



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112638932 A

(43) 申请公布日 2021.04.09

(21) 申请号 201980038572.X

(22) 申请日 2019.04.25

(30) 优先权数据

18169888.7 2018.04.27 EP

62/772,809 2018.11.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/029109 2019.04.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/210054 EN 2019.10.31

(71) 申请人 比奥根MA公司

地址 美国马萨诸塞州

申请人 生物有限公司

(72) 发明人 J. 格里姆 F. 蒙特拉西奥

I. 达尔基利克-利德尔 M.M. 拉什

J.W. 阿恩特

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int.Cl.

C07K 5/06 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

权利要求书4页 说明书87页

序列表54页 附图11页

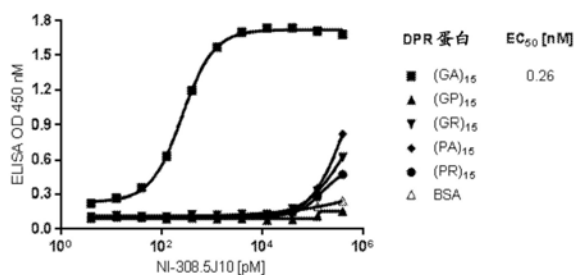
(54) 发明名称

人源性抗(聚-GA)二肽重复序列(DPR)抗体

(57) 摘要

提供了能够结合C9orf72聚甘氨酸-丙氨酸 DPR的新型二肽重复序列(DPR)特异性抗体(例如,人源性抗体)及其合成变体和生物技术衍生物;以及与所述抗体相关的方法和用途。本发明的抗体能够用于靶向DPR蛋白的免疫疗法和诊断剂的药物组合物和诊断组合物中。

NI-308.5J10



1. 一种能够结合如从9号染色体开放阅读框72 (C9orf72) 基因翻译的具有至少6个重复序列 (GA)₆ (SEQ ID NO:80) 的聚甘氨酸-丙氨酸 (GA) 的二肽重复序列 (DPR) 的抗体, 或其DPR结合片段, 其中所述抗体或其DPR结合片段在其可变区包含以下六个互补决定区 (CDR):

(a) VH-CDR1, 所述VH-CDR1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或其变体, 其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代,

(b) VH-CDR2, 所述VH-CDR2包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其变体, 其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代,

(c) VH-CDR3, 所述VH-CDR3包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或其变体, 其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代,

(d) VL-CDR1, 所述VL-CDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其变体, 其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代,

(e) VL-CDR2, 所述VL-CDR2包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或其变体, 其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代,

(f) VL-CDR3, 所述VL-CDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或其变体, 其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代, 任选地, 其中所述抗体是人源性抗体, 任选地, 其中所述抗体是单克隆抗体, 任选地, 其中所述抗体是人源性单克隆抗体。

2. 如权利要求1所述的抗体或其DPR结合片段, 所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含

(a) 包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或其变体的可变重 (V_H) 链, 其中所述变体包含一个或多个氨基酸取代; 以及

(b) 包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列或其变体的可变轻 (V_L) 链, 其中所述变体包含一个或多个氨基酸取代; 任选地其中

所述V_H和V_L链氨基酸序列分别与SEQ ID NO:2和7至少90%同一。

3. 如权利要求1或2所述的抗体或其DPR结合片段, 其中

(a) 所述CDR不含易脱酰胺的天冬酰胺 (N) 和/或谷氨酰胺 (Q); 和/或

(b) 所述V_H和/或V_L链氨基酸序列不含占据的糖基化位点。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的抗体或其DPR结合片段, 其中所述一个、两个或更多个氨基酸取代选自

(a) 用非易脱酰胺的氨基酸取代易脱酰胺的天冬酰胺 (N) 或谷氨酰胺 (Q);

(b) 用较大的氨基酸取代与易脱酰胺的N或Q直接相邻的小的柔性氨基酸, 任选地其中所述相邻氨基酸是甘氨酸 (G);

(c) 取代导致糖基化位点去除的至少一种氨基酸, 任选地其中所述至少一种氨基酸在糖基化基序NXS或NXT内; 和/或

(d) 取代一种或多种氨基酸, 其为保守性氨基酸取代,

任选地, 其中 (a) 和 (b) 的所述一个或多个氨基酸取代存在于VH-CDR2中, 并且 (c) 的所述一个或多个氨基酸取代存在于所述V_L链中, 其中

(i) 在VH-CDR2中, 对应于SEQ ID NO:2的位置54的天冬酰胺 (N) 和/或对应于SEQ ID NO:2的位置55的甘氨酸 (G) 被另一种氨基酸取代, 任选地其中所述天冬酰胺 (N) 被丝氨酸 (S) 或苏氨酸 (T) 取代, 和/或其中所述甘氨酸 (G) 被丝氨酸 (S) 或苏氨酸 (T) 取代; 和/或

(ii) 在所述 V_L 链中,对应于SEQ ID NO:7的位置75的天冬酰胺(N)被另一种氨基酸取代,任选地其中所述天冬酰胺(N)被天冬氨酸(D)取代。

5. 如权利要求1所述的抗体或其DPR结合片段,其中所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含以下六个CDR:

- (a) VH-CDR1,所述VH-CDR1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,
- (b) VH-CDR2,所述VH-CDR2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,
- (c) VH-CDR3,所述VH-CDR3包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,
- (d) VL-CDR1,所述VL-CDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,
- (e) VL-CDR2,所述VL-CDR2包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,以及
- (f) VL-CDR3,所述VL-CDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

6. 如权利要求1所述的抗体或其DPR结合片段,其中所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含以下六个CDR:

- (a) VH-CDR1,所述VH-CDR1包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列,
- (b) VH-CDR2,所述VH-CDR2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,
- (c) VH-CDR3,所述VH-CDR3包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,
- (d) VL-CDR1,所述VL-CDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,
- (e) VL-CDR2,所述VL-CDR2包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,以及
- (f) VL-CDR3,所述VL-CDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

7. 如权利要求5或6所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的 V_H 链。

8. 如权利要求5或6所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的 V_L 链。

9. 如权利要求5或6所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的 V_H 链和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的 V_L 链。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,其中

(i) 如通过表面等离子体共振 (SPR) 所测定,所述抗体或DPR结合片段对聚-(GA)₈肽 (SEQ ID NO:81) 具有的结合亲和力对应于 K_D (解离常数) 小于30nM,其中 K_a (缔合速率) 小于 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 且 K_d (解离速率) 小于 $10 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$,任选地其中如通过表面等离子体共振 (SPR) 所测定,所述DPR结合片段具有的结合亲和力对应于 K_D (解离常数) 为10nM至30nM,其中 K_a (缔合速率) 为1至 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 且 K_d (解离速率) 为 2.5 至 $10 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$;和/或

(ii) 如通过差示扫描量热法 (VP-DSC) 所测定,其Fab片段分别具有在78°C - 82°C范围内,任选地在约79°C - 81°C范围内的热稳定性和解链温度 T_m 。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段还包含与所述CDR或 V_H 和 V_L 链氨基酸序列任选地异源的异源多肽序列,任选地,其中所述异源多肽序列包含人恒定结构域,所述人恒定结构域任选地属于IgG型,最任选地属于IgG1类或同种型。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段

- (i) 仅在所述重复序列数量 $n \leq 6$ 时才结合至聚-GA肽；
- (ii) 识别聚-(GA)₁₅肽 (SEQ ID NO:66) 上的线性和构象表位；
- (iii) 以与相应疏水包被的肽基本相同的亲和力与偶联至BSA载体蛋白的聚-GA肽结合；
- (iv) 与不相关的淀粉样蛋白生成性蛋白质基本没有交叉反应性或具有最小交叉反应性；和/或
- (v) 能够结合从C9orf72-FTLD患者的小脑的颗粒细胞层中的C9orf72基因翻译的含DPR的蛋白质或其聚集形式。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的抗体,所述抗体选自由以下组成的组:单链Fv片段(scFv)、F(ab')片段、F(ab)片段和F(ab')₂片段,和/或所述抗体是嵌合鼠-人抗体或鼠源化抗体。

14. 一种或多种多核苷酸,所述多核苷酸编码如权利要求1至13中任一项所述的抗体或其DPR结合片段或其免疫球蛋白V_H或V_L链,任选地其中所述多核苷酸是cDNA和/或可操作地连接至异源核酸。

15. 一种或多种载体,所述载体包含如权利要求14所述的多核苷酸。

16. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含如权利要求14所述的多核苷酸或如权利要求15所述的载体。

17. 一种用于制备抗DPR抗体或其免疫球蛋白链的方法,所述方法包括

- (a) 培养如权利要求16所述的细胞;以及
- (b) 从培养物中分离所述抗体或其免疫球蛋白链。

18. 一种由如权利要求14所述的多核苷酸编码或通过如权利要求17所述的方法可获得的抗体或其DPR结合片段或免疫球蛋白链,任选地,其中所述抗体或其DPR结合片段或如权利要求1至13中任一项所述的抗体或其DPR结合片段

(i) 用选自由以下组成的组的标记可检测地标记:酶、放射性同位素、荧光团、标签、标记和重金属;或

(ii) 连接至药物。

19. 一种组合物,所述组合物包含如权利要求1至13或18中任一项所述的抗体或其DPR结合片段、如权利要求14所述的多核苷酸、如权利要求15所述的载体或如权利要求16所述的细胞,任选地其中所述组合物是

- (i) 药物组合物,并且还包含药学上可接受的载体,任选地其中所述组合物是疫苗;或
- (ii) 诊断组合物或药盒,任选地还包含常规用于基于免疫的诊断方法中的试剂。

20. 如权利要求1至13或18中任一项所述的抗体或其DPR结合片段、如权利要求14所述的多核苷酸、如权利要求15所述的载体或如权利要求16所述的细胞,其用于与含DPR的蛋白质或其聚集体形式相关或由含DPR的蛋白质或其聚集体形式引起的疾病的预防性治疗,任选地其中所述疾病选自由以下组成的组:肌萎缩性侧索硬化(ALS)、额颞叶变性(FTLD)和FTLD-ALS。

21. 如权利要求1至13或18中任一项所述的抗体或其DPR结合片段、如权利要求14所述的多核苷酸、如权利要求15所述的载体或如权利要求16所述的细胞,其用于与含DPR的蛋白质或其聚集体形式相关或由含DPR的蛋白质或其聚集体形式引起的疾病的治疗性治疗,任

选地其中所述疾病选自由以下组成的组：肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、额颞叶变性 (FTLD) 和 FTLD-ALS。

22. 如权利要求1至13或18中任一项所述的抗体或其DPR结合片段、如权利要求14所述的多核苷酸、如权利要求15所述的载体或如权利要求16所述的细胞，其用于体内检测人或动物体内的聚-GA DPR蛋白，例如聚集的聚-GA DPR蛋白，或靶向针对人或动物体内的聚-GA DPR蛋白，例如聚集的聚-GA DPR蛋白的治疗剂和/或诊断剂。

人源性抗(聚-GA)二肽重复序列(DPR)抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年4月27日提交的欧洲专利申请号18169888.7和2018年11月29日提交的美国临时申请号62/772,809的优先权。两个申请的内容以引用的方式整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经以电子方式以ASCII格式提交并且特此以引用的方式整体并入的序列表。2019年4月24日创建的所述ASCII拷贝名为13751-0309W01_SL.txt且大小为102,178字节。

技术领域

[0005] 本发明总体上涉及基于抗体的疗法和诊断方法。特别地,本发明涉及新型的人源性抗体以及其特异性地结合至非常规非ATG翻译的片段、衍生物和生物技术变体,特别是在9号染色体开放阅读框72(C9orf72)中发现的形成聚-甘氨酸-丙氨酸(聚-GA)二肽重复序列(DPR)的六核苷酸重复序列和包含此类DPR的抗原,它们分别可用于治疗和诊断由聚集的DPR和含DPR的蛋白质诱导的疾病和疾患。此外,本发明涉及包含所述抗体及其变体和其衍生物的药物和诊断组合物,所述药物和诊断组合物作为鉴定与DPR或其聚集体相关的疾病的诊断工具以及还作为用于治疗此类疾病的被动疫苗接种策略两者都是有价值的,所述疾病例如额颞叶变性(FTLD)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、FTLD-ALS和脊髓小脑性共济失调36型。

[0006] 发明背景

[0007] 额颞叶变性(FTLD)属于一组与脑的额叶和颞叶萎缩相关的临床、病理和遗传异质性病症。它是痴呆早期发作的第二大最常见原因。认知症状是可变的,并且包括痴呆、行为改变以及人格、语言功能障碍和/或精神病的改变,这是由于额叶和颞叶皮质的变性所致。由于其症状,FTLD可分为三组:(i)行为变异型额颞叶痴呆(bvFTLD),(ii)语义性痴呆(SD),或(iii)进行性非流畅型失语症(PNFA)。患有FTLD的患者在症状发作后5-10年死亡,因为没有合适的治疗方法。然而,已显示50%的FTLD患者具有阳性家族史,并且与肌萎缩性侧索硬化症(ALS)相比似乎代表了具有共同潜在发病机制的疾病连续体。尽管显示出两种常染色体显性病症在遗传和病理学上都是异质性的,参见例如,Vance等人,Brain 129(2006),868-876,遗传分析鉴定了位于C9orf72基因的非编码外显子1a与1b之间的杂合扩增的六核苷酸重复序列(GGGCC)作为FTLD和ALS的最常见遗传原因;参见例如,DeJesus-Hernandez等人,Neuron 72(2011),245-256和Renton等人,Neuron 72(2011),257-268。特别地,显示了三个交替阅读框中(即扩增的六核苷酸重复序列)的有义转录物的非常规非ATG翻译导致了三种不同多肽的产生、生成和聚集,每种多肽由两种氨基酸的重复单元(二肽重复序列,DPR)组成,即聚-(Gly-Ala;GA)、聚-(Gly-Pro;GP)和聚-(Gly-Arg;GR)。此外,相应反义转录物的翻译导致产生聚-(Pro-Arg;PR)、聚-(Pro-Ala;PA)和聚-(Gly-Pro;GP)。这些C9orf72-二肽重复序列(DPR)扩增显示出导致高达30%的FTLD患者、50%的ALS患者和80%的FTLD-

ALS患者,最高突变频率在美国和欧盟高加索群体中观察到。此外,与患有其他形式的FTLD和/或ALS的患者相比,具有带有超过19个重复序列的C9orf72-DPR扩增的患者的发病年龄较低、神经系统病症的发生率增加并且容易出现精神病或幻觉;参见例如,Harms等人,Neurobiol.Aging 34(2013),e13-e19。

[0008] 缺失用于与二肽重复序列(DPR)扩增相关的疾病和/或病症的治疗,例如减缓疾病进展的药物。迄今为止,医疗护理的主要重点在于提供药物来治疗通常非常有压力的伴随症状。

[0009] 在针对ALS、FTLD和其他神经变性疾病的C9orf72病理扩增的治疗靶向方面中的最近最突出的方法集中于反义寡核苷酸/RNA干扰(RNAi)策略,所述策略使用小分子化合物来抵消由源自重复序列转录(病灶)的RNA、由来自重复序列的二肽重复序列蛋白质(DPR)的翻译或由来自C9orf72扩增的RNA结合蛋白的螯合直接施加的毒性作用;以及基因疗法,不仅用于沉默毒性RNA/蛋白质,而且用于挽救由于C9orf72编码序列的转录减少或由于RNA病灶所融合的RNA结合蛋白的可用性降低而引起的单倍剂量不足;关于综述,参见例如,Misc.等人,Mol.Neurobiol.54(2017),4466-4476。

[0010] 尽管考虑靶向具有C9orf72的六核苷酸重复序列扩增的患者的脑中的DPR蛋白的抗体可能是吸引人的,但到目前为止,看起来这种方法似乎尚未被适当考虑,或者可能受所采用的实际方法的影响。例如,Edbauer等人的组描述了通过用聚集的(GA)₁₀肽(SEQ ID NO:72)免疫小鼠来产生针对由序列(Gly-Ala)的二肽重复序列组成的寡肽的抗体,所述聚集的(GA)₁₀肽显示与含有GA-DPR(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)的GST-融合蛋白结合;参见国际申请WO2014/114660。那些抗体中的一种(指定为GA-5F2)可显示抑制在体外共培养测定和细胞提取物中C9orf72聚-GA二肽重复序列蛋白的传播和聚集;参见Zhou等人EMBO Molecular Medicine 9(2017),687-702。

[0011] 然而,除了小鼠单克隆抗体易于在人体内引发人抗小鼠抗体(HAMA)响应的缺点外,由于单克隆抗体一直针对人工抗原而产生,因此尚不清楚DPR-GA₁₅的结合是否转化为对来自患有ALS、FTLD和其他神经变性病症的患者脑中存在的C9orf72基因的DPR蛋白的相应特异性和亲和力。

[0012] 确实,看起来学术界和工业界似乎仍在关注针对C9orf72ALS/FTLD的RNA靶向治疗策略;参见例如Simone等人,EMBO Molecular Medicine 10(2018),22-31的最新出版物和Schludi和Edbauer,EMBO Molecular Medicine 10(2018),4-6的评论,其报告了关于表达GGGGCC重复序列的果蝇中,靶向RNA G-四链体用于在体内和体外改善C9orf72 ALS/FTLD病理的令人鼓舞的结果。

[0013] 然而,基于RNA的治疗剂、小的有机化合物和基因疗法存在若干缺点,如RNA的固有不稳定性、所述化合物的潜在免疫原性性质以及需要有效转运至靶细胞的递送媒介物,以及关于基因疗法的应用的伦理问题仍然存在。

[0014] 因此,仍然需要开发在ALS、FTLD和其他神经变性病症的治疗中治疗性靶向C9orf72的病理性扩增的新药物,所述新药物对于由C9orf72基因的表达产物引起的疾病和病症具有特异性,并且任选地属于经过充分研究的药物类别,并且在人中可耐受。

[0015] 这种技术问题通过权利要求书中表征的并且在下文进一步描述并在实施例和附图中示出的实施方案得以解决。

发明内容

[0016] 本发明提供了在预防或治疗与DPR蛋白及其聚集形式相关的疾病和疾患中特别有用的人源性单克隆抗体,所述人源性单克隆抗体能够结合二肽重复序列(DPR)和由聚-甘氨酸-丙氨酸(Gly-Ala;GA)重复序列组成的含DPR蛋白(DPR蛋白),以及等效的DPR蛋白结合分子如本文举例说明的DPR结合片段、抗体的合成变体和生物技术衍生物。

[0017] 最近,已描述了一类人源性抗DPR抗体,所述抗体有望开发治疗C9orf72-ALS和FTLD患者的基于抗体的治疗性干预;参见国际申请WO 2016/050822,其公开内容以引用的方式并入本文。如其中所述,已经分别从无症状的神经系统疾患和神经变性疾患的患者中分离了抗DPR蛋白抗体及其编码可变区的cDNA;参见WO 2016/050822第3页和实施例。在根据本发明进行的进一步实验中,可鉴定并克隆抗聚-GA DPR抗体,命名为NI-308.5J10并且在下文中也称为“主题抗体”,其可显示具有独特的结合特性,如在不同结合测定中确定的,特别是在来自选定人C9orf72-FTLD患者的脑组织上;参见实施例11和图10。此外,如实施例9和图8所示,主题抗体与聚集的C9orf72聚-GA DPR(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)的结合不会被参考抗聚-GA抗体(NI-mAb参考)与靶标的结合所阻断,同时参考抗聚GA抗体与C9orf72 DPR肽的结合通过主题NI-308.5J10抗体与靶标的先前结合而消除。

[0018] 因此,尽管主题NI-308.5J10抗体和参考抗聚GA抗体两者均已选择并且识别C9orf72聚-GA DPR蛋白或其聚集形式,但出人意料地,主题抗体似乎识别聚-GA肽上的另外构象表位。这种性质使所述抗体特别适合用于在携带C9orf72六核苷酸重复序列扩增的患者中靶向C9orf72 DPR蛋白,因为聚-GA DPR蛋白聚集体经常与其他DPR蛋白和/或无关的聚集蛋白如p62和hnRNP A3共聚集(Mori等人,Acta Neuropathol.126(2013),881-893;Mann等人,Acta Neuropathologica.Communications(2013),1:68.doi:10.1186/2051-5960-1-68;Davidson等人,Acta Neuropathologica Communications(2017);5:31.doi:10.1186/s40478-017-0437-5)。

[0019] 此外,在本发明范围内进行的进一步实验揭示,CDR和框架区中易于脱酰胺或糖基化的氨基酸可被取代而不会丧失主题抗体的基本结合特性;参见实施例12至15和图11。

[0020] 因此,本发明还提供了原始人源性抗DPR抗体的变体和衍生物,所述变体和衍生物在CDR和/或框架区内含有一个或多个氨基酸取代,所述一个或多个氨基酸取代带来改进的抗体可制造性,同时抗体的结合特性和稳定性保持不受影响或甚至得到改进;参见实施例15和16。另外,由于CDR和/或可变区中仅有的微小修饰,还预期原始NI-308.5J10抗体的主题变体和衍生物在人中基本上是非免疫原性的。

[0021] 总之,如本申请中所公开的,本发明提供了一种人源性抗聚-GA抗体以及其变体和衍生物,其具有使其特别适用于靶向人脑中的C9orf72 DPR蛋白或其聚集形式的性质并且因此用于C9orf72 ALS/FTLD患者的免疫疗法。

[0022] 因此,本发明总体上涉及以下实施方案:

[0023] [1]一种能够结合如从9号染色体开放阅读框72(C9orf72)翻译的具有至少6个重复序列(GA)₆(SEQ ID NO:80)的聚甘氨酸-丙氨酸(GA)的二肽重复序列(DPR)的抗体,或其DPR结合片段,其中所述抗体或其DPR结合片段在其可变区包含以下六个互补决定区(CDR):

[0024] (a) VH-CDR1,所述VH-CDR1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列(例如,包含SEQ ID NO:78)或其变体,其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代,

- [0025] (b) VH-CDR2,所述VH-CDR2包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其变体,其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代,
- [0026] (c) VH-CDR3,所述VH-CDR3包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或其变体,其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代,
- [0027] (d) VL-CDR1,所述VL-CDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其变体,其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代,
- [0028] (e) VL-CDR2,所述VL-CDR2包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或其变体,其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代,
- [0029] (f) VL-CDR3,所述VL-CDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或其变体,其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代,
- [0030] 任选地,其中所述抗体是人源性抗体,任选地,其中所述抗体是单克隆抗体,任选地,其中所述抗体是人源性单克隆抗体。
- [0031] [2]如[1]所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含
- [0032] (a) 包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或其变体的可变重(V_H)链,其中所述变体包含一个或多个氨基酸取代;以及
- [0033] (b) 包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列或其变体的可变轻(V_L)链,其中所述变体包含一个或多个氨基酸取代;任选地其中
- [0034] 所述 V_H 和 V_L 链氨基酸序列分别与SEQ ID NO:2和7至少90%相同。
- [0035] [3]如[1]或[2]所述的抗体或其DPR结合片段,其中
- [0036] (a) 所述CDR不含易脱酰胺的天冬酰胺(N)和/或谷氨酰胺(Q);和/或
- [0037] (b) 所述 V_H 和/或 V_L 链氨基酸序列不含占据的糖基化位点。
- [0038] [4]如[1]至[3]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,其中所述一个、两个或更多个氨基酸取代选自
- [0039] (a) 用非易脱酰胺的氨基酸取代易脱酰胺的天冬酰胺(N)或谷氨酰胺(Q);
- [0040] (b) 用较大的氨基酸取代与易脱酰胺的N或Q直接相邻的小的柔性氨基酸,任选地其中所述相邻氨基酸是甘氨酸(G);
- [0041] (c) 取代导致糖基化位点去除的至少一种氨基酸,任选地其中所述至少一种氨基酸在糖基化基序NXS或NXT内;和/或
- [0042] (d) 取代为保守性氨基酸取代的一种或多种氨基酸。
- [0043] [5]如[4]所述的抗体或其DPR结合片段,其中(a)和(b)的所述一个或多个氨基酸取代存在于VH-CDR2中,并且(c)的所述一个或多个氨基酸取代存在于所述 V_L 链中。
- [0044] [6]如[5]所述的抗体或其DPR结合片段,其中
- [0045] (i) 在VH-CDR2中,对应于SEQ ID NO:2的位置54的天冬酰胺(N)和/或对应于SEQ ID NO:2的位置55的甘氨酸(G)被另一种氨基酸取代,任选地其中所述天冬酰胺(N)被丝氨酸(S)或苏氨酸(T)取代,和/或其中所述甘氨酸(G)被丝氨酸(S)或苏氨酸(T)取代;和/或
- [0046] (ii) 在所述 V_L 链中,对应于SEQ ID NO:7的位置75的天冬酰胺(N)被另一种氨基酸取代,任选地其中所述天冬酰胺(N)被天冬氨酸(D)取代。
- [0047] [7]如[1]至[6]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,其中如通过表面等离子体

共振 (SPR) 所测定, 所述抗体或 DPR 结合片段对聚-(GA)₈ 肽 (SEQ ID NO:81) 具有的结合亲和力对应于 K_D (解离常数) 小于 30nM, 其中 K_a (缔合速率) 小于 $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 且 K_d (解离速率) 小于 $10 \times 10^{-3} s^{-1}$, 任选地其中如通过表面等离子体共振 (SPR) 所测定, 所述 DPR 结合片段对具有的结合亲和力对应于 K_D (解离常数) 为 10nM 至 30nM, 其中 K_a (缔合速率) 为 1 至 $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 且 K_d (解离速率) 为 2.5 至 $10 \times 10^{-3} s^{-1}$ 。

[0048] [8] 如 [1] 至 [7] 中任一项所述的抗体或其 DPR 结合片段, 其中如通过差示扫描量热法 (VP-DSC) 所测定, 其 Fab 片段分别具有在 78°C - 82°C 范围内, 例如在约 79°C - 81°C 范围内的热稳定性和解链温度 T_m 。

[0049] [9] 如 [1] 至 [8] 中任一项所述的抗体或其 DPR 结合片段, 所述抗体或其 DPR 结合片段在其可变区中包含

[0050] (i) 以下六个 CDR:

[0051] (a) VH-CDR1, 所述 VH-CDR1 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列 (例如, 包含 SEQ ID NO:78),

[0052] (b) VH-CDR2, 所述 VH-CDR2 包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列,

[0053] (c) VH-CDR3, 所述 VH-CDR3 包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列,

[0054] (d) VL-CDR1, 所述 VL-CDR1 包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列,

[0055] (e) VL-CDR2, 所述 VL-CDR2 包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列,

[0056] (f) VL-CDR3, 所述 VL-CDR3 包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列;

[0057] (ii) 以下六个 CDR:

[0058] (a) VH-CDR1, 所述 VH-CDR1 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列 (例如, 包含 SEQ ID NO:78),

[0059] (b) VH-CDR2, 所述 VH-CDR2 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列,

[0060] (c) VH-CDR3, 所述 VH-CDR3 包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列,

[0061] (d) VL-CDR1, 所述 VL-CDR1 包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列,

[0062] (e) VL-CDR2, 所述 VL-CDR2 包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列,

[0063] (f) VL-CDR3, 所述 VL-CDR3 包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列;

[0064] (iii) 以下六个 CDR:

[0065] (a) VH-CDR1, 所述 VH-CDR1 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列 (例如, 包含 SEQ ID NO:78),

[0066] (b) VH-CDR2, 所述 VH-CDR2 包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列,

[0067] (c) VH-CDR3, 所述 VH-CDR3 包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列,

[0068] (d) VL-CDR1, 所述 VL-CDR1 包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列,

[0069] (e) VL-CDR2, 所述 VL-CDR2 包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列,

[0070] (f) VL-CDR3, 所述 VL-CDR3 包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列;

[0071] (iv) 以下六个 CDR:

[0072] (a) VH-CDR1, 所述 VH-CDR1 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列 (例如, 包含 SEQ ID NO:78),

[0073] (b) VH-CDR2, 所述 VH-CDR2 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列,

[0074] (c) VH-CDR3, 所述 VH-CDR3 包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列,

- [0075] (d) VL-CDR1,所述VL-CDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,
- [0076] (e) VL-CDR2,所述VL-CDR2包含SEQ IDNO:9的氨基酸序列,
- [0077] (f) VL-CDR3,所述VL-CDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;或
- [0078] (v) 以下六个CDR:
- [0079] (a) VH-CDR1,所述VH-CDR1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列(例如,包含SEQ ID NO:78),
- [0080] (b) VH-CDR2,所述VH-CDR2包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,
- [0081] (c) VH-CDR3,所述VH-CDR3包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,
- [0082] (d) VL-CDR1,所述VL-CDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,
- [0083] (e) VL-CDR2,所述VL-CDR2包含SEQ IDNO:9的氨基酸序列,
- [0084] (f) VL-CDR3,所述VL-CDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。
- [0085] [9a]如[1]至[8]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含以下六个CDR:
- [0086] (a) VH-CDR1,所述VH-CDR1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列(例如,包含SEQ ID NO:78),
- [0087] (b) VH-CDR2,所述VH-CDR2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,
- [0088] (c) VH-CDR3,所述VH-CDR3包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,
- [0089] (d) VL-CDR1,所述VL-CDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,
- [0090] (e) VL-CDR2,所述VL-CDR2包含SEQ IDNO:9的氨基酸序列,以及
- [0091] (f) VL-CDR3,所述VL-CDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。
- [0092] [10]如[1]至[9a]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含
- [0093] (i) 如SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:24中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0094] (ii) 如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:24中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0095] (iii) 如SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:24中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0096] (iv) 如SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:24中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0097] (v) 如SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:24中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0098] (vi) 如SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:7中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0099] (vii) 如SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:7中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0100] (viii) 如SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:7中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0101] (ix) 如SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:7中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;或
- [0102] (x) 如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:7中所示的V_H和V_L链氨基酸序列。
- [0103] [10a]如[1]至[10]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含V_H链,所述V_H链包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
- [0104] [10b]如[1]至[10a]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含V_L链,所述V_L链包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
- [0105] [10c]如[1]至[10b]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结

合片段在其可变区中包含 V_H 链,所述 V_H 链包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0106] [10d]如[1]至[10c]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含 V_L 链,所述 V_L 链包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0107] [10e]如[1]至[10d]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含 V_H 链,所述 V_H 链包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0108] [10f]如[1]至[10e]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含 V_L 链,所述 V_L 链包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列。

[0109] [10g]如[1]至[10f]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含 V_H 链,所述 V_H 链包含相对于SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有1、2或3个添加、取代或缺失的SEQ ID NO:12的氨基酸序列的变体。

[0110] [10h]如[1]至[10g]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含 V_L 链,所述 V_L 链包含相对于SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有1、2或3个添加、取代或缺失的SEQ ID NO:24的氨基酸序列的变体。

[0111] [10i]如[1]至[10h]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含 V_H 链,所述 V_H 链包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0112] [10j]如[1]至[10i]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含 V_L 链,所述 V_L 链包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

[0113] [11]如[1]至[10j]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段还包含与所述CDR或 V_H 和 V_L 链氨基酸序列任选地异源的异源多肽序列,任选地,其中所述异源多肽序列包含人恒定结构域,所述人恒定结构域任选地具有IgG型,任选地具有IgG1类或同种型。

[0114] [11a]如[11]所述的抗体或其DPR结合片段,其中所述异源多肽序列与所述CDR是异源的。

[0115] [11b]如[11]所述的抗体或其DPR结合片段,其中所述异源多肽序列与所述 V_H 和 V_L 是异源的。

[0116] [11c]如[11]至[11b]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,其中所述异源多肽序列是轻链恒定结构域,任选地具有 κ 型。

[0117] [11d]如[11]至[11b]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,其中所述异源多肽序列是异源哺乳动物分泌信号肽。

[0118] [12]如[1]至[11d]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,任选地,所述抗体或其DPR结合片段仅在重复序列数目 $n \geq 6$ 时才结合至聚-GA肽。

[0119] [13]如[1]至[12]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,其中所述抗体识别聚-(GA)₁₅肽(SEQ ID NO:66)上的线性和构象表位。

[0120] [14]如[1]至[13]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,其中如通过生物层干涉测量法所测定,所述抗体以约(0.05-0.5nM,任选地0.1-0.2nM)的亲和力KD结合至聚-(GA)₁₅

肽 (SEQ ID NO:66), 其中缔合速率常数为 ($K_a = 0.5 - 5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) 且解离常数为 ($K_d = 1 - 5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$)。

[0121] [15] 如 [1] 至 [14] 中任一项所述的抗体或其 DPR 结合片段, 其中所述抗体以对相应的疏水性包被的肽基本相同的亲和力结合至与 BSA 载体蛋白偶联的聚-GA 肽。

[0122] [16] 如 [1] 至 [15] 中任一项所述的抗体或其 DPR 结合片段, 所述抗体或其 DPR 结合片段对不相关的淀粉样蛋白生成性蛋白基本上没有交叉反应性或具有最小交叉反应性。

[0123] [17] 如 [1] 至 [16] 中任一项所述的抗体或其 DPR 结合片段, 其中所述抗体能够结合如从 C9orf72-FTLD 患者的小脑的颗粒细胞层中的 C9orf72 基因翻译的含 DPR 的蛋白质或其聚集形式。

[0124] [18] 如 [1] 至 [17] 中任一项所述的抗体或其 DPR 结合片段, 如果将所述抗体或其 DPR 结合片段施用至转基因 C9orf72 小鼠模型, 则所述抗体或其 DPR 结合片段能够改善 C9orf72 疾病的病理学标志的至少一种症状, 如神经元丢失、行为异常、运动障碍和存活率降低。

[0125] [19] 如 [1] 至 [18] 中任一项所述的抗体, 所述抗体选自由以下组成的组: 单链 Fv 片段 (scFv)、F(ab') 片段、F(ab) 片段和 F(ab')₂ 片段。

[0126] [20] 如 [1] 至 [19] 中任一项所述的抗体, 所述抗体是嵌合鼠-人抗体或鼠源化抗体。

[0127] [21] 一种或多种多核苷酸, 所述多核苷酸编码如 [1] 至 [20] 中任一项所述的抗体或其 DPR 结合片段或其免疫球蛋白 V_H 或 V_L 链, 任选地其中所述多核苷酸是 cDNA 和/或可操作地连接至异源核酸。

[0128] [21a] 一种多核苷酸, 所述多核苷酸编码如 [1] 至 [20] 中任一项所述的抗体或其 DPR 结合片段的 V_H 链, 其中当与包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的 V_L 链配对时, 所述 V_H 链结合至如从 C9orf72 基因翻译的具有至少 6 个重复序列的聚-GA 的 DPR 或其 DPR 结合片段, 任选地其中所述多核苷酸是 cDNA 和/或可操作地连接至异源核酸。

[0129] [21b] 一种多核苷酸, 所述多核苷酸编码如 [1] 至 [20] 中任一项所述的抗体或其 DPR 结合片段的 V_L 链, 其中当与包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的 V_H 链配对时, 所述 V_L 链结合至如从 C9orf72 基因翻译的具有至少 6 个重复序列的聚-GA 的 DPR 或其 DPR 结合片段, 任选地其中所述多核苷酸是 cDNA 和/或可操作地连接至异源核酸。

[0130] [21c] 如 [21] 至 [21b] 中任一项所述的多核苷酸, 其中所述异源核酸是调控元件。

[0131] [21d] 如 [21] 至 [21b] 中任一项所述的多核苷酸, 其中所述异源核酸是启动子、增强子、核糖体结合位点或转录终止子, 任选地其中所述启动子是巨细胞病毒立即早期启动子。

[0132] [21e] 如 [21] 至 [21b] 中任一项所述的多核苷酸, 其中所述异源核酸编码分泌信号肽, 任选地其中所述分泌信号肽是哺乳动物信号肽。

[0133] [22] 一种或多种载体, 所述载体包含如 [21] 至 [21e] 中任一项所述的多核苷酸。

[0134] [23] 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含如 [21] 至 [21e] 中任一项所述的多核苷酸或如 [22] 所述的载体。

[0135] [24] 如 [21] 至 [21e] 中任一项所述的多核苷酸、如 [22] 所述的载体或如 [30] 所述的宿主细胞用于生产抗 DPR 抗体的用途。

- [0136] [25]一种用于制备抗DPR抗体或其免疫球蛋白链的方法,所述方法包括
- [0137] (a) 培养如[23]所述的细胞;以及
- [0138] (b) 从培养物中分离所述抗体或其免疫球蛋白链。
- [0139] [26]一种抗体或其DPR结合片段或免疫球蛋白链,其由如[21]至[21e]中任一项所述的多核苷酸编码或通过如[25]所述的方法或如[24]所述的用途可获得。
- [0140] [27]如[1]至[20]或[26]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,所述抗体或其DPR结合片段
- [0141] (i) 用选自由以下组成的组的标记可检测地标记:酶、放射性同位素、荧光团、标签、标记和重金属;或
- [0142] (ii) 连接至药物。
- [0143] [28]一种组合物,所述组合物包含如[1]至[20]、[26]或[27]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段、如[21]至[21e]中任一项所述的多核苷酸或如[22]所述的载体或如[23]所述的细胞。
- [0144] [29]如[28]所述的组合物,所述组合物是药物组合物并且还包含药学上可接受的载体,任选地其中所述组合物是疫苗。
- [0145] [30]一种制备用于治疗与含DPR的蛋白质或其聚集形式相关或由含DPR的蛋白质或其聚集形式引起的病症的药物组合物的方法,所述方法包括:
- [0146] (a) 培养如[23]所述的细胞;
- [0147] (b) 从达到药物级的培养物中纯化所述抗体或其免疫球蛋白链;以及
- [0148] (c) 将其抗体与药学上可接受的载体掺混
- [0149] [31]如[28]所述的组合物,所述组合物是诊断组合物或药盒,任选地还包含常规用于基于免疫的诊断方法中的试剂。
- [0150] [32]如[1]至[20]、[26]或[27]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段、如[21]所述的多核苷酸、如[22]所述的载体或如[23]所述的细胞,其用于与含DPR的蛋白质或其聚集形式相关或由含DPR的蛋白质或其聚集形式引起的疾病的预防性治疗。
- [0151] [32a]如[1]至[20]、[26]或[27]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段、如[21]所述的多核苷酸、如[22]所述的载体或如[23]所述的细胞,其用于与含DPR的蛋白质或其聚集形式相关或由含DPR的蛋白质或其聚集形式引起的疾病的治疗性治疗。
- [0152] [32b]如[1]至[20]、[26]或[27]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段、如[21]所述的多核苷酸、如[22]所述的载体或如[23]所述的细胞,其用于与含DPR的蛋白质或其聚集形式相关或由含DPR的蛋白质或其聚集形式引起的疾病的预防性和治疗性治疗。
- [0153] [33]用于根据[32]至[32b]中任一项所述的用途的抗体或其DPR结合片段、多核苷酸、载体或细胞,其中所述疾病选自由以下组成的组:额颞叶变性(FTLD)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和FTLD-ALS。
- [0154] [34]用于根据[32]至[32b]和[33]中任一项所述的用途的抗体或其DPR结合片段、多核苷酸、载体或细胞,其中所述抗体在施用至转基因C9orf72小鼠模型时能够改善C9orf72疾病的病理学标志的至少一种症状,如神经元丢失、行为异常、运动障碍和存活率降低。
- [0155] [35]如[1]至[20]、[26]或[27]中任一项所述的抗体或其DPR结合片段,其用于体

内检测人或动物体内的聚-GA DPR蛋白,例如聚集的聚-GA DPR蛋白,或靶向针对人或动物体内的聚-GA DPR蛋白,例如聚集的聚-GA DPR蛋白的治疗剂和/或诊断剂。

[0156] [36]用于根据[35]所述的用途的抗体或其DPR结合片段,其中所述体内成像包括正电子发射断层摄影术(PET)、单光子发射断层摄影术(SPECT)、近红外(NIR)、光学成像或磁共振成像(MRI)。

[0157] 此外,本文提供了DPR Ab-1抗体或其片段。另外,本文提供了一种抗DPR抗体或其片段,所述抗DPR抗体或其片段包含表12中所述的互补决定区(CDR)、重链序列、轻链序列、可变结构域序列和/或恒定结构域序列。在实施方案中,所述抗DPR抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的轻链。

[0158] 本文还提供了一种核酸分子,所述核酸分子包含:

[0159] (i) 编码抗DPR抗体的重链的核酸序列,所述重链具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列;和/或

[0160] (ii) 编码抗DPR抗体的轻链的核酸序列,所述轻链具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列,任选地其中所述核酸序列(i)和(ii)位于同一核酸分子上或单独的核酸分子上,

[0161] 任选地其中所述核酸分子包含cDNA和/或可操作地连接至异源核酸。

[0162] 本文还提供了一种核酸分子,所述核酸分子包含SEQ ID NO:51-58的核苷酸序列中的一个或多个。

[0163] 本文还提供了一种载体,所述载体包含本文所述的核酸分子。

[0164] 本文还提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞包含(i)本文所述的核酸分子或(ii)本文所述的载体。

[0165] 在一些方面,本文提供了本文所述的核酸分子、载体或宿主细胞用于产生抗DPR抗体或其片段的用途。

[0166] 在一些方面,本文提供了一种产生抗DPR抗体或其片段的方法,所述方法包括:(i)培养本文所述的宿主细胞;以及(ii)从培养物中分离所述抗体或其片段。

[0167] 本文还提供了一种组合物,例如药物组合物,所述组合物包含本文所述的抗DPR抗体或其片段、本文所述的核酸分子、本文所述的载体或本文所述的宿主细胞。在实施方案中,所述药物组合物包含药学上可接受的载体。在实施方案中,所述组合物是诊断组合物或药盒,例如还包含常规用于基于免疫的诊断方法中的试剂。

[0168] 还提供了一种治疗有需要的受试者的与含DPR的蛋白质聚集体相关或由含DPR的蛋白质聚集体(例如含C9ORF72 DPR的蛋白质聚集体)引起的疾病(例如,肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、额颞叶变性(FTLD)或FTLD-ALS)的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所述的抗DPR抗体或其片段(例如,DPR Ab-1,例如含有表12种所示的氨基酸序列),从而治疗所述受试者的病症(例如,ALS、FTLD或FTLD-ALS)。

[0169] 还提供了一种制备用于治疗与含DPR的蛋白质或其聚集形式相关或由含DPR的蛋白质或其聚集形式引起的病症(例如,ALS、FTLD或FTLD-ALS)的药物组合物的方法,所述方法包括:(i)培养本文所述的宿主细胞;(ii)从达到药物级的培养物中分离和/或纯化所述抗体或其片段;以及(iii)将所述抗体或其片段与药学上可接受的载体混合。

[0170] 本文提供了一种本文所述的抗DPR抗体或其片段(例如,DPRAb-1,例如,含有表12中所示的氨基酸序列)、本文所述的核酸分子、本文所述的载体或本文所述的宿主细胞,其

用于治疗(例如,预防性和/或治疗性治疗)与含DPR的蛋白质或其聚集形式相关或由含DPR的蛋白质或其聚集形式引起的病症(例如,ALS、FTLD或FTLD-ALS)。

[0171] 本文提供了本文所述的抗DPR抗体或其片段(例如,DPR Ab-1,例如,含有表12中所示的氨基酸序列)、本文所述的核酸分子、本文所述的载体或本文所述的宿主细胞用于制备用于治疗(例如,预防性和/或治疗性治疗)与含DPR的蛋白质或其聚集形式相关或由含DPR的蛋白质或其聚集形式引起的病症(例如,ALS、FTLD或FTLD-ALS)的药物的用途。

[0172] 通过以下描述和实施例,本发明的其他实施方案将是显而易见的。

附图说明

[0173] 图1:人抗体NI-308.5J10及其变体的可变区的氨基酸序列。示出框架(FR)区和互补决定区(CDR),其中CDR加下划线。使用了Kabat编号方案(参见<http://www.bioinf.org.uk/abs/>;Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,"Sequence of Proteins of Immunological Interest"(1983),在所提及的网络参考文献中引用并在W0 2016/050822 A2中第39和40页的表1中给出,以引用的方式并入本文。除非另外指定,否则提到在本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物中编号具体氨基酸残基位置是根据Kabat编号系统,然而,这是理论上的,并且可能并不等同地适用于本发明的每种抗体。例如,取决于第一CDR的位置,随后的CDR可能在任一方向上移动。因此,本领域技术人员基于本申请的公开内容,在关于图1中的CDR和/或序列表的指示存在任何意外的错误或不一致的情况下,即抗体NI-308.5J10的可变重(V_H)和可变轻(V_L)链氨基酸序列处于适合根据Kabat确定正确CDR序列的位置,其应用于定义要求保护的抗体及其DPR结合片段。(A)抗体NI-308.5J10的可变重链VH和轻链VK序列,如SEQ ID NO:2和7中所示;(B)具有氨基酸取代N54S的抗体NI-308.5J10变体的可变重链序列VH,如SEQ ID NO:12中所示。可变重链和轻链序列的CDR内的优选氨基酸取代以粗体表示,包括(c)至(e)中所示的可变重链序列和(f)中所示的可变轻链序列中存在的那些。如说明书中进一步解释的那样,在CDR和/或框架区内,保守性氨基酸取代是优选的,其考虑到单独或与相邻氨基酸一起的原始氨基酸的物理化学性质,如Mirsky等人,Mol.Biol.Evol.32(2014)806-819在813页、图6特别是LG模型中所述,例如,使得两种氨基酸的位置发生了变化,例如在VL-CDR3中"PS"与"SP",其已在具有相似但不相同的结合特性的人源性抗聚GA抗体的可变轻链中发现,可能是由于一个或多个其他CDR中的两个以上氨基酸取代所致。(C)具有氨基酸取代N54T的抗体NI-308.5J10变体的可变重链序列VH,如SEQ ID NO:15中所示;(D)具有氨基酸取代G55S的抗体NI-308.5J10变体的可变重链序列VH,如SEQ ID NO:18中所示;(E)具有氨基酸取代G55T的抗体NI-308.5J10变体的可变重链序列VH,如SEQ ID NO:21中所示;(F)具有氨基酸取代N75D的抗体NI-308.5J10变体的可变轻链序列VK,如SEQ ID NO:24中所示。

[0174] 图2:C9orf72二肽重复序列蛋白质的结合特异性和 EC_{50} 测定。人源性NI-308.5J10抗体针对C9orf72二肽重复序列蛋白质肽(GA)₁₅(■)(SEQ ID NO:66)、(GP)₁₅(▲)(SEQ ID NO:67)、(GR)₁₅(▼)(SEQ ID NO:68)、(PA)₁₅(◆)(SEQ ID NO:69)、(PR)₁₅(●)(SEQ ID NO:70)和BSA对照(△)的 EC_{50} 通过间接ELISA确定。抗体NI-308.5J10以0.26nM的结合亲和力特异性地识别C9orf72 DPR蛋白肽(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)。

[0175] 图3:BSA偶联和未偶联的C9orf72二肽重复序列蛋白质肽的 EC_{50} 测定。使用间接

ELISA人源性NI-308.5J10抗体对BSA偶联(▲)和未偶联(■)的C9orf72二肽重复序列蛋白质肽(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)、(GP)₁₅(SEQ ID NO:67)、(GR)₁₅(SEQ ID NO:68)、(PR)₁₅(SEQ ID NO:69)、(PA)₁₅(SEQ ID NO:70)或BSA对照(△)的半最大有效浓度(EC₅₀)的测定。抗体NI-308.5J10以相似的结合亲和力识别BSA偶联(0.16nM)和未偶联(0.23nM)的C9orf72 DPR蛋白肽。

[0176] 图4:人源性抗(聚-GA) DPR抗体NI-308.5J10与不相关的聚集蛋白质的结合特异性分析。通过间接ELISA测定抗体与C9orf72(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)、(GP)₁₅(SEQ ID NO:67)、(GR)₁₅(SEQ ID NO:68)、(PR)₁₅(SEQ ID NO:70)和(PA)₁₅(SEQ ID NO:69)肽和5种不相关的淀粉样蛋白生成性蛋白质的结合。抗体NI-308.5J10-显示与C9orf72(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)肽的结合,而没有与不相关的分析物的显著脱靶结合。在20nM浓度下对NI-308.5J10抗体进行测试。

[0177] 图5:NI-308.5J10抗体对C9orf72二肽重复序列蛋白质的结合选择性。通过蛋白质印迹分析确定人源性抗体NI-308.5J10 C9orf72对BSA偶联的C9orf72二肽重复序列蛋白质肽(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)、(GP)₁₅(SEQ ID NO:67)、(GR)₁₅(SEQ ID NO:68)、(PA)₁₅(SEQ ID NO:69)和(PR)₁₅(SEQ ID NO:70)的结合选择性。C9orf72聚-GA DPR蛋白被抗体NI-308.5J10识别。

[0178] 图6:抗体NI-308.5J10的C9orf72 DPR蛋白重复序列长度依赖性结合。通过间接ELISA测定人源性NI-308.5J10抗体对C9orf72聚-GA二肽重复序列蛋白质肽的二肽重复序列长度依赖性结合特异性和半数最大有效浓度EC₅₀)。抗体NI-308.5J10分别以在13.8nM、0.30nM和0.29nM的EC₅₀下的结合亲和力靶向DPR蛋白肽(GA)₆(SEQ ID NO:80)、(GA)₁₀(SEQ ID NO:79)和(GA)₂₀(SEQ ID NO:82)。图6按出现顺序分别公开了SEQ ID NO:77、76、75、74、73、72和71。

[0179] 图7:通过生物层干涉测量法表征NI-308.5J10与聚-GA C9orf72二肽重复序列蛋白质肽的结合。使用生物层干涉测量法测定抗体NI-308.5J10对C9orf72二肽重复序列蛋白质肽(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)的结合常数KD、K_a和K_d。显示NI-308.5J10与固定的合成(GA)₁₅肽(SEQ ID NO:66)的结合的生物层干涉测量法(BLI)传感图。抗体以各种浓度运行:30、15、7.5、3.75和1.875nM。一式三份进行测量。传感图显示每种测试的抗体浓度的单次测量值,但最高浓度则另外显示了第二数据集。抗体NI-308.5J10显示KD为(1.5±0.2)×10⁻¹⁰M,K_a为(1.63±0.05)×10⁵M⁻¹s⁻¹并且K_d为(2.4±0.4)×10⁻⁵s⁻¹。

[0180] 图8:通过生物层干涉测量法表征NI-308.5J10和参考人源性抗聚-GA DPR抗体(NI-mAb参考)与聚-GA C9orf72 DPR肽的竞争性结合。使用生物层干涉测量法测定抗体NI-308.5J10和NI-mAb参考针对C9orf72 DPR肽(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)的竞争结合模式。生物层干涉测量法(BLI)传感图,显示NI-308.5J10(A)和NI-mAb参考(B)针对固定的合成(GA)₁₅肽(SEQ ID NO:66)的竞争性结合。

[0181] 图9:抗体NI-308.5J10的完整性分析。SDS-PAGE分析、然后对2或10μg重组人源性NI-308.5J10抗C9orf72聚-GA DPR抗体进行考马斯亮蓝染色。检测到对应于预期大小的抗体重链和轻链的两个主要条带。

[0182] 图10:NI-308.5J10检测FTLD患者中的病理性C9orf72二肽重复序列蛋白质聚集体。(A)人源性NI-308.5J10抗体在选定C9orf72-FTLD病例的小脑颗粒细胞层中揭示了病理

性神经元细胞质内含物、神经元核内内含物和营养不良的神经突。相比之下,非神经系统对照小脑对NI-308.5J10染色呈阴性。(B)通过抗体NI-308.5J10检测到的选定C9orf72-FTLD病例的小脑颗粒细胞层中神经元C9orf72 DPR内含物的代表性高倍放大图像。

[0183] 图11:其中已绘制了突变N54S、N54T、G55S、G55T和N75D的NI-308.5J10抗体的晶体结构。如从晶体结构可得出,翻译后修饰远离抗体的结合位点。

[0184] 图12:NI-308.5J10抗体变体的完整性分析。由N75D轻链与每个重链突变体的组合组成的工程化的NI-308.5J10抗体变体可作为完整的人IgG1且还作为Fab产生。通过SDS-PAGE分析纯化的蛋白质的大小和同质性,上:人IgG1:泳道1,NI-308.5J10WT/WT;泳道2,NI-308.5J10变体WT/N75D;泳道3,NI-308.5J10变体N54S/N75D;泳道4,NI-308.5J10变体N54T/N75D;泳道5,NI-308.5J10变体G55S/N75D;泳道6,NI-308.5J10变体G55T/N75D;下:his标记的Fab:泳道1,WT-Fab-6His/WT NI-308.5J10;泳道2,NI-308.5J10变体WT-Fab-6His/N75D;泳道3,NI-308.5J10变体N54S-Fab-6His/N75D;泳道4,NI-308.5J10变体N54T-Fab-6His/N75D;泳道5,NI-308.5J10变体G55S-Fab-6His/N75D;泳道6,NI-308.5J10变体G55T-Fab-6His/N75D。所有蛋白质均显示出预期的大小,没有明显的聚集体或蛋白水解产物。

[0185] 图13A:DPR Ab-1 Fab与GA(例如聚(GA)的结合。如表面等离子体共振所示,DPR Ab-1的Fab片段结合(GA)₈重复序列(SEQ ID NO:81)。

[0186] 图13B:如晶体结构所示,DPR Ab-1的Fab片段结合GA重复序列肽。

具体实施方式

[0187] 本发明总体上涉及用于检测与二肽重复序列(DPR)蛋白质且特别是其聚集形式相关的疾病和疾患的免疫疗法和非侵入性方法。更具体地,本发明涉及重组人源性单克隆抗体及其DPR结合片段,所述抗体及其DPR结合片段基于从选定的人供体群体获得的序列信息产生并且能够结合至此类DPR,特别是聚甘氨酸-丙氨酸(Gly-Ala;GA)-DPR和含有此类DPR的蛋白质。本发明的重组人源性单克隆抗体以及其合成和生物技术衍生物有利地特征在于,与形成C9orf72-二肽重复序列(DPR)的具有扩增的六核苷酸重复序列的改变的C9orf72特异性地结合。如实施例所示,本发明的重组抗体作为检测DPR和/或病理性C9orf72的诊断试剂是高度特异性的,而不会产生假阳性并且是由于分别编码至少可变区和CDR的序列的人起源,并且可合理地预期人体中原始抗体的成熟是有效且安全的治疗剂。

[0188] I. 定义

[0189] 除非另有说明,否则如本文所用的术语如Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology,Oxford University Press,1997,修订版2000和再版2003,ISBN 0 19 850673 2中所提供给出定义。此外,除非另有说明,否则术语如W0 2016/050822 A2中所提供,特别是在第26至53页的“I.定义”小节(包括第39和40页的CDR定义的表1)中给出本文使用的术语和表述的定义以表征本发明,所述文献的公开内容以引用的方式明确地并入本文。这同样适用于W0 2016/050822 A2中针对抗体、多核苷酸等公开的一般实施方案。

[0190] 应该注意的是,术语“一个/种(a/an)”实体是指一个或多个所述实体;例如,“一种抗体”被理解为表示一种或多种抗体。因此,术语“一个/种(a或an)”、“一个/种或多个/种”和“至少一个/种”在本文可互换地使用。

[0191] 如果没有另外特别说明,则本文使用术语“DPR”,即“二肽重复序列”蛋白质来具体

指两种氨基酸的重复单元,特别是由于基因中扩增的六核苷酸重复序列。术语“DPR”和“DPR”也用于统指所有类型和形式的DPR,如GA、GR、GP、PA、PR等。在下文中,将主要关于特异性识别DPR的抗体对本发明进行描述,所述DPR包含或由以下组成:GA,例如(GA)_n(其中n是1、2、3、4、5、6或更大(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更大),例如其中n介于6与15之间,包括6和15,例如其中n是15),例如具有15个重复序列(GA)₁₅(SEQ ID NO:66),GP,例如具有15个重复序列(GP)₁₅(SEQ ID NO:67),GR,例如具有15个重复序列(GR)₁₅(SEQ ID NO:68)或PR,例如具有15个重复序列(PR)₁₅(SEQ ID NO:70),或PA,例如具有15个重复序列(PA)₁₅(SEQ ID NO:69),通常在患有FLTD或ALS的患者的脑组织中发现的C90RF72-DPR蛋白中观察到。在实施方案中,本文所述的抗DPR抗体特异性地结合至包含GA重复序列的DPR。尽管抗C90RF72-DPR抗体代表优选的实施方案,但是本发明通常提供抗DPR蛋白抗体和相应的实施方案。因此,要强调的是,除非特别地仅适用于抗C90RF72-DPR,否则原则上本文公开的以及实施例和附图中说明的任何实施方案和相应特征也通常意指适用于任何抗DPR蛋白抗体。

[0192] DPR相关疾病的另一个实例是脊髓小脑性共济失调36型(一种缓慢进行性神经变性病症和常染色体显性小脑共济失调1型(ADCA 1型)的亚型),其特性是成人发作型步态和肢体共济失调、下肢痉挛、构音障碍、肌肉束缚、舌头萎缩和反射亢进。一些受影响的个体也可发展听力损失;参见例如,Garcia-Murias等人,Brain 135(2012),1423-1435。结果表明,脊髓小脑性共济失调36型由染色体20p13上NOP56基因中的内含子GGCCTG六核苷酸重复序列的杂合扩增引起;参见例如,Garcia-Murias等人,Brain 135(2012),1423-1435。Ikeda等人,Neurology 79(2012),333-341;Kobayashi等人,Am.J.Hum.Genet.89(2011),121-130。

[0193] 如果没有另外特别指出,则术语“C90RF72”是指9号染色体开放阅读框72(C90RF72)的改变的形式。术语“C90RF72”也通常用于鉴定导致C90RF72-二肽重复序列(DPR)的C90RF72六核苷酸扩增。因此,所述术语也用于表示C90RF72-DPR。还使用术语“C90RF72”来共同指C90RF72的所有类型和形式,如突变的C90RF72。在术语C90RF72之前添加的字母用于表示特定直系同源物所来源的生物体,例如对于人类C90RF72为hC90RF72或对于鼠源为mC90RF72。

[0194] 本文公开的抗DPR抗体任选地结合C90RF72-二肽重复序列(DPR)及其表位。例如,本文公开了特异性地结合病理上改变的C90RF72物种或其片段(即从扩增的内含子C90RF72六核苷酸重复序列的C90RF72转录物非常规翻译的二肽重复序列以及C90RF72-DPR的聚集形式或其片段)的抗体。术语C90RF72-DPR的(病理上)聚集的/聚集体在本文中用于具体指代上述形式。如本文所用的术语(病理)“聚集形式”或“聚集体”描述由于来自扩增的内含子C90RF72六核苷酸重复序列的C90RF72转录物的C90RF72错误/病理翻译所致的累积或簇形成的产物。这些聚集体、累积或簇形式可以是C90RF72-DPR蛋白和/或其片段,基本上由C90RF72-DPR蛋白和/或其片段组成或由其组成。如本文所使用,提到“特异性结合”、“选择性结合”或“优选结合”C90RF72-DPR的抗体是指不会结合其他不相关的蛋白质的抗体。本发明的抗体基本上不识别选自以下组成的组的不相关的淀粉样蛋白形成蛋白:成对的螺旋丝(PHF)-tau、TAU、交互响应DNA结合蛋白43(TDP-43)、甲状腺素运载蛋白(TTR)、全长淀粉样蛋白前体蛋白质(f1APP)和/或亨廷顿蛋白(HTT)。在一个实例中,本文所公开的C90RF72-DPR抗体可结合DPR和/或C90RF72-DPR或其表位,并且在其他蛋白质的约2倍背景以上的情

况下没有显示结合。“特异性地结合”或“选择性地结合”DPR和/或C90RF72-DPR蛋白变体的抗体是指不结合C90RF72-DPR蛋白的所有变体,即不结合至少一种其他C90RF72构象体的抗体。例如,本文公开了可优先结合至C90RF72的形式的抗体,所述C90RF72显示在体外或在获自患有与C90RF72相关的疾病或有发展与C90RF72相关的疾病的患者的组织中形成DPR的扩增的六核苷酸重复序列。

[0195] 术语“肽”应理解为在其含义内包括术语“多肽”和“蛋白质”(其有时可在本文中互换使用)。类似地,蛋白质和多肽的片段也被考虑,并且在本文中可被称为“肽”。然而,术语“肽”任选地表示包含至少5个连续氨基酸,例如至少10个连续氨基酸、例如至少15个连续氨基酸、例如至少20个连续氨基酸、例如至少25个连续氨基酸的氨基酸聚合物。另外,根据本发明的肽通常具有不超过100个连续氨基酸,例如,少于80个连续氨基酸或少于50个连续氨基酸。

[0196] 如本文所用的术语“多肽”意图涵盖单数“多肽”以及复数“多肽”,并且是指由酰胺键(又称为肽键)线性联结的单体(氨基酸)所组成的分子。术语“多肽”是指具有两个或更多个氨基酸的任何一个或多个链,并且不是指产物的具体长度。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指具有两个或更多个氨基酸的一个或多个链的任何其他术语包含在“多肽”的定义中,并且术语“多肽”可代替这些术语中的任何一个、或可与其互换使用。

[0197] 术语“多肽”还旨在指多肽在表达后修饰的产物,包括而不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化以及通过已知保护/阻断基团来进行的衍生、蛋白水解裂解或通过非天然发生的氨基酸来进行的修饰。多肽可源自天然生物来源或由重组技术产生,但不必从指定核酸序列翻译。它可以任何方式产生,包括通过化学合成。

[0198] 本发明的多肽可具有约3个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、25个或更多个、50个或更多个、75个或更多个、100个或更多个、200个或更多个、500个或更多个、1,000个或更多个,或2,000个或更多个氨基酸的大小。多肽可以具有一种限定的三维结构,但是它们不是必然具有这种结构。具有限定的三维结构的多肽被称为折叠的,并且不具有限定的三维结构而可采用很多不同构象的多肽被称为未折叠的。如在此使用,术语糖蛋白是指偶联至至少一个碳水化合物部分的蛋白质,该碳水化合物部分经由氨基酸残基(例如丝氨酸残基或天冬酰胺残基)的含氧或含氮侧链来附接至该蛋白质。

[0199] “分离的”多肽或其片段、变体或衍生物意欲为不在它的天然周围环境中的多肽。不要求特定的纯化水平。例如,一种分离的多肽可以从其天然或自然环境中去除。出于本发明的目的,在宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白质视为分离的,已通过任何适合技术分离、分馏或部分地或基本上纯化的天然或重组多肽也视为分离的。

[0200] “重组肽、多肽或蛋白质”是指通过重组DNA技术产生的肽、多肽或蛋白质,即由细胞、微生物或哺乳动物产生,由编码包含所需肽的融合蛋白的外源重组DNA表达构建体转化。大多数细菌培养物中表达的蛋白质或肽通常不含聚糖。酵母中表达的蛋白质或多肽可具有不同于哺乳动物细胞中表达的蛋白质或多肽的糖基化模式。

[0201] 作为本发明的多肽,包括上述多肽的片段、衍生物、类似物或变体以及合成或生物学变体及其任何组合。术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”包括具有与天然肽的氨基酸序列足够相似的氨基酸序列的肽和多肽。术语“足够相似的”意指相对于第二氨基酸序列

含有足够或最小数目的相同或等效氨基酸残基的第一氨基酸序列,以使得第一和第二氨基酸序列具有共同结构域和/或共同的功能活性。例如,包含至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%相同的共同结构域的氨基酸序列为被定义为足够相似。任选地,变体将与本发明的优选肽的氨基酸序列足够相似,特别是与改变的C90RF72蛋白质,如病理性C90RF72-DPR以及单独的DPR蛋白,它们中的任一者的变体、衍生物或类似物。此类变体通常保留本发明的靶向构建体的功能活性。变体包括通过一个或多个氨基酸缺失、添加和/或取代在氨基酸序列方面分别与天然和wt肽不同的肽。这些可能是天然存在的变体以及人工设计的变体。

[0202] 此外,当提及本发明的抗体或抗体多肽时,术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”包括保留相应天然结合分子、抗体或多肽的至少一些抗原结合性质的任何多肽。除了本文其他处所讨论的具体抗体片段以外,本发明的多肽的片段包括例如蛋白水解片段以及缺失片段。本发明的抗体和抗体多的变体包括如上所述的片段,并且还包括由于氨基酸取代、缺失或插入而具有改变的氨基酸序列的多肽。变体可天然存在或非天然存在。非天然存在的变体可使用本领域已知的诱变技术来产生。变体多肽可包括保守或非保守氨基酸取代、缺失或添加。DPR蛋白特异性结合分子的衍生物(例如本发明的抗体和抗体多肽)是已被改变以表现出天然多肽上未发现的另外特征的多肽。实例包括融合蛋白。变体多肽在本文还可称为“多肽类似物”。如本文所用,结合分子或其片段,抗体或抗体多肽的“衍生物”是指具有一个或多个通过功能性侧基的反应化学衍生生活的残基的主题多肽。“衍生物”还包括含有20个标准氨基酸的一个或多个天然存在的氨基酸衍生物的那些肽。例如,4-羟基脯氨酸可取代脯氨酸;5-羟基赖氨酸可取代赖氨酸;3-甲基组氨酸可取代组氨酸;高丝氨酸可取代丝氨酸;并且鸟氨酸可取代赖氨酸。

[0203] 确定分子的相似性和/或同一性:

[0204] 通过比较一种肽的氨基酸序列与第二肽的序列来确定两种肽之间的“相似性”。如果一种肽的氨基酸相同或是保守性氨基酸取代,则它与第二肽的相应氨基酸相似。保守性取代包括在Dayhoff,M.O.,编辑,The Atlas of Protein Sequence and Structure 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. (1978) 和Argos,EMBO J.8 (1989),779-785中描述的那些。例如,属于以下组之一的氨基酸代表保守性变化或取代:-Ala、Pro、Gly、Gln、Asn、Ser、Thr;-Cys、Ser、Tyr、Thr;-Val、Ile、Leu、Met、Ala、Phe;-Lys、Arg、His;-Phe、Tyr、Trp、His;以及-Asp、Glu。

[0205] 通过比较一种多核苷酸的核酸序列与多核苷酸的序列来确定两种多核苷酸之间的“相似性”。如果一种多核苷酸的核酸相同或者如果所述核酸是编码序列的一部分,则所述多核苷酸的核酸与第二多核苷酸的相应核酸相似,包含所述核酸的对应三联体编码相同的氨基酸或编码保守性氨基酸取代。使用Karlin和Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:5873-5877的数学算法任选地确定两个序列之间的同一性或相似性百分比。这种算法被结合至Altschul等人(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410可在NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 获得的BLASTn和BLASTp程序中。

[0206] 根据NCBI网页和“BLAST程序选择指南”中关于具体长度和组成的序列所推荐的,

根据BLAST多核苷酸搜索的BLASTn程序和BLAST蛋白搜索的BLASTp程序的标准参数,执行同一性或相似性百分比的确定。

[0207] 使用BLASTn程序进行BLAST多核苷酸搜索。

[0208] 对于常规参数,“最大目标序列”框可设置为100,“短查询”框可打勾,“期望阈值”框可设置为1000,并且“字长”框可如针对NCBI网页上的短序列(少于20个碱基)所推荐设置为7。对于更长的序列,“期望阈值”框可设置为10,并且“字长”框可设置为11。对于计分参数,“匹配/不匹配分数”可设置为1,-2,并且“空位成本”框可设置为线性。对于过滤器和掩蔽参数,“低复杂度区域”框可不打勾,“物种特异性重复序列”框可不打勾,“仅用于查找表的掩蔽”框可打勾,“DUST过滤器设置”可打勾,并且“掩蔽小写字母”框可不打勾。通常,在此方面可使用“搜索短的几乎精确匹配”,其提供了大多数上述设置。在此方面的进一步信息可在NCBI网页上发布的“BLAST程序选择指南”中找到。

[0209] 使用BLASTp程序进行BLAST蛋白质搜索。对于常规参数,“最大目标序列”框可设置为100,“短查询”框可打勾,“期望阈值”框可设置为10,并且“字长”框可设置为“3”。对于评分参数,“矩阵”框可设置为“BLOSUM62”,“空位成本”框可设置为“存在:11延伸:1”,“组成调整”框可设置为“条件组成分数矩阵调整”。对于过滤器和掩蔽参数,“低复杂度区域”框可不打勾,“仅用于查找表的掩蔽”框可不打勾,并且“掩蔽小写字母”框可不打勾。

[0210] 根据NCBI网页上以HTML和PDF版本公布的“BLAST程序选择指南”中的建议,对两个程序进行修改,例如,就所搜索序列的长度而言。

[0211] 多核苷酸:

[0212] 术语“多核苷酸”意欲涵盖单个核酸以及多个核酸,并且是指分离的核酸分子或构建体,例如信使RNA(mRNA)或质粒DNA(pDNA)。多核苷酸可以包含常规磷酸二酯键或非常规键(例如酰胺键,如在肽核酸(PNA)中所发现)。术语“核酸”是指多核苷酸中存在的任何一个或多个核酸片段,例如DNA或RNA片段。“经分离的”核酸或多核苷酸意指已自其天然环境移除的核酸分子,DNA或RNA。例如,出于本发明的目的,载体中所含有的编码抗体的重组多核苷酸被认为是分离的。分离的多核苷酸的其他实例包括维持在异源宿主细胞中的重组多核苷酸或溶液中的(部分或基本上)纯化的多核苷酸。经分离的RNA分子包括本发明的多核苷酸的体内或体外RNA转录本。根据本发明的经分离的多核苷酸或核酸还包括以合成方式产生的这些分子。另外,多核苷酸或核酸可以是或可包括调控元件如启动子、核糖体结合位点或转录终止子。

[0213] 如本文所用,“编码区”是核酸中由翻译成氨基酸的密码子组成的一部分。尽管“终止密码子”(TAG、TGA或TAA)不翻译成氨基酸,但是它可以被认为是编码区的一部分,但任何侧翼序列,例如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、内含子等不是编码区的一部分。本发明的两个或更多个编码区可存在于例如单个载体上的单个多核苷酸构建体中,或存在于例如独立(不同)载体上的独立多核苷酸构建体中。此外,任何载体可含有单一编码区,或可包括两个或更多个编码区,例如单一载体可单独地编码一个免疫球蛋白重链可变区和一个免疫球蛋白轻链可变区。另外,本发明的载体、多核苷酸或核酸可以编码异源编码区,所述异源编码区融合或未融合至编码结合分子、抗体或其片段、变体或衍生物的核酸。异源性编码区包括但不限于特殊元件或基序,诸如分泌信号肽或异源性功能域。

[0214] 在一些实施方案中,多核苷酸或核酸是DNA。在DNA的情况下,包括编码多肽的核酸

的多核苷酸通常可以包括启动子和/或可操作地与一个或多个编码区相关联的其他转录或翻译控制元件。可操作相关联是针对基因产物(例如多肽)的编码区按以下这种方式与一个或多个调控序列相关联,该方式使得该基因产物的表达处于这种或这些调控序列的影响或控制之下。如果启动子功能的诱导导致编码所希望的基因产物的mRNA的转录,并且如果两个DNA片段之间的连接的性质不干扰表达调控序列引导基因产物的表达的能力或不干扰有待转录的DNA模板的能力,那么两个DNA片段(如多肽编码区和与其关联的启动子)“可操作地缔合”或“可操作地连接”。因此,启动子区将可操作地与编码多肽的核酸相关联,只要启动子能够实现该核酸的转录。启动子可以是仅在预定细胞中引导DNA的实质性转录的细胞特异性启动子。除了启动子以外,其他转录控制元件例如增强子、操纵子、阻遏子以及转录终止信号可以可操作地与多核苷酸相关联以便引导细胞特异性转录。本文公开了合适的启动子和其他转录控制区。

[0215] 各种转录控制区是本领域技术人员已知的。这些包括但不限于:转录控制区,其在脊椎动物细胞中起作用,如但不限于来自巨细胞病毒(立即早期启动子,与内含子-A联合)、猿猴病毒40(早期启动子)以及逆转录病毒(如劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus))的启动子和增强子区段。其他转录控制区包括得自脊椎动物基因如肌动蛋白、热休克蛋白、牛生长激素以及兔 β 球蛋白的那些转录控制区域,连同能够控制真核细胞中的基因表达的其他序列。另外的合适转录控制区包括组织特异性启动子和增强子,连同淋巴因子可诱导的启动子(例如可由干扰素或白介素诱导的启动子)。

[0216] 类似地,多种翻译控制元件是本领域的普通技术人员已知的。这些翻译控制元件包括但不限于核糖体结合位点、翻译起始和终止密码子,以及得自小核糖核酸病毒的元件(特别是内核糖体进入位点,或IRES,也称为CITE序列)。

[0217] 在其他实施方案中,本发明的多核苷酸是RNA,例如,呈信使RNA(mRNA)的形式。

[0218] 本发明的多核苷酸和核酸编码区可以缔合有另外的编码区,所述另外的编码区编码分泌或信号肽,所述分泌或信号肽指导由本发明的多核苷酸编码的多肽的分泌。根据信号假说,由哺乳动物细胞分泌的蛋白质具有信号肽或分泌前导序列,一旦生长中的蛋白质链跨过粗面内质网输出被起始,那么所述序列就从成熟蛋白质裂解。本领域的普通技术人员应意识到由脊椎动物细胞分泌的多肽通常具有融合至多肽的N-末端的信号肽,所述信号肽从完整或“全长”多肽裂解,以产生分泌的或“成熟”形式的多肽。在某些实施方案中,使用天然信号序列,例如免疫球蛋白重链或轻链信号肽,或使用所述序列的功能性衍生物,其保留引导可与其可操作地缔合的多肽的分泌的能力。或者,可使用异源哺乳动物信号肽,或其功能衍生物。例如,野生型前导序列可以取代为人组织纤溶酶原活化因子(TPA)或小鼠-葡糖苷酸酶的前导序列。

[0219] 在本发明的上下文中使用的“结合分子”主要涉及抗体及其片段,但是也可指结合二肽重复序列(DPR)蛋白的其他非抗体分子,其任选地结合至改变的C90RF72,特别是(病理上)改变的C90RF72-DPR,包括但不限于激素、受体、配体、主要组织相容性复合物(MHC)分子、伴侣蛋白如热休克蛋白(HSP)以及细胞间粘附分子如钙粘蛋白、整合素、C型凝集素和免疫球蛋白(Ig)超家族的成员。因此,仅为了清楚起见并且不限制本发明的范围,针对代表用于开发治疗剂和诊断剂的优选结合分子的抗体和抗体样分子讨论大多数以下实施方案。

[0220] 抗体:

[0221] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中互换使用。抗体或免疫球蛋白是至少包含重链的可变结构域的结合分子,并且通常至少包含重链和轻链的可变结构域。脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构相对较易了解;参见例如,Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版1988)。

[0222] 如下文更详细地讨论,术语“免疫球蛋白”包含可在生物化学上区分的广泛的不同类别的多肽。本领域技术人员应理解,重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ (γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ),它们之中有一些亚类(例如, $\gamma 1$ - $\gamma 4$)。这种链的性质决定了抗体的“类别”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型)(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等)被很好地表征并且已知赋予功能特异化。鉴于本公开,熟练的技术人员易于辨别出这些类别和同种型各自的修饰型式,并且因此处于本发明的范围内。所有免疫球蛋白类别明显在本发明的范围内,以下论述通常将涉及IgG类别的免疫球蛋白分子。关于IgG,标准免疫球蛋白分子包含分子量大约23,000道尔顿的两个相同轻链多肽和分子量53,000至70,000的两个相同重链多肽。这四条链通常由二硫键以“Y”构型连接在一起,其中轻链从“Y”的开口处开始并且一直通过可变区与重链括在一起。

[0223] 轻链被分类为 κ 或 λ (κ 、 λ)。每个重链类别可与 κ 或 λ 轻链结合。通常,轻链和重链彼此共价键合,并且当免疫球蛋白由杂交瘤、B细胞或遗传工程化的宿主细胞产生时,两条重链的“尾”部分通过共价二硫键或非共价键联彼此键合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的分叉端的N-末端延伸至每条链底部的C-末端。

[0224] 轻链和重链均分成结构和功能同源性的区。术语“恒定”和“可变”是在功能上使用。在这方面,应理解轻(V_L)链和重(V_H)链部分二者的可变结构域决定抗原识别和特异性。相反地,轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要的生物特性,诸如分泌、经胎盘移动性、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域的编号随着它们变得更远离抗体的抗原结合位点或氨基末端而增加。N-末端部分是可变区并且在C-末端部分处是恒定区;CH3结构域和CL结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基-末端。

[0225] 如上所指明,可变区允许抗体选择性识别和特异性结合抗原上的表位。即,抗体的 V_L 结构域和 V_H 结构域或互补决定区(CDR)的子集组合以形成限定三维抗原结合位点的可变区。这种四元抗体结构形成存在于Y的每个臂的末端处的抗原结合位点。更具体地,抗原结合位点由 V_H 和 V_L 链的每一个上的三个CDR限定。含有足以与DPR特异性结合、特别是与形成C9ORF72-DPR的改变的C9ORF72特异性结合的结构任何抗体或免疫球蛋白片段在本文中可互换地称为“结合片段”或“免疫特异性片段”。

[0226] 在天然存在的抗体中,抗体包含存在于每个抗原结合结构域中的六个高变区,有时称为“互补决定区”或“CDR”,其是短的、非连续的氨基酸序列,所述氨基酸被特别地定位以在抗体在水性环境中呈现其三维构型时形成抗原结合结构域。“CDR”侧接四个相对保守的“框架”区或“FR”,其显示出较小的分子间变异性。框架区大部分采用 β 折叠构象,并且CDR形成连接并且在一些情况下形成 β 折叠结构的一部分的环。因此,框架区起作用以便形成支架,所述支架提供通过链间、非共价相互作用将CDR以正确取向来进行定位。由所定位的CDR形成的抗原结合结构域限定与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。这个互补表面促进了抗体与它的同源表位的非共价结合。分别构成CDR和框架区的氨基酸可由本领域普通技术人员针对任何给定的重链或轻链可变区来容易地鉴别,因为它们已经得到了精确地定义;

参见“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”Kabat,E.,等人,美国卫生和公众服务部,(1983);以及Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.,196(1987),901-917,所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0227] 在其中本领域内使用和/或接受的术语存在两种或更多种定义的情况下,如本文所使用的术语的定义旨在包括所有此类意义,除非明确地相反说明。具体实例是使用术语“互补决定区”(“CDR”)来描述在重链与轻链多肽两者的可变区中所发现的非连续抗原组合位点。这个具体区已经被Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”(1983)和被,J.Mol.Biol.,196(1987),901-917所描述,这些参考文献以引用的方式并入本文,其中定义包括当针对彼此比较时的氨基酸残基的重叠或子集。然而,应用任一定义来指抗体或其变体的CDR旨在处于如本文所定义和使用的术语的范围内。如通过以上引用的参考文献中的每个所定义的涵盖CDR的适当氨基酸残基作为比较被列举在以下表1中。涵盖特定CDR的准确残基编号将取决于CDR的序列和大小而改变。给定抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可常规确定哪些残基包含抗体的人IgG亚型的特定高变区或CDR。

[0228] 表1:CDR定义¹

[0229]

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[0230] ¹表1中的所有CDR定义的编号根据由Kabat等人列举的编号惯例(参见下文)。

[0231] Kabat等人还定义了适用于任何抗体的用于可变结构域序列的编号系统。本领域普通技术人员可明确地对任何可变结构域序列指定这种“Kabat编号”系统,而不依赖于超过序列本身的任何实验数据。如本文所用,“Kabat编号”是指由Kabat等人,美国卫生和公众服务部,“Sequence of Proteins of Immunological Interest”(1983)所阐明的编号系统。除非另外指定,否则提到在本发明的抗体或抗原结合片段、变体或衍生物中编号具体氨基酸残基位置是根据Kabat编号系统,然而,这是理论上的,并且可能并不等同地适用于本发明的每种抗体。例如,取决于第一CDR的位置,随后的CDR可能在任一方向上移动。

[0232] 本发明的抗体或其片段(例如,抗原结合片段或免疫特异性片段)、其变体或衍生物包括但不限于:多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、灵长类化抗体、鼠源化或嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段(例如Fab、Fab'和F(ab')₂、Fd、Fv、单链Fv(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)、包含VL或VH结构域的片段、由Fab表达文库产生的片段以及抗独特型(抗Id)抗体(包括,例如,本文公开的抗体的抗Id抗体)。ScFv分子在本领域中是已知的并且描述于例如美国专利5,892,019之中。本发明的免疫球蛋白或抗体分子可具有免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0233] 在一个实施方案中,本发明的抗体不是具有五价结构的IgM或其衍生物。特别地,

在本发明的具体应用中,特别是在治疗用途中,IgM由于其五价结构和缺乏亲和力成熟而常常显示出非特异性交叉反应性和非常低的亲和力,因此IgM比IgG和其他二价抗体或相应的结合分子的用处少。在特别优选的实施方案中,本发明的抗体不是多克隆抗体,即它基本上由一种特定的抗体种类组成,而不是从血浆免疫球蛋白样品获得的混合物。

[0234] 包括单链抗体在内的抗体片段可包含单独的或与以下结构的整体或一部分组合的一个或多个可变区:铰链区、CH1、CH2和CH3结构域。本发明中还包括DPR结合片段,所述DPR结合片段包含一个或多个可变区与铰链区、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域的任何组合。本发明的抗体或其免疫特异性片段可来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。任选地,所述抗体是人、鼠、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马或鸡抗体。在另一个实施方案中,可变区可以是来源于软骨鱼(condricthoid)(例如,来自鲨鱼)。

[0235] 如本文所用,术语“重链部分”或“重链”或“重链区”包括源自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链部分的多肽包含以下中的至少一种:CH1结构域、铰链(例如,上、中和/或下铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域或其变体或片段。例如,在本发明中使用的结合多肽可包含:包含CH1结构域的多肽链;包含CH1结构域、铰链结构域的至少一部分以及CH2结构域的多肽链;包含CH1结构域和CH3结构域的多肽链;包含CH1结构域、铰链结构域的至少一部分以及CH3结构域的多肽链或包含CH1结构域、铰链结构域的至少一部分、CH2结构域以及CH3结构域的多肽链。在另一个实施方案中,本发明的多肽包括包含CH3结构域的多肽链。此外,在本发明中使用的结合多肽可缺乏至少一部分的CH2结构域(例如,所有或部分的CH2结构域)。如上所列举,本领域普通技术人员将理解这些结构域(例如,重链部分)可以被修饰以使得它们的氨基酸序列与天然存在的免疫球蛋白分子不同。

[0236] 在本文公开的某些抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物中,多体的一条多肽链的重链部分是或多体的第二多肽链上的那些重链部分相同的。或者,本发明的含重链部分的单体不相同。例如,每种单体可包含不同的靶结合位点,形成例如双特异性抗体或双抗体。

[0237] 在另一个实施方案中,本文公开的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物由单条多肽链如scFv组成,并且将在细胞内(胞内抗体)表达以用于潜在的体内治疗和诊断应用。

[0238] 在本文所公开的诊断和治疗方法中使用的结合多肽的重链部分可源自不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链部分可包括衍生自IgG1分子的CH1结构域和衍生自IgG3分子的铰链区。在另一个实例中,重链部分可以包括部分衍生自IgG1分子和部分衍生自IgG3分子的铰链区。在另一个实例中,重链部分可以包括部分衍生自IgG1分子和部分衍生自IgG4分子的嵌合铰链。

[0239] 如本文所使用,术语“轻链部分”或“轻链”或“轻链区”包含来源于免疫球蛋白轻链的氨基酸序列。任选地,轻链部分包括至少一个VL或CL结构域。

[0240] 针对抗体的肽或多肽表位的最小大小认为是约四个氨基酸至五个氨基酸。肽或多肽表位任选地含有至少七个,任选地至少九个,或任选地介于至少约15至约30个氨基酸之间。因为CDR可以识别在它的三级形式下的抗原肽或抗原多肽,所以包含表位的氨基酸不需要是邻接的,并且在一些情况下可以甚至不在相同的肽链上。在本发明中,被本公开的抗体识别的肽或多肽表位含有DPR如GA₁₅(SEQ ID NO:66)的至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、任选地至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、或介于约15至约30

个之间的连续或非连续氨基酸的序列,如在C90RF72-DPR中所发现。换句话说,本发明的抗体或其生物技术衍生物任选地识别具有例如3至50、任选地10至40、任选地15至30或任选地15的重复数的由两种不同的氨基酸X和X' (XXX和XXX'; XaaXaa')组成的二肽。因此,如果本发明的抗体识别的表位或抗原或其生物技术衍生物通常由重复数为15的DPR组成,则可指定为 $(XX')_{15}$ 。

[0241] “特异性地结合”或“特异性识别”在本文互换使用,通常意指结合分子,例如抗体经由其抗原结合结构域与表位结合,并且结合需要在抗原结合结构域与表位之间有一些互补性。根据这一定义,当抗体经由其抗原结合结构域比它将与随机、不相关的表位结合更容易地与表位结合时,所述抗体被称为与所述表位“特异性地结合”。本文使用术语“特异性”来限定相对亲和性,通过所述相对亲和性某一抗体与某一表位结合。例如,可以认为抗体“A”比抗体“B”对给定表位具有更高的特异性,或者说抗体“A”以比它对相关表位“D”更高的特异性结合至表位“C”。

[0242] 当存在时,术语“免疫学结合特性”或抗体与抗原的呈所有语法形式的其他结合特性是指抗体的特异性、亲和力、交叉反应性和其他结合特性。

[0243] “优先结合”意指结合分子,例如抗体比它将与相关的、相似的、同源的或类似的表位结合更容易地与表位特异性结合。因此,“优先结合”给定表位的抗体将比结合相关表位更可能结合所述给定表位,即使这种抗体可能与所述相关表位交叉反应。

[0244] 通过非限制性实例,如果结合分子,例如抗体以比针对第二表位的抗体的KD小的解离常数(KD)结合所述第一表位,则所述结合分子可被认为优先结合第一表位。在另一个非限制性实例中,如果抗体以比针对第二表位的抗体的KD小至少一个数量级的亲和性结合第一表位,则抗体可被认为优选结合第一抗原。在另一个非限制性实例中,如果抗体以比针对第二表位的抗体的KD小至少两个数量级的亲和性结合第一表位,则抗体可被认为优选结合第一表位。

[0245] 在另一个非限制性实例中,如果结合分子,例如抗体以比针对第二表位的抗体的k(off)小的解离速率(offrate) (k(off))结合第一表位,则抗体可以被认为优选结合第一表位。在另一个非限制性实例中,如果抗体以比针对第二表位的抗体的k(off)小至少一个数量级的亲和性结合第一表位,则抗体可被认为优选结合第一表位。在另一个非限制性实例中,如果抗体以比针对第二表位的抗体的k(off)小至少两个数量级的亲和性结合第一表位,则抗体可被认为优选结合第一表位。

[0246] 可以说本文中公开的结合分子,例如抗体或抗原结合片段、变体或衍生物以小于或等于 $5 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-2}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-3}sec^{-1} 的解离速率(k(off))结合DPR或其片段、变体或特异性构象。任选地,可以说本发明的抗体以小于或等于 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-4}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-5}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{sec}^{-1}$ 、 10^{-6}sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{sec}^{-1}$ 或 10^{-7}sec^{-1} 的解离速率(k(off))结合DPR蛋白或其片段、变体或特异性构象。在特别优选的实施方案中,DPR是与C90RF72相关的DPR,即C90RF72-DPR。

[0247] 可以说结合分子,例如本文公开的抗体或抗原结合片段、变体或衍生物以大于或等于 $10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或 $5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 的缔合速率(k(on))结合DPR或其片段、变体或特异性构象。任选地,可以说本发明的抗体以大于或等于 $10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、 $10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$, or $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ or $10^7 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 的开启率(k(on))结合DPR或其

片段、变体或特异性构象。在一个实施方案中,可以说结合分子以大于或等于 $10^3\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^4\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 或 $5 \times 10^4\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 的缔合速率($k(\text{on})$)结合C90RF72-DPR或其片段、变体或特异性构象。任选地,可以说本发明的抗体以大于或等于 $10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、 $10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 或 $5 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 或 $10^7\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 的缔合速率($k(\text{on})$)结合C90RF72-DPR或其片段、变体或特异性构象。

[0248] 如果结合分子,例如抗体与所述表位优选结合达到在某种程度上阻断参比抗体与表位结合的程度,抗体被称为竞争性地抑制参比抗体与给定表位结合。竞争性抑制可通过本领域已知的任何方法来确定,例如,竞争性ELISA测定。可以说抗体竞争性地抑制参考抗体与给定表位的结合至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%。

[0249] 如本文所要,术语“亲和力”是指单独表位与结合分子(例如免疫球蛋白分子)的CDR的结合强度的量度。参见例如,Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版(1988)第27-28页。如本文所使用,术语“亲和力(avidity)”是指一个群体的免疫球蛋白与抗原之间的复合体的总体稳定性,即,免疫球蛋白与抗原的混合物的功能组合强度;参见例如Harlow第29-34页。亲和力与具有特异性表位的群体中的单独免疫球蛋白分子的亲和性并且还有免疫球蛋白和抗原的化合价相关。例如,二价单克隆抗体与具有高度重复的表位结构的抗原(如聚合物)之间的相互作用将是高亲和力的一种相互作用。可使用任何合适的方法以实验方式测定抗体对抗原的亲和力或亲合力(avidity);参见例如,Berzofsky等人,“*Antibody-Antigen Interactions*” In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., 编辑, Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), 以及本文描述的方法。用于测量抗体对抗原的亲合力的通用技术包括ELISA、RIA和表面等离子体共振。如果在不同条件(例如,盐浓度、pH)下进行测量,则特定抗体-抗原相互作用的所测量亲和力可以变化。因此,任选地用抗体和抗原的标准化溶液以及标准化缓冲液进行亲和力和其他抗原结合参数,例如KD、 IC_{50} 的测量。

[0250] 本发明结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物还可在它们的交叉反应性方面来描述或规定。如本文所使用,术语“交叉反应性”是指对一种抗原有特异性的抗体与第二抗原反应的能力;为两种不同抗原物质之间的相关性量度。因此,如果抗体与除了诱导它形成的一种表位以外的表位结合,则抗体是交叉反应的。交叉反应表位通常包含许多与诱导表位相同的互补结构特征,并且在一些情况下可实际上比原物更好地适合。

[0251] 例如,某些抗体具有一定程度的交叉反应性,其中它们结合相关但不相同的表位,例如与参比表位具有至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少65%、至少60%、至少55%并且至少50%同一性(如使用本领域已知并且本文描述的方法所计算)的表位。如果抗体不能结合与参比表位具有小于95%、小于90%、小于85%、小于80%、小于75%、小于70%、小于65%、小于60%、小于55%并且小于50%同一性(如使用本领域已知并且本文描述的方法所计算)的表位,则抗体可以据说具有几乎没有的交叉反应性或不具有交叉反应性。如果抗体不能结合所述表位的任何其他类似物、直向同源物或同源物,则抗体可被认为对某一表位有“高度特异性”。

[0252] 还可根据它们对DPR和/或显示C90RF72-DPR的突变的C90RF72种类和/或其片段的结合亲和力来描述或指定本发明的结合分子,例如抗体或抗原结合片段,其变体或衍生物。

优选的结合亲和力包括解离常数或 K_d 小于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 。

[0253] 如先前所指明,各种免疫球蛋白类别的恒定区的亚单位结构和三维构型是众所周知的。如本文所使用,术语“VH结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端的可变结构域,并且术语“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一(最氨基末端)恒定区结构域。CH1结构域与VH结构域相邻并且是免疫球蛋白重链分子的铰链区的氨基末端。

[0254] 如本文所使用,术语“CH2结构域”包括使用常规编号方案(残基244至残基360, Kabat编号系统;并且残基231至残基340, EU编号系统;参见前面引用的Kabat EA等)例如从抗体的约残基244延伸至残基360的重链分子的部分。CH2结构域的独特在于它不与另一个结构域紧密配对。而两条N-连接的支链碳水化合物链介于完整的天然IgG分子的两个CH2结构域之间。还被充分记载的是CH3结构域从CH2结构域延伸至IgG分子的C-末端并且包含大约108个残基。

[0255] 如本文所用,术语“铰链区”包括使CH1结构域与CH2结构域连接的重链分子的部分。这个铰链区包含大约25个残基并且是柔性的,从而允许两个N-末端抗原结合区独立地移动。铰链区可再分成三个相异的结构域:上、中和下铰链结构域;参见Roux等人J. Immunol. 161 (1998), 4083-4090。

[0256] 如本文所用,术语“二硫键”包括在两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸包含可与第二硫醇基形成二硫键或二硫桥的硫醇基。在大多数天然存在的IgG分子中, CH1区和CL区由二硫键连接并且两条重链在使用Kabat编号系统(位置226或229, EU编号系统)的对应于239和242的位置上由两个二硫键连接。

[0257] 如本文所用,术语“连接”、“融合”或“融合”可互换使用。这些术语是指通过包括化学耦联或重组手段的任何手段将两个或多个元件或组分连接在一起。“框内融合”是指连接两个或更多个多核苷酸开放阅读框架(ORF)以便以维持原始ORF的正确翻译阅读框架的方式来形成连续更长的ORF。因此,重组融合蛋白是含有对应于由原始ORF编码的多肽的两个或更多个节段的单一蛋白质(这些节段在天然地通常并不这样连接。)虽然阅读框由此在整个融合区段上被致使连续,但是这些区段可以被例如框内接头序列在物理上或空间上分离。例如,编码免疫球蛋白可变区的CDR的多核苷酸可框内融合,但是被编码至少一个免疫球蛋白框架区或另外的CDR区的多核苷酸分离,只要“融合的”CDR作为连续多肽的一部分来共翻译即可。

[0258] 如本文使用的术语“表达”是指基因产生生物化学品例如, RNA或多肽的过程。所述过程包括基因在细胞内的功能性存在的任何表现,包括但不限于基因敲除以及瞬间表达与稳定表达。它包括但不限于将基因转录成信使RNA(mRNA)、转移RNA(tRNA)、小发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)或任何其他RNA产物,以及将mRNA翻译成多肽。如果最终所希望的产物是生物化学物质,那么表达包括该生物化学物质和任何前体的产生。基因的表达产生“基因产物”。如本文所使用,基因产物可以是核酸,例如由基因转录产生的信使RNA、或从转录物翻译的多肽。本文所述的基因产物更包括具有转录后修饰的核酸,所述修饰例如为聚腺苷酸化;或具有转录后修饰的多肽,所述修饰例如为甲基化、糖基化、添加脂质、与其他

蛋白质亚基缔合、蛋白水解裂解等。

[0259] 如本文所使用,术语“样品”是指从受试者或患者获得的任何生物材料。在一方面,样品可包括血液、腹膜液、CSF、唾液或尿液。在其他方面中,样品可包括从血液样品中富集的全血、血浆、血清、B细胞,以及培养细胞(例如,来自受试者的B细胞)。样品还可以包括活组织检查物或组织样品,所述活组织检查物或组织样品包括神经组织。在还其他方面中,样品可以包括全细胞和/或细胞的裂解液。可以通过本领域已知的方法来收集血液样品。

[0260] 疾病:

[0261] 除非另有说明,否则术语“病症”和“疾病”在本文可互换使用,并且包括受试者、动物、分离的器官、组织或细胞/细胞培养物中的任何不希望的生理变化。

[0262] 额颞叶变性(FTLD)是与脑的额叶和颞叶萎缩相关的发病机制。此外,还显示50%的FTLD患者具有阳性家族史,并且与肌萎缩性侧索硬化症(ALS)进行比较。如上所述,发病机制的共同潜在原因似乎是位于FTLD和ALS患者的C9ORF72中的杂合扩增的六核苷酸重复序列。特别地,显示了所得到的两种氨基酸的重复单元(二肽重复序列,DPR)。

[0263] 然而,在其他几种疾病和/或病症中,也报告了导致两种氨基酸(DPR)的重复的扩增的六核苷酸重复序列。所述疾病包括但不限于额颞叶变性(FTLD)、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、FTLD-ALS和/或脊髓小脑性共济失调36型及其中的相关症状。

[0264] 在本发明的一个实施方案中,本发明的抗体、具有与其任一种基本上相同的结合特异性的结合分子、本发明的多核苷酸、载体或细胞用于制备用于预防性和/或治疗性治疗与DPR相关的疾病、用于监测疾病进展和/或治疗响应以及用于诊断与DPR淀粉样变性相关的疾病(包括额颞叶变性(FTLD)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、FTLD-ALS和/或脊髓小脑性共济失调36型)的药物或诊断组合物。

[0265] 在一些实施方案中,本发明的抗体结合至FTLD患者中的病理性C9ORF72-二肽重复序列蛋白质或其聚集形式。因此,在本发明的一个实施方案中,本发明的抗体、具有与其任一种基本上相同的结合特异性的结合分子、多核苷酸、载体或细胞用于制备用于预防性和/或治疗性治疗与C9ORF72-DPR相关的疾病、用于监测疾病进展和/或治疗响应以及用于诊断与C9ORF72-DPR或其聚集形式相关的疾病(包括额颞叶变性(FTLD)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和/或FTLD-ALS,及与其相关的症状)的药物或诊断组合物。

[0266] 治疗:

[0267] 如本文所用,术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”是指治疗性治疗和预防性或防治性措施,其中目的是为了预防或减缓(减轻)不希望的生理学变化或病症,如心脏缺陷的发展。有益或所希望的临床结果包括但不限于症状缓解、疾病程度减轻、疾病状态稳定化(即未恶化)、疾病进展延迟或减缓、疾病状态改善或缓和、以及减轻(无论是部分减轻还是全部减轻),无论是可检测的还是不可检测的。“治疗”还可意指与未接受治疗时预期的存活相比延长存活。需要治疗的那些包括已患有病状或病症的那些以及易于患上病状或病症的那些或有待预防病状或病症的表现的那些。

[0268] 除非另有说明,否则术语“药物(drug)”、“药物(medicine)”或“药物(medicament)”在本文中可互换使用,并且应包括但不限于所有(A)用于内用和外用的物品、药物和制剂,以及旨在用于诊断、治愈、缓解、治疗或预防人类或其他动物疾病的任何物质或物质混合物;和(B)旨在影响人或其他动物的身体结构或任何功能的物品、药物和制剂

(食品除外);以及(C)旨在用作第(A)和(B)条规定的任何物品的组成部分的物品。术语“药物(drug)”、“药物(medicine)”或“药物(medicament)”应包括旨在用于人或其他动物的制剂的完整配方,含有一种或多种“剂”、“化合物”、“物质”或“(化学)组合物”并且在其他情况下还有其他药学上无活性赋形剂如填充剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、粘合剂,或确保“药物”、“药物”或“药物”在人或其他动物体内的预期目标位置,例如皮肤、胃或肠中易于运输、崩解、分解、溶解和生物利用度。术语“剂”、“化合物”或“物质”在本文中可互换使用,并且在更特定的上下文中应包括但不限于所有药理活性剂,即诱导所需生物学或药理学作用或针对通过本发明的方法研究或测试诱导这种可能的药理作用的能力的剂。

[0269] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”是指需要诊断、预后、预防或治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者,例如人患者。

[0270] 药物载体:

[0271] 药学上可接受的载体和施用途径可取自本领域技术人员已知的相应文献。本发明的药物组合物可根据本领域众所周知的方法进行配制;优选地,参见例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472, Vaccine Protocols第2版Robinson等人, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2003; Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. 第2版Taylor and Francis. (2006), ISBN: 0-8493-1630-8。合适的药物载体的实例在本领域中是熟知的,并且包括磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液如油/水乳液、各种类型的润湿剂、无菌溶液等。包含此类载体的组合物可通过熟知的常规方法配制。这些药物组合物可以合适的剂量施用至受试者。合适的组合物的施用可通过不同的方式进行。实例包括经由口服、鼻内、直肠、局部、腹膜内、静脉内、肌内、皮下、真皮下、透皮、鞘内和颅内方法施用含有药学上可接受的载体的组合物。如经鼻喷雾制剂的气雾剂制剂包括活性药剂与防腐剂和等张剂的纯净水溶液或其他溶液。此类制剂任选地被调整至可与鼻粘膜相容的pH和等张状态。在本发明中也设想用于口服施用的药物组合物,如单结构域抗体分子(例如“nanobodiesTM”)等。这些口服制剂可为片剂、胶囊、粉末、液体或半固体形式。片剂可包含固体载体,例如明胶或佐剂。用于经直肠或经阴道施用的制剂可呈现为具有适合载体的栓剂,还参见O'Hagan等人, Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727-735。关于适合多种施用类型的制剂的另外指导可见于Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)和相应的更新。对于药物递送方法的简评,参见Langer, Science 249 (1990), 1527-1533。

[0272] II. 本发明的抗体

[0273] 本发明总体上涉及抗DPR, 任选地抗C9orf72-DPR抗体和DPR结合, 即DPR结合片段以及其生物技术变体和衍生物, 所述抗体任选地展示了如针对例如在实施例中说明的本文所述的抗体所概述的免疫结合特性和/或生物性质。在一些实施方案中, 所述抗DPR抗体是人或人源性抗体。在一些实施方案中, 所述抗DPR抗体是人单克隆抗体。在一些实施方案中, 所述抗DPR抗体是人源性单克隆抗体。根据本发明, 已经从一群健康人受试者克隆了对聚-GA DPR具有特异性的人单克隆抗体。在根据本发明进行的实验过程中, 已经评价了源自原始自身抗体的重组IgG抗体结合至DPR和结合至其他蛋白质(包括牛血清白蛋白(BSA))的能力; 参见实施例3至9以及图2至8。如所提及, 在选定的人C9orf72-FTLD患者的脑组织中, 主

题抗体可显示结合DPR蛋白或其聚集形式；参见实施例11和图10。此外，如实施例9和图8所示，主题抗体与聚集的C9orf72聚-GA DPR (GA)₁₅ (SEQ ID NO:66)的结合不会被参考抗聚GA抗体 (NI-mAb参考) 与靶标的先前结合阻断，从而指向所述抗体识别聚-GA DPR聚集体上的构象性表位的能力，其也可以与其他DPR蛋白和/或淀粉样蛋白生成性蛋白质的共聚集体可及。

[0274] 此外，可优化抗DPR抗体、DPR结合片段、其合成或生物技术衍生物或变体以具有改进的药代动力学、可制造性和稳定性质。因此，CDR或可变区中的至少一个易于修饰的氨基酸被突变的氨基酸取代，所述修饰选自自由糖基化、氧化、脱氨基、肽键裂解、异天冬氨酸形成和/或未配对的半胱氨酸组成的组，所述突变的氨基酸缺乏这种改变，或者其中至少一个碳水化合物部分缺失或化学或酶促地添加至所述抗体中，参见例如Liu等人，*J.Pharm.Sci.* 97 (7) (2008)，2426-2447；Beck等人，*Nat.Rev.Immunol.* 10 (2010)，345-352；Habberger等人，*MAbs.* 6 (2014)，327-339。

[0275] 为了研究可能使原始抗体更稳定和/或改进可制造性、同时保持亲本主题抗体的基本结合特性的氨基酸取代，已经制备并分析了具有聚-(GA)₈肽 (SEQ ID NO:81)的主题NI-308.5J10抗体的Fab片段的晶体结构；参见实施例12至16和图11和12。为了监测原始NI-308.5J10抗体的不同变体的结合亲和力，产生了Fab片段并进行测试以定量固有的单价亲和力，而没有来自多价相互作用的复杂性。由于修饰的Fab片段基本上保留了亲本抗体的Fab片段的亲和力，因此预期相应的完整IgG抗体与针对聚-(GA)₁₅肽 (SEQ ID NO:66)的亲本抗体具有基本上相同的结合亲和力；参见条款[14]和所附的实施例。

[0276] 因此，本发明总体上涉及重组人源性单克隆抗DPR抗体及其DPR结合片段、合成和生物技术衍生物及其变体，其中所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含以下六个互补决定区 (CDR)：

[0277] (a) VH-CDR1，所述VH-CDR1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列 (例如，包含SEQ ID NO:78)或其变体，其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代，

[0278] (b) VH-CDR2，所述VH-CDR2包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其变体，其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代，

[0279] (c) VH-CDR3，所述VH-CDR3包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或其变体，其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代，

[0280] (d) VL-CDR1，所述VL-CDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其变体，其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代，

[0281] (e) VL-CDR2，所述VL-CDR2包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或其变体，其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代，

[0282] (f) VL-CDR3，所述VL-CDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列或其变体，其中所述变体包含一个或两个氨基酸取代；

[0283] 其中所述抗体或其DPR结合显示在所附的实施例和附图中针对主题NI-308.5J10抗体及其特异性变体所说明的任何一种性质，任选地其中所述抗体或其DPR结合具有一种或多种如在条款[1]至[36]中概述的性质，任选地组合，如条款彼此之间的依赖关系所指示。例如，在一个实施方案中，所述抗体或其DPR结合能够结合如从9号染色体的开放阅读框72 (C9orf72) 基因翻译的具有至少6个重复序列 (GA)₆ (SEQ ID NO:80)的聚甘氨酸-丙氨酸

(GA)的二肽重复序列(DPR)。主题NI-308.5J10的合成或生物技术衍生物或变体可含有一个、两个、三个、四个、五个或六个如本文所述的变体CDR。例如,所述合成或生物技术衍生物或变体抗体或其DPR结合可含有三个、任选地两个或任选地仅一个变体VH-CDR,而VL-CDR保持不变或仅一个VL-CDR表示变体,反之亦然。另外地或可替代地,本发明的抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含

[0284] (a) 包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或其变体的可变重(V_H)链,其中所述变体包含一个或多个氨基酸取代;以及

[0285] (b) 包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列或其变体的可变轻(V_L)链,其中所述变体包含一个或多个氨基酸取代;任选地其中

[0286] 所述 V_H 和VL链氨基酸序列分别与SEQ ID NO:2和7至少90%相同。

[0287] 用于选择CDR中的取代和位置的适当氨基酸的优选标准显示在图1中,并在上文图1的图例中进行了解释。

[0288] 如实施例12至16所示,已鉴定了NI-308.5J10 hIgG1抗体的翻译后修饰,即轻链糖基化和重链Asn54脱酰胺,其已通过相应的氨基取代除去。因此,在本发明的抗体或其DPR结合片段的一个实施方案中,CDR不含易脱酰胺的天冬酰胺(N)和/或谷氨酰胺(Q)和/或所述 V_H 和/或 V_L 链氨基酸序列不含占据的糖基化位点。在一个实施方案中,所述 V_H 和/或 V_L 链氨基酸序列中的一个或多个糖基化位点已被突变为不能成为占据的糖基化位点。

[0289] 在一个优选的实施方案中,所述抗体或其DPR结合片段中的一个、两个或多个氨基酸取代选自

[0290] (a) 用非易脱酰胺的氨基酸取代易脱酰胺的天冬酰胺(N)或谷氨酰胺(Q);

[0291] (b) 用较大的氨基酸取代与易脱酰胺的N或Q直接相邻的小的柔性氨基酸,任选地其中所述相邻氨基酸是甘氨酸(G);

[0292] (c) 取代导致糖基化位点去除的至少一种氨基酸,任选地其中所述至少一种氨基酸在糖基化基序NXS或NXT内;和/或

[0293] (d) 取代一种或多种为保守性氨基酸取代的氨基酸;任选地,其中(a)和(b)的氨基酸取代存在于VH-CDR2中并且(c)的氨基酸取代存在于 V_L 链中。

[0294] 此外在此,在分别旨在改进主题抗体及其DPR结合片段的稳定性和可制造性的情况下,根据上述考虑任选地选择用于取代的氨基酸。任选地,根据VH-CDR2中的实施例,对应于SEQ ID NO:2的位置54的天冬酰胺(N)和/或对应于SEQ ID NO:2的位置55的甘氨酸(G)被另一种氨基酸取代,任选地其中所述天冬酰胺(N)被丝氨酸(S)或苏氨酸(T)取代,和/或其中所述甘氨酸(G)被丝氨酸(S)或苏氨酸(T)取代;和/或在所述 V_L 链中,对应于SEQ IDNO:7的位置75的天冬酰胺(N)被另一种氨基酸取代,任选地其中所述天冬酰胺(N)被天冬氨酸(D)取代。

[0295] 任选地,所述抗DPR抗体、DPR结合片段或其生物技术衍生物或变体如果以IgG形式分析,任选地IgG1对于结合DPR蛋白(GA)₆(SEQ ID NO:80)具有对应于 ≤ 15 nM的 EC_{50} (半最大有效浓度)值的结合亲和力-参见实施例7-和/或对于结合DPR蛋白(GA)₁₀(SEQ ID NO:79)、(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)和/或(GA)₂₀(SEQ ID NO:82)具有对应于 ≤ 5 nM、任选地 ≤ 2 nM、任选地 ≤ 1 nM或任选地 ≤ 0.5 nM的 EC_{50} 值的结合亲和力;参见实施例3、4和7以及图2和6。在一个实施方案中,所述主题抗体仅在重复序列数目 $n \leq 6$ 时才结合至聚-GA肽;参见实施例7和图6。

另外或可替代地,如通过生物层干涉测量法所测定,至少呈IgG形式的抗体以约(0.5-2.0nM)的亲合力KD结合至聚-(GA)₁₅(SEQ ID NO:66),任选地约(0.05-0.5nM)的KD和任选地约(0.1-0.2nM)的KD结合至聚-(GA)₁₅肽(SEQ ID NO:66),其中缔合速率常数为($K_a=0.5-5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)并且解离常数为($K_d=1-5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$);参见实施例8和图7。

[0296] 因此,对于高亲和力和提及的EC₅₀和KD值,所述抗DPR抗体、其DPR结合片段或生物技术衍生物或变体任选地还包含与所述CDR或V_H和V_L链氨基酸序列任选地异源的多肽序列,任选地,其中所述多肽序列包含人恒定结构域,所述人恒定结构域任选地具有IgG型,任选地具有IgG1类或同种型。

[0297] 在另一方面,主题NI-308.5J10抗体的DPR结合片段(尤其是Fab片段)证明对于设计和研究合成和生物技术衍生物或变体特别有用,任选地在较小聚GA重复序列的情况下,即(GA)₈(SEQ ID NO:81);参见实施例13至16以及图11和12。因此,在另一个实施方案中,如通过表面等离子体共振(SPR)所测定,本发明的抗体或其DPR结合片段对聚-(GA)₈(SEQ ID NO:81)具有的结合亲和力对应于K_D(解离常数)小于30nM,其中K_a(缔合速率)小于 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 且K_d(解离速率)小于 $10 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$,任选地其中如通过表面等离子体共振(SPR)所测定,所述DPR结合片段对具有的结合亲和力对应于K_D(解离常数)为10nM至30nM,其中K_a(缔合速率)为1至 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 且K_d(解离速率)为2.5至 $10 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 。另外或可替代地,如通过差示扫描量热法(VP-DSC)所测定,所述抗体或其DPR结合片段任选地特征在于,其Fab片段分别具有在78°C-82°C范围内,任选地在约79°C-81°C范围内的热稳定性和解链温度T_m;参见实施例16。

[0298] 一些抗体能够结合至多种生物分子,例如蛋白质。如技术人员将理解的,术语特异性在本文中用于指示除DPR以外的其他生物分子不显著结合至本发明的抗体。任选地,与除DPR以外的生物分子结合的水平产生为对DPR的亲合力的至多仅20%或更少、10%或更少、仅5%或更少、仅2%或更少或仅1%或更少(即低至少5倍、10倍、20倍、50倍或100倍,或超出此范围的任何其他值)的结合亲和力。特别地,如上文所提及和在实施例和附图中所说明,根据本发明,所述抗DPR抗体或其DPR结合片段或其生物技术衍生物或变体任选地展示1、2、3、4或全部5种以下结合特性:(i)识别聚-(GA)₁₅肽(SEQ ID NO:66)上的构象表位,即在先前结合不同的抗聚-GA DPR抗体后仍能结合聚-GADPR聚集体(实施例9和图8);(ii)以与相应疏水包被的肽基本相同的亲和力与偶联至BSA载体蛋白的聚-GA肽结合(实施例3和4以及图2和3);(iii)至少在实施例5中测试并在图4中示出的那些与不相关的淀粉样蛋白生成性蛋白质基本上没有交叉反应性或具有最小交叉反应性;(iv)能够结合包含从C9orf72-FTLD患者的小脑的颗粒细胞层中的C9orf72基因翻译的包含含DPR的蛋白质的聚集体(实施例11和图10)。

[0299] 如前所述,DPR蛋白聚集在脑的额叶和颞叶是神经变性疾病FTLD的标志。在小脑颗粒细胞层中具有神经元细胞质内含物、神经元核内内含物和营养不良性神经突中的DPR聚集体的患者通常表现出改变的认知功能。特别地,如上文所述,患有FTLD的患者表现出痴呆、行为以及人格、语言功能障碍和/或精神病的改变,这是由于额叶和颞叶皮质的变性所致。因此,在一个实施方案中,本发明的抗体或其DPR结合片段可用于治疗与DPR相关的疾病和/或病症。在一个优选的实施方案中,本发明的抗体或其DPR结合片段可用于治疗FTLD及其症状。可在细胞测定(如背景部分中所述的那些)(也参见实施例17)中验证本发明的主题

抗体或其DPR结合片段的治疗用途,并且任选地,以使得如果将其施用至转基因C9orf72小鼠模型,所述抗体能够改善C9orf72疾病的病理学标志的至少一种症状,如神经元丧失、行为异常、运动障碍和存活率降低(实施例18)。

[0300] 以下表2列出了编码上述鉴定的可变区的相应核苷酸序列。 V_H 和 V_L 链的氨基酸序列的CDR的示例性集合在图1A-F至的任一个中示出。因此,本发明提供了新颖的抗DPR抗体的属,其以抗体或其DPR结合片段为例,所述抗体或其DPR结合片段在其可变区中包含

[0301] (i) 以下六个CDR:

[0302] (a) VH-CDR1,所述VH-CDR1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列(例如,包含SEQ ID NO:78),

[0303] (b) VH-CDR2,所述VH-CDR2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,

[0304] (c) VH-CDR3,所述VH-CDR3包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,

[0305] (d) VL-CDR1,所述VL-CDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,

[0306] (e) VL-CDR2,所述VL-CDR2包含SEQ IDNO:9的氨基酸序列,

[0307] (f) VL-CDR3,所述VL-CDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

[0308] (ii) 以下六个CDR:

[0309] (a) VH-CDR1,所述VH-CDR1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列(例如,包含SEQ ID NO:78),

[0310] (b) VH-CDR2,所述VH-CDR2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,

[0311] (c) VH-CDR3,所述VH-CDR3包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,

[0312] (d) VL-CDR1,所述VL-CDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,

[0313] (e) VL-CDR2,所述VL-CDR2包含SEQ IDNO:9的氨基酸序列,

[0314] (f) VL-CDR3,所述VL-CDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

[0315] (iii) 以下六个CDR:

[0316] (a) VH-CDR1,所述VH-CDR1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列(例如,包含SEQ ID NO:78),

[0317] (b) VH-CDR2,所述VH-CDR2包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,

[0318] (c) VH-CDR3,所述VH-CDR3包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,

[0319] (d) VL-CDR1,所述VL-CDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,

[0320] (e) VL-CDR2,所述VL-CDR2包含SEQ IDNO:9的氨基酸序列,

[0321] (f) VL-CDR3,所述VL-CDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;或

[0322] (iv) 以下六个CDR:

[0323] (a) VH-CDR1,所述VH-CDR1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列(例如,包含SEQ ID NO:78),

[0324] (b) VH-CDR2,所述VH-CDR2包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列,

[0325] (c) VH-CDR3,所述VH-CDR3包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,

[0326] (d) VL-CDR1,所述VL-CDR1包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,

[0327] (e) VL-CDR2,所述VL-CDR2包含SEQ IDNO:9的氨基酸序列,

[0328] (f) VL-CDR3,所述VL-CDR3包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

[0329] 任选地,其中所述抗体或DPR结合片段在其可变区中包含

- [0330] (i) 如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:24中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0331] (ii) 如SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:24中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0332] (iii) 如SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:24中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0333] (iv) 如SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:24中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0334] (v) 如SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:24中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0335] (vi) 如SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:7中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0336] (vii) 如SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:7中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0337] (viii) 如SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:7中所示的V_H和V_L链氨基酸序列;
- [0338] (ix) 如SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:7中所示的V_H和V_L链氨基酸序列。

[0339] 然而,如上文已经讨论的,本领域技术人员充分意识到以下事实:此外或可替代地,可使用CDR,所述CDR在其氨基酸序列方面与图1A-F中的任一个至所示的氨基酸序列不同,在CDR2和CDR3的情况下相差一个或两个、甚至更多个氨基酸。因此,在一个实施方案中,提供了本发明的抗体、其生物技术衍生物和变体抗DPR抗体及其DPR片段,所述抗体在其可变区中包含如图1A-F中任一个至所示的CDR,其中一个或多个,任选地不超过一个或两个其CDR包含一个或多个、任选地不超过两个氨基酸取代;也参见上文。

[0340] 如实施例所示,VH-CDR2中的一个或两个氨基酸取代不影响原始抗体的结合亲和力和特性。关于CDR以及分别可变重链和轻链氨基酸序列中的进一步或其他氨基酸取代,任选地例如根据Mirsky等人,Mol.Biol.Evol.35(2014),806-819所分析和描述的最频繁交换的氨基酸进行保守性氨基酸取代;参见Mirsky等人的第813页的图6。在这种情况下,对具有相似和不同结合特性的其他人源性抗聚-GA DPR抗体的CDR进行的初步分析揭示,主题抗体的CDR内的某些位置以及与针对VH-CDR2相似的氨基酸取代使抗体的独特结合特性不受影响。CDR内的优选氨基酸取代的对应位置在图1中以粗体和斜体表示,包括仅在VH-CDR2中以粗体表示的那些。

[0341] 特别地,在VH-CDR1内,D可被S取代和/或S可被T取代;在VH-CDR3内,V可被E取代,T可被S取代和/或M可被V取代;在VL-CDR1内,R可被K取代,P可被S取代,R可被E取代,S可被G取代,并且T可被取代;在VL-CDR2内,S可被A取代和/或A可被G取代;并且在VL-CDR3中,G可被A取代,L可被I取代,并且P可被S取代,而S可被P取代。如所述,任选地,选择属于Mirsky等人(2014),同上的图6中所示的模型LG和AB之一或任选地两者中的同一类别的氨基酸取代,其中LG模型优选用于保持氨基酸性质的趋势,并且其中氨基酸取代是任选地选择的,以使得基本上保持原始氨基酸的物理化学性质,即疏水性、极性 or 带电性质或例如在进行两个或更多个氨基酸取代的情况下,它们相互补偿,以便一起提供表面的物理化学性质。

[0342] 本文提供了一种抗DPR抗体或其片段,例如DPR Ab-1。表12中示出DPR Ab-1的氨基酸序列信息。在一些实施方案中,所述抗DPR抗体或其抗原结合片段结合至本文所述的DPR,例如9号染色体开放阅读框72(C9orf72)二肽重复序列(DPR)蛋白质。在一些实施方案中,所述DPR蛋白包含聚甘氨酸-丙氨酸(GA)重复序列,例如聚-(GA)_n重复序列,其中n是1、2、3、4、5、6或更大(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更大)。在一些实施方案中,所述DPR蛋白包含聚-(GA)_n重复序列,其中n在6与15之间,包括6和15,例如其中n是15。在实施方案中,所述抗DPR抗体或其片段包含DPR Ab-1或其片段(例如,抗原结合片段)。在一些实施方案中,表12中的斜体天冬酰胺残基被糖基化;在其他实施方案中,表12中的斜体天冬酰胺

胺残基是未糖基化的。

[0343] 表12-DPR Ab-1的氨基酸序列信息

	氨基酸序列	SEQ ID NO:
具有信号肽的重链氨基酸序列(在一些实施方案中,斜体的天冬酰胺是糖基化的;在其他实施方案中,斜体的天冬酰胺是未糖基化的)(CDR 加下划线)	MGWSLILLFLVAVATRVLSQVQLVESGGGV VQPGRSLRLSCAAS <u>SGFTFSNHAMHWVRQA</u> PGKGLEWVAVISYDGENTYYADSI <u>EGRFTIS</u> RDNFKNTLFLQMYSLTADDTAMYFCAR <u>GG</u> <u>RRGHFTSY</u> YLDYWGQGT <u>LVTVSSASTKGPS</u> VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	37
重链氨基酸序列(成熟,无信号肽)(CDR 加下划线)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NHAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGENT YYADSI <u>EGRFTIS</u> RDNFKNTLFLQMYSLTAD DTAMYFCAR <u>GGRRGHFTSY</u> YLDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTI <u>SKAKGQPREPQVYTLPPSR</u> DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	38
重链恒定结构域氨基酸序列	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYMS YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTI <u>SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK</u> NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	39
重链可变区氨基酸序列(CDR 加下划线)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS NHAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGENT YYADSI <u>EGRFTIS</u> RDNFKNTLFLQMYSLTAD DTAMYFCAR <u>GGRRGHFTSY</u> YLDYWGQGT LVTVSS	40

[0344]

具有信号肽的轻链氨基酸序列(CDR 加下划线)	MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCRASQNIDKYLNWYQQI PGKAPKLLIYA <u>AASSLHSGVPSRFSGSGSGTD</u> FSLTISSLQPEDFAIYYC <u>QQSYSSFRT</u> FGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	41
轻链氨基酸序列(成熟, 无信号肽)(CDR 加下划线)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIDK YLNWYQQIPGKAPKLLIYA <u>AASSLHSGVPSRF</u> SGSGSGTDFSLTISSLQPEDFAIYYC <u>QQSYSS</u> <u>FRTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK</u> SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	42
轻链恒定结构域氨基酸序列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	43
轻链可变区氨基酸序列(CDR 加下划线)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIDK YLNWYQQIPGKAPKLLIYA <u>AASSLHSGVPSRF</u> SGSGSGTDFSLTISSLQPEDFAIYYC <u>QQSYSS</u> <u>FRTFGQGTKLEIK</u>	44
重链 CDR 1	GFTFSNHAMH	45
重链 CDR 2	VISYDGENTYYADSIEG	46
重链 CDR 3	GGRRGHFTSYLDY	47
轻链 CDR 1	RASQNIDKYLN	48
轻链 CDR 2	AASSLHS	49
轻链 CDR 3	QQSYSSFRT	50

[0346] 在表12中示出框架 (FR) 区和互补决定区 (CDR), 其中 CDR 加下划线。使用了 Kabat 编号方案 (参见 <http://www.bioinf.org.uk/abs/>; Kabat 等人, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983), 在所提及的网络参考文献中引用并在 WO 2016/050822 A2 中第 39 和 40 页的表 1 中给出, 以引用的方式并入本文。除非另外指定, 否则提到在本发明的抗体或其 DPR 结合片段、变体或衍生物中编号具体氨基酸残基位置是根据 Kabat 编号系统, 然而, 这是理论上的, 并且可能并不等同地适用于本发明的每种抗体。例如, 取决于第一 CDR 的位置, 随后的 CDR 可能在任一方向上移动。因此, 本领域技术人员基于本申请的公开内容, 在关于表 12 中的 CDR 和/或序列表的指示存在任何意外的错误或 inconsistent 的情况下, 即抗体 DPRab-1 的可变重 (VH) 和可变轻 (VL) 链氨基酸序列处于适合根据 Kabat 确定正确 CDR 序列的位置, 其应用于定义要求保护的抗体及其 DPR 结合片段。

[0347] 本文提供了一种组合物, 所述组合物包含抗 DPR (例如, 抗 C90RF72 DPR) 抗体或其片段 (例如, 结合, 例如特异性结合和/或以高亲和力结合至聚-(GA)_n 重复序列, 例如本文所述的聚-(GA)_n 重复序列), 其中所述抗 DPR 抗体或其片段包含:

[0348] (i) 重链, 所述重链包含 SEQ ID NO: 37 或 38 的氨基酸序列 (或与 SEQ ID NO: 37 或 38 至少 95%, 例如 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一的氨基酸序列), 由其组成或基本

上由其组成，

[0349] 任选地，其中所述重链氨基酸序列（例如，重链成熟序列）的长度不超过452个氨基酸，和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基，和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸，和/或其中所述重链包含长度不超过123个氨基酸的重链可变区氨基酸序列；

[0350] (ii) 重链，所述重链包含重链恒定结构域，所述重链恒定结构域包含SEQ ID NO: 39的氨基酸序列（或与SEQ ID NO: 39至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列），由其组成或基本上由其组成，

[0351] 任选地，其中所述重链氨基酸序列（例如，重链成熟序列）的长度不超过452个氨基酸，和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基，和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸，和/或其中所述重链包含长度不超过123个氨基酸的重链可变区氨基酸序列；

[0352] (iii) 重链，所述重链包含重链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO: 40（或与SEQ ID NO: 40至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列），由其组成或基本上由其组成，

[0353] 任选地，其中所述重链氨基酸序列（例如，重链成熟序列）的长度不超过452个氨基酸，和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基，和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸，和/或其中所述重链包含长度不超过123个氨基酸的重链可变区氨基酸序列；

[0354] (iv) 重链可变区氨基酸序列，所述重链可变区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 40（或与SEQ ID NO: 40至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列），由其组成或基本上由其组成，

[0355] 任选地，其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸；

[0356] (v) 轻链，所述轻链包含SEQ ID NO: 41或42（或与SEQ ID NO: 41或42至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列），由其组成或基本上由其组成，

[0357] 任选地，其中所述轻链氨基酸序列（例如，轻链成熟序列）的长度不超过214个氨基酸，和/或其中所述轻链包含长度不超过107个氨基酸的轻链可变区氨基酸序列；

[0358] (vi) 轻链，所述轻链包含轻链恒定结构域，所述轻链恒定结构域包含SEQ ID NO: 43（或与SEQ ID NO: 43至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列），由其组成或基本上由其组成，

[0359] 任选地，其中所述轻链氨基酸序列（例如，轻链成熟序列）的长度不超过214个氨基酸，和/或其中所述轻链包含长度不超过107个氨基酸的轻链可变区氨基酸序列；

[0360] (vii) 轻链，所述轻链包含轻链可变区氨基酸序列，所述轻链可变区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 44（或与SEQ ID NO: 44至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列），由其组成或基本上由其组成，

[0361] 任选地，其中所述轻链氨基酸序列（例如，轻链成熟序列）的长度不超过214个氨基酸，和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸；

[0362] (viii) 轻链可变区氨基酸序列，所述轻链可变区氨基酸序列包含SEQ ID NO: 44（或与SEQ ID NO: 44至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序

列),由其组成或基本上由其组成,

[0363] 任选地,其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0364] (ix) 重链,所述重链包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:45的CDR1氨基酸序列(或与SEQ ID NO:45至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);SEQ ID NO:46的CDR2氨基酸序列(或与SEQ ID NO:46至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),以及SEQ ID NO:47的CDR3氨基酸序列(或与SEQ ID NO:47至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),

[0365] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0366] (x) 重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:45的CDR1氨基酸序列(或与SEQ ID NO:45至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);SEQ ID NO:46的CDR2氨基酸序列(或与SEQ ID NO:46至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),以及SEQ ID NO:47的CDR3氨基酸序列(或与SEQ ID NO:47至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),

[0367] 任选地,其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0368] (xi) 轻链,所述轻链包含轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:48的CDR1氨基酸序列(或与SEQ ID NO:48至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);SEQ ID NO:49的CDR2氨基酸序列(或与SEQ ID NO:49至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),以及SEQ ID NO:50的CDR3氨基酸序列(或与SEQ ID NO:50至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),

[0369] 任选地,其中所述轻链氨基酸序列(例如,轻链成熟序列)的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0370] (xii) 轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:48的CDR1氨基酸序列(或与SEQ ID NO:48至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);SEQ ID NO:49的CDR2氨基酸序列(或与SEQ ID NO:49至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),以及SEQ ID NO:50的CDR3氨基酸序列(或与SEQ ID NO:50至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),

[0371] 任选地,其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;和/或

[0372] (xiii) 重链和轻链,所述轻链包含轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:48的CDR1氨基酸序列(或与SEQ ID NO:48至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);SEQ ID NO:49的CDR2氨基酸序列(或与SEQ ID NO:49至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),以及SEQ ID NO:50的CDR3氨基酸序列(或与SEQ ID NO:50至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),

[0373] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基

酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链包含长度不超过123个氨基酸的可变区氨基酸序列;和/或任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸。

[0374] 在一个实施方案中,本文提供了一种多核苷酸,所述多核苷酸任选地连接至异源核酸,其中(i)所述多核苷酸编码具有本文所述的VH-CDR的免疫球蛋白可变重链,并且其中当与包含表12中所列的氨基酸序列的免疫球蛋白可变轻链配对时,所述免疫球蛋白可变重链能够(例如,特异性地和/或以高亲和力)结合至本文所述的DPR(例如,聚-(GA)_n),和/或(ii)所述多核苷酸编码具有本文所述的VL-CDR的免疫球蛋白可变轻链,并且其中当与包含表12中所列的氨基酸序列的免疫球蛋白可变重链配对时,所述免疫球蛋白可变轻链能够(例如,特异性地和/或以高亲和力)结合至本文所述的DPR(例如,聚-(GA)_n)。

[0375] 在一些方面,本文提供了一种抗体或其片段,所述抗体或其片段在N-末端包含信号肽。在一些实施方案中,所述信号肽包含氨基酸序列MGWSLILLFLVAVATRVLS(SEQ ID NO:59)或与SEQ ID NO:59至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列。在其他实施方案中,所述信号肽包含氨基酸序列MDMRVPAQLLGLLLWFPGSRC(SEQ ID NO:60)或与SEQ ID NO:60至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列。

[0376] 在实施方案中,其重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基。在实施方案中,其重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸。

[0377] 在实施方案中,所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸(例如,长度为452个氨基酸)。在实施方案中,所述重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基。在实施方案中,所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸。在实施方案中,所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸(例如,长度为123个氨基酸)。在实施方案中,所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸(例如,长度为214个氨基酸)。在实施方案中,所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸(例如,长度为107个氨基酸)。

[0378] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其片段包含具有IgG1同种型,例如人IgG1(hIgG1)同种型的重链。在实施方案中,所述重链包含同种异型G1m1,17。

[0379] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其片段包含具有κ同种型,例如人κ同种型的轻链。在实施方案中,所述轻链包含同种异型Km3。

[0380] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其片段连接至药物;或者用标记,例如酶、放射性同位素、荧光团、标签、重金属和/或标记可检测地标记。

[0381] 本发明的抗体可以是人源性的,特别是用于治疗应用。或者,本发明的抗体是啮齿动物、啮齿动物源化或嵌合的啮齿动物-人抗体,任选地鼠、鼠源化或嵌合的鼠-人抗体或大鼠,鼠源化或嵌合的鼠-人抗体,其对于动物制度诊断方法和研究特别有用。在一个实施方案中,本发明的抗体是嵌合的啮齿动物-人抗体或啮齿动物源化抗体。

[0382] 如上文所论述,除完全抗体之外,本发明的抗体也可以多种形式存在;包括例如Fv、Fab和F(ab)₂以及呈单链形式;参见例如国际申请W0 88/09344。因此,在一个实施方案中,提供了本发明的抗体,所述抗体选自由以下组成的组:单链Fv片段(scFv)、F(ab')片段、

F(ab) 片段和F(ab')₂片段。

[0383] 可使用本领域中已知的常规技术,例如通过单独或组合使用氨基酸缺失、插入、取代、添加和/或重组和/或本领域中已知的任何其他修饰来进一步修饰本发明抗体或其相应免疫球蛋白链。用于在潜伏在免疫球蛋白链的氨基酸序列下的DNA序列中引入此类修饰的方法为本领域技术人员所熟知;参见例如,Sambrook,Molecular Cloning A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.和Ausubel,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y. (1994)。对本发明抗体的修饰包括在一个或多个组成性氨基酸处进行化学和/或酶促衍生,包括侧链修饰、骨架修饰以及N末端和C末端修饰,包括乙酰化、羟基化、甲基化、酰胺化和连接碳水化合物或脂质部分、辅因子等。同样,本发明涵盖产生包含在氨基末端处的融合于在羧基末端处的异源分子(如免疫刺激性配体)的所描述抗体或其某一片段的嵌合蛋白。参见,如,国际申请W000/30680的相应技术细节。

[0384] 如本领域普通技术人员已知的,本发明的抗体或其DPR结合片段、合成或生物技术变体或衍生物可包含介导一种或多种效应子功能的恒定区。例如,补体的C1组分与抗体恒定区的结合激活补体系统。活化补体对细胞病原体的调理作用和溶解很重要。补体的激活还刺激炎症响应并且还可涉及自身免疫性超敏反应。此外,抗体经由Fc区结合至各种细胞上的受体,其中所述抗体Fc区上的Fc受体位点结合至细胞上的Fc受体(FcR)。存在多种对不同类别的抗体(包括IgG(γ受体)、IgE(ε受体)、IgA(α受体)和IgM(μ受体))具有特异性的Fc受体。抗体与细胞表面上的Fc受体的结合触发许多重要的和多种的生物反应,包括抗体包覆的颗粒的吞噬和破坏、免疫复合物的清除、杀伤细胞对抗体包覆的靶细胞的溶解(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,或ADCC)、炎症介质的释放、胎盘转移以及免疫球蛋白产生的控制。

[0385] 因此,本发明的某些实施方案包括抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物,其中一个或多个恒定区结构域的至少一部分已缺失或以其他方式改变以便提供所需的生物化学特性,如与具有大致相同免疫原性的完整、未改变的抗体相比,降低的效应子功能、非共价二聚化的能力、定位在DPR蛋白聚集和沉积部位的能力提高、血清半衰期减少或血清半衰期增加。例如,用于本文所述的诊断和治疗方法中的某些抗体是结构域缺失的抗体,所述结构域缺失的抗体包含与免疫球蛋白重链相似的多肽链、但缺少一个或多个重链结构域的至少一部分。例如,在某些抗体中,所修饰抗体的恒定区的一个完整结构域缺失,例如,CH2结构域的全部或部分将缺失。在其他实施方案中,用于本文所述的诊断和治疗方法至的某些抗体具有恒定区,例如IgG重链恒定区,其被改变以消除糖基化,在本文其他地方称为无糖基化或“agly”抗体。可通过酶促以及通过工程化恒定区中的共有糖基化位点来制备此类“agly”抗体。不受理论的束缚,据信“agly”抗体可在体内具有改进的安全性和稳定性特征。产生具有所需效应子功能的无糖基化抗体的方法例如在国际申请W02005/018572中找到,其以引用的方式整体并入本文。

[0386] 在本文所述的某些抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物中,可使用本领域已知的技术使Fc部分突变以降低效应子功能。例如,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其他方式)可减少循环修饰抗体的Fc受体结合,从而增加DPR蛋白定位。在其他情况下,可以是,与本发明一致地,恒定区修饰可减弱补体结合并且因此减少缀合的细胞毒素的血清半

衰期和非特异性缔合。另外,恒定区的其他修饰可用于修饰二硫键或寡糖部分,所述二硫键或寡糖部分因增加的抗原特异性或抗体柔性而允许增强的定位。可使用众所周知的免疫学技术容易地测量和定量所述修饰的所得生理概况、生物利用度和其他生物化学效应,如DPR蛋白定位、生物分布和血清半衰期,而无需进行过多的实验。

[0387] 在本文所述的某些抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物中,可使Fc部分突变或交换为替代蛋白质序列,以例如通过经由Fc γ 受体、LRP或Thy1受体或通过“SuperAntibody技术”增强受体介导的抗体的胞吞作用来增加抗体的细胞摄取,所述技术据说可使抗体穿梭进入活细胞而不会伤害它们(Expert Opin.Biol.Ther.(2005),237-241)。例如,可使用本领域已知的技术来工程化抗体结合区的融合蛋白和细胞表面受体或具有与DPR结合的特定序列以及细胞表面受体的双特异性或多特异性抗体的同源蛋白配体的产生。

[0388] 在本文所述的某些抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物中,可使Fc部分突变或交换为替代蛋白质序列,或者可对抗体进行化学修饰以增加其血脑屏障渗透。

[0389] 本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物的经修饰形式可使用本领域已知的技术由完整的前体抗体或亲本抗体制备。在本文更详细地讨论了示例性技术。可使用本领域已知的技术来制备或制造本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物。在某些实施方案中,抗体分子或其片段是“重组产生的”,即使用重组DNA技术产生的。用于制备抗体分子或其片段的示例性技术在本文其他地方更详细地讨论。

[0390] 本发明的抗体或DPR结合片段、生物技术变体或其衍生物还包括例如通过将任何类型的分子共价连接至抗体来进行修饰的衍生物,使得共价连接不会阻止抗体特异性地结合至其同源表位。例如但不限于,抗体衍生物包括已例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解裂解、与细胞配体或其他蛋白质连接等进行了修饰的抗体。可通过已知技术进行多种化学修饰中的任一种,包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外,所述衍生物可含有一种或多种非经典氨基酸。

[0391] 可通过已知技术来产生识别特异性表位的抗体片段。例如,Fab和F(ab')₂片段可重组地或通过使用酶诸如木瓜蛋白酶(用于产生Fab片段)或胃蛋白酶(用于产生F(ab')₂片段)的免疫球蛋白分子的蛋白水解裂解来产生。F(ab')₂片段含有可变区、轻链恒定区以及重链的CH1结构域。此类片段足以用于例如涉及将免疫球蛋白的免疫特异性部分偶联至检测试剂如放射性同位素的免疫诊断程序中。

[0392] 本发明的抗体可通过本领域已知的用于抗体合成的任何方法,特别是通过化学合成或任选地通过如本文所述的重组表达技术来产生。

[0393] 在一个实施方案中,本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物包含合成的恒定区,其中一个或多个结构域部分或完全缺失(“结构域缺失的抗体”)。在某些实施方案中,相容性修饰的抗体将包含结构域缺失的构建体或变体,其中整个CH2结构域已被除去(Δ CH2构建体)。对于其他实施方案,可用短连接肽取代缺失的结构域,以为可变区提供柔性和运动自由度。本领域技术人员将理解,由于CH2结构域对抗体的分解代谢速率的调控性质,因此特别优选此类构建体。结构域缺失的构建体可使用编码IgG₁人恒定结构域的载体得到,参见例如国际申请W0 02/060955和W0 02/096948A2。这种载体被工程化以缺失CH2结构

域,并提供表达结构域缺失的IgG₁恒定区的合成载体。

[0394] 在某些实施方案中,本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物是微型抗体。可使用本领域中描述的方法来制备微抗体,参见例如美国专利5,837,821或国际申请WO 94/09817。

[0395] 在一个实施方案中,本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物包含免疫球蛋白重链,其具有几个或甚至单个氨基酸的缺失或取代,只要其允许单体亚基之间的缔合即可。例如,对CH2结构域的选定区域中的单个氨基酸进行突变可足以基本上降低Fc结合并且因而增加DPR蛋白定位。类似地,可能需要仅仅缺失控制待调节的效应子功能(例如,补体结合)的一个或多个恒定区结构域的那一部分。恒定区的这类部分缺失可以改进抗体的选定特征(血清半衰期),同时使与该恒定区结构域完整相关联的其他所需的功能保持不变。此外,正如以上所提到的,所公开的抗体的恒定区可通过增强所得到的构建体的特征的一个或多个氨基酸的突变或取代来合成。就此而言,破坏由保存性结合位点(例如Fc结合)提供的活性,但大致上保持经过修饰的抗体的构形和免疫原性特征可能是可行的。其他实施方案包括将一个或多个氨基酸添加至恒定区以便增强所希望的特性如效应子功能或提供更多细胞毒素或碳水化合物连接。在此类实施方案中,可能希望插入或复制源自选定恒定区结构域的特异性序列。

[0396] III. 编码本发明抗体的多核苷酸

[0397] 本发明还涉及一种或多种多核苷酸,所述多核苷酸编码上文II章节中描述的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物中的任一种。编码抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物的多核苷酸可由任何多核糖核苷酸或聚脱氧核糖核苷酸组成,其可以是未修饰的RNA或DNA或修饰的RNA或DNA。例如,编码抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物的多核苷酸可由单链和双链的DNA、为单链区与双链区的混合物的DNA、单链和双链的RNA以及为单链区与双链区的混合物的RNA、包含可为单链或更通常为双链或单链区与双链区的混合物的DNA和RNA的杂合分子组成。另外,编码抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物的多核苷酸可由包含RNA或DNA或RNA和DNA两者的三链区组成。编码抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物的多核苷酸也可含有出于稳定性或其他原因而进行修饰的一个或多个经修饰的碱基或DNA或RNA主链。“经修饰的”碱基包括例如三苯甲基化碱基和不常见的碱基如肌苷。可对DNA和RNA进行多种修饰;因此,“多核苷酸”包括化学、酶或代谢修饰的形式。

[0398] 可通过以下方式产生编码源自免疫球蛋白(例如,免疫球蛋白重链部分或轻链部分)的多肽的非天然变异体的分离的多核苷酸:将一个或多个核苷酸取代、添加或缺失引入免疫球蛋白的核苷酸序列以使得将一个或多个氨基酸取代、添加或缺失引入到所编码的蛋白质之中。可通过标准的技术(如定点诱变和PCR介导的诱变)来引入突变。任选地,保守性氨基酸取代在一个或多个非必需氨基酸残基处进行。

[0399] 众所周知,可通过标准技术,如异硫氰酸胍提取并沉淀、然后离心或色谱法来从原始B细胞、杂交瘤细胞或其他转化细胞中分离RNA。如果需要,可通过标准技术如寡dT纤维素上色谱法从总RNA中分离出mRNA。合适的技术是本领域熟知的。在一个实施方案中,可根据众所周知的方法使用逆转录酶和DNA聚合酶同时或分别制备编码抗体的轻链和重链的cDNA。PCR可通过共有恒定区引物或基于公开的重链和轻链DNA和氨基酸序列的更特异性引物来起始。如上所述,PCR还可用于分离编码抗体轻链和重链的DNA克隆。在这种情况下,可

通过共有引物或更大的同源探针(如人恒定区探针)筛选文库。

[0400] 可使用本领域中已知的技术从细胞中分离DNA,通常是质粒DNA,根据标准的、众所周知的标准技术,例如在与重组DNA技术有关的前述参考文献中,进行限制性绘图并测序。当然,根据本发明,DNA可在分离过程或随后分析中的任何时候合成。在本文中,本发明还涉及一种多核苷酸,所述多核苷酸至少编码本发明抗体的免疫球蛋白链的结合结构域或可变区。

[0401] 在本发明的一个优选实施方案中,所述多核苷酸包含具有如表2中所示的抗DPR抗体的 V_H 或 V_L 区的多核苷酸序列的核酸,基本上由所述核酸组成或由所述核酸组成。在此方面,本领域技术人员将容易理解,至少编码轻链和/或重链的可变结构域的多核苷酸可编码两条免疫球蛋白链或仅一条的可变结果域。因此,在一个实施方案中,所述多核苷酸包含具有如表2所示的抗DPR抗体和/或其片段的 V_H 和 V_L 区的多核苷酸序列的核酸,基本上由所述核酸或由所述核酸组成。

[0402] 表2:识别聚-GA DPR,任选C9orf72-(聚-GA)-DPR的抗体和抗体变体的 V_H 和 V_L 区的核苷酸序列。

[0403]

抗体	可变重链(V _H)和可变轻链(V _L)的核苷酸序列
NI-308.5J10 V _H	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAA GCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACTTACACTGTCTTAGG TGGCTCCGTCAGTGATTACTACTGGAGCTGCATCCGGCA GCCC GCCGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGAACAT ATACTAACGGGAAGACCACTTACACTTACAACCCCTCCC TCGAGAGTCGACTCAGTTTGTCTATAGACACGTCCATGA ACCAATTCTCCCTGAAGTTGACCTCTGTGACGGCCGCGG ACACGGCCGTCTATTACTGCGCGAGATGGGGGGCGGTG ACTGGTGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCC AGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 1
NI-308.5J10 V _K	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGTCCGTC ACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTCCT CGGAGCCTTCTACATACTAATGGATATACATATTTGGAC TGGTACCTACAAAGGCCAGGGCAGTCTCCACAACCTCCT GATCTTTTTGGCTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGA CAGGTT CAGTGGCAGCGGATCAGGCACAAATTTTACAC TGAGAATCAGCGGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAGTT TATTACTGCATGCAAGGTCTACAACCTTCGTGGACGTT GGCCAGGGGACCAAGGTGGAAATCAA SEQ ID NO: 6
NI-308.5J10 V _H -N54S	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAA GCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACTTACACTGTCTTAGG TGGCTCCGTCAGTGATTACTACTGGAGCTGCATCCGGCA GCCC GCCGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGAACAT ATACTAGCGGGAAGACCACTTACACTTACAACCCCTCCC TCGAGAGTCGACTCAGTTTGTCTATAGACACGTCCATGA ACCAATTCTCCCTGAAGTTGACCTCTGTGACGGCCGCGG ACACGGCCGTCTATTACTGCGCGAGATGGGGGGCGGTG ACTGGTGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCC AGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 11
NI-308.5J10 V _H -N54T	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAA GCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACTTACACTGTCTTAGG TGGCTCCGTCAGTGATTACTACTGGAGCTGCATCCGGCA

	<p>GCCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGAACAT ATACTACCGGGAAGACCACTTACACTTACAACCCCTCCC TCGAGAGTCGACTCAGTTTGTCTATAGACACGTCCATGA ACCAATTCTCCCTGAAGTTGACCTCTGTGACGGCCGCGG ACACGGCCGTCTATTACTGCGCGAGATGGGGGGCGGTG ACTGGTGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCC AGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCG</p> <p style="text-align: right;">SEQ ID NO: 14</p>
	<p>NI-308.5J10 V_H-G55S</p> <p>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAA GCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACTTACACTGTCTTAGG TGGCTCCGTCAGTGATTACTACTGGAGCTGCATCCGGCA GCCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGAACAT ATACTAACAGCAAGACCACTTACACTTACAACCCCTCCC TCGAGAGTCGACTCAGTTTGTCTATAGACACGTCCATGA ACCAATTCTCCCTGAAGTTGACCTCTGTGACGGCCGCGG ACACGGCCGTCTATTACTGCGCGAGATGGGGGGCGGTG ACTGGTGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCC AGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCG</p> <p style="text-align: right;">SEQ ID NO: 17</p>
[0404]	<p>NI-308.5J10 V_H-G55T</p> <p>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAA GCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACTTACACTGTCTTAGG TGGCTCCGTCAGTGATTACTACTGGAGCTGCATCCGGCA GCCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGAACAT ATACTAACACCAAGACCACTTACACTTACAACCCCTCCC TCGAGAGTCGACTCAGTTTGTCTATAGACACGTCCATGA ACCAATTCTCCCTGAAGTTGACCTCTGTGACGGCCGCGG ACACGGCCGTCTATTACTGCGCGAGATGGGGGGCGGTG ACTGGTGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCC AGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCG</p> <p style="text-align: right;">SEQ ID NO: 20</p>
	<p>NI-308.5J10 V_K-N75D</p> <p>GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGTCCGTC ACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTCCT CGGAGCCTTCTACATACTAATGGATATACATATTTGGAC TGGTACCTACAAAGGCCAGGGCAGTCTCCACAACCTCCT GATCTTTTTGGCTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGA CAGGTTTCAAGTGGCAGCGGATCAGGCACAGACTTTACAC TGAGAATCAGCGGAGTGGAGGCTGACGATGTTGGAGTT TATTACTGCATGCAAGGTCTACAACCTTCGTGGACGTT GGCCAGGGGACCAAGGTGGAAATCAAA</p> <p style="text-align: right;">SEQ ID NO: 23</p>

[0405] DPR Ab-1抗体或其片段的氨基酸序列可由各种核苷酸序列编码。例如,可优化密码子以最大化多肽的表达。以下表13中示出编码DPR Ab-1的一组示例性核苷酸序列。

[0406] 表13-编码DPR Ab-1的核苷酸序列

	核苷酸序列	SEQ ID NO:
具有信号肽的重链核苷酸序列	ATGGGTTGGAGCCTCATCTTGCTGTTTCTTGTCG CTGTTGCTACGCGTGTCTGTGCGCAGGTGCAGCT GGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTAGTCCAGCCTGG GAGGTCCCTGAGACTGTCCTGTGCAGCCTCTGGA TTCACCTTCAGTAATCATGCTATGCACTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGG CAGTTATATCATATGATGGCGAGAACACATATT ATGCAGACTCCATTGAGGGCCGATTCACCATTTC CAGAGACAATTTCAAGAACACACTCTTTCTACA AATGTACAGCCTGACAGCTGATGACACGGCTAT GTACTTCTGTGCGAGAGGGGGCCGTCGGGGGCA CTTACCTCATACTACCTTGACTACTGGGGCCAG GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGGCTAGTACCA AGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTG ACGGTGTCGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGACACCTTCCCGGTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTA CAAGACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACC TGAATCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTTTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCAGAAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCA TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGT TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA GTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAAAAAGCCTCTCC CTGTCTCCCGTTGA	51
重链核苷酸序列(成熟,	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTA GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTGTCCTGTG	52

[0407]

[0408]

<p>无信号肽)</p>	<p>CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAATCATGCTAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGCGA GAACACATATTATGCAGACTCCATTGAGGGCCG ATTCACCATTTCCAGAGACAATTTCAAGAACAC ACTCTTTCTACAAATGTACAGCCTGACAGCTGAT GACACGGCTATGTA CT TCTGTGCGAGAGGGGGC CGTCGGGGGCACTTCACCTCATACTACCTTGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT CGGCTAGTACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCC GA ACCCGTGACGGTGTCTGTGGA ACTCAGG CGCCCTGACCAGCGGGCGTGACACCTTCCCGGC TGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTTTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAAAAAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA</p>	
<p>重链恒定结构域核苷酸序列</p>	<p>GCTAGTACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCCGTGACGGTGTCTGTGGA ACTCAGGCGC CTTGACCAGCGGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTC CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCACCGT GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG</p>	<p>53</p>

[0409]

	<p>TCTTCCTCTTCCCCCAAACCCCAAGGACACCCT CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTTTCCAACAAAGCCCT CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAG CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAA AAAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA</p>	
<p>重链可变区 核苷酸序列</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTA GTCCAGCCTGGGAGGTCCTGAGACTGTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAATCATGCTAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGCGA GAACACATATTATGCAGACTCCATTGAGGGCCG ATTCACCATTTCCAGAGACAATTTCAAGAACAC ACTCTTTCTACAAATGTACAGCCTGACAGCTGAT GACACGGCTATGTACTTCTGTGCGAGAGGGGGC CGTCGGGGGCACTTCACCTCATACTACCTTGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT CG</p>	<p>54</p>
<p>具有信号肽 的轻链核苷 酸序列</p>	<p>ATGGACATGCGGGTGCCCGCCAGCTGCTGGGC CTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCTAGATGCG ACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGCCAGAACATAGACAAGTACTTAAA TTGGTATCAGCAGATACCGGGGAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCTATGCTGCATCGAGTTTGCACAGT GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCTCTCTCACCATCAGCAGTCTGC AACCTGAAGATTTTGCAATTTACTACTGTCAACA GAGTTACAGTTCCTTCCGGACGTTCCGGCCAAGG GACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG TACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACA GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA</p>	<p>55</p>

	AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC TGAGTTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGTTGA		
[0410]	轻链核苷酸 序列(成熟, 无信号肽)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTT GCCGGGCAAGCCAGAACATAGACAAGTACTTAA ATTGGTATCAGCAGATAACCGGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATGCTGCATCGAGTTTGCACAG TGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATC TGGGACAGATTTCTCTCTCACCATCAGCAGTCTG CAACCTGAAGATTTTGCAATTTACTACTGTCAAC AGAGTTACAGTTCCTTCCGGACGTTTCGGCCAAG GGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGC CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGTTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG GGAGAGTGTTGA	56
	轻链恒定域 核苷酸序列	CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCC CAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAG ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG TCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA	57
	轻链可变区 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTT GCCGGGCAAGCCAGAACATAGACAAGTACTTAA ATTGGTATCAGCAGATAACCGGGGAAAGCCCCTA AGCTCCTGATCTATGCTGCATCGAGTTTGCACAG TGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATC TGGGACAGATTTCTCTCTCACCATCAGCAGTCTG CAACCTGAAGATTTTGCAATTTACTACTGTCAAC AGAGTTACAGTTCCTTCCGGACGTTTCGGCCAAG GGACCAAGCTGGAGATCAA	58

[0411] 如其他地方所述,本发明还包括本发明的多核苷酸的片段。另外,本发明还考虑编码如本文所述的融合多核苷酸、Fab片段和其他生物技术衍生物的多核苷酸。

[0412] 在一个实施方案中,本发明涉及一种多核苷酸,所述多核苷酸任选地连接至异源核酸,其中(i)所述多核苷酸编码具有如前述条款[1]至[10]中任一项所定义的VH-CDR的免疫球蛋白可变重链,并且其中当与包含SEQ ID NO:7或24中所示的氨基酸序列的免疫球蛋白可变轻链配对时,所述免疫球蛋白可变重链展示如实施例所述和如前述条款[1]至

[36]中任一项所述的主体抗体的结合特性,和/或(ii)所述多核苷酸编码具有如前述条款[1]至[10]中任一项所定义的VL-CDR的免疫球蛋白可变轻链,并且其中,当与包含SEQ ID NO:2、12、15、18或21中任一个所示的氨基酸序列的免疫球蛋白可变重链配对时,所述免疫球蛋白可变轻链展示如实施例所述和如前述条款[1]至[36]中任一项所述的主体抗体的结合特性。

[0413] 此外,本发明涉及一种或多种载体,所述载体包含那些多核苷酸中的一种或多种,任选地,其中所述载体是表达载体,并且所述一种或多种多核苷酸可操作地连接至表达控制序列。此外,本发明涉及一种宿主细胞,所述宿主细胞包含本发明的一种或多种多核苷酸或载体;以及一种产生抗聚-(GA)-DPR抗体或其DPR结合片段的方法,所述方法包括在允许表达所述抗DPR抗体或其DPR结合片段的条件下培养本发明的宿主细胞;以及从培养物中分离所述抗DPR抗体或其DPR结合片段。

[0414] 多核苷酸可通过本领域中已知的任何方法来产生或制造。例如,如果抗体的核苷酸序列是已知的,那么编码所述抗体的多核苷酸可从化学合成的寡核苷酸来组装(例如,如Kutmeier等人,BioTechniques 17(1994),242中所描述),简言之,其涉及合成含有编码所述抗体的序列的部分的重叠寡核苷酸,退火并且连接那些寡核苷酸,然后通过PCR来扩增所连接的寡核苷酸。

[0415] 或者,编码抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物的多核苷酸可从来自适合来源的核酸产生。如果含有编码特定抗体的核酸的克隆是不可获得的,但是抗体分子的序列是已知的,则编码所述抗体的核酸可化学合成,或使用可杂交至序列的3'和5'端的合成引物通过PCR扩增、或者通过使用对于特定基因序列具有特异性的寡核苷酸探针来进行克隆,以便从cDNA文库鉴定编码所述抗体的cDNA克隆而从适合来源(例如,抗体cDNA文库、或产生自表达DPR该抗体的任何组织或细胞、如选择来表达抗体的B细胞的cDNA文库或从它们分离的核酸、任选聚A+RNA)获得。接着可使用本领域中熟知的任何方法将通过PCR所产生的扩增核酸克隆到可复制克隆载体中。

[0416] 一旦确定了抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物的核苷酸序列和相应的氨基酸序列,就可使用本领域中熟知用于操纵核苷酸序列的方法,例如重组DNA技术、定点诱变、PCR等(参见,例如以下文献中所述的技术:Sambrook等人,Molecular Cloning, A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.(1990)和Ausubel等人,编辑,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley& Sons,NY(1998),所述文献以引用的方式并入本文),对抗体的核苷酸序列进行操纵以产生具有不同氨基酸序列的抗体,例如以产生氨基酸取代、缺失和/或插入。

[0417] IV. 本发明的抗体多肽的表达

[0418] 在操纵分离的遗传物质以提供本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物后,通常将编码所述抗体的多核苷酸插入表达载体中,以引入宿主细胞中,所述宿主细胞可用于产生所需量的抗体。本文描述了抗体或其片段、衍生物或类似物,例如与靶分子结合的抗体的重链或轻链的重组表达。一旦已经获得编码本发明的抗体分子、或抗体的重链或轻链、或其一部分(任选地含有重链或轻链可变结构域)的多核苷酸,用于产生抗体分子的载体可通过重组DNA技术使用本领域中熟知的技术来产生。因此,本文描述了通过表达含有抗体编码核苷酸序列的多核苷酸来制备蛋白质的方法。可使用本领域中的技术人员熟知的方法来

构建含有抗体编码序列和适当转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术、以及体内基因重组。因此,本发明提供可复制载体,所述载体包含编码本发明的抗体分子、或其重链或轻链、或重链或轻链可变结域的核苷酸序列,所述核苷酸序列可操作地连接至启动子。所述载体可包含编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列(参见例如,国际申请WO 86/05807和WO 89/01036;和美国专利号5,122,464),并且可将抗体的可变结构域克隆到这种载体以表达完整重链或完整轻链。

[0419] 本文所用的术语“载体”或“表达载体”意指根据本发明用作用于引入宿主细胞中且在所述宿主细胞中表达所需基因的媒介物的载体。如本领域技术人员所已知,此类载体可易于选自由质粒、噬菌体、病毒和逆转录病毒组成的组。一般而言,与本发明兼容的载体将包含选择标记、适当限制位点,以便有助于对所要基因的克隆和进入真核细胞或原核细胞中和/或在其中进行复制的能力。出于本发明的目的,可采用多种表达载体系统。例如,一类载体利用DNA元件,其来源于动物病毒,诸如牛乳突瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录病毒(RSV、MMTV或MOMLV)或SV40病毒。其他表达载体涉及使用具有内部核糖体结合位点的多顺反子系统。此外,将DNA整合至其染色体中的细胞可通过引入一个或多个标记进行选择,所述标记允许对经转染宿主细胞的选择。标记可为营养缺陷型宿主提供原养、生物剂抗性(例如抗生素)或对诸如铜的重金属的抗性。可将可选择标记基因直接联结至要表达的DNA序列或通过共转化引入至同一细胞中。mRNA的最佳合成还可需要其他元件。这些元件可包括信号序列、剪接信号以及转录启动子、增强子和终止信号。

[0420] 在特别优选的实施方案中,如上所述,将克隆的可变区基因与重链和轻链恒定区基因(任选地人)一起插入表达载体中。在一个实施方案中,这使用Biogens, Inc.的专有表达载体(称为NEOSPLA)来完成,并在美国专利号6,159,730中公开。此载体含有细胞巨大病毒启动子/增强子、小鼠 β 球蛋白主要启动子、SV40复制起点、牛生长激素多腺苷酸化序列、新霉素磷酸转移酶外显子1和外显子2、二氢叶酸还原酶基因和前导序列。已发现此载体在并入可变区和恒定区基因、于CHO细胞中转染,接着通过于含有培养基的G418中选择和氨甲蝶呤扩增之后产生极高程度的抗体表达。当然,能够在真核细胞中表达的任何表达载体均可用于本发明。合适载体的实例包括但不限于质粒pcDNA3、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、以及pZeoSV2(可从Invitrogen, San Diego, CA获得),和质粒PCI(可从Promega, Madison, WI获得)。总体上,针对表达适当较高水平的免疫球蛋白重链和轻链的那些细胞对大量的转化细胞进行筛选是可例如通过机器人系统来执行的常规实验。载体系统也教导于美国专利号5,736,137和5,658,570中,所述专利各自以引用的方式整体并入。此系统提供高表达水平,例如 $>30\text{Pg}/\text{细胞}/\text{天}$ 。其他示例性表达载体系统公开于例如美国专利号6,413,777中。

[0421] 在其他优选的实施方案中,本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物可使用多顺反子构建体来表达,如在美国专利申请公布号2003-0157641 A1种公开的那些,并且所述专利整体并入本文。在这些表达系统中,可从单个多顺反子构建体产生多种目标基因产物,如抗体的重链和轻链。这些系统有利地使用内部核糖体进入位点(IRES)以提供相对高水平的抗体。适用IRES序列公开于美国专利号6,193,980中,其也并入本文中。本领域技术人员应理解,此类表达系统可用于有效地产生本申请中所公开的所有抗体。因此,在一个实施方案中,本发明提供了一种载体,所述载体包含至少编码抗体的免疫球蛋白链的结合结

构域或可变区的多核苷酸,任选地与编码所述结合分子的另一免疫球蛋白链的可变区的多核苷酸组合。

[0422] 更一般而言,一旦编码抗体的单体亚基的载体或DNA序列已获制备,即可将表达载体引入适当宿主细胞中。将质粒引入宿主细胞中可通过本领域技术人员所熟知的各种技术来实现。这些技术包括但不限于转染(包括脂质转染,使用例如 **Fugene®** 或 lipofectamine)、原生质粒融合、磷酸钙沉淀、细胞与包膜DNA的融合、微注射和完整病毒感染。通常,经由标准磷酸钙共沉淀法将质粒引入宿主。使具有表达构建体的宿主细胞在适于产生轻链和重链的条件下生长,并测定重链和/或轻链蛋白合成。示例性分析技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、或荧光活化的细胞分选分析(FACS)、免疫组织化学等。

[0423] 通过常规技术将表达载体转移至宿主细胞,然后通过常规技术来培养所转染的细胞以便产生用于本文所述的方法中的抗体。因此,本发明包括宿主细胞,所述宿主细胞包含编码本发明的抗体或其重链或轻链、或至少其免疫球蛋白的结合结构域或可变区的多核苷酸,所述多核苷酸任选地可操作地连接至异源启动子。另外或可替代地,本发明还包括宿主细胞,所述宿主细胞包含如上文所定义的载体,所述载体包含至少编码所述抗体的免疫球蛋白链的结合结构域或可变区的多核苷酸,任选地与编码所述结合分子的另一免疫球蛋白链的可变区的多核苷酸组合。在表达双链抗体的优选实施方案中,可在宿主细胞中共表达编码重链和轻链的单一载体或多个载体以便表达完整的免疫球蛋白分子,如下文所详细描述。

[0424] 宿主细胞可用本发明的两个表达载体共转染,第一载体编码重链来源的多肽,并且第二载体编码轻链来源的多肽。两个载体可含有相同的可选择标记,从而使得重链和轻链多肽能同等地表达。可替代地,可使用编码重链和轻链多肽两者的单一载体。在这类情况下,有利地将轻链放在重链之前以便避免过量的无毒重链;参见Proudfoot, Nature 322 (1986), 52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 2197。重链和轻链的编码序列可包含cDNA或基因组DNA。

[0425] 如本文所用,“宿主细胞”是指含有使用重组DNA技术构建并编码至少一种异源基因的载体的细胞。在对用于从重组宿主分离抗体的方法的描述中,除非另外清楚地指明,否则术语“细胞”和“细胞培养物”可互换使用以指示抗体的来源。换言之,自“细胞”回收多肽可意指自离心分离的完整细胞或自含有培养基和悬浮细胞的细胞培养物中回收。

[0426] 多种宿主表达载体系统可用以表达用于本文所述的方法中的抗体分子。此类宿主表达系统代表着通过其可以产生并随后纯化感兴趣的编码序列的运载体,但还代表当用合适的核苷酸编码序列转化或转染时,原位表达本发明的抗体分子的细胞。这些宿主表达系统包括但不限于:微生物,诸如用含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体所转化的细菌(例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌);用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体所转化的酵母(例如,酵母属、毕赤酵母属);用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)所感染的昆虫细胞系统;用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒CaMV;烟草花叶病毒TMV)所感染的或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)所转化的植物细胞系统;或含有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如,COS、CHO、NSO、BLK、293、3T3细胞),这些重组表达构建体含有源自哺乳动物细

胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;疫苗病毒7.5K启动子)。任选地,对于重组抗体分子的表达使用细菌细胞(如大肠杆菌),或任选地使用真核细胞,尤其在表达完整重组抗体分子的情况下。例如,与载体(如来自人巨大细胞病毒的主要中早期基因启动子元件)联合的哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞(CHO))是抗体的有效表达系统;参见例如,Foecking等人,Gene 45(1986),101; Cockett等人,Bio/Technology 8(1990),2。

[0427] 用于蛋白质表达的宿主细胞系经常为哺乳动物起源;据信本领域技术人员有能力优先确定最适于在其中表达所要基因产物的特定宿主细胞系。示例性宿主细胞系包括但不限于CHO(中国仓鼠卵巢)、DG44和DUXB11(中国仓鼠卵巢细胞系,DHFR减)、HELA(人宫颈癌)、CVI(猴肾细胞系)、COS(具有SV40 T抗原的CVI的衍生物)、VERY、BHK(幼仓鼠肾)、MDCK、WI38、R1610(中国仓鼠成纤维细胞)BALBC/3T3(小鼠成纤维细胞)、HAK(仓鼠肾细胞系)、SP2/0(小鼠骨髓瘤)、P3x63-Ag3.653(小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT(牛内皮细胞)、RAJI(人淋巴细胞)、以及293(人肾)。CHO和293细胞系是特别优选的。宿主细胞系通常可从商业服务、美国组织培养收藏中心(American Tissue Culture Collection)或从公开文献得到。

[0428] 此外,可选择调节插入序列的表达或以所需特定方式修饰并加工基因产物的宿主细胞株。对蛋白质产物的这类修饰(例如,糖基化)和加工(例如,裂解)就蛋白质功能而言可以是重要的。不同的宿主细胞针对蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰具有特征性和特异性的机制。可选择适当细胞系或宿主系统以确保所表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此,可使用具有用于初级转录物的适当加工、基因产物的糖基化、以及磷酸化的细胞机器(cellular machinery)的真核宿主细胞。

[0429] 为了长期、高产率的产生重组蛋白,稳定表达是优选的。例如,可以工程化稳定表达抗体分子的细胞系。代替使用含有病毒复制起点的表达载体,宿主细胞可使用由适当表达控制元件(例如启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)和可选择标记物来控制的DNA来转化。在引入外源DNA后,可以允许工程化的细胞在富集的培养基中生长1-2天,并且然后切换至选择性培养基。重组质粒中的可选择标记赋予选择抗性并允许细胞将质粒稳定整合到其染色体中,并且生长以形成基因座,细胞转而可进行克隆并扩增成细胞系。这种方法可有利地用于将稳定表达抗体分子的细胞系工程化。

[0430] 可使用多种选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,Cell 11(1977),223)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Szybalska和Szybalski,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48(1992),202)和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy等人,Cell 22(1980),817)基因可分别用于tk-、hgprrt-或aprrt-细胞中。另外,可使用抗代谢物抗性用作选择以下基因的基础:赋予甲氨蝶呤抗性的dhfr(Wigler等人,Natl.Acad.Sci.USA 77(1980),357;O'Hare等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78(1981),1527);赋予霉酚酸抗性的gpt(Mulligan和Berg,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78(1981),2072);赋予氨基糖苷G-418抗性的neo(Goldspiel等人,Clinical Pharmacy 12(1993),488-505;Wu和Wu,Biotherapy 3(1991),87-95;Tolstoshev,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32(1993),573-596;Mulligan,Science 260(1993),926-932;以及Morgan和Anderson,Ann.Rev.Biochem.62(1993),191-217;TIB TECH 11(1993),155-215;);以及赋予生潮霉素抗性的hygro(Santerre等人,Gene 30(1984),147)。可使用的重组DNA技术领域通常已知的方法描述于以下文献中:Ausubel

等人(eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); 以及第12和13章, Dracopoli等人(编辑), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley&Sons, NY (1994); Colberre-Garapin等人, *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981), 所述参考文献的以引用的方式整体并入本文。可通过载体扩增增加抗体的表达水平, 关于综述, 参见Bebbington和Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Academic Press, New York, 第3卷. (1987)。当表达抗体的载体系统中的标记是可扩增的时, 宿主细胞培养物中存在的抑制剂的水平增加将使标记基因的拷贝数增加。因为所扩增的区域与抗体基因相关联, 所以抗体的产生也将增加; 参见Crouse等人, *Mol. Cell. Biol.* 3 (1983), 257。

[0431] 体外生产可允许按比例扩大以得到大量的所需抗体。在组织培养条件下用于哺乳动物培养的技术在本领域中为已知的, 并且包括均匀悬浮培养, 例如在气升式反应器中或在连续搅拌反应器中的均匀悬浮培养; 或固定或截留细胞培养, 例如在中空纤维、微囊中, 在琼脂糖微珠或陶瓷匣筒上的培养。如果必要和/或需要时, 多肽的溶液可通过惯用层析方法来纯化, 例如凝胶过滤、离子交换层析、经由DEAE纤维素层析或(免疫)亲和力层析的层析法, 例如在合成铰链区多肽的优选生物合成之后或在本文所述的HIC层析步骤之前或之后来纯化。

[0432] 编码本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物的基因也可在诸如细菌或昆虫或酵母或植物细胞的非哺乳动物细胞中表达。容易吸收核酸的细菌包括以下的成员: 肠内杆菌科, 诸如大肠杆菌或沙门氏菌的菌株; 芽孢杆菌科, 诸如枯草芽孢杆菌; 肺炎球菌; 链球菌属, 和流感嗜血杆菌。应进一步理解, 当在细菌中表达时, 异源多肽通常成为包涵体的部分。所述异源多肽必须加以分离、纯化并随后装配成功能性分子。当需要四价形式的抗体时, 然后将亚单位自动组装成四价抗体; 参见例如国际申请W0 02/096948。

[0433] 在细菌系统中, 许多表达载体宜视所表达的抗体分子的预期用途来选择。例如, 当待产生大量所述蛋白质以产生抗体分子的医药组合物时, 指导表达高含量的易于纯化的融合蛋白产物的载体可为合乎需要的。此类载体包括但不限于: 大肠杆菌表达载体pUR278 (Ruther等人, *EMBO J.* 2 (1983), 1791), 其中抗体编码序列可个别地与lacZ编码区框内连接至载体中, 以便产生融合蛋白; pIN载体 (Inouye和Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke和Schuster, *J. Biol. Chem.* 24 (1989), 5503-5509); 等等。pGEX载体也可用于将外来多肽表达为与谷胱甘肽S-转移酶(GST)的融合蛋白。一般来讲, 此类融合蛋白是可溶性的, 且可易于通过吸附及结合于基质谷胱甘肽-琼脂糖珠粒, 随后在游离谷胱甘肽存在下洗脱而从溶解细胞纯化。pGEX载体经设计以包括凝血酶或因子Xa蛋白酶裂解位点以便可从GST部分释放克隆的目标基因产物。

[0434] 除原核生物之外, 也可使用真核微生物。酿酒酵母或普通焙用酵母为真核微生物中最常用的, 尽管许多其他菌株为普遍可利用的, 例如, 毕赤酵母。对于酵母属中的表达, 普遍使用例如质粒YRp7 (Stinchcomb等人, *Nature* 282 (1979), 39; Kingsman等人, *Gene* 7 (1979), 141; Tschemper等人, *Gene* 10 (1980), 157)。此质粒已含有TRP1基因, 其提供用于缺乏在色氨酸中的生长能力的酵母突变体菌株的选择标记, 例如ATCC第44076号或第PEP4-1

号(Jones,Genetics 85(1977),12)。作为酵母宿主细胞基因组的特征的trp1损伤的存在则提供用于检测通过在色氨酸不存在下的生长来转化的有效环境。

[0435] 在昆虫系统中,通常使用加洲苜蓿夜蛾核多角体病毒(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus,AcNPV)作为表达外来基因的载体。病毒生长于草地粘虫(Spodoptera frugiperda)细胞中。抗体编码序列可单独地克隆进病毒的非必需区(例如,多角体蛋白基因)中并且置于AcNPV启动子(例如,多角体蛋白启动子)的控制下。

[0436] 一旦已经重组表达了本发明的抗体分子,就可根据本领域的标准程序,包括例如通过以下方法纯化本发明的完整抗体、其二聚体、单个轻链和重链或其他免疫球蛋白形式:色谱法(例如,离子交换、亲和力,特别是通过蛋白A后对特定抗原的亲和力,以及尺寸柱色谱法)、离心、差异溶解度(例如硫酸铵沉淀)或通过任何其他用于纯化蛋白质的标准技术;参见例如,Scopes,“Protein Purification”,Springer Verlag,N.Y.(1982)。或者,在美国专利公布2002-0123057 A1中公开了增加本发明抗体亲和力的优选方法。因此,在一个实施方案中,本发明还提供了一种制备抗DPR抗体或识别突变和/或聚集的C9orf72-DPR种类和/或其片段或其免疫球蛋白链的抗体的方法,所述方法包括:

[0437] (a) 培养如上文所定义的宿主细胞,所述细胞包含如上文定义的多核苷酸或载体;以及

[0438] (b) 从培养物分离所述抗体或其免疫球蛋白链。

[0439] 此外,本发明还涉及一种由如上文定义的多核苷酸编码的或通过所述用于制备抗DPR抗体或识别突变和/或聚集的C9orf72-DPR种类和/或其片段或其免疫球蛋白链的抗体的方法可获得的抗体或其免疫球蛋白链。

[0440] V. 本发明的融合蛋白和缀合物

[0441] 在某些实施方案中,抗体多肽包含通常不与抗体缔合的氨基酸序列或一个或多个部分。示例性修饰在下文进行更详细地描述。例如,本发明的单链Fv抗体片段可包含柔性接头序列,或者可经修饰以添加功能性部分(例如PEG、药物、毒素或标记,如荧光、放射性、酶、核磁、重金属等)。

[0442] 本发明的抗体多肽可包含融合蛋白,基本上由融合蛋白组成或由融合蛋白组成。融合蛋白是,包含例如具有至少一个靶结合位点的免疫球蛋白DPR结合结构域和至少一个异源部分(即其自然界中不天然连接的部分)的嵌合分子。这些氨基酸序列通常可存在于单独蛋白质中,它们在融合多肽中结合在一起,或者这些多肽通常可存在于同一蛋白质中但是以新的安排来放置于融合多肽中。可例如通过化学合成,或通过产生并翻译其中以所需关系编码肽区域的多核苷酸来产生融合蛋白。

[0443] 如应用于多核苷酸或多肽的术语“异源”意指多核苷酸或多肽源于某一实体,所述实体不同于它与之比较的实体的其余部分的基因型。例如,如本文所用,与抗体或其抗原结合片段、变体或类似物融合的“异源多肽”源自相同物种的非免疫球蛋白多肽,或不同物种的免疫球蛋白或非免疫球蛋白多肽。

[0444] 如本文其他地方更详细地讨论的,本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物可进一步在N-或C-末端重组融合至异源多肽或化学缀合(包括共价和非共价缀合)至多肽或其他组合物。例如,可将抗体重组融合或缀合至在检测测定中用作标记的分子和效应分子,如异源多肽、药物、放射性核素或毒素;参见例如国际申请WO 92/08495;WO 91/14438;

WO 89/12624;美国专利号5,314,995;以及欧洲专利申请EP 0 396 387。

[0445] 本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物可由通过肽键或修饰的肽键(即肽等排体)彼此连接的氨基酸组成,并且可含有除20种基因编码的氨基酸以外的氨基酸。抗体可通过天然过程(如翻译后加工)或通过本领域中熟知的化学修饰技术进行修饰。此类修饰在基础教科书和更详细的专著以及大量研究文献中进行了充分说明。修饰可发生于抗体中的任何地方,包括肽主链、氨基酸侧链以及氨基或羧基末端,或在诸如碳水化合物的部分上。应当理解,同一类型的修饰可在给定抗体的若干位点处以相同或不同程度存在。此外,给定抗体可含有许多类型的修饰。抗体可例如由于泛素化而是支链的,并且它们可以是环状的,有或没有分支。环状抗体、支链抗体和支链环状抗体可由翻译后天然过程产生,或者可通过合成方法制备。修饰包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、共价连接黄素、共价连接血红素部分、共价连接核苷酸或核苷酸衍生物、共价连接脂质或脂质衍生物、共价衔接磷脂酰肌醇、交联、环化、二硫键形成、脱甲基、形成共价交联、形成半胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、聚乙二醇化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转移RNA介导的向蛋白质添加氨基酸(如精氨酸化)、以及泛素化;参见例如,Proteins-Structure And Molecular Properties,T.E.Creighton,W.H.Freeman and Company,New York第2版,(1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins,B.C.Johnson,编辑,Academic Press,New York,(1983) 1-12;Seifter等人,Meth.Enzymol.182(1990),626-646;Rattan等人,Ann.NY Acad.Sci.663(1992),48-62)。

[0446] 如本文其他地方所讨论的,可将本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物与异源多肽融合以增加所述多肽的体内半衰期或用于使用本领域已知方法的免疫测定中。例如,在一个实施方案中,PEG可与本发明的抗体缀合以增加它们的体内半衰期;参见例如,Leong等人,Cytokine 16(2001),106-119;Adv.in Drug Deliv.Rev.54(2002),531;或Weir等人,Biochem.Soc.Transactions 30(2002),512。

[0447] 此外,可将本发明的抗体或其DPR结合片段、合成变体或生物技术衍生物与标记物序列(如肽)融合,以促进其纯化或检测。在优选的实施方案中,标记物氨基酸序列是六组氨酸肽(HIS)(SEQ ID NO:84),如pQE载体(QIAGEN,Inc.,9259Eton Avenue,Chatsworth,Calif.,91311)中提供的标签等,其中许多标记物可商购获得。如Gentz等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86(1989),821-824中所述,例如,六组氨酸为融合蛋白提供了方便纯化。可用于纯化的其他肽标签包括但不限于“HA”标签,其对应于源自流感血凝素蛋白的表位(Wilson等人,Cell 37(1984),767)、GST、c-myc和“flag”标签;参见例如,Bill Brizzard,BioTechniques 44(2008)693-695,其综述了表位标签技术,并且其中第694页的表1列出了可用于本发明的最常见的表位标签,其主题特此明确地以引用的方式并入。

[0448] 融合蛋白可使用本领域众所周知的方法来制备;参见例如美国专利号5,116,964和5,225,538。可凭经验选择进行融合的精确位点,以优化融合蛋白的分泌或结合特性。然后将编码融合蛋白的DNA转染到宿主细胞中进行表达,其如本文先前所述进行。

[0449] 本发明的抗体可非缀合形式使用或可与多种分子中的至少一种缀合,例如,以改善分子的治疗性质、促进靶标检测或用于患者的成像或治疗。当进行纯化时,本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物可在纯化之前或之后进行标记或缀合。特别地,本发明的

抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物可与治疗剂、前药、肽、蛋白质、酶、病毒、脂质、生物响应调节剂、药剂或PEG缀合。

[0450] 本领域技术人员将理解,取决于所选择的待缀合的剂,缀合物也可使用多种技术组装。例如,例如通过使DPR结合多肽与生物素的活化酯,如生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯反应来制备与生物素的缀合物。类似地,可在偶联剂(例如本文所列的那些)存在下或通过与异硫氰酸酯,任选地荧光素-异硫氰酸酯反应来制备具有荧光标记物的缀合物。以类似的方式制备本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物的缀合物。

[0451] 本发明还包括与诊断或治疗剂缀合的本发明的抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物。所述抗体可用于诊断,例如证明存在DPR以表明患上与DPR相关的疾病或病症的风险,所述疾病或病症任选地与形成DPR的突变的C9orf72相关,即C9orf72-DPR,以监测此类疾病的发展或进展,即显示DPR或其聚集形式的发生或与DPR或其聚集形式相关的疾病,或作为临床测试程序的一部分,例如确定给定治疗和/或预防方案的功效。因此,在一个实施方案中,本发明涉及一种抗体,所述抗体进行可检测地标记。此外,在一个实施方案中,本发明涉及一种与药物连接的抗体。通过将抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物与可检测物质偶联可促进检测。可检测的物质或标记通常可以是酶;重金属,任选地是金;染料,任选地荧光或发光染料;或放射性标记。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性材料、使用各种正电子发射断层摄影术的正电子发射金属和非放射性顺磁性金属离子;关于可与抗体缀合以用作根据本发明的诊断剂的金属离子,参见例如,美国专利号4,741,900。适合的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;适合的辅基复合体的实例包括抗生物素蛋白链菌素/生物素和亲和素/生物素;适合的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白;适合的放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 或 ^{99}Tc 。因此,在一个实施方案中,本发明提供了一种可检测标记的抗体,其中所述可检测标记选自自由以下组成的组:酶、放射性同位素、荧光团和重金属。

[0452] 抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物也可通过与化学发光化合物偶联而被可检测地标记。然后通过检测化学反应过程中产生的发光的存在来确定化学发光标记的抗体的存在。特别有用的化学发光标记化合物的实例包括鲁米诺、异鲁米诺、芳族吡啶鎓酯、咪唑、吡啶鎓盐和草酸酯。

[0453] 抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物可被可检测地标记的方式之一是将其连接至酶,并在酶免疫测定(EIA)中使用连接的产物(Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7); Voller等人, J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, (编辑), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, 等人, (编辑), Enzyme Immunoassay, Kigaku Shoin, Tokyo (1981)。与抗体结合的酶将与适当的底物(任选地生色底物)反应,以产生可例如通过分光光度法、荧光法或目测手段检测的化学部分。可用于可检测地标记抗体的酶包括但不限于苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -5-类固醇异构酶、酵母醇脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶、丙糖磷酸异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺

酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。另外,所述检测可通过比色法完成,所述比色法采用酶得生色底物。检测还可通过与相似制备的标准品比较,底物的酶促反应程度的视觉比较来完成。

[0454] 还可使用多种其他免疫测定中的任何一种来完成检测。例如,通过放射性标记抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物,有可能通过使用放射免疫测定(RIA)来检测抗体(参见例如,Weintraub,B.,Principles of Radioimmunoassays,Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques,The Endocrine Society,(1986年3月)),其以引用的方式并入本文)。可通过包括但不限于 γ 计数器、闪烁计数器或放射自显影的方式来对检测放射性同位素。

[0455] 抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物也可使用发射荧光的金属如 ^{152}Eu 或镧系元素的其他金属来可检测地标记。可使用诸如二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)的此类金属螯合基团将这些金属连接至抗体。

[0456] 用于使各种部分缀合至抗体或其DPR结合片段、变体或衍生物的技术是熟知的,参见例如,参见例如,Arnon等人,"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy",in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等人(编辑),第243-56页(Alan R.Liss,Inc.(1985);Hellstrom等人,"Antibodies For Drug Delivery",in Controlled Drug Delivery(第2版),Robinson等人(编辑),Marcel Dekker,Inc.,(1987)623-53;Thorpe,"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review",in Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等人(编辑),(1985)475-506;"Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy",in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等人(编辑),Academic Press(1985)303-16以及Thorpe等人,"The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates",Immunol.Rev.62(1982),119-158。

[0457] 如所提及的,在某些实施方案中,可缀合增强结合分子,例如结合多肽,例如抗体或其免疫特异性片段的稳定性或功效的部分。例如,在一个实施方案中,PEG可与本发明的结合分子缀合以增加其体内半衰期。Leong等人,Cytokine 16(2001),106;Adv.in Drug Deliv.Rev.54(2002),531;或Weir等人,Biochem.Soc.Transactions 30(2002),512。

[0458] VI. 本发明的组合物和使用方法

[0459] 本发明涉及包含本发明的前述DPR结合分子,例如抗体或其DPR结合片段、变体或生物技术衍生物,或本发明的多核苷酸、载体或细胞的组合物,如上文所定义。在一个实施方案中,本发明的组合物是药物组合物,并且还包含药学上可接受的载体。此外,取决于药物组合物的预期用途,本公开的药物组合物可包含其他剂,如白细胞介素或干扰素。为了用于治疗显示DPR或其聚集形式的发生或与DPR或其聚集形式(特别是C9orf72-DPR)相关的疾病或病症(如FTLD),另外的剂可选自由以下组成的组:有机小分子、抗-DPR抗体以及它们的组合。因此,在一个特别优选的实施方案中,本发明涉及DPR结合分子,例如本发明的抗体或其DPR结合片段或具有与其任一者基本相同结合特异性的结合分子、本发明的多核苷酸、载体或细胞用于制备药物或诊断组合物的用途,所述药物或诊断组合物用于预防性和治疗性

治疗与DPR蛋白相关的疾病或病症、监测与DPR蛋白和/或聚集的C9orf72相关的疾病或病症的进展或受试者对DPR治疗的响应或用于确定受试者发展与DPR蛋白和/或聚集的C9orf72-DPR相关的疾病或病症的风险。

[0460] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及一种治疗以DPR和DPR蛋白如由于C9orf72-DPR引起的聚集的C9orf72的异常累积和/或沉积为特征的疾病或病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的前述DPR结合分子、抗体、多核苷酸、载体或细胞中的任一者。

[0461] 本发明的治疗方法的特别优点在于以下事实:本发明的重组抗体源自健康人受试者的B细胞或记忆B细胞,而没有疾病的症状或体征,例如携带无症状突变和/或突变,显示DPR或其聚集形式的发生或与DPR或其聚集形式相关,并且因此具有一定概率能够预防与DPR有关的临床表现疾病,所述DPR例如具有扩增的六核苷酸重复序列突变的C9orf72、从而导致在C9orf72蛋白中形成二肽重复序列(DPR)和由于C9orf72-DPR所致的聚集的C9orf72,或降低了临床表现疾病或病症的发生的风险或延迟临床表现疾病或病症的发作或进展。通常,本发明的抗体还已经成功地经历了体细胞成熟,即,通过抗体可变区的体细胞变异,在与靶DPR分子的高亲和力结合中的选择性和有效性方面的优化。

[0462] 此类细胞在体内,例如在人中就自身免疫性或过敏反应而言,尚未通过相关或其他生理蛋白或细胞结构被激活的了解也具有极大医学重要性,因为这意味着成功地通过临床测试阶段的机会大大增加。可以说,在至少一名人受试者中,在预防性或治疗性抗体的临床前和临床开发之前,已经证明了效率、可接受性和耐受性。因此,可预期本发明的人源性抗DPR抗体,其作为治疗剂的高靶标结构特异性亲和力及其降低的副作用可能性均显著增加了其临床成功的可能性。

[0463] 本发明还分别提供了一种药物和诊断用包装或药盒,所述包装或药盒包括一个或多个填充有一种或多种上述成分,例如本发明的抗DPR抗体、其结合片段、生物技术衍生物或变体、本发明的多核苷酸、载体或细胞。与所述容器相伴的可为由管制医药或生物产品的制造、使用或销售的政府机构开具的呈表格形式的报告书,所述报告书反映由制造、使用或销售的机构核准供人施用。此外或或者,药盒包括用于适当诊断测定中的试剂和/或说明书。组合物,例如本发明的药盒特别适用于伴随存在DPR的疾病或病症的风险评估、诊断、预防和治疗,并且特别适用于通常以DPR的存在为特征的治疗。特别地,所述组合物可用于治疗与DPR聚集有关的病症,例如具有扩增的六核苷酸重复序列的突变的C9orf72,由于C9orf72-DPR而导致聚集的C9orf72的形成。与DPR相关的疾病和/或病症包括但不限于额颞叶变性(FTLD)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、FTLD-ALS和/或脊髓小脑性共济失调36型。

[0464] 本发明的药物组合物可根据本领域熟知的方法进行配制;参见例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy(2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472。合适的药物载体的实例在本领域中是熟知的,并且包括磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液如油/水乳液、各种类型的润湿剂、无菌溶液等。包含此类载体的组合物可通过熟知的常规方法配制。这些药物组合物可以合适的剂量施用至受试者。合适的组合物的施用可通过不同的方式进行,例如,静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、鼻内、局部或皮内施用或脊柱或脑递送。如经鼻喷雾制剂的气雾剂制剂包括活性药剂与防腐剂 and 等张剂的纯净水溶液或其他溶液。此类制剂任选地被调整至可与鼻粘膜相容的pH和等

张状态。用于经直肠或经阴道施用的制剂可呈现为具有适合载体的栓剂。

[0465] 剂量方案将由主治医师且由临床因素决定。如在医学领域中众所周知,用于任何一个患者的剂量取决于许多因素,包括患者的大小、体表面积、年龄、待施用的具体化合物、性别、施用时间和途径、一般健康状况以及目前正在施用的其他药物。典型剂量可例如在0.001至1000 μ g(或再次范围内用于表达或用于抑制表达的核酸)的范围内;然而,设想低于或高于这个示例性范围的剂量,尤其在考虑以上提及的因素下。通常,剂量可例如在宿主体重的约0.0001mg/kg至100mg/kg,并且更通常在0.01mg/kg至5mg/kg(例如,0.02mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg等)的范围内。例如,剂量可以是1mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内,任选地至少3、10或30mg/kg。以上范围的中间剂量也意图在本发明的范围内。受试者可每天、按天交替地、每周或根据由经验分析决定的其他时程来投与所述剂量。示例性治疗需要以多剂量形式经延长的时间段(例如至少六个月)施用。另外的示例性治疗方案需要每两周一次或每月一次或每3至6个月一次施用。示例性剂量方案包括连续或隔天1-10mg/kg或15mg/kg,或每周30mg/kg;也参见实施例18。在一些方法中,具有不同结合特异性的两种或更多种单克隆抗体可同时施用,在这种情况下施用的每种抗体的剂量落入所指示的范围。可通过定期评估来监测进展。用于胃肠外施用的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液以及乳液。非水溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油诸如橄榄油以及可注射的有机酯诸如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。胃肠外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸化林格氏液或不挥发性油。静脉内媒介物包括流体和营养补充液、电解质补充液,诸如基于林格氏右旋糖的那些补充液等。防腐剂和其他添加剂也可存在于例如像抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等中。此外,取决于药物组合物的预期用途,本发明的药物组合物可包含其他药剂,如多巴胺或精神药理学药物。

[0466] 此外,在本发明的优选实施方案中,例如,如果本发明的药物组合物包含抗DPR抗体或DPR结合片段,或其合成或生物技术变体或衍生物,则可将药物组合物配制为疫苗用于进行被动免疫。如背景技术部分所述,聚集的DPR种类是诸如FTLD和ALS的疾病和/或病症的主要诱因。因此,谨慎地预期用人源性抗-DPR抗体和本发明的等效DPR结合分子的被动免疫将有助于避免主动免疫疗法概念的几种不良作用并导致DPR的聚集减少。因此,本发明的抗DPR抗体及其等效物将特别适用作预防或改善显示DPR或其聚集形式(特别是C9orf72-DPR)的存在或由其引起的疾病或病症(例如FTLD)的疫苗。

[0467] 在一个实施方案中,使用本发明抗体的重组Fab(rFab)和单链片段(scFv)可能是有益的,其可更容易地穿透细胞膜。例如,Robert等人,Protein Eng.Des.Sel.(2008);S1741-0134,提前在线发表,描述了单克隆抗体W0-2的嵌合重组Fab(rFab)和单链片段(scFv)的使用,所述抗体识别Abeta N-末端区域中的表位。工程化的片段能够(i)防止淀粉样蛋白原纤维化,(ii)分解预先形成的Abeta1-42原纤维,和(iii)抑制Abeta1-42寡聚体介导的神经毒性,在体外与完整IgG分子一样有效。使用缺乏效应子功能的小型Fab和scFv工程化抗体形式的公认优点包括,更有效地穿过血脑屏障,并使引发炎症性副反应的风险最小化。此外,除了scFv和单结构域抗体保留全长抗体的结合特异性外,它们还可作为单一基因表达并在哺乳动物细胞中在细胞内作为胞内抗体表达,具有改变它们的靶标的折叠、相互作用,修饰或亚细胞定位的潜力;关于综述参见,例如Miller和Messer,Molecular

Therapy 12 (2005), 394-401。

[0468] 在不同的方法中, Muller等人, Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241, 描述了一种技术平台, 即所谓的“SuperAntibody技术”, 据说可使抗体穿梭到活细胞中而不伤害它们。这种穿透细胞的抗体打开了新的诊断和治疗窗口。术语“TransMab”是为这些抗体创造的。

[0469] 在另一实施方案中, 可期望共同施用或顺序施用可用于治疗与DPR (特别是聚集的DPR, 例如C9orf72-DPR) 的发生有关的疾病、病症或症状的其他抗体。在一个实施方案中, 另外的抗体包含在本发明的药物组合物中。可用于治疗受试者的抗体的实例包括但不限于靶向CD33、SGLT2、IL-6和IL-1的抗体。

[0470] 在另一实施方案中, 可期望共同施用或顺序施用可用于治疗与DPR (特别是聚集的DPR, 如突变的C9orf72, 即C9orf72-DPR) 相关的疾病、病症或症状的其他剂。在一个实施方案中, 另外的剂包含在本发明的药物组合物中。可用于治疗受试者的剂的实例包括但不限于: 靶向不自主肌肉运动的VMAT2抑制剂, 如抗炎剂如二氟尼柳、皮质类固醇、2-(2,6-二氯苯胺基) 苯乙酸(双氯芬酸)、异丁基丙酸-酚酸(布洛芬); 利尿剂, 表没食子儿茶素没食子酸酯、盐酸美法仑、地塞米松、硼替佐米、硼替佐米-美法仑、硼替佐米-地塞米松、美法仑-地塞米松、硼替佐米-美法仑-地塞米松; 抗抑郁药、抗精神病药、神经镇定剂、抗痴呆药(例如NMDA-rezeptor拮抗剂美金刚)、乙酰胆碱酯酶抑制剂(例如多奈哌齐、盐酸、利伐斯明、加兰他敏)、谷氨酸拮抗剂和其他益智药降压药(例如双胍苯吡嗪、甲基多巴)、细胞抑制剂、糖皮质激素、血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂; 抗炎剂或它们的任何组合。

[0471] 治疗有效剂量或有效量是指活性成分足以改善症状或疾患的量。此类化合物的治疗功效和毒性可通过标准医药程序在细胞培养物或实验动物中确定, 例如ED₅₀ (在50%群体中具有治疗有效性的剂量) 和LD₅₀ (对50%群体而言致死的剂量)。治疗性作用与毒性作用之间的剂量比率是治疗指数, 并且其可表示为比率LD₅₀/ED₅₀。

[0472] 从前述可见, 显然本发明涵盖至少包含上述抗体的CDR及其变体的DPR结合分子的任何用途, 特别是用于诊断和/或治疗与DPR (特别是聚集的DPR种类, 如C9orf72-DPR) 相关的疾病或病症(如FTLD) 的用途。任选地, 所述结合分子是本发明的抗体或其生物技术衍生物。

[0473] 在另一个实施方案中, 本发明涉及一种诊断组合物, 所述诊断组合物包含本发明的上述DPR结合分子、抗体、DPR结合片段、多核苷酸、载体或细胞中的任一种以及任选地合适的检测手段, 如常规用于基于免疫或核酸的诊断方法检测的试剂。本发明的抗体例如适用于免疫测定中, 在所述免疫测定中, 所述抗体可以液相加以利用或结合于固相载体。可利用本发明抗体的免疫测定的实例是呈直接或间接形式的竞争性和非竞争性免疫测定。所述免疫测定的实例是放射免疫测定(RIA)、夹心式免疫测定(免疫计量测定)、流动式细胞测量术和蛋白质印迹测定。本发明抗体可结合于许多不同载体且用于分离与其特异性结合的细胞。熟知载体的实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、葡聚糖、尼龙、直链淀粉、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿。出于本发明的目的, 载体的性质可为可溶性的或不溶性的。本领域普通技术人员已知许多不同的标记和标记方法。可用于本发明的标记类型的实例包括酶、放射性同位素、胶体金属、荧光化合物、化学发光化合物和生物发光化合物; 还参见上文讨论的实施方案。

[0474] 通过另一实施方案,DPR结合分子,特别是本发明的抗体也可用于通过从测试的个体获得体液样品(所述体液样品可以是血液样品、血浆样品、血清样品、淋巴样品或任何其他体液样品,如唾液或尿液样品)并使所述体液样品与本发明的抗体在能够形成抗体-抗原复合物的条件下接触来诊断个体的疾病或病症的方法中。然后通过本领域中已知的方法确定此类复合体的水平,水平显著高于对照样品中形成的水平表明所测试的个体中的疾病或病症。以相同的方式,也可使用由本发明的抗体结合的特异性抗原。因此,本公开涉及一种体外免疫测定,所述体外免疫测定包括结合分子,例如本发明的抗体或其DPR结合片段。

[0475] 在本发明的另一实施方案中,DPR结合分子、特别是本发明的抗体也可用于通过从所测试的个体获得活检来诊断个体的疾病或病症的方法中。在此方面,本发明还涉及专门为此目的设计的装置。例如,可使用基于抗体的阵列,其例如负载有特异性识别DPR的本发明的抗体或等效DPR结合分子。微阵列免疫测定的设计被概述于Kusnezow等人,Mol.Cell Proteomics 5 (2006),1681-1696中。因此,本发明还涉及负载有本发明的DPR结合分子的微阵列。

[0476] 在一个实施方案中,本发明涉及一种诊断受试者中与DPR(特别是聚集的DPR种类,例C9orf72-DPR)相关的疾病或病症的方法,所述方法包括分别确定来自待诊断为具有至少一种本发明的抗体、其DPR结合片段或具有其中任一者的基本相同结合特异性的DPR结合分子的受试者的样品中DPR和聚集的DPR的存在,其中DPR或其病理聚集形式的存在,任选地C9orf72-DPR的存在指示FTLD和/或ALS,并且与生理C9orf72(即未显示出重复序列区域翻译成DPR蛋白)的水平相比,DPR或其病理聚集形式(特别是C9orf72-DPR)的水平增加表明所述受试者中FTLD和/或ALS的进展。

[0477] 待诊断的受试者可以是对疾病而言无症状的或临床前的。任选地,对照受试者患有与DPR、聚集的DPR和/或任选的C9orf72-DPR相关的疾病,例如如上所述的FTLD、ALS和FTLD-ALS以及其他,其中DPR(例如,聚集的C9orf72-DPR)与参考标准的水平之间的相似性指示待诊断的受试者患有FTLD、ALS和/或FTLD-ALS,或处于发展与DPR聚集相关的疾病和/或病症的风险。或者或另外,作为第二对照,对照受试者不具有DPR聚集,其中生理C9orf72或由于其基因中的突变(如突变的C9orf72基因和/或聚集的C9orf72-DPR)而易于插入DPR的另一种蛋白质和参考标准的水平之间的差异表明待诊断的受试者患有与DPR相关的疾病和/或病症,如FTLD、ALS和/或FTLD-ALS,或处于发展与DPR相关的疾病和/或病症的风险。任选地,待诊断的受试者和一个或多个对照受试者是年龄匹配的。待分析的样品可以是任何疑似含有病理性DPR蛋白(如聚集的C9orf72-DPR)的体液,例如血液、血浆、血清、尿液、腹膜液、唾液或脑脊髓液(CSF)。

[0478] 可通过本领域已知的任何适合的方法来评估生理性C9orf72或类似蛋白质和/或聚集的DPR如C9orf72-DPRs的水平,所述方法包括例如,通过选自以下的一种或多种技术分析DPR和/或并入DPR的蛋白质如C9orf72:蛋白质印迹、免疫沉淀、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、荧光激活细胞分选(FACS)、二维凝胶电泳、质谱法(MS)、基质辅助的激光脱附/离子化飞行时间-MS(MALDI-TOF)、表面增强的激光脱附离子化飞行时间(SELDI-TOF)、高效液相色谱法(HPLC)、快速蛋白质液相色谱法(FPLC)、串联质谱法(MS/MS)之后的多维液相色谱法(LC)以及激光密度测定法。任选地,DPR的所述体内成像包括闪烁扫描术、正电子发射断层摄影术(PET)、单光子发射断层摄影术(SPECT)、近红外(NIR)光学成

像或磁共振成像 (MRI)。

[0479] 因此,在一个实施方案中,提供本发明的抗体、如上文定义的多核苷酸、载体或细胞或包含其任一者的药物或诊断组合物,以用于预防性治疗、治疗性治疗与DPR蛋白或其聚集形式有关的疾病或病症和/或监测所述疾病或病症的进展或对所述疾病或病症的治疗的响应。因此,本发明还涉及一种诊断或监测受试者中与DPR蛋白有关的疾病或病症(例如FTLD和ALS)的进展的方法,所述方法包括确定来自待诊断为具有至少一种本发明的抗体或具有其中任一者的基本相同结合特异性的DPR结合分子的受试者的样品中DPR蛋白的存在,其中DPR的存在(例在突变的C9orf72和聚集的C9orf72-DPR种类中)指示所述疾病或病症。在一个实施方案中,提供了所述诊断或监测受试者中的DPR相关疾病和/或病症的进展的方法,所述方法包括确定来自待诊断为具有至少一种本发明的抗体的受试者的样品中DPR(诸如突变的C9orf72及其聚集形式中)的存在,其中DPR(如突变的C9orf72和/或聚集的C9orf72-DPR)的存在指示与DPR相关的症状前、有前驱症状的或临床疾病和/或病症,与没有DPR的生理性C9orf72的水平相比或与源自健康对照受试者的参考样品或来自同一受试者的对照样品相比,DPR聚集体(特别是C9orf72-DPR)的水平增加指示与DPR相关的症状前、有前驱症状的或临床疾病和/或病症,如FTLD和ALS。本领域技术人员将理解,在一个实施方案中,所述方法也用于诊断或监测来自分别与DPR和含有DPR的蛋白质有关的病症组中的任何其他疾病或病症的进展,如上文所定义。

[0480] 如上所述,本发明的抗体不仅可在体外使用,而且可在体内使用,其中除了诊断之外,还可寻求治疗性应用。因此,在一个实施方案中,本发明还涉及一者包含本发明抗体的CDR的DPR结合分子,所述DPR结合分子用于制备用于体内检测人或动物体内的DPR(任选地C9orf72-DPR)或靶向针对人或动物体内的DPR(任选地C9orf72-DPR)的治疗和/或诊断剂的组合物。潜在的治疗剂和/或诊断剂可选自可用于治疗与DPR相关的疾病和/或病症的治疗剂的非穷列举和如上所述的潜在标记物。关于体内成像,在一个优选的实施方案中,本发明提供了包含本发明抗体的CDR的所述DPR结合分子,其中所述体内成像包括闪烁扫描术、正电子发射断层摄影术(PET)、单光子发射断层摄影术(SPECT)、近红外(NIR)光学成像或磁共振成像(MRI)。在另一实施方案中,本发明还提供了包含本发明抗体的CDR的所述DPR结合分子,或用于制备用于上述指定的体内成像方法、用于如上文所定义的诊断或监测受试者中与DPR蛋白有关的疾病或病症的进展的方法中的组合物的所述分子。

[0481] 在这种情况下,本发明还涉及一种可用于诊断或监测与DPR和含有DPR的蛋白质相关的疾病和/或病症的进展的药盒,所述药盒包含至少一种本发明的抗体或具有其任一者的基本相同的结合特异性的DPR结合分子、如上文分别定义的多核苷酸、载体或细胞和/或肽,任选地具有试剂和/或使用说明书。

[0482] 本文提供了通过以下编号段落描述的组合物、方法和/或用途:

[0483] 1. 一种抗DPR抗体或其片段,所述抗DPR抗体或其片段包含

[0484] (i) 重链,所述重链具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:38至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);以及

[0485] (ii) 轻链,所述轻链具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:42至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列)。

[0486] 1a. 一种抗DPR抗体或其片段(例如,结合,例如特异性结合和/或以高亲和力结合

至聚-(GA)_n重复序列,例如本文所述的聚-(GA)_n重复序列),例如聚-(GA)₆₋₁₅(SEQ IDNO:83),其中所述抗DPR抗体或其片段包含:

[0487] (i) 重链,所述重链包含SEQ ID NO:37或38的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:37或38至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0488] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0489] (ii) 重链恒定结构域,所述重链恒定结构域包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:39至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0490] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0491] (iii) 重链可变区氨基酸序列,所述重链可变区氨基酸序列包含SEQ ID NO:40(或与SEQ ID NO:40至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0492] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0493] (iv) 轻链氨基酸序列,所述轻链氨基酸序列包含SEQ ID NO:41或42(或与SEQ ID NO:41或42至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0494] 任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0495] (v) 轻链恒定结构域氨基酸序列,所述轻链恒定结构域氨基酸序列包含SEQ ID NO:43(或与SEQ ID NO:43至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0496] 任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0497] (vi) 轻链可变区氨基酸序列,所述轻链可变区氨基酸序列包含SEQ ID NO:44(或与SEQ ID NO:44至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0498] 任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0499] (vii) 重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:45的CDR1氨基酸序列(或与

SEQ ID NO:45至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列)；SEQ ID NO:46的CDR2氨基酸序列(或与SEQ ID NO:46至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列)，以及SEQ ID NO:47的CDR3氨基酸序列(或与SEQ ID NO:47至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列)，

[0500] 任选地，其中所述重链氨基酸序列(例如，重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸，和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基，和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸，和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸；

[0501] 和/或

[0502] (viii) 轻链可变区，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:48的CDR1氨基酸序列(或与SEQ ID NO:48至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列)；SEQ ID NO:49的CDR2氨基酸序列(或与SEQ ID NO:49至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列)，以及SEQ ID NO:50的CDR3氨基酸序列(或与SEQ ID NO:50至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列)，

[0503] 任选地，其中所述重链氨基酸序列(例如，重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸，和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基，和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸，和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸；和/或任选地，其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸，和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸。

[0504] 1b. 如段落1-1e中任一项所述的抗DPR抗体或其片段，所述抗DPR抗体或其片段包含异源序列，例如，所述异源序列与所述重链、轻链、重链可变区、重链恒定结构域、轻链可变区、轻链恒定结构域、可变重CDR和/或可变轻CDR是异源的。

[0505] 1c. 如段落1b所述的抗DPR抗体或其片段，其中所述异源序列包含免疫球蛋白重链恒定区、免疫球蛋白轻链恒定区或异源哺乳动物分泌信号肽。

[0506] 1d. 如段落1-1c中任一段所述的抗DPR抗体或其片段，所述抗DPR抗体或其片段包含聚乙二醇或可检测标记，例如酶、放射性同位素、荧光化合物、化学发光化合物、生物发光化合物或重金属。

[0507] 1e. 如段落1-1d中任一段所述的抗DPR抗体或其片段，其中所述抗体或其片段选自以下组成的组：Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv、单链Fv(scFv)、单链抗体和二硫键连接的Fv(sdFv)。

[0508] 2. 一种核酸分子，所述核酸分子包含：

[0509] (i) 编码抗DPR抗体的重链的核酸序列，所述重链具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:38至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列)；和/或

[0510] (ii) 编码抗DPR抗体的轻链的核酸序列，所述轻链具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:42至少95%，例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列)，任选地其中所述核酸序列(i)和(ii)位于同一核酸分子上或单独的核酸分子上。

[0511] 2a. 如段落2所述的核酸分子，其中所述核酸分子包含cDNA和/或可操作地连接至异源核酸，例如异源信号肽(例如分泌信号肽，例如哺乳动物分泌信号肽，例如，本文所述的

分泌信号肽)或异源调控元件(例如,异源增强子、核糖体结合位点、转录终止子或异源启动子(例如,巨细胞病毒、猿猴病毒40或逆转录病毒启动子))。

[0512] 2b.一种核酸分子,所述核酸分子编码以下(i)-(viii)中的一者或多者:

[0513] (i)重链,所述重链包含SEQ ID NO:37或38的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:37或38至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0514] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0515] (ii)重链恒定结构域,所述重链恒定结构域包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:39至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0516] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0517] (iii)重链可变区氨基酸序列,所述重链可变区氨基酸序列包含SEQ ID NO:40(或与SEQ ID NO:40至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0518] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0519] (iv)轻链氨基酸序列,所述轻链氨基酸序列包含SEQ ID NO:41或42(或与SEQ ID NO:41或42至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0520] 任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0521] (v)轻链恒定结构域氨基酸序列,所述轻链恒定结构域氨基酸序列包含SEQ ID NO:43(或与SEQ ID NO:43至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0522] 任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0523] (vi)轻链可变区氨基酸序列,所述轻链可变区氨基酸序列包含SEQ ID NO:44(或与SEQ ID NO:44至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0524] 任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0525] (vii) 重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:45的CDR1氨基酸序列(或与SEQ ID NO:45至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);SEQ ID NO:46的CDR2氨基酸序列(或与SEQ ID NO:46至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),以及SEQ ID NO:47的CDR3氨基酸序列(或与SEQ ID NO:47至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),

[0526] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0527] 和/或

[0528] (viii) 轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:48的CDR1氨基酸序列(或与SEQ ID NO:48至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);SEQ ID NO:49的CDR2氨基酸序列(或与SEQ ID NO:49至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),以及SEQ ID NO:50的CDR3氨基酸序列(或与SEQ ID NO:50至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),

[0529] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;和/或任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸。

[0530] 3.一种核酸分子,所述核酸分子包含SEQ ID NO:51-58的核苷酸序列中的一个或多个(或与SEQ ID NO:51-58至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列)。

[0531] 3a.一种或多种核酸分子,所述核酸分子编码如段落1-1e中任一段所述的抗体或其片段。

[0532] 3b.一种cDNA,所述cDNA包含如段落2-3a中任一段所述的核酸分子。

[0533] 3c.一种cDNA,所述cDNA包含多核苷酸,所述多核苷酸编码:

[0534] (i) 重链,所述重链包含SEQ ID NO:37或38的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:37或38至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0535] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0536] (ii) 重链恒定结构域,所述重链恒定结构域包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:39至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0537] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其

氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0538] (iii) 重链可变区氨基酸序列,所述重链可变区氨基酸序列包含SEQ ID NO:40(或与SEQ ID NO:40至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0539] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0540] (iv) 轻链氨基酸序列,所述轻链氨基酸序列包含SEQ ID NO:41或42(或与SEQ ID NO:41或42至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0541] 任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0542] (v) 轻链恒定结构域氨基酸序列,所述轻链恒定结构域氨基酸序列包含SEQ ID NO:43(或与SEQ ID NO:43至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0543] 任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0544] (vi) 轻链可变区氨基酸序列,所述轻链可变区氨基酸序列包含SEQ ID NO:44(或与SEQ ID NO:44至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0545] 任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0546] (vii) 重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:45的CDR1氨基酸序列(或与SEQ ID NO:45至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);SEQ ID NO:46的CDR2氨基酸序列(或与SEQ ID NO:46至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),以及SEQ ID NO:47的CDR3氨基酸序列(或与SEQ ID NO:47至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),

[0547] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0548] 和/或

[0549] (viii) 轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:48的CDR1氨基酸序列(或与SEQ ID NO:48至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);SEQ ID NO:49的CDR2氨基酸序列(或与SEQ ID NO:49至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),以及SEQ ID NO:50的CDR3氨基酸序列(或与SEQ ID NO:50至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),

[0550] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;和/或任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;和/或

[0551] (ix) 重链,所述重链具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:38至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);和/或

[0552] (x) 轻链,所述轻链具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:42至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列)。

[0553] 4. 一种载体,所述载体包含如段落2-3a中任一段所述的核酸分子或如段落3b-3c中任一段所述的cDNA。

[0554] 4a. 如段落4所述的载体,其中所述载体是可操作地连接至多核苷酸的表达载体,其中所述多核苷酸编码以下中的一者或多者:

[0555] (i) 重链,所述重链包含SEQ ID NO:37或38的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:37或38至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0556] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0557] (ii) 重链恒定结构域,所述重链恒定结构域包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:39至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0558] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0559] (iii) 重链可变区氨基酸序列,所述重链可变区氨基酸序列包含SEQ ID NO:40(或与SEQ ID NO:40至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0560] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0561] (iv) 轻链氨基酸序列,所述轻链氨基酸序列包含SEQ ID NO:41或42(或与SEQ ID NO:41或42至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0562] 任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0563] (v) 轻链恒定结构域氨基酸序列,所述轻链恒定结构域氨基酸序列包含SEQ ID NO:43(或与SEQ ID NO:43至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0564] 任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0565] (vi) 轻链可变区氨基酸序列,所述轻链可变区氨基酸序列包含SEQ ID NO:44(或与SEQ ID NO:44至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),由其组成或基本上由其组成,

[0566] 任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;

[0567] (vii) 重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:45的CDR1氨基酸序列(或与SEQ ID NO:45至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);SEQ ID NO:46的CDR2氨基酸序列(或与SEQ ID NO:46至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),以及SEQ ID NO:47的CDR3氨基酸序列(或与SEQ ID NO:47至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),

[0568] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;

[0569] 和/或

[0570] (viii) 轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:48的CDR1氨基酸序列(或与SEQ ID NO:48至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);SEQ ID NO:49的CDR2氨基酸序列(或与SEQ ID NO:49至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),以及SEQ ID NO:50的CDR3氨基酸序列(或与SEQ ID NO:50至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列),

[0571] 任选地,其中所述重链氨基酸序列(例如,重链成熟序列)的长度不超过452个氨基酸,和/或其中重链在其氨基酸序列的C-末端不包含赖氨酸残基,和/或其中所述重链在其氨基酸序列的C-末端具有甘氨酸,和/或其中所述重链可变区氨基酸序列的长度不超过123个氨基酸;和/或任选地,其中所述轻链氨基酸序列的长度不超过214个氨基酸,和/或其中所述轻链可变区氨基酸序列的长度不超过107个氨基酸;和/或

[0572] (ix) 重链,所述重链具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:38至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列);和/或

[0573] (x) 轻链,所述轻链具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列(或与SEQ ID NO:42至少95%,例如95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的氨基酸序列)。

[0574] 4b.如段落4-4a中任一段所述的载体,其中所述载体包含如段落3b-3c中任一段所述的cDNA。

[0575] 4c.如段落4-4b中任一项所述的载体,其中所述载体包含启动子(例如,异源启动子,例如巨细胞病毒(例如,巨细胞病毒立即早期启动子)、猿猴病毒40或逆转录病毒启动子)。

[0576] 5. 一种宿主细胞, 所述宿主细胞包含 (i) 如段落2-3a中任一段所述的核酸分子; (ii) 如段落3b-3c中任一段所述的cDNA; 或 (iii) 如段落4-4c中任一段所述的载体,

[0577] 任选地, 其中所述宿主细胞是哺乳动物宿主细胞 (例如, 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、HEK 293细胞或NS0细胞)。

[0578] 6. 如段落2-3a中任一段所述的核酸分子、如段落3b-3c中任一段所述的cDNA、如段落4-4c中任一段所述的载体或如段落5所述的宿主细胞用于产生抗-DPR抗体或其片段的用途。

[0579] 7. 一种产生抗DPR抗体或其片段的方法, 所述方法包括: (i) 培养如段落5所述的宿主细胞; 以及 (ii) 从培养物中分离所述抗体或其片段。

[0580] 8. 一种组合物, 例如药物组合物, 所述组合物包含如段落1-1e中任一段所述的抗DPR抗体或其片段、如段落2-3a中任一段所述的核酸分子、如段落3b-3c中任一段所述的cDNA、如段落4-4c中任一段所述的载体或如段落5所述的宿主细胞,

[0581] 任选地, 其中所述药物组合物包含药学上可接受的载体,

[0582] 任选地, 其中所述药物组合物适合于鞘内施用。

[0583] 9. 一种治疗有需要的受试者中与含DPR的蛋白质或其聚集形式相关或由含DPR的蛋白质或其聚集形式引起的病症 (例如, 肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、额颞叶变性 (FTLD) 或FTLD-ALS) 的方法, 所述方法包括向所述受试者施用本文所述的抗DPR抗体或其片段 (例如, 如段落1-1e中任一段所述的抗DPR抗体或其片段), 从而治疗所述受试者的病症 (例如, ALS、FTLD或FTLD-ALS)。

[0584] 10. 一种制备用于治疗与含DPR的蛋白质或其聚集形式相关或由含DPR的蛋白质或其聚集形式引起的病症 (例如, ALS、FTLD或FTLD-ALS) 的药物组合物的方法, 所述方法包括: (i) 培养如段落5所述的宿主细胞; (ii) 从达到药物级的培养物中分离和/或纯化所述抗体或其片段; 以及 (iii) 将所述抗体或其片段与药学上可接受的载体混合。

[0585] 11. 如段落1-1e中任一段所述的抗DPR抗体或其片段、如段落2-3a中任一段所述的核酸分子、如段落3b-3c中任一段所述的cDNA、如段落4-4c中任一段所述的载体或如段落5所述的宿主细胞, 其用于治疗 (例如, 预防性和/或治疗性治疗) 与含DPR的蛋白质或其聚集形式相关或由含DPR的蛋白质或其聚集形式引起的病症 (例如, ALS、FTLD或FTLD-ALS)。

[0586] 12. 一种用于体内检测脑中DPR (例如, 聚-GA DPR) 沉积物的方法, 所述方法包括:

[0587] 向受试者 (例如, 人受试者) 施用如段落1-1e中任一段所述的抗DPR抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段连接至可检测的标记 (例如, 酶、放射性同位素、荧光团和/或重金属); 以及

[0588] 检测所述受试者的脑中的所述可检测标记, 从而检测所述受试者的脑中的所述DPR沉积物, 任选地, 其中通过正电子发射断层摄影术 (PET)、单光子发射断层摄影术 (SPECT)、近红外 (NIR) 光学成像或磁共振成像 (MRI) 监测所述DPR沉积物。

[0589] 序列

[0590] 表14. 序列的选择

[0591]

SEQ ID NO	描述	序列
3	NI-308.5J10 VH-CDR1	DYYWS
4	NI-308.5J10 VH-CDR2	RTYTNGKTTYTYNPSLES

[0592]

SEQ ID NO	描述	序列
5	NI-308.5J10 VH-CDR3	WGAVTGDYYYGMDV
8	NI-308.5J10 VL-CDR1	RSPRLLHTNGYTYLD
9	NI-308.5J10 VL-CDR2	LASNRAS
10	NI-308.5J10 VL-CDR3	MQGLQPSWT
13	NI-308.5J10 VH-CDR2 序列-N54S 突变	RTYTSKGTTYTYNPSLES
14(核 酸)	NI-308.5J10 可变重链 (VH)序列- N54T 突变	caggtgcagctgcaggagtcgggccaggactggtgaagcctcggagacct gtccctcacttacactgtcttaggtggctccgctcagtgattactactggagctgcatc cggcagcccggcgggaaggactggagtggattggcgaacataactaccgg gaagaccacttacactacaacccctccctcgagagtcgactcagttgtctataga cacgtccatgaaccaattccctgaagttgacctctgtgacggccggacacg gccgtctactactgcgcgagatggggggcgggtgactggtgactactactacggtat ggacgtctggggcccaggcaccctggtcaccgtctcctcg
14(氨 基酸)	NI-308.5J10 可变重链 (VH)序列- N54T 突变	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTYTVLGGSVSDYYWSC IRQPAGKGLEWIGRITYTTGKTTYTYNPSLESRLSLSI DTSMNQFSLKLTSVTAADTAVYYCARWGAVTGDY YYGMDVWGPGLVTVSS
16	NI-308.5J10 VH-CDR2 序列-N54T 突变	RTYTTGKTTYTYNPSLES
19	NI-308.5J10 VH-CDR2 序列-G55S 突变	RTYTNSKTTYTYNPSLES
22	NI-308.5J10 VH-CDR2 序列-G55T 突变	RTYTNTKTTYTYNPSLES
25	NI-308.5J10 可变轻链 (VK)质粒 (SDD 152)	EIVLTQSPLSLSVTPGEPASISCRSPRLLHTNGYTYL DWYLQRPQGSPQLLIFLASNRASGVPDRFSGSGSGT NFTLRISGVEADDVGVYYCMQGLQPSWTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
26	NI-308.5J10- hIgG1 可变 重链(VH)质	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTYTVLGGSVSDYYWSC IRQPAGKGLEWIGRITYTNGKTTYTYNPSLESRLSLSI DTSMNQFSLKLTSVTAADTAVYYCARWGAVTGDY

[0593]

SEQ ID NO	描述	序列
	粒(SDD 151)	YYGMDVWGPGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
27	NI-308.5J10 可变轻链 (VK)质粒 (SDD 177)- N75D 突变	EIVLTQSPSLSVTPGEPASISCRSPRSLHTNGYTYL DWYLQRPQGSPQLLIFLASNRASGVPDRFSGSGSGT DFTLRISGVEADDVGVYYCMQGLQPSWTFGQGTKV EIKRTVAAPSVEFIPPSDEQLKSGTASVVCLLNFP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
28	NI-308.5J10- hIgG1 可变 重链(VH)质 粒(SDD 173)-N54S 突变	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTYTVLGGSVSDYYWSC IRQPAGKGLEWIGRTYTSQKTTYTYNPSLESRLSLSI DTSMNQFSLKLTSTVAADTAVYYCARWGAVTGDY YYGMDVWGPGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	NI-308.5J10- hIgG1 可变 重链(VH)质 粒(SDD 174)-N54T 突变	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTYTVLGGSVSDYYWSC IRQPAGKGLEWIGRTYTTGKTTYTYNPSLESRLSLSI DTSMNQFSLKLTSTVAADTAVYYCARWGAVTGDY YYGMDVWGPGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	NI-308.5J10- hIgG1 可变 重链(VH)质 粒(SDD	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTYTVLGGSVSDYYWSC IRQPAGKGLEWIGRTYTNSTKTTYTYNPSLESRLSLSI DTSMNQFSLKLTSTVAADTAVYYCARWGAVTGDY YYGMDVWGPGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS

SEQ ID NO	描述	序列	
	175)-G55S 突变	GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
31	NI-308.5J10- hIgG1 可变 重链(VH)质 粒(SDD 176)-G55T 突变	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTYYTVLGGSVSDYYWSC IRQPAGKGLEWIGRTYTNKTTYTYNPSLESRLSLSI DTSMNQFSLKLTSTVAADTA VYYCARWGAVTGDY YYGMDVWGPGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
[0594]	32	NI-308.5J10- Fab-6His 可 变重链(VH) 质粒(SDD 178)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTYYTVLGGSVSDYYWSC IRQPAGKGLEWIGRTYTNKTTYTYNPSLESRLSLSI DTSMNQFSLKLTSTVAADTA VYYCARWGAVTGDY YYGMDVWGPGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCHHHHHH
	33	NI-308.5J10- Fab-6His 可 变重链(VH) 质粒(SDD 179) - N54S 突变	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTYYTVLGGSVSDYYWSC IRQPAGKGLEWIGRTYTSKTTYTYNPSLESRLSLSI DTSMNQFSLKLTSTVAADTA VYYCARWGAVTGDY YYGMDVWGPGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCHHHHHH
	34	NI-308.5J10- Fab-6His 可 变重链(VH) 质粒(SDD 180)-N54T 突变	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTYYTVLGGSVSDYYWSC IRQPAGKGLEWIGRTYTTGTTYTYNPSLESRLSLSI DTSMNQFSLKLTSTVAADTA VYYCARWGAVTGDY YYGMDVWGPGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCHHHHHH
	35	NI-308.5J10- Fab-6His 可 变重链(VH) 质粒(SDD	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTYYTVLGGSVSDYYWSC IRQPAGKGLEWIGRTYTNSKTTYTYNPSLESRLSLSI DTSMNQFSLKLTSTVAADTA VYYCARWGAVTGDY YYGMDVWGPGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS

[0595]

SEQ ID NO	描述	序列
	181)-G55S 突变	GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSN TKVDKKVEPKSCHHHHHH
36	NI-308.5J10- Fab-6His 可 变重链(VH) 质粒(SDD 182)-G55T 突变	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTFTYTVLGGSVSDYYWSC IRQPAGKGLEWIGRTYTNKTKTYTNPISLESRLSLSI DTSMNQFSLKLTSTVAADTAVYYCARWGA VTGDY YYGMDVWGPGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSN TKVDKKVEPKSCHHHHHH
61	合成的二肽 重复序列蛋 白(GA)15	CHHHHHHGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG AGAGA
62	合成的二肽 重复序列蛋 白(GP)15	CGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGP
63	合成的二肽 重复序列蛋 白(GR)15	CGRGRGRGRGRGRGRGRGRGRGRGRGRGRGRGR
64	合成的二肽 重复序列蛋 白(PA)15	CPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPA
65	合成的二肽 重复序列蛋 白(PR)15	CPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR
66	二肽重复序 列蛋白肽 GA	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
67	二肽重复序 列蛋白肽 GP	GPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGPGP
68	二肽重复序 列蛋白肽 GR	GRGRGRGRGRGRGRGRGRGRGRGRGRGRGRGR
69	二肽重复序 列蛋白肽 PA	PAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPA
70	二肽重复序 列蛋白肽 PR	PRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR
71	合成的二肽 重复序列蛋 白(GA)20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGAHHHHHH

[0596]

SEQ ID NO	描述	序列
72	合成的二肽重复序列蛋白(GA)10	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAHHHHHH
73	合成的二肽重复序列蛋白(GA)6	GAGAGAGAGAGAHHHHHH
74	合成的二肽重复序列蛋白(GA)5	GAGAGAGAGAHHHHHH
75	合成的二肽重复序列蛋白(GA)4	GAGAGAGAHHHHHH
76	合成的二肽重复序列蛋白(GA)3	GAGAGAHHHHHH
77	合成的二肽重复序列蛋白(GA)2	GAGAHHHHHH

[0597] 以上公开内容总体上描述了本申请。除非另有说明,否则如本文所用的术语如 Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, 修订版2000和再版2003, ISBN 0 19 850673 2中所提供给出定义。完整书目引用可在权利要求书之前的说明书结尾处找到。所有引用的参考文献(包括文献参考文献、授权专利、在本申请通篇中引用的公开专利申请,包括背景技术部分和制造商的说明书,说明等)的内容均特此明确地以引用的方式并入;然而,不承认所引用的任何文献确实是关于本发明的现有技术。

[0598] 通过参考以下具体实施例可获得更全面的理解,所述实施例在本文中提供仅用于说明目的,而无意于限制本发明的范围。

[0599] 实施例

[0600] 实施例1:抗(聚-GA)二肽重复序列(DPR)蛋白抗体的分离和鉴定

[0601] 基于国际申请W0 2016/050822 A2中所述的方法,鉴定了靶向聚-GA二肽重复序列(DPR)蛋白、其片段、C9orf72-DPR和/或其片段的人源性抗体,所述申请的公开内容以引用的方式并入本文。特别地,由Schafer-N(Copenhagen, Denmark)合成并纯化了聚-GA二肽重复序列蛋白GA₁₅:H-CHHHHHH(GA)₁₅-OH (SEQ ID NO:61)。然后经由双功能接头(SMCC)将聚-GA二肽重复序列蛋白缀合至牛血清白蛋白(BSA)。随后,直接使用96孔微孔板(Corning)进行直接ELISA,所述微孔板用在包被缓冲液(15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, pH 9.42)中5μg/ml浓度的非缀合或BSA缀合的聚-GA二肽重复序列蛋白或BSA(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)包被。在室温下用含有2%BSA(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)的PBS/0.1% Tween[®]-20封闭非特异性结合位点1小时。将B细胞条件培养基从记忆B细胞培养板转移至ELISA板,并在室温下孵育1小时,然后同与HRP缀合的驴抗人IgG Fcγ特异性抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)和与HRP缀合的山羊抗人IgA特异性抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)一起

孵育。通过在标准比色测定中测量HRP活性来确定结合。仅对显示出培养基中所含的抗体与聚-GA DPR结合、但不与BSA结合的B细胞培养物进行抗体克隆。

[0602] 实施例2:抗体序列的确定

[0603] 基于它们的mRNA序列确定以上鉴定的抗-(聚-GA) DPR抗体的可变区的氨基酸序列,参见图1A-F。简言之,收获选择的非永生化记忆B细胞培养物的活B细胞。随后,从产生选择的抗-(聚-GA) DPR抗体的细胞中提取mRNA,并将其转化为cDNA,并通过PCR扩增编码所述抗体的可变区的序列,将其克隆到质粒载体中并测序。简言之,代表人免疫球蛋白种系组库的所有序列家族的引物组合被用于前导肽、V-区段和J-区段的扩增。在5'端使用前导肽特异性引物且在3'端使用恒定区特异性引物进行第一轮扩增(Smith等人,Nat Protoc.4(2009),372-384)。对于重链和 κ 轻链,在5'端使用V-区段特异性引物且在3'端使用J-区段特异性引物进行第二轮扩增。对于 λ 轻链,在5'端使用V-区段特异性引物且在3'端使用C-区特异性引物进行第二轮扩增(Marks等人,Mol. Biol.222(1991),581-597;de Haard等人,J. Biol. Chem.26(1999),18218-18230)。

[0604] 在重组表达完整抗体后,通过在ELISA上重新筛选,进行具有所需特异性的抗体克隆的鉴定。通过将可变重链和轻链序列在“正确阅读框中”插入表达载体中实现完整人IgG1抗体的重组表达,所述表达载体在5'端以编码前导肽的序列和在3'端以编码适当恒定结构域的序列对可变区序列进行补充。为此目的,引物含有被设计为促进将可变重链和轻链序列克隆到抗体表达载体中的限制性位点。通过将免疫球蛋白重链RT-PCR产物框内插入带有信号肽和人或小鼠免疫球蛋白 γ 1的恒定结构域的重链表达载体中来表达重链免疫球蛋白。通过将 κ 轻链RT-PCR产物框内插入提供信号肽和人 κ 轻链免疫球蛋白的恒定结构域的轻链表达载体中来表达 κ 轻链免疫球蛋白。通过将 λ 轻链RT-PCR产物框内插入提供信号肽和人或小鼠 λ 轻链免疫球蛋白的恒定结构域的 λ 轻链表达载体中来表达 λ 轻链免疫球蛋白。

[0605] 在共转染至Ig重链表达载体和 κ 或 λ Ig轻链表达载体的HEK 293或CHO细胞(或任何其他适当的人或小鼠来源的受体细胞系)中时获得功能性重组单克隆抗体。随后使用标准的蛋白A柱纯化从条件培养基纯化重组人单克隆抗体。可使用短暂或稳定转染的细胞产生不限数量的重组人单克隆抗体。可通过直接使用Ig表达载体或将Ig可变区重新克隆到不同的表达载体中来建立产生重组人单克隆抗体的细胞系。诸如F(ab)、F(ab)₂和scFv的衍生物也可从这些Ig可变区生成。

[0606] 框架区和互补决定区通过与数据库如Abysis(<http://www.bioinf.org.uk/abysis/>)中可用的参考抗体序列进行比较来确定,并使用Kabat编号方案进行注释(<http://www.bioinf.org.uk/abs/>)。

[0607] 实施例3:针对C9orf72二肽重复序列蛋白的ELISA EC₅₀分析

[0608] 为了确定重组人源性C9orf72抗体NI-308.5J10对C9orf72聚-GA DPR的结合特异性和半数最大有效浓度(EC₅₀),进行了ELISA EC₅₀分析。简言之,由Schafer-N(Copenhagen, Denmark)合成并纯化二肽重复序列蛋白:(GA)₁₅:H-CHHHHHH(GA)₁₅-OH(SEQ ID NO:61);(GP)₁₅:H-C(GP)₁₅-OH(SEQ ID NO:62);(GR)₁₅:H-C(GR)₁₅-OH(SEQ ID NO:63);(PA)₁₅:H-C(PA)₁₅-OH(SEQ ID NO:64);(PR)₁₅:H-C(PR)₁₅-OH(SEQ ID NO:65)。将96孔微孔板(Corning Incorporated, Corning, USA)用包被缓冲液(15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, pH 9.42)中浓度为5 μ g/ml或20 μ g/ml的二肽重复序列蛋白肽包被。在室温下用含有2%BSA(Sigma-Aldrich,

Buchs, Switzerland) 的 PBS/0.1% Tween®-20 封闭非特异性结合位点 1 小时。将 NI-308.5J10 稀释至指定的浓度,并在室温下孵育 1 小时,然后同与 HRP 缀合的驴抗人 IgG Fc γ 特异性抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA) 一起孵育。通过在标准比色测定中测量 HRP 活性来确定结合。

[0609] 使用 GraphPad Prism 软件 (San Diego, USA) 通过非线性回归来估算 EC₅₀ 值。人源性抗体 NI-308.5J10 对 C9orf72 二肽重复序列蛋白肽 (GA)₁₅ (SEQ ID NO: 66)、(GP)₁₅ (SEQ ID NO: 67)、(GR)₁₅ (SEQ ID NO: 68)、(PA)₁₅ (SEQ ID NO: 69) 和 (PR)₁₅ (SEQ ID NO: 70) 抗体 NI-308.5J10 以亚纳摩尔范围内的结合亲和力特异性地识别聚-GA DPR 蛋白 (表 3, 图 2)。总之,通过 RTM™ 筛选对健康老年人供体群体进行的高通量免疫组库分析带来了以高亲和力特异性靶向 C9orf72 六核苷酸扩增相关的聚-GA DPR 的人单克隆抗体的成功克隆和重组产生。

		EC ₅₀ [nM]				
[0610]	抗体	(GA) ₁₅ (SEQ ID NO: 66)	(GP) ₁₅ (SEQ ID NO: 67)	(GR) ₁₅ (SEQ ID NO: 68)	(PR) ₁₅ (SEQ ID NO: 70)	(PA) ₁₅ (SEQ ID NO: 69)
	NI-308.5J10	0.26	-	-	-	-

[0611] 表 3: 人源性抗体 NI-308.5J10 对五种 C9orf72 DPR 蛋白的 EC₅₀ 分析。

[0612] 实施例 4: 对 BSA 偶联的 DPR 肽的结合亲和力

[0613] 为了确定重组人源性 NI-308.5J10 抗体对与牛血清白蛋白 (BSA) 偶联的聚-GA C9orf72 二肽重复序列蛋白肽的半数最大有效浓度 (EC₅₀), 进行了 ELISA EC₅₀ 分析。简言之, 由 Schafer-N (Copenhagen, Denmark) 合成并纯化了聚-GA 二肽重复序列蛋白: (GA)₁₅:H-CHHHHHH (GA)₁₅-OH (SEQ ID NO: 61)。然后经由双功能接头 (SMCC) 将聚-GA DPR 蛋白肽偶联至牛血清白蛋白 (BSA)。将 96 孔微孔板 (Corning Incorporated, Corning, USA) 用包被缓冲液 (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, pH 9.42) 中浓度为 5 μ g/ml 的聚-GA BSA 偶联或未偶联的二肽重复序列蛋白肽包被。在室温下用含有 2% BSA (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) 的 PBS/0.1% Tween®-20 封闭非特异性结合位点 1 小时。将 NI-308.5J10 稀释至指定的浓度,并在室温下孵育 1 小时,然后同与 HRP 缀合的驴抗人 IgG Fc γ 特异性抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA) 一起孵育。通过在标准比色测定中测量 HRP 活性来确定结合。

[0614] 使用 GraphPad Prism 软件 (San Diego, USA) 通过非线性回归来估算 EC₅₀ 值。测定了 BSA 偶联和未偶联的聚-GA DPR 对抗体 NI-308.5J10 的可比结合亲和力 (表 4, 图 3)。总之,在这些实验条件下,抗体 NI-308.5J10 识别与 BSA 载体蛋白偶联的聚-GA DPR 肽,与对疏水包被的肽的亲和力相当。

		EC ₅₀ [nM]		
[0615]	抗体	肽	BSA 偶联的肽	未偶联的肽
	NI-308.5J10	(GA) ₁₅ (SEQ ID NO: 66)	0.16	0.23

[0616] 表 4: 对 BSA 偶联和未偶联的 C9orf72 DPR 肽的结合亲和力。

[0617] 实施例 5: 对不相关的淀粉样蛋白生成性蛋白的结合特异性分析

[0618] 为了确定 NI-308.5J10 重组抗体的靶标特异性, 如下进行间接 ELISA。将 96 孔微孔

板 (Corning Incorporated, Corning, USA) 用包被缓冲液 (15mM Na_2CO_3 , 35mM NaHCO_3 , pH 9.42) 中浓度为每肽 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 $(\text{GA})_{15}$ (SEQ ID NO:66)、 $(\text{GP})_{15}$ (SEQ ID NO:67)、 $(\text{GR})_{15}$ (SEQ ID NO:68)、 $(\text{PA})_{15}$ (SEQ ID NO:69) 或 $(\text{PR})_{15}$ (SEQ ID NO:70) 肽或浓度为 $5-10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的不相关的靶蛋白包被。在室温下用含有 2% BSA (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) 的 PBS/0.1% **Tween**[®]-20 封闭非特异性结合位点 1 小时。将 NI-308.5J10 抗体稀释至 4nM 浓度, 并在室温下孵育 1 小时。使用与 HRP 缀合的驴抗人 IgG Fc γ 特异性抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA) 确定结合, 然后在标准比色测定中测量 HRP 活性。以高于中值的倍数增加来计算靶蛋白的信号。通过间接 ELISA 评估抗体与 C9orf72 二肽重复序列蛋白和 7 种不相关的淀粉样蛋白形成蛋白 (IAPP、Ab、HD、TTR、 α -syn、Tau、TDP-43) 的结合来确定 NI-308.5J10 人源性抗体的靶特异性。如图 4 所示, 人源性抗体 NI-308.5J10 显示出对聚-GADPR 肽的高结合特异性, 而与不相关的淀粉样蛋白生成性蛋白不存在交叉反应性或具有最小交叉反应性。

[0619] 实施例 6: C9orf72 二肽重复序列蛋白的蛋白质印迹分析

[0620] 为了确定重组人源性 C9orf72 抗体 NI-308.5J10 对 C9orf72 聚-GA 二肽重复序列蛋白的结合特异性, 进行了免疫印迹分析。由 Schafer-N (Copenhagen, Denmark) 合成并纯化了二肽重复序列蛋白肽: $(\text{GA})_{15}:\text{H}-\text{CHHHHHH}(\text{GA})_{15}-\text{OH}$ (SEQ ID NO:61); $(\text{GP})_{15}:\text{H}-\text{C}(\text{GP})_{15}-\text{OH}$ (SEQ ID NO:62); $(\text{GR})_{15}:\text{H}-\text{C}(\text{GR})_{15}-\text{OH}$ (SEQ ID NO:63); $(\text{PA})_{15}:\text{H}-\text{C}(\text{PA})_{15}-\text{OH}$ (SEQ ID NO:64); $(\text{PR})_{15}:\text{H}-\text{C}(\text{PR})_{15}-\text{OH}$ (SEQ ID NO:65)。然后经由双功能接头 (SMCC) 将 DPR 蛋白肽缀合至牛血清白蛋白 (BSA)。简言之, 使用补充有抗氧化剂的 **Novex**[®] **NuPAGE**[®] MES SDS 运行缓冲液 (Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland) 通过梯度 SDS-PAGE (**Novex**[®] Bis-Tris **NuPAGE**[®] 4%-12%; Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland) 对 BSA 缀合的二肽重复序列蛋白肽 ($0.5\mu\text{g}$) 进行拆分。然后通过使用 **Novex**[®] **NuPAGE**[®] 转移缓冲液 2x (Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland) 将拆分的蛋白质电印迹 (**Novex**[®] Semi-Dry Blotter, 1 小时, 25V) 在甲醇活化的 PVDF 膜 (**Immobilon**[®]-P Transfer Membrane, Merck&Cie, Schaffhausen, Switzerland) 上。在 4°C 下用含有 2% BSA (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) 的 PBS/0.1% **Tween**[®]-20 (PBST) 封闭非特异性结合位点过夜 (或可替代地在室温下 1 小时)。将 NI-308.5J10 抗体稀释至 10nM 浓度, 并在室温下孵育 1 小时 (或可替代地在 4°C 下过夜)。将膜在 PBST 中在室温下洗涤 3 次, 持续 15 分钟, 然后同与 HRP (1:20000 或 1:10000 稀释, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA) 缀合的驴抗人 IgG Fc γ -特异性抗体一起在室温下孵育 1 小时。使用 ECL 和 ImageQuant 350 检测 (GE Healthcare, Otelfingen, Switzerland) 通过膜显影来测定抗体结合。

[0621] 通过蛋白质印迹分析确定人源性抗体 NI-308.5J10 与 BSA 偶联的 C9orf72 二肽重复序列蛋白 $(\text{GA})_{15}$ (SEQ ID NO:66)、 $(\text{GP})_{15}$ (SEQ ID NO:67)、 $(\text{GR})_{15}$ (SEQ ID NO:68)、 $(\text{PA})_{15}$ (SEQ ID NO:69) 和 $(\text{PR})_{15}$ (SEQ ID NO:70) 的结合特异性。抗体 NI-308.5J10 特异性地识别 DPR 蛋白聚-GA (图 5)。总之, 在 SDS PAGE 和蛋白质印迹后, 人源性抗体 NI-308.5J10 可识别 BSA 偶联的聚-GA DPR 肽。所观察到的结合模式与通过 ELISA 分析获得的结果一致。

[0622] 实施例7:通过间接ELISA表征重复序列长度依赖性结合

[0623] 为了确定重组人源性抗体308.5J10对不同重复序列大小的C9orf72 DPR的结合亲和力,进行了ELISA EC_{50} 分析。简言之,由Schafer-N (Copenhagen,Denmark) 合成并纯化了二肽重复序列蛋白肽:GA₂₀:H- (GA)₂₀HHHHHH-NH₂ (SEQ ID NO:71);GA₁₀:H- (GA)₁₀HHHHHH-NH₂ (SEQ ID NO:72);GA₆:H- (GA)₆HHHHHH-NH₂ (SEQ ID NO:73);GA₅:H- (GA)₅HHHHHH-NH₂ (SEQ ID NO:74);GA₄:H- (GA)₄HHHHHH-NH₂ (SEQ ID NO:75);GA₃:H- (GA)₃HHHHHH-NH₂ (SEQ ID NO:76);GA₂:H- (GA)₂HHHHHH-NH₂ (SEQ ID NO:77)。将96孔微孔板(Corning Incorporated,Coming,USA)用包被缓冲液(15mM Na₂CO₃,35mMNaHCO₃,pH 9.42)中浓度为50μg/ml的二肽重复序列蛋白肽包被。在室温下用含有2%BSA(Sigma-Aldrich,Buchs,Switzerland)的PBS/0.1% Tween®-20封闭非特异性结合位点1小时。将NI-308.5J10稀释至指定的浓度,并在室温下孵育1小时,然后同与HRP缀合的驴抗人IgG Fc γ 特异性抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories,Inc.,West Grove,USA)一起孵育。通过在标准比色测定中测量HRP活性来确定结合。使用GraphPad Prism软件(San Diego,USA)通过非线性回归来估算 EC_{50} 值。

[0624] 在疏水性肽包被后通过间接ELISA测定抗体NI-308.5J10对具有不同重复序列长度的C9orf72聚-GA DPR蛋白的结合亲和力。抗体NI-308.5J10需要至少6个GA重复序列来进行首次可检测的结合。检测到具有10个(SEQ ID NO:79)或20个(GA)-重复序列(SEQ ID NO:82)的聚-GADPR的高亲和力结合,反映在亚纳摩尔范围内的 EC_{50} 中(表5,图6)。总之,人源性NI-308.5J10抗体表现出与聚-GADPR的重复序列长度依赖性结合,与短重复序列大小缺乏结合,并且对延伸的二肽重复序列具有优先有高亲和力结合。

[0625]	抗体	EC ₅₀ [nM]						
		(GA) ₂ (SEQ ID NO: 71)	(GA) ₃ (SEQ ID NO: 72)	(GA) ₄ (SEQ ID NO: 73)	(GA) ₅ (SEQ ID NO: 74)	(GA) ₆ (SEQ ID NO: 75)	(GA) ₁₀ (SEQ ID NO: 76)	(GA) ₂₀ (SEQ ID NO: 77)
	NI-308.5J10	-	-	-	-	13.8	0.30	0.29

[0626] 表5:抗体NI-308.5J10的C9orf72聚-GA重复序列长度依赖性结合。

[0627] 实施例8:通过生物层干涉测量法表征结合性质

[0628] 为了确定NI-308.5J10抗体与(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)二肽重复序列(DPR)肽的结合常数(K_D , K_a , K_d),进行了生物层干涉测量法(BLI)。由Schafer-N (Copenhagen,Denmark) 合成并纯化了聚-GA二肽重复序列蛋白:(GA)₁₅:H-CHHHHHH(GA)₁₅-OH(SEQ ID NO:61)。将纯的冻干的(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)以10mg/ml的浓度溶解于DMSO(Sigma-Aldrich,Buchs,Switzerland)中,并储存在-20℃下。简言之,在Octet RED96仪器(Pall ForteBio LLC,Fremont,USA)上进行生物层干涉测量实验。Octet胺反应性(AR2G)生物传感器用于(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)二肽重复序列蛋白肽的共价固定。将AR2G生物传感器用EDC(1-乙基-3-[3-二甲氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐;在水中20mM;Pall ForteBio LLC,Fremont,USA)和s-NHS(N-羟基磺基琥珀酰亚胺;在水中10mM;Pall ForteBio LLC,Fremont,USA)激活300秒,然后使生物传感器表面负载在10mM乙酸盐缓冲液(pH 6)(Pall ForteBio LLC,Fremont,USA)中5μg/ml的(GA)₁₅(SEQ ID NO:66)肽持续600秒。在肽负载后,将AR2G生物传感器用1M乙醇胺(pH 8.5)(Pall ForteBio LLC,Fremont,USA)猝灭300秒,在动力学缓冲液(Pall ForteBio LLC,Fremont,USA)中冲洗120秒(基线),并且在稀释的动力学缓冲液(PBS中1:

10) 中以不同浓度 (30、15、7.5、3.75 和 1.875 nM) 评估人 NI-308.5J10 抗体缔合持续 600 秒。在动力学缓冲液中评价抗体解离持续 800 秒。通过使用仅 PBS 参考收集数据来参考所有结合数据。通过使用 Octet 系统软件 (Pall ForteBio LLC, Fremont, USA), 以同时 K_a/K_d 全局拟合和 1:1 交互作用模型进行数据分析。在拟合后, 使用来自 GraphPad (San Diego, USA) 的 Prism 软件绘制 BLI 传感图。

[0629] NI-308.5J10 抗体以高亲和力 KD (0.15 ± 0.02 nM) 结合至聚-GA DPR 肽, 具有高缔合速率常数 ($K_a = (1.63 \pm 0.05) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) 和在约相同范围内的解离常数 ($K_d = 2.4 \pm 0.4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) (图 7 和表 6)。总之, 抗体 NI-308.5J10 以高亲和力识别聚-GA DPR 肽。

[0630]	抗体	KD (M)	K_a (M s^{-1})	K_d (s^{-1})
	NI-308.5J10	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-10}$	$(1.63 \pm 0.05) \times 10^5$	$(2.4 \pm 0.4) \times 10^{-5}$

[0631] 表 6: 抗体 NI-308.5J10 与聚-GA DPR 肽的结合常数 (K_D 、 K_a 、 K_d)

[0632] 实施例 9: 通过生物层干涉测量术确定竞争结合

[0633] 为了确定抗体 NI-308.5J10 和 NI-mAb 的表位竞争组, 进行了参考生物层干涉测量术 (BLI)。由 Schafer-N (Copenhagen, Denmark) 合成并纯化了聚-GA 二肽重复序列蛋白肽: (GA)₁₅:H-CHHHHHH (GA)₁₅-OH (SEQ ID NO:61)。将纯的冻干的 (GA)₁₅ (SEQ ID NO:66) 以 10 mg/ml 的浓度溶解于 DMSO (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) 中, 并储存在 -20°C 下。简言之, 在 Octet RED96 仪器 (Pall ForteBio LLC, Fremont, USA) 上进行生物层干涉测量实验。Octet 胺反应性 (AR2G) 生物传感器用于 (GA)₁₅ (SEQ ID NO:66) 二肽重复序列蛋白肽的共价固定。将 AR2G 生物传感器用 EDC (1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐; 在水中 20 mM; Pall ForteBio LLC, Fremont, USA) 和 s-NHS (N-羟基磺基琥珀酰亚胺; 在水中 10 mM; Pall ForteBio LLC, Fremont, USA) 激活 300 秒, 然后使生物传感器表面负载在 10 mM 乙酸盐缓冲液 (pH 6) (Pall ForteBio LLC, Fremont, USA) 中 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 (GA)₁₅ (SEQ ID NO:66) 肽持续 600 秒。在肽负载后, 将 AR2G 生物传感器用 1 M 乙醇胺 (pH 8.5) (Pall ForteBio LLC, Fremont, USA) 猝灭 300 秒, 在动力学缓冲液 (Pall ForteBio LLC, Fremont, USA) 中冲洗 120 秒 (基线)。然后以成对方式评估 NI-308 抗体的靶标结合: 参考 NI-308 抗体 (15 nM, 在动力学缓冲液 (Pall ForteBio LLC, Fremont, USA) 中) 与 (GA)₁₅ (SEQ ID NO:66) 肽的结合 (持续 800 秒) 直接进行, 随后竞争性 NI-308 抗体 (15 nM, 在动力学缓冲液 (Pall ForteBio LLC, Fremont, USA) 中) 的结合 (持续 800 秒)。通过使用仅 PBS 参考收集数据来参考所有结合数据。通过使用 Octet 系统软件 (Pall ForteBio LLC, Fremont, USA) 进行数据分析。使用来自 GraphPad (San Diego, USA) 的 Prism 软件绘制 BLI 传感图。

[0634] 抗体 NI-mAb 参考与 C9orf72 二肽重复序列蛋白肽 (GA)₁₅ (SEQ ID NO:66) 的结合被 NI-308.5J10 抗体与靶标的先前结合消除 (图 8A), 从而表明 NI-mAb 参考抗体识别结合表位, 所述结合表位也被 NI-308.5J10 抗体靶向。抗体 NI-308.5J10 与 C9orf72 DPR 肽 (GA)₁₅ (SEQ ID NO:66) 的结合未被 NI-mAb 参考抗体与靶标的先前结合阻断 (图 8B), 从而表明这种抗体潜在识别聚-GA 肽上的另外构象表位。总之, 抗体 NI-308.5J10 和 NI-mAb 参考识别共同的结合表位, 并且与抗体 NI-mAb 参考相比, 抗体 NI-308.5J10 潜在识别聚-GA 肽上的另外构象表位。

[0635] 实施例 10: 通过 SDS PAGE 进行的抗体完整性分析

[0636] 为了评估重组人 NI-308.5J10 抗体的纯度和完整性, 已进行了 SDS PAGE 分析。简言

之,将人NI-308.5J10抗体通过CHO-S细胞的瞬时转染表达,并通过FPLC系统(ÄKTApurifier;GE Healthcare Life Sciences)上的蛋白A亲和纯化进行纯化。在PD-10柱(GE Healthcare Life Sciences)脱盐后,将抗体配制在PBS中。在还原条件下通过梯度SDS-PAGE(Novex® Bis-Tris NuPAGE® 4%-12%;Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland)使用补充有抗氧化剂(Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland)的Novex® NuPAGE® MES SDS运行缓冲液拆分2和10µg纯化的重组人NI-308.5J10抗体,然后进行考马斯蓝染色(Novex® SimplyBlue™ SafeStain,Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland)。结果,在重组人NI-308.5J10抗体的还原条件下的SDS-PAGE分析揭示了两条主要带,对应于预期大小的抗体重链和轻链。没有检测到显著污染或蛋白水解降解产物(图9)。

[0637] 实施例11:对死后人C9orf72-FTLD和非神经病学对照脑组织中DPR聚集体病理的结合分析

[0638] 为了评估抗体NI-308.5J10与源自人C9orf72-FTLD患者和非神经病学对照的死后小脑组织中C9orf72二肽重复序列蛋白的结合,已进行了结合分析。简言之,将来自3名具有C9orf72六核苷酸重复扩增的FTLD患者和1名非神经病学对照受试者(BiOBANC HCB-IDIBAPS, Barcelona, Spain)的小脑的福尔马林固定、石蜡包埋的5µm切片进行了预处理,通过在1mM EDTA缓冲液(pH 8.3)中烹饪来进行抗原回收,并且微波照射12分钟(600W)。内源性过氧化物酶活性的猝灭通过在室温下用3% H_2O_2 的甲醇溶液处理10分钟来实现。在室温下用PBS/5%血清(马/山羊)/4%BSA封闭非特异性结合位点1小时。在封闭步骤后,将切片与人源性NI-308.5J10抗体在20nM浓度下在4°C孵育过夜。使用生物素化的驴抗人IgG(H+L)(1:350dil, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)或抗兔第二抗体(1:250稀释, Vector Laboratories; Burlingame, USA)进行检测,并且使用Vectastain Elite ABC试剂盒(Vector Laboratories, Burlingame, USA)放大抗体信号,并用二氨基联苯胺(DAB, Thermo Scientific, Rockford, USA)检测抗体信号。使用Eukitt®固定介质(O. Kindler GmbH; Freiburg, Germany)固定载玻片。使用Dotslide VS120载玻片扫描仪(Olympus Schweiz AG, Switzerland)进行明场成像。通过来自选定FTLD患者和非神经病学对照受试者的小脑切片的免疫组化分析来评估NI-308.5J10与病理性C9orf72二肽重复序列蛋白的结合。如图10所示,人源性NI-308.5J10抗体在所测试的C9orf72-FTLD病例的小脑的颗粒细胞层中揭示突出的神经元细胞质内含物、神经元核内内含物和营养不良的神经突。相比之下,非神经病学对照小脑对所测试的抗体呈阴性(图10)。总之,人源性抗体NI-308.5J10特异性地检测C9orf72-FTLD病例小脑颗粒细胞层中的C9orf72二肽重复序列蛋白,而在对照小脑中未观察到染色,从而表明所述抗体的高靶标特异性。

[0639] 实施例12:NI-308.5J10中轻链糖基化和重链Asn54脱酰胺的鉴定

[0640] 为了鉴定翻译后修饰,已进行了质谱。通过加热使NI-308.5J10hIgG1变性,并用RapiGest(Waters, Inc)处理,然后用PNGase F(Prozyme)去糖基化。在处理,将蛋白质在4M尿素和10mM EDTA中的40mM DTT中在37°C下变性1小时。将RapiGest用0.5%TFA在37°C下猝灭1小时,并在LCT Premier质谱仪(Waters, Inc)上进行分析。轻链和重链的分离在

TSKgel Phenyl-5PW柱(2.0x 75mm,10 μ m,TOSOH Bioscience)上实现。使用MaxEnt 1软件(Waters,Inc)对生成的分子质量解卷积。还原的NI-308.5J10的完整质量分析表明,轻链的N-糖基化位点几乎被杂合/复合聚糖完全占据,并且检测到的重链与预测的pyroGLu23-475相对应。

[0641] 之后,进行了胰蛋白酶消化/质谱。简言之,将抗体NI-308.5J10还原,烷基化,沉淀并用胰蛋白酶消化。使用2M尿素、0.15M tris-HCl、2mM CaCl₂ pH 7.6和5mM甲胺中的7% (w/w)胰蛋白酶(Promega)在室温下进行胰蛋白酶消化8小时。为了除去N-聚糖,在孵育6小时后将1.25mU PNGaseF(Prozyme)添加至混合物。在LC-MS分析之前,添加尿素以消化至最终浓度4M。在由UPLC和Xevo G2-S QToF质谱仪(Waters,Inc)组成的LC-MS系统上分析消化混合物。用Acquity HSS T3 C18柱(2.1x 150mm,Waters,Inc)以梯度洗脱(TFA/乙腈)实现消化物的分离。使用BiopharmaLynx软件处理LC-MS肽作图数据。对鉴定进行手动验证。根据离子计数估算修饰的量。分析揭示,重链的Asn54非常容易脱酰胺。在此样品中超过85%的HC Asn54脱酰胺,其中约85%呈isoAsp形式。结果总结在表7中。在NI308.5J10 Fab的晶体结构中也观察到位置54处的isoAsp。

氧化位点	脱酰胺%
LC N33	2
HC N54	96
HC N391	1.7
HC N396	0.3

[0643] 表7:NI308.5J10中Asn残基脱酰胺的结果

[0644] 实施例13:NI-308.5J10变体的设计和突变的验证

[0645] 选择一种NI-308.5J10轻链突变以除去轻链糖基化位点(N75D)。选择了四种NI-308.5J10重链突变,以除去易脱酰胺的天冬酰胺(N54S,N54T)或位置55的甘氨酸(G55S,G55T)。设计构建体以将变体表达为完整人IgG1。为了允许Fab表达,设计了含有具有C-末端六组氨酸标签(SEQ ID NO:84)的变体的VH和CH1区的构建体。序列列于

[0646] 表8中。

SEQ ID NO	质粒 #	修饰的位置	氨基酸序列
27	SDD177	VL-N75D	EIVLTQSPKLSLSPGKASISCRSPRSLLHTN GYTYLDWYLQRPQGSPQLLIFLASNRASGVP DRFSGSGSGTDFTLRISGVEADDVGVYYCM QGLQPSWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
28	SDD173	VH-N54S 完整 hIgG1	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTYYTVLGGVSD YYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTSKTTYTY NPSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSTVAADTA VYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	SDD174	VH-N54T 完整 hIgG1	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTYYTVLGGVSD YYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTTGKTTYTY NPSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSTVAADTA VYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	SDD175	VH-G55S 完整 hIgG1	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTYYTVLGGVSD YYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTNKTTYTY NPSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSTVAADTA VYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

[0647]

			VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	SDD176	VH-G55T 完整 hIgG1	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTYITVLGGSVSD YYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTNKTTYTY NPSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSTVAADTA VYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	SDD178	WT Fab- his	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTYITVLGGSVSD YYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTNKTTYTY NPSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSTVAADTA VYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCHHHHHH
33	SDD179	VH-N54S Fab-6H	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTYITVLGGSVSD YYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTSKTTYTY NPSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSTVAADTA VYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCHHHHHH
34	SDD180	VH-N54T Fab-6H	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTYITVLGGSVSD YYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTTGTTYTY NPSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSTVAADTA VYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCHHHHHH
35	SDD181	VH-G55S Fab-6H	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTYITVLGGSVSD YYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTNKTTYTY NPSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSTVAADTA VYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGLT

[0648]

			VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCHHHHHH
[0649]	36	SDD182 VH-G55T Fab-6H	QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTYTVLGGSVSD YYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTNTKTTYTY NPSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSTVTAADTA VYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCHHHHHH

[0650] 表8:经修饰的NI-308.5J10抗体的氨基酸序列

[0651] 为了验证突变,已进行了NI-308.5J10抗体变体N54S/N75D的质谱分析。对5J10 N54S/N75D hIgG1的完整质量分析显示,还原的糖基化抗体中检测到的主要组分是预测的轻链和具有N-连接的G0F聚糖的重链,从而表明N75D突变成功。对还原的非去糖基化NI-308.5J10 N54S/N75D hIgG1的质谱图去卷积。对NI-308.5J10 N54S/N75D hIgG1的完整质量分析显示,还原的糖基化抗体中检测到的主要组分是预测的轻链和具有N-连接的G0F聚糖的重链,从而表明N75D突变成功。

[0652] 图11示出突变已映射至其中的NI-308.5J10抗体的晶体结构。如从晶体结构可得出,翻译后修饰远离抗体的结合位点。

[0653] 实施例14:变体IgG1和Fab的产生

[0654] 使用FectoPro转染试剂将由N75D轻链与每个重链突变体组成的工程化的抗体NI-308.5J10变体瞬时转染到CHO-S细胞中,并在24小时后转移至降低的温度。使用上述构建体,蛋白质以完整人IgG1形式产生并且也以Fab形式产生。通过离心收获上清液,并通过穿过0.45um过滤器使其澄清。然后通过亲和色谱、随后尺寸排阻色谱法纯化Fab(表9)。为了纯化完整的IgG1蛋白,将澄清的培养基负载到rProtein A琼脂糖凝胶(GE healthcare)上。将柱用20mM Na₂HPO₄ pH 7.4、150mM NaCl洗涤,并用25mM NaH₂PO₄ pH 2.8、100mM NaCl洗脱蛋白质,用从0.5M储备液稀释的12.5mM Na₂HPO₄ pH 8.6中和。为了纯化Fab,将澄清的培养基负载到NiExcel琼脂糖凝胶(GE Healthcare)上,用缓冲液A(25mM tris pH 8,500mM NaCl,10mM咪唑)洗涤,并用含有300mM咪唑的缓冲液A洗脱。将亲和纯化的蛋白质在PBS中的Superdex 20010/300柱上纯化。通过SDS-PAGE分析纯化的蛋白质的大小和同质性。对于SDS-PAGE,将样品置于来自Invitrogen的4%-20%Tris-甘氨酸梯度凝胶上。在电泳前,将未还原的样品在95℃下加热3分钟。将还原的样品用含有100mM DTT的样品缓冲液处理,并在电泳前在95℃下加热3分钟。SDS-PAGE的结果(图12)表明,所有蛋白质均显示出预期大小,没有明显的聚集体或蛋白水解产物。

	HC		LC		4D #	滴度 (mg/l)
	突变	质粒 #	突变	质粒 #		
[0655] hIgG1	WT	SDD151	WT	SDD152	#6003	134.5
	WT	SDD151	N75D	SDD177	#6207	132.3
	N54S	SDD173	N75D	SDD177	#6208	130.1
	N54T	SDD174	N75D	SDD177	#6209	122.4
	G55S	SDD175	N75D	SDD177	#6210	126.5
	G55T	SDD176	N75D	SDD177	#6211	129.3
hIgG1- Fab-6His	WT-Fab-6His	SDD178	WT	SDD152	#6212	118.1
	WT-Fab-6His	SDD178	N75D	SDD177	#6213	97.8
	N54S-Fab-6His	SDD179	N75D	SDD177	#6214	104.1
	N54T-Fab-6His	SDD180	N75D	SDD177	#6215	106.1
	G55S-Fab-6His	SDD181	N75D	SDD177	#6216	102
	G55T-Fab-6His	SDD182	N75D	SDD177	#6217	103

[0656] 表9:NI-308.5J10变体IgG和Fab的表达

[0657] 实施例15:通过SPR确定的蛋白质与聚-GA的结合

[0658] 使用Biacore T200仪器 (GE Healthcare),通过SPR评估了变异Fab与合成聚-GA的结合。使用制造商提供的试剂和方案,将合成的生物素8xGA BSA从在SPR缓冲液(10mM HEPES,pH 7.2,150mM NaCl,3.4mM EDTA,0.05%BSA,0.005%表面活性剂P20)中5ng/mL的溶液以2-4pg/mm²捕获在生物素CAPture芯片(GE Healthcare)上。将在SPR缓冲液中1.23、3.7、11、33和100nM递增浓度的变体抗体Fab片段的一系列溶液各自以30μL/min的速度注入生物素8xGA包被的传感器芯片上4分钟,然后进行缓冲液洗涤,并在注射过程中以及最终注射后15分钟内记录相对于无生物素8xGA的参考传感器的结合反应。使用Biacore T200评价软件v3.0使用1:1结合模型分析数据。所有NI-308.5J10变体均显示与合成8x GA的相似结合动力学,其中K_D为20-30nM。测量的结果列于表10中。如NI-308.5J10变体Fab与合成8x GA的SPR结合谱显示,所有NI-308.5J10变体均显示与合成8x GA的相似结合动力学,KD为20-30nM。

	缔合速率, k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	解离速率, k _d (s ⁻¹)	亲和力, K _D (nM)
5J10 WT Fab	2.7 x10 ⁵	7.8 x10 ⁻³	28
LC N75D Fab	2.3 x10 ⁵	5.9 x10 ⁻³	26
[0659] HC N54S/LC N75D Fab	2.9 x10 ⁵	6.0 x10 ⁻³	21
HC N54T/LC N75D Fab	2.6 x10 ⁵	7.6 x10 ⁻³	30
HC G55S/LC N75D Fab	1.8 x10 ⁵	4.4 x10 ⁻³	24
HC G55T/LC N75D Fab	2.0 x10 ⁵	4.4 x10 ⁻³	22

[0660] 表10:通过SPR测量的NI-308.5J10变体Fab对8x GA的结合速率和亲和力。

[0661] 实施例16:5J10变体的稳定性

[0662] 在NI-308.5J10变体上进行了分子稳定性的另外测试。通过差示扫描量热法 (VP-DSC, MicroCal) 生成的所有变体的热稳定性曲线都相似,其中CH2结构域(完整IgG1)的解链温度为约72°C, Fab的解链温度在79°C-81°C的范围内,并且CH3结构域的解链温度>86°C (表11)。

分子	T _{m1} CH2	T _{m2} Fab	T _{m3} CH3
5J10hIgG1	*	80.2	*
5J10-LC N75D hIgG1	72.9	80.0	87.0
5J10-LC N75D,HC N54S hIgG1	72.6	80.6	87.2
5J10-LC N75D,HC N54T hIgG1	72.9	79.0	86.7
5J10-LC N75D,HC G55S hIgG1	72.7	79.7	86.9
5J10-LC N75D,HC G55T hIgG1	72.5	79.8	86.9
5J10Fab	NA	80.2	NA
5J10-LC N75D Fab	NA	80.2	NA
5J10-LC N75D,HC N54S Fab	NA	80.7	NA
5J10-LC N75D,HC N54T Fab	NA	79.3	NA
5J10-LC N75D,HC G55S Fab	NA	80.2	NA
5J10-LC N75D,HC G55T Fab	NA	80.2	NA

[0664] 表11:NI-308.5J10变体的热稳定性.对于完整IgG,通过DSC在温度T_{m1}(表征hFc CH2结构域的解折叠)、T_{m2}(表征Fab(CH1,VH,CL,VL)的解折叠)和T_{m3}(表征hFc CH3结构域的解折叠)处观察到三个主要的解链转变。对于5J10 hIgG1,由于与T_{m2}(*)重叠而无法确定T_{m1}和T_{m3}。对于Fab,观察到一个解链转变,表征Fab(CH1,VH,CL,VL)的解折叠。

[0665] 实施例17:用于研究C9orf72 DPR蛋白的致病机制的基于细胞的模型

[0666] 新兴细胞培养和动物模型中的最新报告为异常C9orf72 DPR蛋白的毒性提供了证据。例如,细胞培养系统中细胞质聚-GA的毒性由May等人(Acta Neuropathol.128(2014), 485-503)和Zhang等人(Acta Neuropathol.128(2014), 505-524)进行了报告。

[0667] 为了确定是否如针对tau(Yanamandra等人,Ann.Clin.Transl.Neurol.2(2013), 278-288)和 α -突触核蛋白(Tran等人,Cell Rep.7(2014), 2054-2065)所示,可通过用本发明的抗体处理来预防DPR病理的扩散,类似地以同样的方法使用体外C9orf72 DPR毒性测定。特别地,产生了合成的DNA序列以驱动在ATG依赖性翻译中带有150个二肽重复序列的单独DPR蛋白的表达。采用随机密码子策略以确保仅表达选定的单独DPR蛋白序列。为了驱动DPR蛋白在神经元细胞如SH-SY5Y、NSC-34、Neuro-2a、iPSC来源的神经元和原代神经元中的表达,将合成的DNA序列克隆到通过神经元特异性Thy 1.2启动子调控的表达载体中。为了在各种真核细胞(如HEK293T、U-2 OS、HeLa和Cos细胞)中进行高水平表达,将合成的DNA序列克隆到通过CMV启动子调控的表达载体中。源自C9orf72患者成纤维细胞的人iPSC来源的神经元和转分化神经元(iNeurons)代表了另外C9orf72 DPR蛋白细胞培养模型。

[0668] 这些细胞模型可用于测试本发明抗体的治疗效用。可通过经由线粒体和/或半胱天冬酶活性测定监测细胞活力,经由细胞溶解和/或膜渗漏测定监测细胞毒性以及经由免

疫组织化学测定监测抑制细胞DPR蛋白扩散来进行本发明抗体的治疗效果的评价和确认。

[0669] 实施例18:抗DPR抗体在C9orf72病理的转基因小鼠模型中的治疗效用的验证

[0670] 针对易于聚集和/或错误折叠的蛋白质开发的免疫疗法方法已在一些神经变性疾病临床前和临床研究中取得了有希望的结果。如WO 2016/050822 A2的实施例15中所述,在C9orf72病理的转基因小鼠模型中验证主题抗DPR抗体的治疗效用。此外,已开发了显示C9orf72疾病的病理标志(包括来自RAN翻译的RNA病灶和二肽重复序列蛋白以及相关的认知缺陷和存活表型)的C9orf72 BAC转基因小鼠品系(Liu等人,Neuron 90(2016),521-34和Jiang等人,Neuron 90(2016),535-50),所述品系适用于确认抗DPR抗体的治疗效用。此外,适当的转基因小鼠品系,即表达具有约500个六核苷酸重复序列的人C9orf72基因的所谓的C9-500BAC转基因小鼠品系可从Jackson Laboratory,600Main Street,Bar Harbor,ME USA 04609以FVB/NJ-Tg(C9orf72)500Lpwr/J商业购得。该品系的半合子小鼠发展出年龄依赖性麻痹、焦虑样行为、存活率下降以及脑和脊髓的广泛神经变性,伴随有义/反义RNA病灶的累积以及RAN蛋白和TDP43的聚集。C9-500小鼠允许研究急性、快速进行性疾病以及缓慢进行性疾病。因此,这是用于研究家族性肌萎缩性侧索硬化症(ALS或Lou Gehrig病)和额颞叶性痴呆(FTD)中C9orf72重复序列长度依赖性毒性增加的模型,并且因此是用于证实主题抗体的治疗效用的优选小鼠模型。

[0671] 此外,与此同时还开发了其他动物模型;参见例如,Simone等人(2018),同上中描述的果蝇模型,以及国际申请WO 2018/064600中描述的非人类动物模型。将由此类动物模型产生的体内数据转化为相应人类疾病的疗法的策略也是本领域技术人员已知的;参见例如,Picher-Martel等人Acta Neuropathologica Communications 4(2016),1-29。特别地,可从阿杜单抗的开发中获得指导,阿杜单抗是一种重组人源性抗体,能够靶向阿尔茨海默氏病患者大脑中的 β -淀粉样蛋白(Abeta),并且迄今为止在I和II期临床试验中显示出有希望的结果。国际申请WO 2008/081008中描述了在阿尔茨海默氏病的小鼠模型中用于阿杜单抗的先导抗体的产生及其体内生物化学和免疫组织化学性质以及生物学活性的研究,所述申请的公开内容以引用的方式并入本文。如WO 2008/081008的实施例4中所示,当以3mg/kg的剂量腹膜内且微弱地施用,抗Abeta抗体能够改善阿尔茨海默氏病转基因小鼠模型中的异常认知行为并赋予 β -淀粉样蛋白斑块负荷降低。正如可在临床试验中证实的那样,在所述小鼠模型中使用的剂量和治疗方案在临床试验中也被证明是有效的,其中已经研究了1与10mg/kg之间的剂量,包括3mg/kg。因此,由病理蛋白引起的疾病的转基因小鼠模型可良好地用于预测给定抗体在人患者中的治疗效用。

[0672] 关于主题抗体及其变体的施用模式和剂量,基于对过表达导致肌萎缩性侧索硬化症(ALS)的症状发展的引起疾病的人超氧化物歧化酶1(SOD1)突变体的转基因小鼠的外周抗体治疗的治疗潜力的研究,在直接脑输注以及还有抗SOD1抗体的外周施用后治疗可能显示是有效的,尤其是在每周以3至30mg/kg剂量每腹膜内(i.p.)注射施用;参见Maier等人,2018,Science Translational Medicine。由于含有聚GA-DPR的蛋白质是从C9orf72基因翻译的,与患有ALS的患者的大脑中存在错误折叠和聚集的SOD1类似,甚至可能共聚集,因此谨慎地预期主题抗体及其变体在相同的剂量方案内有效,即以3至30mg/kg每周腹膜内注射。因此,在优选的实施方案中,将抗DPR抗体及其DPR结合片段配制在药物组合物,所述药物组合物被设计成以3至30mg/kg的剂量经由腹膜内注射每周一次施用。因此,还根据本

发明,以3至30mg/kg的剂量每周一次腹膜内注射主题抗体是优选的施用方案。

[0673] 此外,由于在人类免疫系统内的进化上的优化和亲和力成熟,本发明的抗体由于从健康人受试者中分离且具有优异安全性和缺乏免疫原性的高可能性而提供了有价值的治疗工具。这些预期的治疗效果的可确认可通过上述出版物中所述的测试方法使用人抗体代替小鼠抗体来提供。

序列表

<110> 比奥根MA公司

生物有限公司

<120> 人源性抗(聚-GA)二肽重复序列(DPR)抗体

<130> 13751-0309W01

<140>

<141>

<150> 62/772,809

<151> 2018-11-29

<150> EP 18169888.7

<151> 2018-04-27

<160> 84

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 372

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (372)

<223> /注释="NI-308.5J10可变重链(VH)序列"

<400> 1

cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

acc ctg tcc ctc act tac act gtc tta ggt ggc tcc gtc agt gat tac 96

Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr

20 25 30

tac tgg agc tgc atc cgg cag ccc gcc ggg aag gga ctg gag tgg att 144

Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

ggg cga aca tat act aac ggg aag acc act tac act tac aac ccc tcc 192

Gly Arg Thr Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

ctc gag agt cga ctc agt ttg tct ata gac acg tcc atg aac caa ttc 240

Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe

65 70 75 80

tcc ctg aag ttg acc tct gtg acg gcc gcg gac acg gcc gtc tat tac 288

Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 tgc gcg aga tgg ggg gcg gtg act ggt gac tac tac tac ggt atg gac 336
 Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 gtc tgg ggc cca ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 372
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Thr Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

Asp Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 4
 Arg Thr Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 1 5 10 15
 Glu Ser
 <210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 5
 Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (336)
 <223> /注释="NI-308.5J10可变轻链(VK)序列"
 <400> 6
 gaa att gtg ctg act cag tct cca ctc tcc ctg tcc gtc acc cct gga 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct cct cgg agc ctt cta cat act 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Pro Arg Ser Leu Leu His Thr
 20 25 30
 aat gga tat aca tat ttg gac tgg tac cta caa agg cca ggg cag tct 144
 Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 cca caa ctc ctg atc ttt ttg gct tct aat cgg gcc tcc ggg gtc cct 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 gac agg ttc agt ggc agc gga tca ggc aca aat ttt aca ctg aga atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 agc gga gtg gag gct gac gat gtt gga gtt tat tac tgc atg caa ggt 288
 Ser Gly Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95

cta caa cct tcg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
 Leu Gln Pro Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 7

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Pro Arg Ser Leu Leu His Thr
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95
 Leu Gln Pro Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 8

Arg Ser Pro Arg Ser Leu Leu His Thr Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 9

Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 10
 Met Gln Gly Leu Gln Pro Ser Trp Thr
 1 5
 <210> 11
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成
 多核苷酸"
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (372)
 <223> /注释="NI-308.5J10可变重链 (VH) 序列 - N54S
 突变"
 <400> 11
 cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 acc ctg tcc ctc act tac act gtc tta ggt ggc tcc gtc agt gat tac 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30
 tac tgg agc tgc atc cgg cag ccc gcc ggg aag gga ctg gag tgg att 144
 Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 ggg cga aca tat act agc ggg aag acc act tac act tac aac ccc tcc 192
 Gly Arg Thr Tyr Thr Ser Gly Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 ctc gag agt cga ctc agt ttg tct ata gac acg tcc atg aac caa ttc 240
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 tcc ctg aag ttg acc tct gtg acg gcc gcg gac acg gcc gtc tat tac 288
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 tgc gcg aga tgg ggg gcg gtg act ggt gac tac tac tac ggt atg gac 336
 Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110

gtc tgg ggc cca ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 372
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"

<400> 12

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Thr Tyr Thr Ser Gly Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 13

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"

<220>

<221> 来源

<223> /注释="NI-308.5J10 VH-CDR2序列 - N54S突变"

<400> 13

Arg Thr Tyr Thr Ser Gly Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
1 5 10 15

Glu Ser

<210> 14

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (372)

<223> /注释="NI-308.5J10可变重链(VH)序列 - N54T
突变"

<400> 14

cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

acc ctg tcc ctc act tac act gtc tta ggt ggc tcc gtc agt gat tac 96
Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30

tac tgg agc tgc atc cgg cag ccc gcc ggg aag gga ctg gag tgg att 144
Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ggg cga aca tat act acc ggg aag acc act tac act tac aac ccc tcc 192
Gly Arg Thr Tyr Thr Thr Gly Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

ctc gag agt cga ctc agt ttg tct ata gac acg tcc atg aac caa ttc 240
Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
65 70 75 80

tcc ctg aag ttg acc tct gtg acg gcc gcg gac acg gcc gtc tat tac 288
Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

tgc gcg aga tgg ggg gcg gtg act ggt gac tac tac tac ggt atg gac 336
Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110

gtc tgg ggc cca ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 372
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Thr Tyr Thr Thr Gly Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<220>

<221> 来源

<223> /注释="NI-308.5J10 VH-CDR2序列 - N54T 突变"

<400> 16

Arg Thr Tyr Thr Thr Gly Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
1 5 10 15

Glu Ser

<210> 17

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (372)

<223> /注释="NI-308.5J10可变重链 (VH) 序列 - G55S
突变"

<400> 17

cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

acc ctg tcc ctc act tac act gtc tta ggt ggc tcc gtc agt gat tac 96
Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30

tac tgg agc tgc atc cgg cag ccc gcc ggg aag gga ctg gag tgg att 144
Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ggg cga aca tat act aac agc aag acc act tac act tac aac ccc tcc 192
Gly Arg Thr Tyr Thr Asn Ser Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

ctc gag agt cga ctc agt ttg tct ata gac acg tcc atg aac caa ttc 240
Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
65 70 75 80

tcc ctg aag ttg acc tct gtg acg gcc gcg gac acg gcc gtc tat tac 288
Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

tgc gcg aga tgg ggg gcg gtg act ggt gac tac tac tac ggt atg gac 336
Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110

gtc tgg ggc cca ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 372
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
多肽"

<400> 18

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Thr Tyr Thr Asn Ser Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"

<220>

<221> 来源

<223> /注释="NI-308.5J10 VH-CDR2序列 - G55S 突变"

<400> 19

Arg Thr Tyr Thr Asn Ser Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
1 5 10 15

Glu Ser

<210> 20

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (372)

<223> /注释="NI-308.5J10可变重链(VH)序列 - G55T
突变"

<400> 20

cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

acc ctg tcc ctc act tac act gtc tta ggt ggc tcc gtc agt gat tac 96
Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30

tac tgg agc tgc atc cgg cag ccc gcc ggg aag gga ctg gag tgg att 144
Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ggg cga aca tat act aac acc aag acc act tac act tac aac ccc tcc 192
Gly Arg Thr Tyr Thr Asn Thr Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

ctc gag agt cga ctc agt ttg tct ata gac acg tcc atg aac caa ttc 240
Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
65 70 75 80

tcc ctg aag ttg acc tct gtg acg gcc gcg gac acg gcc gtc tat tac 288
Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

tgc gcg aga tgg ggg gcg gtg act ggt gac tac tac tac ggt atg gac 336
Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110

gtc tgg ggc cca ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 372
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Thr Tyr Thr Asn Thr Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<220>

<221> 来源

<223> /注释="NI-308.5J10 VH-CDR2序列 - G55T突变"

<400> 22

Arg Thr Tyr Thr Asn Thr Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
1 5 10 15

Glu Ser

<210> 23

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
多核苷酸"

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (336)

<223> /注释="NI-308.5J10可变轻链(VK)序列 - N75D
突变"

<400> 23

gaa att gtg ctg act cag tct cca ctc tcc ctg tcc gtc acc cct gga 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct cct cgg agc ctt cta cat act 96
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Pro Arg Ser Leu Leu His Thr
 20 25 30

aat gga tat aca tat ttg gac tgg tac cta caa agg cca ggg cag tct 144
Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca caa ctc ctg atc ttt ttg gct tct aat cgg gcc tcc ggg gtc cct 192
Pro Gln Leu Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agc gga tca ggc aca gac ttt aca ctg aga atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

agc gga gtg gag gct gac gat gtt gga gtt tat tac tgc atg caa ggt 288
Ser Gly Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95

cta caa cct tcg tgg acg ttc ggc cag ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
Leu Gln Pro Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 24

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Pro Arg Ser Leu Leu His Thr
           20           25           30
Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65           70           75           80
Ser Gly Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
           85           90           95
Leu Gln Pro Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100          105          110
```

<210> 25

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<220>

<221> 来源

<223> /注释="NI-308.5J10可变轻链(VK)质粒(SDD 152)"

<400> 25

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Pro Arg Ser Leu Leu His Thr
```

	20		25		30														
Asn	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser				
	35						40				45								
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Phe	Leu	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro				
	50						55				60								
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asn	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile				
65				70						75					80				
Ser	Gly	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Gly				
			85							90				95					
Leu	Gln	Pro	Ser	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
	100									105				110					
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu				
	115									120				125					
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe				
	130									135				140					
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln				
145											155			160					
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser				
											170			175					
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu				
											185			190					
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser				
	195										200			205					
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
	210										215								

<210> 26
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="NI-308.5J10-hIgG1可变重链(VH)质粒(SDD 151)"
 <400> 26
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr			
	20	25	30
Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Arg Thr Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser			
	50	55	60
Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe			
65	70	75	80
Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
	85	90	95
Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp			
	100	105	110
Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys			
	115	120	125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly			
	130	135	140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro			
145	150	155	160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr			
	165	170	175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val			
	180	185	190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn			
	195	200	205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro			
	210	215	220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu			
225	230	235	240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
	245	250	255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
	260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
	275	280	285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
	290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
305	310	315	320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly
 450
 <210> 27
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成
 多肽"
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="NI-308.5J10可变轻链(VK)质粒(SDD 177)
 - N75D 突变"
 <400> 27
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Pro Arg Ser Leu Leu His Thr
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Gly Arg Thr Tyr Thr Ser Gly Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly
 450
 <210> 29
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成
 多肽"
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="NI-308.5J10-hIgG1可变重链(VH)质粒
 (SDD 174) - N54T突变"
 <400> 29
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Thr Tyr Thr Thr Gly Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

	100		105		110
Val	Trp Gly Pro Gly Thr Leu	Val	Thr Val Ser Ser Ala	Ser	Thr Lys
	115		120		125
Gly	Pro Ser Val Phe Pro Leu	Ala	Pro Ser Ser Lys	Ser	Thr Ser Gly
	130		135		140
Gly	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu	Val	Lys Asp Tyr Phe	Pro	Glu Pro
145		150		155	160
Val	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly	Ala	Leu Thr Ser Gly	Val	His Thr
	165		170		175
Phe	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser	Gly	Leu Tyr Ser Leu	Ser	Ser Val
	180		185		190
Val	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu	Gly	Thr Gln Thr Tyr	Ile	Cys Asn
	195		200		205
Val	Asn His Lys Pro Ser Asn Thr	Lys	Val Asp Lys Lys	Val	Glu Pro
210		215		220	
Lys	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr	Cys	Pro Pro Cys Pro	Ala	Pro Glu
225		230		235	240
Leu	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe	Leu	Phe Pro Pro Lys	Pro	Lys Asp
	245		250		255
Thr	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	Glu	Val Thr Cys Val	Val	Val Asp
	260		265		270
Val	Ser His Glu Asp Pro Glu Val	Lys	Phe Asn Trp Tyr	Val	Asp Gly
	275		280		285
Val	Glu Val His Asn Ala Lys Thr	Lys	Pro Arg Glu Glu	Gln	Tyr Asn
290		295		300	
Ser	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val	Leu	Thr Val Leu His	Gln	Asp Trp
305		310		315	320
Leu	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	Lys	Val Ser Asn Lys	Ala	Leu Pro
	325		330		335
Ala	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser	Lys	Ala Lys Gly Gln	Pro	Arg Glu
	340		345		350
Pro	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	Ser	Arg Asp Glu Leu	Thr	Lys Asn
	355		360		365
Gln	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	Lys	Gly Phe Tyr Pro	Ser	Asp Ile
370		375		380	
Ala	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	Gln	Pro Glu Asn Asn	Tyr	Lys Thr
385		390		395	400
Thr	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	Gly	Ser Phe Phe Leu	Tyr	Ser Lys
	405		410		415

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly
 450

<210> 31

<211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="NI-308.5J10-hIgG1可变重链(VH)质粒(SDD 176) - G55T突变"
 <400> 31
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Thr Tyr Thr Asn Thr Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro

210	215	220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
225	230	235
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
	245	250
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
	260	265
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
	275	280
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
305	310	315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
	325	330
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
	340	345
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn		
	355	360
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
370	375	380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
385	390	395
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
	405	410
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
	420	425
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
	435	440
		445
Ser Leu Ser Pro Gly		
450		
<210> 32		
<211> 233		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial sequence)		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"		

<220>

<221> 来源

<223> /注释="NI-308.5J10-Fab-6His可变重链(VH)质粒
(SDD 178)"

<400> 32

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	1		5				10				15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Tyr	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Asp	Tyr	20					25			30		
Tyr	Trp	Ser	Cys	Ile	Arg	Gln	Pro	Ala	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35					40			45		
Gly	Arg	Thr	Tyr	Thr	Asn	Gly	Lys	Thr	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	50					55			60		
Leu	Glu	Ser	Arg	Leu	Ser	Leu	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Met	Asn	Gln	Phe	65					70			75		80
Ser	Leu	Lys	Leu	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	85					90			95		
Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Ala	Val	Thr	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	100					105			110		
Val	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	115					120			125		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	130					135			140		
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	145					150			155		160
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	165					170			175		
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	180					185			190		
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	195					200			205		
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	210					215			220		
Lys	Ser	Cys	His	His	His	His	His	His	His							225					230					

<210> 33

<211> 233

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<220>

<221> 来源

<223> /注释=" NI-308.5J10-Fab-6His可变重链 (VH) 质粒 (SDD 179) - N54S突变"

<400> 33

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Tyr	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Asp	Tyr	20	25	30	
Tyr	Trp	Ser	Cys	Ile	Arg	Gln	Pro	Ala	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Arg	Thr	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys	Thr	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	50	55	60	
Leu	Glu	Ser	Arg	Leu	Ser	Leu	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Met	Asn	Gln	Phe	65	70	75	80
Ser	Leu	Lys	Leu	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	85	90	95	
Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Ala	Val	Thr	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	100	105	110	
Val	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	115	120	125	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	130	135	140	
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	145	150	155	160
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	165	170	175	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	180	185	190	
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	195	200	205	
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	210	215	220	
Lys	Ser	Cys	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	225	230		

<210> 34
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="NI-308.5J10-Fab-6His可变重链(VH)质粒(SDD 180) - N54T突变"
 <400> 34
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Thr Tyr Thr Thr Gly Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys His His His His His His
 225 230
 <210> 35
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成
 多肽"
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="NI-308.5J10-Fab-6His可变重链(VH)质粒
 (SDD 181) - G55S突变"
 <400> 35
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Thr Tyr Thr Asn Ser Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys His His His His His His
 225 230
 <210> 36
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成
 多肽"
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="NI-308.5J10-Fab-6His可变重链(VH)质粒
 (SDD 182) - G55T突变"
 <400> 36
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Tyr Thr Val Leu Gly Gly Ser Val Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Cys Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Thr Tyr Thr Asn Thr Lys Thr Thr Tyr Thr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Ser Ile Asp Thr Ser Met Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Trp Gly Ala Val Thr Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr																			
145						150					155								160
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro																			
						165					170								175
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val																			
						180					185								190
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser																			
						195					200								205
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile																			
						210					215								220
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val																			
225						230					235								240
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala																			
						245					250								255
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro																			
						260					265								270
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val																			
						275					280								285
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val																			
						290					295								300
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln																			
305						310					315								320
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln																			
						325					330								335
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala																			
						340					345								350
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro																			
						355					360								365
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr																			
						370					375								380
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser																			
385						390					395								400
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr																			
						405					410								415
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr																			
						420					425								430
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe																			
						435					440								445
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys																			

450	455	460
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
465	470	
<210> 38		
<211> 452		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial sequence)		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"		
<400> 38		
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn His		
	20	25
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Glu Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Ile		
	50	55
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr Leu Phe		
65	70	75
Leu Gln Met Tyr Ser Leu Thr Ala Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys		
	85	90
Ala Arg Gly Gly Arg Arg Gly His Phe Thr Ser Tyr Tyr Leu Asp Tyr		
	100	105
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
	115	120
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
	130	135
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
145	150	155
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
	165	170
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
	180	185
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
	195	200
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys		

210	215	220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
225	230	235
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		240
	245	250
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		255
	260	265
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		270
	275	280
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		285
290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
305	310	315
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
	325	330
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		335
	340	345
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
355	360	365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
370	375	380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
385	390	395
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
	405	410
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		415
	420	425
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
435	440	445
Leu Ser Pro Gly		
450		
<210> 39		
<211> 329		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"		

<400> 39

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<210> 40

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
 多肽"

<400> 40

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn His
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Glu Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Ile
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Phe Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Met Tyr Ser Leu Thr Ala Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Arg Arg Gly His Phe Thr Ser Tyr Tyr Leu Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 41

<211> 236

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
 多肽"

<400> 41

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1	5	10	15
Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser			
	20	25	30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser			
	35	40	45
Gln Asn Ile Asp Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Lys			
	50	55	60
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Ser Gly Val			
65	70	75	80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr			
	85	90	95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln			
	100	105	110
Ser Tyr Ser Ser Phe Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
	115	120	125
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
	130	135	140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
	165	170	175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
	180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
	195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
	210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230	235	
<210> 42			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (Artificial sequence)			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"			
<400> 42			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asp Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Phe Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 43
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成
 多肽"
 <400> 43
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

	20		25		30										
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
	35		40		45										
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
	50		55		60										
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
65			70		75									80	
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
			85		90									95	
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
	100		105												

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多肽"

<400> 44

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1			5				10							15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Asp	Lys	Tyr
			20				25							30	
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40							45	
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55							60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ser	Phe	Arg
					85					90				95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100							105					

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

1	5	10
---	---	----

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <400> 49
 Ala Ala Ser Ser Leu His Ser

1	5
---	---

 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成肽"
 <400> 50
 Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Phe Arg Thr

1	5
---	---

 <210> 51
 <211> 1416
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述:合成多核苷酸"
 <400> 51
 atgggttga gcctcatctt gctgtttctt gtcgctgttg ctacgcgtgt cctgtcgcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgta gtccagcctg ggaggtccct gagactgtcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac cttcagtaat catgctatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaagggggc tggagtgggt ggcagttata tcatatgatg gcgagaacac atattatgca 240
 gactccattg agggccgatt caccatttcc agagacaatt tcaagaacac actcttttcta 300
 caaatgtaca gcctgacagc tgatgacacg gctatgtact tctgtgcgag agggggccgt 360
 cgggggcact tcacctcata ctaccttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 420

tcctcggcta gtaccaagg cccatcgtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc 480
 tctgggggca cagcggcct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga acccgtgacg 540
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag 600
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt 720
 gagcccaaat cttgtgacaa gactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 780
 gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg 840
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 960
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1020
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtttccaac aaagcctcc cagccccat cgagaaaacc 1080
 atctccaaag ccaaaggca gccccagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg 1140
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1200
 gacatgcccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgctt 1260
 cccgtgttg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1320
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1380
 tacacgcaaa aaagcctctc cctgtctccc gttga 1416

<210> 52

<211> 1359

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多核苷酸"

<400> 52

cagggtcagc tgggtgagtc tgggggagc gtagtccagc ctgggaggtc cctgagactg 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aatcatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagt ggtggcagtt atatcatatg atggcgagaa cacatattat 180
 gcagactcca ttgagggcgg attcaccatt tccagagaca atttcaagaa cacactcttt 240
 ctacaaatgt acagcctgac agctgatgac acggctatgt acttctgtgc gagagggggc 300
 cgtcgggggc acttcacctc ataactactt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360
 gtctcctcgg ctagtaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420
 acctctgggg gcacagcggc cctgggetgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccctg 480
 acggtgtcgt ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc acacttccc ggctgtccta 540
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 660
 gttgagccca aatcttgtga caagactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 720
 ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc 780

cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc ttaggtcaag 840
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag 900
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960
 aatggcaagg agtacaagtg caaggtttcc acaaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1080
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200
 cctcccgtgt tggactccga cggctcctt ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1260
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320
 cactacacgc aaaaaagcct ctccctgtct cccggttga 1359

<210> 53

<211> 990

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多核苷酸"

<400> 53

gctagtacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccctg gacggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaagactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccgaccct 420
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc gcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ttggactccg acggtcctt cttctctac agcaagctca ccgtggacaa gacgaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg 960
 caaaaaagcc tctccctgtc tcccgttga 990

<210> 54

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多核苷酸"

<400> 54

```
cagggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtagtccagc ctgggaggtc cctgagactg 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aatcatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggcgagaa cacatattat 180
gcagactcca ttgagggccg attcaccatt tccagagaca atttcaagaa cacactcttt 240
ctacaaatgt acagcctgac agctgatgac acggctatgt acttctgtgc gagagggggc 300
cgtcgggggc acttcacetc ataactacett gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctcg 369
```

<210> 55

<211> 711

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多核苷酸"

<400> 55

```
atggacatgc ggggtgcccgc ccagctgctg ggctgctgc tgctgtggtt ccccggctct 60
agatgacgaca tccagatgac ccagctctcca tctcctctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagccagaac atagacaagt acttaaattg gtatcagcag 180
ataccgggga aagcccctaa gctcctgac tatgctgcat cgagtttgca cagtggggtc 240
ccatcaagggt tcagtggcag tggatctggg acagatttct ctctcacat cagcagtctg 300
caacctgaag attttgcaat ttactactgt caacagagtt acagttcctt ccggacgttc 360
ggccaagggga ccaagctgga gatcaaactg acgggtgctg caccatctgt cttcatcttc 420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480
ttctatccca gagaggcca agtacagtg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
cagggcctga gttcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgttg a 711
```

<210> 56

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多核苷酸"

<400> 56

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagcca gaacatagac aagtacttaa attggtatca gcagataccg 120
gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatcgagtt tgcacagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttctctctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caatttacta ctgtcaacag agttacagtt cttccggac gttcggccaa 300
gggaccaagc tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcaagtcac ccatcagggc 600
ctgagttcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttga 645
```

<210> 57

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多核苷酸"

<400> 57

```
cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagttcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg ttga 324
```

<210> 58

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成多核苷酸"

<400> 58

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagcca gaacatagac aagtacttaa attggtatca gcagataccg 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatcgagtt tgcacagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttctctctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caatttacta ctgtcaacag agttacagtt ccttccggac gttcggccaa 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 59

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 59

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg

1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 60

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成肽"

<400> 60

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys

20

<210> 61

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成二肽重复序列蛋白 (GA) 15"

<400> 61

Cys His His His His His His Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly

1 5 10 15

Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly

 20 25 30

Ala Gly Ala Gly Ala

35

<210> 62

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成

二肽重复序列蛋白 (GP) 15"

<400> 62

Cys Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly

1 5 10 15

Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro

 20 25 30

<210> 63

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成

二肽重复序列蛋白 (GR) 15"

<400> 63

Cys Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly

1 5 10 15

Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg

 20 25 30

<210> 64

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成

二肽重复序列蛋白 (PA) 15"

<400> 64

Cys Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala
 20 25 30

<210> 65

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成

二肽重复序列蛋白 (PR) 15"

<400> 65

Cys Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro
 1 5 10 15
 Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg
 20 25 30

<210> 66

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成

二肽重复序列蛋白肽GA"

<400> 66

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
 20 25 30

<210> 67

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成

二肽重复序列蛋白肽PR"

<400> 70

Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg

1 5 10 15

Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Arg

 20 25 30

<210> 71

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成

二肽重复序列蛋白 (GA) 20"

<400> 71

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala

1 5 10 15

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala

 20 25 30

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala His His His His His His

 35 40 45

<210> 72

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成

二肽重复序列蛋白 (GA) 10"

<400> 72

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala

1 5 10 15

Gly Ala Gly Ala His His His His His His

 20 25

<210> 73

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
二肽重复序列蛋白 (GA) 6"

<400> 73

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala His His His His
1 5 10 15
His His

<210> 74

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
二肽重复序列蛋白 (GA) 5"

<400> 74

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala His His His His His His
1 5 10 15

<210> 75

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
二肽重复序列蛋白 (GA) 4"

<400> 75

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala His His His His His His
1 5 10

<210> 76

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成
二肽重复序列蛋白 (GA) 3"

<400> 76

(A) NI-308.5J10 VH (可变重链序列VH) (SEQ ID NO: 2)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTYTVLGGSVSDYYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTNGKTTYTN
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
PSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSVTAADTAVYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGTLVTVSS

NI-308.5J10 VK (可变轻链序列VK) (SEQ ID NO: 7)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EIVLTQSPLSLSVTPGEPASISCRSPRSLLHTNGYTYLDWYLQRPQGSPQLLIFLASNRAS
 FR3-----CDR3-----FR4-----
 GVPDRFSGSGSGTNFTLRISGVEADDVGVYYCMQGLQPSWTFGQGTKVEIK

(B) NI-308.5J10 VH N54S (可变重链序列VH N54S) (SEQ ID NO: 12)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTYTVLGGSVSDYYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTSGKTTYTN
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
PSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSVTAADTAVYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGTLVTVSS

(C) NI-308.5J10 VH N54T (可变重链序列VH N54T) (SEQ ID NO: 15)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTYTVLGGSVSDYYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTGKTTYTN
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
PSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSVTAADTAVYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGTLVTVSS

(D) NI-308.5J10 VH G55S (可变重链序列VH G55S) (SEQ ID NO: 18)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTYTVLGGSVSDYYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTNSKTTYTN
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
PSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSVTAADTAVYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGTLVTVSS

(E) NI-308.5J10 VH G55T (可变重链序列VH G55T) (SEQ ID NO: 21)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTYTVLGGSVSDYYWSCIRQPAGKGLEWIGRTYTNTKTTYTN
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
PSLESRLSLSIDTSMNQFSLKLTSVTAADTAVYYCARWGAVTGDYYYGMDVWGPGTLVTVSS

(F) NI-308.5J10 VK N75D (可变轻链序列VK N75D) (SEQ ID NO: 24)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EIVLTQSPLSLSVTPGEPASISCRSPRSLLHTNGYTYLDWYLQRPQGSPQLLIFLASNRAS
 FR3-----CDR3-----FR4-----
 GVPDRFSGSGSGTDFTLRISGVEADDVGVYYCMQGLQPSWTFGQGTKVEIK

图1

NI-308.5J10

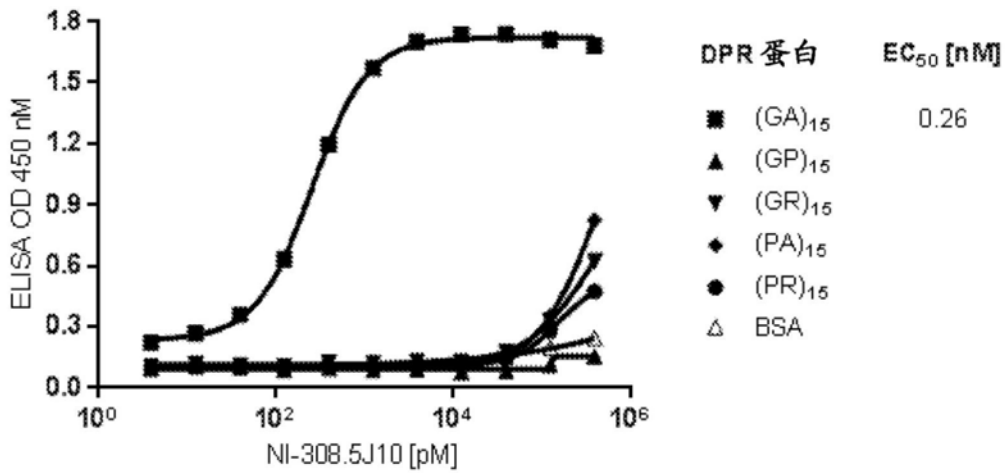


图2

NI-308.5J10

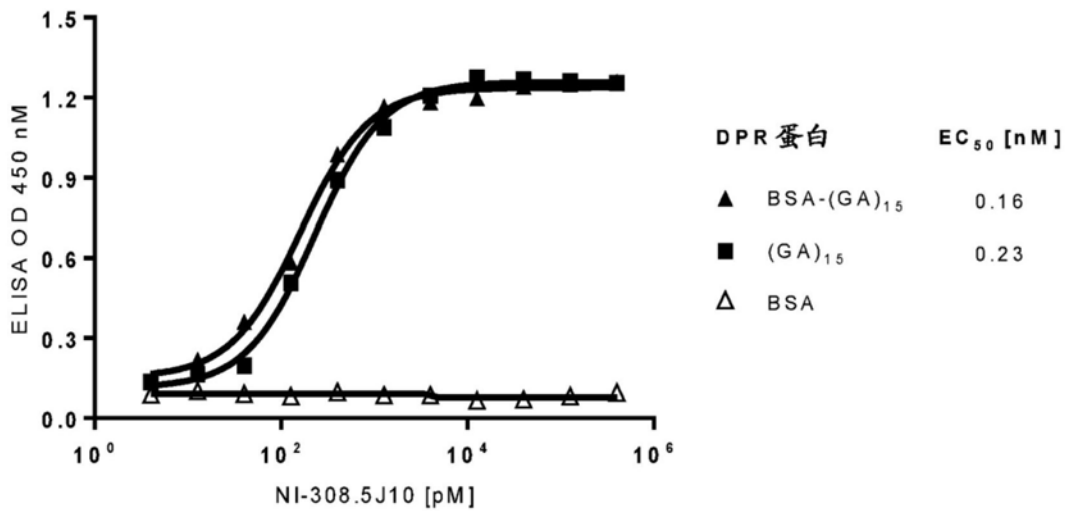


图3

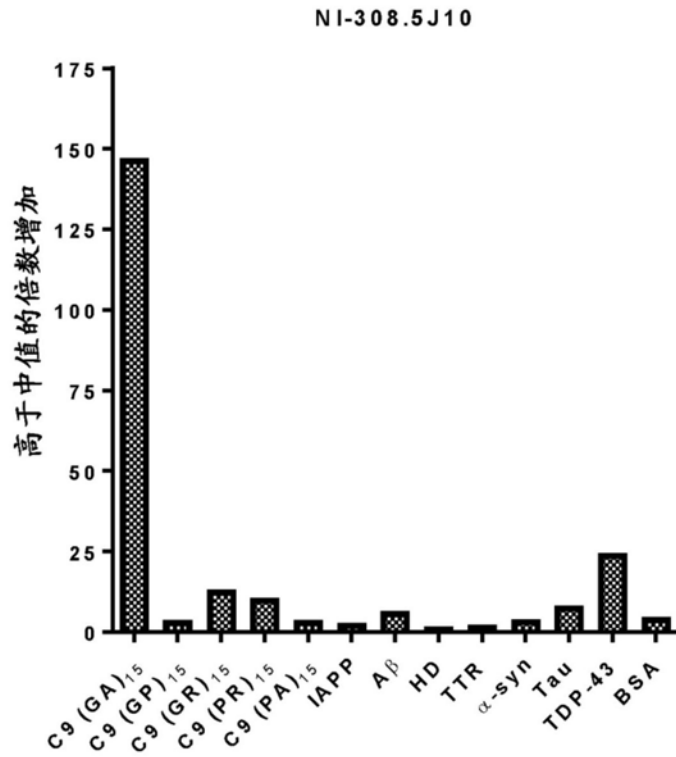


图4

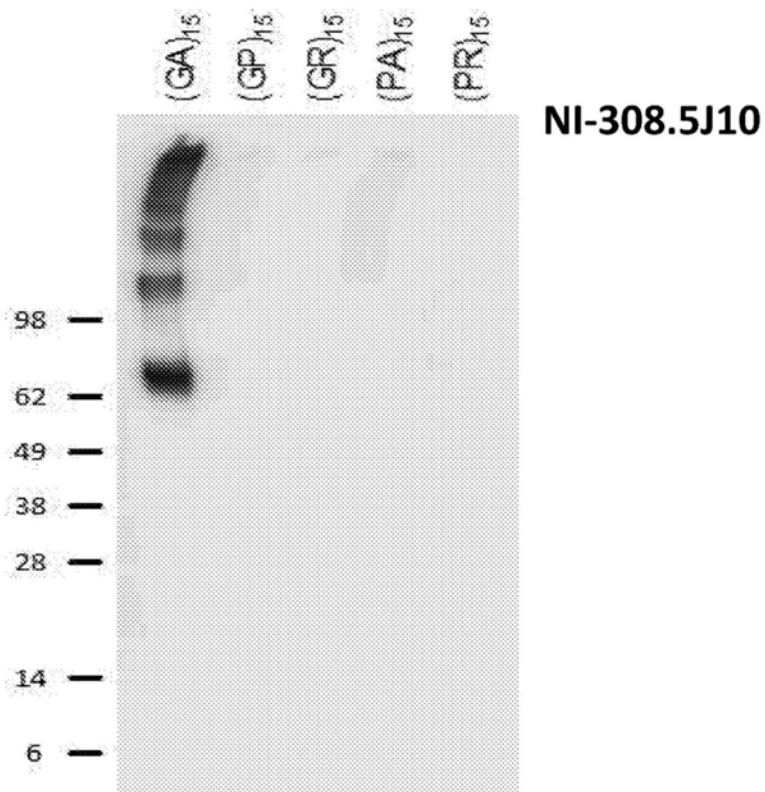


图5

NI-308.5J10

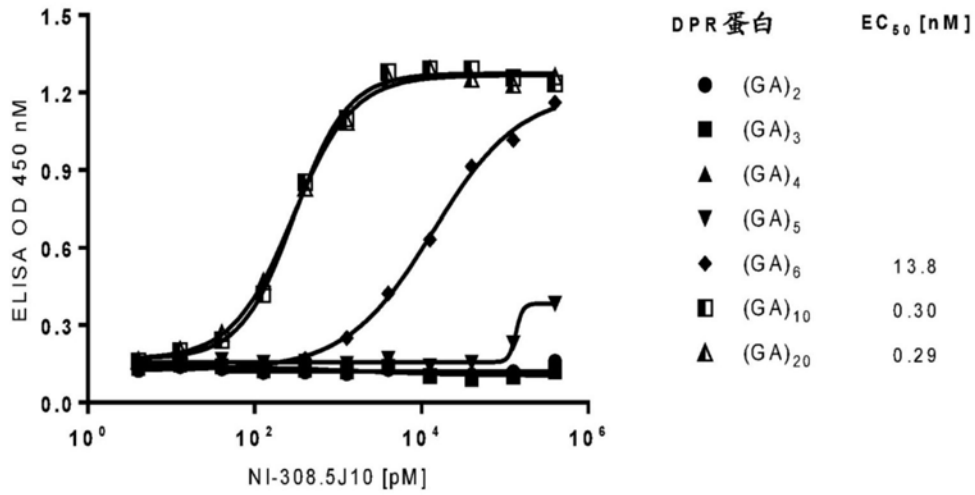
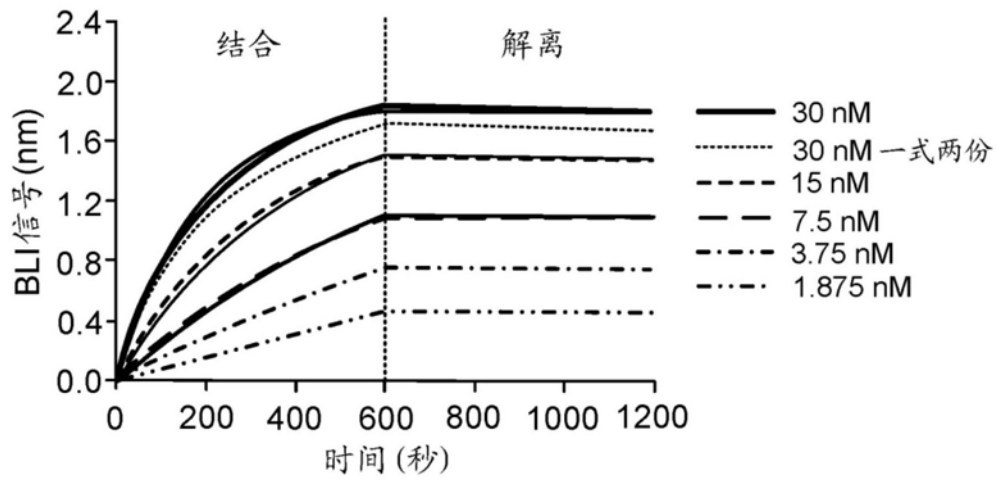


图6

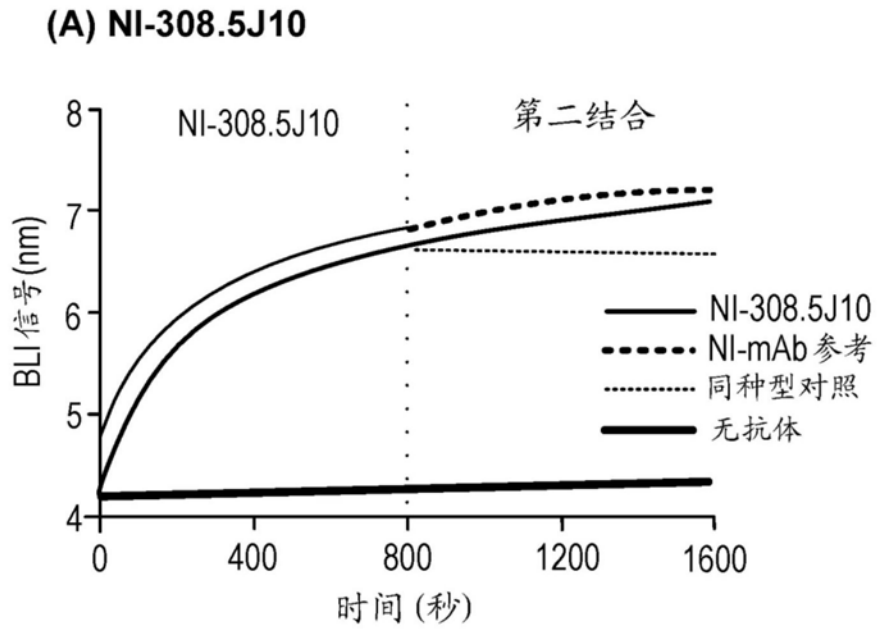
NI-308.5J10

NI-308.5J10



抗体	K _D (M)	SD	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	SD	k _d (s ⁻¹)	SD
NI.308.5J10	1.5E-10	2E-11	1.63E+05	5E+03	2.4E-05	4E-06

图7



(B) NI-mAb 参考

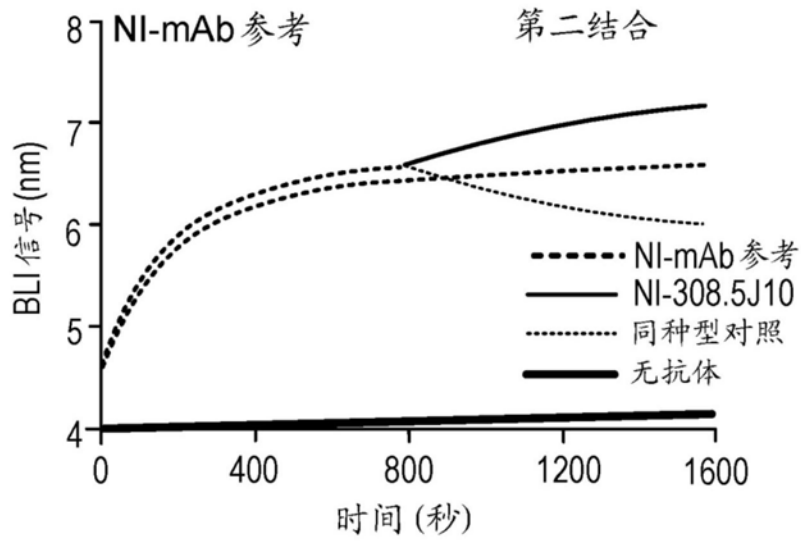


图8

NI-308.5J10

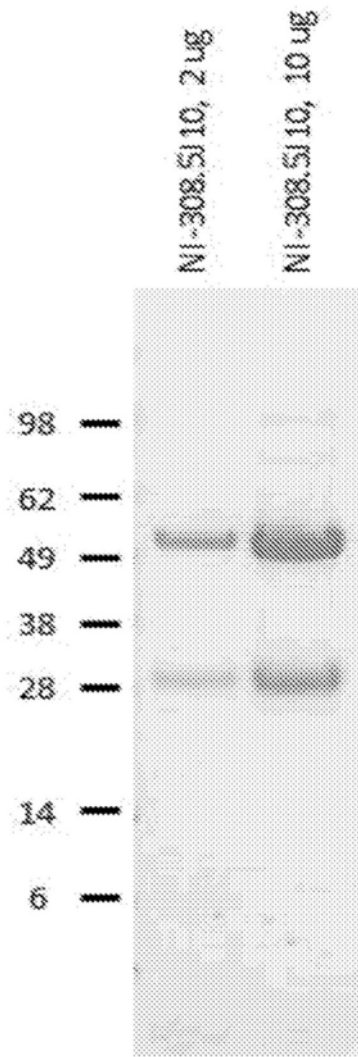


图9

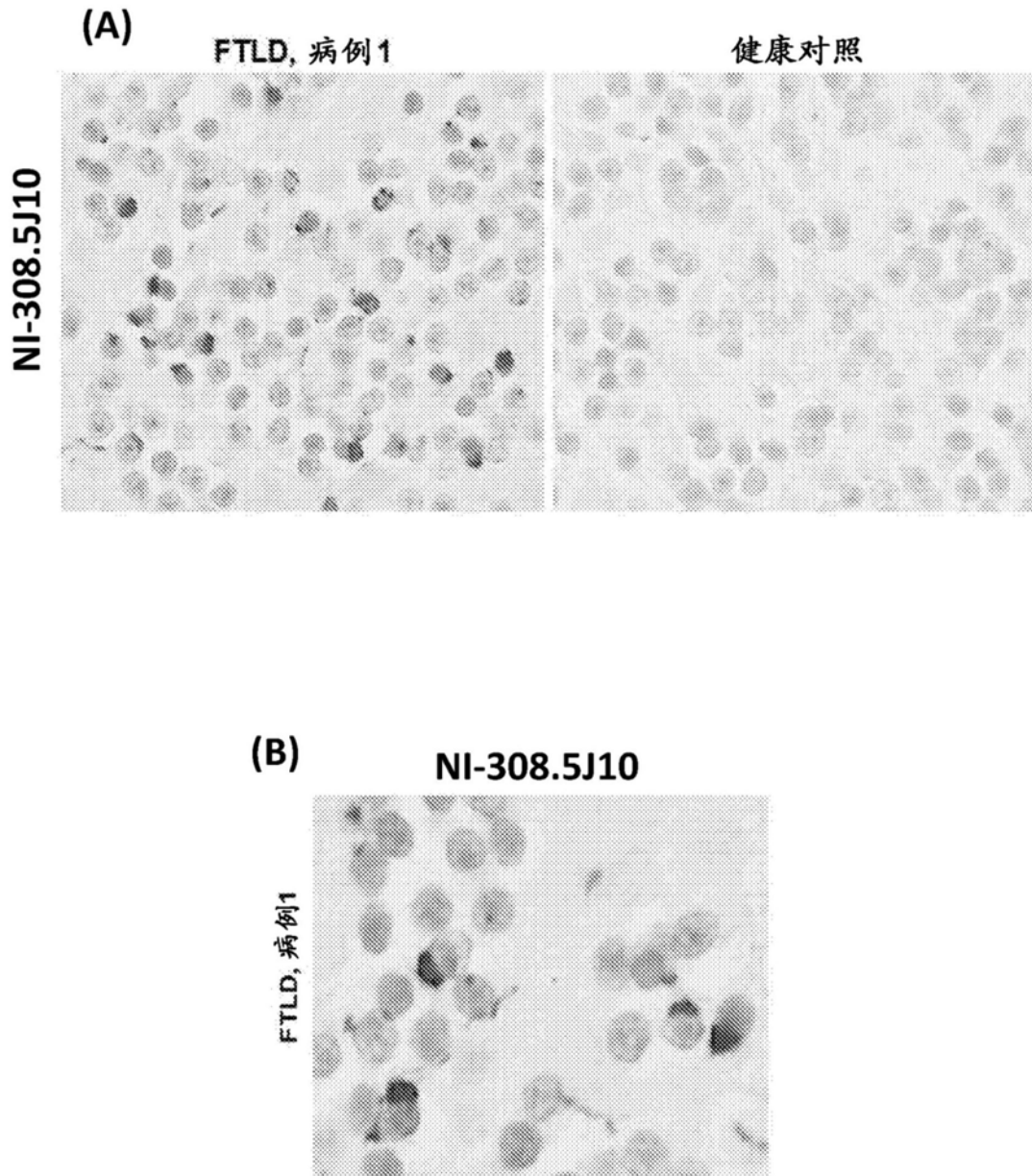


图10

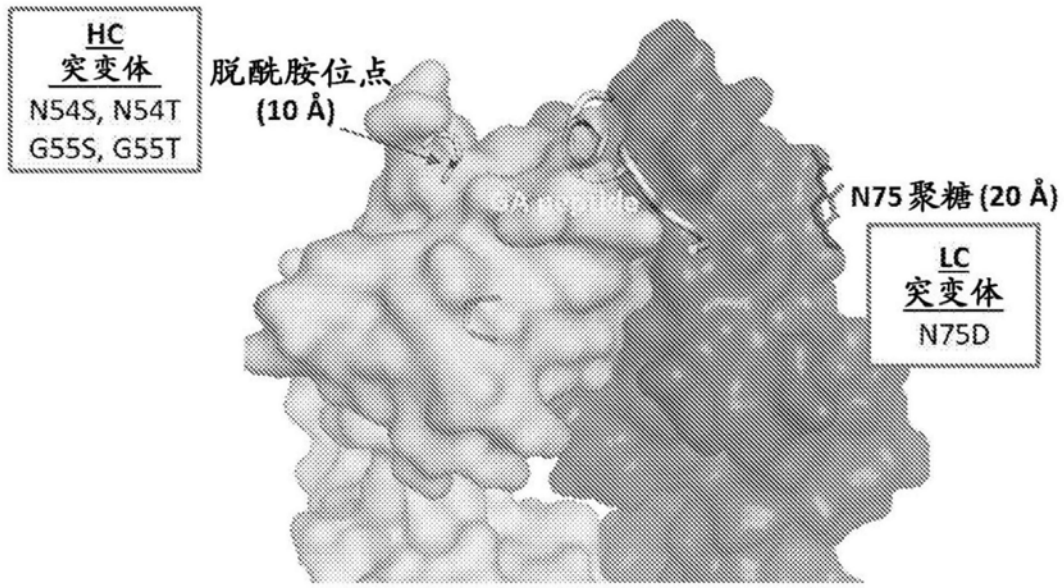


图11

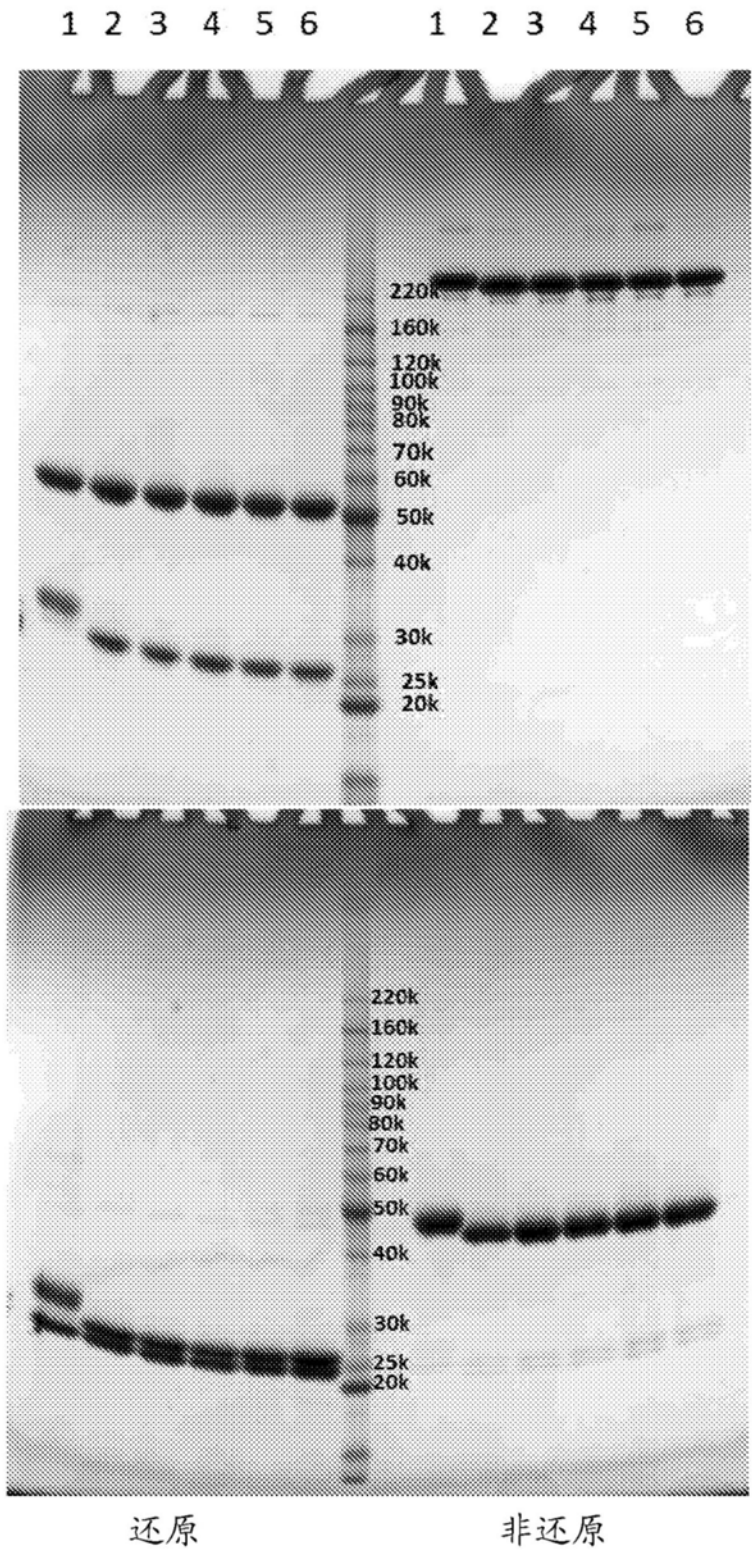


图12

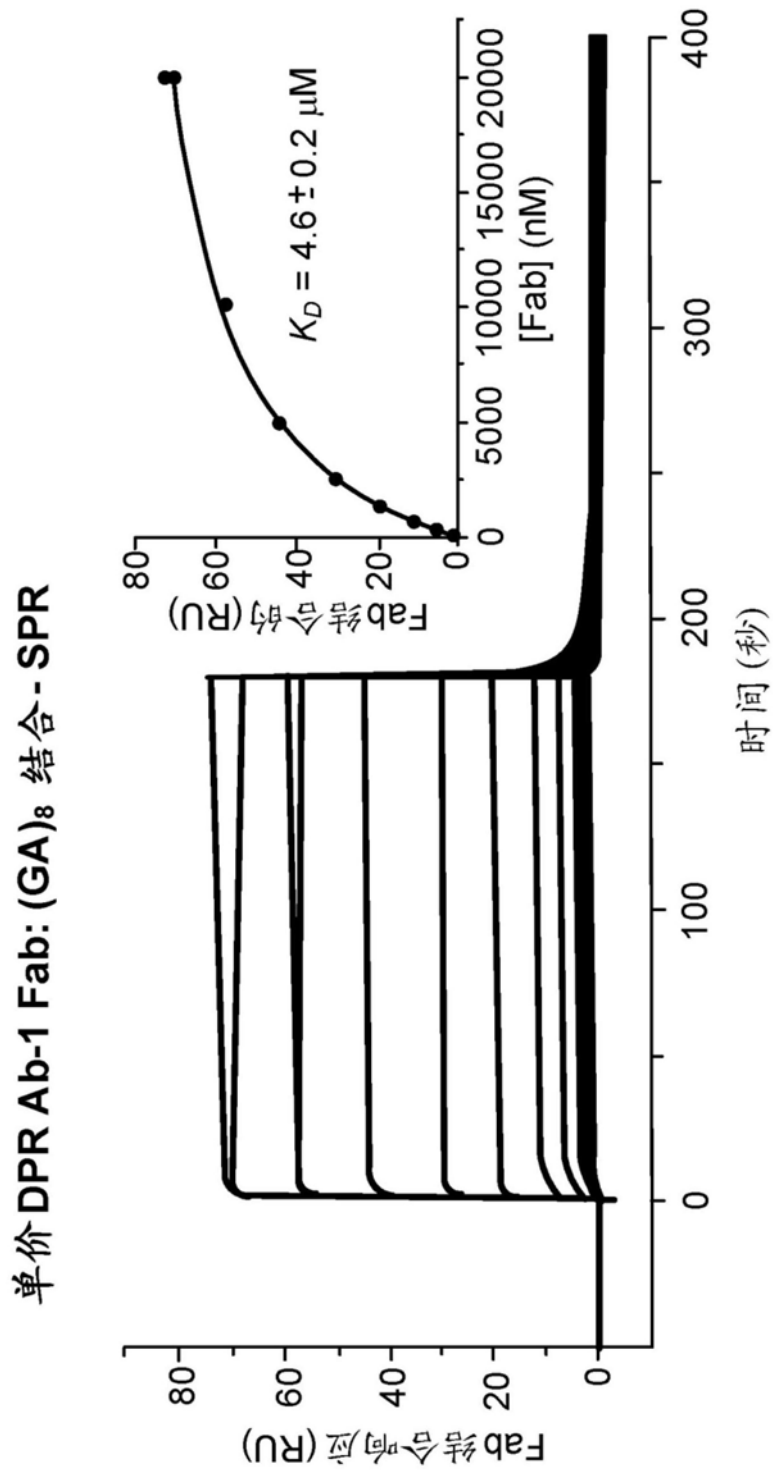


图13A

晶体结构: DPR Ab-1 Fab-GA

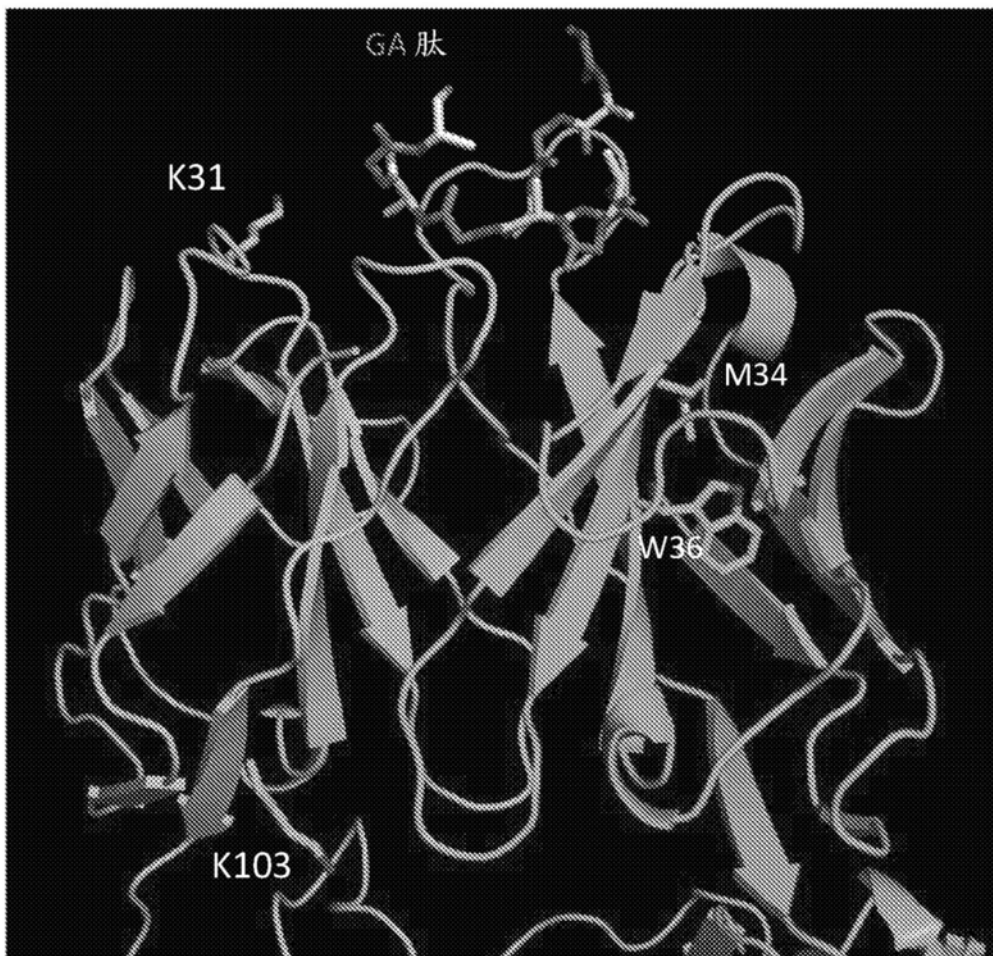
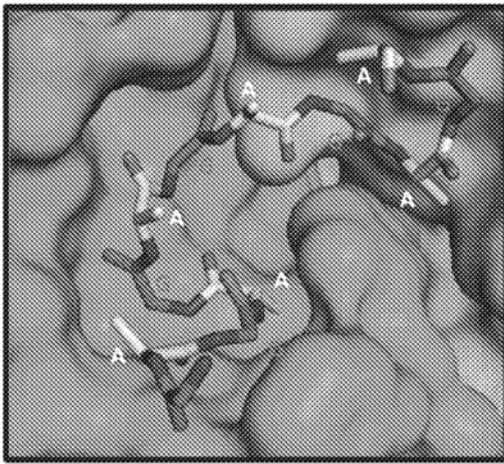


图13B