

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102260349 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 30

(21) 申请号 201110196714. 0

(22) 申请日 2011. 07. 12

(71) 申请人 山西医科大学

地址 030001 山西省太原市新建南路 86 号

(72) 发明人 祁金顺 蔡红艳 杨威 王昭君

王晓晖 武美娜

(74) 专利代理机构 山西五维专利事务所(有限
公司) 14105

代理人 杨耀田

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

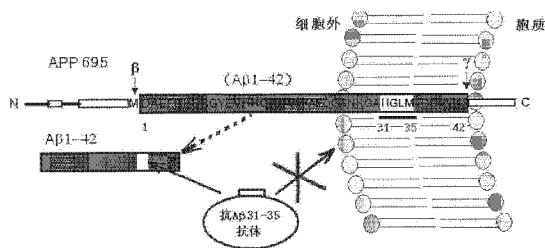
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 5 页

(54) 发明名称

用于治疗 and 预防阿尔茨海默病的抗 A β 31-35 抗体及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种用于治疗 and 预防阿尔茨海默病(AD)的抗 A β 31-35 抗体,制备方法:采用有机固相合成法合成氨基酸序列为 Ile-Ile-Gly-Leu-Met 的 A β 31-35 片段,纯化,分析,与血蓝蛋白偶联,偶联物对大白兔进行基础免疫和加强免疫后获得抗 A β 31-35 抗体。将该抗体用于在体 AD 动物实验或临床 AD 患者治疗,可有效避开 APP 上处于跨膜部分的结合位点,选择性清除细胞外的 A β 。与传统的针对 A β N-末端的抗体相比,抗 A β 31-35 抗体在预防 and 治疗 AD 中将具有副作用更小、特异性更强的特点。



1. 一种用于治疗 and 预防阿尔茨海默病的抗 A β 31-35 抗体, 其特征在于, 通过包括如下步骤的方法制得:

(1) 采用有机固相合成法合成氨基酸序列为 Ile-Ile-Gly-Leu-Met 的 A β 31-35 片段, 其中固相载体用 HMP 树脂, 保护氨基酸采用 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, 从多肽羧基端向氨基端合成, 用 TFA 法裂解肽树脂, 经减压蒸馏和乙醚萃取方法处理后得到粗品 A β 31-35 片段; 再用高效液相反相色谱法进行纯化; 取纯化后的 A β 31-35 片段与血蓝蛋白偶联, 偶联方法是用碳化二亚胺法进行缩合反应, 得到 A β 31-35 片段-血蓝蛋白偶联物;

(2) 用该偶联物对大白兔进行基础免疫和加强免疫后获得抗 A β 31-35 抗体。

2. 如权利要求 1 所述的抗 A β 31-35 抗体在制备治疗和预防阿尔茨海默病药物中的应用。

用于治疗 and 预防阿尔茨海默病的抗 A β 31-35 抗体及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗 A β 抗体,具体属于一种用于治疗 and 预防阿尔茨海默病的抗 A β 31-35 抗体及其制备方法。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD),又名老年性痴呆,是一种中枢神经系统原发性退行性疾病,主要表现为进行性认知功能障碍、学习和记忆能力丧失、个性改变,晚期出现严重痴呆。AD 最典型的病理特征是脑内出现大量、高密度的老年斑,其主要成分是淀粉样 β 蛋白 (Amyloid β protein, A β)。A β 的神经毒性作用已被广泛报道。如图 1 所示, A β 来自于跨膜的淀粉样前体蛋白 (Amyloid precursor protein, APP),但 APP 本身具有神经营养作用。传统的 AD 免疫疗法多使用针对 A β N-末端的抗体,其虽然具有一定疗效,但副作用较大,能与 APP 位于细胞外的结构域结合从而伤害正常的 APP。因此,目前临床实验已经暂停。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种用于治疗 and 预防阿尔茨海默病的抗 A β 31-35 抗体及其制备方法,抗 A β 31-35 抗体在预防 and 治疗 AD 中应具有副作用小、特异性强的特点。

[0004] 本发明提供的一种用于治疗 and 预防阿尔茨海默病的抗 A β 31-35 抗体,通过包括如下步骤的方法制得:

[0005] (1) 采用有机固相合成法合成氨基酸序列为 Ile-Ile-Gly-Leu-Met 的 A β 31-35 片段,固相载体用 HMP 树脂,保护氨基酸采用 Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl),从多肽羧基端向氨基端合成,用 TFA 法裂解肽树脂,经减压蒸馏和乙醚萃取方法处理后得到粗品 A β 31-35 片段;再用高效液相反相色谱法 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 进行纯化,分析;取纯化后的 A β 31-35 片段与血蓝蛋白偶联,偶联方法是用碳化二亚胺法 [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, EDC] 进行缩合反应,得到 A β 31-35 片段-血蓝蛋白偶联物(抗原);

[0006] (2) 用该偶联物对大白兔进行基础免疫和加强免疫后获得抗 A β 31-35 抗体。

[0007] 我们已经研究了抗 A β 31-35 抗体对脑室注射 A β 或神经细胞培养中加入 A β 所致脑功能或细胞伤害的保护效应,效果明显。这种抗体可以在制备治疗和预防阿尔茨海默病药物中应用。

[0008] 与现有技术相比本发明设计并制备针对 A β 31-35 序列的抗 A β 31-35 抗体,不仅能特异性封闭或阻断内源性 A β 发挥神经毒性作用的活性中心,而且更重要的是,由于抗 A β 31-35 抗体只能与细胞外的 A β 特异结合,不能与跨膜结构中 APP 分子上处于膜结构内相应的 31-35 序列接触,因而抗 A β 31-35 抗体在结合、清除 A β 的同时,可避免与跨膜蛋白 APP 的结合,从而不会影响 APP 发挥正常的促神经元生长、发育的作用。因此,与传统的

针对 A β N-末端的抗体相比,抗 A β 31-35 抗体在预防和治疗 AD 中将具有副作用更小、特异性更强的特点。

附图说明

[0009] 图 1 人 A β 淀粉样前体蛋白 (APP695) 结构示意图。

[0010] 图 2 抗 A β 31-35 抗体预处理对 A β 1-42 引起的大鼠空间学习记忆行为伤害的影响。其中 :A, 各组大鼠在第 1-4 训练日的寻台潜伏期变化 ;B, 第 3 训练日典型的大鼠游泳轨迹。

[0011] 图 3 抗 A β 31-35 抗体预处理对 A β 1-42 引起的大鼠海马 LTP 抑制的影响。其中 :A, 连续记录的海马 CA1 区场电位幅度变化, 显示 0.5nmol 抗 A β 31-35 抗体对 A β 1-42 引起的 LTP 抑制具有部分恢复效应 ;B, 不同处理组在高频刺激后三个时间点的幅度变化比较, 显示抗 A β 31-35 抗体对 LTP 的剂量依赖性保护效应。

[0012] 图 4 A β 1-42 对培养神经元的伤害作用和抗 A β 31-35 抗体的预处理效应。

[0013] 图 5 A β 31-35 (A) 和 A β 25-35 (B) 对海马培养细胞细胞内钙水平的剂量依赖性升高效应。

具体实施方式

[0014] 实施例 1

[0015] 用于治疗 and 预防阿尔茨海默病的抗 A β 31-35 抗体的制备步骤 :

[0016] (1) 抗原制备

[0017] 采用有机固相合成法合成 A β 31-35 片段, 固相载体用 HMP 树脂, 保护氨基酸采用 Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) 保护的氨基酸, 从多肽羧基端向氨基端合成, 用 TFA 法裂解肽树脂, 经减压蒸馏和乙醚萃取方法处理后得到粗品 A β 31-35 片段。再用高效液相反相色谱法 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 进行纯化, 纯化后的样品再用 HPLC 分析, 纯度为 95%, 将纯化后的 A β 31-35 片段冷冻抽干。

[0018] 取纯化后的 A β 31-35 片段与血蓝蛋白偶联, 偶联方法是用碳化二亚胺法 [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, EDC] 进行缩合反应, 得到 A β 31-35 片段 - 血蓝蛋白偶联物 (抗原)。

[0019] (2) 抗体制备

[0020] 新西兰大白兔 2 只, 雄性, 经过检疫无病原菌的一级动物, 体重为 1.5kg, 免疫前行耳静脉采血分离血清, 冻存作为阴性对照血清。

[0021] 基础免疫 : 取 A β 31-35 片段 - 血蓝蛋白偶联物 2mg/ml 与等量 CFA 充分乳化后于两只兔背部皮下多点注射, 每次免疫的抗原量为 1000 μ g/ 只。

[0022] 加强免疫 : 第一次免疫后间隔 2 周, 再以 1mg/1ml 抗原加等体积的 IFA 充分乳化后注入兔背部皮下多点加强免疫。而后每隔 2 周按第二次免疫法重复加强免疫 6 次。每次免疫后的第 12 天, 行颈动脉插管取血, 分离血清得到抗 A β 31-35 抗体, 效价为 1 : 16000。

[0023] 实施例 2

[0024] 我们观察了抗 A β 31-35 抗体对脑室注射 A β 或神经细胞培养中加入 A β 所致脑功能或细胞伤害的保护效应。主要结果如下 :

[0025] (1) Morris 水迷宫实验图 2 显示了各组大鼠寻找水下平台的平均潜伏期 (A) 和典型的游泳轨迹 (B)。与正常大鼠比较, 脑室内注射 5nmol A β 1-42 可导致寻台潜伏期明显延长; 不同浓度的抗 A β 31-35 抗体处理后, 潜伏期和游泳距离缩短, 特别是 0.5 和 5nmol 的抗 A β 31-35 抗体预处理组在各训练日均明显小于单独使用 A β 1-42 组 ($P < 0.01$), 表明 A β 引起的行为学伤害可被抗 A β 31-35 抗体所逆转。

[0026] (2) 在体海马 LTP 预实验如图 3 所示, 急性给予 A β 1-42 不影响高频刺激前测试刺激引起的 fEPSP, 但 HFS 诱导的 LTP 受到 A β 1-42 片段的显著压抑。联合给予不同浓度的抗 A β 31-35 抗体后, A β 1-42 引起的 LTP 压抑效应被明显逆转。图 3A 显示了 0.5nmol 的抗 A β 31-35 抗体对 A β 1-42 引起的 LTP 压抑的恢复效应。较高浓度 (5nmol) 抗 A β 31-35 抗体几乎完全逆转了 A β 1-42 引起的 LTP 损害 (图 3B)。

[0027] (3) 细胞生存和细胞毒性预实验图 4 显示了 A β 1-42 对培养神经元的损害作用和抗 A β 31-35 抗体的预处理效应。发现: 20 μ M A β 1-42 预处理 24 小时后细胞存活率较对照组明显下降 (绿色细胞为 Calcein-AM 染色标记活细胞, 红色细胞为 PI 染色标记的死亡细胞); 给予 20 μ M 抗 A β 31-35 抗体预处理后可以明显抑制 A β 1-42 诱导的细胞损伤。

[0028] (4) 细胞内钙成像预实验初步结果显示, A β 31-35 (图 5A) 的效应类似于 A β 25-35 (图 5B), 两者均能升高 $[Ca^{2+}]_i$, 且都具有一定程度的剂量依赖性。其中, 给予 10 μ M 和 20 μ M 的 A β 31-35 时, 荧光比值 $R(F_{340}/F_{380})$ 可分别增加 21.1% 和 70.7% (P 值均 < 0.05)。提示: 小片段的 A β 31-35 具有类似于 A β 25-35 以及内源性大分子 A β 的效应, 可以剂量依赖性引起海马细胞内 Ca^{2+} 水平升高, 这可能与 A β 产生的细胞毒性有关。目前, 抗 A β 31-35 抗体对细胞钙超载的研究正在进行中。

[0029] SEQUENCE LISTING

[0030] <110> 山西医科大学

[0031] <120> 用于治疗 and 预防阿尔茨海默病的抗 A β 31-35 抗体及其制备方法

[0032] <130>0

[0033] <160>1

[0034] <170> Patent In version 3.5

[0035] <210>1

[0036] <211>5

[0037] <212> PRT

[0038] <213> 人工合成

[0039] <400>1

[0040] Ile Ile Gly Leu Met

[0041] 1 5。

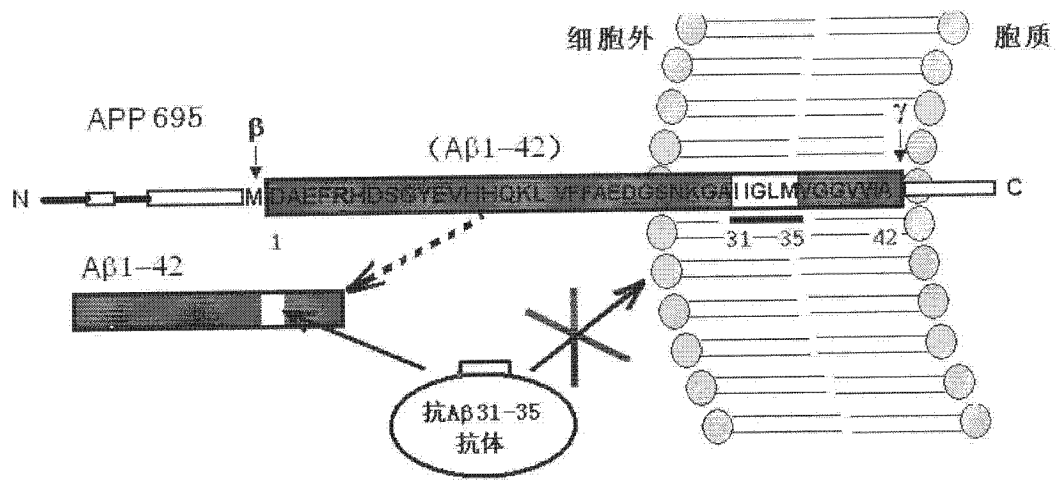


图 1

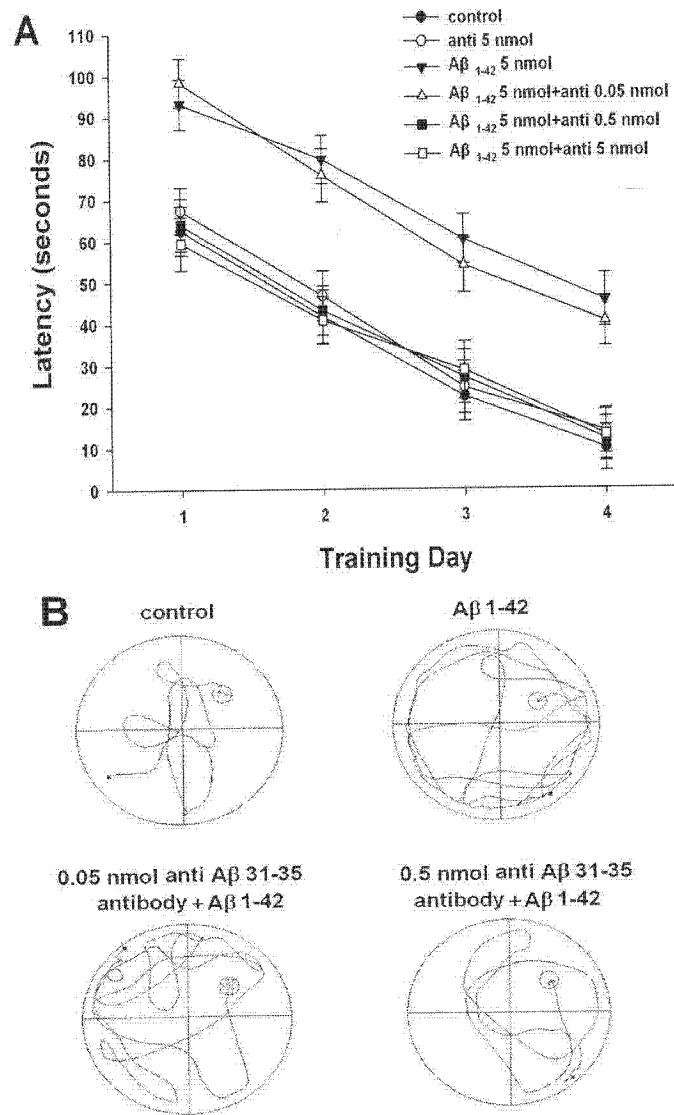


图 2

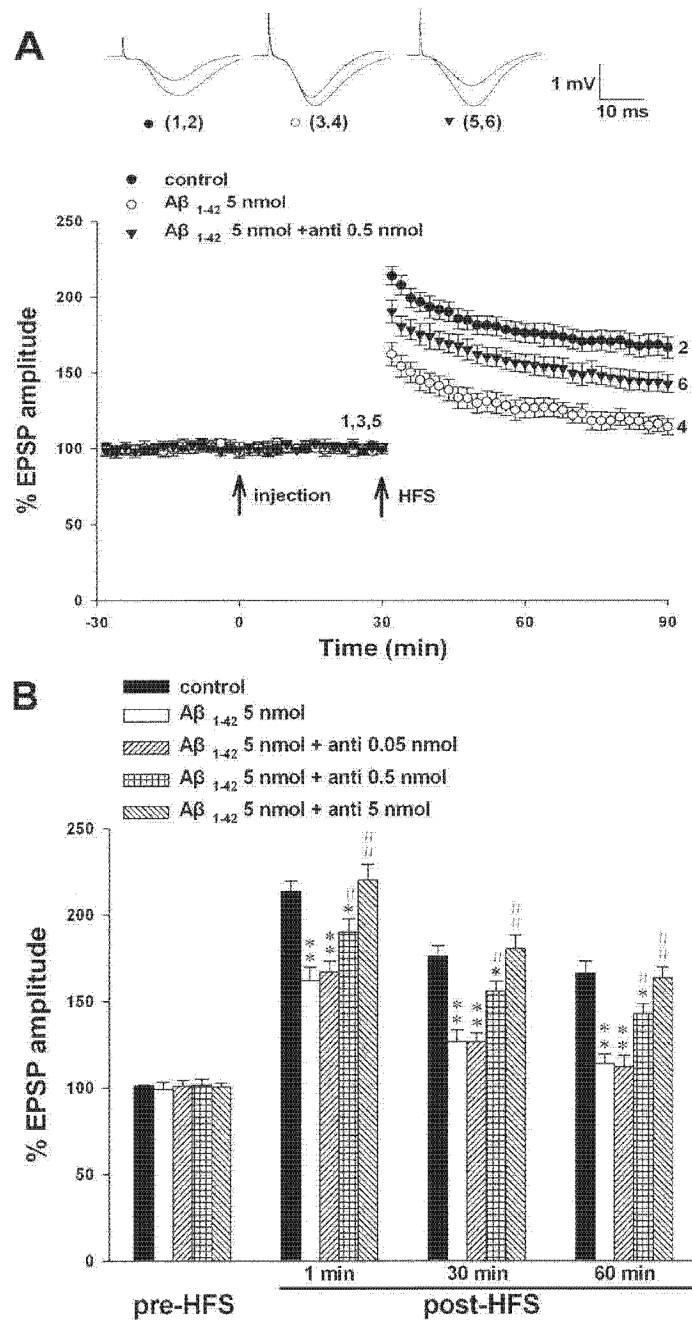


图 3

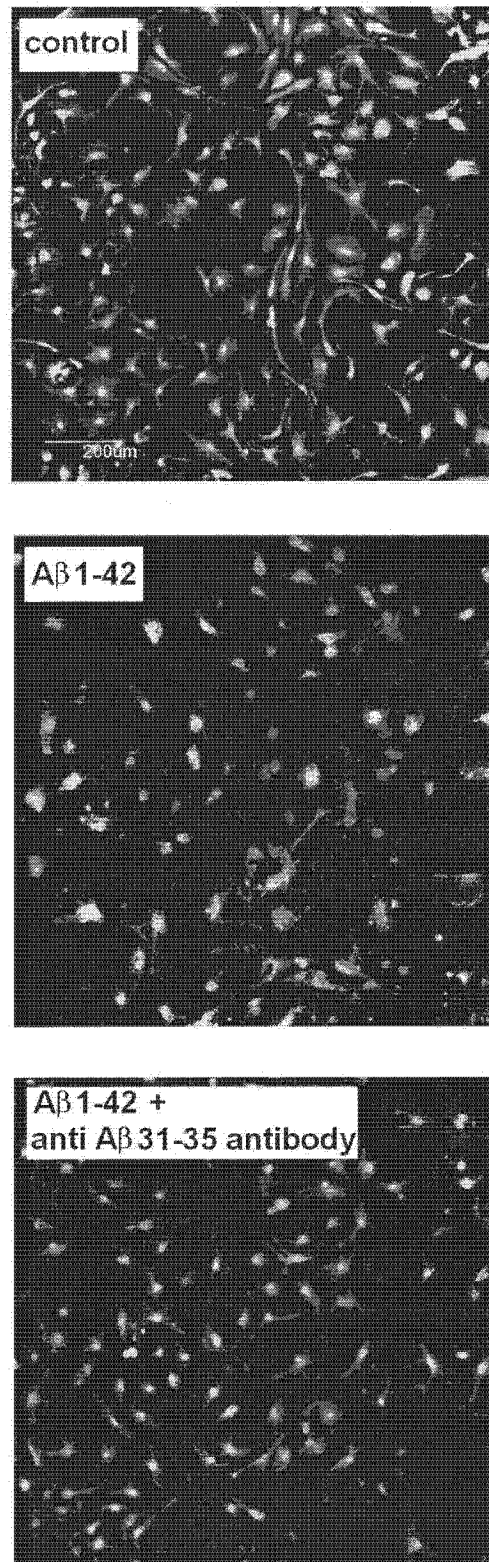


图 4

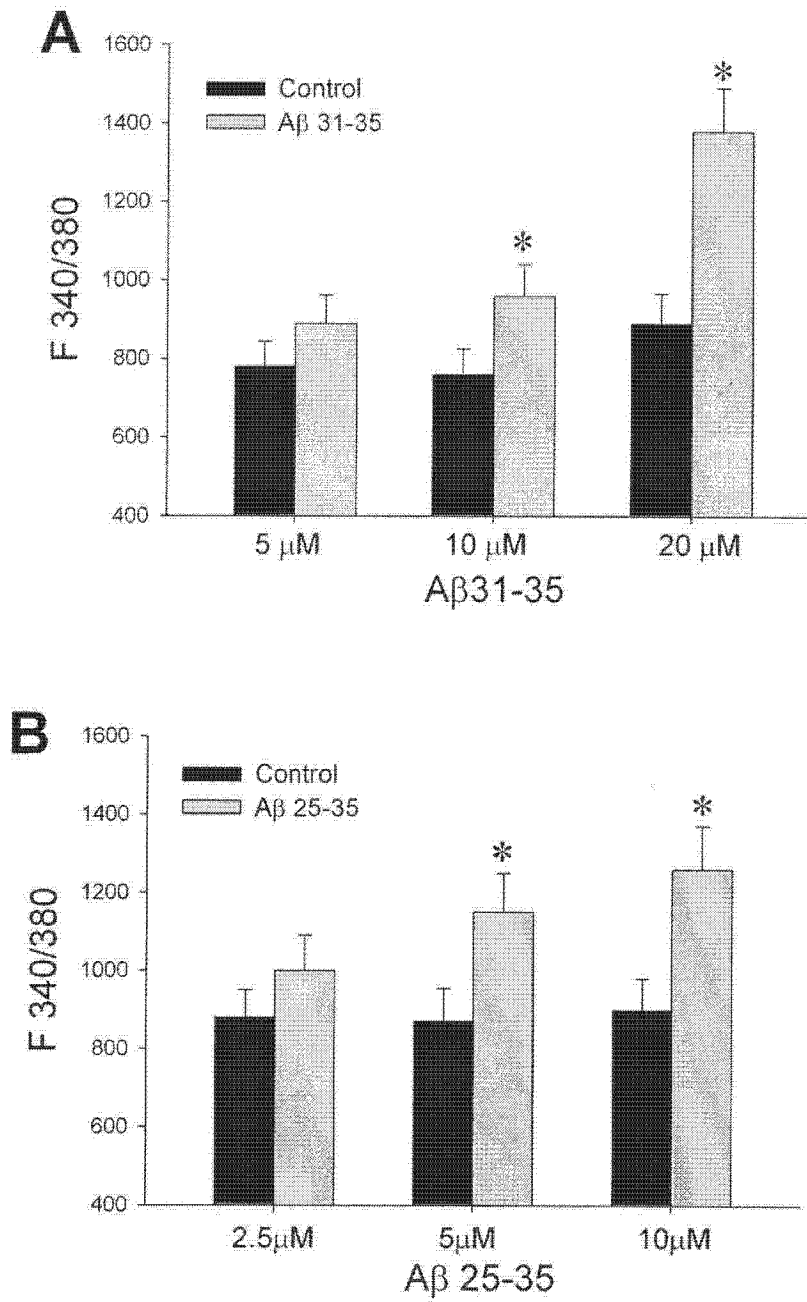


图 5