

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480002213.2

[43] 公开日 2006年8月30日

[11] 公开号 CN 1826354A

[22] 申请日 2004.1.13

[21] 申请号 200480002213.2

[30] 优先权

[32] 2003.1.14 [33] AT [31] A36/2003

[32] 2003.9.17 [33] AT [31] A1464/2003

[86] 国际申请 PCT/EP2004/000162 2004.1.13

[87] 国际公布 WO2004/062556 英 2004.7.29

[85] 进入国家阶段日期 2005.7.14

[71] 申请人 阿法尔斯研发有限责任公司

地址 奥地利维也纳

[72] 发明人 弗兰克·马特纳

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 赵仁临 张平元

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 5 页

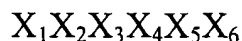
[54] 发明名称

预防和治疗阿尔茨海默病(AD)的方法

[57] 摘要

本发明涉及含有如下氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ 的化合物在制备用于阿尔茨海默病的疫苗中的用途, 其中 X_1 为除 C 以外的氨基酸, X_2 为除 C 以外的氨基酸, X_3 为除 C 以外的氨基酸, X_4 为除 C 以外的氨基酸, X_5 为除 C 以外的氨基酸, X_6 为除 C 以外的氨基酸, 且其中 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ 不为 DAEFRH, 所述的化合物具有与天然 N-末端 $A\beta$ 42 序列 DAEFRH 的特异性抗体的结合能力且其 5-链节具有与天然 N-末端 $A\beta$ 42 序列 DAEFRH 的特异性所述抗体的结合能力。

1. 含有如下氨基酸序列的化合物在制备用于阿尔茨海默病(AD)的疫苗中的用途:



其中:

X_1 为除 C 以外的氨基酸;

X_2 为除 C 以外的氨基酸;

X_3 为除 C 以外的氨基酸;

X_4 为除 C 以外的氨基酸;

X_5 为除 C 以外的氨基酸;

X_6 为除 C 以外的氨基酸;

且其中 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ 不为 DAEFRH, 所述的化合物具有与天然 N-末端 A β 42 序列 DAEFRH 的特异性抗体结合的能力, 且其 5-链节具有与天然 N-末端 A β 42 序列 DAEFRH 的所述特异性抗体结合的能力。

2. 权利要求 1 的用途, 其特征在于所述的化合物含有肽或由肽组成, 其中:

X_1 为 G 或带有羟基的氨基酸或带负电荷的氨基酸, 优选 E、Y、S 或 D;

X_2 为疏水氨基酸或带正电荷的氨基酸, 优选 I、L、V、K、W、R、Y、F 或 A;

X_3 为带负电荷的氨基酸, 优选 D 或 E;

X_4 为芳族氨基酸或 L, 优选 Y、F 或 L;

X_5 为 H、K、Y、F 或 R, 优选 H、F 或 R; 且

X_6 为 S、T、N、Q、D、E、R、I、K、Y 或 G, 优选 T、N、D、R、I 或 G,

尤其是 EIDYHR、ELDYHR、EVDYHR、DIDYHR、DLDYHR、DVDYHR、DIDYRR、DLDYRR、VDYRR、DKELRI、DWELRI、YREFFI、YREFRI、YAEFRG、EAEFRG、DYEFRG、ELEFRG、DRELRI、DKELKI、DRELKI、GREFRN、EYEFRG、DWEFRDA、SWEFRT、DKELR 或 SFEFRG。

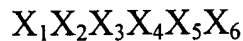
3. 权利要求 1 或 2 的用途, 其特征在于所述的化合物为含有 5-15 个氨基酸残基的多肽。

4. 权利要求 1-3 中任意一项的用途, 其特征在於所述的化合物与药物上可接受的载体、优选 KLH 且任选氢氧化铝偶联。

5. 权利要求 1-4 中任意一项的用途, 其特征在於它含有用量为 0,1 ng-10 mg, 优选 10 ng-1 mg, 尤其是 100 ng-100 μ g 的化合物。

6. 分离与天然 N-末端 A β 42 序列 DAEFRH 的特异性抗体结合的化合物的方法, 包括下列步骤:

- 提供含有肽的肽化合物文库, 所述的肽含有如下氨基酸序列:



其中:

X₁ 为除 C 以外的氨基酸;

X₂ 为除 C 以外的氨基酸;

X₃ 为除 C 以外的氨基酸;

X₄ 为除 C 以外的氨基酸;

X₅ 为除 C 以外的氨基酸;

X₆ 为除 C 以外的氨基酸;

且其中 X₁X₂X₃X₄X₅X₆ 不为 DAEFRH;

- 使所述的肽文库与所述的抗体接触; 和

- 分离与所述抗体结合的肽文库中那些成员。

7. 权利要求 6 的方法, 其特征在於在所述的文库中提供个体化的所述肽, 尤其是固定在固体表面的所述肽。

8. 权利要求 6 或 7 的方法, 其特征在於所述的抗体包括合适的标记, 该标记在与所述库中的肽结合时能够得到检测或分离。

9. 抗阿尔茨海默病的疫苗, 含有包括至少一种选自下列组中的肽的抗原: EI-DYHR、ELDYHR、EVDYHR、DIDYHR、DLDYHR、DVDYHR、DIDYRR、DLDYRR、DVDYRR、DKELRI、DWELRI、YREFRI、YAEFRG、EAEFRG、DYEFRG、ELEFRG、DRELRI、DKELKI、DRELKI、GREFRN、EYEFRG、WEFRDA、SWEFRT、DKELR 或 SFEFRG。

预防和治疗阿尔茨海默病(AD)的方法

本发明涉及用于预防和治疗阿尔茨海默病(AD)的方法。

淀粉样蛋白- β 肽(AS)在阿尔茨海默病(AD)的神经病理学中起重要作用(Roher等1993: " β -淀粉样蛋白-(1-42)是脑血管淀粉样蛋白沉积物的主要成分: 阿尔茨海默病的病理学实质"-PNAS 90: 10836)。该病的家族型与淀粉样蛋白前体蛋白(APP)和早老素基因中的突变有关。在这些基因中与疾病相关的突变导致作为阿尔茨海默病的淀粉样蛋白斑中发现的主要形式的肽(A β 42)的42-氨基酸形式的产生增加。该病的动物模型是商购的。超表达突变体人APP(其中第717位上的氨基酸是F而不是V)的PDAPP转基因小鼠逐步发展成了年龄和脑依赖性形式的许多阿尔茨海默病的神经病理学标志(Games等, 1995:"超表达V717F S-淀粉样蛋白前体蛋白的转基因小鼠中的阿尔茨海默型神经病理学"-Nature 373: 523)。

已经使用"正常的"、非基于模拟表位的疫苗进行了疫苗接种研究。在AD-型神经病理学情况发作前(6周)或在老龄时(11个月)给转基因动物免疫接种聚集的A β 42, 给幼小的动物免疫接种可以预防发生蚀斑形成、神经炎性营养不良和星形神经胶质增生(astrogliosis)。治疗老龄动物明显减轻了AD-样神经病理学情况。这种实验性疫苗接种手段诱导针对能够通过血脑屏障并攻击淀粉样蛋白斑的A β 42的抗体产生(Schenk等, 1999:"用淀粉样蛋白- β 免疫接种弱化了PDAPP小鼠中的阿尔茨海默病样病理情况"-Nature 400: 173)。斑块随后通过几种机制除去, 包括Fc-受体介导的吞噬作用(Bard等, 2000:"外周给药的针对淀粉样蛋白 β -肽的抗体进入阿尔茨海默病小鼠模型的中枢神经系统并减轻病理情况"-Nature Med 6: 916)。这种疫苗也能够延缓记忆缺失(Janus等, 2000:"A β 肽免疫接种减轻了阿尔茨海默病模型中的行为缺陷并减少了斑块"-Nature 408:979)。

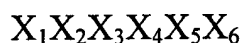
自1999年后期以来很有前途的AD免疫接种疗法已经用于临床。推测免疫接种可以引起免疫系统攻击斑块并从受侵害的人脑中清除这些沉积物, 不过, 确切的机理仍需要更具体地表征。

这些临床试验由药物公司 Elan 与其合伙人 American Home Products(治疗疫苗 AN-1792, QS21 作为佐剂)共同进行。I 期试验成功地在 2000 年中完成。II 期试验于 2001 年晚期开始以测试在患有轻度-中度 AD 的一组患者中的功效。

目前这些 II 期试验已经因在几位患者中出现的神经炎症而永久地终止(Editorial 2002"无法解决的问题?"-Nature Med 8: 191)。症状包括导致全世界范围的试验即刻终止的无菌性脑膜脑炎。在最恶化的病例情况中,证实受侵害的患者具有确定的自身免疫反应-在许多免疫疗法中固有的危害。预计自身免疫并发症产生同时普遍存在的 APP,它当然带有与其蛋白水解产物相同的抗原决定簇。近来集中在聚集的 A β 42 免疫接种诱导的抗体(在人和小鼠中)性质上的其它研究揭示出大部分抗体识别 A β 42 的第 4 和第 10 位氨基酸(A β 4-10)之间的小结构域。小鼠抗体能够阻断 A β 原纤维生成并破坏预先存在的 A β 纤维(McLaurin 等, 2002:"针对淀粉样蛋白-肽靶淀粉样蛋白- β 残基 4-10 并抑制细胞毒性和原纤维生成的治疗有效抗体"-Nature Med 8: 1263)。显然人抗体不与在细胞表面上接触的 APP 或任意其它前体的非聚集的蛋白水解产物反应(Hock 等, 2002:"对患有阿尔茨海默病的患者接种疫苗产生对 β -淀粉样蛋白具有特异性的抗体"-Nature Med 8: 1270)。在人与小鼠血清之间观察到明显差异:与人抗体相反,小鼠抗体检出单体、寡聚和纤维状 A β 。这具有重要性且可能是治疗功效的先决条件,因为积累的证据表明不由人抗-A β 识别的 A β 小寡聚体是该病中的主要毒性参与者(Walsh 等, 2002:"天然分泌的淀粉样蛋白 β 蛋白寡聚体有效抑制体内海马长时程增强"-Nature 416: 535)。因此,潜在的新策略在于使用含有 β -淀粉样蛋白氨基酸 4-10(而不是聚集的 A β 42)的疫苗进行免疫接种。尽管功效未知,这种策略也可能面对自身免疫问题,因为应对患者直接免疫接种(线性 B 细胞)"自身"表位。

尽管近来在 AD 疫苗接种策略中的这些研发令人失望,但是仍然将 A β 疫苗视为抗 AD 的最有希望的方法。然而,存在对 AD 疫苗接种中的改进和新策略的迫切需求。尤其是这类疫苗不应诱导自体反应的 T 和/或 B 细胞。

因此,本发明提供了含有如下氨基酸序列的化合物在制备用于阿尔茨海默病(AD)的疫苗中的用途:



其中:

X_1 为除 C 以外的氨基酸;

X_2 为除 C 以外的氨基酸;

X_3 为除 C 以外的氨基酸;

X_4 为除 C 以外的氨基酸;

X_5 为除 C 以外的氨基酸;

X_6 为除 C 以外的氨基酸;

且其中 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ 不为 DAEFRH, 所述的化合物具有与天然 N-末端 A β 42 序列 DAEFRH 的特异性抗体结合的能力, 且其 5-链节具有与天然 N-末端 A β 42 序列 DAEFRH 的所述特异性抗体结合的能力。

本发明的 A β 42 模拟表位用于对 AD 的疫苗接种: 该模拟表位诱导针对 A β 42、但不针对天然 APP 的抗体产生。使用(单克隆)抗体和(商购)肽文库鉴定该模拟表位(例如按照 Reineke 等, 2002 : "由 5520 个随机产生的序列的肽阵列鉴定不同的抗体表位和模拟表位"-J Immunol Methods 267: 37)。使用不识别 APP 但仅检测带有氨基末端天冬氨酸的不同 A β 种类(单克隆)抗体(这类抗体的实例描述在 Johnson-Wood 等, 1997: "阿尔茨海默病转基因小鼠模型中的淀粉样蛋白前体蛋白加工和 A β 42 沉积"-PNAS 94:1550)。已经证实这类抗体为鉴定本发明过程中适合疫苗的模拟表位的理想工具。尽管证实当将这类单克隆抗体直接给药于小鼠时在 AD 小鼠模型中具有有益作用(Bard 等, 2000: "外周给药的针对淀粉样蛋白 β -肽的抗体进入阿尔茨海默病小鼠模型的中枢神经系统并减轻病理情况"-Nature Med 6: 916), 但是始终未提出将这些抗体用作分离 AD 疫苗化合物的模拟表位的研究工具。

在现有技术中, 所有的努力均集中在天然存在的 A β 肽。如上所述, 因神经炎症事件而终止了 A β 肽疫苗的临床试验。实际上, T 细胞表位预测程序(用于 I 类限制表位的 BIMAS 和用于 II 类限制表位的 TEPITOPE)在序列中提示了高得分(自身)表位。这可能意味着神经炎症事件是因使得这类疫苗不适合于一般应用的自身免疫反应所致。

与现有技术中提出的这类 A β 疫苗相反, 预计在使用含有本发明模拟表位的疫苗治疗过程中没有自身免疫反应发生, 因为用于本发明模拟表位鉴定的(单克隆)抗体不识别 APP 且模拟表位序列不同于迄今为止已经用于试验或应用于未来试验的 A β 42-自身衍生的序列。

用于本发明模拟表位鉴定的抗体检测带有游离氨基末端天冬氨酸的 A β -

衍生的氨基酸序列 DAEFRH (= 原始表位), 由此它不识别天然 APP。该抗体可以为单克隆或多克隆抗体制品或其任意的抗体部分或衍生物, 先决条件仅在于抗体分子特异性识别 DAEFRH 表位, 即它不会结合淀粉样蛋白前体蛋白的天然 N-末端延长形式, 这意味着与 DAEFRH 表位的结合能力至少高于 APP 分子 100 倍、优选至少 1000 倍、更优选至少 10^5 倍。该抗体可以为表现出与 Johnson-Wood 等(1997)所述抗体相同或较高的与 DAEFRH 序列的结合能力的抗体。当然, 也可以使用具有较低结合能力的抗体(>10%、>50% 或 80%的 Johnson-Wood 等所述抗体的结合能力), 不过, 更优选较高的结合能力。

本发明的化合物结合那些对 DAEFRH 序列具有相似特异性的抗体。

优选本发明所用的化合物含有肽或由肽组成, 其中:

X_1 为 G 或带有羟基的氨基酸或带负电荷的氨基酸, 优选 E、Y、S 或 D;

X_2 为疏水氨基酸或带正电荷的氨基酸, 优选 I、L、V、K、W、R、Y、

F 或 A;

X_3 为带负电荷的氨基酸, 优选 D 或 E;

X_4 为芳族氨基酸或 L, 优选 Y、F 或 L;

X_5 为 H、K、Y、F 或 R, 优选 H、F 或 R; 且

X_6 为 S、T、N、Q、D、E、R、I、K、Y 或 G, 优选 T、N、D、R、I 或 G,

尤其是 EIDYHR、ELDYHR、EVDYHR、DIDYHR、DLDYHR、DVDYHR、DIDYRR、DLDYRR、DVDYRR、DKELRI、DWELRI、YREFRI、YAEFRG、EAEFRG、DYEFRG、ELEFRG、DRELRI、DKELKI、DRELKI、GREFRN、EYEFRG、DWEFRDA、WEFRT、DKELR 或 SFEFRG。

本发明的化合物(模拟表位)具有 5-15 个氨基酸的优选长度。该化合物可以以分离(肽)形式的疫苗提供或该化合物可以与其它分子, 诸如药物载体物质或多肽、脂质或碳水化合物结构偶联或复合。优选本发明的模拟表位具有 5-15、6 和 12 个、特别是 9-11 个氨基酸残基(最短)长度。然而, 所述的模拟表位可以与非特异性接头或载体, 尤其是肽接头或蛋白质载体偶联(通过共价或非共价方式)。此外, 所述的肽接头或蛋白质载体可以由 T-细胞辅助表位组成或含有 T-细胞辅助表位。

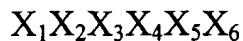
优选所述的药物上可接受的载体为 KLH、破伤风毒素、白蛋白结合蛋

白、牛血清白蛋白、树枝状聚合物(MAP; Biol. Chem. 358: 581)以及 Singh 等在 Nat. Biotech. 17 (1999), 1075-1081 中(特别是在该文件中的表 1 中的那些)和 O'Hagan 等在 Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727- 735(特别是其中所述固有的强化免疫的化合物和递送系统)所述的佐剂物质或其混合物。此外, 所述的疫苗组合物可以含有氢氧化铝。

可以通过任何合适的施用方式、例如静脉内、腹膜内、肌内、鼻内、口服、皮下等和任意合适的递药装置给药包括本发明化合物(模拟表位)和药物上可接受载体的疫苗(O'Hagan 等, Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727- 735)。一般来说, 该疫苗含有如下用量的本发明化合物: 0,1 ng-10 mg、优选 10 ng-1 mg, 尤其是 100 ng-100 μ g; 或者例如 100fmole-10 μ mole, 优选 10 pmole-1 μ mole, 尤其是 100 pmole-100 nmole。该疫苗还可以包括典型的辅助物质, 例如缓冲剂、稳定剂等。

本发明的另一个方面进一步涉及分离与天然 N-末端 A β 42 序列 DAEFRH 的特异性抗体结合的化合物的方法, 包括下列步骤:

- 提供包括肽的肽化合物文库, 所述的肽含有如下氨基酸序列:



其中:

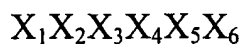
- X₁ 为除 C 以外的氨基酸;
- X₂ 为除 C 以外的氨基酸;
- X₃ 为除 C 以外的氨基酸;
- X₄ 为除 C 以外的氨基酸;
- X₅ 为除 C 以外的氨基酸;
- X₆ 为除 C 以外的氨基酸;

且其中 X₁X₂X₃X₄X₅X₆ 不为 DAEFRH;

- 使所述的肽文库与所述的抗体接触; 和
- 分离与所述抗体结合的肽文库中那些成员。

根据本发明该方面的具体实施方案, 本发明涉及分离与天然 N-末端 A β 42 序列 DAEFRH 的特异性抗体结合的化合物的方法, 包括下列步骤:

- 提供包括肽的肽化合物文库, 所述的肽含有如下氨基酸序列:



其中:

X₁为除K和C以外的天然氨基酸;

X₂为除C以外的天然氨基酸;

X₃为除K和C以外的天然氨基酸;

X₄为除K和C以外的天然氨基酸;

X₅为除C以外的天然氨基酸;

X₆为除P和C以外的天然氨基酸;

且其中 X₁X₂X₃X₄X₅X₆不为 DAEFRH;

- 使所述的肽文库与所述的抗体接触; 和
- 分离与所述抗体结合的肽文库中那些成员。

可以按照上述适合于具有5个氨基酸变体的文库的方法对本发明的合适的5-链节进行分离且可以优选通过筛选具有如本文所述的具有氨基酸变体X₁-X₅的文库或通过鉴定6-链节-文库中筛选的阳性成员中的合适的5-链节来进行(参见:上文)。因此,用相同的方法还可以应用7-链节、8-链节、9-链节、10-链节、...文库以筛选与本发明抗体类型结合的合适的序列。例如,可以通过测试这些具有5、6、7、8、9、...个氨基酸残基长度的用于结合本发明抗体的片段找到这类较长序列的合适的抗体结合片段。

已经证实这类方法可以成功地用于提供本发明的A β 模拟表位。

优选以在所述文库中的个体化形式,尤其是固定在固体表面的形式提供所述的肽,诸如能够使用MULTIPIN肽技术进行。可以将文库以肽混合物提供且可以在抗体结合后分离抗体:肽复合物。另一方面,可以将抗体固定且然后使肽文库(混悬液或溶液形式)与固定化抗体接触。

优选筛选的抗体(或肽文库中的成员)包括合适的标记,这种标记允许在与文库中的肽结合时检测或分离抗体或抗体:肽复合物。合适的标记体系(即生物素化、荧光、放射性、磁性标记、显色标记、二次抗体)易于由本领域技术人员得到。

必须构建文库以排除天然存在的A β 序列(例如DAEFRH),因为显然将使用该序列进行疫苗接种排除在本发明外。

用于分离本发明表位的其它合适的技术为例如如WO 03/020750中所述在噬菌体-肽文库中筛选。

本发明还涉及包括如本文所定义的抗N-末端A β 42-抗体-结合肽(或在某些优选的情况中为包括这类肽的较大分子(例如与载体或递送分子连接的

肽))(任选为单一有效成分)的组合物; 本发明优选涉及针对阿尔茨海默病的疫苗, 包括这类抗原, 尤其是包括至少一种肽的抗原, 所述的肽选自如下的组: EIDYHR、ELDYHR、EVDYHR、DIDYHR、DLDYHR、DVDYHR、DIDYRR、DLDYRR、DVDYRR、DKELRI、DWELRI、YREFRI、YAEFRG、EAEFRG、DYEFRG、ELEFRG、DRELRI、DKELKI、DRELKI、GREFRN、EYEFRG、DWEFRDA、SWEFRT、DKELR 或 SFEFRG。包括本发明提供的其它肽在内的这些肽特别适用于制备药物组合物, 尤其是用于制备 AD 疫苗。这些序列是纯人工的 A β -模拟表位。用于疫苗接种目的的肽与合适的载体偶联(通过共价或非共价方式)且可以将它们以肽化合物或与其它化合物或部分、例如佐剂、肽或蛋白质载体等的复合物提供且按照合适的方式给药(例如如 O'Hagan 等在 Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727-735 中所述)。

在下列实施例和附图中进一步描述本发明, 当然, 它们不用来限定本发明。

附图 1 表示用于本发明筛选方法的文库 4 中的个体化肽成员。

附图 2 表示使用用于 DAEFRH 的模拟表位进行的抑制试验。

附图 3 表示使用其它用于 DAEFRH 的模拟表位进行的抑制试验。

附图 4 和 5 描述了使用本发明的模拟表位肽进行的抑制试验。

实施例

1: 用于检测带有游离 N-末端(在 N-末端上的游离天冬氨酸)的 A β 42-衍生的肽种类的单克隆抗体(mAb)的制备

给小鼠接种在 CFA(第一次注射)和 IFA(加强注射)中乳化的与蛋白质牛血清白蛋白 BSA 连接的 6 链节肽 DAEFRH(天然 N-末端 A β 42 序列)疫苗(以便利用半抗原-载体-作用)。通过 ELISA (DAEFRH-肽-包被的 ELISA 平板)检测产生 DAEFRH-肽-特异性抗体的杂交瘤。将肽 SEVKMDAEFRH(APP-衍生的含有 A β 42-衍生的序列 DAEFRH 的天然 N-末端延长的序列)用作阴性对照肽: 排除识别延长肽的杂交瘤, 因为它们无法在带有 N-末端上游离天冬氨酸的 A β 42-衍生的肽与不含游离天冬氨酸的 APP-衍生的肽 DAEFRH 之间进行区分。

2.: 肽文库的构建:

已经通过改进 Reinke 等(2000)的方法,通过筛选用于结合对带有氨基末端天冬氨酸的 A β 种类具有特异性的抗体(优选单克隆抗体)而找到了本发明的模拟表位。另一种方法是以 MULTIP-INTM 肽技术市场上可以得到的。

MultipinTM 肽技术包括在以与用于许多生物试验的标准 8 x 12 微量滴定板相容的方式固定在块上的特别制备的聚乙烯大头针(pin)上合成肽。可以通过这种方法制备大头针结合的肽(保持与大头针共价结合的不可裂解的肽)和溶液相肽(已经从大头针表面裂解下)。基于 Multipin 合成系的 PepSets 允许同时合成和筛选大量的肽。

PepSets 由 96 个各自合成的肽的模块组成,它们中的两个为谨慎选择的控制序列。通过反相 HPLC 确定裂解的控制序列的纯度且通过氨基酸分析对肽含量进行定量。通过标准 ELISA 技术确定阳性和阴性不可裂解的控制序列。

使用各种化学修饰获得 PepSet 肽,包括乙酰化、生物素化、磷酸化和环化。将溶液相(裂解的)肽以冻干粉运送。

为了制备溶液相肽,存在对 C-末端的选择,包括酸和酰胺,这取决于预计的肽应用。将可裂解的键作为预制的 C-末端氨基酸的酯衍生物引入到大头针表面上或"Rink"酰胺接头上。然后通过用强酸处理大头针-结合的肽释放含有酸或酰胺端基的肽。对合成规模的选择为标称的 1 微摩尔或 5 微摩尔等级。诸如疏水性和裂解效率的因素影响肽的回收,使得当以标称 1 微摩尔规模合成肽时的预计肽产量为 0.5-1 微摩尔(接近 1mg 15 链节肽),或在以标称 5 微摩尔规模合成肽的产量为 2.5-5 微摩尔。

不可裂解的肽保持与大头针共价结合且可以用于使用 ELISA 技术快速筛选有意义的肽。这类肽用于抗体表位扫描和结构-活性关系(SAR)研究的目的。除去结合抗体或其它蛋白重新产生了所述肽且将其再用于进一步的试验中。PepSets 用于各种应用,包括根据经蛋白质序列的扫描鉴定生物学上有意义的肽接头、使肽接头最优化和研发类似物的新的制备方法。通过使用各种合成设计显著强化在用于筛选步骤的总体策略上的灵活性,所述的合成设计共同提供完全表征所述首位候选物的系统性方法。

从系统性肽类中获得的综合结果不仅鉴定了有意义的肽、而且表明了关键残基,其可交换性和最佳肽长度。因此,作为该发现的结果可以分类相关

肽的范围。用 D-氨基酸和其它不常用残基取代 L-氨基酸是控制肽结构和构象的强有力手段。这种方法也是快速发现具有不同药理学特性的新类似物的方法，所述的新类似物诸如具有增加的稳定性的拮抗剂和肽。

以已知的蛋白质序列开始，可以使用 Multipin 方法对所有序列抗体表位作图。用于对序列 B-细胞表位作图的几种可选方法目前是可行的。它们包括大头针-结合的肽、直接包被在微量滴定板上的溶液相肽和俘获在预先包被了抗生物素蛋白或链霉抗生物素的微量滴定板上的生物素化肽。

就本发明的实施例而言，实施例 1 中所述的抗体用于筛选肽文库，然而，例如，如 Johnson-Wood 等(1997)所述，任何抗体制品特异性识别 DAEFRH-序列、但不识别 A β 分子天然 N-末端延长的序列(例如 MDAEFRH、KMDAEFRH、SEVKMDAEFRH 或完整的淀粉样蛋白(前体)蛋白 APP)。

为该目的构建了 4 个文库：

2.1.：文库 1：这种 6 链节文库含有具有如下序列(氨基酸位置 1-6)的肽：

1 位：所有天然的 aa，除 D、K 和 C 外(17 种可能性)

2 位：所有天然的 aa，除 A、K 和 C 外(17 种可能性)

3 位：所有天然的 aa，除 E、K 和 C 外(17 种可能性)

4 位：所有天然的 aa，除 F、K 和 C 外(17 种可能性)

5 位：所有天然的 aa，除 R、K 和 C 外(17 种可能性)

6 位：所有天然的 aa，除 H、K、C 和 P 外(16 种可能性)

文库 1 是六肽的混合物。理论上包括含有 17 种不同氨基酸(参见下文)的所有可能的肽。该混合物中不含任何赖氨酸和半胱氨酸残基。此外，该混合物中不含：

特定 1 位上的天冬氨酸；

特定 2 位上的丙氨酸；

特定 3 位上的谷氨酸；

特定 4 位上的苯丙氨酸；

特定 5 位上的精氨酸；和

特定 6 位上的组氨酸。

按照 FastMoc 方案，使用 Applied Biosystems431A-合成仪进行合成，合成规模为 0.25 mmol。

使用重量为 1 mmol 所有所需氨基酸(被保护的氨基和侧链)开始合成。然

后产生 Asn、Gln、Gly、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val 的混合物。加入下列位置特异性氨基酸:

Ala, Glu, Phe, Arg, His (位置/混合物 1);

Asp, Glu, Phe, Arg, His (位置/混合物 2);

Asp, Ala, Phe, Arg, His (位置/混合物 3);

Asp, Ala, Glu, Arg, His (位置/混合物 4);

Asp, Ala, Glu, Phe, His (位置/混合物 5); 和

Asp, Ala, Glu, Phe, Arg (位置/混合物 6, 不含 Pro)。

混合物 6 用于加载树脂(2-氯-三苯甲基氯树脂, 1.49 mmol/g, Alexis Germany):

1 mmol 氨基酸残基混合物 6

611 mg 树脂(= 0.91 mmol 反应基团)

15 ml 二氯甲烷

5.5 当量= 5 mmol 二异丙基乙胺(871 μ l)。

将该混合物在烧瓶中振摇 1 小时。然后加入 1 ml 甲醇并将该混合物再振摇 10 分钟。通过 frit 提取加载的树脂并用二甲基甲酰胺、二氯甲烷、异丙醇、甲醇和乙醚(各 30 ml)洗涤两次。在高度真空中干燥过夜。称出的量为 737 mg。

用 1 ml 20% 在 DMF 中的哌啶将 5.66 mg 等分试样处理 30 分钟以确定树脂的密度。然后离心该混合物。通过光度测定法测定上清液中的游离 Fmoc 保护基(301 nm, 吸光系数= 7800 M(e-1))。因此, 树脂的密度为 0.49 mmol/g。

下列所有步骤均使用其它混合物(放入 5 个不同的筒)在合成仪上进行。使用 515 mg 加载的树脂(相当于 0.25 mmol: 使用 4 倍过量的氨基酸混合物)。在合成结束时裂解 N-末端 Fmoc 保护基。在用乙醇洗涤并干燥过夜后, 用 TFA/H₂O(95: 5, v: v)从树脂上裂解肽。在 Speed Vac 上将 TFA 溶液浓缩至 1/5 体积并沉淀且用乙醚洗涤并冻干。

6 链节肽 EIDYHR、ELDYHR 和 EVDYHR 是可以按照上述实施例 1 制备的单克隆抗体检测的模拟表位的实例。

2.2.: 文库 2:

该 6 链节文库含有带有下列序列(氨基酸位置 1-6)的肽:

1 位: D(固定的)

2 位: 所有天然 aa, 除 A、K 和 C 外(17 种可能性)

3 位: 所有天然 aa, 除 E、K 和 C 外(17 种可能性)

4 位: 所有天然 aa, 除 F、K 和 C 外(17 种可能性)

5 位: 所有天然 aa, 除 R、K 和 C 外(17 种可能性)

6 位: 所有天然 aa, 除 H、K、C 和 P 外(16 种可能性)。

按照上述文库 1 所述的方法(2.1 项下)构建肽文库 2。

6 链节肽 DIDYHR、DLDYHR 和 DVDYHR 是可以按照上述 1 制备的单克隆抗体检测的模拟表位的实例。

2.3.: 文库 3: 第 3 个肽文库用于另一种确定模拟表位序列的其他方法。

该文库含有原始序列且使模拟表位的检测与原始表位更为密切相关。

这种 6 链节文库含有带有如下序列(氨基酸位置 1-6)的肽:

1 位: 均为天然的 aa, 除 D、K 和 C 外(17 种可能性)

2 位: 均为天然的 aa, 除 K 和 C 外(18 种可能性)

3 位: 均为天然的 aa, 除 K 和 C 外(18 种可能性)

4 位: 均为天然的 aa, 除 K 和 C 外(18 种可能性)

5 位: 均为天然的 aa, 除 K 和 C 外(18 种可能性)

6 位: 均为天然的 aa, 除 K、C 和 P 外(17 种可能性)

按照上述文库 1 所述的方法(2.1 项下)构建肽文库 3。

6 链节肽 DIDYRR、DLDYRR 和 DVDYRR 是可以按照上述 1 制备的单克隆抗体检测的模拟表位的实例(1 位上的 D 和 5 位上的 R 与原始表位相同)。

2.4.: 文库 4: 该肽文库 4 由 $5 \times 18 = 90$ 个肽组成、商购自 Mimotopes Ltd. (Paris, France; 参见制造商的指南)且按照天然 N-末端 A β 42 序列 DAEFRH 设计。

1 位: D(固定的)

2 位: 均为天然氨基酸, 除 K 和 C 外(18 种不同的肽)

3 位: 均为天然氨基酸, 除 K 和 C 外(18 种不同的肽)

4 位: 均为天然氨基酸, 除 K 和 C 外(18 种不同的肽)

5 位: 均为天然氨基酸, 除 K 和 C 外(18 种不同的肽)

6 位: 均为天然氨基酸, 除 K 和 C 外(18 种不同的肽)。

文库 4 中的个体化肽成员描述在图 1 中。1、24、48、56 和 80 号肽带有 A β 42 N-末端序列的原始序列。所有其它肽均为对其与 DAEFRH-结合抗体的结合能力测试的候选肽。

2.5.: 使用肽文库的 ELISA:

如上所述, 使用 Applied Biosystems 431A 肽合成仪、按照经典的 Fmoc-化学制备肽文库 1、2 和 3。按照制造商的描述得到商购的肽文库 4 (参见上文和 www.mimotopes.com)。使 90 个肽的 C-末端与大头针连接。

按照如下方案, 使用各肽文库进行 ELISA:

将肽文库溶于 100%DMSO (终浓度 10 mg/ml)。

用 PBS 进一步稀释肽溶液。

将肽混合物在 ELISA 平板(Nunc Maxisorp, Germany)上包被过夜(4°C), 以 500 μ g/孔开始并滴定至 100 ng/孔。

用 PBS/Tween 20 (0.1%v/v)将平板洗涤 3x 次。

用 PBS/BSA 封闭平板(室温下 2 小时)。

用 PBS/Tween 将平板洗涤 3x 次。

在室温下将平板与生物素化 DAEFRH-特异性 mAb(在 PBS 中 10 μ g/ml)一起保温 4 小时。

用 PBS/Tween 将平板洗涤 3x 次。

将平板与链霉抗生物素-辣根过氧化物酶一起保温(在室温下 30 分钟)。

用 PBS/Tween 将平板洗涤 5x 次。

将平板与 ABTS +H₂O₂ 一起保温(0.1% w/v; 10-45 分钟)并用柠檬酸终止反应, 随后进行光度测定评价(波长 405 nm)。

3.:通过抑制试验验证模拟表位

3.1. 其它文库

除上述 4 个文库(参见 2.1.、2.2.、2.3.、和 2.4.)外, 还将第 5 个文库用于确定模拟表位序列。这种 6 链节文库在 EMC microcollections(Tubingen Germany)商购且它含有 114 个不同的六肽混合物, 通过所有除 C 以外的天然

aa(19种可能性)中的一个确定每种混合物中的一个位置, 剩余的5个位置为可变的:

混合物 01-06 (1个位置固定, 丙氨酸 A, 剩余的5个位置可变, X):

混合物 01: AXXXXX

混合物 02: XAXXXX

混合物 03: XXAXXX

混合物 04: XXXAXX

混合物 05: XXXXAX

混合物 06: XXXXXA

混合物 07-12 (1个位置固定, 精氨酸 R, 剩余的5个位置可变, X):

混合物 07: RXXXXX

混合物 08: XRXXXX

混合物 09: XXRXXX

混合物 10: XXXRXX

混合物 11: XXXXAX

混合物 12: XXXXXR

因此, 使用除 C 以外的所有天然 aa 设计混合物 13 和 14。

3.2.抑制试验

图 2 和 3 描述了用包括在和获自 5 个文库(如上所述的)中的模拟表位肽进行的抑制试验结果。模拟表位肽与原始表位竞争单由克隆抗体识别。原始表位和模拟表位肽在 C-末端上含有用于与蛋白质载体偶联的另一个 C(如果需要)。

使用下列肽:

肽 1737 DAEFRH

肽 3001 DKELRI

肽 3002 DWELRI

肽 3003 YREFFI

肽 3004 YREFRI

肽 3005 YAEFRG

肽 3006 EAEFRG

肽 3007 DYEFRG

肽 3008 ELEFRG

肽 3009 SFEFRG

肽 3010 DISFRG

肽 3011 DIGWRG

步骤:

以 0.1 μ g/ml 肽-BSA 的浓度给 ELISA 平板(Nunc Maxisorp)包被原始肽表位 DAEFRH (C-末端被 C 延长且与牛血清白蛋白 BSA 偶联)(100 μ l/孔, 12 小时, 4 $^{\circ}$ C)。在用 1% PBS/BSA 封闭(200 μ l/孔, 12 小时, 4 $^{\circ}$ C)后, 用 PBS/Tween 将平板洗涤 3x 次。然后加入生物素化单克隆抗体(1: 2000, 50 μ l/孔)和浓度 50、5、0.5、0.05、0.005 和 0.0005 μ g/ml 的肽(50 μ l/孔), 在 37 $^{\circ}$ C 下 20 分钟。用 PBS/Tween 将平板洗涤 3x 次并与辣根过氧化物酶(HRP)-标记的链霉抗生物素一起保温(100 μ l/孔, 30 分钟, RT)。用 PBS/Tween 将平板洗涤 5x 次并与 ABTS +H₂O₂ 一起保温(0.1% w/v; 10-45 分钟)且用柠檬酸终止反应, 随后进行光度测定评价(波长 405 nm)。

正如图 2 中预计和观察到的, 肽 1737 DAEFRH 可以与 BSA-偶联的平板结合的肽 DAEFRH 竞争且由此抑制单克隆抗体的识别。此外, 证实肽 3003 不能抑制单克隆抗体与原始表位结合。相反, 肽 3001、3002、3004、3005、3006 和 3007(不同程度)阻断表位识别。而肽 3004 仅在高浓度(50 μ g/ml)下具有抑制作用, 肽 3001、3006 和 3007 具有强烈抑制作用, IC₅₀ 低于 0.5 μ g/ml。肽 3002 和 3005 是"中等"抑制剂, IC₅₀ 大于 0.5 μ g/ml。

正如图 3 中预计和观察到的, 肽 1737 DAEFRH 可以成功地与 BSA-偶联的平板结合的肽 DAEFRH 竞争另外进行的单克隆抗体识而不依赖于实验。此外, 表明肽 3010 和 3011 在测试浓度下没有抑制作用, 而肽 3008 和 3009 为(相对)弱的抑制剂, IC₅₀ 低于 5 μ g/ml。

表 1 简单概括了包括在和获自文库(如所述的)中的模拟表位的抑制能力:

表 1: 模拟表位抑制能力:

肽 3001 DKELRI 强

肽 3002 DWELRI 中等

肽 3003 YREFFI 无

肽 3004 YREFRI 弱
肽 3005 YAEFRG 中等
肽 3006 EAEFRG 强
肽 3007 DYEFRG 强
肽 3008 ELEFRG 弱
肽 3009 SFEFRG 弱
肽 3010 DISFRG 无
肽 3011 DIGWRG 无

4. 按照本发明筛选的其它模拟表位的抑制试验 抑制试验

图 4 和 5 描述了用包括在和获自 5 个文库(如所述的)中的模拟表位肽进行的抑制试验结果。模拟表位肽与原始表位竞争单克隆抗体识别。原始表位和模拟表位肽在 C-末端上(7 位)含有用于与蛋白质载体偶联的另一个 C(如果需要)。

使用下列肽:

肽 1737 DAEFRH (原始表位 + C)

肽 1234 KKELRI

肽 1235 DRELRI

肽 1236 DKELKI

肽 1237 DRELKI

肽 1238 DKELR

肽 1239 EYEFRG

肽 1241 DWEFRDA

肽 4002 SWEFRT

肽 4003 GREFRN

肽 4004 WHWSWR

步骤:

以 0.1 μ g/ml 肽-BSA 的浓度给 ELISA 平板(Nunc Maxisorp)包被原始肽表位 DAEFRH (C-末端被 C 延长且与牛血清白蛋白 BSA 偶联)(100 μ l/孔, 12 小时, 4 $^{\circ}$ C)。在用 1%PBS/BSA 封闭(200 μ l/孔, 12 小时, 4 $^{\circ}$ C)后, 用 PBS/Tween 将平板洗涤 3x 次。然后加入生物素化单克隆抗体(1: 2000, 50 μ l/孔)和不同浓

度的肽(50 μ l/孔), 在 37 $^{\circ}$ C 下 20 分钟。用 PBS/Tween 将平板洗涤 3x 次并与辣根过氧化物酶(HRP)-标记的链霉抗生物素一起保温(100 μ l/孔, 30 分钟, RT)。用 PBS/Tween 将平板洗涤 5x 次并与 ABTS +H₂O₂ 一起保温(0.1% w/v; 10-45 分钟)且用柠檬酸终止反应, 随后进行光度测定评价(波长 405 nm)。

正如图 4 中预计和观察到的, 肽 1737 DAEFRH 可以与 BSA-偶联的平板结合的肽 DAEFRH 竞争且由此抑制单克隆抗体的识别。此外, 表明肽 4004 不能抑制单克隆抗体与原始表位结合。相反, 肽 4002 和 4003(不同程度)阻断表位识别。而肽 4003 仅在相对高浓度(10 μ g/ml)下具有抑制作用, 肽 4002 具有强抑制作用, IC₅₀ 低于 0.4 μ g/ml。

正如附图 5 中预计和观察到的, 肽 1737 DAEFRH 可以成功地与 BSA-偶联的平板结合的肽 DAEFRH 竞争另外进行的单克隆抗体识别而不依赖于实验。此外, 表明肽 1234 在测试浓度下几乎没有抑制作用, 而肽 1235、1236、1237、1238、1239 和 1241(不同程度)阻断表位识别。肽 1235, 1238 和 1241 是强抑制剂, IC₅₀ 小于 0.5 μ g/ml, 而肽 1236 和 1237 是(相对)弱的抑制剂, IC₅₀ 大于 5 μ g/ml。肽 1239 是中等抑制剂, IC₅₀ 大于 0.5 μ g/ml。

表 2 简单概括了包括在和获自文库(如所述的)中的模拟表位的抑制能力:

表 2: 模拟表位抑制能力:

肽 1234KKELRI 无

肽 1235 DRELRI 强

肽 1236 DKELKI 弱

肽 1237 DRELKI 弱

肽 1238 DKELR 强

肽 1239 EYFRG 中等

肽 1241 DWEFRDA 强

肽 4002 SWEFRT 强

肽 4003 GREFRN 弱

肽 4004WHWSWR 无

图 4 和 5 中所示的结果表明除各种 6 链节肽(如此处和上文所述)外, 5 链节肽(即肽 1238 DKELR)和 7 链节肽(即肽 1241 DWEFRDA)也可以用作基于模拟表位的阿尔茨海默病疫苗中的表位。

1	丙氨酸	ala	A
2	精氨酸	arg	R
3	天冬酰胺	asn	N
4	天冬氨酸	asp	D
5	半胱氨酸	cys	C
6	谷氨酰胺	gln	Q
7	谷氨酸	glu	E
8	甘氨酸	gly	G
9	组氨酸	his	H
10	异亮氨酸	ile	I
11	亮氨酸	leu	L
12	赖氨酸	lys	K
13	甲硫氨酸	met	M
14	苯丙氨酸	phe	F
15	脯氨酸	pro	P
16	丝氨酸	ser	S
17	苏氨酸	thr	T
18	色氨酸	trp	W
19	酪氨酸	tyr	Y
20	缬氨酸	val	V

图 1A

No.	D	A	E	F	R	H	
1	D	A	E	F	R	H	阳性对照
2	D	R	E	F	R	H	
3	D	N	E	F	R	H	
4	D	D	E	F	R	H	
5	D	Q	E	F	R	H	
6	D	E	E	F	R	H	
7	D	G	E	F	R	H	
8	D	H	E	F	R	H	
9	D	I	E	F	R	H	
10	D	L	E	F	R	H	
11	D	M	E	F	R	H	
12	D	F	E	F	R	H	
13	D	P	E	F	R	H	
14	D	S	E	F	R	H	
15	D	T	E	F	R	H	
16	D	W	E	F	R	H	
17	D	Y	E	F	R	H	
18	D	V	E	F	R	H	
19	D	A	A	F	R	H	
20	D	A	R	F	R	H	
21	D	A	N	F	R	H	
22	D	A	D	F	R	H	
23	D	A	Q	F	R	H	阳性对照
24	D	A	E	F	R	H	
25	D	A	G	F	R	H	
26	D	A	H	F	R	H	
27	D	A	I	F	R	H	
28	D	A	L	F	R	H	
29	D	A	M	F	R	H	
30	D	A	F	F	R	H	
31	D	A	P	F	R	H	
32	D	A	S	F	R	H	
33	D	A	T	F	R	H	
34	D	A	W	F	R	H	
35	D	A	Y	F	R	H	
36	D	A	V	F	R	H	
37	D	A	E	A	R	H	
38	D	A	E	A	R	H	
39	D	A	E	N	R	H	
40	D	A	E	D	R	H	
41	D	A	E	Q	R	H	
42	D	A	E	E	R	H	
43	D	A	E	G	R	H	
44	D	A	E	H	R	H	
45	D	A	E	I	R	H	
46	D	A	E	L	R	H	
47	D	A	E	M	R	H	
48	D	A	E	F	R	H	阳性对照
49	D	A	E	P	R	H	
50	D	A	E	S	R	H	

图 1B

51	D	A	E	T	R	H	
52	D	A	E	W	R	H	
53	D	A	E	Y	R	H	
54	D	A	E	V	R	H	
55	D	A	E	F	A	H	
56	D	A	E	F	R	H	阳性对照
57	D	A	E	F	N	H	
58	D	A	E	F	D	H	
59	D	A	E	F	Q	H	
60	D	A	E	F	E	H	
61	D	A	E	F	G	H	
62	D	A	E	F	H	H	
63	D	A	E	F	I	H	
64	D	A	E	F	L	H	
65	D	A	E	F	M	H	
66	D	A	E	F	F	H	
67	D	A	E	F	P	H	
68	D	A	E	F	S	H	
69	D	A	E	F	T	H	
70	D	A	E	F	W	H	
71	D	A	E	F	Y	H	
72	D	A	E	F	V	H	
73	D	A	E	F	R	A	
74	D	A	E	F	R	R	
75	D	A	E	F	R	N	
76	D	A	E	F	R	D	
77	D	A	E	F	R	Q	
78	D	A	E	F	R	E	
79	D	A	E	F	R	G	
80	D	A	E	F	R	H	阳性对照
81	D	A	E	F	R	I	
82	D	A	E	F	R	L	
83	D	A	E	F	R	M	
84	D	A	E	F	R	F	
85	D	A	E	F	R	P	
86	D	A	E	F	R	S	
87	D	A	E	F	R	T	
88	D	A	E	F	R	W	
89	D	A	E	F	R	Y	
90	D	A	E	F	R	V	

图 1C

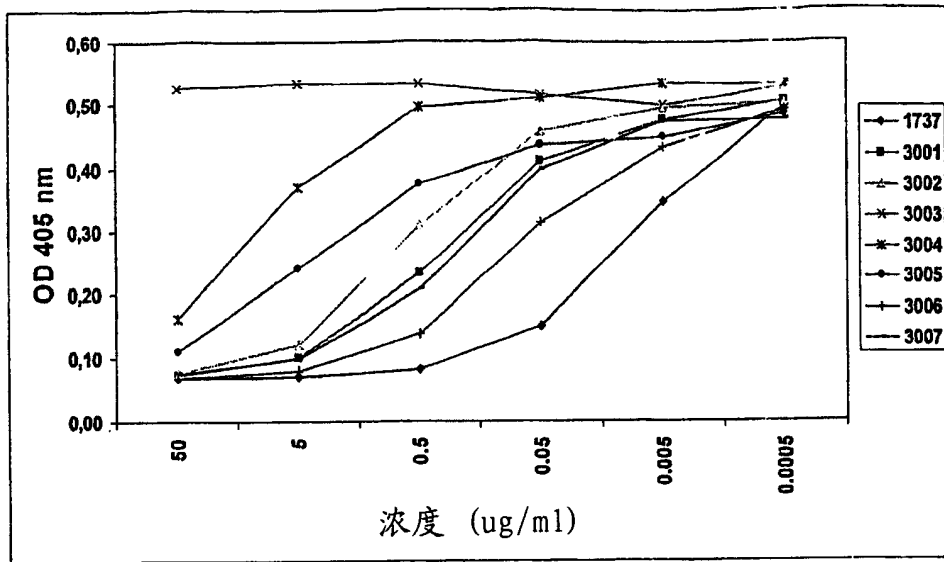


图 2

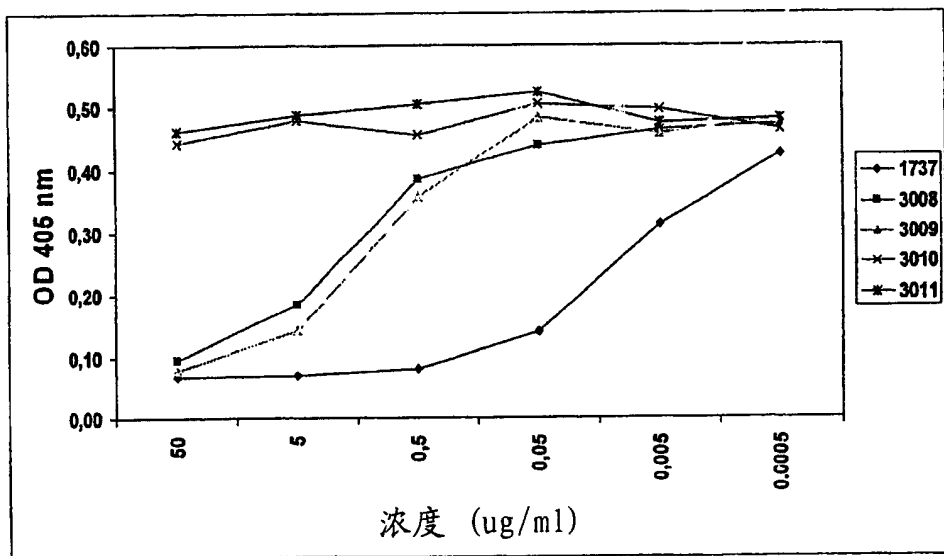


图 3

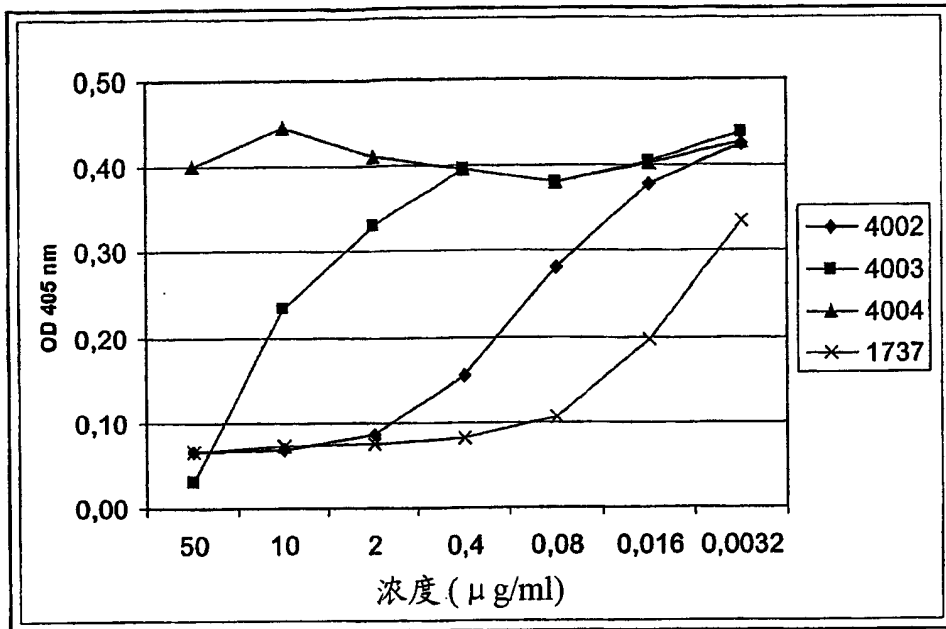


图 4

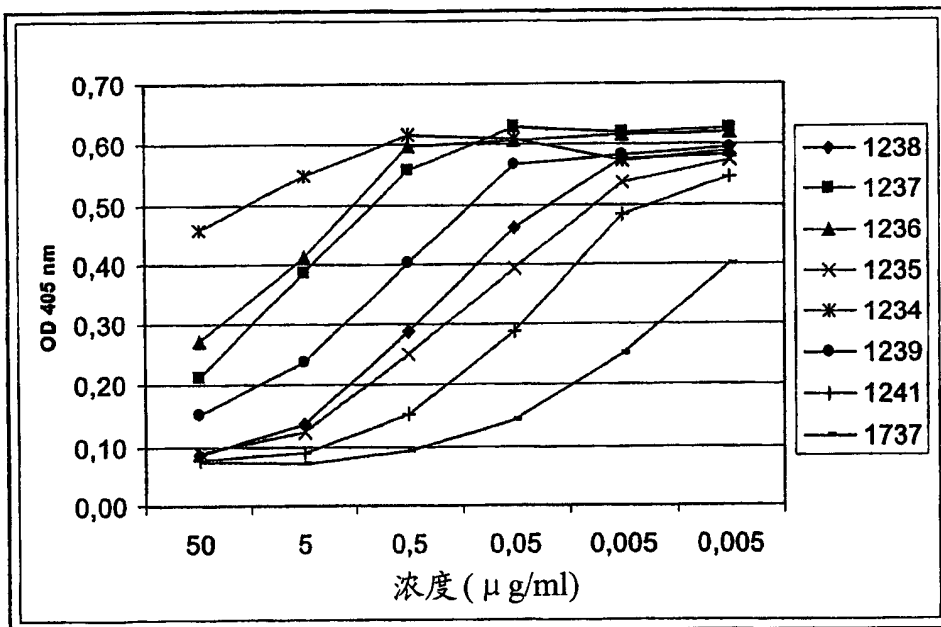


图 5