



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111205369 B

(45) 授权公告日 2024. 03. 08

(21) 申请号 201911347383.9

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2014.05.09

A61P 25/14 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111205369 A

(56) 对比文件

CN 105531287 B, 2020.01.21

US 2003232052 A1, 2003.12.18

WO 2008151833 A2, 2008.12.18

WO 2005052002 A2, 2005.06.09

(43) 申请公布日 2020.05.29

(30) 优先权数据

61/828,625 2013.05.29 US

61/871,288 2013.08.28 US

Justin Legleiter等. Monoclonal

antibodies recognize distinct

conformational epitopes formed by

polyglutamine in a mutant huntingtin

fragment. 《J Biol Chem.》. 2009, 第284卷 (第

284期), 第21647-21658页.

(62) 分案原申请数据

201480042530.0 2014.05.09

(73) 专利权人 维拜昂公司

地址 美国纽约州

李和. 变异亨廷顿病蛋白凝聚物的分子生物

学基础及选择性神经病理学. 《解剖学研究》

. 2001, (第3期), 第227-228、231页.

(72) 发明人 L·A·亨德森 I·A·阿玛罗

审查员 关维

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平 徐志明

(51) Int. Cl.

权利要求书2页 说明书36页

C07K 16/18 (2006.01)

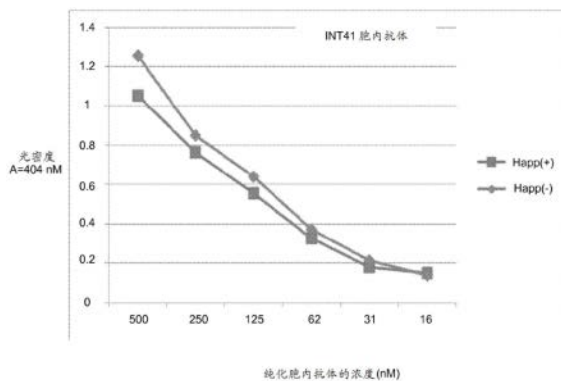
序列表28页 附图22页

(54) 发明名称

改变亨廷顿蛋白突变体降解的单链胞内抗体

(57) 摘要

本文提供胞内抗体的组合物和使用方法, 所述胞内抗体结合聚谷氨酸蛋白且改变聚谷氨酸相关疾病中如亨廷顿氏病中的聚谷氨酸蛋白聚集的作用. 提供防止聚谷氨酸聚集、基因失调和亨廷顿氏病的不利作用的胞内抗体。



1. 一种包含氨基酸序列的单链胞内抗体,其包含:可变重链序列、可变轻链序列以及插入在所述可变重链序列与所述可变轻链序列之间的接头序列,

a) 所述可变重链序列包含:

由SEQ ID NO:21组成的可变重链CDR1序列,  
由SEQ ID NO:22组成的可变重链CDR2序列,和  
由SEQ ID NO:7组成的可变重链CDR3序列;且

所述可变轻链序列包含:

由SEQ ID NO:23组成的可变轻链CDR1序列,  
由SEQ ID NO:24组成的可变轻链CDR2序列,和  
由SEQ ID NO:11组成的可变轻链CDR3序列;或

b) 所述可变重链序列包含:

由SEQ ID NO:21组成的可变重链CDR1序列,  
由SEQ ID NO:22组成的可变重链CDR2序列,和  
由SEQ ID NO:8组成的可变重链CDR3序列;且

所述可变轻链序列包含:

由SEQ ID NO:23组成的可变轻链CDR1序列,  
由SEQ ID NO:24组成的可变轻链CDR2序列,和  
由SEQ ID NO:12组成的可变轻链CDR3序列;或

c) 所述可变重链序列包含:

由SEQ ID NO:21组成的可变重链CDR1序列,  
由SEQ ID NO:22组成的可变重链CDR2序列,和  
由SEQ ID NO:9组成的可变重链CDR3序列;且

所述可变轻链序列包含:

由SEQ ID NO:23组成的可变轻链CDR1序列,  
由SEQ ID NO:24组成的可变轻链CDR2序列,和  
由SEQ ID NO:13组成的可变轻链CDR3序列,

并且其中所述胞内抗体能够结合聚脯氨酸序列并且减少细胞中的聚谷氨酸串蛋白的聚集。

2. 如权利要求1所述的胞内抗体,其中所述胞内抗体包含含有SEQ ID NO:5的位置1-99、110-225和237-256处的氨基酸的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的胞内抗体,其中所述接头序列包含富含甘氨酸的序列。

4. 如权利要求3所述的胞内抗体,其中所述序列包含SSGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:16)。

5. 如权利要求1所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2、3或4组成。

6. 如权利要求1所述的胞内抗体,其中所述胞内抗体结合Tau蛋白中的一个或多个表位。

7. 一种用于减少受试者的细胞中聚谷氨酸串蛋白的聚集的药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1-6中任一项所述的胞内抗体和药学上可接受的载体。

8. 如权利要求7所述的药物组合物,其中所述药学上可接受的载体包含递送剂。

9. 如权利要求7所述的药物组合物,其中所述聚谷氨酸串蛋白是亨廷顿蛋白。
10. 一种载体,其包含编码如权利要求1-6中任一项所述的胞内抗体的核酸序列。
11. 如权利要求10所述的载体,其中所述载体是病毒载体。
12. 如权利要求10所述的载体,其中所述载体是重组腺相关病毒。
13. 一种分离的细胞,其包含如权利要求1-6中任一项所述的胞内抗体。
14. 如权利要求1-6中任一项所述的胞内抗体在制备用于治疗或管理受试者中与细胞中的聚谷氨酰胺蛋白的聚集相关的疾病的药物中的用途,其中所述疾病为亨廷顿氏病、脊髓延髓肌萎缩症、齿状核红核苍白球路易体萎缩症或脊髓小脑共济失调。
15. 如权利要求14所述的用途,其中所述聚谷氨酰胺蛋白是亨廷顿蛋白。
16. 如权利要求14所述的用途,其中所述受试者是哺乳动物。
17. 如权利要求14所述的用途,其中所述受试者是人。
18. 如权利要求1-6中任一项所述的胞内抗体在制备用于治疗或管理受试者中阿尔茨海默氏病的药物中的用途。

## 改变亨廷顿蛋白突变体降解的单链胞内抗体

[0001] 本申请是申请日为2014年5月9日和发明名称为“改变亨廷顿蛋白突变体降解的单链胞内抗体”的201480042530.0号发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2013年8月28日提交的美国临时申请号61/871,288和2013年5月29日提交的美国临时申请号61/828,625的权益,其各自特此以引用的方式整体并入。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含以ASCII格式电子提交并在此通过引用全文并入的序列表。2014年6月12日生成的所述ASCII拷贝名称为26566PCT\_CRF\_SequenceListing.txt且大小为31214字节。

[0006] 发明背景

### 发明领域

[0007] 本发明总体上涉及用于改变聚谷氨酸相关疾病(如亨廷顿氏病(Huntington's disease))的不利作用和疾病进展的组合物和方法。

[0008] 相关技术描述

[0009] 亨廷顿氏病是引起脑中的神经细胞的渐进式分解(退化)、从而导致认知和运动功能下降的遗传性疾病[1,2]。细胞中的突变体亨廷顿蛋白(Htt)的聚集改变蛋白质功能和基因调控,这引起运动、思想(认知)和精神病症连同神经元死亡。患有亨廷顿氏病的大多人在他们20岁或30岁时发展病征和症状,但是疾病发作可在生命早期或晚期,其中患者死亡通常在诊断的10-15年内发生。亨廷顿氏病的幼年型在大约6%的患者中发生,其特征在于症状的快速发作和和疾病进展在儿童早期开始。

[0010] 引起亨廷顿氏病的遗传突变在亨廷顿蛋白的氨基末端附近的氨基酸谷氨酰胺(Q)的重复中发现,其被称为Htt聚Q或Htt<sub>p</sub>Q。重复的数量通常预测受试者中的发病年龄和进展速率。超过38Q的重复导致亨廷顿氏病病理学。亨廷顿蛋白的功能未良好表征,但是它似乎参与含有细胞和组织功能所需的神经递质和其他分子的囊泡的转运功能[3,4]。虽然突变在所有细胞中发现,但亨廷顿氏病主要显现在脑中。

[0011] Htt<sub>p</sub>Q的聚集导致亨廷顿蛋白的异常和捕获降解以及毒性降解产物的产生,所述毒性降解产物似乎进入细胞的细胞核并且在基因失调中起作用[5]。细胞核中的Htt<sub>p</sub>Q片段结合驱动细胞功能的转录调控蛋白质[4-6]。此外,Htt<sub>p</sub>Q的积聚在细胞核中的毒性片段通过直接结合DNA且通过改变染色质结构来改变基因表达[7,8]。一些证据证明半胱天冬酶6裂解片段积聚在细胞核中并且阻断半胱天冬酶6裂解消除毒性细胞核片段的产生,从而导致在Htt<sub>p</sub>Q动物中不存在疾病[9-11]。基因失调的模式被良好表征并且在基于细胞的系统中、在表现Htt<sub>p</sub>Q聚集的动物模型中以及在尸体剖检时取得的患者样品中一致。主要受影响的基因家族是调控蛋白质合成和降解、蛋白质折叠(也称为热休克途径)以及线粒体功能的基因家族,其为细胞提供能量。

[0012] 调控运动功能和认知的神经元的随后损失导致进行性痴呆和运动控制的损失。因

此,需要改善降解过程的组合物和方法。具体地说,疾病改善疗法必须展示预防基因失调和防止Htt pQ聚集的能力,其似乎是疾病进展中的主要因素。迄今为止,还未鉴别防止Htt pQ的聚集且改善基因失调的疾病改善性治疗剂。常规药剂和治疗减轻运动和精神病症的症状。例如,用于亨廷顿氏病的唯一FDA批准的药物(Xenazine®)提供舞蹈病的暂时缓解,所述舞蹈病是导致此疾病的初始表征的运动功能障碍的一个诊断部分。

[0013] 本公开寻求满足此需求且提供其他相关优点。

[0014] 发明概述

[0015] 本文提供使用胞内抗体来改变亨廷顿氏病的疾病进展的组合物和方法。在一个实施方案中,提供一种包含单链胞内抗体的组合物。所述单链胞内抗体包含氨基酸序列,其包含:可变重链互补决定区3(CDR3)序列、可变轻链CDR3序列以及插入在所述可变重链CDR3序列与所述可变轻链CDR3序列之间的接头序列,其中所述可变重链CDR3序列包含 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ ,其中 $X_1$ 是H、I、A或无氨基酸,其中 $X_2$ 是W、T或A,其中 $X_3$ 是P、G或V,其中 $X_4$ 是R、G或C,其中 $X_5$ 是L、Y、E或N,其中 $X_6$ 是W、R、C或G,其中 $X_7$ 是R或无氨基酸,其中 $X_8$ 是F、P或无氨基酸,其中 $X_9$ 是P、K、D或无氨基酸,其中 $X_{10}$ 是L、A或T,并且其中所述胞内抗体能够结合聚脯氨酸序列并且减少细胞中的聚谷氨酸串蛋白(tract protein)的聚集。

[0016] 在一个实施方案中,所述胞内抗体包含可变重链CDR3序列,所述可变重链CDR3序列包含WPGYRKA (SEQ ID NO:6)。在另一个实施方案中,所述胞内抗体包含可变重链CDR3序列,所述可变重链CDR3序列包含HWPRLWRFPL (SEQ ID NO:7)。在另一个实施方案中,所述胞内抗体包含可变重链CDR3序列,所述可变重链CDR3序列包含ITGCECT (SEQ ID NO:8)。在其他实施方案中,所述胞内抗体包含可变重链CDR3序列,所述可变重链CDR3序列包含AAVCNGPRDT (SEQ ID NO:9)。

[0017] 在一些实施方案中,所述可变轻链CDR3序列包含 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ ,其中 $X_1$ 是S或无氨基酸,其中 $X_2$ 是Y或无氨基酸,其中 $X_3$ 是C或无氨基酸,其中 $X_4$ 是V、A、I或无氨基酸,其中 $X_5$ 是L、S、R或Y,其中 $X_6$ 是N、K、G或S,其中 $X_7$ 是M、G或L,其中 $X_8$ 是H、K或L,其中 $X_9$ 是W、A或P,其中 $X_{10}$ 是A、L或V,并且其中 $X_{11}$ 是N、Y、L或无氨基酸。在一个实施方案中,所述可变轻链CDR3序列包含SYCASKGHWL (SEQ ID NO:10)。在另一个实施方案中,所述可变轻链CDR3序列包含VLNMHWAN (SEQ ID NO:11)。在另一个实施方案中,所述可变轻链CDR3序列包含SCIRGLKAAAY (SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中,所述可变轻链CDR3序列包含GYSLLPV L (SEQ ID NO:13)。

[0018] 在一个实施方案中,所述可变重链CDR3序列包含WPGYRKA (SEQ ID NO:6),并且其中所述可变轻链CDR3序列包含SYCASKGHWL (SEQ ID NO:10)。在另一个实施方案中,所述可变重链CDR3序列包含HWPRLWRFPL (SEQ ID NO:7),并且其中所述可变轻链CDR3序列包含VLNMHWAN (SEQ ID NO:11)。在另一个实施方案中,所述可变重链CDR3序列包含ITGCECT (SEQ ID NO:8),并且其中所述可变轻链CDR3序列包含SCIRGLKAAAY (SEQ ID NO:12)。在其他实施方案中,所述可变重链CDR3序列包含AAVCNGPRDT (SEQ ID NO:9),并且所述可变轻链CDR3序列包含GYSLLPV L (SEQ ID NO:13)。

[0019] 在另一个实施方案中,所述胞内抗体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列包含图2中的SEQ ID NO:5的位置1-99、110-225和237-256的氨基酸。在一些实施方案中,所述可变重链CDR3区包含 $X_1WPCX_5X_6X_7X_8X_9T$ ,并且其中 $X_1$ 是H、I、A或无氨基酸, $X_5$ 是L、Y、E或N, $X_6$ 是W、R、C

或G, X<sub>7</sub>是R或无氨基酸, X<sub>8</sub>是无氨基酸, X<sub>9</sub>是P、K或D, 并且X<sub>10</sub>是L、A或T (SEQ ID NO:14)。

[0020] 在其他实施方案中, 所述可变轻链CDR3区包含SX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>LHWAX<sub>10</sub>, 其中X<sub>2</sub>是无氨基酸, X<sub>3</sub>是C或无氨基酸, X<sub>4</sub>是V、A、I或无氨基酸, X<sub>5</sub>是L、S、R或Y, 并且X<sub>6</sub>是N、K、G或S (SEQ ID NO:15)。所述接头序列可包括富含甘氨酸的序列。在一个实施方案中, 所述序列包含SSGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:16)。

[0021] 在另一个实施方案中, 所述单链胞内抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:1。在一个实施方案中, 所述单链胞内抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:2。在另一个实施方案中, 所述单链胞内抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:3。在一些实施方案中, 所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:4。在另一个实施方案中, 所述单链胞内抗体的氨基酸序列由SEQ ID NO:1组成。在一个实施方案中, 所述单链胞内抗体的氨基酸序列由SEQ ID NO:2组成。在其他实施方案中, 所述单链胞内抗体的氨基酸序列由SEQ ID NO:3组成。在其他实施方案中, 所述单链胞内抗体的氨基酸序列由SEQ ID NO:4组成。

[0022] 在一些实施方案中, 所述单链胞内抗体包含氨基酸序列, 其包含: 可变重链互补决定区 (CDR) 序列、可变轻链CDR序列以及插入在所述可变重链CDR序列与所述可变轻链CDR序列之间的接头序列, 其中所述可变轻链CDR序列包含X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>, 其中X<sub>1</sub>是S或无氨基酸, 其中X<sub>2</sub>是Y或无氨基酸, 其中X<sub>3</sub>是C或无氨基酸, 其中X<sub>4</sub>是V、A、I或无氨基酸, 其中X<sub>5</sub>是L、S、R或Y, 其中X<sub>6</sub>是N、K、G或S, 其中X<sub>7</sub>是M、G或L, 其中X<sub>8</sub>是H、K或L, 其中X<sub>9</sub>是W、A或P, 其中X<sub>10</sub>是A、L或V, 并且其中X<sub>11</sub>是N、Y、L或无氨基酸, 并且其中所述胞内抗体能够结合聚脯氨酸序列并且减少细胞中的聚谷氨酸串蛋白的聚集。

[0023] 在一个实施方案中, 所述可变轻链CDR序列包含SYCASKGHWL (SEQ ID NO:10)。在另一个实施方案中, 所述可变轻链CDR序列包含VLNMHWAN (SEQ ID NO:11)。在另一个实施方案中, 所述可变轻链CDR序列包含SCIRGLKAAAY (SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中, 所述可变轻链CDR序列包含GYSLLPVL (SEQ ID NO:13)。所述可变重链CDR序列可包含WPGYRKA (SEQ ID NO:6)。在其他实施方案中, 所述可变重链CDR序列包含HWPRLWRFPL (SEQ ID NO:7)。所述可变重链CDR序列可包含ITGCECT (SEQ ID NO:8)。在其他实施方案中, 所述可变重链CDR序列包含AAVCNGPRDT (SEQ ID NO:9)。在一个实施方案中, 所述可变重链CDR序列包含WPGYRKA (SEQ ID NO:6), 并且其中所述可变轻链CDR序列包含SYCASKGHWL (SEQ ID NO:10)。

[0024] 在某些方面, 所述可变重链CDR序列包含HWPRLWRFPL (SEQ ID NO:7), 并且其中所述可变轻链CDR序列包含VLNMHWAN (SEQ ID NO:11)。在其他方面, 所述可变重链CDR序列包含ITGCECT (SEQ ID NO:8), 并且其中所述可变轻链CDR序列包含SCIRGLKAAAY (SEQ ID NO:12)。在一个方面, 所述可变重链CDR序列包含AAVCNGPRDT (SEQ ID NO:9), 并且其中所述可变轻链CDR序列包含GYSLLPVL (SEQ ID NO:13)。

[0025] 在其他实施方案中, 所述胞内抗体包含氨基酸序列, 所述氨基酸序列包含图2中的SEQ ID NO:5的位置1-99、110-225和237-256的氨基酸。

[0026] 在一些方面, 所述可变重链CDR区包含X<sub>1</sub>WPCX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>T, 并且其中X<sub>1</sub>是H、I、A或无氨基酸, X<sub>5</sub>是L、Y、E或N, X<sub>6</sub>是W、R、C或G, X<sub>7</sub>是R或无氨基酸, X<sub>8</sub>是无氨基酸, X<sub>9</sub>是P、K或D, 并且X<sub>10</sub>是L、A或T (SEQ ID NO:14)。在其他方面, 所述可变轻链CDR区包含SX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>LHWAX<sub>10</sub>, 其中X<sub>2</sub>是无氨基酸, X<sub>3</sub>是C或无氨基酸, X<sub>4</sub>是V、A、I或无氨基酸, X<sub>5</sub>是L、S、R或Y, 并且X<sub>6</sub>是N、K、G或S (SEQ ID NO:15)。

[0027] 在一个实施方案中,所述接头序列包含富含甘氨酸的序列。在另一个实施方案中,所述序列包含SSGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:16)。

[0028] 在另一个实施方案中,所述单链胞内抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:1。所述单链胞内抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:2。在一些实施方案中,所述单链胞内抗体的氨基酸序列包含SEQ ID NO:3。在一个实施方案中,所述单链胞内抗体的氨基酸包含SEQ ID NO:4。

[0029] 在一些实施方案中,所述单链胞内抗体的氨基酸序列由SEQ ID NO:1组成。在其他实施方案中,所述单链胞内抗体的氨基酸序列由SEQ ID NO:2组成。在另一个实施方案中,所述单链胞内抗体的氨基酸序列由SEQ ID NO:3组成。在其他实施方案中,所述单链胞内抗体的氨基酸序列由SEQ ID NO:4组成。

[0030] 在一个方面,所述胞内抗体能够结合亨廷顿蛋白 (HttpQ) 蛋白质。在一个实施方案中,所述聚谷氨酸串是亨廷顿蛋白 (HttpQ) 蛋白质。在另一个实施方案中,所述胞内抗体降低由所述HttpQ蛋白的聚集引起的过度表达基因的表达。在一些实施方案中,所述胞内抗体增加由所述HttpQ蛋白的聚集引起的表达不足基因的表达。

[0031] 在另一方面,所述聚脯氨酸序列包含PQLPQPPPQAQP (SEQ ID NO:17)。在某些方面,所述聚脯氨酸序列包含PGPAVAEEPLHRPG (SEQ ID NO:18)。在其他方面,所述聚脯氨酸序列包含PXP,并且其中X是任何氨基酸。

[0032] 在一个实施方案中,所述胞内抗体预防由聚谷氨酸串蛋白的聚集引起的基因失调。在另一个实施方案中,所述胞内抗体阻断突变体亨廷顿蛋白的毒性片段由于基因失调而结合染色质的能力。在一个实施方案中,INT41减少转录调控因子与细胞核中的染色质的结合。在另一个实施方案中,所述胞内抗体防止聚谷氨酸串蛋白在细胞膜上的积聚。

[0033] 本发明的方面包括一种用于减少受试者中的聚谷氨酰胺串蛋白的聚集的药物组合物,所述药物组合物包含如本文所描述的所述胞内抗体和药学上可接受的载体。在一个实施方案中,所述药学上可接受的载体包含递送剂。在另一个实施方案中,所述聚谷氨酰胺串蛋白是亨廷顿蛋白 (HttpQ) 蛋白质。

[0034] 本发明的其他方面包括一种载体,所述载体包含编码如本文所描述的所述胞内抗体的核酸序列。在一个方面,所述载体是病毒载体。在另一方面,所述载体是重组腺相关病毒。本发明的另一方面包括一种分离的细胞,所述分离的细胞包含如本文所描述的所述胞内抗体。

[0035] 本发明包括防止细胞中的聚谷氨酰胺 (聚Q) 蛋白的聚集的方法,所述方法包括:(a) 将如本文所描述的所述胞内抗体引入所述细胞;(b) 使在步骤(a)中产生的所述细胞维持足以使所述胞内抗体结合所述聚Q蛋白的一段时间,从而防止所述细胞中的聚Q蛋白的聚集。

[0036] 在一些实施方案中,本发明包括一种预防由细胞中的聚谷氨酰胺 (聚Q) 蛋白的聚集引起的基因失调的方法,所述方法包括:(a) 将如本文所描述的所述胞内抗体引入所述细胞;(b) 使在步骤(a)中产生的所述细胞维持足以使所述胞内抗体结合所述聚Q蛋白或其片段的一段时间,从而预防所述细胞中的一种或多种基因的基因失调。在一些方面,所述一种或多种基因包括在表2中列出的基因。在另一个实施方案中,所述聚Q蛋白是亨廷顿蛋白 (HttpQ) 蛋白质。

[0037] 本发明的另一方面包括一种治疗或管理患有与细胞中的聚谷氨酰胺蛋白的聚集相关的疾病的受试者的方法,所述方法包括向需要所述治疗或管理的受试者施用治疗有效量的如本文所描述的所述胞内抗体。在一个实施方案中,所述疾病包括亨廷顿氏病、脊髓延髓肌萎缩症(SBMA)、齿状核红核苍白球路易体萎缩症(dentatorubral and pallidoluysian atrophy)或脊髓小脑共济失调。在另一个实施方案中,所述聚谷氨酰胺蛋白是亨廷顿蛋白(Htt<sub>Q</sub>)蛋白质。在另一个实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在其他实施方案中,所述受试者是人。

[0038] 本发明包括一种包含氨基酸序列的单链胞内抗体,其包含:可变重链互补决定区3(CDR3)序列、可变轻链CDR3序列以及插入在所述可变重链CDR3序列与所述可变轻链CDR3序列之间的接头序列,其中所述可变重链CDR3序列包含SEQ ID NO:6,其中所述可变轻链CDR3序列包含SEQ ID NO:10,并且其中所述胞内抗体能够结合人Tau蛋白的蛋白质序列。在一些实施方案中,所述可变重链CDR序列包含WPGYRKA (SEQ ID NO:6)。在其他实施方案中,所述可变轻链CDR序列包含SYCASKGHWL (SEQ ID NO:10)。在其他实施方案中,所述可变重链CDR序列包含WPGYRKA (SEQ ID NO:6),并且其中所述可变轻链CDR序列包含SYCASKGHWL (SEQ ID NO:10)。在一个实施方案中,所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:1。在另一个实施方案中,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1组成。在另一个实施方案中,所述胞内抗体结合Tau蛋白中的一个或多个表位。

[0039] 本发明还包括一种治疗或管理患有阿尔茨海默氏病或其他Tau病状的受试者的方法,所述方法包括向需要所述治疗或管理的受试者施用治疗有效量的本文所描述的胞内抗体。在一个实施方案中,所述胞内抗体防止Tau片段与引起神经元功能障碍的神经元的结合。

[0040] 在一些实施方案中,本发明包括一种包含氨基酸序列的单链胞内抗体,其包含:可变重链互补决定区3(CDR3)序列、可变轻链CDR3序列以及插入在所述可变重链CDR3序列与所述可变轻链CDR3序列之间的接头序列,其中所述可变重链CDR3序列包含SEQ ID NO:6,其中所述可变轻链CDR3序列包含SEQ ID NO:10,并且其中所述胞内抗体能够结合人Tau蛋白的蛋白质序列。

[0041] 在一个实施方案中,所述可变重链CDR序列包含WPGYRKA (SEQ ID NO:6)。在另一个实施方案中,所述可变轻链CDR序列包含SYCASKGHWL (SEQ ID NO:10)。在一些实施方案中,所述可变重链CDR序列包含WPGYRKA (SEQ ID NO:6),并且其中所述可变轻链CDR序列包含SYCASKGHWL (SEQ ID NO:10)。在某些实施方案中,所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:1。在另一个实施方案中,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1组成。在另一个实施方案中,所述胞内抗体结合Tau蛋白中的一个或多个表位。

[0042] 本发明包括一种治疗或管理患有阿尔茨海默氏病或其他Tau病状的受试者的方法,所述方法包括向需要所述治疗或管理的受试者施用治疗有效量的本文所描述的胞内抗体。在一个实施方案中,所述胞内抗体防止Tau片段与引起神经元功能障碍的神经元的结合。

[0043] 具体地,本发明涉及以下方面:

[0044] 1.一种包含氨基酸序列的单链胞内抗体,其包含:可变重链互补决定区3(CDR3)序列、可变轻链CDR3序列以及插入在所述可变重链CDR3序列与所述可变轻链CDR3序列之间的



接头序列,其中所述可变重链CDR3序列包含 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ ,其中 $X_1$ 是H、I、A或无氨基酸,其中 $X_2$ 是W、T或A,其中 $X_3$ 是P、G或V,其中 $X_4$ 是R、G或C,其中 $X_5$ 是L、Y、E或N,其中 $X_6$ 是W、R、C或G,其中 $X_7$ 是R或无氨基酸,其中 $X_8$ 是F、P或无氨基酸,其中 $X_9$ 是P、K、D或无氨基酸,其中 $X_{10}$ 是L、A或T,并且其中所述胞内抗体能够结合聚脯氨酸序列并且减少细胞中的聚谷氨酸串蛋白的聚集。

[0045] 2.如第1项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR3序列包含WPGYRKA (SEQ ID NO:6)。

[0046] 3.如第1项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR3序列包含HWPRLWRFPL (SEQ ID NO:7)。

[0047] 4.如第1项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR3序列包含ITGCECT (SEQ ID NO:8)。

[0048] 5.如第1项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR3序列包含AAVCNGPRDT (SEQ ID NO:9)。

[0049] 6.如第1-5项中任一项所述的胞内抗体,其中所述可变轻链CDR3序列包含 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ ,其中 $X_1$ 是S或无氨基酸,其中 $X_2$ 是Y或无氨基酸,其中 $X_3$ 是C或无氨基酸,其中 $X_4$ 是V、A、I或无氨基酸,其中 $X_5$ 是L、S、R或Y,其中 $X_6$ 是N、K、G或S,其中 $X_7$ 是M、G或L,其中 $X_8$ 是H、K或L,其中 $X_9$ 是W、A或P,其中 $X_{10}$ 是A、L或V,并且其中 $X_{11}$ 是N、Y、L或无氨基酸。

[0050] 7.如第1-6项中任一项所述的胞内抗体,其中所述可变轻链CDR3序列包含SYCASKGHWL (SEQ ID NO:10)。

[0051] 8.如第1-6项中任一项所述的胞内抗体,其中所述可变轻链CDR3序列包含VLNMHWAN (SEQ ID NO:11)。

[0052] 9.如第1-6项中任一项所述的胞内抗体,其中所述可变轻链CDR3序列包含SCIRGLKAAAY (SEQ ID NO:12)。

[0053] 10.如第1-6项中任一项所述的胞内抗体,其中所述可变轻链CDR3序列包含GYSLLPVL (SEQ ID NO:13)。

[0054] 11.如第1项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR3序列包含WPGYRKA (SEQ ID NO:6),并且其中所述可变轻链CDR3序列包含SYCASKGHWL (SEQ ID NO:10)。

[0055] 12.如第1项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR3序列包含HWPRLWRFPL (SEQ ID NO:7),并且其中所述可变轻链CDR3序列包含VLNMHWAN (SEQ ID NO:11)。

[0056] 13.如第1项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR3序列包含ITGCECT (SEQ ID NO:8),并且其中所述可变轻链CDR3序列包含SCIRGLKAAAY (SEQ ID NO:12)。

[0057] 14.如第1项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR3序列包含AAVCNGPRDT (SEQ ID NO:9),并且其中所述可变轻链CDR3序列包含GYSLLPVL (SEQ ID NO:13)。

[0058] 15.如第1-14项中任一项所述的胞内抗体,其中所述胞内抗体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列包含图2中的SEQ ID NO:5的位置1-99、110-225和237-256的氨基酸。

[0059] 16.如第1项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR3区包含 $X_1WPCX_5X_6X_7X_8X_9T$ ,并且其中 $X_1$ 是H、I、A或无氨基酸, $X_5$ 是L、Y、E或N, $X_6$ 是W、R、C或G, $X_7$ 是R或无氨基酸, $X_8$ 是无氨基酸, $X_9$ 是P、K或D,并且 $X_{10}$ 是L、A或T (SEQ ID NO:14)。

[0060] 17.如第1项所述的胞内抗体,其中所述可变轻链CDR3区包含 $SX_2X_3X_4X_5X_6LHWAX_{10}$ ,

其中 $X_2$ 是无氨基酸, $X_3$ 是C或无氨基酸, $X_4$ 是V、A、I或无氨基酸, $X_5$ 是L、S、R或Y,并且 $X_6$ 是N、K、G或S(SEQ ID NO:15)。

[0061] 18.如第1项所述的胞内抗体,其中所述接头序列包含富含甘氨酸的序列。

[0062] 19.如第18项所述的胞内抗体,其中所述序列包含SSGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:16)。

[0063] 20.如第1项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:1。

[0064] 21.如第1项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:2。

[0065] 22.如第1项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:3。

[0066] 23.如第1项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:4。

[0067] 24.如第1项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1组成。

[0068] 25.如第1项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2组成。

[0069] 26.如第1项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列由SEQ ID NO:3组成。

[0070] 27.如第1项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4组成。

[0071] 28.一种包含氨基酸序列的单链胞内抗体,其包含:可变重链互补决定区(CDR)序列、可变轻链CDR序列以及插入在所述可变重链CDR序列与所述可变轻链CDR序列之间的接头序列,其中所述可变轻链CDR序列包含 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ ,其中 $X_1$ 是S或无氨基酸,其中 $X_2$ 是Y或无氨基酸,其中 $X_3$ 是C或无氨基酸,其中 $X_4$ 是V、A、I或无氨基酸,其中 $X_5$ 是L、S、R或Y,其中 $X_6$ 是N、K、G或S,其中 $X_7$ 是M、G或L,其中 $X_8$ 是H、K或L,其中 $X_9$ 是W、A或P,其中 $X_{10}$ 是A、L或V,并且其中 $X_{11}$ 是N、Y、L或无氨基酸,并且其中所述胞内抗体能够结合聚脯氨酸序列并且减少细胞中的聚谷氨酸串蛋白的聚集。

[0072] 29.如第28项所述的胞内抗体,其中所述可变轻链CDR序列包含SYCASKGHWL(SEQ ID NO:10)。

[0073] 30.如第28项所述的胞内抗体,其中所述可变轻链CDR序列包含VLNMHWAN(SEQ ID NO:11)。

[0074] 31.如第28项所述的胞内抗体,其中所述可变轻链CDR序列包含SCIRGLKAAY(SEQ ID NO:12)。

[0075] 32.如第28项所述的胞内抗体,其中所述可变轻链CDR序列包含GYSLLPVL(SEQ ID NO:13)。

[0076] 33.如第28-32项中任一项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR序列包含WPGYRKA(SEQ ID NO:6)。

[0077] 34.如第28-32项中任一项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR序列包含HWPRLWRFPL(SEQ ID NO:7)。

[0078] 35.如第28-32项中任一项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR序列包含ITGCECT(SEQ ID NO:8)。

[0079] 36.如第28-32项中任一项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR序列包含AAVCNGPRDT(SEQ ID NO:9)。

[0080] 37.如第28项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR序列包含WPGYRKA(SEQ ID NO:6),并且其中所述可变轻链CDR序列包含SYCASKGHWL(SEQ ID NO:10)。

[0081] 38.如第28项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR序列包含HWPRLWRFPL(SEQ

ID NO:7),并且其中所述可变轻链CDR序列包含VLNMHWAN(SEQ ID NO:11)。

[0082] 39.如第28项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR序列包含ITGCECT(SEQ ID NO:8),并且其中所述可变轻链CDR序列包含SCIRGLKAAAY(SEQ ID NO:12)。

[0083] 40.如第28项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR序列包含AAVCNGPRDT(SEQ ID NO:9),并且其中所述可变轻链CDR序列包含GYSLLPVL(SEQ ID NO:13)。

[0084] 41.如第28-40项中任一项所述的胞内抗体,其中所述胞内抗体包含氨基酸序列,所述氨基酸序列包含图2中的SEQ ID NO:5的位置1-99、110-225和237-256的氨基酸。

[0085] 42.如第28项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR区包含 $X_1$ WPCX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>T,并且其中 $X_1$ 是H、I、A或无氨基酸, $X_5$ 是L、Y、E或N, $X_6$ 是W、R、C或G, $X_7$ 是R或无氨基酸, $X_8$ 是无氨基酸, $X_9$ 是P、K或D,并且 $X_{10}$ 是L、A或T(SEQ ID NO:14)。

[0086] 43.如第28项所述的胞内抗体,其中所述可变轻链CDR区包含SX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>LHWAX<sub>10</sub>,其中 $X_2$ 是无氨基酸, $X_3$ 是C或无氨基酸, $X_4$ 是V、A、I或无氨基酸, $X_5$ 是L、S、R或Y,并且 $X_6$ 是N、K、G或S(SEQ ID NO:15)。

[0087] 44.如第28项所述的胞内抗体,其中所述接头序列包含富含甘氨酸的序列。

[0088] 45.如权利要求44所述的胞内抗体,其中所述序列包含SSGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:16)。

[0089] 46.如第28项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:1。

[0090] 47.如第28项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:2。

[0091] 48.如第28项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:3。

[0092] 49.如第28项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:4。

[0093] 50.如第28项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1组成。

[0094] 51.如第28项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2组成。

[0095] 52.如第28项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列由SEQ ID NO:3组成。

[0096] 53.如第28项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4组成。

[0097] 54.如第1-53项中任一项所述的胞内抗体,其中所述胞内抗体能够结合亨廷顿蛋白(Htt<sub>pp</sub>Q)蛋白质。

[0098] 55.如第1-54项中任一项所述的胞内抗体,其中所述聚谷氨酸串蛋白是亨廷顿蛋白(Htt<sub>pp</sub>Q)蛋白质。

[0099] 56.如权利要求55所述的胞内抗体,其中所述胞内抗体降低由所述Htt<sub>pp</sub>Q蛋白的聚集引起的过度表达基因的表达。

[0100] 57.如权利要求55所述的胞内抗体,其中所述胞内抗体增加由所述Htt<sub>pp</sub>Q蛋白的聚集引起的表达不足基因的表达。

[0101] 58.如第1-53项中任一项所述的胞内抗体,其中所述聚谷氨酸串蛋白是脊髓延髓肌萎缩症(SBMA)蛋白和脊髓小脑共济失调(SCA)蛋白。

[0102] 59.如第1-58项中任一项所述的胞内抗体,其中所述聚脯氨酸序列包含PQLPQPPPQAQP(SEQ ID NO:17)。

[0103] 60.如第1-58项中任一项所述的胞内抗体,其中所述聚脯氨酸序列包含PGPAVAEEPLHRPG(SEQ ID NO:18)。

[0104] 61.如第1-58项中任一项所述的胞内抗体,其中所述聚脯氨酸序列包含PXP,并且

其中X是任何氨基酸。

[0105] 62. 如第1-61项中任一项所述的胞内抗体,其中所述胞内抗体预防由所述聚谷氨酸串蛋白的聚集引起的基因失调。

[0106] 63. 如第1-62项中任一项所述的胞内抗体,其中所述胞内抗体防止所述聚谷氨酸串蛋白的毒性片段结合细胞核中的染色质。

[0107] 64. 如第1-63项中任一项所述的胞内抗体,其中所述胞内抗体减少转录调控因子与所述细胞核中的染色质的结合。

[0108] 65. 如第1-64项中任一项所述的胞内抗体,其中所述胞内抗体防止所述聚谷氨酸串蛋白在细胞膜上的积聚。

[0109] 66. 一种用于减少受试者中的聚谷氨酸串蛋白的聚集的药物组合物,所述药物组合物包含如第1-65项中任一项所述的所述胞内抗体和药学上可接受的载体。

[0110] 67. 如第66项所述的药物组合物,其中所述药学上可接受的载体包含递送剂。

[0111] 68. 如第66项所述的药物组合物,其中所述聚谷氨酸串蛋白是亨廷顿蛋白(Htt<sub>p</sub>Q)蛋白质。

[0112] 69. 一种载体,其包含编码如第1-65项中任一项所述的所述胞内抗体的核酸序列

[0113] 70. 如第69项所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

[0114] 71. 如第69项所述的载体,其中所述载体是重组腺相关病毒。

[0115] 72. 一种分离的细胞,其包含如第1-65项中任一项所述的所述胞内抗体。

[0116] 73. 一种防止细胞中的聚谷氨酰胺(聚Q)蛋白的聚集的方法,所述方法包括:

[0117] (a) 将如第1-65项中任一项所述的所述胞内抗体引入所述细胞;

[0118] (b) 使在步骤(a)中产生的所述细胞维持足以使所述胞内抗体结合所述聚Q蛋白的一段时间,从而防止所述细胞中的聚Q蛋白的聚集。

[0119] 74. 一种预防由细胞中的聚谷氨酰胺(聚Q)蛋白的聚集引起的基因失调的方法,所述方法包括:

[0120] (a) 将如第1-65项中任一项所述的所述胞内抗体引入所述细胞;

[0121] (b) 使在步骤(a)中产生的所述细胞维持足以使所述胞内抗体结合所述聚Q蛋白的一段时间,从而预防所述细胞中的一种或多种基因的基因失调。

[0122] 75. 如第74项所述的方法,其中所述一种或多种基因包含在表2中列出的基因。

[0123] 76. 如第74项所述的方法,其中所述聚Q蛋白是亨廷顿蛋白(Htt<sub>p</sub>Q)蛋白质。

[0124] 77. 一种治疗或管理患有与细胞中的聚谷氨酰胺蛋白的聚集相关的疾病的受试者的方法,所述方法包括向需要所述治疗或管理的受试者施用治疗有效量的如第1-65项中任一项所述的所述胞内抗体。

[0125] 78. 如第77项所述的方法,其中所述疾病包括亨廷顿氏病、脊髓延髓肌萎缩症(SBMA)、齿状核红核苍白球路易体萎缩症或脊髓小脑共济失调。

[0126] 79. 如第77项所述的方法,其中所述聚谷氨酰胺蛋白是亨廷顿蛋白(Htt<sub>p</sub>Q)蛋白质。

[0127] 80. 如第77项所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

[0128] 81. 如第77项所述的方法,其中所述受试者是人。

[0129] 82. 一种包含氨基酸序列的单链胞内抗体,其包含:可变重链互补决定区3(CDR3)

序列、可变轻链CDR3序列以及插入在所述可变重链CDR3序列与所述可变轻链CDR3序列之间的接头序列,其中所述可变重链CDR3序列包含SEQ ID NO:6,其中所述可变轻链CDR3序列包含SEQ ID NO:10,并且其中所述胞内抗体能够结合人Tau蛋白的蛋白质序列。

[0130] 83.如第82项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR序列包含WPGYRKA (SEQ ID NO:6)。

[0131] 84.如第82项所述的胞内抗体,其中所述可变轻链CDR序列包含SYCASKGHWL (SEQ ID NO:10)。

[0132] 85.如第82项所述的胞内抗体,其中所述可变重链CDR序列包含WPGYRKA (SEQ ID NO:6),并且其中所述可变轻链CDR序列包含SYCASKGHWL (SEQ ID NO:10)。

[0133] 86.如第82项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:1。

[0134] 87.如第82项所述的胞内抗体,其中所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1组成。

[0135] 88.如第82项所述的胞内抗体,其中所述胞内抗体结合所述Tau蛋白中的一个或多个表位。

[0136] 89.一种治疗或管理患有阿尔茨海默氏病或其他Tau病状的受试者的方法,所述方法包括向需要所述治疗或管理的受试者施用治疗有效量的如第82-88项中任一项所述的所述胞内抗体。

[0137] 90.如第89项所述的方法,其中所述胞内抗体防止Tau片段与引起神经元功能障碍的神经元的结合。

[0138] 附图的若干视图的简述

[0139] 根据以下说明和附图将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优点,在附图中:

[0140] 图(FIG.) 1a-1d示出选定胞内抗体与聚脯氨酸的结合。纵轴被表示为在A=404nm下的OD单位,并且横轴是纯化的胞内抗体的浓度(nM)。图1a示出对INT41 (SEQ ID NO:1)的结合。图1b示出对A2 (SEQ ID NO:2)的结合。图1c示出对E10 (SEQ ID NO:3)的结合。图1d示出对H8 (SEQ ID NO:4)的结合。INT41是最强结合物,从而示出在较高胞内抗体浓度下的较高光密度。

[0141] 图2示出使用LaserGene比对的选定scFv的序列以便确定关键和共有氨基酸。共有序列 (SEQ ID NO:5) 被示出与INT41 (SEQ ID NO:1)、A2 (SEQ ID NO:2)、E10 (SEQ ID NO:3) 和H8 (SEQ ID NO:4) 比对。

[0142] 图3示出图2中比对的胞内抗体序列的可变重链序列和可变轻链序列。

[0143] 图4示出INT41和类似的PRP特异性胞内抗体的流式细胞术图显示对HttpQ聚集的抑制(未转染的293T细胞(293T)的对照组;用非聚集HttpQ30-GFP (PQ30) 转染的293T细胞;用聚集HttpQ103-GFP (PQ103) 转染的293T细胞;以及用聚集HttpQ103-GFP (PQ103) 和胞内抗体 (INT41) 转染的293T细胞)。

[0144] 图5示出通过GFP荧光测量的针对所测试的组(对照、PQ30、PQ103、PQ103+Happ1t和PQ103+INT41)制成表格的流式细胞术数据。

[0145] 图6示出INT41对表现由HttpQ引起的过度表达的基因的表达的作用。

[0146] 图7示出INT41对由PQ103引起的基因的表达不足的作用。

[0147] 图8是重组腺相关病毒(rAAV)的构建的示意性图示,如由Chen, H. Mol Ther,

2008.16(5):924-311所描述。

[0148] 图9示出INT41对抑制毒性细胞核片段结合细胞核中的染色质的作用。INT41阻断全长Htt的细胞膜积聚并且阻断毒性Htt片段的染色质结合(以蛋白质印迹示出)。用N-末端片段的抗体探测印迹。

[0149] 图10示出转录调控CREB结合在HttQ73染色质/DNA部分中增加并且INT41减少CREB与染色质/DNA的结合。用抗CREB抗体(用AAV6模拟转导("M"))重新探测图9中所示的免疫印迹,但CREB与染色质/DNA的结合在用rAAV6-INT41转导细胞时减少(泳道标记为"41")。泳道包含来自细胞溶解产物的细胞质(Cyto)、细胞膜(Mem)、可溶性细胞核(Nsol)或染色质/DNA(Chro)的部分,所述细胞溶解产物来自用不含INT41(M)的AAV6或用rAAV6-INT41(41)转导的诱导PC12Q73细胞。

[0150] 图11示出INT41特异性Htt降解片段的亲和纯化。图11示出当来自HttQ73诱导的细胞的溶解产物(右侧柱)穿过固定的INT41亲和柱时,仅结合降解的Htt的较小片段(用兔抗N-末端Htt抗体探测的部分)并且未诱导的HttQ73细胞(左侧柱(第8、9、10、11天)未结合在相同印迹上探测的部分中的任何可检测的蛋白质。

[0151] 图12示出人Tau蛋白序列,包括9个剪接变体。INT41表位以粗体突出显示并且与外来体相关的肽以框描绘轮廓。

[0152] 图13A和13B示出4-12周龄的在用rAAV6-GFP、rAAV6-Happ1t、rAAV6-INT41或VEH(媒介物)处理之后的R6/2\_WT小鼠和R6/2\_Tg小鼠的平均体重( $\pm$ S.E.M.) (空心圆圈:R6/2WT对照中的媒介物;黑色正方形:R6/2Tg中的rAAV-GFP;灰色正方形:R6/2Tg中的rAAV-Happ1t;空心正方形:R6/2Tg中的rAAV-INT41)。

[0153] 图14示出测量放置在测试场中心中的动物的移动和行进的总距离以及移动速度的旷场测试的结果。在4、6、8和12周龄时对用rAAV6-GFP、rAAV6-Happ1t、rAAV6-INT41或媒介物(VEH)转染的R6/2\_Tg和WT小鼠的组进行测试。

[0154] 图15示出在4、6、8和12周龄时用rAAV6-GFP、rAAV6-Happ1t、rAAV6-INT41或媒介物转染的R6/2\_Tg和WT小鼠从中心测试(由在旷场的中心中行进的平均( $\pm$ S.E.M.)距离表示)行进的旷场距离的结果。

[0155] 图16示出用INT41、Happ1t、GFP或媒介物(对照)处理的小鼠中的未标准化的后肢握力。相较于VEH处理的R6/2\_WT小鼠示出rAAV6-INT41、rAAV6-Happ1t或rAAV6-GFP对R6/2\_Tg小鼠的后肢握力的作用。分别针对雌性(图11A)和雄性(图11B)呈现数据。

[0156] 图17示出雌性INT41处理的小鼠、Happ1t处理的小鼠、GFP处理的小鼠或对照媒介物处理的小鼠中的抱握反应。描绘每周呈现具有全肢抱握的小鼠的比例,如在5周龄时rAAV6-INT41、rAAV6-Happ1t、rAAV6-GFP或VEH的双侧纹状体输注之后从7-12周龄所评估。在4、5和6周龄时评定抱握。

[0157] 图18示出雄性INT41处理的小鼠、Happ1t处理的小鼠、GFP处理的小鼠或对照媒介物处理的小鼠中的抱握反应。描绘每周呈现具有全肢抱握的小鼠的比例,如在5周龄时rAAV6-INT41、rAAV6-Happ1t、rAAV6-GFP或VEH的双侧纹状体输注之后从7-12周龄所评估。在4、5和6周龄时评定抱握。

[0158] 图19示出T-迷宫认知测试的结果,所述T-迷宫认知测试测量雄性和雌性小鼠中实现任务获得的小鼠的比例(在9-10周时)。处理组包括用媒介物转染的R6/2\_野生型小鼠(n

=9)、用GFP转染的R6/2\_Tg小鼠(n=6)、用Happ1t转染的R6/2\_Tg小鼠(n=5)以及用INT41转染的R6/2\_Tg小鼠(n=8)。

[0159] 发明详述

[0160] 定义

[0161] 除非另外指明,否则权利要求书和说明书中使用的术语是如以下阐述所定义。

[0162] 术语“改善”是指疾病状态(例如,与亨廷顿氏病相关的疾病状态)的治疗中的任何治疗上有益的结果,包括预防所述疾病状态、减轻所述疾病状态的严重程度或进展、缓解或治愈所述疾病状态。

[0163] 术语“原位”是指在与活生物体分离生长(例如,在组织培养物中生长)的活细胞中发生的过程。

[0164] 术语“体内”是指在活生物体内发生的过程。

[0165] 如本文所用的术语“哺乳动物”包括人和非人并且包括但不限于人、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、鼠科动物、牛科动物、马科动物以及猪。

[0166] 在两个或更多个核酸或多肽序列的背景下,术语“同一性”百分比是指在进行比较和比对以获得最大对应性时,如使用以下所描述的序列比较算法中的一种(例如,技术人员可获得的BLASTP和BLASTN或其他算法)或通过目视检查所测量,两个或更多个序列或子序列具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基。取决于应用,“同一性”百分比可存在于所比较的序列的一个区内,例如功能结构域内;或者可替代地,存在于待比较的两个序列的全长内。

[0167] 对于序列比较,通常一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机中,指定子序列坐标(如果需要),并且指定序列算法的程序参数。序列比较算法随后基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0168] 可例如通过局部同源性算法(Smith&Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981))、同源性比对算法(Needleman&Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970))、相似性搜索方法(Pearson&Lipman,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA85:2444(1988))、这些算法的计算机实施(GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,Wis.)或者通过目视检查(参见Ausubel等,下文)来进行比较序列的最佳比对。

[0169] 适于确定序列同一性百分比和序列相似性百分比的算法的一个实例是BLAST算法,所述算法描述于Altschul等,J.Mol.Biol.215:403-410(1990)中。用于进行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(www.ncbi.nlm.nih.gov)公开获得。

[0170] 术语“足够量”意指足以产生所需作用的量,例如,足以调节细胞中的蛋白质聚集的量。

[0171] 术语“治疗有效量”是有效于改善疾病的症状的量。治疗有效量可以是“预防有效量”,因为预防可被认为是治疗。

[0172] 术语“药学上可接受的载体”是指用于施用治疗剂的载体。这类载体包括但不限于,盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇及其组合。所述术语明确排除细胞培养基。对于

口服施用的药物,药学上可接受的载体包括但不限于,药学上可接受的赋形剂,如惰性稀释剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂。适合的惰性稀释剂包括碳酸钠和碳酸钙、磷酸钠和磷酸钙以及乳糖,而玉米淀粉和海藻酸是适合的崩解剂。粘合剂可包括淀粉和明胶,而润滑剂(如果存在)一般将是硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。必要时,片剂可涂有如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯的材料,以延缓胃肠道吸收。

[0173] 必须注意的是,除非上下文另外明确规定,否则如说明书和所附权利要求中所用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述”包括复数指示物。

#### [0174] 胞内抗体

[0175] “胞内抗体”是指结合细胞内蛋白质的抗体。对胞内抗体进行修饰以保持在细胞内部且在细胞内部起作用(细胞内定位)。修饰的实例包括单链抗体(单链可变片段,或scFv),免疫球蛋白可变轻链(VL)或重链(VH)结构域的修饰以获得超稳定性,或选择对更还原的细胞内环境具有抗性的抗体。胞内抗体包含可变重链序列、接头序列和可变轻链序列。

[0176] “单链可变片段”(scFv)是用短接头肽连接的免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)的可变区的融合蛋白。接头肽的长度可以是约10至25个氨基酸。虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由单独基因编码,但是它们可使用重组方法通过合成接头来连接,所述合成接头使它们能够被制备为单一蛋白链,其中VL区和VH区配对以形成单价分子。参见例如,Bird等, *Science* 242:423-426,1988;和Huston等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883,1988。所述接头通常富含甘氨酸以获得柔性,以及丝氨酸或苏胺酸以获得可溶性,并且可连接VH的N末端与VL的C末端,或反之亦然。尽管除去恒定区且引入接头,这种蛋白质仍保留原始免疫球蛋白的特异性。在一些实施方案中,scFv选自随机产生的scFv蛋白的大文库且未工程化。单链可变片段缺乏在完整抗体分子中发现的恒定Fc区和用于纯化蛋白质的常见结合位点。单链可变片段可在细菌细胞培养物如大肠杆菌中产生。scFv可使用传统色谱法纯化或使用蛋白质L(其与 $\kappa$ 轻链的可变区相互作用)通过结合固定来纯化。scFv还可通过在scFv分子的C末端并入的六组氨酸标签或在scFv分子的C或N末端并入的Strep II标签来纯化。

#### [0177] 本发明的方法

[0178] 标准技术可用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术可根据制造商的说明书或如本领域中通常所完成或如本文所述来执行。前述技术和工序通常可根据本领域中熟知的常规方法且如本说明书通篇所引用和论述的各种一般性和更具体的参考文献中所述来执行。参见例如,Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), 其出于任何目的以引用的方式并入本文。除非提供特定定义,否则结合本文所述的分析化学、合成有机化学和医学以及药物化学使用的命名法以及本文所述的分析化学、合成有机化学和医学以及药物化学的实验室工序和技术是本领域中熟知的且通常使用的那些。标准技术可用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

#### [0179] 产生肽序列

[0180] 可使用本领域中已知的各种各样的技术来合成或产生肽序列。可根据常规技术将肽合成为溶液或固相支持体上的肽。各种自动合成仪是可商购的且可根据已知的方案使用。参见Stewart和Young(上文); Tam等, *J Am Chem Soc*, 105:6442, (1983); Merrifield,



Science 232:341-347(1986);Barany和Merrifield,The Peptides,Gross和Meienhofer编辑,Academic Press,New York,1-284;Barany等,Int J Pep Protein Res,30:705-739(1987)。

[0181] 固相肽合成方法可使用含有0.1-1.0mM胺/g聚合物的共聚(苯乙烯-二乙烯基苯)。用于肽合成的这些方法使用 $\alpha$ -氨基的丁氧基羰基(t-BOC)或9-芴基甲基氧基-羰基(FMOC)保护。两种方法涉及逐步合成,由此从所述肽的C末端开始在每个步骤添加单个氨基酸。Coligan等,Curr Prot Immunol,Wiley Interscience,1991,Unit 9。在化学合成完成后,可使合成肽脱保护以除去t-BOC或FMOC氨基酸封闭基团且通过在降低的温度下用酸处理来从聚合物裂解(例如,在0°C下液态HF-10%苯甲醚持续约0.25至约1小时)。在蒸发试剂之后,用1%乙酸溶液从聚合物萃取肽,随后冻干以产生粗材料。这通常可通过如使用5%乙酸作为溶剂在Sephadex G-15上凝胶过滤的这类技术来纯化。柱的适当级分的冻干将产生均匀的肽或肽衍生物,所述肽或肽衍生物随后可通过如氨基酸分析、薄层色谱法、高效液相色谱法、紫外吸收光谱、摩尔旋光、溶解度的这类标准技术表征,并且通过固相埃德曼降解来定量。

[0182] 在其他实施方案中,噬菌体展示技术可用于鉴别肽。可(使用例如 $\lambda$ 噬菌体)制备噬菌体文库,从而展示氨基酸残基的插入物。所述插入物可表示例如完全简并或偏倚性阵列。可选择结合所需抗原的携带噬菌体的插入物,并且这一过程在重新选择结合所需抗原的噬菌体的若干循环内重复。可进行DNA测序以鉴别所表达的肽的序列。可以这种方式确定结合所需抗原的所述序列的最小线性部分。可使用含有包含部分或所有最小线性部分加其上游或下游的一个或多个另外简并残基的插入物的偏倚性文库来重复所述工序。

[0183] 在另一个实施方案中,包括膜锚定展示靶标捕获(MAD-Trap)和功能配体诱导的靶标捕获(FLI-Trap)的ProCode技术可用于选择结合scFv肽。参见PCT/US2011/028977和PCT/US2006/032810,其各自以引用的方式整体并入。

[0184] 这些技术可用于制备聚脯氨酸肽序列,如本文所述的那些:(i)由Southwell使用的富含脯氨酸的肽[7,8](PQLPQPPPQAQP)(SEQ ID NO:17)和(ii)羧基源性的亨廷顿氏肽(PGPAVAEEPLHRPG)(SEQ ID NO:18)。

#### [0185] 载体

[0186] 重组病毒载体:可在本文所述的方法中使用能够接受待表达的核酸分子的编码序列的病毒载体。例如,可使用源自腺病毒(AV);腺相关病毒(AAV);逆转录病毒(例如,慢病毒(LV)、弹状病毒、鼠白血病病毒);疱疹病毒等的载体。

[0187] 选择适合用于本发明的重组病毒载体、用于将用以表达胞内抗体序列的核酸序列插入载体中的方法以及将病毒载体递送至目标细胞的方法在本领域的技术内。参见Dornburg R(1995),Gene Therap.2:301-310;Eglitis M A(1988),Biotechniques 6:608-614;Miller A D(1990),Hum Gene Therap.1:5-14;Anderson W F(1998),Nature 392:25-30;以及Rubinson D A等,Nat.Genet.33:401-406。

[0188] 病毒载体可包括源自AV和AAV的那些。用于表达本发明的胞内抗体序列的适合AAV载体、用于构建重组AV载体的方法以及用于将所述载体递送至靶细胞中的方法描述于Samulski R等(1987),J.Virol.61:3096-3101;Fisher K J等(1996),J.Virol,70:520-532;Samulski R等(1989),J.Virol.63:3822-3826;美国专利号5,252,479;美国专利号5,

139,941;国际专利申请号WO 94/13788;以及国际专利申请号WO 93/24641中,其全部公开内容以引用的方式并入本文。

#### [0189] 胞内抗体产生和选择

[0190] 在一些实施方案中,产生特异性地抑制细胞内Htt pQ蛋白或包含聚Q序列的蛋白质的胞内抗体。可产生结合富含脯氨酸的肽或源自亨廷顿蛋白的肽序列的胞内抗体。在其他实施方案中,可选择胞内抗体以结合任何生物体的细胞内蛋白。值得注意的是,由于功能性蛋白质、酶、蛋白质-蛋白质相互作用以及信号转导途径的进化保守性程度,虽然所述胞内抗体将优选地对细胞中的蛋白质具有特异性,但也可预期所述胞内抗体将抑制相关物种中的同源蛋白质。

[0191] 当在细胞质中表达时scFv通常表现出较差稳定性和可溶性。已经开发技术来克服与胞内抗体的稳定表达相关的这些困难。一些策略是如下:通过突变硫氧还蛋白和谷氧还蛋白途径的组分来修饰宿主菌株的细胞质氧化还原电位;进行多轮突变和选择以鉴别在细胞内区室中有效折叠的scFv序列;以及使用与大肠杆菌麦芽糖结合蛋白的成熟部分的C末端融合以稳定化在细菌和哺乳动物细胞质中表达的scFv。在另一个实施方案中,可使用修饰的酵母2-杂合体方法,其中可选择的标记物与靶scFv融合作为可溶性的抗原独立性报道基因。

[0192] 在一个实施方案中,Fisher等的选择测定用于基于细菌双精氨酸易位(Tat)途径的内在蛋白质折叠质量控制机制来工程化胞内抗体。参见Fisher等.Efficient isolation of soluble intracellular single-chain antibodies using the twin-arginine translocation machinery(Fisher等,J Mol Biol,2009.385(1):p.299-311)。选择测定采用目标蛋白质(POI)与N末端Tat特异性信号肽(ssTorA)和C末端TEM1 $\beta$ -内酰胺酶(Bla)的三重夹心融合,从而使抗生素抗性与Tat途径输出偶联。所述测定适于开发在Tat输出测定之后的胞内抗体选择(ISELATE),其是用于容易鉴别可溶性增强的scFv序列的高通量选择策略。所述方法意指改进通过Tat途径增强的输出中的底物可溶性、折叠速率以及表面亲水性结果。ISELATE提供一种选择具有极大增强的Tat输出效率的克隆的方法。

[0193] 可如Fisher等中所描述使用随机化scFv13变体的合成文库。可通过随机化文库寡核苷酸DNA来将氨基酸多样性引入scFvT3的CDR3H链和CDR3L链中。可使用PCR引物扩增合成文库。可将合成文库克隆至细胞(如PC314)中以消除scFv截短变体和未表达的变体。可汇集表达scFv的细胞,并且将文库克隆至载体中(例如,pSALect展示载体(NdeI/NotI))。

[0194] 在一些实施方案中,产生展示scFv文库的原生质球。例如,可使用表达scFv文库的野生型大肠杆菌细胞且使其生长。可诱导从质粒表达scFv。例如,可用异丙基 $\beta$ -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷诱导来自基于pSALect的质粒的scFv。使原生质球在培养物中生长且收集原生质球。

[0195] 在一个实施方案中,然后对产生的scFv文库进行分析以选择结合生物素化的肽(例如,生物素化的亨廷顿肽)的阳性转化体。在一个实施方案中,可使用磁珠且与原生质球scFv文库和亨廷顿肽一起孵育。选择阳性转化体以用于涂铺且使其生长。

[0196] 本发明提供具有已通过直接突变或亲和力成熟方法改进的结合特征的胞内抗体。随机诱变可用于将突变引入胞内抗体的编码序列中。可使用PCR引物根据制造商的方案使用GeneMorph II随机诱变试剂盒(Stratagene)通过易错PCR来将具有低突变频率的随机突

变引入胞内抗体的编码序列中。在其他实施方案中,用于修饰或增加由两个可变结构域组成的抗体结合位点的亲和力和特异性的方法可应用于胞内抗体(参见例如,Yang等,J.Mol Biol.254:392-403(1995))。例如,可使用噬菌体展示针对所需结合特征容易地筛选已引入多样性的文库结合结构域。或者,可采用酵母表面展示。可通过突变CDR残基并且针对所需特征进行筛选来修饰或改进胞内抗体。在另一个实施方案中,将单独氨基酸残基或残基的组合随机化以使得在特定位置处发现另外相同的抗原结合位点的群体,二至二十个氨基酸的亚群。或者,可通过易错PCR方法在一定范围的残基内诱导突变(参见例如,Hawkins等,J.Mol Biol.226:889-96(1992))。在另一个实例中,可在大肠杆菌的突变菌株中繁殖含有重链或轻链可变区基因的噬菌体展示载体(参见例如,Low等,J.Mol.Biol.250:359-68(1996))。这些诱变方法是本领域的技术人员已知的许多方法的说明。

#### [0197] 结合测定

[0198] 可使用各种结合测定来测试胞内抗体与聚脯氨酸肽序列或聚谷氨酸蛋白的结合。例如,可进行ELISA测定来测定分离的scFv克隆针对生物素化的亨廷顿肽的结合活性。

[0199] 酶联免疫吸附测定(ELISA)或酶免疫测定(EIA)是使用抗体和颜色变化来鉴别物质的测试。ELISA是被设计用于检测和定量物质(如肽、蛋白质、抗体和激素)的基于板的测定。在ELISA中,抗原必须被固定至固体表面并且然后与连接至酶的抗体复合。通过经由与底物孵育以产生可测量的产物评定缀合酶活性来完成检测。检测策略的最关键要素是高度特异性抗体-抗原相互作用。ELISA通常在96孔(或384孔)聚苯乙烯板中进行,所述板将被动结合抗体和蛋白质。

[0200] 本领域中已知的各种其他肽结合测定可用于测试胞内抗体与目标肽序列或蛋白质的结合。

#### [0201] 本发明的药物组合物

[0202] 本发明还涵盖用于治疗聚Q疾病如亨廷顿氏病的方法。本发明的所述方法包括施用治疗有效量的胞内抗体,如INT41。本发明的胞内抗体可配制在药物组合物中。除了一种或多种胞内抗体之外,这些组合物还可包含药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域的技术人员熟知的其他材料。这类材料应是无毒的并且不应干扰活性成分的功效。所述载体或其他材料的确切性质可取决于施用途径,例如口服、静脉内、经皮或皮下、经鼻、肌内、腹膜内途径。

[0203] 用于口服施用的药物组合物可以是片剂、胶囊、粉末或液体形式。片剂可包含固体载体如明胶或佐剂。液体药物组合物通常包含液体载体,如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油。可包含生理盐水溶液、葡萄糖或其他糖溶液或二醇,如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。

[0204] 对于静脉内、经皮或皮下注射或在病痛部位处注射,活性成分将呈胃肠外可接受的水溶液的形式,所述水溶液是不含热原的且具有适合的pH、等渗性和稳定性。本领域的相关技术人员能够使用例如等渗媒介物(如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液)来制备适合的溶液。可根据需要包含防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0205] 无论是待给予至个体的根据本发明的胞内抗体、肽还是其他药学上有用的化合物,施用优选地以“治疗有效量”或“预防有效量”(视情况而定,但是预防可被认为是治疗),

这足以显示对所述个体的益处。所施用的实际量和施用速率和时程将取决于所治疗的蛋白质聚集疾病的性质和严重程度。治疗处方(例如剂量决定等)在全科医师和其他医师的责任范围内,并且通常考虑待治疗的病症、个体患者的状况、递送部位、施用方法以及执业医师已知的其他因素。以上提及的技术和方案的实例可在Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol, A. (编辑),1980中找到。

[0206] 组合物可单独施用或与其他治疗组合,取决于待治疗的病状同时抑或顺序地施用。在一些实施方案中,通过双侧纹状体内注射来在动物中施用所述组合物。可使用对流增强递送来在人中施用所述组合物(Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain.R H Bobo等,PNAS 1994第91卷第6期第2076-2080页和Convection-Enhanced Delivery of AAV Vector in Parkinsonian Monkeys;In Vivo Detection of Gene Expression and Restoration of Dopaminergic Function Using Pro-drug Approach,KS Bankiewicz等Experimental Neurology 164,2-14(2000))。

[0207] 使用胞内抗体防止细胞中的聚谷氨酸蛋白的聚集的方法

[0208] 提供防止细胞中的聚谷氨酰胺(聚Q)蛋白的聚集的方法。所述方法包括将本文所述的胞内抗体(如INT41、A2、H8或E10)引入所述细胞中。在一些实施方案中,将所述胞内抗体引入细胞中可通过转染来进行。将所述细胞维持足以使所述胞内抗体结合聚Q蛋白的一段时间,从而防止所述细胞中的聚Q蛋白的聚集。

[0209] 还提供预防由细胞中的聚谷氨酰胺(聚Q)蛋白的聚集引起的基因失调的方法。所述方法包括将本文所述的胞内抗体引入所述细胞中并且将所述细胞维持足以使所述胞内抗体结合聚Q蛋白的一段时间,从而预防所述细胞中的一种或多种基因的基因失调。靶向预防失调的示例性基因在2013年8月28日提交的美国临时申请61/871,288的表8中列出,所述申请以引用的方式整体并入。在一些实施方案中,所述聚Q蛋白是亨廷顿蛋白(Htt<sub>p</sub>Q)蛋白质。

[0210] 治疗由聚谷氨酸蛋白的聚集引起的疾病的方法

[0211] 在一个方面,本发明具体地涉及使用胞内抗体或由其制备的药物组合物用于治疗或预防与聚谷氨酸相关疾病(如亨廷顿氏病)相关的认知或行为病状。根据本发明的胞内抗体或由其制备的药物组合物可增强生命质量,特别是正针对亨廷顿氏病进行治疗的患者的生命质量。

[0212] 本发明此外还涉及将其他药物和/或其他治疗方法、例如与已知的药物和/或已知的治疗方法(例如像当前用于治疗亨廷顿氏病的那些药物和/或治疗方法)与胞内抗体或其药物组合物组合使用用于治疗亨廷顿氏病。例如,胞内抗体或其药物组合物的使用可与减轻运动和精神病症的症状的常规药剂和治疗(例如, **Xenazine®**,其提供舞蹈班的暂时缓解)组合。

## 实施例

[0213] 以下是用于实行本发明的具体实施方案的实施例。所述实施例仅用于示例性目的,并且不意图以任何方式限制本发明的范围。关于所使用的数字(例如,用量、温度等),已尽力确保精确度,但是当然应该允许一些实验误差和偏差。

[0214] 除非另外指示,否则本发明的实践采用蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药

理学的常规方法,所述方法处于本领域的技能之内。所述技术在文献中充分地阐释。参见例如,T.E.Creighton,Proteins:Structures and Molecular Properties(W.H.Freeman and Company,1993);A.L.Lehninger,Biochemistry(Worth Publishers,Inc.,current addition);Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,1989);Methods In Enzymology(S.Colowick和N.Kaplan编辑,Academic Press,Inc.);Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版(Easton,Pennsylvania:Mack Publishing Company,1990);Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry第3版(Plenum Press)A卷和B卷(1992)。

[0215] 实施例1:新颖胞内抗体的鉴别

[0216] 通过在胞内抗体互补决定区(CDR)中使用丙氨酸置换策略以鉴别关键氨基酸和随后诱变以用于亲和力成熟来设计新颖候选物。包括膜锚定展示靶标捕获(MAD-Trap)和功能配体诱导的靶标捕获(FLI-Trap)的ProCode技术是用于选择结合scFv肽的方法。参见PCT/US2011/028977和PCT/US2006/032810,其公开内容以引用的方式整体并入。

[0217] 已知的胞内抗体如Happ1和Happ1t在溶解度方面具有困难且因此不能有效地用于治疗剂或治疗中。通过诱变增强溶解度的努力对Happ1和Happ1t是不成功的。使用由Patterson等[12-15]描述的富含脯氨酸的肽作为结合物的捕获源、接着ELISA结合测定以初始表征结合物来开发新的胞内抗体。INT41和类似的胞内抗体是使用最初在康奈尔大学(Cornell University)的DeLisa实验室开发的技术从scFv序列的天然文库开发的[16-19]。然后在由Caltech组使用的许多基于相同细胞的模型和动物模型中测试结合物,其中Happ1作为阳性对照。在由PsychoGenics(亨廷顿氏的动物模型测试的重要供应商)进行的动物研究中,INT41被发现在其在多个运动功能和认知测试中显示改进的能力方面优于Happ1t。病理结果证明INT41减少小聚集体的形成,而Happ1t增加聚集,从而表明Happ1t的有限溶解度可能在疾病进展中的一些点处促成病理。以下提供用于鉴别INT41和选定胞内抗体的示例性方法。

[0218] 肽合成:

[0219] 通过定制肽合成服务(Biomatic,Delaware)来合成肽。使用以下肽:(i)由Southwell使用的富含脯氨酸的肽[13,14](PQLPQPPPQAQP,SEQ ID NO:17)和(ii)羧基源性的亨廷顿氏肽(PGPAVAEEPLHRPG,SEQ ID NO:18)。产生具有羧基末端生物素的肽以有助于在涂覆Streptavidin的珠粒和ELISA板上选择。

[0220] scFv文库(T3)构建

[0221] 合成文库设计是基于T3框架[16]。通过随机化文库寡核苷酸DNA来将氨基酸多样性引入scFvT3的CDR3H链和CDR3L链中。CDR3H被工程化为具有产生7、10或13个氨基酸的NNK长度。CDR3L被工程化为具有5、8或10个氨基酸的NNK长度。所述文库(GeneArt)包含 $1.54 \times 10^{11}$ 个分子。

[0222] 使用以下列出的PCR引物来扩增合成文库:

引物	序列(5'-3')
[0223] PC147	GACCATGATTACGCCAAGCTTGGCTAGCCATATGTCTAGAATGGCAGAA GTTTCAGCTGGT (SEQ ID NO:19)
PC148	ATCCAGTGATTTTTTCTCGTCGACCTCGAGTGCGGCCGCACCCAGA GACTGCCAGTTTGG (SEQ ID NO:20)

[0224] 将合成文库克隆至PC314(Xba1/Not1)中以消除scFv截短变体和未表达的变体。汇集表达scFv的细胞,并且将文库克隆至pSALect展示载体(NdeI/NotI)中。

#### [0225] 原生质球的制备

[0226] 将野生型大肠杆菌(Lucigen E.cloni 10G)和表达T3组合scFv文库的大肠杆菌细胞在37°C下在含有氯霉素(20µg/mL)的25ml LB培养基中生长1.5小时。用异丙基β-D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG,1.0mM)诱导来自基于pSALect的质粒的scFv的表达。在孵育之后,将细胞细颈瓶转移至室温过夜生长。测量每种培养物的OD600并且将对应于 $1 \times 10^{10}$ 个细胞的体积添加至1.5ml微量离心管。将细胞沉淀用500µL的冰冷分级分离缓冲液(0.1M Tris、0.75M蔗糖、缓冲剂pH 8.0)轻轻洗涤并且重新悬浮于350µl的补充有溶菌酶(1mg/mL)的冰冷分级分离缓冲液中。将细胞缓慢涡旋,逐滴添加700µL的EDTA(1mM,pH 8.0),并且将管在室温下孵育20分钟。在添加50µl的冷MgCl(0.5M)之后,将管在冰上孵育10分钟,且然后在4°C下离心沉淀(6000rpm)10分钟。小心除去上清液,且将原生质球重新悬浮于1mL的冰冷PBS中。

#### [0227] 淘选T3 scFv文库

[0228] 在一个实施例中,对产生的scFV文库进行分析以选择结合生物素化的亨廷顿肽的阳性转化体。将Pierce链霉亲和素磁珠(25µl,Thermo Scientific)用磷酸盐缓冲盐水洗涤并且与70µl的大肠杆菌野生型原生质球混合以使T3scFv文库的非特异性结合最小化。添加磷酸盐缓冲盐水(930µl)以使微量离心管中的体积达到1ml。将所述珠粒在4°C下在振荡下孵育过夜。将原生质球T3 scFv文库(130µl)与生物素化的亨廷顿肽(RPQLPQPPPQAQPRGGGSK;SEQ ID NO:25)在4.5µM、45µM和100µM的浓度下混合。用PBS使每个微量离心管中的体积达到1ml。将T3原生质球scFv文库与亨廷顿肽在4°C下在振荡下孵育过夜(原生质球:Ag复合物)。在4°C下孵育过夜之后,将所述磁珠捕获、用1ml PBS洗涤并且与原生质球:Ag复合物混合。将所述混合物在4°C下孵育另外30分钟。用磁力捕获Ag:原生质球复合物,用含有300mM NaCl和0.015%Tween的磷酸盐缓冲盐水洗涤并且重新悬浮于50µl洗脱缓冲液(Quiagen)中。将样品在95°C下煮沸5分钟,冷却至4°C且随后用H2O透析30分钟。将100ng的DNA转化至大肠杆菌10G电感受态细胞(Lucigen)中以用于扩增。将培养物在37°C下在振荡下孵育1小时。通过涂铺在含有氯霉素的LB琼脂上且在37°C下生长过夜来选择阳性转化体。

#### [0229] 随机诱变

[0230] 随机诱变用于将突变引入胞内抗体的编码序列中。使用PCR引物根据制造商的方案使用GeneMorph II随机诱变试剂盒(Stratagene)通过易错PCR来将具有低突变频率的随机突变引入胞内抗体的编码序列中:

引物	序列(5'-3')
[0231] PC147	GACCATGATTACGCCAAGCTTGGCTAGCCATATGTCTAGAATGGCAGAAG TTCAGCTGGT (SEQ ID NO:19)
PC148	ATCCAGTGATTTTTTCTCGTTCGACCTCGAGTGC GGCCGCACCCAGAACTG CCAGTTTGG (SEQ ID NO:20)

[0232] 选择PCR条件以获得1-5个突变/1000碱基对的突变率。4种PCR混合物各自由50µL总体积中的5µL的10X Mutazyme II反应缓冲液、1µL的40mM诱变dNTP混合物(200µM每种最终)、0.5µL的正向和反向引物主混合物(250ng/µl的每种引物)、1µL的Mutazyme II DNA聚

合酶(2.5U/ $\mu$ L)以及0.7ng的胞内抗体模板组成。将扩增的DNA使用QIAquick PCR纯化试剂盒进行纯化。然后将纯化的产物用限制酶NotI和NdeI消化且克隆至质粒载体pSALect中。通过将T4 DNA连接酶添加至PCR产物和pSALect载体持续1小时来实现连接。将重组质粒各自转化至大肠杆菌10G电感受态细胞(Lucigen)中以用于扩增。将培养物在37°C下在振荡下孵育1小时。通过涂铺在含有氯霉素的LB琼脂上且在37°C下生长过夜来选择阳性转化体。第二天,将5ml LB培养基添加至各板,将细胞刮下,并且汇集胞内抗体诱变克隆。

#### [0233] 克隆

[0234] 小量制备通过ELISA(终点稀释)筛选的阳性命中物,并且用NotI/NdeI切割质粒DNA。将约0.75-kb NotI/NdeI DNA片段克隆至pET 24a的多个克隆位点中,从而产生C末端Strep-标签融合构建体。随后将重组载体转化至BL21(DE3)细胞中以用于蛋白质表达分析。对于基于细胞的测定,小量制备通过ELISA筛选的阳性命中物并且质粒DNA用作PCR反应中的模板。PCR引物PC147(5'-GACCATGATTACGCCAAGCTTGGCTAGCCATATGTCTAGAATGGCAGAA GTTCAGCTGGT-3')(SEQ ID NO:19)和PC148(ATCCAGTGATTTTTTCTCGTCGACCTCGAGTGGCCG CACCCAGAAC TGCCAGTTGG)(SEQ ID NO:20)用于扩增反应中。将约0.75-kb DNA片段使用QIAquick PCR纯化试剂盒进行纯化,用NheI和XhoI切割并且连接至pOptiVEC的多个克隆位点中。pOptiVEC还用于scFv的所有基于细胞的表达,所述scFv是从pSALect PCR扩增的且在NheI和XhoI位点处连接至pOptiVEC中。

#### [0235] ELISA

[0236] 进行ELISA以测定分离的scFv克隆针对指定为Happ(+)(RPQLPQPPPQAQPRGGGSK-生物素(SEQ ID NO:26)的生物素化的亨廷顿肽和指定为Happ(-)(PGPAVAEEPLHRPG-生物素(SEQ ID NO:28)的第二生物素化的亨廷顿肽的结合活性。除了抗原涂覆,所有孵育都在室温下进行。将微量滴定板(Nuc)涂覆100 $\mu$ l的生物素化的亨廷顿肽溶液(2 $\mu$ g/ml于50mM NaHCO<sub>3</sub>缓冲液中,pH 9.6)且在4°C下孵育过夜。将板用200 $\mu$ l的1x TBS(50mM Tris-Cl、150mM NaCl pH 8.0)洗涤3次,并且用100 $\mu$ l的于TBS中的2%牛奶封闭2小时。将板用200 $\mu$ l的1x TBS洗涤一次。在一些实验中,预封闭的Streptavidin涂覆的板(Pierce)用于结合生物素化的肽。将细胞提取物(50 $\mu$ l)或纯化的StrepII标记的胞内抗体添加至涂覆抗原的封闭板且孵育1.5小时。来自通过在与IPTG孵育过夜之后淘洗选择的单独克隆的大肠杆菌培养物的提取物通过如制造商所描述在B-Per(Pierce)中溶解来制备且在10,000X g下离心10分钟以除去细胞壁和碎片。来自这些提取物的上清液直接使用或在使用之前用TBS稀释(1:2,1:4)。将板用200 $\mu$ l的1x TBST(50mM Tris-Cl、150mM NaCl、Tween 20pH 8.0)洗涤5次。接着,添加100 $\mu$ l的辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗FLAG标记的(Sigma)抗体且孵育1.5小时。将板用200 $\mu$ l的1x TBST洗涤5次且用200 $\mu$ l的1x TBS洗涤1次。在洗涤之后,添加100 $\mu$ l的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)。在适当时间之后通过添加100 $\mu$ l的2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>来终止过氧化物酶反应。在分光光度计上在405nm下测量光密度(OD)且测定scFv结合的水平。

#### [0237] 基于细胞的表达

[0238] 用于转染和punta形成的条件首先通过运行基质来优化,从而改变Htt-exon-1-GFP和胞内抗体的载体和细胞浓度。在DMEM+10%胎牛血清中培养293T细胞。在转染前一天,将1.2x 10<sup>5</sup>个细胞在无抗生素的情况下涂铺于24孔板中的500 $\mu$ L生长培养基中使得细胞在转染时间时将是约60%汇合。所使用的转染培养基是Opti-MEM并且Lipofactamine2000

(Invitrogen) 用于将DNA引入细胞中。为了通过流式细胞术分析,通过用0.05%胰蛋白酶/EDTA处理、接着稀释至10%血清中的Opti-MEM中且然后通过离心3次在相同培养基中洗涤来释放细胞。

[0239] 对于每种转染样品,进行以下步骤:

[0240] a. 在50 $\mu$ L的Opti-MEM中用/不用0.8 $\mu$ g scFv DNA稀释0.2 $\mu$ g pQ103DNA,轻轻混合。

[0241] b. 将2 $\mu$ l Lipofectamine混合在50 $\mu$ L的Opti-MEM中,轻轻混合。

[0242] c. 在室温下孵育5分钟,将DNA与Lipofectamine组合。在室温下轻轻混合物且孵育另外20-30分钟。

[0243] d. 将DNA/Lipofectamine复合物添加至293T细胞,轻轻混合且在37 $^{\circ}$ C下孵育约40小时。(在37 $^{\circ}$ C下孵育16小时之后可将培养物移至32 $^{\circ}$ C以减缓生长且维持单层)。

[0244] 在转染后24-40小时收获293T细胞之后,通过显微镜和/或流式细胞术(Coulter Epics Analyzer)进行GFP punta的计数。

[0245] 组织病理学

[0246] 来自如上R6/2小鼠的脑如下所述在12周时进行。

[0247] 灌注方法:使用戊巴比妥钠腹膜内(100mg/kg BW)麻醉动物。接下来,使用蠕动泵穿心灌注小鼠且在冰上用0.1M PBS(pH=7.4)中的4%多聚甲醛(PFA)灌注。然后从颅骨除去脑且在4 $^{\circ}$ C下后固定过夜。然后将脑在4 $^{\circ}$ C下储存于含有0.01%叠氮化钠的0.1M PBS中直到装运至神经科学学会(NeuroScience Associates)时。

[0248] 使用MultiBrain<sup>®</sup>技术由神经科学学会(Knoxville, TN)制备切片。每块一起包埋二十五(25)个小鼠脑,穿过整个小鼠脑在冠状面中在35 $\mu$ m下冷冻切片(约12mm长度)。将所有切割切片收集至抗原保存溶液中。用EM-48单克隆抗体进行免疫组织化学以在210 $\mu$ m间隔下揭示每六个切片的HTT聚集体,从而产生约57个载玻片/块(约57个染色载玻片/小鼠脑,总计约2850个染色切片)。

[0249] 实施例2:INT41胞内抗体的鉴别

[0250] 使用聚脯氨酸肽PRP使用如所描述的MAB-Trap[18]来选择胞内抗体。

[0251] 在初始轮选择之后,在与原生质球孵育之后如所描述在涂覆Streptavidin的珠粒上选择scFv,使用在4.5 $\mu$ M、45 $\mu$ M、100 $\mu$ M的生物素化肽下在40 $^{\circ}$ C下过夜的两轮选择。然后使四个阳性命中物经受随机PCR诱变。在使用0.5 $\mu$ M生物素化的肽在40 $^{\circ}$ C下持续1小时的另一轮选择和富集之后,基于ELISA结果选择了一组最终四种scFv(INT41(SEQ ID NO:1)、A2(SEQ ID NO:2)、E10(SEQ ID NO:3)和H8(SEQ ID NO:4))。

[0252] 将一组最终选择的scFv用3' (羧基末端)StreptII标签PCR克隆至pET24载体中且转化至大肠杆菌中。在抗生素上选择大肠杆菌克隆,测序以验证插入物,并且制备达1L培养物且在大约0.2OD<sub>600</sub>下用IPTG诱导并且继续在振荡培养物(300rpm)中过夜,之后在10-2000<sub>600</sub>下收获。将沉淀的细胞在10-20X体积稀释至TBS 5mM EDTA之后微射流化(M110Y, Microfluidics Corporation),之后通过离心在10,000x G澄清,然后在Streptactin琼脂糖凝胶高效柱(GE Life Sciences)上纯化。如由制造商所描述洗涤和洗脱柱。

[0253] 将纯化的scFv用生物素化的PRP(RPQLPQPPPQAQPRGGGSK-生物素;SEQ ID NO:26)和源自亨廷顿蛋白的下游序列的第二生物素化的富含脯氨酸的肽(PGPAVAEEPLHRPG-生物素;SEQ ID NO:28)通过ELISA进行筛选。Happ(+)是肽序列PQLPQPPPQAQP(SEQ ID NO:17)。



Happ(-) 是肽序列PGPAVAEEPLHRP (SEQ ID NO:18)。Happ(+) 和Happ(-) 源自亨廷顿蛋白外显子1蛋白质序列。亨廷顿蛋白外显子1蛋白包括以下序列:N末端区 (MATLEKLMKAFESLKSFQQQQ (Q)<sub>n</sub>) (SEQ ID NO:29)、聚脯氨酸区 (PPPPPPPPPPQLPQPPPQAQPLLPQPQ (下划线是Happ(+)) (SEQ ID NO:30) 以及C末端富含P的区 (PPPPPPPPPPGPABAEELHRPK (下划线是Happ(-)) ;SEQ ID NO:31)。Happ(+) 和Happ(-) 肽用于胞内抗体INT41、A2、H8和E10的ELISA结合测定中。

[0254] 两种聚脯氨酸肽均由所有scFv (包括Happ1t scFv) 特异性地且同样地识别[13-15], 从而表明特异性在于共同识别将结构破坏引入由任何单个氨基酸分离的序列的主要脯氨酸序列PGP (Happ(-)) 或PQP (Happ(+)) [20]。此PXP序列是富含脯氨酸的区的共同识别元件, 其在细胞内信号传导中起显著作用[21]。Happ1t蛋白主要在包涵体中发现, 但重折叠是不成功的并且它仅可以溶解产物形式测定, 其中可维持足够溶解度。

[0255] 在图1a-1d中, 示出选定胞内抗体与聚脯氨酸肽的结合。纵轴被表示为在A=404nm下的OD单位, 并且横轴是纯化的胞内抗体的浓度 (nM)。图1a示出对INT41 (SEQ ID NO:1) 的结合。图1b示出对A2 (SEQ ID NO:2) 的结合。图1c示出对E10 (SEQ ID NO:3) 的结合。图1d示出对H8 (SEQ ID NO:4) 的结合。INT41是最强结合物, 从而示出在较高胞内抗体浓度下的较高光密度单位。

[0256] 虽然在纯化时H8在结合方面仅是弱阳性的, 但它展示当以溶解产物形式测定时的信号的三倍, 即使它以与INT41大约相同的水平表达。纯化形式的H8回收是相对低的。H8可能是在纯化形式下不稳定的并且可能聚集, 从而产生较低信号。这可解释其在基于细胞的测定中阻断的能力, 其中所测试的所有胞内抗体的细胞内浓度是可比较的。

[0257] 将选定胞内抗体进行测序且在表1中示出。

[0258] 表1.

SEQ ID NO	序列	名称
1	MAEVQLVVS GGGLVKPGGSMILSCAASGFTFSNYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSEYIYYADFKGRFTISRDNKNSLYLQMDSLRAEDTAVY YCAWPGYRKA WGRGTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPASVS GSPGQSITISCAGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYEDSKRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSY CASKGHWLFGGGTKLA VLGAAAEQKLIS	INT41
2	MAEVQLVVS GGGLVKPGGSMILSCAASGFTFSNYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSEYIYYADFKGRFTISRDNKNSLYLQMDSLRAEDTAVY YCAHW PRLWRPFLWGRGTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPA SVSGSPGQSITISCAGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYEDSKRP SGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCVLNMHWANFGGGTKL AVLGAAAEQKLIS	A2
3	MAEVQLVVS GGGLVKPGGSMILSCAASGFTFSNYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSEYIYYADFKGRFTISRDNKNSLYLQMDSLRAEDTAVY YCAITGCECTWGRGTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPASVSG SPGQSITISCAGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYEDSKRPSGV NRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSCIRGLKAA YFGGGTKLAVL GAAAEQKLIS	E10
4	MAEVQLVVS GGGLVKPGGSMILSCAASGFTFSNYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSEYIYYADFKGRFTISRDNKNSLYLQMDSLRAEDTAVY YCAA AVCNRPDTWGRGTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPA SVSGSPGQSITISCAGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYEDSKRP SGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCGYSLLPVLFGGGTKLA	H8

[0260] 

	VLGAAAEQKLIS	
--	--------------	--

[0261] 图2示出使用LaserGene比对的选定scFv的序列以便确定关键和共有氨基酸。示出共有序列(SEQ ID NO:5)与INT41(SEQ ID NO:1)、A2(SEQ ID NO:2)、E10(SEQ ID NO:3)和H8(SEQ ID NO:4)比对。

[0262] 图2还示出胞内抗体序列内的CDR1、CDR2和CDR3区。在图3中,示出胞内抗体的可变重链序列和可变轻链序列。对于比对的序列,可变重链CDR1序列在位置8-12处,可变重链CDR2序列在位置50-58处,可变重链CDR3序列在位置100-110处。可变轻链CDR1序列在位置158-167处,可变轻链CDR2序列在位置185-190处,并且可变轻链CDR3序列在位置225-235处。接头序列在位置119-137处(SSGGGSGGGGSGGGGS)(SEQ ID NO:16)。

[0263] 实施例3:胞内抗体防止HttpQ蛋白的聚集

[0264] 在某些实施方案中,测试了胞内抗体对HttpQ蛋白聚集的作用。

[0265] 使含有HttpQ的DNA载体与绿色荧光蛋白(GFP)融合并且通过用或不用编码选定胞内抗体的核酸分子转染来引入细胞中[8]。通过荧光显微镜和流式细胞术来观察HttpQ蛋白的聚集。

[0266] 在流式细胞术中,通过在数分钟中分析成千上万个细胞来实现更好定量。在图4中,INT41和类似PRP特异性胞内抗体的流式细胞术分析显示对HttpQ聚集的抑制。将细胞的数目绘制在Y轴上并且对数荧光绘制在X轴上。在对照组中,293T细胞(图4A)未转染。在HttpQ-GFP不存在下(对照,293T)未观察到荧光( $<10^0$ )。非聚集HttpQ30-GFP(PQ30)主要在荧光标度的第一和第二十进制中显示荧光。在图4C中,聚集HttpQ103-GFP(PQ103)显示显著移位至荧光的最高十进制。将293T细胞的单独培养物用1-4 $\mu$ g的PQ30-GFP(图4B)转染或用含有PQ103-GFP的慢病毒载体转染(图4C)[8]。将接受PQ103-GFP加1-4 $\mu$ g的Happ1t cDNA的PQ103+胞内抗体(图4D)在CMV启动子控制下克隆至OptiVec载体(Life Sciences,Carlsbad CA)中。在Coulter FACS Scan上监测荧光。进行流式细胞术测定,并且PRR特异性胞内抗体使第三十进制中的荧光减少达20倍并且展示未转染对照与PQ30-GFP之间荧光信号的显著减少。由于转染效率的变化将这些实验重复六次。图5示出针对所测试的组(对照、PQ30、PQ103、PQ103+Happ1t和PQ103+INT41)制成表格的结果。样品5和6是E10的两种变体,其中的一种具有非结合框架区中的单个氨基酸变化。

[0267] 在荧光显微镜实验中,HttpQ30在整个细胞质中显示蛋白质分布的扩散细胞质染色特征,而HttpQ103展示细胞质中荧光的点状染色或明亮斑点,其指示在INT41存在下受抑制的聚集(数据未示出)。当将Happ1t、INT41和Happ1t靶向相同序列的其他胞内抗体与HttpQ103-GFP共表达时,最高十进制中的荧光被显著减少,如在图4中作为荧光移位至293T对照与PQ30(PQ103+胞内抗体)之间的中间分布所观察到。

[0268] 实施例4:INT41预防基因失调

[0269] 在另一个实施例中,进行实验以测试胞内抗体对基因失调的作用。

[0270] 在一个实施例中,从细胞提取mRNA,并且测量29,000种基因的基因表达水平(通过Phalanx One Array进行)。将这些数据针对不同样品中的基因表达水平在较大微阵列上进行分析。使用Integrity Systems软件针对疾病相关性、途径分析和细胞内网络的类似特征对所述数据进行分析。所述分析揭示HttpQ(PQ103)的基因表达模式与来自亨廷顿动物模型的那些和来自在尸体剖检时取得的人神经元的样品一致。所述数据还展示在表达水平上增

加或降低的基因的亚群(数据未示出)。

[0271] 将表达PQ103或PQ103+INT41的细胞针对选定基因的过度表达或表达不足进行分析。在从表达PQ103+INT41的细胞取得的样品中,对于最受影响的基因,由PQ103聚集表型引起的过度表达和表达不足模式变化均在很大程度上得以防止。

[0272] 亨廷顿中具有改变的表达的基因的一些实例连同表达倍数变化在下表2中列出,改变的表达被本发明的胞内抗体防止。在亨廷顿中失调且其失调受本发明的胞内抗体抑制的其他基因涉及在线粒体功能、网格蛋白涂覆的小窝转运、膜转运以及导致渐进式神经元功能障碍和神经元死亡的其他基因中。表达增加增加2X或表达降低0.5X的基因的示例性列表(649种基因)还在2013年8月28日提交的美国临时申请61/871,288的附录(表8)中找到,所述申请以引用的方式整体并入。测试了总计29,000种基因。在一个实施方案中,用Rosetta Biosoftware对所述基因进行测试,所述Rosetta Biosoftware使用专用系统用于通过并入加权误差来计算倍数变化。基因列表的计算在2013年8月28日提交的美国临时申请61/871,288的表8中示出,所述申请以引用的方式整体并入。

[0273] 在图6中,INT41显示抑制由PQ103引起的基因的过度表达。代表性过度表达基因的倍数表达的降低在单独表达PQ103的细胞或表达PQ103的细胞和表达INT41的细胞之间示出。从达 $2 \times 10^6$ 个细胞分离mRNA且送至Phalanx One Array Sciences以用于使用Kreatech™标记QC和微小RNA。将mRNA针对29,000种基因的阵列一式三份进行探测。通过Rosetta Resolver软件对结果进行分析。

[0274] 图7示出INT41对由PQ103引起的基因的表达不足的作用。代表性表达不足基因的倍数表达的增加在单独表达PQ103的细胞或表达PQ103的细胞和表达INT41的细胞之间示出。

[0275] 这些FACS和基因表达结果一起证明INT41防止聚集表型(图4-5)以及为亨廷顿氏病的特征和因果关系的表型(基因失调,图6-7)。

[0276] 表2示出少数选定基因的基因表达数据,其揭示单独表达INT41不会产生多效性基因调控。所述数据示出受PQ103影响的一些基因,特别是涉及在热休克或蛋白质折叠途径以及降解中的那些。

[0277] 表2

基因	PQ103 <sup>1</sup>	PQ103+INT41 <sup>2</sup>	INT41 <sup>3</sup>	注释
NRCAM	0.44	1.80	NS	神经元 CAM
IMMT	0.32	1.66	NS	线粒体 IM 蛋白
ANXA4	0.36	1.58	NS	胞吞/胞吐

[0278]

[0279]	PCDH9	0.37	1.68	NS	神经元原钙粘附蛋白
	BNIP3	0.38	1.91	NS	促凋亡
	NRP1	0.45	1.92	NS	神经纤毛蛋白
	UBE2E3	0.59	1.30	NS	泛素缀合酶
	UBE2J2	6.32	0.58	2.7	泛素缀合酶
	HSPA1B	5.88	0.56	NS	HSP701B 使聚集稳定
	PDF	8.66	0.49	1.97	蛋白质合成调控因子
	SPCS1	4.20	0.55	NS	泛素信号肽酶
	NCSTN	4.17	0.57	NS	缺口/ $\beta$ 淀粉样蛋白裂解(AZ)
	CTSD	4.07	0.37	NS	天冬氨酰蛋白酶(AZ)
	HSP90AA	2.79	NS	NS	细胞溶质 HSP90 $\alpha$

[0280] 1,3=针对加权误差调整的倍数变化对比对照293T;2=针对加权误差调整的倍数变化对比PQ103;NS=不显著。

[0281] 表2中的数据证明单独INT41仅改变蛋白质的合成和降解所需的基因的表达,其将针对在表达INT41的细胞中的添加要求而被预期。

[0282] 实施例5:INT41防止突变体亨廷顿蛋白的毒性片段结合细胞核中的染色质

[0283] 在另一个实施例中,用针对全长人亨廷顿蛋白质的诱导基因在PC12细胞中针对INT41对突变体亨廷顿蛋白及其片段的亚细胞定位和活性的作用对INT41进行研究。

[0284] 选择最初在亨廷顿氏病基金会(CHDI)开发的PC12大鼠神经元细胞,因为类似的诱导PC12神经元由表征毒性亨廷顿蛋白片段的其他实验室使用(11)。

[0285] 图8是rAAV的构建的示意性图示(Chen,H.Mol Ther,2008.16(5):924-30。将INT41 cDNA基因序列放置在巨细胞病毒(CMV)启动子和人生长激素(hGH)内含子的下游。将SV40聚腺苷酸化序列(SV40聚A)放置在INT41cDNA的下游。完整表达盒由载体包装所需的AAV6反向末端重复序列(ITR)侧接。如图8提供所述载体的表达盒区的示意图。将AAV重复编码序列工程化为含有包含昆虫启动子的人工内含子,以使得可从单个序列表达AAV复制和包装所需的Rep78和Rep52蛋白。此外,还将人工内含子工程化至AAV帽编码序列以能够表达以最佳比例形成病毒颗粒所需的VP1、VP2和VP3蛋白。将工程化的Rep序列和Cap序列克隆在一起以产生表达AAV Rep蛋白和Cap蛋白两者的重组杆状病毒。将第二杆状病毒工程化为含有由AAV ITR侧接的靶序列。这两种杆状病毒用于共感染昆虫细胞以用于AAV载体产生。在共感染和扩增之后,将细胞沉淀收集、溶解、澄清且经受2轮氯化铯超速离心。取决于研究的需要,将AAV载体缓冲交换为PBS缓冲液或其他适合的缓冲液。通过定量实时PCR方法测定AAV载体的滴度,如本领域的技术人员所已知。

[0286] 图9证明在表达73个重复序列的Htt<sup>Q</sup>的PC12细胞中,INT41显著减少突变体亨廷顿蛋白片段与细胞核中的染色质的结合并且减少细胞膜上全长突变体亨廷顿蛋白的积聚。将细胞用含有腺相关病毒6(rAAV6-INT41)的重组INT41转导且在72小时之后诱导以表达人亨廷顿蛋白。在诱导人亨廷顿蛋白基因之后,在第8天收获细胞,并且如由试剂盒制造商(Thermo 78840)所描述进行亚细胞分级分离。使用microBCA试剂盒(Thermo 23235)测定每种级分的蛋白质浓度。

[0287] 对于分析,将来自每种级分的12ug总蛋白质负载至3%-8%Tris-乙酸盐凝胶上且

在30mAmps下运行4小时。随后将凝胶转移至转移缓冲液(192mM Tris、25mM甘氨酸、20%甲醇)30V中的硝基纤维素(0.2um, BioTraceNT)持续2小时。将膜在TBST/5%牛奶中封闭过夜且然后用TBST/5%牛奶中的1:1500的兔抗Htt(Sigma H7540)抗体在室温下探测4小时。使用TBST的三个十分钟洗涤,然后与TBST/5%牛奶中的1:5,000的缀合至HRP的山羊抗兔IgG抗体(Jackson 111-035-003)在室温下孵育1小时。使用TBST的三个十分钟洗涤在应用Pierce ECL2(Thermo 80196)之前进行以用于在薄膜上化学发光检测。

[0288] 图10示出转录调控CREB结合在HttQ73染色质/DNA部分中增加并且INT41减少CREB与染色质/DNA的结合。用抗CREB抗体(用AAV6模拟转导("M"))重新探测图9中所示的免疫印迹,但CREB与染色质/DNA的结合在用rAAV6-INT41转导细胞时减少(泳道标记为"41")。泳道包含来自细胞溶解产物的细胞质(Cyto)、细胞膜(Mem)、可溶性细胞核(Nsol)或染色质/DNA(Chro)的部分,所述细胞溶解产物来自用不含INT41(M)的AAV6或用rAAV6-INT41转导的诱导的PC12Q73细胞。

[0289] 图11示出INT41特异性Htt降解片段的亲和纯化,具体地在固定INT41琼脂糖凝胶上在8-11天时诱导和未诱导的溶解产物的亲和纯化。图11示出当来自HttQ73诱导的细胞的溶解产物(右侧柱)穿过固定的INT41亲和柱时,仅结合降解的Htt的较小片段(用兔抗N-末端Htt抗体探测的部分)并且未诱导的HttQ73细胞(左侧柱(第8、9、10、11天)未结合在相同印迹上探测的部分中的任何可检测的蛋白质。将用pH 2.5甘氨酸洗脱的级分掺入5ug细胞色素C,然后将100ul的每种级分与400ul冷丙酮混合且在-80℃下孵育10分钟和在-20℃下孵育过夜,并且在4℃下在14,000X g下微量离心10分钟。将级分在12%SDS PAGE凝胶上运行,转移至硝基纤维素并且用抗N末端Htt探测,接着用山羊抗兔HRP和ECL开发探测。在测量级分之后运行级分8-11以测定哪些级分包含洗脱的Htt或其片段。

[0290] 实施例6:INT41结合过度磷酸化区处的人Tau蛋白以用于治疗阿尔茨海默氏病

[0291] 在其他实施方案中,INT41可结合人Tau蛋白。图12示出人Tau蛋白序列,包括9个剪接变体。INT41表位以粗体突出显示并且与外来体相关的肽以框描绘轮廓。图12示出INT41表位("PxP"呈粗体),其是Tau蛋白的过度磷酸化区;INT41表位结合在外来体中分泌的序列(图12示出加框序列)(Pooler等EMBO Reports 2113,14:389-394;Saman等JBC 2012,287:3842-3849)。

[0292] INT41可结合HttPQ的片段并且改变这些片段的病理和降解。类似地,INT41结合由引起神经元病理和神经元损失的外来体分泌的Tau的片段可使那些片段稳定,有助于细胞内的降解并且防止外来体中的Tau片段的分泌。或者,虽然不互相排斥,但INT41可在结合毒性Tau片段的外来体中转运并且中和其细胞外活性。

[0293] Tau蛋白的片段是从阿尔茨海默氏患者的细胞分泌的,并且Tau片段结合细胞受体且引起神经元功能障碍。在细胞外空间中引入抗体可以是针对基于动物模型研究的阿尔茨海默氏病的有效疗法,因为所述抗体可防止Tau片段与引起神经元功能障碍的细胞受体的结合(参见Griswold-Prenner;Irene等,美国公布号2001/40086921)。用胞内抗体(如INT41)防止分泌和/或过度磷酸化可使Tau片段与细胞受体结合且预防神经元功能障碍。

[0294] 本发明包括一种治疗或管理患有阿尔茨海默氏病或其他Tau病状的受试者的方法,所述方法包括向需要所述治疗或管理的受试者施用治疗有效量的本文所描述的胞内抗体。在一个实施方案中,所述胞内抗体防止Tau片段与引起神经元功能障碍的神经元的结

合。

[0295] 实施例7:INT41改进动物模型中的认知和行为功能

[0296] 在另一个实施例中,将INT41胞内抗体针对对动物模型中的认知和行为功能的作用进行研究。

[0297] 选择R6/2鼠类模型,因为它是针对具有大聚Q串(>120个重复序列)的Htt<sub>p</sub>Q转基因的。这是提供在较短时间段内测试的能力的侵袭性或急性模型,并且一般认为是用于测试神经保护或改善疾病的治疗性药物的最佳模型之一。

[0298] 小鼠生而具有Htt<sub>p</sub>Q聚集体并且继续随着年龄积聚Htt<sub>p</sub>Q。治疗干预在5周龄时开始,其中在处理2-3周最佳表达转基因。因此,治疗干预在R6/2模型中在疾病进展中良好发生。用重组腺相关病毒(rAAV6型)引入INT41序列。野生型AAV不与疾病相关,并且重组AAV载体已进行修饰以递送编码的转基因且不能够病毒复制。AAV是对于神经元高度趋向性的,从而使得它是用于神经变性疾病的理想递送系统。

[0299] 将重组AAV6-INT41(rAAV6-INT41,连同rAAV6-GFP和rAAV-Happ1作为对照)通过各自纹状体内双侧注射1.5 $\mu$ l施用于转基因动物中,连同仅接受媒介物(用于注射的缓冲液)的非转基因R6/2组。动物测试对于训练的测试者来说是不知情的且针对每个动物记录所有运动和认知相关的测试。5周的rAAV6施用导致在施用后2-3周最佳表达(INT41、GFP和Happ1估计在7与8周之间最佳表达)。以下表3示出所研究的组以及每组中雌性和雄性受试者的数目。

[0300] 表3

基因型	处理	雌性	雄性
R6/2_Wt	VEH	5	9
R6/2_Tg	GFP	5	9
	Happ1t	5	9
	INT41	6	9

[0302] 在5周龄引入rAAV之前运行了多个标准测试,并且继续这些测试直到动物在持续病理12周之后杀死。

[0303] 表4

研究周	工序
1	繁殖建立
2和3	
4	出生周
5	
6	将尾巴送至用于基因分型。到该周结束时,接收基因分型结果。
7	断奶周
8	4周行为基线评定(OFAM、GS、RR)
9	第4.5-5周-纹状体内rAAV6输注
10	第6周行为评定(OFAM、GS、RR)
11	第7周
12	第8周(OFAM、GS、RR)

13	第9-10周行为评定-认知,使用程序性T-迷宫
14	(通常第2周测试)
15	第11周
16	第12周行为评定 (OFAM、GS) 和组织收集

[0305] 以下定义各种测试。转棒 (RR) :连续3天对小鼠进行测试。每个每日时期包括在转棒设备 (Rotamex, OH) 上在4RPM下的5分钟 (min) 的训练试验。一小时之后,针对5分钟的3个连续加速试验对动物进行测试,在每个试验期间速度在300秒内变化。试验间间隔是至少30分钟。记录自加速棒掉落的潜伏时间,且进行定量分析。

[0306] 旷场 (OFAM) :活动室 (Med Associates Inc, St Albans, VT; 27×27×20.3cm) 配备有红外 (IR) 光束。将小鼠放置在所述室的中心中,且持续30分钟记录它们的行为。对以下五个独立量度进行定量分析:总运动、在旷场中心中的运动、在中心中的育成率、总育成频率以及速度。

[0307] 握力 (GS) :握力用于评定前肢和后肢肌肉中的肌肉强度。简言之,抓住小鼠的颈背,通过尾巴轻轻地握持,并且朝向量器 (Chatillion Force Gauge, San Diego Instruments, San Diego, CA) 上的第一网握持件降低直到动物用两个前爪抓住。然后将动物朝向平台降低并且并且用一致力轻轻直接拉回直到它释放其握持,在此时其后肢握持第二网握持件,继续轻轻拉动运动直到受试者释放其握持。在应变仪上记录前肢和后肢握力。每个测试时期动物经历5个试验,并且尾巴的平均值用于计算握力。在测试之后,将动物放回至其居住笼中。

[0308] 抱握测试:抱握测试用于观察当通过尾巴悬挂时前肢和后肢的抱握。将小鼠在其尾巴末端处提起且保持30秒,在笼上方大约12英寸。在运行时间期间,如果相对肢的脚趾互锁并且保持抱握持续大于一秒,将其计分为抱握且分类为前肢、后肢或完全抱握 (前肢和后肢)。在30秒之后,将小鼠降低回至其居住笼中。

[0309] 程序性T-迷宫:在由黑色树脂玻璃构建的两个T-迷宫 (在PsychoGenics, Inc. 内部建立) 中对小鼠进行测试。每个T-迷宫位于单独的测试房间中,光线昏暗且配备有摄像机 (安装在T迷宫上方) 和计算机以及监测器。监测器屏幕覆盖有红色透明薄膜以使光发射最小化。将T迷宫在25°C±1°C下填满水,用Tempura无毒白色颜料涂色以使得它不透明。在“T”的交叉件的一端,将平台放置在水面下方大约0.5cm。

[0310] 将小鼠放置在T形迷宫的杆中且允许选择游到右臂或左臂以到达逃避平台。选择被定义为进入左臂或右臂,而不一定到达逃避平台。未能离开T迷宫的杆被定义为“无选择”。将在最大试验持续时间 (60秒 (s)) 内未能到达平台的任何小鼠直接放回到平台上。在所有情况下,一旦动物到达或被放置在平台上,就允许动物在那保持30秒且然后放回至预热的居住笼中,从而允许皮毛在区组间干燥。每个小鼠每天训练8个试验。测试在大约8只小鼠的区组中进行,以使得每只小鼠在返回至第一小鼠用于第二试验之前都进行了一次试验。因此,试验间间隔维持在大约15分钟下。将小鼠每周测试6天,持续最多2周 (总计12个时期)。获得任务被定义为对于连续两天75%正确。在获得之后,使单独小鼠行进至逆转测试:使获得任务的所有小鼠经历6天的逆转测试,不管表现如何。当在池中时在所有时间监测小鼠。如果动物在第一试验中努力停留在水上方,则对于所述小鼠终止实验。

[0311] 体重:图13A和13B示出处理组与对照组之间的体重差异。体重差异仅在10-12周之

间变得明显,特别是在雄性小鼠中,雄性小鼠通常比雌性进展更迅速大约2周。在rAAV处理组之间未观察到R6/2转基因小鼠的体重差异。在图13A和13B中,示出4-12周龄的在用rAAV6-GFP、rAAV6-Happ1t、rAAV6-INT41或VEH(媒介物)处理之后的R6/2\_WT小鼠和R6/2\_Tg小鼠的平均体重( $\pm$ S.E.M.) (空心圆圈:R6/2WT对照中的媒介物;黑色正方形:R6/2Tg中的rAAV-GFP;灰色正方形:R6/2Tg中的rAAV-Happ1t;空心正方形:R6/2Tg中的rAAV-INT41)。

[0312] **旷场测试:**旷场测试测量放置在测试场中心中的动物的移动和行进的总距离以及移动速度。GFP对照(仅雌性小鼠中)表现出异常高的和出人意料的行进的总距离。用INT41处理的R6/2转基因小鼠显示相对于Happ1t从中心行进的显著更大距离。用Happ1t处理的小鼠显著低于GFP小鼠,如通过行进的总距离所测量,特别是相对于雌性小鼠中的野生型媒介物对照。

[0313] 图14示出通过由4、6、8和12周龄的R6/2\_Tg和WT小鼠在旷场中行进的平均( $\pm$ S.E.M.)总距离测量的旷场测试的结果。在4周龄时获得数据且充当基线数据以用于将小鼠分配至处理组中。在5周龄时用rAAV6-GFP、rAAV6-Happ1t、rAAV6-INT41或媒介物(VEH)处理之后在6、8和12周龄时获得的数据表示输注后1、3和7周时间点。图14示出跨五分钟时间间隔以及针对整个30分钟时期的和呈现的数据。分别针对雌性(A)和雄性(B)呈现数据。以下表5示出用于旷场测试的处理组之间的统计比较(P值显著性)。

[0314] 表5:旷场测试

旷场: 总距离			
性别 x 组(基因型/处理) x 年龄相互作用			
$F_{(9, 206)} = 2.02, p = 0.0444$			
	比较	8 周	12 周
[0315] 雌性	GFP 对 INT41	0.3698	0.0673
	GFP 对 Happ1t	0.0102	0.0125
	Happ1t 对 INT41	0.0694	0.4005
雄性	无差异	不适用	不适用

[0316] 图15示出从中心测试行进的旷场距离的数据。所述数据由4、6、8和12周龄的R6/2\_Tg和WT小鼠在旷场的中心中行进的平均( $\pm$ S.E.M.)距离表示。在4周龄时获得的数据充当基线数据以用于将小鼠分配至处理组中。在5周龄时用rAAV6-GFP、rAAV6-Happ1t、rAAV6-INT41或媒介物处理之后在6、8和12周龄时获得的数据表示输注后1、3和7周时间点。跨五分钟时间间隔以及针对整个30分钟时期的和呈现数据。图15示出分别针对雌性(A)和雄性(B)的数据。星号(\*)指示INT41处理的小鼠显示与GFP显著不同的行进距离( $p < 0.05$ )。#指示Happ1t接近与GFP的显著差异( $p = 0.0623$ )。

[0317] **握力测试:**用应变仪测试且记录握力。报告五个记录值的平均值。相较于同一小鼠品系中的GFP对照的后肢握力,INT41处理的R6/2转基因小鼠展示后肢握力的显著改进。未观察到对前肢握力的作用。

[0318] 图16示出用胞内抗体INT41、Happ1t、GFP或媒介物(对照)处理的小鼠中的未标准化的后肢握力。相较于VEH处理的R6/2\_WT小鼠示出rAAV6-INT41、rAAV6-Happ1t或rAAV6-GFP对R6/2\_Tg小鼠的后肢握力的作用。分别针对雌性(图16A)和雄性(图16B)呈现数据。4周是所有处理小鼠的基线。在12周时,相较于GFP对照小鼠,INT41显示后肢握力的显著差异( $p$



<0.05)。Happ1t接近与GFP对照的显著差异 ( $p=0.0623$ )。

[0319] **抱握反应:**在用INT41或Happ1处理的R6/2转基因小鼠或对照中测试抱握反应。仅在R6/2转基因小鼠中观察到抱握反应,当通过尾巴捉起时其抓住它们自己,而不是伸出以抓住其环境中的某种东西。INT41处理的R6/2转基因小鼠展示获得这种改变的行为的显著延迟,类似于Happ1处理的小鼠。

[0320] 在图17-18中,示出INT41处理的小鼠、Happ1t处理的小鼠、GFP处理的小鼠或对照媒介物处理的小鼠的抱握反应(图17示出雌性小鼠的结果;图18示出雄性小鼠的结果)。描绘每周呈现具有全肢抱握的小鼠的比例,如在5周龄时rAAV6-INT41、rAAV6-Happ1t、rAAV6-GFP或VEH的双侧纹状体输注之后从7-12周龄开始所评估。在4、5和6周龄时评定抱握,但是因为沒有小鼠展示抱握表型,所以所述年龄未包括在以上图中。

[0321] 相较于rAAV6-GFP处理的R6/2\_Tg小鼠,在用rAAV6-Happ1t处理的R6/2\_Tg小鼠中观察到的完全抱握行为的卡方分析(Chi square analysis)显示以下:

[0322] 在性别组合数据中,较小比例的用Happ1t处理的R6/2\_Tg小鼠在11周龄时展示完全抱握行为 ( $p=0.0341$ )。

[0323] 在仅R6/2\_Tg雌性中:在10周时,相较于雌性GFP处理的对应物,对于较高比例的Happ1t处理的R6/2\_Tg雌性来说存在展示完全抱握行为的趋势 ( $p=0.0578$ )。在12周龄时,显著更高比例的Happ1t处理的R6/2\_Tg雌性确实展示比GFP处理的R6/2\_Tg雌性更完全的抱握 ( $p=0.0384$ )。

[0324] 在仅R6/2\_Tg雄性中:在10周时,相较于雄性GFP处理的对应物,对于较小比例的Happ1t处理的R6/2\_Tg雄性来说存在展示完全抱握行为的趋势 ( $p=0.0637$ )。在11周龄时,显著更低比例的Happ1t处理的R6/2\_Tg雄性确实展示比GFP处理的R6/2\_Tg雄性更完全的抱握 ( $p=0.0016$ )。

[0325] 直接相较于rAAV6-GFP处理的R6/2\_Tg小鼠,比较用rAAV6-INT41处理的R6/2\_Tg小鼠中的完全抱握行为的频率的卡方分析揭示对于INT41处理的R6/2\_Tg小鼠(性别组合的)在11周龄时展示较低比例的完全抱握的趋势 ( $p=0.0768$ )。未注意到性别特异性作用。

[0326] **T-迷宫认知测试:**T-迷宫认知测试测量学习能力,其中当在T构型槽中游泳时放置平台,其中平台在T的一侧上。学习通过在连续两天进行平台位置的学习能力显示。当75%获得任务时所述组被确定为已经实现学习。

[0327] 在此测试中,INT41处理的雌性R6/2转基因在与非转基因对照小鼠相同的时间内实现任务的学习。用INT41处理的雄性小鼠(其以较快速率疾病进展)在学习方面比GFP或Happ1小鼠更好,但不比非转基因对照好。

[0328] 图19示出T-迷宫认知测试的结果,所述T-迷宫认知测试测量雄性和雌性小鼠中实现任务获得的小鼠的比例(在9-10周时)。图19A示出雄性小鼠的结果;图19B示出雌性小鼠的结果。以获得任务的平均天数测量程序性T迷宫任务的获得。数据表示平均值 $\pm$ SEM。星号(\* $p<0.05$ ,\*\* $p<0.01$ )指示相较于R62-WT媒介物的显著差异。T-迷宫结果证明INT41和Happ1处理的雌性小鼠(作为一组)与对照表现一样好。在雄性小鼠中,INT41处理的小鼠比GFP和Happ1t小鼠表现好,但差异不是统计上显著的。

[0329] **实施例8:动物模型测试的总结**

[0330] 以下表6示出使用INT41进行的动物模型研究的结果的总结。所述结果指示在若干

行为和认知终点内INT41的阳性结果。

[0331] 表6:动物模型结果的总结

[0332]	测试	对照	INT-41*
	存活	4例计划外死亡	1例计划外死亡
	旷场-总距离	逐渐下降	在早期时间点增加的运动
	旷场-距离中心	逐渐下降	在12周显著改进
	旷场-速度	逐渐下降	在12周在雌性中改进
	后握力	可变下降	在12周在雄性中改进
	完全抱握	GFP对照增加抱握;用Happ1t延迟	在抱握行为方面延迟
	程序性T-迷宫	学习时间明显较慢	雌性与媒介物非转基因对照相同

[0333] 实施例9:R6/2脑切片中的聚集体的免疫组织化学计数

[0334] 在一个实施例中,研究了来自小鼠的R6/2脑切片中的聚集体的免疫组织化学计数。通过用40x物镜在每个动物两个横截面水平双侧计数(且跨所有动物相同地进行)来测定来自脑切片的免疫组织化学染色的聚集体的计数。在两个不同冠状水平对两个纹状体成像-每个动物4个图像且如Simmons等[16]所描述进行分析。

[0335] 表7.R6/2动物中的HttpQ聚集体的分析

[0336]		GFP	Happ1t	INT41
	中值聚集体数目(平均偏差)	1365(219)	1543(299)	1240(209)
	雌性中值聚集体数目(平均偏差)	1325(238)	1543(308)	1184(156)
	聚集体0.01-0.1 $\mu$ m的频率/动物	227	266	176
	聚集体0.1-1 $\mu$ m的频率/动物	741	748	611

[0337] 所检查的区域包括在纹状体的大约同一平面中每个动物1,000与2,000个之间的聚集体。所述结果证明INT41组总体上具有较少聚集体。当通过频率分析(GraphPad Prism 6.0)检查聚集体时,INT41组具有在较小大小范围内的较少聚集体,这与抑制HttpQ的初始聚集一致。INT41小鼠中0.01-0.1 $\mu$ m聚集体数目的频率比GFP小鼠低22%( $p < 0.13$ )且比Happ1t小鼠低34%( $p < 0.05$ )。INT41小鼠中0.1-1 $\mu$ m聚集体的频率比GFP小鼠低16%( $p < 0.09$ )且比Happ1t小鼠低18%( $p < 0.10$ )。

[0338] 亨廷顿氏病的疾病改善要求治疗剂阻断或防止由HttpQ的聚集引发的持续级联事件且导致神经元死亡。INT41在基于细胞的系统(其中其阻断HttpQ103-GFP聚集和基因失调)和动物模型(其中其改进运动和认知功能)两者中均具有与疾病改善一致的特性。亨廷顿氏病的动物模型未能屈从人临床结果,但HttpQ聚集的机制特征已得到良好研究且与人疾病紧密相连。可溶性聚集体的池随年龄下降,因为不溶性聚集体积聚[17,18],并且这种动力学可通过INT41基于抑制INT41处理的R6/2小鼠的脑中的小聚集体的形成来改变(表6)。

[0339] R6/2研究证明在运动和认知功能的若干测试中的改进,主要在雌性小鼠中,其中疾病进展不那么迅速。体外和体内的这些研究表明INT41可减缓或防止HttpQ的早期聚集,从而支持早期干预作为治疗必需。虽然Happ1t与INT41类似地表现,但Happ1t组中的一些动物较早死亡(数据未示出),但这一观察结果在无正式存活研究的情况下不能被证实。

[0340] 大肠杆菌和哺乳动物表达系统中INT41与Happ1t之间的溶解度差异表明Happ1t具

有折叠问题,所述折叠问题可能是由于重链的不存在所致,从而留下通常与重链结构域相互作用的轻链结构域以寻求自我缔合或与可能导致聚集的其他蛋白质缔合。

[0341] 与历史对照R6/2转基因小鼠的数据比较指示GFP出人意料地在一些测试(具体地旷场)中具有有一些疾病改善作用。历史对照和公开的GFP基线数据的综述表明GFP小鼠可具有比预期更慢的下降,特别是如图9中所观察到。GFP的作用可归因于基因调控蛋白降解的增加,特别是修饰蛋白质以用于降解的一些泛素相关基因[19]。然而,GFP的作用是短暂的且将需要与TG对照的仅直接比较来证实任何差异。

[0342] 虽然已经参照优选实施方案和不同替代实施方案具体地示出且描述了本发明,但是相关领域的技术人员应理解,可在不脱离本发明的精神和范围的情况下在其中在形式和细节方面做出各种改变。

[0343] 在本说明书的主体内引用的所有参考文献、颁布的专利和专利申请出于所有目的特此以引用的方式整体并入。

[0344] 非正式序列列表

SEQ ID NO	序列	描述
1	MAEVQLVVS GGGLVKPGGSMILSCAASGFTFSNYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSEYIYYADFKGRFTISR DNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCAWPGYRKA WG RGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPASVSGS PGQSITISCAGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM I YEDSKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADY YCSYCASKGHWLFGGGTKLAVLGAAAEQKLIS	INT41
2	MAEVQLVVS GGGLVKPGGSMILSCAASGFTFSNYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSEYIYYADFKGRFTISR DNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCAHW PRLWRFPL WGRGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPASV SGSPGQSITISCAGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMIYEDSKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDE ADYYCVLNMHWANFGGGTKLAVLGAAAEQKLIS	A2
3	MAEVQLVVS GGGLVKPGGSMILSCAASGFTFSNYSM	E10

[0346]

	NWVRQAPGKGLEWVSSISSSEYIYYADFKGRFTISR DNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCAITGCECTWGR GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPASVSGSP GQSITISCAGT SSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYEDSKRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSCIRGLKAA YFGGGTKLAVLGAAAEQKLIS	
4	MAEVQLVVSAGGLVKPGGSMILSCAASGFTFSNYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSEYIYYADFKGRFTISR DNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCAAVCNRPDT WGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPASV SGSPGQSITISCAGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDE ADYYCGYSLLPVLFGGGTKLAVLGAAAEQKLIS	H8
5	MAEVQLVVSAGGLVKPGGSMILSCAASGFTFSNYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSEYIYYADFKGRFTISR DNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCAXWPCXXXXT WGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPASV SGSPGQSITISCKNSSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDE ADYYCSXXXLHWAXFGGGTKLAVLGAAAEQKLIS	共有序列
6	WPGYRKA	INT41 的可变重链 CDR3 序列
7	HWPRLWRFPL	A2 的可变重链 CDR3 序列
8	ITGCECT	E10 的可变重链 CDR3 序列
9	AAVCNRPDT	H8 的可变重链 CDR3 序列
10	SYCASKGHWL	INT41 的可变轻链 CDR3 序列
11	VLNMHWAN	A2 的可变轻链 CDR3 序列
12	SCIRGLKAAAY	E10 的可变轻链 CDR3 序列
13	GYSLLPVL	H8 的可变轻链 CDR3 序列
14	XWPCXXXXT	共有序列的可变重 链 CDR3 序列
15	S-XXXLHWAX	共有序列的可变轻 链 CDR3 序列
16	SSGGGSGGGGSGGGGS	接头序列
17	PQLPQPPQAQP	聚脯氨酸序列
18	PGPAVAEEPLHRPG	聚脯氨酸序列
19	5'- GACCATGATTACGCCAAGCTTGGCTAGCCATATGTC TAGAATGGCAGAAGTTCAGCTGGT-3'	引物 PC147

	20	5'-ATCCAGTGATTTTTTCTCGTCGACCTCGAGTGC GGCCGCACCCAGAACTGCCAGTTTGG-3'	引物 PC148
	21	VSGGG	可变重链 CDR1 (图 2 上的氨基酸位置 8-12)
	22	VSSISSSE	可变重链 CDR2 (图 2 中的氨基酸位置 50-58)
	23	AGTSSDVGGY	可变轻链 CDR1 (图 2 中的氨基酸位置 158-167)
	24	IYEDSK	可变轻链 CDR2 (图 2 中的氨基酸位置 185-190)
	25	RPQLPQPPPQAQPRGGGSK	亨廷顿肽序列 (Happ(+))
[0347]	26	RPQLPQPPPQAQPRGGGSK-biotin	生物素化的亨廷顿 肽(Happ(+))
	27	PGPAVAEEPLHRPG	亨廷顿肽序列 (Happ(-))
	28	PGPAVAEEPLHRPG-biotin	生物素化的亨廷顿 肽序列(Happ(-))
	29	MATLEKLMKAFESLKSFQQQQ(Q) <sub>n</sub>	亨廷顿蛋白外显子 1 蛋白的 N 末端区
	30	PPPPPPPPPPQLPQPPPQAQPLLPQPQ	亨廷顿蛋白外显子 1 蛋白的聚脯氨酸 区(加下划线的部 分是 Happ(+))
	31	PPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPK	亨廷顿蛋白外显子 1 蛋白的 C 末端富 含 P 的区(加下划 线的部分是 Happ(-))

[0348] 引用的参考文献

[0349] 1.Zuccato,C.,M.Valenza,and E.Cattaneo,MoleculAr mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease.Physiol Rev,2010.90 (3):p.905-81.

[0350] 2.Schulte,J.and J.T.Littleton,The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology.Curr Trends Neurol,2011.5:p.65-78.

[0351] 3.Kippert,F.and D.L.Gerloff,Highly sensitive detection of individual HEAT and ARM repeats with HHpred and COACH.PLoS One,2009.4(9):p.e7148.

[0352] 4.Xia,J.,et al.,Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal.Hum Mol Genet,2003.12(12):p.1393-403.

[0353] 5.Landles,C.,et al.,Proteolysis of mutant huntingtin produces an exon 1 fragment that accumulates as an aggregated protein in neuronal nuclei in

Huntington disease. *J Biol Chem*, 2010. 285(12) :p.8808-23.

[0354] 6 Riva, L., et al., Poly-glutamine expanded huntingtin dramatically alters the genome wide binding of HSF 1. *J Huntingtons Dis*, 2012. 1(1) :p.33-45.

[0355] 7. Benn, C.L., et al., Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine dependent manner. *Neurobiology of Dis.*, 2008. 28(42) :p.10720-33.

[0356] 8. Labbadia J., et al., Altered chromatin architecture underlies progressive impairment of heat shock response in mouse models of Huntington Disease. *J Clin Invest.* 2011. 121(8) :p.3306-19.

[0357] 9. Wellington, C.L., et al., Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neuroscience*, 2002. 22(18) :p.7662-72.

[0358] 10. Graham, R.K., et al., Cleavage at the caspase 6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell*, 2006. 125(6) :p.1179-91.

[0359] 11. Ratovitski T., N-terminal proteolysis of full-length mutant huntingtin in an inducible PC 12 cell model of Huntington's disease. *Cell Cycle*, 2007. 6(23) :p.2970-81.

[0360] 12. Khoshnain, A., J. Ko, and P.H. Patterson, Effects of intracellular expression of anti-huntingtin antibodies of various specificities on mutant huntingtin aggregation and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(2) : p.1002-7.

[0361] 13. Southwell, A.L., et al., Intrabodies binding the proline-rich domains of mutant huntingtin increase its turnover and reduce neurotoxicity. *J Neurosci*, 2008. 28(36) :p.9013-20.

[0362] 14. Southwell, A.L., J. Ko, and P.H. Patterson. Intrabody gene therapy ameliorates motor, cognitive, and neuropathological symptoms in multiple mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci*, 2009. 29(43) :p.13589-602.

[0363] 15. Southwell, A.L., et al., Perturbation with intrabodies reveals that calpain cleavage is required for degradation of huntingtin exon 1. *PLoS One*, 2011. 6(1) :p.e16676.

[0364] 16. Fisher, A.C. and M.P. DeLisa, Efficient isolation of soluble intracellular single-chain antibodies using the twin-arginine translocation machinery. *J Mol Biol*, 2009. 385(1) :p.299-311.

[0365] 17. Fisher, A.C., W. Kim, and M.P. DeLisa, Genetic selection for protein solubility enabled by the folding quality control feature of the twin-arginine translocation pathway. *Protein Sci*, 2006. 15(3) :p.449-58.

[0366] 18. Karlsson, A.J., et al., Engineering antibody fitness and function using membrane-anchored display of correctly folded proteins. *J Mol Biol*,

2012.416(1):p.94-107.

[0367] 19.Waraho,D.and M.P.DeLisa,Versatile selection technology for intracellular protein-protein interactions mediated by a unique bacterial hitchhiker transport mechanism.Proc Natl Acad Sci U S A,2009.106(10):p.3692-7.

[0368] 20.Ball,L.J.,et al.,Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains.Angew Chem Int Ed Engl,2005.44(19):p.2852-69.

[0369] 21.Srinivasan,M.and A.K.Dunker,Proline rich motifs as drug targets in immune mediated disorders.Int J Pept,2012.2012:p.634769.

[0370] 22.Simmons,D.A.,et al.,Brief amphetamine treatments slow the progression of Huntington's disease phenotypes in R6/2 mice.Neurobiol Dis,2011.41(2):p.436-44.

[0371] 23.Baldo,B.,et al.et al.,TR-FRET-based duplex immunoassay reveals an inverse correlation of soluble and aggregated mutant huntingtin in huntington's disease.Chem Biol,2012.19(2):p.264-75.

[0372] 24.Marcellin,D.,et al.et al.,Fragments of HdhQ150 mutant huntingtin form a soluble oligomer pool that declines with aggregate deposition upon aging.PLoS One,2012.7(9):p.e44457.

[0373] 25.Bennett,E.J.,et al.,Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease.Nature.2007.448(7154):p.704-8.

## 序列表

<110> VYBION, INC.  
 <120> 改变亨廷顿蛋白突变体降解的单链胞内抗体  
 <130> 29262-26566/PCT  
 <140> PCT/US2014/037563  
 <141> 2014-05-09  
 <150> 61/871, 288  
 <151> 2013-08-28  
 <150> 61/828, 625  
 <151> 2013-05-29  
 <160> 40  
 <170> PatentIn 3.5 版  
 [0001] <210> 1  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成多肽  
 <400> 1  
 Met Ala Glu Val Gln Leu Val Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro  
 1                    5                    10                    15  
 Gly Gly Ser Met Ile Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
                   20                    25                    30  
 Asn Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
                   35                    40                    45  
 Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Glu Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp  
                   50                    55                    60





Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser  
 245 250

<210> 2

<211> 253

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 2

Met Ala Glu Val Gln Leu Val Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro  
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Met Ile Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30

[0003]

Asn Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Glu Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60

Phe Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser  
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Ala His Trp Pro Arg Leu Trp Arg Phe Pro Leu Trp Gly Arg  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly





Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val  
 180 185 190

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr  
 195 200 205

Ile Ser Gly Leu Arg Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Cys  
 210 215 220

Ile Arg Gly Leu Lys Ala Ala Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala  
 225 230 235 240

Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser  
 245 250

[0006] <210> 4

<211> 253

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 4

Met Ala Glu Val Gln Leu Val Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro  
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Met Ile Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30

Asn Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Glu Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60



Ala Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser  
 245 250

<210> 5

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (100)..(100)

<223> His、Ile、Ala 或不存在

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (104)..(104)

[0008]

<223> Leu、Tyr、Glu 或 Asn

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (105)..(105)

<223> Trp、Arg、Cys 或 Gly

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (106)..(106)

<223> 可能存在或可能不存在

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (107)..(107)

<223> Pro、Lys、Asp 或不存在

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (226)..(226)

<223> 可能存在或可能不存在

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (227)..(227)  
 <223> Val、Ala、Ile 或不存在

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (228)..(228)  
 <223> Leu、Ser、Arg 或 Tyr

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (229)..(229)  
 <223> Asn、Lys、Gly 或 Ser

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (234)..(234)  
 <223> Asn、Tyr、Leu 或不存在

<400> 5  
 [0009] Met Ala Glu Val Gln Leu Val Val Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro  
 1                   5                   10                   15

Gly Gly Ser Met Ile Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
                   20                   25                   30

Asn Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
                   35                   40                   45

Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Glu Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp  
                   50                   55                   60

Phe Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser  
 65                   70                   75                   80

Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                   85                   90                   95



Tyr Cys Ala Xaa Trp Pro Cys Xaa Xaa Arg Xaa Thr Trp Gly Arg Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val  
 130 135 140

Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Lys Asn Ser Ser  
 145 150 155 160

Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro  
 165 170 175

[0010] Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser  
 180 185 190

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser  
 195 200 205

Leu Thr Ile Ser Gly Leu Arg Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 210 215 220

Ser Cys Xaa Xaa Xaa Leu His Trp Ala Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 225 230 235 240

Leu Ala Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser  
 245 250

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 6

Trp Pro Gly Tyr Arg Lys Ala  
1                    5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 7

His Trp Pro Arg Leu Trp Arg Phe Pro Leu  
1                    5                    10

[0011]

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 8

Ile Thr Gly Cys Glu Cys Thr  
1                    5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 9  
Ala Ala Val Cys Asn Gly Arg Pro Asp Thr  
1                   5                   10

<210> 10  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 10  
Ser Tyr Cys Ala Ser Lys Gly His Trp Leu  
1                   5                   10

[0012]

<210> 11  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 11  
Val Leu Asn Met His Trp Ala Asn  
1                   5

<210> 12  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 12  
Ser Cys Ile Arg Gly Leu Lys Ala Ala Tyr  
1                   5                   10



<222> (8).. (8)

<223> Pro、Lys 或 Asp

<400> 14

Xaa Trp Pro Cys Xaa Xaa Arg Xaa Thr

1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2).. (2)

<223> 可能存在或可能不存在

[0014]

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3).. (3)

<223> Val、Ala、Ile 或不存在

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4).. (4)

<223> Leu、Ser、Arg 或 Tyr

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (5).. (5)

<223> Asn、Lys、Gly 或 Ser

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (10).. (10)

<223> Leu、Ala 或 Thr

<400> 15

Ser Cys Xaa Xaa Xaa Leu His Trp Ala Xaa



<210> 19  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 19  
 gaccatgatt acgccaagct tggctagcca tatgtctaga atggcagaag ttcagctggt 60

<210> 20  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成引物

[0016] <400> 20  
 atccagtgat ttttttctcg tcgacctega gtgcggccgc acccagaact gccagtttgg 60

<210> 21  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 21  
 Val Ser Gly Gly Gly  
 1 5

<210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 22

Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Glu

1 5

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 23

Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

1 5 10

[0017]

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 24

Ile Tyr Glu Asp Ser Lys

1 5

<210> 25

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 25

Arg Pro Gln Leu Pro Gln Pro Pro Pro Gln Ala Gln Pro Arg Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Lys



<210> 26  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(19)  
 <223> C 末端生物素

<400> 26  
 Arg Pro Gln Leu Pro Gln Pro Pro Pro Gln Ala Gln Pro Arg Gly Gly  
 1                    5                    10                    15

Gly Ser Lys

[0018]

<210> 27  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 27  
 Pro Gly Pro Ala Val Ala Glu Glu Pro Leu His Arg Pro Gly  
 1                    5                    10

<210> 28  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(14)  
 <223> C 末端生物素

<400> 28



<210> 32  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 32  
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 1                    5                    10                    15

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
                   20                    25                    30

Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
                   35

[0020]

<210> 33  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 33  
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 1                    5                    10                    15

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
                   20                    25                    30

<210> 34  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 34  
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 1                    5                    10                    15

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 20 25 30

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 35 40 45

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 50 55 60

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 65 70 75 80

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 85 90 95

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 100

[0021]

- <210> 35
- <211> 73
- <212> PRT
- <213> 智人

<400> 35  
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 1 5 10 15

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 20 25 30

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 35 40 45

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 50 55 60

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
65 70

- <210> 36
- <211> 150
- <212> PRT
- <213> 智人

<400> 36  
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 1 5 10 15

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 20 25 30

[0022] Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 35 40 45

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 50 55 60

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 65 70 75 80

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 85 90 95

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 100 105 110

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 115 120 125

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 130 135 140

Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 145 150

<210> 37  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 鼠属物种

<400> 37  
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 1 5 10 15

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 20 25 30

[0023]

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 35 40 45

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 50 55 60

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 65 70 75 80

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 85 90 95

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 100 105 110

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 115 120

<210> 38  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 6xHis 标签

<400> 38  
 His His His His His His  
 1 5

<210> 39  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 39  
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 1 5 10 15

[0024]

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 20

<210> 40  
 <211> 758  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 40  
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly  
 1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His  
 20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu  
 35 40 45

	Gln	Thr	Pro	Thr	Glu	Asp	Gly	Ser	Glu	Glu	Pro	Gly	Ser	Glu	Thr	Ser	
	50						55					60					
	Asp	Ala	Lys	Ser	Thr	Pro	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Thr	Ala	Pro	Leu	Val	
	65					70					75					80	
	Asp	Glu	Gly	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Ala	Ala	Ala	Gln	Pro	His	Thr	Glu	
					85					90					95		
	Ile	Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Ala	Glu	Glu	Ala	Gly	Ile	Gly	Asp	Thr	Pro	
				100					105						110		
	Ser	Leu	Glu	Asp	Glu	Ala	Ala	Gly	His	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Glu	Ser	
			115					120						125			
[0025]	Gly	Lys	Val	Val	Gln	Glu	Gly	Phe	Leu	Arg	Glu	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	
	130						135						140				
	Leu	Ser	His	Gln	Leu	Met	Ser	Gly	Met	Pro	Gly	Ala	Pro	Leu	Leu	Pro	
	145					150					155					160	
	Glu	Gly	Pro	Arg	Glu	Ala	Thr	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Thr	Gly	Pro	Glu	
				165						170					175		
	Asp	Thr	Glu	Gly	Gly	Arg	His	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Lys	His	Gln	Leu	
				180						185					190		
	Leu	Gly	Asp	Leu	His	Gln	Glu	Gly	Pro	Pro	Leu	Lys	Gly	Ala	Gly	Gly	
			195					200						205			
	Lys	Glu	Arg	Pro	Gly	Ser	Lys	Glu	Glu	Val	Asp	Glu	Asp	Arg	Asp	Val	
	210						215					220					





	Ala Lys Thr Leu Lys Asn Arg Pro Cys Leu Ser Pro Lys His Pro Thr				
		405	410	415	
	Pro Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ile Gln Pro Ser Ser Pro Ala Val Cys				
		420	425	430	
	Pro Glu Pro Pro Ser Ser Pro Lys Tyr Val Ser Ser Val Thr Ser Arg				
		435	440	445	
	Thr Gly Ser Ser Gly Ala Lys Glu Met Lys Leu Lys Gly Ala Asp Gly				
		450	455	460	
	Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys				
		465	470	475	480
[0027]	Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro				
		485	490	495	
	Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser				
		500	505	510	
	Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg				
		515	520	525	
	Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala				
		530	535	540	
	Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu				
		545	550	555	560
	Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys				
		565	570	575	

	Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val		
	580	585	590
	Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys		
	595	600	605
	Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln		
	610	615	620
	Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly		
	625	630	635 640
	Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val		
	645	650	655
[0028]	Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly		
	660	665	670
	Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile		
	675	680	685
	Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp		
	690	695	700
	His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr		
	705	710	715 720
	Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met		
	725	730	735
	Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser		
	740	745	750
[0029]	Leu Ala Lys Gln Gly Leu		
	755		

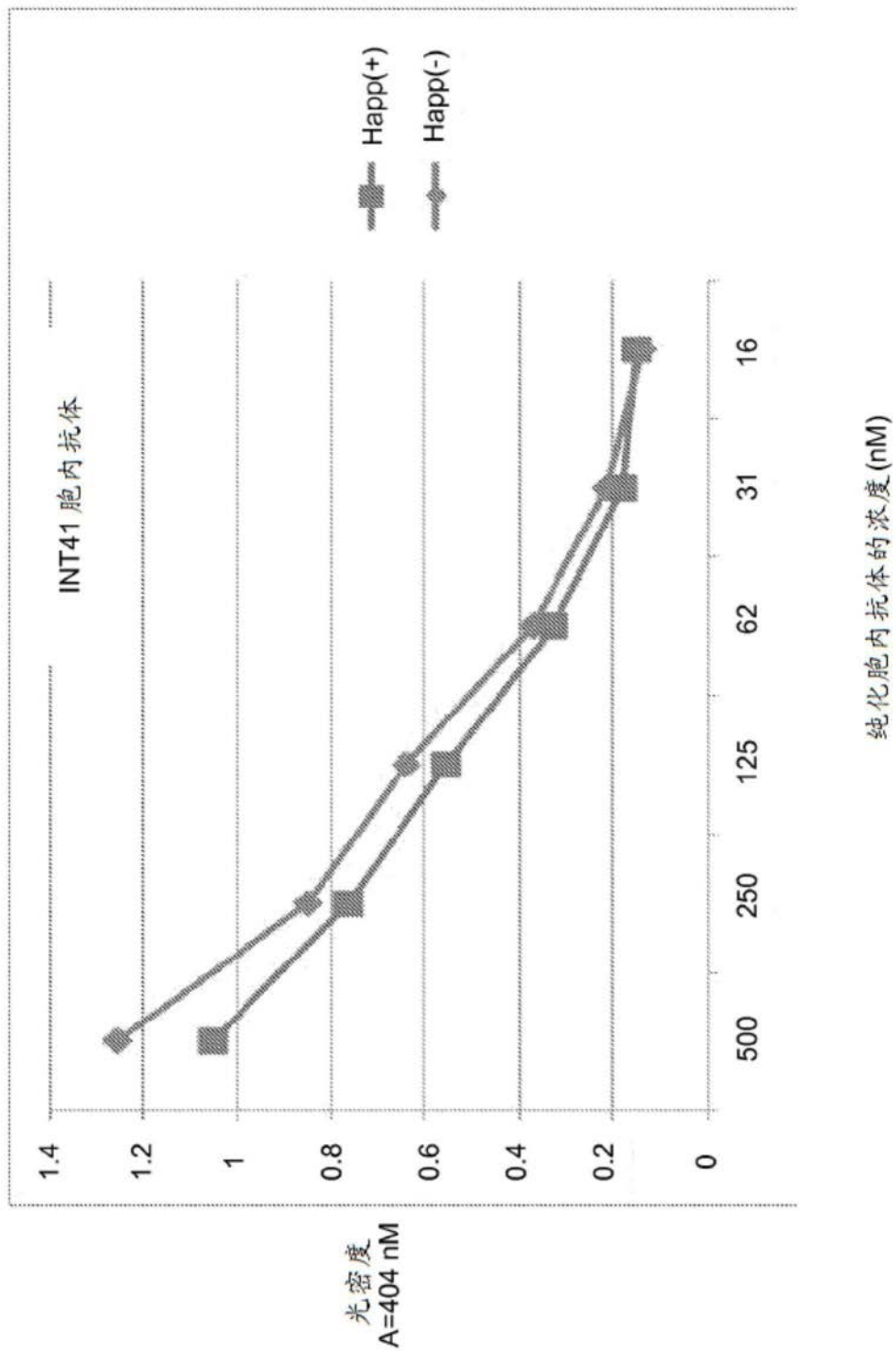


图1a

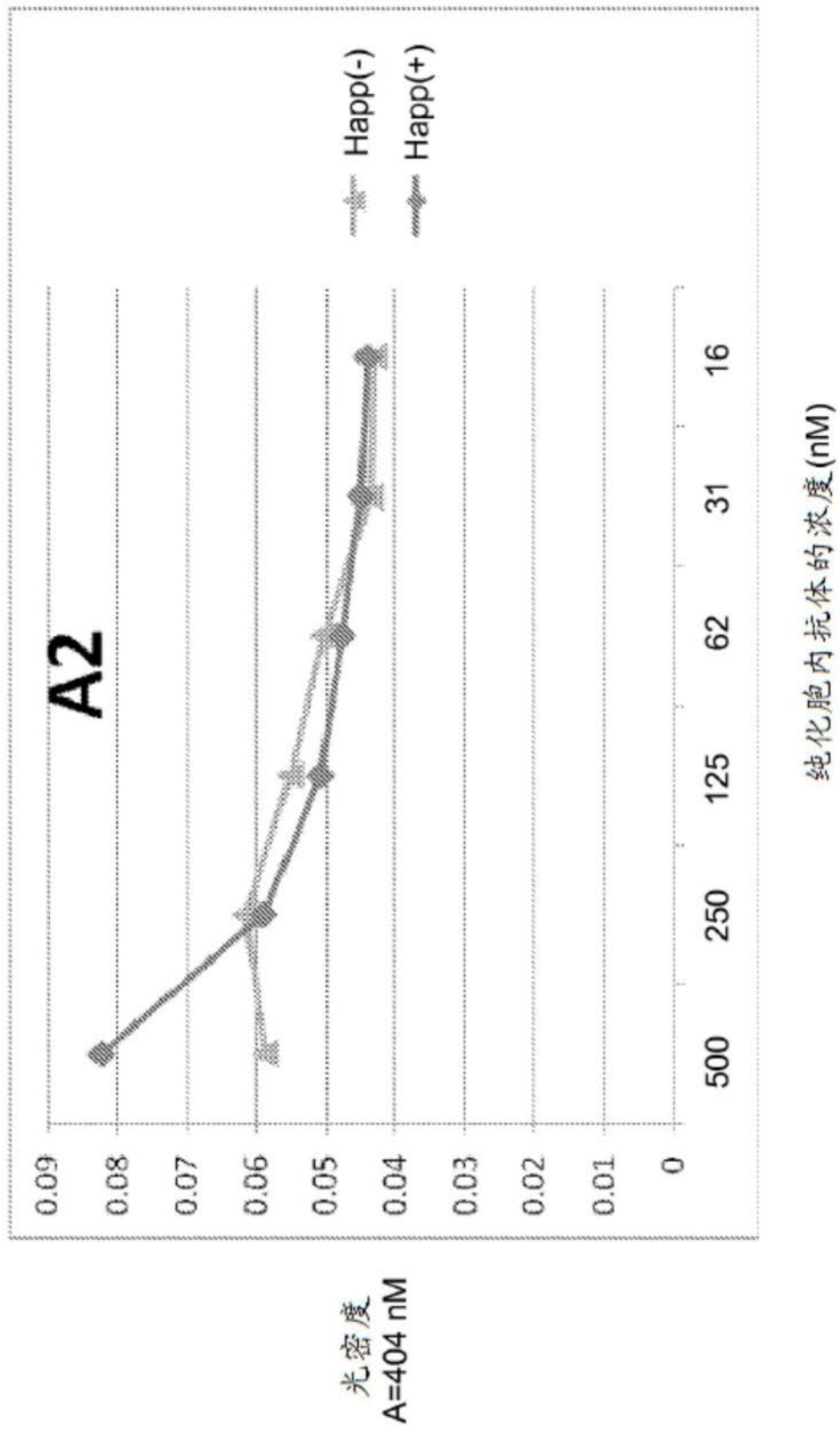


图1b

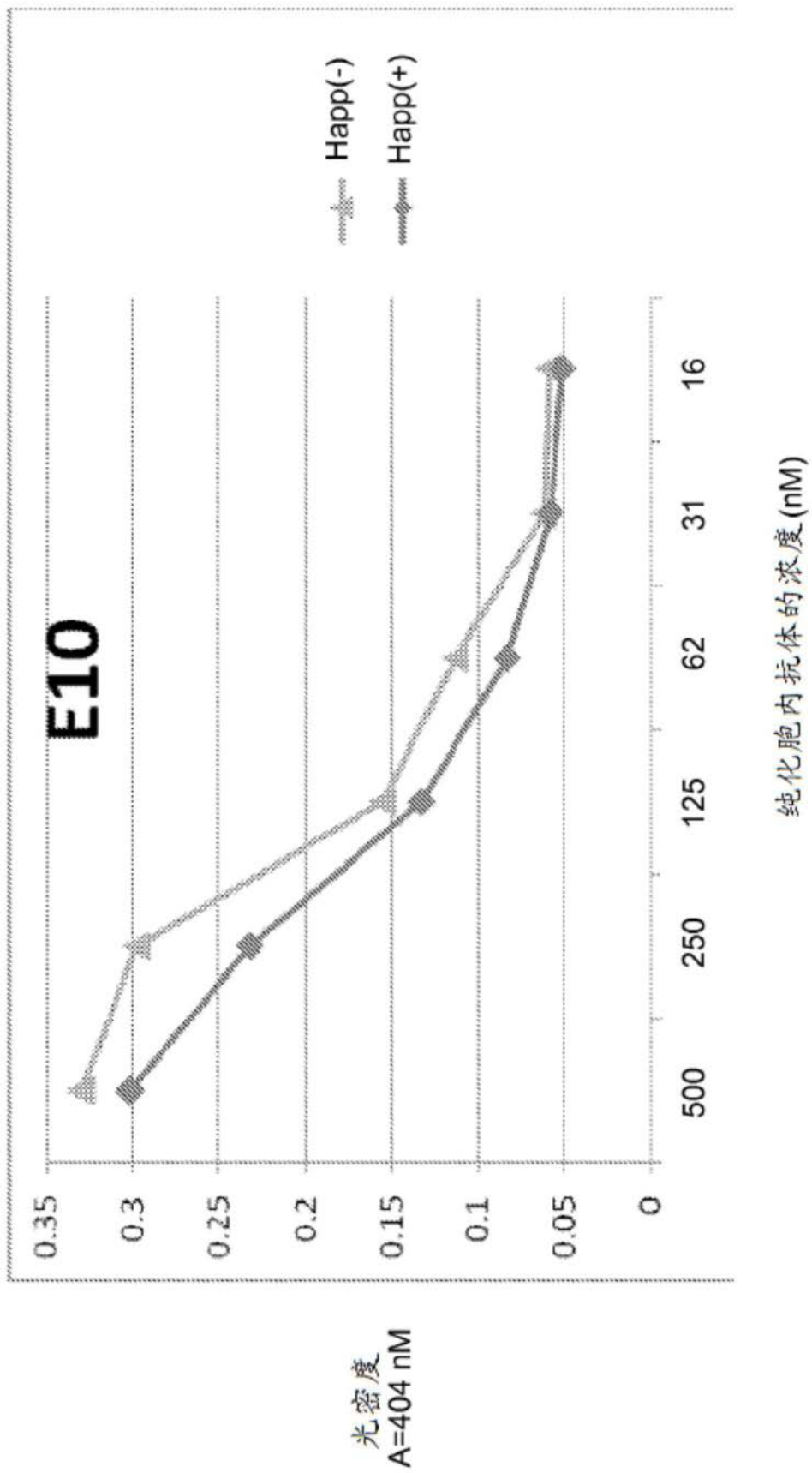


图1c

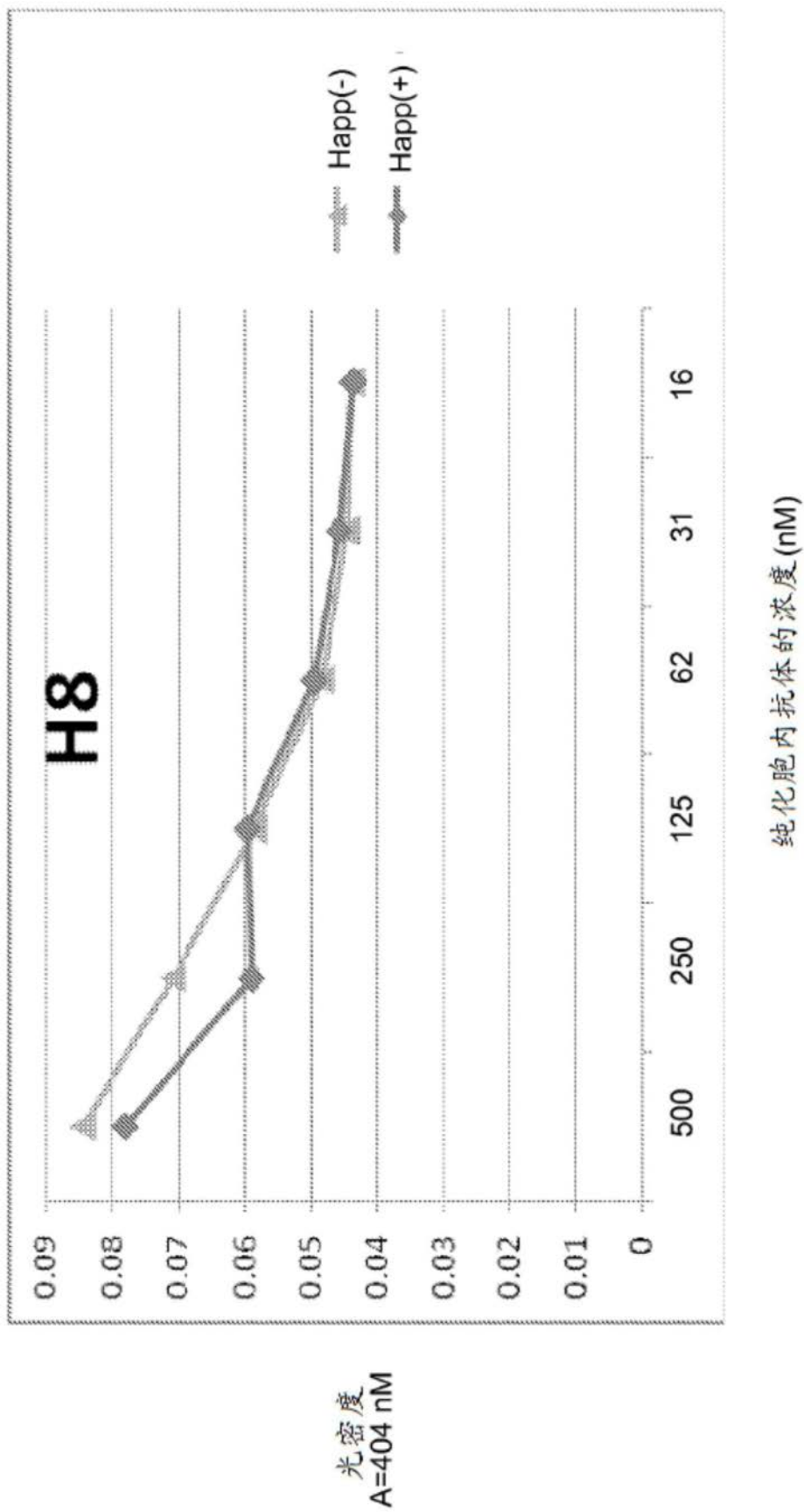


图1d





VH~CDR3		VL~CDR3	
SEQ ID NO	起始位置在 100	SEQ ID NO	起始位置在 225
SEQ ID NO: 7	0123456789 HWPRLWRPPL	SEQ ID NO: 11	56789012345 --VLMHWAN
SEQ ID NO: 6	--WPGYR--KA	SEQ ID NO: 10	SYCASKGHWL~
SEQ ID NO: 8	ITGCEC--T	SEQ ID NO: 12	S~CIRGLKAAAY
SEQ ID NO: 9	AAVCNCRPDT	SEQ ID NO: 13	G---YSLLEFVL
SEQ ID NO: 14	XWPCXX-XT	SEQ ID NO: 15	S-XXXXLHWAX

VHCDR1= 氨基酸位置	8-12	VSCGG	SEQ ID NO: 21
VHCDR2= 氨基酸位置	50-58	VSSISSSE	SEQ ID NO: 22
VLCDR1= 氨基酸位置	158-167	AGTSSDVGGY	SEQ ID NO: 23
VLCDR2= 氨基酸位置	185-190	IYEDSK	SEQ ID NO: 24

图3

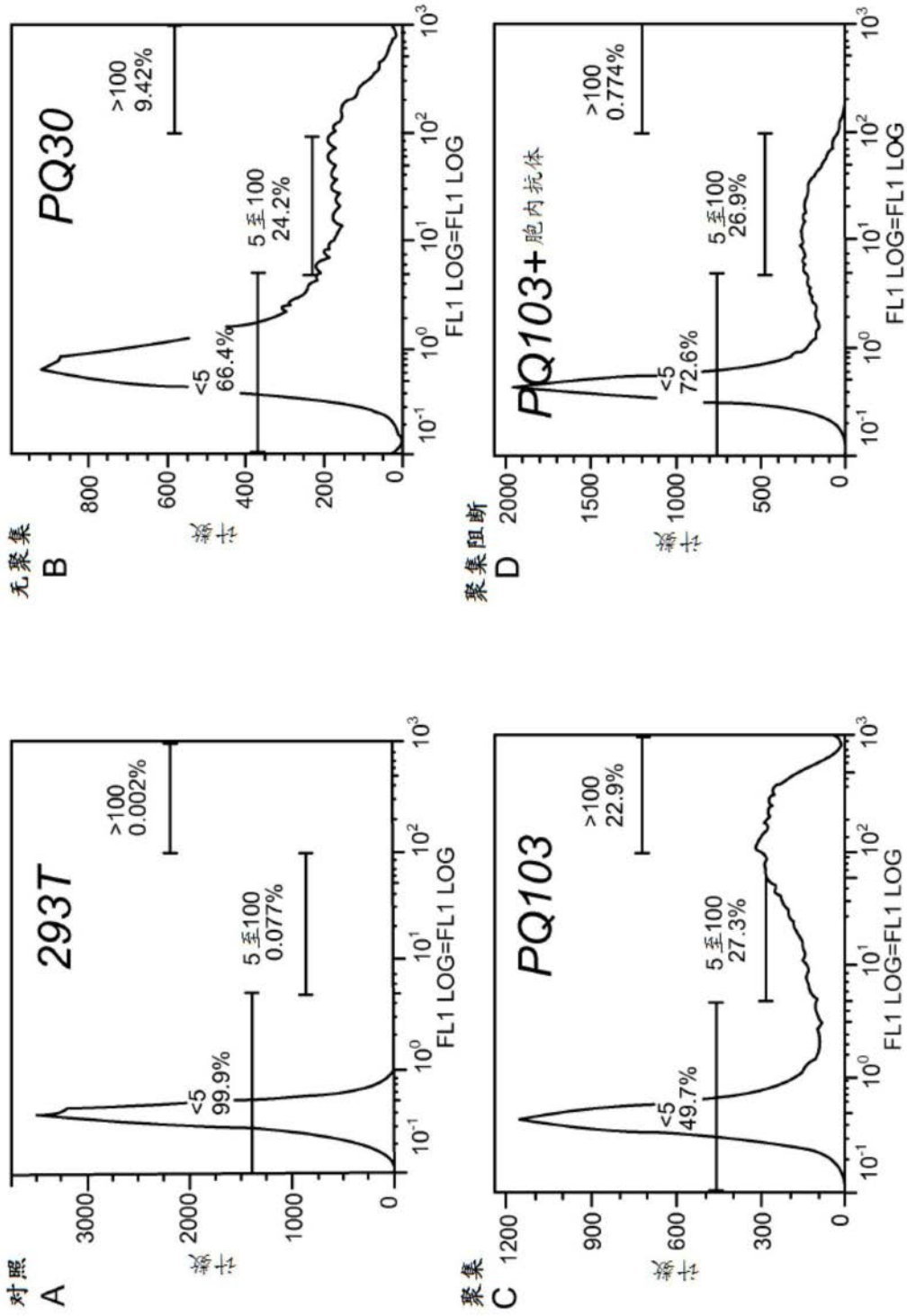
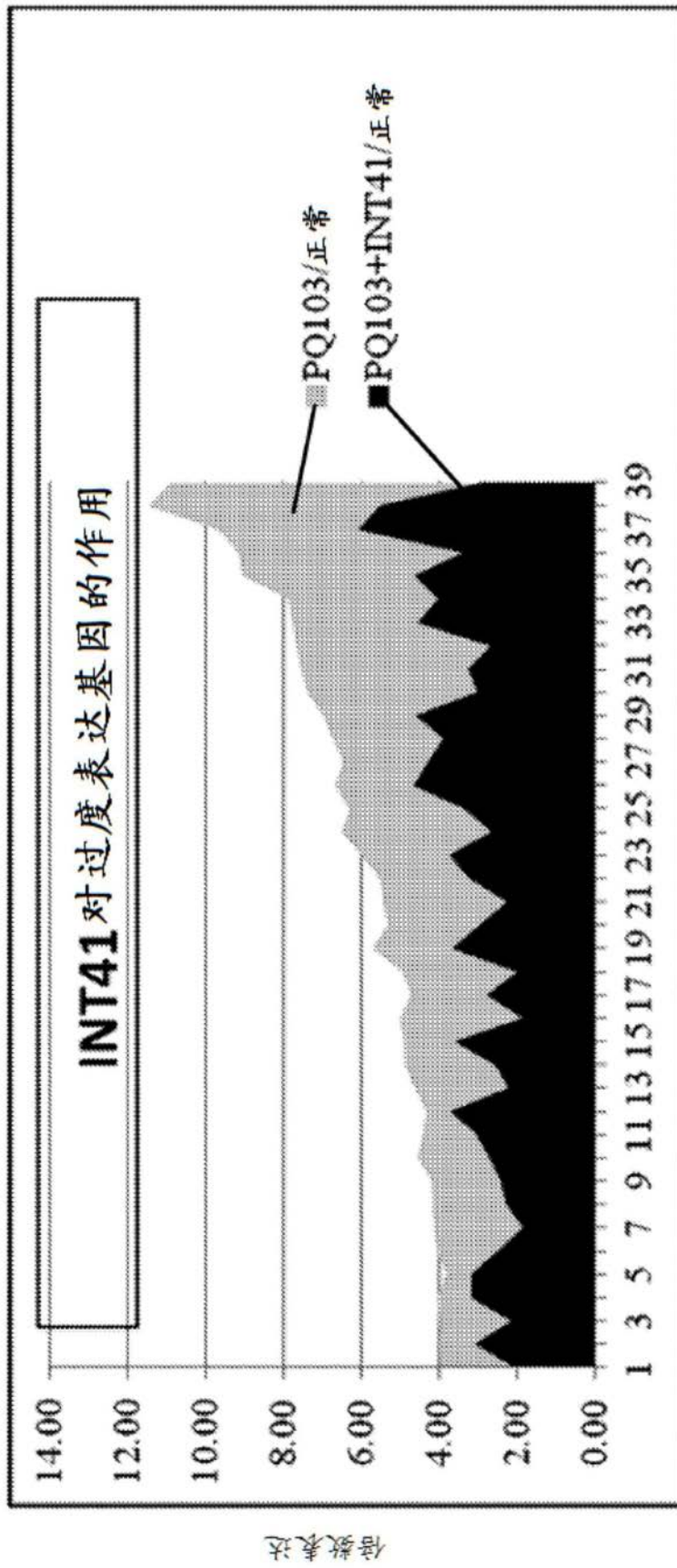


图4

60k细胞 - 设置改变的FL1 430增加1

样品	质粒	#总细胞	#门控的细胞	gfp 荧光 ( 100% )		
				<5	5至100	>100
<u>0</u>	<u>293T</u>	<u>60056</u>	<u>54741</u>	<u>99.9</u>	<u>0.007</u>	<u>0.002</u>
<u>1</u>	<u>293T + pQ30</u>	<u>61847</u>	<u>57796</u>	<u>66.4</u>	<u>24.2</u>	<u>9.42</u>
<u>2</u>	<u>293T + pQ103</u>	<u>61175</u>	<u>53637</u>	<u>49.7</u>	<u>27.3</u>	<u>22.9</u>
<u>3</u>	<u>293T + pQ103 + Happ1t</u>	<u>63302</u>	<u>59979</u>	<u>72.6</u>	<u>26.9</u>	<u>0.774</u>
<u>4</u>	<u>293T + pQ103 + 38.1 (INT41)</u>	<u>61358</u>	<u>57579</u>	<u>71.6</u>	<u>27.3</u>	<u>1.41</u>
<u>5</u>	<u>293T + pQ103 + 41.2</u>	<u>61575</u>	<u>58185</u>	<u>72.8</u>	<u>25.6</u>	<u>1.83</u>
<u>6</u>	<u>293T + pQ103 + 41.3</u>	<u>62168</u>	<u>58913</u>	<u>72</u>	<u>25.7</u>	<u>2.57</u>

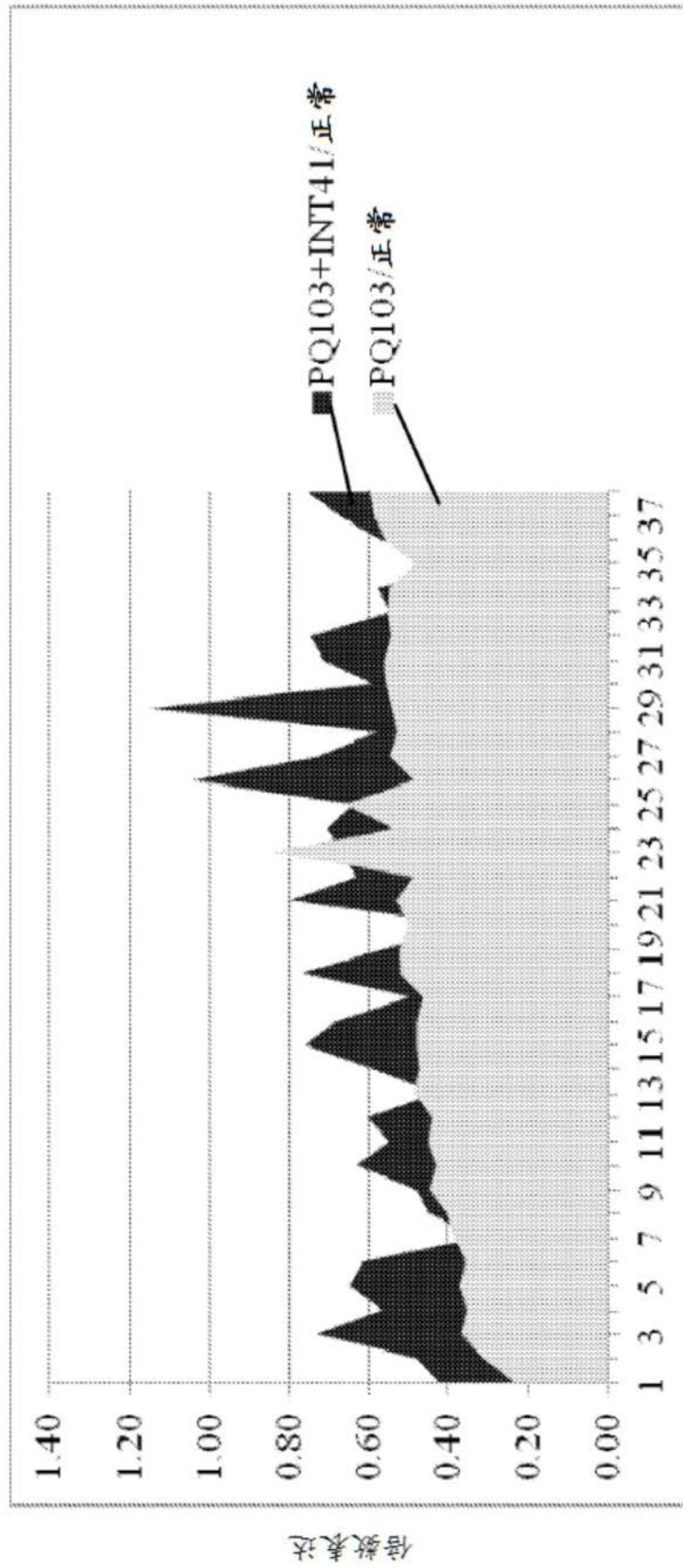
图5



代表性过度表达基因

图6

### INT41对表达不足基因的作用



代表性表达不足基因

图7

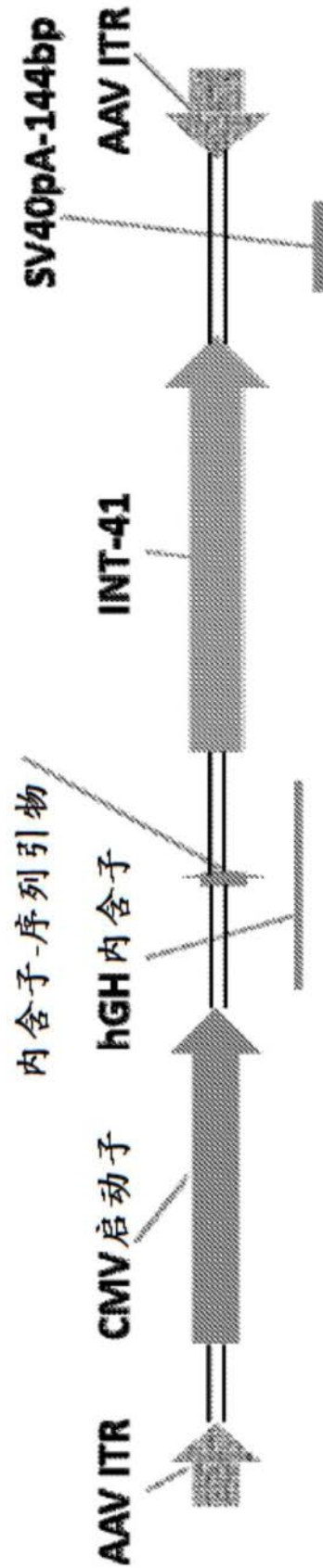


图8



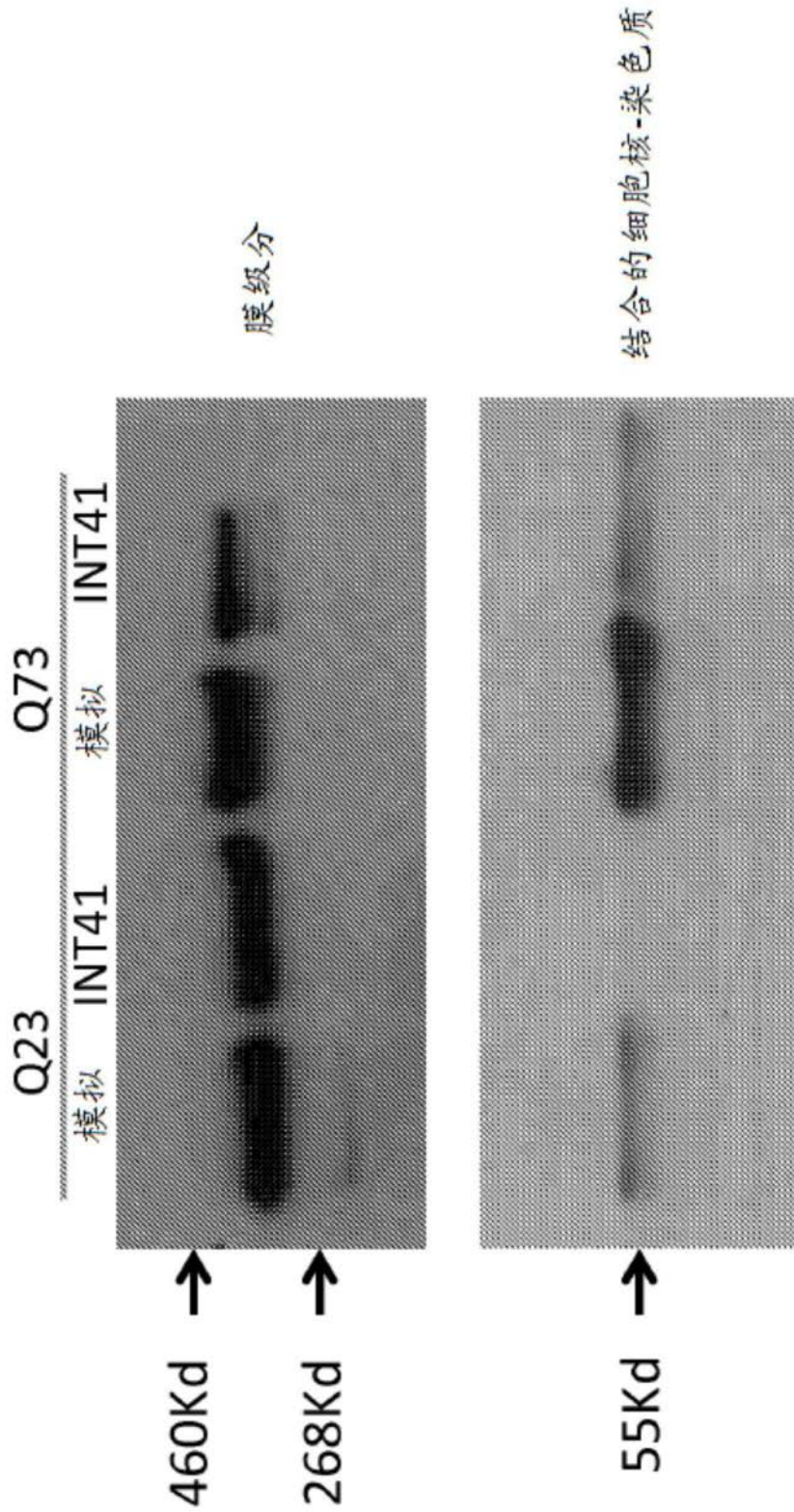


图9



图10



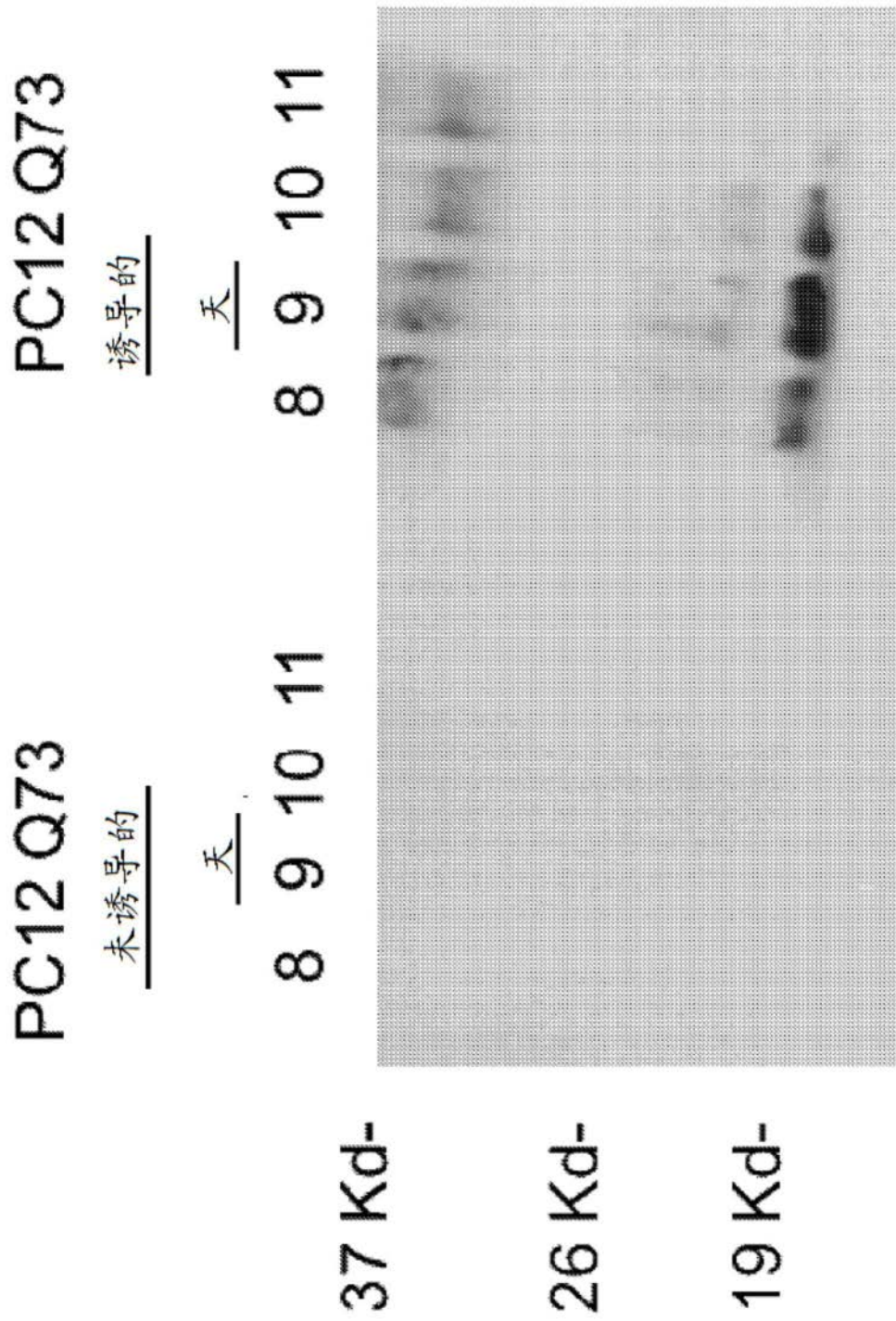


图11

1 maerqefev medhagtygl gdrkdqggyt mhqdqegtdt aglkesplqt ptedgseepp  
 61 setsdakstp taedvtapl v degapgkqaa aqphteipeg ttaeeagigd tpsledeaaag  
 121 hvtqepesgk vvqegflrep **gpp**glshqlm sgmpgapllp egpreatrqp sgtgpedteg  
 181 grhapellkh qlldlhqeg pplkgaggke rpgskeevde drdvdesppq dsppska  
 241 qdgrppqtaa reatsipgfp aegai**plp**vvd flskvsteip asepdgpsvg rakgqdaple  
 301 ftfhveitpn vqkeqahsee hlgraaafpga pgegpeargp slgedtkead **lpep**sekqpa  
 361 aaprgkpvsvr vpqlkarmvs kskdgtgsdd kkaktstrss aktlknrpcl spkh**ptp**gss  
 421 dpliqpsspa vc**pepp**sspk yvssvtstrtg ssgakemklk gadgktkiat prgaappgqk  
 481 gqanatripa k**tppap**ktpp ssg**ep**pksgd rsgysspssp gtpgsrsrtp **slptp**trfp  
 541 kkavvrtpp kspssaksrl qta**pvp**mpdl knvkskigst enlkhqpggg kvqiinkkld  
 601 lsnvqskcgs kdnikhvppgg gsvqivykp v dlskvtskcg slgnihhkp gggvevksek  
 661 ldfkdrvqsk igsldnithv pgggnkkiet hkltfrenak aktdhgaeiv ykspvsvsgdt  
 721 sprhlsnvss tgsidmvdsp qlatladevs aslakqgl

图12

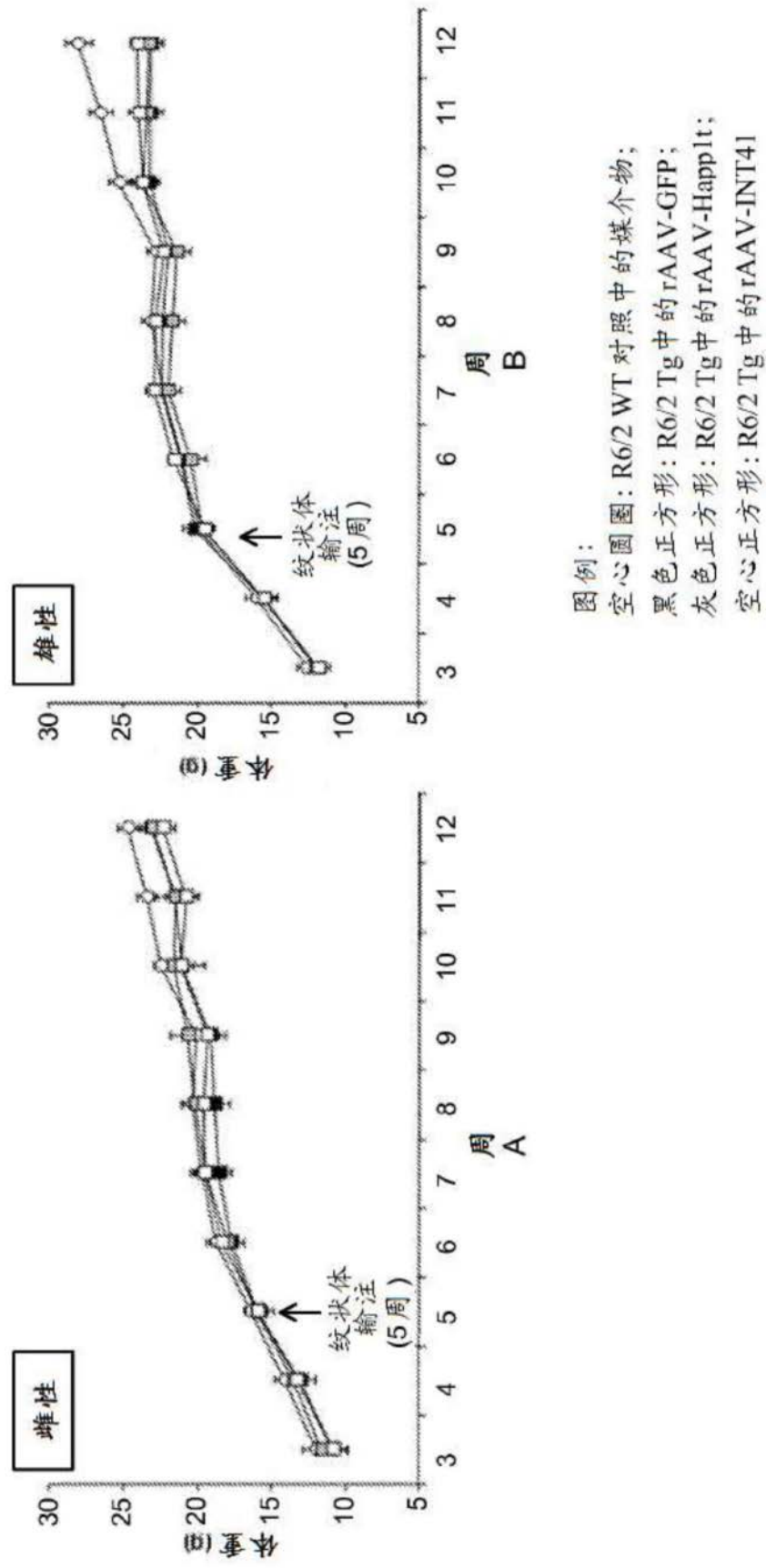


图13

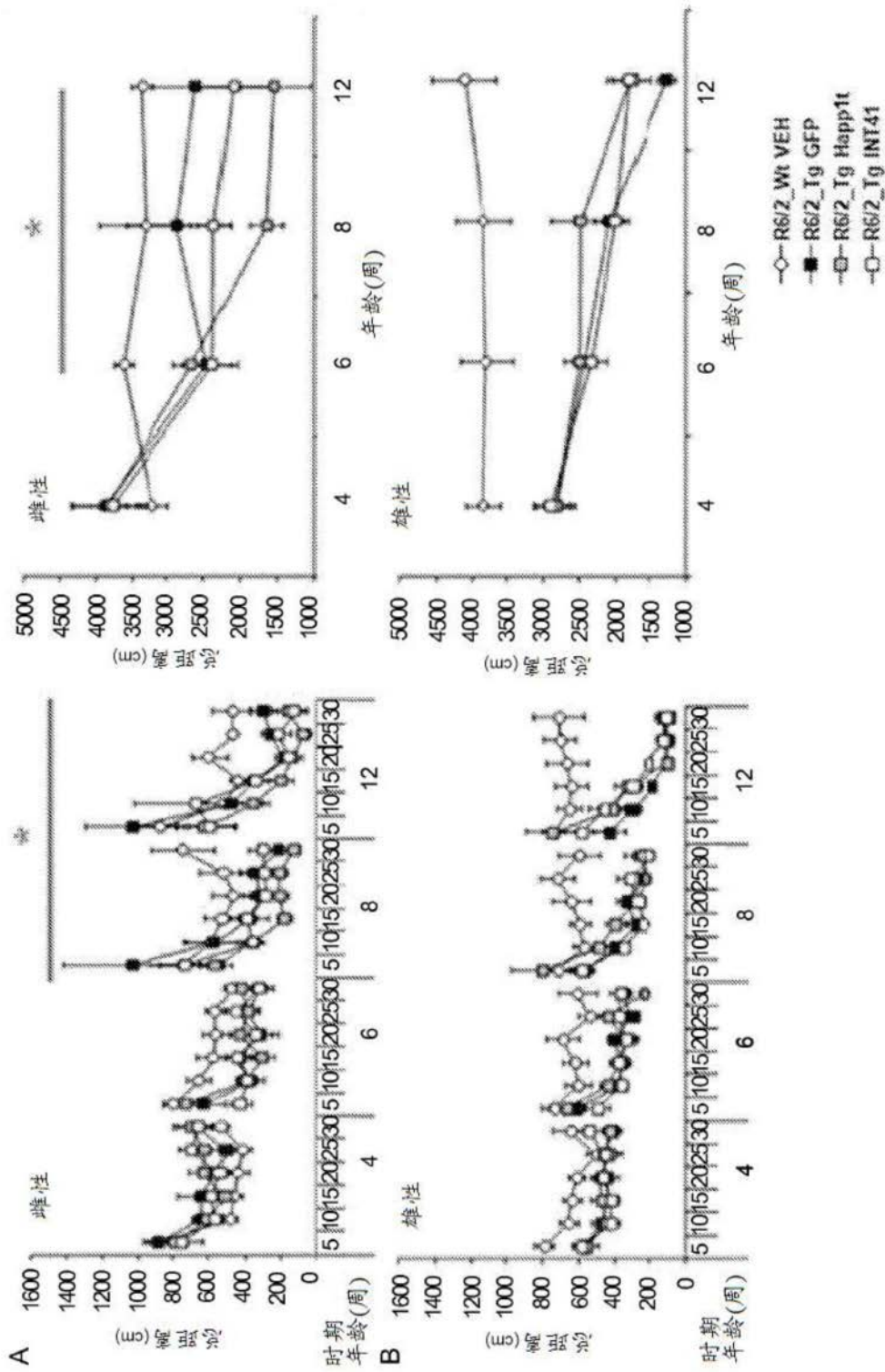


图14



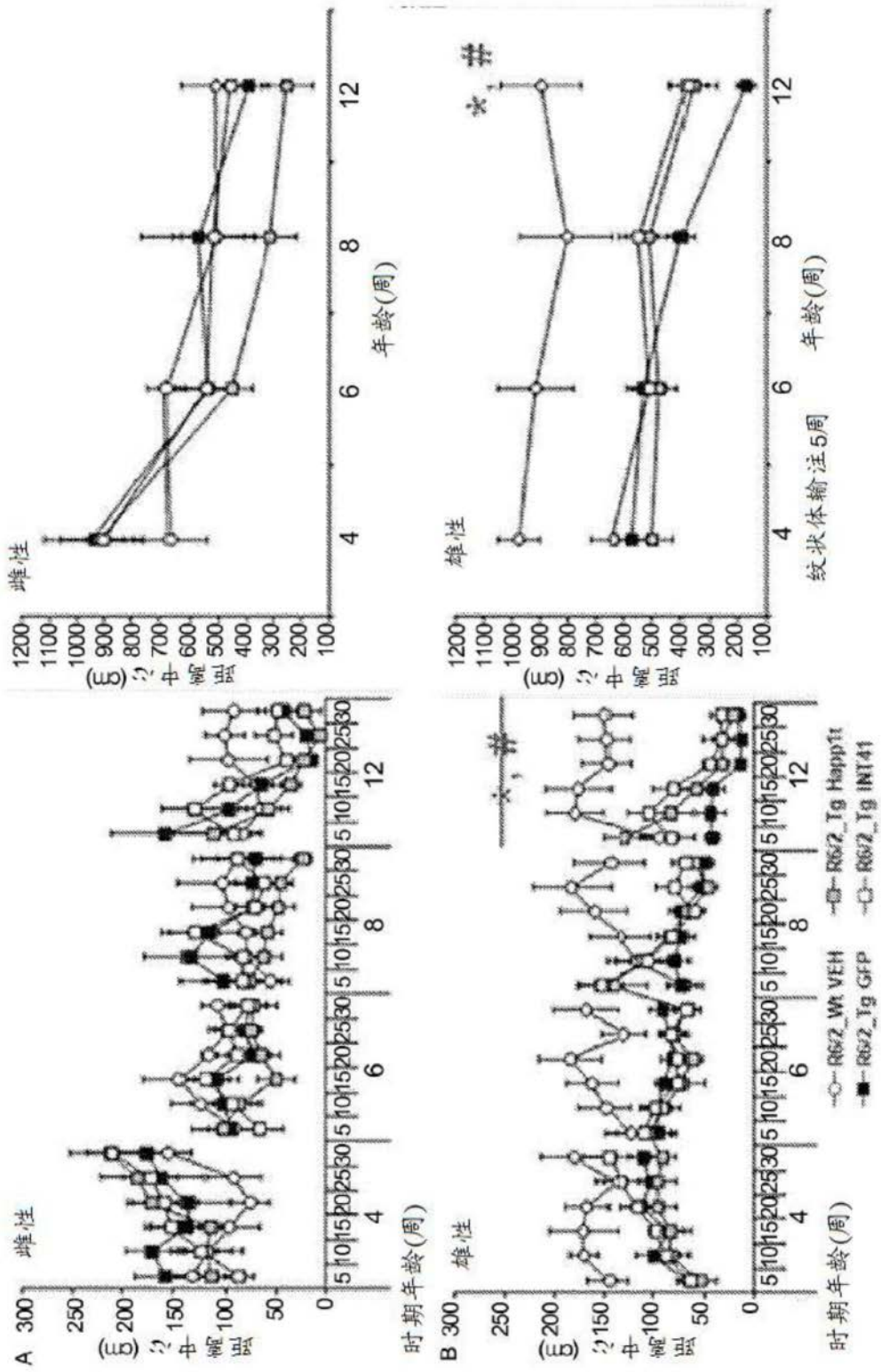


图15

基因型	处理	雌性	雄性
R6/2_Wt	VEH	5	9
	GFP	5	9
R6/2_Tg	Happ1t	5	9
	INT41	6	9

- R6/2\_Wt VEH
- R6/2\_Tg GFP
- R6/2\_Tg Happ1t
- R6/2\_Tg INT41

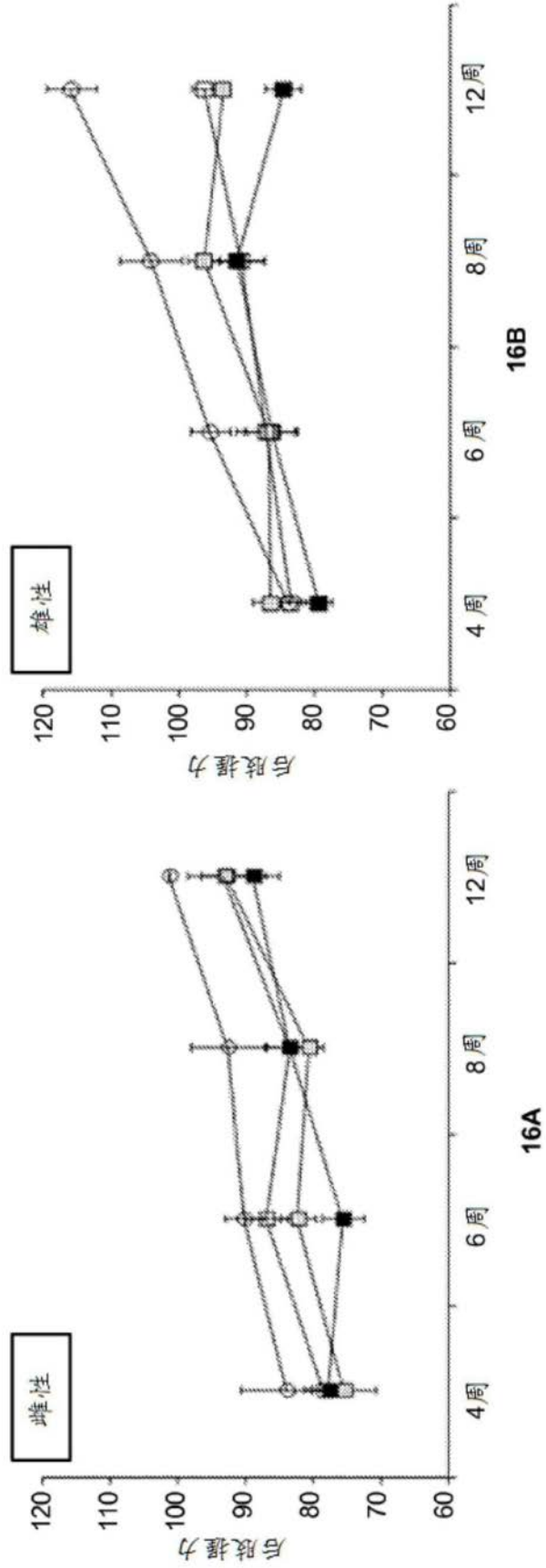


图16

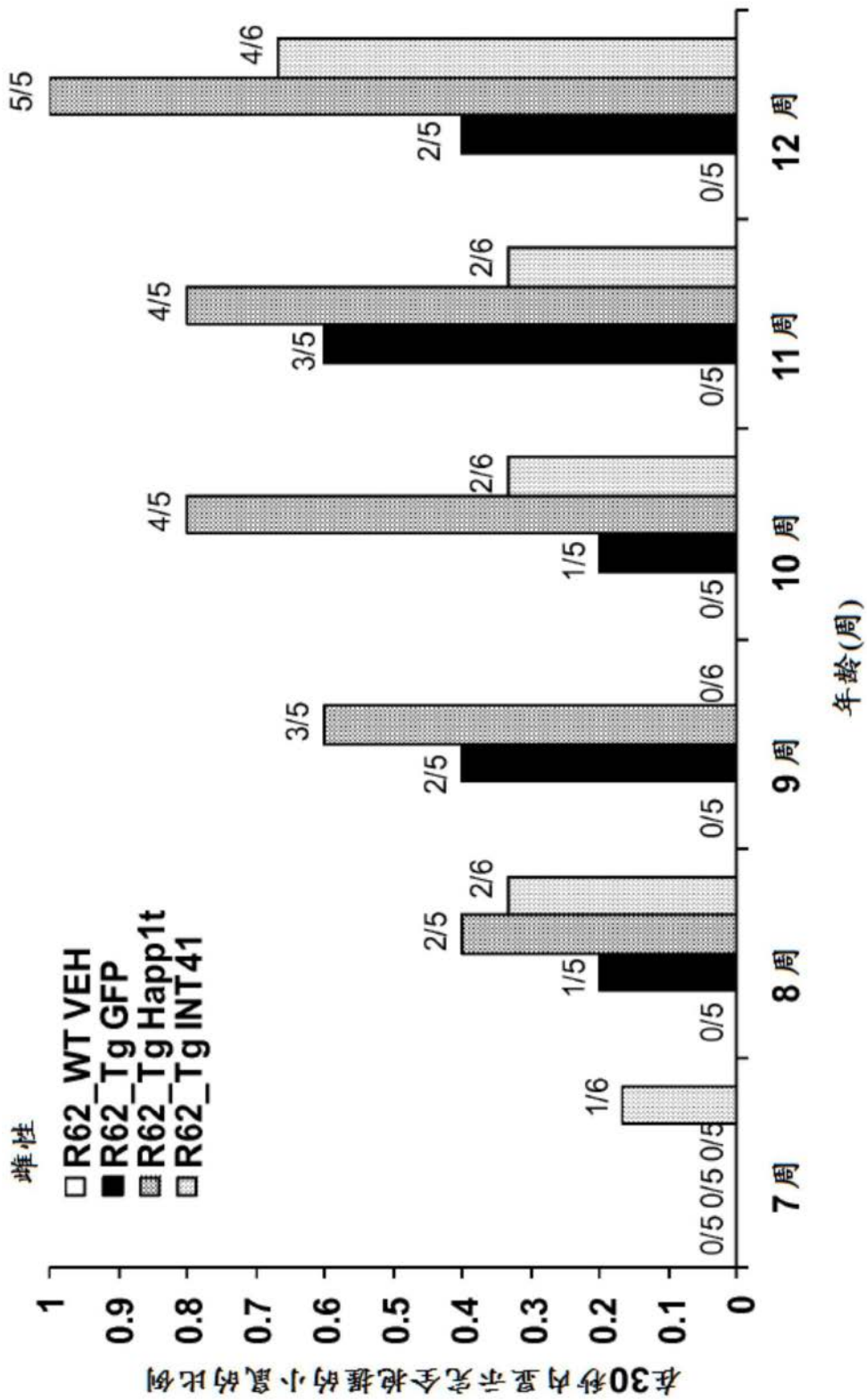


图17

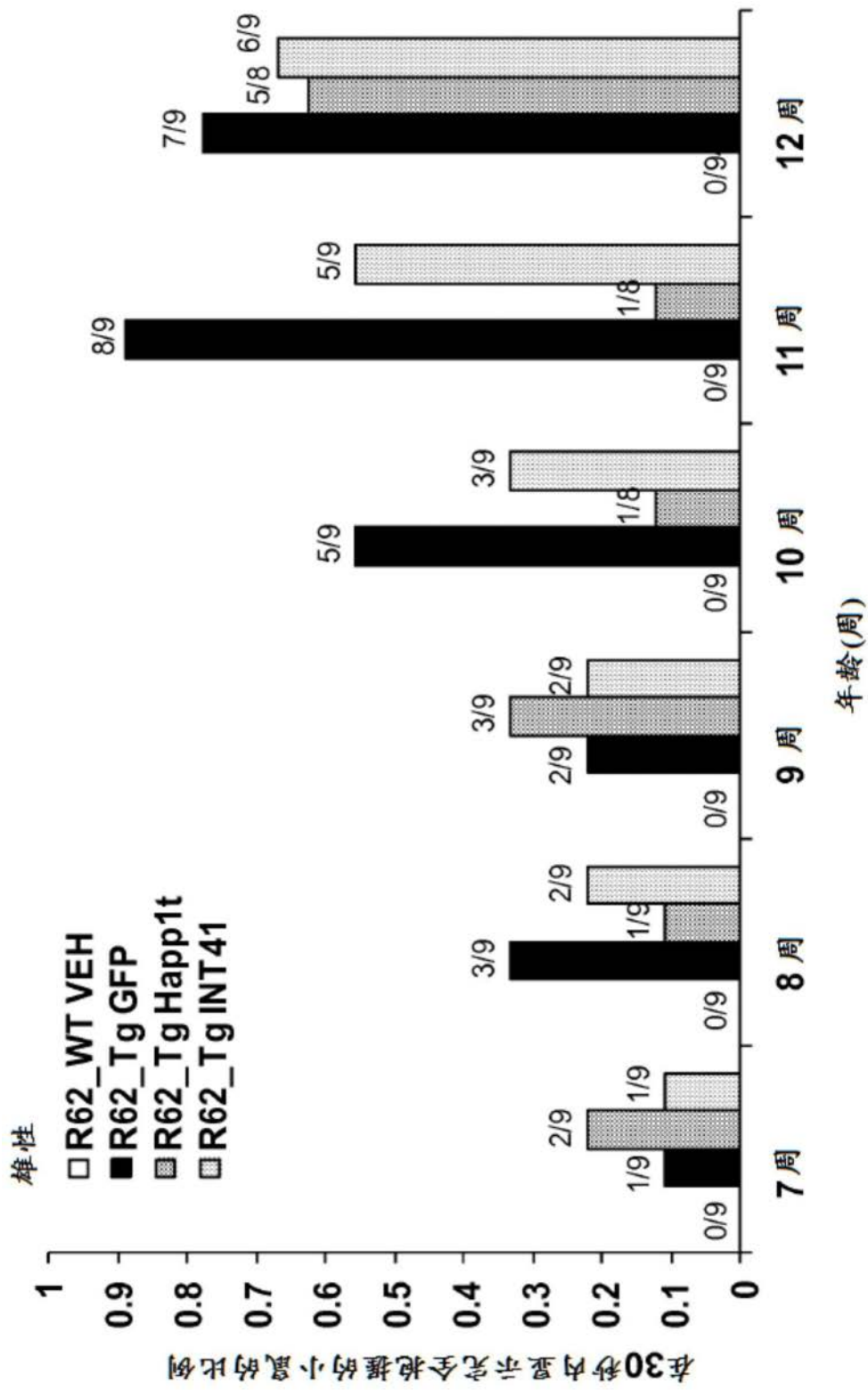


图18



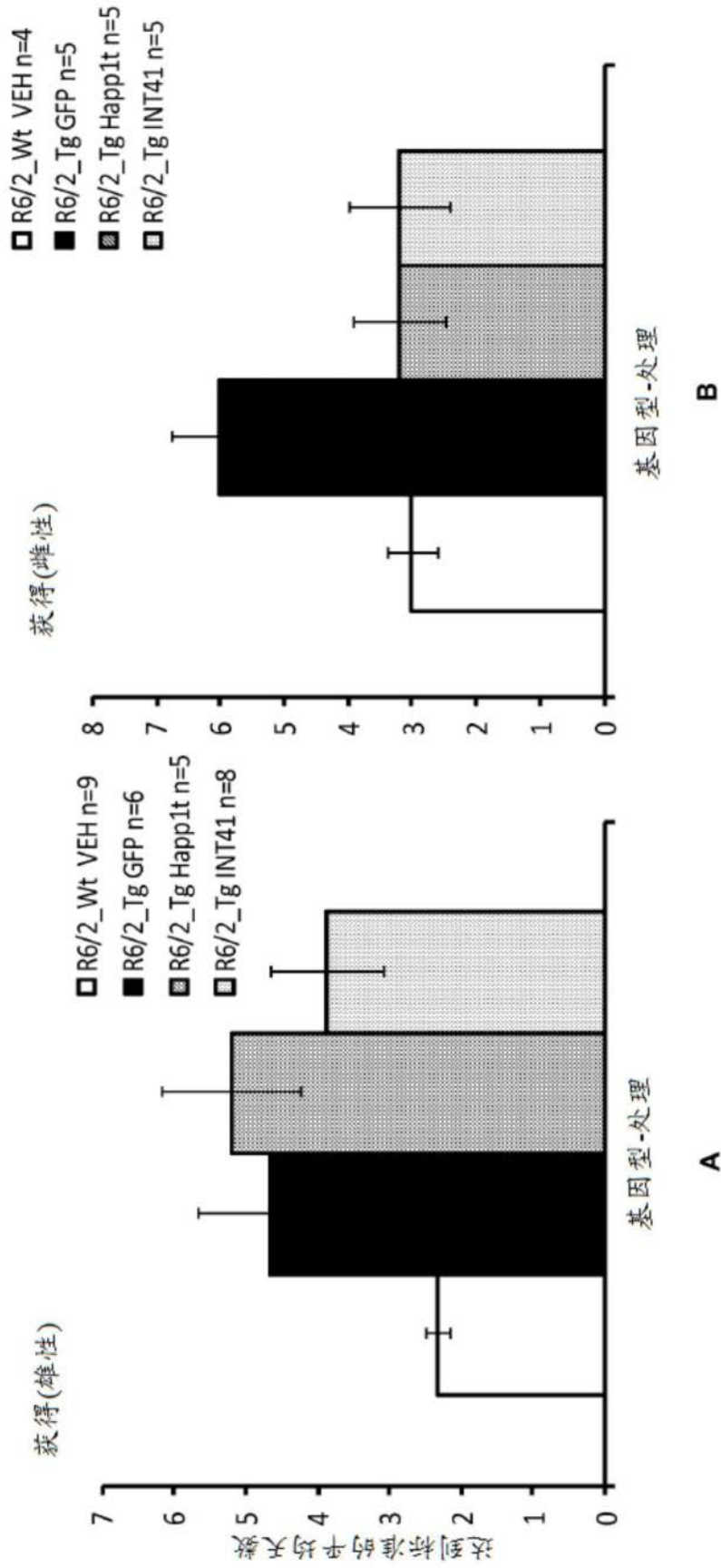


图19