10} 至 10^{-12}M^{-1} 。在材料和方法部分中,提供了解释如何确定抗体浓度的细节。

[0061] 术语“免疫反应”可以指结合区能够在与SEQ ID No:3或其表位结合时引发免疫应答。

[0062] 术语“表位”可以指能够与抗体或其抗原结合片段的结合区域引起并结合的抗原的任何区域。

[0063] 优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段特异性结合SEQ ID No:3的C端中的一个或多个氨基酸。优选地,根据本发明的抗体或其抗原结合片段特异性结合SEQ ID No.5中的一个或多个氨基酸(即SYMVHWK,其是SEQ ID No.3的C端氨基酸编号7-14)。优选地,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合表位中的C端赖氨酸(K)残基。

[0064] 如实施例中所述,本发明人惊讶地观察到,SEQ ID No:3中的C端氨基酸序列VHWK,其在本文中描述为SEQ ID No.6(即SEQ ID No.3的C端氨基酸编号10-14),用作根据本发明的抗体或其抗原结合片段的表位。因此,更优选地,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合SEQ ID No.6中的一个或多个氨基酸。最优选地,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合SEQ ID No.6。因此,应当理解,抗体结合的表位包含SEQ ID No.6或由SEQ ID No.6组成。

[0065] 本文所述的多克隆抗体被证明对T14肽、特别是C端序列-VHWK具高度特异性。此外,其对完整AChE蛋白的识别表明该表位序列在三级结构中是暴露和可及的。所述抗体不识别线性T30肽片段(其中存在T14)的事实被认为是由于在T30序列的C末端处不存在暴露的赖氨酸(K)。

[0066] 基于T14肽内的-VHWK表位的发现,本发明人认为这些序列可以用作生产有用抗体的抗原。如实施例中所述,T14肽(SEQ ID No:3)是与作为载体蛋白的匙孔血蓝蛋白(KLH)交联的半胱氨酸,其刺激宿主中的免疫应答。与T14交联的KLH蛋白在本文中称为SEQ ID No:7。

[0067] 因此,在第二方面,提供了用作抗原的SEQ ID No:3或SEQ ID No:7或其变体或片段。

[0068] 优选地,所述抗原作为抗体结合的表位。优选地,所述变体或片段包含SEQ ID No:6或由SEQ ID No:6组成。

[0069] 在第三方面,提供了一种抗体或其抗原结合片段,其通过包括以下的方法获得:

[0070] (i) 用SEQ ID No:3或SEQ ID No:7或其变体或片段使宿主生物体免疫;和

[0071] (ii) 从所述宿主收集所述抗体或其抗原结合片段。

[0072] 所述宿主可以是哺乳动物,并且可以是人类、兔子或小鼠。优选地,所述变体或片段包含SEQ ID No:6或由SEQ ID No:6组成。优选地,所述方法包括对宿主动物放血,然后从血清中收集所述抗体或其抗原结合片段。优选地,使血清通过具有共价结合的肽-支撑物的重力柱。洗涤后,抗体或其抗原结合片段优选在酸性缓冲液中洗脱,然后可将溶液中和。所述方法还可包括针对合适的缓冲液(例如PBS)进行透析和任选地冻干。

[0073] 有利的是,根据本发明的第一方面的抗体或其抗原结合片段本身具有治疗剂的效用。然而,此外,已经评估了使药物功效最大化的技术,包括糖基化工程改造以增强抗体或其抗原结合片段的ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)和/或CDC(补体依赖性细胞毒性)活性,与细胞毒性部分如辐射、细胞毒性药物或毒素结合。

[0074] 因此,在第四方面,提供了一种抗体-药物结合物(ADC),其包含第一或第三方面的抗体或其抗原结合片段,以及细胞毒性部分。

[0075] 抗体-药物结合物(ADC)可用于经由抗体将有效的细胞毒性药物选择性地递送到靶细胞。ADC开发的一个关键参数是抗体可能能够在与靶抗原即SEQ ID No:3或SEQ ID No:6结合时内吞。因此,内吞抗体可将结合药物递送到靶细胞中。

[0076] 所述细胞毒性部分可以是任何毒素,例如《抗体-药物结合物和免疫毒素:从临床

前开发到治疗应用 (Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins: From Pre-Clinical Development to therapeutic applications)》中所描述的毒素 (参见第118页)。此外, AD 中抗体疗法的具体实例是: SOLANEZUMAB (Lilly): <http://www.alzforum.org/therapeutics/solanezumab>

[0077] GANTENERUMAB (Roche): <http://www.alzforum.org/therapeutics/solanezumab>

[0078] 其它实例 (包括所有用于 I 期至 III 期阿尔茨海默病的免疫疗法): http://www.alzforum.org/therapeutics/search?fda_statuses=&target_types%5B%5D=170&therapy_types%5B%5D=162&conditions%5B%5D=145&keywords-entry=&keywords=

[0079] 所述药物部分可以是 α 发射放射性核苷酸, 例如²²⁵Ac标记。这些毒素可以经由可切割的连接子如二硫键、胺连接子或肽连接子或者经由不可切割的连接子如硫醚键使用 SMCC (N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸酯) 连接子连接到抗体或其抗原结合片段。

[0080] 如实施例中所所述, 本发明的抗体以非常高的特异性结合于 T14 肽。所述抗体令人惊讶地在生物组织、甚至已经深层冷冻的组织中存活。数据还显示, T14 样肽 (即 SEQ ID No: 3 或其变体或片段) 作为独立的生物化学实体存在, 其可以在患有或倾向于患上神经退行性疾病如阿尔茨海默病的患者中检测到。因此, 这些研究结果表明, 本发明的抗体可以用作诊断工具, 以及用于供治疗神经退行性疾病的治疗干预。

[0081] 因此, 根据第五方面, 提供了根据第一或第三方面的抗体或其抗原结合片段, 或者根据第四方面的抗体-药物结合物, 其各自任选地衍生化, 用于治疗或诊断。

[0082] 所述抗体或其抗原结合片段或者抗体-药物结合物可用于治疗、改善或预防神经退行性疾病。

[0083] 因此, 根据第六方面, 提供了根据第一或第三方面的抗体或其抗原结合片段, 或者根据第四方面的抗体-药物结合物, 其各自任选地衍生化, 用于治疗、预防或改善神经退行性疾病。

[0084] 根据第七方面, 提供了治疗、预防或改善受试者中的神经退行性疾病的方法, 所述方法包括向需要这种治疗的患者施用治疗有效量的根据第一或第三方面的抗体或其抗原结合片段, 或者根据第四方面的抗体-药物结合物, 其各自任选地衍生化。

[0085] 术语“衍生化”可以指抗体或其抗原结合片段或结合物可在使用前被修饰, 优选地产生其衍生物或变体。衍生化的实例可包括聚乙二醇化抗体或聚乙二醇化抗体片段, 或抗体-细胞因子融合蛋白。然而, 在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段或结合物可能不被衍生化。

[0086] 优选地, 所述神经退行性疾病选自: 阿尔茨海默病; 帕金森病; 亨廷顿氏病; 运动神经元疾病; 脊髓小脑 1 型、2 型和 3 型; 肌萎缩性侧索硬化 (ALS); 和额颞叶痴呆。最优选地, 所述神经退行性疾病是阿尔茨海默病。

[0087] 应当理解, 根据本发明的抗体、其片段和结合物 (本文统称为“药剂”) 可用于单一疗法 (例如单独使用抗体或其抗原结合片段, 或单独使用抗体-药物结合物), 用于治疗、改善或预防神经退行性疾病。可选地, 根据本发明的药剂可作为治疗、改善或预防神经退行性疾病的已知疗法如其它乙酰胆碱酯酶抑制剂的辅助或与其组合使用。

[0088] 根据本发明的药剂可组合成具有多种不同形式的组合物,具体取决于所述组合物的使用方式。因此,例如,所述组合物可以是粉末、片剂、胶囊、液体、软膏、乳膏、凝胶、水凝胶、气雾剂、喷雾剂、胶束溶液、透皮贴剂、脂质体悬浮液的形式或可施用于需要治疗的人或动物的任何其它合适的形式。应当理解,根据本发明的药物的载体应该是被给药的受试者充分耐受并且优选能够递送药剂穿过血脑屏障的载体。

[0089] 包含本发明的药剂的药物可以多种方式使用。例如,可能需要口服施用,在这种情况下,所述药剂可包含在组合物内,所述组合物可例如以片剂、胶囊或液体的形式经口摄入。包含本发明的药剂和药物的组合物可通过吸入(例如鼻内)施用。组合物也可配制用于局部使用。例如,乳膏或软膏可应用于例如与大脑相邻的皮肤。

[0090] 根据本发明的药剂和药物也可并入缓释或延迟释放装置中。这样的装置可以例如插入皮肤上或皮肤下,并且药物可以在数周甚至数月内释放。所述装置可至少位于治疗部位(即大脑)附近。当需要用根据本发明使用的药剂进行长期治疗并且通常需要频繁施用(例如至少每日注射)时,这样的装置可能是特别有利的。

[0091] 在一个优选的实施方案中,根据本发明的药剂和药物可通过注射到血流中或直接注射到需要治疗的部位来施用于受试者。例如,药物可至少与大脑相邻注射。注射可以是静脉内(推注或输注)或皮下(推注或输注)或皮内(推注或输注)。

[0092] 应当理解,所需的抗体、片段和结合物(即药剂)的量由其生物学活性和生物利用度确定,后者又取决于施用模式、药剂的生理化学性质,以及它是以单一疗法还是组合疗法使用。施用频率也将受到所述药剂在所治疗受试者体内的半衰期的影响。待施用的最佳剂量可由本领域技术人员确定,并且将随着使用中的具体药剂、药物组合物的强度、施用模式和细菌感染的进展而变化。取决于所治疗的特定受试者的其它因素将导致需要调整剂量,包括受试者年龄、体重、性别、饮食和施用时间。

[0093] 通常,日剂量为 $0.001\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重至 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重的根据本发明的药剂可用于治疗、改善或预防神经退行性病症,这取决于哪种药剂。更优选地,药剂的日剂量为 $0.01\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重至 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重,更优选为 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,并且最优选为约 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。

[0094] 所述药剂可在神经退行性病症发作之前、期间或之后施用。日剂量可作为单次施用(例如单次每日注射)给予。可选地,所述药剂可能需要在一天内施用两次或更多次。例如,药剂可以 $0.07\mu\text{g}$ 至 700mg 的日剂量(即假定体重为 70kg)分两次(或更多次,取决于所治疗的神经退行性病症的严重程度)施用。接受治疗的患者可以在醒来时服用第一剂量,然后在晚上(如果是两剂量方案)或者其后3或4小时时间间隔服用第二剂量。可选地,缓释装置可用于向患者提供最佳剂量的根据本发明的药剂,而不需要施用重复剂量。可以使用已知的程序,例如制药工业常规使用的程序(例如体内实验、临床试验等),以形成根据本发明的药剂的特定制剂和精确的治疗方案(例如药剂的日剂量和施用频率)。

[0095] 在本发明的第八方面,提供了一种药物组合物,其包含根据第一或第三方面的抗体或其抗原结合片段,或根据第四方面的抗体-药物结合物,其各自任选地衍生化;和任选地药学上可接受的载体。

[0096] 所述药物组合物优选是抗神经退行性疾病组合物,即用于治疗性改善、预防或治疗受试者中的神经退行性病症如阿尔茨海默病的药物制剂。

[0097] 所述抗体或其功能片段、肽或核酸可能未衍生化。

[0098] 在第九方面,本发明还提供了一种用于制造根据第八方面的药物组合物的方法,所述方法包括将治疗有效量的各自任选地衍生化的如第一或第三方面所定义的抗体或其抗原结合片段或者如第四方面所定义的抗体-药物结合物与药学上可接受的载体组合。

[0099] 所述抗体或其抗原结合片段可如关于第一方面所定义。

[0100] “受试者”可以是脊椎动物、哺乳动物或家畜。因此,根据本发明的药物可用于治疗任何哺乳动物,例如牲畜(例如马)、宠物,或可用于其它兽医应用。最优选地,所述受试者是人类。

[0101] 所述抗体或其抗原结合片段的“治疗有效量”是当对受试者施用时的治疗神经退行性疾病或产生所期望的作用所需的药剂量的任何量。

[0102] 例如,所用的抗体或其片段的治疗有效量可以是约0.001ng至约1mg,并且优选约0.01ng至约100ng。抗体或片段的量优选是约0.1ng至约10ng并且最优选约0.5ng至约5ng的量。

[0103] 如本文所提及的“药学上可接受的载体”是本领域技术人员已知可用于配制药物组合物的任何已知化合物或已知化合物的组合。

[0104] 在一个实施方案中,药学上可接受的载体可以是固体,并且组合物可以是散剂或片剂的形式。药学上可接受的固体载体可包括一种或多种物质,其也可以作为调味剂、润滑剂、增溶剂、悬浮剂、染料、填料、助流剂、压缩助剂、惰性粘合剂、甜味剂、防腐剂、染料、涂料或片剂崩解剂。所述载体也可以是封装材料。在散剂中,所述载体是与根据本发明的细粉状活性剂混合的细粉状固体。在片剂中,活性剂可与具有必要压缩性质的载体以合适的比例混合,并压实成所需的形状和尺寸。散剂和片剂优选含有高达99%的活性剂。合适的固体载体包括例如磷酸钙、硬脂酸镁、滑石粉、糖、乳糖、糊精、淀粉、明胶、纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、低熔点蜡和离子交换树脂。在另一个实施方案中,药物载体可以是凝胶,并且组合物可以是乳膏等形式。

[0105] 然而,药物载体可以是液体,并且药物组合物是溶液的形式。液体载体用于制备溶液、悬浮液、乳液、糖浆、酏剂和加压组合物。根据本发明的活性剂可溶解或悬浮在药学上可接受的液体载体如水、有机溶剂、二者的混合物或药学上可接受的油或脂肪中。液体载体可含有其它合适的药物添加剂,例如增溶剂、乳化剂、缓冲剂、防腐剂、甜味剂、调味剂、悬浮剂、增稠剂、着色剂、粘度调节剂、稳定剂或渗透调节剂。用于口服和肠胃外施用的液体载体的合适实例包括水(部分含有如上所述的添加剂,例如纤维素衍生物,优选羧甲基纤维素钠溶液)、醇类(包括一元醇和多元醇,例如二醇)及其衍生物,和油类(例如分馏椰子油和花生油)。对于肠胃外施用,载体还可以是油酸酯,例如油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯。无菌液体载体可用于供肠胃外施用的无菌液体形式组合物。用于加压组合物的液体载体可以是卤代烃或其它药学上可接受的推进剂。

[0106] 作为无菌溶液或悬浮液的液体药物组合物可以通过例如肌肉内、鞘内、硬膜外、腹膜内、静脉内和特别是皮下注射来利用。所述药剂可制备成无菌固体组合物,其可以在施用时使用无菌水、盐水或其它适当的无菌可注射培养基溶解或悬浮。

[0107] 本发明的药剂和组合物可以含有其它溶质或悬浮剂(例如,足够的盐水或葡萄糖以使溶液等渗)、胆汁盐、阿拉伯胶、明胶、脱水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨酯80(与环氧乙烷

共聚的山梨糖醇油酸酯及其酸酐)等的无菌溶液或悬浮液经口施用。根据本发明使用的药剂也可以液体或固体组合物形式经口施用。适于口服施用的组合物包括固体形式,例如丸剂、胶囊、颗粒剂、片剂和散剂,以及液体形式,例如溶液、糖浆、酏剂和悬浮液。可用于肠胃外施用的形式包括无菌溶液、乳液和悬浮液。

[0108] 如本文所讨论,本发明的抗体对T14肽(即SEQ ID No:3)并且特别是C端序列-VHWK(即SEQ ID No:6)(其充当表位)具有高度特异性或选择性。所述抗体令人惊讶地在生物组织、甚至已被深层冷冻的组织中存活。此外,数据显示,T14样肽作为独立的生物化学实体存在。这些研究结果表明可检测序列(即-VHWK表位)可以用作诊断工具。

[0109] 因此,在第十方面,提供了SEQ ID No:3或其变体或片段,其用于检测或诊断神经退行性病症的生物标志物。

[0110] 优选地,SEQ ID No:3或其变体或片段作为可被抗体或抗原结合片段、优选地根据第一方面或第三方面的抗体或抗原结合片段结合的表位。

[0111] 优选地,用作生物标志物的SEQ ID No:3的变体或片段包含SEQ ID No:6或由SEQ ID No:6组成。

[0112] 本发明还提供一种诊断患有神经退行性疾病的患者的试剂盒。

[0113] 因此,根据本发明的第十一方面,提供了一种用于诊断患有神经退行性病症或其倾向的受试者或用于提供受试者病状的预后的试剂盒,所述试剂盒包括用于检测来自测试受试者的样品中存在的抗原浓度的检测装置,其中所述检测装置包含任选地衍生化的根据第一或第三方面的抗体或其抗原结合片段,其中所述样品中抗原的存在表明所述受试者患有神经退行性病症。

[0114] 根据第十二方面,提供了一种用于诊断患有神经退行性病症或其倾向的患者或用于提供受试者病状的预后的方法,所述方法包括检测从受试者中获得的样品中存在的抗原浓度,其中使用任选地衍生化的根据第一或第三方面的抗体或其抗原结合片段实现检测,并且其中所述样品中抗原的存在表明受试者患有神经退行性病症。

[0115] 有利的是,本发明的抗体可用于确定个体是否处于比当前可能早得多患上神经退行性病症(例如阿尔茨海默病或帕金森病)的更高风险,以便可以提供早期治疗,或提供信息以帮助他们在生活方式和饮食方面做出更明智的决定。另外,神经退行性病症的早期诊断,或者受试者可能患上神经退行性病症的风险的早期检测,将极大地帮助医生开具处方药。

[0116] 优选地,所述抗原包含以下或由以下组成:SEQ ID No:3,更优选SEQ ID No:5,并且最优选SEQ ID No:6。

[0117] 优选地,所述样品包含生物样品。所述样品可以是可从获得蛋白质的受试者获得的任何材料。所述样品可包括大脑,例如皮质、蓝斑或海马。

[0118] 图18-20显示所述抗体令人惊讶地与CSF中的T14结合。因此,优选地,样品包括脑脊髓液(CSF)。

[0119] 样品可包括血液、尿液、组织等。

[0120] 图23显示所述抗体令人惊讶地与血液本身中的T14结合。因此,最优选地,样品包括血液样品。血液可能是静脉或动脉血。

[0121] 所述试剂盒可包括用于接收提取样品的样品收集容器。可以立即对血液样品测定

T14水平。可选地,血液样品可以在低温下储存,例如在冰箱中或甚至在进行T14测定之前冷冻。T14的检测可以在全血上进行。然而,优选地,血液样品包括血清。优选地,血液样品包括血浆。

[0122] 在进行T14测定之前可以进一步处理血液。例如,可加入抗凝血剂,例如柠檬酸盐(如柠檬酸钠)、水蛭素、肝素、PPACK或氟化钠。因此,为了防止血液样品凝结,样品收集容器可含有抗凝血剂。可选地,可以将血液样品离心或过滤以制备可用于分析的血浆或血清部分。因此,优选在血浆或血清样品中分析或测定T14。优选地,在体外从取自受试者的血清样品或血浆样品测量T14浓度。

[0123] 优选地,所述试剂盒或方法用于鉴定样品中T14阳性细胞(即包含SEQ ID No:3或其变体或片段的细胞)的存在或不存在,或者确定其在样品中的浓度。检测装置可包括适于检测样品中T14阳性细胞的存在和/或不存在的测定。所述试剂盒或方法可包括使用可以比较测定的阳性对照和/或阴性对照。例如,所述试剂盒可包括来自患有神经退行性病症(即阳性对照)或不患有神经退行性病症(即阴性对照)的个体的样品中T14阳性细胞浓度的参考。

[0124] 所述试剂盒还可包括可以检测的标记。术语“标记”可以指可以连接到抗体或其片段的部分。部分可以例如用于治疗或诊断程序。治疗标记包括例如可连接到本发明的抗体或其片段并用于监测抗体与T14肽(即SEQ ID No:3)或其片段如SEQ ID No:5或SEQ ID No:6的结合的部分。如本文所述,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合SEQ ID No:3或其变体或片段。优选地,所述抗体或其抗原结合片段不与SEQ ID No:2(即T30)结合。优选地,所述抗体或其抗原结合片段不与SEQ ID No:4(即T15)或 β -淀粉样蛋白结合。

[0125] 诊断标记包括例如可以通过分析方法检测的部分。分析方法包括例如定性和定量程序。定性分析方法包括例如免疫组织化学和间接免疫荧光。定量分析方法包括例如免疫亲和程序如放射免疫测定、ELISA或FACS分析。分析方法还包括体外和体内成像程序。可以通过分析手段检测的诊断标记的具体实例包括酶、放射性同位素、荧光染料、化学发光标志物和生物素。

[0126] 标记可以直接连接到本发明的抗体或其片段,或者连接到特异性结合本发明分子的二级结合剂。这种二级结合剂可以是例如二级抗体。二级抗体可以是多克隆或单克隆抗体,并且是人类、啮齿动物或嵌合来源。

[0127] 本发明人认为本发明的抗体可用作药物发现过程中新的治疗化合物的筛选的一部分。例如,用于检测毒性肽T14的方法和测定法可用于候选化合物筛选(例如,HTS和选择性文库筛选,和基于结构的设计),用于鉴定可提供有效治疗的靶点,以及二级测定(例如体外和离体二级测定),作为药物“先导物”开发的一部分。

[0128] 因此,在本发明的第十三方面,提供了根据第一或第三方面的抗体或其抗原结合片段在药物发现筛选中鉴定用于治疗、预防或改善神经退行性病症的治疗性化合物的用途。

[0129] 在第十四方面,提供了比色或荧光标记的T14肽(SEQ ID No:3)用于鉴定抑制T14肽(SEQ ID No:3)合成或活性的药剂的离体用途。

[0130] 在第十五方面,提供了一种用于鉴定用于治疗、预防或改善神经退行性病症的候选药剂的方法,所述方法包括以下步骤:

[0131] (i) 在体外或离体使细胞与测试剂在根据第一或第三方面的抗体或其抗原结合片段的存在下接触;和

[0132] (ii) 使用所述抗体或其抗原结合片段来检测T14肽(SEQ ID No:3)的存在、浓度或活性,其中不存在T14肽或者T14肽合成、浓度或活性与对照相比降低指示所述药剂是用于治疗、预防或改善以不适当的补体激活为特征的疾病的候选物。

[0133] 在第十五方面,提供了一种用于鉴定抑制T14肽(SEQ ID No:3)合成或活性的药剂的测定法,所述测定法包括:

[0134] (i) 基于细胞的表达系统;

[0135] (ii) 根据第一或第三方面的抗体或其抗原结合片段;和

[0136] (iii) 被配置以允许至少一种测试剂与所述表达系统接触的容器。

[0137] 在第十六方面,提供了一种用于鉴定调节T14肽(SEQ ID No:3)合成或活性的药剂的方法,所述方法包括:

[0138] (i) 在体外或离体使细胞与测试剂在根据第一或第三方面的抗体或其抗原结合片段的存在下接触;和

[0139] (ii) 使用所述抗体或其抗原结合片段来检测T14肽(SEQ ID No:3)的存在、浓度或活性,其中T14合成、浓度或活性与对照相比的改变指示所述测试剂调节T14肽(SEQ ID No:3)合成或活性。

[0140] 应当理解,在本发明的测定和方法中,所述抗体或其抗原结合片段可用于检测毒性肽T14(SEQ ID No:3)的存在、浓度或活性。因此,如果抗体检测到T14,或者回应于测试化合物的存在而使其浓度或活性增加,则这将表明测试化合物不能代表可用作治疗神经退行性病症的疗法的候选物。相反,如果抗体没有检测到毒性T14,或者在测试化合物的存在下抗体检测到T14的浓度或活性的降低,则这将表明所述测试化合物是可用于治疗神经退行性病症的治疗剂。所述方法和测定优选涉及鉴定降低或阻止T14肽的合成或活性的药剂。

[0141] 本文描述的任何方法可以在体外或离体进行。接触可以是在基本上无细胞的系统中。所述方法中的任一种可包括筛选在基于细胞的系统中和/或在非人类哺乳动物中在体内显示相同活性的阳性指示的药剂。

[0142] 应当理解,本发明延伸到任何核酸或肽或其变体、衍生物或类似物,其包含以下或基本上由以下组成:本文提及的任何序列的氨基酸或核酸序列,包括其变体或片段。术语“基本上氨基酸/核苷酸/肽序列”、“变体”和“片段”可以是与本文提及的序列中的任一者的氨基酸/核苷酸/肽序列具有至少40%序列同一性,例如与确定为SEQ ID No:3(即T14多肽序列)或SEQ ID No:6(即VHWK表位)等的序列具有40%同一性的序列。

[0143] 也设想了与所提及的任何序列具有大于50%,更优选大于65%、70%、75%,并且还更优选大于80%序列同一性的序列同一性的氨基酸/多核苷酸/多肽序列。优选地,氨基酸/多核苷酸/多肽序列与所提及的任何序列具有至少85%同一性,更优选地至少90%、92%、95%、97%、98%,并且最优选地与本文所提及的任何序列具有至少99%同一性。

[0144] 本领域技术人员将理解如何计算两个氨基酸/多核苷酸/多肽序列之间的同一性百分比。为了计算两个氨基酸/多核苷酸/多肽序列之间的同一性百分比,必须首先准备两个序列的比对,接着计算序列同一性值。两个序列的同一性百分比可采用不同的值,这取决于:(i) 用于比对序列的方法,例如ClustalW、BLAST、FASTA、Smith-Waterman(在不同程序中

实施),或根据3D比较的结构比对;和(ii)比对方法使用的参数,例如局部对全局比对,所使用的成对-评分矩阵(例如blosun62、pam250、gonnet等)和空位罚分,例如功能形式和常数。

[0145] 进行比对后,有许多不同的方法来计算两个序列之间的同一性百分比。例如,可由以下来除以同一性数字:(i)最短序列的长度;(ii)比对长度;(iii)序列的平均长度;(iv)非空位位置的数量;或(iv)不包括突出端的等价位置数量。此外,应当理解,同一性百分比也具有强烈的长度依赖性。因此,一对序列越短,可能预期偶然发生的序列同一性越高。

[0146] 因此,应当理解,蛋白质或DNA序列的精确比对是一个复杂的过程。流行的多重比对程序ClustalW(Thompson等,1994,《核酸研究(Nucleic Acids Research)》,22,4673-4680;Thompson等,1997,《核酸研究(Nucleic Acids Research)》,24,4876-4882)是用于产生根据本发明的蛋白质或DNA的多重比对的优选方式。ClustalW的合适参数可能如下:对于DNA比对:空位开放罚分=15.0,空位延伸罚分=6.66,并且矩阵=同一性。对于蛋白质比对:空位开放罚分=10.0,空位延伸罚分=0.2,并且矩阵=Gonnet。对于DNA和蛋白质比对:ENDGAP=-1和GAPDIST=4。本领域技术人员将意识到可能需要改变这些和其它参数以获得最佳序列比对。

[0147] 优选地,因而可以从这种比对以 $(N/T) \times 100$ 计算两个氨基酸/多核苷酸/多肽序列之间的同一性百分比,其中N是共用相同残基的序列的位置数,并且T是包括空位但不包括突出端的所比较的位置的总数。因此,用于计算两个序列之间的同一性百分比的最优选方法包括(i)使用clustalw程序使用例如如上所述的一组合适的参数来准备序列比对;和(ii)将n和t的值代入到以下公式中:序列同一性= $(N/T) \times 100$ 。

[0148] 鉴别相似序列的替代方法将是本领域技术人员已知的。例如,基本上相似的核苷酸序列将由在严格条件下与本文所示的任何核酸序列或其互补序列杂交的序列编码。严格条件是指核苷酸在约45℃下在3×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中与过滤结合的DNA或RNA杂交,接着在约20-65℃下在0.2×ssc/0.1%SDS中进行至少一次洗涤。可选地,基本上相似的多肽相比于本文所示的序列可能相差至少1个,但少于5、10、20、50或100个氨基酸。

[0149] 由于遗传密码的简并性,很明显,本文所述的任何核酸序列可在基本上不影响由其编码的蛋白质的序列的情况下改变或变化,从而提供其功能变体。合适的核苷酸变体是具有通过在序列内编码相同氨基酸的不同密码子的取代而改变从而产生沉默变化的序列的那些变体。其它合适的变体是具有同源核苷酸序列但包含通过用与所取代氨基酸具有相似生物物理性质的侧链取代编码氨基酸的不同密码子而改变以产生保守变化的序列的全部或部分的那些变体。例如,小的非极性疏水氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸和甲硫氨酸。大的非极性疏水氨基酸包括苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。极性中性氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电荷的(碱性)氨基酸包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸。带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。因此,应当理解哪种氨基酸可被具有相似生物物理性质的氨基酸代替,并且本领域技术人员将知道编码这些氨基酸的核苷酸序列。

[0150] 本文(包括任何所附权利要求、摘要和附图)描述的所有特征和/或如此公开的任何方法或过程的所有步骤可与任何上述方面以任何组合来组合,其中这些特征和/或步骤中的至少一些相互排斥的组合除外。

附图说明

[0151] 为了更好地理解本发明,并且为了说明本发明的实施方案可以如何实施,现在将作为示例参考附图,其中:

[0152] 图1是根据ELISA的Pep4 (SEQ ID No:7)的标准曲线;

[0153] 图2是根据ELISA的T14 (SEQ ID No:3)的标准曲线;

[0154] 图3是根据ELISA的T30 (SEQ ID No:2)的标准曲线;

[0155] 图4是根据ELISA的T15 (SEQ ID No:4)的标准曲线;

[0156] 图5示出在C端具有VHWK基序 (SEQ ID No:6)的具9、10、11、12、13和14个氨基酸的肽的ELISA检测;

[0157] 图6示出在C端不具有VHWK基序的具9、10、11、12、13和14个氨基酸的肽的ELISA检测;

[0158] 图7示出具11个氨基酸的肽的ELISA检测;

[0159] 图8示出具12个氨基酸的肽的ELISA检测;

[0160] 图9示出具13个氨基酸的肽的ELISA检测;

[0161] 图10示出具14个氨基酸的肽的ELISA检测;

[0162] 图11示出使用根据本发明的抗体的一个实施方案通过ELISA进行的AChE分子检测;

[0163] 图12示出通过Ellman测定法确定的单独地和与根据本发明的抗体的一个实施方案组合的AChE的活性;

[0164] 图13示出通过Ellman测定法确定的单独地和与根据本发明的抗体的一个实施方案组合的AChE的活性;

[0165] 图14示出通过Ellman测定法确定的单独地和与根据本发明的抗体的一个实施方案组合的AChE的活性;

[0166] 图15示出T14样肽在大鼠匀浆的不同稀释液中的检测;

[0167] 图16示出人类大脑对照和AD,以 μg T-14样肽/mg总蛋白表示。AD样品在 $P=0.03$ 下显示显著更高的浓度;

[0168] 图17示出抗体对T14的特异性的证实。柱状图显示对100nM不具有外加最后K残基的外源T14、T30、T15、淀粉样蛋白和T14的应答。在所有情况下 $n=3$ 。对所述抗体的明显应答仅见于T14;

[0169] 图18示出十对年龄匹配的对照和AD患者的Western印迹 (Western Blot, WB) 数据,显示他们的患者代码、性别、年龄、CERAD状态和Braak阶段。使用本发明的抗体的一个实施方案,使用Western印迹法测试大多数 (80%) AD病例的CSF中的T14水平增加,从而证明了假说并将T14鉴定为生物标志物;

[0170] 图19示出使用本发明的抗体的一个实施方案,AD患者的CSF中T14水平升高,但是A β 保持不变。图19 (A):在代表性Western印迹中,对照和AD患者的尸检CSF中的T14表达。由于聚集,T14 (Bond, Zimmerman等,2009; Cottingham, Hollingshead等,2002) 可见较慢的电泳迁移率 (50KDa)。对照:男性,80岁,CERAD正常,Braak I。AD:男性,81岁,CERAD明确,Braak V;图19 (B):在代表性的Western印迹中,对照和AD患者的尸检CSF中的A β 表达。对照:男性,

80岁,CERAD正常,Braak I。AD:男性,81岁,CERAD明确,Braak V。从左到右:对照:女性,82岁,CERAD正常;AD:女性,81岁,CERAD明确,Braak VI;对照:男性,83岁,CERAD正常,Braak I/II;AD:男性,79岁,CERAD明确,Braak V/VI;图19(C):T14表达的定量;和图19(D):对照(n=10)和AD患者(n=10)的尸检CSF中的A β 表达。将T14水平相对于如通过Blot-FaststainTM(Collins等,2015)检测到的总蛋白表达归一化,并以对照的平均值 $\pm$ SEM的百分比表示。在水平 $P<0.0001$ 下的显著差异由****表示;

[0171] 图20显示,使用本发明的抗体的一个实施方案,与三个脑区相比,对照和AD患者的CSF中的T14水平一直较高。然而,A β 不是这种情况。在CSF和三个脑区(CC:大脑皮质,LC:蓝斑,HC:海马)中测量T14水平。在A)对照和B)AD患者中,脑区和CSF中的T14量以CSF中的T14量的百分比表示。测量A β 水平并以与上文关于C)对照和D)AD患者相同的方式表示。E)然后将CSF中的T14和A β 的相对量(黑条)绘制在一起;

[0172] 图21显示,T14聚集随着T14单体池保持不变而呈指数增长。通过在蒸馏水中再悬浮产生外源T14储备溶液(20mM)溶液。随后,将储备溶液用PBS(pH 10.5)稀释至工作储备溶液(400 μ M)。通过加入PBS(pH 5)中和工作储备溶液以产生200 μ M的最终浓度来起始聚集,将其在25 $^{\circ}$ C下温育0、1、2、3、4小时。此外,通过用PBS(pH 10.5)将工作储备液稀释至200 μ M并在25 $^{\circ}$ C下温育4小时来产生T14单体对照。通过将pH 5和pH 10.5PBS混合在一起并在25 $^{\circ}$ C下温育4小时,进一步产生无肽对照。然后在上述T14聚集样品上进行WB(A)和ELISA(B)并定量;

[0173] 图22显示,使用本发明的抗体的一个实施方案,AD脑中的临床脑组织(皮质和海马)中的T14水平显著升高(每mg蛋白质);

[0174] 图23显示,使用本发明的抗体的一个实施方案,过滤的人类血清(30kDa MWCO)显示T14的存在为如通过T14ELISA所测量的可检测水平;

[0175] 图24显示,使用所述抗体的免疫组织化学结果表明在晚期阿尔茨海默病患者中的全球神经元中存在T14;和

[0176] 图25显示在非神经对照和重度AD中用抗T14抗体部分对人类中脑进行免疫组织化学染色。

具体实施方式

[0177] 实施例

[0178] “尾部”乙酰胆碱酯酶(T-AChE)在突触表达,并且本发明人先前已经鉴定出可从其C端切割的两种肽,一种被称为“T14”(长度为14个氨基酸),其在被称为“T30”(长度为30个氨基酸)的另一种肽内,并且它们都与 β -淀粉样蛋白的可比较区域具有强烈的序列同源性。被称为“T15”的另一种肽对应于T30的最后15个氨基酸残基。

[0179] 连接肽T14的氨基酸序列是AEFHRWSSYMVHWK[SEQ ID No:3]。

[0180] 连接肽T30的氨基酸序列是KAEFHRWSSYMVHWKNQFDHYSKQDRCSDL[SEQ ID No:2]。连接肽T15(其对应于T30的最后15个氨基酸残基)的氨基酸序列是NQFDHYSKQDRCSDL[SEQ ID No:5]。

[0181] AChE C端肽“T14”已被鉴定为负责其非水解作用范围的AChE分子的显著部分。合成的14个氨基酸的肽类似物(即“T14”)以及随后其所嵌入的更大、更稳定和更有效的氨基

酸序列(即“T30”)显示与关于‘非胆碱能’AChE所报道的那些类似的作用。

[0182] 此外,本发明人先前已制备了长度为14个氨基酸的环状T14肽(即“NBP-14”),它是基于T14的氨基酸序列(即AEFHRWSSYMVHWK[SEQ ID No:3]),但已通过末端丙氨酸(A)和赖氨酸(K)残基环化。可以通过几种不同的方式实现环化。例如,Genosphere Biotechnologies(法国)通过将线性肽转化为N端至C端内酰胺来进行T14的环化。T14环化以产生环状NBP14将两端(即HWK-AEF)连接在一起。本发明人先前已经表明,环状NBP-14在体外选择性地抑制AChE的非经典作用(即,与其酶活性无关的AChE的作用)和/或其末端肽,并且可用于治疗神经退行性病症。NBP14作用于 $\alpha 7$ 烟碱受体,以保护细胞免于线性T14、T30和 β -淀粉样蛋白毒性。它还阻断由线性T14和T30的毒性引起的代偿性AChE释放。此外,当单独给予时,环状NBP14对大鼠脑切片中的 Ca^{2+} 浓度无显著影响,但阻断了T30的作用。

[0183] 基于他们的早期工作,本发明人现在已开发了一种抗体,其以非常高的特异性结合AChE C端肽“T14”。已经表明所述抗体可以高置信度用作诊断神经退行性病症的诊断工具。他们还认为所述抗体可以用于治疗。

[0184] 材料和方法

[0185] 多克隆抗体的合成

[0186] 所述抗体由Genosphere Biotechnologies(法国巴黎)订购合成。使用两只新西兰兔,在70天内用KLH肽(“Pep4”:T14-半抗原CAEFHRWSSYMVHWK-SEQ ID No.7)作为免疫原进行四次免疫。对动物放血四次,并且将出血汇集。然后将抗血清通过具有共价结合的肽-支撑物的重力柱,洗涤后,将抗体在酸性缓冲液中洗脱并将溶液中和。相对于PBS缓冲液进一步透析和冻干,完成该过程。

[0187]

制造商 ELISA 结果: 吸光度 405 nm				
抗体 稀释度	兔子 No. 1		兔子 No. 2	
	免疫前	纯化	免疫前	纯化
1:1 000	0.120	1.64	0.143	1.66
1:10 000	0.045	0.77	0.036	0.74
1:100 000	0.016	0.19	0.017	0.19

[0188] T14抗体条件的优化

[0189] 制造商关于抗体的报告用于在最佳条件下进行ELISA实验。在报告中,制造商详细说明了与抗体浓度有关的光学密度(见下表)和该程序所用的ELISA方案(方案见下文)。

[0190] 来自制造商的方案:

[0191] 将抗原以每孔10 μ g涂在EIA条上。孔用200 μ l PBS缓冲液洗涤。

[0192] 将抗血清连续稀释,加入独立的孔中,并温育2小时。洗涤未结合的抗体,并加入抗兔IgG-HRP结合物。将板洗涤并用TMB底物显色操作15分钟。在405nm(2.00AUFS)下读取吸光度。颜色强度与抗体量成正比。如果吸光度相比于免疫前血清>2倍,则抗体为阳性。免疫前血清的背景吸光度可达0.1至0.3。

[0193] 结论:

[0194] 对于本文所述的所有实验,1:1000是所选的抗体稀释度。

[0195] 通过使用抗体检测样品中的肽(ELISA)

[0196] ELISA测定的程序如下:

[0197] 标准曲线和样品一式三份地操作。对于T14、Pep4、T15和淀粉样蛋白的检测,将8纳摩尔浓度的各物用于ELISA。另一方面,对于基序测定实验,仅使用每个肽变体的一个浓度100nM。对于大鼠脑样品上的T14的检测,使用不同稀释度的蛋白质。由于人类匀浆样品的价值,这些仅以1:160的稀释度使用。用于测定脑组织中的T14肽的标准曲线和脑组织样品在PBS缓冲液中稀释。T14的标准曲线范围为8至100nM。简言之,用100 μ l/孔的样品或标准T14涂布96孔免疫板(NUNC),以石蜡膜覆盖,并在4℃下温育过夜。第二天,通过在水槽上用流水轻拂板来除去样品,并且加入200 μ l的在Tris缓冲盐水和Tween 20 (TBS-T) 中含有2%牛血清白蛋白(BSA)的封闭溶液,并在室温下温育4小时。然后除去封闭溶液,并加入100 μ l的在封闭溶液中稀释至1 μ g/ml的抗体,并在4℃温育过夜。第二天除去初级抗体,并且用200 μ l TBS-T将孔洗涤3次。之后,加入100 μ l的在封闭溶液中稀释至0.1 μ g/ml的二级抗体,并在室温下温育2小时;在所有温育期间,板用石蜡膜覆盖。2小时后,将板用TBS-T洗涤4次。加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺开始显色反应。15-30分钟后用含有2M H_2SO_4 的停止溶液停止反应,并且在Vmax板读取器(Molecular devices, Wokingham, UK) 中在450nm测量吸光度。

[0198] AChE活性的Ellman测定法

[0199] AChE活性是使用测量由于AChE活性而导致存在硫醇基团的Ellman试剂来测量的。在G4实验的情况下,单独地或与NBP-14组合或与加兰他敏(Galanthamine)组合测定AChE(G4)。在关于细胞活力测定的实验前一天将细胞接种。用不同浓度的NBP-14(0.1-100 μ M)以及单独地或与NBP-14(0.1和0.7 μ M)组合的T30、T14和AB10 μ M处理细胞。处理后,收集每次处理的上清液(灌注液),并且将25 μ L的各种条件加入新的平底96孔板中,接着加入175 μ l的Ellman试剂(溶液A: KH_2PO_4 139mM和 K_2HPO_4 79.66mM, pH 7.0; 溶液B(底物): 乙酰硫胆碱碘化物11.5mM; 溶液C(试剂): 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) 8mM和 $NaHCO_3$ 15mM)。按照比率33(A):3(B):4(C)以3种溶液的混合物制备Ellman试剂。在405nm下的实验中以规律的时间间隔(3、10、30和60分钟)进行吸光度测量。

[0200] 脑匀浆(大鼠和人类)的制备

[0201] 样品制备如下。将脑样品称重,然后置于杜恩斯匀浆器中,并且每1mg脑材料加入1.5 μ L PBS。通过使用“松”柱塞完全插入杜恩斯匀浆器底部至少10次,将杜恩斯匀浆器底部中的脑样品匀浆化。使用“紧”柱塞进一步使材料匀浆化,确保至少10次完全插入。将匀浆化样品收集在2mL Eppendorfs中,并在4℃下冷冻的离心机中以13,000g离心15分钟。一旦离心完成,就将上清液收集到准备好的0.5ml 30KDa MWC0过滤器中。样品在13,000g下离心30分钟,并且将蛋白酶抑制剂混合液(Roche成品PIC 04693116001)加入到滤液中。这用于T14肽的ELISA。通过将过滤器倒置到另一个微量离心管来收集未过滤的样品滞留物(>30kDa)并且将其用于使用Pierce测定(如下所述)来确定初始样品的蛋白质浓度。

[0202] 蛋白质测定

[0203] Thermo Scientific Pierce 660nm蛋白质测定剂是一种即用型洗涤剂和还原剂相容性测定试剂,以快速测量(A660nm)与牛血清白蛋白的蛋白质标准相比的总蛋白浓度。对于该测定,将10微升的在PBS中1:10稀释的每种人类脑匀浆样品加入到96孔微量滴定板中,接着加入150微升Pierce测定剂。温育5分钟后,在Vmax板读取器(Molecular devices, Wokingham, UK) 中在660nm下测量吸光度,并且将光学密度的结果外推至BSA的标准曲线以获得毫升/微升。

[0204] 数据分析

[0205] 对于所有实验,通过使用GraphPAD Instat (GraphPAD软件, San Diego, CA) 利用单因素方差分析 (ANOVA) 和Tukey事后检验来进行多个治疗组和相同对照之间的比较。这些测试将每次治疗的平均值与所有其它治疗的平均值进行比较;也就是说,同时应用于所有成对比较的集合,并且识别两个平均值之间的差异大于预期允许的标准误差的位置。在P值< 0.05下获得统计学显著性。使用Microsoft Excel绘制图形。

[0206] 对于人脑实验,数据分析在附图中表示为5个对照和7名阿尔茨海默病患者的平均值,以及应用Bessel校正的平均值的标准误差(n-1)。为了将光学密度读数转换成每个样品中的T14的微克数,使用校准曲线,其中使用‘指数模型’将不同的已知浓度的外源T14针对各自的读数进行绘制。最后,关于与总蛋白相关的T14含量将值标准化(μg/mg)。

[0207] 脑样品来源

[0208] 大鼠:来自Charles River的35天龄雄性Wistar大鼠的新鲜匀浆化全脑。

[0209] 人类:由Thomas Willis Oxford Brain Collection (由Margaret Esiri教授转交) 提供的来自深层冷冻组织的中脑切片。伦理申请获得了牛津拉德克利夫医院 (Oxford Radcliffe Hospital) NHS的人体组织库批准,其符合人体组织法、人体组织管理局操作规程以及其它与组织的尸检和使用有关的法律。具体来说,约5mm的冠状切片具有上面的导水管周围灰质,和大脑脚,和下面的含有中缝背、红核和第三神经核的黑质。

[0210] Western印迹法

[0211] 脑样品制备

[0212] 来自十名尸检AD患者和其年龄匹配对照的大脑皮质、蓝斑、海马和CSF切片由牛津John Radcliffe医院大脑库的Margaret Esiri教授和Gabriele DeLuca博士友好捐赠。将每个脑样品称重并放置在杜恩斯匀浆器中。对于每1μg脑材料,将2μl含有微型无EDTA的蛋白酶抑制剂混合液 (Roche成品PIC 04693116001) 的PBS (1X) 加入到杜恩斯匀浆器中,并且首先使用“松”柱塞且接着使用“紧”柱塞来进行匀浆化。随后,样品在4℃下以13,000g旋转30分钟,并取出上清液。CSF样品不需要准备。所有样品都储存在-80℃。

[0213] 测量蛋白质样品浓度

[0214] 使用Pierce™ 660nm蛋白质测定剂 (Thermo Scientific) 测量上述样品的蛋白质浓度。简而言之,从牛血清白蛋白 (BSA) 的10mg/ml储备液进行连续稀释 (0至2mg/ml)。通过将10μl蛋白质转移到透明的96孔板 (Greiner) 来制备每种BSA浓度的三个重复物。然后,样品用三种浓度 (1:1、1:2、1:10) 稀释,并将每种浓度的三个重复物置于同一96孔板中,每个重复物含有10μl样品。随后,将150μl Pierce试剂加入到标准物和所有样品中,并且将混合物在轻轻摇动下温育5分钟。最后,利用分光光度计 (Molecular Devices) 在660nm下读板。使用都通过Microsoft Excel计算的BSA标准曲线的斜率和y截距来确定样品的蛋白质浓度。

[0215] 蛋白质样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0216] 将聚丙烯酰胺凝胶 (mini-PROTEAN® TGX stain free™ 凝胶, BIO-RAD) 置于电泳槽 (BIO-RAD, mini-PROTEAN四体系) 中并且向所述凝胶和槽罐 (BioRad) 中加入电泳缓冲液 (25mM TRIS碱, pH 8.6, 192mM甘氨酸, 0.1% SDS)。通过与蒸馏水和4x Laemmli样品缓冲液 (最终浓度: 69.5mM TRIS-HCl pH 6.8、1.1% LDS、11.1% (w/v) 甘油、0.005% 溴酚蓝, BIO-

RAD) 和 2.5% 巯基乙醇 (BIO-RAD) 混合来制备蛋白质样品。也制备了外源 T14 的样品当量浓度, 其作为测量内源 T14 肽的阳性对照。将混合物在 95℃ 下加热 5 分钟, 然后在冰上冷却。将样品和阳性对照上样到凝胶中, 并在 35mV 下与分子量标志物 (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards, BIO-RAD) 一起电泳 90 分钟。将冰块放置在电泳槽内以防止任何过热。

[0217] 将蛋白质样品转移到 PVDF 膜上

[0218] 修剪堆叠的凝胶, 并且将分离的凝胶转移到 Mini Transblot Cell (BIO-RAD) 中的 PVDF 转移膜 (Thermo Scientific) 上。简言之, PVDF 转移膜通过用甲醇浸泡 1 分钟接着用蒸馏水浸泡 2 分钟而活化。随后用转移缓冲液 (20mM TRIS 碱 pH 8.6、154mM 甘氨酸、0.8% w/v SDS 和 20% 甲醇) 使所有层饱和。转移层叠物按照从底部到顶部的顺序由转移海绵、印迹纸、凝胶、PVDF 转移膜组成, 将印迹纸、转移海绵置于转移盒中, 将该转移盒插入填充有转移缓冲液的 Mini Transblot Cell 中。最后, 电泳转移在 200mA 下进行 90 分钟。将冰块放置在转移槽内以防止任何过热。

[0219] PVDF 膜的染色

[0220] 使用 BLOT-Faststain™ (G-Biosciences, USA) 对总蛋白染色, 作为内参照 (Colins 等, 2015)。电泳转移后立即用稀释的 BLOT-Faststain™ 定影剂溶液 (10 倍) 将 PVDF 转移膜在轻轻摇动下染色 2 分钟。然后将所述膜与稀释的 BLOT-Faststain™ 显影剂溶液 (4 倍) 一起在轻轻摇动下温育 1 分钟。随后, 将所述膜在显影剂溶液中在黑暗中于 4℃ 下储存 30 分钟, 以使蛋白质条带达到最大强度。最后, 用冷水洗涤膜以消除背景染色, 并使用 G box (Syngene) 成像。然后可以使用温热的去离子水 (40-45℃) 将膜脱色, 并准备用于封闭阶段。

[0221] 蛋白质条带的检测

[0222] 在含有 5% 脱脂奶粉的 TBS (TRIS 缓冲盐水、20mM TRIS 碱 pH 7.5、0.5mM NaCl) 中将 PVDF 转移膜封闭 1 小时, 然后在 TTBS (补充有 0.05% v/v Tween-20 的 TBS) 中洗涤两次, 每次 7 分钟。将所述膜与在含有 1% 脱脂奶粉的 TTBS 中稀释的初级抗体一起在 4℃ 下温育过夜 (表 1)。第二天, 除去初级抗体。在 TTBS 中将膜洗涤三次, 每次 5 分钟, 然后在室温下与二级抗体一起温育 1 小时。所选择的二级抗体取决于所用的初级抗体的类型。它可以是在含有 1% 脱脂奶粉的 TTBS 中稀释 (工作浓度: 1:1000) 的与 HRP 结合的山羊抗小鼠二级抗体 (a9309, Sigma) 或在含有 1% 脱脂奶粉的 TTBS 中稀释 (工作浓度: 1:5000) 的与 HRP 结合的山羊抗兔二级抗体 (ab6721, abcam)。二级抗体温育后, 在 TTBS 中将膜洗涤三次持续 5 分钟, 然后在 TBS 中进行最后 10 分钟洗涤。使用 G box (Syngene) 检测蛋白质条带。

[0223] 表 1 用于 Western 印迹检测的初级抗体。

[0224]

抗体	产生物种	公司	目录号	工作浓度
抗 T14	兔	Genosphere 制造 (本发明)	N/A	1:1000
抗烟碱乙酰胆碱受体 $\alpha 7$	兔	Abcam	Ab10096	1:1000
抗磷酸 PHF τ	小鼠	Thermo Scientific	MN 1020	1:1000
抗淀粉样蛋白前体蛋白	兔	Abcam	Ab 2072	1:5000
抗 AChE	兔	Abnova	PAB 5222	1:1000

[0225] 蛋白质条带成像和数据分析

[0226] 将PVDF膜置于G box (Syngene) 中。调整对焦和变焦设置,以确保所述膜在屏幕中心处最大。来自Clarity™ Western ECL底物(BIO-Rad)的鲁米诺和过氧化物溶液等份混合并施加到膜上。在黑暗中以1分钟的时间间隔拍摄图像,持续5分钟,获得蛋白质条带的最佳信号。之后,使用自动设置以白光使膜曝光,以获得分子梯的图像。然后使用图像J分析印迹图像。将相同尺寸的盒放置在每个泳道中的蛋白质条带周围,允许测量蛋白质条带强度。然后从条带强度中减去背景,并在Microsoft Excel和Graphpad软件中分析结果。

[0227] 抗体汽提以重新探测

[0228] 来自PVDF转移膜的蛋白质信号可以被汽提并重新探测不同的蛋白质。简言之,用温和的汽提缓冲液(200mM甘氨酸、3.5mM SDS、1% v/v Tween-20, pH 2.2)洗涤膜两次,每次10分钟。随后,将膜用PBS洗涤两次,每次10分钟,然后用TTBS洗涤两次,每次5分钟。将Clarity™ Western ECL底物(BIO-Rad)加入到膜中并使用G Box (Syngene) 成像,以检查残留的蛋白质信号。如果残留信号过强,则重复整个汽提过程。然后,膜准备用于随后的封闭阶段和初级抗体探测(见上文)。

[0229] 人类血清(HS)制备

[0230] HS是从利兹大学分子和细胞生物研究所的Nigel Hooper教授提供的对照组和AD患者中获得的。样品由Amy Halliday通过截留分子量(MWCO)过滤器过滤,Amy Halliday是于2008年作为牛津大学药理学系Susan Greenfield团队的一份子工作的前博士后。将血清过滤分离成>30kDa、30-10kDa和<10kDa的级分。对于该研究,将30-10kDa和<10kDa部分以等量重组,得到在<30kDa HS中存在的T14的光谱。

[0231] T14肽抗体的ELISA

[0232] 标准曲线和样品一式三份地操作。将人脑匀浆样品用人类血清以1:160稀释。将组织样品中T14肽测定的标准曲线在PBS缓冲液中稀释。标准曲线范围为8至100nM的T14。简言之,用100 μ l/孔的样品或标准T14涂布96孔免疫板(NUNC),覆盖以石蜡膜,并在4℃下温育过夜。第二天,通过在水槽上用流水轻拂板来除去样品,并且加入200 μ l的在Tris缓冲盐水和Tween 20 (TBS-T) 中含有2%牛血清白蛋白(BSA)的封闭溶液,并在室温下温育4小时。然后除去封闭溶液,并加入100 μ l的在封闭溶液中稀释至1 μ g/ml的抗体,并在4℃下温育过夜。第二天除去初级抗体,并且用200 μ l TBS-T将孔洗涤3次。然后加入100 μ l的在封闭溶液中稀释

至0.1 μ g/ml的酶结合二级抗体,并在室温下温育2小时;在所有温育期间,板用石蜡膜覆盖。2小时后,将板用TBS-T洗涤4次。加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺开始显色反应。30分钟后用含有2M H₂SO₄的停止溶液停止反应,并且对于脑匀浆在Vmax板读取器(Molecular devices, Wokingham, UK)中以及对于人类血清在VersaMax板读取器(Molecular Devices, Wokingham, UK)中在450nm下测量吸光度。

[0233] 用针对T14的抗体对人类和大鼠脑切片进行免疫组织化学染色

[0234] 1.将脑样品固定在10%福尔马林中。

[0235] 2.将组织块脱水并包埋在石蜡中。

[0236] 3.从每个石蜡包埋的组织块切下6 μ m切片。

[0237] 4.通过在60 $^{\circ}$ C烘烤20分钟,将组织熔融到每个载玻片上。

[0238] 5.载玻片在histoclear中温育(3 $\times$ 5分钟)以熔融蜡。

[0239] 6.使用分级乙醇系列(10次浸渍100%EtOH、10次浸渍100%EtOH、10次浸渍100%EtOH、10次浸渍90%EtOH、10次浸渍70%EtOH)将载玻片水合。

[0240] 7.载玻片在3%过氧化氢中温育30分钟以淬灭内源过氧化物酶活性。

[0241] 8.载玻片在含有EDTA的pH9缓冲溶液中高压灭菌(121 $^{\circ}$ C,10分钟)。

[0242] 9.将载玻片安装在盒上并固定在序列中。

[0243] 10.用含有0.05% tween 20的Tris缓冲盐水(TBS/T)洗涤载玻片(2 $\times$ 5分钟)。

[0244] 11.施加初级抗T14抗体1小时。

[0245] 12.用TBS/T洗涤载玻片(2 $\times$ 5分钟)。

[0246] 13.将与辣根过氧化物酶结合的二级抗体施加40分钟(由Dako提供,目录号K5007)。所述二级抗体识别T14初级抗体的不变区域。所述二级抗体与辣根过氧化物酶结合,该酶是催化能够检测连接到二级抗体的色原的反应的酶,其与T14初级抗体结合。因此,这能够检测脑切片中的免疫标记的T14。

[0247] 14.用TBS/T洗涤载玻片(2 $\times$ 5分钟)。

[0248] 15.如制造商的说明书中所概述将Impact VIP过氧化物酶底物施加到扁平载玻片上15分钟(由Vector Laboratories提供,目录号SK-4605)。

[0249] 16.用TBS/T洗涤载玻片(2 $\times$ 5分钟)。

[0250] 17.利用DPX安装剂安装载玻片。

[0251] 除非另有说明,否则在室温下进行所有温育。

[0252] 结果

[0253] 实施例1-肽识别

[0254] 本发明人已经从兔子分离出多克隆抗体。图1-4示出关于1:1000抗体和指定纳摩尔浓度的不同肽(即PEP4、T14、T30和T15)的剂量反应。

[0255] 如图1所示,抗体特异性检测用于其合成的抗肽,即PEP4(CAEFHRWSSYMVHWK-SEQ ID No:7)。如图2所示,所述抗体还特异性结合T14(AEFHRWSSYMVHWK-SEQ ID No:3)。然而,如图3和图4所示,所述抗体不结合T30(KAEFHRWSSYMVHWKNQFDHYSKQDRCSL-SEQ ID No:2)或T15(NQFDHYSKQDRCSL-SEQ ID No:5)。这意味着检测要求是基于所暴露的特定末端氨基酸以及它们获得的可能的三级结构。

[0256] 另外,如图17所示,所述抗体不能识别淀粉样蛋白。这意味着如前所述,抗体的识

别取决于所暴露的氨基酸的不同组合。

[0257] 因此,本发明人已经证实本发明的多克隆抗体的惊人的高特异性。

[0258] 实施例2-肽结合区

[0259] 本发明人通过用一系列不同的线性肽进行结合实验来研究本发明的抗体的免疫特异性。用于测定抗体免疫特异性的线性肽的序列如表2和表3所示。

[0260] 表2-肽序列

[0261]

肽名	SEQ ID No.	氨基酸序列	肽名	SEQ ID No.	氨基酸序列
909	No:10	WSSYMVHWK	908	No:16	RWSSYMVHW
1008	No:11	RWSSYMVHWK	1007	No:17	HRWSSYMVHW
1107	No:12	HRWSSYMVHWK	1106	No:18	FHRWSSYMVHW
1206	No:13	FHRWSSYMVHWK	1205	No:19	EFHRWSSYMVHW
1305	No:14	EFHRWSSYMVHWK	1304	No:20	AEFHRWSSYMVHW
1404	No:15	AEFHRWSSYMVHWK	1403	No:21	KAEFHRWSSYMVHW

[0262] 表3-肽序列

[0263]

肽名称	SEQ ID No.	氨基酸序列	肽名称	SEQ ID No.	氨基酸序列
1107	No:12	HRWSSYMVHWK	1209	No:27	WSSYMVHWKAEF
1108	No:22	RWSSYMVHWKA	1305	No:14	EFHRWSSYMVHWK
1109	No:23	WSSYMVHWKAE	1306	No:28	FHRWSSYMVHWKA
1110	No:24	SSYMVHWKAEF	1308	No:29	RWSSYMVHWKAEF
1206	No:13	FHRWSSYMVHWK	1404	No:15	AEFHRWSSYMVHWK
1207	No:25	HRWSSYMVHWKA	1405	No:30	EFHRWSSYMVHWKA
1208	No:26	RWSSYMVHWKAE	1407	No:31	HRWSSYMVHWKAEF

[0264] 如图5所示,所述抗体特异性地需要在C端存在-VHWK氨基酸基序或表位(即SEQ ID No:6)以能够检测肽。如图6所示,含有该基序但不具有C端K氨基酸的那些肽不被所述抗体识别。此外,含有-VHWK基序但它不在序列末端的那些肽也不被所述抗体识别,如图6所示。

[0265] 图7-10表示针对不同的11、12、13和14聚体线性肽的抗体的结合,有些具有所需的C端-VHWK基序,而有些不具有所需的C端-VHWK基序。可以清楚地看到,肽1107、1206、1305和1404中的每一个都具有抗体强烈结合的C端-VHWK基序。

[0266] 实施例3-AChE识别

[0267] 如图11所示,所述抗体检测乙酰胆碱酯酶(AChE,即“G4”),并且改变乙酰胆碱的水解速度而不影响酶的最终活性,如图12-14所示,并且仅当AChE活性相对于高浓度的抗体较低时是显著的。鉴于大脑和身体中的AChE活性非常高,并且任何作为治疗的抗体将处于较低剂量范围内,可以将由于降低酶活性而导致的任何副作用最小化。此外,相对于临床使用的药物加兰他敏(其抑制活性更多,即50%),所述抗体最大限度地阻断AChE约15%(参见WO 2015/004430)。

[0268] 实施例4-在大鼠和人体组织中检测

[0269] 当用大鼠和人类样品进行检测时,所述样品用30KDa MWC0过滤器过滤以除去AChE,其阻止酶的检测,并在样品中呈假阳性。结果显示抗体如何在两种样品中检测到肽。图15示出大鼠脑匀浆的结果,并且图16示出对照和阿尔茨海默病(AD)人脑匀浆的结果。

[0270] 讨论

[0271] 抗体的特异性

[0272] 多克隆抗体被证明对T14肽(至关重要,是C端序列-VHWK)具有高度特异性。它对完整的AChE蛋白的识别表明,该序列在三级结构中是暴露和可及的。所述抗体不识别线性T30肽片段(其中存在T14)的事实被认为是由于在所获得的三级结构中未暴露的T30序列末端不存在赖氨酸(K)。

[0273] 在复杂样品如大鼠和人脑中的检测能力

[0274] 这些数据表明,所述抗体令人惊讶地在生物组织、甚至已经深层冷冻的组织中存活,并且T14样肽作为一个独立的生物化学实体存在,如先前仅由间接证据表明(Garcia-Ayllon,M.S.等,Altered levels of acetylcholinesterase in Alzheimer plasma.PloS one 5,e8701,doi:10.1371/journal.pone.0008701(2010);Arendt,T.,Bruckner,M.K.,Lange,M.和Bigl,V.Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development--a study of molecular forms.《国际神经化学(Neurochemistry international)》,21,381-396(1992))。最值得注意的是,与对照脑相比,在AD中可以检测到显著差异。

[0275] 所检测序列的重要性

[0276] 这些研究结果表明,如果结合到细胞毒性部分的话,可检测的序列(即-VHWK表位),特别是C端的暴露K残基可被用作诊断工具以及治疗干预的靶标,包括可能使用抗体本身。后一种应用可能受到抗体可降低AChE酶促反应速度的研究结果的限制,但是AChE的催化速率非常高以致于它们可能高于阈值,并且实际上解释了为什么药物如加兰他敏和Aricept仍然在临床使用。

[0277] 实施例5-如由Western印迹(WB)所证实的CSF中的T14的检测

[0278] 使用本发明的抗体,本发明人然后比较了脑脊髓液(CSF)中的T14原纤维和A β 。他们发现T14通过Western印迹法检测为50KDa条带,因为它形成原纤维。这通过随时间推移而聚集的外源T14进一步显而易见,如由T14Western印迹信号的增加所证实(参见图21A)。

[0279] 接下来参看图18,在迄今为止使用Western印迹法测试的10个AD病例中,有8例(80%)的CSF中的T14原纤维增加。当所有10例汇集时,与对照相比,AD患者中的这种增加约为24%($p < 0.0001$,参见图19C)。有趣的是,当所有10例AD病例汇集时,对照与AD患者之间的CSF中的A β 水平无变化(参见图19D)。可以看出,T14和A β 水平在对照患者的CSF中是类似的。

然而,令人惊讶的是,AD患者的T14水平升高,而A β 水平保持不变(参见图20D)。因此,本发明人已清楚地证实,CSF中的T14是比A β 更好且更稳固的AD诊断生物标志物,并且可用于疾病的早期检测。

[0280] 本发明人然后比较了CSF与3个脑区(皮质、蓝斑和海马)之间的T14原纤维和A β 。他们已经证实,与对照和AD患者所测试的3个脑区相比,CSF中的T14水平较高,这表明T14释放到CSF中并聚集在那里(参见图20A和20B)。相比之下,他们观察到与对照患者的CSF相比,3个脑区(皮质、蓝斑、海马)中的A β 水平较高(参见图20C),并且对照患者的皮质、蓝斑和CSF之间的A β 水平没有显著差异(参见图20D)。此外,AD患者的海马中的A β 水平低于CSF中(参见图20D)。

[0281] 因此,显然,CSF中的淀粉样蛋白不像T14一样一贯地反映AD。CSF中的T14水平比脑组织中高得多,这表明T14主要作为长距离信号传导的游离分子释放,而不是像脑组织中的淀粉样蛋白一样聚集。因此,T14在AD中是比淀粉样蛋白更好的生物标志物,并且T14显然有潜力作为帕金森病以及阿尔茨海默病的敏感指标。

[0282] 因此,本发明的抗体可以清楚地用于检测所测试脑区中以及CSF中的T14,其中T14水平升高,因此更易于检测。

[0283] 实施例6-关于脑样品中的T14单体的ELISA数据

[0284] 从实施例5开始,本发明人接着使用对T14的C端具特异性的多克隆抗体来检测其它脑样品中的T14单体。他们比较了脑皮质和海马中的T14水平。使用30kDa MWCO过滤器过滤样品以消除较大的蛋白质如AChE和白蛋白,从而降低背景信号。

[0285] 如图22所示,他们发现,在比较了4对年龄匹配的对照和AD患者的研究中,T14水平在AD脑的皮质和海马中显著升高(每mg蛋白质)。因此,本发明人已经证实,在众所周知与阿尔茨海默病中的损伤相关的脑区中T14增加。

[0286] 实施例7-比较对照和AD人类血清中的T14水平

[0287] 尽管从实施例5和6显而易见,使用本发明的抗体可以容易地在脑和CSF中检测到T14,但是从活体患者获得脑和CSF样品是一种高度侵入性和危险的操作。因此,本发明人研究了使用所述抗体在已经长时间-80℃储存的人类血清(HS)样品中检测T14的可能性。研究的目的是使用这些样品来优化用于可加工的更新鲜HS样品的ELISA。所述样品已经使用30kDaMWCO过滤器过滤,以消除较大的蛋白质如AChE和白蛋白,从而降低背景信号。

[0288] 参看图23,12对年龄匹配的对照和AD患者HS的试验性研究显示,令人惊讶地可使用所述抗体来检测过滤的人类血清中的T14。此外,与对照相比,T14在AD中升高。因此,数据表明可检测HS中的T14,因此可以用作简单的非侵入性诊断工具,并且将优选从具有或疑似具有神经退行性病症的患者获得CSF(或脑)样品。

[0289] 实施例8-免疫细胞化学

[0290] 参看图24,显示了通过免疫细胞化学在晚期阿尔茨海默病中存在于全球神经元中的T14的第一次可视化。由于所示的这个特定区域通常在帕金森病中易受攻击,所以它支持两种退行性疾病共用基于毒性T14的共同机制的理论。

[0291] 实施例9-用抗T14抗体对人类中脑切片进行免疫组织化学染色

[0292] 参看图25,在40x和200x放大倍数下显示了对照和重度阿尔茨海默病(AD)样品中的中脑黑质的T14免疫染色。显示了重度AD中的细胞外T14免疫标记的沉积物(箭头),以及

对照和AD中典型的多巴胺能神经元细胞质T14免疫染色模式(箭头状物)。在视野范围内捕获了一系列T14神经元细胞质染色模式。从附图中可以看出,从AD样品的细胞中释放出T14(箭头),但在对照中并非如此。来自AD细胞的T14释放或分泌被认为是由于死亡神经元的泄漏。T14的细胞外沉积物似乎与深色黑色素(即多巴胺)聚结。

序列表

<110> 神经生物有限公司

<120> 识别AChE的T14肽的抗体

<130> GBA1V170009622

<160> 31

<210> 1

<211> 614

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

Met Arg Pro Pro Gln Cys Leu Leu His Thr Pro Ser Leu Ala Ser Pro
1           5           10           15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Gly Gly Gly Val Gly Ala Glu
          20           25           30
Gly Arg Glu Asp Ala Glu Leu Leu Val Thr Val Arg Gly Gly Arg Leu
          35           40           45
Arg Gly Ile Arg Leu Lys Thr Pro Gly Gly Pro Val Ser Ala Phe Leu
          50           55           60
Gly Ile Pro Phe Ala Glu Pro Pro Met Gly Pro Arg Arg Phe Leu Pro
65           70           75           80
Pro Glu Pro Lys Gln Pro Trp Ser Gly Val Val Asp Ala Thr Thr Phe
          85           90           95
Gln Ser Val Cys Tyr Gln Tyr Val Asp Thr Leu Tyr Pro Gly Phe Glu
          100          105          110
Gly Thr Glu Met Trp Asn Pro Asn Arg Glu Leu Ser Glu Asp Cys Leu
          115          120          125
Tyr Leu Asn Val Trp Thr Pro Tyr Pro Arg Pro Thr Ser Pro Thr Pro
          130          135          140
Val Leu Val Trp Ile Tyr Gly Gly Gly Phe Tyr Ser Gly Ala Ser Ser
145          150          155          160
Leu Asp Val Tyr Asp Gly Arg Phe Leu Val Gln Ala Glu Arg Thr Val
          165          170          175
Leu Val Ser Met Asn Tyr Arg Val Gly Ala Phe Gly Phe Leu Ala Leu
          180          185          190
Pro Gly Ser Arg Glu Ala Pro Gly Asn Val Gly Leu Leu Asp Gln Arg
          195          200          205
Leu Ala Leu Gln Trp Val Gln Glu Asn Val Ala Ala Phe Gly Gly Asp
          210          215          220

```

Pro Thr Ser Val Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ala Ser Val			
225	230	235	240
Gly Met His Leu Leu Ser Pro Pro Ser Arg Gly Leu Phe His Arg Ala			
	245	250	255
Val Leu Gln Ser Gly Ala Pro Asn Gly Pro Trp Ala Thr Val Gly Met			
	260	265	270
Gly Glu Ala Arg Arg Arg Ala Thr Gln Leu Ala His Leu Val Gly Cys			
	275	280	285
Pro Pro Gly Gly Thr Gly Gly Asn Asp Thr Glu Leu Val Ala Cys Leu			
	290	295	300
Arg Thr Arg Pro Ala Gln Val Leu Val Asn His Glu Trp His Val Leu			
305	310	315	320
Pro Gln Glu Ser Val Phe Arg Phe Ser Phe Val Pro Val Val Asp Gly			
	325	330	335
Asp Phe Leu Ser Asp Thr Pro Glu Ala Leu Ile Asn Ala Gly Asp Phe			
	340	345	350
His Gly Leu Gln Val Leu Val Gly Val Val Lys Asp Glu Gly Ser Tyr			
	355	360	365
Phe Leu Val Tyr Gly Ala Pro Gly Phe Ser Lys Asp Asn Glu Ser Leu			
	370	375	380
Ile Ser Arg Ala Glu Phe Leu Ala Gly Val Arg Val Gly Val Pro Gln			
385	390	395	400
Val Ser Asp Leu Ala Ala Glu Ala Val Val Leu His Tyr Thr Asp Trp			
	405	410	415
Leu His Pro Glu Asp Pro Ala Arg Leu Arg Glu Ala Leu Ser Asp Val			
	420	425	430
Val Gly Asp His Asn Val Val Cys Pro Val Ala Gln Leu Ala Gly Arg			
	435	440	445
Leu Ala Ala Gln Gly Ala Arg Val Tyr Ala Tyr Val Phe Glu His Arg			
	450	455	460
Ala Ser Thr Leu Ser Trp Pro Leu Trp Met Gly Val Pro His Gly Tyr			
465	470	475	480
Glu Ile Glu Phe Ile Phe Gly Ile Pro Leu Asp Pro Ser Arg Asn Tyr			
	485	490	495
Thr Ala Glu Glu Lys Ile Phe Ala Gln Arg Leu Met Arg Tyr Trp Ala			
	500	505	510
Asn Phe Ala Arg Thr Gly Asp Pro Asn Glu Pro Arg Asp Pro Lys Ala			
	515	520	525
Pro Gln Trp Pro Pro Tyr Thr Ala Gly Ala Gln Gln Tyr Val Ser Leu			

530	535	540
Asp Leu Arg Pro Leu Glu Val Arg Arg Gly Leu Arg Ala Gln Ala Cys		
545	550	555
Ala Phe Trp Asn Arg Phe Leu Pro Lys Leu Leu Ser Ala Thr Asp Thr		
565	570	575
Leu Asp Glu Ala Glu Arg Gln Trp Lys Ala Glu Phe His Arg Trp Ser		
580	585	590
Ser Tyr Met Val His Trp Lys Asn Gln Phe Asp His Tyr Ser Lys Gln		
595	600	605
Asp Arg Cys Ser Asp Leu		
610		
<210> 2		
<211> 30		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 2		
Lys Ala Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys Asn		
1	5	10
Gln Phe Asp His Tyr Ser Lys Gln Asp Arg Cys Ser Asp Leu		
20	25	30
<210> 3		
<211> 14		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 3		
Ala Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys		
1	5	10
<210> 4		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 4		
Asn Gln Phe Asp His Tyr Ser Lys Gln Asp Arg Cys Ser Asp Leu		
1	5	10
<210> 5		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 5		

Asn Gln Phe Asp His Tyr Ser Lys Gln Asp Arg Cys Ser Asp Leu

1 5 10 15

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Val His Trp Lys

1

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 与T14蛋白 (SEQ ID No:3) 交联的匙孔血蓝蛋白 (KLH) 蛋白

<400> 7

Cys Ala Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys

1 5 10 15

<210> 8

<211> 42

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

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

<210> 9

<211> 0

<212> DNA

<213> 智人

<400> 9

000

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys

1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys

1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys

1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys

1 5 10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys

1 5 10

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Ala Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys

1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp

1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp

1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp

1 5 10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp

1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Ala Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp

1 5 10

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

Lys Ala Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys Ala Glu

1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys Ala Glu Phe

1 5 10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 25

His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys Ala

1 5 10

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 26

Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys Ala Glu

1 5 10

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 27

Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys Ala Glu Phe

1 5 10

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys Ala

1 5 10

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 29

Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys Ala Glu Phe

1 5 10

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 30

Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys Ala

1 5 10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 31

His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys Ala Glu Phe

1 5 10

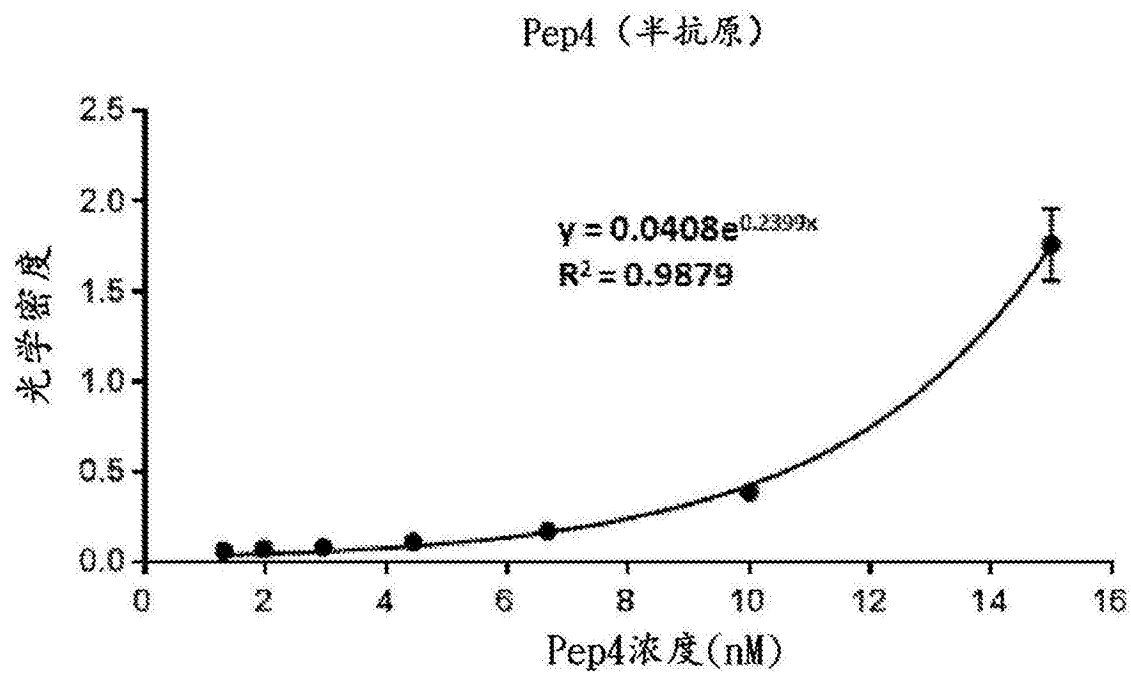


图1

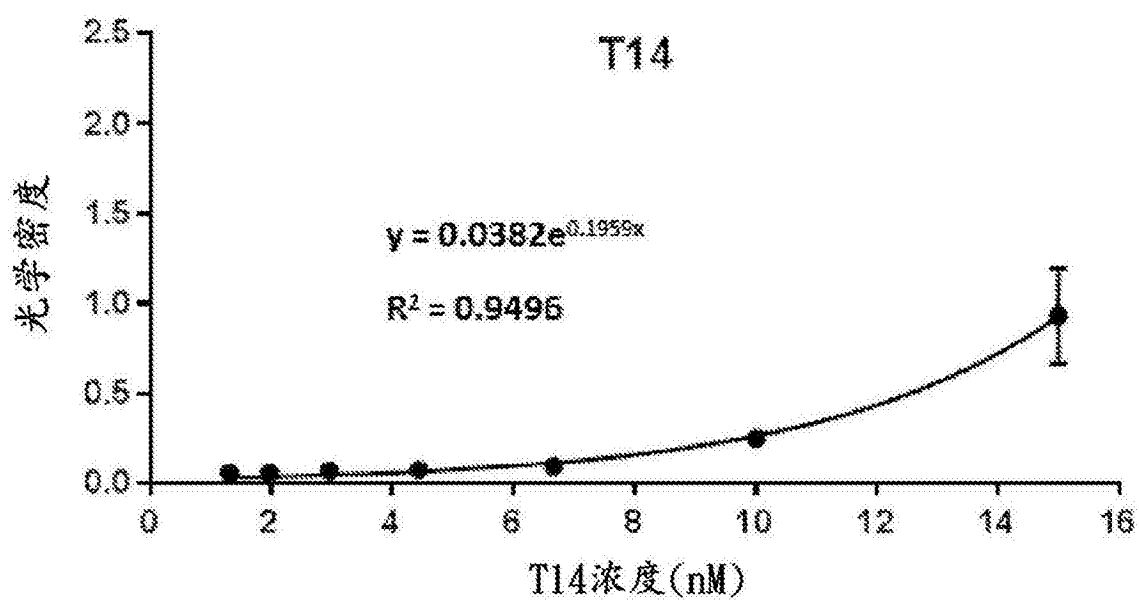


图2

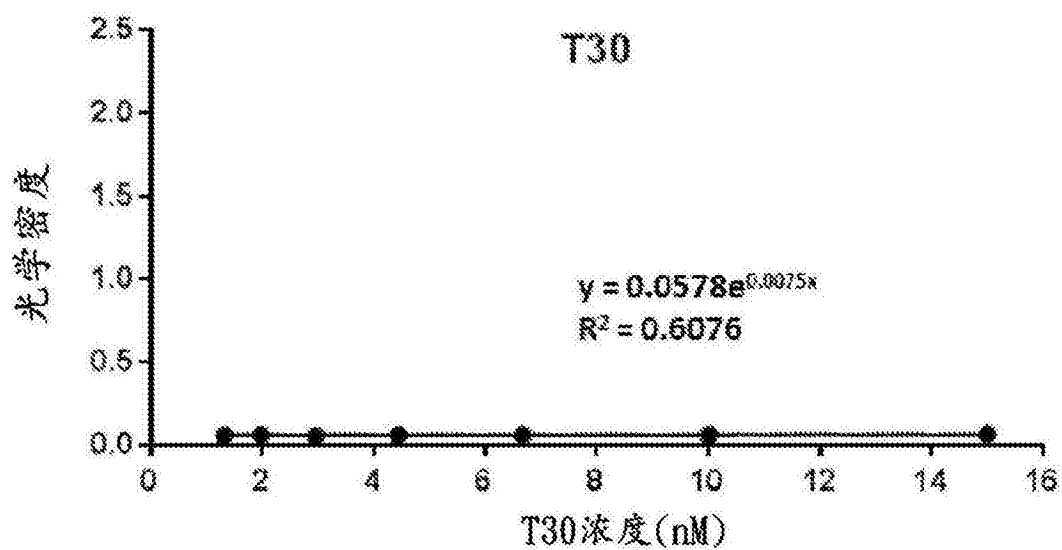


图3

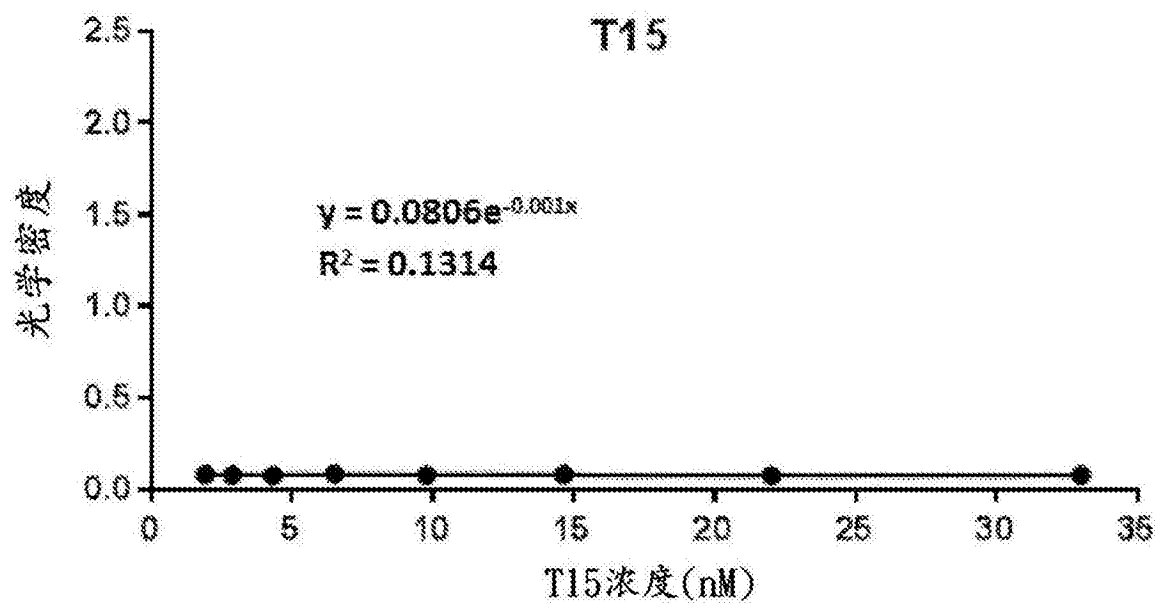


图4

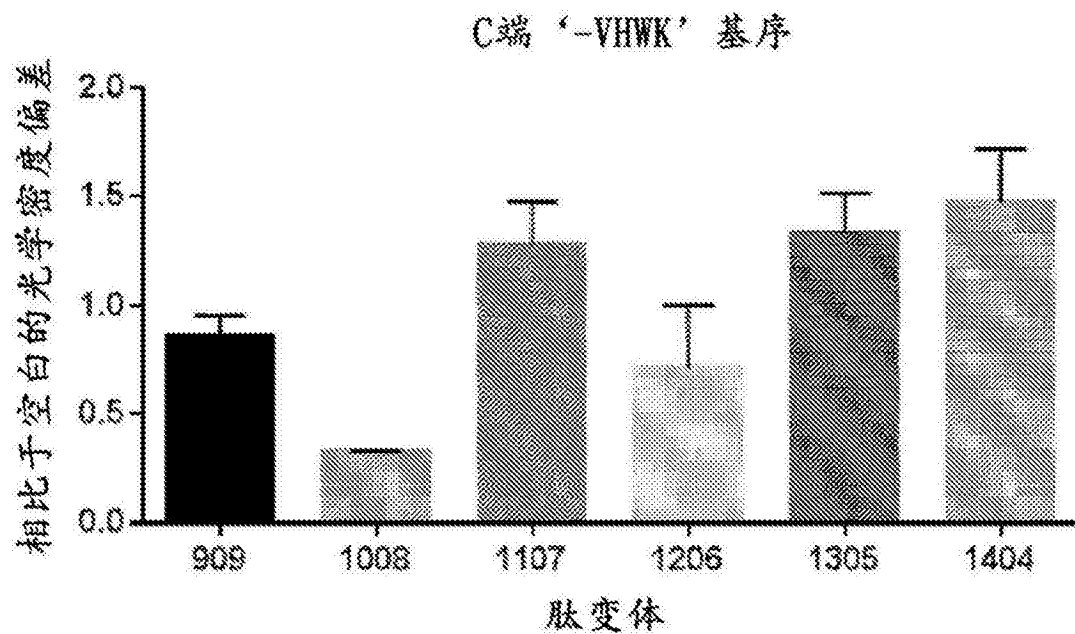


图5

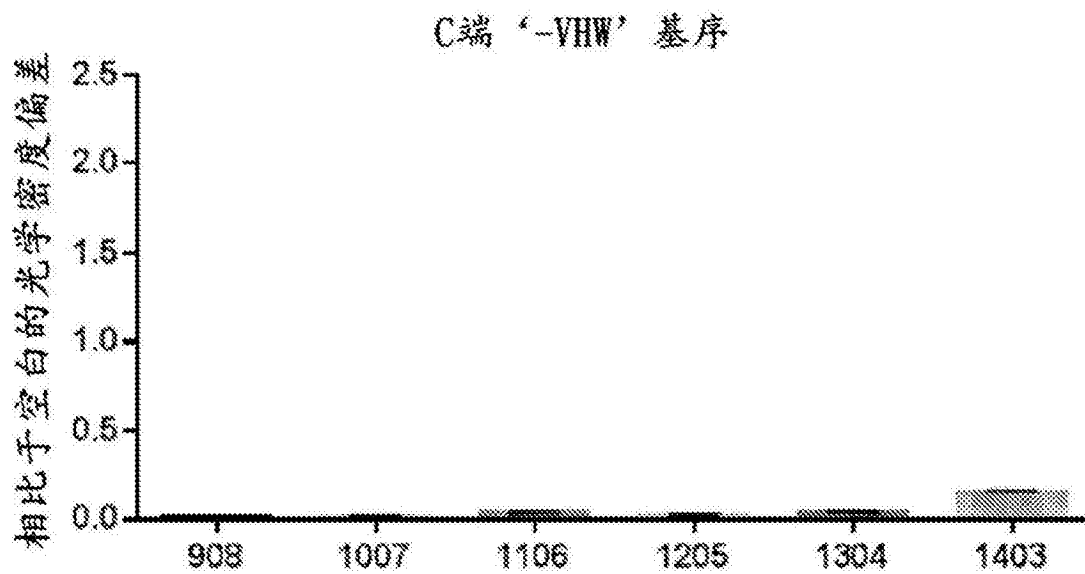


图6

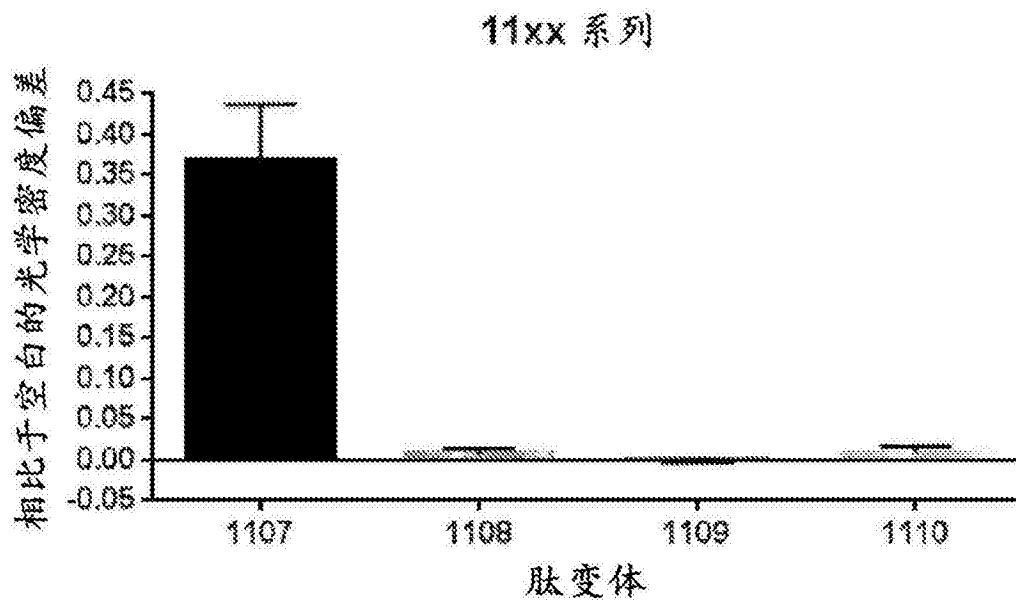


图7

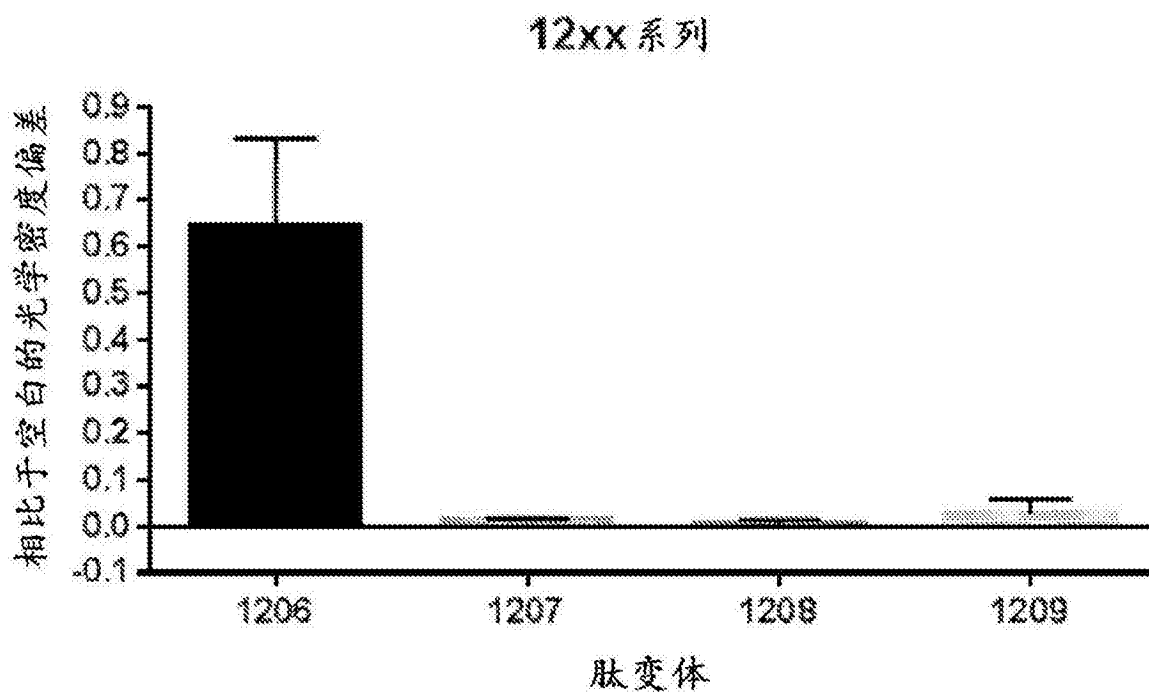


图8

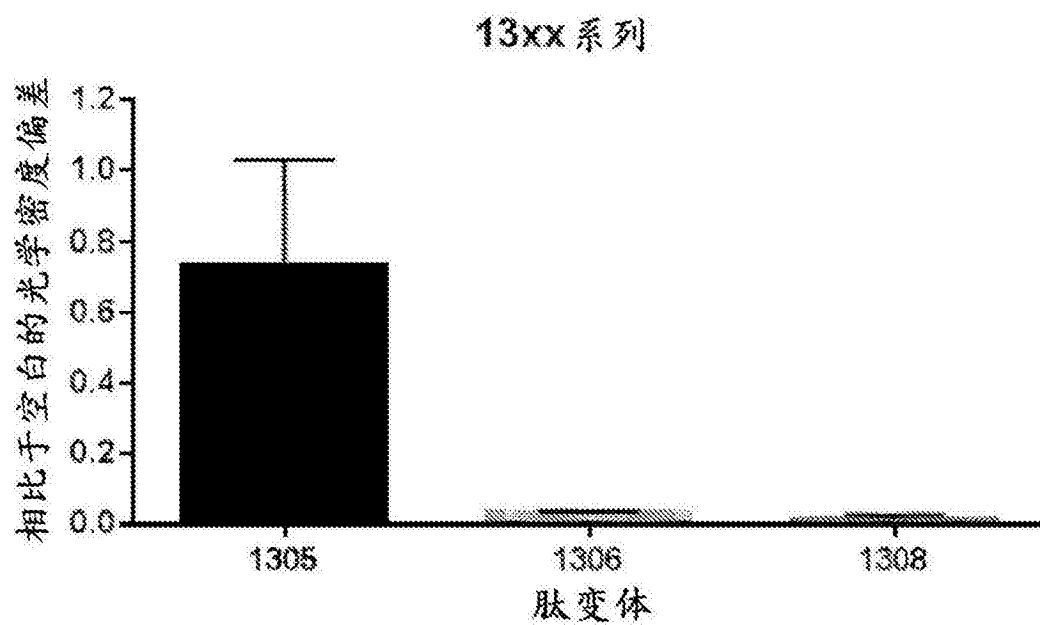


图9

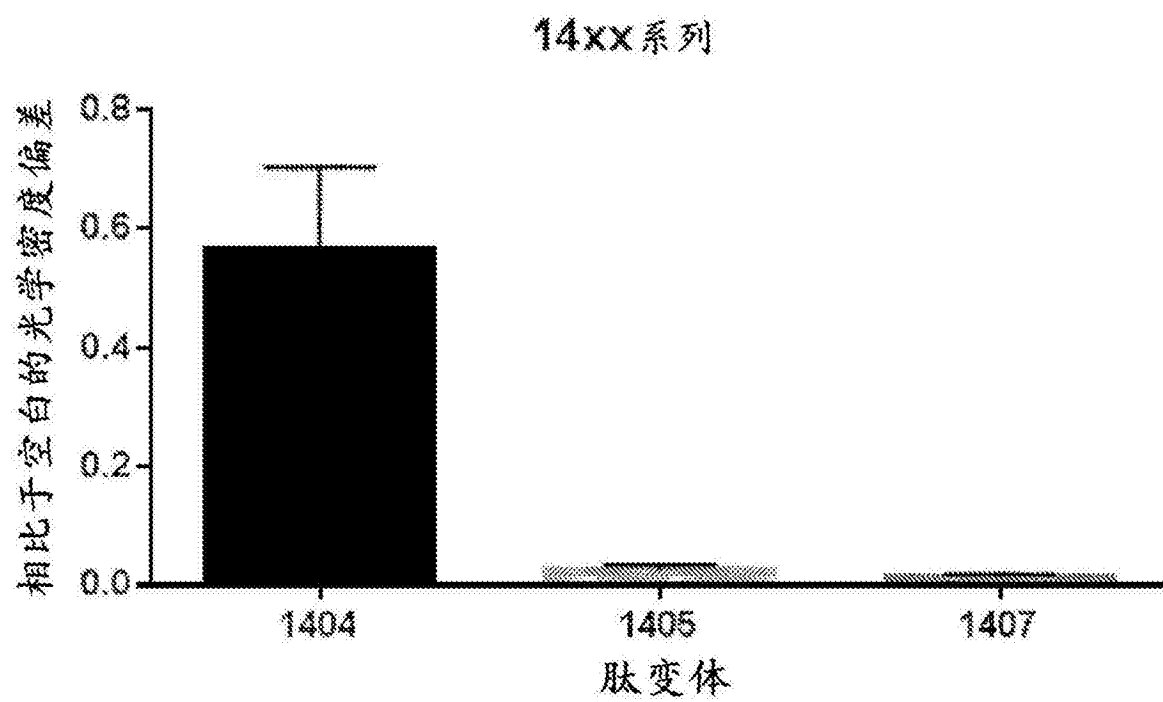


图10

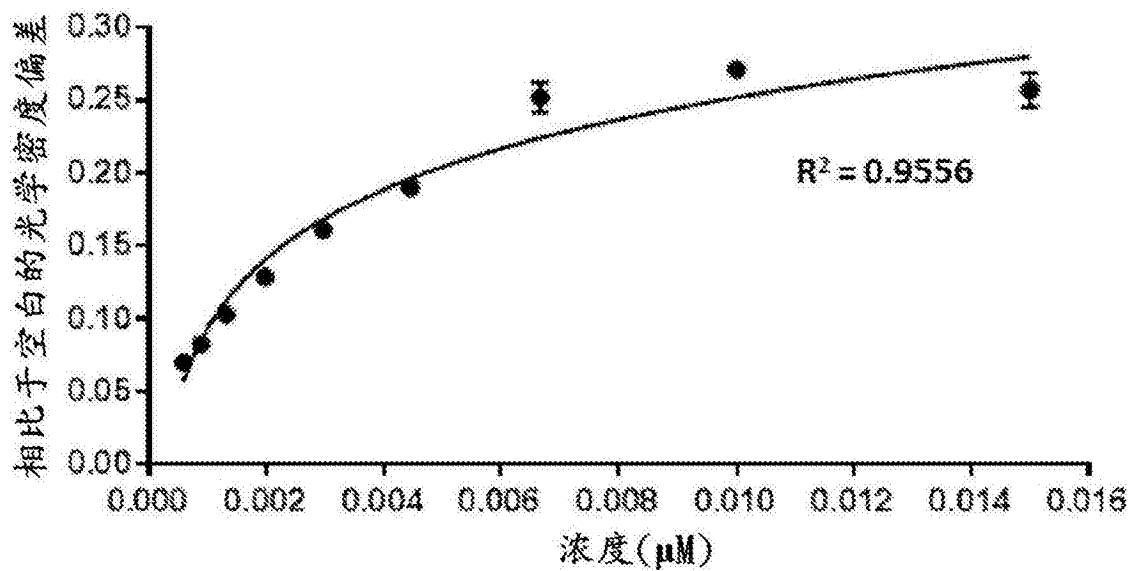


图11

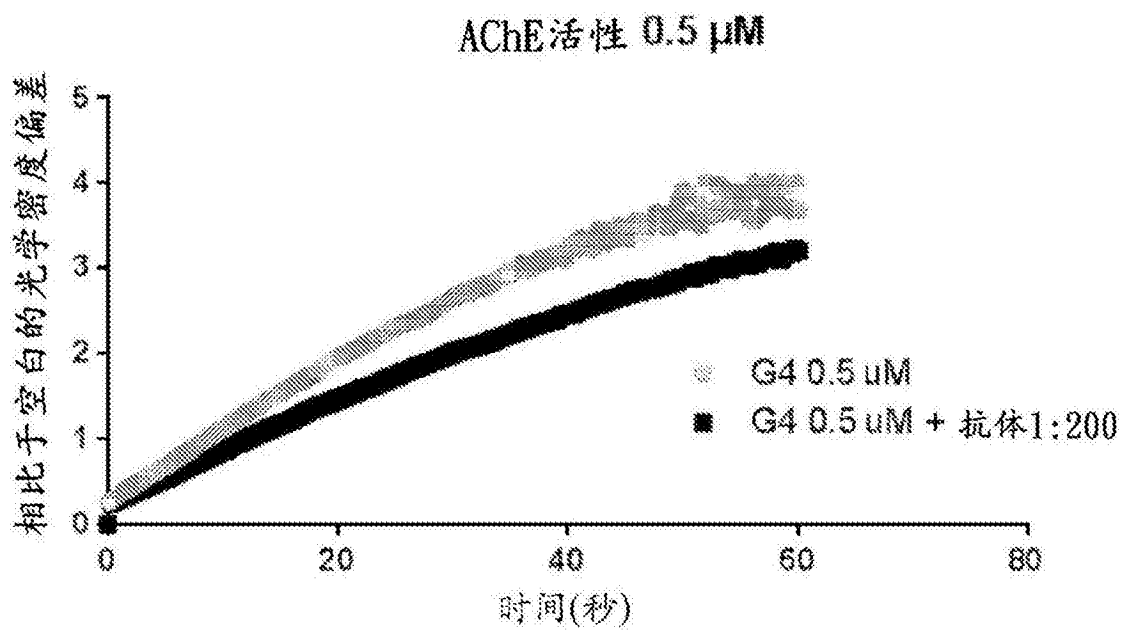


图12

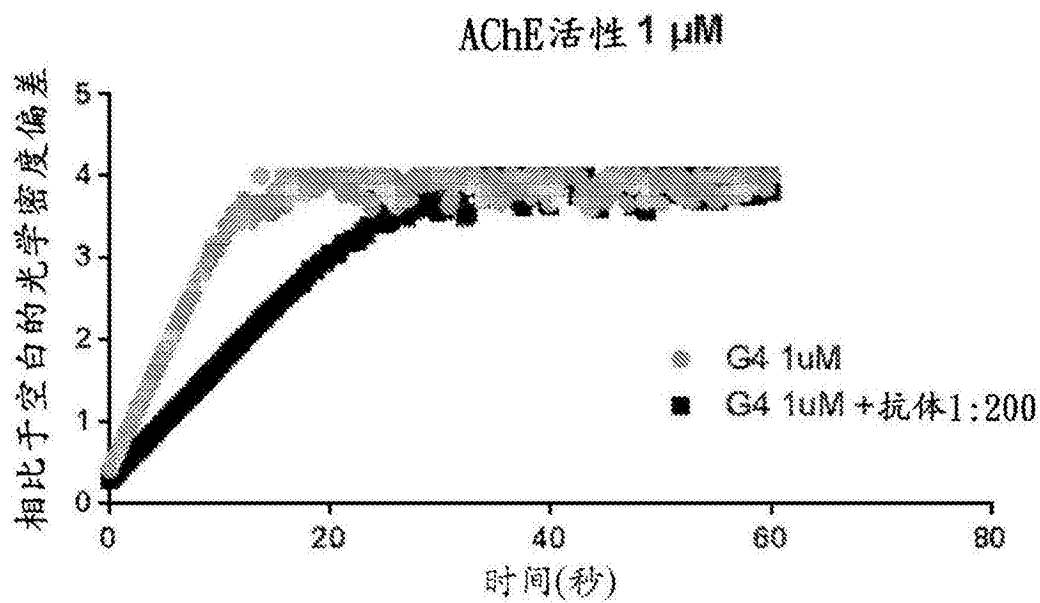


图13

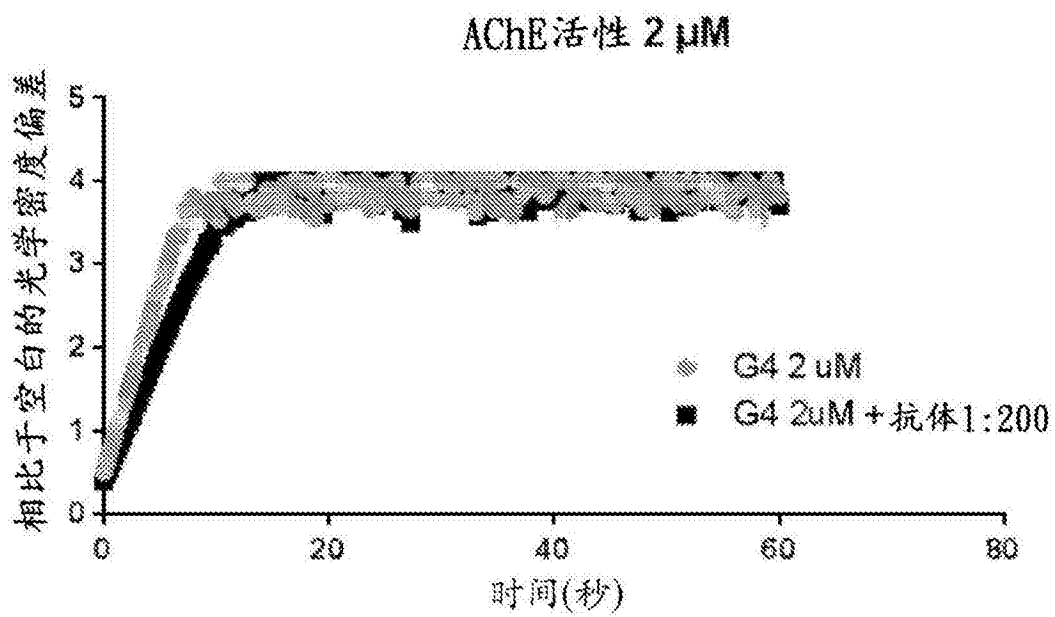


图14

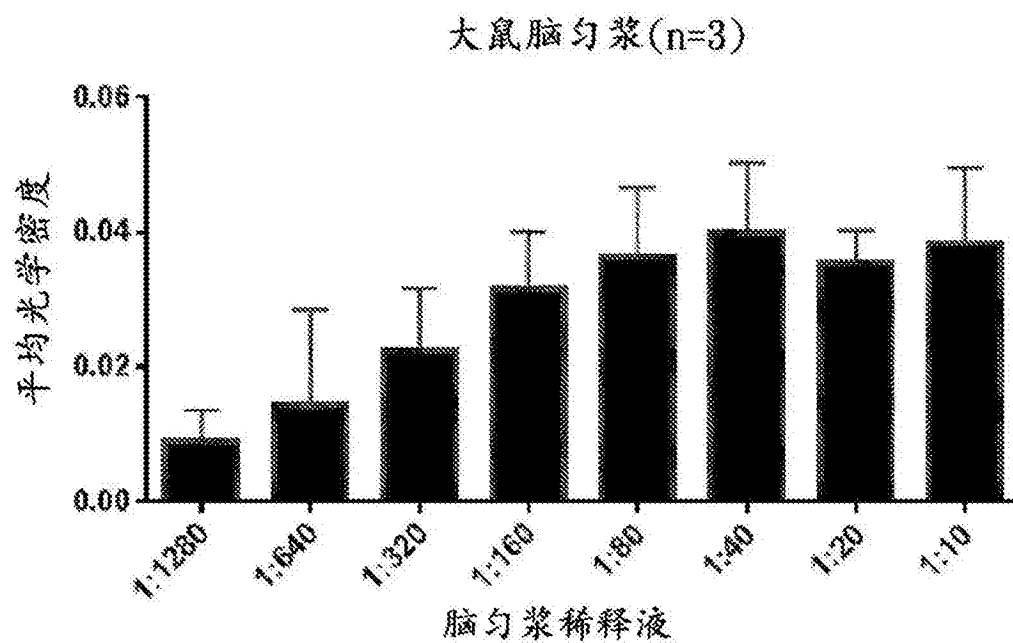


图15

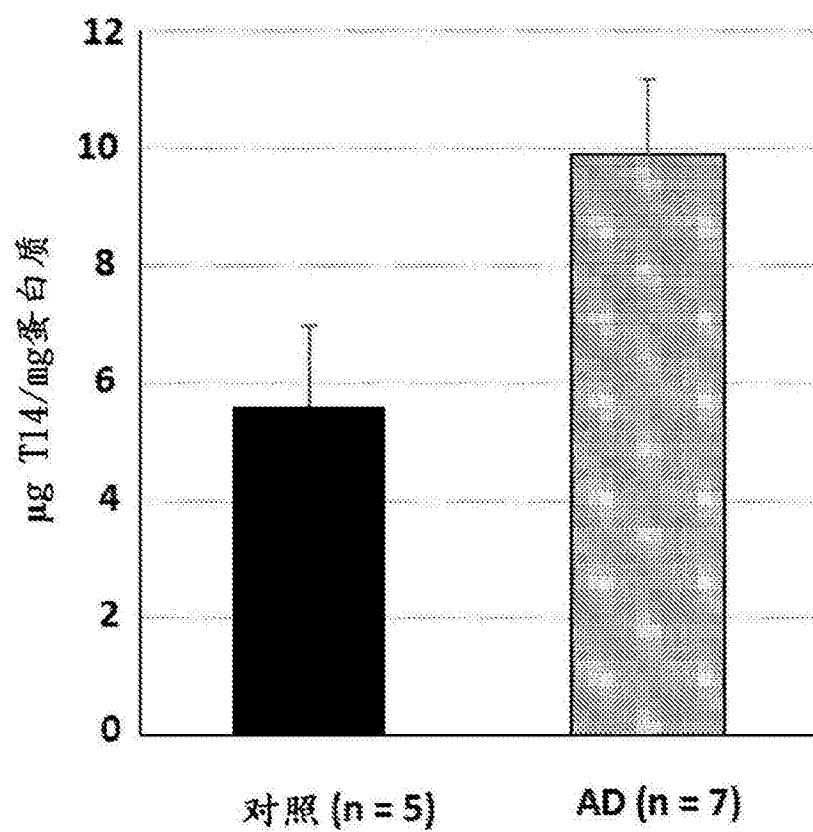


图16

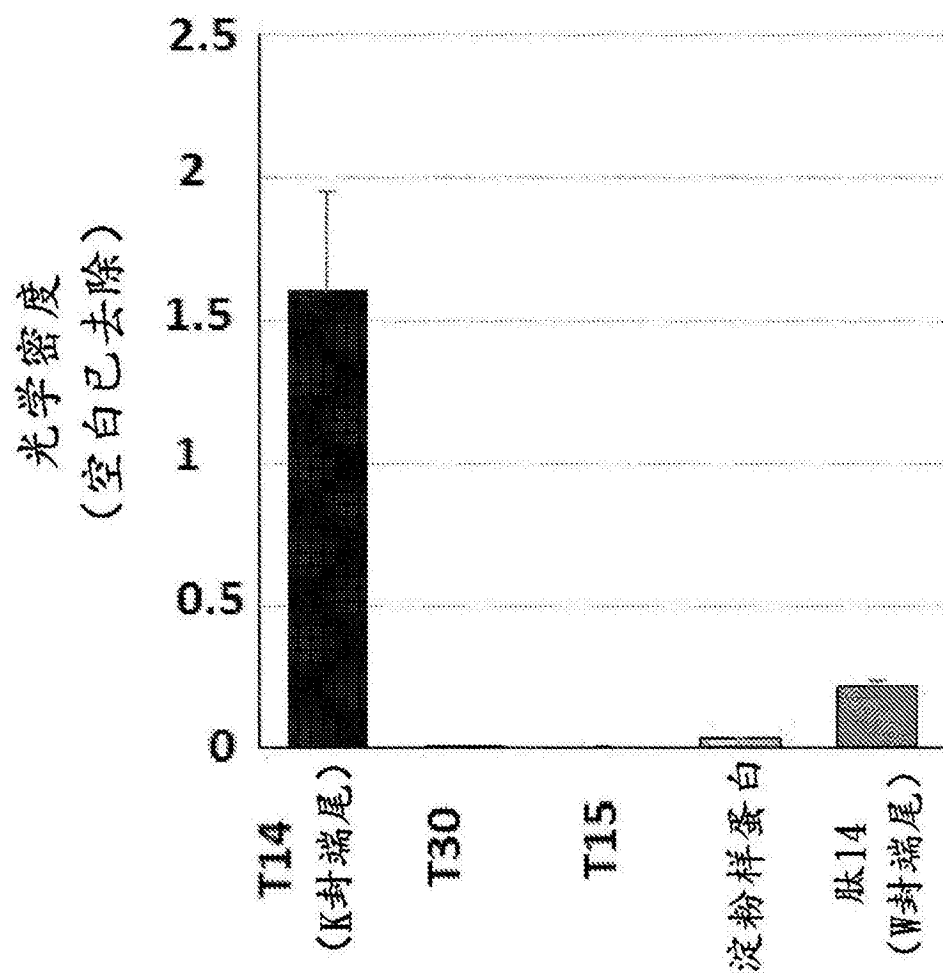


图17

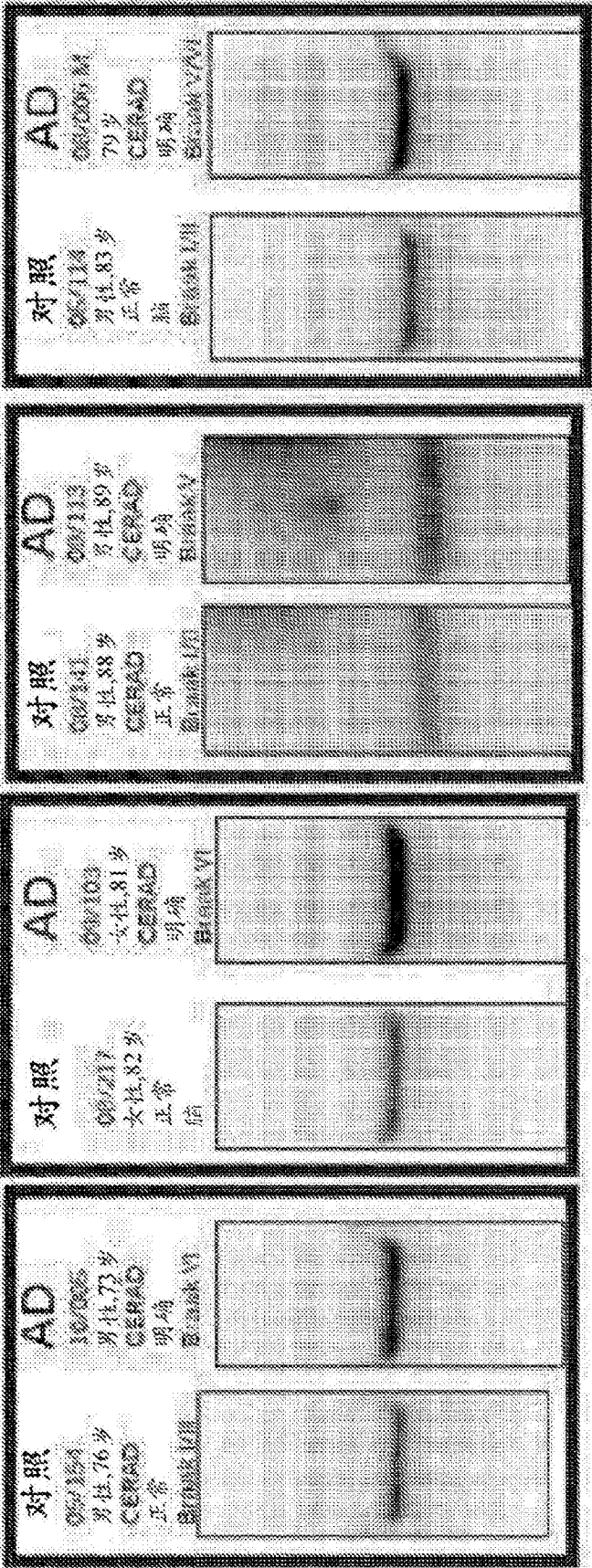


图18

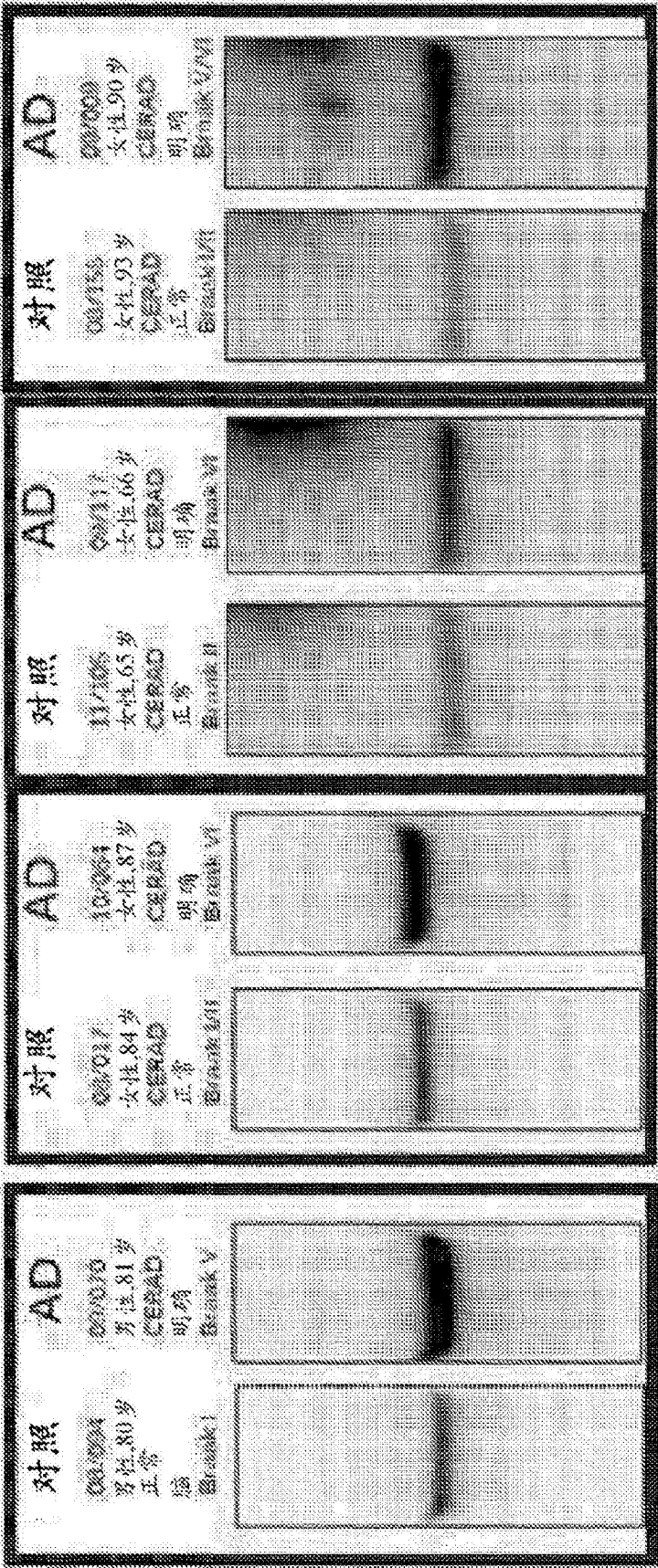


图18(续)

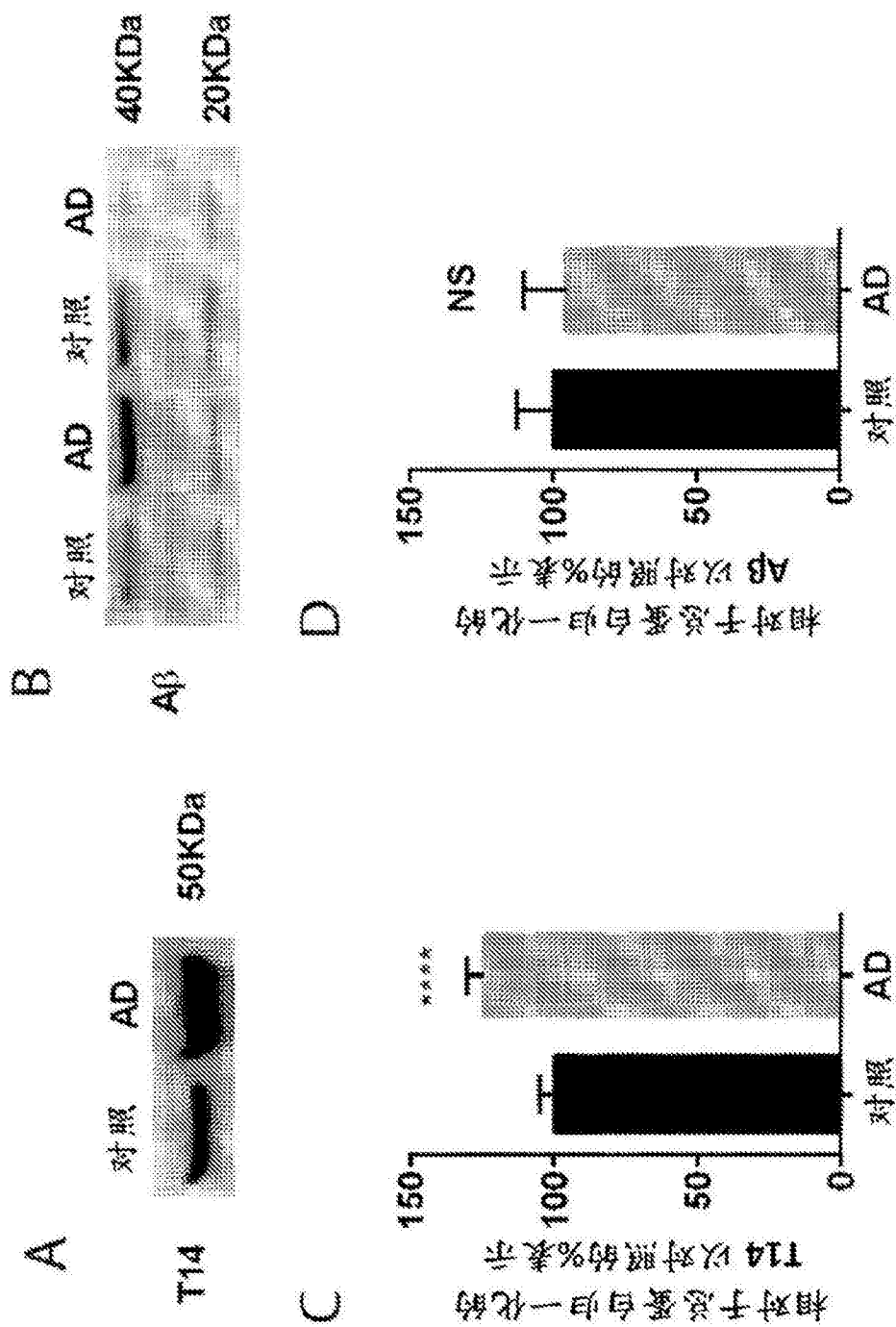


图19

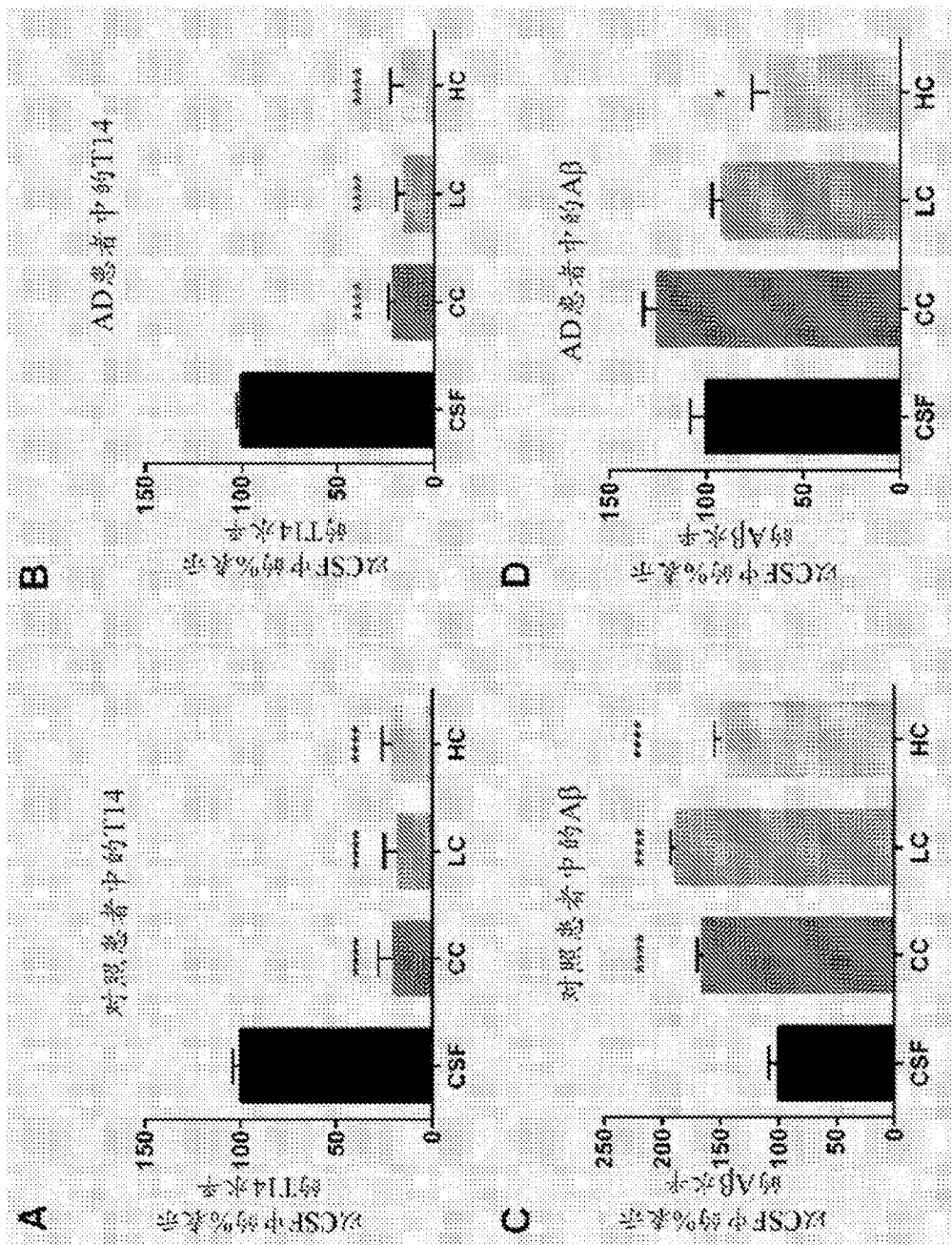


图20

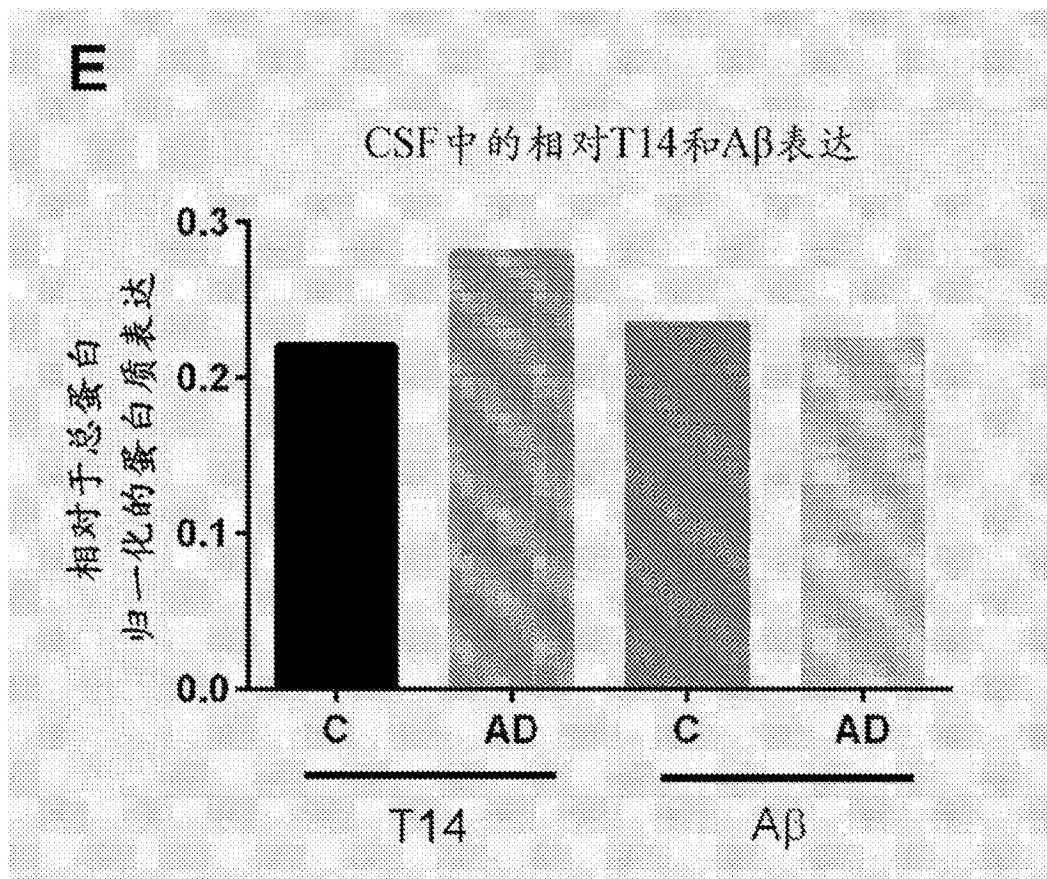


图20 (续)

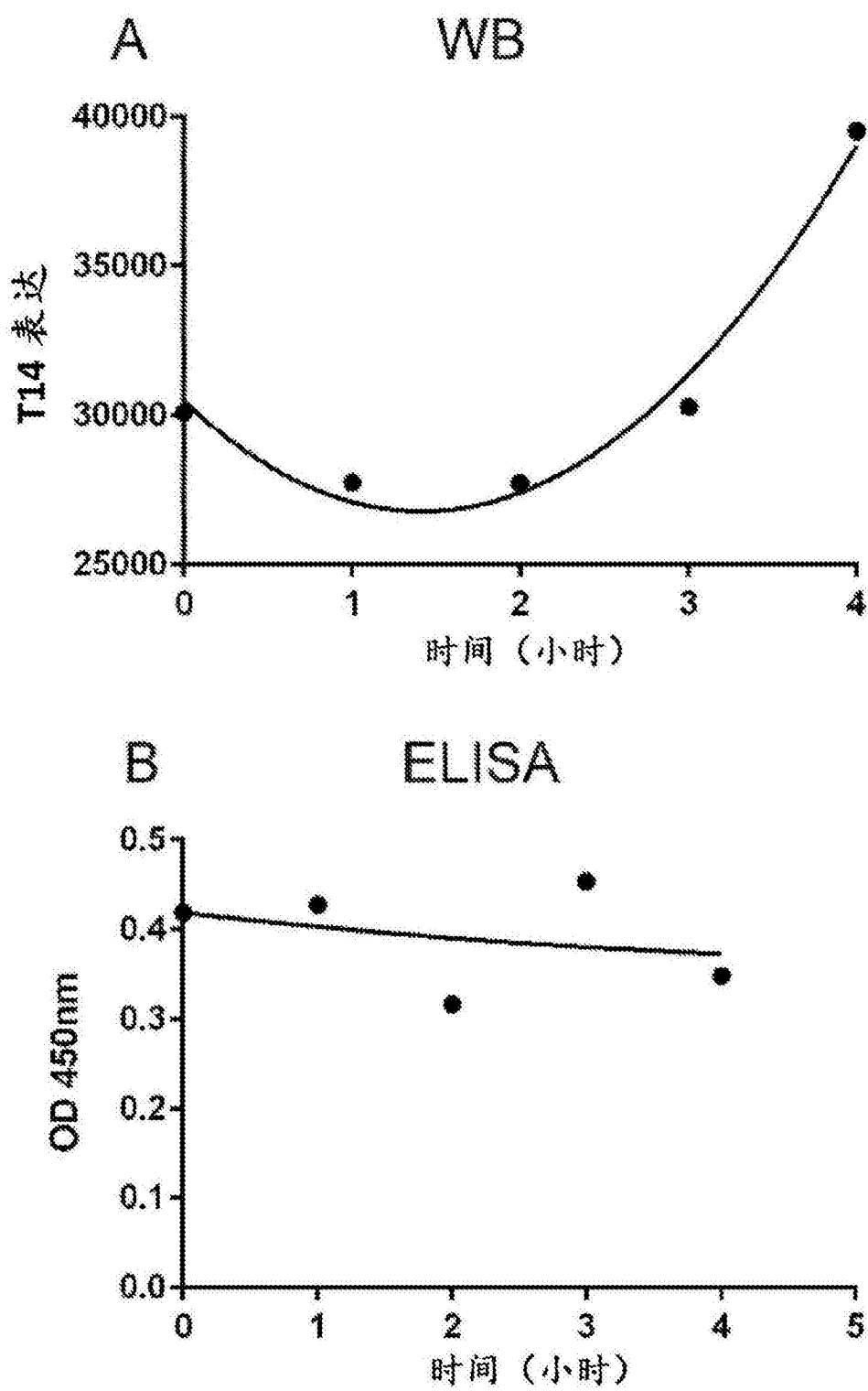


图21

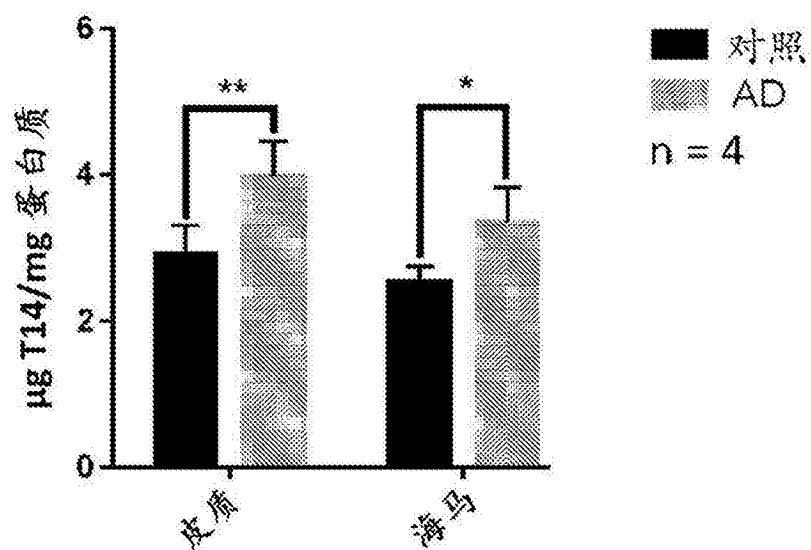


图22

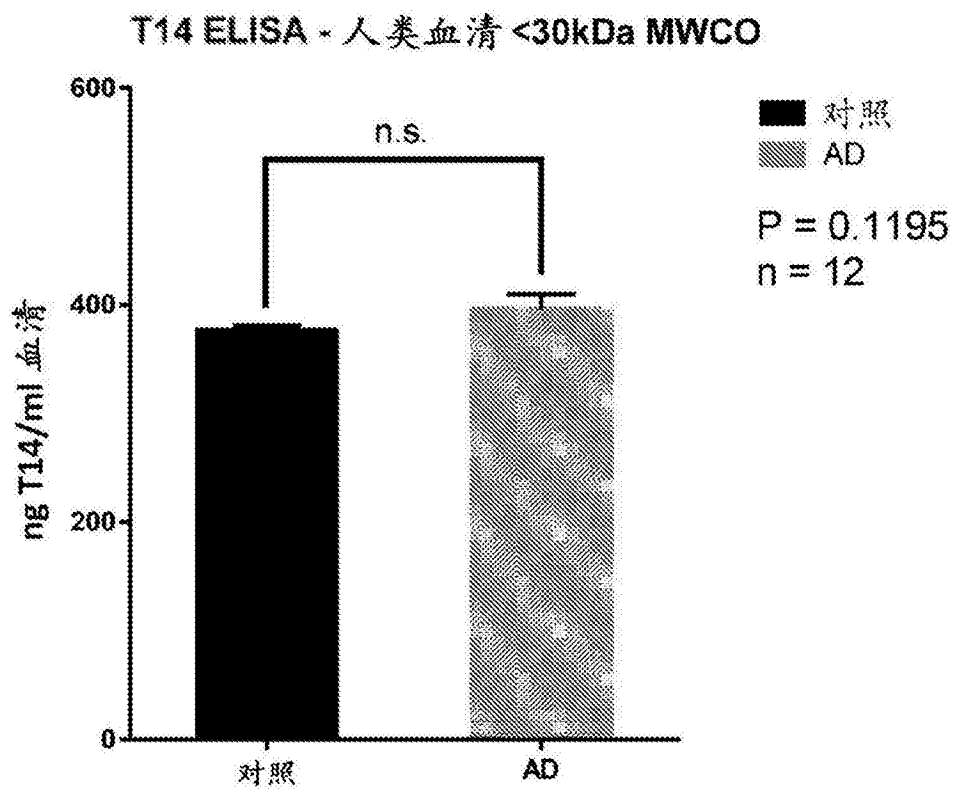


图23

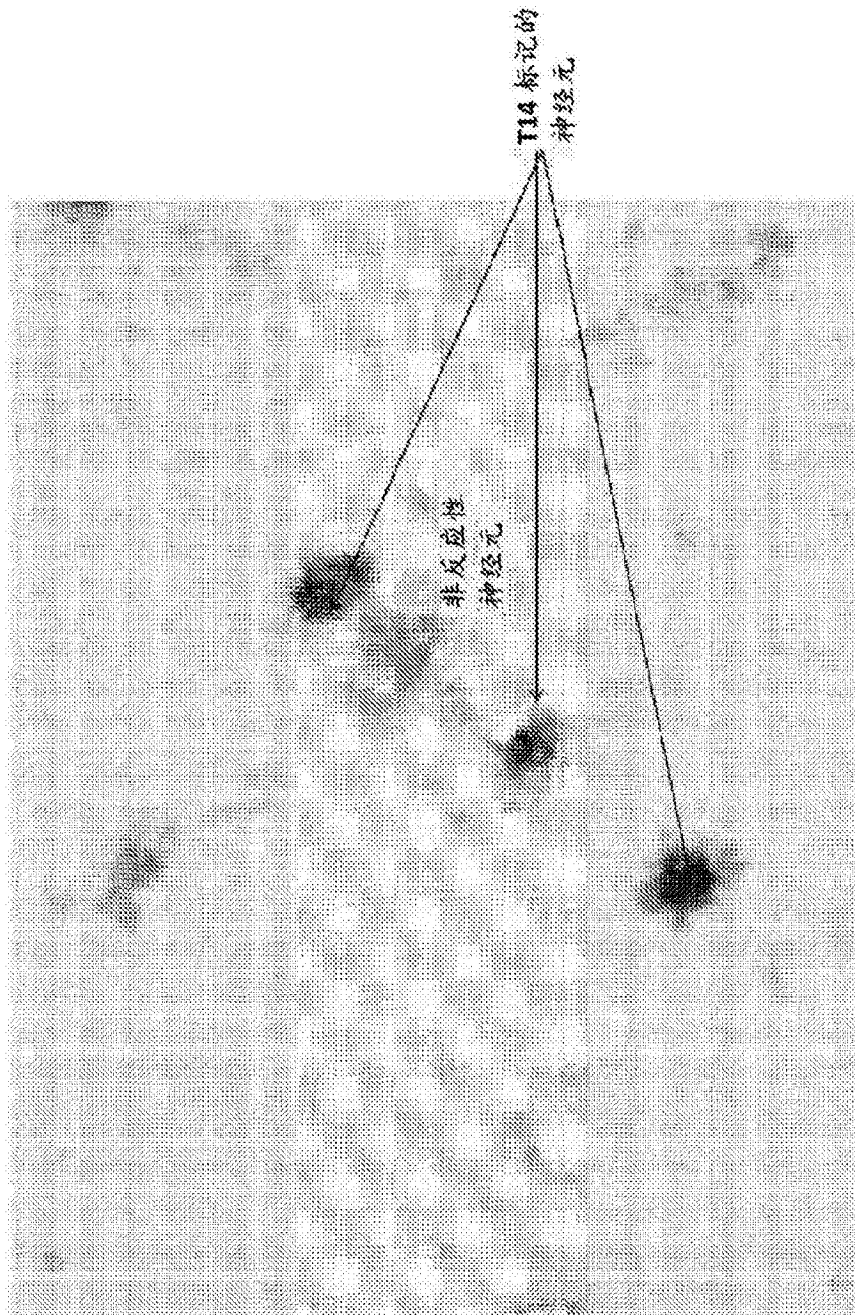


图24

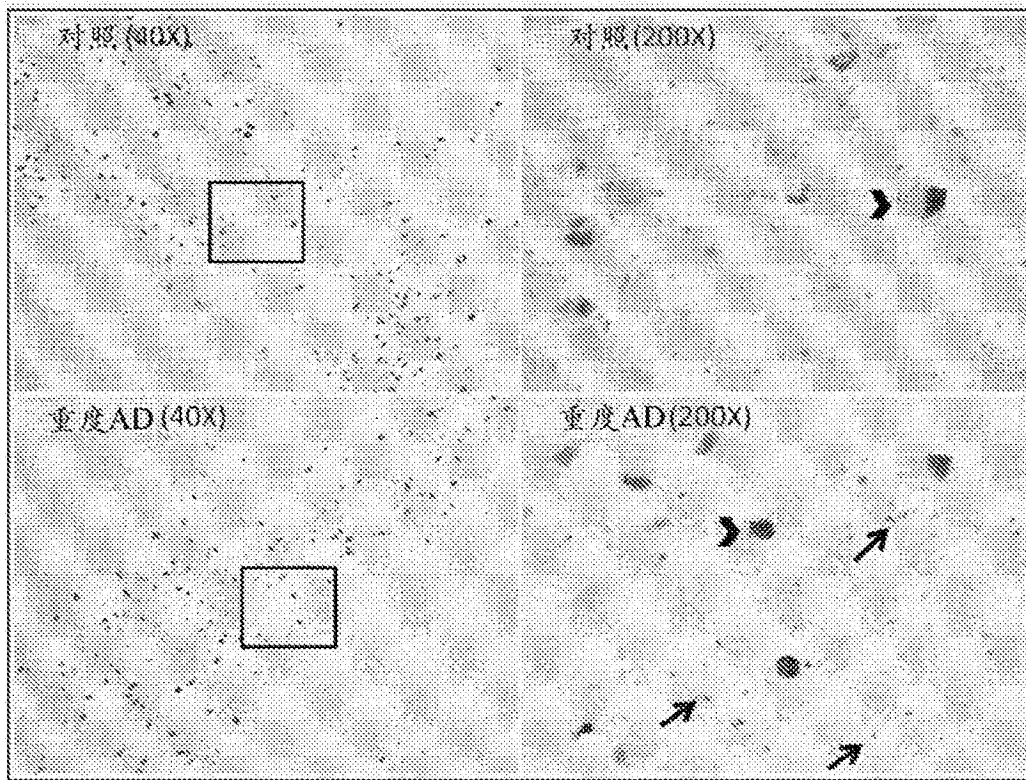


图25