



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101411876 B

(45) 授权公告日 2013.01.16

(21) 申请号 200810129893.4

A61P 25/28(2006.01)

(22) 申请日 2001.06.28

G07K 16/18(2006.01)

(30) 优先权数据

60/214,779 2000.06.28 US

60/242,177 2000.10.23 US

(56) 对比文件

WO 9927944 A1, 1999.06.10, 权利要求书, 说明书第 3-5, 7, 13, 14-20, 30, 32, 34, 48 页和实施例部分.

(62) 分案原申请数据

01813312.6 2001.06.28

审查员 吴立

(73) 专利权人 普拉纳生物技术有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

专利权人 综合医院有限公司

(72) 发明人 A·布什 R·彻尼 R·E·坦兹

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 陈轶兰

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 22 页

(54) 发明名称

神经毒性寡聚体

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗或减轻阿尔茨海默氏病和其它与异常蛋白聚集有关的病症的方法和组合物。具体地说,本发明涉及用于阿尔茨海默氏病、帕金森病和内障的免疫疗法的方法和组合物。一方面本发明提供了预防、治疗或减轻病症的方法,所述病症特征在于与氧化性损伤有关的特定蛋白的病理性聚集和蓄积以及形成酪氨酸交联,该方法包括以下步骤:用免疫有效剂量的一种或多种酪氨酸交联的化合物,任选还包含与所述化合物络合的铜离子,对需要这种治疗的对象进行免疫。或者可以采用针对酪氨酸交联的化合物的被动免疫。还公开并要求保护预防性或治疗性组合物和诊断方法。

1. 包含酪氨酸交联键的 A β ₉₋₁₆ 寡聚体用于制备诱导对含有酪氨酸交联键的 A β 寡聚体特异性的抗体应答以治疗或预防阿尔茨海默氏病的药物的用途。
2. 权利要求 1 的用途,其中所述 A β ₉₋₁₆ 寡聚体与本身具有免疫原性的载体蛋白偶联。
3. 权利要求 2 的用途,其中所述载体蛋白选自破伤风类毒素、匙孔血蓝蛋白和白蛋白。
4. 权利要求 1-3 任一项的用途,其中所述 A β ₉₋₁₆ 寡聚体与佐剂一起施用。
5. 权利要求 1-4 任一项的用途,其中所述 A β ₉₋₁₆ 寡聚体是来源于在人 A β ₉₋₁₆ 的氨基酸序列中酪氨酸 10 周围序列的酪氨酸交联肽。
6. 特异性针对来源于在人 A β ₉₋₁₆ 的氨基酸序列中酪氨酸 10 周围序列的酪氨酸交联肽的抗体或抗体片段在制备用于治疗阿尔茨海默氏病的药物中的用途。
7. 权利要求 6 的用途,其中所述抗体或抗体片段特异性针对具有所述酪氨酸交联键的 A β 寡聚体。
8. 权利要求 6 或 7 的用途,其中所述抗体是多克隆的。
9. 权利要求 6 或 7 或 8 的用途,其中所述抗体来源于人。
10. 权利要求 6 或 7 的用途,其中所述抗体是单克隆的。
11. 用作药物的预防性或治疗性组合物,其包含权利要求 1 中所定义的酪氨酸交联的 A β ₉₋₁₆ 寡聚体或权利要求 6 或 7 中所定义的抗体或抗体片段,以及可药用载体。
12. 权利要求 11 的预防性或治疗性组合物,还包含佐剂。

神经毒性寡聚体

[0001] 本申请是申请日为 2001 年 6 月 28 日、发明名称为“神经毒性寡聚体”的中国发明专利申请 No. 01813312.6 的分案申请。

[0002] 发明领域

[0003] 本发明涉及治疗或减轻阿尔茨海默氏病和其它与异常蛋白聚集有关的病症的方法和组合物。具体地说,本发明涉及用于阿尔茨海默氏病、帕金森病和内障的免疫疗法的方法和组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 阿尔茨海默氏病 (AD) 特征性的淀粉样病变主要由淀粉状蛋白 β ($A\beta$) 组成 (Glennner&Wong, 1984), 这是一种在生物液体中发现的通常可溶的含 39-43 个氨基酸的蛋白。淀粉状蛋白形成与该疾病的发病机理相关联, 因此鉴定导致 $A\beta$ 分解代谢受到抑制及其在新皮质中蓄积的神经化学改变会对 AD 的发病机理提供重要的线索。

[0006] 尽管与 AD 相关的基础病理学、遗传易感性和生物学正变得越来越清楚, 开发预防或治愈该疾病的有效药物的合理的化学和结构基础仍难以捉摸。尽管 AD 的遗传学表明 $A\beta$ 的代谢与该疾病的发病机理密切相关, 如上所述, 迄今为止治疗 AD 的药物集中在“认知增强剂”, 其并不针对潜在的疾病过程。这些药物只获得了有限的成功。

[0007] 在 AD 中扰乱的神经化学环境的性质可从淀粉状蛋白 $A\beta$ 的翻译后修饰部分地推断出。从生物体系提取的 $A\beta$ 通常在十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳上作为表观 ~4kD 的单体迁移 (SDS-PAGE; (Shoji 等, 1992)); 然而, 从 AD 患者死后脑标本中提取的 $A\beta$ 在 SDS-PAGE 上作为 SDS-、尿素 - 和甲酸 - 抗性寡聚体迁移 (Masters 等, 1985; Roher 等, 1996; Cherny 等, 1999)。

[0008] 对这些从神经炎斑和血管淀粉状蛋白提取的 SDS- 抗性寡聚体进行的矩阵协助的激光解吸离子化 - 质谱分析 (MALDI-MS) 表明存在共价交联的二聚和三聚 $A\beta$ 种类 (Roher 等, 1996)。

[0009] 合成的 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 通常在 SDS-PAGE 上作为表观单体迁移, 但经温育形成更高表观分子量的种类 (Burdick 等, 1992)。该过程通过暴露于氧化体系而加速 (Dyrks 等, 1992; Atwood 等, 1997)。

[0010] 已提出酪氨酸交联作为体内 $A\beta$ 寡聚反应的一种机制, 因为在合成的人 $A\beta$ 中的酪氨酸残基可通过过氧化物酶催化的氧化体系而交联 (Galeazzi 等, 1999)。作为大鼠 $A\beta$, 与人 $A\beta$ 不同, 缺乏酪氨酸残基 (Atwood 等, 1997), 因此它对金属催化的氧化寡聚反应耐受, 而这可能解释了在这些动物中淀粉状蛋白沉积的罕见 (Vaughan 和 Peters, 1991)。

[0011] 蛋白中的酪氨酸交联是氧化应激的敏感标志。在单一酪氨酸残基和 / 或二酪氨酸残基之间形成共价碳 - 碳桥或碳 - 氧桥, 产生多种稳定的发荧光的反应产物 (Gross 和 Sizer, 1959; Amado 等, 1984; Jacob 等, 1996)。游离酪氨酸基团的主要反应产物是强荧光的氨基酸 3,3'-二酪氨酸 (DT)、3,3',3'-三酪氨酸 (TT) 和 pulcherosine (P), 以及无荧光的异二酪氨酸 (iso-DT) (Gross 和 Sizer, 1959; Amado 等, 1984; Jacob 等, 1996; Heinecke 等, 1993)。与正常脑的相同区域相比, DT 和 3-硝基酪氨酸水平在 AD 患者脑的海马和新皮质

区域中升高,并且在AD患者的脑室脑脊液中也升高(Hensley等,1998)。

[0012] 酪氨酸交联在其它神经变性疾病如帕金森病和其它 α -synuclein fibrils 沉积的病症中可能也是重要的。这些疾病和病症包括帕金森病本身、伴雷维小体形成的痴呆、多系统萎缩、哈-施病和弥漫性雷维小体病。重组 α -synuclein 接触硝化剂导致酪氨酸残基的硝化以及酪氨酸的氧化以形成DT;这导致 α -synuclein 的交联以形成稳定的聚集物(Souza等,2000)。同一作者还发现针对硝化的synuclein产生的单克隆抗体特异性结合在多种synucleinopathies中的雷维小体和神经胶质细胞内含物(Duda等,关于制备参见Souza等,2000)。

[0013] 我们现已发现源自人淀粉状蛋白的 $A\beta$ 含有酪氨酸交联,并同时包括二酪氨酸和三酪氨酸交联的种类。这些交联可以在体外复制,例如通过将合成的人 $A\beta$ 与过氧化物酶和 H_2O_2 一起温育,或与 H_2O_2 在铜离子的存在下一起温育。这些修饰是耐受蛋白酶的,因而我们提出在AD中由 $A\beta$ 与 H_2O_2 和过氧化物酶或铜离子的异常相互作用引起的酪氨酸交联促成神经毒性 $A\beta$ 寡聚体的形成,以及 $A\beta$ 的沉积。因此可以使用针对低分子量酪氨酸交联的化合物而不是整个 $A\beta$ 的免疫来治疗或预防AD,而没有引发自身免疫并发症的风险,后者可能由用完整 $A\beta$ 或其大片段进行免疫而诱导。通过将免疫疗法的目标靶限制到所述分子的异常片段或部分,可以将对该分子的正常功能造成的不良干扰降至最低,同时提供针对异常分子的积极治疗。应理解可以使用主动或被动免疫。

[0014] 引起蛋白通过酪氨酸发生共价交联的氧化过程还与其它特征在于特定蛋白病理性聚集和蓄积的病症有关。因此认为这些病症也可用本发明的方法预防或治疗。

[0015] 应明确尽管在此参考了多篇现有技术文献,这种引用并不表示承认这些文献中的任何一篇构成澳大利亚或任何其它国家中的部分公知常识。

[0016] 发明概述

[0017] 一方面,本发明提供了预防、治疗或减轻病症的方法,其中所述病症特征在于与氧化损伤相关的特定蛋白的病理性聚集和蓄积以及形成酪氨酸交联,所述方法包括以下步骤:用免疫有效剂量的一种或多种选自以下的化合物:二酪氨酸、三酪氨酸、四酪氨酸(也称为pulcherosine)、氧化的酪氨酸正源物如邻-酪氨酸和间-酪氨酸、硝基酪氨酸和含有酪氨酸交联的肽,任选还包含与所述化合物络合的铜离子,对需要治疗的对象进行免疫。这些化合物在此统称为“酪氨酸交联的化合物”。

[0018] 本领域普通技术人员会认可所述化合物的免疫有效剂量是会引发产生能与酪氨酸交联的化合物结合的抗体的剂量。该技术人员也能确定特定的酪氨酸交联的化合物是否引起抗体产生。

[0019] 在优选的技术方案中,病理性聚集形式的特定蛋白包含酪氨酸交联的部分。在特别优选的技术方案中,所述酪氨酸交联的化合物是一种肽,它是病理性聚集形式的特定蛋白的免疫原性部分,所述肽包含与交联的酪氨酸的上游和下游残基相连接的交联的酪氨酸部分。

[0020] 在优选的技术方案中,所述酪氨酸交联的化合物是二酪氨酸交联的化合物。

[0021] 每当量二酪氨酸可以使用多至3当量的铜,条件是施用的每一剂含不超过 $1\mu M$ 的铜。

[0022] 用于免疫的化合物任选与载体蛋白偶联,所述载体蛋白本身具有免疫原性,如破

伤风类毒素、匙孔血蓝蛋白或白蛋白。还任选所述化合物可以与佐剂一起施用,如明矾、单磷脂、胞壁酰肽、诸如 QS21 的 iscom 之类。本领域的技术人员清楚知道合适的载体和佐剂。

[0023] 使用含有酪氨酸交联的肽时,优选与病症相关的特定蛋白的最小的且具有免疫原性的部分,其由与交联的酪氨酸的上游和下游残基相连的二酪氨酸部分构成。当所述病症是阿尔茨海默氏病时,优选所述包含酪氨酸交联的肽来源于在人 A β ₁₋₄₀ 或 A β ₁₋₄₂ 的氨基酸序列中酪氨酸 10 周围的序列。

[0024] 在本发明的所有方面,当使用含有酪氨酸交联的肽时,优选所述酪氨酸交联可通过在铜离子存在下的氧化而得到。

[0025] 更优选所述肽还包含与二酪氨酸络合的铜离子。

[0026] 可以通过任何便利的途径进行免疫,包括皮下、肌肉或静脉内注射,涂敷至粘膜表面,或局部应用,例如药膏。

[0027] 所述化合物的给药剂量会取决于以下因素而不同:个体化合物的性质、患者的体重、年龄和一般健康状况以及是否使用佐剂。预计剂量将在 0.1 μ g 至 200mgDT 的范围内,更优选 1-50mg,最优选 10-20mg。尽管可以给予单次免疫,优选进行多次免疫,例如一周一次进行 1-12 个月,更优选进行 4 个月。在 6-12 个月之后可以给予加强系列。通过测定 DT 抗体监测免疫应答;可以采用任何便利的测定体系,如 ELISA。

[0028] 在任选的技术方案中,所述方法还包括以下的额外步骤:鉴定在病理性聚集的特定蛋白中酪氨酸交联的占优势形式;并合成一种或多种包含一种或多种占优势形式的酪氨酸交联的酪氨酸交联的化合物。

[0029] 在本发明的这一方面的或选形式中,免疫可以是被动的。因而本发明提供了预防、治疗或减轻病症的方法,其中所述病症特征在于与氧化性损伤相关的特定蛋白的病理性聚集和蓄积,并且其中所述病理性聚集形式的特定蛋白包含酪氨酸交联,所述方法包括向需要这种治疗的对象施用有效量的抗体或抗体片段的步骤,

[0030] 所述抗体或抗体片段是针对酪氨酸交联的化合物产生的,

[0031] 所述化合物是病理性聚集形式的特定蛋白的免疫原性部分并且包含酪氨酸交联,

[0032] 并且所述抗体或抗体片段能特异性结合该病理性聚集形式的特定蛋白。

[0033] 所述抗体可以是多克隆或单克隆的。当抗体是多克隆抗体时,优选其来源于人,并可以例如来源于正常健康个体的混合人血清。或者可以使用来自对酪氨酸交联的化合物进行过超免疫的个体的血清。超免疫方案在本领域中是已知的。所述抗体可以通过任何便利的方法从血清中分离;在本领域中已知多种合适的方法。当所述抗体是单克隆抗体时,优选将其人源化。很好理解抗体的抗原结合片段,如 F(ab')、F(ab')₂、Fv 或单克隆 scFv 在本发明的范围之内。产生和纯化多克隆抗体和单克隆抗体的方法以及重组产生人源化单克隆抗体或 scFv 片段的方法,在本领域中广为人知。参见例如 Harlow 和 Lane (1988); W090/07861;和 W092/01047。人源化单克隆抗体也可以在转基因哺乳动物中产生;参见例如 W091/10741 和 W093/12227。

[0034] 优选所述抗体特异性地与病理性聚集形式的特定蛋白发生反应,而不与未聚集形式的该蛋白发生显著的反应。

[0035] 在主动或被动免疫之后,监测患者的临床改善情况,这可以在短至 1 周之内开始,

但更通常可以在 6 周时观察到,并可长达 12 个月。采用在监测患有相关病症患者中所用的常规临床指征。参与的临床医生会知道最适合采用的测试。

[0036] 当治疗是预防性的时,监测患者发生病症的征象。患者可以是由于遗传连锁而具有患病危险,例如在家族性阿尔茨海默氏病或亨廷顿舞蹈病中。

[0037] 因此,本发明在第二方面提供了用于本发明方法中的预防性或治疗性组合物,其包含酪氨酸交联的化合物,以及可药用载体,并任选还包含佐剂,和 / 或与所述化合物络合的铜离子。

[0038] 在第二方面的或选方案中,本发明提供了用于本发明的被动免疫方法中的预防性或治疗性组合物,其包含针对如上所定义的酪氨酸交联的化合物的抗体或其片段,所述抗体能结合酪氨酸交联的化合物,以及可药用载体。

[0039] 在第三方面,本发明提供了诊断病症的方法,其中所述病症特征在于与氧化性损伤相关的特定蛋白的病理性聚集和蓄积以及形成酪氨酸交联,所述方法包括以下步骤:测定来自怀疑患有所述病症的对象的生物液体样本中是否存在选自以下组的化合物:二酪氨酸、三酪氨酸、四酪氨酸、氧化的酪氨酸正源物如邻-酪氨酸和间-酪氨酸、硝基酪氨酸和含有酪氨酸交联的肽。

[0040] 可选择地,所述方法包括以下步骤:测定来自怀疑患有所述病症的对象的生物液体中是否存在针对酪氨酸交联的化合物的抗体。

[0041] 优选所述生物液体选自血液、血浆、血清、脑脊液、尿和唾液。优选所述化合物是二酪氨酸。

[0042] 所述测定可以通过任何合适的方式进行,但最为方便地通过 ELISA 测定进行,使用针对酪氨酸交联的化合物的抗体。这种测定可以反过来用于检测针对酪氨酸交联的化合物的抗体。优选所述抗体是单克隆抗体,或单克隆抗体的混合物。或者所述测定可以通过在 325nm 的激发波长和 350-500nm 的发射波长下测定荧光来进行。

[0043] 在本发明的所有这三方面,优选所述病症选自阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、运动神经元病、内障、帕金森病、克罗伊茨费尔特-雅各布病、亨廷顿舞蹈病、伴有雷维小体形成的痴呆、多系统萎缩、哈-施病和弥漫性雷维小体病或内障。

[0044] 更优选所述病症是阿尔茨海默氏病或帕金森病。

[0045] 为了本说明书的目的,应清楚理解词语“包括”指“包括但不限于”,词语“包含”具有相应的含义。

[0046] 附图简要说明

[0047] 图 1 显示了人 A β , 而不是大鼠 A β , 在过氧化物酶催化的氧化之后发生荧光和 SDS- 抗性。将人 A β ₁₋₄₀、人 A β ₁₋₄₂ 或大鼠 A β ₁₋₄₀ (50 μ M) 置于 50mM 硼酸 (pH9.5) \pm H₂O₂ (1mM) 和过氧化物酶 (7.5 μ g/ml) 中 37°C 温育 1 天。

[0048] (A) 荧光光谱 (λ _{激发} 325, λ _{发射} 350-500);

[0049] (B) 在 SDS-PAGE 上的迁移 (通过使用 4G8 的蛋白质印迹);

[0050] (C) 将 A β ₁₋₄₂ (10nM) 与 H₂O₂ (1 μ M) 和过氧化物酶 (7.5 μ g/ml) 在磷酸盐缓冲盐水 (pH7.4) 中 37°C 温育 5 天。通过 SDS-PAGE 和蛋白质印迹 (4G8) 将产物 (泳道 2) 与在相同条件下但缺乏 H₂O₂/ 过氧化物酶情况下温育的肽 (泳道 1) 相比较。

[0051] 图 2 显示了源于人淀粉状蛋白的 A β 含有酪氨酸交联的寡聚体。将源于人淀粉状

蛋白的 A β (20 μ M) (Roher 等, 1996) 用荧光光谱分析, 与纯 DT 标准相比 ($\lambda_{\text{激发}}$ 325, $\lambda_{\text{发射}}$ 350-500) (A), 以及蛋白质印迹 (4G8) 分析 (B)。

[0052] 图 3 显示了二酪氨酸和三酪氨酸交联存在于源自人淀粉状蛋白的 A β 中, 并且它们结合铜。

[0053] (A) 和 (B) 将人淀粉状蛋白纯化、水解并在层析分离之后测定质谱。显示了反映对在不同层析保留时间 (RT) 洗脱的相同样本的分析的两次独立的扫描。

[0054] (C) 在增加浓度的 CuSO₄ 或 NaCl 存在下, 纯化的 DT 在 280nm 和 315nm 处的吸光度。

[0055] 图 4 显示了可溶性 A β 高亲和力地结合铜。

[0056] (A) 粗可溶性提取物 (1) 和来自铜整合 Sepharose 柱的 pH1 洗脱物 (2) 的银染。

[0057] (B) 用 W02、G211 和 G210 探测的 pH1 洗脱物的蛋白质印迹。

[0058] 图 5 显示了 LC-MS 分析的结果, 证实了人 A β 结合铜。

[0059] 粗制可溶性提取物 (5A) 和 IMAC 纯化的可溶性提取物 (5B) 的 LC-MS 分析。

[0060] A β_{1-42} 的质谱 (5C) 和 (5E), 和结合两个铜原子的 A β_{1-40} 的质谱 (5D) 和 (5F)。

[0061] IMAC 和 LC-MS 数据证实源自脑的 A β 可结合铜。

[0062] 图 6 显示在蛋白质印迹中检测交联的 A β_{1-40} 和 A β_{1-42} 中的二酪氨酸。

[0063] 还比较了创建二酪氨酸键合的两种技术。

[0064] 上面的蛋白质印迹 (A) 使用 W02 抗体证实 A β 的存在。下面的印迹 (B) 证实了由单克隆抗体 IC3 识别的二酪氨酸键合的存在。该抗体是针对用硼酸 /H₂O₂/ 辣根过氧化物酶制备的一种形式的二酪氨酸而产生的。

[0065] 泳道 1A β_{1-40} - 硼酸交联

[0066] 泳道 2A β_{1-42} - 硼酸交联

[0067] 泳道 3A β_{1-40} - 铜交联

[0068] 泳道 4A β_{1-42} - 铜交联

[0069] 泳道 5A β_{1-40} - 未处理

[0070] 泳道 6A β_{1-42} - 未处理

[0071] 泳道 7 缀合至 KLH 的二酪氨酸

[0072] 图 7 显示作为潜在的免疫原产生的酪氨酸交联形式的实例。这些结构含有酪氨酸交联并且羧基和氨基末端乙酰化以模拟额外氨基酸残基的存在, 所述额外氨基酸残基正常情况下会存在于酪氨酸交联的肽中酪氨酸交联的部分的任一侧。设计多拷贝二酪氨酸抗原的呈递以提高所产生的免疫应答的强度。

[0073] 7A 酪氨酸

[0074] 7B 二酪氨酸

[0075] 7C Atee

[0076] 7D DiAtee

[0077] 7E IsoDiAtee

[0078] 7F TriAtee

[0079] 7G TetraAtee

[0080] 7H 含一个异键的 TriAtee 的或选形式

[0081] 图 8 显示在蛋白质印迹中检测多种酪氨酸交联的种类中的二酪氨酸键。含 DT 的种

类包括连接至 BSA 的二酪氨酸交联的 $A\beta_{9-16}$ 二聚体或三聚体,和连接至 BSA 或 KLH 载体蛋白的多种聚-DT 种类。上面的蛋白质印迹 (A) 证实了样本结合针对 DT 产生的多克隆兔抗血清的能力,其中 DT 是使用硼酸 / H_2O_2 / 过氧化物酶技术制备的并使用戊二醛连接至 KLH(在实施例 7 中讨论)。下面的蛋白质印迹 (B) 证实由单克隆抗体 IC3 识别的二酪氨酸键合的存在。该抗体是针对也是用硼酸 / H_2O_2 / 过氧化物酶技术制备的一种形式的二酪氨酸而产生的。

[0082] 泳道 1 $A\beta_{9-16}$ DT 二聚体 -BSA

[0083] 泳道 2 $A\beta_{9-16}$ DT 三聚体 -BSA

[0084] 泳道 3 粗 ATEE-BSA

[0085] 泳道 4 聚酪氨酸 -BSA

[0086] 泳道 5 BSA

[0087] 泳道 6 $A\beta$ 三聚体 -KLH

[0088] 泳道 7 粗 ATEE-KLH

[0089] 泳道 8 聚酪氨酸 -KLH

[0090] 泳道 9 KLH

[0091] 发明详述

[0092] 本发明现在将通过仅参照以下非限定性实施例和附图的方式进行详细描述。

[0093] 在此使用的缩写如下：

[0094] AD 阿尔茨海默氏病

[0095] DT 3,3' - 二酪氨酸

[0096] TT 3,3' 3' - 三酪氨酸

[0097] P puIcherosine

[0098] iso-DT 异二酪氨酸

[0099] 试验程序

[0100] 试剂和 $A\beta$ 肽制备

[0101] 如先前所述从患 AD 的人脑的淀粉样斑中提取寡聚 $A\beta$ (Roher 等,1996)。将纯化的淀粉状蛋白 $A\beta$ 溶于甲酸,然后在使用之前立即用更换 5 次的 100mM 的碳酸氢铵 (pH7.5) 透析。

[0102] 由 W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory (Yale University, New Haven, CT) 进行人 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 和大鼠 $A\beta_{1-40}$ 的合成、纯化并通过 HPLC 分析、氨基酸分析和质谱对其进行表征,使用由 Quality Control Biochemicals, Inc. (Hopkinton, MA) 合成的肽进行确证研究。

[0103] 各肽由 HPLC 鉴定为单一峰。将合成的 $A\beta$ 肽溶于双重去离子水中,浓度为 0.5-1.0mg/ml,进行超声处理 3 分钟,然后于 10000g 离心 20 分钟,在试验当天使用上清 ($A\beta$ 原液)。如前所述 (Atwood 等,1998) 通过在 214nm 分光光度分析吸光度或通过 Micro BCA 蛋白测定 (Pierce, Rockford, IL) 确定 $A\beta$ 肽原液的浓度。

[0104] 使用之前,将所有的缓冲液和金属离子的原液通过 0.22 μ m 滤器 (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) 过滤以除去颗粒物。所有其它的试剂均为分析级或更纯。辣根过氧化物酶购自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。

[0105] 二酪氨酸和酪氨酸交联的 A β 的制备和荧光分析

[0106] 通过将溶于硼酸缓冲液 (50mM, pH9.5) 中的 L-酪氨酸 (1mg/ml) 与 H₂O₂ (5mM) 和辣根过氧化物酶 (7.5 μ g/ml) 在 37°C 温育 1 天而产生 DT 标准 (Amado 等, 1984)。

[0107] 通过将溶于硼酸盐缓冲液 (50mM, pH9.5) 中的 A β (50 μ M) 与 H₂O₂ (1mM) 和过氧化物酶 (7.5 μ g/ml) 在 37°C 温育 5 天而产生交联的 A β 。在接近生理条件下研究该反应的一项单独的试验中, 将 A β ₁₋₄₂ 在磷酸缓冲盐水 (PBS, pH7.4) 中稀释至 10nM, 并与 1 μ M H₂O₂ 和过氧化物酶 (7.5 μ g/ml) 在 37°C 温育 5 天。温育之后, 将样本冻干以使肽的浓度范围可通过蛋白质印迹检测 (见下)。

[0108] 反应产物通过快速相液相层析 (FPLC) 分离。在层析之前先通过在 0°C 离心而将过量的硼酸从样本中沉淀出来。然后通过加入 0.25% TFA 将样本酸化, 并通过过滤 (0.22 μ m 孔径) 除去剩余的不溶物质。将样本装填到 3ml Resource RPC 柱 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 上, 并用含 0.1% TFA 的水洗柱。将结合的种类用 0-100% 线性梯度的含 0.1% TFA 的乙腈以 1ml/min 在 45 分钟内洗脱, 并以 0.5ml 馏分收集。将馏分干燥、重组于水中并通过荧光 (激发 330nm; 发射 400nm) 和 UV 吸光度 (284nm) 测定二酪氨酸。峰馏分进一步通过质谱分析表征, 并使用消光系数对二酪氨酸进行定量 ($E_{315nm} = 8380M^{-1}cm^{-1}$; Malencik 等, 1996)。

[0109] 使用 Hitachi F-4500 分光荧光计分析溶液中荧光化合物的存在。DT、TT 和 P 具有特征性的发射光谱 ($\lambda_{激发} 325, \lambda_{发射} 350-500$), 这与酪氨酸和色氨酸完全不同, 酪氨酸和色氨酸在这些波长不发出荧光。在该发射范围内随二酪氨酸浓度在 0-50 μ M 增加, 荧光呈线性增加。

[0110] MALDI-TOF 质谱分析

[0111] 将 SDS 抗性的、寡聚的、源自人淀粉状蛋白的 A β 的样本用 6NHCl 在 105°C 真空下水解 48 小时。此后, 在 Harvard University Mass Spectrometry Facility 通过液相色谱 MALDI-TOF 质谱 (LC-MS) 分析样本。

[0112] 使用 LCT 质谱仪 (Micromass Inc, Beverly MA) 与连到 C18 反相柱 (2.1mm \times 250mm) 的 HP1100 液相色谱相连接而得到质谱。使用缓冲液 A (水-0.1% 甲酸 (FA)) 和缓冲液 B (乙腈-0.1% FA) 的梯度进行 LC-MS。所述梯度从 2% B (0-2 分钟) 到 100% B (20-23 分钟)。

[0113] 蛋白质印迹分析

[0114] 将等份的各反应 (2ng 肽) 收集到 15 μ l 样本缓冲液 (含 4% SDS, 5% β -巯基乙醇) 中并加热至 95°C (5 分钟)。将样本在 PAGE (Tricine 胶, 10-20%; Novex, San Diego, CA) 上电泳, 转移至 PVDF 薄膜 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 用戊二醛 (1%, v/v) 固定, 用乳 (10%, w/v) 封闭, 然后用抗-A β 单克隆抗体 4G8 (Senetek, Maryland Heights, MI) 在 4°C 探测过夜。在一项试验中使用单克隆抗体 W02 (表位: 残基 5-8)、G211 (表位: 残基 35-42) 或 G210 (表位: 残基 33-40)。然后将印迹与抗小鼠辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合物 (Pierce, Rockford, IL) 于室温温育 2 小时, 并用 ECL 试剂 (Amersham, Little Chalfont, UK) 或 Supersignal Ultra (Pierce, Rockford, IL) 显象。使用 Fluoro-Image Analysis System (Bio-Rad, Hercules, CA) 捕获化学发光信号, 并用 Multi-Analyst Software (Bio-Rad, Hercules, CA) 分析电子图象。分子大小标准参照物购自 Amersham (Arlington Heights, IL)。

[0115] 实施例 1:过氧化物酶催化的 A β 聚合伴随着酪氨酸交联的形成

[0116] 我们最初测试了过氧化物酶催化的氧化条件是否可以促进 A β 聚合,通过测定与或不与 H₂O₂ 和过氧化物酶温育 1 天的人 A β ₁₋₄₀、人 A β ₁₋₄₂ 和大鼠 A β ₁₋₄₀ (50 μ M) 的荧光。对这些样本的荧光计分析指示在含 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 的样本中荧光显著增加,如图 1A 所示。这些结果与先前关于合成的人 A β 所报道的结果类似,后者在高得多的肽浓度 1.25mM 下实现 (Galvezzi 等,1999)。与人序列 A β 肽的行为相比,与 H₂O₂ 和过氧化物酶温育后没有观察到大鼠 A β ₁₋₄₀ 荧光信号的增加,亦如图 1A 所示。这提示荧光信号是对 A β 的酪氨酸氧化产物特异性的,因为大鼠 A β 缺乏酪氨酸 (Shivers 等,1988)。

[0117] 为了证实这些反应导致 A β 聚合,将如上所述处理的 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 在 SDS-PAGE 上进行电泳,并通过蛋白质印迹分析。与未经处理的 A β 相比,与 H₂O₂ 和过氧化物酶一起温育的人合成 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 均显示出表观 SDS 抗性聚合物的显著增加,如图 1B 所示。当 A β 与单独 H₂O₂ 或过氧化物酶温育时,既没有观察到聚合也没有观察到荧光增加。

[0118] 实施例 2:聚合在生理条件下发生

[0119] 为了确定 H₂O₂/过氧化物酶诱导的合成 A β 的聚合是否在接近生理的条件下发生,我们还将 10nM 的 A β ₁₋₄₂ 与 1 μ M H₂O₂ 和过氧化物酶 (7.5 μ g/ml) 在 PBS (pH7.4) 中温育。我们观察到肽的 SDS 抗性被再次诱导,如图 1C 所示;然而,产生的寡聚体的表观分子量比通过使用更高浓度底物所产生的要低,如图 1B 所示。在这些条件下表观 A β 聚合物在 SDS-PAGE 上的迁移提示形成了二聚体 (8kD)、三聚体 (13kD) 和四聚体 (17kD)。

[0120] 分别如图 2A 和图 2B 所示,对从患 AD 的死后脑组织纯化的 A β 的荧光分析显示了酪氨酸交联的类型的特征性分光荧光模式;该纯化的蛋白在 SDS-PAGE 上作为表观的寡聚体迁移,如先前所述 (Roher 等,1996)。

[0121] 实施例 3:寡聚体的酪氨酸交联

[0122] 为了证实表观寡聚的源自人淀粉状蛋白的 A β 是酪氨酸交联的,将样本进行水解,然后通过 MALDITOF-MS 分析。该分析,如图 3A 所示,指示相当于 361Da (m/z361,代表 M+H) 的峰,从而证实了样本中 DT 或 iso-DT 的存在。还检测到相当于 540Da 的较小峰,与 TT 或 P 的存在一致。其它显著的峰在 247、263、307、309 和 538Da 检测到;这些可能代表对 A β 氨基酸的其它修饰,如羧基化 (Atwood,1999) 和其它氨基酸交联。

[0123] 在 423 和 425Da (比值 3:2) 还检测到水解人 A β 所得到的更大量片段,提示 Cu 结合到 DT 或 iso-DT (Cu 质量 = 63&65Da, \approx 2:1 天然同位素丰度)。

[0124] 实施例 4:二酪氨酸对铜的结合

[0125] 为了测试在 423 和 425 的峰是否是由于 DT 结合 Cu 所致,我们通过光谱分析检查了 Cu²⁺ 与 DT 的相互作用。将二酪氨酸 (50 μ M) 溶于磷酸缓冲液 (50mM, pH7.4) 中,并在 SPECTRAMax Plus (Molecular Devices) 上测量吸收光谱 (200-1000nm)。波谷 (280nm) 和波峰 (315nm) 明显。然后将二酪氨酸与递增浓度的 CuNO₃ (0-200 μ M) 或 NaCl (0-200 μ M) 一起温育,并监测在 280nm 和 315nm 处吸光度的变化。

[0126] 我们发现当 DT 与递增浓度的 Cu²⁺ 一起温育时,它在 315nm 处的特征性吸收峰消失,而在 280nm 出现一个新的吸收峰。化学计量比在 1:1-2:1 (Cu:DT) 之间时光谱变化达到平台,然后在 3:1 饱和,提示 DT 可结合多至 3 当量的 Cu。二氯化物结合也会产生类似的 p+2 质量单位增加 (CI 质量 = 35 和 37Da, \approx 3:1 天然同位素丰度),但将 DT 与 NaCl 共温育不

诱导光谱吸收改变。这些结果如图 3C 所示。

[0127] 实施例 5 :A β 的二酪氨酸化增加其铜结合能力

[0128] 我们预测一部分在人脑可溶性级分中发现的 A β 由于二酪氨酸化会显示出增强的铜结合性能。为了测试这是否是真实的情况,我们将患 AD 脑的一部分可溶性提取物通过带有铜的螯合 S epharose 柱。将来自冷冻 AD 脑和对照脑 (AC) 的 0.5g 大脑皮层灰质在 3ml 冰冷的磷酸缓冲盐水 (PBS) 中匀浆化。将样本于 175000g 离心 1 小时,并保留上清用于分析 A β 含量。将 10ml 上清装填到带有 1mg/ml 硫酸铜的螯合 S epharose 柱上。使用含 0.5M NaCl 的 0.05M 乙酸钠缓冲液 (pH8) 洗出未结合的蛋白。以分步梯度的增加酸度洗脱结合的物质,使用 pH5.5、3 和 1 连续步骤,然后用 50mM EDTA 洗以解吸柱。使用 2kDa 的大小截断值将洗脱物进行彻底透析以除去游离的铜和盐,冻干并进行 SDS-PAGE、蛋白质印迹和 LC-MS 分析。在 Quatro II triple quadrupole (Micromass) 上获得 ESI 质谱 (+ve 离子)。以连续模式每 8 秒从 650-1650m/z 收集质谱。将样本引入在 5mM 乙酸铵缓冲液中的离子源。狭线印迹分析显示在 pH3 洗脱物中无 W02 免疫反应性,并在 pH1 再进行一次洗脱。在该 pH 检测到强的免疫反应性,并且经透析的样本呈蓝色。

[0129] 蛋白质印迹分析显示在 pH1 和 EDTA 馏分中存在 A β ;这提示与铜的非常高亲和力的结合,因为 pH3 通常足以从这种柱上洗脱大多数的铜结合蛋白。在这些馏分中的物质显示出高度富含寡聚 A β 。这些结果如图 4 所示。

[0130] 银染 (图 4A) 证实了实质性的基于金属亲和力的纯化 (泳道 1 vs. 2),而蛋白质印迹分析展示了似乎相当于多个单体 A β 的免疫反应性条带 (图 4B)。图 5 显示来自 AD 脑组织的粗制的和 IMAC-纯化的上清提取物的 LC(上)和 MS(下)曲线。值得注意的是 IMAC 纯化的样本的 LC 和 MS 谱实质上更为清楚。对 IMAC 纯化的样本的 LC-MS 分析产生相当于 A β 种类的信号,包括带有 2 个铜原子的 A β ₁₋₄₀,如在铜存在或缺失情况下对合成肽的 LC-MS 分析所证实的。在代表性质谱上突出的峰群表明质量/电荷比与母离子一致,其质量为 4515.1 (A β ₁₋₄₂) 和 4457.9 (A β ₁₋₄₀+2Cu)。

[0131] 为了证实该强结合铜的 A β 馏分是否含有 DT,我们采用了针对使用 H₂O₂ 和辣根过氧化物酶的方法产生的 DT 所产生的单克隆抗体 1C3 (Kato 等, (1998);这是 Himeji Institute of Technology, Himeji, Japan 的 Dr. Yoji Kato 赠送的礼物)。我们发现在蛋白质印迹上观察到的更高分子量的 A β 寡聚体与对 DT 的正染色定位在共同区域。

[0132] 含 A β 的馏分还展示出存在二酪氨酸部分特征性的荧光发射光谱。该发射通过加入铜而终止,其方式是对由于该修饰引起铜结合增强所预测到的。

[0133] 实施例 6 :对二酪氨酸化的 A β 的进一步表征

[0134] 将富含 DT 的 A β 从人脑的可溶性级分中分离出来,其量足以进行进一步表征。这些研究包括在组织培养中的毒性研究、氨基酸测序、金属结合研究和测定富含 DT 的 A β 是否具有增强的电化学活性的试验,所述电化学活性例如诱导过氧化氢形成和铜还原。

[0135] 实施例 7 :针对二酪氨酸的免疫的效果

[0136] 我们尝试在野生型小鼠中产生对 DT 的免疫应答。在该试验中,通过以下步骤制备 DT:将在硼酸缓冲液中的酪氨酸与 H₂O₂ 混合,并将该混合物与辣根过氧化物酶一起温育,如在试验程序中所述。

[0137] 使用戊二醛并按照标准方案将 DT 缀合至载体蛋白匙孔血蓝蛋白 (KLH)。在弗氏

完全佐剂中制备 DT-KLH、单独 KLH 或未经处理的酪氨酸每一种的乳液,对每两只动物各用含 100mg DT-KLH 或者未经处理的酪氨酸或单独 KLH 的接种物进行腹膜内接种。在此时取免疫前血清。在免疫接种之后 10 天收集第一免疫血清。在此后以两周的间隔给予两次加强免疫。在每次接种时和在最后的强化后一周时取血样。

[0138] 采用 ELISA 测定对 DT 的免疫应答。我们发现用 DT-KLH 或未处理的酪氨酸免疫的小鼠对 DT 的免疫应答从未超过用单独 KLH 免疫的小鼠的应答。用获自 Dr. Kato 的 DT 单克隆抗体 1C3 作为阳性对照,在该测定中产生了针对 DT 的适度的阳性反应。

[0139] 在第二项试验中,用 DT-KLH 以上述方式免疫两只兔。对这些动物所产生的的血清的 ELISA 结果证实产生了针对 DT 的适中的免疫应答。

[0140] 我们还尝试证实在来自 4 名通过死后的组织病理学检查被诊断患有阿尔茨海默氏病的患者的个体血清中是否存在针对 DT 的内源抗体。通过 ELISA 或通过蛋白质印迹在这些血清中没有观察到针对 DT 的免疫反应性。

[0141] 在进一步的试验重复中,我们检查了上述针对 DT-KLH 产生的小鼠或兔抗血清是否识别从人脑提取的 A β 二聚体或更高级别寡聚体中的 DT 部分。令人惊奇的是,上述血清均未显示针对人脑 A β 中的 DT 部分的活性。阳性对照抗体 1C3 在该测定中也呈阴性。

[0142] 实施例 8 :制备二酪氨酸部分的方法对免疫原性和抗体反应性的影响

[0143] 我们怀疑免疫应答的意外缺乏可能是由于二酪氨酸部分的抗原性差所致。

[0144] 为了调查研究这一假设,我们用两种不同的方法制备了酪氨酸交联的合成 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂。第一种方法包括将在硼酸缓冲液中的 A β 肽与辣根过氧化物酶和 H₂O₂ 一起温育,如在上面试验程序中所描述的。

[0145] 在第二种方法中,在含 30 μ M CuCl₂ 和 200 μ M H₂O₂ 的双重去离子水中制备 2.5 μ M A β 溶液,并于室温温育 1-5 天。

[0146] 将交联的 A β 的各变种的样本进行 PAGE,并使用 A β 特异性抗体 W02 或阳性对照抗 DT 抗体 1C3 进行蛋白质印迹。这些印迹的结果如图 6 所示。

[0147] 在 ELISA 和蛋白质印迹分析中 1C3 抗体在交联的 A β 中均检测到 DT。此外,在蛋白质印迹中所述抗体识别实施例 7 中制备的 DT-KLH 中二酪氨酸的存在。从这些结果似乎由硼酸或铜方法 A β ₁₋₄₂ 比 A β ₁₋₄₀ 更有效地交联。另外,当用涉及铜的方法交联时, A β ₁₋₄₀ 丧失对 W02 的免疫反应性。这可能是由于该肽对自由基损伤或交联之后抗体结合部位的修饰、掩蔽或阻碍更为敏感。

[0148] 令人惊奇的是,从用 1C3 的鉴别染色很明显 A β 通过二酪氨酸交联的模式取决于产生交联所用的不同反应。1C3 单克隆抗体检测不出由硼酸方法制备的 DT,但确实检测出由铜方法制备的 DT。

[0149] 同样令人惊奇的是,1C3 抗体在 A β ₁₋₄₀ 中检测 DT 交联优先于在 A β ₁₋₄₂ 中。这一模式与用抗 A β 抗体 W02 所观察到的情况相反。

[0150] 这些结果证实诱导 DT 交联的方法和被交联的多肽的结构在抗体对 DT 的识别中是关键性的变量。在这种情况下,向二酪氨酸连接的 A β ₁₋₄₀ 添加 2 个氨基酸残基导致抗二酪氨酸抗体结合的能力大大降低。这一结果可以推至体内情形,提示对抗原的选择对引发生理学相关的免疫应答是至关重要的。

[0151] 实施例 9 :酪氨酸交联的形式对抗体识别的影响

[0152] 预计 DT 接种物必须缀合至大的载体蛋白以引起免疫应答。而且,所产生的免疫应答的质量在部分程度上也会取决于对适合载体的选择。为了检查这一点,我们为各 DT 种类选择了两种可供选择的载体,牛血清白蛋白 (BSA) 和匙孔血蓝蛋白 (KLH)。

[0153] 另外,为了调查二酪氨酸的不同形式在免疫识别中的作用,我们制备了含有多种形式 DT 的粗混合物,包括多种寡聚体和分支形式的 DT。在该粗混合物中的酪氨酸交联是用如上所述的硼酸 /H₂O₂/ 过氧化物酶方法创建的。所得的 DT 混合物含有在酪氨酸分子的环和骨架上的多个位点键合的分子。所产生的结构的实例如图 7 所示。

[0154] 然后通过反相 HPLC 将粗混合物分离成主要含单 - 二酪氨酸、二酪氨酸、三酪氨酸和聚酪氨酸的馏分。

[0155] 寡聚结构的两个重要特征是它们可以呈递多个拷贝的目标抗原以提高免疫原性并增强免疫应答,以及它们可以呈现酪氨酸残基之间化学键的或选形式。

[0156] 为了研究在 AD 中构成在体内对 A β 氧化修饰的酪氨酸交联的性质,我们还制备了酪氨酸交联的 A β 片段。使用相同的技术,我们制备了由两条或更多条 A β ₉₋₁₆ 肽链组成通过二酪氨酸交联的分子 (结构未显示)。所得到的交联最可能代表多种形式酪氨酸交联的外消旋混合物。

[0157] 上述的多种新结构在蛋白质印迹中得到表征,使用抗 -DT 单克隆 1C3 或来自用 DT-KLH 免疫的兔的免疫血清 (如实施例 7 中所述)。这些结果如图 8 所示。

[0158] 结果证实与 BSA 相连的 A β ₉₋₁₆ 的二聚体而不是三聚体对兔免疫血清和单克隆抗体 1C3 均具有免疫反应性。

[0159] 在印迹中 KLH 的存在被兔免疫血清识别,无论其是否缀合至另外的酪氨酸交联抗原。聚酪氨酸 -BSA 和聚酪氨酸 -KLH 被 1C3 识别,但兔免疫血清不能区分单独 KLH 和聚酪氨酸 -KLH。

[0160] 从这些结果清楚可见对兔的免疫产生了对某些形式的二酪氨酸具有反应性但对其它形式无反应性的抗体,正如从图 6 中的数据所预测的。

[0161] 实施例 10 :在转基因动物中用二酪氨酸免疫对 A β 沉积的作用

[0162] 可以得到多种神经疾病的转基因小鼠模型,包括阿尔茨海默氏病 (Games 等, 1995 ;Hsiao 等,1996) ;帕金森病 (Masliah 等,2000) ;家族性肌萎缩性侧索硬化 (ALS) (Gurney 等,1994) ;亨廷顿舞蹈病 (Reddy 等,1998) ;和克罗伊茨费尔特 - 雅各布病 (CJD) (Telling 等,1994)。

[0163] 我们已发现阿尔茨海默氏病的转基因模型之一 APP2576tg 小鼠 (Hsiao 等,1996) 还具有高的内障发生率。这些动物模型适于测试本发明的方法。

[0164] 使用 APP2576 品系的转基因小鼠 (Hsiao 等,1996)。选择 8-9 月龄的雌性小鼠并分组进行治疗。

[0165] 使用多种技术制备酪氨酸交联的抗原以产生不同形式的酪氨酸交联。所用的抗原包括 :

[0166]

抗原	载体蛋白
A β ₉₋₁₆ 二聚体	BSA
A β ₉₋₁₆ 三聚体	BSA
(粗)ATEE	BSA

聚酪氨酸	BSA
A β 三聚体	KLH
(粗)ATEE	KLH
聚酪氨酸	KLH

[0167] 每次免疫包含在弗氏完全佐剂中的 25 μ g 抗原,总体积为 0.5ml,皮下给予。

[0168] 对照动物接受不含酪氨酸交联的抗原的载体蛋白。

[0169] 以 14 天间隔取血清样本,在 28 天给予加强免疫。测定血清样本中是否存在抗 -DT 抗体,例如使用 Kato 等的 ELISA 方法。预期在最后的强化注射后大约 5 周内获得高抗体效价。还测定了血中 A β 的水平。

[0170] 一旦出现高效价抗体,每隔一段时间处死动物,并检查它们的脑以确定所述免疫接种是否减少了脑淀粉状蛋白形成,并鉴定最有效的免疫方案。使用校准蛋白质印迹测定在脑和血清中的可溶性和不溶性 A β 的水平。用免疫组化方法检查脑中的 A β 斑负荷。

[0171] 在长达 8 个月的时间内测试各组中其它小鼠的认知表现,根据标准方法使用 Morris 水迷宫。每天还由不知情的操作者测定动物的总体健康状况,使用的 5 分整数等级主观地评价包括运动活性、警觉和一般健康指征在内的特征组合。

[0172] 实施例 11 :用针对二酪氨酸的抗体治疗的效果

[0173] 通过本领域熟知的标准操作用一种或多种实施例 7 中描述的免疫原对正常小鼠进行超免疫。每隔一段时间对小鼠进行放血并如上所述测定其血清中的抗 -DT。检测到高效价抗体时,收获血清并用本领域常用方法分离和 / 或富集抗体成分。

[0174] 将这些抗体静脉内注射或直接注射入 APP2576 转基因小鼠的 CSF 中,在数天或数周内以单剂或重复多剂给予。

[0175] 在用抗二酪氨酸抗体治疗后每隔一段时间处死转基因小鼠,并检查它们的脑以确定抗体治疗是否减少了脑淀粉状蛋白形成。

[0176] 实施例 12 :诊断与酪氨酸交联相关的病症

[0177] 对来自证实患有 AD 的患者和来自年龄相匹配的对照的血清和脑脊液 (CSF) 样本使用如上所述的荧光分析测定其中酪氨酸交联的化合物的存在。在一组样本中,首先使样本通过偶联至次氨基三乙酸的固相支持体而富集样本中的酪氨酸交联的化合物,如美国专利 No. 5972674 中所述。

[0178] 使用来自患有 ALS、帕金森病和 CJD 的患者的样本进行类似的测定。

[0179] 可能患者还具有针对酪氨酸交联的化合物的循环抗体,因此在可供选择的测定中,用 ELISA 测定利用针对 DT 的单克隆抗体检测血清或 CSF 中的这种抗体 (Kato 等,1998)。

[0180] 实施例 13 :鉴定存在于经氧化修饰的 A β 中的二酪氨酸的形式

[0181] 为了鉴定存在于经氧化修饰的 A β 中的 DT 的主要形式,产生铜催化的 A β 寡聚体的酶促消化片段,并通过质谱分析所述片段。该技术近来被应用于分析对朊病毒蛋白的铜催化氧化修饰 (Requena, J. R., 等,2001PNAS98 :7170-7175)。

[0182] 这使得对抗原的鉴定最可能有效产生适用于被动免疫的单克隆抗体,如实施例 11 中所述。产生针对任何特定抗原的高度特异性单克隆抗体的方法在本领域中是广为人知的。一旦选出了抗原,则使用已知的方法进行对最有效抗原呈递方式的系统性分析。

[0183] 讨论

[0184] 在 AD 中的神经元损伤与可溶性 A β 相关,而不与固定在神经炎斑中的不溶性 A β

相关 (McLean 等, 1999)。现在我们首次显示了从罹患 AD 的脑中提取的神经毒性 A β 寡聚体含有酪氨酸交联, 其可以是 DT、iso-DT、TT 和 / 或 P。这些修饰通过将 A β 与过氧化物酶和 H₂O₂ 一起温育, 或通过铜离子存在下氧化 A β 而在体外得到模仿。这些修饰可干扰 A β 的代谢, 可促成在 AD 中看到的神经毒性, 并且指示在所述疾病中的神经化学紊乱。

[0185] DT、T 和 P 之间碳-碳桥的形成被认为是不可逆的; DT 交联对 6NHCl 在 110°C 水解切割 24 小时和蛋白酶消化非常耐受 (Smail 等, 1995)。在病理学上, 蛋白的 DT 修饰对分解代谢的抗性可以解释酪氨酸聚合物对脂褐质形成所起的作用 (Kato 等, 1998), 和对荧光内障形成中 α -晶体蛋白的交联所起的作用 (Kikugawa 等, 1991)。显然, 预期 A β 的酪氨酸交联会抑制其分解代谢, 并因此在 AD 中淀粉样蛋白斑沉积的发展中可能是重要的步骤。

[0186] 酪氨酸交联的形成必需要使含有酪氨酸残基的分子进行接触。我们的结果提示 A β 的酪氨酸残基必须对于过氧化物酶是可接近的, 并且淀粉状蛋白的 A β 亚基之间的酪氨酸残基必须在某些阶段并置。

[0187] 由于 DT 形成需要 H₂O₂, 检测在来自 AD 的脑 A β 中的 DT 修饰暗示在 AD 中脑中的 H₂O₂ 升高。不希望受到任何已提出的机制的约束, 我们认为在脑实质中的小神经胶质细胞的吞噬活化, 与 AD 中的淀粉状蛋白形成密切相关 (Sheng 等, 1997), 可能提供过氧化物酶活性和 H₂O₂ 以引起 A β 的酪氨酸交联。已观察到活化的大鼠小神经胶质细胞的过氧化物酶水平增加 (Lindenau 等, 1998), 并且体外试验已证实了 A β 引发和 / 或触发培养的大鼠小神经胶质细胞和人吞噬细胞的呼吸爆发的能力 (Van Muiswinkel 等, 1996)。活化的吞噬细胞释放髓过氧化物酶 (Pember 等, 1983), 并在呼吸爆发过程中产生活性氧种类。这一反应被设计用来杀死入侵的病原体或肿瘤细胞; 但是, 也显示该环境促进周围蛋白和脂类的氧化 (Byun 等, 1999)。在活化的小神经胶质细胞邻近可以产生类似的微环境。在体外, 髓过氧化物酶-H₂O₂ 体系促进酪氨酸交联的种类如 DT、TT、P 和 isoDT 的合成 (Jacob 等, 1996)。

[0188] 因此, 对 A β 蓄积作出反应的小神经胶质细胞的活化可促进 A β 的酪氨酸交联, 抑制其清除并导致恶性循环。A β 本身可能产生用于形成 DT 的最近 H₂O₂ 源, 促成这一可能的恶性循环, 因为 A β 与 O₂ 反应通过还原亚化学计算量的 Cu²⁺ 或 Fe²⁺ 而形成 H₂O₂ (Huang, Atwood 等, 1999; Huang, Cuajungco 等, 1999)。所以, 非常重要的人是从人淀粉状蛋白中纯化完整的结合有铜的 A β (图 3A)。合成的 A β ₁₋₄₂ 以阿托摩尔 (attomolar) 亲和力结合 Cu²⁺, 并且由于在 AD 淀粉状蛋白中富集铜 (Lovell 等, 1998), 我们曾怀疑 A β 可能在体内结合铜。源自淀粉状蛋白的 A β 含有铜这一发现也与 AD 的病理生理学相关, 因为 Cu²⁺ 沉淀 A β (Atwood 等, 1998), 并且 Cu²⁺ 加强所述肽的毒性 (Huang 等, 1999)。

[0189] 令人产生兴趣的是, 在用酸水解源自人淀粉状蛋白的 A β 之后, 以及在质谱分析的酸性条件下, Cu²⁺ 仍保持与 DT 结合 (图 3A)。对 Cu²⁺ 的这一不同寻常的亲和力可能是由 DT 修饰在 A β 上形成外加的高亲和力 Cu²⁺ 结合部位的结果。由于该增加的对 Cu²⁺ 的亲和力, DT-修饰的 A β 的神经毒性或其电化学活性与未修饰的 A β 相比可增高。由 DT 修饰引起的外加的 Cu²⁺ 结合还可增加 A β 沉淀为淀粉状蛋白, 这可以解释为什么用螯合剂在 pH7.4 处理促进二聚体 A β 从死后 AD 脑组织中释放的程度高于单体 A β (通过蛋白质印迹测定) (Cherny 等, 1999)。对蛋白水解抗性增加和外加金属结合的组合可能是促成 AD 病理的 A β 的酪氨酸交联的特别有害的后果。

[0190] PDAPP 转基因小鼠过量产生人形式的 A β ₁₋₄₂ 并随着老化显示出广泛的脑淀粉样蛋

白斑沉积,以及行为和认知缺陷 (Games 等,1995 ;W096/40896)。用合成的 A β ₁₋₄₂ 免疫成熟 PDAPP 小鼠导致淀粉样蛋白斑在数量和强度上的惊人减低,而用该抗原免疫的 PDAPP 小鼠不产生淀粉样蛋白斑 (Schenk 等,1999 和 W099/27944)。看来已诱导了对 A β ₁₋₄₂ 的成功免疫应答,证据是在紧靠残余淀粉样蛋白斑附近的清除性小神经胶质细胞,以及在血中存在针对 A β ₁₋₄₂ 的抗体。作者建议用 A β 免疫可用于预防或治疗 AD。然而,广泛认为对 AD 进行免疫疗法似乎并不切实可行,因为由于免疫耐受人受体对自身蛋白不能产生有意义的免疫应答。Schenk 等得到的结果提示,给予适当的刺激,脑可能具有再吸收或清除顽固的淀粉状蛋白沉积的能力。但是,用 A β 本身进行免疫并不理想,因为可能诱导有害的自身免疫应答,和/或诱导不充分的、不能清除斑的应答。通过用根据本发明的非天然二酪氨酸或含有二酪氨酸的化合物进行免疫,可以避免这一问题。

[0191] 对本领域的技术人员来说很明显,尽管出于清楚和理解的目的详细描述了本发明的某些细节,可以对在此描述的技术方案和方法作出多种修改和变化,而不偏离本说明书中所公开的发明概念的范围。

[0192] 在此引用的参考文献列于以下数页,并在此引入作为参考。

[0193] 参考文献

[0194] Amado, R., Aeschbach, R., and Neukom, H. (1984) *Methods Enzymol* 107, 377-88. 13

[0195] Atwood, C. S., Huang, X., Moir, R. D., Scarpa, R. C., Bacarra, N. M. E., Hartshorn, M. A., Goldstein, L. E., Romano, D. M., Tanzi, R. E., and Bush, A. I. (1997) *Soc. Neurosci. Abstr.* 23, 1883

[0196] Atwood, C. S., Moir, R. D., Huang, X., Bacarra, N. M. E., Scarpa, R. C., Romano, D. M., Hartshorn, M. A., Tanzi, R. E., and Bush, A. I. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 12817-12826

[0197] Atwood, C. S., Scarpa, R. C., Huang, X., Farrag, Y. W., Moir, R. D., Cuajungco, M. P., Tanzi, R. E., and Bush, A. I. (1999) *Soc. Neurosci. Abstr.* 24, 546

[0198] Atwood, C. S., Scarpa, R. C., Huang, X., Moir, R. D., Jones, W. D., Fairlie, D. P., Tanzi, R. E., and Bush, A. I. (2000) *J. Neurochemistry* 75, 1219-1233

[0199] Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Hanschen, A., Yates, J., Cotman, C., and Glabe, C. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 546-554

[0200] Byun, J., Henderson, J. P., Mueller, D. M., and Heinecke, J. W. (1999) *Biochemistry* 38(8), 2590-600

[0201] Cherny, R. A., Legg, J. T., McLsan, C. A., Fairlie, D., Huang, X., Atwood, C. S., Beyreuther, K., Tanzi, R. E., Masters, C. L., and Bush, A. I. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 23223-23228

[0202] Dyrks, T., Dyrks, E., Hartmann, T., Masters, C., and Beyreuther, K. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 18210-18217

[0203] Galeazzi, L., Ronchi, P., Franceschi, C., and Giunta, S. (1999) *Amyloid* 6(1), 7-13

[0204] Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 120, 885-890

- [0205] Gross, A. J. , and Sizer, I. W. (1959) *J. Biol. Chem.* 234,1611-1614
- [0206] Hsiao, K. , Chapman, P. , Nilsen, S. , Eckman, C. , Harigaya, Y. , Younkin, S. , Yang, F. , Cole, G. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. (1996) *Science* ;274(5284) :99-102.
- [0207] Heinecke, J. W. , Li, W. , Francis, G. A. , and Goldstein, J. A. (1993) *J Clin Invest* 91(6), 2866-72
- [0208] Hensley, K. , Maidu, M. L. , Yu, Z. , Sang, H. , Markesbery, W. R. , and Floyd, R. A. (1998) *J. Neurosci* 188126-8132
- [0209] Huang, X. , Cuajungco, M. P. , Atwood, C. S. , Hartshorn, M. A. , Tyndall, J. , Hanson, G. R. , Stokes, K. C. , Leopold, M. , Multhaup, G. , Goldstein, L. E. , Scarpa, R. C. , Saunders, A. J. , Lim, J. , Moir, R. D. , Glabe, C. , Bowden, E. F. , Masters, C. L. , Fairlie, D. P. , Tanzi, R. E. , and Bush, A. I. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 37111-6
- [0210] Huang, X. , Atwood, C. S. , Hartshorn, M. A. , Multhaup, G. , Goldstein, L. E. , Scarpa, R. C. , Cuajungco, M. P. , Gray, D. N. , Lim, J. , Moir, R. D. , Tanzi, R. E. , . and Bush, A. I. (1999) *Biochemistry* 38, 7609-7616
- [0211] Jacob, J. S. , Cistola, D. P. , Hsu, F. F. , Muzaffar, S. , Mueller, D. M. , Hazen, S. L. , and Heinecke, J. W. (1996) *J Biol Chem* 271(33), 19950-6
- [0212] Kato, Y. , Maruyama, W. , Naoi, M. , Hashizume, Y. , and Osawa, T. (1998) *FEBS Letters* 439(3), 231-4
- [0213] Kikugawa, K. , Kato, T. , Beppu, M. , and Hayasaka, A. (1991) *Biochim Biophys Acta* 1096(2), 108-14
- [0214] Lindenau, J. , Noack, H. , Asayama, K. , and Wolf, G. (1998) *Glia* 24(2), 252-6
- [0215] Lovell, M. A. , Robertson, J. D. , Teesdale, W. J. , Campbell, J. L. , and Markesbery, W. R. (1998) *J Neurol Sci* 158(1), 47-52. 15
- [0216] Malsncik, D. A. , Sprouse, J. F. , Swanson, C. A. , and Anderson, S. R. (1996) *Anal Biochem* 242(2), 202-13
- [0217] Masters, C. L. , Multhaup, G. , Simms, G. , Pottgiesser, J. , Martins, R. N. , and Beyreuther, K. (1985) *The EMBO Journal* 4, 2757-2763
- [0218] McLean et al. , (1999), *Ann. Neurol.* 46, 860-866.
- [0219] Pember, S. O. , and Kinkade, J. M. , Jr. (1983) *Blood* 61(6), 1116-24. 14
- [0220] Requena, J. R. , et al. (2001) *PNAS* 98, 7170-7175)
- [0221] Roher, A. E. , Chaney, M. O. , Kuo, Y. M. , Webster, S. D. , Stine, W. B. , Haverkamp, L. J. , Woods, A. S. , Cotter, R. J. , Tuohy, J. M. , Krafft, G. A. , Bonnell, B. S. , and Emmerling, M. R. (1996) *J Biol Chem* 271(34), 20631-5
- [0222] Sela M. and Arnon, R. (1960) *Biochem J.* 75, 91-102.
- [0223] Sheng, J. G. , Mrak, R. E. , and Griffin, W. S. (1997) *Acta Neuropathol (Berl)* 94(1), 1-5
- [0224] Schenk, D. et al. , (1992) *Nature* 400, 173-177.
- [0225] Shivers, B. D. , Hilbich, C. , Multhaup, G. , Salbaum, M. , Beyreuther, K. , and

Seeburg, P. H. (1988)EMBO J. 7,1365-1370

[0226] Shoji, M. , Golde, T. E. , Ghiso, J. , Cheung, T • T • , Estus, S. , Shaffer, L. M. , Cai, X. -D. , McKay, D. M. , Tintner, R. , Frangione, B. , and Younkin, S. G. (1992)Science 258,126-129

[0227] Smail, E. H. , Briza, P. , Panagos, A. , and Berenfeld, L. (1995)Infect Immun63(10),4078-83

[0228] Souza, J. M. , Giasson, B. l. , Chen, Q. , Lee, V. M-Y. , andIlschiropoulos(2000) J. Biol. Chem. ,295,18344-18349

[0229] Van Muiswinkel, F. L. , Veerhuis, R. , and Eikelenboom, p. (1996) J. Neurochem. 66,2468-2476

[0230] Vaughan, D. W. , and Peters, A. (1981)

[0231] J. Neuropathol. Exp. Neurol. 40,472-487

- · — · — · — 1. hAβ 1-40 + H₂O₂ + 过氧化物酶
- — · — · — · — 2. hAβ 1-42 + H₂O₂ + 过氧化物酶
- — — — — 3. rAβ 1-40 + H₂O₂ + 过氧化物酶
- 4. hAβ 1-40
- 5. hAβ 1-42
- x — x — 6. rAβ 1-40

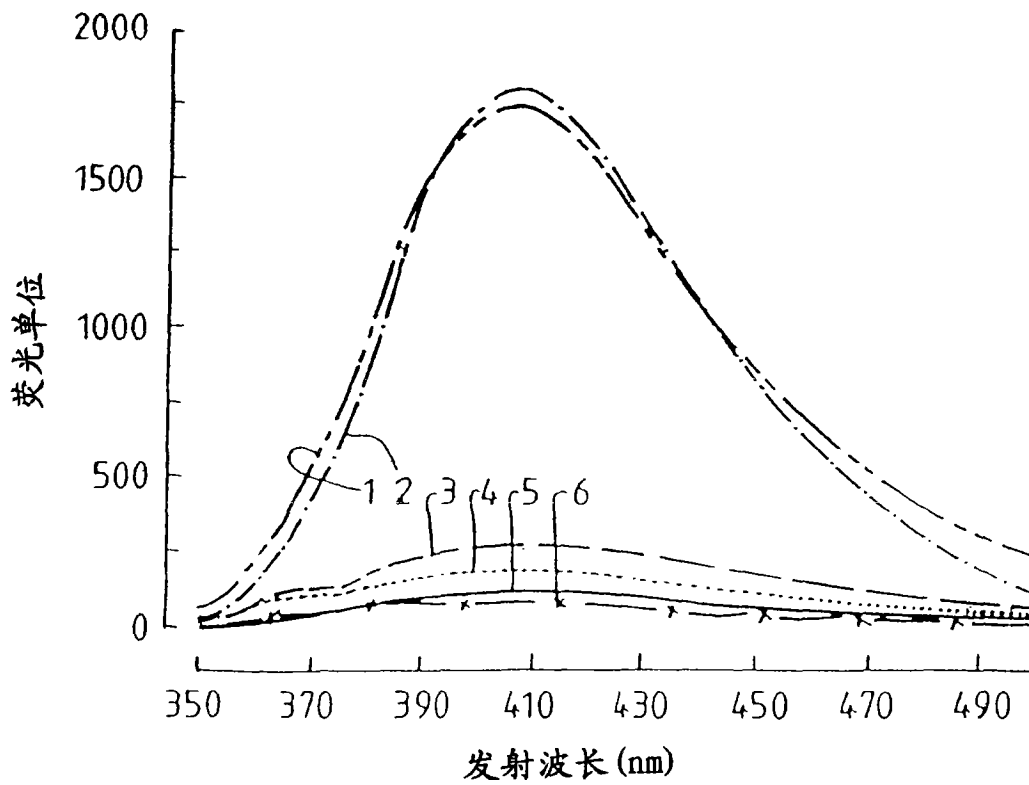


图 1A

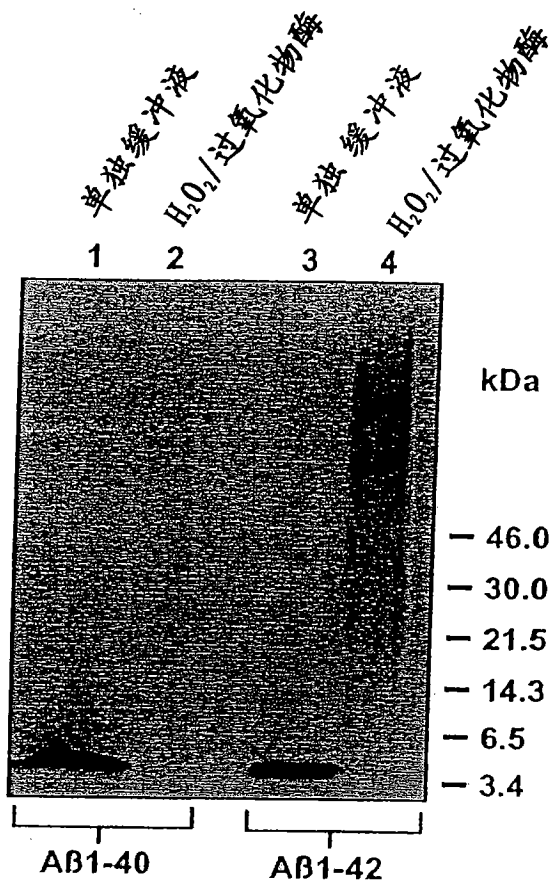


图 1B

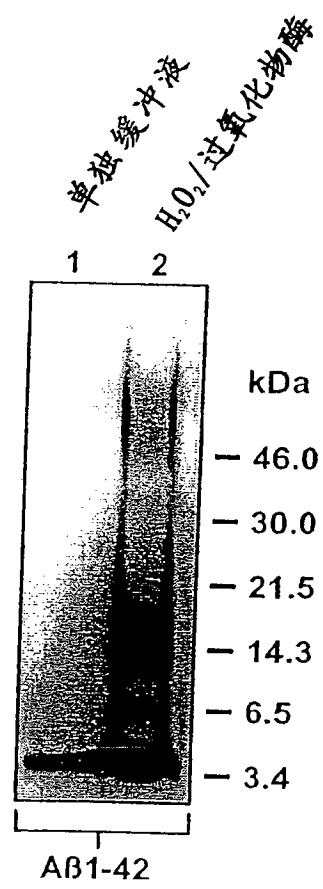


图 1C

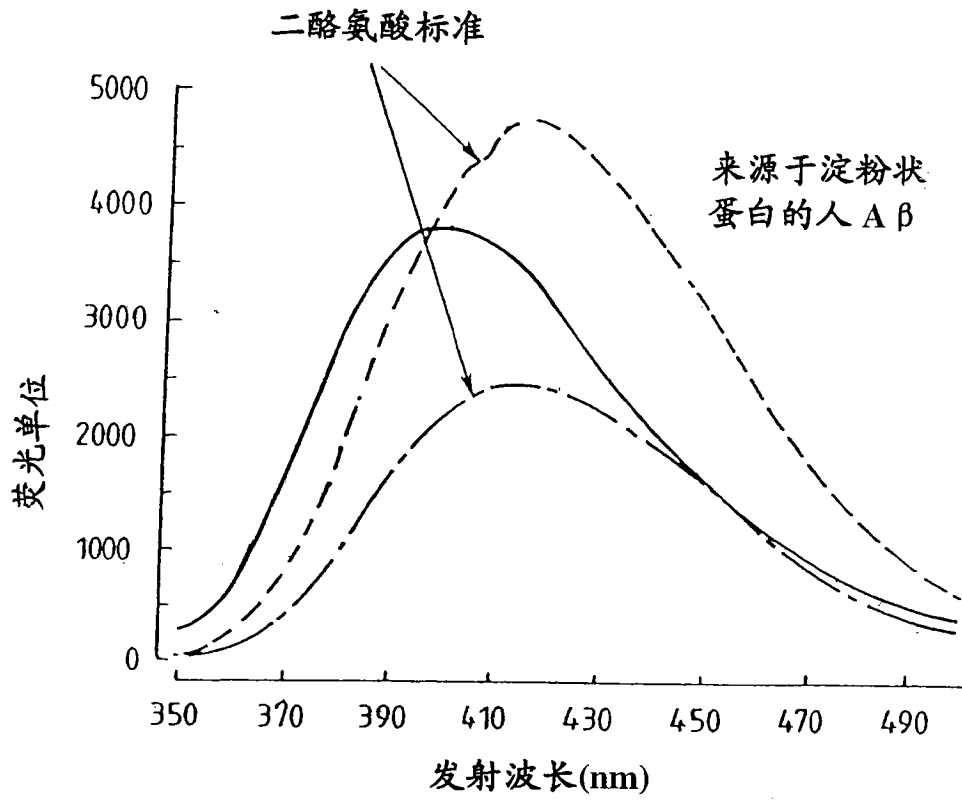


图 2A

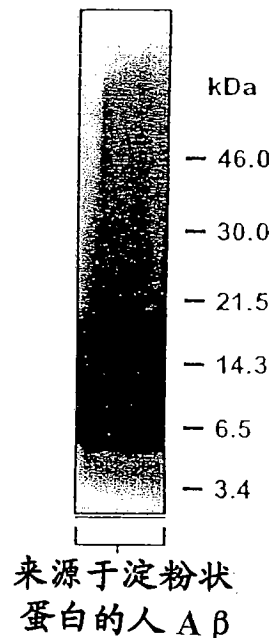


图 2B

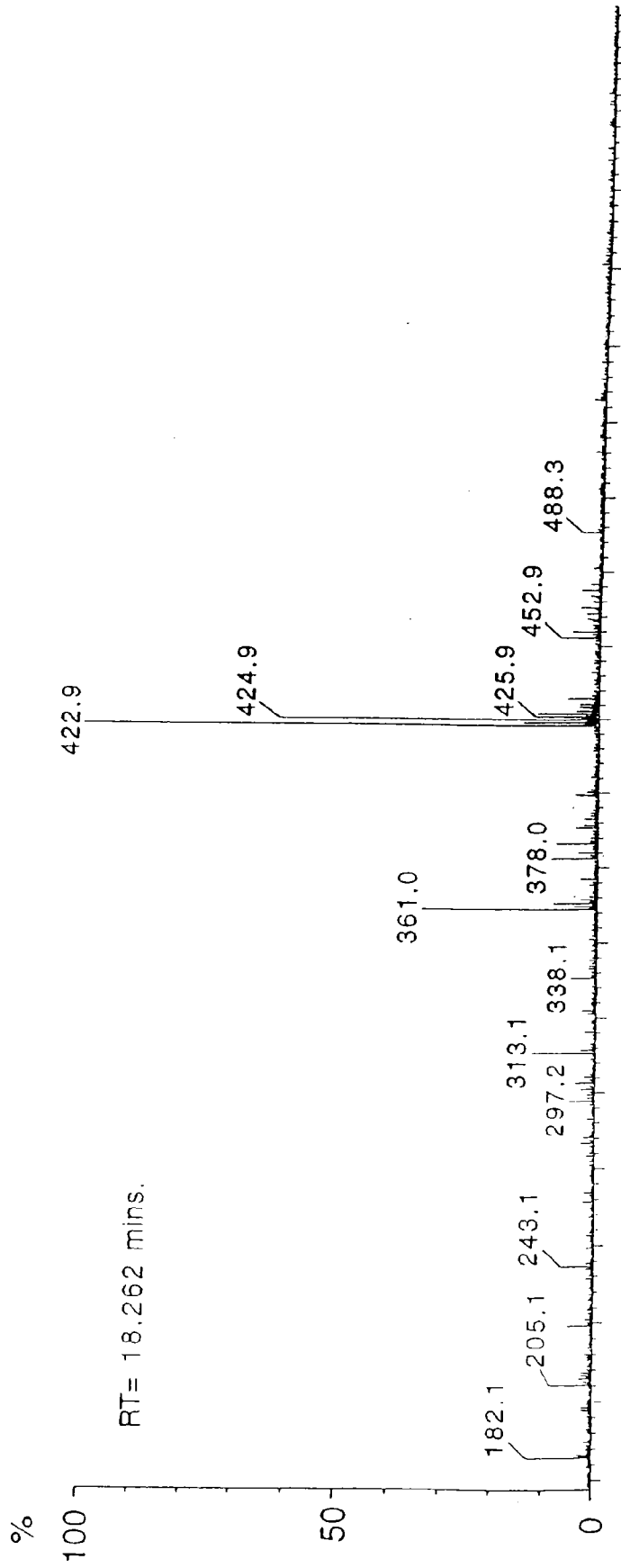


图 3A

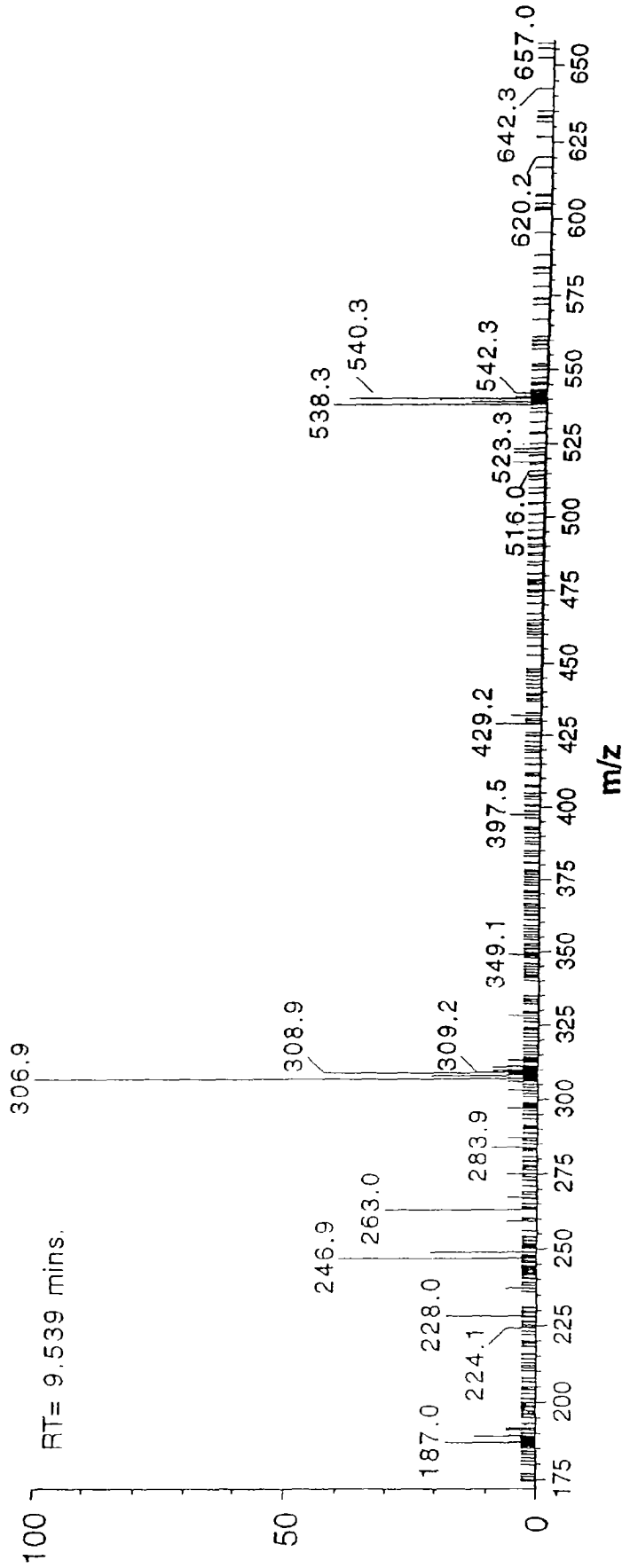


图 3B

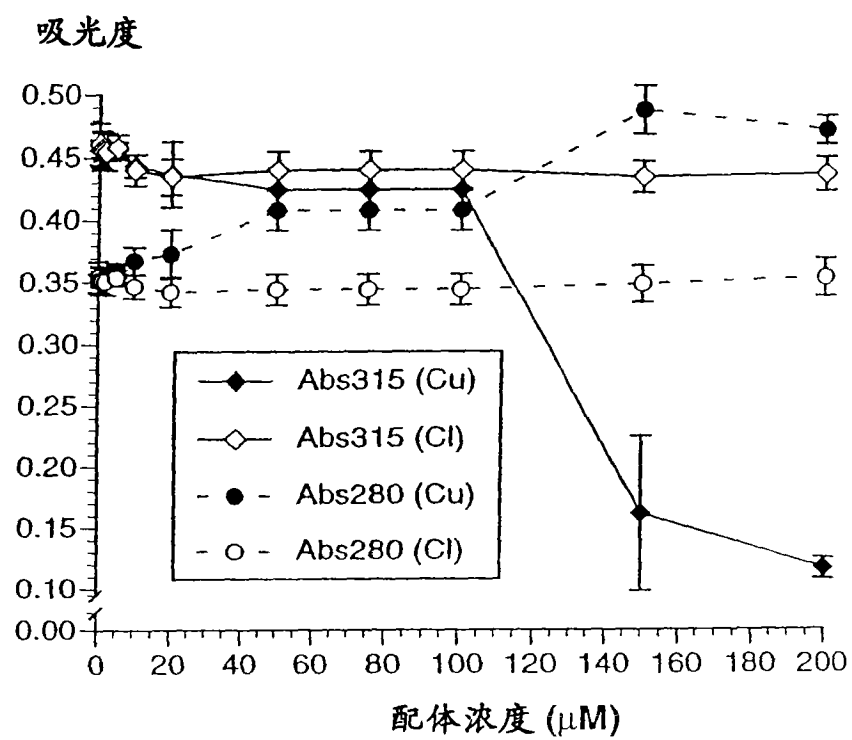


图 3C

图 4B

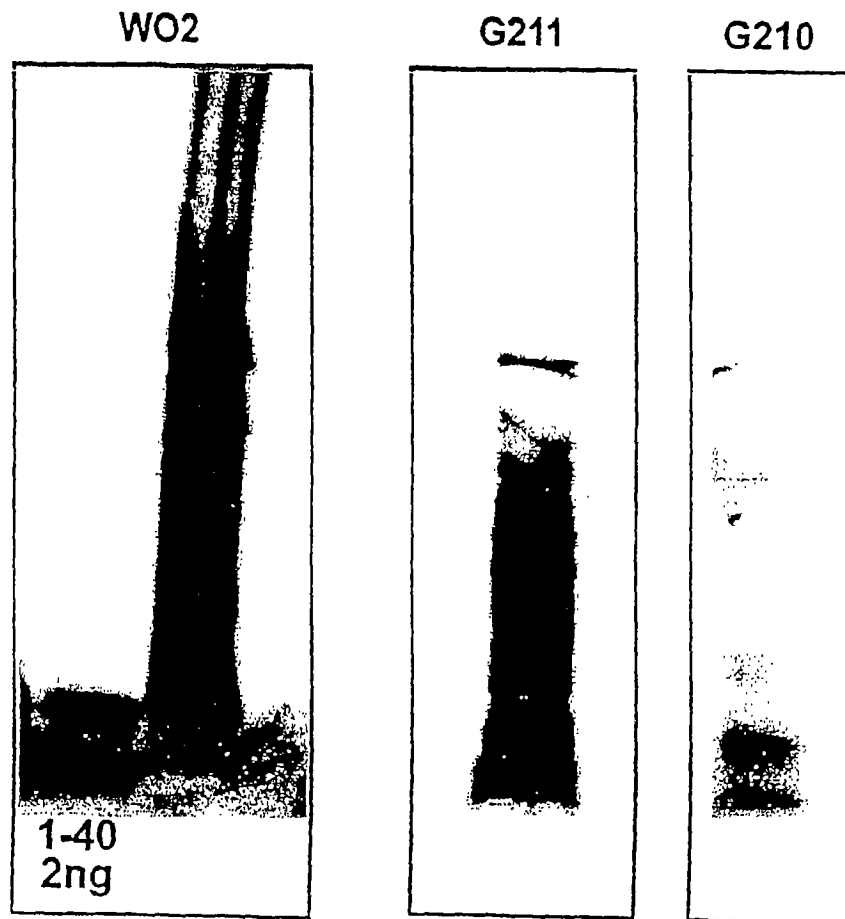


图 4A

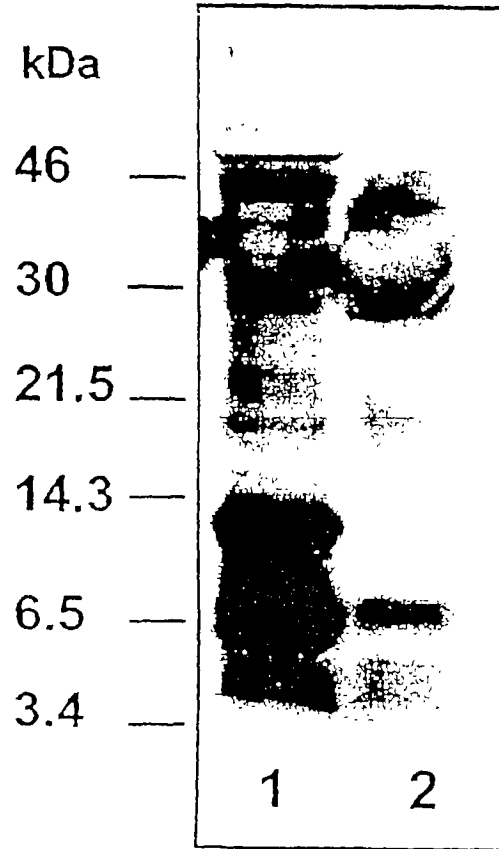
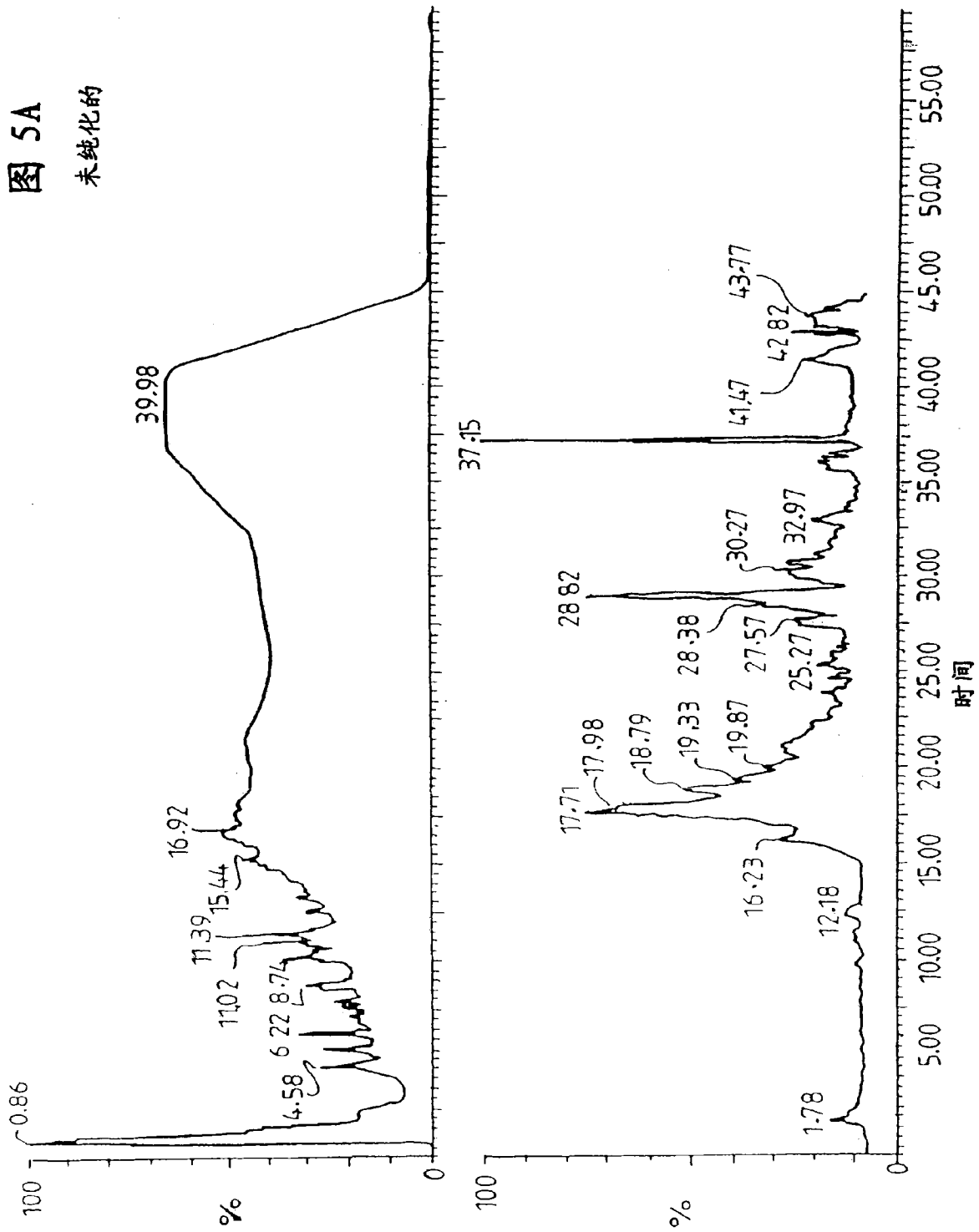


图 5A

未纯化的



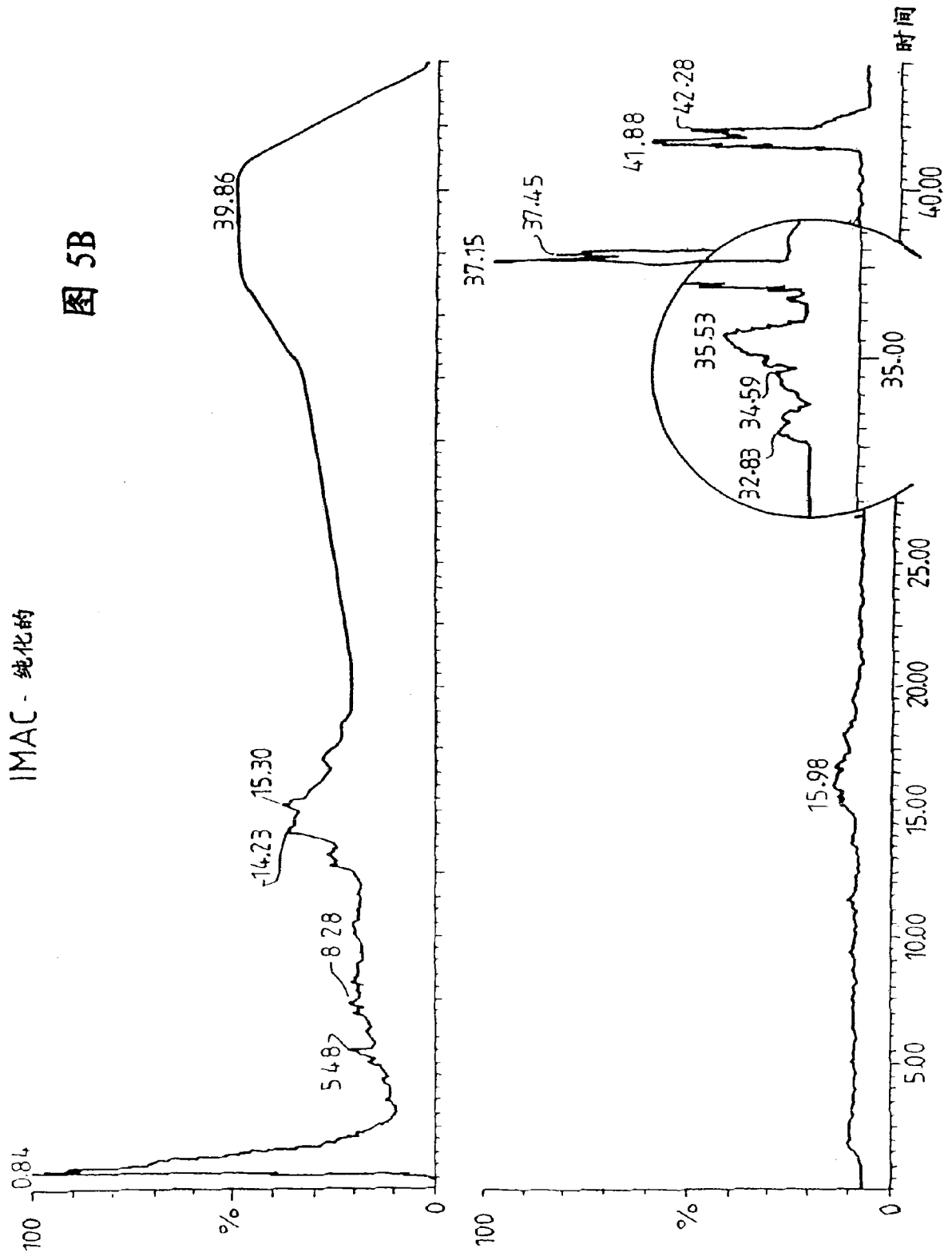
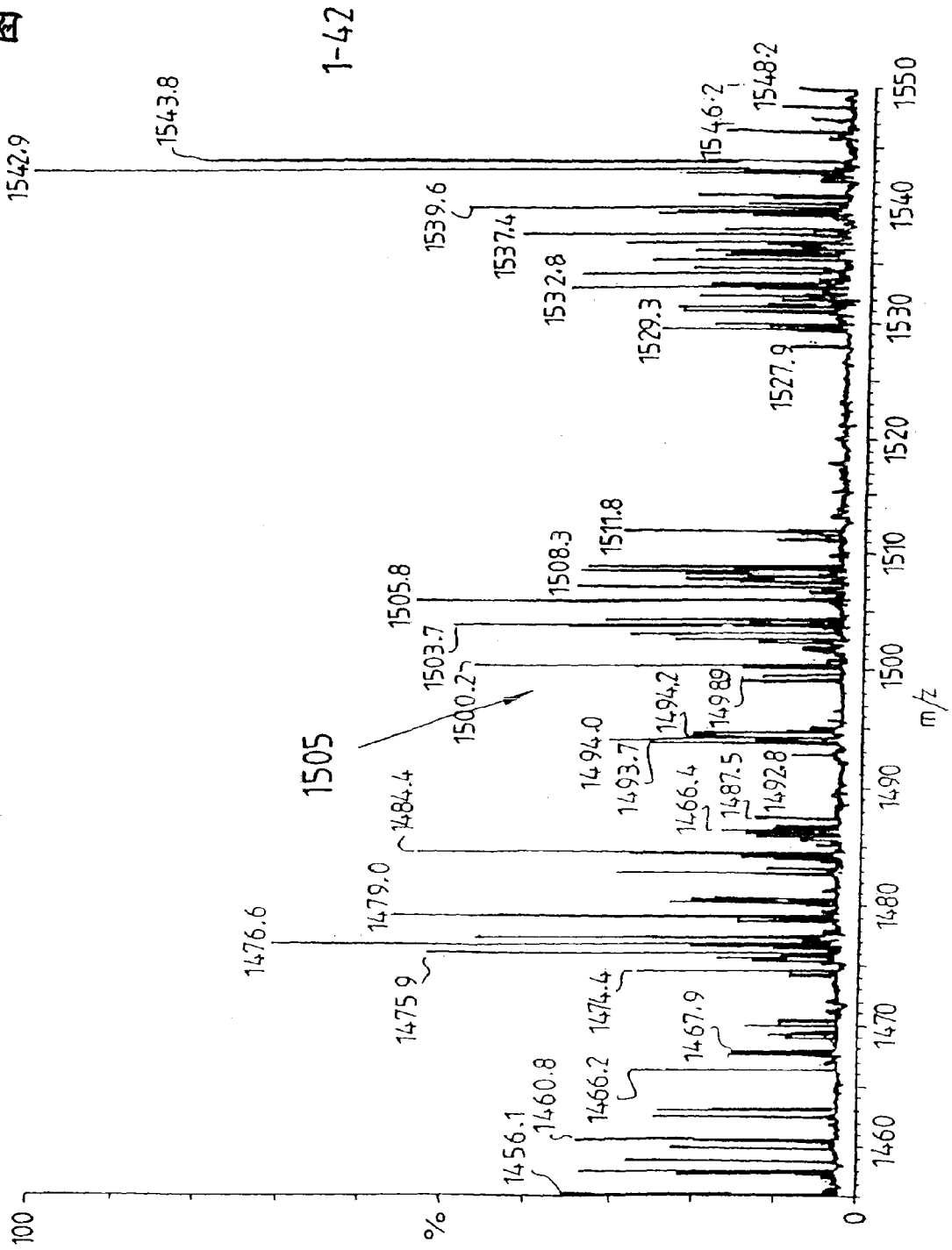
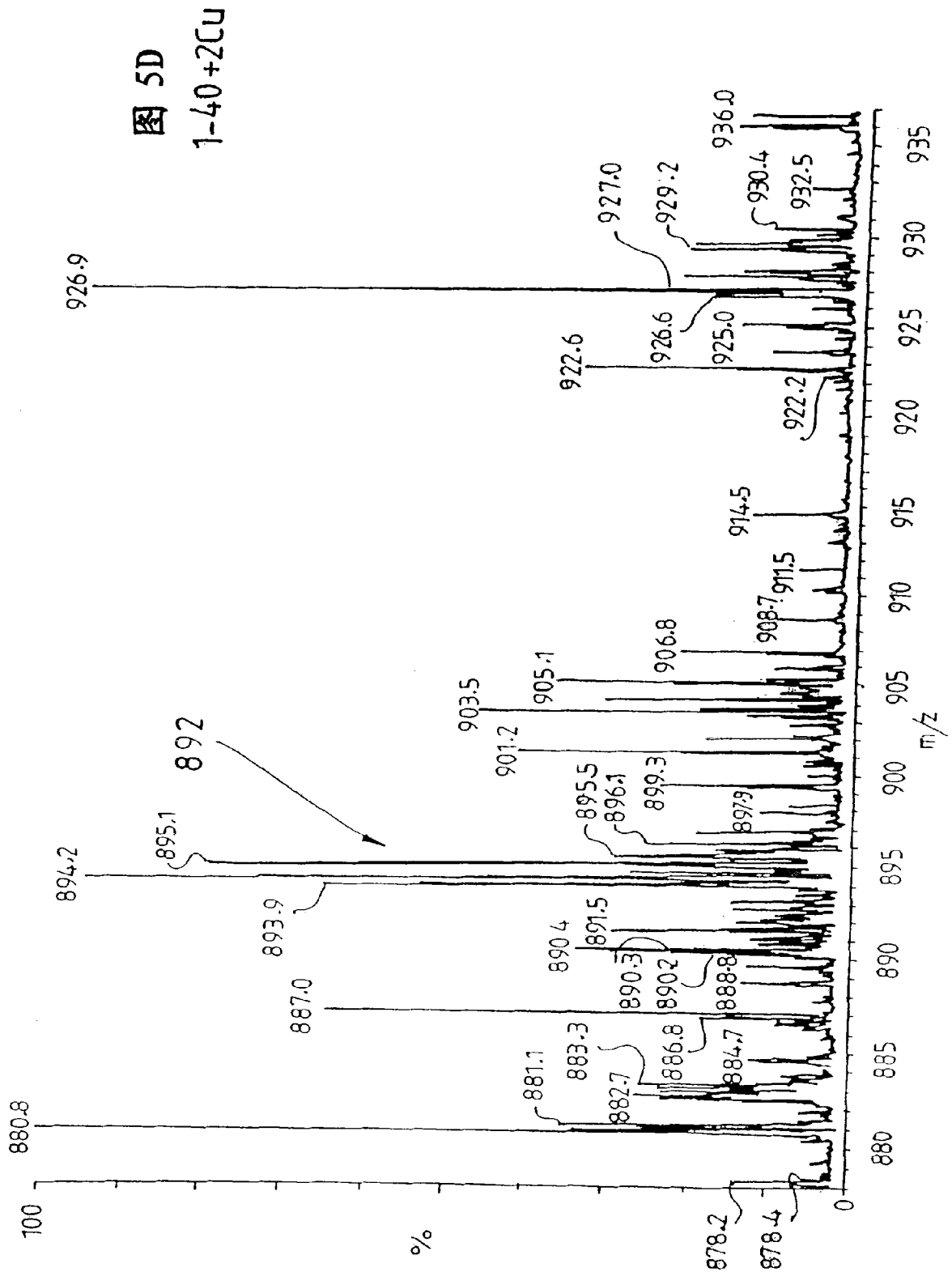
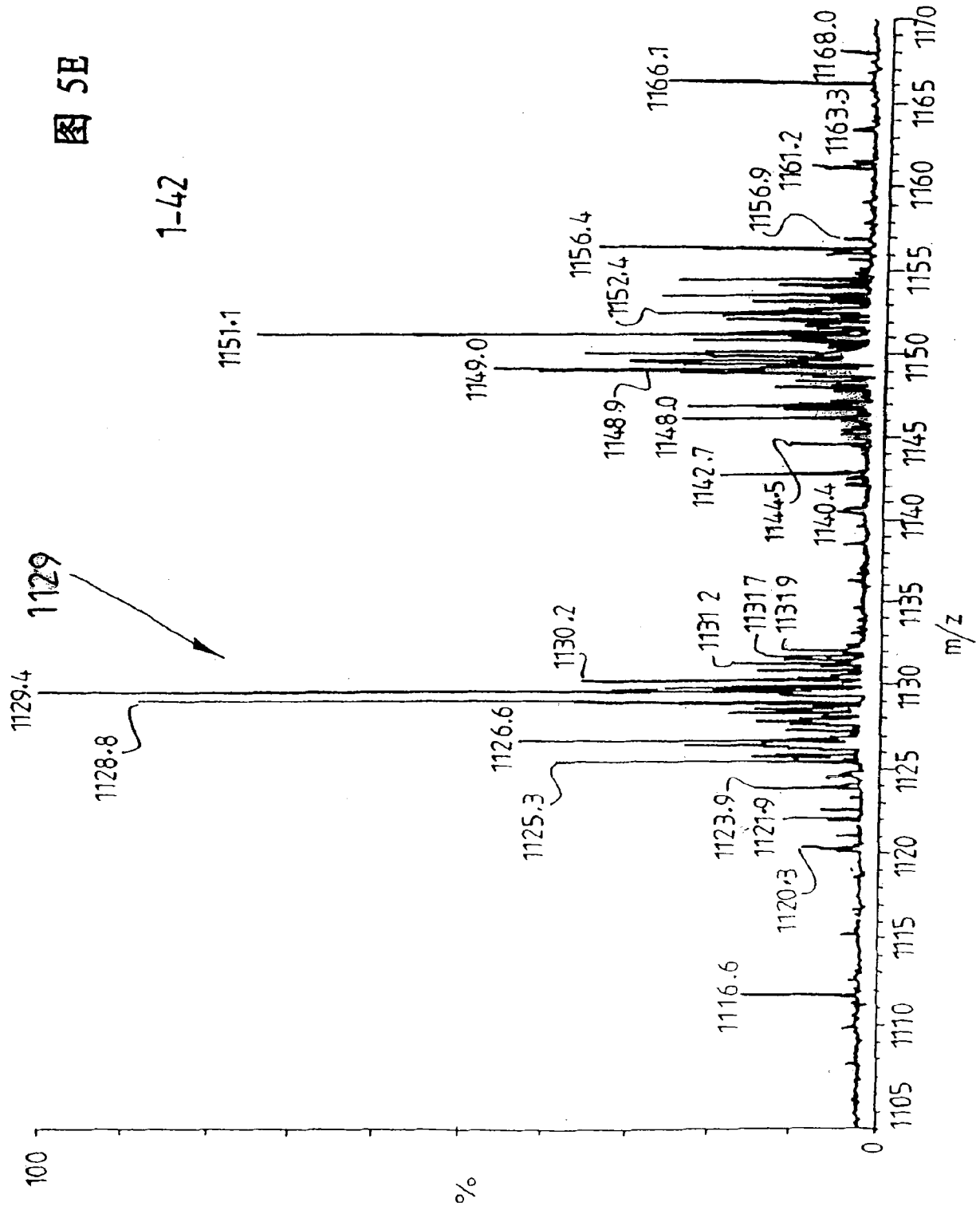
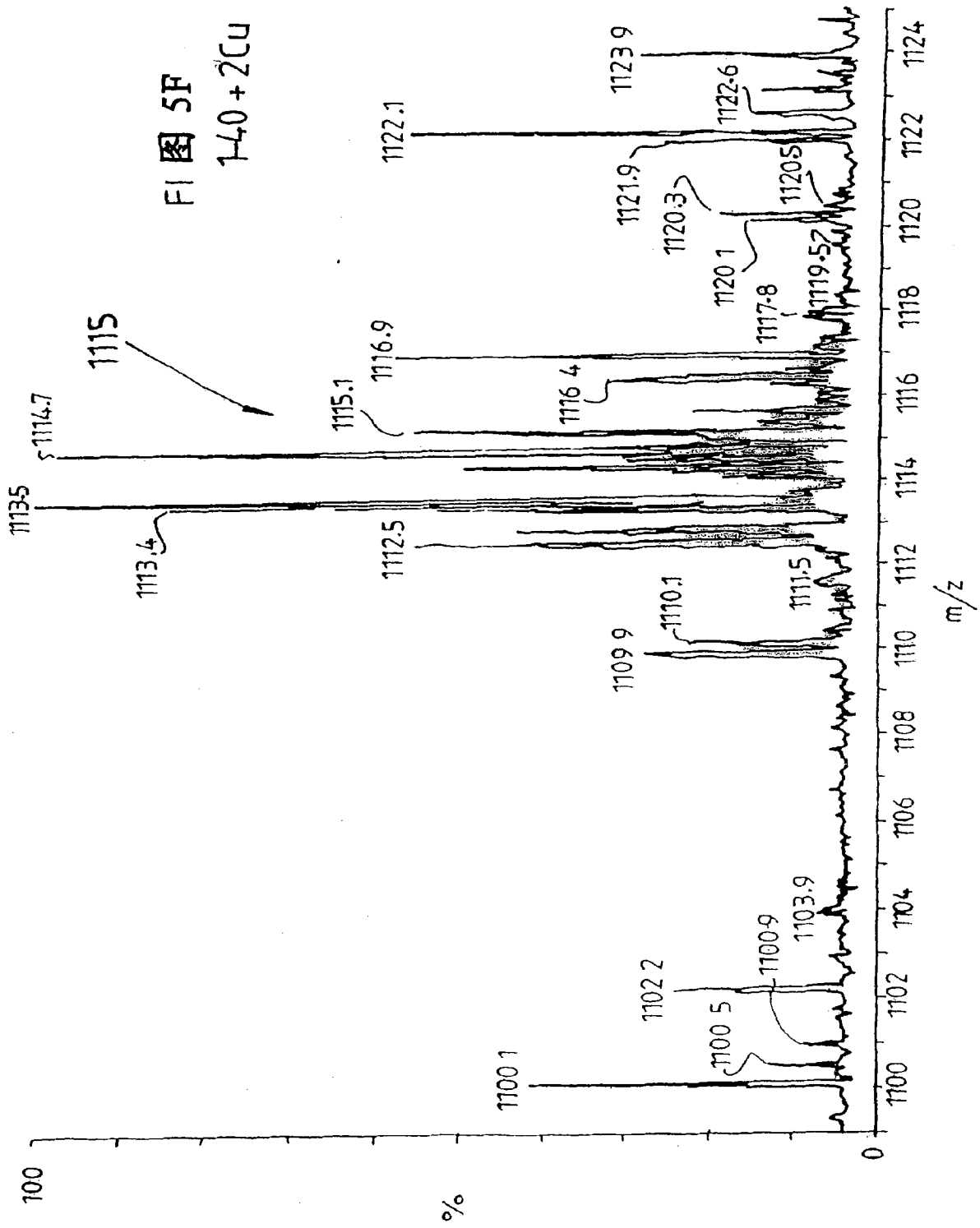


图 5C









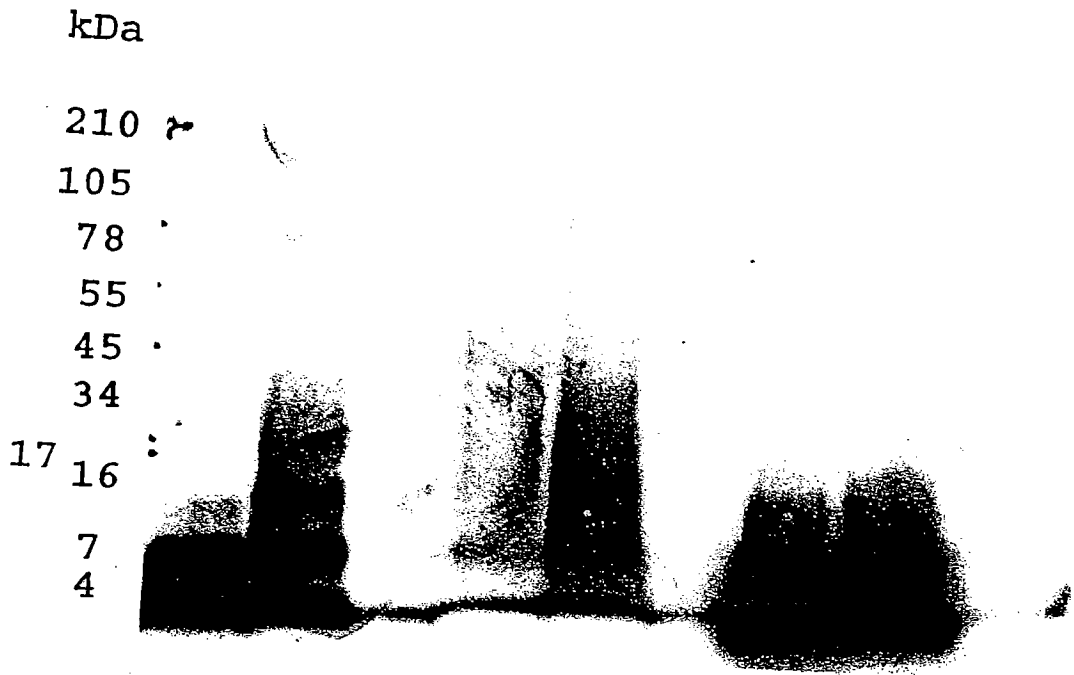


图 6A

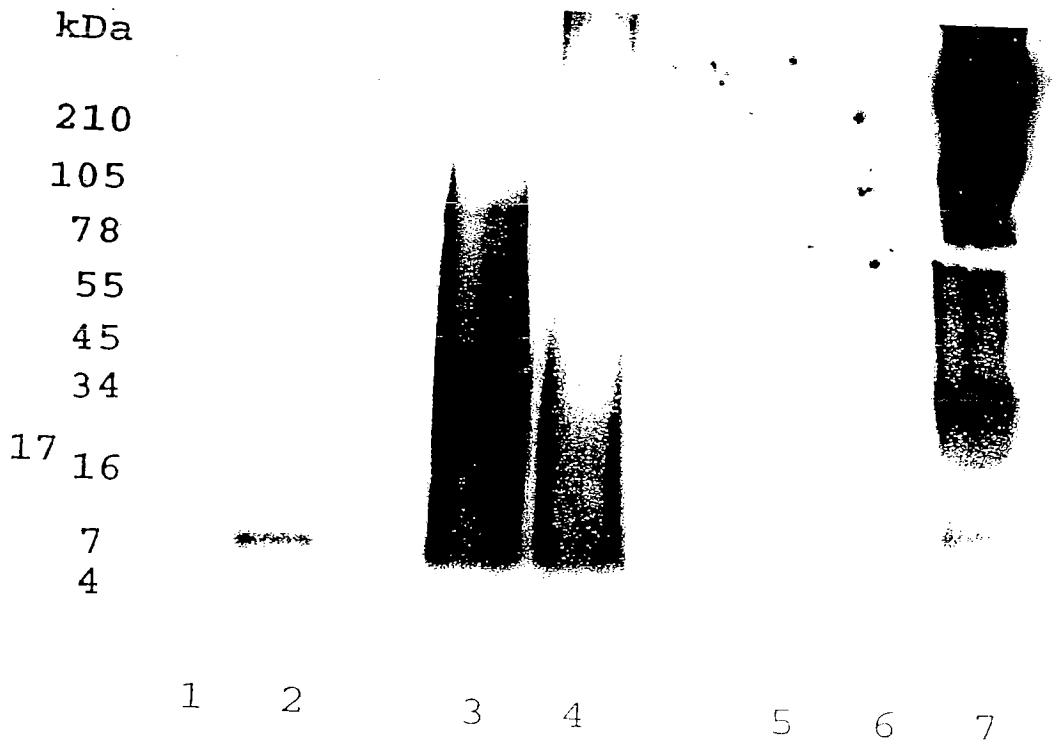


图 6B

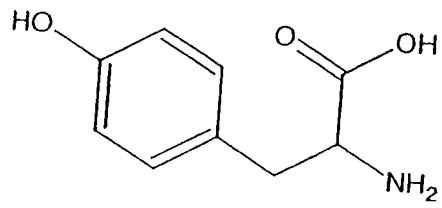


图 7A

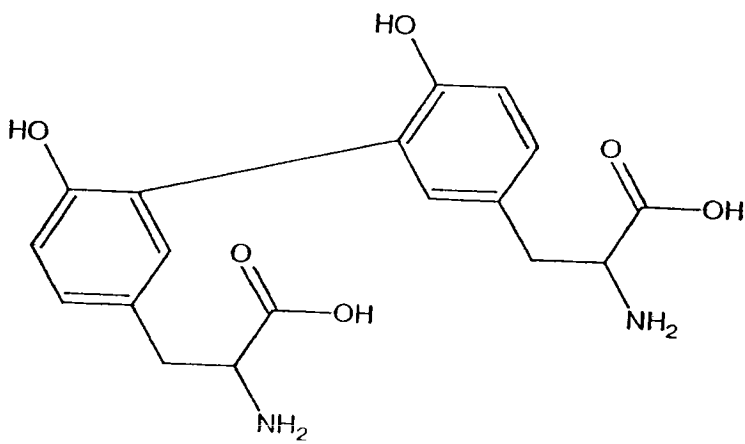


图 7B

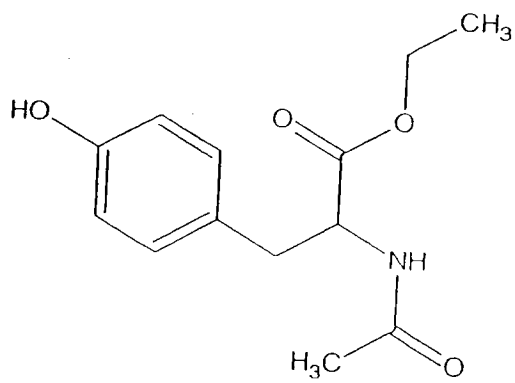


图 7C

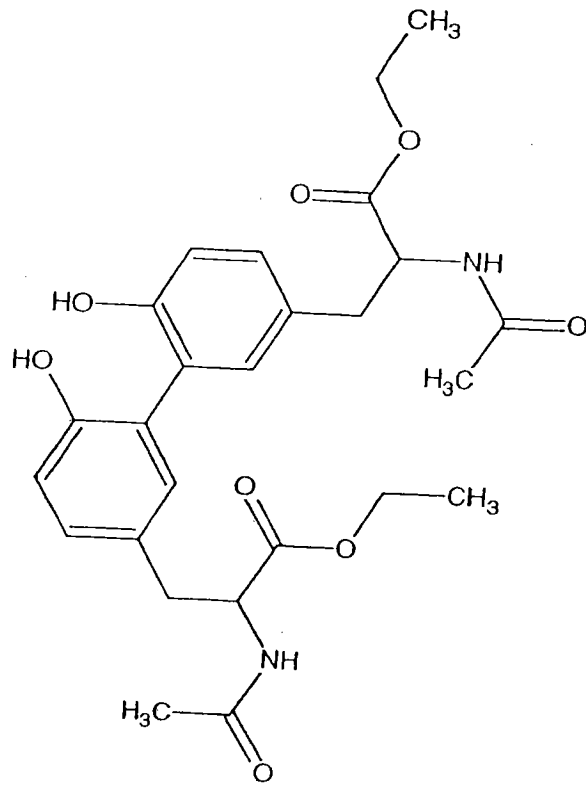


图 7D

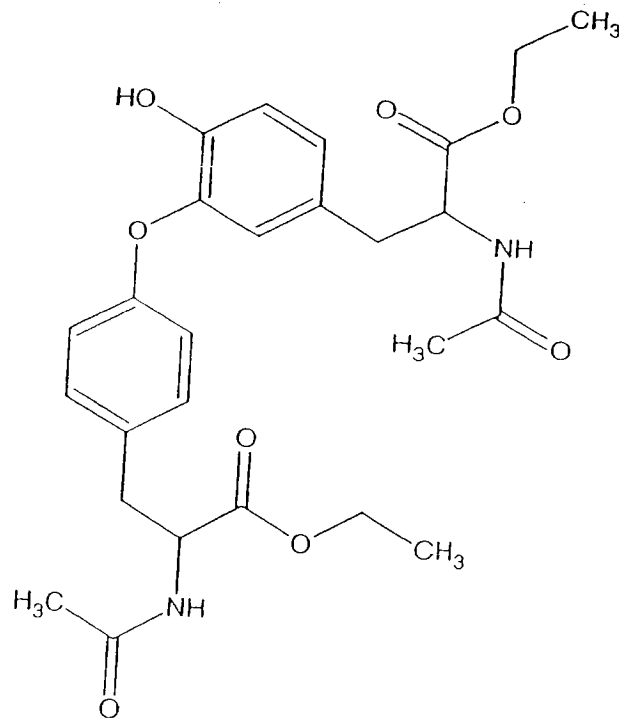


图 7E

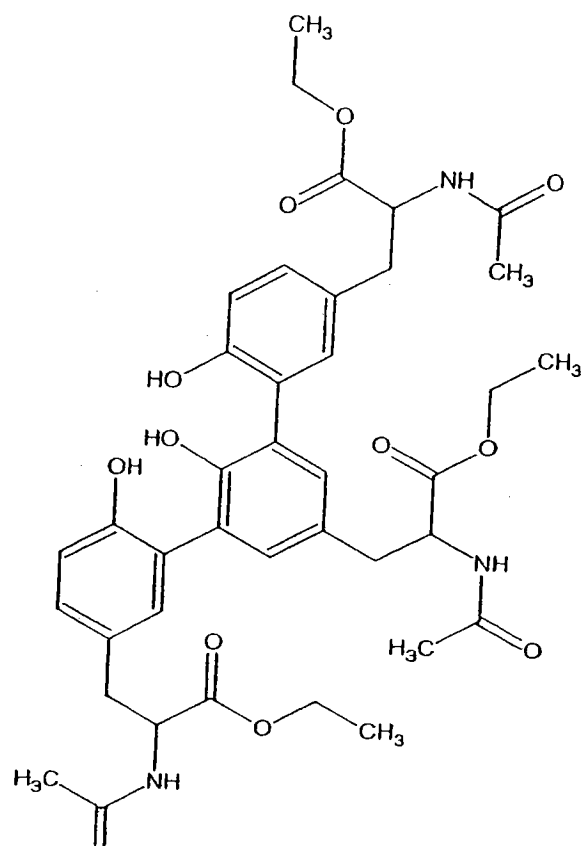
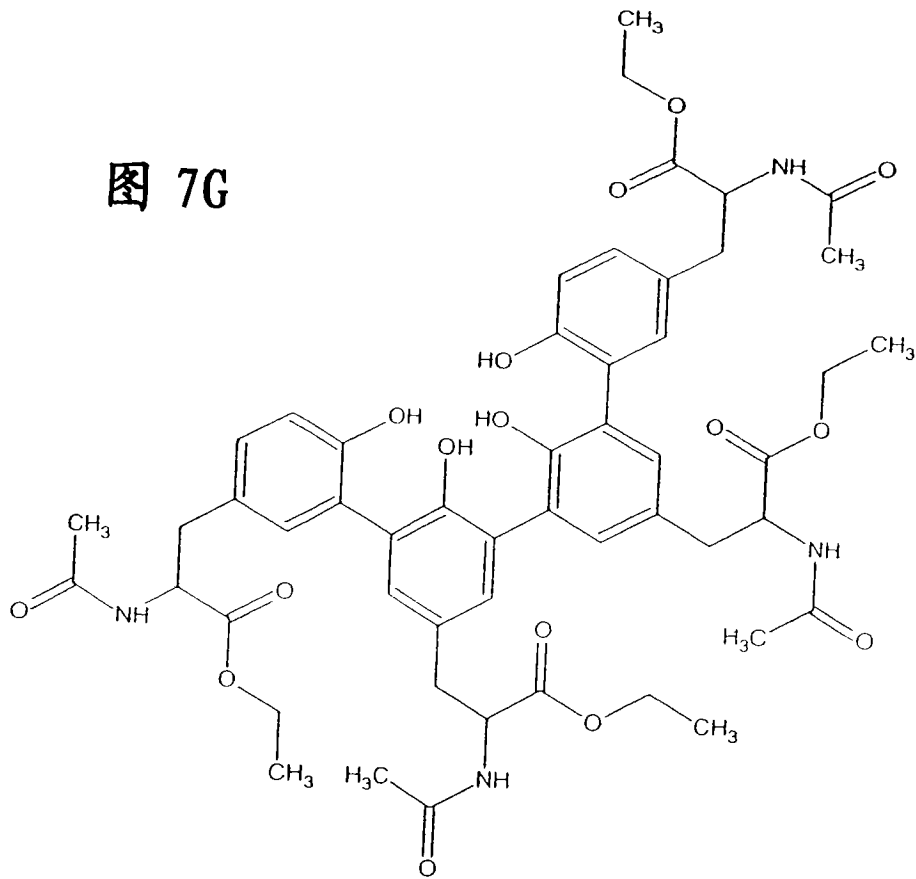


图 7F

图 7G



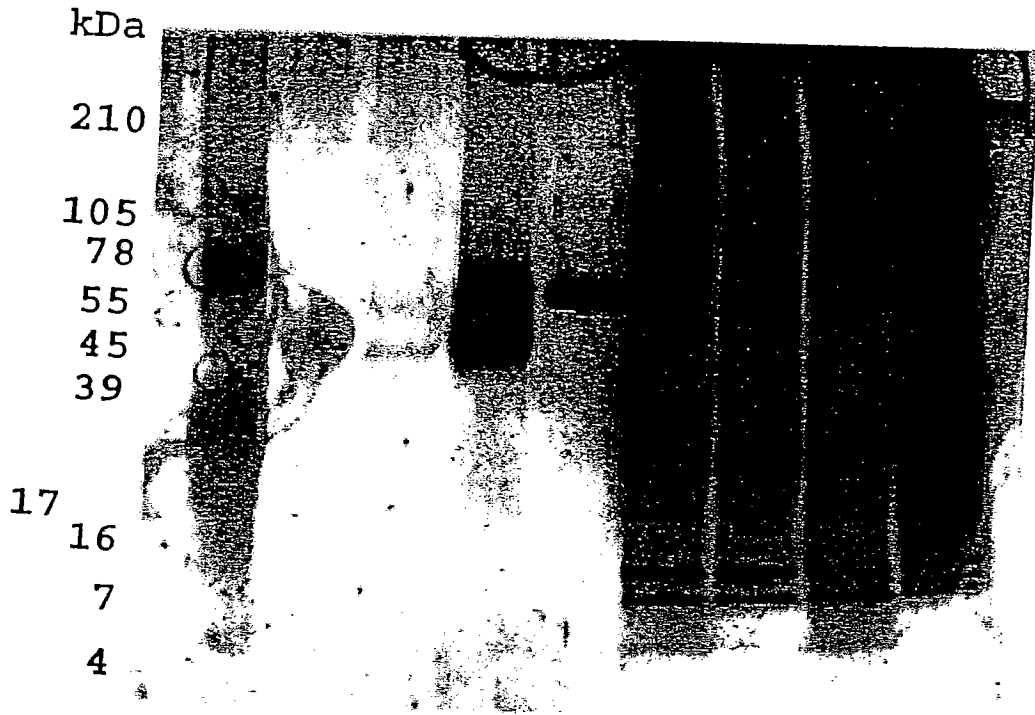


图 8A

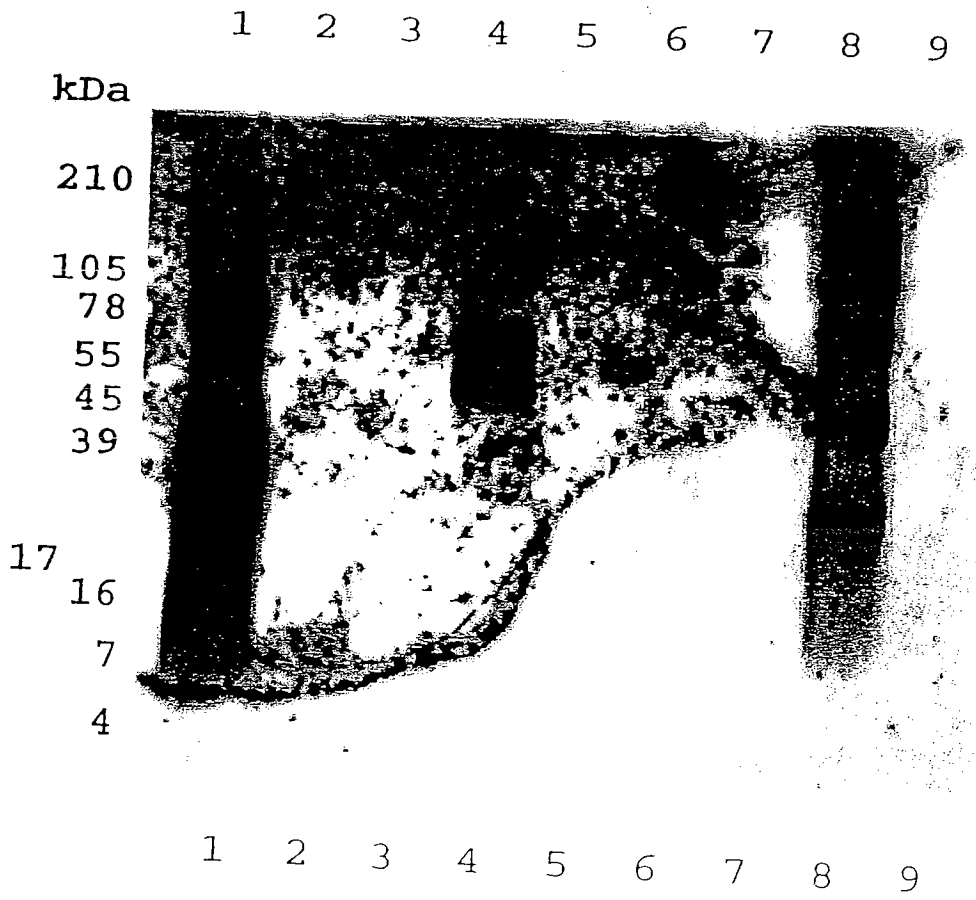


图 8B

专利名称(译)	神经毒性寡聚体		
公开(公告)号	CN101411876B	公开(公告)日	2013-01-16
申请号	CN200810129893.4	申请日	2001-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
申请(专利权)人(译)	综合医院有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	综合医院有限公司		
[标]发明人	A布什 R彻尼 R E 坦兹		
发明人	A·布什 R·彻尼 R·E·坦兹		
IPC分类号	A61K39/395 A61K47/48 A61P25/28 C07K16/18 G01N33/53 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61K39/385 A61P21/00 A61P25/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P27/12 G01N33/68		
CPC分类号	A61K2039/6081 A61K38/1709 A61K47/48246 A61K39/0007 C07K16/18 G01N33/6896 A61K47/64 A61P21/00 A61P25/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/12		
审查员(译)	吴立		
优先权	60/214779 2000-06-28 US 60/242177 2000-10-23 US		
其他公开文献	CN101411876A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于治疗或减轻阿尔茨海默氏病和其它与异常蛋白聚集有关的病症的方法和组合物。具体地说，本发明涉及用于阿尔茨海默氏病、帕金森病和内障的免疫疗法的方法和组合物。一方面本发明提供了预防、治疗或减轻病症的方法，所述病症特征在于与氧化性损伤有关的特定蛋白的病理性聚集和蓄积以及形成酪氨酸交联，该方法包括以下步骤：用免疫有效剂量的一种或多种酪氨酸交联的化合物，任选还包含与所述化合物络合的铜离子，对需要这种治疗的对象进行免疫。或者可以采用针对酪氨酸交联的化合物的被动免疫。还公开并要求保护预防性或治疗性组合物和诊断方法。

