

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680051750.5

[51] Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 9 月 9 日

[11] 公开号 CN 101528770A

[22] 申请日 2006.11.30

[21] 申请号 200680051750.5

[30] 优先权

[32] 2005.11.30 [33] US [31] 60/740,866

[32] 2006.3.3 [33] US [31] 60/778,947

[86] 国际申请 PCT/US2006/046043 2006.11.30

[87] 国际公布 WO2007/064917 英 2007.6.7

[85] 进入国家阶段日期 2008.7.24

[71] 申请人 艾博特公司

地址 美国伊利诺伊州

共同申请人 艾博特股份有限两合公司

[72] 发明人 T·F·霍尔奇曼 J·E·哈兰

R·P·埃达尔吉

E·T·奥列尼查克

A·佩拉达-罗佩斯

B·拉布克沃斯基 L·于

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 关立新 李连涛

权利要求书 7 页 说明书 61 页 附图 47 页

[54] 发明名称

制备重组形式的人 β - 淀粉样蛋白的方法和
这些蛋白质的应用

[57] 摘要

本发明涉及克隆、表达和分离重组形式的 β - 淀粉样蛋白, 其含 N - 末端甲硫氨酸(或者一种或多种氨基酸), 以及用该重组蛋白质制备治疗性抗体、鉴定治疗性小分子、和进行诊断测试的方法。

More:
CATATGATG CCGAATTTC CCATGATAG GGCATGAG TGCATCAT GAACTGCG TTTTCGGG AGATGTGG CAGCAAAA GGGCGATT
GTAACTAC GCGTAAAG GGTACTATG CGGATCTTC AGCTAGTGT CTTTGACAC AAAAGCGC TTCTACAC GTCSTTGT CCGCGCTAT
[XhoI]
[NotI]
TTGGCTGAT GGTGGGTGT GTGGTATG GGTGATGAG
AACCGGCTA CCGCGGACA CAGCACTAC GCACTGCTC

A

1. Nucleic acid sequence of the human β -amyloid protein gene.

B

1.纯化的 β -淀粉样蛋白,其与式[X+Y]所示蛋白质有至少70%氨基酸序列同一性,其中"X"包含位于所述蛋白质氨基末端的一种或多种选自甲硫氨酸、缬氨酸和亮氨酸的氨基酸,而"Y"包含天然淀粉样 β 蛋白质氨基酸序列的全部或部分。

2.权利要求1的纯化的 β -淀粉样蛋白,其中"Y"包含所述天然 β -淀粉样蛋白的39至43个连续的氨基酸。

3.权利要求2的纯化的 β -淀粉样蛋白,其中"Y"包含选自Glu665Asp, Lys/Met670/Asn/Leu, Ala673Thr, His677Arg, Asp678Asn, Ala692Gly, Glu693Gly, Glu β 93Gln, Asp694Asn, Ala713Thr和Ala713Val的突变。

4.权利要求2或权利要求3的纯化的 β -淀粉样蛋白,其中"X"是甲硫氨酸。

5.分离的核酸分子,其编码与式[X+Y]所示的蛋白质有至少70%氨基酸序列同一性的 β -淀粉样蛋白,其中"X"含位于所述蛋白质氨基末端的一种或多种选自甲硫氨酸、缬氨酸和亮氨酸的氨基酸,而"Y"包含天然淀粉样 β 蛋白质氨基酸序列的全部或部分。

6.含权利要求5的所述分离的核酸分子的载体。

7.含权利要求6的所述载体的宿主细胞。

8.制备与式[X+Y]所示的蛋白质有至少70%氨基酸序列同一性的纯化的 β -淀粉样蛋白的方法,其中"X"包含位于所述蛋白质氨基末端的一种或多种选自甲硫氨酸、缬氨酸和亮氨酸的氨基酸,而"Y"包含天然淀粉样 β 蛋白质氨基酸序列的全部或部分,其包括以下步骤:

a.将编码权利要求1所述 β -淀粉样蛋白的核酸分子转染入载体;和
b.用一段时间并在足以由所述宿主细胞表达所述 β -淀粉样蛋白的条件下将步骤a)的所述载体转化入宿主细胞。

9.权利要求8的方法,其中所述宿主细胞是原核或真核的。

10.权利要求9的方法,其中所述原核宿主细胞选自大肠杆菌、杆菌、链球菌和乳酸菌。

11.权利要求9的方法,其中所述真核细胞选自昆虫细胞、酵母细胞和哺乳动物细胞。

12.结合权利要求1所述 β -淀粉样蛋白的分离的抗体。

13. 权利要求 12 的分离的抗体, 其中所述抗体是单克隆或多克隆的。

14. 权利要求 13 的分离的抗体, 其中所述抗体是单克隆的并是人或人源化的。

15. 权利要求 14 的分离的抗体, 其中所述抗体具有至少 0.50 微摩尔的特异结合常数 (Kd)。

16. 权利要求 14 的分离的抗体, 其中所述抗体具有大于每摩尔-30 千焦耳的结合焓。

17. 权利要求 14 的分离的抗体, 其中所述抗体具有每个淀粉样球聚体至少一个抗体的抗体对淀粉样球聚体结合率。

18. 治疗或预防需要所述治疗或预防的患者中的阿耳茨海默氏病的方法, 其包括向所述患者以足以实现所述治疗或预防的量给药权利要求 12 所述分离的抗体。

19. 权利要求 18 的方法, 其中所述分离的抗体通过选自肌肉内、静脉内和皮下的途径给药。

20. 分离的 β -淀粉样肽寡聚物, 其包含: 1) 链内反平行方向的残基 19 至 21 和残基 30 至 32 和 2) 链间平行方向的残基 34-38, 其中所述寡聚物包含对于选自以下的原子对具有分子内质子间距为约 1.8 - 6.5 埃的 A- β (1-42) 肽: F19 (NH) - I32 (NH), F19 (NH) - I32 (HB#), F19 (NH) - I32 (HG##), A21 (NH) - A30 (NH), A21 (NH) - A30 (HB#), A21 (NH) - I31 (HD1#), A21 (NH) - I31 (HG1#), I32 (NH) - F19 (HD1#), I32 (NH) - F19 (HB#) 和 A30 (NH) - A21 (HB#)。

21. 分离的 β -淀粉样肽寡聚物, 其包含对于选自以下的原子对肽链 A 和肽链 B 间分子间质子间距为约 1.8 - 6.5 埃的 A- β (1-42) 肽: G33 (NH) - G34 (NH), M35 (NH) - V36 (NH), G37 (NH) - G38 (NH), G33 (NH) - V18 (C γ H₃), V18 (NH) - V18 (C γ H₃), L34 (NH) - L34 (C₅H₃), M35 (NH) - V36 (C γ H₃), G38 (NH) - V39 (C γ H₃) 和 V39 (NH) - V39 (C γ H₃), 其中所述寡聚物包含分子内反平行 β 折叠, 其至少含残基 19-21 和 30-32 和原子对 {F19 CO, I32 N}, {I32 CO, F19 N}, {A21 CO, A30 N}, 和 {A30 CO, A21 N}, 而且距离为 $3.3 + 0.5 \text{ \AA}$, 其中 CO 表示主链氧原子, 而且所述残基的 ϕ (ϕ) 角范围为 -180 至 -30 和所述残基的 ψ (ψ) 角范围为约 60 至 180 或约 -180 至 -150。

22.分离的 β -淀粉样寡聚物,其中所述寡聚物包含分子间平行 β 折叠,其至少含至少两种 β -淀粉样肽(标记为A和B)的残基34-38,其中以下原子对{G33 CO (A), L34 N (B)}, {L34 CO (B), M35 N (A)}, {M35 CO (A), V36 N (B)}, {V36 CO (B), G37 N (A)}, 和{G37 CO (B), G38 N (A)} (其中CO表示主链氧原子)距离为 $3.3 \pm 0.5 \text{ \AA}$,而且所述残基的 ϕ 角范围为-180至-30和所述残基的 ψ 角范围为约60至180或-180至-150。

23.结合至少一种 β -淀粉样 N-Met 1-42 寡聚物的分离的抗体,其中所述寡聚物选自:

(a)分子内反平行 β 折叠,其至少含残基19-21和30-32,其中以下原子对{F19 CO, I32 N}, {I32 CO, F19 N}, {A21 CO, A30 N}, 和{A30 CO, A21 N} (其中CO表示主链氧原子)距离为 $3.3 \pm 0.5 \text{ \AA}$,而且所述残基的 ϕ 角范围为-180至-30和所述残基的 ψ 角范围为约60至180或-180至-150;和

(b)分子间平行 β 折叠,其至少含至少两种 β -淀粉样肽(标记为A和B)的残基34-38,其中以下原子对{G33 CO (A), L34 N (B)}, {L34 CO (B), M35 N (A)}, {M35 CO(A), V36 N (B)}, {V36 CO (B), G37 N (A)}, 和{G37 CO (B), G38 N (A)} (其中CO表示主链氧原子)距离为 $3.3 \pm 0.5 \text{ \AA}$,而且所述残基的 ϕ 角范围为-180至-30和所述残基的 ψ 角范围为约60至180或-180至-150。

24. 权利要求23的分离的抗体,其中至少两种N-Met 1-42 β -淀粉样肽的3维结构包含任何图x和Y所示的物理许可的构象。

25.纯化的球聚体,其包含至少两种权利要求1所述分离的 β -淀粉样蛋白。

26. 结合权利要求25所述纯化的球聚体的分离的抗体。

27.诊断怀疑患有该疾病的患者中阿耳茨海默氏病的方法,其包括如下步骤:

a. 从所述患者中分离生物样品;

b. 用一段时间并在足以形成球聚体/抗体复合物的条件下,使所述生物样品接触权利要求12或权利要求26所述分离的抗体;和

c. 检测所述样品中所述球聚体/抗体复合物的存在性,存在所述复合物表示所述患者中诊断出阿耳茨海默氏病。

28. 诊断怀疑患有该疾病的患者中阿耳茨海默氏病的方法, 其包括如下步骤:

- a. 从所述患者中分离生物样品;
- b. 用一段时间并在足以形成抗体/球聚体复合物的条件下使所述生物样品接触权利要求 25 所述球聚体;
- c. 用一段时间并在足以使所述缀合物结合结合的抗体的条件下, 将缀合物加入得到的抗体/球聚体复合物, 其中所述缀合物包含与能产生可检测信号的信号产生化合物相连的抗体; 和
- d. 通过检测所述信号产生化合物产生的信号来检测可能出现于所述生物样品中的抗体的存在性, 所述信号表示所述患者中诊断出阿耳茨海默氏病。

29. 诊断怀疑患有阿耳茨海默氏病的患者中阿耳茨海默氏病的方法, 其包括以下步骤:

- a. 从所述患者中分离生物样品;
- b. 用一段时间并在足以形成抗体/纯化的球聚体复合物的条件下, 使所述生物样品接触权利要求 25 所述球聚体; 和
- c. 检测所述样品中所述抗体/纯化的
- d. 球聚体复合物的存在性, 存在所述复合物表示所述患者中诊断出阿耳茨海默氏病。

30. 诊断怀疑患有阿耳茨海默氏病的患者中阿耳茨海默氏病的方法, 其包括以下步骤:

- a. 从所述患者中分离生物样品;
- b. 用一段时间并在足以形成抗抗体/抗体复合物的条件下, 使所述生物样品接触特异于所述样品中抗体的抗抗体;
- c. 用一段时间并在足以使所述缀合物结合的抗体的条件下, 将缀合物加入得到的抗抗体/抗体复合物, 其中所述缀合物包含与能产生可检测信号的信号产生化合物相连的权利要求 31 所述球聚体; 和
- d. 检测所述信号产生化合物产生的信号, 所述信号表示所述患者中诊断出阿耳茨海默氏病。

31. 包含权利要求 12 或权利要求 26 所述分离的抗体的组合物。

32. 疫苗, 其包含权利要求 1 或权利要求 25 所述纯化的 β -淀粉样蛋白和药学上可接受的佐剂。

33. 预防或治疗需要所述预防或治疗的患者中的阿耳茨海默氏病的方法，其包括向所述患者以足以实现所述预防或治疗的量给药权利要求31所述组合物的步骤。

34. 预防或治疗需要所述预防或治疗的患者中的阿耳茨海默氏病的方法，其包括向所述患者以足以实现所述预防或治疗的量给药权利要求32所述组合物的步骤。

35. 鉴定治疗或预防阿耳茨海默氏病的化合物的方法，其包括以下步骤：

a) 用一段时间并在足以使所述一种或多种化合物结合或中和所述纯化的球聚体的条件下，将一种或多种感兴趣的化合物暴露于权利要求31所述纯化的球聚体；和

b) 鉴定那些结合或中和所述纯化的球聚体的化合物，所述鉴定出的化合物用于治疗或预防阿耳茨海默氏病。

36. 设计用于治疗或预防患者中的阿耳茨海默氏病的小分子的方法，其包括如下步骤：

a) 分析选自权利要求25所述纯化的球聚体、权利要求25所述分离的 β -淀粉样肽寡聚物和权利要求25所述分离的寡聚物组装体的蛋白质的3维结构；

b) 鉴定所述步骤a)选出的蛋白质表面上的一种或多种表位；和

c) 设计结合所述一种或多种步骤b)鉴定出的表位的小分子，所述小分子用于治疗或预防阿耳茨海默氏病。

37. 鉴定用于治疗或预防阿耳茨海默氏病的单克隆抗体的方法，其包括如下步骤：

a) 用一段时间并在足以使一种或多种所述单克隆抗体与所述球聚体结合并形成球聚体/抗体复合物的条件下，使权利要求25所述纯化的球聚体暴露于单克隆抗体文库；

b) 鉴定所述球聚体/抗体复合物的存在性；

c) 和确定一种或多种带有所述复合物的抗体的同一性，所述一种或多种抗体用于治疗或预防阿耳茨海默氏病。

38. 稳定 Met-淀粉样 β (1-42)寡聚物或其部分的样品的方法，其包括的步骤为用一段时间并以足以实现所述稳定的量将烷基链去污剂或液体加入所述样品。

39.疫苗,其包含权利要求 26 所述分离的抗体和药学上可接受的佐剂。

40. 包含图 27 的连续的氨基酸残基 E22-D23-V24-G25-S26-N27-K28 (SEQ ID NO: 25)的表位。

41. 结合权利要求 40 所述表位的分离的抗体。

42.由选自以下的抗原产生的人源化抗体: 北极 (E693G)突变, 荷兰 (E693Q)突变, 意大利突变 (E693K), 爱荷华 (D694N)突变和佛兰德 (A692G)突变。

43. 权利要求 1 的人源化抗体,其中所述抗体识别淀粉样 β 肽的天然人序列和至少一种所述突变的序列。

44.检测怀疑患有阿耳茨海默氏病的患者中突变的淀粉样 β 肽序列的方法,其包括如下步骤:

a) 从所述患者中分离生物样品;

b) 用一段时间并在足以形成突变抗原/抗体复合物的条件下使所述生物样品接触权利要求 42 所述抗体;和

c) 检测所述突变抗原/抗体复合物的存在性,所述复合物表示所述患者有突变的淀粉样 β 肽序列并由此有阿耳茨海默氏病。

45.分离的球聚体,其每摩尔淀粉样肽包含约至少 0.5 - 2.0 摩尔十二烷基磺酸钠 (SDS)或脂肪酸。

46. 权利要求 45 所述分离的球聚体的表位。

47. 结合权利要求 46 所述表位的分离的抗体。

48. 权利要求 47 的分离的抗体,其阻断淀粉样 β 肽聚合体的形成。

49. 包含淀粉样 β 肽的分离的球聚体,其中所述肽包含带有选自以下突变的氨基酸序列: 北极 (E693G)突变, 荷兰 (E693Q)突变, 意大利突变 (E693K), 爱荷华 (D694N)突变和佛兰德 (A692G)突变。

50.分离的抗体,其相对于所述天然人淀粉样肽优先结合权利要求 46 所述表位。

51.预防或治疗需要所述预防或治疗的患者中的阿耳茨海默氏病的方法,其包括向所述患者以足以实现所述预防或治疗的量给药权利要求 50 所述分离的抗体。

52. 包含淀粉样 β 肽的分离的球聚体,其中所述肽包含根据氢-氘

交换行为展示出约 33%或更少保护或交换的氨基酸,其中所述氨基酸选自: 2 (Asp), 3 (Ala), 4 (Glu), 5 (Phe), 7 (His), 8 (asp), 9 (Ser), 10 (Gly), 17 (Lys), 20 (Phe), 21 (Phe), 22(Ala), 25(Val), 26(Gly), 29 (Lys)和 30 (Gly) 。

53. 包含淀粉样 β 肽的分离的球聚体,其中所述肽包含根据氢-氘交换行为展示出约 33%至约 66%保护或交换的氨基酸,其中所述氨基酸选自:16(Gln), 31(Ala), 32 (Ile), 42 (Ile)和 43 (Ala) 。

54. 包含淀粉样 β 肽的分离的球聚体,其中所述肽包含根据氢-氘交换行为展示出约 66%或更多保护或交换的氨基酸,其中所述氨基酸选自: 12 (Glu) 18 (Leu), 19(Val), 24 (Asp), 33(Ile), 34(Gly), 35 (Leu), 36 (Met), 38(Gly), 39(Gly)和 40(Val)。

制备重组形式的人 β -淀粉样蛋白的方法和这些蛋白质的应用

发明背景

技术领域

本发明涉及克隆、表达和分离重组形式的淀粉样 β 蛋白，其含 N-末端甲硫氨酸 (和/或者一种或多种其它氨基酸残基)，以及用这些重组蛋白质的方法。

背景信息

淀粉样 β (1-42)蛋白 (也被称为 A β (1-42)) 是长度范围有 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 和 1-43 个残基的蛋白质家族。1-42 型是阿耳茨海默和先天愚型患者脑中蛋白质、液体、碳水化合物和盐组成的不可溶性细胞外沉积(老年或神经炎斑)的中心成份(Masters 等, PNAS 82, 4245-4249, 1985)。特别是, 淀粉样 β (1-42)和相似衍生物)蛋白质具有 42 个氨基酸的多肽, 其通过蛋白水解过程衍生自淀粉样前体蛋白(APP)。除了人变体, 这也包括人之外的生物 (特别是其它哺乳动物, 尤其是大鼠) 中出现的淀粉样 β (1-42)蛋白异构产物。该蛋白质在水环境中倾向于聚合, 其可以非常不同的分子形式出现。

已经证明, 不可溶性蛋白沉积与痴呆病症(如, 阿耳茨海默氏病)的发生或进程的简单相关性并不令人信服(Terry 等, Ann. Neurol. 30, 572-580 (1991), Dickson 等, Neurobiol. Aging 16, 285-298 (1995))。相反, 突触和认知感觉的丧失似乎更与可溶形式的 A β (1-42)相关 (Lue 等, Am. J. Pathol. 155, 853-862 (1999); McLean 等, Ann. Neurol. 46, 860-866 (1999))。

在可溶形式的 A β (1-42)中, 根据推测会造成痴呆病症 (如, 阿耳茨海默氏病) 的分子类型, 本质上有两种不同的假设。首先, 假设有 A β (1-42)初原纤维的细胞毒作用。后者仍是可溶的、纤维状的、相对高凝集度的 A β (1-42)形式, 其分子量范围为 150-250 kDa (Arispe 等 PNAS 90, 567 (1993), Lashuel 等, Nature 418, 291 (2002)), 由于具有形成孔的性质, 其显然会通过神经元细胞膜造成不受控的钙流入。其次, 分子量范围为 15-30 kDa 的寡聚 A β (1-42)衍生物已经被描述(M. P. Lambert 等 PNAS

95,6448-6453 (1998))。这些非纤维状的寡聚物也被称为淀粉样衍生的、扩散性和致痴呆的配体或 ADDL 的(参见美国专利 6,218,506; 国际申请 WO 01/10900; 和 Lambert 等, 同上)可在对海马切片神经元的长期增强率显示出有抑制作用的制品中被找到。可是, 以前对寡聚物研究状态的特征在于实际相关的种类间有很大不确定性。文献中的信息有很大差异。例如, 美国专利 6,218,506 描述 ADDL 有 3 至 12 个亚基, 而国际申请 WO 01/10900 描述的 ADDL 有多至 24 个亚基(也可参见 Luhrs 等, PNAS 102(48), 17342-17347 (2005))。

另外, 有报道出现 N-末端截短形式的 A β (1-42) 蛋白与阿耳茨海默氏病有关联。除了 A β (1-42), 早在 1985 年, N-末端截短形式也在死亡的阿耳茨海默患者脑的沉积物中被检测到(C. Masters 等, PNAS 82, 4245-4249 (1985))。因此, 也知道脑中出现的特定蛋白酶(如 neprilysin (NEP 24.11) 或 IDE (胰岛素降解酶的简称) 能降解 A β (1-42) (D.J. Selkoe, Neuron 32, 177-180, (2001))。可是, N-末端截短形式在阿耳茨海默氏病发病机理中的重要性还不清楚(Lee 等, JBS 278, 4458-4466 (2003))。有趣的是, 一些患有零星或家族性阿耳茨海默氏病或先天愚型的患者优先积聚这些截短形式 (J. Näslund 等, PNAS 91, 8378-8382, (1994), C. Russo 等, Nature 405, 531-532, (2000), T. C. Saido 等, Neuron 14, 457-466, (1995))。相对近期的研究(Sergeant 等, J. of Neurochemistry 85, 1581-1591, (2003)) 显示死亡阿耳茨海默患者脑中所有不可溶性 A β 肽的 60% 是基于 N-末端截短形式的。

根据以上观点, 当然有需求要制备大量(各种形式的)淀粉样 β 蛋白质来达到研究和结果测试的需要, 所述研究和结果测试涉及检测人的阿耳茨海默氏病, 更重要的是, 涉及开发预防和治疗阿耳茨海默氏病的生物和小分子。进一步, 这类制备能进行进一步研究蛋白质与阿耳茨海默病因的关联性质。因此, 制备足量和天然样功能形式的这种蛋白质的价值无法估量。

另外, 以前的体外研究依赖于化学合成的序列, 其可能由肽的天然裂解点而得到。而且, 体内研究通常依赖于生物合成的淀粉样 β , 其不言而喻是由天然裂解点而得到的。因此, 具有在原核重组系统(如大肠杆菌)中产生大量天然和突变的淀粉样肽的能力当然优选存在于当前的制备方法中。

本文引用的所有专利和文献全文都纳入本文参考。

发明简述

本发明涵盖纯化的 β -淀粉样蛋白,其与式[X+Y]所示的蛋白质有至少70%氨基酸序列同一性,其中"X"包含位于所述蛋白质氨基末端的一种或多种选自甲硫氨酸、缬氨酸和亮氨酸的氨基酸,而"Y"包含天然淀粉样 β 蛋白质氨基酸序列的全部或部分。特别是,"Y"可以包含天然 β -淀粉样蛋白的39至43个连续的氨基酸。"Y"还包括已知的人家族性突变变体,其与天然 β -淀粉样蛋白的氨基酸序列有至少70%序列同一性。根据阿耳茨海默前体蛋白质(APP)的编号的序列,这些人家族性突变包括但不限于:Glu665Asp (Peacock, 等, Ann Neurol. 1994 Apr; 35 (4):432-8); Lys/Met670/Asn/Leu (瑞典) (Mullan, 等, Nat Genet. 1992 Aug; 1 (5):345-7); Ala673Thr (Peacock, 等, Neurology. 1993 Jun; 43 (6):1254-6); His677Arg (Janssen, 等 Neurology. 2003 Jan 28; 60 (2):235-9); Asp678Asn (Wakutani, 等 J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004 Jul; 75 (7):1039-42); Ala692Gly (弗兰德) (Kumar-Singh 等, Am J Pathol. 2002 Aug 1; 161 (2):507-520); Glu693Gly (北极) Kamino, 等, Am J Hum Genet. 1992 Nov; 51 (5):998-1014); Glu693Gln (荷兰) (Van Broeckhoven, 等 Science. 1990 Jun 1; 248 (4959):1120-2); Glu693Lys (意大利) (Tsubuki, 等, Lancet. 2003 Jun 7; 361 (9373):1957-8); Asp694Asn (爱荷华) (Grabowski, 等, Ann Neurol. 2001 Jun; 49 (6):697-705); Ala713Thr (Carter, 等, Nat Genet. 1992 Dec; 2(4):255-6); Ala713Val (Jones, 等, Nat Genet. 1992 Jul; 1(4):306-9)。如上所示,"X"可以是诸如甲硫氨酸。

另外,本发明包括分离的核酸分子,其编码与式[X+Y]所示的蛋白质有至少70%氨基酸序列同一性的 β -淀粉样蛋白,其中"X"含位于所述蛋白质氨基末端的一种或多种选自甲硫氨酸、缬氨酸和亮氨酸的氨基酸,而"Y"包含天然淀粉样 β 蛋白质氨基酸序列的全部或部分。"X"和"Y"可如上定义。本发明还包括含分离的核酸分子的载体以及含该载体的宿主细胞。

另外,本发明涵盖制备与式[X+Y]所示的蛋白质有至少70%氨基酸序列同一性的纯化的 β -淀粉样蛋白的方法,其中"X"包含位于所述蛋白质氨基末端的一种或多种选自甲硫氨酸、缬氨酸和亮氨酸的氨基酸,

而“Y”包含天然淀粉样 β 蛋白质氨基酸序列的全部或部分。该方法包括以下步骤：a) 将编码上述 β -淀粉样蛋白的核酸分子转染入载体；和 b) 用一段时间并在足以由宿主细胞表达 β -淀粉样蛋白的条件下将步骤 a) 的所述载体转化入宿主细胞。宿主细胞可以是原核(例如，大肠杆菌、杆菌、链球菌或乳酸菌)或真核细胞(例如，昆虫细胞、酵母细胞或哺乳动物细胞)的。

而且，本发明包括结合和/或由如上所述 β -淀粉样蛋白 Met 形式的分离的抗体。它可以是单克隆或多克隆的。优选它是单克隆的并是人或人源化的。该抗体可具有至少 0.50 微摩尔的特异结合常数 (K_d)、每摩尔大于-30 千焦耳的结合焓和/或每个淀粉样球聚体至少一个抗体的抗体与淀粉样球聚体结合率。(重要的是，应注意到，该抗体也可结合抗原(例如，A β (1-42)或 A β (1-40))的非 Met 形式)。

另外，本发明包括治疗或预防需要治疗或预防的患者中的阿耳茨海默氏病的方法该方法包括向所述患者以足以实现所述治疗或预防的量给药上述分离的抗体。抗体可以以任何合适的治疗途径给药，包括如，肌肉内、静脉内或皮下。

另外，本发明包括分离的 Met- β -淀粉样肽寡聚物，其包含：1) 链内反平行方向的残基 19 至 21 和残基 30 至 32 和 2) 链间平行方向的残基 34-38。寡聚物还包含对于选自以下的原子对具有分子内质子间距为约 1.8 - 6.5 埃的 A- β (1-42)肽：F19 (NH) -I32 (NH)，F19 (NH) - I32(HB)，F19 (NH) -I32 (HG##)，A21 (NH) -A30 (NH)，A21 (NH) -A30 (HB#)，A21 (NH) -I31 (HD1#)，A21(NH)- I31(HG1#)，I32 (NH) -F19 (HD#)，I32 (NH) -F19 (HB#)和 A30 (NH) -A21 (HB#)。

本发明另外包括分离的 Met- β -淀粉样肽寡聚物，其中寡聚物包含对于选自以下的原子对肽链 A 和肽链 B 间分子间质子间距为约 1.8 - 5.5 埃的 A- β (1-42)肽：G33 (NH) -G34 (NH)，M35 (NH) -V36 (NH)，G37 (NH) - G38 (NH)，G33 (NH) -V18 ($C_\gamma H_3$)，V18 (NH) -V18 ($C_\gamma H_3$)，L34 (NH) -L34 ($C_\delta H_3$)，M35 (NH) -V36 ($C_\gamma H_3$)，G38(NH) - V39 ($C_\gamma H_3$)和 V39 (NH) -V39 ($C_\gamma H_3$)。寡聚物还包含分子内反平行 β 折叠，其至少含残基 19-21 和 30-32 和原子对 {F19 CO, I32 N}，{I32 CO, F19 N}，{A21 CO, A30 N}，和 {A30 CO, A21 N}，而且距离为 3.3 $\pm$ 0.5 Å，其中 CO 表示主链氧原子，而且所述残基的 ϕ (ϕ)角范围为-180 至-30 和所述残基的 ψ (ψ)角范

围为约 60 至 180 或约 -180 至 -150。

另外, 本发明包括分离的 Met- β -淀粉样寡聚物, 其中寡聚物包含分子间平行 β 折叠, 其至少含至少两种 β -淀粉样肽(标记为 A 和 B)的残基 34-38, 其中以下原子对 {G33 CO (A), L34 N (B)}, {L34 CO (B), M35 N (A)}, {M35 CO (A), V36 N (B)}, {V36 CO (B), G37 N (A)}, 和 {G37 CO (B), G38 N (A)} (其中 CO 表示主链氧原子) 距离为 $3.3 \pm 0.5 \text{ \AA}$, 而且所述残基的 ϕ 角范围为 -180 至 -30 和所述残基的 ψ 角范围为 60 至 180 或 -180 至 -150。

另外, 本发明包括另一种结合至少一种 β -淀粉样 N-Met 1-42 寡聚物的分离的抗体。该寡聚物可选自如: (a) 分子内反平行 β 折叠, 其至少含残基 19-21 和 30-32, 其中以下原子对 {F19 CO, I32 N}, {I32 CO, F19 N}, {A21 CO, A30 N}, 和 {A30 CO, A21 N} (其中 CO 表示主链氧原子) 距离为 $3.3 \pm 0.5 \text{ \AA}$, 而且所述残基的 ϕ 角范围为 -180 至 -30 和所述残基的 ψ 角范围为约 60 至 180 或 -180 至 -150; 和 (b) 分子间平行 β 折叠, 其至少含至少两种 β -淀粉样肽(标记为 A 和 B)的残基 34-38, 其中以下原子对 {G33 CO (A), L34 N (B)}, {L34 CO (B), M35 N (A)}, {M35 CO (A), V36 N (B)}, {V36 CO (B), G37 N (A)}, 和 {G37 CO (B), G38 N (A)} (其中 CO 表示主链氧原子) 距离为 $3.3 \pm 0.5 \text{ \AA}$, 而且所述残基的 ϕ 角范围为 -180 至 -30 和所述残基的 ψ 角范围为约 60 至 180 或 -180 至 -150。该抗体-寡聚物复合物具有包含至少两种 N-Met 1-42 β -淀粉样肽的 3 维结构, 其依次包含任何图 20 和 21 所示的物理许可的构象。(该抗体也可结合抗原的非 Met 形式以及 Met 和非 Met 形式的截短部分。)

另外, 本发明包括纯化的含 Met 的球聚体, 其包含至少两种上述分离的 β -淀粉样蛋白以及结合纯化的球聚体的分离的抗体。

对于与诊断应用相关的, 本发明包括诊断怀疑患有该疾病的患者中阿耳茨海默氏病的方法。该方法包括如下步骤: a) 从患者中分离生物样品; b) 用一段时间并在足以形成球聚体/抗体复合物的条件下, 使生物样品接触一种或多种分离的抗体; 和 c) 检测样品中球聚体/抗体复合物的存在性, 存在复合物表示所述患者中诊断出阿耳茨海默氏病。

本发明还包括诊断怀疑患有该疾病的患者中阿耳茨海默氏病的方法, 其包括如下步骤: a) 从患者中分离生物样品; b) 用一段时间并在

足以形成抗体/球聚体复合物的条件下使生物样品接触含 Met 形式的球聚体; c) 用一段时间并在足以使缀合物结合结合的抗体的条件下, 将缀合物加入得到的抗体/球聚体复合物, 其中缀合物包含与能产生可检测信号的信号产生化合物相连的抗体; 和 d) 通过检测信号产生化合物产生的信号来检测可能出现于生物样品中的抗体的存在性, 信号表示患者中诊断出阿耳茨海默氏病。

本发明还包括诊断怀疑患有阿耳茨海默氏病的患者中阿耳茨海默氏病的方法, 其包括以下步骤: a) 从患者中分离生物样品; b) 用一段时间并在足以形成抗体/纯化的球聚体复合物的条件下, 使所述生物样品接触上述含 Met 形式的球聚体; 和 c) 检测样品中抗体/纯化的球聚体复合物的存在性, 存在复合物表示患者中诊断出阿耳茨海默氏病。

另外, 本发明包括另一种诊断怀疑患有阿耳茨海默氏病的患者中阿耳茨海默氏病的方法, 其包括以下步骤: a) 从患者中分离生物样品; 用一段时间并在足以形成抗抗体/抗体复合物的条件下, 使生物样品接触特异于样品中抗体的抗抗体; b) 用一段时间并在足以使缀合物结合结合的抗体的条件下, 将缀合物加入得到的抗抗体/抗体复合物, 其中缀合物包含与能产生可检测信号的信号产生化合物相连的含 Met 的球聚体; 和 c) 检测信号产生化合物产生的信号, 信号表示患者中诊断出阿耳茨海默氏病。

本发明还包括疫苗, 其包含上述纯化的 Met- β -淀粉样蛋白和药学上可接受的佐剂。另外, 本发明包括疫苗, 其含由纯化的 Met- β -淀粉样蛋白产生的或结合蛋白质的抗体、和药学上可接受的佐剂。

另外, 本发明还包括预防或治疗需要预防或治疗的患者中的阿耳茨海默氏病的方法, 其包括向患者以足以实现预防或治疗的量给药上述疫苗的步骤。

另外, 本发明包括鉴定治疗或预防阿耳茨海默氏病的化合物的方法。该方法包括以下步骤:

a) 用一段时间并在足以使一种或多种化合物结合或中和纯化的球聚体的条件下, 将一种或多种感兴趣的化合物暴露于上述含 Met 的纯化的球聚体; 和 b) 鉴定那些结合或中和纯化的球聚体的化合物, 鉴定出的化合物用于治疗或预防阿耳茨海默氏病。

而且, 本发明包括设计用于治疗或预防患者中的阿耳茨海默氏病的

小分子的方法该方法包括如下步骤：a)分析诸如上述纯化的含 Met 的球聚体、上述分离的含 Met 的 β -淀粉样蛋白组合物、或分离的含 Met 的 β -淀粉样蛋白组合物组装体的蛋白质的 3 维结构；b)鉴定步骤 a)选出的蛋白质表面上的一种或多种表位；和 c)设计结合步骤 b)鉴定出的表位的小分子，所述小分子用于治疗或预防阿耳茨海默氏病。

本发明还包括鉴定用于治疗或预防阿耳茨海默氏病的单克隆抗体的方法。该方法包括如下步骤：a)用一段时间并在足以使一种或多种单克隆抗体与所述球聚体结合并形成球聚体/抗体复合物的条件下，使上述纯化的含 Met 的球聚体暴露于单克隆抗体文库；b)鉴定球聚体/抗体复合物的存在性；和 c)确定一种或多种带有复合物的抗体的同一性，所述一种或多种抗体用于治疗或预防阿耳茨海默氏病。

另外，本发明包括稳定含 Met 的（或不含 Met 的）Met-淀粉样 β (1-42)寡聚物或其部分的样品的方法，其包括的步骤为用一段时间（即，1-2 小时）并以足以实现所述稳定的量（即，5% 水悬浮液或溶液）将烷基链去污剂或液体加入样品。

本发明还包括纯化的含 Met 的球聚体，其含至少两种上述分离的淀粉样 β 蛋白质。

另外，本发明涵盖分离的抗体，其结合图 21 所示蛋白质的氨基酸残基 E22-D23-V24-G25-S26-N27-K28。本发明还包括该表位本身。该序列可进一步在 K28 之后包含 G29。另外，本发明包括至少图 21 的蛋白质的始于第 A21 位的 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个连续的氨基酸。另外，应当注意到，该表位可以在除了上述 Met 形式的 A β 蛋白质之外的非 Met 形式的 A β (1-42)蛋白质和 A β (1-40)蛋白质中找到。

另外，必须注意到，预计由于微生物中存在天然蛋白酶，大肠杆菌中小肽的表达（如本发明的那些）会迅速降解。可是，本发明显示，甲硫氨酸形式的淀粉样 β 蛋白质在宿主细胞表达中仍旧完全完整，而且另外的特征有，产生的蛋白质包含由被称为 APP 的淀粉样前体蛋白编码的精确氨基酸序列。

附图简述

图 1(A)图示了编码 β -淀粉样肽的基因的 DNA 序列 (SEQ ID NO:1)。克隆所用的核苷酸限制性位点显示了但没有包括在设计的引物

中。显示了起始的 Met (ATG)和终止密码子(TGA)。图 1(B) 显示了衍生自淀粉样前体蛋白质 (APP)体内加工过程的天然淀粉样 β (1-42)蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)。

图 2 图示了多种形式的含天然 N-末端甲硫氨酸的淀粉样 β 肽或蛋白质,其从天然序列 (包括已知的突变变体) 残基 40 至 44 (SEQ ID NO: 3 = 1-39, SEQ ID NO:4 = 1-40, SEQ ID NO: 5 = 1-41, SEQ ID NO: 6 = 1-42 和 SEQ ID NO: 7 = 1-43)延伸出。

图 3 代表重组淀粉样 β 的纯化方案。

图 4 代表重组 Met 淀粉样 β 1-42 的 MALDI 质谱。肽的理论分子量是 4645 Da。观察到的值是 4648 Da。3 Da 的差异在仪器精度限制之内。

图 5 图示了 ELISA 结果, 其证实了小鼠单克隆抗体 A 的选择性超过针对由重组淀粉样蛋白 (序列: Met-A β 1-42) 制备的球聚体的小鼠单克隆抗体 B。

图 6 图示了 ELISA 测试的结果, 其比较了小鼠单克隆抗体 A、小鼠单克隆抗体 B、小鼠单克隆抗体 C 和针对由重组淀粉样蛋白(序列: Met-A β 1-42) 制备的球聚体的小鼠单克隆抗体的结合性。

图 7 图示了 ELISA 测试的结果, 其比较了小鼠单克隆抗体 A、小鼠单克隆抗体 B、小鼠单克隆抗体 C 和针对由重组淀粉样蛋白 (序列: Met-A β 1-42) 制备的球聚体截短序列残基 20-42 的小鼠单克隆抗体 D 的结合性。

图 8 概述了用合成的淀粉样肽或重组全长淀粉样肽制备球聚体中所用的步骤。

图 9 描述了由合成的 Bachem 肽 (1-42)或重组 MetA- β (Met1-42) 制备的球聚体的各种凝胶上样量的 SDS-PAGE 凝胶(带有分子量标准)。

图 10 描述了流体力学分析 (沉积速度和动态光散射 (DLS))由重组 MetA- β 1-42 制备的球聚体的结果。

图 11 描述了由重组 MetA- β 1-42 制备的球聚体或购自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)的金纳米球的有代表性的原子力显微镜 (AFM) 图像。仅对于边缘图像, 最锐利的特征越亮。图像越暗, 特征越接近于云母芯片基质表面的表面。

图 12 至 14 描述了在没有 SDS (图 15)、有 0.05% SDS (图 16)和 0.2% SDS (图 17)时显现的球聚体(30 微克/mL 单体淀粉样蛋白浓度)的有代表

性的 AFM 图像。在每幅图中, 左:高度图, 右, 边缘图。最高(左)和最锐利(右)的特征在每幅图中(分别)较亮。图像越暗, 特征越接近于云母芯片基质表面的表面。

图 15 图示了单克隆抗体 A 与由重组 MetA- β 1-42 制备的球聚体的结合结果。结合直接通过等温滴定热量测定法(ITC)来测量。在该例子中, 热量计小室含 86 微摩尔(基于单体单位)浓度的淀粉样 β 。用 A 抗体滴定至 132 微摩尔。两者都是在含 35mM NaCl 的 5 mM 磷酸钠缓冲液(pH 7.4)中。拟合的解离常数(结合的 Kd)为 490 纳摩尔(或 0.46 μ M), 观察到的结合焓是-47.5 千焦耳/摩尔, 而且表观结合化学计量是每个抗体分子 6.3 个淀粉样 β 分子。结合流体力学分析, 该结果提示每个球聚体单位有两个全长抗体组合位点。

图 16 描述了含 ^{15}N - 标记的 N-Met A β 1-42 的 90% H_2O /10% D_2O 溶液(A 栏)和交换成 100% D_2O 溶液一天之后(B 栏)的 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ 异核单量子关联能谱法(HSQC)图谱。

图 17(A) 代表 N-met 淀粉样 β 肽 1-42 的序列。用 NMR 鉴定的两条 β 链加了框(SEQ ID NO:8)。图 17(B) 代表分析 NMR 数据的链间 NOE 而鉴定出的 A β 1-42 反平行 β 折叠(SEQ ID NO:9) (aas 28-39); SEQ ID NO:10 (aas 17-23))。

图 18 描述了基于固态 NMR 和观察到的混合了本文所述球聚体的平行/反平行结构途径的以前推测平行 β -折叠纤维结构途径(Sciaretta 等, Biochemistry 2005, 44:6003-6014)间的显著结构差异。

图 19 描述了据信是通过 SDS (约 1.5%)中溶液状态的 NMR 观察到的最小球聚体种类的 (1-2 nm 高)并混合有些微较大(4-5 nm)完全球聚体的 AFM 图。仅对于边缘图像; 最锐利的特征越亮。图像越暗, 特征越接近于云母芯片基质表面的表面。

图 20 概述了 N-Met A β 1-42 样品上获得的 NMR 数据。虚线表示用混合样品 ($[\text{U}-^{15}\text{N}^2\text{H}]$ -标记的和 $[\text{U}-^{14}\text{N}, ^2\text{H}]$ -标记的样品, 以 1:1 比率混合)在 ^{15}N -过滤的和 ^{15}N -编辑的 3D NOESY 实验中观察到的分子间 NH-NH NOE。箭头实线表示用混合样品 ($[\text{U}-^{15}\text{N}, ^2\text{H}]$ -标记的样品以 1:1 比率与含选择性 IVL 残基的 ^{13}C -标记的质子化甲基的 $[\text{U}-^{14}\text{N}, ^2\text{H}]$ -标记的样品混合)在 ^{15}N -解析的 3D NOESY 实验中观察到的侧链由 NH 至甲基(箭头)的 NOE。实线表示用带有 ^2H 背景中 Ile, Val, Leu 残基的选

择性 ^{13}C -标记的质子化甲基的统一 ^{15}N -标记的样品在 ^{15}N -解析的 3D NOESY 实验中观察到的分子内 NH-NH NOE。箭头虚线表示用 $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -标记的样品在 ^{15}N -解析的 3D NOESY 实验中观察到的分子内 NOE。用圈表示在 NH/ND 交换实验中显示出慢交换的主链酰胺。

图 21 描述了与 NMR 数据一致的 N-Met- β -淀粉样肽 1-42 重复单位的结构模型。用带有程序 CNX(Brunger 等, *Acta Crystallogr. D* 54 (Pt 5), 905-21 (1998)) 和来自本文分析的 NMR 数据的 NOE 衍生的距离约束的模拟退火规程来计算结构。带状图所示的残基对应于黑色的残基。

图 22 描述了球聚体中 3 个 "假设的" 较高阶排列的淀粉样肽相互作用, 其发源于溶液中观察到的三聚、四聚或五聚中间体形式(图 12, SDS 胶)。较高阶聚集也如本文所述般聚集, 而且通过流体力学而被观察到。这些排列基于由分子间聚集和永久形成平行淀粉样肽 β 折叠纤维的驱动力形成的沿着 C-末端平行折叠区域而存在的分子间相互作用 (参见图 20)。这不是指要限制其他潜在排列的淀粉样肽或暗示它们不存在。

图 23 描述了有代表性的支撑由体外所见的链内和链间 β 折叠相互作用混合体向淀粉样构象转变转换的 Met-A- β 1-42 样品的图表和原子力和电子显微图 (参见图 s 20 和 21)。球聚体在存在上述 SDS 或脂肪酸时形成并其中实际有上述 SDS 或脂肪酸存在。如本图所示, 描绘了 SDS。必须阐明包围球聚体结构的 SDS 的精确方向。转换发生在链内反平行 β -折叠相互作用打开并形成完全平行折叠从而导致淀粉样纤维形成的时候。形成的纤维和反平行区域"打开"后产生的聚集形式的肽在图中 AFM 和 TEM 图片中被观察到。较低的 TEM 图片描述了有代表性的切片, 其带有尺度 $y \sim 260 \text{ nm}$, $x \sim 372 \text{ nm}$ 。观察到的纤维宽度为 $\sim 6 \text{ nm}$ 。如前述制备纯化的 Met1-42 球聚体样品。Met1-42 终浓度为 0.03 mg/mL 并用 2% 乙酸铀酰染色, 用于通过传递电子显微镜 (TEM) 以 337,500X 放大倍率成像。较低的 AFM 图像描述了有代表性的切片, 其带有尺度 $y = 250 \text{ nm}$, $x = 500 \text{ nm}$ 。图像显示观察到种类分散场。如前述制备纯化的 Met1-42 球聚体样品。Met1-42 初浓度为 1.1 mg/mL , 在纳米级纯水中以 20:1 稀释 (最终 0.055 mg/mL), 并于 4°C 温育 2+周。在新切开的云母芯片上沉积 $20 \mu\text{L}$ 并温育 5-8 分钟, 然后用 $600 \mu\text{L}$ 纳米级纯水冲洗云母芯片并进行 AFM 扫描。如图 X 和 Y 所示, 球聚体选择性抗体选择性结合带有混合的分子内反平行 β 折叠(约为残基 18-33)和平行 β 折叠(约为

残基 34-39)的肽中产生的表位。造成体外形成球聚体的机理或多个机理与体内观察到的那些有区别。

图 24 描述了本发明观察到的球聚体 β -淀粉样成分的坐标。坐标用于 β -淀粉样肽 N-Met 1-42 球聚体的二聚成分模型。一种分子的序列编号是 15-42, 而另一种分子的序列编号是 115-142。

图 25 图示了球聚体 (B 栏)和原纤维(C 栏)形式的淀粉样 β 肽的主链酰胺保护性的比较。

图 26 图示了用 C^{14} -SDS 使 SDS 与 A β 球聚体的结合。

图 27 图示了表示成其 N-末端 Met 形式的人家族性突变的阿耳茨海默肽。

发明详述

本发明涉及重组形式的淀粉样 β 蛋白质以及其制备方法。更具体地, 本发明包括式[X + Y]所示的淀粉样 β 蛋白质, 其中"X"包含肽氨基或 N-末端氨基酸序列选自甲硫氨酸(Met)、缬氨酸(Val)和亮氨酸(Leu)的一种或多种氨基酸。"X"包含优选 Met。

另外, "Y"代表肽内除了"X" 氨基酸或氨基末端的酸的氨基酸数量。特别是, "Y"代表 39-43 的整数并代表天然淀粉样 β (1-42) 氨基酸序列的部分或全部。按照天然氨基酸选择的 38-43 范围内的数, 该氨基酸序列起始于任何氨基酸 "数"或位于天然 1-42 序列 (例如, 氨基酸 1, 氨基酸 5, 氨基酸 12, 氨基酸 22, 氨基酸 35 等)内并终止于任何氨基酸数或位于天然序列内。本发明蛋白质的其他性质包括能结合如图 X-Y 所示的抗体。结合特征是: 1) Kd 小于或等于 0.50 微摩尔; 2) 有利结合焓 (负 ΔH) 大于每摩尔负 30 千焦耳; 和 3) 抗体与淀粉样蛋白结合率为至少每个淀粉样球聚体一个抗体。

除了本发明的氨基酸序列或蛋白质, 本发明还包括氨基酸序列, 其包含、对应于、等同于、或互补于有至少约 70%、优选至少约 80%、并更优选至少约 90%同一性的本发明蛋白质的氨基酸序列。(此外, 所有介于 70%和 100%的整数 (和其分数) 也被认为是在本发明涉及同一性百分数的范围内)。

应当注意到, 本发明还涵盖分离的核苷酸序列, 其编码本发明蛋白质以及那些具有包含、对应于、等同于、或互补于有至少约 70%、优选

至少越 80%、并更优选至少约 90%同一性的这些编码核苷酸序列的序列。(所有介于 70%和 100%的整数(和其分数)也被认为是在本发明涉及同一性百分数的范围内)。这类序列可衍生自任何来源,分离自天然来源、通过半合成途径生产、或重新合成。特别是,这类序列可分离或衍生自实施例所述之外的来源(例如,细菌,真菌,藻类,小鼠或人)。

为了本发明的目的,核苷酸序列"片段"被定义为对应于特定核苷酸序列区域的约至少 6、优选至少约 8、更优选至少约 10 个核苷酸、并更优选至少约 15 核苷酸的连续序列。

术语"同一性"指在一个核苷酸对一个核苷酸的基础上通过特定比较窗或片段得到的两个序列的相关性。因此,同一性被定义为两个 DNA 片段(或两个氨基酸序列)相同链(正义或反义)间的相同、相应或相等程度。"序列同一性百分数"的计算是比较两个特定区域上优化排列的序列,确定相同碱基或氨基酸在序列中出现的数量从而得到匹配的位置数,将这些位置数除以比较的片段中位置总数并将结果乘 100。优化排列序列可通过 Smith & Waterman, Appl. Math. 2:482 (1981)的算法、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970)的算法、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444 (1988)的方法和实现相关算法的计算机程序(例如, Clustal Macaw Pileup(<http://cragm.stanford.edu/biochem218/11Multiple.pdf>); Higgins 等, CABIOS. 5L151-153 (1989)), FASTDB(Intelligenetics), BLAST (National Center for Biomedical Information; Altschul 等, Nucleic Acids Research 25:3389-3402 (1997)), PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI)或 GAP, BESTFIT, FASTA 和 TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI). (参见美国专利 5,912,120)来进行。

为了本发明的目的,"互补性"被定义为两个 DNA 片段间的相关程度。在适合形成双螺旋的条件下,测定一个 DNA 片段的正义链与另一个 DNA 片段反义链杂交的能力,来确定它。"互补"被定义为根据规范碱基配对规则与给定序列配对的序列。例如,一个核苷酸链中的序列 A-G-T "互补"于另一个链中的 T-C-A。

在双螺旋中,腺嘌呤出现于一条链中,胸腺嘧啶出现于另一条链中。相似地,在鸟嘌呤在一条链中被找到时,胞嘧啶出现于另一条中。两个

DNA 片段核苷酸序列间相关性越大，两个 DNA 片段间形成杂合双聚合体的能力越大。

2 个氨基酸序列间的"相似性"被定义为在两个序列中存在一系列相同和保守的氨基酸残基。2 个氨基酸序列间的相似程度越高，这 2 个序列的相应、相同或相等性越高。("2 个氨基酸序列间的同一性被定义为在两个序列中存在一系列完全相同或不可变的氨基酸残基。)"互补性"、"同一性"和"相似性"的定义是所属领域普通技术人员已知的。

"编码的"指编码多肽序列的核酸序列，其中多肽序列或其部分包含核酸序列编码的多肽的至少 3 个氨基酸、更优选至少 8 个氨基酸、并更优选至少 15 个氨基酸的氨基酸序列。

另外，核酸分子与另一个核酸分子"杂交"，这时，单链形式的核酸分子能在合适的温度和离子强度条件下能与另一个核酸分子退火(参见 Sambrook 等, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版 (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York))。温度和离子强度条件确定了杂交的"严紧性"。

本文所用的术语"杂交"一般用于指核酸在合适的严紧性条件下的杂交，根据探针序列和靶序列的性质，这对所属领域技术人员来说是很显而易见的。杂交和洗涤条件是现有公知的，而且能容易实现条件调节，这取决于各种溶液的温育时间、温度和/或离子强度所期望的严紧性。参见如上述的 Sambrook 等, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版 (1989), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York 和本文参考的那些 (也可参见 Short Protocols in Molecular Biology, Ausubel 等编和 Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, "Overview of principles of Hybridization and the strategy of Nucleic Acid assays" (1993), 都纳入本文参考。)具体地，通过杂交序列长度(特别是探针序列长度)、核酸的相对 G-C 含量和允许的错配量来规定条件的选择。期望在具有较低互补程度的链间杂交时，优选低严紧条件，期望完美或接近完美的互补时，优选高严紧条件。对于典型的高严紧条件，杂交溶液含 6 X S. S. C, 0.01 M EDTA、1x Denhardt 氏溶液和 0.5% SDS。对克隆的 DNA 片段，在约 68 摄氏度下进行杂交 3 至 4 小时，而对总真核 DNA，进行约 12 至约 16 小时。对于中等严紧性，人们可利用滤膜预杂交，并与 3 X 氯化钠、

柠檬酸钠 (SSC)、50% 甲酰胺 (占该缓冲液的 0.1 M, pH 7.5)和 5 X Denhardt 氏溶液的溶液杂交。然后,人们可在 37 摄氏度预杂交 4 小时,然后在 37 摄氏度与总量等于 3,000,000 cpm 的标记的探针杂交 16 小时,然后在 2 X SSC 和 0.1% SDS 溶液中洗涤,于室温洗 4 次,每次 1 分钟,并在 60 摄氏度洗 4 次,每次 30 分钟。接着干燥,将其暴露于胶片上。对于低严谨性,杂交温度降至双聚体溶解温度 (T_m)下约 12 摄氏度。已知 T_m 是 G-C 含量和双聚体长度以及溶液离子强度的函数。

"杂交"需要两个核酸包含互补序列。可是,根据杂交严谨性,会发生碱基间错配。如上所示,适于杂交核酸的严谨性取决于核酸长度和互补程度。这些变化是现有公知的。更具体地,2 个核苷酸序列间相似或同源性程度越大,杂交具有那些序列的核酸的 T_m 值越大。为了杂交长度大于 100 核苷酸的,已经可用计算 T_m 的方程 (参见 Sambrook 等,同上)。为了与较短的核酸杂交,错配位置变得更重要,而且寡核苷酸长度决定其特异性(参见 Sambrook 等,同上)。

本文所用的"分离的核酸片段或序列"是单链或双链的 RNA 或 DNA 聚合物,其任选包含合成的、非天然的或改变的核苷酸碱基。DNA 多聚体形式的分离的核酸片段包含一种或多种 cDNA、基因组 DNA 或合成的 DNA 片段。(特定多聚核苷酸"片段"指多聚核苷酸序列,其包含与特定核苷酸序列区域相同或互补的约有至少约 6 个核苷酸、优选至少约 8 个核苷酸、更优选至少约 10 个核苷酸、并更优选至少约 15 个核苷酸、和最优选至少约 25 个核苷酸的连续序列。)核苷酸(通常在它们的 5'-单磷酸形式中被找到)根据单字母命名而被称作以下名称:"A"为腺苷酸或脱氧腺苷酸(分别针对 RNA 或 DNA),"C"为胞嘧啶核苷酸或脱氧胞嘧啶核苷酸,"G"为鸟嘌呤核苷酸或脱氧鸟嘌呤核苷酸,"U"为尿苷酸,"T"为胸腺嘧啶核苷酸,"R"为嘌呤 (A 或 G),"Y"为嘧啶(C 或 T),"K"为 G 或 T,"H"为 A 或 C 或 T,"I"为次黄嘌呤核苷,和"N"为任意核苷酸。

术语"功能等价的片段或亚片段"和"功能等价片段或亚片段"在本文中可互换使用。这些术语指分离的核酸片段的部分或亚序列,其保留改变基因表达或产生某种表型的能力而无论片段或亚片段是否编码活性酶。

术语"同源性"、"同源的"、"基本相似"和"基本相应"在本文中可互

换使用。它们指核酸片段，其中一种或多种核苷酸碱基中的变化不影响核酸片段介导基因表达或产生某种表型的能力。这些术语也指本发明核酸片段的修饰，如缺失或插入一种或多种核苷酸，其相对于最初、未修饰的片段，基本不改变所得的核酸片段的功能性质。因此可理解，所属领域技术人员将认识到本发明涵盖的大于特定示例性的序列。

"基因"指表达特定蛋白质的核酸片段，包括调解序列前(5'非编码序列)和后(3'非编码序列)的编码序列。

"天然基因"指与其自身调节序列一起天然能找到的基因。相反，"嵌合构建体"指核酸片段的组合，其正常情况下不会天然在一起。因此，嵌合构建体可包含衍生自不同的来源的调节序列和编码序列、或衍生自相同的来源但以不同于正常情况下能天然找到的方式排列的调节序列和编码序列。(术语"分离的"指从其天然环境取出序列。)

"外来"基因指通常宿主生物中找不到的基因，但其可通过基因转移导入宿主生物中。by. 外来基因可包含插入到非天然生物、或嵌合构建体中的天然基因。"转基因"是通过转化过程导入基因组中的基因。

"编码序列"指编码特定氨基酸序列的DNA序列。"调节序列"指位于编码序列上游(5'非编码序列)、之内、或下游(3'非编码序列)的核苷酸序列，而且其能影响相关编码序列的转录、RNA加工或稳定性、或翻译。调节序列可包括但不限于，启动子、翻译前导序列、内含子、和聚腺苷化识别序列。

"启动子"指能控制编码序列或功能性RNA表达的DNA序列。启动子序列由最接近的和较末梢的上游元件组成，后面的元件通常被称为增强子。因此，"增强子"是DNA序列，其能刺激启动子活性并可以启动子的天然元件或插入增强启动子水平或组织特异性的异种元件。启动子序列也可位于基因的转录部分内、和/或转录序列的下游。启动子可完整地源自天然基因，或包含源自发现的不同天然启动子的不同元件，或甚至可包含合成的DNA片段。所属领域技术人员能理解，不同的启动子可在不同的组织或细胞类型中、或在不同的发育阶段、或在响应不同环境条件时指导基因表达。使基因在多数宿主细胞类型中在大多数情况下表达的启动子通常被称为"构成型启动子"。进一步认识的是，由于在多数情况下，调节序列的确切界限不能完全确定，因此有一些变化的DNA片段可具有相同的启动子活性。

"内含子"是基因中间隔序列，其不编码蛋白质序列部分。因此，这类序列转录成 RNA，但是然后被切割而不被翻译。该术语应用于切掉的 RNA 序列。"外显子"是基因序列部分，其被翻译并在源于基因的成熟的信使 RNA 中被找到，但不必是编码最终基因产物的序列部分。

"翻译前导序列"指位于基因启动子序列和编码序列之间的 DNA 序列。翻译前导序列出现在翻译起始序列的完全加工的 mRNA 上游。翻译前导序列可影响初级转录子向 mRNA 的加工、mRNA 稳定性或翻译效率。已经描述了翻译前导序列的例子 (Turner, R.和 Foster, G. D. (1995) *Molecular Biotechnology* 3:225)。

"3'非编码序列"指位于编码序列下游的 DNA 序列，而且包括聚腺苷化识别序列和其他编码能影响 mRNA 加工或基因表达的调节信号的序列。聚腺苷化信号的特征通常在于影响聚腺苷酸链加到 mRNA 前体的 3' 末端。Ingelbrecht 等, *Plant Cell* 1:671-680 (1989)例示了使用不同的 3'非编码序列。

"RNA 转录子"指 RNA 聚合酶催化转录 DNA 序列而得的产物。当 RNA 转录子是 DNA 序列完美互补拷贝时，它被称为初级转录子，或它可以是衍生自转录后加工的初级转录子的 RNA 序列并被称为成熟 RNA。"信使 RNA (mRNA)"指没有内含子而且可有细胞翻译成蛋白质的 RNA。"cDNA"指互补于并用反转录酶合成自 mRNA 模板的 DNA。CDNA 可以是单链的或利用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段转化成双链。"正义" RNA 指包括 mRNA 并可在细胞中或在体外翻译成蛋白质的 RNA 转录子。"反义 RNA"指互补于全部或部分靶初级转录子或 mRNA 并阻断靶基因表达的 RNA 转录子(美国专利 5,107,065)。反义 RNA 的互补可以在特定基因转录子的任何部分内，即在 5' 非编码序列、3'非编码序列、内含子，或编码序列中。"功能性 RNA"指反义 RNA、核酶 RNA、或不可翻译但对细胞过程有影响的 RNA。术语"互补"和"反互补"在涉及 mRNA 转录子时可在本文中互换使用，并指定义信使反义 RNA。

术语"内源 RNA"指用本发明重组构建体(无论天然产生的或非天然产生的，即通过重组方式、诱变等到入的)转化前由出现在宿主基因组中任何核酸序列编码的任何 RNA。

术语"非天然产生的"指人工的，与在正常情况下能天然找到的不一致的。

术语"可操作相连的"指核酸序列相连在核酸片段上,由此一个的功能由另一个调控。例如,启动子可操作相连于编码序列,这时它能调节那个编码序列的表达(即,编码序列在启动子的转录控制之下)。编码序列能以正义或反义方向可操作相连于调节序列。在另一个实施例中,本发明的互补RNA区域能直接或间接地可操作相连于靶 mRNA 5'、或靶 mRNA 3'、或靶 mRNA 内,或者第一互补区域在靶 mRNA 5' 而其互补在 3'。

本文所用的术语"表达"指产生功能性最终产物。表达基因包括转录基因和翻译 mRNA 成前体或成熟蛋白质。"反义抑制"指产生能抑制靶蛋白质表达的反义 RNA 转录子。"共抑制"指产生能抑制表达相同或基本相似外来或内源基因的正义 RNA 转录子 (美国专利 5,231,020)。

"成熟"蛋白质指翻译后加工的多肽;即,初级翻译产物中出现的任何前体或原肽去除而得的一个。"前体"蛋白质指 mRNA 的初级翻译产物;即,其中前体或原肽仍存在。前体或原肽可以是但不限于细胞内定位信号。

"稳定转化"指将核酸片段转化进宿主生物基因组,形成遗传性稳定遗传。相反,"瞬时转化"指将核酸片段转化进宿主生物的核、或含 DNA 的细胞器,导致基因表达而不整合或稳定遗传。含转化的核酸片段的宿主生物被称为"转基因"生物。本文所用的术语"转化"指稳定转化和瞬时转化。

本文所用的标准重组 DNA 和分子克隆技术是现有公知的并完全描述于 Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和 Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (后文的"Sambrook")。

术语"重组"指两种不同方式分裂的序列片段的人工组合,例如,通过化学合成或通过基因工程技术操纵分离的核酸片段而组合。

"PCR"或"聚合酶链式反应"是合成大量特定 DNA 片段的技术,其有一系列重复循环组成 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT)。通常,双链 DNA 被热变性,两个互补于靶片段 3'边界的引物低温退火,然后中等温度延伸。一组这 3 个连续步骤被称为循环。

聚合酶链式反应 ("PCR")是通过重复复制模板在短期内用于扩增 DNA 几百万倍的有力技术。(Mullis 等, Cold Spring Harbor Symp. Quant.

Biol. 51:263-273 (1986); Erlich 等, 欧洲专利申请 50,424; 欧洲专利申请 84,796; 欧洲专利申请 258,017; 欧洲专利申请 237,362; Mullis, 欧洲专利申请 201,184; Mullis 等, 美国专利 4,683,202; Erlich, 美国专利 4,582,788; 和 Saiki 等, 美国专利 4,683,194)。该过程使用特定体外合成寡核苷酸组来引发 DNA 合成。引物的设计取决于要分析的 DNA 序列。通过续断高温熔解模板、让引物与模板中的互补序列技术退火、然后用 DNA 聚合酶复制模板的许多循环(通常为 20-50 个), 来实现该技术。

PCR 反应的产物通过琼脂糖凝胶分离接着溴乙锭染色并用 UV 透视镜观察来分析。或者, 可将放射性 dNTP 加入 PCR 从而使标记整合入产物。在该情况中通过将凝胶在 x 射线胶片上曝光来使 PCR 产物可见。放射性 PCR 产物的额外优点是能定量各扩增产物水平。

术语"重组构建体"、"表达构建体"和"重组表达构建体"在本文中可互换使用。这些术语指基因材料的功能单位, 其能用所属领域技术人员公知的标准方法插入细胞基因组中。这类构建体可以自身或与载体协同使用。如果用了载体, 那么载体的选择取决于用于转化宿主或宿主细胞的方法, 这是所属领域技术人员公知的。例如, 可使用质粒。技术人员知道必须在载体上出现以成功转化、选择和繁殖含本发明任何分离的核酸片段的宿主细胞的遗传原件。技术人员也会认识到不同的独立转化事件会造成不同水平和模式的表达 (Jones 等, (1985) EMBO J. 4:2411-2418; De Almeida 等, (1989) Mol. Gen. Genetics 228:78-86), 因此必须筛选多种事件以获得展示期望表达水平和模式的系。可通过 Southern 分析 DNA、Northern 分析 mRNA 表达、Western 分析蛋白质表达、或表型分析来完成该筛选。

一旦分离了编码感兴趣的 β -淀粉样蛋白的核苷酸序列, 则可通过使用载体或构建体, 将其导入原核或真核宿主细胞, 优选是原核宿主细胞, 如大肠杆菌。

也必须将编码表达蛋白质 N-末端的核苷酸序列导入载体。另外, 载体(例如, 噬菌体、粘粒或质粒)可包含编码天然淀粉样 β 蛋白质相关部分的核苷酸序列、编码 N-末端的核苷酸序列、以及在宿主细胞中有功能并能引发蛋白质表达的任何调节序列(例如, 启动子)。调节序列(例如, 启动子)可操作地相连、或可操作相连于核苷酸序列。(如果启动子或调节序列影响编码序列的转录或表达, 则启动子或调节序列如所

述与编码序列"可操作相连"。)合适的启动子包括如, T7 lac 启动子、T7 启动子、pBAD、tet 启动子、Lac 启动子、Trc 启动子、Trc 启动子和 PL 启动子, 它们所有都可用于试着在细菌细胞(例如, 如大肠杆菌)中表达蛋白质。如果人们利用昆虫作为宿主细胞, 则可利用启动子, 如多角体蛋白、PI0、MT、Ac5 和 OplE2。如果人们优选在病毒中表达蛋白质, 则可使用 pCMV、pUbC 和 pU6 作为启动子。哺乳动物细胞中可用的启动子包括如, CMV, U6, EF-1, pCMV-2x TetO2, pUbC, SV40, b-酪素和 RSV。合适的酵母启动子包括 AOX1, GAP, AUG1, GAL1, nmt1, nmt41, nmt81 和 TEFl。构建体中出现的序列的选择取决于期望的表达产物以及宿主细胞的性质。

如上所述, 一旦构建成载体, 那么可通过所属领域普通技术人员已知的方法, 包括如转染、转化和电穿孔, 来将它导入选择的宿主细胞中(参见 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, 第 1-3 卷, 编者 Sambrook 等, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))。然后在允许核苷酸序列表达以产生期望的、编码的、随后收获并纯化的淀粉样 β 蛋白质的合适条件下, 培养宿主细胞。

合适的原核宿主细胞的例子包括如, 细菌(如, 大肠杆菌)、杆菌、链球菌和乳酸菌。合适的真核宿主细胞例子包括如, 昆虫细胞(例如, SF9, SF21 和 Hi5)、酵母细胞、*S. pombe*、哺乳动物细胞和果蝇细胞。

宿主细胞中的表达可以瞬时或稳定方式来实现。瞬时表达可由导入的构建体产生, 所述构建体包含宿主细胞中有功能的表达信号, 但该构建体不复制并很少整合入宿主细胞, 或在宿主细胞不增殖时。瞬时表达也可通过诱导出与感兴趣的基因可操作相连的调节启动子的活性来实现;但是, 这些可诱导系统通常展示出低基本水平的表达。稳定表达可通过如能整合进宿主基因组或在宿主细胞中自发复制的构建体来实现。通过是用位于或转染有表达构建体的选择性标记, 然后选择表达该标记的细胞, 来选出稳定表达感兴趣的基因。当稳定表达由整合引起时, 构建体整合位置可在宿主基因组中随机产生或能通过使用含与宿主基因组的同源性足以与宿主基因座位靶重组的区域的构建体而靶向。当构建体靶向于内源基因座位, 所有或一些转录和翻译调节区域可由内源基因座位提供。

也可使用转基因哺乳动物从而表达感兴趣的蛋白质。更具体地, 一

旦产生上述构建体，它可被插入胚胎的原核中。然后将胚胎植入受体雌性动物。或者，也可使用核转移法(Schnieke 等, Science 278:2130-2133 (1997))。然后允许妊娠和分娩 (参见如, 美国专利 5,750,176 和美国专利 5,700,671)。用作宿主的哺乳动物可选自诸如, 小鼠、大鼠、兔、猪、山羊、绵羊、马和奶牛。可是, 由于它能够将编码感兴趣的蛋白质的 DNA 整合入其基因组, 可使用任何哺乳动物。

除了上述过程, 业内人士熟悉标准资料, 其描述了特定构建条件和过程、操纵和分离大分子(例如, DNA 分子、质粒等)、产生重组生物和筛选和分离克隆, (参见例如, Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989); Maliga 等, Methods in Plant Molecular Biology, Cold Spring Harbor Press (1995); Birren 等, Genome Analysis: Detecting Genes, 1, Cold Spring Harbor, New York (1998); Birren 等, Genome Analysis: Analyzing DNA, 2, Cold Spring Harbor, New York (1998); Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual, 编. Clark, Springer, New York (1997))。

本文的术语" $A\beta$ (X-Y)"指包括 X 和 Y 的人淀粉样 β 蛋白质的氨基酸位置 X 至氨基酸位置 Y 的氨基酸序列, 特别是氨基酸序列 DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGWIA 或其任何天然产生的变体 (特别是带有至少一个选自 A2T, H6R, D7N, A21G ("弗兰德"), E22G ("北极"), E22Q ("荷兰"), E22K ("意大利"), D23N ("爱荷华"), A42T 和 A42V 的突变的那些) 的氨基酸位置 X 至氨基酸位置 Y 的氨基酸序列, 其中数值是相对于包括 X 和 Y 的 $A\beta$ 肽或带有 3 个额外氨基酸替换的序列 (其都不阻止球聚体形成) 的起点的, 本文的"额外" 氨基酸替换是任何偏离天然发现的规范序列的。

更具体地, 本文的术语" $A\beta$ (1-42)" 指包括 1 和 42 的人淀粉样 β 蛋白质的氨基酸位置 1 至氨基酸位置 42 的氨基酸序列, 特别是氨基酸序列 DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGWIA (对应于氨基酸位置 1 至 42) 或其任何天然产生的变体 (特别是带有至少一个选自 A2T, H6R, D7N, A21G ("弗兰德"), E22G ("北极"), E22Q ("荷兰"), E22K ("意大利"), D23N ("爱荷华"), A42T 和 A42V 的突变的那些) 的氨基酸位置 1 至氨基酸位置 42 的氨基酸序列, 其中数值是相对于包括 1 和 42 的 $A\beta$ 肽或带有 3 个额外氨基酸替换的序列 (其都不阻

止球聚体形成)的起点的。同样,本文的术语"A β (1-40)"指包括 1 和 40 的人淀粉样 β 蛋白质的氨基酸位置 1 至氨基酸位置 40 的氨基酸序列,特别是氨基酸序列 DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV 或其任何天然产生的变体(特别是带有至少一个选自 A2T, H6R, D7N, A21G ("弗兰德"), E22G ("北极"), E22Q ("荷兰"), E22K ("意大利"), D23N ("爱荷华"), A42T 和 A42V 的突变的那些)的氨基酸位置 1 至氨基酸位置 40 的氨基酸序列,其中数值是相对于包括 1 和 40 的 A β 肽或带有 3 个额外氨基酸替换的序列(其都不阻止球聚体形成)的起点的。

本文的术语"A β (X-Y)球聚体" (A β (X-Y) 球寡聚物)指如上定义的可溶、球状、非共价连接的 A β (X-Y)肽,其具有同质性和独特物理特征。A β (X-Y)球聚体是稳定、非纤维状、寡聚聚合的 A β (X-Y)肽,其通过与阴离子去污剂一起温育而获得。与单体和纤维相反,这些球聚体的特征在于定义的亚单位聚合数(例如,如 WO2004/067561 所述,早期聚合形式, n=4-6, 寡聚物 A", 而晚期聚合形式, n=12-14, "寡聚物 B")。球聚体具有 3 维球型结构 ("熔化的小球", 参见 Barghorn 等, 2005, J Neurochem, 95, 834-847)。它们进一步的特征在于一种或多种以下特征:

- 用混合蛋白酶(如嗜热菌蛋白酶或内切蛋白酶 GluC)裂解 N-末端氨基酸 X-23, 形成截短的形式的 A β (X-Y)球聚体;

- 混合蛋白酶和抗体不可接近的 C-末端氨基酸 24-Y;

- 截短形式的这些 A β (X-Y)球聚体维持其球聚体构象带有较佳可接近性的核心表位 A β (20-Y)的球聚体 3 维核心结构。

根据本发明和特别是为了评估本发明抗体的结合亲和性的目的,本文的术语 "A β (X-Y)球聚体"指 WO 2004/067561 (其纳入本文参考)所述的过程而得的产物。所述过程包括解除天然、重组或合成的 A β (X-Y)肽或其衍生物的折叠;将至少部分未折叠的 A β (X-Y)肽或其衍生物暴露于去污剂,减低去污剂活性并继续温育。

为了解除肽的折叠,可使氢键裂解剂(例如,六氟异丙醇 (HFIP))作用于蛋白质。当作用温度为约 20 至 50 摄氏度(特别是约 35 至 40 摄氏度)时,几分钟(例如约 10 至 60 分钟)的作用时间就足够了。接着在混合有水溶性缓冲液(例如,二甲亚砜 (DMSO))的合适有机溶剂中溶解经蒸发干燥(优选是浓缩形式)的残余物,产生至少部分未折叠的

肽或其衍生物的悬浮液，用于以后使用。如果需要，在间歇期将储存悬浮液低温（例如约-20 摄氏度）储存。

或者，肽或其衍生物可置于微酸（优选水溶液）中，例如约 10 mM HCl 水溶液。通常温育几分钟后，离心去除不可溶性成分。一般在 10,000 g 离心几分钟。这些方法步骤优选在室温进行，即温度范围为 20 至 30 摄氏度。离心获得的上清含 A β (X-Y) 肽或其衍生物并可低温储存，例如间歇时间储存在约-20 摄氏度。

以下暴露于去污剂涉及寡聚化肽或其衍生物以得到中间体寡聚物（在 WO 2004/067561 中被称为寡聚物 A）。为此，让去污剂作用于至少部分未折叠的肽或其衍生物，直至产生足够的中间体寡聚物。优选要使用离子去污剂，特别是阴离子去污剂。

根据具体的实施方案，使用式(I)：



的去污剂，其中 R 基为具有 6 至 20 个、优选 10 至 14 个碳原子的未分支或分支烷基，或具有 6 至 20 个、优选 10 至 14 个碳原子的未分支或分支链烯基，X 基为酸性基团或其盐，其中 X 优选自 $-\text{COO}^-\text{M}^+$ 、 $-\text{SO}_3^-\text{M}^+$ ，特别是 $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$ ，而且 M^+ 是氢阳离子、或者无机或有机阳离子，优选自碱性金属和碱土金属阳离子以及铵阳离子。具有式(I)的去污剂是有利的，其中 R 是未分支烷基，必须特别提及的是 1-烷基。特别优选十二烷基磺酸钠(SDS)。也可以有利地使用月桂酸和油酸。去污剂十二烷基肌氨酸的钠盐(也称为肌氨酰 NL-30 或 Gardol[®])也格外有利。

去污剂作用时间尤其依赖于进行寡聚化的蛋白质是否解折叠，如果是，还有解折叠的程度。根据解折叠步骤，如果预先以氢键断裂试剂(即，特别是以六氟异丙醇)处理蛋白质，当作用温度约为 20 至 50℃、特别是约为 35 至 40℃时，数小时范围内的作用时间是足够的，有利地为约 1 至 20、特别是约 2 至 10 小时的作用时间。如果以较少解折叠或基本没有解折叠的肽或其衍生物为起始点，以相应较长的作用时间为宜。如果肽或其衍生物经过预处理，例如，根据上述步骤的 HFIP 处理的备选方案，或者将肽或其衍生物直接进行寡聚化，则当作用温度约为 20 至 50℃、特别是约为 35 至 40℃时，约 5 至 30 小时、特别是约 10 至 20 小时范围内的作用时间足够了。温育后，宜通过离心去除不溶性组分。于 10000g 数分钟为宜。

所选择的去污剂浓度取决于所使用的去污剂。如果使用 SDS, 浓度范围为 0.01 至 1%、优选 0.05 至 0.5% 重量, 例如约 0.2% 重量, 这经证明是有利的。如果使用月桂酸或油酸, 略高的浓度是有利的, 例如, 在 0.05 至 2%、优选 0.1 至 0.5% 重量的范围, 例如约 0.5% 重量。

去污剂作用应在接近于生理范围的盐浓度下发生。因此, 尤其以 50 至 500mM、优选 100 至 200mM 范围内、特别是 140mM 的 NaCl 浓度为宜。

接着减小去污剂作用和持续温育进一步涉及寡聚化得到本发明的 A β (X-Y)球聚体(在 WO 2004/067561 中被称为寡聚物 B)。由于得自前面步骤的组合物有规律地包含去污剂和生理范围的盐浓度, 然后宜降低去污剂的作用并也优选降低盐浓度。这可以通过降低去污剂和盐的浓度而解决, 例如通过稀释, 宜使用水或低盐浓度缓冲液, 例如 Tris-HCl (pH7.3)。在约 2 至 10 范围内、有利地在 3 至 8 范围内、特别是约为 4 的稀释因子经证明为适宜的。也可以添加中和所述去污剂作用的物质实现去污剂作用的降低。这些物质的实例包括能够络合去污剂的物质, 像能够在纯化和提取措施过程中稳定细胞的物质, 例如特定的 EO/PO 阻断共聚物, 特别是以商品名 Pluronic®F 68 的阻断共聚物。烷氧基化、特别是乙氧基化烷基酚, 例如 Triton®X 系列的乙氧基化 t-辛基酚(特别是 Triton®X100)、3-(3-(胆酰胺基丙基二甲氨基)-1-丙磺酸盐(CHAPS®)或烷氧基化、特别是乙氧基化山梨聚糖脂肪酯, 例如 Tween®系列的那些, 特别是 Tween®20, 在特定的临界微囊浓度附近或之上的浓度范围内。

随后, 温育该溶液直至产生足够的本发明 A β (X-Y)球聚体。当作用温度约为 20 至 50°C、特别是约为 35 至 40°C 时, 数小时范围内、优选约 10 至 30 小时范围内、特别是约 15 至 25 小时范围内的作用时间是足够的。然后可以浓缩溶液, 并且可能的残余物可以通过离心去除。本文中证明以 10000g 数分钟为宜。离心后获得的上清液含本发明 A β (X-Y)球聚体。

本发明 A β (X-Y)球聚体最终可以本来的方式来收获, 如通过超滤、透析、沉淀或离心。如果在变性条件下通过诸如 SDS-PAGE 电泳分离 A β (X-Y)球聚体以产生两个条带(如 A β (1-42)的表观分子量为 38/48 kDa), 这是优选的, 而且如果分离这两个条带前用二醛处理寡聚物来使

之合并成一个,这是尤其优选的。如果大小排阻层析球聚会形成单峰(例如, A β (1-42)的相应分子量为约 60 kDa),这也是优选的。

始于 A β (1-42)肽的所述过程特别适于获得 A β (1-42)球聚体。优选球聚体显示出与神经元细胞的亲和性。优选球聚体也显示出神经调节效应。

根据本发明的另一方面,本文的术语"A β (X-Y)球聚体"指基本由 A β (X-Y) 亚基组成的球聚体,其中如果 12 个亚基中平均至少有 11 个是 A β (X-Y)型的,则这是优选的,如果小于 10%的球聚体包含任何非 A β (X-Y)肽,则这是更优选的,而且如果制剂中非 A β (X-Y)肽含量低于检测阈值,则这是最优选的。更具体地,本文的术语"A β (1-42)球聚体"指基本由以上定义的 A β (X-Y)单位组成的球聚体;本文的术语"A β (12-42)球聚体"指基本由以上定义的 A β (12-42) 单位组成的球聚体;而且本文的术语"A β (20-42)球聚体"指基本由以上定义的 A β (20-42) 单位组成的球聚体。

本文的术语"交联的 A β (X-Y)球聚体"指通过交联(优选化学交联,更优选醛交联,最优选二醛交联球聚体的组成单位)上述 A β (X-Y)球聚体而获得的分子。在本发明的另一个方面中,交联的球聚体基本是球聚体,其中单位通过共价键至少部分连接,而不止是通过非共价相互作用连在一起。

本文的术语"A β (X-Y)球聚体衍生物"特别是指通过共价连接方便检测基团而标记的球聚体,所述基团优选荧光团,例如,荧光素、硫氰酸酯、藻红蛋白、水母荧光蛋白、高尔基体荧光蛋白或其任何组合或荧光活性衍生物;发色团;化学发光团,例如,荧光素酶,优选 *Photinus pyralis* 荧光素酶、弧菌荧光素酶、或其任何组合或有化学发光的衍生物;酶活性基团,例如,过氧化物酶,例如,辣根过氧化物酶,或其任何有酶活性的衍生物;电子密集基团,例如,含重金属的基团,例如含金基团;半抗原,例如,苯酚衍生的半抗原;强抗原结构,例如,预计有抗原性的肽序列,例如通过 Kolaskar 和 Tongaonkar 算法预测有抗原性的;另一分子的适体;螯合基团,例如,六组氨酸基;天然或天然衍生的蛋白质结构,其进一步介导特定的蛋白质-蛋白质相互作用,例如, fos/jun 对的成员;磁性基团,例如铁磁性基团;或放射性基团,例如含 ^1H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S 或 ^{125}I 或其任何组合的基团;或通过共价或非共价高亲和相互作用来标

记球聚体, 优选共价连接于方便失活、螯合、降解或沉淀的基团, 优选标记有促进体内降解的基团, 更优选标记有泛素, 其中如果该标记的寡聚物在体内组装, 则是特别优选的; 或通过以上任何组合来修饰球聚体。这些将它们与蛋白质连接的标记和标示的基团和方法是现有已知的。在球聚化之前、之中或之后进行标记和/或标示。在本发明的另一个方面中, 球聚体衍生物是通过标记和/或标示反应而由球聚体得到的分子。相应地, 本文的术语" $A\beta$ (X-Y) 单体衍生物"特别是指如所述用于标记或标示球聚体的 $A\beta$ 单体。

本文的术语"较大亲和性"指相互作用程度, 其中一方面未结合的抗体和未结合的球聚体和另一方面抗体-球聚体复合物之间的平衡更倾向于抗体-球聚体复合物。同样, 本文的术语"较小亲和性"指相互作用程度, 其中一方面未结合的抗体和未结合的球聚体和另一方面抗体-球聚体复合物之间的平衡更倾向于未结合的抗体和未结合的球聚体。

本文的术语 " $A\beta$ (X-Y) 单体"指分离形式的 $A\beta$ (X-Y) 肽, 优选基本不参与与其他 $A\beta$ 肽非共价相互作用的 $A\beta$ (X-Y) 肽形式。特别是, $A\beta$ (X-Y) 单体通常以水溶液形式提供。在本发明特别优选的实施方案中, 单体水溶液含 0.05% 至 0.2%、更优选约 0.1% NH_4OH 。在本发明另一个特别优选的实施方案中, 单体水溶液含 0.05% 至 0.2%、更优选约 0.1% $NaOH$ 。使用时, 宜于以合适的方式稀释所述溶液。另外, 通常宜于在制备后 2 小时内、特别是 1 小时内、尤其是 30 分钟内使用所述溶液。

本文的术语"原纤维"指包含非共价连接各 $A\beta$ (X-Y) 肽组装体的分子结构, 其在电子显微镜下显示出纤维结构, 其结合刚果红然后在偏振光下显示出双折射, 而且其 X-射线衍射模式是交叉- β 结构。

在本发明的另一个方面中, 原纤维是由如下过程而得的分子结构, 所述过程包括在无去污剂的情况 (例如, 在 0.1 M HCl 中) 下自诱导聚合合适的 $A\beta$ 肽, 导致形成大于 24、优选大于 100 个单位的聚集体。该过程是现有公知的。 $A\beta$ (X-Y) 原纤维可方便地以水溶液形式使用。在本发明特别优选的实施方案中, 原纤维水溶液的制备是将 $A\beta$ 肽溶解于 0.1% NH_4OH , 用 20 mM NaH_2PO_4 、140 mM $NaCl$ (pH 7.4) 以 1:4 稀释, 然后重新将 pH 调节成 7.4, 以 37 摄氏度温育溶液 20 h, 然后 10000 g 离心 10 分钟并重悬于 20 mM NaH_2PO_4 、140 mM $NaCl$ (pH 7.4)

中。

本文的术语" $A\beta$ (X-Y) 原纤维"指基本由 $A\beta$ (X-Y)亚基组成的原纤维, 其中如果平均至少 90%的亚基是 $A\beta$ (X-Y)型的, 则是优选的, 如果至少 98%的亚基是 $A\beta$ (X-Y)型的, 则是更优选的, 而且如果非 $A\beta$ (X-Y)肽含量低于检测阈值, 则是最优选的。

重组淀粉样B蛋白质的应用。

根据本发明方法制备的蛋白质有许多有趣的效用, 如这些方法本身那样。例如, 这些方法去掉了用有机合成法制备肽的需求。另外, 这些方法大量节约了生产成本, 因为大规模重组表达大大便宜于肽合成。

另外, 本发明方法能方便地导入与各种当前鉴定的阿耳茨海默家族病症以及任何将来鉴定的相关的任何天然产生的氨基酸变体。

而且, 本发明方法让人们能制备合适量的起始材料, 用于制备其他可接着用于制备治疗阿耳茨海默氏病的单克隆抗体(或其它抗体)的材料。

另外, 方法让人们能制备用于如下用途的球聚体(参见如, 国际申请 WO2004/067561; Barghorn 等, J. Neurochem. 2005 95, 834-847): 1) 基于人免疫的介入疗法 (例如, 球聚体可用于活化免疫); 2) 人诊断测试或基于动物的替代测试系统 (例如, 表位(即, 球聚体或其部分) 可在人或动物模型中检测以诊断疾病或确定姑息疗法); 3) 大或小规模筛选, 用以开发小分子 (即, 非抗体或非生物物质)抗阿耳茨海默氏病预防或治疗剂或预防或治疗与特征在于认知损伤的阿耳茨海默氏病相关的神经疾病; 4) 基于晶体检测或 NMR 结构设计的研究, 用以开发小分子抗阿耳茨海默氏病 (相关疾病) 的预防或治疗剂; 5) 基于晶体检测或 NMR 结构设计的研究, 以开发抗体或其它基于蛋白质的抗阿耳茨海默氏病(相关疾病) 的预防或治疗剂;和 6)制备球聚体用于基于 RNAi 的设计研究, 以开发抗阿耳茨海默氏病的预防或治疗剂。(为了本发明的目的, "球聚体"被定义为生物结构, 其包含非共价连接的各淀粉样肽的小组装体, 所述淀粉样肽含平行分子间 β 折叠和反平行分子内 β 折叠。球聚体是亚稳定、可溶的, 而且其二级结构不同于形成原纤维的 (如上) 亚基。一段时间内它最终将通过所述构象 "转换" 途经转化成完全平行 β 折叠的纤维形式(图 18 和 23)。特别是, 观察到的球聚体相互作用的二级结构

和可能的 3 维和四级结构如图 20、21 和 22 所示 [也可参见图 18 中的坐标]。球聚体还不同于寡聚物，因为球聚体的物理尺寸受其分子内和分子间相互作用限制;这些导致高受限形式的寡聚物。球聚体尺寸由球聚体组装体内存在的分子间相互作用和分子内相互作用限制。它包含根据本文定义的尺寸范围定义的独特二级结构内的各单体对单体平行 β -折叠相互作用。预计大得多的淀粉样寡聚物(纤维形式) 优先包含链间平行 β 折叠二级结构。这些较大的寡聚物和纤维形式由动力学开启淀粉样 " 转换"结构而形成(图 23)。通过比较，球聚体的优先特征在于包含我们所定义的混合的链间平行和链内反平行结构。

结构由作为一个重复单位的至少 2 个分子组成。重复单位含至少由淀粉样 β 蛋白质的残基 19-21 和 30-32 组成的 2 个分子内反平行 β 折叠、和至少由淀粉样 β 蛋白质残基 34-38 组成的一个分子间平行 β 折叠(图 21)。反平行 β 折叠具有有两个 β 链形成的 β -发夹结构，其通过环连接。通过(NOE)主链酰胺(如实线所示)之间和距离介于 1.8 和 6 埃的主链酰胺和它们的侧链 (箭头虚线所示) (图 20)之间的交叉链核质子进动效应，来定义该反平行 β 折叠结构 (也可参见下表 1)。

表 1
NOESY 谱中观察到的长程 NOE

长程分子内 NOE

F19 NH	I32 NH, HB, HG##
A21 NH	A30 NH, HB#
A21 NH	I31 HD1#, HG1#
I32 NH	F19 HD#, HB#
A30 NH	A21 HB#

长程分子间 NOE

G33 NH	G34 NH
M35 NH	V36 NH
G37 NH	G38 NH
G33 NH	VI8 C _γ H3

VI8 NH	VI8 C _γ H ₃
L34 NH	L34 C _δ H ₃
M35 NH	V36 C _γ H ₃
G38 NH	V39 C _γ H ₃
V39 NH	V39 C _γ H ₃

通过主链 NH-NH (虚线所示)之间和主链 NH 和侧链甲基(箭头实线所示)之间的分子间 NOE, 来定义互相对准的平行 β 折叠 (图 20)。

分子内对分子间 NOE 利用不同的同位素标记的样品来区分。制备以下样品: (样品 A) 均一-[¹⁵N]-标记的质子化样品; (样品 B) ²H 背景中带有 lie、val、Leu 残基的选择性 ¹³C-标记的质子化甲基均一-[¹⁵N]-标记的样品; (样品 C) 混合样品, 其中一个分子标记有[U-¹⁵N, ²H], 而另一个标记的有 [U-¹⁴N, ²H], 其以 1:1 比率混合; (样品 D) 混合样品, 其中带有[U-¹⁴N, ²H]-标记的肽的[U-¹⁵N, ²H]-标记的肽以 1:1 比率混合, 其含 IVL 残基的选择性 ¹³C-标记的质子化甲基。样品 A 和 B 的 3D ¹⁵N-解析的 NOESY 谱中观察到了实线所示的分子内 NH-NH NOE (图 20), 而在样品 C 的 ¹⁵N-过滤的和 ¹⁵N-编辑的 3D NOESY 谱中没有。用样品 A 如箭头虚线所示的 (图 20) ¹⁵N-解析的 3D NOESY 观察到了主链酰胺和它们侧链间的其他分子内 NOE。这些 NOE 数据再次表明存在有反平行 β 折叠结构。样品 C 的过滤的和 ¹⁵N-编辑的 3D NOESY 谱中没有观察到虚线所示的分子间(图 20)。这些 NOE 清晰地确认了互相对准的平行分子间 β 折叠。如箭头实线所示的 (图 20)样品 D 的 ¹⁵N-解析的 ¹H/¹H 和 ¹³C/¹H NOESY 谱中观察到了一个分子上的主链酰胺 ¹⁵NH 和另一个分子上的 ¹³CH₃ 甲基之间的其他分子间 NOE。这些分子间 NOE 再次表明互相对准的平行 β 折叠结构附符合 phi (ϕ)角-120 $\pm$ 50 和 psi (ψ)角 140 $\pm$ 50。根据 NH/ND 交换实验, 其中冻干水溶性 ¹⁵N-标记的样品并溶于 D₂O 中, 对于含样品的 D₂O, 用至少 20 分钟得到 β 折叠中交换而保护的胺。保护的胺用残基上的圈来表示(图 20)。这些缓慢交换的胺多数位于 β -折叠中并可能是氢键连接的。

用来自 NMR 数据分析的 NOE 衍生的距离约束 (参见表 1), 通过模拟退火规程[M. Nilges, 等, FEBS Lett. 229, 317-324, (1988)]用程序 CNX 来计算结构 [A. T. Brunger, 等, Acta Crystallogr. D54 (Pt 5), 905-21,

(1998)]。G33 位于反平行和平行 β 折叠之间的连接处。未定义该残基的构象，它可以是任何符合任何物理许可构象的 ϕ 、 ψ 角。该实体（可能是二聚体）的有代表性的构象如图 21 所示，其坐标在图 24 中给出。

应当注意到，本发明淀粉样 β 实体结构之一的完整结构坐标包括图 24 所示的那些以及来自保留的氨基酸主链原子(或其保守替换)的 $\pm$ 均方根偏差。

对于有关平均坐标位置的 20 个算得的最有利的结构的平行 β -折叠氨基酸残基 34-38 的均方根偏差，对于主链原子(Ca, N, 和 C') 为 0.51 ± 0.29 埃，而对于所有重原子，为 1.04 ± 0.36 埃。较不利的平均坐标位置，对于主链原子(Ca, N, 和 C') 为 0.51 ± 1.29 埃，而对于所有重原子，为 1.04 ± 1.36 埃。不利的平均坐标位置，对于主链原子(Ca, N, 和 C') 为 0.51 ± 2.29 埃，而对于所有重原子，为 1.04 ± 2.36 埃。

对于有关平均坐标位置的 20 个算得的最有利的结构的反平行 β 折叠氨基酸残基 19-21 和 30-32 的均方根偏差，对于主链原子(Ca, N, 和 C') 为 0.67 ± 0.23 埃，而对于所有重原子，为 1.52 ± 0.36 埃。较不利的平均坐标位置，对于主链原子(Ca, N, 和 C') 为 0.67 ± 1.23 埃，而对于所有重原子，为 1.52 ± 1.36 埃。最不利的平均坐标位置，对于主链原子(Ca, N, 和 C') 为 0.67 ± 2.23 埃，而对于所有重原子，为 1.52 ± 2.36 埃。

以上均方根偏差(rmsd) 是实验确定的数值。由于未定义平行 β 折叠和反平行 β 折叠间的方向，因此目前没有确定对于完整结构坐标的 rmsd。("均方根偏差" 是平均值偏差坐标的算术平均值的平方根，它是表示本文所述的结构坐标的偏差或变化的方式。)

另外，可用现有已知的分子建模方法来鉴定本文所述的淀粉样 β 分子(例如，二聚体)的一种或多种活性位点或结合槽。具体来说，如图 21 所示，用结构坐标表征 3 维模型。然后，根据该模型，计算使推测的活性位点可见、可鉴定并可基于诸如分子表面结构、表面电荷、空间排列、存在的反应性氨基酸和疏水和亲水性来表征。然后，可用由各种淀粉样 β 复合物、竞争和非竞争抑制实验产生的化学位移干扰谱，和/或通过生成并表征淀粉样 β 突变来鉴定关键残基或活性位点特征，由此可进一步改进该推测的活性位点。(参见美国专利 6,934,639.)

通过从淀粉样 β 分子的 3 维模型来测定并进行计算机拟合分析，

由此来鉴定与活性位点相互作用或相关的试剂。计算机拟合分析用各种计算机程序如下评估推测的活性位点和鉴定到的试剂间的“合适性”：1) 用活性位点的同源性建模或结构坐标来产生推测活性位点的3维模型，和2) 确定推测的活性位点和鉴定到的试剂间的相关程度。相关程度可用计算机或用结合测试实验确定。

另外，应当注意到，本发明的蛋白质、球聚体和寡聚物(以及抗其的抗体)可用于多种诊断测试中。

在本发明的一个实施方案中，蛋白质、球聚体或寡聚物、或其部分被包被在固相上(或存在于液相中)。然后，让测试或生物样品(例如，全血、脑脊髓液、血清等)接触固相。如果样品中存在抗体，则该抗体结合固相上的抗原，然后通过直接或间接方法来检测。直接方法包括简单检测复合物本身的存在性以及由此得到的抗体的存在性。在间接方法中，将缀合物加入结合的抗体。缀合物包含第二抗体，其结合第一结合抗体，其连接有产生信号的化合物或标记。如果第二抗体结合结合的第一抗体，则产生信号的化合物产生可测量的信号。然后，该信号表明测试样品中存在第一抗体。

用于诊断免疫测试中的固相实例有多孔和非多孔材料、乳胶粒、磁颗粒、微粒(参见美国专利 5,705,330)、珠、膜、微滴定孔和塑料管。如果需要，根据所需测试进行形式特征来确定标记缀合物中出现的抗原或抗体的固相材料和方法的选定。

如上所述，缀合物(或指示剂)将包含抗体(或根据测试，可能是抗抗体)，其连接于产生信号的化合物或标记。该产生信号的化合物或“标记”是本身可检测的或可与一种或多种其他化合物反应来产生可检测的产物。产生信号的化合物的实例包括色原体、放射性同位素(例如， ^{125}I ， ^{131}I ， ^{32}P ， ^3H ， ^{35}S 和 ^{14}C)、化学发光化合物(例如，吖啶)、颗粒(可见的或荧光的)、核酸、复合试剂、或催化剂(如酶(例如，碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶和核糖核酸酶)。对于酶应用(例如，碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶)的情况，加入产生颜色、荧光、或光的底物能产生可检测信号。也可使用其它检测系统，如时间解析的荧光、内反射荧光、扩增(例如，聚合酶链式反应)和拉曼光谱。

以上免疫测试可检测的生物流体的例子包括血浆、全血、干全血、血清、脑脊髓液或组织和细胞的水溶性或有机-水溶性提取物。

在本发明的另一个实施方案中，测试样品可暴露于包被有本发明的特定抗体（例如，人或人源化的单克隆抗体、多克隆抗体等）的固相（或液相）。如果存在于样品，则上述球聚体、寡聚物或蛋白质结合固相，然后可通过上述直接或间接方法检测。更具体地，间接方法涉及添加含连有标记或产生信号的化合物的第二抗体（其结合结合的抗原）的缀合物。当第二抗体结合结合的抗原时，那么产生可检测信号表明测试样品中存在阿耳茨海默蛋白质，如球聚体、寡聚物、肽、或其部分。

本发明还涵盖第三个检测测试样品中抗体的存在性的方法。该包括如下步骤：(a) 用一段时间并在足以形成抗抗体/抗原复合物的条件下，用特异于抗原（例如，蛋白质、球聚体或寡聚物、或其部分）的抗抗体接触怀疑含抗体的样品；(b) 用一段时间并在足以使抗原结合结合的抗体的条件下，将抗原加入得到的抗抗体/抗原复合物中，该抗原含本文所述的蛋白质、球聚体、寡聚物、或其部分；和(c) 将缀合物加入得到的抗体/抗体/抗原复合物中，该缀合物包含的组合物含连接于能检测可检测信号的信号产生化合物的单克隆或多克隆抗体，该单克隆或多克隆抗体抗该抗原；和(d) 通过检测信号产生化合物产生的信号来检测测试样品中可能存在的抗体的存在性。可用包含抗体与抗抗体对照或校准物。

本发明还包括疫苗，其包含一种或多种本文定义的抗原（即，蛋白质、寡聚物、球聚体、或其部分）和药学上可接受的佐剂（例如，弗氏佐剂或磷酸缓冲盐液）。

试剂盒也包括在本发明的范围内。更具体地，本发明包括确定患者中抗体存在性的试剂盒。特别是，确定测试样品中抗体存在性的试剂盒包含 a) 本文定义的抗原（例如，蛋白质、球聚体、寡聚物、或其部分；和 b) 缀合物，其包含连接于能产生可检测信号的信号产生化合物的抗体。试剂盒也可含对照或校准物，其包含结合抗原的试剂。

本发明还包括检测测试样品中的抗体的另一类试剂盒。试剂盒可包含 a) 特异于感兴趣的抗体的抗抗体，和 b) 以上定义的抗原或其部分。也可包括对照或校准物，其包含结合抗原的试剂。更具体地，试剂盒可包含 a) 特异于抗体的抗抗体和 b) 含抗原的缀合物，该缀合物连接于能产生可检测信号的信号产生化合物。此外，试剂盒也可包含校准物对照，其包含结合抗原的试剂。

试剂盒也可包含一个容器（如小瓶、瓶或绷带，其中每个容器带有

预设的固相)和另一个含各缀合物的容器。这些试剂盒也可包含进行测试所需的其它试剂(如洗涤、加工和指示剂)的小瓶或容器。

另外,本发明包括抗并用选自如下的抗原产生的人源化的抗体:北极(E693G)突变,荷兰(E693Q)突变,意大利突变(E693K),爱荷华(D694N)突变和佛兰德(A692G)突变。该抗体可识别淀粉样 β 肽的天然人序列和至少一个突变的序列。该抗体可给药于经鉴定带有该突变的患者,用于治疗。该抗体具有双可变结构域并可识别天然的人淀粉样 β 序列和至少一个上述家族性突变。该抗体也可以是双特异性的。

另外,本发明包括检测怀疑患有阿耳茨海默氏病的患者中突变的淀粉样 β 肽序列的方法。该方法包含如下步骤:a)从患者中分离生物样品;b)用一段时间并在足以形成突变的抗原/抗体复合物的条件下,使所述生物样品接触以上直接所述的抗体;和c)检测突变的抗原/抗体复合物的存在性,所述复合物表示所述患者带有突变的淀粉样 β 肽序列和由此而得的阿耳茨海默氏病。

另外,本发明包括分离的球聚体,其每摩尔淀粉样肽包含约至少0.5-2.0摩尔的十二烷基磺酸钠(SDS)或脂肪酸。球聚体最优选存在约1.0摩尔SDS。本发明还包括分离的球聚体的表位。(可通过肽和SDS(或脂肪酸)的混合物来形成表位。另外,本发明还包括结合表位的分离的抗体。该抗体还可阻断淀粉样 β 肽聚集体的形成。阻断可发生在肽二聚体、肽三聚体、肽四聚体、肽五聚体、肽六聚体、肽七聚体、肽八聚体、肽九聚体、肽十聚体、肽十一聚体、肽十二聚体、肽十三聚体和肽十四聚体的阶段。

而且,本发明还包括分离的球聚体,其包含淀粉样 β 肽。该肽包含具有选自如下突变的氨基酸序列:北极(E693G)突变,荷兰(E693Q)突变,意大利突变(E693K),爱荷华(D694N)突变和佛兰德(A692G)突变。本发明还包括该球聚体的表位(即,肽和SDS(或脂肪酸)混合物形成的表位、和球聚体,但其在免疫学上不同于天然人淀粉样 β 肽序列的免疫反应性表位。

而且,本发明包括分离的抗体(例如,单克隆抗体),相对于天然人淀粉样肽的表位,其优先结合上述表位。该抗体也可用于治疗患家族性阿耳茨海默氏病的患者。

本发明还涵盖分离的抗体(例如,单克隆抗体),其可用于治疗(上

述)家族性形式的阿耳茨海默氏病,并具有与家族性突变表位(其不同于在治疗零星阿耳茨海默氏病时存在的表位)有关的偏好和选择性表位反应性。

另外,本发明包括预防或治需要预防或治疗的疗患者中的的阿耳茨海默氏病方法,其包括向患者以足以实现预防或治疗的量给药任何一种或多种上述分离的抗体。

另外,本发明包括含淀粉样 β 肽的分离的球聚体。肽包含氨基酸,其根据氢-氘交换行为能展示出约33%或更少保护或交换,其中氨基酸选自:2(Asp),3(Ala),4(Glu),5(Phe),7(His),8(asp),9(Ser),10(Gly),17(Lys),20(Phe),21(Phe),22(Ala),25(Val),26(Gly),29(Lys)和30(Gly)。分离的球聚体包含淀粉样 β 肽。

而且,本发明包括含淀粉样 β 肽的分离的球聚体。肽包含氨基酸,其根据氢-氘交换行为能展示出约33%至约66%保护或交换,其中所述氨基酸选自:16(Gln),31(Ala),32(Ile),42(Ile)和43(Ala)。

而且,本发明涵盖含淀粉样 β 肽的分离的球聚体。肽包含氨基酸,其根据氢-氘交换行为能展示出约66%或更多保护或交换,其中氨基酸选自:12(Glu)18(Leu),19(Val),24(Asp),33(Ile),34(Gly),35(Leu),36(Met),38(Gly),39(Gly)和40(Val)。

人家族性突变

预计如图27中所见的表示成其M-末端Met形式的人家族性突变的阿耳茨海默肽与天然序列球聚体形式产生的抗体有不同(更低)的反应性。例如,对于如下家族性突变,结合由天然序列的球聚体产生的抗体A的能力将会下降:北极(E693G),荷兰(E693Q),意大利(E693K),爱荷华(D694N)和弗兰德(A692G)。该减小的与突变的球聚形式结合的能力由该抗体A表位区域中改变的序列/结构而造成。人源化形式的抗体在治疗患有与这些突变相关的家族性形式的阿耳茨海默氏病的患者中的应用将需要抗体,其针对含这些区域的序列的球聚体表位而开发。抗体A样抗体本身对于这些家族性突变将没有治疗活性,因为他们会显示出减低的识别体内球聚体中出现的家族性表位的能力。

本发明可通过使用如下非限制性实施例来例示:

实施例 I

A β -淀粉样肽的克隆

A β -淀粉样肽是合成构建的。特别是,图1图示了编码本文所述的肽的DNA序列以及该肽的氨基酸序列。在载体pET29上设计覆盖了编码A β -淀粉样肽的序列和克隆其所需的限制性位点的引物(参见下表2)并用于退火反应以产生用于与所需大肠杆菌表达载体进行连接反应的片段。

一起退火这些寡片段之后,通过用DNA连接酶连接来将它们整合入pET29 NdeI XhoI位点(Invitrogen, Carlsbad, CA)从而形成pET29-A β 淀粉样肽 [1-42]的天然形式。通过DNA测序确证最终的构建体。

通过定点诱变(SDM)用模板pET29-A β 淀粉样肽 [1-42]来制备 β 淀粉样肽[1-39, 40, 42和43]。在使用快速改变试剂盒(Stratagene, La Jolla, CA)的独立SDM反应中,使用引物对SDMamy-39s和as、SDMamy-40s和as、SDMamy-41s和as、SDMamy-43s和as(参见表2)。通过DNA测序确证新构建体pET29-A β 淀粉样肽 [1-39]、pET29-A β 淀粉样肽 [1-40]、pET29-A β 淀粉样肽 [1-41]和pET29-A β 淀粉样肽 [1-43]。

得到的构建体用于转化大肠杆菌BL21 (DE3)来检测表达。通过在用1mM IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖呋喃苷)诱导后于37摄氏度培养4hr,由此来进行肽的表达。由测试表达产生的期望大小的蛋白质的不可溶性级分在靠马斯染色的SDS蛋白质凝胶上显现。

表 2

A.

amy-1 TATGGATGCGGAATTTTCGCCATGATAGCGGCTATGAAG (SEQ ID NO: 11)

amy-2

TGCATCATCAGAACTGGTGTTCGCGGAAGATGTGGGCAGCAACAAA (SEQ ID NO: 12)

amy-3 GGCGCGATTA TTGGCCTGAT GGTGGGTGGT GTGGTGATTGCGTGAC (SEQ ID NO: 13)

amy-4

CACCAGTTTCTGATGATGCACTTCATAGCCGCTATCATGGCGAAATTCCGCATCCA (SEQ ID NO N

amy-5

ATCAGGCCAATAATCGCGCCTTTGTTGCTGCCCACATCTTCCGCGA
AAAA (SEQ ID NO: 15)

amy-6 TCGAGTCACGCAATCACCACACCACCCACC (SEQ ID NO: 16)

B.

SDMamy-43 (+) GGGTGGTGTGGTGATTGCGACCTGACTCGAGCA
CCACCACC (SEQ ID NO: 17)

SDMamy-43 (-) GGTGGTGGTGCTCGAGTCAGGTCGCAATCACCACA
CCACCC (SEQ ID NO: 18)

SDMamy-41 (+) GGTGGGTGGTGTGGTGATTTGACTCGAGCACCA
CCACC (SEQ ID NO: 19)

SDMamy-41 (-) GGTGGTGGTGCTCGAGTCAAATCACCACACCACCC
ACC (SEQ ID NO: 20)

SDMamy-40 (+) GATGGTGGGTGGTGTGGTGACTCGAGCACCACC
ACC (SEQ ID NO: 21)

SDMamy-40 (-) GGTGGTGGTGCTCGAGTCACACCACACCACCCA
CCATC (SEQ ID NO: 22)

SDMamy-39 (+) CCTGATGGTGGGTGGTGTGTGACTCGAGCACCACC
(SEQ ID NO: 23)

SDMamy-39 (-) GGTGGTGGTGCTCGAGTCACACACCACCCACCATCAGG
(SEQ ID NO: 24)

A 部分包括合成 A β 淀粉样肽 [1-42] 所用的引物的核苷酸序列。B 部分包括 SDM 上所用的引物的核苷酸序列，用于修饰 pET29-A β 淀粉样肽 [1-42] 并制备 pET29-A β 淀粉样肽 [1-39]、[1-40]、[1-41]、和[1-43]。

实施例 II

β -淀粉样蛋白的发酵和表达

1) A- β (1-39):

[产生未标记的材料]

将表达质粒转化入大肠杆菌 BL21(DE3)并置于添加有卡那霉素

(50mg/L)的 LB 上。37℃温育过夜后，平板上长出的转化子用于接种到添加有 50mg/L 卡那霉素的 150 mL M9 预培养基中。预培养物置于轨道摇床 (185 rpm)上并于 30 摄氏度温育。当培养物的 OD_{600nm} 达到 0.468 时，将全部预培养物转移至含 18 L 培养基的新 Brunswick 科学 (Edison, NJ)微发酵罐中。发酵培养基(每升 L)由如下成分组成：11.32g Na₂HPO₄*7H₂O、3g KH₂PO₄、0.5g NaCl、1 mL 1% DF-60 防沫剂、1.5g NH₄Cl、3.55g 葡萄糖、2 mL 1M MgSO₄、0.1 mL 1M CaCl₂、0.02 mL FeSO₄ (40 mg/mL)、2 mL 卡那霉素 (25 mg/mL)、和 0.633 mL 痕量元素溶液[每 L 含 5N HCl: 10 g MnSO₄'H₂O; 10 g AlCl₃H₂O; 4 g CoCl₂; 2 g ZnSO₄'7H₂O; 2 g Na₂MoO₄'2H₂O; 1 g CuCl₂'2H₂O; 0.5 g H₃BO₄]。温度起初控制在 30.0 摄氏度。以 2 vvm 将空气喷入发酵罐，而且在 DO₂ 浓度落于 45%以下时，通过级联控制系统增加搅拌速度，来将溶解氧浓度 [DO₂] 维持在大于 45%的空气饱和度上。在运行期间通过自动加入 4N H₂SO₄ 和 4N KOH，来将 pH 控制在 7.0 上。在 OD_{600nm} 为 2.0 时，将温度设置点改变到 41℃，并通过加入 1mM IPTG 来诱导表达 A-β。在全部表达阶段，通过加入 30%葡萄糖溶液，使葡萄糖浓度维持在 0 g/L 以上。诱导后 3h 收获细胞。

2) A-β (1-40):

[产生 ¹⁵N 标记的材料]

将表达质粒转化入大肠杆菌 BL21(DE3)并置于添加有卡那霉素 (50mg/L)的 LB 上。37℃温育过夜后，平板上长出的转化子用于接种到添加有 50mg/L 卡那霉素的 150 mL ¹⁵N-M9 预培养基中。预培养物置于轨道摇床 (185 rpm)上并于 30 摄氏度温育。当培养物的 OD_{600nm} 达到 0.468 时，将 75mL 预培养物转移至含 18 L 培养基的新 Brunswick 科学 (Edison, NJ)微发酵罐中。发酵培养基(每升 L)由如下成分组成：11.32g Na₂HPO₄*7H₂O、3g KH₂PO₄、0.5g NaCl、1 mL 1% DF-60 防沫剂、1.5g ¹⁵N-NH₄Cl、3.55g 葡萄糖、2 mL 1M MgSO₄、0.1 mL 1M CaCl₂、0.02 mL FeSO₄ (40 mg/mL)、2 mL 卡那霉素 (25 mg/mL)、和 0.633 mL 痕量元素溶液[每 L 含 5N HCl: 10 g MnSO₄'H₂O; 10 g AlCl₃H₂O; 4 g CoCl₂; 2 g ZnSO₄'7H₂O; 2 g Na₂MoO₄'2H₂O; 1 g CuCl₂'2H₂O; 0.5 g H₃BO₄]。温度起初控制在 30.0 摄氏度。以 2 vvm 将空气喷入发酵罐，而且在 DO₂ 浓度

落于 45%以下时, 通过级联控制系统增加搅拌速度, 来将溶解氧浓度 $[DO_2]$ 维持在大于 45%的空气饱和度上。在运行期间通过自动加入 4N H_2SO_4 和 4N KOH, 来将 pH 控制在 7.0 上。在 OD_{600nm} 为 1.5 时, 将温度设置点改变到 41°C, 并通过加入 1mM IPTG 来诱导表达 A- β 。在全部表达阶段, 通过加入 30%葡萄糖溶液, 使葡萄糖浓度维持在 0 g/L 以上。诱导后 3h 收获细胞。

3) A- β (1-41):

[产生 ^{15}N 标记的材料]

将表达质粒转化入大肠杆菌 BL21(DE3)并置于添加有卡那霉素 (50mg/L)的 LB 上。37°C温育过夜后, 平板上长出的转化子用于接种到添加有 50mg/L 卡那霉素的 150 mL ^{15}N -M9 预培养基中。预培养物置于轨道摇床 (185 rpm)上并于 30 摄氏度温育。当培养物的 OD_{600nm} 达到 0.424 时, 将全部预培养物转移至含 18 L 培养基的新 Brunswick 科学 (Edison, NJ)微发酵罐中。发酵培养基(每升 L)由如下成分组成: 11.32g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 、3g KH_2PO_4 、0.5g NaCl、1 mL 1% DF-60 防沫剂、1.5g ^{15}N - NH_4Cl 、3.55g 葡萄糖、2 mL 1M $MgSO_4$ 、0.1 mL 1M $CaCl_2$ 、0.02 mL $FeSO_4$ (40 mg/mL)、2 mL 卡那霉素 (25 mg/mL)、和 0.633 mL 微量元素溶液[每 L 含 5N HCl: 10 g $MnSO_4 \cdot H_2O$; 10 g $AlCl_3 \cdot H_2O$; 4 g $CoCl_2$; 2 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 2 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 1 g $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 0.5 g H_3BO_4]。温度起初控制在 30.0 摄氏度。以 2 vvm 将空气喷入发酵罐, 而且在 DO_2 浓度落于 45%以下时, 通过级联控制系统增加搅拌速度, 来将溶解氧浓度 $[DO_2]$ 维持在大于 45%的空气饱和度上。在运行期间通过自动加入 4N H_2SO_4 和 4N KOH, 来将 pH 控制在 7.0 上。在 OD_{600nm} 为 1.8 时, 将温度设置点改变到 41°C, 并通过加入 1mM IPTG 来诱导表达 A- β 。在全部表达阶段, 通过加入 30%葡萄糖溶液, 使葡萄糖浓度维持在 0 g/L 以上。诱导后 3 小时收获细胞。

4) A- β (1-42):

[产生 ^{15}N 标记的材料]

将表达质粒转化入大肠杆菌 BL21(DE3)并置于添加有卡那霉素 (50mg/L)的 LB 上。37°C温育过夜后, 平板上长出的转化子用于接种到

添加有 50mg/L 卡那霉素的 150 mL ^{15}N -M9 预培养基中。预培养物置于轨道摇床 (185 rpm) 上并于 30 摄氏度温育。当培养物的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 达到 0.520 时, 将 75mL 预培养物转移至含 18 L 培养基的新 Brunswick 科学 (Edison, NJ) 微发酵罐中。发酵培养基(每升 L)由如下成分组成: 11.32g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3g KH_2PO_4 、0.5g NaCl 、1 mL 1% DF-60 防沫剂、1.5g ^{15}N - NH_4Cl 、3.55g 葡萄糖、2 mL 1M MgSO_4 、0.1 mL 1M CaCl_2 、0.02 mL FeSO_4 (40 mg/mL)、2 mL 卡那霉素 (25 mg/mL)、和 0.633 mL 痕量元素溶液[每 L 含 5N HCl : 10 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 10 g $\text{AlCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 4 g CoCl_2 ; 2 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.5 g H_3BO_4]。温度起初控制在 30.0 摄氏度。以 2 vvm 将空气喷入发酵罐, 而且在 DO_2 浓度落于 45% 以下时, 通过级联控制系统增加搅拌速度, 来将溶解氧浓度 [DO_2] 维持在大于 45% 的空气饱和度上。在运行期间通过自动加入 4N H_2SO_4 和 4N KOH , 来将 pH 控制在 7.0 上。在 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 为 1.5 时, 将温度设置点改变到 41°C, 并通过加入 1mM IPTG 来诱导表达 A- β 。在全部表达阶段, 通过加入 30% 葡萄糖溶液, 使葡萄糖浓度维持在 0 g/L 以上。诱导后 3h 收获细胞。

5) A- β (1-42):

[产生未标记的材料]

将表达质粒转化入大肠杆菌 BL21(DE3) 并置于添加有卡那霉素 (50mg/L) 的 LB 上。37°C 温育过夜后, 平板上长出的转化子用于接种到包含添加有卡那霉素 (50mg/L) 的 1L 恐怖肉汤 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 的六连发酵瓶中。将瓶于 30 摄氏度转移至轨道摇床 (185 rpm) 上。当培养物的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 达到 0.45 时, 通过加入 1mM IPTG 来诱导表达 A- β 并将瓶于 41°C 转移至轨道摇床上。诱导后 3h 收获细胞。

6) A- β (1-43):

[产生未标记的材料]

将表达质粒转化入大肠杆菌 BL21(DE3) 并置于添加有卡那霉素 (50mg/L) 的 LB 上。37°C 温育过夜后, 平板上长出的转化子用于接种到包含添加有卡那霉素 (50mg/L) 的 1L 恐怖肉汤 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 的 14 连发酵瓶中。将瓶于 30 摄氏度转移至轨道摇床 (185 rpm) 上。

当培养物的 OD_{600nm} 达到 0.44 时, 通过加入 1mM IPTG 来诱导表达 A- β 并将瓶于 41℃ 转移至轨道摇床上。诱导后 3h 收获细胞。

实施例 III

重组表达的 B-淀粉样蛋白的纯化

为纯化重组人淀粉样蛋白而开发的全部方案如图 3 所示并如下所述。

起始样品:

所有分离的样品的起始材料是冷冻在-80 摄氏度的细胞浆, 其得自大肠杆菌细胞培养物的收获物。细胞培养物源自多重 1 升摇瓶培养或源自多至 35 升的发酵罐发酵。培养基由丰富的培养基组成, 能产生未标记的材料或最小培养基, 其含有或不含有外加的用于制备各种标记的 A- β 样品的标记。摇瓶或发酵罐发酵可使用不同的培养基。

行动 1: 从瓶中取细胞裂解物和包涵体制品的冷冻的细胞浆, 并将其加入到烧杯中的 5-10 体积冷的裂解缓冲液中, 将于室温其置于摇床上。裂解缓冲液由 100 mM tris (最终 4 摄氏度的 pH 为 7.5 至 7.8) 组成。对于来自发酵罐培养的细胞浆, 将 0.1% triton X100 加入裂解缓冲液。将 Benzonase (EMD Biosciences, Madison, WI) 加入到浓度为 0.1ul/ml 的细胞裂解物中。使冷冻的细胞浆搅动, 直至沉淀全部重悬起来。这通常在 45-60 分钟内完成。如不哦需要, 用组织匀浆器临时使悬浮液均一化以帮助该过程。用 M-110L 微流化剂 (Microfluidics, Newton, PA) 进行细胞裂解, 置于冰下的冷却旋管中; 或使用冷的法国压力细胞 (SLM Aminco, Rochester, NY) 进行。裂解的材料于 15 摄氏度置于 250 mL nalgene (Nalge Nunc International, Rochester, NY) 离心瓶中、或置于或 50ml 圆底聚碳酸酯离心管中, 并在 JLA 16.25 转子(Beckman Instruments, Palo Alto, CA)中于 4 摄氏度以 23000xG 离心 30 分钟。轻轻倒出上清液, 取样, 然后弃去。

行动 2: 包涵体和沉淀的洗涤

加入冷的 50mM tris 缓冲液(pH 7.5 至 7.8)来洗涤以上得到的沉淀。用组织匀浆器重悬材料并如上在 JLA 16.25 转子中以 23000xG 离心。总共 3 次如此用 tris 洗包涵体材料。每次收集上清液样品, 用于 SDS PAGE 分析。

行动 3：水洗

Tris 缓冲液洗后进行最后一次水洗。这样进行是为了在冷冻干燥样品前去除大多数 tris 缓冲液。在该步骤中，所有材料同时合并到一个瓶中。如上在 JLA 16.25 转子中以 23000xG 最后离心重悬的样品。收集上清液样品，用于 SDS PAGE 分析，然后弃去。

离心得到的沉淀沉淀于水 (用于 NMR 的样品)或含 0.1%三氟乙酸的水中。加入后者进行发酵罐发酵，其中大量材料同时被加工了。注意到，只用水冷冻干燥的材料是带高静电的，非常难于大量处理，而加入三氟乙酸制备的冻干的材料在以后处理时容易并安全得多。调节重悬样品的最终体积从而得到薄薄的浆片，其在冷冻(剥落)过程期间易于扩散到冷冻干燥机瓶壁上。

行动 4: 冷冻干燥

剥落冷冻重悬的样品并置于冷冻干燥机上，冻干过夜或至完成过程所需的时间。在 50 ml 聚丙烯圆锥管中冻干小样，由此它们不必转移出那儿。

行动 5：提取

所用的提取溶剂是 V-A) DMSO; V-B) 七氟丁酸(HFBA)和 V-C) 三氟乙酸。用氟酸的途径基于纯 TFA 中 A- β 1-42 或 1-40 的高溶解性[Jao, 等, (1997), "Trifluoroacetic Pretreatment Reproducibly Disaggregates the Amyloid β -peptide". Int. J. Exp. Clin. Invest., V4, 第 240-252 页]。纯 TFA 用于为了结构而制备 A- β 的第一步。纯 TFA 从肽中去除所有过去以前的结构并可使之高度可溶。

行动 5A: DMSO 提取

DMSO 是最常用的溶剂，用于从冻干的包涵体样品中提取肽。根据起始细胞浆的量得到来自发酵罐发酵的 10-20g 这种冻干的材料。在加温摇床上的 600 mL 玻璃烧杯中，将 300mL DMSO [二甲亚砜]加温至 37 摄氏度。将冻干的材料小心加入到 DMSO 中而不产生尘埃。转移后，用组织匀浆器使悬浮液均一。搅动再持续 15 分钟。全部过程超过 45 分钟。烧杯用玻璃板盖住。停止搅动和加热，并使材料在发热罩的板上放置过夜。使样品温度在任何时候不超过 37 摄氏度。总体积约 350 mL，在第二天早上于 25℃以 23000xG 在 JLA16.25 转子的两个 250 mL nalgene 瓶中离心 30 分钟。轻轻将 DMSO 上清液倒入 600 mL 玻璃烧瓶中。再将

50 mL DMSO 加入每个瓶中，然后均一化并离心。合并两个样品，总共得到约 400 ml。弃去沉淀，因为在以前的实验中 SDS PAGE 显示该过程基本能提取所有的肽。

NMR 样品一般含 5 至 10 gm 细胞将。将（从水中）冻干的包涵体材料装入 50 ml 聚丙烯圆锥管。将 25 ml DMSO 加入该管并临时使样品均一化以形成悬浮液。一般使其于室温至于板上约 4 小时，然而有时出于方便进行温育过夜。将重悬的沉淀转移至聚碳酸酯离心管中并于 25 °C 在 JLA 16.25 转子中以 23000xG 离心 30 分钟。沉淀量少并弃去。轻轻将上清液倒入 50ml 圆锥管中。在几个这种样品平行处理成到这种阶段时有时，将其冷冻于-20 摄氏度，等待层析。

行动 6 :用于层析的制品

用于层析的制品进行 DMSO 透析，溶入反相柱平衡洗脱液（10% 乙腈溶于含 0.1% 氢氧化铵的水中（以下行动 6A)）。

只要样品体积相对于柱体积小（通常小于 10%柱体积），也可将 DMSO 提取物(以下行动 6B) 直接用于反相柱。这可在有分析刻度的柱上进行。对于 NMR 样品，25ml DMSO 样品用 0.1% 氢氧化铵稀释成 250ml 并直接用于柱上。

行动 6A: 透析或稀释

将 DMSO 提取物仔细流入 6000-8000 定点透析膜 (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA)，其长度足以容纳约 1.5L。用 10L 15% 乙腈透析，向其中加入 10 mL 浓氨水(0.1%v/v)。在板上进行透析 4 小时。定期更换透析膜以重新分配浓 DMSO 并加速透析过程。4 小时后，将膜置于新换的 10L 相同缓冲液中，并再持续该过程 2 小时。在透析末尾，取出样品并于 25°C 以 23000xG 离心 30 分钟。基本没有沉淀。在透析末尾，将 350-400 ml DMSO 提取物体积加倍。将全部样品移入 2L 量筒并用 0.1%氨水稀释 2 倍，使总体积多至 2000 ml。进行稀释以确保样品可结合反相柱(行动 6A)

行动 6A: 层析

将 Polymer Labs (Amherst, MA)的 15-20 微米、300A、PLPR-S 反相树脂手工装于 2.2 X 25cm, (95 mL) 干净的柱。循环从 75% 乙腈 + 0.1% 氨水 (75%B)开始进行并平衡至 10%B。将柱连于 Pharmacia P500 泵 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ),和于室温将 1400 mL 泵过柱过

夜，置于板上超过 1000 分钟。第二天早上，用约 250 mL 10%B 用 P500 泵洗柱，然后连接至 Beckman HPLC (Palo Alto, CA)。用 10%B 持续洗，直至 280nm 处的吸收到达基线，然后开始从 10%B 往 30%B 梯度洗超过 200 分钟(0.1%梯度)。全部吸收保持在 1 个吸收单位，流速为 5 mL/分钟。手工收集材料。收集约 50 个级分。它们体积可变，但最大约 10 mL。在 30%B 时，用 30%B 持续洗脱柱并收集洗脱液。以后根据痕量弃去该洗脱液。100 uL 每个级分置于真空离心干燥器上干燥，并将 100 uL 1X 样品缓冲液加入试管中。让样品进行 SDS PAGE，并让级分在 4 摄氏度保存过夜。SDS PAGE 后，决定弃去 PLPRS 反相材料来代替试着再生它，因为它可能因本轮不纯物而潜在地污染下一轮。

第二天早上，将每个凝胶得到结果的进行合并。材料用 3500 定点膜在 Amicon (Millipore Inc, Billerica, CA)搅拌的细胞上浓缩，在约 4 小时中从 350 浓缩至 50 mL。溶解全部样品。然后冻干过夜。第二天早上，用秤重器仔细将其转移入两个预先称重的 50 mL 聚丙烯圆锥管。转移的总重量为 250 mg 加 330 mg (总共 580 mg)冻干的材料。这储存于 -20℃。全部过程在 5 个工作日内进行。以下是纯化表，其被称为表 3。

表 3

步骤	ml	吸收值确定的 mg	%
细胞裂解物	1800ml	279693	100
DMSO 提取物	400	14400	5.15
上样	1400	13353	4.77
合并	350	518	0.185
浓缩	63	508	0.182
冻干	粉	580	0.207

作用 6B：直接使用。

将含 10ul 浓氨水 (1% v/v)1 mL 的 DMSO 加入到 20mg 固体物中。用超声临时处理材料以重悬固体物，然后离心。0.5/1 mL 可溶于 DMSO 的材料用于 3u 分析性 0.46x25 cm PLPR-S 柱(步骤 2.1)上。SDS PAGE 分析为纯的 A- β 是用约 30%B 洗脱的。在 SDS PAGE 凝胶上观察到预先形成的球聚体的特征模式。冻干材料并通过图 8 简述的球聚体形成规程进行处理，而且在图 9 所示的 SDS PAGE 上得到条带模式。

在第二次尝试中，制备出溶于 DMSO 的 10mg/mL (不添加氨水)物质。1mL 该样品的一半直接注入分析柱。在这种情况下，在柱上进行 pH 改变。用预期的%B 洗脱肽，并进行合并 (用 SDS PAGE 分析)、冻干，并通过球聚体形成流程处理形成如前的有功能的球聚体。对于 NMR 样品，25ml DMSO 样品用 0.1% 氢氧化铵稀释成 250ml 并直接用于柱上。

作用 5B、5C: 酸提取途径

也可用七氟丁酸、(HFBA)和三氟乙酸进行提取。

作用 7A1、7A2、7A3: 用于层析的制品

300 mL 无水 HFBA 置于加温搅拌板上的 600 mL 玻璃烧瓶中。将冻干的 IB 样品 (~10 g) 在强力搅拌的条件下在通风橱中加入到 HFBA 中。如果需要，用组织匀浆器和探测超声波器解聚任何形成的团块。将材料加热至 40 摄氏度，进行冷却，并在避光的条件下在板上放置过夜。第二天早上，HFBA 溶解的 IB 样品 (其大部分是溶液) 置于旋转蒸发器上，用约 40℃ 作为水浴温度以去除大部分 HPBA。小心不要干燥瓶壁上的固体物。(当材料像粘液浆般时，将约 50ml 1,1,1,3,3,3, 六氟异丙醇 (HFIP) 加入烧瓶。用组织匀浆器和/或超声探测器，通过加热、旋转烧瓶，使浆体溶解入 HFIP。)当所有都成为溶液时，在蒸发器上去除 HFIP 使样品粘结成粘液浆。加入另外 50 mL 等分的 HFIP 并重复该过程。将 50 mL DMSO 加入烧瓶，这时样品呈浆体粘结状。样品颜色变成深褐色并轻微加热以溶解入 DMSO。将其在室温放置过夜。第二天早上，瓶底有沉淀，而上清液是澄清的。离心样品并弃去沉淀。

作用 8: 将提取物加入含乙酸的水中

缓慢将 1 体积该提取物加入 2 体积含 30% 乙酸的水中，于室温快速搅拌。于室温持续搅拌 30 分钟，然后离心样品以去除少量不可溶性物质。其间，用 30% 乙酸装 5 X 90 cm (~1800 mL) Sephadex G50 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 柱并置于冷室中备用。150-200 mL 溶于~33%DMSO 的样品用于 G50，小心处理不要让样品冻结。用 30% 乙酸以 1.5 mL/分钟洗脱约 1.2 柱体积的样品。得到 3 个峰。弃去第一个 (即，空白) 峰。第二个峰包含几乎纯的 A-β。第三个峰包含一些 A-β，但还含提取溶剂，也将其弃去。冻干中间的峰，加热在最小量的 DMSO (~10-20 mL) 中处理。

作用 9A: 酸性反相层析

离心掉样品中的不可溶性材料并用于在 20%B (含 0.1%TFA 的 20% 乙腈)中平衡的 Vydac TP214 C4 反相柱(Grace-Vydac, Hesperia, CA)。在基于硅土的 C4 柱上用 TFA 系统中约 60%B 洗脱 A- β 。冻干合并物,溶于 10 mL DMSO 中。

作用 9B: 碱性反相层析

然后将 DMSO 样品用于作用 5A 途径所述的 PLPR-S 反相系统,以得到纯的 A- β 并将其转化成铵盐形势,然后冻干。

检验最终组合物:

任何这些方法制备的纯的淀粉样 β 肽显示出所观察到的质量为 4645 至 4648 Da (图 4)。这与预计所用的 DNA 表达序列存在 N-末端甲硫氨酸一致。基于表达所用的各表达序列,其他克隆的淀粉样 β 形式也显示出预期的质量。

实施例 IV

从重组 β -淀粉样蛋白中制备球聚体

标准流程: 按比例增加时使用倍增因数。

步骤 1: 2 X 3 mg 人淀粉样 β (1-42) (Bachem Biosciences, King of Prussia, PA) + 2 X 500 μ L HFIP(六氟异丙醇) (6 mg/mL 悬浮液)溶于两个 1.6 mL 移液管 (2 x 500 μ L 部分) (Eppendorf Northamerica, Westbury, NY);于 37°C 震荡 1.5h (产生澄清溶液);

步骤 2: 在真空离心干燥器中干燥 1.5h;

步骤 3: 溶于 2 等分各 132 μ L DMSO 的重悬的干燥材料在水浴中用超声处理 20 秒,在平板震荡器上轻微震荡 10 分钟;和

步骤 4: 储存于-20 摄氏度,以备进一步使用。这产生了溶于 DMSO 的 5 mM 淀粉样 β (1-42)储存悬浮液

第 1 天结束

步骤 5: 15 mL Falcon 管注满 690 μ L 20 mM 磷酸钠; 140 mM NaCl; pH7.4 缓冲液;

步骤 6: 加入 60 μ L 溶于 DMSO 的 5 mM 淀粉样 β (1-42)储存悬浮液 (400 μ M 淀粉样 β (1-42));

步骤 7: 加入 75 μ L 含 2% SDS 的水(0.2% SDS);

步骤 8: 于 37°C 温育 6-8 h; 和

步骤 9: 加入 2475 μL 水, 用水稀释 4 倍, 最终体积为 3.3 mL
($132/60 \times 3.3 = 7.26 \text{ mL}$)

步骤 10: 于 37°C 温育 18-20h,

第 2 天结束, 第 2 晚

步骤 11a: 以 3000xG 离心 10 分钟;

步骤 11b: 或者(浓缩前, 如果要交联)步骤 11a 后交联,-

步骤 12: 用 30 kDa Centrprep (Millipore Inc, Billerica, CA) 浓缩上清液至 1 mL;

步骤 13: 用 PBS/4 (PBS = 磷酸缓冲盐液, 1 mM KCl, 154 mM NaCl, 4 mM 磷酸, pH 7.4; PBS/4 = 用水稀释 1 至 4 倍的 PBS, 最终 pH 7.4) 透析样品过夜, 于 4°C 用 12-15 kDa 定点管离心浓度在移液管中以 10,000xG 10 分钟(澄清的沉淀)并等分成 250 μL , 冷冻于 -20°C 进行 Bradford、Sup-12 的 SDS PAGE。

第 3 天结束

只要一次处理足够的肽, 通常能得到高产量。

备选/替换法:

步骤 12: 用 YM10 膜在搅动的小室(Amicon, Millipore Inc, Billerica, CA) 上进行浓缩;

步骤 13: 用 PBS/4 平衡的 Sephadex G25 柱进行替换透析。

为了代替 Bradford 法, 使用计算的吸收度。

实施例 V

由此制备的重组 B-淀粉样蛋白和球聚体的特征

在不同研究位置上用制备的单克隆抗体进行 ELISA 来比较合成的和源于重组的淀粉样。

图 5 是用大肠杆菌种产生的 Met-A β 1-42 肽制备的 A β 球聚体的直接 ELISA。通过以浓度依赖性方式结合球聚体特异性抗体来证明显示的球聚体表位。检测到两种不同的抗体 A, 其由不同洲的分开实业公司制备(LU = Ludwigshafen; AP = Abbott Park)。抗体 B 不能识别全长 A β 1-42 肽制备的球聚体, 因此不能结合球聚体。

ELISA 比较鉴定出现在全长和截短的重组淀粉样球聚体中的球聚体表

位

图 6 提供的 ELISA 数据显示了在检测含重组人淀粉样肽 Met1-42 的全长球聚体时小鼠单克隆抗体 A、C、D 和 B 之间的差异 (图 2)。该图显示, 抗体 A 以比抗体 C 和 D 更低浓度识别 (更紧密结合) 这些球聚体, 其都能比 10F11 单克隆抗体更紧密地结合。通过比较, 图 7 提供的 ELISA 数据显示了, 所有抗体识别用蛋白水解酶嗜热菌蛋白酶截短的球聚体, 其 (主要) 包含从残基 20 至残基 42 的淀粉样序列 (参见图 2)。该 ELISA 数据显示, 这些抗体已几乎相同的亲和性识别截短的球聚体。综合图 6 和 7, 表明抗体 A 对球聚体表位是高度选择性的 (如以下 NMR 衍生的结构数据所定义的)。抗体 C、D 和 B 有区别地优先结合截短 20-42 序列形式 (图 2) 的淀粉样。对截短的淀粉样蛋白选择性的最大差异由抗体 B 显示出。基于表位相互作用中的这些差异, 更优选带有像抗体 C 或 D 抗体那样的表位结合特征的抗体, 而最优选带有抗体 A 表位结合特征的抗体, 用于结合含在 20-42 (或 20-43) 淀粉样序列范围内的球聚体表位。

进行点印迹分析抗 9 种不同的合成的淀粉样 β 和 APP 制品的一系列 mAb (A、B、C 和 D) (数据未显示)。除了确证图 5、6 和 7 所示的 ELISA 结果, 这些点印迹与以下提供的 NMR 结构数据也形成了确立反应性表位 (特别是 “关闭” 形式的 β 淀粉样构象转换的) 的优选实施方案的基础 (图 3)。在该关闭形式中, 暴露出表位并可用于免疫反应。在 “开放” 的形式中, 淀粉样原纤维迅速聚集形成较大的完全平行折叠结构, 因此作为不同表位而无更长的可利用度。(纤维形式几乎互斥性地与单克隆抗体 C 反应, 而单克隆抗体 A 与二醛交联或未交联的球聚体和截短的淀粉样 20-42 反应。而单克隆抗体 D 和 B 与嗜热菌蛋白酶截短的或嗜热菌蛋白酶和 EndoGluC 截短的序列 12-42 反应 (数据未显示)。

ELISA 材料: 微滴定板来自 Nunc Immuno Plate, 其平底, 有 Maxi-Sorb 表面 (目录号 #439454)。缀合物 (第二抗体) 是来自 Jackson Immuno Research 的驴抗小鼠 HRPO 缀合物 (目录号 #715-035-150)。HRPO 底物是 3, 3', 5' 5' -四甲基对二氨基联苯液体底物 (TMB) (Sigma, (目录号 #T4444)。脱脂奶粉 (NFDM) 来自 BioRad (目录号 #170-6404)。所有其他化学物质来自常规来源。

缓冲液和溶液: PBST 缓冲液: 用 0.05% Tween 20 制备的 Sigma

PBS。将 0.5gm BSA 溶于 100mL PBST 来制备含 0.5% BSA 的 PBST。封闭溶液是含 3% NFDM 的 PBST。缀合物稀释剂是含 1% NFDM 的 PBST。包被缓冲液是 100mM NaHCO₃ (pH8.2)。HRPO 终止溶液是 2M H₂SO₄。

ELISA 板的包被：要测试的淀粉样球聚体用包被缓冲液稀释成 1.0 ug/mL。每孔加入 100uL 来包被。用封板膜密封孔并置于 4℃ 过夜。

平板的封闭：从孔中去除包被溶液。用 150uL PBST(可选)洗孔 2-3X。加入 300uL 封闭溶液(含 3% NFDM 的 PBST)。然后用封板膜覆盖孔并于室温震荡温育~2 小时。

ELISA 第一抗体：从孔中去除封闭溶液。用 150uL PBST(可选)洗 2-3X。加入 100uL 第一抗体溶液。对于全长 met + A β 1-42 球聚体，使用 0.04 至 100ug/mL 的抗体 5F7 溶液。用含 0.5% BSA 的 PBST 稀释抗体，用封板膜覆盖并于室温震荡温育~2 至 3hr。

ELISA 第二抗体 (HRPO 缀合物)：从孔中去除第一抗体溶液，用 150uL PBST(必需)洗 2-3X，并加入 200uL 用含 1% NFDM 的 PBST 以 1:5000 稀释的第二抗体 (HRPO 缀合物)溶液。用封板膜覆盖孔并于室温震荡温育~1hr。

底物显色：从孔中去除缀合物溶液，用 200 uL PBST(必需)洗 2-3X。然后每孔加入 100uL HRPO 底物溶液。然后让其显色，进行观察(即，蓝色)。(通常在室温进行反应 5-10 分钟。)每孔加入 50uL 终止溶液，使颜色由蓝变黄。用微滴定板读数仪在对空进行 A450nm 读数。最好在加入终止溶液的 30 分钟内读数。用嗜热菌蛋白酶截短球聚体：向约 20mL 9 mg 球聚体加入 45ul 含 4mg/ml 嗜热菌蛋白酶(Calbiochem)的 PBS (180ug 嗜热菌蛋白酶或 9000uL/180uL 以约 1 比 50 (v/v) 稀释)。让反应在室温进行过夜。第二天早上，可看见反应混合物是澄清的。加入 0.5 mM EDTA 以终止嗜热菌蛋白酶反应。为了制备用于分析的最终产物，如下进行色谱：用氢氧化铵调节 1 mL 截短的球聚体至 pH 10。然后将其用于 7mm 聚合物反相柱，以去除 SDS (polymer laboratories, Amherst MA.)并以 1%/分钟梯度洗脱。主要洗脱级分含纯化的截短的 (20-42)球聚体。

点印迹材料、过程和样品的制备：一组多种合成的淀粉样 β 和阿耳茨海默前体蛋白质 (APP) 作为抗原以不同浓度(100 pmol, 10 pmol, 1 pmol 和 0.1 pmol)点样在硝化纤维折纸 (转印迹转移基质 (目录号

162-0113)纯硝化纤维膜 (0.45 μm , BIO-RAD Laboratories, Inc., 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA) 上, 用 Hamiltan 注射器电样成约 2-5 mm 的点, 并用气流干燥 (栏 1-10)。

检测试剂: NBT/BCIP 片(目录号 1 697 471), 其来自德国的 Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Nonnenwald 2, 82372 Penzberg。

牛白蛋白: SIGMA-ALDRICH (目录号 A-7888) (BSA), 来自 St. Louis, Missouri 63178。

封闭: 含 5% 脱脂奶粉的 TBS。

缓冲溶液: TBS, 25 mM Tris HCl - pH 7.5, 150 mM NaCl; TTBS, 25 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20; PBS, 20 mM 磷酸, pH 7.4, 140 mM NaCl, 0.2 mg/ml BSA

抗体 I: 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 抗体 (每膜 20 ml $\Rightarrow$ 4 $\mu\text{g Ab}$), 其溶于含 1% 脱脂奶粉的 TBS。

抗体 II: 1:5000 稀释 (20 ml per 膜 $\Rightarrow$ 4 $\mu\text{l Ab}$)的抗小鼠-AP, 其溶于含 1% 脱脂奶粉的 TBS

过程:

- 1) 1 μl 抗原稀释液(1-5) 以约 1 cm 距离点样。
- 2) 于室温干燥 10 分钟。
- 3) 封闭: 加入 30 ml 含 5% 脱脂奶粉的 TBS 来封闭膜并于室温温育 1.5 h。
- 4) 洗涤: 轻轻倒出封闭溶液并于室温用 20 ml TTBS 洗膜 10 分钟。
- 5) 抗体 I: 用含 1% 脱脂奶粉的 TBS 稀释第一抗体至 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 。每膜用 20 ml。于室温温育过夜。
- 6) 洗涤: 用 20 ml TTBS 进行 2 次, 每次 10 分钟, 用 20 ml TBS 进行 1 次, 10 分钟。
- 7) 抗体 II: 用含 1% 脱脂奶粉的 TBS 稀释第二抗体至 1:5000。每膜用 20 ml。于室温温育 1h。
- 8) 洗涤: 用 20 ml TTBS 进行 2 次, 每次 10 分钟, 用 20 ml TBS 进行 1 次, 10 分钟。
- 9) 显色: 将 1 片 NBT/BCIP 溶于 20 ml 水中。轻轻倒出洗液并用显色溶液覆盖膜约 10 分钟。

封闭:用水洗

各样品如下制备:

按照 S. Barghorn 等 JoN. 2005, 95, 834-847 来制备淀粉样 β (1-42) 球聚体。含淀粉样 β (1-42) 的 HFIP 如下制备: 1 mg/ml 淀粉样 β (1-42) 于 37°C 溶于 HFIP 1.5h; 在真空离心干燥器中干燥; 将干燥的材料重悬于 DMSO 中; 稀释于含 0.1% 聚丙二醇与环氧乙烷的加聚物 F68 的 PBS 中, 于 20 摄氏度搅拌 1h; 以 3000g 离心 20 分钟。沉淀重悬于含 1% 聚丙二醇与环氧乙烷的加聚物 F68 的 PBS 中; 超声处理 20 秒并用水以 1:6.7 稀释, 在 20 摄氏度搅拌 1h。然后, 以 3000g 离心样品 20 分钟, 弃去上清液并存于 -80 摄氏度。

由上述淀粉样 β (1-42) 球聚体制备淀粉样 β (20-42) 球聚体。

由淀粉样 β (1-42) 球聚体如下制备交联的淀粉样 β (1-42) 球聚体: 于室温用 1 mM 二醛处理 1mg/ ml 淀粉样 β (1-42) 球聚体 2h, 然后于 RT 用 5 mM 乙醇胺处理 30 分钟。

根据 Lambert 等 PNAS 95, 6448-6453, 1998 制备 ADDL 的。

如下制备截短的淀粉样 β (12-42) 球聚体: 用 1/93 (v/v) EndoGluC 蛋白质酶 (Roche Biosciences, Indianapolis, IN) 于 20 摄氏度处理淀粉样 β (1-42) 球聚体 20h; 用过量二异丙基氟代磷酸 (DIFP) 终止反应; 然后用 30kD 分子量定点离心制备法浓缩并用 1/4 PBS 透析, 其中透析液调节成有 0.1% SDS 含量; 透析后将其存于 -80 摄氏度。

如下制备含淀粉样 β (1-40) 的 HFIP: 于 37 摄氏度将 1 mg/ml 淀粉样 β (1-40) 溶于 HFIP 中 1h; 在真空离心干燥器中干燥, 重悬的干燥材料溶于 DMSO 并存于 -80 摄氏度;

如下制备含淀粉样 β (1-42) 的 0.1% NH_4OH : 1 mg/ml 淀粉样 β (1-42) 溶于 0.1% NH_4OH 并存于 -80 摄氏度。

如下制备淀粉样 β (1-42) 纤维: 1 mg/ml 淀粉样 β (1-42) 溶于 0.1% NH_4OH ; 以 1:4 用 PBS 稀释; 用 HCl 将 pH 调节至 pH 7.4; 于 37 °C 温育 20h; 以 10000xG 离心 10 分钟; 重悬沉淀于 PBS 中并存于 -80 摄氏度。

APP (第一个点: 1pmol) 由 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO 提供。

未预料的结构特点和生物物理特征:

a) 流体力学特点

图 10 描述了由重组 MetA- β 1-42 制备的球聚体的流体力学分析(沉积速度和动力学光散射 (DLS))结果。上栏描述了一系列如上所述制备的重组 Met-A β 球聚体的有代表性的沉积速度图谱,而且所述球聚体在 2.5mM 磷酸钠、0.65 mM KCl、34.5 mM NaCl (pH 7.4) 中离心。如箭头所示,扫描时间向右增加,图谱包括一系列由 Beckman XLI 分析型超离心产生的各 S 形扫描结果。上栏的 x 轴距离离心中心有几厘米,而 y 轴是干涉带的相对位移。下栏描述了在所有分析时间期中完全沉积分布(上栏)的 C 图,其是根据 Schuck (Biophysical Journal, 2000, 78:1606-1619) 用 SEDFIT 来计算的。得自动力学光散射的 C 分析和独立的结果在图中有概述。它们表明,球聚体具有约 63 kDa 的分子量,其大约相当于球聚体包含~14 个 Met-A- β 单体(14×4645) = 65030 Da。

b)用于分析型超离心、沉积速度实验的实验规程:

用蓝宝石窗将样品上样于标准的两部分小室中。用 4 洞或 8 洞转子检测所有样品。条件如下:温度:20C,转子速度:42,000rpm,收集干涉数据;以连续模式用 0.003cm 的径向步长收集 280nm 处的吸收数据。每步收集一个数据点(不进行信号平均)。通常,在不大于 9 小时的进程中收集 200 个扫描点或更少。

c) 拟合数据:

用两个互补方法来拟合数据:如在 SEDFIT v8.9 (Schuck, 2000)中执行的,进行连续 S 分布分析 (C 分析,图 7),来理解样品的整体异质性。用最大熵算法拟合径向和时间独立性噪声并从数据中去除。用程序 SVEDBERG (Philo, J. S., 1997, Biophysical Journal, 72:435-444)将未处理的移动界面谱(图 6, 上栏)拟合成改良的 Fujita-MacCosham 函数。这能确定沉降系数(S)和扩散系数 (D),由此来计算由该模型说明的物质种类的分子量 (Mr)。对于该分析,可视化检查扫描结果,并仅用合适的扫描结果。挑出扫描结果的标准包括足够清除出半月板和有足够的剩余高水平区域留下(即,没有沉积太远)。模型包括单一种类和多个种类(最大多至 3)。

d) 拟合结果:

C 分析: C 分析提示了主要单一种类带有 S~4,也会出现少量较高阶

的集聚。该较大的种类峰有点宽，这提示了可能存在多个未解析的种类。将摩擦系数全局拟合（所有种类）成 $f/f_0=1.54$ ，这提示了出现的寡聚物不是简单的球。

SVEDBERG 分析: 尽管可能用单一种类来拟合数据，但在加入额外的潜在种类时可得到更好的拟合。通过残余的较低系统变量和拟合参数适合度降低 38%，来判断拟合是否改善。对于主要成份(基于种类去卷积而得的 92%的材料)，拟合回归到值为 $S_{20,w} = 4.1$ 、和 $D_{20,w} = 5.5$ 。利用这些值得到 M_r 为~68kDa，这表明寡聚物有~14 个肽单位。得到形状因数 $f/f_0 = 1.42$ ，这再次表明是更长的球形。为两组分由宽分布的较大的 S 值代表，这表明它们可能包含少量(小于 10%)未解析的较高阶聚集体。使结果清晰可见的互补分析方法使模型适应分子量的修正值——其代表球聚体组装体中特定数量的寡聚物。然后，由这些拟合得到的残差平方的总合对每个可能的球聚体大小增加值作图。该分析出现在用于两个成分(主要成份是球聚体，次要成分是较高阶的种类)拟合的图 21 中。在该图中，通过固定推测的聚集体分子量(M_r 增加值=4645)进行拟合主要成份 10 至 18 肽的寡聚状态，并在 SVEDBERG 中进行拟合。得到的拟合适合度参数（平方和）对每个球聚体的肽的数量作图，用于强制拟合。最小值（最低拟合误差）出现在每个球聚体有约 14 个肽的寡聚状态。

全面的沉积分析提示，球等量半径约为 3.6 nm，而 DLS 提示值为约 3.9 nm。用装有 APD 检测仪的激光散射系统(ALV Instruments, 德国) 进行 DLS 研究。激光波长为 647 nm 宽的氦离子激光(Coherent Instruments, CA)，而且选择的散射角介于 40 和 150 度。在水浴控制的 20°C 温度时测量样品。利用正规化(拉普拉斯导位算法(参见如，SPIE Proceedings 第 1430 卷 "Photon Correlation Spectroscopy: Multicomponent Systems" 编者 K. S. Schmitz, ISBN: 0-8194-0520-5, 第 266 页)来进行多成分的相关函数分析。用能反向散射 APD 检测的 DLS 平板读数仪 DynaPro (Protein Solution, Wyatt Instruments, CA)，用 158 度的散射角进行额外的 DLS 测量。二极管激光具有 819.7nm 的发射波长；检测但不控制温度 (T=25°C)。

e) 原子力显微镜观察球聚体:

图 14 描述了球聚体(上栏)和金纳米球 (下栏)有代表性的 AFM 扫描结果。X 和 Y 轴的维度相等，没个显示出长度为 250 nm 的标记。在相同设置的条件下扫描每个样品，在每种情况下，球聚体和纳米球长度

似乎延伸了 3 至 5 nm (Z 轴)。根据 NIST (National Institute of Standards and Technology) 3D 参考标准, 用 20 nm 深的凹槽进行 Z 轴的绝对校准。标准得自 Nanodevices 公司 (Veeco Instruments 的分支机构, Woodbury NY)。该标准(N=IO)得到的重复高度测量值揭示平均高度为 19.909 nm 而且标准差为 0.228 nm。Veeco/Digital Instruments 保证使高度测量校准成 0 至 20 nm 范围内的线性关系。为了确定球聚体高度范围内的 AFM 性能, 而且为了评估 AFM 顶部的侧面扭曲来测量 X 和 Y 维度, 用 AFM 测量胶体金纳米球(直径平均为 5 nm)。金纳米球购自 Sigma (St. Louis, MO, 目录号# G-1402, lot 103K91851), 而且 Sigma 的技术专家声明颗粒将显示出 3.5 至 6.5 nm 的大小范围。使用金纳米球, 因为 AFM 成像工具顶部以轻敲模式 AFM 通常所用的力不能压缩这些纳米球。通过比较, 以前显示当用 AFM 成像时, 淀粉样聚集体轻微扭曲(Stine 等, 1996)。厂商(Veeco/Digital Instruments) 指定 AFM 顶部曲率半径为 10 nm (Veeco 模型# TESP, 其顶部实际由 NanoWorld AG (Neuchatel, 瑞士) 制造; type:NCH-W, 单位号:12543L320, 弹簧常数 28-54 N/m)。根据成像测定, 金纳米球(实际为 3-5 nm)似乎有约 15 nm 的直径, 这表明侧边图像失真因数为 4 至 7。上图中单图像的球聚体测得约 23 nm 或去掉了侧边扭曲约 3.2 至 4.2 nm。这些尺度符合由(以上)流体力学和光散射分析确定的球等量半径。

用水由 Barnstead 纳米级纯水系统(APS Water Services Corp., Van Nuys, CA)将样品稀释至 0.029 mg/ml 的浓度。使用前监测水的电导率, 所有所用的水的最小电导率为 18.0 M Ω -cm。沉积前, 用 Eppendorf 5415C 微离心机 (Eppendorf AG, Hamburg, 德国)以 14000 rpm 离心样品 10 分钟。20 微升样品沉积于 1/2" 直径的新剪裁的云母盘 (Ruby Red Mica Sheets, 目录号#71850, Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA) 上。每个样品置于带有湿纸巾的密闭培养皿中, 并使之温育 7 分钟。然后, 用 1 ml 纳米级纯水 (等分成 5 - 200 μ l)冲洗每个样品并使之在轻微流动的气流下干燥。

在 Veeco/Digital Instruments 毫微秒示波器 IIIa (Veeco, Santa Barbara, CA)上进行原子力显微镜 (AFM)分析。用 TESP 顶部($f_0 \sim 280$ kHz)进行轻敲模式 AFM。在高度和振幅模式下于 4 nm、2 nm、和 1 nm 收集图像。利用切面分析‘高度模式’的图片来确定各球聚体的高度(参见 Stine

等, 1996, J. Prot. Chem., 15, 193-203)。

图 12、13 和 14 描述了有代表性的 球聚体 AFM 图像, 其在没有 SDS (图 12)、0.05% SDS (图 13) 和 0.2% SDS (图 14) 的情况下可见。对于这些浓度的 Met-A β 肽 (30 $\mu\text{g/mL}$ 单体浓度或更大), 在存在 SDS 的情况下, 大大减少了肽迅速(几十分钟)形成大密度的纤维聚集体的倾向, 而且通过 SDS 阻止形成这些较高阶的纤维聚集体使肽稳定。通过 SDS 处理产生的全部球聚体稳定了它们, 使之不能迅速聚集成较大的纤维形式。据信 SDS 的十二烷基磺酸链上的磺酸部分能通过肽的球聚组装物结合的负电荷的磺酸基之间的电荷-电荷排斥, 来阻断聚集成更大的种类。由于在制备球聚体的过程中降低了 SDS 浓度(图 8), 透析后仅保留了残存量。该过程得到的肽的球聚组装物的独特结构/构象(图 20-24) (由于它们本身构象特点) 而由此不能迅速聚集形成分子量有几十万或数百万道尔顿的大纤维聚集体。这些稳定的球聚体出现独特的表位区域(不同于淀粉样原纤维上的表位), 其能与人类自体抗体和小鼠单克隆抗体反应(图 5-7)。在生物学上, 体内产生淀粉样肽发生在细胞膜的天然中(图 23)。在该场合下, 淀粉样肽总是暴露于并甚至嵌入细胞膜。常规的生物学知识为, 该膜包括双层两性分子的生物液体。因此预计用于产生球聚体的 SDS 模拟了细胞液体膜的天然两性分子环境。在该两性分子环境中, 淀粉样蛋白自组装成出现(暴露)了前述表位区域的球聚结构。

体外过程得到的球聚体已经用于确定呈现出表位的肽二级结构 (图 17-24), 从而用于选择和设计合适的治疗性 (阻断) 单克隆抗体。这些球聚体也已用于产生能活化抗阿耳茨海默氏病免疫的潜在疫苗。另外, 这些球聚体也已用作为分子工具来发现小分子试剂(药物), 其能阻断球聚体形成或改变球聚体与其他细胞实体相互作用, 由此减轻或消除疾病进程。另外, 也可用稳定的球聚体, 来产生诊断测试方法以预测疾病倾向或监测治疗剂的功效。预计超过 SDS 的两性分子试剂单独或与已知的天然脂肪酸或去污剂的组合也将用于在体外制备球聚体。预计可用于制备球聚体的化学试剂的部分列表包括以下种类的一种或多种: 辛酸、壬酸、癸酸、十一酸、十二酸、十四酸、11,14- 二十二烯酸、13-二十二烯酸胺、13-epi-12-氧植物二酸、13 (Z) -二十二烯酸, 17-十八碳炔酸、1-二十烷酰基甘油、1-二十烷酰基甘油- d5、2-二十烷酰基甘油、2-二十烷酰基甘油-d5、2-二十烷酰基甘油醚、2-氟棕榈酸、2- 羟基肉豆蔻酸、2-

亚油酸甘油, 3-硫代十四酸、4,5-去氢二十二碳六烯酸、5,6-去氢花生四烯酸、7,7-二甲基-5,8-二十二烯酸、8,11-二十二烯酸、9,12-十八烯酸、9-十八胺肾上腺酸、 α -亚油酸、 α -亚油酸乙醇胺花生四烯酸、花生四烯酸-d8、花生四烯酸甲基酯、花生四烯酸(无过氧化物)、花生四烯酸(钠盐)、花生四烯酸乙醇胺、花生四烯酸乙醇胺-d8、花生四烯酸甘氨酸、花生四烯酸 m-硝基苯胺、花生四烯酸 p-硝基苯胺、花生四烯酸三氟甲基酮、cis-十八碳四烯酸、缀合的亚油酸 (10E, 12Z)、缀合的亚油酸(9E, HE)、缀合的亚油酸 (9Z, 11E), 癸酰基 m-硝基苯胺、癸酰基 p-硝基苯胺、二高- γ -亚麻酸、二高- γ -亚麻酸乙酯、二高- γ -亚麻酸甲基酯、二高- γ -亚麻酸乙醇胺、二十二碳六烯酸、二十二碳六烯酸-d5、二十二碳五烯酸、二十二碳四烯酸乙醇胺、二十二碳三烯酸、二十碳五烯酸、二十碳五烯酸(无过氧化物)、二十碳四烯酸、二十碳三烯酸(11Z, 14Z, 17Z)、二十碳三烯酸(5Z, 8Z, 11Z)、二十碳五烯酸、反油酸、 γ -亚麻酸、月桂酸、反十八碳烯酸、亚油酸、亚油酸-d4、亚油酸(无过氧化物)、亚油酰乙醇胺、蜂蜜酸乙醇胺、甲基 α -亚油酸氟代磷酸、甲基花生四烯酸氟代磷酸、甲基 γ -亚麻酸盐、甲基 γ -亚油酸氟代磷酸、N-油酰甘氨酸、N-油酰牛磺酸、N-棕榈酸牛磺酸、N-硬脂酰牛磺酸、油酸、油酸-2,6-二异丙基苯胺、油酰乙醇胺、油酰苯胺、油酰三氟甲基酮、 ω -3 花生四烯酸、 ω -3 花生四烯酸-d8、软脂酸、软脂酰乙醇胺、软脂酰三氟甲基酮、植烷酸、硬脂酸、硬脂酸甲基酯、硬脂酰乙醇胺、创伤酸、伞形基花生四烯酸、1-丁烷磺酸钠、戊烷磺酸钠、1-庚烷磺酸钠、辛基磺酸钠、壬基磺酸钠、(十二烷基磺酸钠)十二烷基磺酸锂、1-十二烷磺酸钠、十四烷基磺酸钠、十六烷基磺酸钠、己烷磺酸钠、十八烷基磺酸钠、月桂酰磺酸钠、2-羟基-3-硫代丙基十二酸、N-月桂基肌氨酸二辛基硫代琥珀酸盐、DOSS、二-2 乙己基硫代琥珀酸盐和钠盐。

f) 球聚体的等温滴定热量测定:

图 15 描述了单克隆抗体 A 与由重组 MetA- β 1-42 制备的球聚体结合结果。用等温滴定热量测定 (ITC) 来直接测量结合。在该实施例中, 热量计小室包括浓度为 86 微摩尔 (基于单体单位) 的淀粉样 β 。用 132 微摩尔的抗体滴定。两者溶于含 35mM NaCl (pH7.4) 的 5 mM 磷酸钠缓冲液中。拟合的解离常数 (结合 Kd) 为 490 纳摩尔 (或 0.46 μ M), 观察到的结合焓为每摩尔 -47.5 千焦耳, 而且结合的表现化学计量为每个

抗体分子有 6.3 个淀粉样 β 分子。综合流体力学分析 (图 13 和 21), 这提示每个球聚体单元有约两个抗原结合位点。

g) NMR 特征:

样品制备: 同位素购自 Cambridge 同位素实验室和 Isotec。所用制备用于 NMR 研究的标记的样品使用最少培养基 [Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989]。将 N-Met 1-42 肽克隆进 pET29a 载体并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 株中表达。于 36 摄氏度摇瓶培养细胞, 直至 OD 达到 1.0, 然后于 42 摄氏度表达 2 小时。均一-[^{15}N]-标记的样品培养于含 1 g/L $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 和 3 g/L 葡萄糖的 H_2O 培养基中。均一-[^{15}N , ^2H]-标记的样品培养于含 1 g/L $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 和 3 g/L D-葡萄糖-d12 的 D_2O 培养基中。均一-[^{14}N , ^2H]-标记的样品培养于含 1 g/L $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 和 3 g/L D-葡萄糖-d12 的 D_2O 培养基中。均一-[^{15}N , ^2H , ^{13}C]-标记的样品培养于含 1 g/L $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 和 3 g/L D-葡萄糖-d12 的 100% D_2O 培养基中。2H 背景中带有 Ile、Val、Leu 残基的选择性 ^{13}C -标记的质子化甲基的均一-[^{15}N]-标记的样品通过在培养基中培养细胞来制备, 所述培养基含 100% D_2O 、D-葡萄糖-d12 (3 g/L)、和 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (1 g/L), 并向培养基添加 3- ^{13}C - α -酮丁酸酯 (标记异亮氨酸甲基用 50 mg/L) 和 3,3- $^{13}\text{C}_2$ - α -酮异戊酸酯 (同时标记缬氨酸和亮氨酸甲基用 100 mg/L)。表达的肽如以上实施例 III 所述的进行纯化。通过使用 Barghorn 等 (J. Neurochem. 2005 95, 834-847) 公开的规程, 用含~1.5% SDS-d25 和 1x 磷酸缓冲盐液 (pH 7.4) 的缓冲液 (GIBCO) 制备并浓缩 NMR 样品成终浓度为 16 mg/ml。为了制备混合的样品, 带有不同标记方案的纯化的肽以 1:1 比率混合, 然后根据规程进行样品制备。

NMR 谱: 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 在 Bruker DRX600 或 DRX800 NMR 光谱计上收集 NMR 谱。用三重共振实验 (HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CB, HN(COCA)CB) [T. Yamazaki, 等, J. Am. Chem. Soc. 116, 11655-11666, (1994)] 用均一-[^{15}N , ^2H , ^{13}C]-标记的样品分派主链的 ^1H 、 ^{15}N 、和 ^{13}C 共振值。用均一- ^{15}N -标记的样品由 ^{15}N -编辑的 NOESY 谱来分派 $^1\text{H}_\alpha$ 和侧链信号共振值 [S.W. Fesik, 等, J. Magn. Reson. 78, 588-593, (1988); G.M. Clore, 等, Meths. Enzymol. 239, 349-363, (1994)]。用 2H 背景中带有 Ile、Val、Leu 残基的选择性 ^{13}C -标记的质子化甲基的均一- ^{15}N -标记的样品由 3D ^{15}N -解析的 NOESY 实验来分派主链酰胺 NH-NH NOE

值。如前述, 用混合样品进行 ^{15}N -过滤的和 ^{15}N -编辑的 3D NOESY 实验[M. Ikura, 等, J. Am. Chem. Soc. 114, 2433- 2440, (1992); G. W. Vuister, 等, J. Am. Chem. Soc. 116, 9206-9210, (1994)], 所述样品中 $[\text{U}-^{15}\text{N}^2\text{H}]$ -标记的和 $[\text{U}-^{14}\text{N}, ^2\text{H}]$ -标记的样品以 1:1 比率混合。分离的混合的样品用于 ^{15}N -过滤的和 ^{15}N -编辑的 3D NOESY 实验中, 所述样品中 $[\text{U}-^{15}\text{N}, 2\text{H}]$ -标记的肽和含 IVL 残基的选择性 ^{13}C - 标记的质子化甲基的 $[\text{U}-^{14}\text{N}, 2\text{H}]$ -标记的肽以 1:1 比率混合。这些实验中所用的 NOESY 混合时间范围为 80 至 400 毫秒。

结构计算: 根据模拟退火规程[M. Nilges, 等, FEBS Lett. 229, 317-324, (1988)] 用程序 CNX[A. T. Brünger, 等, Acta Crystallogr. D54 (Pt 5), 905- 21, (1998)]计算 β -淀粉样肽 N-met 1-42 重复单位的结构。结构计算中包括了由分析 NMR 数据得到的总共 178 距离约束。另外, 基于 $\text{C}\alpha$ 和 $\text{C}\beta$ 化学位移的分析, 结构计算中包括了 β 折叠区域中的 44 ϕ 角约束 [G. Cornilescu, 等, J. Biomol. NMR 13, 289-302, (1999)]。

总之, 制备淀粉样 β 肽 N-Met 1-42 (被称为 A β 1-42)的可溶球聚体并通过 NMR 来研究。 ^{15}N - 标记的 A β 1-42 在 90% H_2O / 10% D_2O 溶液中的 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ 异核单量子关联能谱法 (HSQC)图谱(图 23A)清楚显示, 相对于溶液中未知折叠的肽的化学位移, 图谱中的交叉峰很好地被分散了并向前场高度转换。在交换到 100% D_2O 溶液中后, 一天后在 D_2O 中仍能清楚地观察到了向前场转换的胺 (图 16B), 这表明这些胺质子受保护不备溶剂化和可能的氢键化。这些结果表明, 溶液中观察到的 A β 1-42 形式是高度结构化的。

另外, 对均一 ^2H , ^{15}N , 和 ^{13}C -标记的形式的 A β 1-42 集成一套 NMR 三重共振主链实验。 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC 谱中大部分位移的交叉峰被分派为各主链酰胺。基于 $\text{C}\alpha$ 和 $\text{C}\beta$ 共振分配的化学位移, 发现两个 β 链存在 N-Met A β 1-42 的残基 17-23 和 28-39 (图 17 和 20)。通过使用不同的同位素-标记的样品, 观察到的分子内对分子间 NOE 在 ^{15}N -过滤的和 ^{15}N -编辑的 3D NOESY 实验中有差异。数据分析和结构计算表明观察到的 N-Met A β 1-42 结构包含混合的平行/反平行 β 折叠(图 s 20, 21 和 24)。这些对 N-Met A β 1-42 溶液的 NMR 研究提示, 球聚体途径中肽折叠展示出的结构不同于如 Sciarretta 等 (Biochemistry 2005, 44, 6003-6014)所述的原纤维途径的原纤维聚合结构。最小重复性链内和链间相互作用是

观察到的那些并如本文所述。

实施例 VI

开发杂交瘤细胞系的实例

用大量现有已知的技术制备单克隆抗体, 包括应用杂交瘤、重组、和噬菌体展示技术、或其组合。例如, 用杂交瘤技术制备单克隆抗体, 所述技术包括现有已知的和教导的那些, 例如参见 Harlow 等, *Antibody: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988); Hammerling, 等, 参见: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981) (所述参考文献全文那如本文参考)。本文所用的术语"单克隆抗体"不限于通过杂交瘤技术制备的抗体。术语"单克隆抗体"指衍生自单一克隆(包括任何真核、原核、或噬菌体克隆)的抗体, 而不是产生其的方法。

本文所述的用于生产一种单克隆抗体(例如, 单克隆抗体 A)的特定规程如下:

免疫小鼠: 用含 50 ug 抗原的 CFA 皮下免疫 Balb/c 和 A/J 小鼠(6-8 周大)。每个三周用含 50 ug 抗原的 Immuneasy (Qiagen)强化免疫动物, 总共进行 3 次强化。融合前 4 天, 用 10ug 抗原静脉内强化免疫小鼠。

细胞融合和杂交瘤筛选: 用标准技术免疫的动物的脾细胞与 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞以 5:1 的比率融合。融合后 7 至 10 天, 当观察到肉眼可见的克隆时, 用 ELISA 测试抗体与 A β 20-42 的 SN。通过限制稀释来按比例增加 ELISA 阳性孔中的细胞病进行克隆。

抗体同种型的确定: 用 Zymed EIA 同种分型试剂盒确定抗 A β 20-42 Mab 的同种型。

按比例增加并纯化单克隆抗体: 杂交瘤在培养基中扩大培养, 所述培养基含 5% 低 IgG 含量的胎牛血清(Hyclone)。收获上清液并浓缩。用蛋白质 A 层析并在 PBS 中透析来纯化 Mab。

血清滴度: 用 A β 20-42 免疫 10 只小鼠。所有小鼠血清转化至 1:5000-10,000 的 ELISA 滴度(1/2 Max OD 450 nm)。

用非 Met 形式的淀粉样 β 蛋白质生产本文所述的单克隆抗体 A、B 和 D。用非 Met1-42 形式的淀粉样 β 蛋白质生产本文所述的单克隆抗体 C。

实施例 VII

用 C^{14} -SDS 使 SDS 与 A β 球聚体结合

13.5 mL A β 球聚体用 0.05% SDS 浓缩成 0.62 mL。0.3 mL 该浓缩的材料用于 10 mL EconoPac DG10 柱。手工收集 0.25 mL 级分。图 X 的小图表显示出用 SDS 洗脱的游离单体区域, 其带有扩展的 y 轴。提供了肽 (实心方块) 和 SDS (实心圆) 的浓度、以及 SDS 与肽 (空心三角) 的比率。SDS 与球聚体峰 (级分 14 和 15) 上的肽的比率介于每分子肽有约 0.5 至约 1.5 分子的 SDS。层析分离显示通过进行大小排阻层析使 SDS 与 A β 肽分离了。结果如图 25 所示。

在文献中, 用放射性标记的去污剂和大小排阻层析测量蛋白质-去污剂聚集体中结合的去污剂的量是很成熟的。Tanford 和同事已经使用它研究各种蛋白质, 包括牛血清白蛋白 (Makino 等, (1973), J. Biol. Chem., 248:4926-4932)、几种在 SDS 中的蛋白质 (Tanford 等, (1974), Biochemistry, 13:2369- 2376); 并被引用作为表征去污剂溶液中的膜蛋白的常规方法 (Tanford 和 Reynolds, (1976), BBA, 457: 133- 170)。Moller 和同事也已经用该方法进行研究去污剂与膜蛋白的结合 (Moller 和 leMaire, (1993), J. Biol. Chem. 2658: 18659- 18672)。LeMaire 和同事也已经广泛使用该方法, 尤其用 Ca^{2+} -依赖性 ATP 酶 (Rivas 等, (1982), Anal. Biochem., 123:194- 200)。主要根据 Hummel 和 Dryer ((1962), BBA, 63: 530-532) 首次描述得早期研究蛋白质-配体相互作用的工作, Helenius 和 Simmons 专门修改了该方法来检测蛋白质去污剂相互作用 ((1972), J. Biol. Chem., 247: 3656-3661))。去污剂与蛋白质在大小排阻层析柱上的共迁移证明了蛋白质和去污剂间的物理相互作用。根据 Helenius 和 Simmons (同前), "结合蛋白质的去污剂的量能通过蛋白质共洗脱的放射活性的去污剂的量来测量。"

该技术部分基于以下需求, 即层析凝胶要有效地排除蛋白质而包括配体 (在球聚体的情况下是 SDS) (Andreu, (1985), Methods in Enzymology, 117: 346-354)。在这些实验中, 我们在 SDS 的 CMC (临界胶态浓度) 以下工作, 由此去污剂分子溶解成单体。作为单体, 它们进入脱盐树脂 (如所用的 DG10) 的孔中, 而 A β 球聚体将被排除掉。因此, 树脂能有效地从 A β 球聚体和任何结合它们的 SDS 中分离游离的 SDS。

发现与 A β 球聚体共迁移的 SDS 被描述成是结合的。在经典使用该方法的情况下，大小排阻柱在背景水平的 SDS 中平衡。然后观察 SDS 与蛋白质的结合，如果伴随有蛋白质洗脱，则去污剂水平会提升高于该背景水平。

在本文中，在缓冲液中缺失任何竞争性去污剂的情况下，通过 SDS 结合来进行检测。该方法提供了结合 SDS 的更严紧的探针，因为没有现成提供的游离 SDS 来代替层析期间任何排除出 A β 球聚体的那些。可是，它导致洗脱球聚体峰中肽与 SDS 的表观化学计量比率改变，因为层析时插入(凝胶层析基质)的 SDS 与洗脱的 A β 球聚体不完全分离(因为它结合于球聚体)。

实施例 VIII

比较球聚体和原纤维形式的淀粉样 β 肽的主链酰胺保护作用

球聚体的主链酰胺交换实验:

水性缓冲液中的球聚体样品在液氮瓶中冷冻并冻干过夜。这些冻干的样品中的一些储存于 -70 摄氏度并用作参照样品(不溶于 D₂O 中)。然后将剩下的冻干的样品溶于 D₂O 中。在 4 摄氏度下交换性 H/D 交换发生的不同时期之后，将这些样品在液氮瓶中冷冻以终止 H/D 交换并冻干。然后，在用含 0.07% 氘化的二氯乙酸 (Cambridge 同位素同位素实验室公司, Andover, MA) 的 480 μ l DMSO-d₆ (Cambridge 同位素实验室公司 Andover, MA) 溶解这些交换了的样品以及未交换的(参照)样品之后，在 3 分钟内收集 1 维和 2 维 ¹⁵N/¹H HSQC 谱。在酸化的 DMSO-d₆ 中溶解球聚体之后，多聚球聚体被转化成单体。通过集成一套使用 [U-¹⁵N, ¹³C]-标记的样品的主链实验(T. Yamazaki 等, (1994) J. Am. Chem. Soc. 116, 11655-11666)，来分派在酸化的 DMSO-d₆ 溶剂中的该单体形式的淀粉样 β 肽的 ¹⁵N/¹H HSQC 谱的值。根据这些分派值，分析淀粉样 β 肽的各残基的峰强度并得到它们的主链酰胺保护因数。保护因数被定义为 D₂O 中交换后观察到的样品交叉峰强度与没有进行 D₂O 交换的样品强度的比率。这些交换实验中用的单体浓度为 0.5 mM。基于 1D NMR 谱的脂肪族 CH₃ 区域强度来校准保护因数计算中所用的峰强度。

前球聚体 (早期支被步骤中的肽) 主链酰胺交换实验: 在含 ~1.5% SDS-d₂₅ 和 1x 磷酸缓冲盐液 (pH 7.4) (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA)

的缓冲液中冻干 ^{15}N -标记的样品之后,然后将干燥的样品溶于 D_2O 中并收集一系列 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC 谱。在这些实验中检测缓慢交换的胺。

用 Met-淀粉样 β 进行实验,但是为了方便与文献中的数据(参见下文)进行图解比较, N-末端 Met 残基排除出图中的栏目中(参见图 26)。保护因数被定义为 D_2O 中交换后观察到的样品 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC 谱中交叉峰强度与没有进行 D_2O 交换的样品强度的比率。对于球聚体,收集主链酰胺保护实验的重复数据集并用于报道它们平均和标准的偏差。排除掉球聚体中的残基 D1、D7、S8、和 H14,因为它们在当前实验中所用的 DMSO/酸性溶剂中显示出固有的快速回复交换率。由于残基对 (E11 和 D23)、(V18 和 V36)、和(I32 和 I41)(如 B 栏中的星号所示)的谱线重叠,仅能报道这些主链酰胺对的平均保护因数。结果,通过评估各残基展示的最高和最低的保护因数(假设最大保护因数为 80%),并通过使用这些界限的标准差,可得到这些重叠残基所示的不确定性。B 栏所示的球聚体的胺保护是针对在 D_2O 中交换了 5 天的样品。在 D_2O 中温育 20 分钟(黑条)和 120 分钟(亮灰条)后,根据 Olofsson 等 ((2006), JBC 281, 477-483) 得出 C 栏中的原纤维主链酰胺保护。另外, A 栏显示了前球聚体的主链分配和胺交换数据。用+和-号分别表示分配的和未分配的残基。如序列下实心、半实心、和空心圆分别所示,有早期制备阶段(前球聚体)肽特征的主链酰胺显示出缓慢、中等、和快速的交换率。与观察到中心和 C-末端残基(C 栏)的胺交换率缓慢的纤维形式相反,缓慢的交换率主要在前球聚体(A 栏)和球聚体(B 栏)中的 C-末端 12 个残基处被观察到。因此,这个比较证实了前前球聚体(A 栏)和球聚体(B 栏)形式的淀粉样 β 肽展现出非常相似的胺交换率,这与采用相似核心结构的两种形式一致。相反,前球聚体和球聚体形式都展示出不显著同于纤维形式肽的中心区域的 NH/ND 交换率,这提示它们具有不同于纤维形式的结构核心。

保藏的抗原的命名

保藏的 A- β 克隆:

蛋白质形式	D#	ATCC 保藏的名称
- β (1-39)]	880	PTA-7245
- β (1-40)]	879	PTA-7246
- β (1-41)]	878	PTA-7243
- β (1-42)]	718	PTA-7244
- β (1-43)]	881	PTA-7248
- β (12-42)]	1065	PTA-7250
- β (1-42), N27A]	1084	PTA-7247
- β (1-42), A21G]	1088	PTA-7249
- β (1-42), E22G]	1089	PTA-7251

"D"数字代表雅培实验室的内部命名。

以上保藏根据布达佩斯条约的条款进行,并于2005年12月1日由美国典型微生物保藏中心(10801 University Boulevard, Manassas Virginia 20110-2209)接受。

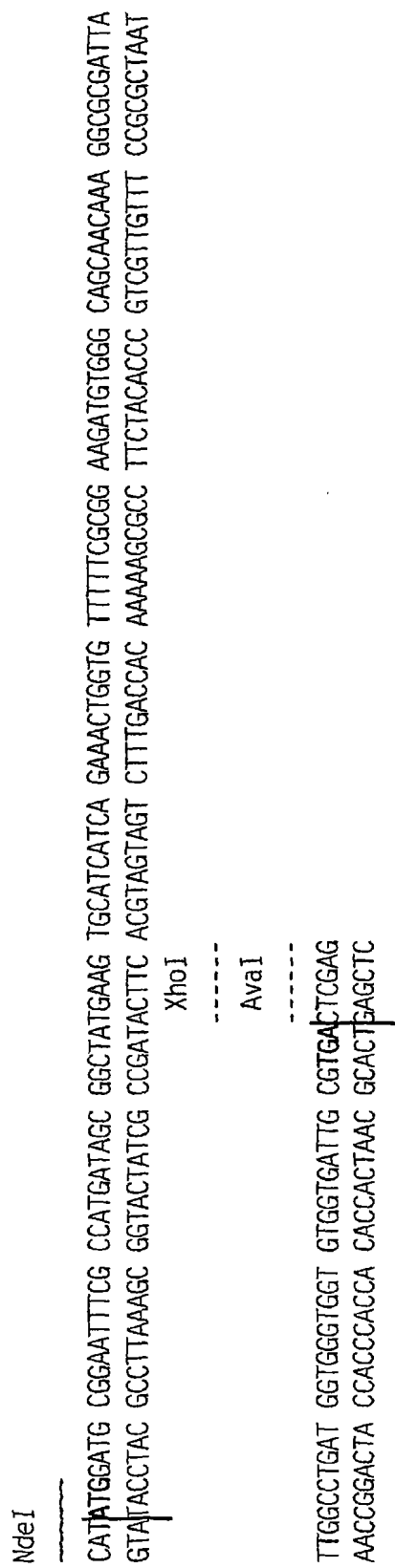


图 1A

1 DAEFRHDSG YEVHHQKLVF FAEDVGSNKG AIIGLMVGGV VIA*

图 1B

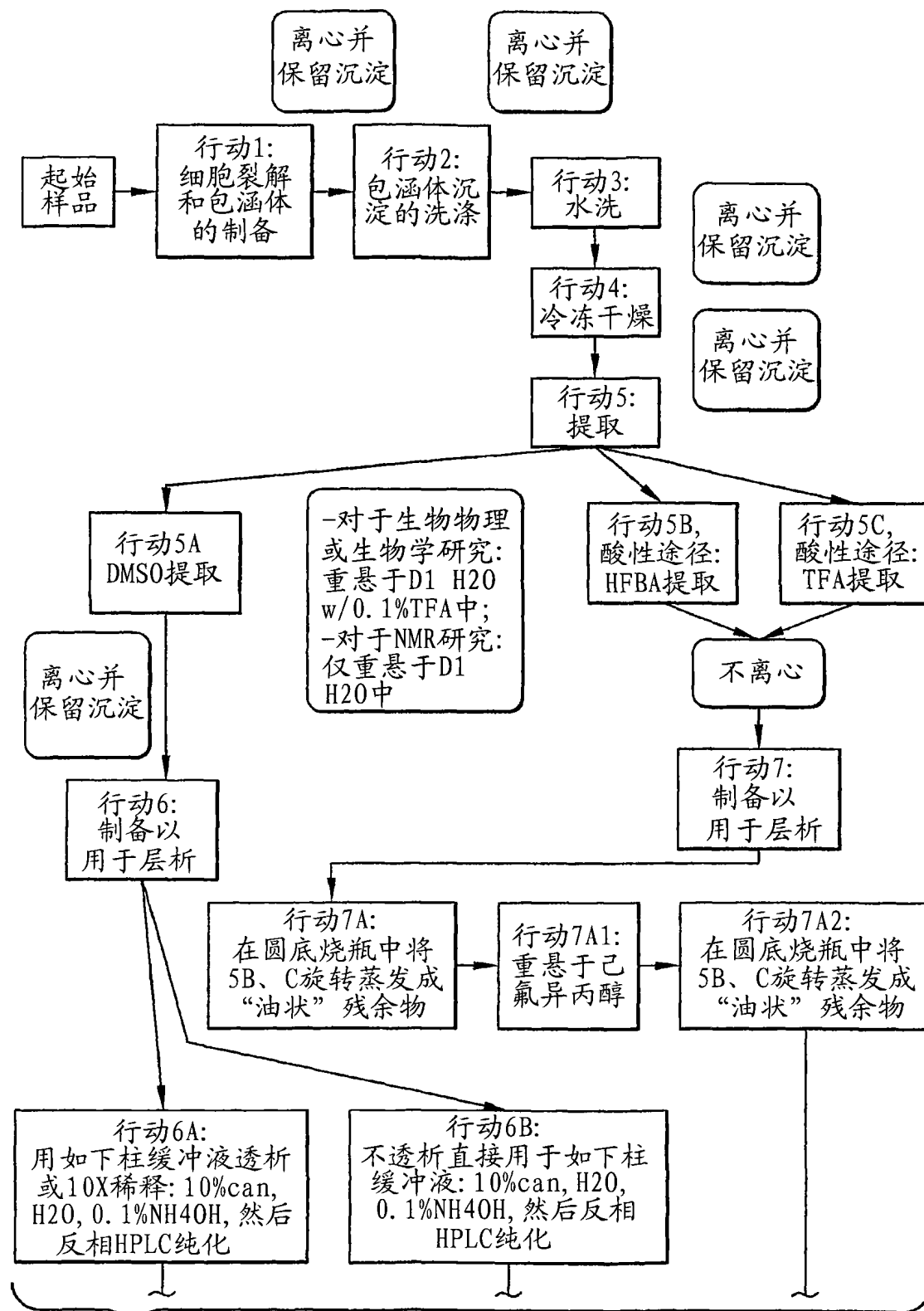
全长淀粉样蛋白序列

1-39: MDAEFRHDSG YEVHHQKLVF FAEDVGSNKG AIIGLMVGGV
1-40: MDAEFRHDSG YEVHHQKLVF FAEDVGSNKG AIIGLMVGGV V
1-41: MDAEFRHDSG YEVHHQKLVF FAEDVGSNKG AIIGLMVGGV VI
1-42: MDAEFRHDSG YEVHHQKLVF FAEDVGSNKG AIIGLMVGGV VIA
1-43: MDAEFRHDSG YEVHHQKLVF FAEDVGSNKG AIIGLMVGGV VIAT

由嗜热菌蛋白酶裂解截短的淀粉样蛋白序列

20-42: FAEDVGSNKG AIIGLMVGGV VIA

图 2



续图3B

图 3A

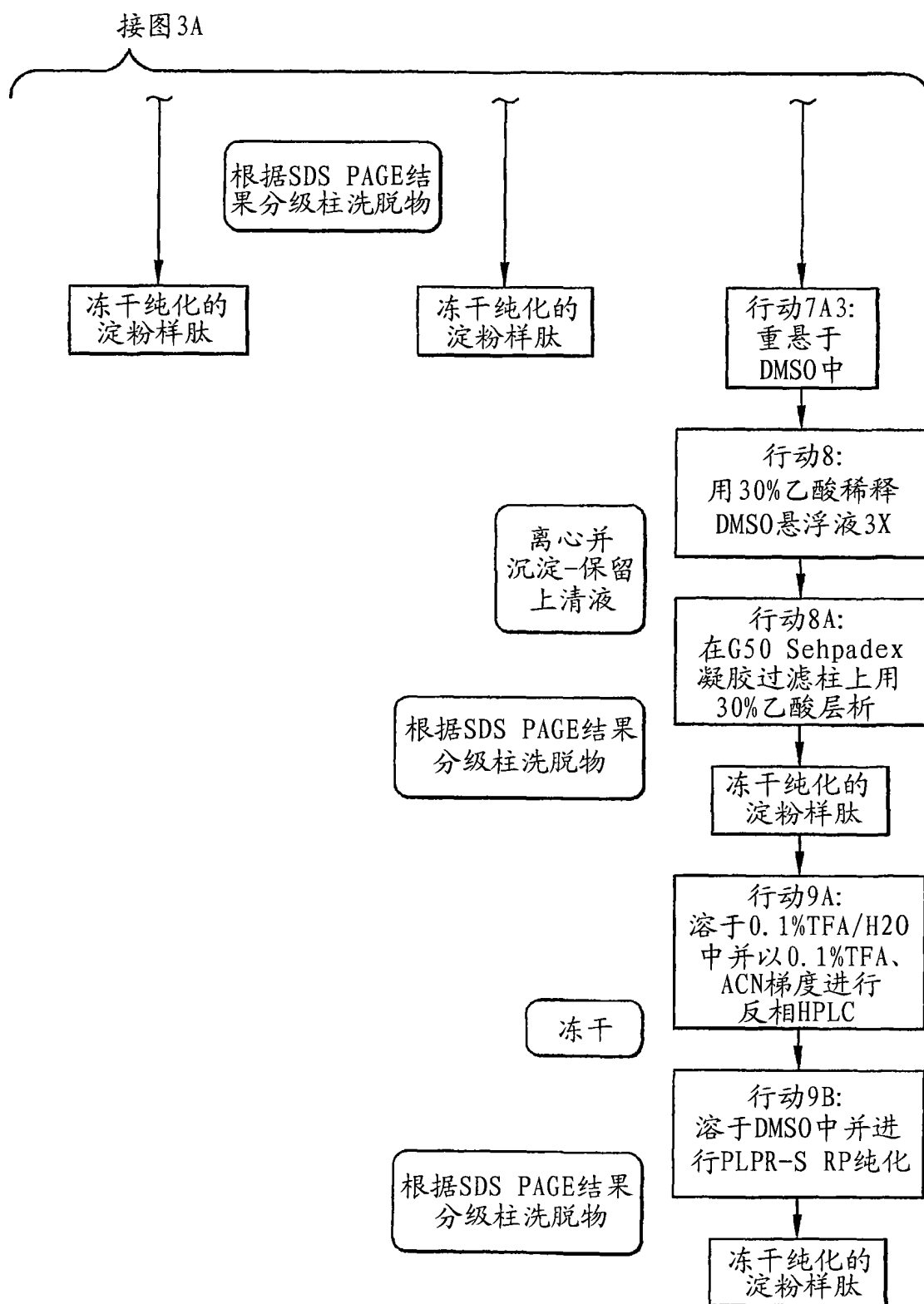


图 3B

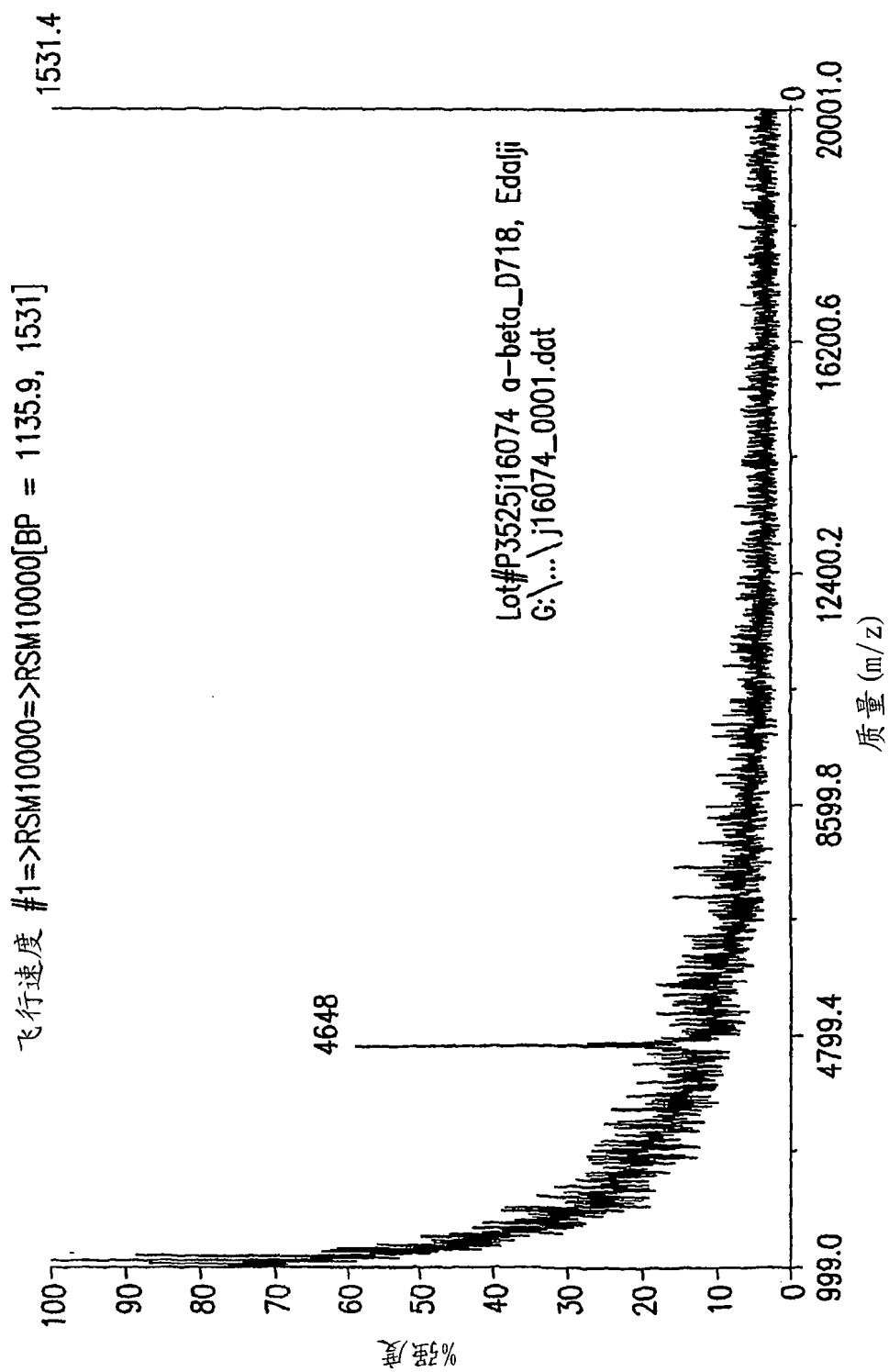


图 4

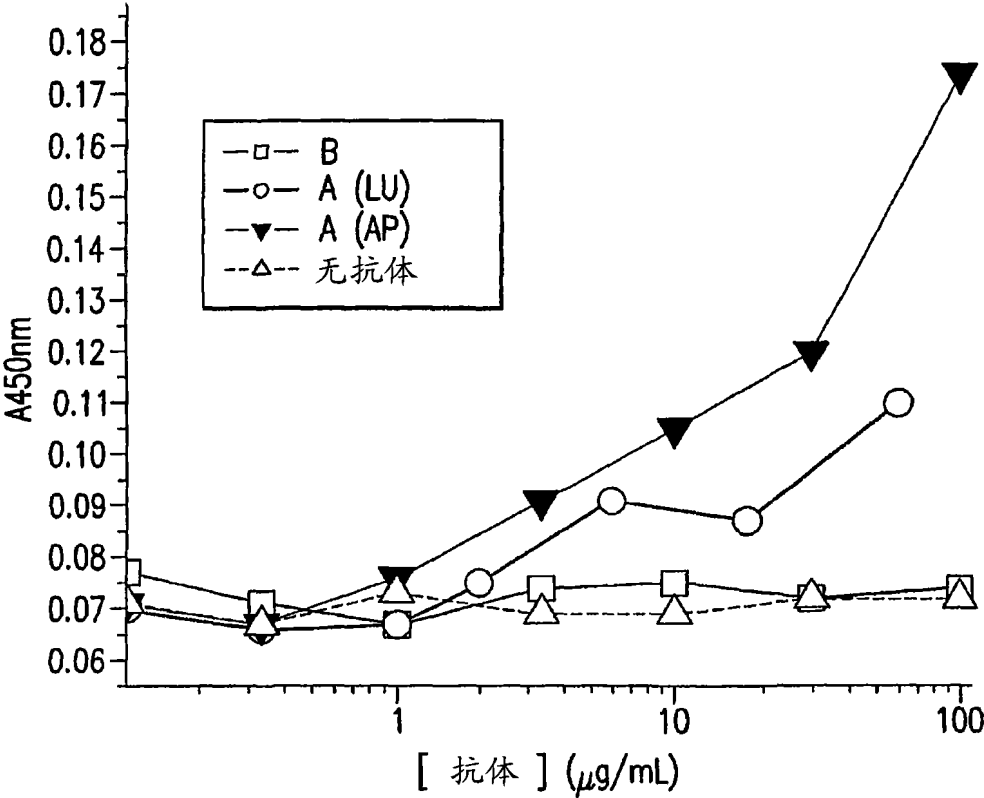


图 5

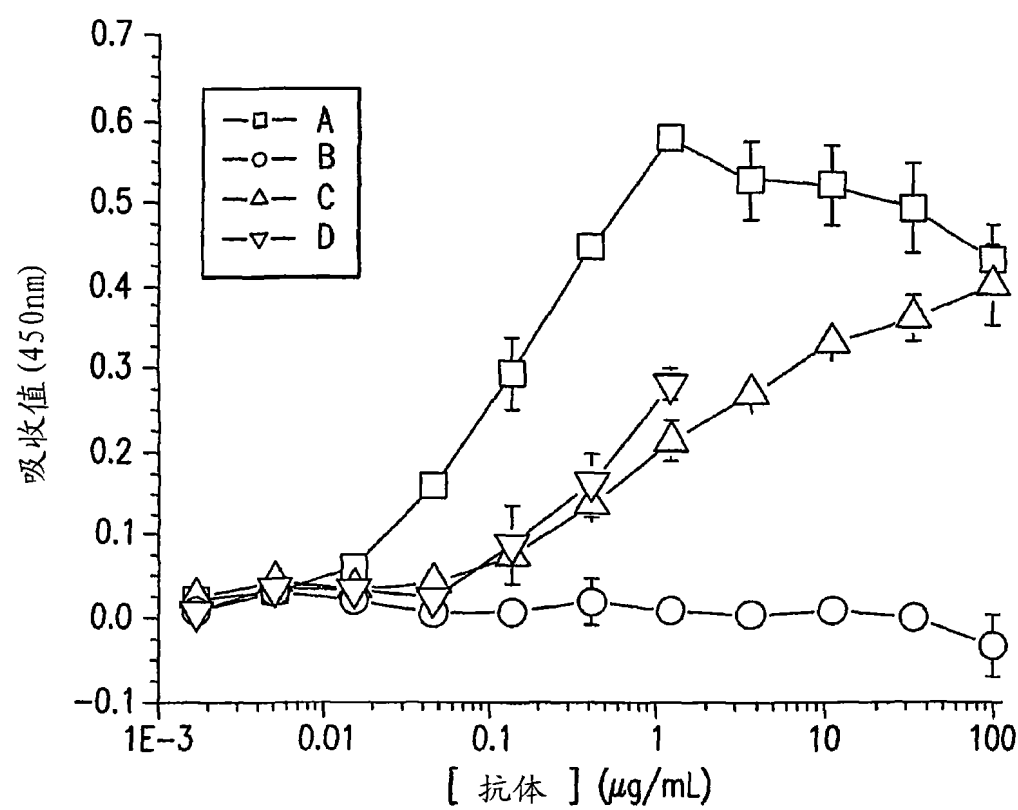


图 6

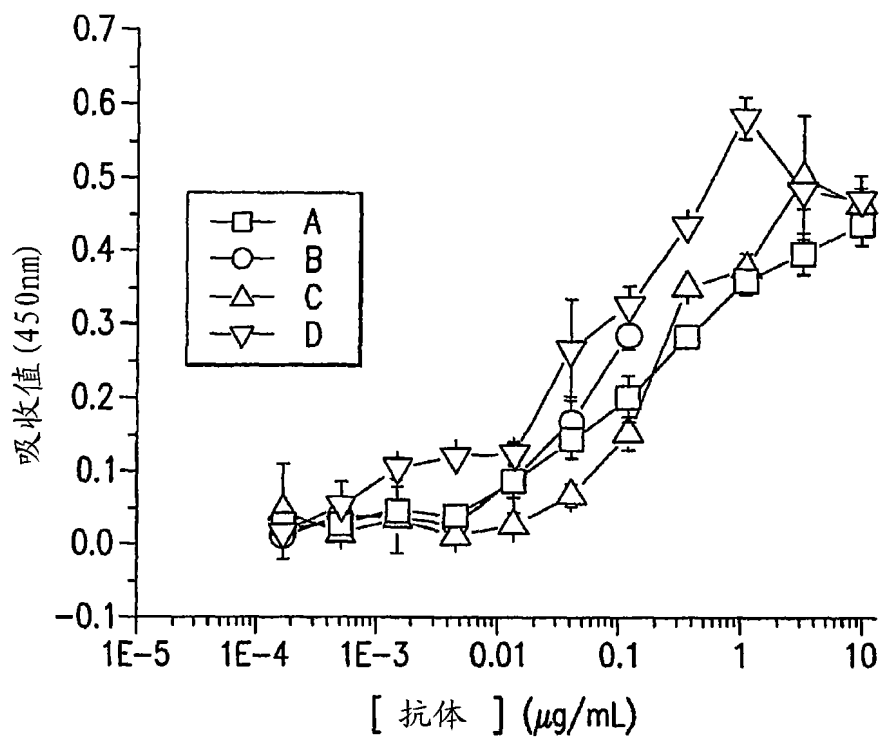


图 7

将冻干的肽溶于HFIP

- 冻干去除HFIP
- 溶于DMSO

用PBS稀释

- 加入SDS至浓度为0.2%, 于37摄氏度温育几个小时

用水稀释4X

- 最终SDS=0.05%, 于37摄氏度温育过夜

透析去除SDS

图 8

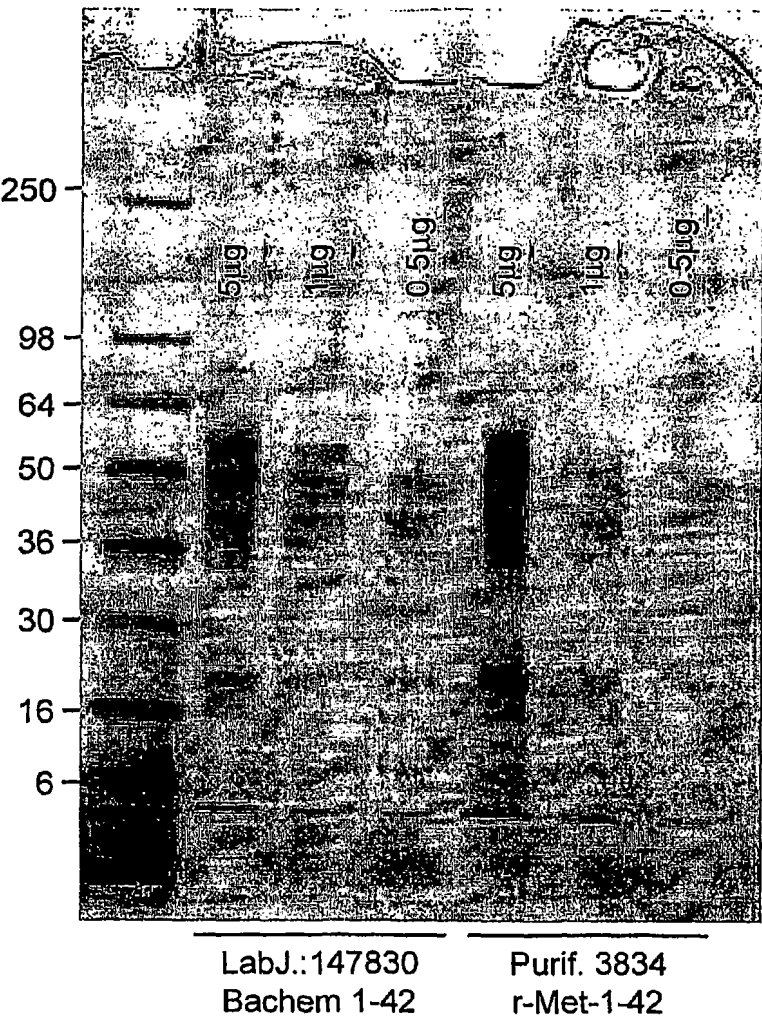


图 9

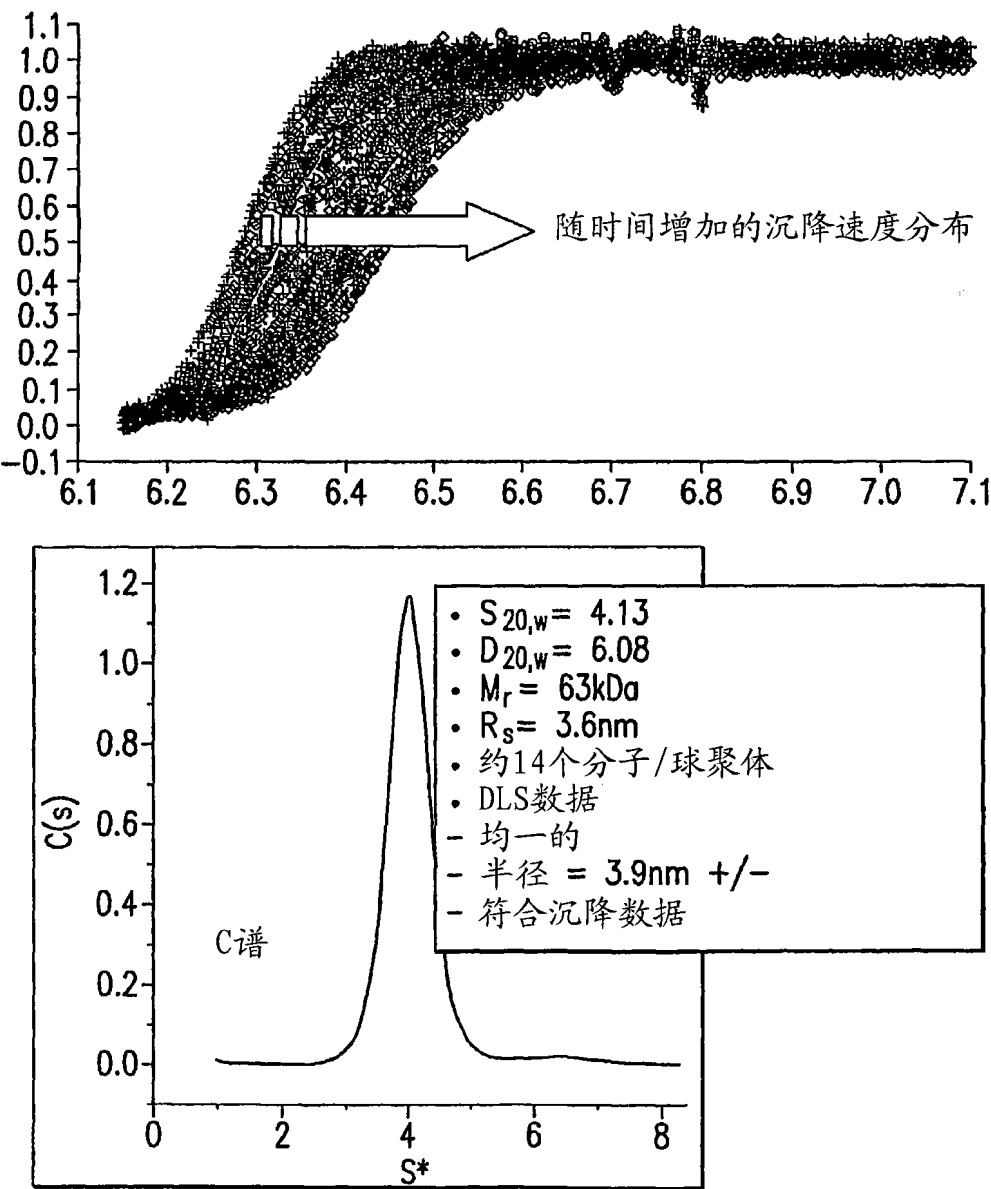


图 10

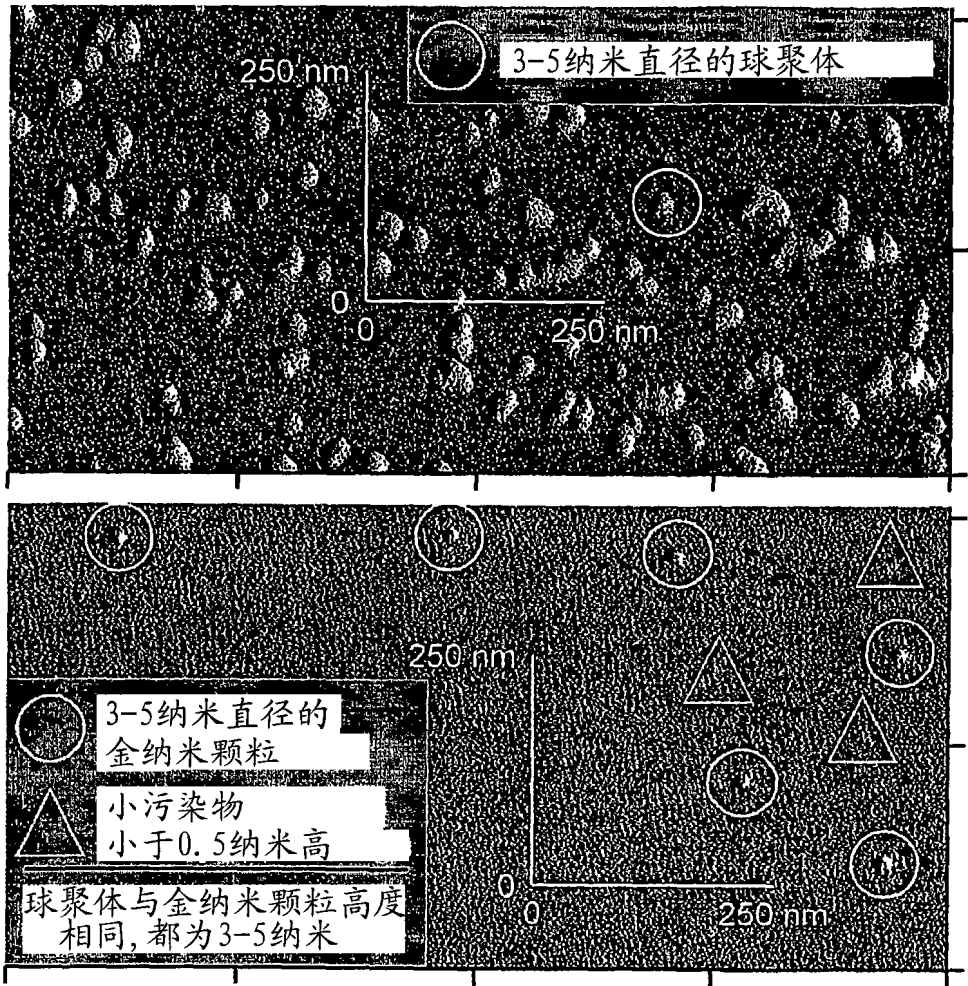


图 11

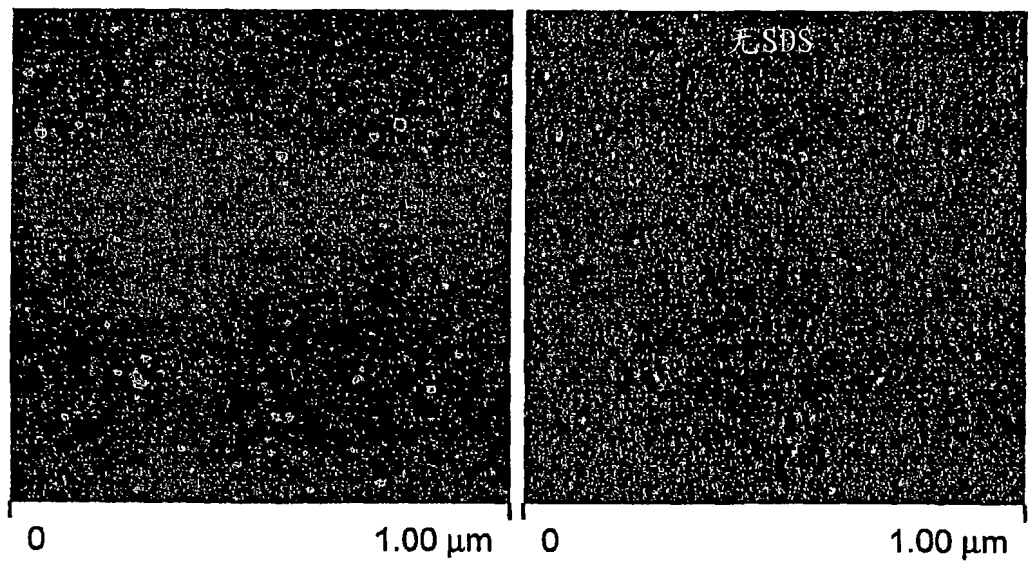


图 12

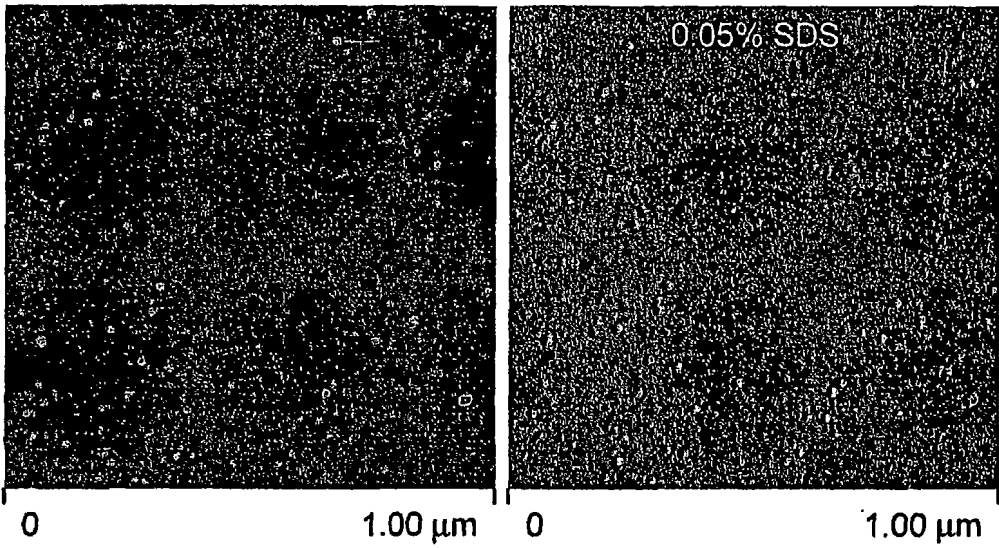


图 13

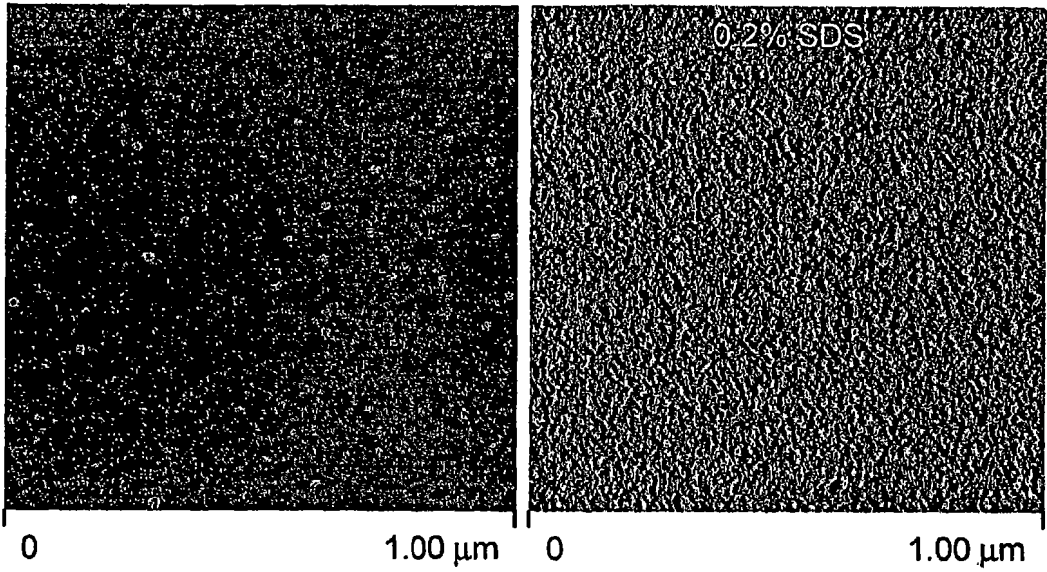


图 14

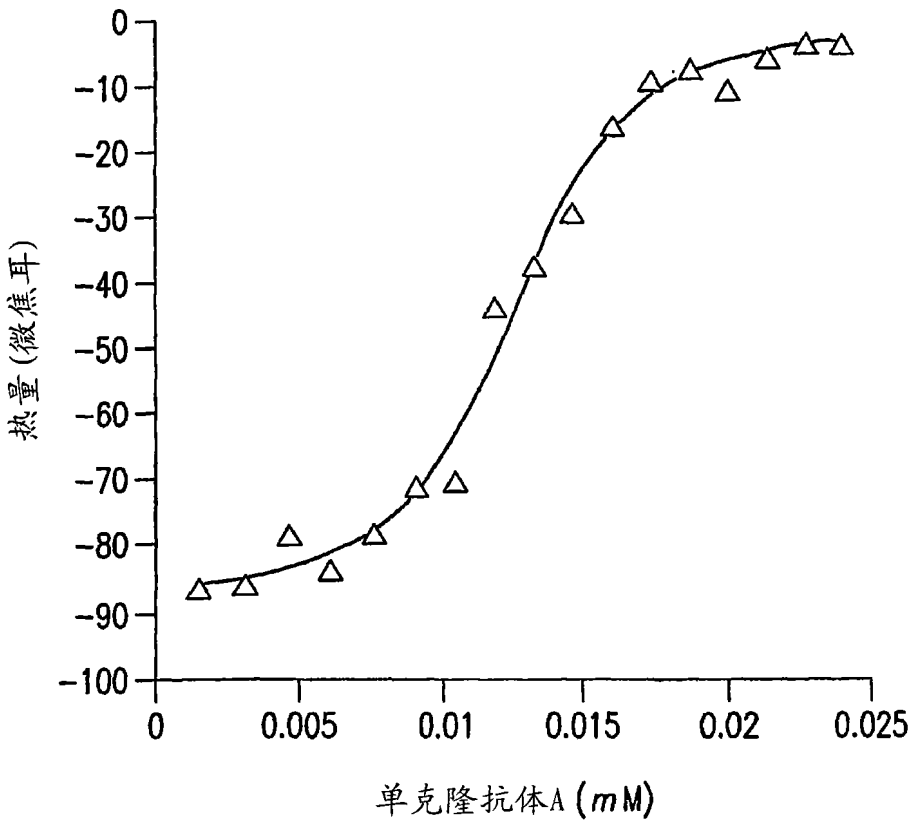


图 15

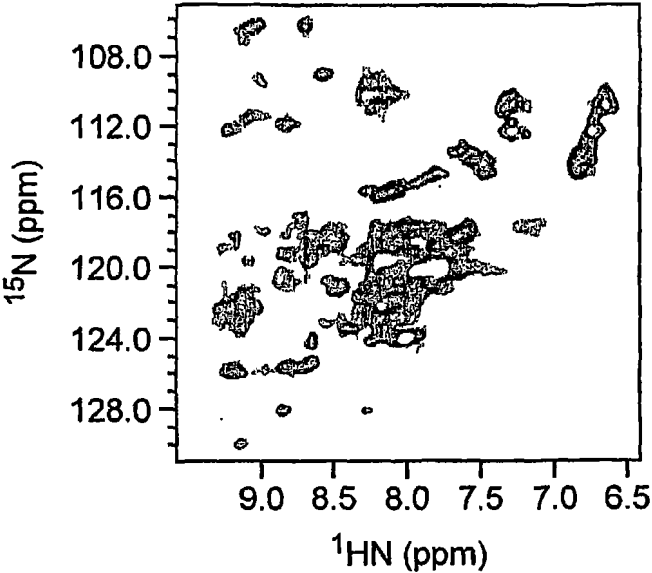


图 16A

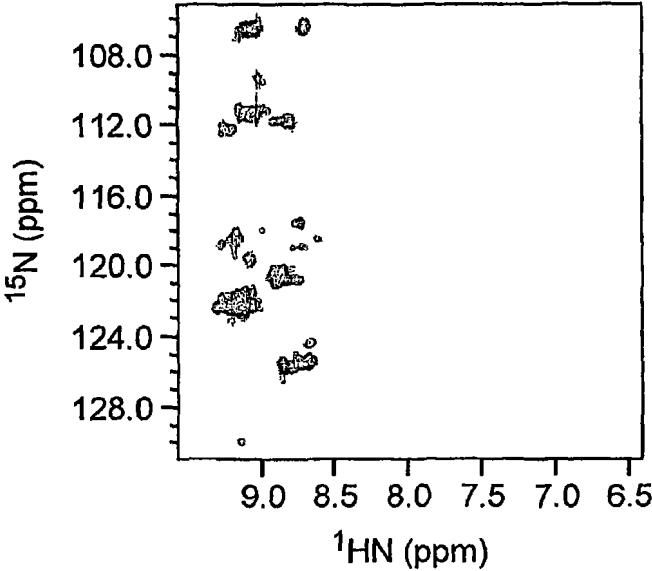


图 16B



图 17A

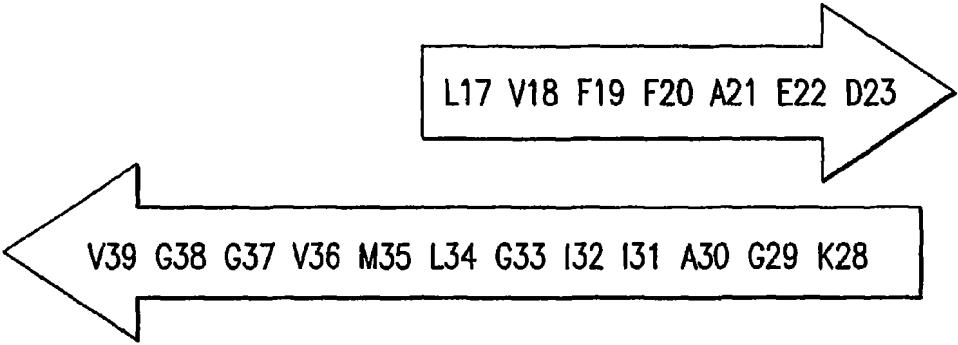


图 17B

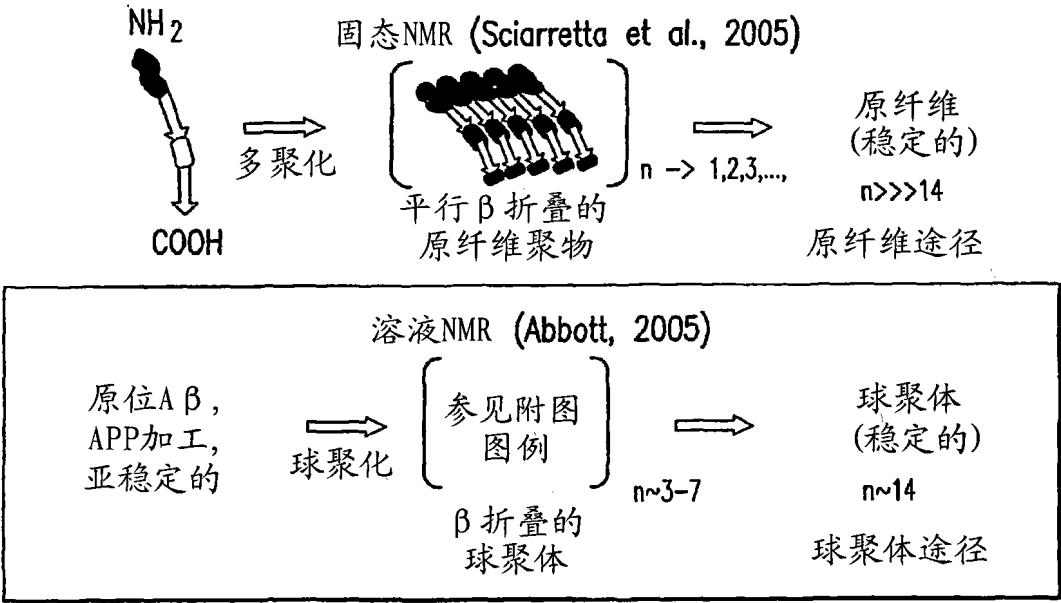


图 18

β 折叠的球聚体如图20所示。

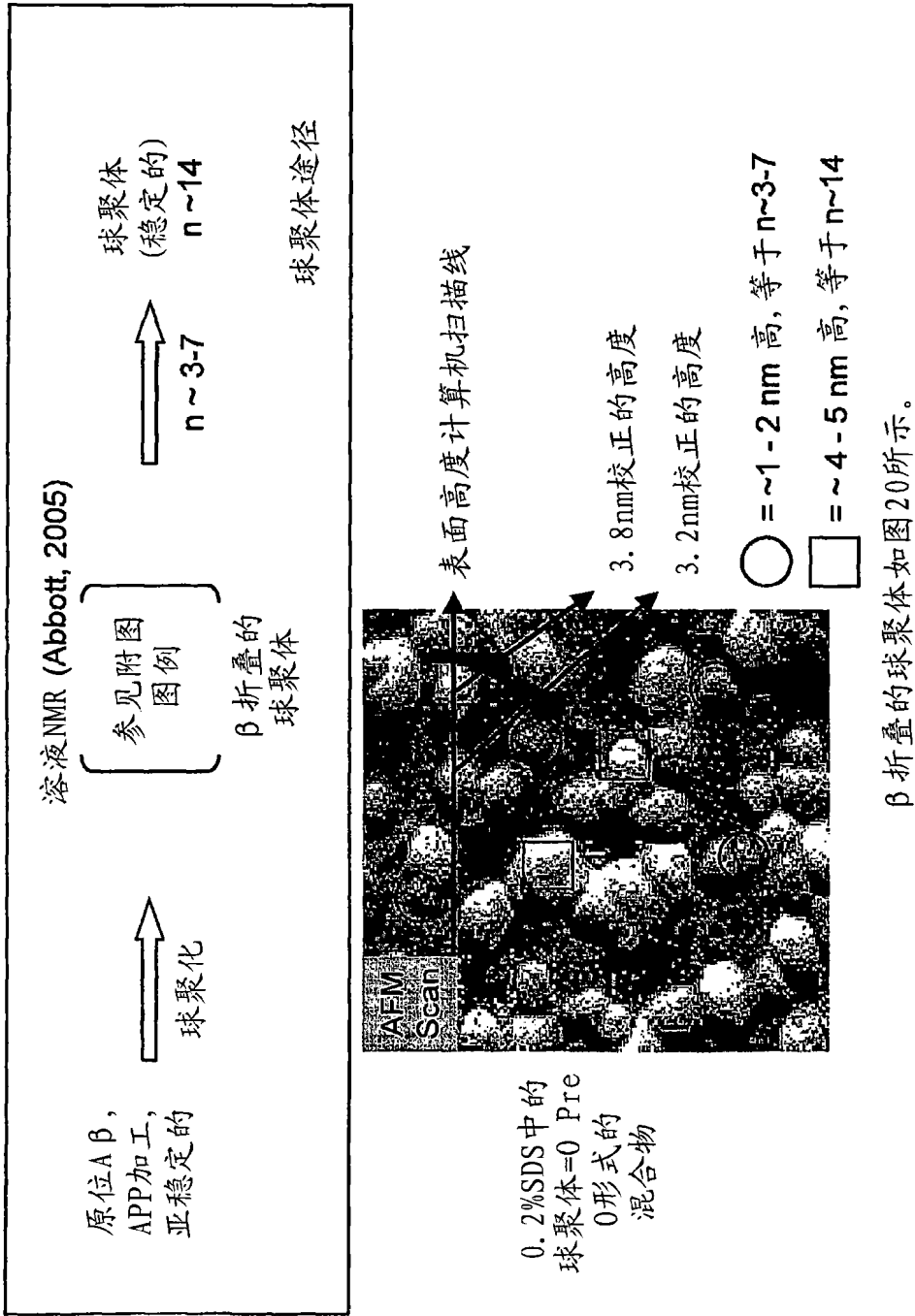


图 19

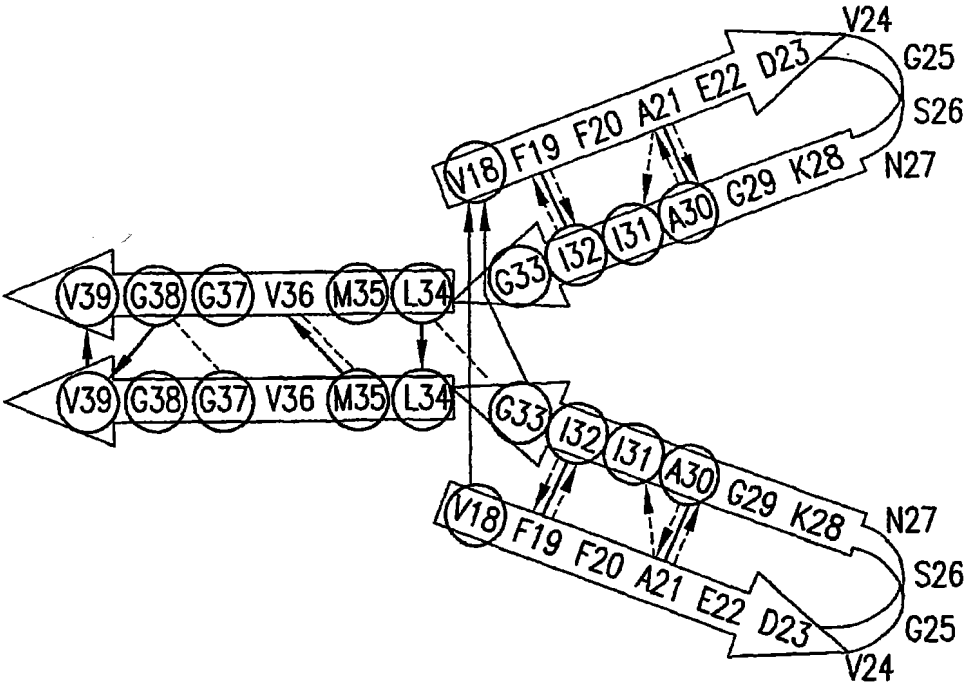


图 20

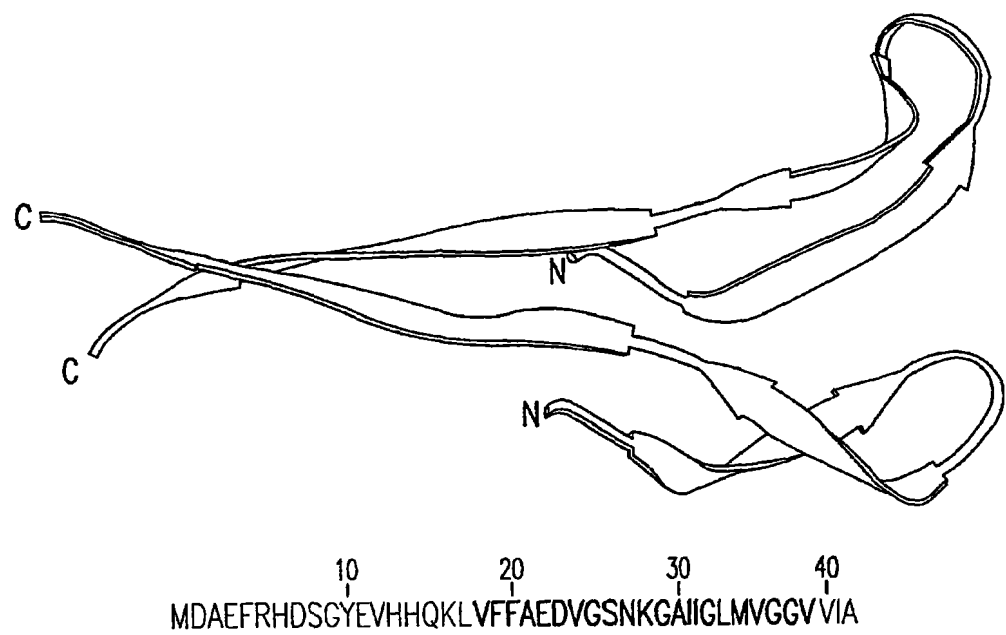


图 21

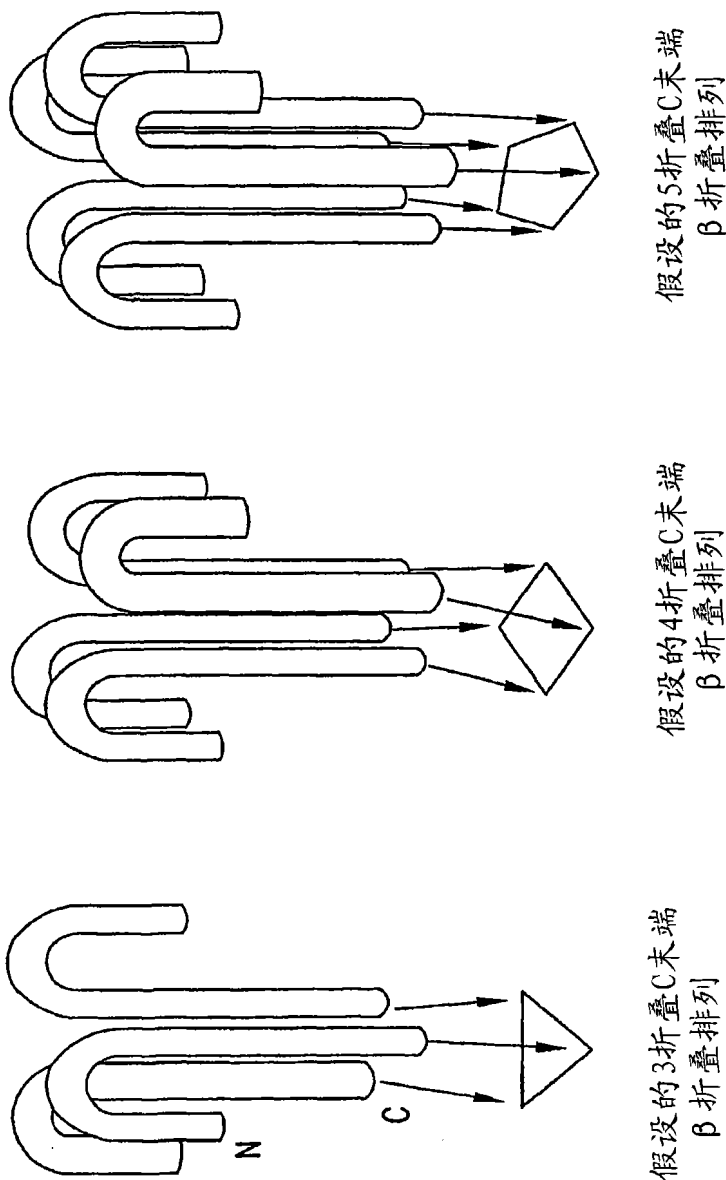


图 22

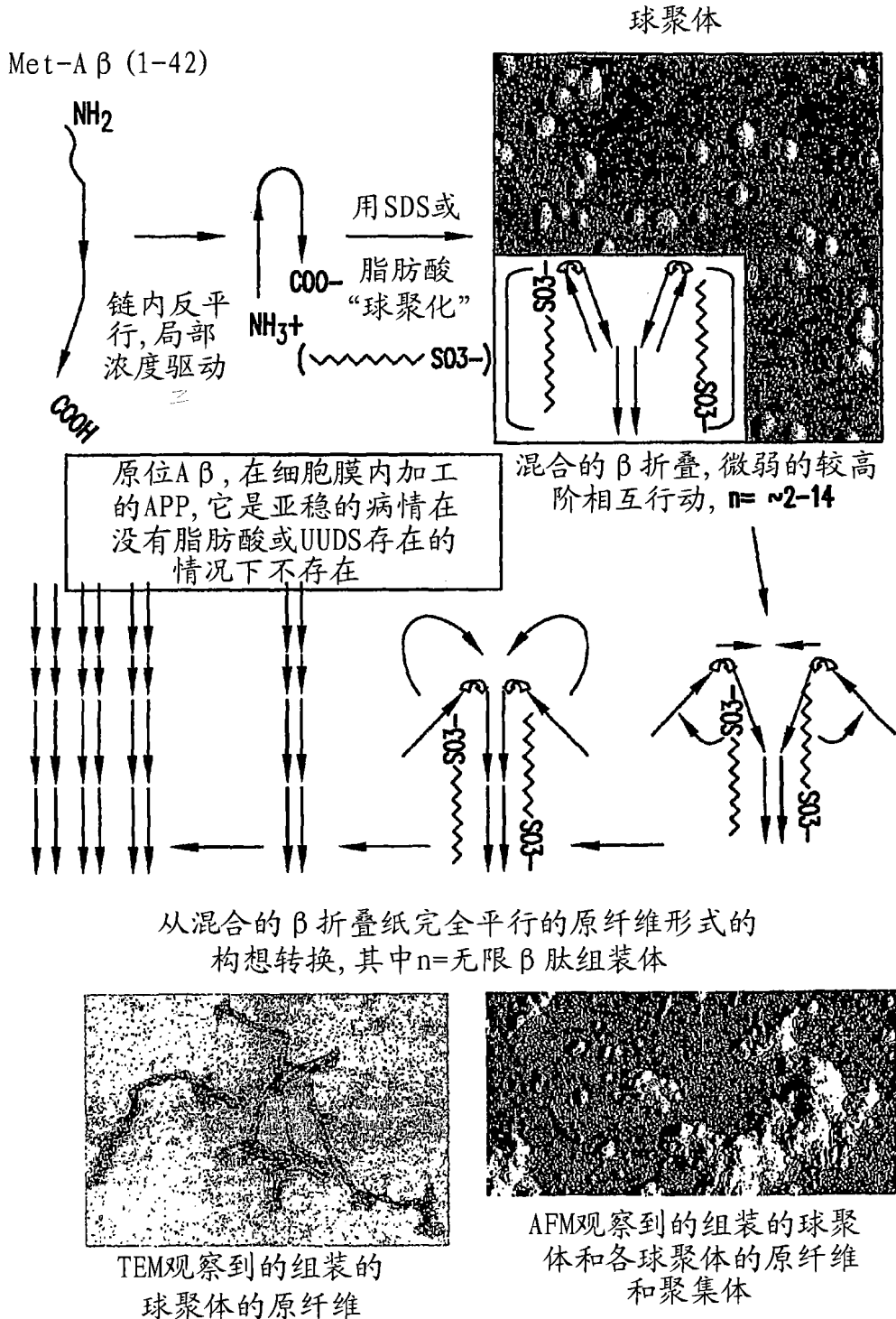


图 23

ATOM	1	HA	GLN	15	89.898	71.968	50.323	1.00	0.00
ATOM	2	CB	GLN	15	91.447	73.251	51.060	1.00	0.00
ATOM	3	HB1	GLN	15	91.396	73.714	50.085	1.00	0.00
ATOM	4	HB2	GLN	15	92.314	72.609	51.099	1.00	0.00
ATOM	5	CG	GLN	15	91.618	74.347	52.099	1.00	0.00
ATOM	6	HG1	GLN	15	90.822	74.266	52.824	1.00	0.00
ATOM	7	HG2	GLN	15	91.558	75.306	51.606	1.00	0.00
ATOM	8	CD	GLN	15	92.946	74.259	52.825	1.00	0.00
ATOM	9	OE1	GLN	15	94.010	74.338	52.210	1.00	0.00
ATOM	10	NE2	GLN	15	92.891	74.095	54.142	1.00	0.00
ATOM	11	HE21	GLN	15	92.008	74.040	54.564	1.00	0.00
ATOM	12	HE22	GLN	15	93.734	74.035	54.636	1.00	0.00
ATOM	13	C	GLN	15	90.490	71.273	52.251	1.00	0.00
ATOM	14	O	GLN	15	91.429	70.500	52.057	1.00	0.00
ATOM	15	N	GLN	15	89.074	73.248	51.758	1.00	0.00
ATOM	16	HT1	GLN	15	88.836	72.993	52.738	1.00	0.00
ATOM	17	HT2	GLN	15	88.234	73.111	51.162	1.00	0.00
ATOM	18	HT3	GLN	15	89.347	74.251	51.729	1.00	0.00
ATOM	19	CA	GLN	15	90.192	72.400	51.269	1.00	0.00
ATOM	20	N	LYS	16	89.686	71.184	53.305	1.00	0.00
ATOM	21	HN	LYS	16	88.955	71.829	53.404	1.00	0.00
ATOM	22	CA	LYS	16	89.863	70.150	54.317	1.00	0.00
ATOM	23	HA	LYS	16	90.871	69.770	54.230	1.00	0.00
ATOM	24	CB	LYS	16	89.673	70.738	55.716	1.00	0.00
ATOM	25	HB1	LYS	16	90.466	70.381	56.356	1.00	0.00
ATOM	26	HB2	LYS	16	88.725	70.401	56.110	1.00	0.00
ATOM	27	CG	LYS	16	89.687	72.258	55.744	1.00	0.00
ATOM	28	HG1	LYS	16	88.738	72.623	55.379	1.00	0.00
ATOM	29	HG2	LYS	16	90.481	72.613	55.105	1.00	0.00
ATOM	30	CD	LYS	16	89.913	72.788	57.151	1.00	0.00
ATOM	31	HD1	LYS	16	89.988	73.865	57.111	1.00	0.00
ATOM	32	HD2	LYS	16	90.833	72.375	57.537	1.00	0.00
ATOM	33	CE	LYS	16	88.773	72.405	58.080	1.00	0.00
ATOM	34	HE1	LYS	16	88.751	73.099	58.907	1.00	0.00
ATOM	35	HE2	LYS	16	88.948	71.407	58.453	1.00	0.00
ATOM	36	NZ	LYS	16	87.456	72.437	57.386	1.00	0.00
ATOM	37	HZ1	LYS	16	86.702	72.677	58.061	1.00	0.00
ATOM	38	HZ2	LYS	16	87.249	71.508	56.968	1.00	0.00
ATOM	39	HZ3	LYS	16	87.468	73.150	56.629	1.00	0.00
ATOM	40	C	LYS	16	88.885	69.001	54.099	1.00	0.00

图 24A

ATOM	41	O	LYS	16	88.409	68.781	52.985	1.00	0.00
ATOM	42	N	LEU	17	88.588	68.271	55.169	1.00	0.00
ATOM	43	HN	LEU	17	88.999	68.494	56.029	1.00	0.00
ATOM	44	CA	LEU	17	87.665	67.144	55.092	1.00	0.00
ATOM	45	HA	LEU	17	87.232	67.138	54.103	1.00	0.00
ATOM	46	CB	LEU	17	88.413	65.829	55.316	1.00	0.00
ATOM	47	HB1	LEU	17	87.847	65.231	56.014	1.00	0.00
ATOM	48	HB2	LEU	17	89.373	66.055	55.757	1.00	0.00
ATOM	49	CG	LEU	17	88.647	64.996	54.054	1.00	0.00
ATOM	50	HG	LEU	17	89.097	64.054	54.330	1.00	0.00
ATOM	51	CD1	LEU	17	87.327	64.701	53.358	1.00	0.00
ATOM	52	HD11	LEU	17	86.512	64.859	54.049	1.00	0.00
ATOM	53	HD12	LEU	17	87.320	63.675	53.020	1.00	0.00
ATOM	54	HD13	LEU	17	87.213	65.360	52.510	1.00	0.00
ATOM	55	CD2	LEU	17	89.599	65.716	53.112	1.00	0.00
ATOM	56	HD21	LEU	17	90.565	65.817	53.584	1.00	0.00
ATOM	57	HD22	LEU	17	89.207	66.696	52.882	1.00	0.00
ATOM	58	HD23	LEU	17	89.702	65.147	52.200	1.00	0.00
ATOM	59	C	LEU	17	86.545	67.288	56.118	1.00	0.00
ATOM	60	O	LEU	17	86.333	68.366	56.672	1.00	0.00
ATOM	61	N	VAL	18	85.831	66.194	56.365	1.00	0.00
ATOM	62	HN	VAL	18	86.049	65.364	55.892	1.00	0.00
ATOM	63	CA	VAL	18	84.733	66.201	57.323	1.00	0.00
ATOM	64	HA	VAL	18	84.713	67.170	57.801	1.00	0.00
ATOM	65	CB	VAL	18	83.378	65.980	56.625	1.00	0.00
ATOM	66	HB	VAL	18	82.813	65.261	57.199	1.00	0.00
ATOM	67	CG1	VAL	18	82.584	67.276	56.574	1.00	0.00
ATOM	68	HG11	VAL	18	82.422	67.638	57.578	1.00	0.00
ATOM	69	HG12	VAL	18	81.632	67.097	56.097	1.00	0.00
ATOM	70	HG13	VAL	18	83.136	68.014	56.010	1.00	0.00
ATOM	71	CG2	VAL	18	83.583	65.417	55.226	1.00	0.00
ATOM	72	HG21	VAL	18	83.752	64.352	55.288	1.00	0.00
ATOM	73	HG22	VAL	18	84.439	65.891	54.769	1.00	0.00
ATOM	74	HG23	VAL	18	82.704	65.608	54.629	1.00	0.00
ATOM	75	C	VAL	18	84.922	65.128	58.390	1.00	0.00
ATOM	76	O	VAL	18	84.084	64.239	58.545	1.00	0.00
ATOM	77	N	PHE	19	86.027	65.216	59.124	1.00	0.00
ATOM	78	HN	PHE	19	86.660	65.943	58.949	1.00	0.00
ATOM	79	CA	PHE	19	86.321	64.254	60.179	1.00	0.00
ATOM	80	HA	PHE	19	85.726	63.371	59.998	1.00	0.00

图 24B

ATOM	81	CB	PHE	19	87.802	63.870	60.151	1.00	0.00
ATOM	82	HB1	PHE	19	88.398	64.769	60.107	1.00	0.00
ATOM	83	HB2	PHE	19	87.995	63.273	59.273	1.00	0.00
ATOM	84	CG	PHE	19	88.237	63.079	61.353	1.00	0.00
ATOM	85	CD1	PHE	19	89.266	63.532	62.165	1.00	0.00
ATOM	86	HD1	PHE	19	89.758	64.464	61.930	1.00	0.00
ATOM	87	CD2	PHE	19	87.616	61.882	61.669	1.00	0.00
ATOM	88	HD2	PHE	19	86.814	61.520	61.043	1.00	0.00
ATOM	89	CE1	PHE	19	89.666	62.804	63.270	1.00	0.00
ATOM	90	HE1	PHE	19	90.468	63.166	63.895	1.00	0.00
ATOM	91	CE2	PHE	19	88.012	61.150	62.773	1.00	0.00
ATOM	92	HE2	PHE	19	87.520	60.218	63.008	1.00	0.00
ATOM	93	CZ	PHE	19	89.038	61.611	63.574	1.00	0.00
ATOM	94	HZ	PHE	19	89.348	61.041	64.437	1.00	0.00
ATOM	95	C	PHE	19	85.958	64.821	61.547	1.00	0.00
ATOM	96	O	PHE	19	86.705	65.612	62.122	1.00	0.00
ATOM	97	N	PHE	20	84.805	64.409	62.064	1.00	0.00
ATOM	98	HN	PHE	20	84.254	63.777	61.558	1.00	0.00
ATOM	99	CA	PHE	20	84.339	64.876	63.364	1.00	0.00
ATOM	100	HA	PHE	20	84.872	65.785	63.601	1.00	0.00
ATOM	101	CB	PHE	20	82.840	65.177	63.314	1.00	0.00
ATOM	102	HB1	PHE	20	82.360	64.466	62.658	1.00	0.00
ATOM	103	HB2	PHE	20	82.694	66.174	62.924	1.00	0.00
ATOM	104	CG	PHE	20	82.166	65.103	64.654	1.00	0.00
ATOM	105	CD1	PHE	20	81.305	64.059	64.957	1.00	0.00
ATOM	106	HD1	PHE	20	81.120	63.292	64.219	1.00	0.00
ATOM	107	CD2	PHE	20	82.393	66.078	65.613	1.00	0.00
ATOM	108	HD2	PHE	20	83.061	66.896	65.388	1.00	0.00
ATOM	109	CE1	PHE	20	80.684	63.990	66.189	1.00	0.00
ATOM	110	HE1	PHE	20	80.015	63.171	66.413	1.00	0.00
ATOM	111	CE2	PHE	20	81.775	66.013	66.847	1.00	0.00
ATOM	112	HE2	PHE	20	81.960	66.780	67.585	1.00	0.00
ATOM	113	CZ	PHE	20	80.919	64.968	67.136	1.00	0.00
ATOM	114	HZ	PHE	20	80.435	64.916	68.099	1.00	0.00
ATOM	115	C	PHE	20	84.625	63.842	64.448	1.00	0.00
ATOM	116	O	PHE	20	84.096	62.731	64.416	1.00	0.00
ATOM	117	N	ALA	21	85.466	64.216	65.407	1.00	0.00
ATOM	118	HN	ALA	21	85.856	65.114	65.379	1.00	0.00
ATOM	119	CA	ALA	21	85.822	63.321	66.501	1.00	0.00
ATOM	120	HA	ALA	21	85.257	62.408	66.383	1.00	0.00

图 24C

ATOM	121	CB	ALA	21	87.302	62.972	66.437	1.00	0.00
ATOM	122	HB1	ALA	21	87.559	62.337	67.271	1.00	0.00
ATOM	123	HB2	ALA	21	87.887	63.879	66.480	1.00	0.00
ATOM	124	HB3	ALA	21	87.509	62.454	65.512	1.00	0.00
ATOM	125	C	ALA	21	85.481	63.942	67.852	1.00	0.00
ATOM	126	O	ALA	21	86.025	64.982	68.224	1.00	0.00
ATOM	127	N	GLU	22	84.576	63.296	68.581	1.00	0.00
ATOM	128	HN	GLU	22	84.178	62.473	68.229	1.00	0.00
ATOM	129	CA	GLU	22	84.159	63.784	69.891	1.00	0.00
ATOM	130	HA	GLU	22	84.479	64.810	69.980	1.00	0.00
ATOM	131	CB	GLU	22	82.636	63.725	70.018	1.00	0.00
ATOM	132	HB1	GLU	22	82.216	64.627	69.597	1.00	0.00
ATOM	133	HB2	GLU	22	82.375	63.673	71.065	1.00	0.00
ATOM	134	CG	GLU	22	82.011	62.534	69.312	1.00	0.00
ATOM	135	HG1	GLU	22	82.602	61.655	69.525	1.00	0.00
ATOM	136	HG2	GLU	22	82.015	62.719	68.248	1.00	0.00
ATOM	137	CD	GLU	22	80.583	62.278	69.752	1.00	0.00
ATOM	138	OE1	GLU	22	80.183	62.813	70.807	1.00	0.00
ATOM	139	OE2	GLU	22	79.865	61.543	69.042	1.00	0.00
ATOM	140	C	GLU	22	84.805	62.967	71.006	1.00	0.00
ATOM	141	O	GLU	22	84.118	62.445	71.884	1.00	0.00
ATOM	142	N	ASP	23	86.129	62.862	70.967	1.00	0.00
ATOM	143	HN	ASP	23	86.622	63.301	70.242	1.00	0.00
ATOM	144	CA	ASP	23	86.867	62.109	71.975	1.00	0.00
ATOM	145	HA	ASP	23	86.161	61.489	72.506	1.00	0.00
ATOM	146	CB	ASP	23	87.913	61.214	71.309	1.00	0.00
ATOM	147	HB1	ASP	23	88.898	61.607	71.515	1.00	0.00
ATOM	148	HB2	ASP	23	87.748	61.210	70.242	1.00	0.00
ATOM	149	CG	ASP	23	87.852	59.783	71.808	1.00	0.00
ATOM	150	OD1	ASP	23	86.732	59.242	71.923	1.00	0.00
ATOM	151	OD2	ASP	23	88.924	59.204	72.083	1.00	0.00
ATOM	152	C	ASP	23	87.543	63.048	72.969	1.00	0.00
ATOM	153	O	ASP	23	88.582	63.638	72.674	1.00	0.00
ATOM	154	N	VAL	24	86.949	63.177	74.151	1.00	0.00
ATOM	155	HN	VAL	24	86.125	62.677	74.330	1.00	0.00
ATOM	156	CA	VAL	24	87.493	64.044	75.188	1.00	0.00
ATOM	157	HA	VAL	24	88.160	64.751	74.716	1.00	0.00
ATOM	158	CB	VAL	24	86.380	64.834	75.902	1.00	0.00
ATOM	159	HB	VAL	24	86.801	65.290	76.786	1.00	0.00
ATOM	160	CG1	VAL	24	85.849	65.939	75.004	1.00	0.00

图 24D

ATOM	161	HG11	VAL	24	86.622	66.676	74.843	1.00	0.00
ATOM	162	HG12	VAL	24	84.998	66.409	75.475	1.00	0.00
ATOM	163	HG13	VAL	24	85.548	65.519	74.055	1.00	0.00
ATOM	164	CG2	VAL	24	85.258	63.902	76.335	1.00	0.00
ATOM	165	HG21	VAL	24	85.092	64.007	77.396	1.00	0.00
ATOM	166	HG22	VAL	24	85.532	62.881	76.113	1.00	0.00
ATOM	167	HG23	VAL	24	84.354	64.156	75.802	1.00	0.00
ATOM	168	C	VAL	24	88.275	63.242	76.223	1.00	0.00
ATOM	169	O	VAL	24	88.224	63.534	77.417	1.00	0.00
ATOM	170	N	GLY	25	88.997	62.230	75.755	1.00	0.00
ATOM	171	HN	GLY	25	88.997	62.043	74.793	1.00	0.00
ATOM	172	CA	GLY	25	89.782	61.401	76.651	1.00	0.00
ATOM	173	HA1	GLY	25	89.633	60.364	76.389	1.00	0.00
ATOM	174	HA2	GLY	25	89.439	61.559	77.663	1.00	0.00
ATOM	175	C	GLY	25	91.263	61.717	76.580	1.00	0.00
ATOM	176	O	GLY	25	92.039	61.282	77.430	1.00	0.00
ATOM	177	N	SER	26	91.654	62.477	75.562	1.00	0.00
ATOM	178	HN	SER	26	90.986	62.792	74.917	1.00	0.00
ATOM	179	CA	SER	26	93.051	62.853	75.380	1.00	0.00
ATOM	180	HA	SER	26	93.495	62.961	76.358	1.00	0.00
ATOM	181	CB	SER	26	93.799	61.763	74.611	1.00	0.00
ATOM	182	HB1	SER	26	93.813	62.011	73.560	1.00	0.00
ATOM	183	HB2	SER	26	93.296	60.817	74.751	1.00	0.00
ATOM	184	OG	SER	26	95.134	61.640	75.069	1.00	0.00
ATOM	185	HG	SER	26	95.464	62.503	75.330	1.00	0.00
ATOM	186	C	SER	26	93.163	64.182	74.639	1.00	0.00
ATOM	187	O	SER	26	93.453	65.216	75.240	1.00	0.00
ATOM	188	N	ASN	27	92.930	64.145	73.331	1.00	0.00
ATOM	189	HN	ASN	27	92.702	63.290	72.910	1.00	0.00
ATOM	190	CA	ASN	27	93.004	65.346	72.507	1.00	0.00
ATOM	191	HA	ASN	27	92.415	66.114	72.986	1.00	0.00
ATOM	192	CB	ASN	27	94.453	65.826	72.397	1.00	0.00
ATOM	193	HB1	ASN	27	94.961	65.247	71.640	1.00	0.00
ATOM	194	HB2	ASN	27	94.946	65.682	73.347	1.00	0.00
ATOM	195	CG	ASN	27	94.550	67.293	72.026	1.00	0.00
ATOM	196	OD1	ASN	27	94.503	68.169	72.889	1.00	0.00
ATOM	197	ND2	ASN	27	94.684	67.568	70.733	1.00	0.00
ATOM	198	HD21	ASN	27	94.713	66.820	70.101	1.00	0.00
ATOM	199	HD22	ASN	27	94.750	68.508	70.465	1.00	0.00
ATOM	200	C	ASN	27	92.436	65.087	71.115	1.00	0.00

图 24E

ATOM	201	O	ASN	27	93.083	65.374	70.107	1.00	0.00
ATOM	202	N	LYS	28	91.224	64.544	71.066	1.00	0.00
ATOM	203	HN	LYS	28	90.757	64.341	71.903	1.00	0.00
ATOM	204	CA	LYS	28	90.571	64.246	69.798	1.00	0.00
ATOM	205	HA	LYS	28	91.032	64.857	69.036	1.00	0.00
ATOM	206	CB	LYS	28	90.759	62.772	69.436	1.00	0.00
ATOM	207	HB1	LYS	28	89.790	62.296	69.399	1.00	0.00
ATOM	208	HB2	LYS	28	91.354	62.298	70.203	1.00	0.00
ATOM	209	CG	LYS	28	91.447	62.556	68.098	1.00	0.00
ATOM	210	HG1	LYS	28	90.979	63.189	67.358	1.00	0.00
ATOM	211	HG2	LYS	28	91.337	61.521	67.810	1.00	0.00
ATOM	212	CD	LYS	28	92.927	62.892	68.172	1.00	0.00
ATOM	213	HD1	LYS	28	93.106	63.494	69.051	1.00	0.00
ATOM	214	HD2	LYS	28	93.205	63.448	67.290	1.00	0.00
ATOM	215	CE	LYS	28	93.780	61.636	68.252	1.00	0.00
ATOM	216	HE1	LYS	28	94.752	61.900	68.641	1.00	0.00
ATOM	217	HE2	LYS	28	93.890	61.227	67.258	1.00	0.00
ATOM	218	NZ	LYS	28	93.168	60.604	69.134	1.00	0.00
ATOM	219	HZ1	LYS	28	92.412	60.102	68.626	1.00	0.00
ATOM	220	HZ2	LYS	28	92.763	61.052	69.981	1.00	0.00
ATOM	221	HZ3	LYS	28	93.888	59.915	69.431	1.00	0.0
ATOM	222	C	LYS	28	89.085	64.580	69.864	1.00	0.00
ATOM	223	O	LYS	28	88.268	63.959	69.185	1.00	0.00
ATOM	224	N	GLY	29	88.741	65.564	70.689	1.00	0.00
ATOM	225	HN	GLY	29	89.436	66.023	71.206	1.00	0.00
ATOM	226	CA	GLY	29	87.354	65.963	70.829	1.00	0.00
ATOM	227	HA1	GLY	29	87.135	66.103	71.878	1.00	0.00
ATOM	228	HA2	GLY	29	86.724	65.176	70.443	1.00	0.00
ATOM	229	C	GLY	29	87.043	67.248	70.088	1.00	0.00
ATOM	230	O	GLY	29	86.464	68.175	70.654	1.00	0.00
ATOM	231	N	ALA	30	87.428	67.302	68.818	1.00	0.00
ATOM	232	HN	ALA	30	87.881	66.527	68.422	1.00	0.00
ATOM	233	CA	ALA	30	87.190	68.483	67.997	1.00	0.00
ATOM	234	HA	ALA	30	86.389	69.048	68.452	1.00	0.00
ATOM	235	CB	ALA	30	88.431	69.362	67.967	1.00	0.00
ATOM	236	HB1	ALA	30	88.713	69.622	68.977	1.00	0.00
ATOM	237	HB2	ALA	30	88.220	70.263	67.409	1.00	0.00
ATOM	238	HB3	ALA	30	89.240	68.827	67.494	1.00	0.00
ATOM	239	C	ALA	30	86.778	68.097	66.581	1.00	0.00
ATOM	240	O	ALA	30	86.543	66.925	66.289	1.00	0.00

图 24F

ATOM	241	N	ILE	31	86.694	69.093	65.704	1.00	0.00
ATOM	242	HN	ILE	31	86.893	70.006	65.998	1.00	0.00
ATOM	243	CA	ILE	31	86.314	68.861	64.316	1.00	0.00
ATOM	244	HA	ILE	31	86.080	67.812	64.204	1.00	0.00
ATOM	245	CB	ILE	31	85.066	69.679	63.931	1.00	0.00
ATOM	246	HB	ILE	31	85.381	70.685	63.700	1.00	0.00
ATOM	247	CG1	ILE	31	84.075	69.719	65.095	1.00	0.00
ATOM	248	HG11	ILE	31	84.347	68.962	65.817	1.00	0.00
ATOM	249	HG12	ILE	31	83.083	69.515	64.722	1.00	0.00
ATOM	250	CG2	ILE	31	84.411	69.093	62.689	1.00	0.00
ATOM	251	HG21	ILE	31	85.170	68.862	61.957	1.00	0.00
ATOM	252	HG22	ILE	31	83.718	69.810	62.276	1.00	0.00
ATOM	253	HG23	ILE	31	83.880	68.191	62.955	1.00	0.00
ATOM	254	CD1	ILE	31	84.037	71.052	65.810	1.00	0.00
ATOM	255	HD11	ILE	31	84.994	71.240	66.274	1.00	0.00
ATOM	256	HD12	ILE	31	83.267	71.032	66.568	1.00	0.00
ATOM	257	HD13	ILE	31	83.821	71.836	65.099	1.00	0.00
ATOM	258	C	ILE	31	87.454	69.219	63.369	1.00	0.00
ATOM	259	O	ILE	31	87.865	70.376	63.288	1.00	0.00
ATOM	260	N	ILE	32	87.960	68.220	62.654	1.00	0.00
ATOM	261	HN	ILE	32	87.589	67.319	62.759	1.00	0.00
ATOM	262	CA	ILE	32	89.054	68.434	61.714	1.00	0.00
ATOM	263	HA	ILE	32	89.078	69.484	61.463	1.00	0.00
ATOM	264	CB	ILE	32	90.412	68.055	62.337	1.00	0.00
ATOM	265	HB	ILE	32	90.980	67.507	61.600	1.00	0.00
ATOM	266	CG1	ILE	32	90.206	67.171	63.568	1.00	0.00
ATOM	267	HG11	ILE	32	89.550	66.353	63.310	1.00	0.00
ATOM	268	HG12	ILE	32	89.751	67.757	64.352	1.00	0.00
ATOM	269	CG2	ILE	32	91.196	69.307	62.702	1.00	0.00
ATOM	270	HG21	ILE	32	91.561	69.778	61.801	1.00	0.00
ATOM	271	HG22	ILE	32	92.031	69.038	63.332	1.00	0.00
ATOM	272	HG23	ILE	32	90.552	69.993	63.231	1.00	0.00
ATOM	273	CD1	ILE	32	91.490	66.585	64.113	1.00	0.00
ATOM	274	HD11	ILE	32	91.764	67.100	65.022	1.00	0.00
ATOM	275	HD12	ILE	32	92.277	66.701	63.382	1.00	0.00
ATOM	276	HD13	ILE	32	91.346	65.535	64.323	1.00	0.00
ATOM	277	C	ILE	32	88.851	67.625	60.438	1.00	0.00
ATOM	278	O	ILE	32	87.770	67.090	60.196	1.00	0.00
ATOM	279	N	GLY	33	89.898	67.541	59.625	1.00	0.00
ATOM	280	HN	GLY	33	90.734	67.991	59.869	1.00	0.00

图 24G

ATOM	281	CA	GLY	33	89.816	66.794	58.384	1.00	0.00
ATOM	282	HA1	GLY	33	89.891	67.483	57.555	1.00	0.00
ATOM	283	HA2	GLY	33	88.859	66.295	58.339	1.00	0.00
ATOM	284	C	GLY	33	90.915	65.758	58.260	1.00	0.00
ATOM	285	O	GLY	33	92.070	66.027	58.590	1.00	0.00
ATOM	286	N	LEU	34	90.557	64.570	57.783	1.00	0.00
ATOM	287	HN	LEU	34	89.622	64.416	57.535	1.00	0.00
ATOM	288	CA	LEU	34	91.524	63.491	57.619	1.00	0.00
ATOM	289	HA	LEU	34	92.402	63.744	58.195	1.00	0.00
ATOM	290	CB	LEU	34	90.945	62.177	58.145	1.00	0.00
ATOM	291	HB1	LEU	34	91.503	61.362	57.709	1.00	0.00
ATOM	292	HB2	LEU	34	89.918	62.104	57.818	1.00	0.00
ATOM	293	CG	LEU	34	90.977	62.016	59.666	1.00	0.00
ATOM	294	HG	LEU	34	90.367	62.787	60.115	1.00	0.00
ATOM	295	CD1	LEU	34	90.404	60.667	60.072	1.00	0.00
ATOM	296	HD11	LEU	34	91.081	59.883	59.767	1.00	0.00
ATOM	297	HD12	LEU	34	89.447	60.524	59.592	1.00	0.00
ATOM	298	HD13	LEU	34	90.277	60.638	61.144	1.00	0.00
ATOM	299	CD2	LEU	34	92.397	62.173	60.190	1.00	0.00
ATOM	300	HD21	LEU	34	92.532	61.544	61.058	1.00	0.00
ATOM	301	HD22	LEU	34	92.569	63.204	60.462	1.00	0.00
ATOM	302	HD23	LEU	34	93.098	61.881	59.422	1.00	0.00
ATOM	303	C	LEU	34	91.925	63.334	56.156	1.00	0.00
ATOM	304	O	LEU	34	91.076	63.338	55.265	1.00	0.00
ATOM	305	N	MET	35	93.225	63.197	55.917	1.00	0.00
ATOM	306	HN	MET	35	93.853	63.202	56.669	1.00	0.00
ATOM	307	CA	MET	35	93.741	63.038	54.562	1.00	0.00
ATOM	308	HA	MET	35	92.906	62.825	53.912	1.00	0.00
ATOM	309	CB	MET	35	94.417	64.330	54.097	1.00	0.00
ATOM	310	HB1	MET	35	93.661	65.088	53.958	1.00	0.00
ATOM	311	HB2	MET	35	94.908	64.146	53.153	1.00	0.00
ATOM	312	CG	MET	35	95.451	64.861	55.076	1.00	0.00
ATOM	313	HG1	MET	35	96.188	65.428	54.527	1.00	0.00
ATOM	314	HG2	MET	35	95.931	64.025	55.561	1.00	0.00
ATOM	315	SD	MET	35	94.728	65.924	56.341	1.00	0.00
ATOM	316	CE	MET	35	96.175	66.312	57.324	1.00	0.00
ATOM	317	HE1	MET	35	97.060	66.221	56.713	1.00	0.00
ATOM	318	HE2	MET	35	96.239	65.626	58.156	1.00	0.00
ATOM	319	HE3	MET	35	96.096	67.323	57.696	1.00	0.00
ATOM	320	C	MET	35	94.729	61.879	54.489	1.00	0.00

图 24H

ATOM	321	O	MET	35	95.635	61.769	55.314	1.00	0.00
ATOM	322	N	VAL	36	94.548	61.015	53.495	1.00	0.00
ATOM	323	HN	VAL	36	93.807	61.156	52.868	1.00	0.00
ATOM	324	CA	VAL	36	95.423	59.864	53.314	1.00	0.00
ATOM	325	HA	VAL	36	96.192	59.908	54.071	1.00	0.00
ATOM	326	CB	VAL	36	94.653	58.541	53.484	1.00	0.00
ATOM	327	HB	VAL	36	93.790	58.727	54.106	1.00	0.00
ATOM	328	CG1	VAL	36	94.165	58.030	52.137	1.00	0.00
ATOM	329	HG11	VAL	36	95.010	57.709	51.546	1.00	0.00
ATOM	330	HG12	VAL	36	93.643	58.821	51.619	1.00	0.00
ATOM	331	HG13	VAL	36	93.495	57.196	52.289	1.00	0.00
ATOM	332	CG2	VAL	36	95.523	57.502	54.174	1.00	0.00
ATOM	333	HG21	VAL	36	95.013	56.550	54.177	1.00	0.00
ATOM	334	HG22	VAL	36	95.715	57.811	55.191	1.00	0.00
ATOM	335	HG23	VAL	36	96.459	57.406	53.644	1.00	0.00
ATOM	336	C	VAL	36	96.081	59.883	51.939	1.00	0.00
ATOM	337	O	VAL	36	95.605	60.551	51.021	1.00	0.00
ATOM	338	N	GLY	37	97.177	59.144	51.804	1.00	0.00
ATOM	339	HN	GLY	37	97.510	58.632	52.570	1.00	0.00
ATOM	340	CA	GLY	37	97.883	59.089	50.537	1.00	0.00
ATOM	341	HA1	GLY	37	98.766	59.708	50.602	1.00	0.00
ATOM	342	HA2	GLY	37	97.240	59.477	49.762	1.00	0.00
ATOM	343	C	GLY	37	98.301	57.679	50.167	1.00	0.00
ATOM	344	O	GLY	37	98.388	56.804	51.029	1.00	0.00
ATOM	345	N	GLY	38	98.560	57.458	48.883	1.00	0.00
ATOM	346	HN	GLY	38	98.474	58.194	48.241	1.00	0.00
ATOM	347	CA	GLY	38	98.967	56.143	48.424	1.00	0.00
ATOM	348	HA1	GLY	38	98.130	55.671	47.931	1.00	0.00
ATOM	349	HA2	GLY	38	99.249	55.547	49.280	1.00	0.00
ATOM	350	C	GLY	38	100.135	56.200	47.460	1.00	0.00
ATOM	351	O	GLY	38	100.293	57.173	46.722	1.00	0.00
ATOM	352	N	VAL	39	100.956	55.155	47.466	1.00	0.00
ATOM	353	HN	VAL	39	100.778	54.410	48.077	1.00	0.00
ATOM	354	CA	VAL	39	102.116	55.090	46.585	1.00	0.00
ATOM	355	HA	VAL	39	102.260	56.068	46.150	1.00	0.00
ATOM	356	CB	VAL	39	103.391	54.714	47.362	1.00	0.00
ATOM	357	HB	VAL	39	103.293	53.693	47.702	1.00	0.00
ATOM	358	CG1	VAL	39	104.612	54.798	46.459	1.00	0.00
ATOM	359	HG11	VAL	39	105.092	55.757	46.591	1.00	0.00
ATOM	360	HG12	VAL	39	104.307	54.687	45.429	1.00	0.00

图 241

ATOM	361	HG13	VAL	39	105.305	54.011	46.716	1.00	0.00
ATOM	362	CG2	VAL	39	103.557	55.609	48.581	1.00	0.00
ATOM	363	HG21	VAL	39	102.915	55.258	49.376	1.00	0.00
ATOM	364	HG22	VAL	39	103.289	56.622	48.323	1.00	0.00
ATOM	365	HG23	VAL	39	104.585	55.581	48.911	1.00	0.00
ATOM	366	C	VAL	39	101.900	54.077	45.466	1.00	0.00
ATOM	367	O	VAL	39	101.549	52.925	45.718	1.00	0.00
ATOM	368	N	VAL	40	102.111	54.515	44.230	1.00	0.00
ATOM	369	HN	VAL	40	102.389	55.445	44.093	1.00	0.00
ATOM	370	CA	VAL	40	101.939	53.647	43.071	1.00	0.00
ATOM	371	HA	VAL	40	101.904	52.626	43.423	1.00	0.00
ATOM	372	CB	VAL	40	100.623	53.951	42.332	1.00	0.00
ATOM	373	HB	VAL	40	100.843	54.067	41.280	1.00	0.00
ATOM	374	CG1	VAL	40	99.644	52.798	42.487	1.00	0.00
ATOM	375	HG11	VAL	40	98.711	53.050	42.006	1.00	0.00
ATOM	376	HG12	VAL	40	99.469	52.613	43.537	1.00	0.00
ATOM	377	HG13	VAL	40	100.056	51.911	42.029	1.00	0.00
ATOM	378	CG2	VAL	40	100.014	55.249	42.837	1.00	0.00
ATOM	379	HG21	VAL	40	99.922	55.947	42.018	1.00	0.00
ATOM	380	HG22	VAL	40	100.650	55.672	43.601	1.00	0.00
ATOM	381	HG23	VAL	40	99.037	55.051	43.252	1.00	0.00
ATOM	382	C	VAL	40	103.103	53.795	42.097	1.00	0.00
ATOM	383	O	VAL	40	103.697	54.867	41.982	1.00	0.00
ATOM	384	N	ILE	41	103.423	52.711	41.397	1.00	0.00
ATOM	385	HN	ILE	41	102.912	51.886	41.533	1.00	0.00
ATOM	386	CA	ILE	41	104.516	52.721	40.433	1.00	0.00
ATOM	387	HA	ILE	41	104.961	53.706	40.443	1.00	0.00
ATOM	388	CB	ILE	41	105.603	51.695	40.805	1.00	0.00
ATOM	389	HB	ILE	41	105.115	50.792	41.140	1.00	0.00
ATOM	390	CG1	ILE	41	106.482	52.237	41.934	1.00	0.00
ATOM	391	HG11	ILE	41	105.849	52.631	42.716	1.00	0.00
ATOM	392	HG12	ILE	41	107.105	53.030	41.548	1.00	0.00
ATOM	393	CG2	ILE	41	106.448	51.352	39.587	1.00	0.00
ATOM	394	HG21	ILE	41	105.801	51.085	38.765	1.00	0.00
ATOM	395	HG22	ILE	41	107.095	50.520	39.821	1.00	0.00
ATOM	396	HG23	ILE	41	107.047	52.208	39.312	1.00	0.00
ATOM	397	CD1	ILE	41	107.388	51.193	42.549	1.00	0.00
ATOM	398	HD11	ILE	41	106.827	50.287	42.723	1.00	0.00
ATOM	399	HD12	ILE	41	107.777	51.561	43.487	1.00	0.00
ATOM	400	HD13	ILE	41	108.207	50.986	41.876	1.00	0.00

图 24J

ATOM	401	C	ILE	41	104.011	52.421	39.026	1.00	0.00
ATOM	402	O	ILE	41	104.397	53.083	38.062	1.00	0.00
ATOM	403	N	ALA	42	103.145	51.419	38.914	1.00	0.00
ATOM	404	HN	ALA	42	102.875	50.928	39.718	1.00	0.00
ATOM	405	HA	ALA	42	103.321	51.256	36.863	1.00	0.00
ATOM	406	CB	ALA	42	102.319	49.534	37.595	1.00	0.00
ATOM	407	HB1	ALA	42	101.865	49.231	38.527	1.00	0.00
ATOM	408	HB2	ALA	42	103.250	49.004	37.458	1.00	0.00
ATOM	409	HB3	ALA	42	101.650	49.304	36.778	1.00	0.00
ATOM	410	CA	ALA	42	102.588	51.031	37.624	1.00	0.00
ATOM	411	C	ALA	42	101.310	51.806	37.323	1.00	0.00
ATOM	412	OT1	ALA	42	101.245	53.001	37.682	1.00	0.00
ATOM	413	OT2	ALA	42	100.384	51.212	36.731	1.00	0.00
TER	414								
ATOM	415	HA	GLN	115	85.614	68.400	46.448	1.00	0.00
ATOM	416	CB	GLN	115	87.733	68.678	46.594	1.00	0.00
ATOM	417	HB1	GLN	115	88.413	69.265	47.193	1.00	0.00
ATOM	418	HB2	GLN	115	87.779	69.021	45.571	1.00	0.00
ATOM	419	CG	GLN	115	88.194	67.230	46.633	1.00	0.00
ATOM	420	HG1	GLN	115	88.180	66.834	45.628	1.00	0.00
ATOM	421	HG2	GLN	115	87.512	66.665	47.251	1.00	0.00
ATOM	422	CD	GLN	115	89.594	67.079	47.194	1.00	0.00
ATOM	423	OE1	GLN	115	90.494	66.574	46.523	1.00	0.00
ATOM	424	NE2	GLN	115	89.785	67.516	48.434	1.00	0.00
ATOM	425	HE21	GLN	115	89.022	67.907	48.909	1.00	0.00
ATOM	426	HE22	GLN	115	90.681	67.431	48.822	1.00	0.00
ATOM	427	C	GLN	115	86.174	68.250	48.500	1.00	0.00
ATOM	428	O	GLN	115	87.034	68.428	49.363	1.00	0.00
ATOM	429	N	GLN	115	85.985	70.331	47.165	1.00	0.00
ATOM	430	HT1	GLN	115	85.522	70.565	48.067	1.00	0.00
ATOM	431	HT2	GLN	115	85.343	70.578	46.385	1.00	0.00
ATOM	432	HT3	GLN	115	86.854	70.895	47.076	1.00	0.00
ATOM	433	CA	GLN	115	86.310	68.882	47.119	1.00	0.00
ATOM	434	N	LYS	116	85.088	67.512	48.703	1.00	0.00
ATOM	435	HN	LYS	116	84.438	67.407	47.977	1.00	0.00
ATOM	436	CA	LYS	116	84.839	66.853	49.980	1.00	0.00
ATOM	437	HA	LYS	116	85.772	66.818	50.522	1.00	0.00
ATOM	438	CB	LYS	116	83.818	67.647	50.797	1.00	0.00
ATOM	439	HB1	LYS	116	84.328	68.456	51.299	1.00	0.00
ATOM	440	HB2	LYS	116	83.380	66.995	51.538	1.00	0.00

图 24K

ATOM	441	CG	LYS	116	82.696	68.239	49.960	1.00	0.00
ATOM	442	HG1	LYS	116	82.877	68.009	48.920	1.00	0.00
ATOM	443	HG2	LYS	116	82.683	69.309	50.097	1.00	0.00
ATOM	444	CD	LYS	116	81.344	67.674	50.363	1.00	0.00
ATOM	445	HD1	LYS	116	81.362	66.600	50.241	1.00	0.00
ATOM	446	HD2	LYS	116	80.582	68.097	49.725	1.00	0.00
ATOM	447	CE	LYS	116	81.012	68.002	51.810	1.00	0.00
ATOM	448	HE1	LYS	116	81.806	68.609	52.219	1.00	0.00
ATOM	449	HE2	LYS	116	80.940	67.080	52.367	1.00	0.00
ATOM	450	NZ	LYS	116	79.725	68.741	51.930	1.00	0.00
ATOM	451	HZ1	LYS	116	79.897	69.767	51.894	1.00	0.00
ATOM	452	HZ2	LYS	116	79.263	68.511	52.833	1.00	0.00
ATOM	453	HZ3	LYS	116	79.087	68.479	51.151	1.00	0.00
ATOM	454	C	LYS	116	84.340	65.427	49.769	1.00	0.00
ATOM	455	O	LYS	116	83.449	65.185	48.955	1.00	0.00
ATOM	456	N	LEU	117	84.920	64.487	50.508	1.00	0.00
ATOM	457	HN	LEU	117	85.624	64.743	51.140	1.00	0.00
ATOM	458	CA	LEU	117	84.534	63.085	50.402	1.00	0.00
ATOM	459	HA	LEU	117	83.633	63.033	49.809	1.00	0.00
ATOM	460	CB	LEU	117	85.635	62.283	49.707	1.00	0.00
ATOM	461	HB1	LEU	117	86.023	61.560	50.408	1.00	0.00
ATOM	462	HB2	LEU	117	86.431	62.962	49.438	1.00	0.00
ATOM	463	CG	LEU	117	85.195	61.536	48.446	1.00	0.00
ATOM	464	HG	LEU	117	86.068	61.157	47.936	1.00	0.00
ATOM	465	CD1	LEU	117	84.312	60.352	48.809	1.00	0.00
ATOM	466	HD11	LEU	117	83.999	59.847	47.907	1.00	0.00
ATOM	467	HD12	LEU	117	83.443	60.702	49.346	1.00	0.00
ATOM	468	HD13	LEU	117	84.868	59.666	49.431	1.00	0.00
ATOM	469	CD2	LEU	117	84.466	62.477	47.499	1.00	0.00
ATOM	470	HD21	LEU	117	83.401	62.320	47.584	1.00	0.00
ATOM	471	HD22	LEU	117	84.779	62.279	46.484	1.00	0.00
ATOM	472	HD23	LEU	117	84.700	63.499	47.755	1.00	0.00
ATOM	473	C	LEU	117	84.250	62.493	51.779	1.00	0.00
ATOM	474	O	LEU	117	85.157	62.331	52.595	1.00	0.00
ATOM	475	N	VAL	118	82.985	62.173	52.030	1.00	0.00
ATOM	476	HN	VAL	118	82.306	62.326	51.340	1.00	0.00
ATOM	477	CA	VAL	118	82.581	61.600	53.308	1.00	0.00
ATOM	478	HA	VAL	118	83.376	61.773	54.018	1.00	0.00
ATOM	479	CB	VAL	118	81.300	62.266	53.844	1.00	0.00
ATOM	480	HB	VAL	118	81.581	63.161	54.380	1.00	0.00

图 24L

ATOM	481	CG1	VAL	118	80.386	62.667	52.696	1.00	0.00
ATOM	482	HG11	VAL	118	79.396	62.867	53.078	1.00	0.00
ATOM	483	HG12	VAL	118	80.339	61.864	51.976	1.00	0.00
ATOM	484	HG13	VAL	118	80.774	63.556	52.220	1.00	0.00
ATOM	485	CG2	VAL	118	80.579	61.338	54.810	1.00	0.00
ATOM	486	HG21	VAL	118	79.915	60.690	54.258	1.00	0.00
ATOM	487	HG22	VAL	118	80.007	61.925	55.514	1.00	0.00
ATOM	488	HG23	VAL	118	81.304	60.741	55.344	1.00	0.00
ATOM	489	C	VAL	118	82.345	60.098	53.187	1.00	0.00
ATOM	490	O	VAL	118	81.532	59.651	52.379	1.00	0.00
ATOM	491	N	PHE	119	83.061	59.324	53.996	1.00	0.00
ATOM	492	HN	PHE	119	83.694	59.740	54.619	1.00	0.00
ATOM	493	CA	PHE	119	82.929	57.872	53.980	1.00	0.00
ATOM	494	HA	PHE	119	82.472	57.592	53.043	1.00	0.00
ATOM	495	CB	PHE	119	84.306	57.213	54.078	1.00	0.00
ATOM	496	HB1	PHE	119	84.181	56.141	54.126	1.00	0.00
ATOM	497	HB2	PHE	119	84.797	57.553	54.977	1.00	0.00
ATOM	498	CG	PHE	119	85.205	57.523	52.915	1.00	0.00
ATOM	499	CD1	PHE	119	85.923	58.707	52.875	1.00	0.00
ATOM	500	HD1	PHE	119	85.833	59.409	53.691	1.00	0.00
ATOM	501	CD2	PHE	119	85.330	56.631	51.862	1.00	0.00
ATOM	502	HD2	PHE	119	84.775	55.705	51.883	1.00	0.00
ATOM	503	CE1	PHE	119	86.751	58.996	51.807	1.00	0.00
ATOM	504	HE1	PHE	119	87.305	59.922	51.787	1.00	0.00
ATOM	505	CE2	PHE	119	86.156	56.914	50.791	1.00	0.00
ATOM	506	HE2	PHE	119	86.246	56.211	49.976	1.00	0.00
ATOM	507	CZ	PHE	119	86.867	58.098	50.763	1.00	0.00
ATOM	508	HZ	PHE	119	87.513	58.322	49.927	1.00	0.00
ATOM	509	C	PHE	119	82.040	57.394	55.123	1.00	0.00
ATOM	510	O	PHE	119	81.752	58.145	56.054	1.00	0.00
ATOM	511	N	PHE	120	81.609	56.139	55.046	1.00	0.00
ATOM	512	HN	PHE	120	81.872	55.589	54.278	1.00	0.00
ATOM	513	CA	PHE	120	80.752	55.561	56.074	1.00	0.00
ATOM	514	HA	PHE	120	80.305	56.373	56.628	1.00	0.00
ATOM	515	CB	PHE	120	79.642	54.726	55.434	1.00	0.00
ATOM	516	HB1	PHE	120	80.088	53.915	54.877	1.00	0.00
ATOM	517	HB2	PHE	120	79.075	55.350	54.759	1.00	0.00
ATOM	518	CG	PHE	120	78.685	54.134	56.429	1.00	0.00
ATOM	519	CD1	PHE	120	78.789	52.805	56.805	1.00	0.00
ATOM	520	HD1	PHE	120	79.569	52.192	56.377	1.00	0.00

图 24M

ATOM	521	CD2	PHE	120	77.680	54.908	56.988	1.00	0.00
ATOM	522	HD2	PHE	120	77.590	55.946	56.702	1.00	0.00
ATOM	523	CE1	PHE	120	77.910	52.258	57.721	1.00	0.00
ATOM	524	HE1	PHE	120	78.002	51.221	58.006	1.00	0.00
ATOM	525	CE2	PHE	120	76.798	54.367	57.904	1.00	0.00
ATOM	526	HE2	PHE	120	76.020	54.981	58.332	1.00	0.00
ATOM	527	CZ	PHE	120	76.913	53.041	58.270	1.00	0.00
ATOM	528	HZ	PHE	120	76.225	52.616	58.986	1.00	0.00
ATOM	529	C	PHE	120	81.563	54.698	57.035	1.00	0.00
ATOM	530	O	PHE	120	82.107	53.664	56.649	1.00	0.00
ATOM	531	N	ALA	121	81.640	55.131	58.290	1.00	0.00
ATOM	532	HN	ALA	121	81.185	55.963	58.537	1.00	0.00
ATOM	533	CA	ALA	121	82.385	54.398	59.306	1.00	0.00
ATOM	534	HA	ALA	121	82.840	53.540	58.832	1.00	0.00
ATOM	535	CB	ALA	121	83.495	55.268	59.876	1.00	0.00
ATOM	536	HB1	ALA	121	83.154	56.291	59.939	1.00	0.00
ATOM	537	HB2	ALA	121	84.360	55.216	59.231	1.00	0.00
ATOM	538	HB3	ALA	121	83.759	54.915	60.861	1.00	0.00
ATOM	539	C	ALA	121	81.463	53.916	60.421	1.00	0.00
ATOM	540	O	ALA	121	80.253	54.137	60.379	1.00	0.00
ATOM	541	N	GLU	122	82.044	53.255	61.417	1.00	0.00
ATOM	542	HN	GLU	122	83.013	53.111	61.395	1.00	0.00
ATOM	543	CA	GLU	122	81.274	52.741	62.544	1.00	0.00
ATOM	544	HA	GLU	122	80.255	53.078	62.430	1.00	0.00
ATOM	545	CB	GLU	122	81.294	51.211	62.546	1.00	0.00
ATOM	546	HB1	GLU	122	82.263	50.876	62.888	1.00	0.00
ATOM	547	HB2	GLU	122	81.137	50.859	61.538	1.00	0.00
ATOM	548	CG	GLU	122	80.233	50.590	63.439	1.00	0.00
ATOM	549	HG1	GLU	122	79.500	50.099	62.816	1.00	0.00
ATOM	550	HG2	GLU	122	79.754	51.374	64.007	1.00	0.00
ATOM	551	CD	GLU	122	80.807	49.573	64.406	1.00	0.00
ATOM	552	OE1	GLU	122	80.572	48.363	64.204	1.00	0.00
ATOM	553	OE2	GLU	122	81.491	49.987	65.366	1.00	0.00
ATOM	554	C	GLU	122	81.823	53.271	63.865	1.00	0.00
ATOM	555	O	GLU	122	83.032	53.438	64.024	1.00	0.00
ATOM	556	N	ASP	123	80.925	53.533	64.810	1.00	0.00
ATOM	557	HN	ASP	123	79.976	53.379	64.623	1.00	0.00
ATOM	558	CA	ASP	123	81.319	54.043	66.118	1.00	0.00
ATOM	559	HA	ASP	123	82.312	54.458	66.026	1.00	0.00
ATOM	560	CB	ASP	123	80.359	55.145	66.569	1.00	0.00

图 24N

ATOM	561	HB1	ASP	123	79.790	54.793	67.417	1.00	0.00
ATOM	562	HB2	ASP	123	79.684	55.379	65.759	1.00	0.00
ATOM	563	CG	ASP	123	81.084	56.415	66.970	1.00	0.00
ATOM	564	OD1	ASP	123	82.294	56.338	67.271	1.00	0.00
ATOM	565	OD2	ASP	123	80.441	57.486	66.984	1.00	0.00
ATOM	566	C	ASP	123	81.348	52.923	67.153	1.00	0.00
ATOM	567	O	ASP	123	80.666	51.909	67.004	1.00	0.00
ATOM	568	N	VAL	124	82.142	53.114	68.202	1.00	0.00
ATOM	569	HN	VAL	124	82.660	53.944	68.264	1.00	0.00
ATOM	570	CA	VAL	124	82.260	52.121	69.262	1.00	0.00
ATOM	571	HA	VAL	124	81.915	51.174	68.872	1.00	0.00
ATOM	572	CB	VAL	124	83.723	51.953	69.714	1.00	0.00
ATOM	573	HB	VAL	124	83.751	51.225	70.512	1.00	0.00
ATOM	574	CG1	VAL	124	84.581	51.436	68.570	1.00	0.00
ATOM	575	HG11	VAL	124	85.615	51.406	68.880	1.00	0.00
ATOM	576	HG12	VAL	124	84.479	52.093	67.719	1.00	0.00
ATOM	577	HG13	VAL	124	84.258	50.442	68.297	1.00	0.00
ATOM	578	CG2	VAL	124	84.270	53.267	70.250	1.00	0.00
ATOM	579	HG21	VAL	124	83.453	53.883	70.596	1.00	0.00
ATOM	580	HG22	VAL	124	84.801	53.783	69.463	1.00	0.00
ATOM	581	HG23	VAL	124	84.944	53.069	71.070	1.00	0.00
ATOM	582	C	VAL	124	81.408	52.500	70.468	1.00	0.00
ATOM	583	O	VAL	124	80.766	53.550	70.482	1.00	0.00
ATOM	584	N	GLY	125	81.407	51.637	71.480	1.00	0.00
ATOM	585	HN	GLY	125	81.938	50.817	71.412	1.00	0.00
ATOM	586	CA	GLY	125	80.630	51.900	72.676	1.00	0.00
ATOM	587	HA1	GLY	125	80.549	52.968	72.814	1.00	0.00
ATOM	588	HA2	GLY	125	81.144	51.476	73.526	1.00	0.00
ATOM	589	C	GLY	125	79.235	51.309	72.603	1.00	0.00
ATOM	590	O	GLY	125	78.622	51.019	73.630	1.00	0.00
ATOM	591	N	SER	126	78.735	51.130	71.385	1.00	0.00
ATOM	592	HN	SER	126	79.273	51.381	70.606	1.00	0.00
ATOM	593	CA	SER	126	77.404	50.570	71.180	1.00	0.00
ATOM	594	HA	SER	126	77.328	49.671	71.773	1.00	0.00
ATOM	595	CB	SER	126	76.334	51.562	71.639	1.00	0.00
ATOM	596	HB1	SER	126	75.491	51.516	70.965	1.00	0.00
ATOM	597	HB2	SER	126	76.745	52.560	71.634	1.00	0.00
ATOM	598	OG	SER	126	75.887	51.260	72.950	1.00	0.00
ATOM	599	HG	SER	126	76.604	50.862	73.449	1.00	0.00
ATOM	600	C	SER	126	77.185	50.211	69.714	1.00	0.00

图 240

ATOM	601	O	SER	126	76.095	49.787	69.327	1.00	0.00
ATOM	602	N	ASN	127	78.232	50.387	68.907	1.00	0.00
ATOM	603	HN	ASN	127	79.069	50.729	69.285	1.00	0.00
ATOM	604	CA	ASN	127	78.173	50.086	67.478	1.00	0.00
ATOM	605	HA	ASN	127	79.126	50.354	67.047	1.00	0.00
ATOM	606	CB	ASN	127	77.932	48.591	67.253	1.00	0.00
ATOM	607	HB1	ASN	127	77.541	48.442	66.258	1.00	0.00
ATOM	608	HB2	ASN	127	77.212	48.237	67.975	1.00	0.00
ATOM	609	CG	ASN	127	79.200	47.773	67.400	1.00	0.00
ATOM	610	OD1	ASN	127	79.901	47.868	68.407	1.00	0.00
ATOM	611	ND2	ASN	127	79.501	46.963	66.392	1.00	0.00
ATOM	612	HD21	ASN	127	78.897	46.939	65.621	1.00	0.00
ATOM	613	HD22	ASN	127	80.316	46.422	66.461	1.00	0.00
ATOM	614	C	ASN	127	77.082	50.901	66.789	1.00	0.00
ATOM	615	O	ASN	127	75.916	50.508	66.774	1.00	0.00
ATOM	616	N	LYS	128	77.470	52.037	66.219	1.00	0.00
ATOM	617	HN	LYS	128	78.414	52.297	66.264	1.00	0.00
ATOM	618	CA	LYS	128	76.525	52.907	65.529	1.00	0.00
ATOM	619	HA	LYS	128	75.589	52.376	65.440	1.00	0.00
ATOM	620	CB	LYS	128	76.295	54.187	66.335	1.00	0.00
ATOM	621	HB1	LYS	128	75.802	54.912	65.704	1.00	0.00
ATOM	622	HB2	LYS	128	77.252	54.581	66.643	1.00	0.00
ATOM	623	CG	LYS	128	75.444	53.978	67.576	1.00	0.00
ATOM	624	HG1	LYS	128	75.924	53.249	68.212	1.00	0.00
ATOM	625	HG2	LYS	128	74.472	53.615	67.278	1.00	0.00
ATOM	626	CD	LYS	128	75.267	55.272	68.355	1.00	0.00
ATOM	627	HD1	LYS	128	74.341	55.224	68.908	1.00	0.00
ATOM	628	HD2	LYS	128	75.232	56.097	67.660	1.00	0.00
ATOM	629	CE	LYS	128	76.413	55.497	69.328	1.00	0.00
ATOM	630	HE1	LYS	128	76.075	56.150	70.119	1.00	0.00
ATOM	631	HE2	LYS	128	77.230	55.966	68.800	1.00	0.00
ATOM	632	NZ	LYS	128	76.893	54.220	69.925	1.00	0.00
ATOM	633	HZ1	LYS	128	77.288	54.395	70.871	1.00	0.00
ATOM	634	HZ2	LYS	128	77.632	53.800	69.326	1.00	0.00
ATOM	635	HZ3	LYS	128	76.106	53.546	70.008	1.00	0.00
ATOM	636	C	LYS	128	77.026	53.256	64.131	1.00	0.00
ATOM	637	O	LYS	128	78.114	52.842	63.730	1.00	0.00
ATOM	638	N	GLY	129	76.226	54.019	63.394	1.00	0.00
ATOM	639	HN	GLY	129	75.371	54.319	63.766	1.00	0.00
ATOM	640	CA	GLY	129	76.606	54.409	62.049	1.00	0.00

图 24P

ATOM	641	HA1	GLY	129	75.738	54.349	61.410	1.00	0.00
ATOM	642	HA2	GLY	129	77.356	53.723	61.685	1.00	0.00
ATOM	643	C	GLY	129	77.162	55.818	61.989	1.00	0.00
ATOM	644	O	GLY	129	76.410	56.784	61.857	1.00	0.00
ATOM	645	N	ALA	130	78.482	55.936	62.085	1.00	0.00
ATOM	646	HN	ALA	130	79.028	55.129	62.189	1.00	0.00
ATOM	647	CA	ALA	130	79.138	57.237	62.042	1.00	0.00
ATOM	648	HA	ALA	130	78.397	57.992	62.264	1.00	0.00
ATOM	649	CB	ALA	130	80.226	57.315	63.102	1.00	0.00
ATOM	650	HB1	ALA	130	79.802	57.677	64.027	1.00	0.00
ATOM	651	HB2	ALA	130	81.002	57.990	62.773	1.00	0.00
ATOM	652	HB3	ALA	130	80.646	56.332	63.259	1.00	0.00
ATOM	653	C	ALA	130	79.722	57.511	60.660	1.00	0.00
ATOM	654	O	ALA	130	79.670	56.659	59.773	1.00	0.00
ATOM	655	N	ILE	131	80.279	58.705	60.484	1.00	0.00
ATOM	656	HN	ILE	131	80.289	59.342	61.229	1.00	0.00
ATOM	657	CA	ILE	131	80.873	59.091	59.210	1.00	0.00
ATOM	658	HA	ILE	131	81.042	58.192	58.635	1.00	0.00
ATOM	659	CB	ILE	131	79.933	60.010	58.407	1.00	0.00
ATOM	660	HB	ILE	131	80.536	60.737	57.885	1.00	0.00
ATOM	661	CG1	ILE	131	78.973	60.740	59.348	1.00	0.00
ATOM	662	HG11	ILE	131	78.651	60.060	60.123	1.00	0.00
ATOM	663	HG12	ILE	131	78.112	61.074	58.787	1.00	0.00
ATOM	664	CG2	ILE	131	79.161	59.206	57.372	1.00	0.00
ATOM	665	HG21	ILE	131	78.505	59.864	56.821	1.00	0.00
ATOM	666	HG22	ILE	131	78.576	58.447	57.869	1.00	0.00
ATOM	667	HG23	ILE	131	79.855	58.737	56.690	1.00	0.00
ATOM	668	CD1	ILE	131	79.587	61.951	60.018	1.00	0.00
ATOM	669	HD11	ILE	131	80.442	61.644	60.602	1.00	0.00
ATOM	670	HD12	ILE	131	78.856	62.413	60.665	1.00	0.00
ATOM	671	HD13	ILE	131	79.900	62.658	59.264	1.00	0.00
ATOM	672	C	ILE	131	82.205	59.803	59.418	1.00	0.00
ATOM	673	O	ILE	131	82.381	60.540	60.389	1.00	0.00
ATOM	674	N	ILE	132	83.140	59.579	58.500	1.00	0.00
ATOM	675	HN	ILE	132	82.940	58.982	57.749	1.00	0.00
ATOM	676	CA	ILE	132	84.457	60.200	58.583	1.00	0.00
ATOM	677	HA	ILE	132	84.399	61.010	59.296	1.00	0.00
ATOM	678	CB	ILE	132	85.522	59.199	59.071	1.00	0.00
ATOM	679	HB	ILE	132	86.492	59.659	58.961	1.00	0.00
ATOM	680	CG1	ILE	132	85.474	57.922	58.232	1.00	0.00

图 24Q

ATOM	681	HG11	ILE	132	85.575	58.181	57.188	1.00	0.00
ATOM	682	HG12	ILE	132	84.525	57.432	58.386	1.00	0.00
ATOM	683	CG2	ILE	132	85.316	58.880	60.545	1.00	0.00
ATOM	684	HG21	ILE	132	85.224	59.799	61.104	1.00	0.00
ATOM	685	HG22	ILE	132	86.161	58.318	60.913	1.00	0.00
ATOM	686	HG23	ILE	132	84.415	58.295	60.664	1.00	0.00
ATOM	687	CD1	ILE	132	86.567	56.932	58.574	1.00	0.00
ATOM	688	HD11	ILE	132	87.510	57.451	58.657	1.00	0.00
ATOM	689	HD12	ILE	132	86.634	56.187	57.795	1.00	0.00
ATOM	690	HD13	ILE	132	86.336	56.451	59.513	1.00	0.00
ATOM	691	C	ILE	132	84.884	60.761	57.231	1.00	0.00
ATOM	692	O	ILE	132	84.592	60.180	56.186	1.00	0.00
ATOM	693	N	GLY	133	85.579	61.894	57.259	1.00	0.00
ATOM	694	HN	GLY	133	85.783	62.312	58.121	1.00	0.00
ATOM	695	CA	GLY	133	86.035	62.514	56.029	1.00	0.00
ATOM	696	HA1	GLY	133	85.892	63.582	56.103	1.00	0.00
ATOM	697	HA2	GLY	133	85.442	62.138	55.208	1.00	0.00
ATOM	698	C	GLY	133	87.498	62.235	55.744	1.00	0.00
ATOM	699	O	GLY	133	88.373	62.629	56.515	1.00	0.00
ATOM	700	N	LEU	134	87.762	61.555	54.633	1.00	0.00
ATOM	701	HN	LEU	134	87.021	61.269	54.059	1.00	0.00
ATOM	702	CA	LEU	134	89.129	61.222	54.247	1.00	0.00
ATOM	703	HA	LEU	134	89.797	61.691	54.954	1.00	0.00
ATOM	704	CB	LEU	134	89.339	59.707	54.294	1.00	0.00
ATOM	705	HB1	LEU	134	90.372	59.500	54.060	1.00	0.00
ATOM	706	HB2	LEU	134	88.718	59.256	53.534	1.00	0.00
ATOM	707	CG	LEU	134	89.012	59.049	55.636	1.00	0.00
ATOM	708	HG	LEU	134	88.430	59.736	56.234	1.00	0.00
ATOM	709	CD1	LEU	134	88.183	57.791	55.425	1.00	0.00
ATOM	710	HD11	LEU	134	88.630	57.192	54.645	1.00	0.00
ATOM	711	HD12	LEU	134	87.179	58.066	55.138	1.00	0.00
ATOM	712	HD13	LEU	134	88.153	57.223	56.343	1.00	0.00
ATOM	713	CD2	LEU	134	90.290	58.726	56.396	1.00	0.00
ATOM	714	HD21	LEU	134	90.745	57.842	55.975	1.00	0.00
ATOM	715	HD22	LEU	134	90.055	58.550	57.436	1.00	0.00
ATOM	716	HD23	LEU	134	90.975	59.557	56.317	1.00	0.00
ATOM	717	C	LEU	134	89.443	61.746	52.850	1.00	0.00
ATOM	718	O	LEU	134	88.555	61.863	52.005	1.00	0.00
ATOM	719	N	MET	135	90.713	62.061	52.613	1.00	0.00
ATOM	720	HN	MET	135	91.375	61.948	53.327	1.00	0.00

图 24R

ATOM	721	CA	MET	135	91.145	62.572	51.318	1.00	0.00
ATOM	722	HA	MET	135	90.272	62.937	50.797	1.00	0.00
ATOM	723	CB	MET	135	92.131	63.727	51.504	1.00	0.00
ATOM	724	HB1	MET	135	93.125	63.320	51.623	1.00	0.00
ATOM	725	HB2	MET	135	91.865	64.272	52.397	1.00	0.00
ATOM	726	CG	MET	135	92.152	64.703	50.339	1.00	0.00
ATOM	727	HG1	MET	135	91.363	65.427	50.480	1.00	0.00
ATOM	728	HG2	MET	135	91.978	64.156	49.425	1.00	0.00
ATOM	729	SD	MET	135	93.721	65.580	50.196	1.00	0.00
ATOM	730	CE	MET	135	93.442	66.534	48.707	1.00	0.00
ATOM	731	HE1	MET	135	94.361	67.019	48.412	1.00	0.00
ATOM	732	HE2	MET	135	92.684	67.280	48.894	1.00	0.00
ATOM	733	HE3	MET	135	93.112	65.877	47.915	1.00	0.00
ATOM	734	C	MET	135	91.788	61.468	50.485	1.00	0.00
ATOM	735	O	MET	135	92.421	60.560	51.023	1.00	0.00
ATOM	736	N	VAL	136	91.622	61.553	49.169	1.00	0.00
ATOM	737	HN	VAL	136	91.108	62.301	48.799	1.00	0.00
ATOM	738	CA	VAL	136	92.187	60.562	48.262	1.00	0.00
ATOM	739	HA	VAL	136	92.562	59.741	48.857	1.00	0.00
ATOM	740	CB	VAL	136	91.121	60.011	47.296	1.00	0.00
ATOM	741	HB	VAL	136	90.772	60.824	46.676	1.00	0.00
ATOM	742	CG1	VAL	136	91.720	58.946	46.390	1.00	0.00
ATOM	743	HG11	VAL	136	92.594	59.344	45.896	1.00	0.00
ATOM	744	HG12	VAL	136	90.991	58.653	45.649	1.00	0.00
ATOM	745	HG13	VAL	136	92.000	58.086	46.980	1.00	0.00
ATOM	746	CG2	VAL	136	89.935	59.457	48.070	1.00	0.00
ATOM	747	HG21	VAL	136	89.028	59.935	47.730	1.00	0.00
ATOM	748	HG22	VAL	136	90.070	59.651	49.124	1.00	0.00
ATOM	749	HG23	VAL	136	89.864	58.392	47.907	1.00	0.00
ATOM	750	C	VAL	136	93.336	61.150	47.450	1.00	0.00
ATOM	751	O	VAL	136	93.128	61.694	46.365	1.00	0.00
ATOM	752	N	GLY	137	94.548	61.037	47.982	1.00	0.00
ATOM	753	HN	GLY	137	94.654	60.593	48.850	1.00	0.00
ATOM	754	CA	GLY	137	95.712	61.562	47.293	1.00	0.00
ATOM	755	HA1	GLY	137	96.246	62.220	47.962	1.00	0.00
ATOM	756	HA2	GLY	137	95.384	62.127	46.434	1.00	0.00
ATOM	757	C	GLY	137	96.654	60.468	46.828	1.00	0.00
ATOM	758	O	GLY	137	97.197	59.720	47.641	1.00	0.00
ATOM	759	N	GLY	138	96.847	60.374	45.517	1.00	0.00
ATOM	760	HN	GLY	138	96.387	60.998	44.917	1.00	0.00

图 24S

ATOM	761	CA	GLY	138	97.729	59.361	44.968	1.00	0.00
ATOM	762	HA1	GLY	138	97.169	58.745	44.281	1.00	0.00
ATOM	763	HA2	GLY	138	98.095	58.743	45.774	1.00	0.00
ATOM	764	C	GLY	138	98.913	59.959	44.234	1.00	0.00
ATOM	765	O	GLY	138	98.799	61.017	43.615	1.00	0.00
ATOM	766	N	VAL	139	100.054	59.281	44.304	1.00	0.00
ATOM	767	HN	VAL	139	100.082	58.444	44.813	1.00	0.00
ATOM	768	CA	VAL	139	101.264	59.751	43.641	1.00	0.00
ATOM	769	HA	VAL	139	100.982	60.519	42.935	1.00	0.00
ATOM	770	CB	VAL	139	102.256	60.362	44.649	1.00	0.00
ATOM	771	HB	VAL	139	102.273	59.737	45.530	1.00	0.00
ATOM	772	CG1	VAL	139	103.659	60.398	44.064	1.00	0.00
ATOM	773	HG11	VAL	139	104.093	59.410	44.110	1.00	0.00
ATOM	774	HG12	VAL	139	104.268	61.085	44.632	1.00	0.00
ATOM	775	HG13	VAL	139	103.612	60.723	43.035	1.00	0.00
ATOM	776	CG2	VAL	139	101.807	61.755	45.062	1.00	0.00
ATOM	777	HG21	VAL	139	102.120	62.471	44.317	1.00	0.00
ATOM	778	HG22	VAL	139	102.250	62.009	46.014	1.00	0.00
ATOM	779	HG23	VAL	139	100.730	61.776	45.150	1.00	0.00
ATOM	780	C	VAL	139	101.955	58.618	42.891	1.00	0.00
ATOM	781	O	VAL	139	102.228	57.560	43.458	1.00	0.00
ATOM	782	N	VAL	140	102.235	58.847	41.612	1.00	0.00
ATOM	783	HN	VAL	140	101.993	59.710	41.216	1.00	0.00
ATOM	784	CA	VAL	140	102.895	57.844	40.784	1.00	0.00
ATOM	785	HA	VAL	140	102.953	56.928	41.353	1.00	0.00
ATOM	786	CB	VAL	140	102.097	57.565	39.496	1.00	0.00
ATOM	787	HB	VAL	140	101.235	56.966	39.754	1.00	0.00
ATOM	788	CG1	VAL	140	101.603	58.864	38.879	1.00	0.00
ATOM	789	HG11	VAL	140	102.438	59.534	38.736	1.00	0.00
ATOM	790	HG12	VAL	140	100.880	59.324	39.537	1.00	0.00
ATOM	791	HG13	VAL	140	101.141	58.657	37.925	1.00	0.00
ATOM	792	CG2	VAL	140	102.942	56.781	38.504	1.00	0.00
ATOM	793	HG21	VAL	140	103.172	55.809	38.915	1.00	0.00
ATOM	794	HG22	VAL	140	103.860	57.317	38.311	1.00	0.00
ATOM	795	HG23	VAL	140	102.394	56.661	37.581	1.00	0.00
ATOM	796	C	VAL	140	104.306	58.284	40.409	1.00	0.00
ATOM	797	O	VAL	140	104.500	59.336	39.801	1.00	0.00
ATOM	798	N	ILE	141	105.291	57.470	40.778	1.00	0.00
ATOM	799	HN	ILE	141	105.074	56.646	41.262	1.00	0.00
ATOM	800	CA	ILE	141	106.685	57.774	40.481	1.00	0.00

图 24T

ATOM	801	HA	ILE	141	106.718	58.728	39.974	1.00	0.00
ATOM	802	CB	ILE	141	107.524	57.882	41.769	1.00	0.00
ATOM	803	HB	ILE	141	108.432	57.315	41.629	1.00	0.00
ATOM	804	CG1	ILE	141	106.752	57.305	42.957	1.00	0.00
ATOM	805	HG11	ILE	141	106.399	56.316	42.702	1.00	0.00
ATOM	806	HG12	ILE	141	105.906	57.940	43.171	1.00	0.00
ATOM	807	CG2	ILE	141	107.908	59.330	42.032	1.00	0.00
ATOM	808	HG21	ILE	141	107.024	59.949	41.997	1.00	0.00
ATOM	809	HG22	ILE	141	108.608	59.660	41.279	1.00	0.00
ATOM	810	HG23	ILE	141	108.364	59.410	43.008	1.00	0.00
ATOM	811	CD1	ILE	141	107.579	57.194	44.219	1.00	0.00
ATOM	812	HD11	ILE	141	108.625	57.118	43.959	1.00	0.00
ATOM	813	HD12	ILE	141	107.280	56.314	44.769	1.00	0.00
ATOM	814	HD13	ILE	141	107.423	58.071	44.830	1.00	0.00
ATOM	815	C	ILE	141	107.298	56.711	39.576	1.00	0.00
ATOM	816	O	ILE	141	106.888	55.550	39.606	1.00	0.00
ATOM	817	N	ALA	142	108.281	57.122	38.775	1.00	0.00
ATOM	818	HN	ALA	142	108.556	58.062	38.805	1.00	0.00
ATOM	819	HA	ALA	142	109.685	56.795	37.297	1.00	0.00
ATOM	820	CB	ALA	142	109.715	55.140	38.623	1.00	0.00
ATOM	821	HB1	ALA	142	109.709	55.379	39.676	1.00	0.00
ATOM	822	HB2	ALA	142	110.735	55.092	38.271	1.00	0.00
ATOM	823	HB3	ALA	142	109.236	54.184	38.468	1.00	0.00
ATOM	824	CA	ALA	142	108.962	56.216	37.854	1.00	0.00
ATOM	825	C	ALA	142	107.982	55.582	36.872	1.00	0.00
ATOM	826	OT1	ALA	142	107.075	56.297	36.397	1.00	0.00
ATOM	827	OT2	ALA	142	108.131	54.375	36.585	1.00	0.00
TER	828								
END									

图 24U

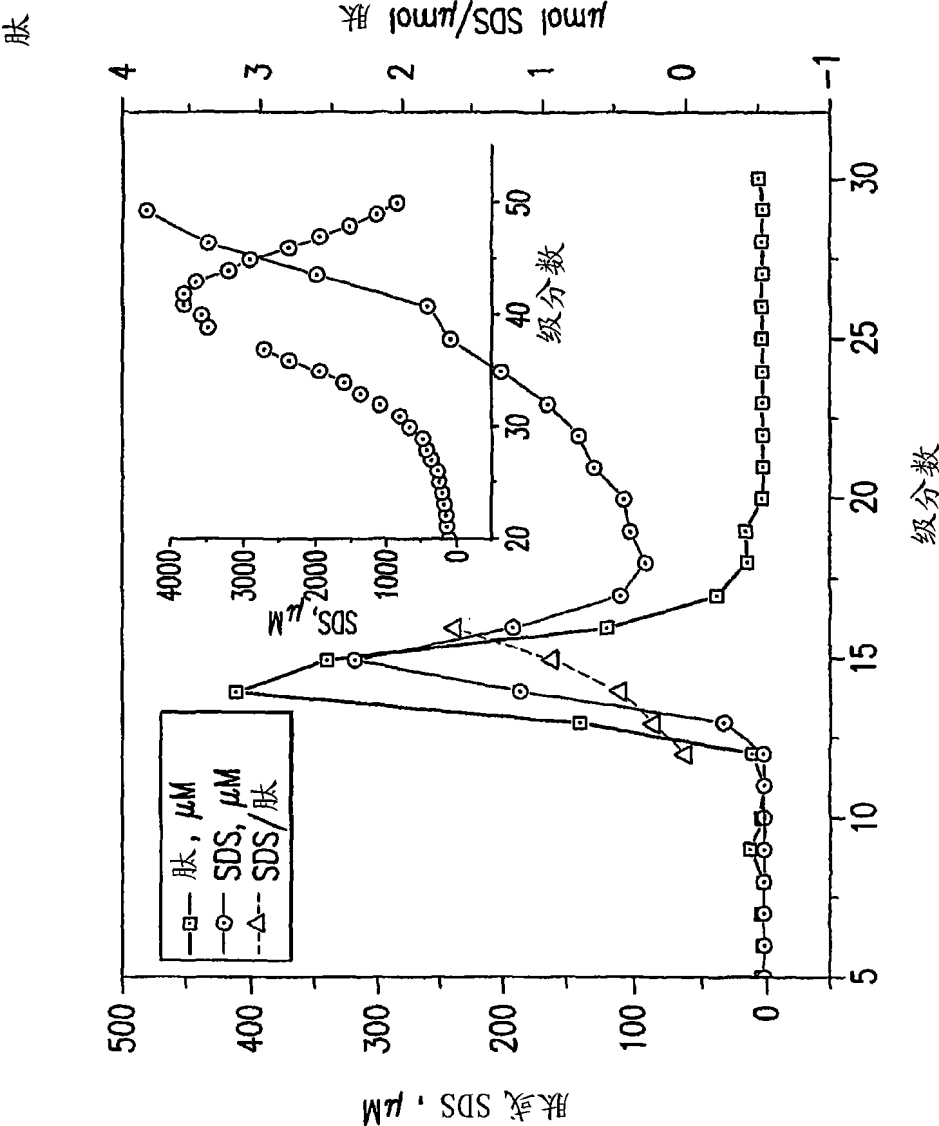


图 25

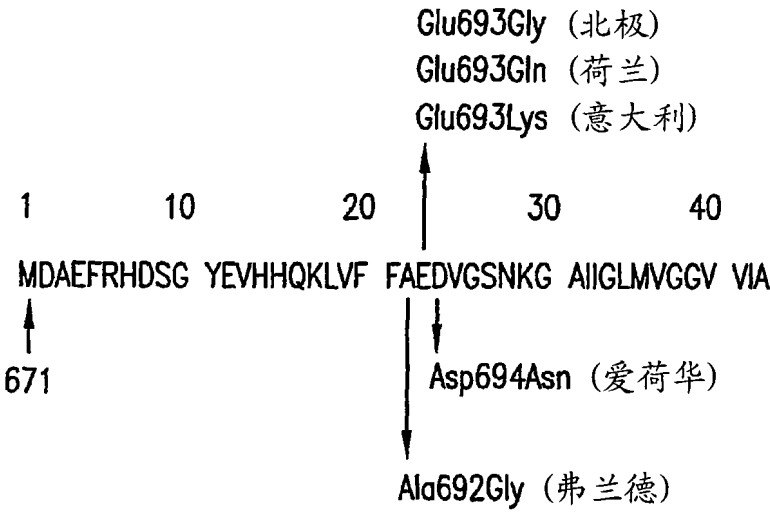
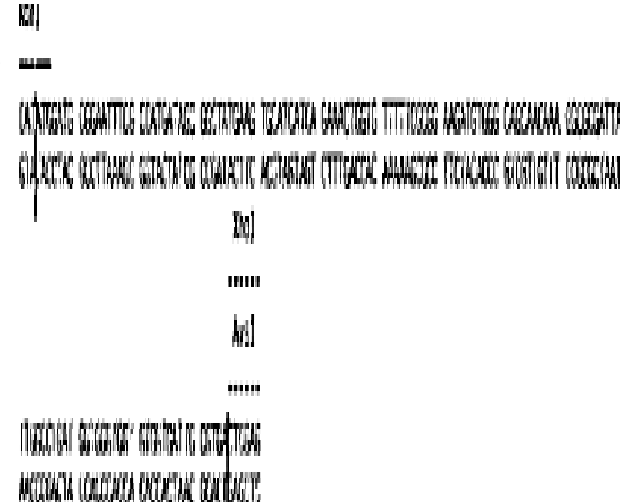


图 27

专利名称(译)	制备重组形式的人 β - 淀粉样蛋白的方法和这些蛋白质的应用		
公开(公告)号	CN101528770A	公开(公告)日	2009-09-09
申请号	CN200680051750.5	申请日	2006-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司 艾博特股份有限两合公司		
申请(专利权)人(译)	艾博特公司 艾博特股份有限两合公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾博特公司 艾博特股份有限两合公司		
[标]发明人	TF霍尔奇曼 JE哈兰 RP埃达尔吉 ET奥列尼查克 A佩拉达 罗佩斯 B拉布克沃斯基 L于		
发明人	T·F·霍尔奇曼 J·E·哈兰 R·P·埃达尔吉 E·T·奥列尼查克 A·佩拉达-罗佩斯 B·拉布克沃斯基 L·于		
IPC分类号	C07K14/47 C07K16/18 A61P25/00 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/4711 A61K38/00 C07K16/18 A61P25/00 A61P25/28		
代理人(译)	关立新 李连涛		
优先权	60/740866 2005-11-30 US 60/778947 2006-03-03 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	
-------	--

