



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102858796 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201180020228. 1

A61K 39/395(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 03. 03

A61P 25/28(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 37/04(2006. 01)

61/310, 167 2010. 03. 03 US

C07K 16/18(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/53(2006. 01)

2012. 10. 22

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2010/002251 A1, 2010. 01. 07,

PCT/CA2011/000238 2011. 03. 03

WO 2010/002251 A1, 2010. 01. 07,

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 皇甫洁琼

W02011/106885 EN 2011. 09. 09

(73) 专利权人 不列颠哥伦比亚大学

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72) 发明人 尼尔·R·凯斯曼

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

C07K 14/47(2006. 01)

A61K 39/00(2006. 01)

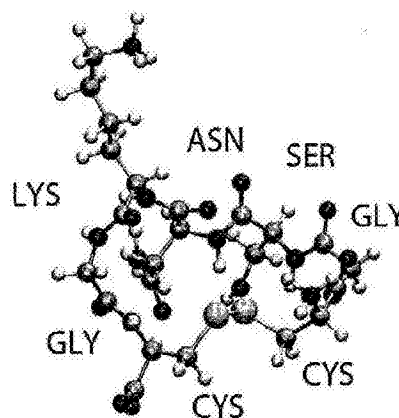
权利要求书1页 说明书24页 附图12页

(54) 发明名称

寡聚体特异性淀粉样蛋白 β 表位和抗体

(57) 摘要

一种新的来源于 A β 的约束的肽表位、相关抗体组合物和使用方法,其中所述表位包含氨基酸序列 SNK。描述了一种特异性结合包含构象表位的环肽的分离的抗体,所述构象表位包含氨基酸序列 SNK 并对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。还描述了一种抗原肽,其包含具有约束的环状构型的表位,所述约束的环状构型包含氨基酸序列 SNK 并对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。还描述了治疗、预防和诊断阿尔茨海默病的方法。



1. 一种分离的抗体,其特异性结合环肽,其中所述环肽包含构象表位,所述构象表位由对应于 SEQ ID NO:1(GSNKG) 的氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列中的 K(赖氨酸)是暴露于溶剂的。

2. 如权利要求 1 所述的分离的抗体,其中所述环肽包含氨基酸序列 CGSNKGC,其中所述氨基酸序列 CGSNKGC 中的 K(赖氨酸)是暴露于溶剂的。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的分离的抗体,其中所述抗体以比结合 A β 的非寡聚形式更大的亲和力特异性结合 A β 的寡聚形式,其中所述抗体包含与 5E3 的 CDR 序列相同的 CDR 序列,以及其中 5E3 包含对应于图 15 所鉴定的序列的重链序列和轻链序列。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的分离的抗体,其中所述抗体是单克隆的。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的分离的抗体,其中所述抗体是人源化的。

6. 一种抗原肽,其包含具有约束的环状构型的表位,其中所述表位由对应于 SEQ ID NO:1(GSNKG) 的氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列中的 K(赖氨酸)是暴露于溶剂的。

7. 如权利要求 6 所述的抗原肽,其中所述抗原肽包含氨基酸序列 CGSNKGC,其中所述氨基酸序列 CGSNKGC 中的 K(赖氨酸)是暴露于溶剂的。

8. 一种抗原肽,其包含具有约束的环状构型的表位,其中所述表位对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区,所述寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区对应于寡聚 A β (1-40) 或寡聚 A β (1-42) 的残基 25-29,以及其中 28 位的赖氨酸残基是暴露于溶剂的。

9. 一种免疫缀合物,其包含与可检测的标记缀合的权利要求 1-5 中任一项所述的抗体。

10. 一种组合物,其包含治疗有效量的权利要求 1-5 中任一项所述的分离的抗体以及药学可接受的佐剂。

11. 一种抗寡聚疫苗组合物,其包含权利要求 6-8 中任一项所述的抗原肽以及药学可接受的佐剂。

12. 药学有效量的权利要求 1-5 中任一项所述的分离的抗体或权利要求 9 所述的免疫缀合物在制备用于治疗需要所述治疗的患者中的阿尔茨海默病的药物中的用途。

13. 权利要求 11 所述的疫苗组合物在制备用于治疗或预防需要所述治疗的患者中的阿尔茨海默病的药物中的用途。

14. 权利要求 1-5 中任一项所述的分离的抗体在制备用于诊断疑似患有阿尔茨海默病的患者中的阿尔茨海默病的试剂盒中的用途。

15. 一种试剂盒,其包含:

权利要求 1-5 中任一项所述的分离的抗体。

16. 如权利要求 15 所述的试剂盒,其包含一种或多种检测试剂。

17. 权利要求 1-5 中任一项所述的抗体或权利要求 9 所述的免疫缀合物在制备用于治疗阿尔茨海默病的组合物中的用途。

18. 编码权利要求 1-5 中任一项所述的分离的抗体的核酸。

19. 结合权利要求 6 或 7 所述的抗原肽的抗体。

寡聚体特异性淀粉样蛋白 β 表位和抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 3 月 3 日提交的美国临时专利申请第 61/310,167 号的优先权, 其整体援引加入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及 $A\beta$ 寡聚体中的新构象表位、相关抗体组合物和使用方法。

[0004] 发明背景

[0005] 阿尔茨海默病 (AD) 是常见的痴呆 (紊乱的记忆和认知) 神经变性疾病, 其与主要由 $A\beta$ (1-40)、 $A\beta$ (1-42) 和 $A\beta$ (1-43) 肽 (也称为淀粉样蛋白 β 或 $A\beta$) 组成的胞外斑块的脑积累相关, $A\beta$ (1-40)、 $A\beta$ (1-42) 和 $A\beta$ (1-43) 肽均为淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 的蛋白水解产物。此外, 主要由异常磷酸化的 tau 蛋白 (神经元微管相关蛋白) 组成的神经原纤维缠结在濒死神经元中细胞内积累。 $A\beta$ (1-42) 是 AD 患者的淀粉样蛋白斑块中的优势种类。

[0006] 家族形式的 AD 可以由 APP 基因或者早老蛋白 1 或 2 基因中的突变引起, 早老蛋白 1 或 2 的蛋白产物与 APP 加工成 $A\beta$ 有关。载脂蛋白 E 等位变体也影响散发性和家族形式的 AD 的发病年龄。最近, 据发现其中的肽寡聚化的 $A\beta$ 的特定分子种类介导 AD 和该疾病的小鼠模型中观察到的神经毒性的主要组分 (Walsh et al. 2002)。 $A\beta$ 寡聚体毒性可以通过神经元胰岛素受体的功能异常 (Zhao et al. 2008), 以及通过干扰正常突触功能, 特别是在海马中, 通过谷氨酸能受体的异位激活 (De Felice et al. 2007; Nimmrich et al. 2008) 来显示。已报道 $A\beta$ 寡聚体与朊病毒蛋白 PrPC 的正常细胞同种型之间的纳摩尔亲和力和结合相互作用 (Lauren et al. 2009)。而且, PrPC 与包括谷氨酸受体亚基 (Khosravani et al. 2008) 在内的各种毒性信号传导途径 (Solforosi et al. 2004; Lefebvre-Roque et al. 2007) 之间的相互作用可以导致 $A\beta$ 寡聚体毒性的统一机制。

[0007] 清楚认识到 $A\beta$ 的免疫识别可以导致表达人突变淀粉样蛋白前体蛋白的转基因小鼠的病理学和行为改善。然而, 用“非选择性” $A\beta$ 免疫疗法治疗人类有固有的危险。例如, 自身免疫脑膜脑炎发生在约 10% 的接受包含非选择性 $A\beta$ 免疫原的阿尔茨海默病疫苗的患者中 (Gelinas et al. 2004; Robinson et al. 2004; Broymann and Malter 2004; Mathews and Nixon 2003)。虽然所致的脑膜脑炎可能是由于对 $A\beta$ 的细胞免疫激活导致的, 但是还证实与细胞免疫应答脱离的被动注入的 $A\beta$ 单克隆抗体 (mAb) 与脑微出血有关 (Goni and Sigurdsson 2005)。用 $A\beta$ 非选择性免疫的另一风险是暴露在脑神经元和循环单核细胞表面的亲本蛋白 APP 的免疫识别 (Jung et al. 1996; Jung et al. 1990)。这样的细胞表面膜分子的识别可以引发裂解或干扰 APP 蛋白的胞外结构域的功能, 这可以包括营养活性 (Morimoto et al. 1998; Mileusnic et al. 2005; Mileusnic et al. 2000)。

[0008] $A\beta$ 肽的“非特异性”识别的另一问题是, $A\beta$ 肽仅是毒性 $A\beta$ 分子种类 $A\beta$ 寡聚体的前体。据证实 $A\beta$ 寡聚体杀死培养的细胞系和神经元 (Lambert et al. 2007; Lacor et al. 2007; Ronicke et al. 2008), 并且在切片培养和活动物中阻断称为长时程增强

(LTP) 的促进记忆的关键突触活性 (Balducci et al. 2010; Shankar et al. 2008; Selkoe 2008; Klyubin et al. 2005; Walsh et al. 2002; Wang et al. 2002)。已鉴定特异性 A β 寡聚体, 其与小鼠中的记忆缺陷的发病有关, 并且在纯化并注入正常年轻大鼠时其再现小鼠中发现的消极行为缺陷 (Lesne et al. 2006)。相似的研究已证实, PrPC 可以用作 A β 寡聚体的受体, 并且可以将突触 LTP 中断转导其毒性作用 (Lauren et al. 2009)。

[0009] 虽然过去已产生针对 A β 肽的 A β 疫苗和单克隆抗体, 但是目前为止尚未证实动物和 / 或人中产生期望的疗效而不引起严重的副作用。对开发生物制品有治疗需要, 所述生物制品阻滞或减缓疾病的发展而不诱导对人体的消极的和潜在致死的效果。鉴于一般人群寿命的增加以及随着这种增加, 每年诊断患有阿尔茨海默病的患者的数量的相关升高, 该需要特别明显。期望鉴定是疾病特异性表位 (DSE) 的免疫表位并开发特异性靶向毒性 A β 寡聚分子种类的免疫疗法。还期望开发靶向毒性 A β 寡聚分子种类并避免免疫识别细胞表面的 APP 的免疫疗法。这类 DSE 表位会是特异性中和靶蛋白毒性的免疫疗法和预防性疫苗的靶标。还期望开发诊断工具以提供有发展 AD 的风险的群体的指示, 用于区分 AD 与其他痴呆综合征的差异诊断, 以及用于监测生物标记对 AD 疗法的应答。

[0010] 因此, 期望提供毒性 A β 寡聚分子种类独特的疾病特异性表位。

[0011] 发明概述

[0012] 本公开的目的是消除或减少用于诊断、治疗或预防阿尔茨海默病的以前的表位、抗体、组合物和方法的至少一个缺点。

[0013] 在第一方面, 本公开部分基于令人惊讶地发现, 即 A β 中的新结构表位, 其具有用于选择性抗体结合的有利特性。

[0014] 在一实施方案中, 提供了来源于 A β 的环肽, 所述环肽具有至少 SNK 的氨基酸序列, 对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的“转向区 (knuckle region)”。

[0015] 在另一实施方案中, 提供了一种抗原肽, 其包含具有约束的环状构型的表位, 所述表位具有至少 SNK 的氨基酸序列, 对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。

[0016] 在另一实施方案中, 提供了一种抗原肽, 其包含具有约束的环状构型的表位, 所述表位具有对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列, 对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。

[0017] 在一方面, 所述抗原肽的表位对应于寡聚 A β (1-40) 或寡聚 A β (1-42) 的残基 25-29。

[0018] 在另一实施方案中, 提供了一种分离的抗体, 其特异性结合来源于 A β 的环肽, 所述环肽包含构象表位, 所述构象表位具有至少 SNK 的氨基酸序列, 对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。

[0019] 在另一实施方案中, 提供了一种分离的抗体, 其特异性结合来源于 A β 的环肽, 所述环肽包含构象表位, 所述构象表位具有对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列, 对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。

[0020] 在一方面, 所述分离的抗体以比结合 A β 的非寡聚形式更大的亲和力特异性结合 A β 的寡聚形式。

[0021] 在另一方面, 所述分离的抗体是单克隆的。

[0022] 在另一方面, 所述分离的抗体是人源化的。

[0023] 在另一实施方案中,提供了一种免疫缀合物,其包含与可检测的标记缀合的分离的抗体,所述分离的抗体特异性结合来源于 A β 的环肽,所述环肽包含构象表位,所述构象表位具有至少 SNK 的氨基酸序列,对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。

[0024] 在另一方面,提供了编码所述分离的抗体的核酸。

[0025] 在另一实施方案中,提供了一种组合物,其包含治疗有效量的分离的抗体和药学可接受的佐剂,所述分离的抗体特异性结合来源于 A β 的环肽,所述环肽包含构象表位,所述构象表位具有至少 SNK 的氨基酸序列,对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。

[0026] 在另一实施方案中,提供了一种抗寡聚疫苗组合物,其包含抗原肽和药学可接受的佐剂,所述抗原肽包含具有约束的环状构型的表位,所述表位具有至少 SNK 的氨基酸序列,对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。

[0027] 在另一方面,提供了一种治疗或预防需要所述治疗的患者中的阿尔茨海默病的方法,所述方法包括给予药学有效量的所述分离的抗体或免疫缀合物。

[0028] 在另一方面,提供了治疗或预防需要所述治疗的患者中的阿尔茨海默病的方法,所述方法包括给予所述疫苗。

[0029] 在另一方面,提供了一种诊断疑似患有阿尔茨海默病的患者中的阿尔茨海默病的方法,所述方法包括以下步骤:a) 从所述患者分离生物样品;b) 使所述生物样品与所述分离的抗体在足以允许在所述样品中形成抗原/抗体复合物的条件下接触一段时间;以及 c) 检测所述样品中所述抗原/抗体复合物的存在,其中所述复合物的存在表示所述患者中阿尔茨海默病的诊断。

[0030] 在另一实施方案中,提供了一种试剂盒,其包含:所述分离的抗体以及包含连接至信号产生化合物的抗原的缀合物。

[0031] 在另一方面,所述试剂盒包含一种或多种检测试剂。

[0032] 在另一实施方案中,提供了一种制品,其包含:所述分离的抗体;包含连接至信号产生化合物的抗原的缀合物;以及在诊断阿尔茨海默病中使用的说明书。

[0033] 在另一方面,提供了所述抗体或免疫缀合物用于治疗或预防阿尔茨海默病的用途。

[0034] 在另一方面,提供了所述疫苗用于治疗或预防阿尔茨海默病的用途。

[0035] 在另一实施方案中,提供了能够结合环肽的分离的抗体,所述环肽来源于 A β ,并且具有 SNK 的氨基酸序列,对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的转向区。在一方面,这类抗体以比结合 A β 的非寡聚形式更大的亲和力结合 A β 的寡聚形式。

[0036] 在另一实施方案中,提供了一种治疗患有或疑似患有阿尔茨海默病的患者的方法,所述方法包括向所述个体给予治疗有效量的抗体,所述抗体能够结合来源于 A β 的具有包含序列 SNK 的氨基酸组成的环肽。在一方面,所述抗体以比结合 A β 的非寡聚形式更大的亲和力结合 A β 的寡聚形式。

[0037] 在另一实施方案中,提供了一种预防个体中 AD 的发展或进展的方法,所述方法包括向所述个体给予治疗有效量的抗原肽,所述抗原肽包含具有约束的环状构型的表位,所述环状构型具有 SNK 的氨基酸序列,对应于寡聚 A β 的转向区。在给药时,所述抗原肽产生针对寡聚 A β 的免疫应答。产生的抗体能够特异性结合寡聚 A β 。在某些实施方案中,所述

抗体以比结合 A β 的非寡聚形式更大的亲和力结合 A β 的寡聚形式。

[0038] 当回顾以下具体实施方案的描述连同附图时,本公开的其他方面和特征对本领域技术人员会变得显而易见。

附图说明

[0039] 现在仅通过实例的方式参考附图描述本公开的实施方案。

[0040] 图 1 通过图表说明动态光散射的结果,其显示单体 A β 的动态特性;

[0041] 图 2 通过图表说明动态光散射的结果,其显示寡聚 A β 的动态特性;

[0042] 图 3 通过图表说明动态光散射的结果,显示寡聚 A β 的动态特性;

[0043] 图 4 是包含 SNK 表位的二硫化物环化肽的三维模型;

[0044] 图 5 通过图表说明筛选结合于包含 SNK 的构象肽的抗 SNK 单克隆抗体的代表性分析周期的 Biacore™ 结果。

[0045] 图 6 通过图表说明 Biacore™ 传感图叠加的结果,其显示 BSA 缀合的包含 SNK 表位的线性或环状肽与线性 (3F5, 3G2)、环状 (5E3, 5D8) 和中间体特异性 (4D11, 4D12) 单克隆抗体的结合,以及这些抗体与合成的 A β 1-42 寡聚体的反应性;

[0046] 图 7 通过图表说明 Biacore™ 传感图叠加的结果,其显示 BSA 缀合的包含 SNK 表位的线性或环状肽与线性 (3F5, 3G2)、环状 (5E3, 5D8) 和中间体特异性 (4D11, 4D12) 单克隆抗体的结合,以及这些抗体与合成的 A β 1-42 寡聚体的反应性;

[0047] 图 8 通过图表说明 Biacore™ 分析的结果,其显示合成的 A β 1-42 寡聚体与不同浓度的环状单克隆抗体 5E3 的结合;

[0048] 图 9 为流式细胞术示踪 (flow cytometry trace),其显示将标记的 6E10 抗体和阴性对照结合至位于细胞表面的 APP 的细胞的比较;

[0049] 图 10 为流式细胞术示踪,其显示将标记的 5E3 抗体和阴性对照结合于位于细胞表面的 APP 的细胞的比较;

[0050] 图 11 通过图表说明神经元毒性分析的结果,其显示在不同浓度的 5E3 抗体的存在和不存在下与模拟对照、可溶性单体和寡聚 A β 1-40 温育的细胞的细胞存活程度;

[0051] 图 12 说明免疫印迹的结果,其显示在 TBS 中匀浆、在 Tris-Tricine 凝胶中分级并且用 pan-A β 6E10 抗体免疫印迹的脑组织;

[0052] 图 13 说明免疫印迹的结果,其显示在 TBS 中匀浆、在 Tris-Tricine 凝胶中分级并且用 5E3 抗体免疫印迹的脑组织;

[0053] 图 14 示出在抗体 5E3 的存在 (“5E3”) 或不存在 (“C”) 下测试 A β 聚合的静态光散射实验的结果;以及

[0054] 图 15 说明抗体 5E3 的重链和轻链的核苷酸序列即 5' 和 3' 读取。

[0055] 发明详述

[0056] 一般来说,本公开提供了新的来源于 A β 的约束的肽表位以及相关抗体组合物,从本文中称为“新表位”或“新构象表位”。能够结合所述新构象表位的抗体在阿尔茨海默病的治疗中可用作诊断剂和治疗剂。所述新的来源于 A β 的约束的肽表位可用于疫苗以预防 AD 和相关痴呆。能够结合所述新构象表位的抗体还可用于阿尔茨海默病相关痴呆的诊断、治疗和预防。

[0057] 在本文中未直接定义的任何术语应当理解为具有与本发明所属领域对它们的理解通常相关的意思。

[0058] 如本文所用,术语“分离的抗体”在本文中用来指能够结合所述新构象表位的抗体,其基本上是纯的,并且不含包括具有不同抗原特异性的其他抗体和抗体片段的外来细胞物质。然而,特异性结合所述新构象表位的分离的抗体可以具有对其他抗原的交叉反应性。技术人员应当容易地理解,对任何给定抗体可能必须优化实验条件以最大化特异性结合。术语抗体意图包括其片段,所述片段也与本发明的新构象表位特异性反应。可以利用常规技术将抗体片段化,并且以如上文所述的相同方式筛选片段的功用。例如,可以通过用胃蛋白酶处理抗体来产生片段。可以将所得的片段进一步处理以还原二硫键。

[0059] 如本文所用,术语“个体”指动物,例如鸟或哺乳动物。具体动物包括大鼠、小鼠、狗、猫、牛、羊、马、猪或灵长类。个体还可以为人,或者称为患者。个体还可以为转基因动物。个体还可以为啮齿动物,例如小鼠或大鼠。

[0060] 如本文所用,术语“表位”指分子内的区域,其可以被特异性抗体识别,或者其诱导特异性抗体的形成。

[0061] 如本文所用,术语“构象表位”指其中氨基酸序列具有特定的三维结果的表位。特异性结合构象特异性表位的抗体识别所述构象特异性表位的氨基酸的空间排列。

[0062] 如本文所用,术语“A β ”可以可选地称为“淀粉样蛋白 β (amyloid beta)”、“淀粉样蛋白 β (amyloid β)”或“A β ”。淀粉样蛋白 β 是 39-43 个氨基酸的肽,看来其为阿尔茨海默病患者脑中的淀粉样蛋白斑块的主要成分。如本申请中其他地方所述,据证实 A β 寡聚化是阿尔茨海默病中的神经毒性的关键部分。

[0063] 如本文所用,术语“更大的亲和力”在本文中指抗体结合的程度,其中与结合靶标 Z 相比,抗体 X 更强地结合靶标 Y 并具有更小的解离常数,并且在这种上下文中,抗体 X 对靶标 Y 比对 Z 具有更大的亲和力。同样,术语“较小的亲和力”在本文中指抗体结合的程度,其中与结合靶标 Z 相比,抗体 X 较弱地结合靶标 Y 并具有较大的解离常数,并且在这种上下文中,抗体 X 对靶标 Y 比对 Z 具有更小的亲和力。

[0064] 如本文所用,术语“A β 单体”在本文中指分离的线性形式的 A β (X-Y) 肽,优选基本上不参与与其他 A β 肽的非共价相互作用的 A β (X-Y) 肽形式。

[0065] 如本文所用,术语“A β 寡聚体”在本文中指 A β 肽的分离形式,其中前体 A β 单体在少于约 50 个单体的有序三维机构中非共价聚集。

[0066] 如本文所用,术语“A β 原纤维”在本文中指分子结构,其包含在电子显微镜下显示纤维结构的非共价关联的个别 A β (X-Y) 肽的装配。所述纤维结构通常为“交叉 β ”结构;多聚体的大小没有理论上限,并且原纤维可以包含数千个单体。

[0067] 如本文所用,术语“抗原”在本文中指包含一个或多个表位的分子,例如蛋白、多肽或其片段,所述表位会刺激宿主的免疫系统产生体液和 / 或细胞的抗原特异性应答。该术语与术语“免疫原”可交换使用。诸如抗独特型抗体的抗体或其片段以及可以模拟抗原或抗原决定簇的合成肽模拟表位也在如本文所用的抗原的定义下。相似地,例如在 DNA 免疫应用中在体内表达抗原或抗原决定簇的寡核苷酸或多核苷酸也包括在本文的抗原的定义中。

[0068] 用来描述本发明的肽的命名遵循常规做法,其中氨基在每个氨基酸残基的左边,而羧基在每个氨基酸残基的右边。在代表本发明所选的具体实施方案的序列中,虽然未具

体显示,除非另有说明,氨基端和羧基端基团应当理解为在生理 pH 值下设想的形式。

[0069] 在描述中,为了解释的目的,示出许多细节以提供实施方案的全面理解。然而,本领域技术人员应当理解,这些具体细节不是必需的。

[0070] 由于晶体学和 NMR 在溶液和固态范式中的局限性,原子水平的 A β 寡聚体结构尚未在原子水平最终解决。生物化学、生物物理学和免疫化学数据显示原纤维 / 寡聚体模型,其中 A β 寡聚体包装在宽阔的 β 发夹立体拉链结构中 (Luhers et al. 2005; Sawaya et al. 2007; Rauk 2009)。天然存在的单体 A β 肽在聚集时经历构象变化,包括折叠和形成发夹立体拉链寡聚 A β 结构结果。A β (1-42) 具有较大的 β -折叠聚集的倾向。寡聚 A β 的详细结构是未知的;然而,已利用分子动力学模拟、原子力显微镜和酰胺氢交换测量的组合表征了 A β 寡聚体的结构。已利用上述方法分析了 A β (1-42) 和 A β (1-40) 寡聚体的结构。本领域技术人员已知 A β 寡聚体的 β 链的方向,包括残基 D23 和 K28 之间的分子间盐桥。在这种构型中, K28 残基基本上朝向内部以形成 D23 和 K28 之间的这种盐桥并稳定发卡转角 (Lurs et al. 2005) and Rauk 2008)。

[0071] 进行本领域已知的建议的 A β 寡聚体结构的检测,以鉴定免疫应答可以特异性针对并可以开发 A β 寡聚体特异性抗体的区域。A β 寡聚体模型的检测表明 3 个区域具有可用于结合的暴露于溶剂的潜在的抗体易接近的残基:A β 肽的 mAb 6E10 识别的 A β 寡聚体 N 端 (残基 4-9) (鉴定为 SEQ ID NO:2 的 FRHDSG); mAb 4G8 识别的 A β 寡聚体肽的 N 端第三中的混合极性疏水结构域 (鉴定为 SEQ ID NO:3 的 LVFFAEDV) (残基 17-24); 以及由残基 25-29 (GSNKG) 组成的 A β 寡聚体肽的约束的转角结构域。包含 SNK 残基 26-28 的约束的转角结构域表位的发现是构象约束的,并且不会存在于线性 A β 或 APP 上。预期针对这种构象约束的表位的抗体不结合线性 A β 或 APP,并且会是 A β 寡聚体特异性抗体。

[0072] 进行二硫化物连接的包含残基 25-29 (CGSNKGC) 的环肽的分子动力学建模的图像采集;加入非天然半胱氨酸用于二硫键。这种建模显示,赖氨酸 28 的侧链如图 4 所示朝向外部,与参考文献 Lurs et al. (2005) 和 Rauk (2008) 中预测的朝向内部的赖氨酸 28 侧链相反。赖氨酸 28 残基的外向朝向这一令人惊讶的发现与包含残基 25-29 (CGSNKGC) 的这种环肽的高免疫原性一致,赖氨酸一侧是暴露于溶剂的、大的并且通过 E-氨基带电荷。在下文的实例中显示针对包含至少 SNK 残基的构象环状表位的抗体有效中和 A β 寡聚体的毒性,参见例如图 11。赖氨酸 28 残基的外向朝向这一令人惊讶的发现还与真正的 A β 寡聚体还以抗体易接近的方式表现出相似的赖氨酸侧链朝向溶剂一致。位于 A β 寡聚体的转向区中的丝氨酸 26、天冬酰胺 27 和赖氨酸 28 残基即 SNK 均为带电荷的或极性的,并且比小的非极性氨基酸具有更大的免疫原性。位于 A β 寡聚体的转向区中的 SNK 残基的环状构象形成新的构象表位,所述构象表位暴露于溶剂并可用于抗体结合。下文描述的实例证实了 A β 寡聚体的构象约束的 SNK 表位用于结合的可用性这一发现。A β 寡聚体表面的这种新的结构约束的表位的发现具有选择性抗体结合的有利特性。

[0073] 所述新构象表位还可以包括位于 SNK 表位序列任一端的天然甘氨酸。所述新构象表位还可以在所述表位序列的两端包括天然甘氨酸残基。在一方面,所述天然甘氨酸残基对所述新构象表位的免疫原性具有有限的贡献或没有贡献,然而,所述甘氨酸残基可以缓解肽环化中固有的一些空间张力。在氨基酸结构式中,每个残基一般可以通过一字母或三字母命名表示,所述一字母或三字母命名对应于氨基酸的俗名,按照以下表 1。

[0074] 表 1 :天然存在的肽中常见的 20 个标准 L- 氨基酸的命名和缩写。

[0075]

完整的氨基酸名称	三字母缩写	一字母缩写
丙氨酸	Ala	A
半胱氨酸	Cys	C
天冬氨酸	Asp	D
谷氨酸	Glu	E
苯丙氨酸	Phe	F
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
赖氨酸	Lys	K
亮氨酸	Leu	L
甲硫氨酸	Met	M
天冬酰胺	Asp	N
脯氨酸	Pro	P
谷氨酰胺	Gln	Q
精氨酸	Arg	R
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
缬氨酸	Val	V
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	T

[0076] 所述表位由在 A β 寡聚体表面的暴露于溶剂并结构上约束的强极性 / 带电荷残基组成。所述表位在环状约束的构型中由至少残基 26-28 即 SNK 组成。在另一方面,所述表位在环状约束的构型中由残基 25-28 即 GSNK 组成。在另一方面,所述表位在环状约束的构

型中由残基 26-29 即 SNKG 组成。在另一方面,所述表位在环状约束的构型中由残基 25-29 即 GSNKG (SEQ ID NO:1) 组成。

[0077] 在一方面,所述新构象特异性表位的结构依赖于氨基酸残基的相对刚性的空间排列。

[0078] 与鉴定为 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 的已知表位相比,所述已知表位分别结合已知抗体 6E10 和 4G8,在 A β 寡聚体的暴露于溶剂的表面上以及支持亲本蛋白 APP 表达的细胞(神经元和单核细胞)的表面表达,具有约束的环状构型的新构象表位不存在于 APP 的分子表面上,因此限制 APP 的自身免疫识别。位于神经元和单核细胞的细胞表面的 APP 的 GSNKG 基序主要是非结构化的。如下文实施例中所示,结合具有约束的环状构型的新构象表位的构象特异性抗体有限地识别或不识别细胞表面 APP 上的非结构化的 GSNKG 基序。识别所述新构象表位的抗体很少或不与单体 A β 反应。在另一方面,由于表位的空间拥挤和/或其他不利方面,识别所述新构象表位的抗体很少或不与原纤维 A β 反应。

[0079] 在本公开的另一方面提供了所述新构象表位的抗体。分析显示结合具有约束的环状构型的新构象表位的抗体,识别 A β 寡聚体的氨基酸 25-29 区域中的亚基之间的非线性表位结构。所述抗体对所述新构象表位的特异性使得所述抗体能够特异性靶向 A β 的寡聚形式,从而避免靶向已知影响神经元和免疫功能的单体 A β 和 APP,并且增加所述抗体用于结合的可用性,因为单体 A β 以远大于寡聚 A β 的数量存在。

[0080] 能够结合所述新构象表位的抗体在阿尔茨海默病的治疗中可用作诊断剂、治疗剂,并且本发明的另一方面提供了用于预防 AD 的疫苗。

[0081] 特异性结合包含如本文所述来源于 A β 的新构象表位的环肽的抗体包括从包含所述新构象表位的二硫化物环肽合成的抗体。

[0082] 为了用作治疗剂,特异性结合来源于 A β 的环肽的抗体可以利用标准的完善的抗体制备方法来制备,其中所述环肽包含具有至少 SNK 的氨基酸序列的构象表位,对应于寡聚 A β 的转向区。治疗组合物包含特异性结合来源于 A β 的环肽的抗体联合药学可接受的佐剂,其中所述环肽包含具有至少 SNK 的氨基酸序列的表位,对应于寡聚 A β 的转向区。可以将这样的治疗剂给予需要治疗或预防阿尔茨海默病的患者。在一方面,这样的治疗剂可以延缓阿尔茨海默病的发生。

[0083] 表述“药学可接受”表示可接受用于药学和兽医领域,即没有不可接受的毒性或其他地方不适合。药学可接受的佐剂的实例是常规与基于肽的药物一起使用的佐剂,例如稀释剂、赋形剂等。药物制剂的指导一般可以参考“Remington's: The Science and Practice of Pharmacy (雷明顿: 药物科学和实践)”, 21st Ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005。佐剂的选择取决于所述组合物的预期给药模式。在本发明的一实施方案中,配制所述化合物用于通过输注或者通过皮下、肌肉内或静脉内注射来给药,因此所述化合物用作无菌和不含热原形式的水溶液,并且任选缓冲或使其等渗。因此,所述化合物可以在蒸馏水中,或者更期望地,在盐水、磷酸缓冲盐水或 5% 葡萄糖溶液中给药。利用佐剂制备通过片剂、胶囊剂或混悬剂口服给药的组合物,所述佐剂包括糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,包括羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;粉状西黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;硬脂酸;硬脂酸镁;硫酸钙;植物油,例如花生油、棉子油、芝麻油、橄榄油和玉米油;多元醇,例如丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚

乙二醇 ; 琼脂 ; 海藻酸 ; 水 ; 等渗盐水和磷酸盐缓冲溶液。还可以存在湿润剂、润滑剂如十二烷基硫酸钠、稳定剂、压片剂、抗氧化剂、防腐剂、着色剂以及增香剂。可以利用适当的基质如甘油三酯基质制备乳剂、洗剂和软膏剂用于局部施用。这类乳剂、洗剂和软膏剂还可以包含表面活性剂。还可以制备气雾剂制剂,例如用于鼻部递送,其中使用合适的抛射剂佐剂。不论怎样给药,还可以将其他佐剂加入所述组合物,例如,可以将抗微生物剂加入所述组合物以在延长的储存期中防止微生物生长。治疗组合物通常在制备和储存条件下必须是无菌的和稳定的。

[0084] 为了用作疫苗,包含构象上约束的表位的抗原肽联合药学可接受的佐剂在给药时产生特异性靶向寡聚 A β 的抗体,所述表位具有至少 SNK 的氨基酸序列,对应于寡聚 A β 的转向区。这些抗体特异性结合具有至少 SNK 的氨基酸序列的对应于寡聚 A β 的转向区的表位。疫苗包含抗原肽联合药学可接受的佐剂,所述抗原肽包含构象上约束的表位,所述表位具有至少 SNK 的氨基酸序列,对应于寡聚 A β 的转向区。所述疫苗通过中和寡聚 A β 来阻断脑淀粉样变的发展,并且发挥防止 AD 发展的作用。当寡聚 A β 被阻断时,它们的相关毒性被阻断。这类毒性可以包括例如突触功能障碍和神经元细胞死亡。在另一方面,给予上文所述的疫苗而产生的抗体延缓寡聚 A β 的传播,这样所述抗体延缓单体 A β 聚集为毒性寡聚体 A β 形式。在另一方面,给予上文所述的疫苗而产生的抗体阻断寡聚 A β 的传播,这样所述抗体阻断单体 A β 聚集为毒性寡聚体 A β 形式。

[0085] 药学可接受的佐剂的实例可以包括氢氧化铝、明矾、Alhydrogel™(三水合铝)或其他包含铝的盐、病毒体、包含 CpG 基序的核酸、角鲨烯、油、MF59、QS21、各种皂草苷、病毒样颗粒、单磷酸脂质 A/海藻糖 dicorynomycolate、toll 样受体激动剂、共聚物如聚氧丙烯和聚氧乙烯等。

[0086] 可以将所述疫苗给予有发展阿尔茨海默病风险的患者群体,例如包含已知的 AD 促进突变的“有风险”的个体的已知群体,老年群体。

[0087] 在一实施方案中,为了用疫苗治疗,按照预定计划免疫个体,所预定计划可以从每天一次变化至每周一次、每月一次、每年一次、每十年一次。典型治疗方案包括免疫,然后在 6 周的间隔强化注射。另一治疗方案由免疫然后 1、2 和 12 个月后强化注射组成。或者,强化注射会根据个体的免疫应答和生理状况变化。为了免疫,抗寡聚疫苗可以以每次治疗约 0.0001 微克 - 10 克、约 0.01 微克 - 约 1 克、约 1 微克 - 约 1mg 以及约 100-250 微克的剂量给药。在一实施方案中,给予治疗的时间选择为在以下一种或多种时:0 个月、2 个月、6 个月、9 个月和 / 或 12 个月。在一治疗方案中,剂量给药是在第一次免疫后 2、6、9 和 12 个月时。在另一治疗方案中,剂量给药是在第一次免疫后 2 和 4 周,然后每个月。在一可选治疗方案中,剂量给药取决于个体的生理状况和 / 或个体对先前免疫的应答变化。给药途径任选地包括但不限于肌肉内和腹膜内注射。在一实施方案中,可以将所述组合物注射入三角肌。

[0088] 为了用作诊断或治疗反应的生物标记,从患者分离合适的生物样品;使所述样品与特异性结合来源于 A β 的环肽的抗体在适合允许形成抗原 / 抗体复合物的条件下接触一段时间,其中所述环肽包含具有至少 SNK 的氨基酸序列的表位,对应于寡聚 A β 的转向区;并且检测所述复合物的存在。当检测到复合物时,有患者中的 AD 诊断的指示。用于这个目的的合适的生物样品包括组织、细胞和生物流体,包括例如脑脊液 (CSF) 和血液。

[0089] 在使用时,结合所述新构象表位的抗体在AD中具有很大的诊断价值。为了辅助鉴定是用本发明的抗体或疫苗组合物治疗的候选的个体,本发明还提供通过体外或体内诊断方法检测表位。

[0090] 为了检测任何给定样品中寡聚A β 的存在,本发明提供了一种检测方法,其中将疑似包含寡聚A β 的样品用选择性结合新构象表位的抗体或结合片段处理,所述新构象表位是寡聚A β 相对于单体A β 和APP独特呈现的;并且检测是否形成抗原:抗体复合物,其形成是样品中存在寡聚A β 的指示。抗原:抗体复合物的存在进一步表明患者中AD的诊断。

[0091] 当体外应用时,所述检测方法必须分析来自个体的体液或组织或器官样品的生物样品,通常是疑似患有AD的个体。可以将组织或器官样品如获得自固体或半固体组合或器官的样品消化、提取或以其他方式使其成为液体形式。生物样品或多个样品可以在任何适当的时间采自个体,包括在诊断或怀疑个体患有AD或相关痴呆之前,在用于治疗或改善所述疾病或病症的症状的治疗方案期间,在个体死亡之后(无论原因或怀疑的原因如何)。或者,当由集中的血液供应组织或机构转交时,生物样品可以包括捐献的体液或组织,例如血液、血浆或血小板。

[0092] 如果所述抗体形成可检测的抗原:抗体复合物,那么证实样品中存在寡聚A β 。这样的复合物的形成可以利用各种方案测定,包括ELISA、RIA、流式细胞术、蛋白印迹、免疫组织化学等。为了显示复合物并因此显示样品中所述新构象表位的存在,通过缀合或偶联至可见或通过仪器的辅助可检测的物质,期望将抗体提供为标记的抗体。所述物质或标记能够直接或间接产生可检测的信号。例如,所述标记可以是不透射线的或放射性同位素,如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I ;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;显像剂;或者金属离子。或者,所述新构象表位可以利用结合所述表位抗体的标记的第二试剂来显示,例如结合所述表位抗体的标记的抗体,以间接显示所述表位的存在。抗体:抗原复合物的存在可以通过不需要这两种物质在溶液中的间接方法检测。例如,利用流式细胞术,所述复合物可间接检测,其中抗体结合呈现于完整细胞表面上的表位或者与呈现于完整细胞表面上的表位形成抗体:抗原复合物。还应当理解还可以通过基于非抗体的方法鉴定抗原:抗体复合物,所述方法包括基于大小、电荷和迁移率分选蛋白的方法,例如电泳、层析、质谱法等。

[0093] 在相关实施方案中,本发明的标记抗体或其结合片段的标记形式可以体内使用以显像所述抗体结合的寡聚A β 的存在。为了这个目的,本发明提供了偶联至可用于体内显像的物质的形式的抗体或片段,所述物质例如镓、钆等的同位素。

[0094] 在另一方面,提供了一种制品(也称为商业包装),其包含包装材料和药物组合物。所述组合物包含药学可接受的佐剂和治疗有效量的特异性结合来源于A β 的环肽的构象敏感抗体,其中所述环肽包含具有至少SNK的氨基酸序列的表位,对应于寡聚A β 的转向区。可以标记包装材料以显示所述组合物可用于治疗阿尔茨海默病。包装材料可以是一般用来包装药剂的任何合适的材料,包括例如玻璃、塑料、箔和纸板。

[0095] 在另一方面,提供了一种制品,其包含包装材料和药物组合物。如本文所提供的,所述组合物包含肽联合药学可接受的佐剂,所述肽包含构象上约束的表位,所述表位具有

至少 SNK 的氨基酸序列,对应于寡聚 A β 的转向区。所述组合物可以包括生理学或药学可接受的赋形剂,并且所述包装材料可以包括显示所述组合物的活性成分(例如所述肽)的标记。所述标记还可以包括所述组合物的预期用途,例如作为治疗剂或预防剂,或者为了产生寡聚 A β 特异性的抗血清或抗体的目的作为组合物以诱导个体中的免疫应答,以便与如本文所示的试剂盒一起使用。

[0096] 在另一实施方案中,提供了一种试剂盒,其包含组合物,所述组合物包含如本文提供的肽,连同使用化合物或组合物产生或筛选用于鉴定寡聚 A β 的构象敏感抗体的说明书。所述试剂盒可以用于产生和/或鉴定寡聚 A β 特异性抗体或抗血清,并且所述说明书可以包括例如剂量浓度、剂量间隔、优选给药方法、免疫学筛选或测试的方法等。

[0097] 在另一实施方案中,提供了一种用于制备药剂的试剂盒,所述试剂盒包含组合物连同其使用说明书,所述组合物包含如本文所提供的一种或多种肽。所述说明书可以包含用于制备所述药剂的一系列步骤,所述药剂可用于在给予该药剂的个体中诱导治疗性或预防性免疫应答。所述试剂盒还可以包含在治疗中使用所述药剂治疗、预防或改善 AD 或相关痴呆的一种或多种症状的说明书,并且包括例如剂量浓度、剂量间隔、优选给药方法等。

[0098] 在另一实施方案中,提供了一种用于诊断 AD 或相关痴呆的试剂盒。所述试剂盒包含如本文所述的一种或多种构象敏感和选择性的抗体或抗血清,连同其使用说明书。所述抗体还可以偶联至检测试剂。检测试剂的实例包括二抗,例如抗小鼠抗体、抗兔抗体等。这类二抗可以与酶偶联,当提供合适的底物时,所述酶提供可检测的比色或化学发光反应。所述试剂盒还可以包含用于进行检测反应的试剂,包括酶如蛋白酶 K、封闭缓冲液、匀浆缓冲液、提取缓冲液、稀释缓冲液等。

[0099] 在另一实施方案中,提供了一种用于检测生物样品中寡聚 A β 的存在的试剂盒。所述试剂盒包含特异性结合寡聚 A β 的一种或多种构象敏感的抗体或抗血清,连同其使用说明书。所述抗体还可以偶联至检测试剂。检测试剂的实例包括二抗,例如抗小鼠抗体、抗兔抗体等。这类二抗可以与酶偶联,当提供合适的底物时,所述酶提供可检测的比色或化学发光反应。所述试剂盒还可以包含用于进行检测反应的试剂,包括酶如蛋白酶 K、封闭缓冲液、匀浆缓冲液、提取缓冲液、稀释缓冲液等。

[0100] 常规方法可以用来制备构象敏感的抗体,包括多克隆抗血清或单克隆抗体。为了产生多克隆抗体,可以将哺乳动物(例如小鼠、仓鼠或兔)用在哺乳动物中引发抗体应答的新构象表位的免疫原形式免疫。例如,可以利用这种肽的 N 端和 C 端的半胱氨酸之间的二硫键将包含新构象表位的二硫化物连接的环化肽约束在环构象中。所述二硫化物连接的环化肽可以利用常规技术合成并引入哺乳动物。

[0101] 赋予肽免疫原性的技术是本领域公知的,并且包括例如缀合至载体。所述肽可以在佐剂的存在下给药。免疫过程可以通过检测血浆或血清中的抗体滴度来监测。标准 ELISA 或其他免疫测定方法可以使用免疫原作为抗原以评价抗体水平。免疫之后,可以获得抗血清,并且如果期望,从血清分离多克隆抗体。

[0102] 为了产生单克隆抗体,从免疫的动物收获抗体生成细胞(B-淋巴细胞),并且通过标准体细胞融合方法使其与骨髓瘤细胞融合以形成永生的杂交瘤细胞。这类技术是本领域公知的,(例如,最初由 Kohler 和 Milstein 开发的杂交瘤技术(Nature 256, 495-497(1975))以及其他技术如人 B-细胞杂交瘤技术(Kozbor et al., Immunol.

Today 4, 72(1983))、EBV- 杂交瘤技术以产生人单克隆抗体 (Cole et al., Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy(1985) Allen R. Bliss, Inc., pages 77-96)、以及筛选组合抗体文库 (Huse et al., Science 246, 1275(1989))。可以对杂交瘤细胞免疫化学筛选产生与所选的新构象表位特异性反应的抗体, 并且可以分离单克隆抗体。

[0103] 典型的抗体由两条免疫球蛋白 (Ig) “重链”和两条 Ig “轻链”组成, 并且可以认为其采用一般的 Y 形构型。存在几种不同类型的重链, 其限定抗体的类别或同种型。有 5 种类型的哺乳动物免疫球蛋白重链: γ 、 σ 、 α 、 μ 和 ϵ , 并且这些分别限定免疫球蛋白的类别: IgG、IgD、IgA、IgM 和 IgE。在哺乳动物中有 2 种类型的轻链: κ (kappa) 链和 λ (lambda) 链。

[0104] 每条重链具有两个区域: 恒定区, 对于相同类别的所有免疫球蛋白是相同的, 但是在类别之间是不同的 (重链 γ 、 α 和 σ 具有由 3 个串联的免疫球蛋白结构域 (CH1, CH2, CH3) 组成的恒定区, 但是还具有铰链区以增加柔性; 重链 μ 和 ϵ 具有由 4 个结构域组成的恒定区); 以及可变区 (VH), 在不同 B 细胞之间是不同的, 但是对于由相同 B 细胞或 B 细胞克隆产生的所有免疫球蛋白是相同的。任何重链的可变结构域由单个免疫球蛋白结构域组成。这些结构域长约 110 个氨基酸。

[0105] 每条轻链由 2 个串联的免疫球蛋白结构域组成: 1 个恒定 (CL) 结构域; 以及对于结合抗原重要的 1 个可变结构域 (VL)。

[0106] 抗体的一些部分具有独特的功能。例如, “Y”的臂包含可以结合 2 个抗原 (一般相同) 的位点, 因此识别特异性外来物。抗体的这个区域称为“Fab”(片段、抗原结合) 区。其由来自抗体的每条重链和轻链的一个恒定结构域和一个可变结构域组成。“互补位”通过来自重链和轻链的可变结构域成形在抗体单体的氨基末端。可变结构域也称为 FV 区, 并且对于与抗原结合而言是最重要的区域。更具体而言, β -链的可变环, 轻链 (VL) 和重链 (VH) 上各 3 个负责与抗原结合。这些环称为互补性决定区域 (“CDR”)。

[0107] 互补性决定区域 (“CDR”) 是抗体内的区域, 其中这些蛋白与抗原的形状互补。因此, CDR 决定蛋白对特异性抗原的亲合力和特异性。CDR 是分子最可变的部分, 并且有助于这些分子的多样性, 允许抗体识别大量抗原。

[0108] 在抗原受体的可变结构域的氨基酸序列中有不连续排列的 3 个 CDR (CDR1、CDR2 和 CDR3)。因为抗原受体通常由两个可变结构域 (在两条不同多肽链重链和轻链上) 组成, 每个抗原受体有 6 个 CDR, 它们可以共同与抗原接触。单个抗体分子具有两个抗原受体, 因此其包含 12 个 CDR。

[0109] 抗体一般的“Y”形的基础在调节免疫细胞活性中起作用。这个区域称为 Fc (片段, 可结晶的) 区, 并且由两条重链组成, 所述重链贡献 2 个或 3 个恒定结构域, 这取决于抗体的类别。Fc 区通过结合特定类别的 Fc 受体和其他免疫分子如补体蛋白, 确保每个抗体产生适当的对给定抗原的免疫应答。通过这样, 其介导不同生理效应, 包括识别调理颗粒、裂解细胞或者肥大细胞、嗜碱性粒细胞或嗜酸性粒细胞的脱粒。

[0110] 有许多方式定名氨基酸序列中的 CDR。“Kabat”定义基于序列变异性, 并且是最常用的。“Chothia”定义基于结构环区的位置。“AbM”定义是 Oxford Molecular's AbM 抗体建模软件所用的两种之间的折衷。“contact”定义基于可用的复合物晶体结构的分析。

[0111] 利用已知的模式和序列比对方法, 技术人员可以容易地鉴定包含 CDR 的任何给定

序列中的 CDR。在另一方面,技术人员已知的建模或其他方法也可以用于 CDR 鉴定。在本领域中有辅助技术人员鉴定抗体序列中的 CDR 的公知的指导,例如以下网站 (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>) 所示的指导。

[0112] 将 5E3 抗体的重链和轻链测序。重链序列和轻链序列对应于图 15 中鉴定的序列。技术人员应理解可以将是抗原结合决定簇的上述序列的部分转移至另一抗体框架,例如以产生“嵌合”或“人源化”抗体。

[0113] 技术人员可以容易地比对图 15 中说明的 5' 和 3' 序列阅读以产生共有序列(例如,使用可用的软件包如 GCG 或 Sequencher),并且可以检查需要解决差异的序列痕迹(sequence trace)。任何剩余的差异可以通过重新测序来解决。本领域技术人员应知道差异(例如位于核苷酸序列中的中间终止密码子)是明显的核苷酸误读。本领域公知当测序氨基酸和核苷酸时,当测序方法错误称呼一个或多个碱基时,测序错误或误称可以出现,导致不准确的阅读。由于分子生物学的变幻莫测,基于实验室的 DNA 测序方法都不是完全精确的;对于在机器中偶尔误称碱基它们全部是已知的。当将序列阅读与其他阅读或参考比对时,这类误称变得明显。

[0114] “嵌合”抗体也考虑在本发明的范围内。嵌合抗体可以包含来自两个不同抗体的序列。它们可以包含来自两个不同物种的抗体的序列。嵌合抗体分子可以包括例如来自小鼠、大鼠或其他物种的抗体的抗原结合结构域与恒定人肽区。常规方法可以用来制备包含识别本发明的新构象表位的免疫球蛋白可变区的嵌合抗体(参见例如, Morrison et al., Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. 81, 6851 (1985); Takeda et al., Nature 314, 452 (1985), Cabilly 等人, 美国专利第 4,816,567 号; Boss 等人, 美国专利第 4,816,397 号; Tanaguchi 等人, 欧洲专利公开 EP171496; 欧洲专利公开 0173494, 英国专利 GB 2177096B)。

[0115] “人源化抗体”包含来自非人物种的抗体序列,修改其蛋白序列以增加它们与人天然产生的抗体变体的相似性。在某些情况下,这种可以认为是嵌合抗体的特定子集。然而,“人源化”通常被看作有别于产生简单的嵌合体。话虽如此,人源化过程可以包括在初始步骤中产生小鼠-人嵌合体(例如,可以用将小鼠 Fab 剪接至人 Fc)。此后,可以通过选择性改变分子的 Fab 部分中的氨基酸序列来将所述嵌合体进一步人源化。该过程通常是“选择性”的,以便保留最初开发的抗体的特异性。例如,除了 CDR 片段,可以通过交换适当的单个氨基酸来将与入中不同的 Fab 序列部分突变。这利用诱变在 DNA 水平完成。可能制备人源化抗体而不产生嵌合中间体。“直接”产生人源化抗体可以通过将适当的 CDR 编码片段(负责期望的结合特性)插入入抗体“支架”来完成。如上文所讨论的,这通过重组 DNA 方法利用适当的载体和在哺乳动物细胞中表达来实现。即在小鼠(例如)中开发表现出期望特性的抗体后,可以将编码该抗体的 DNA 分离、克隆入载体并测序。然后可以确定对应于该抗体 CDR 的 DNA 序列。一旦已知期望 CDR 的精确序列,可以设计将这些序列适当地插入包含人抗体变体 DNA 的构建体的策略。该策略还可以采用基于 CDR 序列的阅读的线性 DNA 片段的合成。可以利用合成的包含多样性的寡核苷酸引物产生多样性文库。可以利用已知的方法进一步筛选所得的克隆库以鉴定优化的人源化抗体克隆。

[0116] 在一些实施方案中,可以通过产生人恒定区嵌合体来将如本文所述与本发明的新构象表位特异性反应的单克隆或嵌合抗体进一步人源化,其中可变区的部分,特别是抗原结合结构域的保守框架区是人来源的,且仅高变区是非人来源的。这类免疫球蛋白分子可

以通过本领域已知的技术来制备（例如，Teng et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 7308-7312(1983); Kozbor et al., Immunology Today, 4, 7279(1983); Olsson et al., Meth. Enzymol., 92, 3-16(1982)), 以及 PCT 公开 W092/06193 或 EP 0239400)。人源化抗体还可以商业制备 (Scotgen Limited, 2Holly Road, Twickenham, Middlesex, Great. Britain)。

[0117] 在一方面, 提供一种嵌合或人源化抗体, 所述抗体包含 5E3 的重链和 / 或轻链序列, 或者其部分或多个部分。所述部分可以是抗原结合决定簇。在一些实施方案中, 决定簇可以包含 5E3 的 CDR 序列。这类抗体结合与 5E3 相同的表位。它们还可以结合与 5E3 结合的表位至少部分重叠的表位。

[0118] 在一些实施方案中, 所述嵌合或人源化抗体可以包含与 5E3 的 CDR 序列基本上相同的 CDR 序列。在一些实施方案中, 与 5E3 的序列相比, 所述抗体可以具有保守序列变化。

[0119] 在常见氨基酸中, “保守氨基酸取代” 通过以下各组内的氨基酸之间的取代来举例说明: (1) 甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸, (2) 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸, (3) 丝氨酸和苏氨酸, (4) 天冬氨酸和谷氨酸, (5) 谷氨酰胺和天冬酰胺, 以及 (6) 赖氨酸、精氨酸和组氨酸。

[0120] 本领域公知的 BLOSUM62 表是来源于蛋白序列片段的约 2,000 个局部多重比对的氨基酸取代矩阵, 所述蛋白序列片段代表超过 500 组相关蛋白的高度保守区 (Henikoff and Henikoff, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:10915(1992))。因此, BLOSUM62 取代频率可以用来限定可以引入本发明的氨基酸序列的保守氨基酸取代。虽然可能仅基于化学特性设计氨基酸取代 (如上文所讨论的), 但是语言 “保守氨基酸取代” 优选指大于 -1 的 BLOSUM62 值所代表的取代。例如, 如果取代的特征在于 0、1、2 或 3 的 BLOSUM62 值, 那么氨基酸取代是保守的。根据这个系统, 优选的保守氨基酸取代的特征在于 BLOSUM62 值至少为 1 (例如, 1、2 和 3), 而更优选的保守氨基酸取代的特征在于 BLOSUM62 值至少为 2 (例如, 2 或 3)。

[0121] 在一些实施方案中, 所述抗体可以包含与 5E3 的 CDR 序列至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85% 或至少 90% 相同的 CDR 序列。它们还可以与 5E3 的 CDR 序列至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或大于 99% 相同。

[0122] 用于制备抗体的标准重组 DNA 和分子克隆技术是本领域公知的, 并且更全面地描述于 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆: 实验室手册); Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (下文称为 “Sambrook”)。

[0123] 术语 “重组” 指例如通过化学合成或者通过遗传工程技术操作核酸的分离片段来人工组合两个原本分离的序列片段。

[0124] 本发明的一些实施方案的组合物或化合物的剂量可以根据给药途径 (口服、静脉内、吸入等) 以及给予所述组合物或化合物的形式 (溶液、控释等) 而变化。确定适当的剂量在本领域技术人员的能力之内。

[0125] “药学可接受的载体” 包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。药学可接受的载体的实例包括水、盐水、磷酸缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇中的一种或多种, 或者它们的组合。在许多情况下, 会优选在组合物中包括等渗剂, 例如糖, 多元醇如甘露醇、山梨醇, 或者氯化钠。药学可接受的载体还可以包含少量的辅助物质如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂, 其增加抗体或抗体部分的货

架期或有效性。

[0126] 本发明的药物组合物可以包括“有效量”、“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的抗体或抗体部分。“治疗有效量”指在剂量和必需的时间有效实现期望的治疗结果的量。治疗有效量的抗体或抗体部分可以由本领域技术人员确定,并且可以根据这样的因素而变化,例如个体的疾病状态、年龄、性别和重量,以及抗体或抗体部分在个体中引发期望的应答的能力。治疗有效量还是其中治疗有益效果远远大于抗体或抗体部分的任何有毒或有害效果的量。“预防有效量”指在剂量和必需的时间有效实现期望的预防结果的量。通常,因为预防剂量在疾病之前或疾病的较早阶段用于个体,所以预防有效量会少于治疗有效量。有效量可以在质量/质量基础上计算(例如微克或毫克/千克个体),或者可以在质量/体积基础上计算(例如浓度,微克或毫克/毫升)。使用质量/体积单位,存在的抗体的量可以为约 $0.1 \mu\text{g} / \text{ml}$ –约 $20\text{mg}/\text{ml}$,或者其间的任何量,例如 0.1、0.5、1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000、5000、10000、20000 $\mu\text{g} / \text{ml}$,或者其间的任何量;或者约 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ –约 $2000 \mu\text{g} / \text{ml}$,或者其间的任何量,例如 1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 或其间的任何量;或者约 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ –约 $1000 \mu\text{g} / \text{ml}$ 或其间的任何量,例如 10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$,或者其间的任何量;或者约 $30 \mu\text{g} / \text{ml}$ –约 $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 或其间的任何量,例如 30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 。

[0127] 数量和/或浓度可以在质量/质量基础上计算(例如微克或毫克/千克个体),或者可以在质量/体积基础上计算(例如浓度,微克或毫克/毫升)。使用质量/体积单位,存在的抗体或肽的量可以约 $0.1 \mu\text{g} / \text{ml}$ –约 $20\text{mg}/\text{ml}$,或者其间的任何量,例如 0.1、0.5、1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000、5000、10000、20000 $\mu\text{g} / \text{ml}$,或者其间的任何量;或者约 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ –约 $2000 \mu\text{g} / \text{ml}$,或者其间的任何量,例如 1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或其间的任何量;或者约 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ –约 $1000 \mu\text{g} / \text{ml}$ 或其间的任何量,例如 10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$,或者其间的任何量;或者约 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ – $1000 \mu\text{g} / \text{ml}$ 或其间的任何量,例如 30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 。

[0128] 可以将本发明的抗体掺入适合例如肠胃外给药的药物组合物中。优选地,将所述抗体制备为包含有效量的抗体的可注射的溶液。可注射的溶液可以由燧石或琥珀色小瓶、安瓿或者预充式注射器中的液体或冻干剂型组成。任何合适的缓冲液可以用于制备所述药物组合物。这类缓冲液的实例包括但不限于琥珀酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠或磷酸钾。对于冻干剂型可以包括冷冻保护剂和填充剂。稳定剂可以用于液体和冻干剂型中。

[0129] 本发明的各种实施方案的组合物,包括治疗组合物,可以作为包含有效量的抗体或肽的剂量给药。所述剂量可以包含约 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$ –约 $20\text{mg} / \text{kg}$ (基于个体的质量),例

如 0.1、0.5、1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000、5000、10000、20000 $\mu\text{g} / \text{kg}$, 或者其间的任何量; 或者约 1 $\mu\text{g} / \text{kg}$ —约 2000 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 或其间的任何量, 例如 1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000、1500、2000 $\mu\text{g} / \text{kg}$, 或者其间的任何量; 或者约 10 $\mu\text{g} / \text{kg}$ —约 1000 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 或其间的任何量, 例如 10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 $\mu\text{g} / \text{kg}$, 或者其间的任何量; 或者约 30 $\mu\text{g} / \text{kg}$ —约 1000 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 或其间的任何量, 例如 30.0、35.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100、120、140、160、180、200、250、500、750、1000 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 。

[0130] 必要时, 考虑到个体的质量、药物组合物 (单个组分或其组合) 的浓度、或者药物组合物 (单个组分或其组合) 的体积, 本领域技术人员能够容易地将单位互换为适合期望施用的形式。

[0131] 本发明的药物组合物可以为各种形式。这些包括例如液体、半固体和固体剂型, 如液体溶液 (例如, 可注射和可输注的溶液)、分散剂或混悬剂、片剂、丸剂、散剂 (powder)、脂质体和栓剂。优选形式取决于预期的给药模式和治疗应用。典型的优选组合物为可注射或可输注的溶液剂型, 例如与用于用其他抗体被动免疫人的相似的组合物。优选给药模式是肠胃外的 (例如, 静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内)。在一优选实施方案中, 所述抗体通过静脉内输注或注射给药。在另一优选实施方案中, 所述抗体通过肌肉内或皮下注射给药。

[0132] 本发明的抗体可以通过本领域已知的各种方法给药, 虽然对于许多治疗应用, 给药的优选途径 / 模式是皮下注射、静脉内注射或输注。如技术人员会理解的, 给药途径和 / 或模式会根据期望的结果而变化。在某些实施方案中, 活性化合物可以与包含所述化合物免于快速释放的载体制备, 例如控释制剂, 包括植入物、透皮贴剂和微囊递送系统。可以使用生物可降解的生物相容性聚合物, 例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这类制剂的许多方法是专利的或本领域技术人员公知的。参见例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (缓释和控释药物递送系统), J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0133] 在某些实施方案中, 本发明的抗体可以口服给药, 例如与惰性稀释剂或可同化的食用载体。还可以将化合物 (如果期望, 和其他成分) 封在硬或软壳明胶胶囊中, 压缩为片剂或者直接掺入个体的饮食。对于口服治疗给药, 可以将化合物与赋形剂合并, 并且以可消化的片剂、口含片剂、药片、胶囊剂、酏剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂 (wafer) 等的形式使用。为了通过除肠胃外给药以外的方式给予本发明的化合物, 可能必需用材料包被所述化合物或者与材料共给予所述化合物以防止其失活。

[0134] 还可以将补充活性化合物掺入所述药物组合物中。在某些实施方案中, 将本发明的抗体与可用于治疗 AD 或相关痴呆的一种或多种额外的治疗剂共配制和 / 或共给药。例如, 可以将本发明的抗体之一或其抗体部分与结合其他靶标的一种或多种额外的抗体共配制和 / 或共给药。

[0135] 在某些实施方案中, 可以将本发明的抗体或其片段连接至本领域已知的延长半衰期的媒介物。这类媒介物包括但不限于 Fc 结构域、聚乙二醇 (PEG) 和葡聚糖。这类媒介物描述于例如美国申请系列号 09/428, 082 和公开的 PCT 申请第 W099/25044 号, 为了任何目

的将它们援引加入本文。

[0136] 在本发明的一实施方案中,提供了一种抗原肽,其包含具有约束的环状构型的表位,所述表位包含至少 SNK 的氨基酸序列,所述表位对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。

[0137] 在本发明的另一实施方案中,提供了一种抗原肽,其包含具有约束的环状构型的表位,所述表位具有对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,所述表位对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。

[0138] 在本发明的另一实施方案中,提供了能够结合来源于 A β 的环肽的抗体,所述环肽包含构象表位,所述构象表位具有至少 SNK 的氨基酸序列,并且对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。

[0139] 在本发明的另一实施方案中,提供了能够结合来源于 A β 的环肽的抗体,所述环肽包含构象表位,所述构象表位具有对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,并且对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。

[0140] 在某些实施方案中,这类抗体可以比结合 A β 的非寡聚形式更大的亲和力结合 A β 的寡聚形式。

[0141] 在另一实施方案中,提供了一种治疗患有或疑似患有阿尔茨海默病的患者的方法,所述方法包括向所述个体给予治疗有效量的抗体,所述抗体能够结合来源于 A β 的环肽,其中所述环肽包含构象表位,所述构象表位具有至少 SNK 的氨基酸序列,对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。在某些实施方案中,所述抗体可以比结合 A β 的非寡聚形式更大的亲和力结合 A β 的寡聚形式。

[0142] 在另一实施方案中,提供了一种预防个体中 AD 的发展或进展的方法,所述方法包括向所述个体给予治疗有效量的抗体,所述抗体能够结合特异性结合来源于 A β 的环肽的肽,其中所述环肽包含构象表位,所述构象表位具有至少 SNK 的氨基酸序列,对应于寡聚 A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。在某些实施方案中,所述抗体可以比结合 A β 的非寡聚形式更大的亲和力结合 A β 的寡聚形式。

[0143] 考虑接下来的本发明的优选实施方案的描述,本发明的其他方面会变得清楚。本领域技术人员会认识到本发明的其他实施方案是可能的,并且可以在许多方面修改本发明的细节,而全部不背离本发明构思。因此,认为附图、说明书和实施例的性质是示例性的而不是限制性的。

实施例

[0144] 实施例 1 :A β 纯化和聚集以及寡聚体表征

[0145] 转化、表达和纯化

[0146] 将大肠杆菌 (E. coli) BL21 (DE3) pLysS 细胞和大肠杆菌 DH5 α 细胞用编码 A β 1-40 的构建体转化。将来自 1L 培养物的大肠杆菌细胞重悬于 25mL 裂解缓冲液 (50mM TrisHCl pH8.0+1mM 乙二胺四乙酸 (EDTA)) 以获得均质悬浮液 (不加入蛋白酶抑制剂)。将悬浮液转移至 40mL 离心管 (JA-20),放置在冰上并以强度 6 (即小超声波仪尖的最大设置) 和 50HZ 间歇超声处理 3min (分钟) 的时间,随后在 18000g 和 4 $^{\circ}$ C 下进行 10min 的离心步骤。这个超声处理过程重复 3 次。每次将可溶部分回收并通过 SDS-PAGE 分析 (在这种情况下 TCA 沉

淀不是必需的)。最后,将沉淀重悬于 12.5mL 包含 8M 尿素、10mM TrisHCl pH8.0、1mM EDTA 的缓冲液中,然后一个额外的超声处理步骤和离心步骤(18000rpm 持续 10min 的时间)。随后,将这个溶液用 10mM Tris pH8.0+1mM EDTA 稀释 4 倍(加入 37.5mL)。然后将这个蛋白溶液与最后用于纯化的实际缓冲液(25mM Tris pH8.0+1mM EDTA)平衡的 DEAE-纤维素(来自 Whatman 的 D52;将其首先用 0.5N NaOH 再生 15min 的时间,然后水洗涤和 0.5M HCl,然后几次水洗涤,最后浓缩的缓冲溶液(50mM Tris pH8.0+1mM EDTA))一起温育。在温和振荡的条件下允许肽结合于批量树脂(即内部具有磁体的 falcon 管中,放置在磁性搅拌板上),持续 20min 的时间。在 1200rpm 下离心 1min 的时间以沉淀珠之后,在流通中收集未结合的蛋白。将这些珠用移液管移出。

[0147] 进行几次洗涤,每次具有 5min 温育时间和短暂离心步骤(在 1200rpm 下 1min)以去除级分(fraction):使用分别具有 0、50、75、100、125、150、200、250、300、500mM NaCl 的 25mM TrisHCl pH8.0+1mM EDTA。将洗脱的级分保持在冰上以维持肽的单体状态。

[0148] 用这种方法,TCA 沉淀后将 250uL 收集的级分通过 SDS-PAGE 分析。对于 TCA 沉淀,将样品在 20% 三氯乙酸(TCA)中于冰上温育至少 30min,然后在 14,000rpm 下离心 15min。弃去上清并将沉淀用 750uL 冰冷的丙酮洗涤,然后在 14,000rpm 下离心 5min 时间。去除丙酮并使残余物蒸发。将沉淀用蛋白上样染料重新溶解并在 SDS-PAGE 上分析 8-10uL。

[0149] A β 聚集方案和 A β 的寡聚化

[0150] 为了实现 A β 的单体化,将纯化的 A β 用 milliQ 水透析并冻干。冻干之后,将 A β 在 TCA 或甲酸之一中恢复,然后蒸发以在玻璃管上形成单体分子层。将单体 A β 重悬于 pH 为约 6.8 的 PBS(5mM)中以保持 A β 的单体形式。

[0151] 为了实现 A β 的寡聚化,将单体 A β 用作起始原料并以 200 μ M 于超声处理下在 33 $^{\circ}$ C 下温育 12 小时的时间。这个过程导致 A β 寡聚体而不是 A β 原纤维的形成。

[0152] 寡聚体的表征

[0153] 寡聚体的大小通过可以用来确定悬浮液中颗粒的大小分布谱的公知的技术即动态光散射(DLS)来表征。如果光源是激光,并且是单色的和相干的,则观察到散射强度的时间依赖性波动。这些波动是溶液中的小分子进行布朗运动并且因此溶液中散射体之间的距离随时间不断变化的结果。当光击中小颗粒时,光向所有方向散射,称为瑞利散射(Rayleigh scattering)。然后这种散射光被周围的颗粒相长干扰或相消干扰并在这种强度波动内,包含关于散射体的运动的时间尺度的信息。DLS 用来确定溶液中 A β 样品的大小分布,并且用来证实 A β 为单体或寡聚体形式。

[0154] 图 1 说明利用 DLS 分析的 A β 样品是单体 A β 。将可商购的 A β (1-40) (50 μ M) 在 10 $^{\circ}$ C 下于 5mM PBS 中温育。计算小于 1nm 的水合半径。这些结果与预期的单体 A β 的 Rh 小于约 1nm 一致,这是本领域技术人员已知的,对于单体 A β 是典型的。

[0155] 图 2 说明利用 DLS 分析的 A β 样品是寡聚 A β 。将可商购的 A β (1-40) (80 μ M) 在 10 $^{\circ}$ C 下于 150mM PBS 中温育。结果显示准单分散群体。计算 200nm 的水合半径(Rh)。结果与预期的寡聚 A β 的约 100nm - 200nm 的 Rh 一致,这是本领域技术人员已知的,对于寡聚 A β 是典型的。

[0156] 图 3 说明利用 DLS 分析的 A β 样品是寡聚 A β 。将可商购的 A β (1-40) (50 μ M) 在 10 $^{\circ}$ C 下于 150mM PBS 中温育。结果显示准单分散群体。计算 190nm 的水合半径(Rh)。结

果与寡聚 A β 的典型 Rh 一致。

[0157] 实施例 2:制备包含构象约束的表位的环肽

[0158] 利用位于肽的 N 端和 C 端的半胱氨酸残基之间的二硫键构建约束的环状构象的包含新构象表位的环肽。将两个非天然半胱氨酸加至 GSNKG 序列,一个在 C 端,而一个在 N 端。将这两个半胱氨酸在控制的条件下氧化以形成二硫键。

[0159] 构建所述环肽的结构以模拟包含新构象表位的 A β 寡聚体中的“转向”构象和转向区的方向。

[0160] 图 4 说明包含新构象 SNK 表位的二硫化物环化肽的三维模型。

[0161] 本领域技术人员应当理解,形成约束的表位的其他方法是本领域已知的。例如,可以通过在肽的两个残基之间形成键,提供封闭的环来环化肽。环肽可以描述为 homodetic(其中所有键均为肽键)或 heterodetic(其中在环肽内有肽键和其他类型的键,例如酯键、醚键、酰胺键或二硫键)。可以利用化学或酶促方法将肽环化。美国专利公开 2009/0215172 描述了以独立于肽序列的方式催化肽通过酰胺键头尾环化的重组蛋白。所关注的肽周围的前肽中的识别序列决定环化。Bourne 等人 (Methods in Molecular Biology, 2005298:151-166) 描述了通过使用安全锁扣接头和分选过程制备环肽阵列的组合方法。美国专利公开 2004/0014100 公开了体内制备环肽的方法。美国专利公开 2010/0240865、美国专利公开 2010/0137559 和美国专利 7,569,541 描述了环化肽的各种方法,例如,可以通过肽的 N 端或 C 端或者内部的包含巯基或硫醇的残基的氧化来将肽环化。包含巯基的残基的实例包括半胱氨酸、高半胱氨酸、青霉胺。在一些实施方案中,第一包含巯基的残基为半胱氨酸;在一些实施方案中,第一和第二包含巯基的残基均为半胱氨酸。可以将肽内的两个包含巯基的残基氧化以形成通过二硫键连接的二聚氨基酸半胱氨酸。各种氧化试剂可以用来完成这样的巯基-二硫化物转化,例如,氧气(空气)、二甲亚砷、氧化谷胱甘肽、铁氰化钾、三氟乙酸铈(III)或者,如本领域技术人员可能知道的和用于如本领域技术人员已知的这类方法的其他氧化试剂。这类方法的实例描述于 PCT 公开 W001/92466 和 Andreu et al., 1994. Methods in Molecular Biology 35:91-169。

[0162] 实施例 3:衍生和筛选 A β 寡聚体特异性单克隆抗体

[0163] 通过制备针对如实施例 2 所述利用肽的 N 端和 C 端的半胱氨酸之间的二硫键约束在环状构象中的表位的抗体来产生 A β 寡聚体特异性构象表位 (SEQ ID NO:1) 的单克隆抗体 (mAb)。

[0164] 将 BALB/C 小鼠用在此称为 GSNKG-CLE 的新的约束的环状表位 (CLE) 免疫,所述约束的环状表位连接至已用于 PrP 和 SOD1 错误折叠特异性表位的多抗原肽 (MAP) 或匙孔血蓝蛋白 (KLH) (Paramithiotis et al. 2003; Rakhit et al. 2007)。将小鼠血清在连接至牛血清白蛋白 (BSA) 的 GSNKG-CLE 上筛选,并且对具有与 GSNKG-CLE 的特异性和强相互作用而不与非结构化的可溶性 A β 相互作用的那些小鼠进行脾融合和杂交瘤筛选。对阳性选择的 IgG 分泌克隆进行大规模制备,随后用环状和线性 GSNKG-BSA、合成的 A β 寡聚体以及来源于 AD 脑的 A β 寡聚体,通过免疫学方法表征。

[0165] 产生抗环状 GSNKG 肽的单克隆抗体 (mAb),并且通过肽 ELISA 预筛选结合。产生的抗 GSNKG 环肽的一些抗体优选识别环肽、一些线性肽以及一些环状和线性肽。抗体识别线性和环肽的能力可以例如涉及在体内通过半胱氨酸桥的还原已部分或完全线性化的环肽

的免疫识别。产生的中间体 -GSNKG 肽的抗体代表识别环状和线性肽的抗体。基于 ELISA 结果,选择两种环状特异性抗体 (5D8, 5E3)、两种线性特异性 (3F5, 3G2) 以及两种中间体 - 特异性 (4D11, 4D12) 的 IgG 克隆,用于进一步的分析。Biacore™平台是利用表面等离子共振的光学现象实时监测生物分子相互作用而不需要标记的技术,用其进行进一步的分析。

[0166] 图 5 示出示例性 Biacore™结果。利用共价固定在 CM5 传感器芯片上的兔抗小鼠 Fc 特异性 (RAMFc) 抗体从组织培养上清捕获单克隆抗体。然后通过捕获的 mAb 上流动这些分析物来检测 BSA 缀合的 GSNKG 肽 (线性和环状) 和寡聚 A β (1-42) 的结合。结合反应参考包含固定的 RAMFc 但不含捕获的 mAb 的流动细胞,并且用由包含 1mg/ml 羧甲基葡聚糖的 Hepes 缓冲盐水 (HBS) 组成的样品稀释液进一步空白化。此外,将观察到的反应对捕获的 mAb 归一化以允许在不同 mAb 之间准确地比较。

[0167] 图 6 和图 7 示出所得的 Biacore™传感图,并且显示 ELISA 选择的优先线性的克隆 (3F5, 3G2) 不结合 Biacore 芯片上的线性或环状的 BSA 偶联的肽;ELISA 选择的中间体克隆 (4D11, 4D12) 结合 Biacore 芯片上的环状和线性肽;而 ELISA 选择的环状克隆 (5D8, 5E3) 主要结合 Biacore 芯片上的环状偶联的 BSA。环状克隆 5E3 和 5D8 证实与 A β (1-42) 寡聚体和环肽的结合最强,同时还证实与中间体克隆相比,很少至不结合线性肽。数据说明 5E3 抗体证实与 A β (1-42) 寡聚体的结合最强,虽然 5E3 和 5D8 均结合环肽。这些结果表明,在利用实施例 2 的环肽筛选产生的抗体中,环状特异性抗体的子集产生 A β 寡聚体表位的优选抗体识别。

[0168] 图 8 显示 mAb 5E3,其是环状优先的克隆,以浓度依赖性方式结合 A β (1-42) 寡聚体。这个观察证实可滴定的 A β 寡聚体中易接近和构象上约束的表位,这与真正的免疫学抗原 - 抗体相互作用一致。因此 Biacore 分析证实,环状 GSNKG 肽和全长寡聚 A β (1-42) 享有共同的分子特征,即构象上约束的表位,这被构象敏感的 mAb 5E3 特异性识别。

[0169] 为了治疗目的,A β (1-42) 寡聚体特异性 mAb 可以在 AD 的细胞和动物模型中进一步测试,并且测试在 A β 寡聚体损害的突触功能的神经生理学测定中的中和活性。

[0170] 实施例 4:流式细胞术分析

[0171] 进行流式细胞术分析,以确定抗体结合细胞表面的 APP 的程度。

[0172] 将健康的成年 Black/6 小鼠在二氧化碳室中安乐死。将脑立即取出并灌注在磷酸缓冲盐水 (PBS) 中,然后浸没在 PBS+1% 胎牛血清 (FBS) 中。通过用解剖剪切碎脑并通过 100 μ m 和 70 μ m 筛连续传代来产生单细胞悬浮液。将细胞在室温下于 PBS+1%FBS 中温育 30min 作为封闭步骤。然后将细胞在 100 μ l PBS+1%FBS 分别加上 10 μ g/mL 或 1 μ g/mL 的 6E10 和 5E3 中温育 (或不温育)。在室温下 1h (小时) 后,将细胞洗涤两次 (400xg 持续 5min),并且重悬于 PBS+1%FBS 以及 1:1000 稀释的缀合至别藻蓝蛋白 (APC) 或荧光素 (FITC) 的抗小鼠抗体中。除了未染色的对照,将一些细胞与单独的二抗一起温育以控制非特异性相互作用。将二抗与样品在室温下一起温育 30min,之后将细胞洗涤,并且立即分析或者在 4 $^{\circ}$ C 下于 4% 多聚甲醛中固定过夜。用 BD LSRII 流式细胞仪收集数据,并且用 FlowJo 分析数据。

[0173] 图 9 和图 10 示出流式细胞术分析的结果。图 9 为流式细胞术示踪,其显示将标记的 6E10pan-A β 抗体和二抗阴性对照结合至位于细胞表面的 APP 的细胞的比较。图 10 示出将标记的 5E3 抗体和二抗阴性对照结合至位于细胞表面的 APP 的细胞的比较。图 9 所示

的 6E10 抗体说明显著比例的细胞将 FITC 标记的 6E10 结合至位于细胞表面的 APP。相比之下,图 10 所示的 5E3 抗体说明与对照相比,FITC 标记的 5E3 与细胞结合非常少。这些结果清楚地说明与 FITC 标记的 6E10 相比,FITC 标记的 5E3 显示显著较少地结合细胞表面的 APP。这些分析的结果表明结构上约束的寡聚体特异性的新构象表位不存在于神经元的细胞表面,这与天然 APP 中 GSNG 基序的线性非结构化性质一致。在细胞表面不存在结构上约束的新构象表位表明,用于治疗阿尔茨海默病的针对环状表位的免疫应答不靶向天然 APP。这些结果证实,与已知的 6E10 抗体相比,特异性结合寡聚 A β 的环状 GSNG 表位的抗体具有优选的安全性。

[0174] 实施例 5 :神经元分析

[0175] 进行神经元毒性分析以确定在不同浓度的 5E3 抗体的存在和不存在下与模拟(单独培养基)对照、可溶性(线性)和寡聚 A β 1-40 一起温育的细胞的细胞存活程度。将模拟对照仅用培养基(无抗体)处理。

[0176] 使包含 10,000 个大鼠原代神经元/孔的 96 孔在聚 L-赖氨酸 (ScienCell#0403 ;2 微克/cm², 1hr, 37 摄氏度,用 PBS 洗涤 3X) 处理的 96-孔板的孔中生长,每孔具有 0.2ml 神经元培养基 (ScienCell#1521)。每天更换培养基,持续 7 天。将可溶性和寡聚 A β (1-40) 在旋转装置中于室温下在神经元培养基中在不同浓度的 5E3 抗体不存在或存在的情况下(参见图 11) 温育 4 小时。去除培养基后将 0.2ml 这种混合物加入神经元。24hrs 的时间后,利用 Roche 细胞增殖试剂盒 II (#11465015001) 根据制造商的方案测量细胞存活。用酶标仪测定光密度。

[0177] 图 11 说明神经元毒性测定的结果。A β 以线性 A β 单体构型和寡聚 A β 构型均对神经元有毒。据证实针对构象上约束的 A β 表位的抗体 5E3 针对 A β 的寡聚形式是保护性的。未显示抗体 5E3 对线性 A β 保护。这些结果证实抗体 5E3 结合的构象特异性。

[0178] 实施例 6 :免疫印迹分析

[0179] 进行免疫印迹分析以确定 6E10 抗体和 5E3 抗体与 APP、单体 A β 和寡聚 A β 相对结合。

[0180] 匀浆

[0181] 将脑组织样品称重,随后浸没在一定体积的新鲜的冰冷的 TBS(补充了 5mM 乙二醇四乙酸 (EGTA)、5mM EDTA 和蛋白酶抑制剂混合物)中,从而脑组织的终浓度为 20%。利用机械匀浆器将组织在这种缓冲液中匀浆如下:使组织经历匀浆器 3 次,每次 30sec(秒)的时间,匀浆之间在冰上 30sec 的时间。然后使 TBS 匀浆的样品超速离心 (70,000xg 持续 90min)。收集上清并储存在 -80° C。

[0182] 利用 BCA 蛋白测定确定 TBS 匀浆的蛋白浓度。在某些情况下,在 Tris-Tricine 样品缓冲液 (Invitrogen) 中煮后利用 Tris-Tricine 4-20% 凝胶通过 SDS-PAGE 将等量蛋白分级,并转移至 0.2 μ m 聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜。转移之后,将膜浸没在 PBS 中并煮 2 次,每次 3min 的时间,以便表位热恢复。利用 6E10 或寡聚体特异性的抗体 5E3 作为一抗使膜进行免疫印迹。两者均以 1 μ g / ml 的浓度使用。

[0183] 图 12 说明免疫印迹的结果,其显示在 TBS 中匀浆、在 Tris-Tricine 凝胶中分级并且用 pan-A β 6E10 抗体免疫印迹的脑组织。与 APP 和与 A β 的单体形式的反应是明显的,以及与 A β 寡聚体条带的轻微反应性。

[0184] 图 13 说明抗体 5E3 的免疫印迹的结果。抗体 5E3 特异性识别约 45–55kDa 的寡聚体种类,其显然是 SDS 稳定的,表明寡聚体种类中的 A β 单体的强非共价相互作用。未观察到与 A β 的单体形式的反应,虽然在这个免疫印迹上一些有限的与 APP 的反应性是明显的,推测这与印迹膜上的变性以及部分天然和非天然复性有关。pan-A β 抗体 6E10 显示有限地识别或不识别寡聚体种类。实施例 3 中讨论的 Biacore™数据(基于经验的 Biacore™式以及假设 5E3 和 AB42 之间的化学计量比为 1)与免疫印迹一致,并且表明结合 5E3 的 A β (1–42)的种类位于十聚体和十三聚体之间;考虑到每单体 4.0–4.3kDa 的分子量, Biacore 数据预测约 50kDa 的寡聚体种类,这与 5E3mAb 检测的主要条带的分子量一致。

[0185] 实施例 7:分析 A β 寡聚体形成的抑制

[0186] 进行 A β 抑制的分析,以确定 5E3 抗体诱导 A β 寡聚体聚集延迟的能力。

[0187] 静态光散射 (SLS) 是测量散射光强度以获得如聚合物或蛋白一样的大分子的平均分子量 (Mw) 的物理化学技术。以多角度测量散射强度允许计算均方根半径,也称为回转半径 (Rg)。通过对各种浓度的许多样品测量散射强度,可以计算第二维里系数 A2。对于静态光散射实验,在包含大分子的溶液中发射高强度单色光,通常为激光。一个或许多个检测器用来在给定波长 (λ) 以一个或许多个角度 (θ) 测量散射强度。

[0188] 为了从光散射强度直接计算平均分子量而不校准,必需知道激光强度、检测器的量子效率以及检测器的全散射体积和立体角。因为这是不可行的,所有商业仪器均利用强的已知散射体如甲苯来校准,因为利用绝对光散射仪器测量甲苯与几种其他溶剂的瑞利比。

[0189] 图 14 说明 5E3 抗体延迟单体 A β 聚集为有毒的寡聚体 A β 形式的能力。在 5E3 不存在(图 14 中的“C”)或 5E3 存在(图 14 中的“5E3”)的情况下测试 A β 寡聚体形成。将商业来源的 A β (1–40) (23 μ M) 在 39° C 下于 150 μ L 的反应体积中与抗体 5E3 (2.0mM) 一起温育。箭头所示的 SLS 强度的变化对应于 5E3 抗体对散射强度的贡献。图 14 说明与抗体 5E3 一起温育导致 A β 寡聚体形成的显著延迟。

[0190] 这种对聚合的抑制效果支持抗体 5E3、相关人源化和嵌合抗体的治疗作用,以及所述新构象表位本身的治疗效果,例如在疫苗组合物中。

[0191] 实施例 8:检测生物样品中的 A β 寡聚体

[0192] 设想纯化的 5E3 抗体可以用来检测生物样品中的 A β 寡聚体,例如来自包括脑的组织的匀浆。这种检测可以利用各种检测平台进行,包括 Biacore™平台,并且可以具有诊断和/或预后价值。

[0193] 实施例 9:用 5E3 以及相关抗体和疫苗治疗

[0194] 用 5E3 抗体治疗可以用来特异性和/或选择性清除有毒的 A β 寡聚体,并且可以用于治疗和/或预防与 A β 寡聚体毒性相关的疾病如阿尔茨海默病的发作或发展。针对与 5E3 相同的表位的人或人源化抗体,可用于治疗和/或预防阿尔茨海默病。在另一方面,与 5E3 识别的表位重叠的表位可用于治疗和/或预防阿尔茨海默病。

[0195] 相似地,本文所述的新构象表位看来可用于引发对 A β 寡聚体的特异性免疫应答,这可用于治疗或预防例如阿尔茨海默病。

[0196] 上述实施方案仅为实例。本领域技术人员可以对具体实施方案进行改变、修改和变化而不背离仅由所附权利要求定义的范围。

[0197] 参考文献：

[0198] Gelinas, D. S., et al., Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(Suppl 2):p. 14657-62.

[0199] Robinson, S. R., et al., Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget. *Neurobiol Aging*, 2004. 25(5):p. 609-15.

[0200] Broytman, O. and J. S. Malter, Anti-Abeta: The good, the bad, and the unforeseen. *J Neurosci Res*, 2004. 75(3):p. 301-6.

[0201] Mathews, P. M. and R. A. Nixon, Setback for an Alzheimer's disease vaccine: lessons learned. *Neurology*, 2003. 61(1):p. 7-8.

[0202] Goni, F. and E. M. Sigurdsson, New directions towards safer and effective vaccines for Alzheimer's disease. *Curr Opin Mol Ther*, 2005. 7(1):p. 17-23.

[0203] Jung, S. S., J. Nalbantoglu, and N. R. Cashman, Alzheimer's beta-amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex vivo brain cells: a flow cytometric study. *J Neurosci Res*, 1996. 46(3):p. 336-48.

[0204] Jung, S. S., S. Gauthier, and N. R. Cashman, Beta-amyloid precursor protein is detectable on monocytes and is increased in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 1999. 20(3):p. 249-57.

[0205] Morimoto, T., et al., Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res*, 1998. 51(2):p. 185-95.

[0206] Mileusnic, R., C. L. Lancashire, and S. P. Rose, Amyloid precursor protein: from synaptic plasticity to Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1048:p. 149-65.

[0207] Mileusnic, R., et al., APP is required during an early phase of memory formation. *Eur J Neurosci*, 2000. 12(12):p. 4487-95.

[0208] Lambert, M. P., et al., Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *J Neurochem*, 2007. 100(1):p. 23-35.

[0209] Lacor, P. N., et al., Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2007. 27(4):p. 796-807.

[0210] Ronicke, R., et al., Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture? *PLoS One*, 2008. 3(9):p. e3236.

[0211] Balducci, C., et al., Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(5):p. 2295-300.

[0212] Shankar, G. M., et al., Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*, 2008. 14(8):p. 837-42.

[0213] Selkoe, D. J., Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair

synaptic plasticity and behavior. Behav Brain Res, 2008. 192(1):p. 106-13.

[0214] Klyubin, I., et al., Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. Nat Med, 2005. 11(5):p. 556-61.

[0215] Walsh, D. M., et al., Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. Nature, 2002. 416(6880):p. 535-9.

[0216] Wang, H. W., et al., Soluble oligomers of beta amyloid(1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. Brain Res, 2002. 924(2):p. 133-40.

[0217] Lesne, S., et al., A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature, 2006. 440(7082):p. 352-7.

[0218] Lauren, J., et al., Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. Nature, 2009. 457(7233):p. 1128-32.

[0219] Luhers, T., et al., 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(48):p. 17342-7.

[0220] Rauk, A., Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease neurotoxic? Dalton Trans, 2008(10):p. 1273-82.

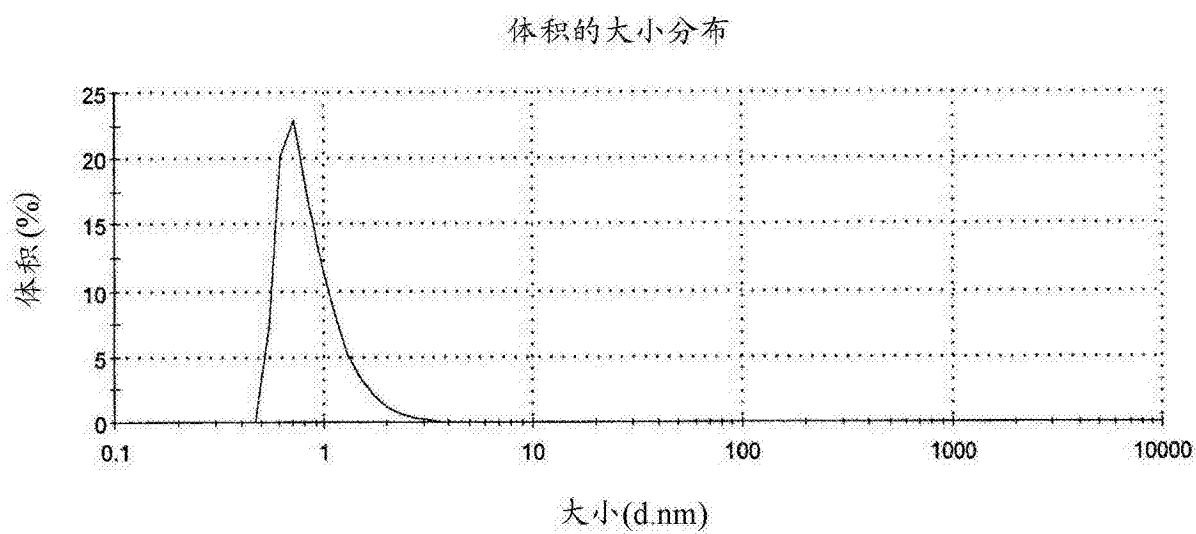


图 1

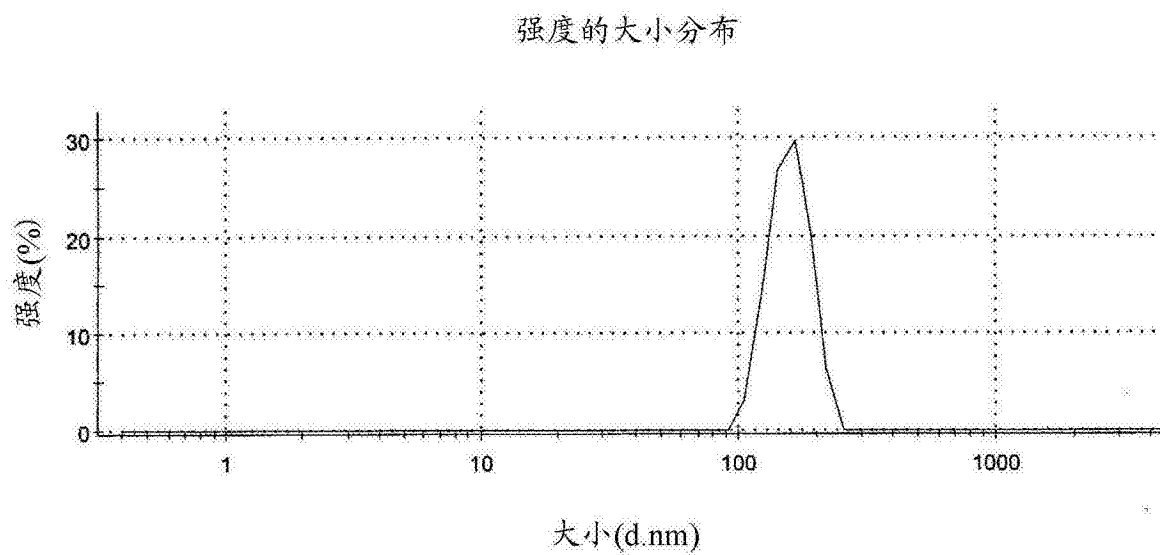


图 2

强度的大小分布

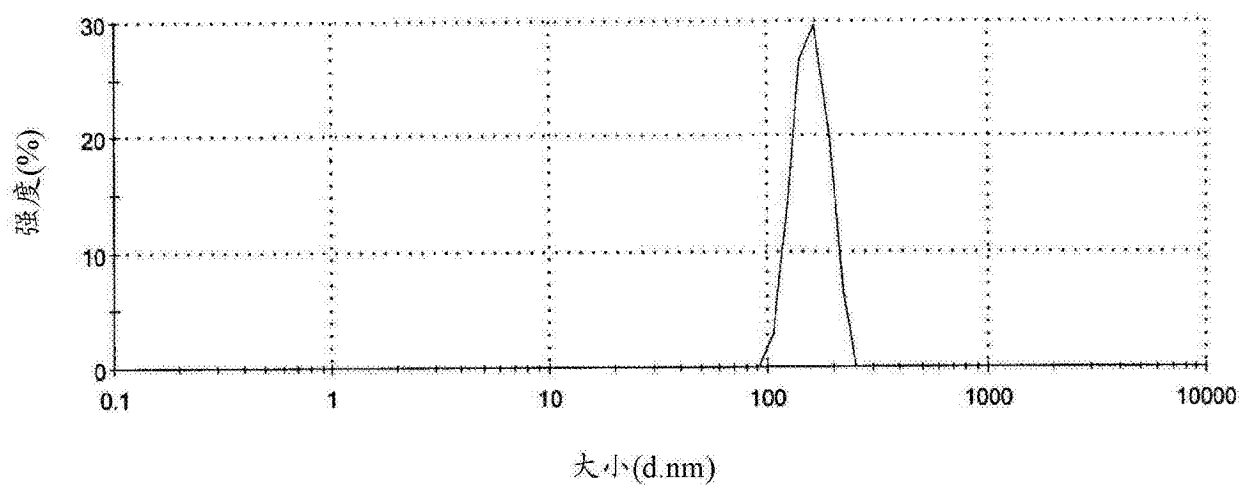


图 3

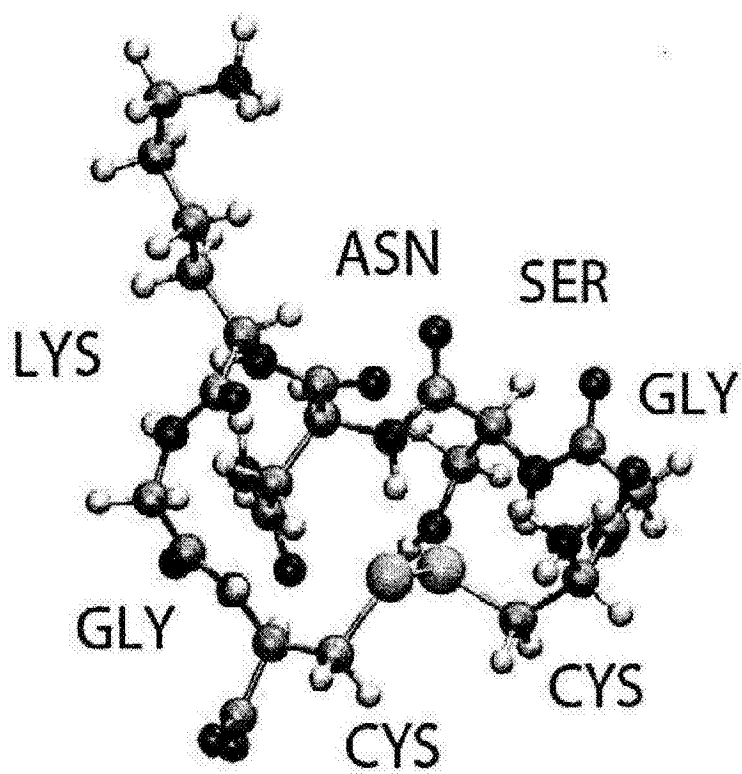


图 4

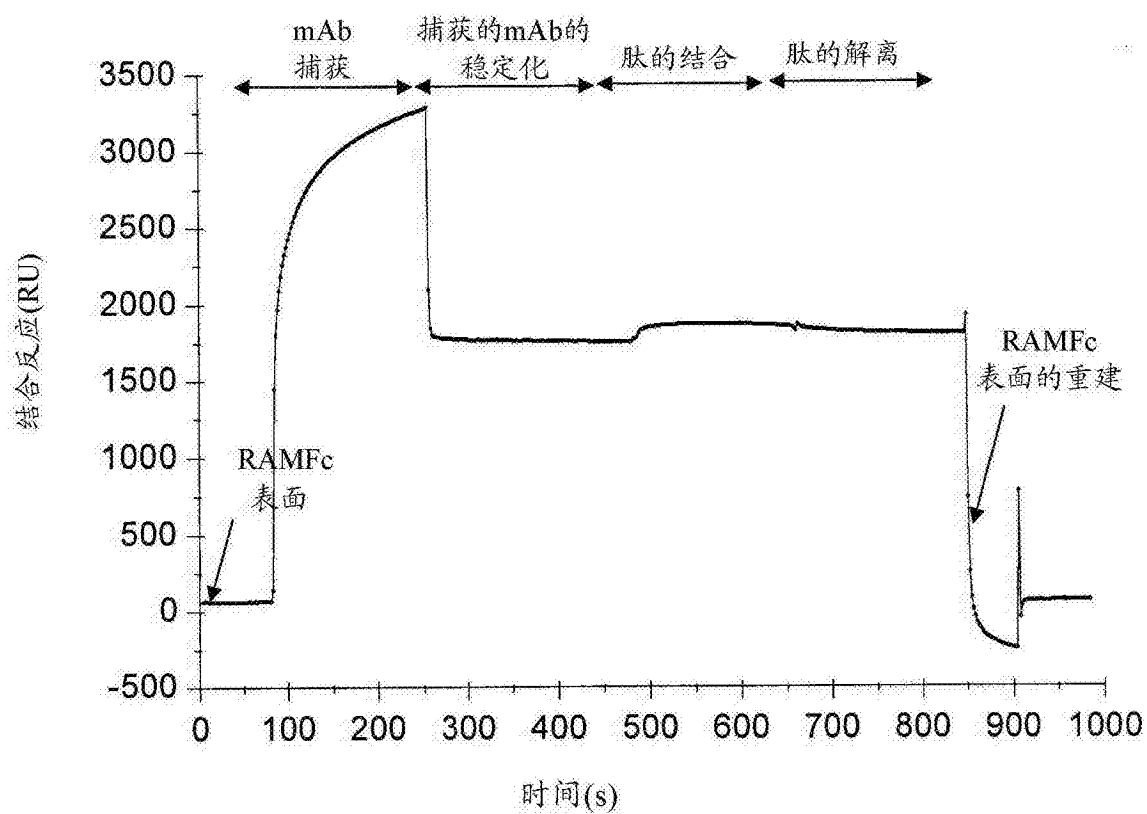


图 5

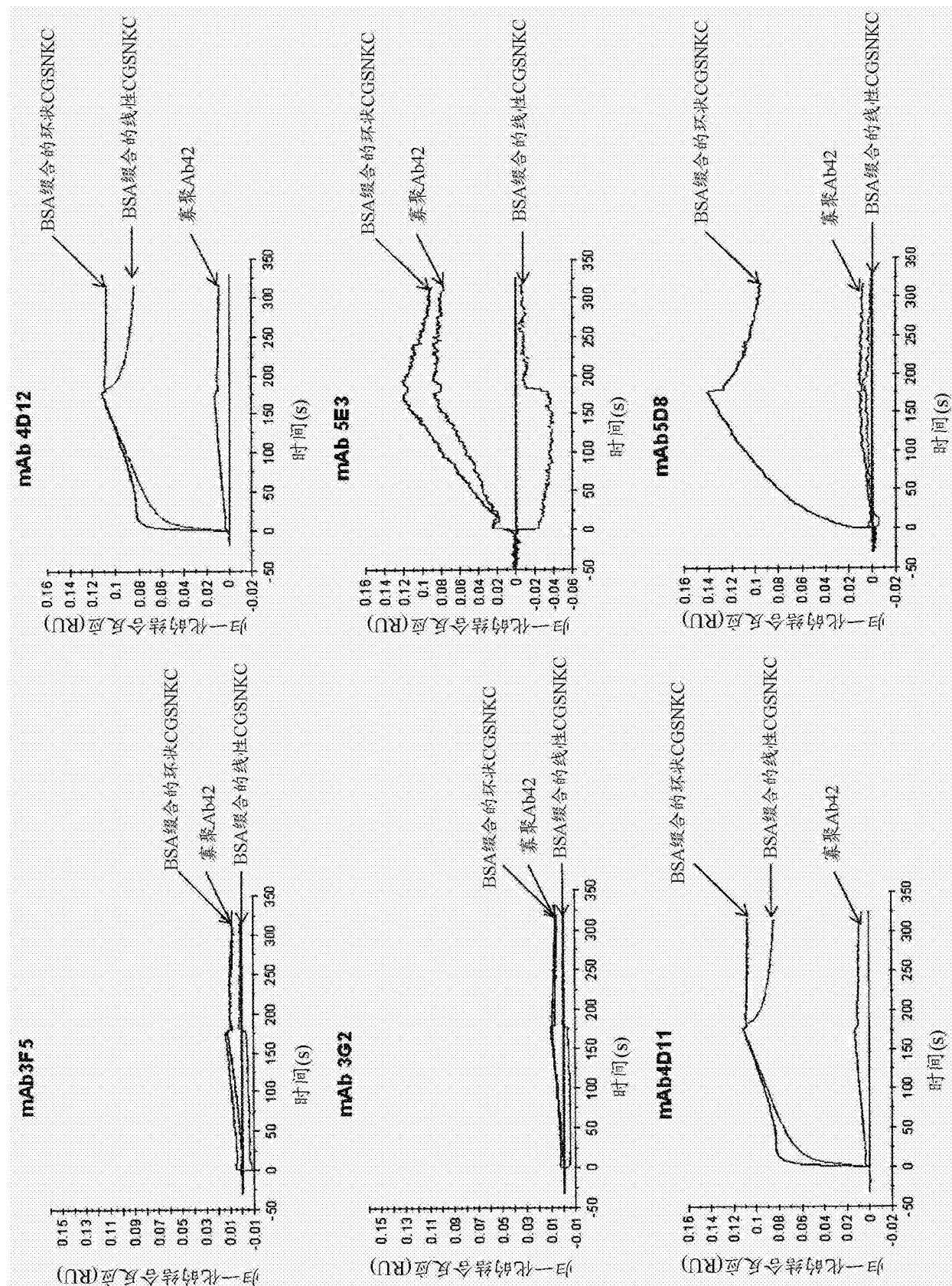


图 6

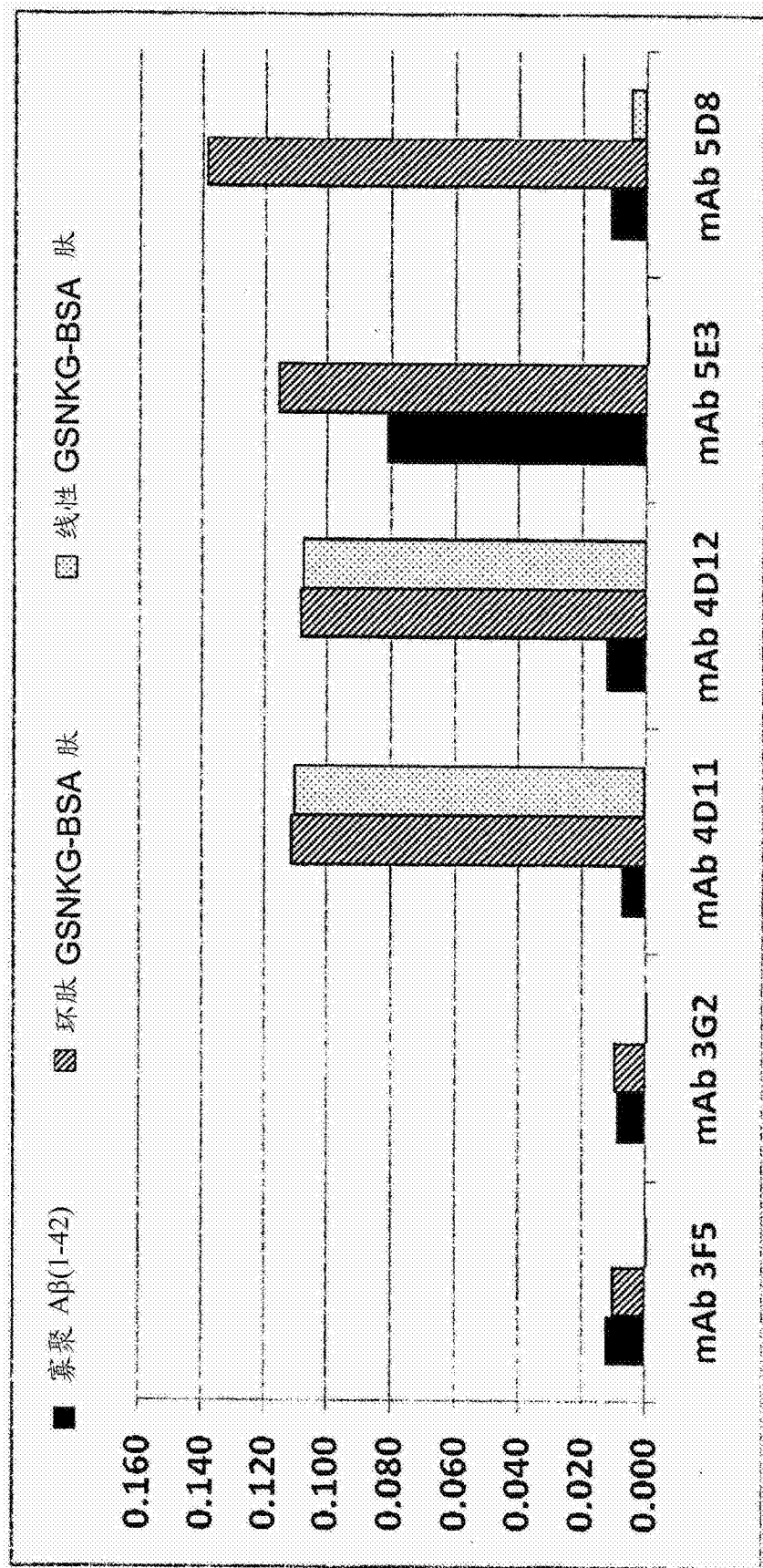


图 7

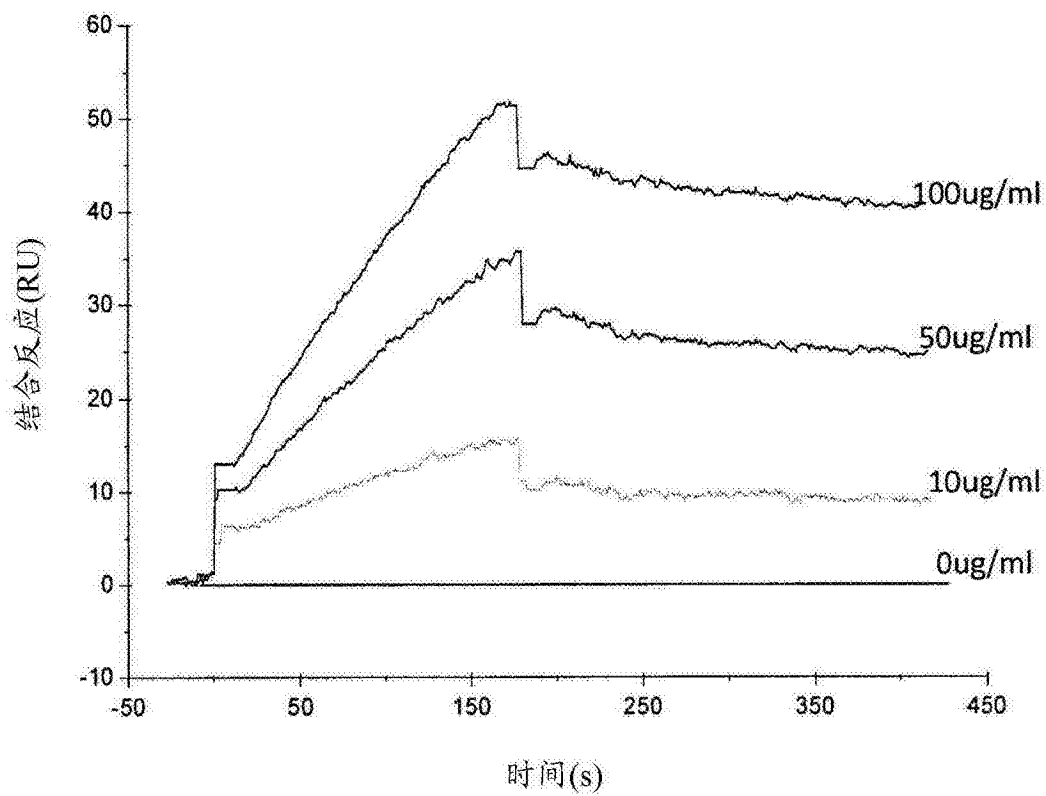


图 8

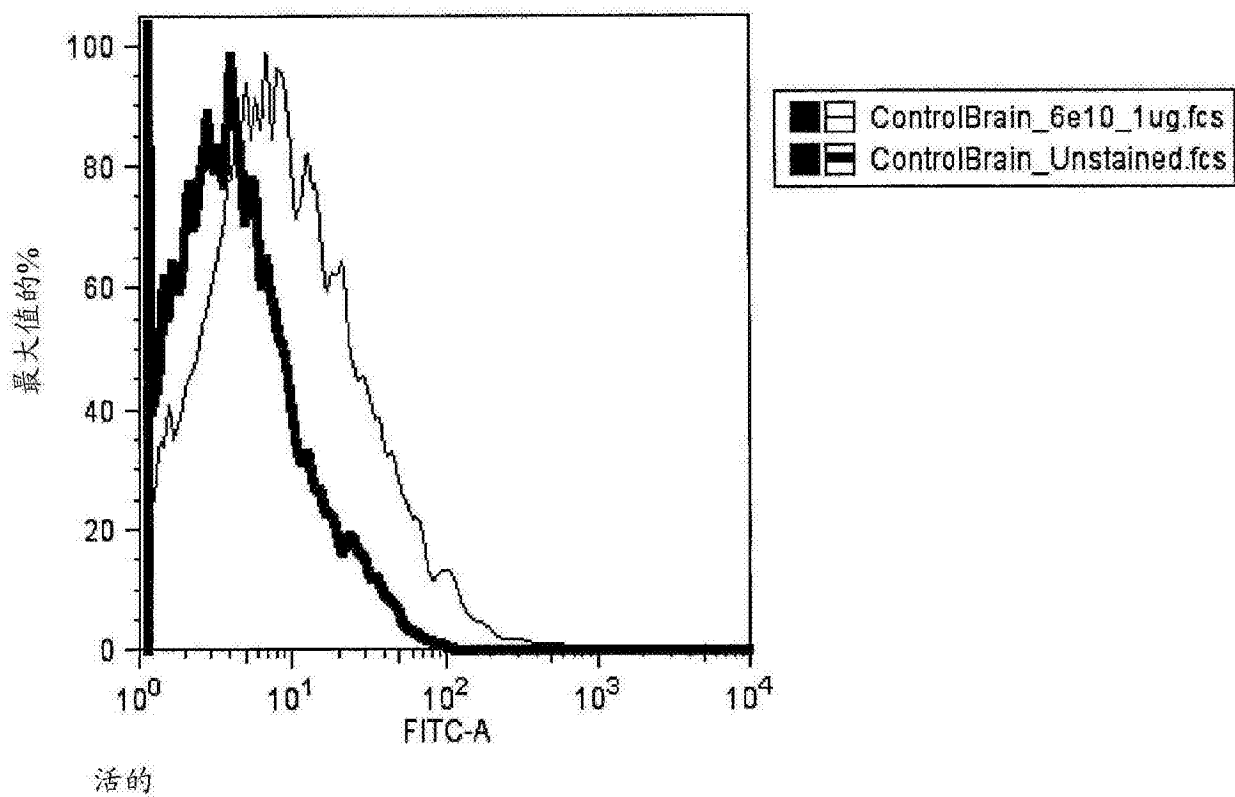


图 9

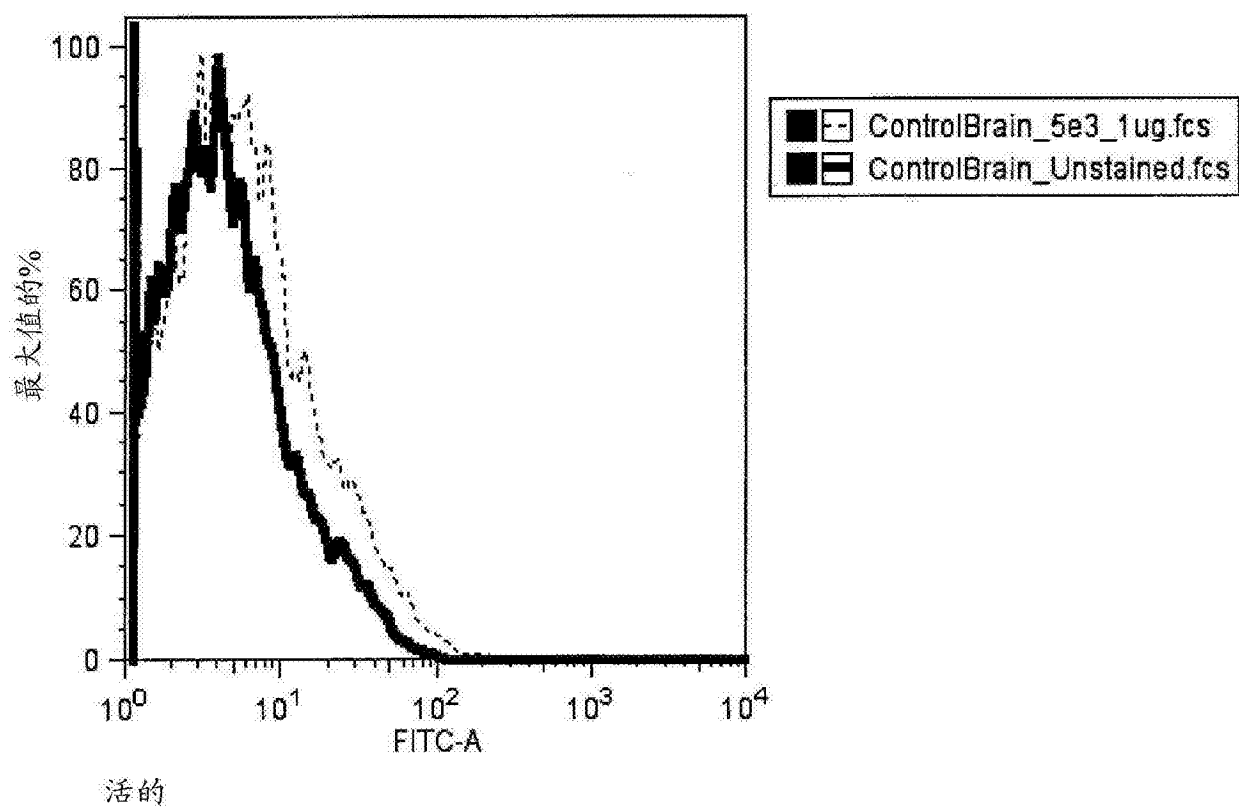


图 10

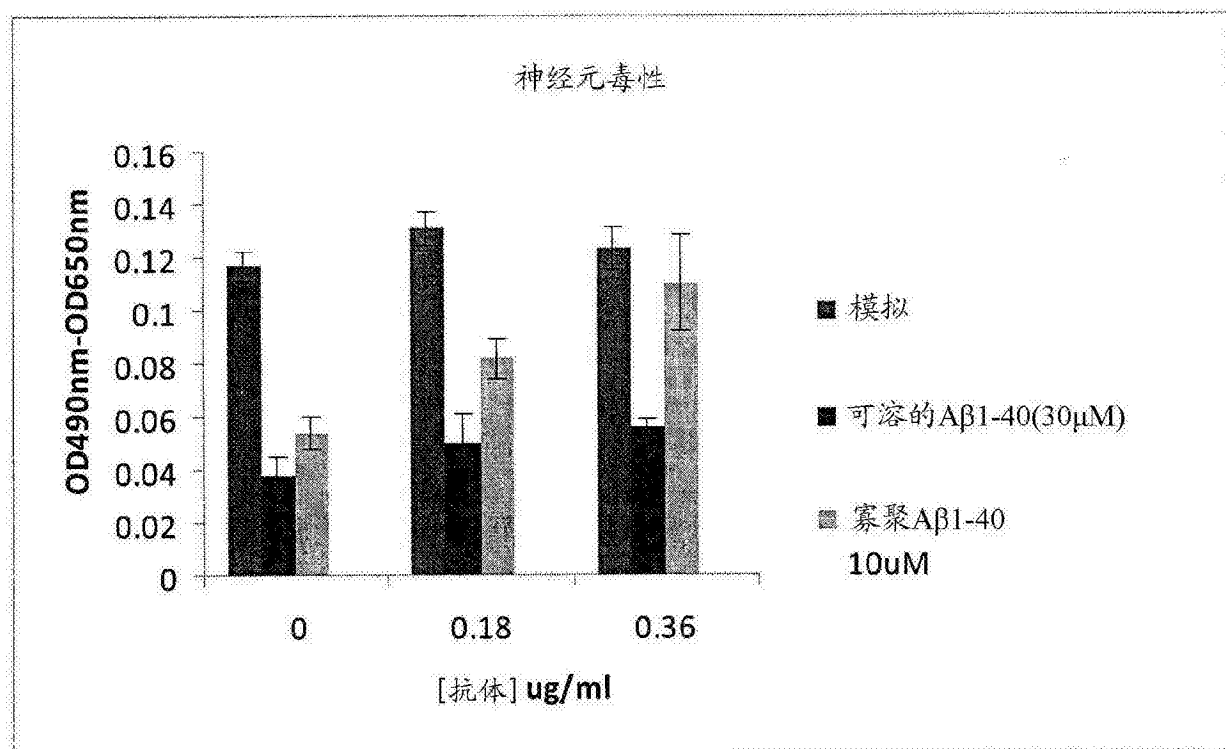


图 11

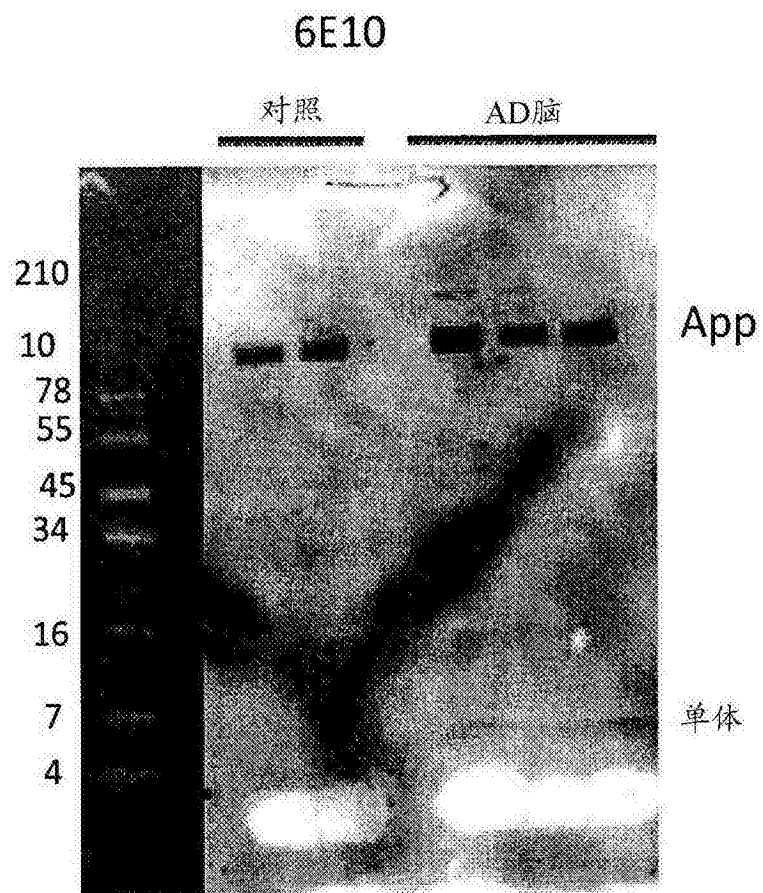


图 12

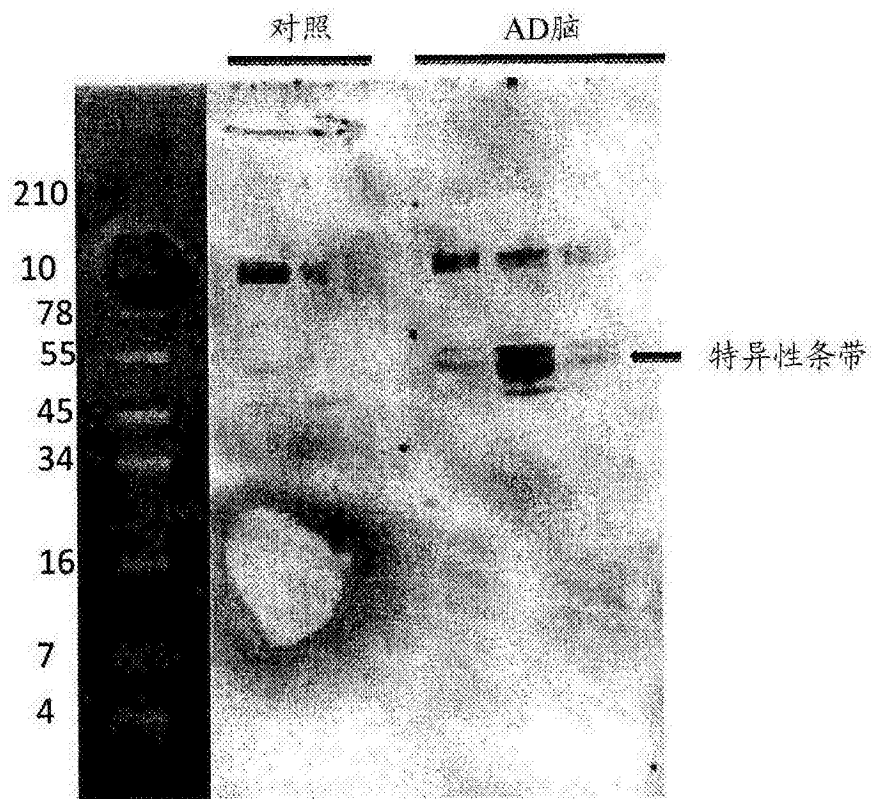


图 13

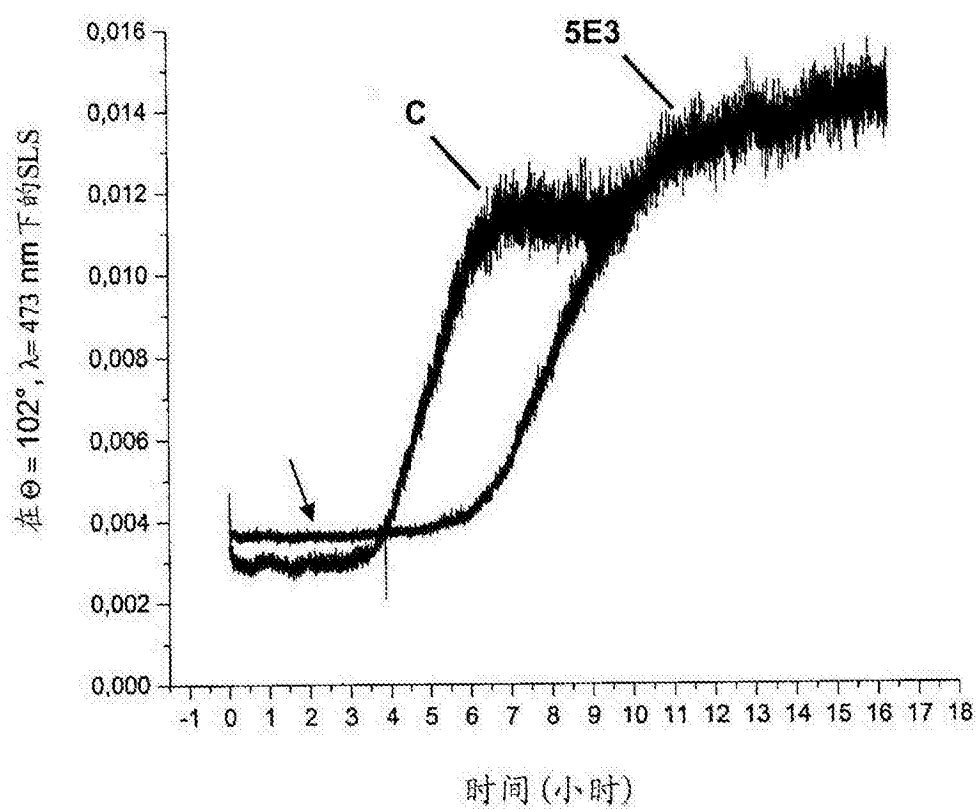


图 14

SEQ ID NO: 4

H-IgH1st3prime 489 48 426 0.05

NNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNATAGCCCTTGNNNNNGCATCCCAGGGTCACCAT
GGAGTTAGTTTGGGCAGCAGATCCAGGGGCCAGTGGATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGCTGAGGA
GACTGTGAGAGTGGTGCCTTGGCCCCAGTAGTGAGCCTCGTAATCCATCCTTGACAGAAATAGACCGCA
GAGTCCTCAGAGGTCAATCTGCTGAGCTGCATGTAGGCTGTGCTGGAGGATTTGTCTGCAGTCAGTGTGG
CCTTGCCCTTGAACCTTCTCATTGTACTTAGTATTAACATTTCCAGGATAAATCCATCCAATCCACTCAAGTCC
CTGTCCAGGCCTGTGTATCACCCACTGTATATAGTAGCTTGTGAATATGTAGCCAGAAGCCTTGCAAGGATA
TCCTCACTGAAGCCCCAGGCTTCACCAGCTCAGGTCCAGACTCCTGCAGCTGCACCTCENNAATTNNNNNN
N

SEQ ID NO: 5

H-IgH1st5prime 486 16 450 0.05

NNNNNNNNNTGGNGANCCTGGGGCTTCNGTGAGGANATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATATTCACAAGC
TACTATATACAGTGGGTGATACACAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTGGAA
ATGTTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCAC
AGCCTACATGCAGCTCAGCAGATTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGGATGGATTACG
AGGCTCACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTAT
CCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTT
CCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTNNNNAACCTTNNN

SEQ ID NO: 6

3prime κ

NNNNNNNNNNNGTTTNNATTNNNGCTTGGTGCCTCCTCCGAACGTCCGAGGATAATTATGATATTGTAGA
CAGTTGTTGTCTGCACAATCTTCTCACTCAAGGGTGCTGATGGGGAGAGAATAATCTGACACCCACCTACT
GCCACTGAGCCTTTTTGGGACACCTCAATCTTGAGTGGATGCGGCGTAAATCANGCGTTTAATAGTTCGGT
CTGGTTTCTGCTGAAGCCAGGTAAAGTAACCACTAATTTCTGACTTGCCCGACGAGTGAGACTGACTCTTT
CTCCCTCAGAGGCAGATAANGAGGATGGANACTGGGTCACTGGATGTCACATCTGGTACCTGGNAACC
NGANNCNCAAAAAANCAGCAA

SEQ ID NO: 7

5prime κ

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNGTCNNNTCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAAAGTCCGTCTCAC
TTGTCGGGCAAGTCNAGAAATTAGTGCTTACTTAACCTGGCTTCAGCAGAGACCCCATGGAATATTAGAC
GCCCCGATCTAACCCCATCCTCTTTAGATTCTGGTGTCCCAAAAAGGGTCCCTGCCAGGATGTCTGGGTCA
GATTATTCTATCAACATCACCATCCTTGAGTCTGAAGATTATGAAGACGATGCCTGTCTACAATATGGTAAT
TATCCTCGGAAGTTCAGTGGAGGCAACGAGCTAGAAATCTAACAGGCTGATGCTGCAACAACCTGTATCCA
TCTTCCACCATCACACCATCA

图 15

专利名称(译)	寡聚体特异性淀粉样蛋白 β 表位和抗体		
公开(公告)号	CN102858796B	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	CN201180020228.1	申请日	2011-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	英属哥伦比亚大学		
申请(专利权)人(译)	不列颠哥伦比亚大学		
当前申请(专利权)人(译)	不列颠哥伦比亚大学		
[标]发明人	尼尔R凯斯曼		
发明人	尼尔·R·凯斯曼		
IPC分类号	C07K14/47 A61K39/00 A61K39/395 A61P25/28 A61P37/04 C07K16/18 C12N15/13 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/00 A61P25/28 A61P37/04 C07K14/4711 C07K16/18 C07K2317/34 G01N33/6896 G01N2333/4709 A61K38/17 A61K38/18 A61K39/395 C07K14/435 C07K14/47 C07K14/475 C07K14/54 C07K16/22 C07K16/24 C07K16/28 A61K39/0005 A61K39/3955 A61K45/06 A61K2039/58 C07K7/06		
代理人(译)	洪欣		
优先权	61/310167 2010-03-03 US		
其他公开文献	CN102858796A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种新的来源于A β 的约束的肽表位、相关抗体组合物和使用方法，其中所述表位包含氨基酸序列SNK。描述了一种特异性结合包含构象表位的环肽的分离的抗体，所述构象表位包含氨基酸序列SNK并对应于寡聚A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。还描述了一种抗原肽，其包含具有约束的环状构型的表位，所述约束的环状构型包含氨基酸序列SNK并对应于寡聚A β 的暴露于溶剂的抗体易接近的转向区。还描述了治疗、预防和诊断阿尔茨海默病的方法。

